

**Zur Struktur und Funktion der
Typ-3-Kupferproteine
sowie der
Lichtsammlerkomplexe
LHCI und LHCII**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Thorsten Schweikardt
geb. am 01.09.1975
in Ingelheim am Rhein

Mainz, den 21.04.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2008

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

“We shall not cease from exploration.
And the end of all our exploring will be
to arrive where we started, and know
the place for the first time.”

T.S. Eliot, Little Gidding

Anmerkungen

Diese Dissertation hat kumulativen Charakter und beinhaltet die folgenden sechs Veröffentlichungen, die in Kapitel 4 aufgeführt sind.

Schweikardt et al., 2007 (Publikation 1)

Decker et al., 2007 (Publikation 2)

Corbet et al., 2007 (Publikation 3)

Decker et al., 2006 (Publikation 4)

Jeschke et al., 2005 (Publikation 5)

Schweikardt et al., 2004 (Publikation 6)

Über die Publikationen zum Thema „Tyrosinasen“ hinausgehende Resultate sind im Kapitel 5 aufgeführt und diskutiert. Eine detaillierte Übersicht der geleisteten Beiträge zu jeder einzelnen Publikation ist im Anhang in Kapitel 10.4 dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	8
1.1.	Proteine: Struktur und Evolution	8
1.2.	Die Grenzen experimenteller Strukturaufklärung	10
1.3.	Bioinformatische Methoden der Strukturvorhersage	11
1.4.	Zielsetzung	14
2.	Proteine	15
2.1.	Die Familie der Typ-3-Kupferproteine	15
2.1.1.	Klassifikation.....	15
2.1.2.	Das aktive Zentrum der Typ-3-Kupferproteine	17
2.1.3.	Modellkomplexe für das Kupferzentrum	19
2.1.4.	Spektroskopische Eigenschaften des Typ-3-Kupferzentrums	20
2.1.5.	Die Terminologie der Phenoloxidase-Aktivität.....	21
2.1.6.	Die Arthropoden- und Mollusken-Hämocyane	22
2.1.6.1.	Das <i>CuB</i> -Zentrum	23
2.1.6.2.	Das <i>CuA</i> -Zentrum	25
2.1.7.	Die Domänenstruktur der Typ-3-Kupferproteine	25
2.1.8.	Die Quartärstruktur der Typ-3-Kupferproteine	27
2.2.	Lichtsammlerkomplexe (Light Harvesting Complex, LHC).....	28
2.2.1.	Struktur der Monomere.....	28
2.2.2.	Quartärstruktur der Lichtsammlerkomplexe	29
2.2.2.1.	LHCII	30
2.2.2.2.	LHCI-730.....	30
2.2.3.	Beteiligung der Lichtsammlerkomplexe an regulatorischen Prozessen	32
3.	Methoden.....	33
3.1.	Homologie-Modellierung mit MODELLER.....	33
3.1.1.	Funktionsweise von MODELLER	33
3.1.2.	Die Evaluation der Homologie-Modelle	41
3.1.3.	Informationsgehalt von Homologie-Modellen	43
3.2.	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	45
3.2.1.	Probleme der TEM	45
3.2.2.	Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (cryoTEM)	46
3.2.3.	Probleme der Cryo-TEM und der Einzelpartikelanalyse.....	46
3.3.	Verbesserungen von Programmen	51
4.	Veröffentlichungen.....	53
5.	Weiterführende Analysen im Bereich „Tyrosinasen“	67
5.1.	Forschung an Tyrosinasen.....	67

5.2. Bakterielle Tyrosinase	68
5.2.1. Die möglichen Aufgaben der bakteriellen Tyrosinase	68
5.2.2. Modellierung der bakteriellen Tyrosinase	68
5.2.2.1. Identifikation der besten Vorlagenstruktur	69
5.2.2.2. Iteratives Alignment, Modellierung und Evaluation der Modelle	69
5.2.2.3. Erkenntnisse aus dem Alignment	70
5.2.2.4. Erkenntnisse aus dem Homologiemodell	72
5.2.3. Vergleich des Homologiemodells mit der Röntgenstruktur	75
5.2.4. Analyse der Röntgenstruktur der bakteriellen Tyrosinase	78
5.2.4.1. Die Met-Form der Tyrosinase	79
5.2.4.2. Zugang zu den Kupferzentren	79
5.2.4.3. Bindungslängen im aktiven Zentrum	82
5.2.4.4. Geometrie des aktiven Zentrums	83
5.2.4.5. Beweglichkeit des His54 in den Röntgenstrukturen der Tyrosinase	85
5.2.4.6. Die Rolle des His54 beim Kupferimport ins aktive Zentrum	88
5.2.4.7. Kupfereinbau in die Tyrosinase durch das Caddieprotein	90
5.2.4.8. Das Caddieprotein als Faltungshelfer?	92
5.2.4.9. Zusammenfassung und Ausblick	94
5.3. Maus-Tyrosinase	95
5.3.1. Das Pigmentierungssystem der Säugetiere	95
5.3.2. Modellierung der Maustyrosinase	98
5.3.2.1. Sequenzalignment	100
5.3.3. Mutagenese der Maustyrosinase	103
5.3.4. Analyse und Evaluation der Strukturmodelle	107
5.3.4.1. Das aktive Zentrum und seine Umgebung	107
5.3.4.2. Die Thioether-Brücke	109
5.3.4.3. Strukturelle Grundlagen für das Verhalten der Doppel-Mutation	110
5.3.4.4. Die Mutation M374G	112
5.3.4.5. Die Mutation S375G	112
5.3.5. Analyse bekannter Mutationen am Homologie-Modell	113
5.3.5.1. Die Mutation S380P	113
5.3.5.2. Die Mutation V393F	115
5.3.6. Zusammenfassung	116
6. Weitere Projekte	117
6.1. Rekonstruktion <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase	117
6.1.1. Probenpräparation	117
6.1.2. Elektronenmikroskopie	117

6.1.3. Rekonstruktion der Proteinstruktur	117
6.1.4. Auflösungsbestimmung	121
6.1.5. Zusammenfassung und Ausblick.....	122
6.2. Modellierung des <i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanins zur Verwendung in der EM-Rekonstruktion	124
6.2.1. Experimentelle Prozeduren	125
6.2.2. Lösungsansätze für die experimentellen Probleme.....	126
6.2.3. Ergebnisse.....	128
6.3. Modellierung des <i>Drosophila melanogaster</i> LSP-2 zur Verwendung in der EM-Rekonstruktion	129
6.3.1. Zielsetzung	129
6.3.2. Alignment und Modellierung	129
6.3.3. Diskussion	132
7. Ausblick	133
8. Zusammenfassung	134
9. Literatur	135
10. Anhang	153
10.1. Abkürzungen	153
10.2. Artnamen.....	154
10.3. Abbildungsverzeichnis	155
10.4. Beiträge zu den Publikationen	159
10.5. Weitere Veröffentlichungen.....	161
10.5.1. Originalarbeiten	161
10.5.2. Illustrationen in Veröffentlichungen	161
10.5.3. Grafiken, Animationen und Druckerzeugnisse	162
10.5.4. Tagungsbeiträge, Vorträge und Poster	162
10.5.4.1. Vorträge auf Einladung	162
10.5.4.2. Poster und Vorträge	163
10.5.5. Danksagungen in Veröffentlichungen.....	164
10.6. Danksagungen	165
10.7. Erklärung	167
10.8. Lebenslauf.....	168

1. Einleitung

„Die Form folgt der Funktion“ – ein Grundsatz aus dem Bereich Design und Architektur des amerikanischen Architekten Louis Sullivan (Sullivan 1896), den die Natur seit Urzeiten befolgt – auch und gerade bei den kleinsten Bausteinen und Funktionsträgern des Lebens, den Proteinen. Genau wie Louis Sullivan interpretiert die Natur diesen Leitsatz nicht nur als den Verzicht auf unnötigen Ballast im engeren Sinne, sondern auch im weiteren Sinne als Anpassung an das Bestehende. Proteine sind die Grundlage für alle Prozesse, die in der Zelle ablaufen. Sie bilden das Zellskelett und geben Form, sie stellen die Nährstoffaufnahme und Energieversorgung sicher, entgiften die Zelle, transportieren Stoffe, versorgen in höher organisierten Lebewesen alle Zellen mit Sauerstoff, schützen vor Krankheitserregern, ermöglichen kognitive Leistungen und sorgen für die Replikation der Erbinformation, ohne die es keinen Fortbestand der Spezies gäbe – alles vollkommen unterschiedliche Aufgaben. Woher kommt diese Vielfalt?

1.1. Proteine: Struktur und Evolution

Obwohl es nur 20 Aminosäuren gibt, ist durch die Kombinatorik die Anzahl der möglichen Funktionen unendlich. Die Natur – oder besser gesagt die Evolution – ist bei der Entwicklung von Proteinen und deren Funktionen sowohl effizient als auch radikal zugleich. Ist ein Funktionskonzept erfolgreich, dann wird es beibehalten und weiterentwickelt, auch hin zu neuen, vielleicht vollständig anderen Funktionen; erniedrigt es die Anpassungsfähigkeit eines Organismus an seine Umwelt, verschwindet es umgehend durch negative Selektion. Ein Hämoglobinmolekül, das durch eine Mutation keinen Sauerstoff mehr binden kann, ist hierfür ein gutes Beispiel. Denn ein Organismus, der von einer solchen Mutation betroffen ist, wird nie die Möglichkeit haben, seine Gene weiterzugeben. Ein Organismus, dessen Proteinfunktionen unabhängiger von der Umgebungstemperatur sind, wird in Lebensbereiche vordringen, die seinen Artgenossen verschlossen bleiben. Er wird neue Nahrungsquellen erschließen können und vielleicht auch die Möglichkeit haben, bedrohlichen Jägern auszuweichen – kurzum, er erhöht durch seine Anpassungsfähigkeit seine Überlebenschancen.

All dies wird durch die Proteine und die sie kodierenden Gene gesteuert. Was die Aufklärung von Genomen, also die Gesamtheit der Gene eines Organismus, angeht, macht die Wissenschaft in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte. Diverse Genomprojekte führten zu einer Flut an Sequenzen – eine Informationsmenge, die die in derselben Zeit gewonnenen Informationen über Proteinstrukturen um ein Vielfaches übertrifft. Im Januar 2008 enthielten die drei weltweit größten Datenbanken NCMI, EMBL und DDBJ etwa 80 Millionen Gene aus 260.000 Organismen (Benson et al. 2008). Insgesamt sind Genome von 940 Bakterien, 48 Archaeobakterien und 162 Eukaryonten aufgeklärt (Stand: März 2008, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi, siehe Abbildung 1).

Auch das Wissen um Proteinstrukturen hat in den letzten Jahren zugenommen, aber verglichen mit etwa 47.000 Proteinen, deren Struktur in der RCSB/PDB-Datenbank vorliegt,

(http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html) erscheint die Zahl der bekannten Gene riesig: Es ist mehr als das 1600-fache, siehe Abbildung 2.

Der Hauptgrund für diese Diskrepanz liegt darin, daß die Proteinstrukturaufklärung sehr viel komplexer ist als die Genom-Analyse. Genstrukturen, im Sinne der reinen Abfolge der Basenpaare, können viel schneller aufgeklärt werden als dreidimensionale Proteinstrukturen, weil die experimentellen Methoden zur Strukturaufklärung, wie im folgenden Abschnitt diskutiert, mit mehr Problemen zu kämpfen haben.

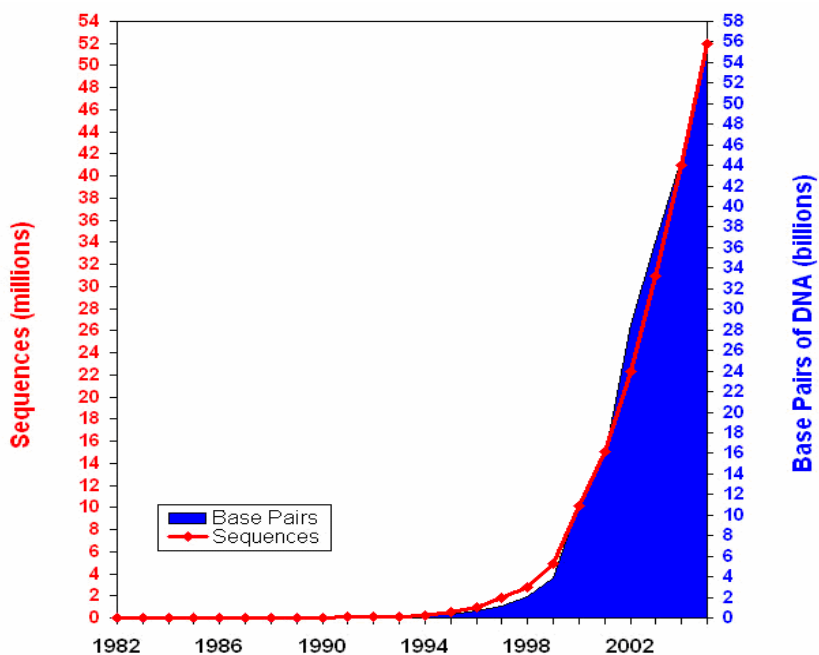


Abbildung 1: Anzahl der bekannten Gene in der Datenbank GenBank,
Grafik aus (Benson et al. 2005, 2008).

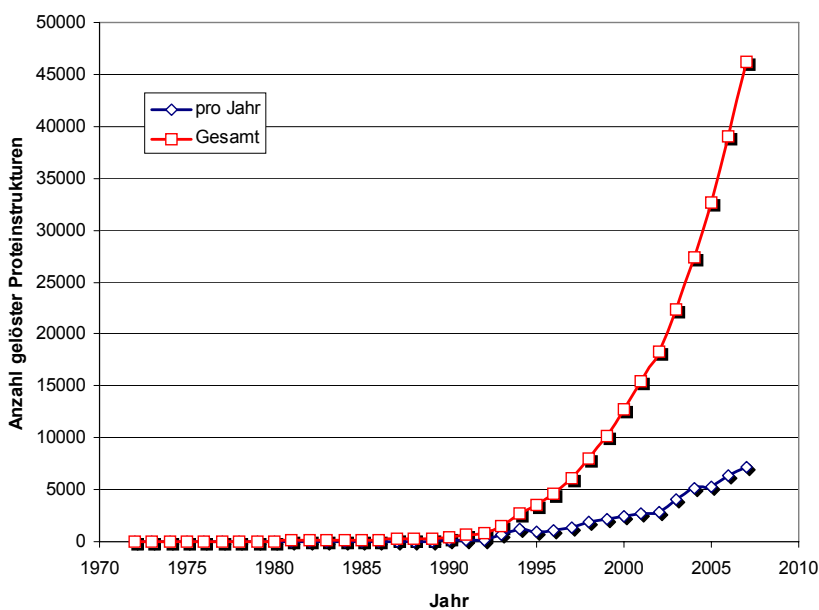


Abbildung 2: Anzahl der gelösten Proteinstrukturen in der Protein Datenbank PDB
Grafik aus (Berman 2008).

1.2. Die Grenzen experimenteller Strukturaufklärung

Die experimentellen Methoden zur Strukturanalyse sind normalerweise sehr komplex und zeitaufwendig. Die meistgenutzten Methoden sind die NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanz, engl. Nuclear magnetic resonance (NMR)) und die Röntgenstrukturanalyse oder Röntgenkristallographie. Sie erreichen beide atomare Auflösung.

Die Kernspinresonanz benutzt ein oszillierendes Magnetfeld, um Atomkerne, die sich in einem statischen Magnetfeld befinden, anzuregen (Hornak 2006).

Die Anregung ist nur in Kernen möglich, die einen Netto-Spin aufweisen. Dies ist z.B. bei ^1H , ^{15}N , ^{13}C oder ^{31}P der Fall, da die Kernresonanz nur bei ungeradzahlicher Kernladungszahl auftritt. Diese Atomkerne erzeugen dann ein Signal, das zur Strukturaufklärung benutzt werden kann.

Zur Analyse muß das Protein in hochreiner Form und einer stark konzentrierten Lösung vorliegen. Das Protein muß, wenn man nicht nur NMR an Protonen betreiben will, rekombinant unter Zugabe von ^{13}C , ^{15}N - und ^{31}P -Isotopen hergestellt werden. Dies bringt das Problem mit sich, mit radioaktiven Proben arbeiten zu müssen. Neben der aufwendigen Herstellung gereinigter Proteine erweist sich die Analyse der gerade bei größeren Proteinen sehr komplexen Kernresonanzspektren als größtes Problem. Die Signale haben eine spezifische Breite, die sich auch durch Verbesserungen der Apparaturen nicht erniedrigen lässt. Dies stellt ein prinzipielles Problem bei der Auflösung dar, da sich manche Signale nicht mehr vollständig voneinander trennen lassen (Hornak 2006).

Die maximale Größe eines mit NMR aufgenommenen Proteins, das man in den frei zugänglichen Datenbanken finden kann, liegt auch heute bei etwa 91 kDa. Dabei handelt es sich um die *Escherichia coli* Transhydrogenase – ein Heterotrimer, das 2005 gelöst wurde (PDB: 2BRU). Das zweitgrößte Protein war ein maltosebindendes Protein mit 40 kDa, gelöst 2000 (PDB: 1EZO). Allerdings gab es schon 2002 wegweisende Experimente aus der Gruppe um Prof. Wüthrich. Der Gruppe gelang es, einen 900 kDa großen GroEL/ES-Komplex zu lösen (Fiaux et al. 2002). Im selben Jahr erhielt Prof. Wüthrich für die Entwicklung der NMR-Methode den Nobelpreis für Chemie. Es gibt also vielversprechende Fortschritte, was die maximale Größe eines zu untersuchenden Proteins angeht.

Die Röntgenstrukturanalyse unterliegt nicht den gleichen Größenbeschränkungen wie die NMR. Die größten mit Hilfe dieser Methode gelösten Strukturen haben Molekulargewichte im Bereich mehrerer Millionen Dalton, wie z.B. Teile von ribosomalen Untereinheiten des Archaeobakteriums *Haloarcula marismortui* (Ban et al. 2000). Nachteil dieser Methode ist, daß man Proteinkristalle benötigt, deren Herstellung Monate oder gar Jahre in Anspruch nehmen kann, da die Bedingungen, unter denen Proteine kristallisieren, sehr unterschiedlich und oft nur sehr schwer zu finden sind. An der Kristallisation von Ribosomen wurde beispielsweise über 20 Jahre lang gearbeitet. Es gibt unzählige Faktoren, die Auswirkungen auf die Größe und Güte der Kristalle haben. Weiterhin sind manche Proteine, vor allem Membranproteine, äußerst schwierig zu kristallisieren (Abola et al. 2000).

Die Streuexperimente selbst erfordern einen hohen apparativen Aufwand und experimentelles Geschick. So müssen die Kristalle während des Versuchs mit einem Stickstoffstrom tiefgekühlt werden, um die durch den Röntgenstrahl induzierten Schäden an der Struktur möglichst gering zu halten, und oft ist nur Synchrotronstrahlung stark genug, um

eine genügend hohe Auflösung zu gewährleisten und die Aufnahmezeit möglichst niedrig zu halten (Uson und Sheldrick 1999).

Man erhält ein Diffraktionsbild, das mittels Fourieranalyse in die dreidimensionale Elektronendichtekarte des Moleküls umgerechnet werden kann. Dies ist aber nur möglich, wenn es gelingt, die Phasen der Röntgenstrahlen zu ermitteln. Diese gehen beim Auftreffen auf dem Röntgenfilm oder den CCD-Sensor verloren. Um eine interpretierbare Elektronendichtekarte eines Proteins zu berechnen, sind aber sowohl die Intensitäten als auch die Phasen der Röntgenstrahlen nötig (das sogenannte „Phasenproblem“). Zur Ermittlung der Phasen bedient man sich verschiedenster Methoden, die immer präziser werden (Kalugin 2001; Terwilliger, T. C. 2001; Strub et al. 2003; Xu und Hauptman 2004; Dauter und Dauter 2007). Die Tatsache, daß die Moleküle in einem Kristallgitter angeordnet sind, kann zu einer strukturellen Veränderung und somit zu Strukturartefakten führen: An den Stellen, an denen sich Moleküle im Kristall näher kommen als in der Lösung, muß mit Deformationen gerechnet werden. Sind diese Deformationen, die ein Protein eingehen muß, um in ein Kristallgitter eingebaut zu werden, zu groß, führt das zu einem sehr instabilen oder ungeordneten Kristall oder die Kristallbildung wird gänzlich unterbunden. Man kann aber durch das entsprechende Design von Proteinen – sprich: durch gerichtete Mutationen – die Kristallbildung fördern (Yamada et al. 2007). In den letzten Jahren gab es bedeutende Fortschritte, was die Kristallisationstechniken (Yadav et al. 2005; McPherson et al. 2007; Chayen und Saridakis 2008) und die Automatisierung der Kristallisation angeht (Pusey et al. 2005; Hiraki et al. 2006; Goldschmidt et al. 2007)

1.3. Bioinformatische Methoden der Strukturvorhersage

Die theoretischen Methoden, eine Proteinstruktur vorherzusagen, sind vielfältig. Sie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Rein physikalische Ansätze und empirische Methoden.

Die *rein physikalischen Methoden*, auch *ab initio*-Modellierung oder *Proteinfaltung* genannt, basieren auf den Wechselwirkungen zwischen Atomen und molekulardynamischen Berechnungen, Kraftfeldberechnungen sowie der Energieminimierung (Cohen et al. 1989; Wilson und Doniach 1989). Die einzige Eingabe in die Programme ist die Sequenz der Proteine. Das Protein faltet sich in einer definierten Umgebung, entweder im Vakuum oder mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen. Die Einbeziehung der Lösungsmittelmoleküle macht die Moleküldynamik natürlich realitätsnäher, aber auch sehr viel rechenintensiver, da die Anzahl der Freiheitsgrade um etwa 1000 zunimmt (Scheraga et al. 2007). Geleitet wird die Faltung von einem Kraftfeld, das die Wechselwirkungen aller Atome untereinander definiert. Hier liegt auch das Problem: definiert ein Kraftfeld die Wechselwirkungen nicht exakt genug, dann wird sich das Protein falsch falten. Bis jetzt ist die vollständige und korrekte Faltung nur bei in sehr kleinen Proteinen unter 50 Aminosäuren gelungen (Duan und Kollman 1998; Jang et al. 2003), um größere Proteine korrekt zu falten, muß die Genauigkeit der Kraftfelder stark verbessert werden.

Es gibt multiple Ansätze im Bereich der *ab initio*-Modellierung, diese werden – genauso wie die verwendeten Kraftfelder – in den Reviews von Liwo und Scheraga ausführlich behandelt (Liwo et al. 2005; Scheraga et al. 2007).

Die durchschnittliche Genauigkeit der *ab initio*-Modellierung liegt bei etwa 3,5 Å (RMSD, root mean square deviation, mittlere quadratische Abweichung) für das Proteinerückgrat (Sali und Blundell 1993). Der Wert für die RMSD wird folgendermaßen definiert:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n R_i * R_i}{n}}$$

Hierbei steht R für den Vektor, der die beiden Atompaaire n miteinander verbindet.

Die *empirischen Methoden* hingegen sind auf bereits experimentell gelöste Strukturen angewiesen: Die Homologie-Modellierung beruht auf der Beobachtung, daß Proteine mit homologen Sequenzen auch ein ähnliches Faltungsmuster besitzen und daß eine geringfügige Änderung der Sequenz auch nur eine geringfügige Änderung der Struktur zur Folge hat (Chothia und Lesk 1986). Man kann mit Hilfe eines Sequenzalignments die Struktur eines Proteins vorhersagen, wenn Strukturen ausreichend homologer Proteine bekannt sind. Ein Alignment ist ein Abgleich von mindestens zwei Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen und dient der Aufklärung der funktionellen oder evolutionären Verwandtschaft.

Die drei wichtigsten empirischen Teilmethoden sollen im Folgenden kurz beschrieben werden:

- „Modelling by Rigid Body Assembly“
- „Modelling by Segment Matching / Coordinate Reconstruction“
- „Modelling by satisfaction of spatial restraints“

Jede der drei Methoden benötigt eine oder mehrere experimentell ermittelte Strukturen homologer Proteine, um die unbekannte Struktur eines Proteins vorherzusagen.

Der erste Schritt der Modellierung ist immer die Suche nach einer Vorlage und die darauffolgende Erstellung eines Alignments zwischen den homologen Proteinen. Lediglich die Art, wie die dreidimensionalen Koordinaten des Zielproteins errechnet werden, ist unterschiedlich (Sali 1995a; Marti-Renom et al. 2000)

Das „*Modelling by rigid body assembly*“ zerschneidet homologe Strukturen in kleine Stücke (sog. „starre Körper“) und setzt diese zum Modell zusammen. Das Programm „Composer“ (Srinivasan und Blundell 1993) benutzt beispielsweise drei verschiedene Arten von „starrten Körpern“, um ein Modell zu generieren. Für konservierte Kernregionen des Proteins werden entsprechende Segmente aus homologen Strukturen ausgewählt. Für Loops wird eine Auswahl unter den äquivalenten Loops homologer Strukturen und nicht homologer Strukturen bestimmter Geometrie getroffen. Seitenketten werden so orientiert wie die entsprechenden Seitenketten in homologen Strukturen. Sollte das aus sterischen Gründen nicht möglich sein, werden sie entsprechend dem von der Aminosäure bevorzugten Rotamer orientiert. Eine generelle Verbesserung der Modellierung wird durch Gebrauch mehrerer homologer Strukturen erreicht, ebenso wie durch die Gewichtung der verschiedenen möglichen Positionen der „starrten Körper“ je nach Homologiegrad der Vorlagen zur Zielstruktur. Als Gerüst für die Positionierung der „starrten Körper“ können z.B. die

gemittelten $C\alpha$ -Abstände in den konservierten Bereichen der homologen Vorlagen verwendet werden (Sutcliffe et al. 1987a; Sutcliffe et al. 1987b).

Bei dem „*Modelling by segment matching*“ macht man sich die Erkenntnis zunutze, daß man 99% der in Proteinen vorkommenden Hexapeptid-Segmente in 100 unterschiedliche Klassen einteilen kann (Unger et al. 1989), innerhalb derer sich die Konformation nur geringfügig ändert. Diese Klassen lassen sich als Bausteine zur Rekonstruktion aller jemals gefundenen Proteinstrukturen verwenden. Die Modelle werden dann durch die folgende Prozedur berechnet: die Positionen der $C\alpha$ -Atome der in den Vorlagenstrukturen konservierten Aminosäuren werden als Richtlinie benutzt, um die Datenbank nach passenden Hexapeptiden abzusuchen (Claessens et al. 1989; Holm und Sander 1991; Levitt 1992). Die gefundenen Hexapeptide werden aneinandergereiht und die überlappenden Enden der Peptide miteinander verbunden. Auf diese Weise können auch Lücken modelliert werden (Jones und Thirup 1986).

Das „*Modelling by satisfaction of spatial restraints*“ arbeitet mit sogenannten „Constraints“ oder „Restraints“. Obwohl beide Begriffe „Ein- oder Beschränkung“ bedeuten, gibt es einen wichtigen Unterschied: „Constraints“ versuchen, eine strukturelle Eigenschaft wie z.B. die Länge einer Atombindung auf einen bestimmten Wert zu beschränken. „Restraints“ hingegen lassen einen größeren Bereich von Werten zu und legen eine Spannbreite von möglichen Werten fest. Die Restraints können diesen Werten auch verschiedene Wahrscheinlichkeiten zuweisen und sind somit sehr viel variabler als die „Constraints“. Das ist auch einer der Gründe, warum diese Methode eine weite Verbreitung erfahren hat. Das Modellieren durch Erfüllen von räumlichen Beschränkungen (restraints), die aus dem Sequenzalignment der zu modellierenden Struktur und homologen Strukturen extrahiert wurden, wurde schon 1990 von Šali et al. vorgeschlagen und 1993 von derselben Gruppe weiterentwickelt (Šali und Blundell 1993). Havel modellierte 1993 die Struktur des Flavodoxins von *Escherichia coli* (Havel 1993), Brocklehurst und Perham die Struktur der Hefe-Pyruvatkinase (Brocklehurst und Perham 1993). Sánchez und Šali sagten mit Hilfe des Programms „MODELLER“ die Strukturen von 1.071 Proteinen von *Saccharomyces cerevisiae* vorher, was etwa 17% der vom gesamten Hefegenom codierten Proteine entspricht (Sanchez und Šali 1998). Die errechneten Modelle wurden in Form einer Datenbank frei zugänglich gemacht (MODBASE, (Sanchez und Šali 2000; Pieper et al. 2004)).

Das von Sánchez und Šali eingesetzte Programm „MODELLER“, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, realisiert das Modellieren von Proteinen durch Erfüllen von räumlichen Randbedingungen, indem die aus dem Alignment gewonnenen Parameter in Form sogenannter Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (WDF, engl. „probability density functions“, pdf) ausgedrückt werden. Dabei wird nicht nur eine Ober- und Untergrenze festgelegt, die einen Wert annehmen kann, sondern es wird jedem möglichen Wert eine bestimmte Wahrscheinlichkeit zugewiesen, mit der er auftreten kann. Das Programm „MODELLER“ wird in Kapitel 3.1 detaillierter behandelt.

1.4. Zielsetzung

Wie aus den oben genannten Zahlen hervorgeht, klafft die Schere zwischen bekannten Sequenz- und Strukturdaten immer weiter auseinander. Sicherlich können viele Informationen aus den Genen oder durch ein Sequenzalignment einer neuen Sequenz mit bekannten Proteinen extrahiert werden, aber um die Funktion eines Proteins genau bestimmen zu können, ist es unabdingbar, die dreidimensionale Struktur des Proteins zu kennen. Nur so kann man wichtige Aminosäuren identifizieren, Katalysemechanismen aufklären, Bindungsstellen für Substrate und Effektoren finden und neue Medikamente entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war, durch experimentelle und bioinformatische Methoden die Struktur verschiedenster Proteinkomplexe zu lösen und – wenn möglich – den durch ihre Kombination entstehenden synergistischen Effekt wie die gleichzeitige Anwendung von Elektronenmikroskopie oder Elektronenspinresonanz und Homologie-Modellierung zu nutzen. Gerade aus dieser Überlegung ergab sich eine intensive Kooperation mit anderen Instituten und Fachbereichen, in denen das Wissen über die entsprechenden Methoden vorhanden war.

Die Methoden wurden auf unterschiedliche Fragestellungen angewandt:

- 1) Was sind die molekularen Mechanismen der Sauerstoff-Aktivierung und des Sauerstoff-Transports in der Familie der Typ-3-Kupferproteine?
Eingesetzt wurden hier die Homologie-Modellierung und die dreidimensionale Rekonstruktionen von Proteinstrukturen aus cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
- 2) Zu welchen Strukturänderungen kommt es im LHC II während der Trimerisierung?
Hier wurden die Methoden Elektronenspinresonanz (ESR) und Homologie-Modellierung kombiniert.
- 3) Welche Aminosäuren am Dimer-Interface sind für den Selfassembly-Prozess des LHCI-730 Komplexes relevant?
Hier wurden die Ergebnisse von Homologie-Modellierung und zielgerichteten Mutationen in Einklang gebracht.

2. Proteine

2.1. Die Familie der Typ-3-Kupferproteine

2.1.1. Klassifikation

Das Typ-3-Kupferzentrum ist ein zweikerniges aktives Zentrum, in dem zwei Kupferionen von je drei Histidinen koordiniert werden. Das N-terminale Kupfer wird CuA genannt, das C-terminale CuB, zur Benennung später mehr. Die Bindung der Histidine an Kupfer hat koordinativen Charakter und wird durch das freie Elektronenpaar der N ϵ -Atome realisiert.

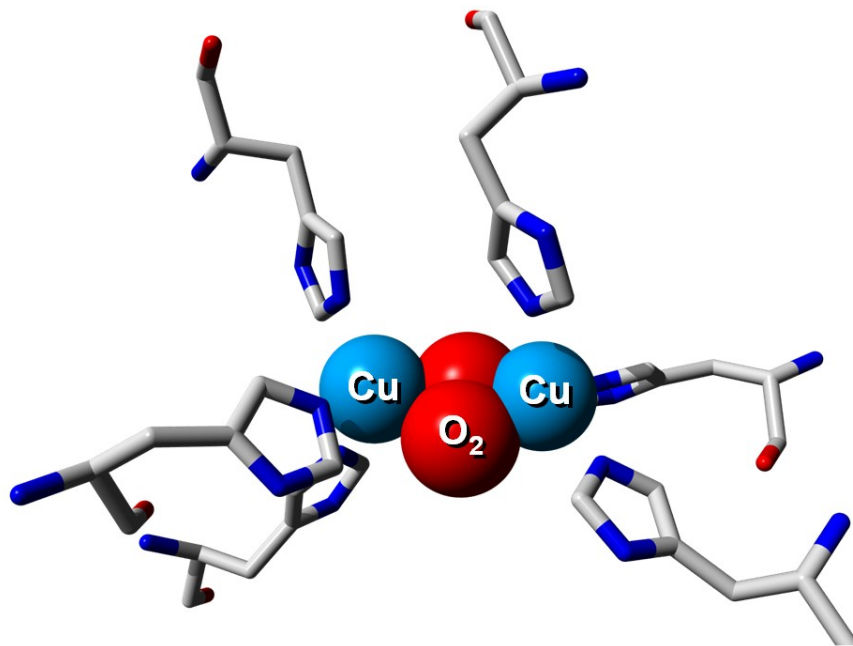


Abbildung 3: Typisches Typ-3-Kupferzentrum im oxygenierten Zustand

Blaue Kugeln: Kupferionen, rote Kugeln: Sauerstoffmolekül. Koordinierende Histidine in Stabdarstellung, grau: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff (Struktur des oxygenierten Pfeilschwanzkrebs-Hämocyanins, 1oxy)

Die Einteilung sämtlicher Proteine mit Typ-3-Kupferzentrum ist aufgrund ihrer großen Heterogenität sehr schwierig. Man kann die Klassifikation nach unterschiedlichen Merkmalen treffen. Ein Problem stellt hierbei die Einteilung der Hexamerine dar, bei denen es sich um Untergruppen der Typ-3-Kupferproteine handelt, die im Laufe der Evolution die Fähigkeit verloren hat, Kupfer zu binden. Die einfachste Möglichkeit, die historisch begründet ist, ist die Einteilung in Hämocyanine und Phenoloxidasen.

1. Historische Einteilung nach Funktion:

Phenoloxidasen:

Vorkommen: Arthropoden, Mollusken, Insekten, Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Menschen.

Hämocyanine:

Hämocyanine aus Mollusken, Arthropoden, Insekten, Tunicaten und Stummelfüßern sowie davon abgeleitet die Pseudohämocyanine aus Krebsen und Hexamerine aus Insekten.

Leider zeigt diese Einteilung einige Schwächen. Zum einen vereinigt sie in jeder der beiden Großgruppen Proteine mit unterschiedlichstem Bauplan und beträchtlicher evolutionärer Distanz. Zum anderen – und dieses Argument wiegt meiner Meinung nach schwerer – konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, daß man durch geeignete Behandlung enzymatisch inaktive Proteine wie Hämocyanine so beeinflussen kann, daß sie Tyrosinase- oder Catecholoxidase-Aktivität ausüben (siehe auch Kapitel 2.1.6). Damit ist die Einteilung nicht konstant.

Man kann alternativ dazu die Einteilung auf Grundlage der Sequenz und Struktur vornehmen, und zwei Hauptgruppen, genannt „Superfamilien“ definieren. Diese Klassifikation ist robuster als die obige Einteilung nach Funktion oder Historie.

2. Einteilung nach Sequenz und Struktur

I. Die Superfamilie der Arthropoden-Hämocyanine.

Diese besteht aus den

- Arthropoden-Hämocyaninen (Markl et al. 1980; Linzen et al. 1985; Volbeda und Hol 1989; Markl und Decker 1992; Hazes et al. 1993; van Holde und Miller 1995; Hagner-Holler et al. 2004) ,
- Arthropoden-Phenoloxidasen (Soderhall et al. 1979; Ashida und Soderhall 1984; Aspan et al. 1995; Burmester und Scheller 1996; Decker et al. 2000; Decker und Terwilliger 2000; Burmester 2001; Solomon et al. 2001a, 2001b; Burmester 2002; Jaenicke und Decker 2003; Decker et al. 2007b),
- Arthropoden-Pseudohämocyaninen (Burmester 1999b),
- Arthropoden-Cryptocyaninen (Terwilliger, N. B. et al. 1999; Burmester 2001, 2002)
- Insektenhexamerinen und ihre Rezeptoren (Telfer und Kunkel 1991; Burmester und Scheller 1996; Burmester 1999a; Hagner-Holler et al. 2007)

Es ist anzumerken, daß die Hexamerine die Fähigkeit zur Kupferbindung im Laufe der Evolution sekundär verloren haben.

II. Die Superfamilie der Mollusken-Hämocyanine.

Hierzu zählen die

- Mollusken-Hämocyanine (Drexel et al. 1987; Cuff et al. 1998; Meissner et al. 2000; Lieb et al. 2001; Markl et al. 2001; Perbandt et al. 2003; Harris et al. 2004; Decker et al. 2007a; Gatsogiannis et al. 2007),
- Mollusken-Tyrosinasen (Lieb et al. 2000; Nagai, K. et al. 2007),
- Säuger-Tyrosinasen (Jara et al. 1988; Hearing et al. 1992; Tripathi et al. 1992; Spritz et al. 1997a; Hearing 1999; Wang und Hebert 2006; Schweikardt et al. 2007),
- bakteriellen Tyrosinasen (Jackman et al. 1991; Chen, L. Y. et al. 1993; Liaw und Lee 1995; Tsai und Lee 1998; Claus und Decker 2006),
- Pilz-Phenoloxidasen (Himmelwright et al. 1980; Espin und Wichers 1999; Halaouli et al. 2006) sowie
- pflanzlichen Tyrosinasen und Catecholoxidasen (Klabunde et al. 1998; Eicken et al. 1999; Gentschev et al. 2000; Siegbahn 2004; Guell und Siegbahn 2007).

Hier ist zu beachten, daß es sich bei den Säuger-Tyrosinasen um Transmembranproteine handelt, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Superfamilie.

Beiden Gruppen gemein ist ein sehr ähnliches, zum Teil homologes, aktives Zentrum. Sie unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur sowie ihrer Funktion, dazu mehr im nächsten Abschnitt, Kapitel 2.1.2.

2.1.2. Das aktive Zentrum der Typ-3-Kupferproteine

Ein Typ-3-Kupferzentrum kann Sauerstoff binden und ihn gezielt wieder abgeben. Diese Reaktion geht bei den Hämocyaninen mit der Änderung der Konformation des aktiven Zentrums einher, die in Abbildung 4 gezeigt wird. Nicht nur der Abstand der Kupferionen verringert sich bei Sauerstoffbindung um bis zu ein Ångström – auch die Oxidationsstufe der Kupferionen (bei Oxygenierung von + I nach + II) sowie die Tertiär- und Quartärstrukturen zeigen Änderungen (Himmelwright et al. 1980; Pate et al. 1989; Volbeda und Hol 1989; Hazes et al. 1993; Magnus et al. 1994; Solomon et al. 1994; Decker et al. 1996; Solomon et al. 1996; Solomon et al. 2001a; Hartmann und Decker 2002; Chen, P. und Solomon 2004).

Im *deoxygenierten* Zustand, also ohne Sauerstoff, wird jedes Kupferion von den drei N ϵ -Atomen der zugehörigen Histidine (HA1, HA2, HA3 in CuA und HB1, HB2, HB3 in CuB) in einer trigonal-planaren Konfiguration koordiniert (siehe Abbildung 4A und Abbildung 5A).

Im *oxygenierten* Zustand bindet der Sauerstoff in einer (μ : η^2 - η^2)-Konformation (der sogenannten „Side-On“-Konformation (Hazes et al. 1993; Magnus et al. 1994; Hazes et al. 1996; Cuff et al. 1998; Matoba et al. 2006)), in der die Achse des Sauerstoff-Moleküls im nahezu rechten Winkel zur Achse der Kupferionen liegt (Abbildung 4B und Abbildung 5B).

Es kommt dabei zu folgender Unterscheidung der Histidine, die jetzt keine trigonal-planare Konfiguration mehr einnehmen: Während im deoxy-Zustand alle Histidine ähnliche Abstände zum koordinierten Kupfer haben, liegen im oxy-Zustand vier der sechs Histidine, die beiden Kupfer und die Sauerstoffe in einer Ebene. Die beiden nicht in der Ebene liegenden Histidine, je eines an CuA und CuB, befinden sich z.B. beim Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses oberhalb und unterhalb dieser Ebene. Man nennt sie die „axialen Bindungspartner“; sie haben den größten Abstand zu den Kupfern. Die in der Ebene liegenden Histidine werden als „äquatoriale Bindungspartner“ bezeichnet. Sie haben einen geringeren Abstand zu den Kupferionen als die axialen Histidine. Abbildung 5 zeigt diese Strukturänderung, die genauso reversibel ist wie die Sauerstoffbindung selbst, schematisch.

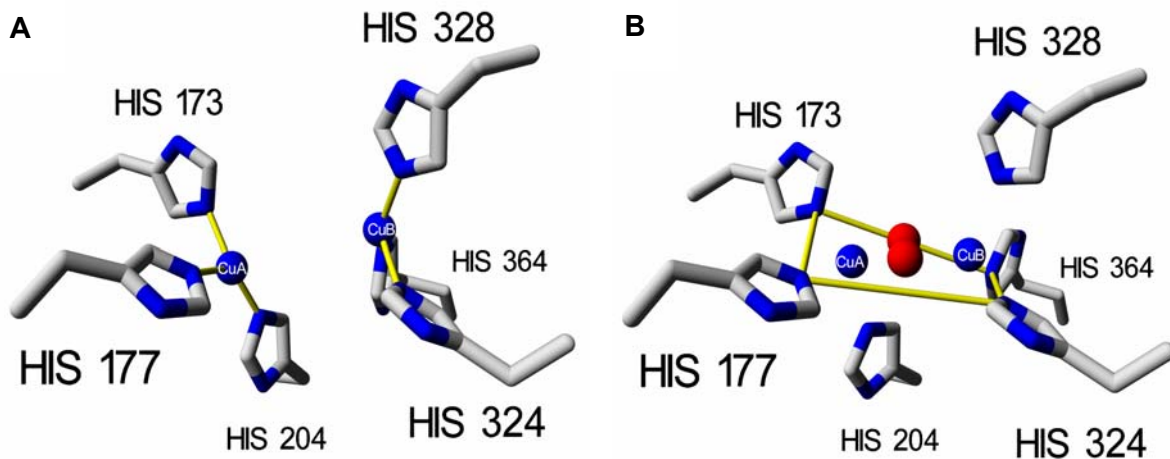


Abbildung 4: Röntgenstrukturen des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkrebs. Gezeigt ist das Typ-3-Kupferzentrum, A) deoxy-Form ohne gebundenen Sauerstoff, B) oxy-Form mit gebundenem Sauerstoff. Blaue Kugeln: Kupferionen, rote Kugeln: Sauerstoff, graue Stäbe: Kohlenstoff, blaue Stäbe: Stickstoff, gelbgraue Linien: Bindungsebene.

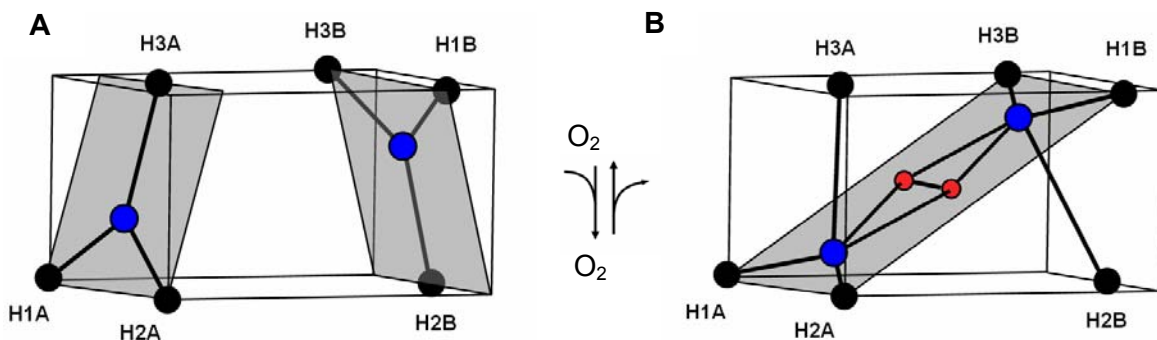


Abbildung 5: Oxygenierungsabhängige, reversible Konformationsänderung des aktiven Zentrums von *Limulus polyphemus* Hämocyanin. Schwarz: His-Ns, blau: Kupfer, rot: Sauerstoff, dunkelgrau: Bindungsebene, verändert nach Magnus et al. 1994.

Die Mitglieder der Typ-3-Kupferproteine zeigen trotz des ähnlichen aktiven Zentrums sehr unterschiedliche Funktionen. Während die Phenoloxidasen, die erdgeschichtlich älteste Gruppe, monophenolische Substrate (Tyrosinasen) oder diphenolische Substrate (Catecholoxidasen) enzymatisch mittels Sauerstoff in Catechole und /oder Chinone umwandeln können, transportieren die Hämocyanine Sauerstoff in einigen Arthropoden- und Mollusken-Arten. Hexamerine, wie sie bei Insekten vorkommen, haben die Fähigkeit zur Cu- und O₂-Bindung verloren und dienen als Speicherproteine (Burmester und Scheller 1996; Burmester et al. 1998; Burmester 1999a; Decker und Terwilliger 2000; van Holde et al. 2001; Hagner-Holler et al. 2007).

2.1.3. Modellkomplexe für das Kupferzentrum

Lange bevor Röntgenstrukturen der Hämocyane und Tyrosinasen zur Verfügung standen, wurde an Kupfer-Modellkomplexen geforscht. Man versuchte, die spektroskopischen Daten der Hämocyane und Tyrosinasen mit denen der leichter zu analysierenden Modellkomplexe abzugleichen und so Rückschlüsse auf die Struktur und Funktion des aktiven Zentrums zu ziehen (Karlin, Kenneth D. et al. 1982; Karlin, Kenneth D. et al. 1984a; Karlin, Kenneth D. et al. 1987; Jacobson et al. 1988; Kitajima, Nobumasa et al. 1992; Karlin, K. D. 1993; Kitajima, N. und Moro-oka 1994; Tolman 1997; Pidcock et al. 1998).

Tatsächlich zeigen die von Kitajima 1992 synthetisierten oxy-Modellkomplexe spektroskopische Eigenschaften, die denen der oxy-Tyrosinase und des oxy-Hämocyanins sehr ähnlich waren (siehe Abbildung 6 und das folgende Kapitel über Spektroskopie).

Karlin und Kollegen konnten mit spektroskopischen Methoden einen Modellkomplex untersuchen, der während bei Zuführung von Kupfer und Sauerstoff in der Lage war, einen Kupferkomplex zu bilden. Dieser band Sauerstoff in einer Side-on-Konformation und war in der Lage, einen endogenen aromatischen Ring zu hydroxylieren, siehe Abbildung 7 (Karlin, Kenneth D. et al. 1984b; Karlin, Kenneth D. et al. 1994).

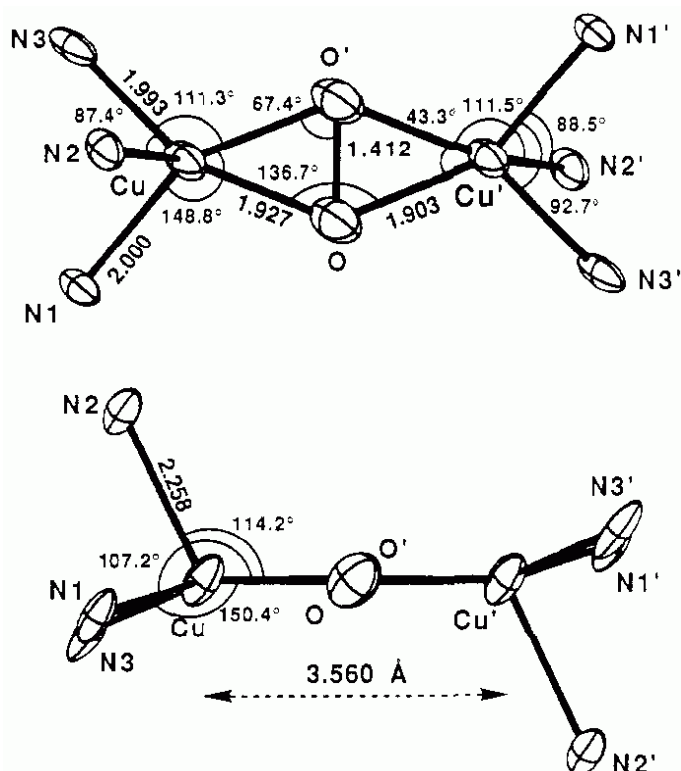


Abbildung 6: Struktur des $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-}i\text{-Pr}_2\text{pz})_3)_2(\text{O}_2)]$ -Modellkomplexes im oxygenierten Zustand

Die Struktur des oxygenierten Modellkomplexes hat große Ähnlichkeit mit der erst Jahre später gelösten oxygenierten Struktur des Hämocyanins von *Limulus polyphemus*, siehe Abbildung 4 und Abbildung 5. Oben Aufsicht, unten die um 90° gedrehte Seitenansicht der Bindungsebene. Distanzangaben in Å, Winkelangaben in Grad, aus (Kitajima, Nobumasa et al. 1992)

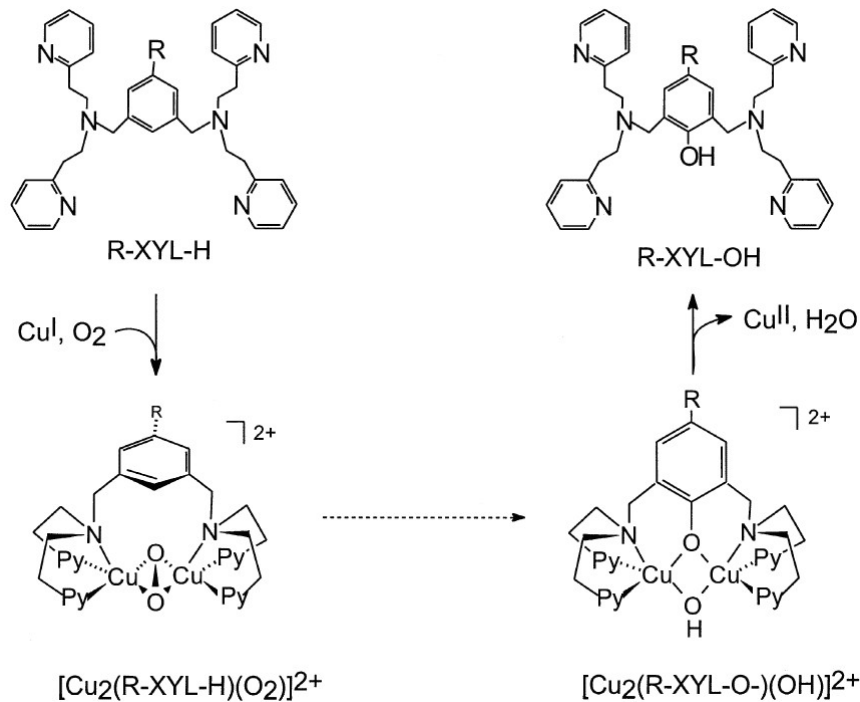


Abbildung 7: Modellkomplex mit Side-on-Konformation des gebundenen Sauerstoffs
 Modellkomplex von Karlin (Karlin, Kenneth D. et al. 1984b), Grafik aus (Decker et al. 2000).

2.1.4. Spektroskopische Eigenschaften des Typ-3-Kupferzentrums

Das spektroskopische Verhalten des Typ-3-Kupferzentrums ist von seinem Oxygenierungszustand abhängig. Im oxygenierten Kupferzentrum verbrückt das Sauerstoffmolekül die beiden Kupferionen antiferromagnetisch, dies führt zu einer starken Absorption im UV-Bereich und im sichtbaren Bereich. Es gibt zwei Absorptionsbanden: bei etwa 340-350 nm, verursacht durch einen Peroxid- π_{σ}^* -Cu^{II}-Charge-Transferübergang, und im sichtbaren Bereich bei etwa 580-600 nm, verursacht durch einen Peroxid- π_{σ}^* -Cu- $d_{x^2-y^2}$ -Charge-Transferübergang.

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten ϵ von verschiedenen Typ-3-Kupferproteinen

Abs (340-350 nm): $\epsilon = 18000 - 20000 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
Abs (580-600 nm): $\epsilon = 1000 - 5800 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$

(Jolley et al. 1974; Kitajima, Nobumasa et al. 1992; Solomon et al. 1994; van Holde und Miller 1995; Solomon et al. 1996; Solomon et al. 2001a).

Eine Deoxygenierung des Kupferzentrums führt zum Verlust der beiden Signale, was man zur Detektion der Sauerstoff-Beladung benutzen kann. Ebenso kann die Auslöschung des für Typ-3-Kupferzentren typischen Fluoreszenzsignals bei 340 nm durch den Cu_2O_2 -Komplex als Signal für die Sauerstoffbeladung dienen (Boteva et al. 1993; Erker et al. 2004). Die Absorption im sichtbaren Wellenlängenbereich ist der Grund dafür, daß das oxygenierte Zentrum eine blaue Farbe annimmt. Das oxygenierte Zentrum kann mit Elektronenspinresonanz (ESR) nicht detektiert werden, da - wie schon erwähnt - keine ungepaarten

Elektronen auftreten (Himmelwright et al. 1980; Pate et al. 1989; Karlin, K. D. 1993; Solomon et al. 1994; Solomon et al. 1996; Metz und Solomon 2001).

Die schon angesprochenen anorganischen Modellkomplexe haben sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften. Die beiden Absorptionsbanden im UV- und sichtbaren Bereich sind, was Lage und Größenordnung der Extinktionskoeffizienten angeht, vergleichbar mit den Werten des nativen Kupferzentrums in Hämocyaninen und Tyrosinasen (Kitajima, Nobumasa et al. 1992):

Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten ε von verschiedenen Modellkomplexen von Kitajima et al. 1992

Abs (338-355 nm): $\varepsilon = 18000 - 21000 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
Abs (530-551 nm): $\varepsilon = 790 - 1040 \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$

2.1.5. Die Terminologie der Phenoloxidase-Aktivität

Es gibt in der Gruppe der Phenoloxidasen zwei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten, (siehe auch Abbildung 8):

Monophenolase / Cresolase / Tyrosinase-Aktivität:

Hydroxylierung von monophenolischen Substraten zu ortho-Diphenolen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Elektronenrezeptor (nach der IUBMB Enzymnomenklatur: Monophenol monooxygenase, EC 1.14.18.1)

Diphenolase / Catecholase / Catecholoxidase-Aktivität:

Oxidation von ortho-Diphenolen zu ortho-Chinonen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Elektronenrezeptor (nach der IUBMB Enzymnomenklatur: Catechol oxidase, EC 1.10.3.1)

In der Literatur existieren sehr viele Bezeichnungen für diese Aktivitäten. Zwar sind die Begriffe Monophenolase und Diphenolase eindeutig definiert, trotzdem nutzen einige Autoren die Begriffe Phenoloxidase (PO) oder Polyphenoloxidase (PPO) für Enzyme, die wahlweise eine oder beide der genannten Aktivitäten zeigen.

In dieser Arbeit werden folgende Definitionen verwendet:

Enzyme, die Monophenole hydroxylieren können, werden als Tyrosinasen bezeichnet.
Enzyme, die nur Diphenole oxidieren können, erhalten die Bezeichnung Catecholoxidase.
Die Gesamtheit der Tyrosinasen und Catecholoxidasen wird als Phenoloxidasen bezeichnet.

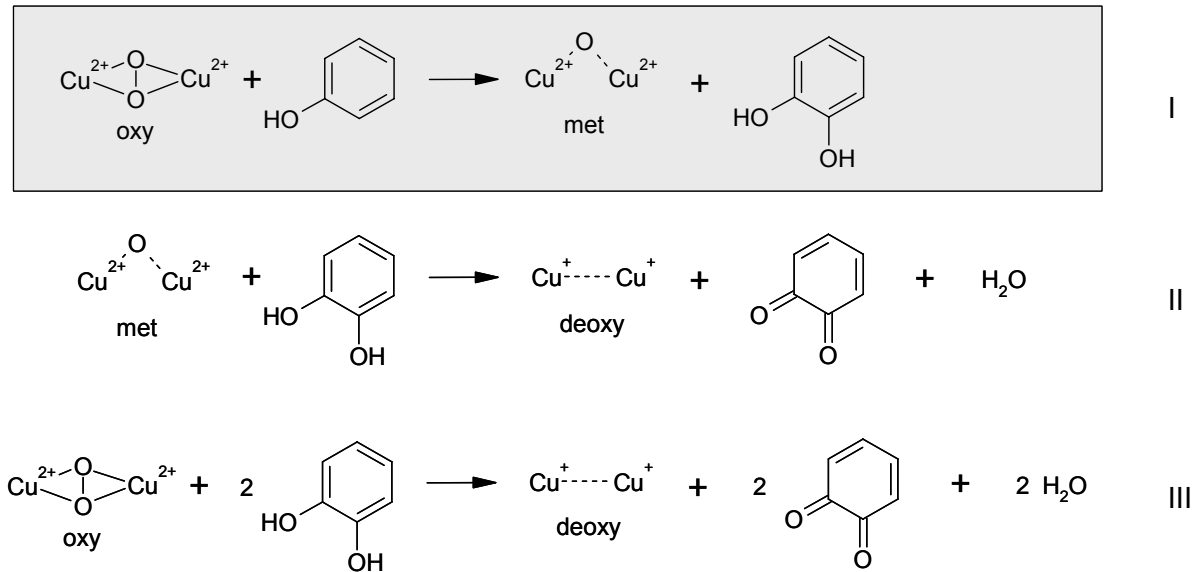


Abbildung 8: Reaktionsschemata der Tyrosinase- und Catecholoxidase-Aktivität

Tyrosinasen sind in der Lage, jede der drei gezeigten Reaktionen (I-III) zu katalysieren, Catecholoxidasen hingegen nur die unteren beiden (II + III). Die Hydroxylierung von Monophenolen (I) ist folgerichtig ausschließlich den Tyrosinasen vorbehalten. Da ein Kupferzentrum im Met-Zustand *keine* Monophenole umsetzen kann, *muß* sich die Tyrosinase im oxygenierten Zustand befinden.

2.1.6. Die Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine

Es wird seit Jahrzehnten diskutiert, in welchem Verwandtschaftsverhältnis die Vertreter der Typ-3-Kupfer-Proteinfamilie stehen, d.h. ob sie sich aus einem oder zwei unbekanntem einkernigen Vorläuferprotein entwickelt haben, vgl. u.a. (van Holde und Miller 1995; Decker und Terwilliger 2000; Jaenicke und Decker 2004). Die beiden Superfamilien der Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine haben nicht viel gemeinsam bis auf ihre funktionelle Eigenschaft, molekularen Sauerstoff an einem Typ-3-Kupferzentrum zu binden. Die Sequenz und Größe der Monomere ist sehr divergent, und der strukturelle Aufbau ist auf jeder Organisationsebene unterschiedlich, vor allem in Tertiär- und Quartärstruktur, vergleiche Abbildung 9 (Markl und Decker 1992; Decker und Terwilliger 2000). Selbst die Kupferzentren zeigen trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur Sequenzunterschiede, die Zweifel an einem einzigen gemeinsamen Vorgängermolekül aufkommen lassen.

In dieser Arbeit werden die Bezeichnungen „CuA“ und „CuB“ benutzt, um das N-terminale respektive C-terminale Kupferzentrum eines gegebenen Typ-3-Kupferproteins zu beschreiben. Diese Zentren sind aber nicht immer homolog zueinander. In der Literatur werden die Termini *CuA* und *CuB* zur Typisierung einkerniger Kupferzentren verschiedener Herkunft verwendet. Man kann die Zentren anhand der Sequenzmuster der drei kupferbindenden Histidine unterscheiden (van Holde und Miller 1995).

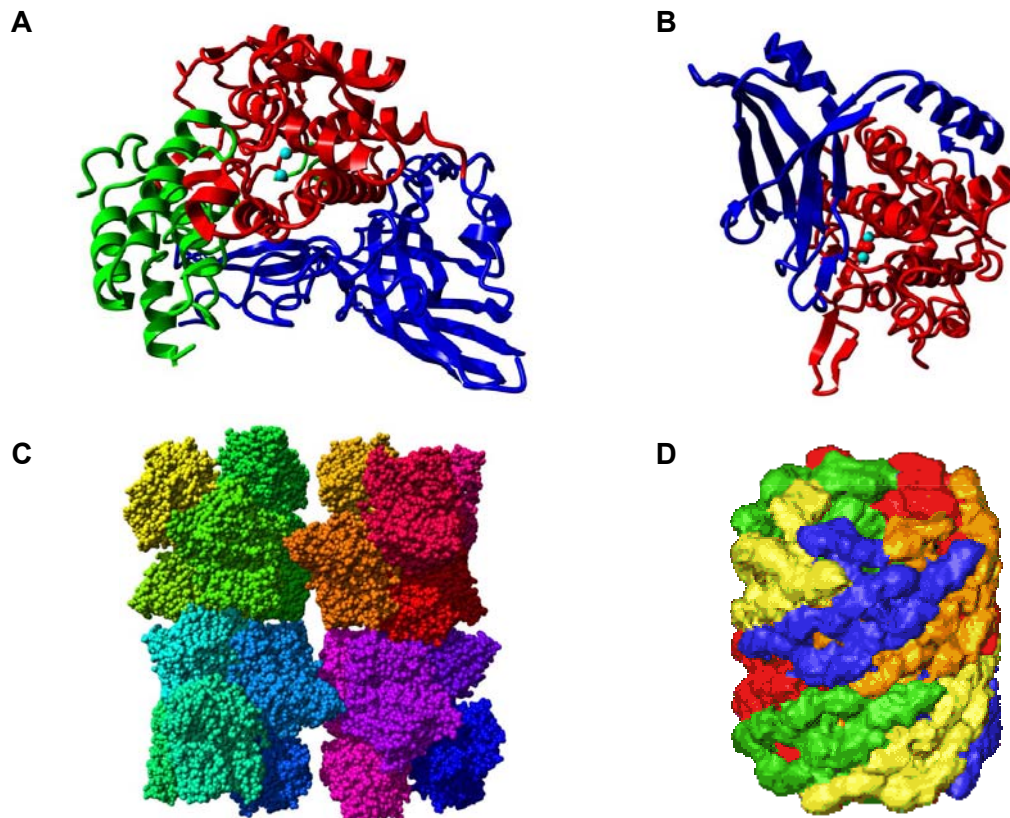


Abbildung 9: Bekannte Strukturen der Arthropoden-Hämocyanin- und Mollusken-Hämocyanin-Superfamilien

A: Tertiärstruktur eines Arthropoden-Hämocyanins (*Limulus polyphemus* Untereinheit II),

B: Tertiärstruktur der Funktionellen Einheit eines Mollusken-Hämocyanins (*Octopus dofleini* FU g),

C: Quartärstruktur eines Arthropoden-Hämocyanins (*Eurytelma californicum*),

D: Quartärstruktur des Mollusken-Hämocyanins HtH1 (*Haliotis tuberculata*).

A-B sind Röntgenstrukturen, C ist ein kombiniertes Modell aus Röntgenkleinwinkelstreuung und Homologie-Modellierung, D ist eine Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Bildern von Ulrich Meissner ((Meissner et al. 2000; Meissner 2003)). In Teilabbildung A und B sind die Domänen angefärbt: Rot: Domäne mit dem aktiven Zentrum, blau: Domäne C-terminal zum aktiven Zentrum, grün: Domäne N-terminal zum aktiven Zentrum. In Teilabbildung C hat jede Untereinheit eine andere Farbe, in D jedes Dimer, dessen Monomere aus bis zu acht funktionellen Einheiten bestehen. Die Strukturen sind *nicht* im selben Maßstab dargestellt.

Verändert nach van Holde, Miller und Decker 2001.

2.1.6.1. Das *CuB*-Zentrum

Der Typus *CuB* kommt in jedem Typ-3-Kupferzentrum vor, egal ob Hämocyanin oder Tyrosinase, egal ob Maus oder Bakterium. Er zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: Der Abstand zwischen dem ersten (H1) und dem zweiten kupferbindenden Histidin (H2) beträgt immer vier Aminosäuren, der Abstand des zweiten (H2) und dritten Histidins (H3) beträgt immer mehr als 22 Aminosäuren.

Abstände der Histidine in *CuB*: 4 – 22+

Vergleicht man die Sequenzen verschiedener Kupferproteine, so findet man zwei unterschiedliche CuB-Zentren, die auf obigem Sequenzmuster beruhen, sich aber evolutionär voneinander entfernt haben:

Abstände der Histidine in CuB_1 : 4 – 22+
Abstände der Histidine in CuB_2 : 4 – 36+

Diese sollen nachfolgend erklärt werden:

Das CuB_1 -Zentrum

Man findet CuB_1 meist als N-terminales Kupferzentrum in den von den Arthropoden-Hämocyaninen abgeleiteten Proteinen. Beispiele hierfür sind

<i>Limulus polyphemus</i>	HC	His: 173-177-204	Abstand: 4 – 27
<i>Panulirus interruptus</i>	HC	His: 194-198-224	Abstand: 4 – 26
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	HC	His: 210-214-237	Abstand: 4 – 23
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Tyr	His: 217-221-243	Abstand: 4 – 22

Weiterhin findet man CuB_1 als C-Terminales Kupferzentrum in den von den Mollusken-Hämocyaninen abgeleiteten Proteinen. Beispiele hier sind:

<i>Ipomoea batatas</i>	CO	His: 240-244-274	Abstand: 4 – 30
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Tyr	His: 190-194-216	Abstand: 4 – 22
<i>Mus musculus</i>	Tyr	His: 363-367-390	Abstand: 4 – 23
<i>Octopus dofleini</i>	HC	His: 2671-2675-2702	Abstand: 4 – 27
<i>Rapana thomasi</i>	HC	His: 181-185-212	Abstand: 4 – 27

Das CuB_2 -Zentrum

CuB_2 hingegen kommt ausschließlich als C-Terminales Kupferzentrum in den von den Arthropoden-Hämocyaninen abgeleiteten Proteinen vor:

<i>Limulus polyphemus</i>	HC	His: 324-328-364	Abstand: 4 – 36
<i>Panulirus interruptus</i>	HC	His: 344-348-384	Abstand: 4 – 36
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	HC	His: 377-381-417	Abstand: 4 – 36
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Tyr	His: 357-361-397	Abstand: 4 – 36

Es fehlt in der obigen Liste das N-terminale Kupferzentrum der Mollusken-Hämocyanin-artigen Typ-3-Kupferproteine. Dessen Aufbau wird im Folgenden beschrieben.

2.1.6.2. Das CuA-Zentrum

Der Typus *CuA* scheint sich unabhängig von *CuB* entwickelt zu haben. Das erste (H1) und zweite (H2) kupferbindende Histidin haben mindestens 16 Aminosäuren Abstand voneinander, das zweite (H2) und dritte (H3) Histidin neun Aminosäuren.

Abstände der Histidine in *CuA*: 16+ – 9

<i>Ipomoea batatas</i>	CO	His: 88-109-118	Abstand: 21 – 9
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Tyr	His: 38-54-63	Abstand: 16 – 9
<i>Mus musculus</i>	Tyr	His: 180-202-211	Abstand: 22 – 9
<i>Octopus dofleini</i>	HC	His: 2671-2675-2702	Abstand: 19 – 9
<i>Rapana thomasi</i>	HC	His: 181-185-212	Abstand: 20 – 9

Van Holde und Miller nehmen an, daß in Arthropoden-Hämocyaninen und den davon abgeleiteten Proteinen eine Genduplikation des *CuB* und eine nachfolgende unterschiedlich schnelle Evolution der Kupferzentren stattgefunden hat. Mollusken-Hämocyanine und die von ihnen abgeleiteten Proteinen scheinen eine Genfusion zwischen zwei Vorläuferproteinen zu sein, von denen eines ein *CuA*, das andere ein *CuB* getragen hat, siehe auch (van Holde und Miller 1995). Die Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanine stellen damit das Endergebnis einer konvergenten Entwicklung dar und nicht das einer divergenten (Lieb et al. 2001; van Holde et al. 2001; Burmester 2002).

2.1.7. Die Domänenstruktur der Typ-3-Kupferproteine

Das aktive Zentrum der bakteriellen Tyrosinase wird durch ein Tyrosin des cotranslatierten Caddieproteins blockiert, bis der Einbau der Kupferionen in die Tyrosinase abgeschlossen ist. Danach dissoziiert der binäre Komplex aus Tyrosinase und Caddie-Protein und setzt die aktive Tyrosinase frei, siehe Abbildung 10 C.

In den Mollusken-Hämocyaninen, die keinen Sauerstoff mehr in phenolische Substratmoleküle einbauen, blockiert eine zum aktiven Zentrum C-terminal gelegene Faltblatt-Domäne das aktive Zentrum mit den zwei Kupferionen, indem sie ein Leucin in das aktive Zentrum inseriert. Dadurch können keine Substrate mehr zum aktiven Zentrum gelangen. Die Funktion als Sauerstofftransporter im Kreislaufsystem der Mollusken wird so gewährleistet, siehe Abbildung 10 B.

In den Hämocyaninen der Arthropoden übernimmt die eine N-terminal gelegene Domäne die Blockade des aktiven Zentrums. Allerdings ist der Mechanismus anders als bei den Mollusken. Die blockierende Domäne besitzt hauptsächlich helikale Strukturen und verschließt den Eingang zum aktiven Zentrum mit einem Phenylalanin, siehe Abbildung 10A. Die C-terminale Faltblatt-Domäne hat große Ähnlichkeit mit der Struktur von Immunglobulinen und kann durch Proteolyse antimikrobielle Peptide abspalten (Decker und Jaenicke 2004). Dies ist eine weitere Funktion von Typ-3-Kupferproteinen – die Beteiligung am sogenannten „angeborenen Immunsystem“.

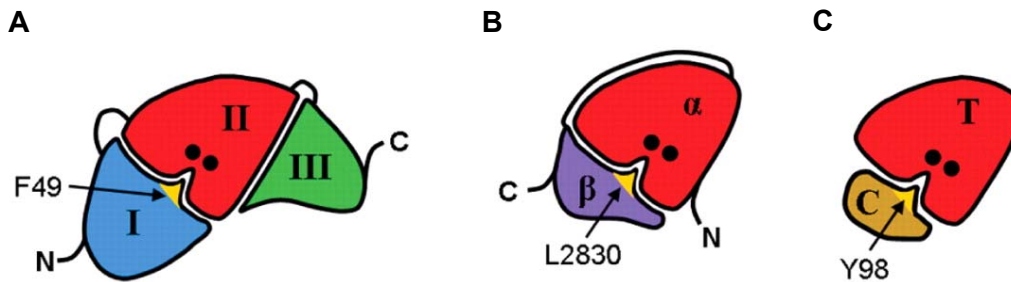


Abbildung 10: Domänenstruktur ausgewählter Typ-3-Kupferproteine.

A: Arthropoden-Hämocyanin, B: Mollusken-Hämocyanin, C: bakterielle Tyrosinase; verändert nach (Decker et al. 2007a). Rot: Domäne mit dem aktivem Zentrum (Kupferionen als schwarze Punkte), andersfarbig: weitere Domänen. Gelb: die das aktive Zentrum verschließende Aminosäure.

Das angeborene Immunsystem

Die Tyrosinasen spielen eine aktive Rolle in der Immunabwehr vieler Organismen. Ihre Produkte – also Catechole, Chinone und ähnliche Stoffe – haben sowohl antimikrobielle als auch gerbende Eigenschaften. Die Tyrosinasen sind somit an der Sklerotisierung und Aushärtung z.B. des Exoskeletts und der angeborenen Immunabwehr beteiligt. Ein in einen Wirt eindringender Organismus wird zuerst durch Catechole und Chinone geschädigt, letztendlich von Melanin ummantelt und von seinen Nährstoffquellen abgeschnitten. (Soderhall et al. 1979; Iwanaga und Kawabata 1998; Soderhall und Cerenius 1998; Lee und Soderhall 2002). Das Melanin sorgt außerdem für eine Pigmentierung des Organismus. Es kann - je nach Schwefelgehalt - eine Farbe zwischen schwarz, dunkelrot und gelb annehmen (Riley 1997).

Die Sequenzen der Arthropoden-Hämocyanine zeigen eine hohe Homologie mit den Sequenzen der Arthropoden-Phenoloxidasen (Decker et al. 2000; van Holde et al. 2001). Hämocyanine zeigen unter bestimmten Bedingungen Tyrosinase- oder Catecholoxidase-Aktivität; sie können durch partielle Verdauung mit Trypsin oder Chymotrypsin (Decker und Rimke 1998; Lee et al. 2004), antimikrobielle Peptide (Nagai, T. et al. 2001), Assoziation mit anderen Proteinen (Nagai, T. und Kawabata 2000), sowie durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) (Decker et al. 2001; Baird et al. 2007; Nillius et al. 2008), Cetylpyridiniumchlorid (CPC) (Nellaiappan und Sugumaran 1996) oder Lipiden (Nellaiappan und Sugumaran 1996) aktiviert werden. Für einen Überblick aller nachgewiesenen Aktivierungsmethoden siehe (Decker und Jaenicke 2004).

Da auch die menschliche Tyrosinase Kupfer enthält und ein Sequenzalignment mit der ebenfalls kupferhaltigen Catecholoxidase der Kartoffel (Klabunde et al. 1998) eine Übereinstimmung mit den kupferbindenden Bereichen zeigt, ist die Vermutung naheliegend, daß Struktur und Funktionsmechanismus der Tyrosinase selbst in evolutionär so weit entfernten Organismen wie Mensch und Arthropoden ähnlich sind (siehe diese Arbeit sowie Decker et al. 2006; Decker et al. 2007b; Schweikardt et al. 2007).

2.1.8. Die Quartärstruktur der Typ-3-Kupferproteine

Während der molekulare Mechanismus der Sauerstoffbindung bei Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen sehr ähnlich zu sein scheint (Typ-3-Kupferzentrum), ist der übergeordnete strukturelle Aufbau grundlegend anders. Während die Arthropoden-Hämocyanine Hexamere oder Vielfache von Hexameren bilden, sind die Mollusken-Hämocyanine Dekamere oder Vielfache davon. Die Monomere der Arthropoden-Hämocyanine haben etwa eine Masse von 72-77 kDa und binden je ein Molekül Sauerstoff (Linzen et al. 1985; Markl und Decker 1992; van Heel und Dube 1994). Die Monomere der Mollusken-Hämocyanine sind hingegen 350-400 kDa groß und binden 7 oder 8 Moleküle Sauerstoff, siehe Abbildung 11 und Abbildung 12.

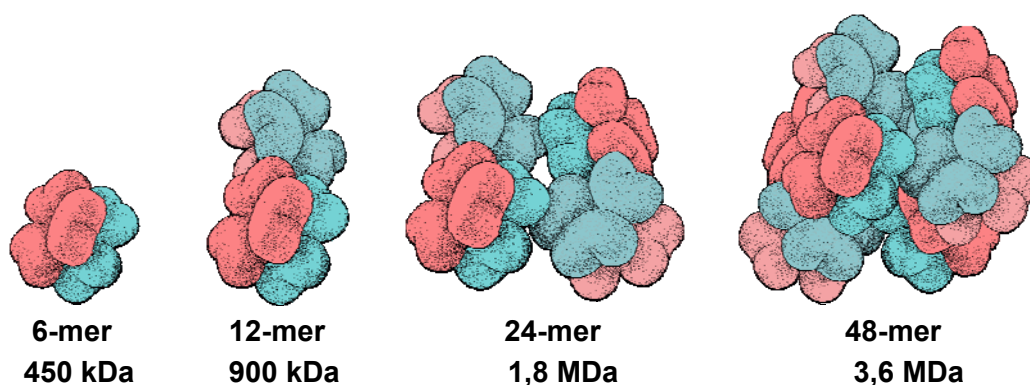


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Arthropoden-Hämocyanine

6-mere und 12-mere kommen vorwiegend bei Crustaceen, 24- und 48-mere vorwiegend bei Cheliceraten vor. So ist das 24-mer die biologisch aktive Einheit in der Hämolymphe der amerikanischen Vogelspinne *Eurypelma californicum*, die biologisch aktive Einheit beim Pfeilschwanzkreb *Limulus polyphemus* ist das 48-mer. Eine Untereinheit (Monomer) hat ein Molekulargewicht von etwa 72-77 kDa und bindet ein Molekül Sauerstoff. (Markl et al. 1980; Markl und Decker 1992) Grafik basierend auf (Savel-Niemann et al. 1988).

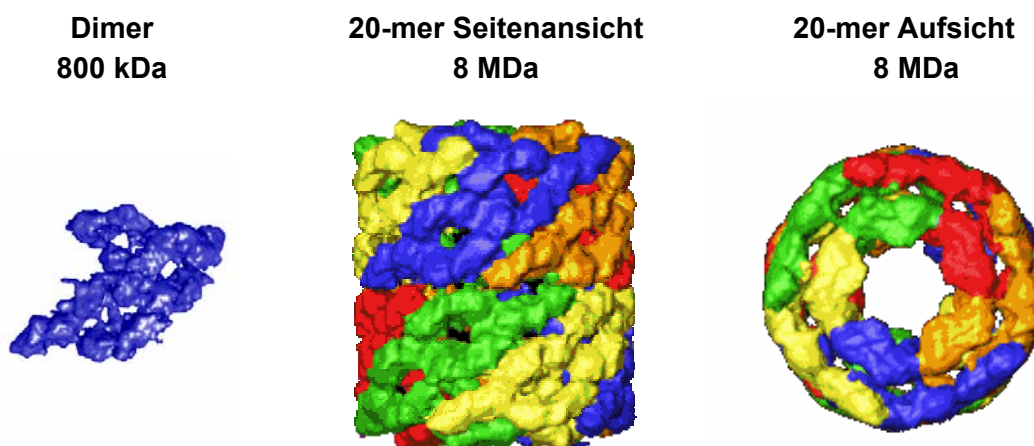


Abbildung 12: 20-meres Hämocyanin von *Haliotis tuberculata*

Links: Dimer Seitenansicht, Mitte: 2x10mer, Seitenansicht, rechts: 2x10mer Aufsicht.

Jedes Dimer, dessen Monomere aus acht funktionellen Einheiten (a-h) besteht, ist in einer anderen Farbe dargestellt (Meissner et al. 2000). Grafiken aus: (Meissner 2003) sowie (Stark 2003)

2.2. Lichtsammlerkomplexe (Light Harvesting Complex, LHC)

Die Lichtsammlerkomplexe LHCI und LHCII (light harvesting complex) befinden sich in den Thylakoidmembranen pflanzlicher Chloroplasten und sind Teil des Photosyntheseapparates der pflanzlichen Zelle. Sie bestehen aus den Lhc-Proteinen und nicht-kovalent gebundenen Pigmenten wie Chlorophyllen und Carotinoiden (Kühlbrandt und Wang 1991; Kühlbrandt et al. 1994; Ben-Shem et al. 2003, 2004; Liu et al. 2004; Standfuss et al. 2005).

Die Hauptaufgabe der Lichtsammlerkomplexe ist es, Sonnenenergie in Form von Licht aufzunehmen und an die Reaktionszentren der Photosysteme I und II (PS I, PS II) weiterzuleiten. Dabei erreichen die Lichtsammlerkomplexe bei der Energieweiterleitung Effizienzgrade von über 90% und erhöhen damit den Energiefluß in die aktiven Zentren des Photosystems etwa um den Faktor 100 (Koolman und Röhm 1998). Die LHC-Moleküle verhindern weiterhin die Photooxidation des Photosystems bei zu hoher Sonneneinstrahlung durch den Xanthophyll - Zyklus (Horton et al. 1996; Elrad et al. 2002). Dabei wird der durch hohe Lichteinstrahlung hervorgerufene Triplettzustand der Chlorophylle nicht photochemisch, sondern durch thermische Ableitung der Energie gelöscht (Young und Frank 1996). Verantwortlich für diese Eigenschaft sind die Carotenoide, die auch Singulett-Sauerstoff neutralisieren können (Young und Frank 1996).

2.2.1. Struktur der Monomere

Die LHC-Monomere weisen eine Sequenzidentität von etwa 35% auf (Jansson und Gustafsson 1990, 1991; Pichersky und Jansson 1996). Daher wurde vermutet, daß auch ihre Tertiärstruktur sehr ähnlich ist – eine Annahme, die durch die Strukturanalysen an verschiedenen Lichtsammlerkomplexen inzwischen zum großen Teil bewiesen werden konnte. Man unterteilt die Gene der LHC und ihre Genprodukte in zwei Gruppen: die *Lhca-Gene* (Lhca1-4), die am Photosystem I assoziieren, und die *Lhcb-Gene* (Lhcb1-6), die hauptsächlich am Photosystem II binden. Die Proteine Lhcb1-3 tragen zum LHCII im Verhältnis 9:3:1 bei. Zur Regulation des Energiezuflusses zu den Photosystemen I und II kann die Assoziation des LHCII mit den Photosystemen variiert werden. Dieses Verhalten wird durch Phosphorylierung des N-Terminus beeinflusst (Nilsson et al. 1997).

Die Primärstruktur der LHC-Monomere umfasst in der Gruppe der Lhca-Proteine mindestens 200 Aminosäuren, und in der Gruppe der Lhcb-Proteine mindestens 210 Aminosäuren (Pichersky und Jansson 1996).

Das Monomer zeigt insgesamt fünf Helices als Sekundärstrukturen, wovon drei den von Karlin-Neumann 1985 vorhergesagten Transmembranregionen entsprechen und mit A, B und C bezeichnet sind (Karlin-Neumann et al. 1985; Kühlbrandt et al. 1994). Dabei kreuzen sich die Helices A und B in der Membran und werden durch Salzbrücken stabilisiert. Helix C liegt fast parallel zur Membrannormalen. Die Helices D und E haben amphipatischen Charakter und liegen fast parallel zur Thylakoidmembran, siehe Abbildung 13.

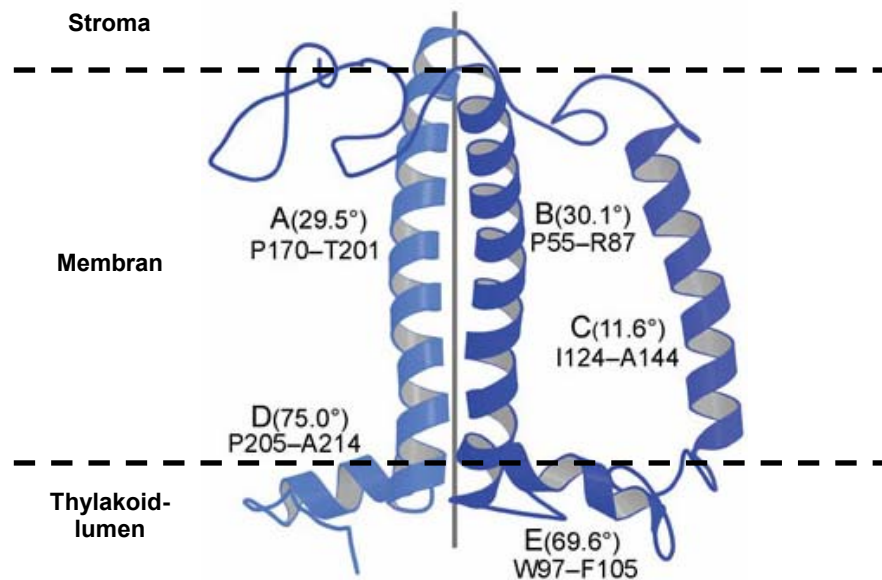


Abbildung 13: Struktur des monomeren LHCII aus *Spinacia oleracea* (Spinat)

Für jede Helix ist der Winkel zur Membrannormalen (senkrechte Linie zwischen Helices A und B) angegeben. Die Helices sind mit A–E bezeichnet. Die Reihenfolge der Bezeichnung folgt nicht der Abfolge in der Sequenz, sondern ist historisch bedingt. Helix E wurde erst in der Analyse von Liu et al. 2004 entdeckt, die anderen Helices entsprechen den Definitionen von Kühlbrandt und Wang 1994. Grafik aus (Liu et al. 2004)

Die Helices bilden ein Gerüst, das Pigmente wie Chlorophyll a und b (Chla, Chlb) sowie Carotinoide optimal anordnet, so daß sie eine zielgerichtete Energieweiterleitung durch Excitonen-Transfer sicherstellen können. So sind die meisten Chlorophylle fast senkrecht zur Membranebene ausgerichtet. Nicht nur die Position, sondern auch die Orientierung der Chlorophylle ist zwischen verschiedenen LHC-Molekülen konserviert. Der Raum zwischen den Helices ist zum großen Teil mit Pigmenten ausgefüllt, siehe auch Abbildung 14. Gebunden werden die Pigmente hauptsächlich durch geladene / polare Seitenketten oder Rückgratatome des LHC-Proteins, aber auch durch Wassermoleküle oder die Kopfgruppen von Membranlipiden (Liu et al. 2004).

2.2.2. Quartärstruktur der Lichtsammlerkomplexe

Trotz der erwähnten hohen Sequenzidentität und der Ähnlichkeit auf Tertiärstrukturebene sind die Quartärstrukturen von LHCI und LHCII sehr unterschiedlich: LHCII bildet trimere Heterokomplexe aus Lhcb1, 2 und 3 (Verhältnis 9:3:1), LHCI hingegen bildet dimere Heterokomplexe am PS I. Lhca1 und Lhca4 bilden zusammen das Dimer LHCI-730. Lhca2 und Lhca3 bilden zusammen das Dimer LHCI-680. Die Zahlen stehen hierbei für die Fluoreszenz-Emissionsbanden in Tieftemperaturspektren (Bassi et al. 1985; Schmid et al. 1997).

2.2.2.1. LHCII

Ein LHCII-Monomer bindet acht Chlorophyll a und sechs Chlorophyll b-Moleküle sowie vier Carotinoide, genauer zwei Luteine, ein Neoxanthin und ein Violaxanthin. Wenn ein Multimer gebildet wird, dann kommt es – wie erwähnt – zur Bildung eines Heterotrimers.

Die Ermittlung der dreidimensionalen Struktur der Lichtsammelkomplexe nahm, nicht zuletzt bedingt durch ihre Lage in der Thylakoidmembran, einen langen Zeitraum in Anspruch und ist für das LHCII am weitesten fortgeschritten. Kühlbrandt und Wang zeigten 1991 den Lichtsammelkomplex LHCII des Photosystems II durch Elektronenkristallographie bei einer Auflösung von 6 Å (Kühlbrandt und Wang 1991) und wenige Jahre später bei einer Auflösung von 3,4 Å (Kühlbrandt et al. 1994). In den letzten Jahren gelang es dann, die entsprechenden Strukturen des Photosystems und der zugehörigen LHC-Moleküle mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Dies führte zu atomaren Strukturen des LHCII aus Spinat (2,7 Å, (Liu et al. 2004)) siehe auch Abbildung 14, und aus der Erbse (2,5 Å, (Standfuss et al. 2005)).

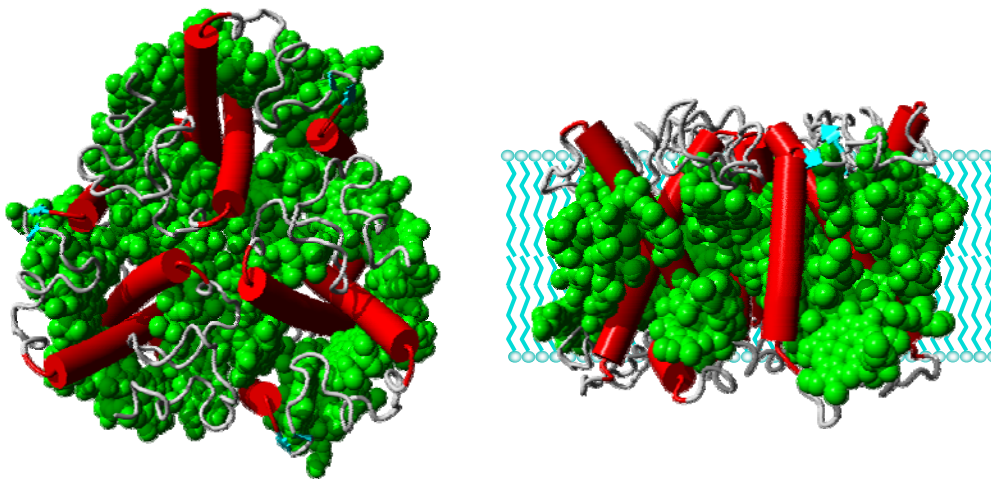


Abbildung 14: Struktur des Lichtsammelkomplexes LHCII aus dem *Spinacia oleracea*

Links: Aufsicht, rechts Seitenansicht in der Membranebene (angedeutet durch schematische Lipide in türkis). Rot: Transmembranhelices des LHC, grau: Loops, grün: Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide), (Liu et al. 2004).

2.2.2.2. LHCI-730

Der Lichtsammelkomplex des Photosystems I besteht aus insgesamt vier Transmembran-Proteinen: Lhca1, 2, 3 und 4. Diese bilden keine Trimere wie LHCII, sondern Heterodimere: Lhca2 und Lhca3 bilden den Komplex LHCI-680, so benannt nach der spezifischen Tieftemperatur-Fluoreszenzemission bei 680 nm; Lhca1 und Lhca4 bilden den Komplex LHCI-730 (Pichersky und Jansson 1996). Die namensgebende Fluoreszenz bei 730 nm wird vor allem von Lhc4 hervorgerufen (Schmid et al. 1997).

Der LHCI-Gürtel ist die bedeutendste Entwicklung im Vergleich zum Photosystem der Cyanobakterien. Die Assoziation des LHC I wird über zwei nur im Photosystem der Pflanzen vorkommende Proteine sichergestellt, PsaG und PsaK (siehe Abbildung 15). Die LHCI-Moleküle werden über eine Helix-Helix-Wechselwirkung des Lhca1 und des PsaG an das Photosystem I gebunden. Die Wechselwirkungen der anderen LHCI-Moleküle mit dem Photosystem sind deutlich geringer. Die Assoziation von Lhca3 an PsaK ist in der Röntgenstruktur nicht endgültig nachweisbar (Ben-Shem et al. 2003, 2004).

PsaH, die dritte Neuerung des Pflanzenphotosystems, ist die Bindungsstelle für LHCII. Das Vorhandensein dieses Proteins ist vermutlich auch der Grund dafür, daß der PS I der Pflanzen keine Trimere bildet wie das Photosystem der Cyanobakterien, sondern nur Monomere. Lunde konnte zeigen, daß die Energieübertragung von LHCII an PS I ohne PsaH nicht möglich ist (Lunde et al. 2000). Doch PsaH macht die Trimerisierung des PS in Pflanzen im Gegensatz zu dem in Cyanobakterien unmöglich, da es am potentiellen Bindungsinterface liegt (Ben-Shem et al. 2003).

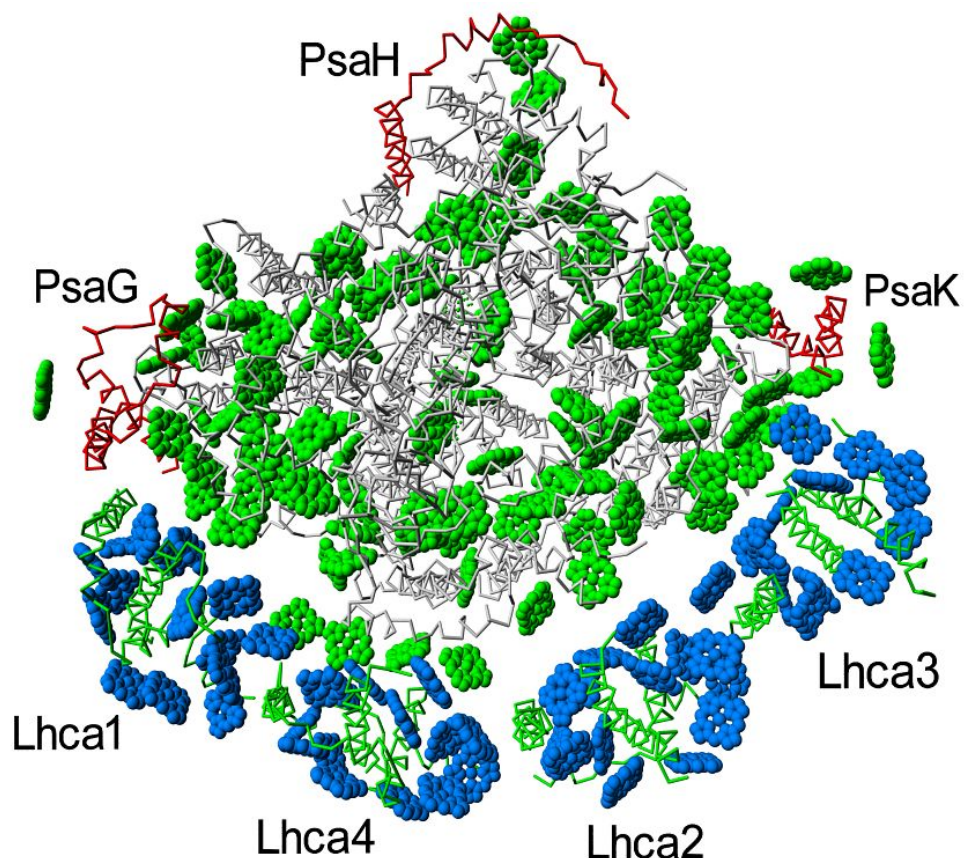


Abbildung 15: Struktur des Photosystems I mit dem Gürtel aus Lichtsammelkomplexen (LHCI)

Die LHCI-Moleküle (grün, Chl in blau) werden über die Helices des Lhca1 und des PsaG (rot) an das Photosystem I (Proteine des Photosystems in grün und rot, Chl in grün) gebunden. Die Wechselwirkungen der anderen LHCI-Moleküle mit dem Photosystem sind deutlich geringer, z.B. über PsaK. PsaH ist die Bindungsstelle für LHCII ((Lunde et al. 2000; Ben-Shem et al. 2003)). Grafik verändert nach Ben-Shem et al. 2003.

Die von Ben-Shem und Kollegen gelöste Röntgenstruktur des Photosystems I hat eine Auflösung von 4,4 Å, daher konnte nur die Lage der Helices und der Porphyrinringe der Chlorophylle gezeigt werden, nicht aber Aminosäure-Seitenketten oder die Phytolreste.

Sehr deutlich hingegen ist die Tatsache, daß die Lhca-Moleküle keine Trimere bilden, trotz der hohen Sequenzidentität zu den Lhcb-Molekülen. Die größten Unterschiede in der Sequenz liegen in den Loop-Bereichen und in der zweiten Helix. Es ist daher zu erwarten, daß der Grund für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten in ebendiesen Bereichen zu suchen ist.

Mit der Identifikation der Aminosäuren, die die Bindung zwischen Lhca1 und Lhca4 vermitteln, beschäftigt sich die Veröffentlichung 3: Corbet D, Schweikardt T, Paulsen H, Schmid V. Amino acids in the second transmembrane helix of the Lhca4 subunit are important for formation of stable heterodimeric light-harvesting complex LHCI-730.

2.2.3. Beteiligung der Lichtsammlerkomplexe an regulatorischen Prozessen

Da die Photosynthese in Pflanzen von den hintereinandergeschalteten Photosystemen PS I und PS II abhängt, ist es wichtig, die zugeleitete Anregungsenergie zwischen den beiden Systemen möglichst gut auszubalancieren, um eine optimale Photosynthese zu gewährleisten. Diese Regulation wird von den Lichtsammlerkomplexen übernommen. Wird z.B. in PSII mehr Plastochinon reduziert, als PSI verarbeiten kann, dann ändert sich das Redoxpotential im Thylakoid, was zur Aktivierung einer Proteinkinase führt. Diese phosphoryliert einen Threoninrest im N-Terminus des LHCII, was zur Dissoziation des LHCII vom PSII und zur Anlagerung an PSI führt. Die Bindestelle hier ist vermutlich PsaH, wie im vorigen Kapitel beschrieben. Dieser Mechanismus – engl. „state transition“ – versetzt die pflanzlichen Photosysteme in die Lage, dynamisch auf die kurzfristige Veränderung der Lichtverhältnisse reagieren zu können.

Die molekulare Grundlage dieses Mechanismus war zu Beginn meiner Dissertation noch unbekannt, es gab aber Hinweise durch Untersuchungen an einem Modellpeptid, daß die Phosphorylierung eine Strukturänderung im N-Terminus hervorruft (Nilsson et al. 1997). Auch Lichteinstrahlung kann offenbar eine Strukturänderung des N-Terminus hervorrufen, denn der N-Terminus von bestrahlten LHCII-Molekülen ist für Proteasen und Kinasen besser zugänglich (Zer et al. 1999; Zer et al. 2003; Vink et al. 2004). Was für diese Theorie spricht, ist, daß selbst die am höchsten aufgelöste Struktur des LHCII bei 2,5 Å nicht den N-Terminus der Monomere zeigen kann (Standfuss et al. 2005) – vermutlich gerade wegen der hohen Mobilität.

Mit der Aufklärung dieses Phänomens durch intramolekulare ESR-Messungen und Homologie-Modellierung haben wir uns in Veröffentlichung 5 beschäftigt: Jeschke G, Bender A, Schweikardt T, Panek G, Decker H, Paulsen H. Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll a/b protein by EPR measurements.

3. Methoden

3.1. Homologie-Modellierung mit MODELLER

3.1.1. Funktionsweise von MODELLER

Das Programm MODELLER benutzt experimentell gelöste Strukturen verwandter Proteine, um die Konformation anderer Proteine mit ähnlicher Aminosäure-Sequenz vorherzusagen (Sali und Blundell 1993; Sali 1995a, 1995b; Fiser und Sali 2003). Homologie-Modellierung ist möglich, weil eine geringfügige Änderung der Sequenz auch nur eine geringfügige Änderung der Struktur zur Folge hat (Chothia und Lesk 1986). Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der *ab-initio*-Modellierung ist die Homologie-Modellierung auch heute noch eine der effektivsten Möglichkeiten, Proteinstrukturen vorherzusagen. Die Genauigkeit der Vorhersage hängt dabei von der Homologie zwischen dem Vorlagen- und Zielprotein ab. Wenn Vorlage und Zielstruktur mindestens 40% Sequenzidentität besitzen, dann wird das Modell im besten Fall für 90% der Atome des Proteinrückgrates eine Abweichung von etwa 1,0 Å zur realen Struktur haben, was eine außerordentliche gute Übereinstimmung bedeutet.

Die Fragestellung der Homologie-Modellierung lautet: wie sieht die wahrscheinlichste Struktur einer Sequenz aus, wenn man sie mit Hilfe eines Sequenzalignments mit verwandten Proteinen bekannter Struktur vergleicht? Das Sequenzalignment definiert sozusagen die homologen Teile der betrachteten Proteine und stellt eine strukturelle Äquivalenz zwischen ihnen her.

Die Vorgehensweise von MODELLER entspricht den folgenden Schritten (Abbildung 16):

- Alignment der zu modellierenden Sequenz mit der bekannten Struktur
- Extraktion der räumlichen Randbedingungen mit Hilfe des Alignments
- Modellierung der Struktur durch Erfüllen dieser räumlichen Randbedingungen

Das Alignment der bekannten Strukturen mit der zu modellierenden Sequenz kann auf verschiedenste Art und Weise hergestellt werden, z.B. mit CLUSTALX (Jeanmougin et al. 1998) und GENEDOC (Nicholas et al. 1997). Die räumlichen Randbedingungen, die zum Modellieren verwendet werden, basieren auf einer statistischen Analyse der Beziehung verschiedener struktureller Merkmale von bekannten Proteinstrukturen.

MODELLER benutzt ein spezielles Alignmentformat (ein erweitertes PIR-Format) und Strukturdateien im PDB-Format (<http://www.wwpdb.org/docs.html>) als Eingabe und wird durch Skripte kontrolliert. Das Programm generiert ein vollständiges Modell des Zielproteins im PDB-Format.

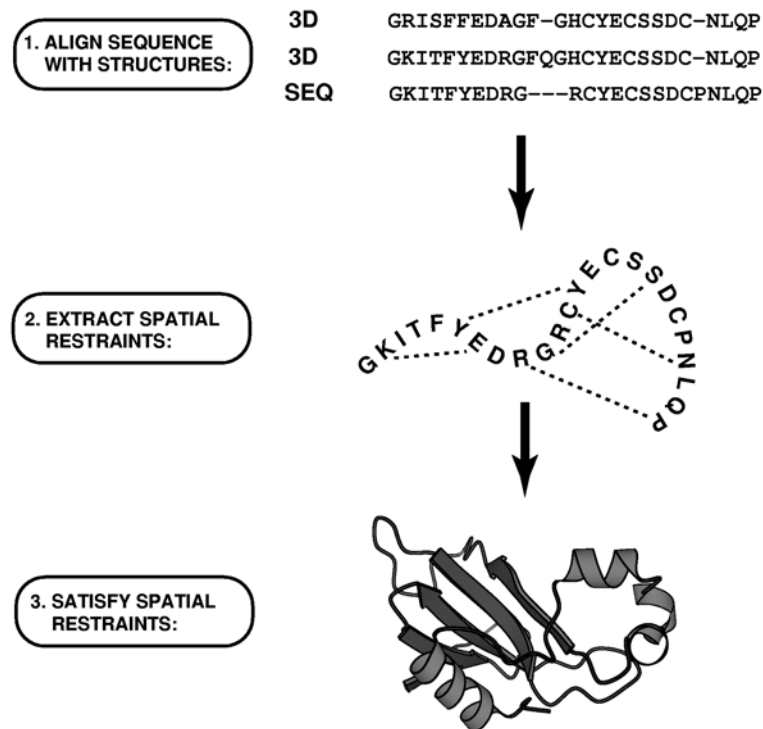


Abbildung 16: Prinzipielle Vorgehensweise von MODELLER

1. Alignment der Sequenz mit homologen Proteinstrukturen
 2. Extraktion der räumlichen Randbedingungen mit Hilfe des Alignments
 3. Modellierung der Struktur durch Erfüllen dieser räumlichen Randbedingungen.
- Verändert nach (Sanchez und Sali 1997)

Um diese Zusammenhänge zu quantifizieren (wie z.B. die Beziehung der Rückgratkonformationen zweier äquivalenter Aminosäuren aus zwei verwandten Proteinen zueinander), wurde eine Datenbank mit 416 Proteinen in 105 Sequenzalignments erstellt. Die gefundenen Beziehungen werden in Form von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (WDF, engl. probability density function, pdf) für die vorherzusagenden Strukturmerkmale ausgedrückt. Die Wahrscheinlichkeit z.B. für das Auftreten bestimmter Dihedralwinkel (ϕ/ψ) wird unter Berücksichtigung der Art der Aminosäure, der Rückgratkonformation der äquivalenten Aminosäure und der Sequenzidentität zwischen den beiden verglichenen Proteinen berechnet. Das dreidimensionale Modell eines Proteins wird durch die Optimierung der molekularen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion erreicht, die eine Kombination aller einzelnen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen des Moleküls darstellt.

Eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (WDF) hat die Form $p(x)$, wobei x das einzuschränkende Merkmal ist. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Wertes $x_1 \leq x \leq x_2$ erhält man durch Integration von p :

$$p(x_1 \leq x \leq x_2) = \int_{x_1}^{x_2} p(x) dx$$

Diese Form ist sehr viel differenzierter als z.B. die Angabe des Durchschnittswerts oder der Ober- und Untergrenze der möglichen Werte.

Eine WDF beschreibt das Merkmal x und hängt direkt von den Werten der sie beschreibenden Parameter a, b, \dots bis z ab:

$$p(x|a,b,\dots,z)$$

Man erhält natürlich nie die reale WDF, sondern nur ihre Näherung:

$$p(x|a,b,\dots,z) \approx W_{x,a,b,\dots,z} \approx f(x,a,b,\dots,z,q)$$

Hierbei ist $W_{x,a,b,\dots,z}$ eine Tabelle mit den beobachteten absoluten Häufigkeiten, mit denen ein Wert für „ x “ in der Datenbank auftritt, und zwar abhängig von den Parametern a,b,\dots,z (die die Achsen der Tabelle bilden), und „ f “ ist die an diese Tabelle angepasste Funktion mit dem Parameterset q , wobei das ideale Set an q das Ergebnis der folgenden Gleichung minimiert.

$$r.m.s. = \sqrt{\sum_{x,a,b,\dots,z} [W_{x,a,b,\dots,z} - f(x,a,b,\dots,z,q)]^2}$$

Die Funktion f ist spezifisch für die vorauszusagende Eigenschaft x .

Die benötigten relativen Häufigkeiten W erhält man aus den absoluten Häufigkeiten W' , die wiederum durch Auszählen der entsprechenden Einträge aus der Analyse der Datenbank erhalten werden:

$$W_{x,a,b,\dots,z} = \frac{W'_{x,a,b,\dots,z}}{\sum_x W'_{x,a,b,\dots,z}}$$

Die resultierende multidimensionale Tabelle, deren Achsen von den Parametern gebildet werden, enthält die relativen Frequenzen. Die Parameter, die dabei statistisch erfasst werden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zur Erstellung der multidimensionalen Frequenztabellen W' verwendete Parameter.

Die Tabellen charakterisieren die Häufigkeit, in der man verschiedene Parameterkombinationen in der verwendeten Datenbank (416 Proteine in 105 Aligments) antrifft; Tabelle aus (Sali und Blundell 1993).

Index	Variable	Feature
1	r	amino acid residue type
2	Φ	main chain dihedral angle Φ
3	Ψ	main chain dihedral angle Ψ
4	t	secondary structure class of a residue
5	M	main chain conformation class of a residue
6	α	fractional content of residues in the main chain conformation class A
7	χ_i	side chain dihedral angle χ_i , $i = 1, 2, 3, 4$
8	c_i	side chain dihedral angle χ_i class, $i = 1, 2, 3, 4$
9	a	residue solvent accessibility
10	\bar{a}	average accessibility of two residues in one protein
11	s	residue neighbourhood difference between two proteins
12	\bar{s}	average residue neighbourhood difference between two proteins
13	i	fractional sequence identity between two proteins
14	d	$C^\alpha-C^\alpha$ distance
15	Δd	difference between two $C^\alpha-C^\alpha$ distances in two proteins
16	h	main chain N-O distance
17	Δh	difference between two main chain N-O distances in two proteins
18	b	average residue B_{iso}
19	R	resolution of X-ray analysis
20	g	distance of a residue from a gap in an alignment
21	\bar{g}	average distance of a residue from a gap

Die Abhängigkeit der vorauszusagenden strukturellen Eigenschaft „ x “ von den verschiedenen Parametern wurde von den Programmierern in Testläufen ermittelt. Es wird immer die WDF gewählt, deren Parameterkombination die höchste Voraussagegenauigkeit im Rahmen der zur Verfügung stehenden Information bietet.

Es gibt WDF, die die *stereochemischen Eigenschaften* der Modelle beschränken wie z.B. Bindungsabstände und Bindungswinkel zwischen Atomen einer Aminosäure. Diese wurden in den ersten Versionen aus dem GROMOS-Krafffeld (Berendsen et al. 1984)) übernommen, in den neueren Versionen von Modeller aus dem CHARMM-Krafffeld (MacKerell et al. 1998). Weiterhin gibt es WDF, die *homologiebasiert* sind (wie Abstandsverteilungen von bestimmten C^α -Atomen in Modell und Vorlage) und als dritte Möglichkeit *benutzerdefinierte* WDF, mit denen man die Möglichkeit hat, bestimmte Eigenschaften des zu modellierenden Moleküls zu definieren, z.B. aus Experimenten bekannte Abstände zwischen Atomen.

Alle diese WDF werden zu einer Gesamtfunktion P zusammengefasst (engl. „molecular pdf“). Die Objective Function OF ist der negative natürliche Logarithmus des Gesamt-WDF P :

$$OF = -\ln(P)$$

Diese Objective Function wird im Verlaufe der Modellierung optimiert (Abbildung 17). Je niedriger der Wert von OF für ein Modell ist, desto besser wurden die Randbedingungen, die zur Modellierung verwendet wurden, erfüllt: die stereochemischen Parameter sind in Ordnung, die aus den Vorlagestrukturen errechneten homologiebasierten Parameter konnten im Modell umgesetzt werden, und auch die vom Benutzer vorgegebenen Abstände wurden berücksichtigt. Mit der Objective Function sollten sich Modelle vergleichen lassen, die unter denselben Bedingungen modelliert wurden (Parameter, Vorlagenmolekül, etc).

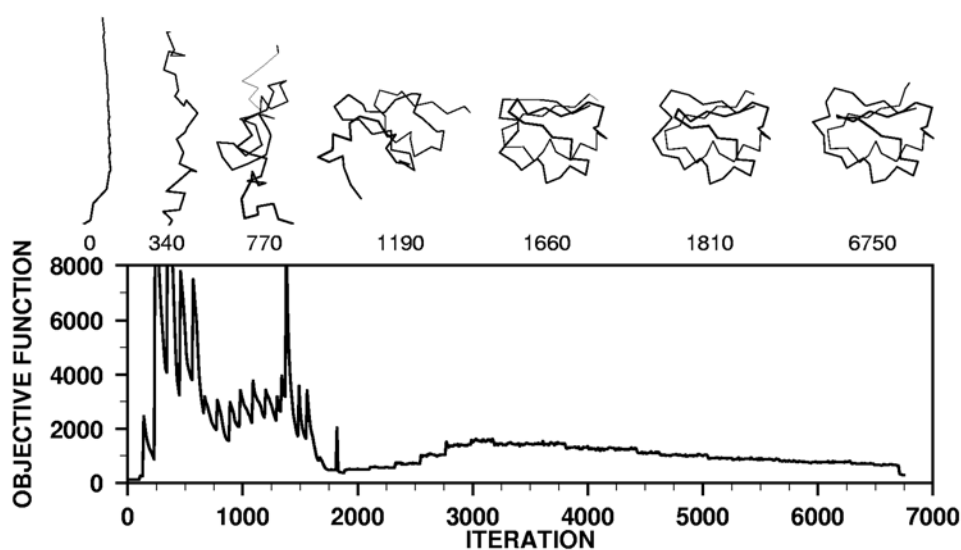


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Optimierung der Objective Function

Optimierung der Objective Function durch die Methoden „Conjugate Gradients“ (bis Iterationstiefe 2000) und „Molecular dynamics with simulated annealing“, aus (Sánchez und Sali 1997)

Allerdings ist die Objective Function erwiesenermaßen kein Maß für die Güte eines Modells und bietet kein effektives Auswahlkriterium zur Identifikation des Modells mit der geringsten Abweichung zur Realität (siehe Diplomarbeit Thorsten Schweikardt, 2001 und mündliche Mitteilung Maya Topf, 2005). Die Evaluation der Modelle muß daher von anderen Programmen (z.B. PROCHECK, WHATIF, YASARA und PROSA) und dem Experimentator übernommen werden.

Beispiel: Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für einen homologen C_{α} - C_{α} -Abstand

Im Falle der hier beschriebenen, homologiebasierten WDF, die den Abstand der C_{α} -Atome zweier Aminosäuren in einem Protein beschreibt (d), wäre die wertvollste Information der äquivalente C_{α} - C_{α} -Abstand in einem verwandten Protein: d' . Sollte diese Information nicht vorhanden sein, dann wird eine WDF verwendet, die diesen Parameter nicht benötigt. Eine solche WDF kann - wenn keine homologiebasierten Werte zur Verfügung stehen - auch nur

auf empirisch ermittelte Werte zurückgreifen, was allerdings die Vorhersagegenauigkeit herabsetzen würde, wie Tabelle 4 zeigt.

Tabelle 4: Voraussagegenauigkeit von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen

Hier wird die Konformation des Proteinerückgrats (M) durch Einbeziehung verschiedener Parameter vorhergesagt. Die höchste Vorhersagegenauigkeit der aufgezählten WDF (76,1%) hat jene PDF, die als Parameter M' , r und i benutzt. Dabei ist M' die äquivalente Rückgratkonformation im Vorlagenprotein, r die Art der Aminosäure und i die Sequenzidentität der beiden Proteine. Weitere Abkürzungen siehe Tabelle 3. Diese Tabelle wurde verändert nach (Sali und Blundell 1993)

Pdf	% correctly predicted	
	non-smth	smth
uniform pdf	16.7	16.7
$p(M)$	27.9	27.9
$p(M/r)$	33.2	33.2
$p(M/t')$	54.0	54.0
$p(M/M')$	70.2	70.2
$p(M/t', r)$	58.4	58.4
$p(M/M', r)$	72.6	72.5
$p(M/M', r, s)$	73.5	73.3
$p(M/M', r, i)$	76.3	76.1
$p(M/M', r, \alpha')$	72.4	72.3
$p(M/M', r, b')$	71.7	71.6
$p(M/M', r, a')$	71.4	71.3
$p(M/M', r, R')$	71.7	71.6
$p(M/M', r, g)$	74.0	73.7
$p(M/M', r', c'_1)$	72.0	71.9
$p(M/M', r, s, g)$	72.9	73.8
$p(M/M', r, a', g)$	72.0	73.3
$p(M/M', r, a', s)$	72.0	73.2

Die folgende WDF aus Sali und Blundell, 1993 beschreibt die Übertragbarkeit der Distanz zweier $C\alpha$ -Atome von der Vorlage auf das Zielprotein, in Abhängigkeit von der Distanzlänge d' , der durchschnittlichen Zugänglichkeit der Aminosäuren \bar{a}' , der Sequenzidentität zwischen den beiden Proteinen i und dem Abstand der Aminosäuren von Lücken im Alignment \bar{g} :

$$p(d | \bar{g}, i, \bar{a}', d') = \frac{1}{\sigma(\bar{g}, i, \bar{a}', d') \sqrt{2\pi}} \times \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{d - d'}{\sigma(\bar{g}, i, \bar{a}', d')} \right)^2 \right] \quad \text{mit}$$

$$\begin{aligned} \sigma(\bar{g}, i, \bar{a}', d') = & 0.849 - 2.033 \bar{g} - 1.227 i + 0.971 \bar{a}' + 1.467 d' + \\ & 1.382 \bar{g}^2 + 1.539 \bar{g}i - 0.504 \bar{g}\bar{a}' - 0.259 \bar{g}d' + 2.412 i^2 - 1.496 i\bar{a}' - \\ & 3.094 id' - 0.425 \bar{a}'^2 + 0.670 \bar{a}'d' - 0.159 d'^2 - \\ & 0.307 \bar{g}^3 - 0.213 \bar{g}^2i + 0.088 \bar{g}^2\bar{a}' + 0.020 \bar{g}^2d' - 0.969 \bar{g}i^2 + 0.453 \bar{g}i\bar{a}' + \\ & 0.177 \bar{g}id' - 0.058 \bar{g}\bar{a}'^2 - 0.042 \bar{g}\bar{a}'d' + 0.020 \bar{g}d'^2 - 0.847 i^3 + \\ & 0.055 i^2\bar{a}' + 1.546 i^2d' + 0.527 i\bar{a}'^2 - 0.220 i\bar{a}'d' + 0.254 id'^2 + \\ & 0.066 \bar{a}'^3 + 0.153 \bar{a}'^2d' - 0.153 \bar{a}'d'^2 - 0.0019 d'^3 \end{aligned}$$

Dabei beschreibt $\sigma(\bar{g}, i, \bar{a}', d')$ die Wichtung der Parameter, die man benutzen muß, um die Form der WDF (die in diesem Fall Gaußfunktionen ähneln) an das Histogramm der Werte für d anzugleichen (siehe Abbildung 18). Dieses Histogramm erhält man durch Auslesen der Datenbank, die Wichtung der Parameter wird anschließend durch eine Regressionsanalyse (Least-Squares-Fit) berechnet.

Ziel ist die Generierung einer WDF, die die bekannten Daten, repräsentiert durch das Histogramm, möglichst gut beschreibt.

Es erscheint logisch, daß die Übertragbarkeit einer Eigenschaft dann am höchsten ist, wenn z.B. die Sequenzidentität der beiden Proteine hoch ist, und der Abstand der Aminosäuren von einer Lücke im Alignment sehr groß.

Hohe Sequenzidentität und großer Abstand von einer Lücke im Alignment bedeuten gute Übertragbarkeit von Eigenschaften. Hat man die in Abbildung 18 gezeigte WDF erhalten, bedeutet das, daß MODELLER bei der Optimierung des Modells versucht, die Distanz d möglichst einen der beiden Idealwerte (18 Å und 22,5 Å in Abbildung 18) annehmen zu lassen. Ist dies nicht möglich, dann trägt die Abweichung des Wertes d zu einer schlechteren molekularen PDF bei. Dies bedeutet, daß das Modell suboptimal ist.

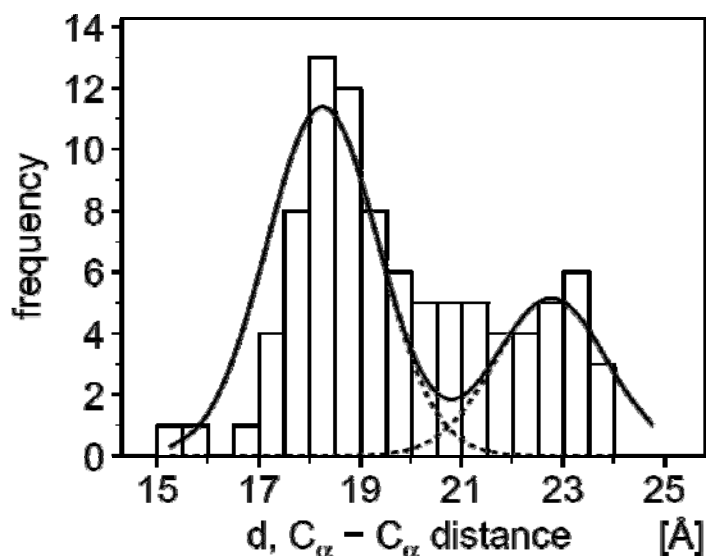


Abbildung 18: Beispiel einer Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für den C_α-C_α-Abstand zweier Aminosäuren

Beispielhaftes Histogramm der in der Datenbank vorhandenen Häufigkeiten des C_α-C_α-Abstand zweier Aminosäuren und die angepasste WDF als Linie. Verändert nach (Sali und Blundell 1993)

Beispiel: Nicht-homologiebasierte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

Man kann die WDF

$$p(\chi_1 | AS, \Phi, \Psi)$$

dazu benutzen, den Seitenkettendihedralwinkel χ_1 einer Aminosäure in Abhängigkeit von der Art der Aminosäure (Leucin, Tyrosin, Arginin etc) und den Dihedralwinkeln Φ und Ψ des Aminosäurerückgrats vorherzusagen, also rein empirisch. Die Aussage, die aus der obigen WDF folgen kann ist z.B.: „Wenn die Aminosäure Serin 86 im zu modellierenden Molekül die Hauptkettendihedralwinkel $\Phi = -60^\circ$ und $\Psi = -60^\circ$ einnimmt, dann beschreibt folgende Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion den eingenommenen Seitenkettendihedralwinkel χ_1 “:

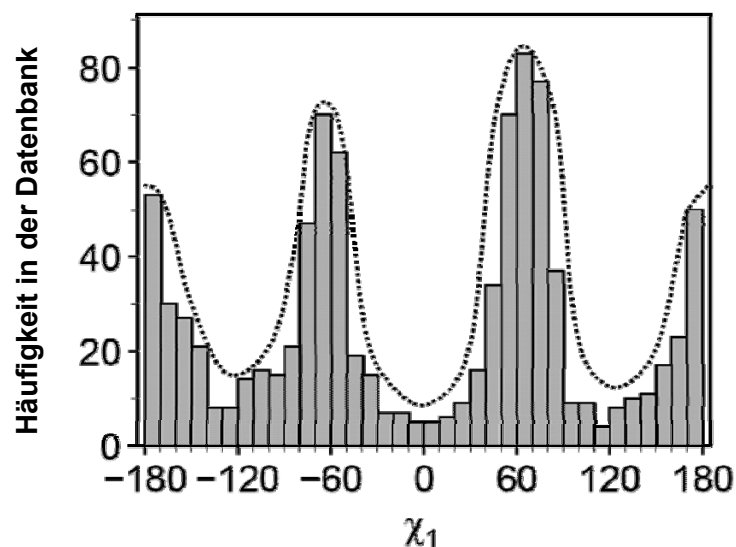


Abbildung 19: Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Seitenkettenwinkel χ_1 , und angepasste WDF
 Beispielhafte Grafik mit empirisch ermittelten Häufigkeiten (Balken) und hinzugefügter WDF (gestrichelte Linie), verändert nach (Sali und Blundell 1993)

Die Abbildung 19 ist eine beispielhafte Grafik. Sie zeigt durch Balken die Häufigkeit, mit der bestimmte Seitenkettenwinkel für Serin in der von Modeller benutzten Datenbank vorkommen – wenn die Hauptkettendihedralwinkel $\Phi = -60^\circ$ und $\Psi = -60^\circ$ sind. Man erkennt drei Werte für den Seitenkettenwinkel χ_1 , die häufiger vorkommen als andere: ca. 60° , -60° und -180° .

Sinnvoll für die Modellierung ist eine bestimmte WDF nur dann, wenn alle für diese WDF spezifischen Parameter außer „ x “ bekannt sind. Wenn also in obiger Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p(\chi_1 | AS\text{-}Typ, \Phi, \Psi)$ der Parameter „Dihedralwinkel Φ “ nicht bekannt ist – z.B. weil es sich bei der Aminosäure, deren Seitenkettenkonformation vorhergesagt werden soll, um den N-Terminus handelt – dann kann die obige Funktion nicht zur Bestimmung der Seitenkettenkonformation eingesetzt werden. Man benötigt in diesem Fall eine WDF, die nicht vom Parameter „Dihedralwinkel Φ “ abhängig ist, und auf ein anderes Parameterset zurückgreift.

3.1.2. Die Evaluation der Homologie-Modelle

Es stehen recht viele Programme zur Verfügung, die Proteinstrukturen nach unterschiedlichen Gesichtspunkten überprüfen können. Die in dieser Arbeit benutzten Programme sollen hier kurz angesprochen werden.

WHATIF

WHATIF (Vriend 1990; Hooft et al. 1996) ist ein Programmpaket zur Visualisierung, Modellierung, Analyse und Modifikation von Proteinstrukturen. Zur Überprüfung der von MODELLER generierten Strukturen auf korrekte Stereochemie und sinnvolle Aminosäure-Packung wurde der FULCHECK-Befehl von WHATIF benutzt.

Die Analyse der Aminosäure-Packung basiert auf empirischen Analysen bekannter Proteinstrukturen. Findet man in einem Modell eine Aminosäure in räumlicher Nähe zu Atomen, in deren Umgebung die Aminosäure sich auch in der Datenbank sehr häufig befindet, dann wird diese Konfiguration als „gute“ Packung angesehen. Eine ungewöhnliche Anordnung von Atomen hat einen negativen Einfluß auf den Wert der Packungsqualität bestimmter Aminosäuren und wird im entsprechenden Graphen als negativer Ausschlag sichtbar.

Es wurde ausschließlich die „first generation packing quality“ benutzt, da die weiterentwickelte „second generation packing quality“ sich nicht zur Evaluation von Homologie-Modellen eignet (persönliche Mitteilung Gert Vriend, WHATIF-Kurs 2000). Der Gesamtwert der „first generation packing quality“ ist nicht allzu aussagekräftig, aber die Auftragung der individuellen Werte für jede einzelne Aminosäure kann auf potentiell problematische Regionen in der Struktur hinweisen.

PROCHECK

PROCHECK (Morris et al. 1992; Laskowski et al. 1993) dient der Überprüfung der stereochemischen Eigenschaften von Proteinen. Die Struktur wird anhand zahlreicher Tests charakterisiert, u.a. Ramachandranplots für das gesamte Protein oder für jeden einzelnen Aminosäurentyp; χ_1 - χ_2 -Plots, mit deren Hilfe man die Stellung der Seitenkette einer Aminosäuren analysieren kann; Plots der Planarität von Seitenketten; sowie Tests der Bindungslängen und -winkel zwischen den Atomen des Proteinerückgrats. Alle diese aus der modellierten Struktur berechneten Werte werden mit Werten von 118 Strukturen verglichen, die röntgenkristallographisch bei Auflösungen unter 2,0 Å ermittelt wurden. Als Ergebnis erhält man sogenannte G-Faktoren, welche die Normalität des getesteten Proteins zum Vergleichsdatensatz anzeigen.

PROSA

„PROSA“ steht für Protein Structure Analysis (Sippl 1993). Das Programm benutzt zur Analyse von Proteinstrukturen ein empirisches Modell, welches auf den gemessenen Abständen der Aminosäuren in Proteinen (Datenbank aus über 200 Röntgenstrukturen) beruht. Die Häufigkeiten, mit denen Aminosäuren in bestimmten Abständen voneinander angetroffen werden, wurden durch das inverse Boltzmann-Gesetz in Pseudo-Energiepotentiale für alle denkbaren Aminosäure-Aminosäure-Kombinationen überführt, mit deren Hilfe der Energiegehalt von Proteinen berechnet wird. Basierend auf diesem Energiegehalt wird der „Z-Score“ berechnet (Sippl 1993).

Die von PROSA errechneten Z-Scores sind negativ linear mit der Länge einer Aminosäuresequenz korreliert. Die Z-Scores für Homologie-Modelle, die eine hohe Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur aufweisen, liegen erfahrungsgemäß näher an der Ideal-Geraden als solche Modelle, die eine niedrigere Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur aufweisen (Diplomarbeit Thorsten Schweikardt, 2001).

Durch Vergleich des Z-Scores der Modellstrukturen mit dem typischen Z-Score eines Proteins gleicher Länge läßt sich also feststellen, ob aufgrund von „Fehlfaltungen“ der Energiegehalt der Struktur vom Sollwert abweicht. Ist das vorgegebene Faltungsmotiv nicht geeignet für die zu modellierende Sequenz, dann kommt es zu ungünstigen Wechselwirkungen – z.B. weil sich gleichgeladene Aminosäuren zu nahe sind – die die Struktur in der Realität destabilisieren würden.

Diese Idee ähnelt grundsätzlich den „Packing scores“ von WHATIF, die ebenfalls auf einer empirischen Methode beruhen. Der „Energiebeitrag“ eines Aminosäuren-Paares hängt bei PROSA davon ab, ob dieses Paar in diesem bestimmten Abstand häufig in der Datenbank vorkommt oder nicht. Kommt es häufig vor, dann ist der Energiebeitrag für die Proteinstruktur als negativ eingestuft (also stabilisierend) und umgekehrt. Sind die Z-Scores eines modellierten Ensembles zu hoch, weist das auf die Verwendung einer weniger gut oder nicht geeigneten Vorlagenstruktur hin (Diplomarbeit Thorsten Schweikardt, 2001).

Nach wie vor gibt es keine sichere Methode, aus einem Ensemble von modellierten Molekülstrukturen das „beste Modell“ auszuwählen (mündliche Mitteilung Maya Topf, Houston, 2005). Maya Topf gehört zur Arbeitsgruppe um Andrej Šali, dem Initiator von MODELLER. Inzwischen hat die Gruppe neue Evaluationsmethoden für Modelle entwickelt und direkt in die neuesten Versionen von MODELLER integriert, so z.B. das DOPE-Potential (Shen und Sali 2006) oder das GA431-Potential (Melo et al. 2002; John und Sali 2003), die dabei helfen sollen, die Analyse und Auswahl der Modelle zu erleichtern .

3.1.3. Informationsgehalt von Homologie-Modellen

Der Informationsgehalt einer modellierten Proteinstruktur ist abhängig von der Sequenzidentität (Abbildung 20), denn mit zunehmender Divergenz erhöht sich auch die Wahrscheinlichkeit, daß sich das Faltungsmotiv des Proteins ändert. Dies folgert aus der schon erwähnten Beobachtungen von Chothia und Lesk 1986 sowie Koehl und Levitt 2001. Außerdem steigt mit abnehmender Sequenzidentität die Wahrscheinlichkeit von Fehlern im Alignment. Da das Sequenzalignment den strukturellen Kontext zwischen Vorlage und Zielprotein herstellt, sind solche Fehler im weiteren Verlauf der Modellierung nicht mehr zu korrigieren und führen unweigerlich zu fehlerhaften Proteinstrukturen.

Die Verlässlichkeit der Modellierung kann dadurch gesteigert werden, daß man mehr als ein Protein derselben Proteinfamilie in das Sequenzalignment miteinbezieht (Marti-Renom et al. 2004). Nützlich sind auch funktionelle Informationen über das vorherzusagende Molekül, wie z.B. Mutationsanalysen am aktiven Zentrum (Schweikardt et al. 2007) oder experimentelle Daten aus NMR oder ESR (Jeschke et al. 2005). Die Kombination verschiedener Aufklärungsmethoden wie EM, Röntgenkristallographie, SAXS und NMR-Spektroskopie wird schon länger erfolgreich praktiziert (Decker et al. 1996; Sali und Kuriyan 1999; Voit et al. 2000; Hartmann und Decker 2002; Topf et al. 2005).

Konkret bedeutet dies, daß man auch Modelle, die aus einer Modellierung hervorgegangen sind, die auf einer geringen Sequenzidentität beruht, tiefergehend interpretieren darf, als es die reine Sequenzidentität zwischen Vorlage- und Zielprotein suggeriert.

Weiß man zum Beispiel, daß zwei Moleküle ähnliche Funktion besitzen, ähnliche Substrate umsetzen, dieselben Kofaktoren benutzen, sich spektroskopisch ähnlich verhalten und gleiche evolutionäre Wurzeln besitzen, dann kann man auch ein Modell, welches bei einer Sequenzidentität von „nur“ 25% erstellt wurde (Sanchez und Sali 1998), viel detaillierter interpretieren als nur auf der Faltungsmotiv-Ebene.

Grund hierfür ist, daß es sehr wohl Ausnahmen gibt, was den Zusammenhang zwischen dem Grad der Aminosäure-Konservierung und der strukturellen Übereinstimmung angeht. Wenn für die Ausübung einer Funktion eine bestimmte Proteinstruktur notwendig ist, dann kann auch die Entwicklung zweier Proteinfamilien mit unterschiedlichen Sequenzmustern eine strukturelle Konvergenz auf molekularer Ebene zur Folge haben.

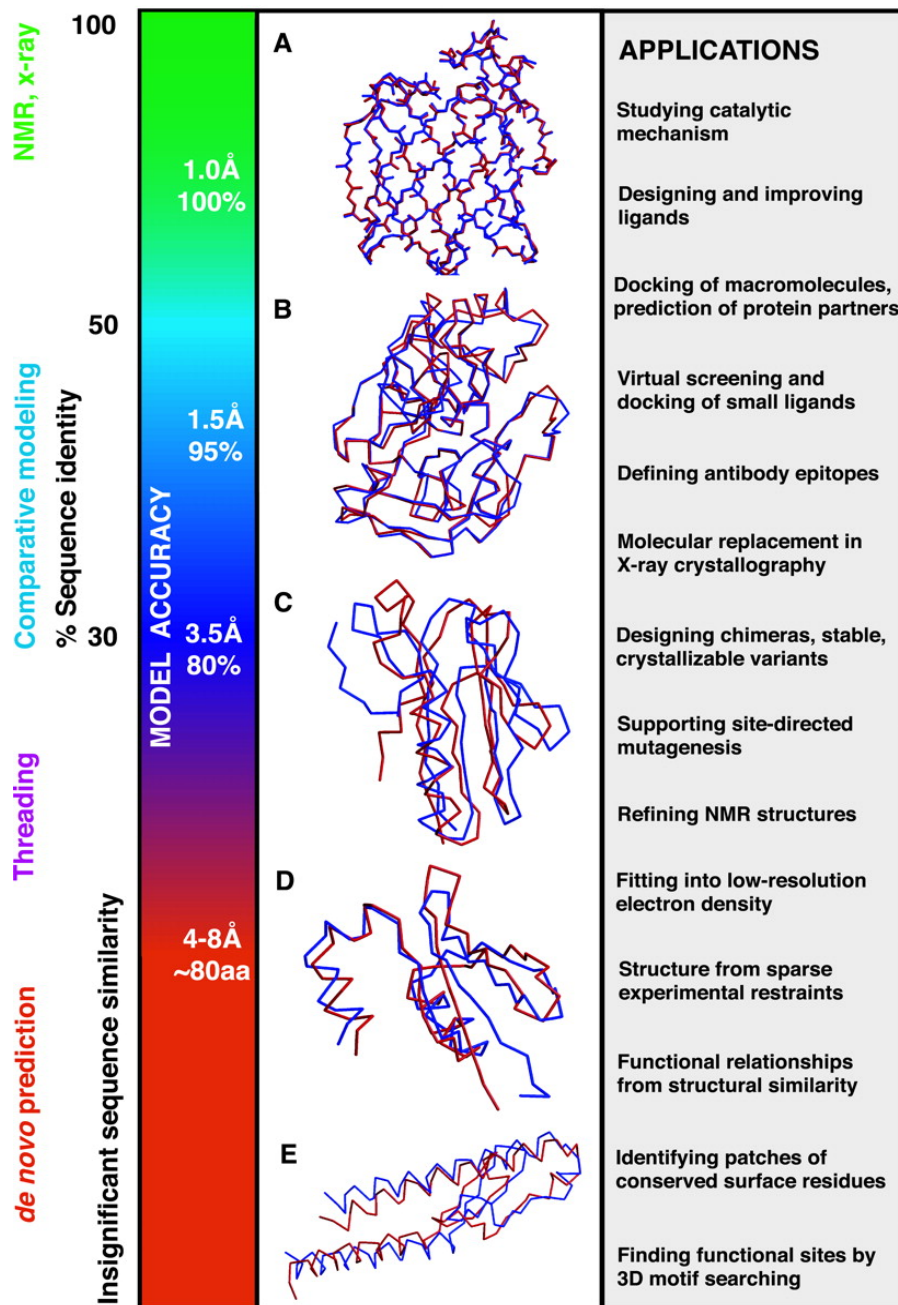


Abbildung 20: Verwendungsmöglichkeiten für Modelle, die bei verschiedenen Sequenzidentitäten zur Vorlage modelliert wurden

Grafik aus (Baker und Sali 2001). Ganz links ist die Methode angegeben, die zur Modellierung verwendet werden kann, daneben die Sequenzidentität zwischen Vorlage und Zielprotein sowie die zu erwartende Genauigkeit des resultierenden Modells. Die Moleküle sind Beispielstrukturen, die bei Identitäten von A) 60%, B) 40%, C) 30% modelliert oder mittels *de-novo*-Methoden ohne Vorlage vorhergesagt wurden (D, E). Die roten Strukturen sind die Modelle, die blauen Strukturen die entsprechenden Röntgenstrukturen.

3.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie wird in immer mehr Gebieten der Biologie als Methode zur Strukturaufklärung eingesetzt (Auer 2000) – sei es auf Proteinebene (Saibil 2000), Organellebene (Nicastro et al. 2000; Stoffler et al. 2003) oder gar zur Betrachtung von ganzen Zellen (Steven und Aebi 2003; Kurner et al. 2005; Cyrklaff et al. 2007). Zum Ziel dieser Arbeit gehörte es, die Struktur großer Proteinkomplexe zu klären. Die Methode der Wahl war hier die Einzelpartikelanalyse (Frank 2006).

3.2.1. Probleme der TEM

Bei jeder Rekonstruktions-Methode kämpft man mit denselben Problemen, die alle zur Verringerung der Auflösung führen können und auch bei der Einzelpartikelanalyse auftreten: Strahlschäden an den Proteinen durch Elektronen und ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis (SRV). Für eine dreidimensionale Einzelpartikelrekonstruktion ist es überdies erforderlich, verschiedene Ansichten der Partikel zu haben (Frank 2006). Liegen die Partikel auf dem Probenträger nicht entsprechend, so kann dieser gekippt werden.

Im EM herrscht fast absolutes Vakuum, was Lösungsmittel verdampfen lässt. Diese Dehydrierung der Proteine führt zu unerwünschten Strukturänderungen, muß also verhindert werden. Möglichkeiten hierzu sind bei Zellschnitten zum Beispiel Fixierungen und Einbettungen sowie im Bereich der Proteine die Negativkontrastierung auf einer Oberfläche. Hierbei wird eine Proteinlösung auf einen Träger aufgebracht – einen Kohlefilm, der auf einem Kupfernetzchen liegt – und danach mit einem kontrastgebenden Schwermetall behandelt (Harris 1997; Saibil 2000; Frank 2006).

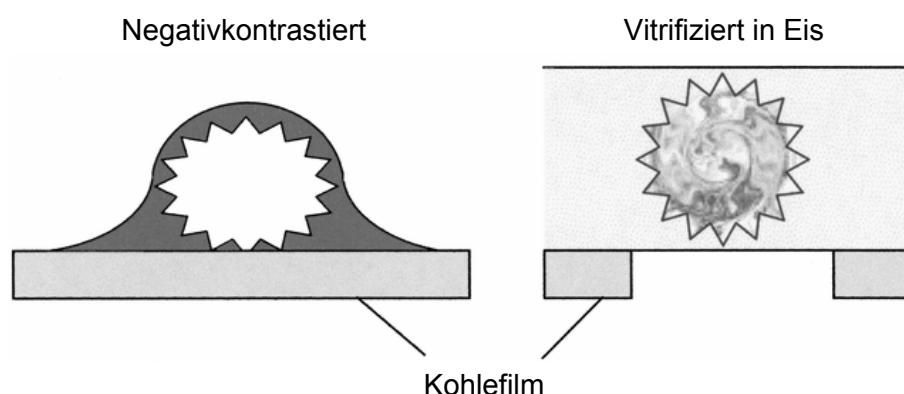


Abbildung 21: Einbettung eines Proteins bei Negativkontrastierung und Vitrifizierung

Vitrifizierung ist die Einbettung in glasartigem Eis, das keine Kristalle bildet. Verändert nach Saibil 2000.

Diese Methode ist allerdings auf niedrige Auflösungen beschränkt. Gründe für die niedrige Auflösung sind die durch die Adsorption des Moleküls an die Oberfläche und durch die Kontrastierung entstehenden Abbildungsartefakte (Harris 1997): Das Kontrastmittel streut die Elektronen nicht nur, sondern absorbiert sie auch, und verursacht damit das Auftreten eines sogenannten Amplitudenkontrastes. Dies bedeutet, daß das Bild des Proteins nicht durch reinen Phasenkontrast entsteht. Die Adsorption der Moleküle an den Kohlefilm kann zu Formänderungen führen und, da das Kontrastmittel immer ein geladenes Teilchen ist,

werden hydrophobe Taschen auf der Proteinoberfläche oder im Inneren schlechter aufgelöst. Der Grund hierfür ist, daß das Kontrastmittelion nicht in den hydrophoben Bereich eindringen kann. Bei gut löslichen Proteinen kann auch das Gegenteil passieren, daß nämlich die Ionen an die gegensätzlich geladenen Aminosäurereste an der Oberfläche binden und es zu einer verstärkten Anlagerung kommt.

3.2.2. Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie (cryoTEM)

Hierunter versteht man die Einbettung von Proteinen in glasartigem oder „vitrifiziertem“ Eis. Man schockgefriert die Proteine durch Einschießen („plunge-freeze“) in flüssiges Ethan bei Temperaturen von etwa 110 Kelvin. Dadurch bilden sich keine Eiskristalle, welche die Proteinstruktur schädigen können. (Saibil 2000; Chiu et al. 2005; Jiang, W. und Ludtke 2005; Frank 2006)

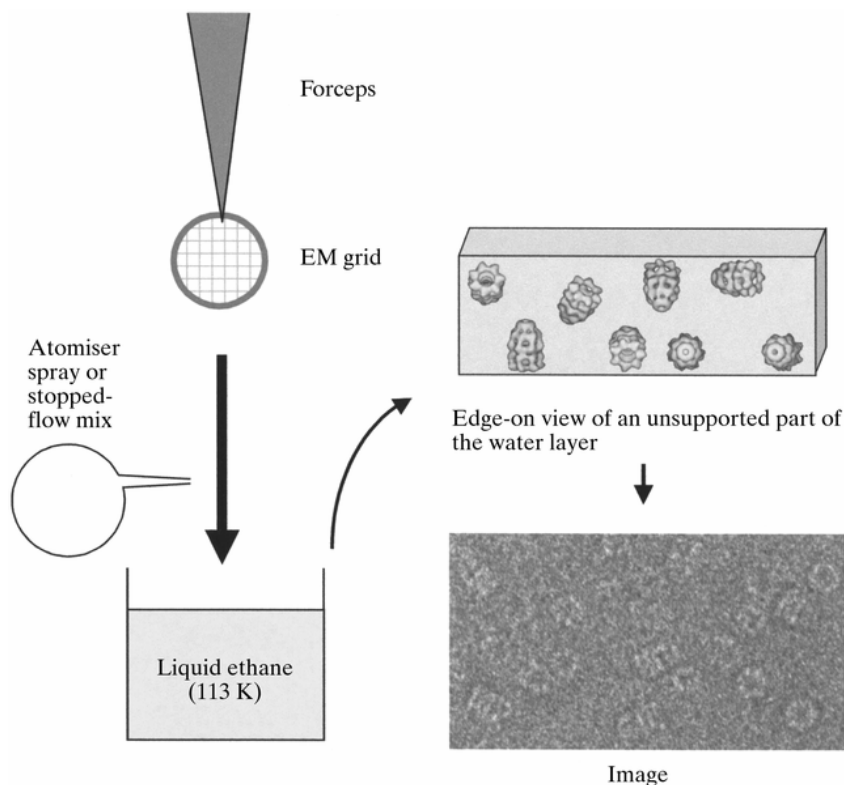


Abbildung 22: Prinzip der Vitrifizierung für die Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie

Aufbringen der Probenlösung auf ein Kupfernetzchen mit löchrigem Kohlefilm und nachfolgendes Einschießen in flüssiges, stickstoffgekühltes Ethan, aus (Saibil 2000)

3.2.3. Probleme der Cryo-TEM und der Einzelpartikelanalyse

Das bildgebende Phänomen der EM ist der Phasenkontrast. Durch die Probe elastisch gestreute Elektronen interferieren mit dem ungebrochenen Elektronenstrahl und erzeugen so das Bild. Inelastisch gestreute Elektronen hingegen geben ihre Energie an die Probe ab und sind daher für die Strahlschäden verantwortlich, hauptsächlich durch Ionisierung. Das

Verhältnis elastisch / inelastisch gestreuter Elektronen ist 1 : 3. Da 10^8 - 10^{10} mal weniger Moleküle zur gleichen Zeit beobachtet werden als in der Röntgenkristallographie, macht sich dieser Strahlschaden sehr viel schneller bemerkbar und reduziert somit die mögliche Auflösung (Henderson 1995). Aus diesem Grund verwendet man den sogenannte LowDose-Modus, bei dem die Moleküle maximal 10-20 Elektronen pro \AA^2 ausgesetzt werden. Dies führt allerdings zu einem sehr schwachen Signal, da der Kontrastunterschied zwischen Eis und Protein gering ist, und macht eine umfangreiche Nachbearbeitung der Bilder notwendig, um eine Verbesserung des Signals herbeizuführen. Weiterhin müssen Abbildungsartefakte der Optik korrigiert werden (Frank 2006).

Die Verbesserung des SRV kann man durch Mittelung vieler Partikel in gleicher Orientierung erreichen. Dadurch wird das statistische Rauschen des EM gemindert. Bei der Einzelpartikelanalyse muß erst eine Klassifikation sowie eine translationale und rotationale Ausrichtung durchgeführt werden, bevor eine Mittelung möglich ist. Zwischen der Verbesserung des SRV und einer möglichst hohen Auflösung besteht ein Widerspruch: Theoretisch führen mehr gemittelte Partikelabbildungen zu einer Verbesserung des SRV und damit der Auflösung. Strukturelle Heterogenität einer großen Partikelpopulation zwingt jedoch zu einer Auswahl „guter“ Partikel (Fotin et al. 2004).

Die Einzelpartikelanalyse kann prinzipiell auf Moleküle beliebiger Größe angewandt werden. Stößt man aufgrund der geringen Größe eines Moleküls allerdings an die Auflösungsgrenze des Mikroskops, wird die Winkelzuweisung für die einzelnen Molekülansichten immer schwieriger. Ist ein sehr kleines Molekül in der Aufnahme nur noch wenige Pixel groß, ist eine Winkelzuweisung und somit die Rekonstruktion nicht möglich. Idealerweise benötigt man eine homogene Probe, d.h. alle Moleküle in der zu untersuchenden Lösung haben dieselbe Konformation. Auch heterogene Proben können analysiert werden, wenn das Programm, welches zur Rekonstruktion eingesetzt wird, die Unterscheidung mehrerer Konformationen beherrscht und wenn der Experimentator diese Heterogenität erwartet und die Rekonstruktionsmethoden entsprechend einsetzt.

Der Prozess der Rekonstruktion, wie er in Abbildung 23 vereinfacht dargestellt ist, besteht im Programm EMAN aus drei grundsätzlichen Schritten: Partikelauswahl, Erstellung des Start-Modells, und das Refinement (Ludtke et al. 1999). Einige wenige der ausgewählten Partikel aus den TEM-Aufnahmen werden benutzt, um ein vorläufiges Startmodell zu erstellen, welches anschließend iterativ verfeinert wird. Dazu werden aus dem ersten groben 3D-Modell des Moleküls Projektionen berechnet. Dies entspricht einem Durchsichtbild eines Moleküls aus einem bestimmten Winkel. Diese Projektionen dienen als Grundlage für eine Klassifizierung aller Partikelbilder. Ziel ist es, alle Bilder, die das Molekül in derselben Ansicht zeigen, in je einer Klasse zu vereinen – z.B. alle Bilder, die das Molekül in der Aufsicht zeigen, einer Klasse zuzuweisen und alle Bilder der Seitenansicht einer anderen.

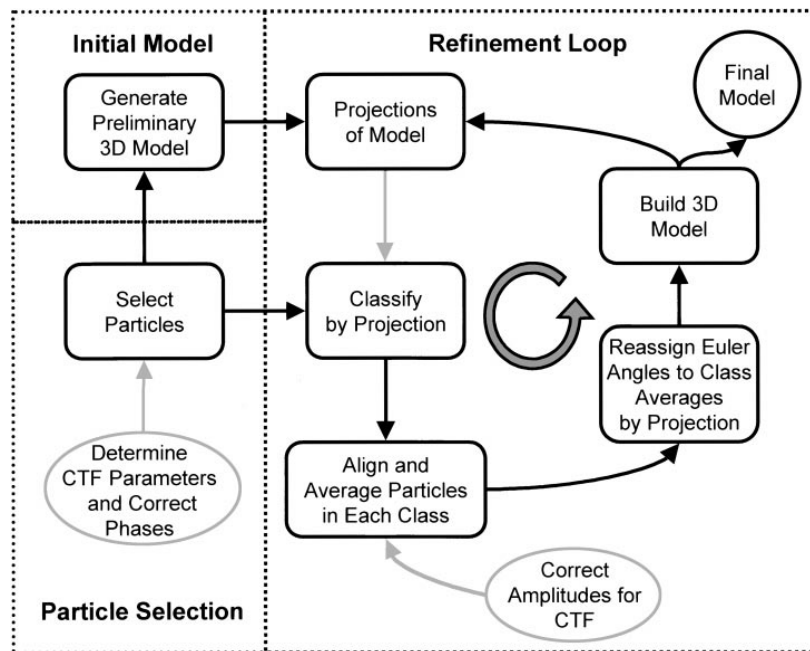


Abbildung 23: Flußdiagramm des Rekonstruktionsprozesses von EMAN

Grafik aus (Ludtke et al. 1999)

Die Bilder der Moleküle sind bei Cryo-EM oft sehr kontrastschwach, bei Negativkontrastierung durch die inhomogene Verteilung des Kontrastmittels sehr unterschiedlich. Um ein einheitliches Bild der jeweiligen Ansicht zu gewinnen, werden alle Bilder einer Klasse gemittelt. Dabei wird das statistische Rauschen der Cryo-EM-Aufnahmen oder das inhomogene Kontrastmittel im Falle der Negativkontrastaufnahmen herausgemittelt und die Struktur des Moleküls deutlicher hervorgehoben. Der Mittelung geht ein translationaler und rotationaler Abgleich der Einzelpartikel („Alignment“) voraus. Dies verhindert die direkte Verfälschung des Modells.

Das Ergebnis der ganzen Prozedur heißt folgerichtig „Klassenmittel“ („class average“) und ist das Durchschnittsbild eines Moleküls, gesehen aus einer bestimmten Richtung. Um die Qualität eines solchen Klassenmittels beurteilen zu können, sollte man sich die Partikel, aus denen die Klasse besteht, sehr genau anschauen. Denn funktioniert die Verschiebung oder Rotation eines am Rand des Bildes liegenden Partikels nicht, dann wird dies das Ergebnis der Mittelung negativ beeinflussen.

Im nächsten Schritt werden den Klassenmitteln die Euler-Winkel der Projektionen zugewiesen, auf deren Grundlage sie erstellt wurden, und eine Rekonstruktion entlang dieser Euler-Winkel vorgenommen.

Man kann die Rekonstruktion im Realraum oder im Fourierraum berechnen lassen, Abbildung 24 zeigt den Ablauf der Rekonstruktion im Fourierraum. Die obere Reihe zeigt vier unterschiedliche Molekülorientierungen, direkt darunter die jeweilige 2D-Projektion. Diese entspricht einem Bild, wie man es im EM sehen würde; ein EM-Bild wäre aber sehr viel verrauschter. Die dritte Zeile zeigt die Fouriertransformation (FT) der 2D-Projektionen, die wiederum einen Schnitt durch die 3D-Fouriertransformation des Moleküls darstellen (De Rosier und Klug 1968). Eine Umkehrung der FT liefert das dreidimensionale Volumen des Moleküls. Die besten Ergebnisse erhält man bei einer möglichst vollständigen Abdeckung

des Fourierraums. Wenn jedoch einige Ansichten des Moleküls unterrepräsentiert sind, hat das eine Verringerung der Auflösung der Rekonstruktion zu Folge (Frank und Rademacher 1992; Penczek et al. 1992).

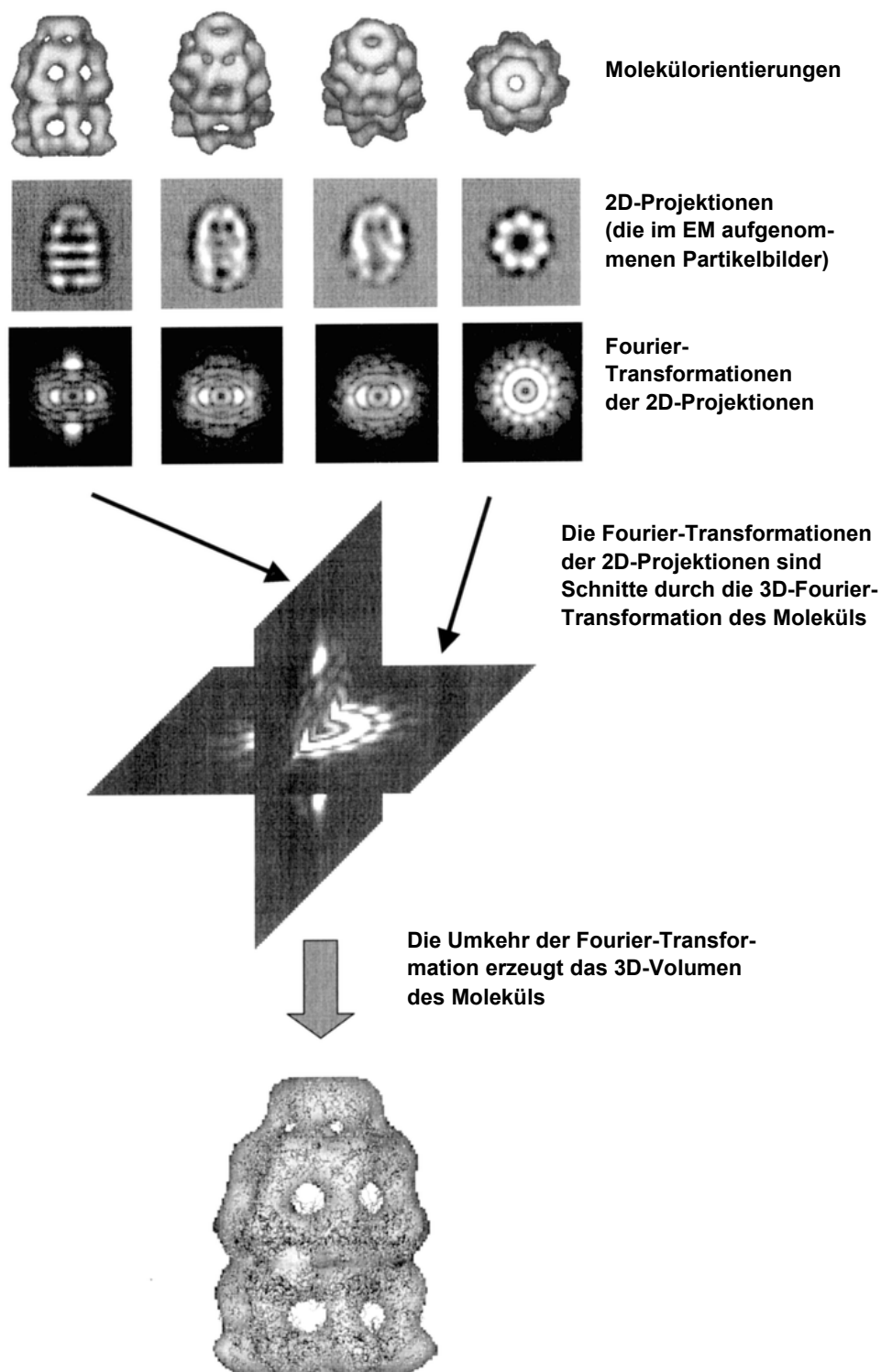


Abbildung 24: 3D-Rekonstruktion im Fourierraum
Verändert nach (Saibil 2000)

Das Ergebnis des ersten Rekonstruktionszyklus ist ein genaueres dreidimensionales Strukturmodell des Moleküls als das Startmodell, da zu seiner Erstellung alle Partikel benutzt

wurden und nicht nur ein paar wenige. Die Rekonstruktion kann dann zu einem fehlerhaften Modell führen, wenn bestimmte Ansichten des Moleküls unterrepräsentiert sind. Eine gleichmäßige Winkelverteilung sollte schon in der experimentellen Phase angestrebt werden, kann aber schwierig zu erreichen sein – manche Moleküle zeigen nicht nur auf Oberflächen, sondern auch in Eis eingebettet eine bevorzugte Orientierung. Folglich werden die meisten Aufnahmen das Molekül in derselben Ansicht zeigen und zu der oben angesprochenen Auflösungsverschlechterung führen.

Nach der Rekonstruktion werden zur Überprüfung Rückprojektionen des Modells für die entsprechenden Eulerwinkel erstellt und mit den Klassensummen verglichen. Weichen die Rückprojektionen zu sehr von den zugrundeliegenden Klassensummen oder den Einzelpartikeln ab, weist das auf Fehler in der Rekonstruktion hin (nicht gezeigter Zwischenschritt in Abbildung 23). Da die ersten Projektionen von einem groben Modell abgeleitet wurden und auf diesen Projektionen die Klassifizierung und das Alignment der Partikel basiert, wiederholt man nun den gesamten Zyklus, um mit den besseren Projektionen eine genauere Klassifizierung der Partikel zu erreichen, die zu weniger verrauschten Klassenmitteln führt und damit zu einem neuen, exakteren Modell. Während dieser Iterationen werden fälschlicherweise einer Klasse zugewiesene Partikel neu zugeteilt und schlecht definierbare Partikel aussortiert.

Das iterative Refinement wird abgeschlossen, wenn sich die 3D-Modelle zweier Iterationen nicht mehr unterscheiden, also konvergiert sind. Die Korrektur der EM-spezifischen Kontrasttransferfunktion (CTF) der Phasen und Amplituden ist optional, aber – wenn man hochaufgelöste Strukturen erstellen will – unverzichtbar. Die Projektionen des Modells werden bei EMAN lediglich als Referenzen für die Partikel-Klassifizierung der nächsten Iteration benutzt und nicht – wie in anderen Programmen – als Grundlage für das Alignment der Partikel einer Klasse. Für weitere Informationen zum Thema dreidimensionale Rekonstruktionen von Molekülstrukturen aus elektronenmikroskopischen Bildern seien die folgenden Artikel empfohlen: (De Rosier und Klug 1968; Frank und Radermacher 1992; Penczek et al. 1992; Saibil 2000; van Heel et al. 2000)

Die in dieser Arbeit gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Elektronenmikroskopie-Zentrum der Uni Mainz in der AG Wolfrum, Abteilung Zoologie angefertigt (Zeiss EM 900, FEI Tecnai 12).

3.3. Verbesserungen von Programmen

Während meiner Dissertation habe ich in Zusammenarbeit mit den Entwicklern verschiedene Programme korrigiert, verbessert und auf unsere Verhältnisse z.B. hinsichtlich der Größe angepasst. Die einzelnen Punkte sind im Folgenden als Stichpunkte aufgeführt:

Rasmol 2.7.2

- Schwerer Fehler im Koordinaten-Tracking-System, Sept. 2000
- Bereinigt durch Herbert Bernstein beim nächsten Update
- Internetadresse: <http://www.bernstein-plus-sons.de/rasmol>

Rasmol 2.7.2.1

- Schwerer Fehler: rechter Mausklick ließ Moleküle verschwinden, April 2002
- Bereinigt durch Herbert Bernstein beim nächsten Update
- Internetadresse: <http://www.bernstein-plus-sons.de/rasmol>

DeepView SwissPDBViewer 3.7b2

- Schwerer Fehler in der Routine für die strukturelle Überlagerung von Proteinen. Dieser trat bei mehrfacher Benutzung des iterativen Fitmechanismus auf und führte zu ständig wechselnden Werten für die mittlere quadratische Abweichung, selbst beim Vergleich identischer Moleküle. Testen der neuen Version für T.Schwede.
- Bereinigt durch Thorsten Schwede, April 2002
- Führte zur Veröffentlichung der Version 3.7 im Juni 2002
- Internetadresse: <http://www.expasy.ch/spdbv>

Whatif 4.99

- Etwa zwanzig Problembereiche während des Einführungskurses in Nijmegen, 2000
- Bereinigt durch Gert Vriend, 2000-2001

Yasara Dynamics / Yasara Twinset 4.3 bis 8.2

- Etwa zwanzig umgesetzte Vorschläge zur Erweiterung des Programms, u.a. in Hinblick auf die Größe der bearbeiteten Proteinstrukturen und zur Verbesserung der Stabilität und Ergonomie, zwischen 2004 und 2008
- Realisiert von und bereinigt durch Elmar Krieger.
- Führte zur Erwähnung und Danksagung im Programm.
- Internetadresse: <http://www.yasara.org>

WebLabViewer 3

- Vorschlag zur besseren Handhabung: Klick auf definierte Gruppe von Aminosäuren zeigt unerwünschterweise automatisch alle Aminosäuren in der Liste en detail an.
- Wurde als Fehlerreport / Verbesserungsvorschlag für die nächste Version in die Datenbank eingefügt, Feb. 2000
- Internetadresse: <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>

WebLabViewer 4.1

- Fehlerbericht: Speichern einer editierten Datei führt zum Absturz des Programms unter Windows ME, Windows 95 und Windows 98SE, Dez 2001
- Bereinigt beim nächsten Update von WebLabViewer 4.2
- Internetadresse: <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>

Genedoc

- Vorschlag zur Erweiterung der Shading-Option, Verbesserung der Skript-Schnittstelle zu Rasmol und neue Option „Shading Output“: optionaler Textoutput der eingefärbten Aminosäuren zur direkten Übernahme in eigene Skripte
- Realisiert von Karl Nicholas
- Führte zur Veröffentlichung der Version 2.5 im März 2000
- Internetadresse: <http://www.genedoc.us>

Proteindatenbank PDB

- Sequenzsuche in der Datenbank mittels FASTA-Algorithmus nicht mehr möglich
- Bereinigt durch Tammy Battistuz, Programmiererin im RCSB, Feb 2001
- Internetadresse: <http://www.rcsb.org>

Modeller 6v1

- Fehler in der Routine Sequence_Search, führte zu Abstürzen des Programms, Juli 2003
- Führte zur Veröffentlichung der Version 6v2 im Mai 2002
- Bereinigt durch das Programmiererteam um Andrej Sali
- Internetadresse: <http://www.salilab.org>

Modeller 6v2

- Fehler in der Routine zur Erstellung von benutzerdefinierten Randbedingungen, führte zu Abstürzen des Programms, Juli 2003
- Bereinigt beim nächsten Update von Modeller
- Internetadresse: <http://www.salilab.org>

4. Veröffentlichungen

1. **Schweikardt T**, Olivares C, Solano F, Jaenicke E, García-Borrón JC, Decker H.
A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations.
Pigment Cell Res. 2007 Oct;20(5):394-401.
2. Decker H, **Schweikardt T**, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tuczec F.
Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases.
Gene. 2007 Aug 15;398(1-2):183-91.
3. Corbet D, **Schweikardt T**, Paulsen H, Schmid VH.
Amino acids in the second transmembrane helix of the Lhca4 subunit are important for formation of stable heterodimeric light-harvesting complex LHCI-730.
J Mol Biol. 2007 Jun 29;370(1):170-82.
4. Decker H, **Schweikardt T**, Tuczec F.
The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?
Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Jul 10;45(28):4546-50.
5. Jeschke G, Bender A, **Schweikardt T**, Panek G, Decker H, Paulsen H.
Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll a/b protein by EPR measurements.
J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):18623-30.
6. **Schweikardt T**, Jaenicke E, Decker H.
Homology modelling of hemocyanins and tyrosinases: pitfalls in automated approaches.
Micron. 2004;35(1-2):97-8.

1. **Schweikardt T**, Olivares C, Solano F, Jaenicke E, García-Borrón JC, Decker H.
A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for
loss of function mutations.
Pigment Cell Res. 2007 Oct;20(5):394-401.

2. Decker H, **Schweikardt T**, Nillius D, Salzbrunn U, Jaenicke E, Tuczec F.
Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases.
Gene. 2007 Aug 15;398(1-2):183-91.

3. Corbet D, **Schweikardt T**, Paulsen H, Schmid VH.
Amino acids in the second transmembrane helix of the Lhca4 subunit are important for formation of stable heterodimeric light-harvesting complex LHCI-730.
J Mol Biol. 2007 Jun 29;370(1):170-82.

4. Decker H, **Schweikardt T**, Tucek F.
The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?
Angew Chem Int Ed Engl. 2006 Jul 10;45(28):4546-50.

5. Jeschke G, Bender A, **Schweikardt T**, Panek G, Decker H, Paulsen H.
Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll a/b protein
by EPR measurements.
J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):18623-30.

6. **Schweikardt T**, Jaenicke E, Decker H.
Homology modelling of hemocyanins and tyrosinases: pitfalls in automated approaches.
Micron. 2004;35(1-2):97-8.

5. Weiterführende Analysen im Bereich „Tyrosinasen“

5.1. Forschung an Tyrosinasen

In den letzten Jahrzehnten gab es große Anstrengungen seitens zahlreicher Arbeitsgruppen aus der Biologie, Chemie und Medizin, um den enzymatischen Mechanismus der Tyrosinase aufzuklären (Himmelwright et al. 1980; Huber und Lerch 1988; Jackman et al. 1991; Betancourt et al. 1992; Chen, L. Y. et al. 1992; Tripathi et al. 1992; Chen, L. Y. et al. 1993; Spritz 1993; Sanchez-Ferrer et al. 1995; Solomon et al. 1996; Spritz et al. 1997a; van Gelder et al. 1997; Tsai und Lee 1998; Branza-Nichita et al. 1999; Branza-Nichita et al. 2000; Decker et al. 2000; Decker und Tuczec 2000; Kong et al. 2000; Nakamura et al. 2000; Oetting 2000; Solomon et al. 2001b; Garcia-Borron und Solano 2002; Jiang, H. et al. 2003; Chen, P. und Solomon 2004; Siegbahn 2004; Watabe et al. 2004; Tepper et al. 2005; Claus und Decker 2006; Hernandez-Romero et al. 2006).

Viele verschiedene Hydroxylierungs- und Oxidationsmechanismen wurden vorgeschlagen. Die Vorschläge basierten auf enzymatischen und spektroskopischen Studien, Molekülorbitaltheorien sowie Homologie-Modellierungen, aber keine Theorie konnte alle Eigenschaften der Tyrosinase erklären. Vor allem die Details des Hydroxylierungsmechanismus, der ein Monophenol zu einem ortho-Diphenol oxidiert, blieb unklar. Das galt genauso für die Bindungsstelle und den Bindungsmodus der Substratmoleküle sowie für die Frage, ob die O-O Bindung *vor*, *während* oder *nach* dem elektrophilen Angriff des Cu_2O_2 auf den aromatischen Ring des Substrats gespalten wird.

Die Lösung der Röntgenstruktur von *Streptomyces castaneoglobisporus* Tyrosinase durch Matoba und Kollegen war ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Unterschiede in den Reaktionsmechanismen von Catecholoxidasen und Tyrosinasen. Beide Enzyme gehören zur Familie der Typ-3-Kupferproteine, unterscheiden sich aber in ihren Substrat- und Reaktionsspezifitäten (siehe Kapitel 2.1.5). Bei *Streptomyces castaneoglobisporus* handelt es sich um einen gram-positiven Actinomyceten, der als Bodenbakterium weit verbreitet ist und sich durch seinen mycelartigen Habitus auszeichnet (Claus und Decker 2006). Seine Tyrosinase ist ein monomeres, lösliches Protein, das aus 273 Aminosäuren besteht und eine Masse von 31kD aufweist.

Seit Jahrzehnten wurde die Kristallisation verschiedenster Tyrosinasen versucht, bis 2006 ohne Erfolg. Der Schlüssel zur erfolgreichen Kristallisation der Tyrosinase war neben ihrer geringen Größe und der Tatsache, daß sie nicht glykosyliert ist, offensichtlich die gleichzeitige Expression der Tyrosinase mit dem vom Gen melC1 codierten „Caddieprotein“. Das Gen melC1 liegt im Genom des Bakteriums direkt vor dem Gen melC2, das für die Tyrosinase codiert. Weiterhin fand die Expression und Kristallisation in einer kupferfreien Lösung statt, das Kupfer wurde später durch Inkubation der Kristalle mit Kupfersulfatlösung hinzugefügt.

5.2. Bakterielle Tyrosinase

5.2.1. Die möglichen Aufgaben der bakteriellen Tyrosinase

Die Tyrosinase von *S. castaneoglobisporus* wird - wie andere Tyrosinasen auch - in das umgebende Medium sekretiert, wo sie im extrazellulären Raum Melanin produziert. Wozu diese Melaninproduktion dient, ist bisher unbekannt (persönliche Mitteilung Harald Claus, 2006), aber man kann über diverse Möglichkeiten spekulieren. Wodurch verschafft die extrazelluläre Tyrosinase dem Bakterium einen Vorteil gegenüber seinen Konkurrenten?

Es könnte ein *Abwehrmechanismus* sein, der extrazelluläre phenolische Substanzen in der Umgebung des Bakteriums neutralisiert, bevor sie das Bakterium schädigen können. Durch die Sekretion der Tyrosinase könnte das Bakterium so sein eigenes, angepasstes Mikroklima schaffen. Dies funktioniert natürlich nur, wenn die Produkte der Tyrosinase weniger toxisch für das Bakterium sind als die Substrate – das Endprodukt Melanin erfüllt dieses Kriterium.

Eine weitere Möglichkeit ist der extrazelluläre *Abbau von Nährstoffen*, eventuell über Zwischenmediatoren, ähnlich wie bei den Laccasen der Basidiomyceten und Ascomyceten (Claus 2003). Damit verbunden ist natürlich das Problem der unerwünschten Polymerisierung von Abbauprodukten – diese macht die nachfolgende Aufnahme der Nährstoffe schwierig. Die dritte Einsatzmöglichkeit der extrazellulären Tyrosinasen ist die Generierung eines *schützenden Abwehrschildes* aus Melanin. Dies klingt im ersten Moment paradox, denn schließlich funktioniert das angeborene Immunsystem der Insekten genau in dieser Art und Weise. Eindringende Krankheitserreger werden durch Catechole und Chinone geschädigt und dann mit einer Melaninummantelung von Nährstoffen und Sauerstoff abgeschnitten. Aber wie mit allen Giften ist das eine Frage der Konzentration. Wenn die Konzentration der sekretierten Tyrosinase entsprechend kontrolliert wird, dann könnte das entstehende Melaninnetz gerade dick genug sein, um gegen Freßfeinde und Konkurrenten zu schützen, ohne komplett zu isolieren.

5.2.2. Modellierung der bakteriellen Tyrosinase

In unserem Labor wird das Bakterium *Streptomyces antibioticus* im halbtechnischen Maßstab kultiviert und die Tyrosinase, welche durch Exocytose in das Kulturmedium abgegeben werden, aufgereinigt (siehe Dissertation (Salzbrunn 2007)). Um einen besseren Einblick in den Reaktionsmechanismus der bakteriellen Tyrosinasen zu erhalten, die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren zu identifizieren und um die Auswirkungen bestimmter Mutationen zu erklären, wurden im Jahr 2004 die Strukturen der Tyrosinasen von *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces glaucescens* mit Homologie-Modellierung erstellt. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine sind zu 86% identisch und zu 92% homolog (Anteil der identischen und isofunktionellen Aminosäuren), was bedeutet, daß ihre Strukturen in der Realität sehr ähnlich sind – somit sind Erkenntnisse aus Experimenten oder der Literatur, die sich auf einen der beiden Stämme beziehen, mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für den anderen Stamm gültig.

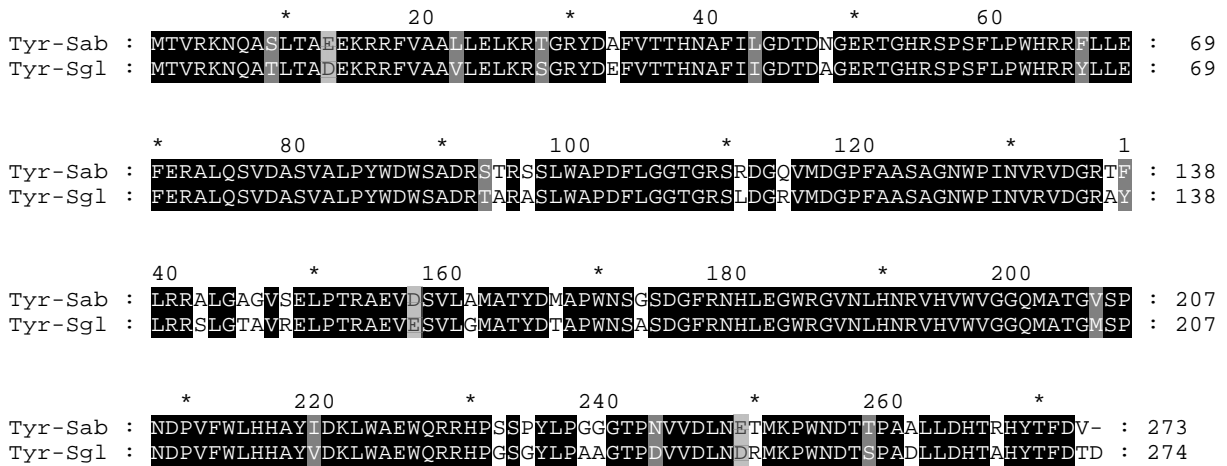


Abbildung 25: Sequenzalignment von *Streptomyces antibioticus* (Tyr-Sab) und *Streptomyces glaucescens* (Tyr-Sgl) Tyrosinase.

Schwarzer Hintergrund: identische Aminosäuren, grauer Hintergrund: isofunktionelle Aminosäuren, weißer Hintergrund: nicht identische oder isofunktionelle Aminosäuren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur der bakteriellen Tyrosinase basierend auf der Struktur der Kartoffel-Catecholoxidase modelliert und mit der 2006 durch Matoba und Kollegen gelösten Röntgenstruktur verglichen. Die Kristallstruktur wurde analysiert, die Unterschiede zur Catecholoxidase herausgearbeitet und ein Katalysemechanismus für die monophenolische Hydroxylierung vorgeschlagen.

5.2.2.1. Identifikation der besten Vorlagenstruktur

Zum Zeitpunkt der Modellierung der bakteriellen Tyrosinase (*Streptomyces*, sTyr) waren drei verschiedene Klassen von Röntgenstrukturen als potentielle Vorlage verfügbar: Arthropoden-Hämocyanine (aHC – Hämocyanine aus *Limulus polyphemus* und *Panulirus interruptus*), Mollusken-Hämocyanine (mHC – Hämocyanine aus *Rapana thomasiana* und *Octopus dofleini*) und die Kartoffel-Catecholoxidase (*Ipomoea batatas*, ibCO).

Um die am besten geeignete Vorlagenstruktur zu identifizieren, wurde die Tyrosinase auf Grundlage jeder möglichen Vorlagenstruktur modelliert und die Modelle mit Hilfe von PROSA analysiert. Es zeigte sich anhand der Z-Scores der modellierten Strukturen, daß die verlässlichsten Modelle auf Grundlage der Kartoffel-Catecholoxidase (ibCO) als Vorlagenstruktur erstellt wurden. Zum Zeitpunkt der Modellierung (2004) war die Röntgenstruktur der *Streptomyces castaneoglobisporus* Tyrosinase (Matoba et al. 2006) noch nicht gelöst.

5.2.2.2. Iteratives Alignment, Modellierung und Evaluation der Modelle

Das erste Alignment der Sequenzen von ibCO und sTyr wurde mit CLUSTALX durchgeführt, unter Verwendung der BLOSUM 30 Matrix für entfernt verwandte Proteine (Thompson et al. 1997; Jeanmougin et al. 1998). Es handelt sich dabei um eine Substitutionsmatrix, die auf Sequenzalignments von Proteinen mit mindestens 30% Sequenzidentität basiert.

Der nächste Schritt war die manuelle Verbesserung mit Hilfe von GENEDOC (Nicholas et al. 1997), wobei die Sekundärstrukturinformationen aus der Kartoffel-Catecholoxidase mit berücksichtigt wurden. Es ist generell unwahrscheinlich, daß Insertionen oder Deletionen (kurz „Indels“) inmitten eines Sekundärstrukturelements (Helix, Faltblatt oder Turn) liegen, es sei denn, dies ist für die Funktion des Proteins von Bedeutung.

Daher wurde versucht, die Indels nicht mit Sequenzabschnitten zu alignen, von denen bekannt ist, daß sie in der ibCO Sekundärstrukturelemente bilden. Das resultierende Alignment und die Röntgenstruktur der Kartoffel-Catecholoxidase wurden zur Modellierung der sTyr mit MODELLER 7 verwendet (Sali und Blundell 1993; Fiser und Sali 2003). Die Modelle wurden mit PROCHECK (Laskowski et al. 1996), WHATIF (Vriend 1990) und PROSA2003 (Sippl 1993) evaluiert.

5.2.2.3. Erkenntnisse aus dem Alignment

Das Sequenzalignment zeigt, daß die Gemeinsamkeiten von Vorlagen- und Zielprotein sich vor allem in den beiden aktiven Zentren, also CuA und CuB, konzentrieren. Daher richtet sich die folgende Analyse auf den Bereich des aktiven Zentrums und nicht auf die Peripherie. Nicht nur außerhalb des aktiven Zentrums, auch zwischen den kupfertragenden Histidinen der Kupferzentren sind Indels zu finden, und zwar in einer Schleifenregion im Bereich des CuB-Zentrums. Das in Abbildung 26 mit einem Rahmen markierte Indel bezeichnet man unter Einbeziehung der Evolutionsrichtung (Bakterien → Pflanzen) als Insertion.

Diese Insertion liegt zwischen dem zweiten und dritten kupfertragenden Histidin des CuB-Zentrums, in einer Schleife, die in der Ansicht in Abbildung 30 und Abbildung 31 „oberhalb“ des aktiven Zentrums liegt. Die Lage des Indels ist deutlich an den Aminosäuremotiven ¹⁹⁶WVG¹⁹⁸ und ²⁰¹MxxxxS²⁰⁶ festzumachen, die sowohl in der bakteriellen Tyrosinase als auch in der Kartoffel-Catecholoxidase konserviert sind.

Das Phenylalanin, das in der Catecholoxidasestruktur den Zugang zum CuA-Zentrum blockiert (schwarzer Pfeil im Sequenzalignment in Abbildung 26), ist nach diesem Alignment strukturell äquivalent zu einem Glycin in der bakteriellen Tyrosinase. Es ist also davon auszugehen, daß das CuA-Zentrum in der Tyrosinase offenliegt und vom Lösungsmittel her für potentielle Substratmoleküle frei zugänglich ist.

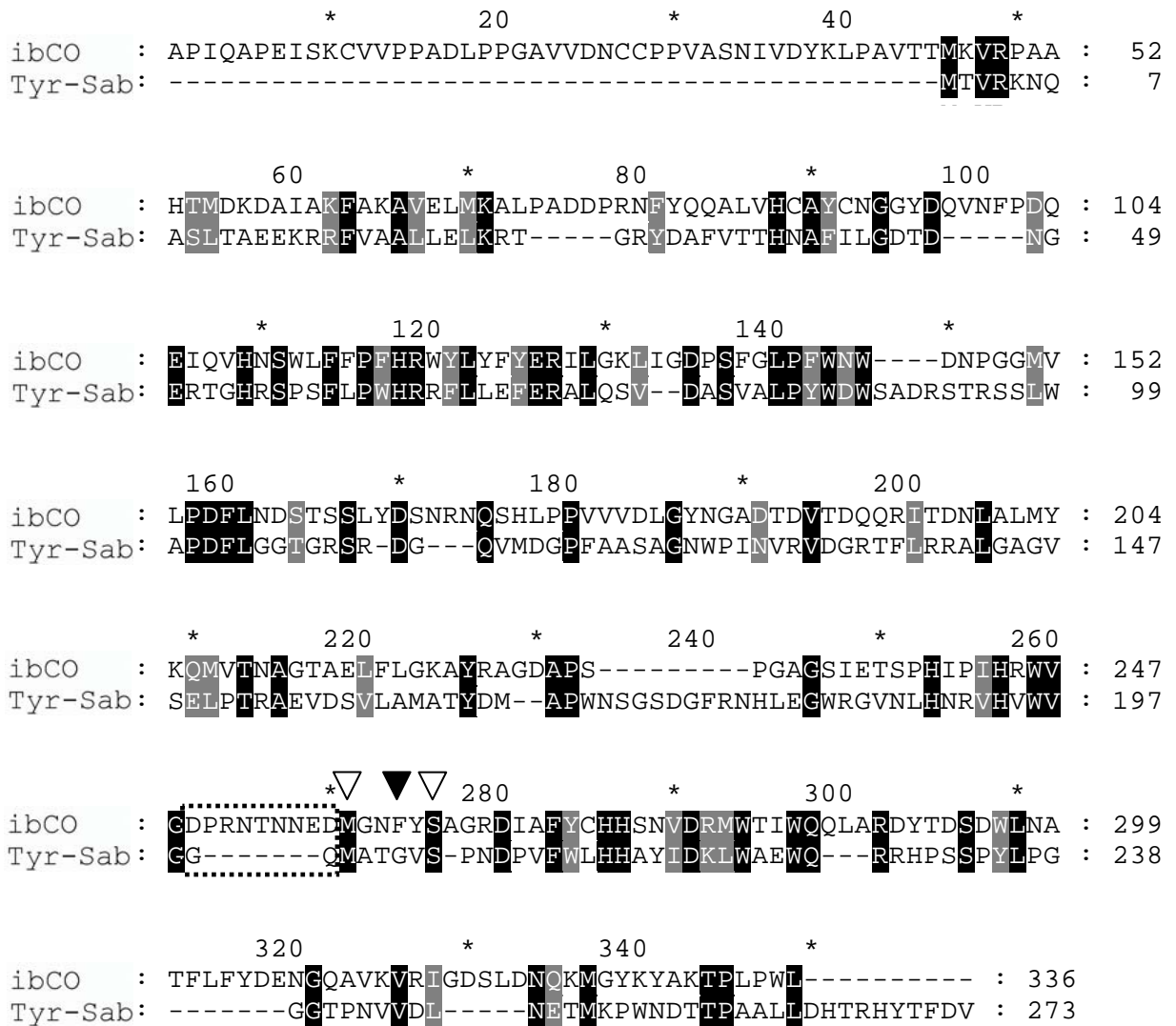


Abbildung 26: Sequenzalignment der Kartoffel-Catecholoxidase und bakterieller Tyrosinase.

Abkürzungen: Kartoffel-Catecholoxidase (ibCO, Struktur 1bt1), bakterielle Tyrosinase (*Streptomyces antibioticus*, Tyr-Sab). Schwarzer Pfeil (▲): Phenylalanin 261 / Glycin 204, weißer Pfeil (Δ): in Tyrosinasen konserviertes Methionin und Serin, Rechteck: Schleifenregion „über“ dem AZ.

5.2.2.4. Erkenntnisse aus dem Homologiemodell

Konsequenterweise zeigen die Modelle der Tyrosinase genau ein solch offenes aktives Zentrum, wie es durch das Alignment impliziert wird, siehe Abbildung 27. Sowohl das CuA- als auch das CuB-Zentrum scheinen dem Lösemittel frei zugänglich zu sein.

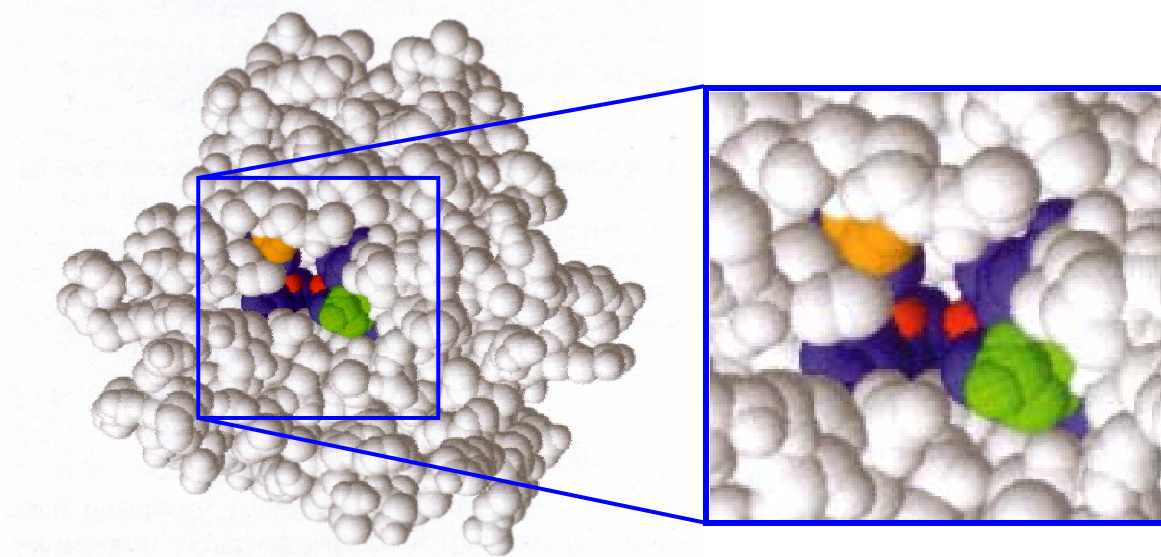


Abbildung 27: Homologiemodell der *Streptomyces antibioticus* Tyrosinase.

Blau: kupfertragende Histidine, rot: Kupferionen, orange: Glycin 204, grün: Asparagin 190 (Modell von Thorsten Schweikardt, Abbildung von Uwe Salzbrunn, aus (Claus und Decker 2006))

Da die Schleife oberhalb des aktiven Zentrums in der Tyrosinase weniger Aminosäuren enthält als die Schleife in der Catecholoxidase, kann man vermuten, daß die Schleife weniger weit ins aktive Zentrum hineinragt. Die sterische Blockade des CuA für Substrate würde aufgrund dieser Tatsache noch geringer ausfallen.

Vergleicht man dagegen die restlichen Aminosäuren des aktiven Zentrums, so gibt es eine sehr große Ähnlichkeit zwischen der Catecholoxidase und der Tyrosinase. Der hauptsächliche Unterschied scheint also die unterschiedliche Zugänglichkeit des aktiven Zentrums zu sein. Dies stützt die von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Theorie, daß die fehlende Tyrosinhydroxylase-Aktivität der Catecholoxidase hauptsächlich auf die mangelnde Zugänglichkeit des CuA-Zentrums zurückzuführen ist (Decker et al. 2000; Decker und Tuczec 2000).

Basierend auf diesem Modell lässt sich auch der Effekt schon bekannter albinismusauslösender Mutationen erklären. Jackman und Lerch mutierten 1991 die Tyrosinase von *Streptomyces glaucescens*, um die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Katalyse wichtig sind. Sie konnten neben den kupfertragenden Histidinen auch das Asparagin 190 als für die Katalyse wichtig identifizieren (Jackman et al. 1991). Sie postulierten auf Grundlage eines Vergleiches mit der einzigen bekannten Röntgenstruktur eines Hämocyanins (*Panulirus interruptus*), daß das Asparagin 190 in der Tyrosinase Teil eines Wasserstoffbrückennetzwerks ist, das die kupfertragenden Histidine stabilisiert, und somit in der Tyrosinase für die Katalyse wichtig ist. Schon die Mutation des Asparagins in ein Glutamin –

was einer effektiven Verlängerung der Seitenkette um eine Methylengruppe entspricht – führte zu einer 2000 fachen Verringerung der enzymatischen Aktivität der Tyrosinase und schlussendlich zum Verlust eines Kupferions.

Also ist die Funktion des Asparagins offensichtlich von der eingeschränkten Mobilität der Seitenkette abhängig. Da im *Panulirus*-Hämocyanin die homologe Aminosäure N345 mit dem O δ -Atom eine Wasserstoffbrücke zum N δ des HB1 (H344) herstellt (Abbildung 28), ist diese Interpretation plausibel – eine Verlängerung der Seitenkette würde die Flexibilität des O δ -Atoms erhöhen und so die Koordination des kupferbindenden Histidins erschweren.

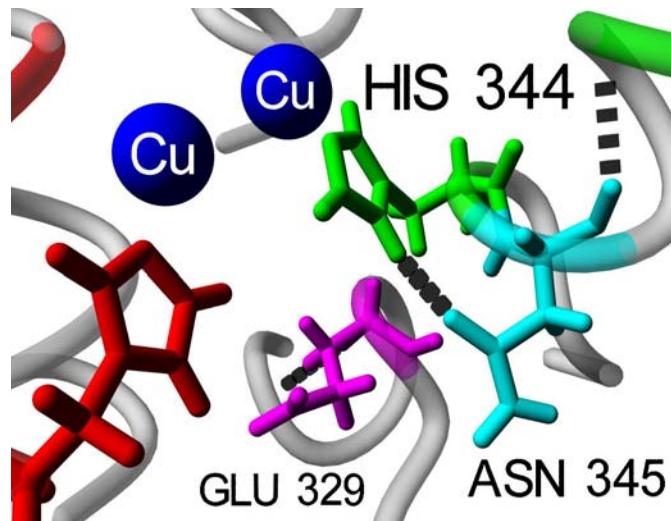


Abbildung 28: Stabilisation des His344 im aktiven Zentrum des Langusten-Hämocyanins durch Asn345

Es wird eine Wasserstoffbrücke zwischen Asn345O δ und His344N δ gebildet. Blaue Kugeln: Kupferionen, links CuA, rechts CuB. Rot: His198, grün: His344, türkis: Asn345, magenta: Glu329. Schwarz gestrichelt: Wasserstoffbrücken. (Röntgenstruktur 1hcy)

Das von mir erstellte Homologiemodell der Tyrosinase zeigt diese Wasserstoffbrücke nicht, obwohl das Asparagin vorhanden war. Der Grund hierfür ist, daß an derselben topologischen Stelle, an der sich im Hämocyanin der Languste und in der bakteriellen Tyrosinase ein Asparagin befindet, die Kartoffel-Catecholoxidase ein Isoleucin aufweist (siehe Abbildung 29 und Sequenzalignment Abbildung 26). Dieses kann aufgrund seiner unpolaren Seitenkette natürlich nicht zur Stabilisierung des Histidins beitragen, und ohne die Wasserstoffbrücke ist die Orientierung der Seitenkette hin zum aktiven Zentrum nicht notwendig. Dies wirkt sich direkt auf die modellierte Struktur aus – die Seitenkette des Asparagins zeigt im Homologiemodell vom aktiven Zentrum der Tyrosinase weg.

Dieses Ergebnis lässt sich auf das Funktionsprinzip von MODELLER zurückführen. Zwar ist die angewendete Methode der Homologiemodellierung sehr erfolgreich, wenn es darum geht, die Struktur des Modells weg von der Vorlage hin zur realen Struktur zu führen (siehe Diplomarbeit Thorsten Schweikardt, 2001), aber die Methode setzt der Effektivität natürliche Grenzen. Weder MODELLER noch ein anderes Programm, das Homologie-Modellierung einsetzt, ist in der Lage, neuartige Konformationen vorherzusagen, wenn die Sequenzidentität zwischen Vorlage und Zielprotein sehr hoch ist, wie in diesem Fall im aktiven Zentrum. Es wurde angenommen, daß in der realen Struktur der Tyrosinase die Wasserstoffbrücke zustande kommen würde.

Die Ergebnisse der Modellierung wurden dahingehend interpretiert, daß die Struktur der Catecholoxidase zumindest an einigen Stellen nahe des aktiven Zentrums von der Struktur der Tyrosinase abweicht und somit nicht in allen Bereichen gleich gut als Vorlagenstruktur geeignet ist.

Das Homologie-Modell und die daraus gewonnenen Rückschlüsse über die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums wurden zwei Jahre später im Januar 2006, veröffentlicht (Claus und Decker 2006).

Es bleibt zu klären, wie die Stabilisierung des HB1 in der Catecholoxidase funktioniert, wenn es kein zum Asn190 homologes Asparagin gibt. Hier wird die Stabilisierung des His240 durch das im Rückgrat befindliche Sauerstoffatom des Glutamat 236 übernommen. Dieses bildet in gleicher Weise wie das O δ -Atom des Asparagins eine Wasserstoffbrücke mit dem N δ des HB1 (H240). Im Hämocyanin der Languste ist dieses Sauerstoffatom 3,3 Å vom Histidin entfernt – zu weit, um eine Wasserstoffbrücke zu bilden.

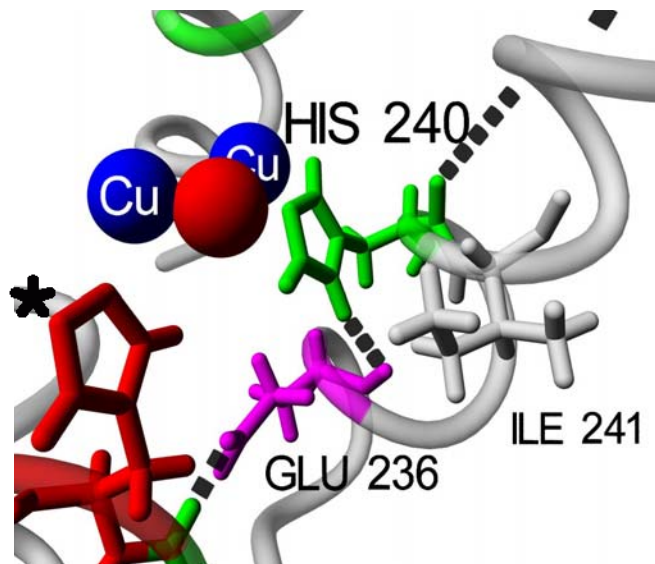


Abbildung 29: Stabilisation des His240 im aktiven Zentrum der Kartoffel-Catecholoxidase durch Glu236

Es wird eine Wasserstoffbrücke zwischen Glu236O und dem His240N δ gebildet. Blaue Kugeln: Kupferionen, links CuA, rechts CuB. Rote Kugel: Sauerstoff. Rot: His109 (der Stern zeigt die Position der nicht gezeigten Thioetherbrücke), grün: His240, grau: Ile241, magenta: Glu236. Schwarz gestrichelt: Wasserstoffbrücken. (Röntgenstruktur 1bt1)

5.2.3. Vergleich des Homologiemodells mit der Röntgenstruktur

Im Februar 2006, kurz nach Veröffentlichung des Homologiemodells der *Streptomyces antibioticus* Tyrosinase, wurde die Struktur der *Streptomyces castaneoglobisporus* Tyrosinase von einer japanischen Arbeitsgruppe um Dr. Matoba und Prof. Sugiyama gelöst.

Somit war es möglich, das Homologiemodell aus dem Jahre 2004 mit der realen Struktur des Proteins zu vergleichen. Die Proteine weisen eine Sequenzidentität von 82% auf (siehe Lokalisation der nicht-identischen Aminosäuren in Abbildung 30), so daß die strukturellen Unterschiede der beiden Proteine minimal sein sollten.

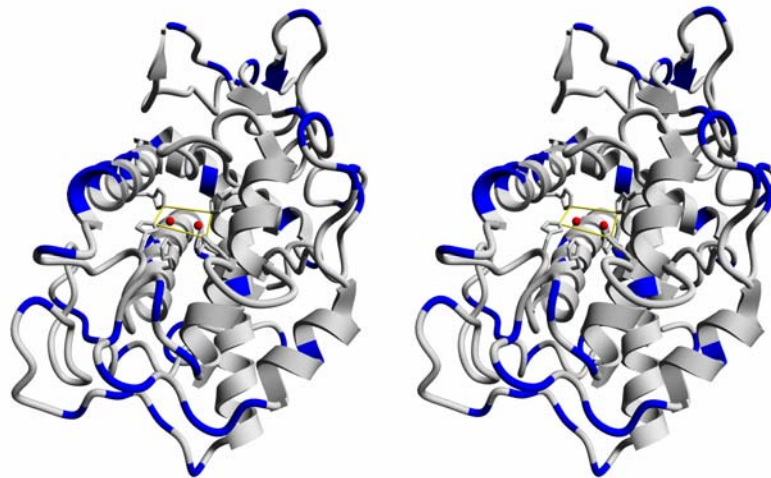


Abbildung 30: Farbcodierte Ansicht der *S. castaneoglobisporus* Tyrosinasen-Röntgenstruktur.

Weiß: Aminosäuren, die in *S. castaneoglobisporus* Tyrosinase und *S. antibioticus* Tyrosinase identisch sind. Blau: Nicht-identische Aminosäuren; rot: Kupferionen, gelb: Bindungsebene. Keine der ersetzten Aminosäuren befindet sich im aktiven Zentrum, auf das sich die Analyse konzentrierte. Stereodarstellung, Parallelsicht.

Das Modell der *S. antibioticus* Tyrosinase und die Röntgenstruktur der *S. castaneoglobisporus* Tyrosinase (PDB-Datenbank-Code: 2ahk) weisen eine mittlere quadratische Abweichung von nur 0,87 Å über die C α -Atome auf (RMSD, root mean square deviation, ermittelt mit der Funktion `Align` von YASARA TWINSET 6). Vergleicht man die Kartoffel-Catecholoxidase und die *S. castaneoglobisporus* Tyrosinase, so ergibt sich eine mittlere quadratische Abweichung von 1,0 Å. Dies bedeutet, daß die modellierte Struktur eine größere Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur zeigt als die Vorlagenstruktur – ein Merkmal einer erfolgreichen Strukturvorhersage.

Überlagert man die drei Moleküle (Tyrosinase-Modell, Tyrosinase-Röntgenstruktur sowie die Kartoffel-Catecholoxidase) strukturell, zeigen die Histidine im aktiven Zentrum nur minimale Abweichungen. Die größte Abweichung von 1,1 Å ist am N ϵ von His54 festzustellen (zwischen dem Homologiemodell und der Röntgenstruktur der Tyrosinase). Diese Abweichung ist vermutlich der Thioetherbrücke geschuldet, die im Vorlagenprotein, der Catecholoxidase, vorhanden ist, aber in keiner der bakteriellen Tyrosinasen.

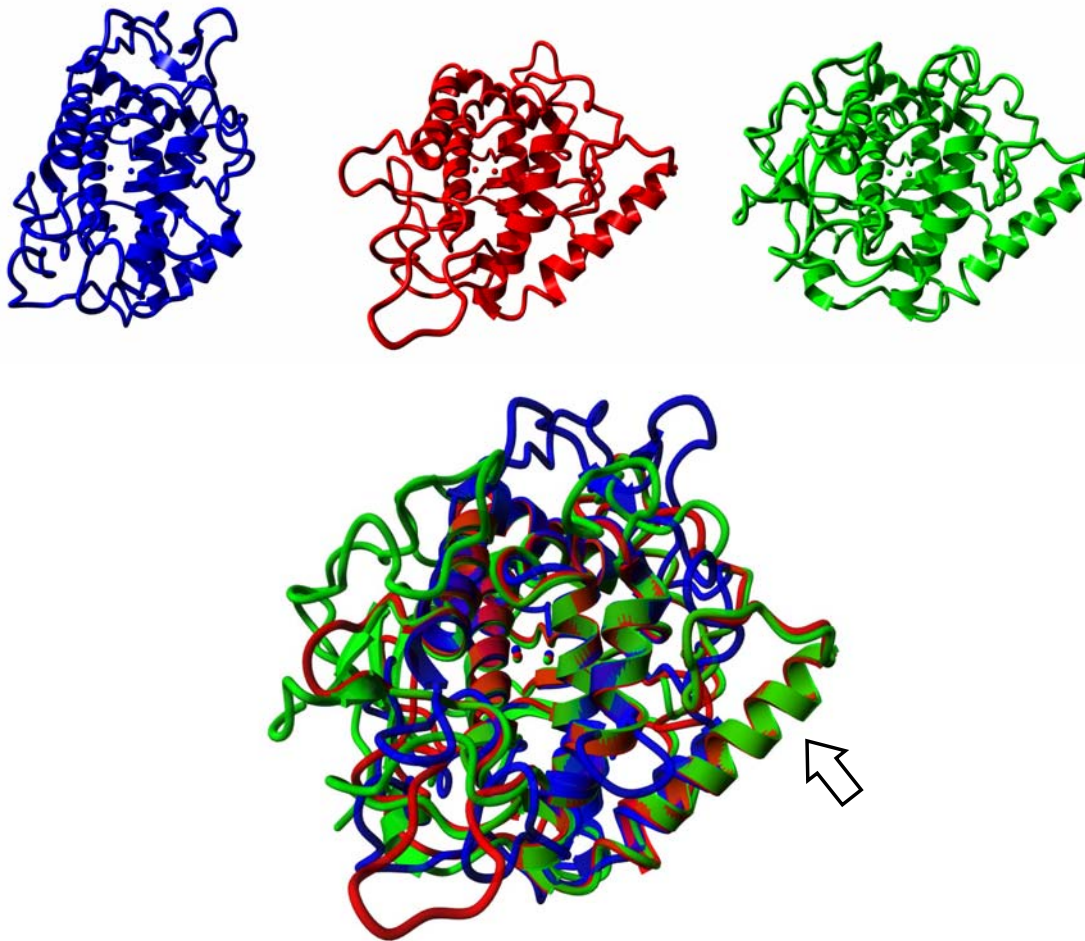


Abbildung 31: Vergleich der Röntgenstrukturen der bakteriellen Tyrosinase, der Kartoffel-Catecholoxidase und dem Modell der bakteriellen Tyrosinase.

Oberer Teil: Blau: Röntgenstruktur *S. castaneoglobisporus* Tyrosinase, rot: Homologiemodell der *S. antibioticus* Tyrosinase, grün: Röntgenstruktur der Kartoffel-Catecholoxidase.

Unterer Teil: Strukturelle Überlagerung aller drei Strukturen. Alle Moleküle sind als Bändermodell gezeigt, die Kupferionen im aktiven Zentrum als Kugeln. Es wird deutlich, daß die stärkste strukturelle Übereinstimmung in der Nähe des aktiven Zentrums liegt, also im Bereich des Vier-Alpha-helix-Bündels. Die Peripherie ist weniger gut konserviert, Beispiel hierfür ist die markierte Helix, die in Realität viel kürzer ist als im Tyrosinase-Modell (Pfeil).

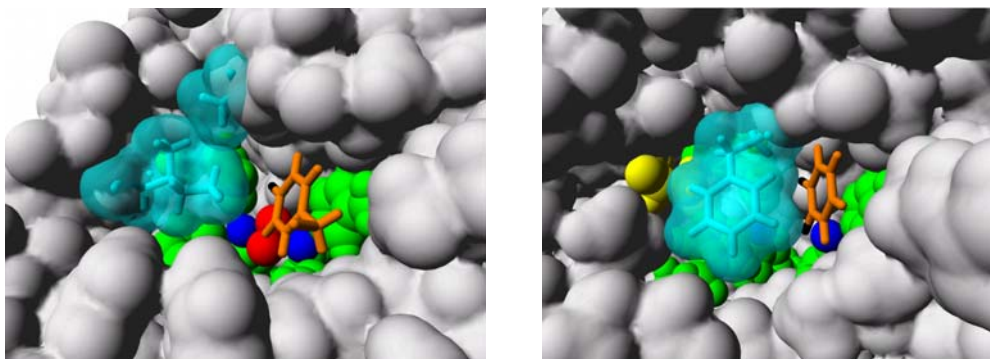


Abbildung 32: Zugänglichkeit des aktiven Zentrums in Tyrosinase und Catecholoxidase

Ansicht des aktiven Zentrums der sTyr (links) und der Catecholoxidase (ibCO) (rechts).

Potentielle Substratbindungsstellen werden in der Tyrosinase durch das Tyr 98 und ein simuliertes Catechol visualisiert. Das Catechol hat dieselbe Orientierung wie der Phenylring des Inhibitors Phenylthioharnstoff (PTU) in der Röntgenstruktur der Catecholoxidase (1bug). Blau: Kupfer, rot: Sauerstoff, grün: Histidine, gelb: Cystein, orange: Substrate (Tyrosin / Catechol), türkis: behindernde Aminosäuren. In der Catecholoxidase kann das Substrat CuA nicht erreichen, weil ein Phenylalanin den Zugang erschwert (Grafik aus Decker, Schweikardt, Tuczec 2006).

Die Schleife, die in Abbildung 32 oberhalb des aktiven Zentrums liegt, trägt in der Catecholoxidase das Phenylalanin, welches den Zugang zu CuA blockiert. In Abbildung 32 ist zu erkennen, daß die auf dem Homologiemodell basierte Vorhersage korrekt war: das CuA ist viel freier zugänglich und die Schleife kleiner als in der Catecholoxidase. Es könnte also sein, daß die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums die Reaktionsspezifität der Tyrosinasen und Catecholoxidasen bestimmt. Dies wurde durch die Analyse der Röntgenstruktur belegt.

Im letzten Kapitel wurde die Rolle des konservierten Glutamins und Asparagins im aktiven Zentrum diskutiert. Wie Abbildung 33 zeigt, können im aktiven Zentrum der bakteriellen Tyrosinase sowohl das Glutamat als auch das Asparagin zur Stabilisierung des HB1 beitragen, was dem Stabilisierungsmechanismus der Catecholoxidase respektive dem Hämocyanin entspricht, siehe Abbildung 28 und Abbildung 29.

Die Röntgenstruktur stärkt die Interpretation der Wichtigkeit des Glutamats – es dient als Bindeglied zwischen dem CuA- und CuB-Kupferzentrum. Dabei bindet es nicht nur über eine Wasserstoffbrücke das Stickstoffatom im Rückgrat des Arg55, sondern auch über eine zweite Wasserstoffbrücke das Tryptophan 184N ϵ . Dies hat zur Folge, daß die aromatische Seitenkette des Tryptophans der positiv geladenen Seitenkette des Arginins nahe genug kommt, um eine Kation- π -Wechselwirkung einzugehen – die beiden Aminosäuren sind im van-der-Waals-Kontakt.

Eine solche Stabilisierung ist nicht ungewöhnlich (25% aller bekannten Proteine in der PDB zeigen solche Bindungen) und wurde in der Catecholoxidase schon beobachtet, zwischen Arg 281 und Trp 119, die in vielen Tyrosinasen konserviert sind (Garcia-Borrón und Solano 2002). Interessanterweise dient diese Wechselwirkung in der Catecholoxidase dem gleichen Zweck wie hier in der Tyrosinase – nämlich der Stabilisierung des aktiven Zentrums durch die Verknüpfung von Helices aus CuA und CuB.

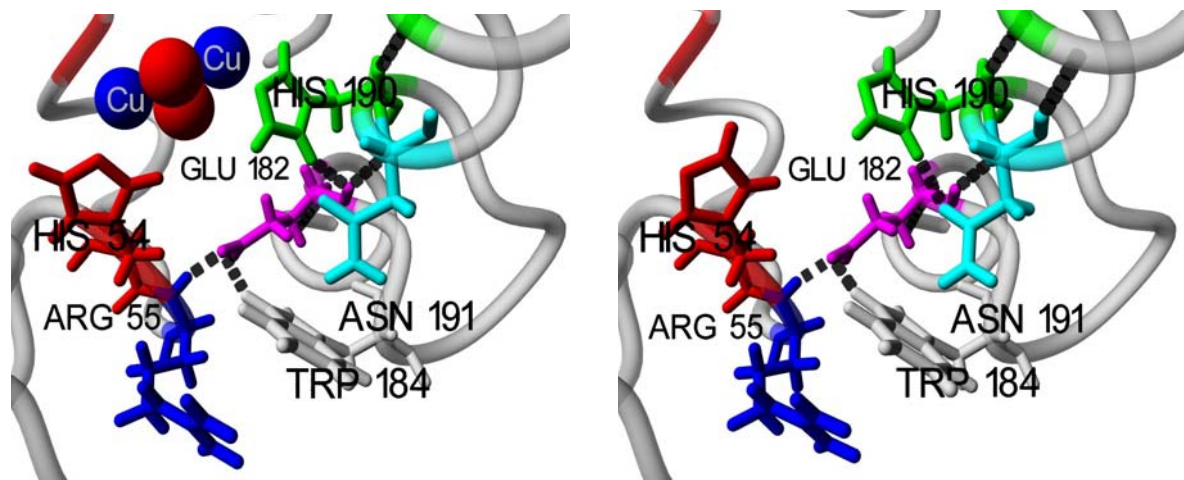


Abbildung 33: Rolle von Glutamat und Asparagin im aktiven Zentrum von Holo- und Apo-Tyrosinase
Links Holo-Tyrosinase, 1wx4, rechts: Apo-Tyrosinase, 1wx5.

5.2.4. Analyse der Röntgenstruktur der bakteriellen Tyrosinase

Ein Vergleich der Geometrie der aktiven Zentren von Mollusken-Hämocyaninen, Arthropoden-Hämocyaninen, Kartoffel-Catecholoxidase und bakterieller Tyrosinase zeigt, daß alle Proteine große Gemeinsamkeiten aufweisen. Alle genannten Proteine haben ein Typ-3-Kupferzentrum, in dem zwei Kupferionen von jeweils drei Histidinen koordiniert werden (siehe Abbildung 34 und Abbildung 35). Trotz der Tatsache, daß diese Proteine untereinander z.T. nur eine sehr geringe Sequenzidentität aufweisen – hier sind besonders die Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken zu nennen – ist die Ähnlichkeit der aktiven Zentren bemerkenswert.

Die Frage, wie es bei einem so ähnlichem Aufbau des aktiven Zentrums zu so unterschiedlicher Funktion kommt, soll im Folgenden geklärt werden.

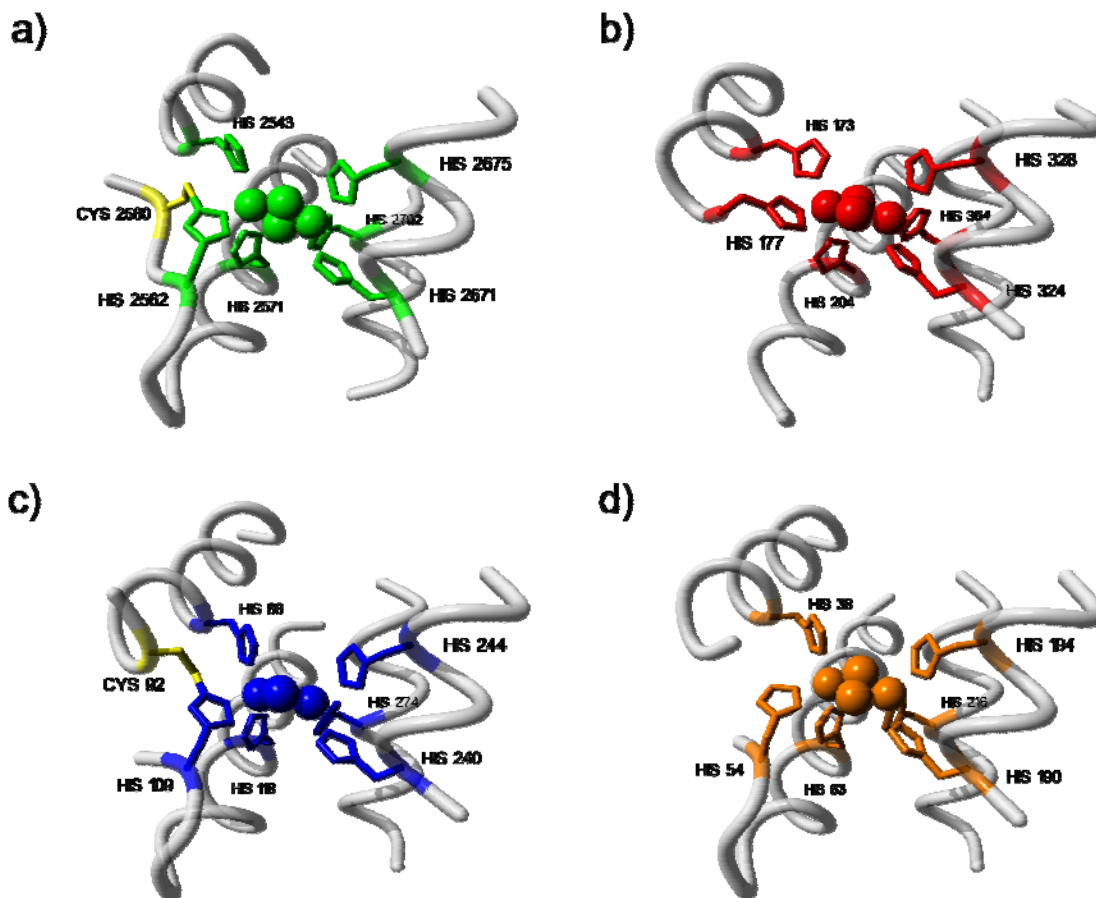


Abbildung 34: Umgebung der aktiven Zentren von Hämocyaninen, Catecholoxidase und Tyrosinase

a) Mollusken-Hämocyanin (*Octopus dofleini*, Funktionelle Einheit g, PDB-code: 1js8, grün)

b) Arthropoden-Hämocyanin (*Limulus polyphemus*, Untereinheit 2, 11a, rot)

c) Pflanzen-Catecholoxidase (*Ipomoea batatas*, 1bt1, blau)

d) bakterielle Tyrosinase (*Streptomyces castaneoglobisporus*, 1wx4, orange).

Die kupfertragenden Histidine entspringen aus Helices und Schleifenregionen im aktiven Zentrum (grau).

Das Cystein und die von ihm gebildete Thioetherbrücke in Catecholoxidase und Mollusken-Hämocyanin sind in gelb dargestellt, der Cu_2O_2 -Komplex wird im Kalottenmodell gezeigt (aus Decker, Schweikardt, Tuczec 2006).

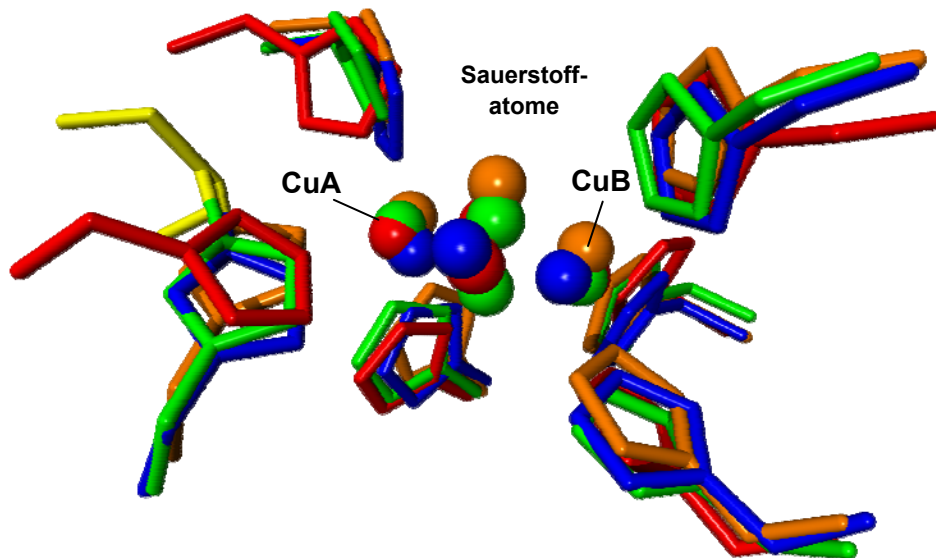


Abbildung 35: Überlagerung der aktiven Zentren von Hämocyaninen, Catecholoxidasen und Tyrosinase
Die strukturelle Überlagerung der vier aktiven Zentren aus Abbildung 34 verdeutlicht den hohen Grad struktureller Übereinstimmung. Grün: Mollusken-Hämocyanin, rot: Arthropoden-Hämocyanin, blau: Pflanzen-Catecholoxidase, orange: bakterielle Tyrosinase, gelb: Thioether-Brücke. Zur besseren Übersicht sind die Atomradien kleiner gewählt als in Abbildung 34 (aus Decker, Schweikardt, Tuczek 2006).

5.2.4.1. Die Met-Form der Tyrosinase

Es ist bekannt, daß die Tyrosinase hauptsächlich im sogenannten Met-Zustand vorliegt. (Riley 2000). Dies dient als Sicherheitsmechanismus vor einer unbeabsichtigten Aktivität, denn in diesem Zustand – Kupfer der Oxidationsstufe 2 und mit einem gebundenen Sauerstoffatom, meist ein Hydroxylion – ist es der Tyrosinase nicht möglich, Monophenole zu hydroxylieren (siehe Abbildung 8). Sie muß zuerst ein Diphenol zu einem Chinon oxidieren und im Zuge dieser Reaktion das aktive Zentrum in den deoxy-Zustand überführen. Danach kann wieder ein Sauerstoff gebunden und ein Monophenol umgesetzt werden. Ein kleiner Prozentsatz der Tyrosinase-Moleküle liegt immer im oxy-Zustand vor, ist also in der Lage, Monophenole in Diphenole umzusetzen und damit die katalytische Menge an Kofaktoren zu bilden, die notwendig sind, um immer mehr Tyrosinase-Moleküle zu aktivieren. Die Zeit, die benötigt wird, um genug katalytisch wirksames Diphenol zu produzieren, nennt sich „Lag-Phase“, weil in dieser Zeit die Gesamtumsatzrate für Substrat sehr gering zu sein scheint (Riley 2000). Wichtig für die folgenden Analysen ist, daß *nur* die *oxygenierte Tyrosinase* Monophenole umsetzen kann.

5.2.4.2. Zugang zu den Kupferzentren

In Abbildung 36 sind die Oberflächen der aktiven Zentren von Hämocyanin und Catecholoxidase, auf deren Grundlage die bis 2006 durchgeführten Analysen basierten, dargestellt – die im oberen Teil gezeigte Tyrosinasestruktur stand erst im Februar 2006 zur Verfügung.

Der Hauptunterschied zwischen den aktiven Zentren der Catecholoxidase und des Hämocyanins ist das Phenylalanin, das den Zugang zum CuA-Zentrum blockierte. Die Analyse von Sequenzalignments der Hämocyanine, Catecholoxidasen und Tyrosinasen bestätigte, daß dieses Phenylalanin in den Catecholoxidasen vorhanden ist, aber in den Tyrosinasen fehlt. Diese Korrelation führte zu der Hypothese, daß die Catecholoxidase-Aktivität am immer gut zugänglichen CuB-Zentrum lokalisiert war und die Monophenolhydroxylase-Aktivität am CuA, weil dieses nur in den Tyrosinasen gut zugänglich ist (Decker et al. 2000; Decker und Tuczec 2000; Decker 2005).

Wenn diese Hypothese zutrifft, dann ist zu erwarten, daß das CuA-Zentrum in der neu gelösten Röntgenstruktur frei zugänglich ist und der Zugang nicht durch ein Phenylalanin behindert wird. Die Homologie-Modelle sowohl der Maus- als auch der bakteriellen Tyrosinase, die beide auf Grundlage der Kartoffel-Catecholoxidase modelliert wurden, sagten beide genau diese Struktur vorher, aber der abschließende experimentelle Beweis stand noch aus.

Die Röntgenstrukturen der *Streptomyces castaneoglobisporus* Tyrosinase unterstützen nun genau diese Hypothese. Zwar wird der Zugang zum aktiven Zentrum durch das Caddieprotein verdeckt, aber nach der Dissoziation des binären Komplexes aus Tyrosinase und Caddieprotein – dies entspricht der Aktivierung *in vivo* – ist das CuA der bakteriellen Tyrosinase frei zugänglich, siehe Abbildung 36A. Dieser Fakt wird in der Analyse der Röntgenstruktur von Matoba zwar erwähnt, aber anders interpretiert.

Matobas Analyse zeigte, daß die Seitenkette des His54 in der Apoform 1wxc der Tyrosinase (also ohne Kupfer im aktiven Zentrum, PDB-Code 1WXC) zwei distinkte Konformationen einnehmen kann. Histidin 54 ist eines der drei Histidine, die CuA koordinieren. In einem Fall hat die Seitenkette die gleiche Konformation wie in der kupfergebundenen Form der Tyrosinase – der späteren Position des Kupferions zugewandt. Die zweite Konformation zeigt das Histidin mit einer etwa 90° zur ersten Konformation rotierten Seitenkette, die nun in Richtung des assoziierten Caddieproteins zeigt. Zusätzlich zeigt das His54 in allen Röntgenstrukturen der Tyrosinase einen höheren B-Faktor (erhöhte Beweglichkeit) als die anderen Histidine, auch in den kupfergebundenen Formen.

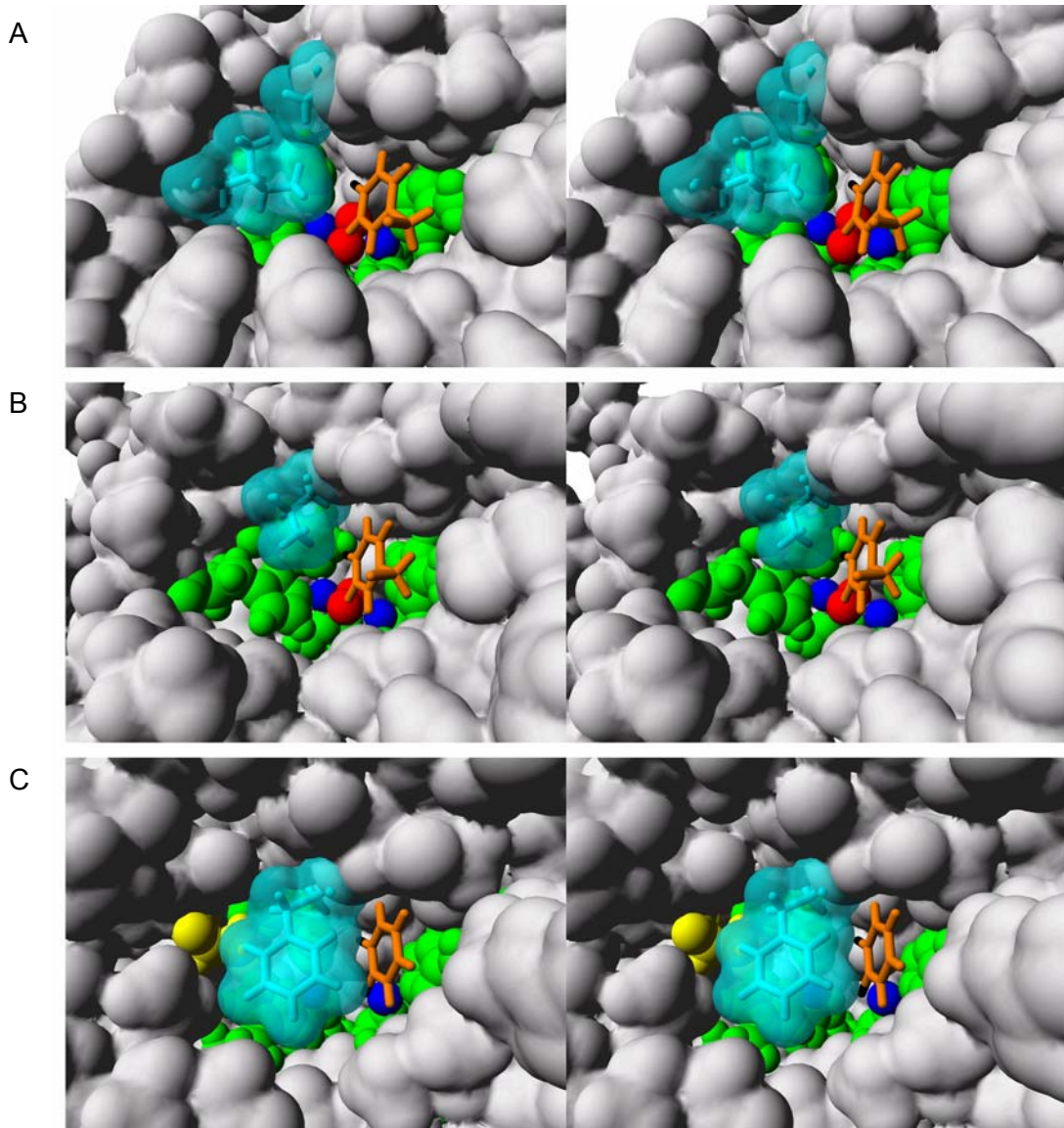


Abbildung 36: Stereoansichten der aktiven Zentren von Tyrosinase, Hämocyanin und Catecholoxidase

A. Tyrosinase (*Streptomyces castaneoglobisporus*)

B. Hämocyanin (*Limulus polyphemus*)

C. Catecholoxidase (*Ipomoea batatas*)

Potentielle Substratbindungsstellen werden in der Tyrosinase durch das Tyr98 des Caddieproteins, im Hämocyanin durch das Phe49 der Domäne 1 und in der Catecholoxidase durch ein den Phenylring des Inhibitors PTU visualisiert. Die schwarz markierten Atome sollen die Lage der jeweiligen OH-Gruppen zeigen.

Farbcodierung: Blaue Kugeln: Kupfer, rote Kugeln: Sauerstoff, grün: Histidine, gelb: Cystein, orange: Substrate, türkis: Aminosäuren, die den Zugang zum CuA blockieren. (aus Decker, Schweikardt, Tuzcek 2006)

In der Catecholoxidase wird das zum His54 homologe Histidin durch eine Thioetherbrücke fixiert, in der Tyrosinase kann es sich frei bewegen. Matoba sieht in dieser erhöhten Flexibilität des His54 den Grund für die unterschiedliche Aktivität von Catecholoxidase und Tyrosinase. Er weist daher den Histidinen 54 und 216 die Rolle der axialen Liganden zu. Die axialen Liganden sind die Bindungspartner, die das zu koordinierende Atom am schwächsten binden. Aus der Lage des His54 an der apikalen Koordinationstelle des CuA folgt logischerweise, daß die Seitenkette des His54 die Substratbindung an CuA blockiert. Die Seitenkette muß sich, um die vorgeschlagene bidentate Bindung des Substrats an CuA und

CuB zu ermöglichen, Matobas Meinung nach vom Kupfer lösen und zur Seite schwingen (vgl. Abbildung 37).

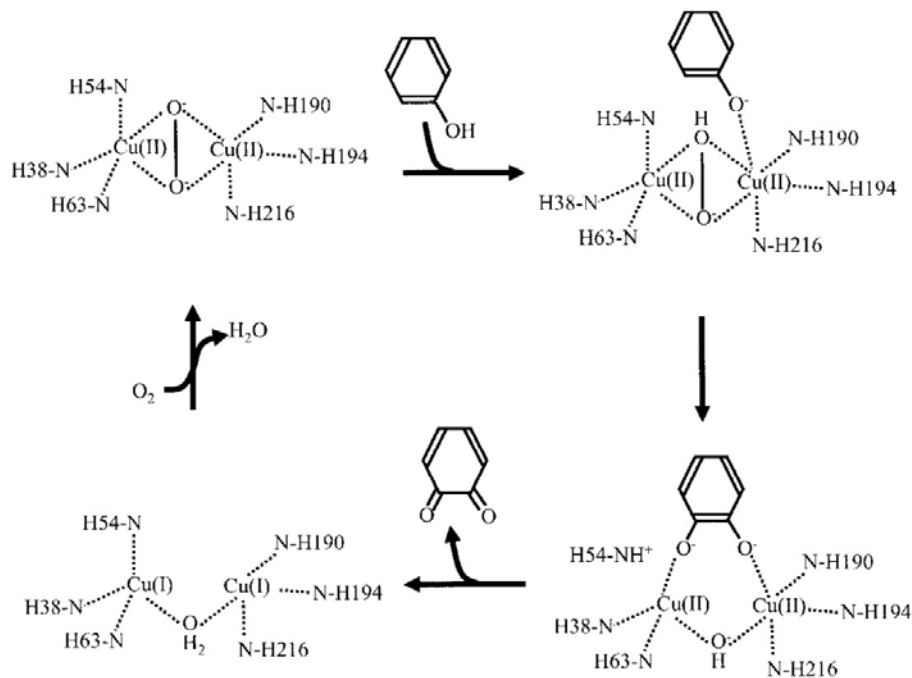


Abbildung 37: Von Matoba vorgeschlagener katalytischer Mechanismus der bakteriellen Tyrosinase
 Grafik aus (Matoba et al. 2006)

Während die experimentellen Befunde beeindruckend sind, gibt es einige Gründe, die gegen die beschriebene Interpretation sprechen. Die folgende Analyse der Röntgenstrukturen widerspricht beiden aufgestellten Hypothesen. Weder scheint das bewegliche His54 für die Tyrosinase-Aktivität notwendig zu sein, noch unterstützen sie die Festlegung des His54 als axialer Bindungspartner des CuA-Zentrums.

5.2.4.3. Bindungslängen im aktiven Zentrum

Die Stickstoffatome der Histidine – im Fall des Typ-3-Kupferzentrums die N_ε-Atome – koordinieren die Kupferionen über sogenannte Komplexbindungen. Für Komplexbindungen gilt dieselbe Regel wie für andere Bindungen auch: je kürzer die Bindung ist, desto stärker ist sie. Daraus folgert, daß eine kürzere Bindung schwerer zu lösen ist als eine lange Bindung (Pauling 1960). Das bedeutet, daß das His54 den größten Abstand zum CuA aufweisen müsste, da es als einziges von CuA dissoziiert.

Nur die oxygenierten Formen der Tyrosinase sind in der Lage, Monophenole umzusetzen (siehe Abbildung 8) – daher kann man die Met-Formen und die Deoxy-Formen des Enzyms von dieser Analyse ausschließen.

Vergleicht man die Histidin-Kupfer-Abstände in den Röntgenstrukturen der Tyrosinase (Tabelle 5), dann wird deutlich, daß in *keiner* der *oxygenierten Formen* der Tyrosinase das

His54 den größten Abstand zum CuA hat. In der durch Zugabe von Dithiothreitol erzeugten oxygenierten Form 1wx4 ist der Abstand des His63 sogar deutlich größer als der des His54. Dasselbe gilt für den Abstand von His190 und CuB. Die größten Abstände zwischen Kupfer und Histidin treten bei His63 und beim His216 auf. Daraus folgert, daß His54 nicht der am schwächsten gebundene Koordinationspartner des CuA ist und sich daher nicht problemlos während der Katalyse vom Kupfer lösen wird. Außerdem würde die zugeführte Energie, die notwendig ist, das His54 vom CuA zu lösen, auch das weniger stark gebundene His63 zur Dissoziation anregen.

Es entspricht übrigens der Konvention in der Chemie, daß die Bezeichnung „axial“ dem Liganden mit der größten Distanz zum Zentralatom zugewiesen wird. Auch hier ist aus Tabelle 5 nicht ersichtlich, wieso dem His54 diese Rolle zugewiesen wird.

Tabelle 5: Abstände aller His-N ϵ -Atome zu den von ihnen koordinierten Kupferionen CuA oder CuB in den von Matoba et al. 2006 gelösten Röntgenstrukturen der bakteriellen Tyrosinase.

1. Spalte: Datenbank-Code der Röntgenstruktur, 2. Spalte: Zustand des aktiven Zentrums, 3. Spalte: Auflösung der Röntgenstruktur, 4. Spalte: B-Faktor. Danach folgen die Abstände, angegeben in (Å), der jeweils größte Messwert ist hervorgehoben. Die Apoformen der Tyrosinase enthalten kein Kupfer, dementsprechend sind keine Abstände messbar. Einheiten in (Å), soweit nicht anders angegeben.

PDB Code	Zustand des aktiven Zentrums	Auflösung	B-Factor (Å ²)	CuA			CuB		
				His 38	His 54	His 63	His 190	His 194	His 216
1wxc	APO	1.2	12.3	-	-	-	-	-	-
1wx2	OXY	1.8	25.3	2.139	2.199	2.206	2.091	2.074	2.146
1wx3	MET 1	1.3	13.5	2.007	2.202	2.139	2.051	2.091	2.139
1wx4	OXY	1.5	12.9	2.084	2.158	2.375	2.058	2.089	2.176
1wx5	APO	2.0	15.8	-	-	-	-	-	-
2ahk	MET 2	1.7	24.3	2.096	2.260	2.438	2.049	2.160	2.191
2ahl	DEOXY	1.6	15.4	2.107	2.194	2.046	2.109	2.090	2.124

Die Schlussfolgerung der gezeigten Analysen ist, daß vom stereochemischen Standpunkt aus die Histidine 63 und 216 als axiale Liganden des CuA bzw. CuB gesehen werden sollten.

5.2.4.4. Geometrie des aktiven Zentrums

In Abbildung 5 wurde auf die Bindungsebene im aktiven Zentrum der Typ-3-Kupferproteine hingewiesen; sie beinhaltet im sauerstoffgebundenen Zustand die Stickstoffatome der koordinierenden Histidine, die Kupferionen und die Atome des Sauerstoffmoleküls.

Eine mögliche „Ebene“ kann man folgendermaßen definieren: wenn man zwei beliebige Punkte einer gegebenen Ebene miteinander verbindet, dann sollte diese Linie vollständig in der Ebene liegen. Das ist natürlich eine sehr mathematische Definition, die in der Natur niemals zu 100% eingehalten wird, besonders nicht in einem so flexiblen System wie einem Protein.

Aber wenn es mehrere Möglichkeiten gibt, eine Ebene zu definieren, sollte aus energetischen Überlegungen die Definition gewählt werden, die die durchschnittliche Abweichung aller potentiell in der Ebene liegenden Atome zur tatsächlichen Ebene minimiert.

Matoba definiert in Abbildung 37 die Aminosäuren His54 und His216 als axiale Liganden (für die Met-Formen I und II die Aminosäuren His54 und His190). Die sich daraus ergebende Bindungsebene im aktiven Zentrum der Tyrosinase ist in Abbildung 38 gezeigt. Man erkennt, daß die Ebene, die von den N ϵ -Atomen der His 38, 63, 190 und 194 aufgespannte Ebene weder die Kupfer- noch die Sauerstoff-Atome miteinschließt. (Man kann die Ebene auch zwischen den N ϵ -Atomen und den Sauerstoffatomen aufspannen und käme zu einem ähnlichen Ergebnis.)

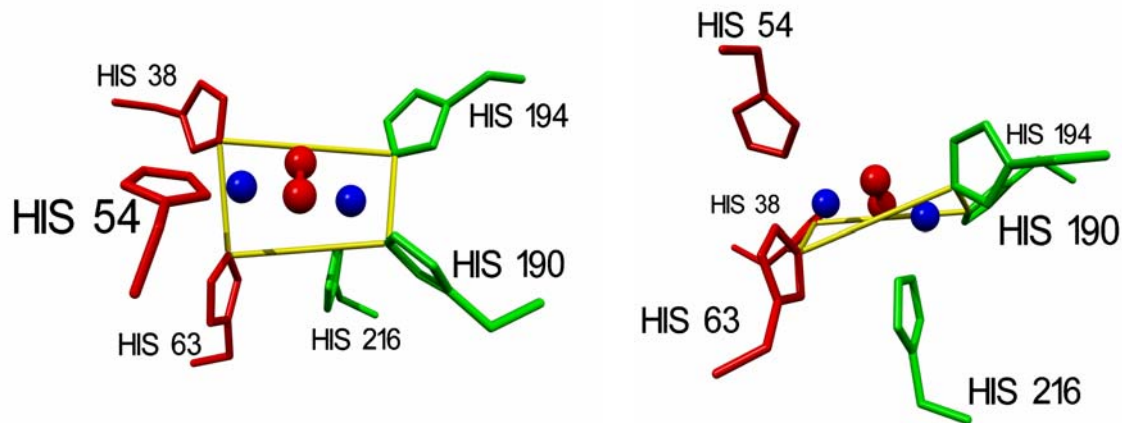


Abbildung 38: Von Matoba vorgeschlagene Bindungsebene im aktiven Zentrum der Tyrosinase
Ebene entsprechend Abbildung 37, mit His54 und His216 als axiale Liganden. Links: Aufsicht auf die Ebene, rechts: um 90° gedrehte Ansicht der Ebene, um die außerhalb der Ebene liegenden Atome zu zeigen. Rote Histidine koordinieren CuA, grüne Histidine koordinieren CuB. Blaue Kugeln: Kupfer, rote Kugeln: Sauerstoffe. Gelbe Linien: Bindungsebene.

Offensichtlich wurde hier versucht, die Konformation des aktiven Zentrums der Hämocyanine in Abbildung 5 nachzuempfinden, in der eines der axialen Histidine oberhalb, und eines unterhalb der Bindungsebene liegt.

Der auf dieser suboptimalen Definition der Bindungsebene aufbauende Reaktionsmechanismus ist folgender: zuerst bindet das Substrat monodentat – also mit einer Hydroxyl-Gruppe – an CuB, danach im Laufe der Reaktion mit je einer Hydroxyl-Gruppe an CuA und CuB. Da in Matobas Modell das His54 die axiale Bindungsstelle des CuA blockiert, muß es sich von CuA lösen, um Platz für das Substrat zu machen.

Die bidentate Bindung ist ein mögliches Reaktionsmodell – es wird hier zwar nicht favorisiert, läßt sich aber problemlos mit den Strukturdaten in Übereinstimmung bringen. Allerdings muß dafür nicht das His54 vom CuA abdissoziieren – wenn man die Bindungsebene korrekt definiert.

Benutzt man die in Abbildung 39 dargestellte alternative Bindungsebene, die His63 als axialen Bindungspartner des CuA definiert, dann können mehrere Probleme auf einmal gelöst werden. Es liegen mehr Atome innerhalb der Ebene, und die axiale Bindestelle des CuA ist unbesetzt. Sie kann direkt von der Hydroxylgruppe des Substrats eingenommen werden ohne die Notwendigkeit, die Bindung des Histidins zum Kupfer während der enzymatischen Reaktion zu lösen.

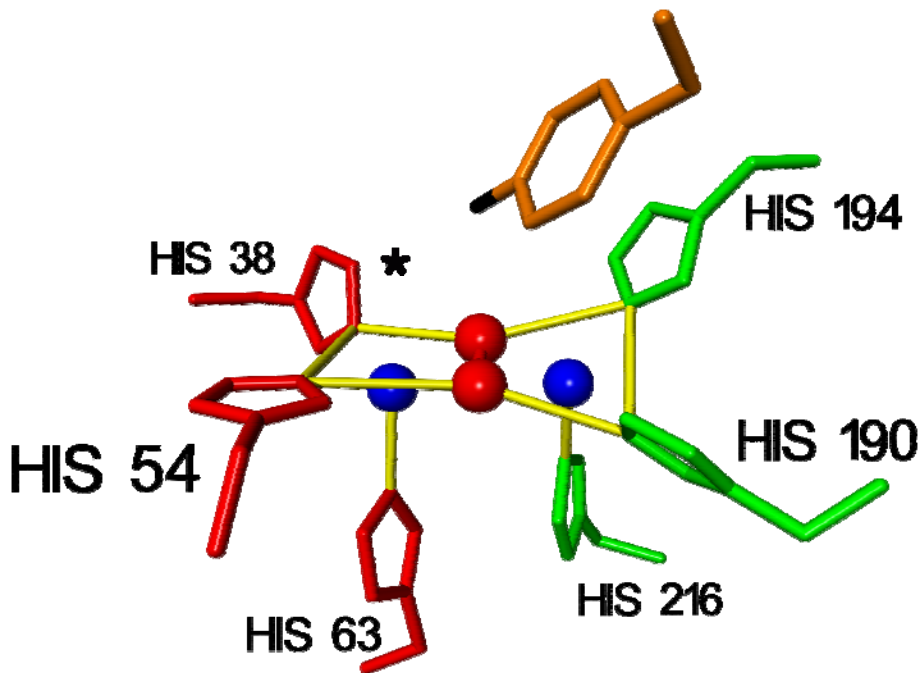


Abbildung 39: Alternative Bindungsebene in der Tyrosinase mit His63 und His216 als axiale Liganden
 Rote Histidine koordinieren CuA, grüne Histidine koordinieren CuB.
 Blaue Kugeln: Kupfer, rote Kugeln: Sauerstoffe. Gelbe Linien: Bindungsebene, orange: Tyr98 des Caddieproteins, Stern: axiale Koordinationsstelle des CuA. (aus Decker, Schweikardt, Tuzcek 2006)

5.2.4.5. Beweglichkeit des His54 in den Röntgenstrukturen der Tyrosinase

Interessanterweise findet man die zweite diskrete Konformation des His54 – also die von der normalen Position nach oben rotierte Version der Seitenkette – ausschließlich in einer der beiden Apoformen der Tyrosinase, die kein Kupfer enthält. Das heißt, die *einzig*e Röntgenstruktur, in der diese zweite Konformation vorliegt, ist in jedem Fall *enzymatisch inaktiv*. Diese Bewegung *kann* also logisch betrachtet nicht Teil des Reaktionsmechanismus sein.

In allen anderen Röntgenstrukturen, die Kupfer enthalten (1wx2, 1wx3, 1wx4, 2ahk, 2ahl), hat das His54 zwar einen höheren B-Faktor als die anderen Histidine (siehe Tabelle 1), aber dies bedeutet nur eine höhere Unsicherheit über die genauen Koordinaten, die die Seitenkette einnimmt. Dies lässt auf eine höhere Beweglichkeit schließen, aber nicht zwingend auf die Existenz zweier diskreter Konformationen des His54.

Die nachfolgende Tabelle soll veranschaulichen, wie man die B-Faktoren der Histidine im aktiven Zentrum interpretieren kann. Vor der Analyse sollte zunächst darauf hingewiesen werden, daß nicht nur His54 in verschiedenen Konformationen vorliegt, sondern auch das Isoleucin 42, mit dem His54 in direktem Kontakt steht. Es ergeben sich zwei Zustände des aktiven Zentrums, die als „offen“ und „geschlossen“ bezeichnet werden. Diese Konformationszustände sind in Abbildung 40 gezeigt.

Die „geschlossene“ Konformation (oberer Teil der Abbildung 40) entspricht der Konformation, wie sie in der Holo-Tyrosinase (funktionsfähige Tyrosinase mit Kupfer) vorkommt – die Seitenkette des His54 ist dem aktiven Zentrum zugewandt, und die Seitenkette des Ile42 liegt wie ein Riegel über der Seitenkette des His54. In der „offenen“ Konformation hingegen zeigt die Seitenkette des Ile42 vom aktiven Zentrum weg, so daß das His54 die Konformation einnehmen kann, die man in Abbildung 40 unten sieht. Seine Seitenkette ist vom aktiven Zentrum ab- und dem Caddieprotein zugewandt.

Tabelle 6 a) zeigt, daß die geschlossene Konformation („B“ – durchschnittlicher B-Faktor von 15,1) weitaus instabiler ist als die offene („A“ – durchschnittlicher B-Faktor von 9,6). Grund für diese um 57% erhöhte Mobilität ist vermutlich, daß in der Apo-Tyrosinase der Bindungspartner des His54 – das Kupfer – fehlt. Weiterhin wechselwirkt His54 mit dem His97 des Caddieproteins.

Tabelle 6 b) macht deutlich, daß das His54 in allen Röntgenstrukturen einen höheren B-Faktor hat als die anderen Histidine im aktiven Zentrum. Tabelle 6 d) beziffert diesen Unterschied der B-Faktoren bei der oxygenierten Tyrosinase auf 45-50%. Grund ist höchstwahrscheinlich, daß His54 die einzige Aminosäure im aktiven Zentrum ist, die *nicht* in einer Helix verankert ist. Schleifen haben grundsätzlich eine höhere Beweglichkeit, die sich hier auf das His54 auswirkt.

Das ist auch der Grund für die im Durchschnitt höhere Beweglichkeit der CuA-Histidine – in der oxygenierten Tyrosinase haben diese um ca. 30% höhere B-Faktoren, siehe Tabelle 6c).

Die dargelegten Betrachtungen zeigen, daß die Beweglichkeit des His54 für die Katalyse vermutlich nicht notwendig ist. Die kann man aus der Tabelle 6 a) und deren Auswertung Tabelle 6 e) schließen: Der B-Faktor des His54 ist nur etwa 20% höher als der B-Faktor-Mittelwert der Histidine 38 und 63 – ohne daß eine zweite diskrete Konformation des His54 wie in der Apo-Tyrosinase (Struktur 1wxc) nachzuweisen wäre.

Alle Röntgenstrukturen zeigen die Tyrosinase im binären Komplex mit dem Caddieprotein. Es ist natürlich schwierig vorherzusagen, welches Maß an Beweglichkeit im aktiven Zentrum des nativen Enzyms herrscht, wenn es vom Caddieprotein abdissoziiert ist.

Tabelle 6: Zusammenstellung der B-Faktoren aller Röntgenstrukturen der bakteriellen Tyrosinase

Schwarze Schrift: Apo-Tyrosinase, rote Schrift: oxygenierte Holo-Tyrosinase, grüne Schrift: Met-Holo-Tyrosinase, blaue Schrift: deoxygenierte Holo-Tyrosinase

a) His 54 (1wxc): B-Faktoren der alternativen Konformationen (Å²)

Atom	Konform. A	Konform. B
CB	11,1	12,7
CG	10,2	13,8
ND1	7,3	16,2
CD2	9,9	14,8
CE1	7,9	16
NE2	11,1	16,9
Mittelwert	9,6	15,1

 "offen" "geschlossen"
Konformation

b) Durchschnittlicher B-Faktor aller Histidine im aktiven Zentrum der *S.castaneoglobisporus* Tyrosinase

His	Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)						
	1wxc	1wx2	1wx3	1wx4	1wx5	2ahk	2ahl
38	9,3	25,4	13,0	12,0	21,9	17,6	15,0
54	9,6 / 15,1	28,3	18,0	14,0	18,5	22,0	15,8
63	6,4	18,5	8,4	8,5	8,2	15,9	10,5
190	7,9	20,4	9,0	8,6	10,5	17,9	11,0
194	8,0	16,9	9,2	9,7	11,9	17,0	12,1
216	11,0	16,4	7,9	7,9	11,1	16,1	10,0

c) Vergleich der B-Faktoren aller Histidine von CuA mit den B-Faktoren aller Histidine aus CuB

MW His CuA	8,4 / 10,3	24,1	13,1	11,5	16,2	18,5	13,8
MW His CuB	9,0	17,9	8,7	8,7	11,2	17,0	11,0
Differenz (%)	- 6 / 15	34	51	32	45	9	25

d) Vergleich der B-Faktoren des His54 mit den B-Faktoren aller anderen Histidine im aktiven Zentrum

MW nicht-His54	8,5	19,5	9,5	9,3	12,7	16,9	11,7
His54	9,6 / 15,1	28,3	18,0	14,0	18,5	22,0	15,8
Differenz (%)	13 / 77	45	89	50	45	30	35

e) Vergleich der B-Faktoren des His54 mit den B-Faktoren der beiden anderen Histidine in CuA

MW His CuA	8,4 / 10,3	24,1	13,1	11,5	16,2	18,5	13,8
His54	9,6 / 15,1	28,3	18,0	14,0	18,5	22,0	15,8
Differenz (%)	9 / 47	18	37	22	14	19	15

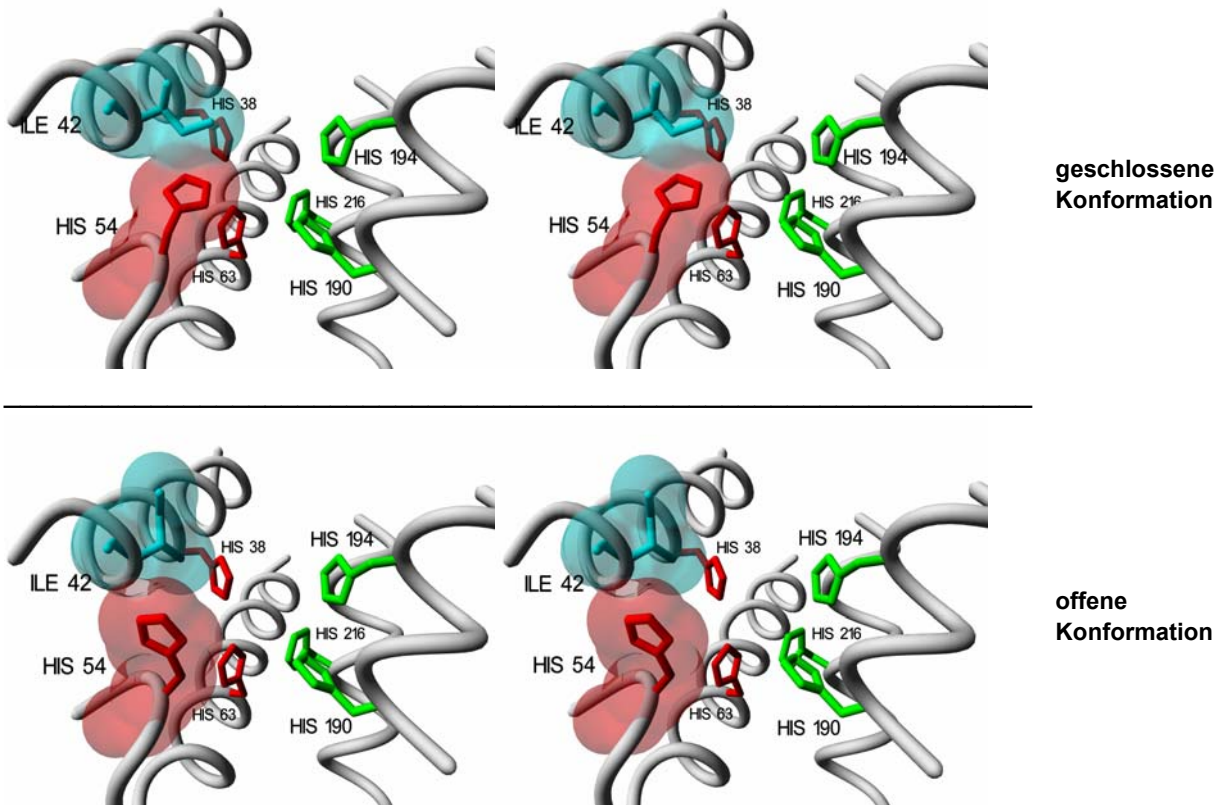


Abbildung 40: Konformationen der Aminosäuren His54 und Ile42 im aktiven Zentrum der Apo-Tyrosinase
Struktur der Apo-Tyrosinase (1wxc). Rot: Histidine, die im Holoenzym CuA binden, grün: Histidine, die im Holoenzym CuB binden. Türkis: Ile42. Stereoabbildungen, Parallelblick.

5.2.4.6. Die Rolle des His54 beim Kupferimport ins aktive Zentrum

Eine naheliegende Bedeutung für die Beweglichkeit des His54 ist der Kupferimport, moduliert durch das Caddieprotein. Dafür spricht, daß die zweite diskrete Konformation des His54 ausschließlich in der Apo-Tyrosinase zu finden ist und durch das Caddieprotein stabilisiert zu werden scheint. Es ist in diesem Zusammenhang höchst interessant, daß ausgerechnet die offene Konformation, in der das His54 mit dem Caddieprotein wechselwirkt, stabiler ist als die geschlossene Konformation, die in den kupferbeladenen Formen der Tyrosinase bevorzugt eingenommen wird (vgl. B-Faktoren Tabelle 6a).

Der binäre Komplex aus Caddieprotein (melC1) und Tyrosinase (melC2) wurde zuerst in einer kupferfreien Umgebung kristallisiert und danach mit Kupfersulfat-Lösung inkubiert (siehe Kapitel 5.1). Erst dies führte zum Einbau der Kupferionen in die rekombinant hergestellte Tyrosinase. In der Röntgenstruktur 1wx2 – eine der beiden oxygenierten Tyrosinasestrukturen – sind neben den zwei Kupferionen im aktiven Zentrum zwei weitere Kupferionen außerhalb des aktiven Zentrums zu finden (grüne Kugeln in Abbildung 41).

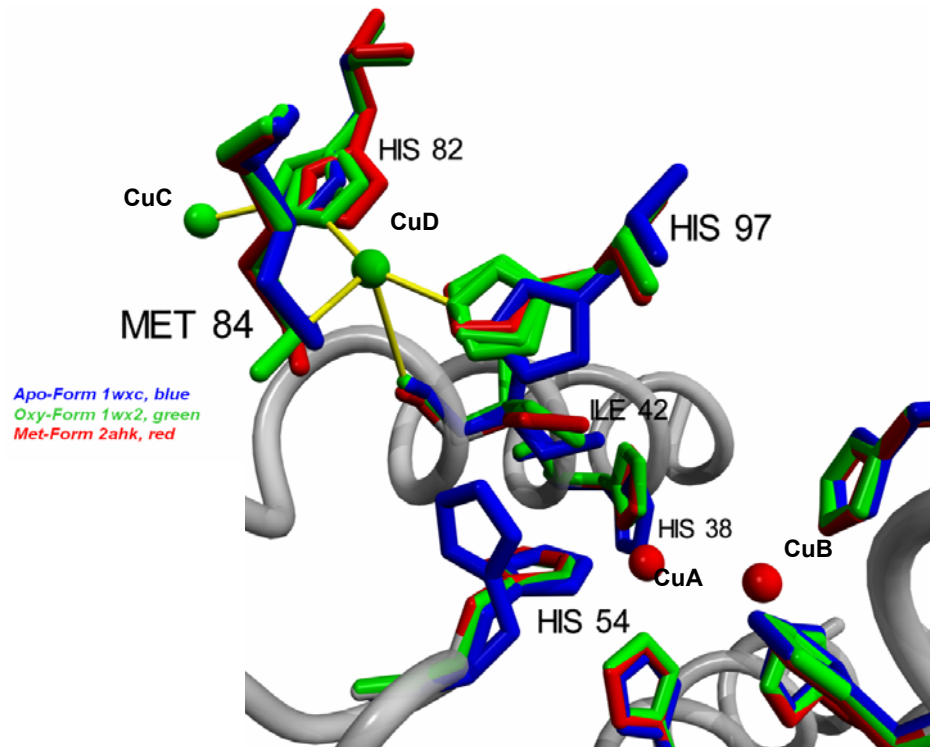


Abbildung 41: Kupferionen und flexible Aminosäuren in der bakteriellen Tyrosinase und im Caddieprotein
 Blaue Aminosäuren aus der Röntgenstruktur der Apo-Tyrosinase (1wxc), grüne Aminosäuren aus der oxygenierten Tyrosinase (1wx2), rote Aminosäuren aus der Met-Tyrosinase (2ahk). Auch in der Met-Tyrosinase ist Kupfer im aktiven Zentrum enthalten, dies wurde zur besseren Übersicht nicht gezeigt. Die Abbildung zeigt die Kontaktregion zwischen Tyrosinase und Caddieprotein - die Aminosäuren His82, Met84 und His97 sind dem Caddieprotein zuzuordnen.

Diese zwei zusätzlichen Kupferbindestellen befinden sich im Caddieprotein, am Interface zur Tyrosinase. Betrachtet man die Orientierung und Konformation der kupferligandierenden Aminosäuren (His82N ϵ , Met84S δ und His97N ϵ des Caddieproteins sowie Ile42O der Tyrosinase als axialer, schwach gebundener Ligand), dann liegt die Vermutung nahe, daß man hier die einzelnen Phasen des Kupferimports in die Tyrosinase nachverfolgen kann.

Über das Caddieprotein und seine Rolle beim Kupfereinbau in die Tyrosinase wird seit langem in verschiedenen Publikationen berichtet. Leu zeigte 1992, daß melC1, das Caddieprotein, für die Sekretion der Tyrosinase notwendig ist (Leu et al. 1992). Er und sein Kollege Chen bewiesen 1993 die Bedeutung bestimmter Aminosäuren des melC1 für den Kupfereinbau in die Tyrosinase (Chen, L. Y. et al. 1992; Chen, L. Y. et al. 1993). Dabei handelte es sich um His102 und His117 im *Streptomyces antibioticus*-melC1, die homolog zu den erwähnten Aminosäuren His82 und 97 in *Streptomyces castaneoglobisporus*-melC1 sind.

Liaw und Lee fanden 1995, daß die beiden genannten Histidine unterschiedliche Rollen bei der Sekretion und der Aktivierung der Tyrosinase spielen. Für die Bildung des binären Komplexes aus Tyrosinase und melC1 spielten sie keinerlei Rolle, obwohl sie beide am Interface des Komplexes liegen und mit der Tyrosinase wechselwirken (Liaw und Lee 1995; Tsai und Lee 1998). Trotzdem zeigte sich, daß beide Aminosäuren zusammen essentiell für die Aktivierung der Tyrosinase waren. Wurde His102 durch eine andere Aminosäure ersetzt, war selbst eine partielle Rekonstitution des binären Komplexes durch Inkubation mit Kupferlösung unmöglich.

Dies spricht für eine wichtige Rolle des His102 – und des homologen His82 in *S.castaneoglobisporus* melC1 – bei der initialen Kupferrekrutierung aus dem umgebenden Medium. Aus diesem Grund wurde die Wechselwirkung des Caddieproteins mit der Tyrosinase genauer untersucht.

5.2.4.7. Kupfereinbau in die Tyrosinase durch das Caddieprotein

Der nachfolgend beschriebene Reaktionspfad wurde aus den vorliegenden Röntgenstrukturen und den verfügbaren Informationen aus der Literatur entwickelt. Die schon in Abbildung 41 gezeigten Konformationen der Aminosäuren im aktiven Zentrum sind weder Näherungen noch Strukturvorhersagen, sie sind in den Röntgenstrukturen 1wxc, 1wx2 und 2ahk zu finden. Die einzige Annahme ist die Position des Kupfers in Phase 3 und 6. Daher ist dieses Kupfer nicht blau, sondern violett gefärbt.

Die in Kapitel 5.2.4.5 und in Abbildung 40 vorgestellte offene Konformation bildet den Startpunkt für den vorgeschlagenen Kupferimport-Mechanismus.

Phase 1

Hier bindet das His82 des melC1 ein im Lösungsmittel befindliches Kupferion (Abbildung 42 a). Theoretisch könnten auch die Histidine 64, 65, 66 und 68 an dieser Rekrutierung von Kupfer teilnehmen. Sie liegen aber alle in einer 10 Aminosäuren langen Oberflächenschleife, die in den Röntgenstrukturen der Tyrosinase nicht aufgelöst werden konnte. Daher ist ihre Position nicht bekannt, und über die Involvierung in die Kupferaufnahme kann nur spekuliert werden. Diese Position des Kupfers wird mit „CuC“ benannt.

Phase 2

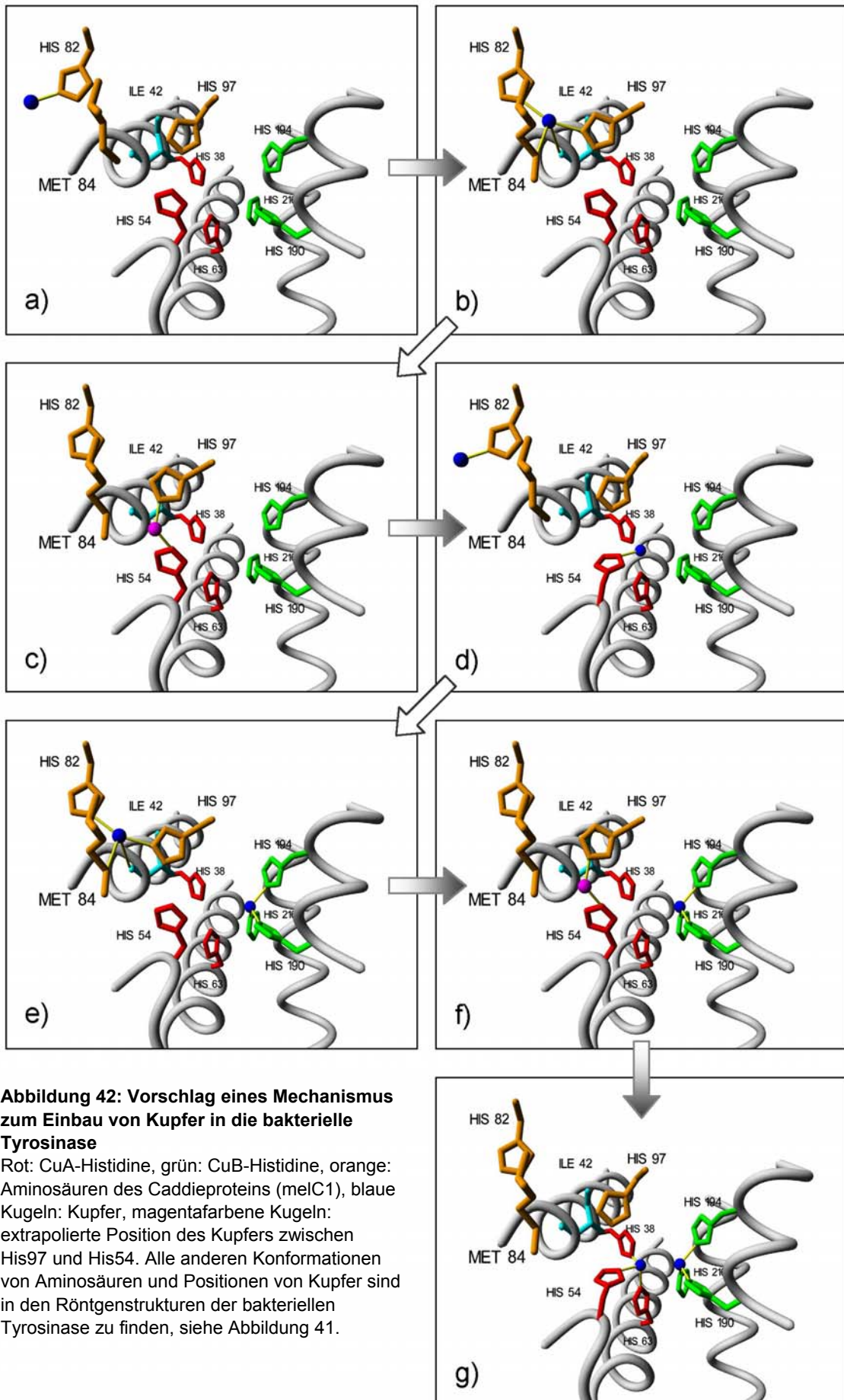
Die Seitenkette des His82 führt eine Drehung von etwa 180° um die C β -C γ -Bindung durch. Dies bringt das gebundene Kupferion in eine Position, die von den Aminosäuren His82, Met84 und His97 des melC1 sowie Ile42 der Tyrosinase umschlossen wird. Die Seitenketten der im melC1 liegenden Aminosäuren ändern hierbei ihre Konformation, um das Kupfer besser koordinieren zu können. Koordinierende Atome sind His82N ϵ , Met84S δ und His97N ϵ (mit Abständen von 2,4 Å, 2,7 Å und 2,4 Å vom Kupfer) sowie der Rückgrat-Sauerstoff des Ile42 (Abstand 3,4 Å und damit nur schwach gebunden, siehe Abbildung 42 b)

Die Koordinationsgeometrie dieses „CuD“-Zentrums ist trigonal planar, wie im Typ-3-Kupferzentrum eines deoxygenierten Hämocyanins (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5), aber mit einem zusätzlichen, schwach assoziierten Liganden Ile42O unterhalb der Bindungsebene.

Phase 3

Diese Phase beinhaltet die einzige Extrapolation innerhalb des vorgeschlagenen Mechanismus, die Position des Kupferions (magentafarben). Die Röntgenstruktur 1wx2 zeigt alternative Konformationen des His97, eine davon zeigt mit dem N ϵ -Atom der Seitenkette in Richtung des His54, wenn auch ohne assoziiertes Kupfer. Um den Kupfereinbau zu bewerkstelligen, muß das His97 das Kupfer an His54 übergeben. Also wird folgender Mechanismus vorgeschlagen:

Die Seitenkette des His97 führt eine Drehung von etwa 180° um die C β -C γ -Bindung durch (siehe Abbildung 42 c) – ähnlich der Bewegung des His82 in Phase 1.



Dadurch wird das N ϵ -Atom mit dem koordinierten Kupferion in Richtung des His54 der Tyrosinase orientiert. In dieser Position kann es sowohl von His97 als auch von His54 koordiniert werden. Der Raum, den das Kupfer einnehmen würde, liegt in der Röntgenstruktur in der Nähe zweier Kristallwassermoleküle. Die Struktur bietet also genug Platz für ein Kupferion an dieser Stelle. Diese Position des Kupfers wird hiermit „CuE“ benannt.

Phase 4

Im nächsten Schritt übernimmt das His54 das Kupfer vom His97 und rotiert mit seiner Seitenkette und dem koordinierten Kupfer ins aktive Zentrum, nämlich an die Stelle, wo später CuA positioniert sein wird. Von dort aus wird das Kupfer zum CuB-Zentrum, dem Ziel des Einbaus weitergeleitet – allerdings geben die Röntgenstrukturen keinerlei Aufschluß darüber, wie dies vonstatten geht (Abbildung 42 d).

Wiederholung der Phase 1 bis 4 zum Einbau des zweiten Kupferions

Wenn His54 das Kupfer ans CuB-Zentrum abgeben hat, rotiert es in die offene Konformation zurück und der Zyklus beginnt erneut (Abbildung 42 d-g). Wenn das zweite Kupfer (CuA) im aktiven Zentrum liegt, bleibt das His54 am Kupfer gebunden und nimmt – genauso wie Ile42 – dabei die geschlossene Konformation ein, die in den kupfergebundenen Formen stabiler ist als die offene Konformation.

Die Röntgenstruktur der oxigenierten Tyrosinase 1wx2 zeigt vermutlich die letzte Phase des Kupferimports mit vollbesetzten Kupferbindestellen. Es hat wahrscheinlich energetische Gründe daß die Bindestelle des postulierten CuE in der Röntgenstruktur nicht besetzt ist. Das Kupfer wird hier nur von zwei Liganden koordiniert und nicht von dreien wie üblich – es handelt sich also um einen instabilen Zwischenzustand. Daher wird das His97 bevorzugt die Konformation der Phase 2 einnehmen, wo es zusammen mit Met84 und His82 das CuD bindet. Leider geben die Röntgenstrukturen keine schlüssigen Hinweise auf den Mechanismus, der zur Spaltung des binären Komplexes führt.

5.2.4.8. Das Caddieprotein als Faltungshelfer?

Halaban und ihre Kollegen fanden 2001 heraus, daß die Faltungseffizienz der Tyrosinase in menschlichen Melanom-Zellen von der Konzentration der Substrate DOPA und Tyrosin im endoplasmatischen Retikulum (ER) abhängt. DOPA und Tyrosin stabilisierten die Tyrosinase im ER und ermöglichten erst den sekretorischen Transport (Halaban et al. 2001).

Wenn die Erhöhung der Faltungseffizienz von einer spezifischen Interaktion mit Tyrosin oder DOPA abhängt, könnte das darauf hindeuten, daß das Caddieprotein nicht nur beim Kupfertransport und der Aktivierung der Tyrosinase eine Rolle spielt, sondern auch ein Faltungshelfer ist. Auch Chen vermutete 1992 schon eine entsprechende Funktion des Caddieproteins (Chen, L. Y. et al. 1992).

Aus den Röntgenstrukturen und den Ergebnissen aus der Literatur lässt sich folgende Arbeitshypothese entwickeln: Das Gen des Caddieproteins, melC1, liegt direkt vor dem Tyrosinase-Gen melC2. Das Caddieprotein wird somit als Erstes abgelesen und bietet der

Tyrosinase einen Nukleationspunkt, um den herum sie sich falten kann. Dieser Nukleationspunkt ist das Tyrosin 98, das später, im binären Komplex, ins aktive Zentrum der Tyrosinase hineinragt. Der Wirkmechanismus wäre äquivalent zu dem eines gelösten Substratmoleküls (siehe Halaban et al. 2001).

Ähnliche Interaktionen wie zwischen Tyrosinase und Caddieprotein gibt es auch in Proteinen, z.B. den Hämocyaninen der Arthropoden. Dort kommt zwar kein Caddieprotein vor, aber die N-terminale Domäne der Arthropoden-Hämocyanine enthält ein Phenylalanin, welches – äquivalent dem Tyr98 des Caddieproteins – in das aktive Zentrum hineinragt. Dieses Phenylalanin dient vermutlich der sich anschließend faltenden Domäne 2 als Nukleationspunkt. Damit wäre es denkbar, daß Domäne 1 evolutionär von einem Chaperon abstammt.

Eine gerichtete Mutagenese dieser aromatischen Aminosäuren im Caddieprotein oder in Domäne 1 der Arthropoden-Hämocyanine würde Aufschluß darüber geben, ob der vorgeschlagene Mechanismus tatsächlich Verwendung findet und welche Eigenschaft der Aminosäure im Nukleationszentrum wichtig ist – die Größe oder die Aromatizität. Eine Mutationsreihe gegen verschiedene Aminosäuren wäre hier ein sinnvoller Ansatz, am besten in einem schon etablierten System wie der in HEK-Zellen (human embryonic kidney) exprimierten Maus-Tyrosinase.

Diejenigen Typ-3-Kupferproteine, bei denen man kein Phenylalanin oder Tyrosin findet, das von einer anderen Domäne ins aktive Zentrum ragt, haben interessanterweise auch eine andere Domänenstruktur (Abbildung 10). Zwar gibt es bei den Mollusken-Hämocyaninen oder der Kartoffel-Catecholoxidase auch eine Domäne, die das aktive Zentrum verdeckt, aber diese liegt C-terminal zum aktiven Zentrum, wird später als dieses translatiert und kann folglich keinen Nukleationspunkt für die Faltung des aktiven Zentrums bereitstellen. Die Aufgabe dieser Domänen und der entsprechenden Aminosäuren liegt vielmehr in der temporären oder permanenten Blockade des aktiven Zentrums.

Die Aminosäuren, die aus den C-terminalen Domänen in die aktiven Zentren hineinragen, sind:

Leu 2830	im	<i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin	(PDB-Code 1js8)
Leu 343	im	<i>Rapana thomasi</i> Hämocyanin	(PDB-Code 1lnl)
Leu 439	in	<i>Ipomoea batatas</i> Catecholoxidase	(PDB-Code 1bt1)

Bei *Ipomoea batatas* Catecholoxidase wird der C-Terminus bei der Aktivierung der Catecholoxidase proteolytisch entfernt (Gerdemann et al. 2002). Der C-Terminus der Hämocyanine bleibt auch in der nativen Form erhalten. Ob die entsprechenden Domänen eine Rolle beim Kupfereinbau spielen, bleibt zu klären.

5.2.4.9. Zusammenfassung und Ausblick

Auf Grundlage der Röntgenstrukturen wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der die hohe Mobilität des His54 in der Apo-Tyrosinase und das Verschwinden dieser Mobilität in den kupfergebundenen Formen erklärt. Die Mobilität des His54 ist auf seine Rolle im Kupfereinbau in die Tyrosinase zurückzuführen, und nicht Voraussetzung für die Hydroxylierung von Monophenolen.

Es ist deutlich, daß dieser vorgeschlagene Mechanismus des Kupfereinbaus nur in solchen Proteinen funktionieren kann, die keine Thioether-Brücke am äquivalenten Histidin aufweisen. Die starre Struktur einer solchen Brücke würde den Kupfereinbau über ein sich bewegendes Histidin aller Wahrscheinlichkeit nach erschweren oder sogar unmöglich machen. Mangels struktureller Information läßt sich für die Catecholoxidase aus der Kartoffel oder die Tyrosinase aus Pilzen – in denen diese Thioether-Brücke vorkommt – kein alternativer Mechanismus für den Kupfereinbau formulieren.

Was den Kupfereinbau in Proteine betrifft, die nicht wie die bakterielle Tyrosinase in einem binären Komplex mit einem Caddieprotein gefunden wurden, gibt es mindestens zwei mögliche Szenarien des Kupfereinbaus.

1. Sie bewerkstelligen den Kupfereinbau über uns bisher unbekannte Kupferchaperone, die dem Caddieprotein ähnliche Funktionen in Bezug auf Kupferrekrutierung und Transfer übernehmen.
2. Die Proteine selbst sind in der Lage, Kupfer aus der Umgebung aufzunehmen und in das aktive Zentrum einzubauen.

Die Klärung dieser Frage liegt außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit, ist aber ein interessantes Thema für weiterführende Untersuchungen.

5.3. Maus-Tyrosinase

5.3.1. Das Pigmentierungssystem der Säugetiere

Die Pigmentierung von Haut und Haaren wird sowohl bei Säugetieren als auch bei anderen Lebewesen durch die farbigen Produkte der Melanin-Synthese hervorgerufen. An dieser Synthese ist das Enzym Tyrosinase maßgeblich beteiligt - unabhängig davon, ob es sich um ein Säugetier oder ein Bakterium handelt (Riley 1997; Protá et al. 1998; Garcia-Borrón und Solano 2002; Land et al. 2003; Tadokoro et al. 2005; Claus und Decker 2006).

Das Prinzip der Melanin-Synthese ist bei allen Lebewesen identisch: ein aromatischer Ausgangsstoff wird über mehrere Oxidations- und Additionsschritte zum hochmolekularen Melanin umgesetzt, welches abhängig von den zur Verfügung stehenden Ausgangsstoffen, die im Laufe der Polymerisierung eingebaut werden, eine unterschiedlich intensive rötliche bis schwarz-braune Färbung aufweist (Riley 1997; Wang und Hebert 2006). Konkret handelt es sich beim primären Substrat für die Tyrosinase unter physiologischen Bedingungen um die Aminosäure L-Tyrosin, die enzymatisch zuerst zu L-DOPA, dann zu L-Dopachinon umgesetzt wird. Unter Einwirkung der Enzyme TYRP1 und TYRP2 (Dopachrom-Tautomerase (Dct)) kommt es zur Bildung diverser Intermediate, die letztendlich polymerisieren und somit Melanin bilden (Land et al. 2003; Wang und Hebert 2006). Störungen in der Pigmentbildung führen zu unterschiedlichen Formen von Albinismus, die so vielfältig sind wie die beteiligten Proteine (Oetting et al. 1996; Oetting et al. 2003).

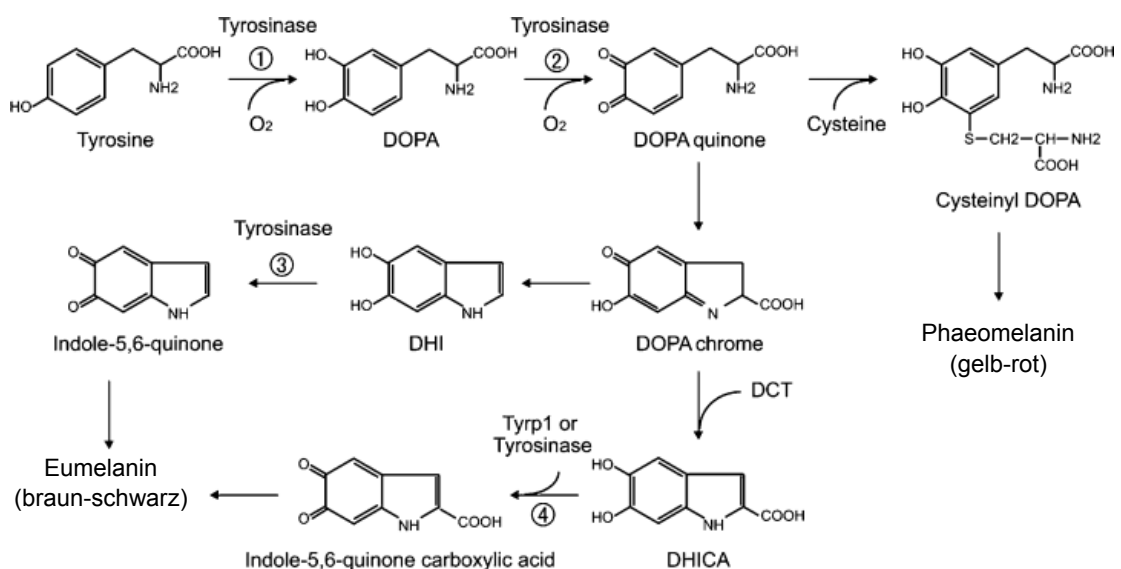


Abbildung 43: Melaninsynthese durch Tyrosinase, Tyrp1 und Tyrp2/Dct

Dct: Dopachromtautomerase, DOPA: Dihydroxyphenylalanin, DHI: Dihydroxyindol, DHICA: Dihydroxyindol-Carbonsäure. Grafik verändert nach (Wang und Hebert 2006)

Die Komplexität der Melanisierung ist jedoch bei Säugetieren ungleich höher als bei Bakterien, da wesentlich mehr Faktoren in diesen Reaktionsweg eingreifen. Zum einen spielt hier die Kompartimentierung der Zelle eine große Rolle. Die Tyrosinase reift im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat und erreicht dann erst ihren Bestimmungsort,

das Melanosom (Setaluri 2003; Wang und Hebert 2006). Zum anderen wird die Melaninsynthese – wie schon erwähnt – nicht allein durch die Tyrosinase katalysiert, sondern durch einen Multienzymkomplex, der auch TYRP1 (speziesspezifische DHICA-Oxidase (Kobayashi et al. 1994b)) und TYRP2 enthält – die „Tyrosinase-related-proteins“ – welche stark homolog zur Tyrosinase sind (Jimenez-Cervantes et al. 1994; Kobayashi et al. 1994b; Olivares et al. 2001; Garcia-Borron und Solano 2002). Im Gegensatz zu anderen Tyrosinasen besitzt die Säugertyrosinase eine Transmembran-Domäne und bildet schon im Endoplasmatischen Retikulum Homo-Dimere (Francis et al. 2003). Zusammen mit TYRP1 und TYRP2 bildet sie den sogenannten melanogenen Komplex, der eine Größe zwischen 200 und 700 kDa erreichen kann (Orlow et al. 1994).

Trotz der hohen Sequenzidentität zwischen Tyrosinase und TYRP1 / TYRP2 binden letztere nicht dieselben Metallionen; die Ursache hierfür ist unbekannt. TYRP1 bindet so gut wie kein Kupfer und auch keine anderen zweiwertigen Kationen (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). TYRP2 hingegen bindet am effizientesten zweiwertiges Zink (Solano et al. 1994; Furumura et al. 1998).

Halaban und Moellmann stellten die Hypothese auf, daß auch Häm-Eisen an die Histidine gebunden werden könnte, die in TYRP1 enthalten sind, konnten dies aber nicht schlüssig beweisen, da diese Hypothese lediglich auf dem Vorhandensein einer für Hämbindungsstellen typischen Kennsequenz in beiden Proteinen basiert (Halaban und Moellmann 1990). Da kein Nachweis einer Hämbindung erfolgte, ist nicht abschließend geklärt, welche Cofaktoren TYRP1 benötigt.

Phänotypisch gesehen ist TYRP1 für die Bildung sehr dunkler Pigmente verantwortlich. Eine Deletion des TYRP1 führt zur Bildung von braunem anstelle von schwarzem Pigment. Deswegen wird das Gen für TYRP1 auch „Brown“-Locus genannt (Sarangarajan und Boissy 2001). Die tatsächliche Funktion des TYRP1 wird noch diskutiert. Es zeigt in unterschiedlichen Organismen unterschiedlich starke Monophenolhydroxylase-, Diphenoloxidase- und DHICA-Oxidase-Aktivität (Jimenez et al. 1991; Jimenez-Cervantes et al. 1993; Boissy et al. 1998; Sarangarajan und Boissy 2001; Garcia-Borron und Solano 2002). Dem TYRP1 wird neben der initialen Produktion von DOPA, welches als Cofaktor für die Tyrosinase benötigt wird, auch eine stabilisierende Wirkung auf die Tyrosinase im melanogenen Komplex zugeschrieben (Hearing et al. 1992; Orlow et al. 1994; Kobayashi et al. 1998).

Daraus folgt, daß die Melanin-Synthese bei Säugetieren ein sehr komplexer Prozeß ist, der nicht nur von der Aktivität der Tyrosinase und der assoziierten Proteine TYRP 1 / 2 abhängig ist (Setaluri 2003), sondern auch von der Funktion der anderen Proteine, wie z.B. dem P-Protein, welches den pH-Wert im Melanosom reguliert (Brilliant 2001), oder MART-1 und gp100 / Pmel17 / silver, die für die Melanosomen-Reifung wichtig sind (Kwon et al. 1991; Kobayashi et al. 1994a; Kwon et al. 1994; Watabe et al. 2004; Hoashi et al. 2005). In diesem hochkomplexen Zusammenspiels vieler Enzyme ist die Tyrosinase Dreh- und Angelpunkt des Pigmentierungsprozesses, da sie die geschwindigkeitsbestimmende Start-Reaktion katalysiert. Wenn die Tyrosinase nicht richtig funktioniert, dann fehlt das entsprechende Substrat für die nachfolgenden Reaktionen.

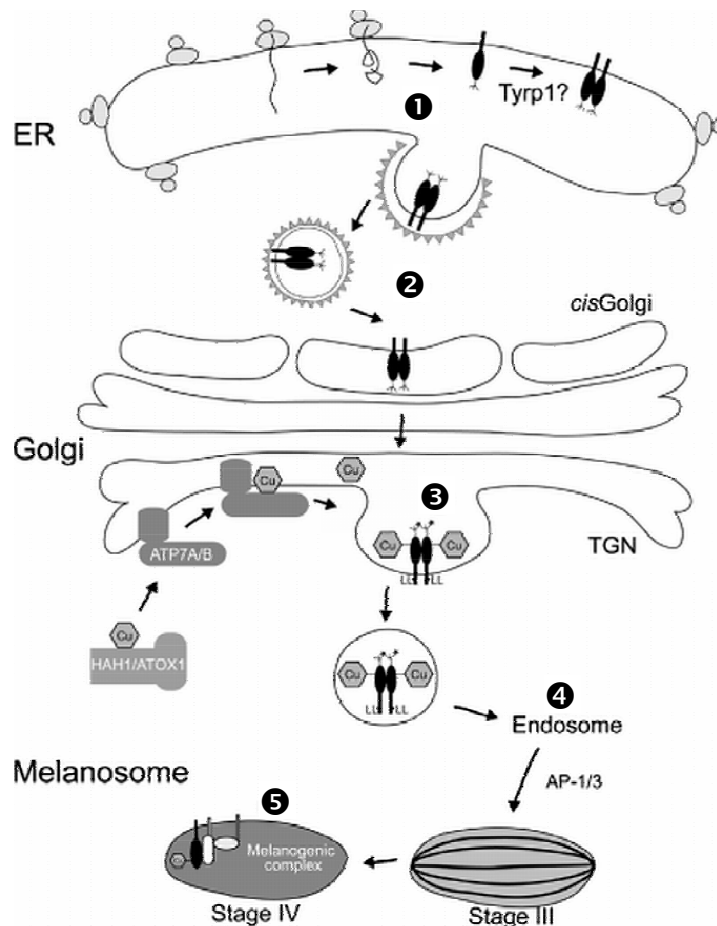


Abbildung 44: Reifung der Säugetier-Tyrosinase auf dem Weg vom ER zum Melanosom

1. Cotranslationale Faltung der Tyrosinase, danach Glykosylierung und Homo-Dimerisierung (vermutlich durch Tyrp1 katalysiert), 2. Transport in Vesikeln zum Golgi-Apparat. 3. Modifikation der Kohlenhydratketten zu komplexen Zuckern und Kupfereinbau im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), 4. Transport zu den Endosomen, deren Reifung zu Melanosomen und im Zuge dessen 5. Bildung des melanogenen Komplexes. Grafik aus (Wang und Hebert 2006).

Es gibt etwa 140 verschiedene Missense-Mutationen und Deletionen des Tyrosinase-Gens, die zu unterschiedlichen Ausprägungen des sogenannten OCA1-Albinismus führen (Oetting und King 1993; Spritz et al. 1997a; Oetting et al. 2003), einer autosomal rezessiven, Tyrosinase-assoziierten Störung des Pigmentierungsprozesses (Stand April 2008, Oculo-cutaneous albinism type 1, siehe Albinismus-Datenbank: <http://albinismdb.med.umn.edu/>).

Das medizinische Interesse an der Tyrosinase und ihrem Wirkmechanismus ist damit evident. Als zentrales Enzym des melanogenen Komplexes steht sie auch im Mittelpunkt unserer Arbeiten. Zum Zeitpunkt meiner Doktorarbeit war keine Tyrosinasestruktur eines Säugetieres bekannt. Daher war die molekulare Grundlage des Albinismus aufgrund der angesprochenen Mutationen nicht nachvollziehbar.

Ausgangspunkt dieses Projektes war die Beobachtung, daß die Expression der Doppelmutante M374G / S375G in HEK293T Zellen zu einer enzymatisch inaktiven Tyrosinase führt. Der erste Schritt meiner Untersuchung war die Vorhersage der Proteinstruktur mittels Homologie-Modellierung und die Analyse der gewonnenen Struktur im Hinblick auf verschiedene Mutationen und ihren Einfluss auf das aktive Zentrum.

5.3.2. Modellierung der Maustyrosinase

Die primären Sequenz-Alignments für mTyr (*Mus musculus*, GenInfo Identifier gi:6755913), hTyr (*Homo sapiens*, gi:401235), sTyr (*Streptomyces castaneoglobisporus*, gi:30720300) und die Catecholoxidase ibCO aus der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*, gi:4158170) wurden mit ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997) erstellt und mit Genedoc 2.61 (Nicholas et al. 1997) manuell verbessert.

Welche Aspekte wurden bei der Auswahl der Musterstrukturen für die Modellierung berücksichtigt? Die Tyrosinase- und Catecholoxidaseaktivität bestimmter Hämocyanine ist durch geeignete Methoden induzierbar (siehe Kapitel 2.1.8). Folglich muß das aktive Zentrum dieser Hämocyanine dem der Maustyrosinase zumindest *ähnlich* sein. Also konnten Hämocyaninstrukturen als potentielle Vorlagen zur Modellierung in Betracht gezogen werden.

Die Arthropoden-Hämocyanine scheiden aufgrund der unterschiedlichen Aminosäure-Topologie aus, d.h. die Sequenz-Abstände zwischen den kupfertragenden Histidinen im aktiven Zentrum ist anders als im Zielprotein (vgl. hierzu auch Kapitel 2.1.6):

Die Histidine des N-terminalen Kupferzentrums der Maustyrosinase sind H180, H202 und H211. Der Abstand zwischen HA1 und HA2 beträgt somit 22 Aminosäuren, der Abstand zwischen HA2 und HA3 neun Aminosäuren. Bei den Arthropoden-Hämocyaninen hingegen, z.B. bei *Limulus polyphemus* mit den Histidinen H173, H177 und H204, betragen die Abstände zwischen HA1 und HA2 nur vier Aminosäuren, der Abstand zwischen HA2 und HA3 aber 26 Aminosäuren.

Man kann im Gegensatz dazu die Kartoffel-Catecholoxidase und die funktionellen Einheiten der Mollusken-Hämocyanine von *Rapana thomasiana* (Perbandt et al. 2003) oder *Octopus dofleini* (Cuff et al. 1998) als Vorlagenstrukturen verwenden, die ähnliche Histidin-Abstände wie die Bakterientyrosinase aufweisen: 21-9 bei KartoffelCO, 20-9 bei *Rapana*HC und 19-9 bei *Octopus*HC.

Das Alignment der verschiedenen Hämocyanine und der bekannten Struktur der Bakterientyrosinase (sTyr) stellten die Grundlage für die Modellierung der Maustyrosinase (mTyr) dar. Die Modellierung wurde mit MODELLER 8v1 durchgeführt (Sali und Blundell 1993; Fiser und Sali 2003). Die resultierenden Homologiemodelle wurden sowohl visuell auf Fehler überprüft als auch mit der Energie-Analyse von PROSA2003 (Sippl 1993) und der Strukturanalyse von WHATIF 4.99 (Vriend 1990) evaluiert. Von der Evaluation ausgenommen wurden die Insertionen im Maustyrosinase-Modell, für die methodenbedingt keine verlässliche Struktur vorhergesagt werden kann (siehe rote Sequenzabschnitte in Abbildung 45).

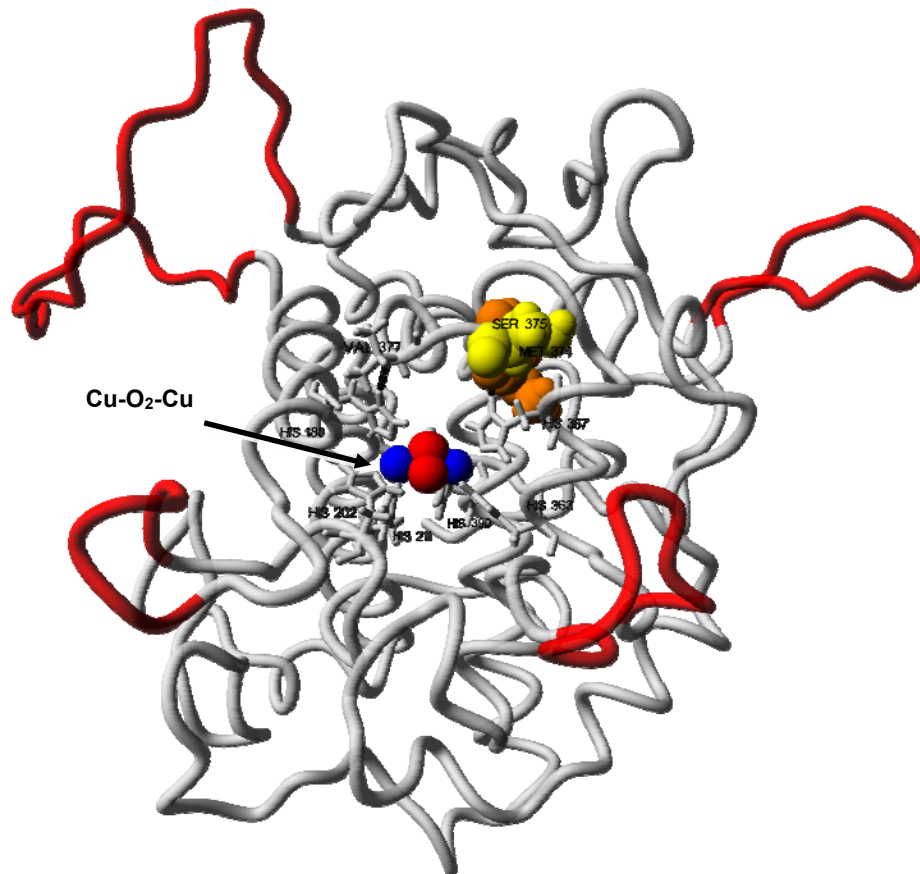


Abbildung 45: Homologiemodell der Wildtyp-Maustyrosinase

Grau: Aminosäuren in der mTyr mit strukturell äquivalenten Vorlagen-Aminosäuren in der sTyr, Rot: Inserts in der mTyr, für die keinerlei Strukturvorhersage getroffen werden kann, aus (Schweikardt et al. 2007) Gezeigte Atome im Kalottenmodell: blau: Kupfer-Atome, rot: Gebundenes Sauerstoff-Molekül im aktiven Zentrum. Zur besseren Orientierung sind die mutierten Aminosäuren eingefärbt; orange: Methionin374; gelb: Serin375.

Die Evaluation der Versuche zeigte, daß Modelle, die auf Grundlage der sTyr modelliert wurden, am verlässlichsten waren. Dies wurde vor allem aus den Ergebnissen der PROSA2003-Analyse geschlossen, die für die sTyr-basierten Modelle den geringsten Z-Score ausweist. In diesem Fall gilt: je niedriger der Z-Score, desto geeigneter ist das Faltungsmotiv der Vorlagenstruktur als Ausgangspunkt für die Modellierung der Zielsequenz:

Tabelle 7: Eignung möglicher Vorlagenproteine zur Modellierung der Maustyrosinase

Z-Score	Vorlagenprotein	Rang Z-Score
-5,5	<i>StreptomycesTyr</i>	1
-4,9	<i>IpomoeasCO</i>	2
-3,0	<i>OctopusHC</i>	3
-2,9	<i>RapanaHC</i>	4

Die weiteren Modellierungen wurden mit der sTyr als Vorlagenstruktur vorgenommen.

5.3.2.1. Sequenzalignment

Da die sTyr sehr viel kleiner ist als die mTyr und es sich beim Säugerprotein nicht um ein lösliches Protein handelt, sondern um ein Protein mit einer Transmembranhelix, kann nicht die vollständige Struktur vorhergesagt werden, sondern nur die lösliche Domäne, die das aktive Zentrum beinhaltet – genau dies war ja auch Ziel dieser Untersuchung. Die Sequenzidentität des vorhergesagten Bereichs der mTyr (Leu118 bis Ser450) mit der sTyr beträgt 23%, die Homologie zwischen den beiden Proteinen in diesem Bereich 37% (Abbildung 46). Die Identität und die Homologie steigen im Bereich der Kupferzentren stark an, nämlich auf 35% Identität und 44% Homologie bei CuA, und 46% Identität und 67% Homologie bei CuB.

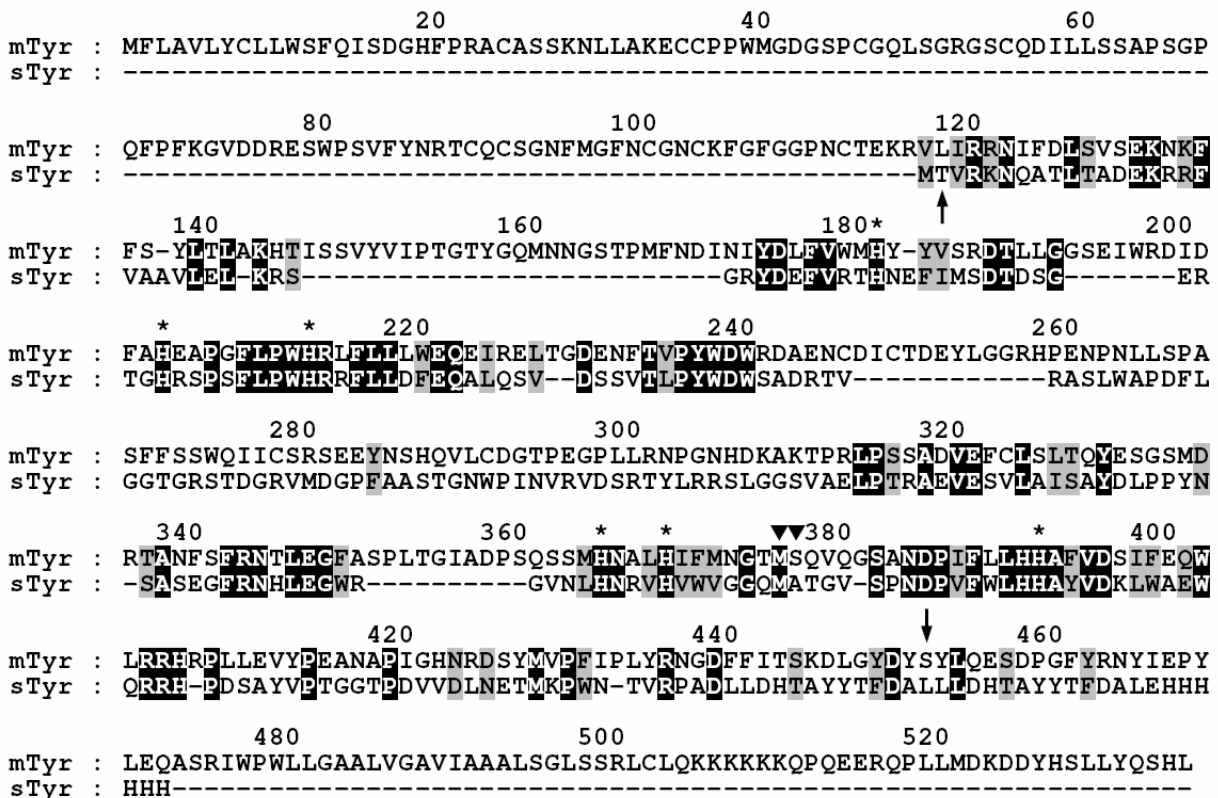


Abbildung 46: Sequenzalignment der *Streptomyces castaneoglobisporus* Tyrosinase (sTyr) mit Maustyrosinase (mTyr)

Sterne: Kupfertragende Histidine im aktiven Zentrum, Schwarzer Hintergrund: identische Aminosäuren, grauer Hintergrund: isofunktionelle Aminosäuren, Pfeile: N- und C-Terminus des Homologie-Modells, Dreiecke: Positionen, die in der mTyr mutiert wurden. Grafik aus (Schweikardt et al. 2007).

Die 117 N-terminalen und 83 C-terminalen Aminosäuren (wobei der C-terminale Teil des Proteins die Transmembranhelix enthält) des Mausenzym konnten dementsprechend nicht vorhergesagt werden. Die PDB Datenbank (Berman 2008) wurde mittels "position-specific iterated" und "pattern-hit initiated" BLAST-Algorithmus (PSI- and PHI-BLAST; (Altschul et al. 1997) nach homologen Peptiden zu den ersten 117 und den letzten 83 Aminosäuren der Maustyrosinase durchsucht. Es konnten aber keine geeigneten Vorlagen gefunden werden, ebenso wenig wie für die Inserts in folgenden Bereichen:

I145-I170 (ISSVYVIPTGTYGQMNNGSTPMFNDI)
G191-D197 (GSEIWRD)
D245-H256 (DICTDEYLGGRH)
S349-S358 (SPLTGIADPS).

Mit Hilfe von PredictProtein wurde die wahrscheinlichste Struktur für diese Sequenzabschnitte vorhersagt (profilbasierte Vorhersagen mittels neuraler Netzwerke, (Rost et al. 2004)) und mit hoher Wahrscheinlichkeit zeigen diese Segmente Random-coil-Strukturen, d.h. sie bilden keine Helices oder Faltblätter. Aus diesem Grund wurden sie als nicht-strukturierte Schleifen klassifiziert. Das Homologie-Modell zeigt, daß diese Insertionen an Stellen liegen, die nicht in der Nähe des aktiven Zentrums sind und somit vermutlich keinen negativen Einfluß auf die Struktur und die Funktion des aktiven Zentrums haben.

Es ist bekannt, daß sowohl die Vorlage – die bakterielle Tyrosinase – als auch das Zielprotein – die Maustyrosinase – denselben Prozess katalysieren, was bedeutet, daß die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum konserviert sein sollte, auch über die vorliegende große evolutionäre Distanz. Eine Ähnlichkeit der beiden Proteine von ca. 23% lässt zuerst nur eine Diskussion über das Faltungsmotiv zu (Sali und Kuriyan 1999; Baker und Sali 2001), aber da wir durch unsere Kooperation über experimentelle Daten verfügen, um unsere strukturelle Analyse zu stützen, ist auch eine tiefgehendere Interpretation gerechtfertigt (Sanchez und Sali 1998).

Die strukturelle Ähnlichkeit des aktiven Zentrums zwischen Maustyrosinase-Modell, der bakteriellen Tyrosinase und der Kartoffel-Catecholoxidase war zum einen aufgrund der ähnlichen enzymatischen Eigenschaften zu erwarten und ist zum anderen systemimmanent – man stellt schließlich mit dem Sequenzalignment eine strukturelle Äquivalenz zwischen den beiden Proteinen her. Die Frage ist: Sind auch andere als die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren an der „richtigen“ Stelle? Und kann das Modell nicht nur unsere experimentellen Beobachtungen erklären, sondern auch das Verhalten von real auftretenden Mutationen?

Um eine bessere Einordnung der Maustyrosinasesequenz in den Kontext der Phenoloxidase-Superfamilie zu erhalten, wurde ein vergleichendes Alignment von Phenoloxidasen aus verschiedenen Reichen durchgeführt (Abbildung 47).

Abbildung 47: Sequenzalignment des CuB-Zentrums von Mitgliedern der Phenoloxidase-Familie
 Abkürzungen für Gene sind: Homo: menschliche Tyrosinase, Mus: Maustyrosinase, Strept: Streptomyces-tyrosinase, Nitros: Nitrosomonastyrosinase, Vicia: Ackerbohrentyrosinase, Spina: Spinattyrosinase. Man sieht die 100%ige Konservierung des in unseren Versuchen mutierten Methionins (Pfeilspitze) und die weniger starke Konservierung des benachbarten Serins. Tyr: Tyrosinase, CO: Catecholoxidase, PPO: Polyphenoloxidase

Es ist deutlich, daß sich die Gruppe der pflanzlichen Phenoloxidasen und Catecholoxidasen von den tierischen und bakteriellen Phenoloxidasen / Tyrosinasen durch ein Indel von etwa 10 Aminosäuren Länge unterscheidet. Trotz dieses Indels ist die Konservierung der CuB-Region sehr hoch und zeigt die Wichtigkeit des mutierten Methionins, das zu 100% konserviert ist. Die benachbarte Position in der Peptidkette, die in der Maustyrosinase von Serin eingenommen wird, scheint keinem so hohen Evolutionsdruck ausgesetzt gewesen zu sein wie das Methionin. Die Aminosäuren, die der Position des Serins äquivalente sind, haben im Laufe der Evolution diverse Austausche gegen z.B. Leucin, Glycin oder Alanin erfahren, siehe Abbildung 47.

Abbildung 48 zeigt das Alignment von Proteinen der Tyrosinasefamilie von Mensch und Maus im Vergleich zur bakteriellen Tyrosinase. Hier sieht man, daß das bewusste Methionin nur bei den Tyrosinasen konserviert ist, aber nicht bei den TYRP, den „tyrosinase-related proteins“. Diese erfüllen Hilfsaufgaben für die Tyrosinase. Das TYRP-2 ist z.B. eine Dopachrom-Tautomerase (Dct), die einen nachfolgenden Schritt der Melaninsynthese katalysiert und keinerlei Tyrosinase-Aktivität zeigt (siehe auch Einleitung dieses Kapitels).

Schlussfolgerungen aus den Alignments

Die gezeigten Alignments lassen den Schluß zu, daß es sich beim Methionin um eine strukturell und funktionell wichtige Aminosäure handelt, wohingegen dem Serin eine geringere Bedeutung für die enzymatische Aktivität der Tyrosinase zukommt. Die erzeugten Modelle der Maustyrosinase untermauern diese Annahme, wie später gezeigt wird.

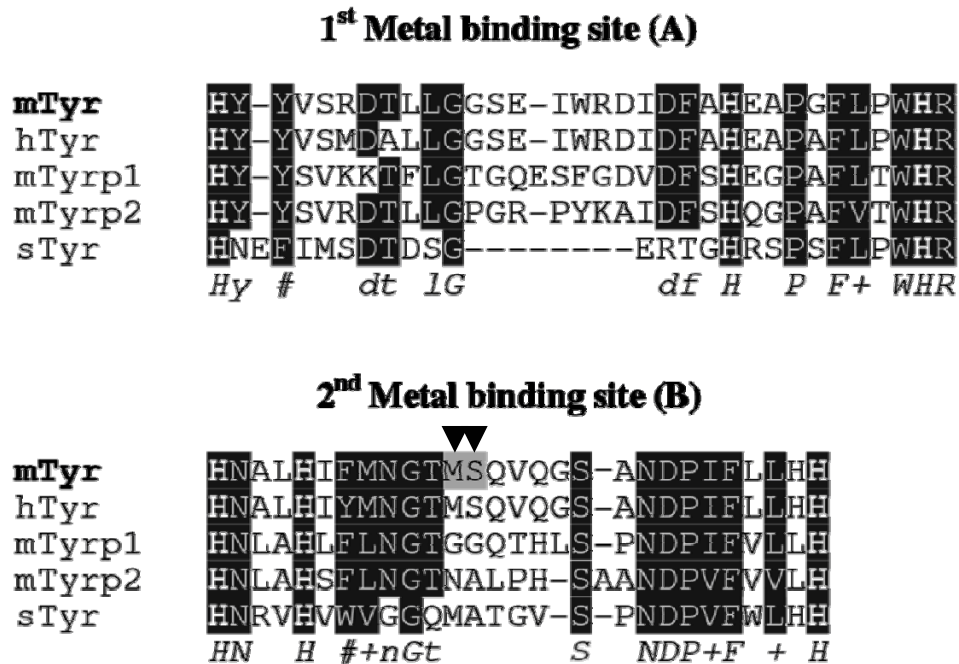


Abbildung 48: Sequenzalignment der CuA- und CuB-Kupferzentren von Maustyrosinase, mTYRP1, mTYRP2 (Dct), humaner Tyrosinase und bakterieller Tyrosinase

Fett: Kupfer-bindende Histidine im aktiven Zentrum, schwarzer Hintergrund: isofunktionelle oder identische Aminosäuren, hellgrauer Hintergrund und Pfeilspitzen: untersuchte Mutationen.

Letzte Zeile: Konsensus-Sequenz. Großbuchstaben: 100% konserviert, kleine Buchstaben: zu 80% konserviert, (#) aromatische Aminosäuren in allen Sequenzen, (+) hydrophobe Aminosäuren in allen Sequenzen, aus (Schweikardt et al. 2007)

5.3.3. Mutagenese der Maustyrosinase

Dieser Teil der Arbeiten wurde von unseren Kooperationspartnern im Departamento de Biochimica, Biologica Molecular (B) e Inmunologia der Universität Murcia in Spanien durchgeführt. Vielen Dank hierfür an Concepción Olivares, Francisco Solano und nicht zuletzt José Carlos García-Borrón.

Die Aminosäuren M374 und S375 wurden aus folgenden Gründen gewählt: Sie liegen zum einen direkt hinter dem konservierten Glykosylierungsmotiv ³⁷¹NGT³⁷³, siehe Abbildung 49 und Abbildung 50. Ein solches Aminosäure-Motiv, an das über die N-Glykosylierung ein Kohlenhydrat gebunden werden kann, nennt man auch „Sequon“ (Marshall 1974).

Die Glykosylierung dieses Sequons im ER sowie die nachfolgende Modifikation im trans-Golgi-Netzwerk (siehe Abbildung 44, Punkt 1 und 3) hat Einfluß auf Cofaktorbindung und Stärke der enzymatischen Aktivität in der Maustyrosinase. Zum anderen ist auch M374 – wie schon oben beschrieben – hochkonserviert in der Tyrosinase-Familie, muß also eine wichtige strukturelle Rolle spielen. Das äquivalente Methionin M201 in der Bakterientyrosinase, bildet mit seinem Rückgrat-Sauerstoff eine Wasserstoffbrücke zum Nδ1 des zweiten kupfertragenden Histidins im CuB-Zentrum (HB2). Da dieses Sauerstoffatom auch in jeder anderen Aminosäure vorkommt, kann die Wasserstoffbrücke nicht der alleinige Grund für die hohe Konservierung des Methionins sein. Dieser ist offensichtlich in der Seitenkette zu suchen. Die Position des S375 hingegen ist nicht konserviert. Somit dürfte der Einfluß auf die enzymatische Aktivität weitaus geringer sein. Diese schon im letzten Kapitel getroffene

Einschätzung wurde durch die nachfolgende Erzeugung und Analyse der Einzelmutanten bestätigt.

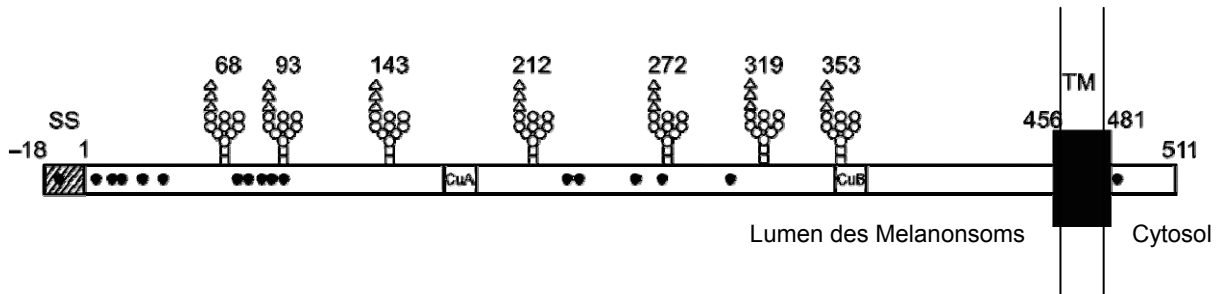


Abbildung 49: Glykosylierungsstellen in der humanen Tyrosinase

Die Bauplan der humanen Tyrosinase ist äquivalent zu dem der Maus-Tyrosinase, die Nummerierung beinhaltet aber nicht die Signalsequenz (SS) von 18 Aminosäuren. Die Glykosylierungsstelle bei Aminosäure 353 ist daher identisch mit der bei Asn371 in Abbildung 50. TM: Transmembrandomäne in Melanosomenmembran, SS: Signalsequenz, CuA: CuA-Zentrum, CuB: CuB-Zentrum, Punkte: Cysteine; aus (Wang und Hebert 2006)

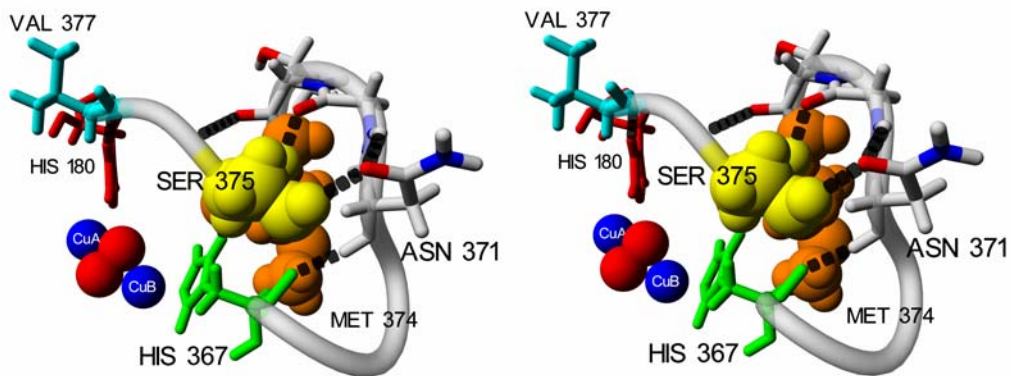


Abbildung 50: Aktives Zentrum und Glykosylierungssequenz im Homologie-Modell der Wildtyp-Maustyrosinase

Ausschnitt, der die stabilisierenden Wasserstoffbrücken zum Glykosylierungssequenz $^{371}\text{NGT}^{373}$ zeigt. Rotes Histidin: CuA-bindend, grünes Histidin: CuB-bindend, blau: Kupferionen, türkis: V377, gelb: S375, orange: M374, schwarze unterbrochene Linien: Wasserstoffbrücken. Farbcode der Aminosäuren $^{371}\text{NGT}^{373}$: Kohlenstoff und Wasserstoff grau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau. Stereoansicht (Parallelblick), aus (Schweikardt et al. 2007)

Die Aminosäuren M374 und S375 wurden bei der Mutation jeweils gegen Glycin ersetzt. Dies entspricht der homologen Sequenz in TYRP1, welches keine Tyrosinase-Aktivität zeigt. Die entstandene Doppel-Mutante wurde Tyr-GG genannt, die später erzeugten Einzelmutanten M374G und S375G. Als Kontrolle wurde Tyr-MeB benutzt, ein Konstrukt, bei dem das *gesamte* CuB-Zentrum der Tyrosinase gegen das homologe Teilstück des TYRP1 ersetzt ist. Das exprimierte Tyr-MeB ist enzymatisch inaktiv, wird im ER der transformierten HEK-Zellen zurückgehalten und nicht weiter prozessiert. Die Expression wird im Westernblot mit einem Antikörper gegen den cytosolischen Teil des Proteins nachgewiesen (αPEP7).

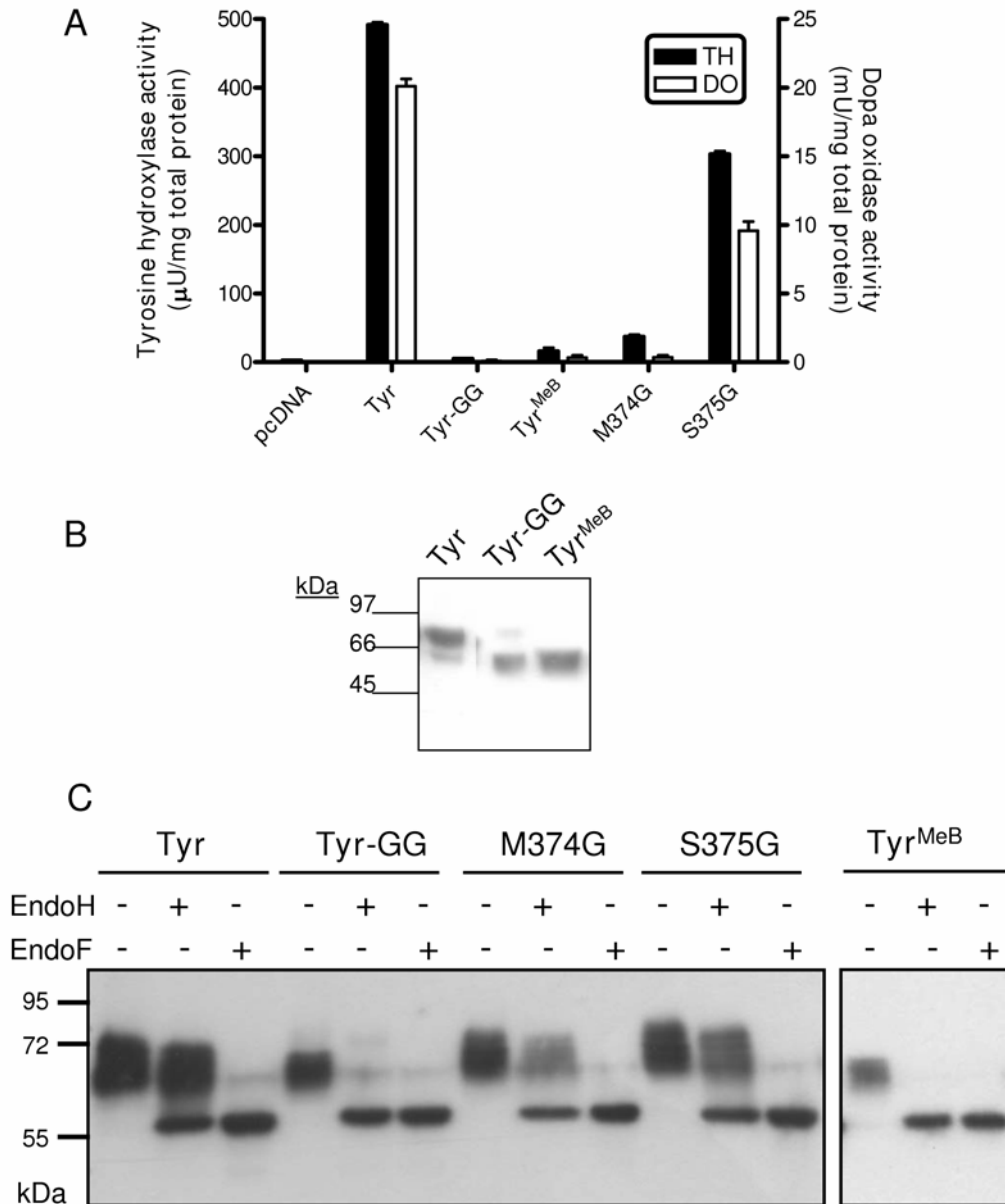


Abbildung 51: Biochemische Analyse der Wildtyp-Tyrosinase und den Tyrosinase-Mutanten

A: Enzymatische Aktivität der Doppel- und Einfachmutanten, die in HEK293T Zellen exprimiert wurden; TH: Tyrosinhydroxylase-Aktivität, DO: Dopamin-Oxidase-Aktivität.

B: Westernblot-Analyse der Wildtyp-Tyr und der Mutanten Tyr-GG und Tyr^{MeB}. Reduzierende SDS-PAGE (12%) der Proteine, geblottet und mit α PEP7 Antiserum behandelt. α PEP7 ist gegen die kurze cytosolische Domäne der Tyrosinase und Tyrp gerichtet. Die Protein-Auftragsmenge für Wildtyp liegt bei 5 μ g/Tasche und 15 μ g/Tasche für die Mutanten, um die geringere Expressionsrate auszugleichen.

C: Deglykosylierung. Zellextrakte von Zellen, die entweder Wildtyp-Tyrosinase oder die respektiven Mutanten exprimierten, wurden mit EndoH oder EndoF behandelt und per Westernblot wie unter B analysiert.

(Abbildung aus (Schweikardt et al. 2007))

Die Wildtyp-Tyrosinase zeigte nach Expression in den HEK-Zellen eine hohe Tyrosinhydroxylase- und DOPA-Oxidaseaktivität im Gegensatz zu Tyr-GG und Tyr^{MeB}, denen jegliche enzymatische Aktivität fehlte (siehe Abbildung 51A). Der Western-Blot bestätigte, daß die fehlende Aktivität nicht auf eine zu niedrige Expression der Mutanten zurückzuführen war. Die Expression war hoch genug, um die Proteine mit Antikörpern detektieren zu können (siehe Abbildung 51B). Die Analyse der Enzymaktivität der Einzelmutanten M374G und

S375G deutete darauf hin, daß der Verlust der enzymatischen Aktivität vor allem auf die M374G-Mutation zurückzuführen war: Die Tyrosinhydroxylase-Aktivität betrug lediglich 7% der Aktivität des Wildtyps, und DOPA-Oxidaseaktivität war nicht vorhanden. Die S375G-Einzelmutante zeigte etwa 60% der Tyrosinhydroxylase-Aktivität und 50% der DOPA-Oxidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 51A).

Um auszuschließen, daß die fehlende Aktivität durch eine unvollständige Prozessierung bedingt war, wurde die Resistenz der Proteine auf Endoglycosidase H (Endo H) und Endoglycosidase F (Endo F) untersucht. Endo H entfernt stark mannosehaltige Kohlenhydrate, wie sie im ER an das Protein addiert werden. Nach der Passage des Golgi-Apparates und der vollständigen Modifikation der Kohlenhydratketten sind jene resistent gegen Endo H. Endo F hingegen entfernt *alle* Kohlenhydrate.

Dies bedeutet Folgendes: Wenn eine Behandlung von Proteinen mit Endo H zu einer Veränderung (meist Erhöhung) der elektrophoretischen Beweglichkeit führt, dann hat das Protein den Golgi-Apparat *nicht* durchlaufen und ist nicht vollständig prozessiert. Grund hierfür kann z.B. eine fehlerhafte Faltung sein.

Die *Wildtyp*tyrosinase war durch Endo H kaum angreifbar; erst Endo F konnte alle Kohlenhydrate entfernen. Das heißt, sie war nativ gefaltet und vollständig prozessiert. Damit ist bewiesen, daß die angewandte Expressions-Methode funktionierende Enzyme produziert, siehe Abbildung 51C.

Die *Doppelmutante* Tyr-GG und die Mutante Tyr-MeB zeigten eine geringere Glykosylierung – sichtbar am Laufverhalten, sie zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Mobilität. Sie waren beide durch Endo H angreifbar, was darauf hinweist, daß diese Mutanten nicht richtig prozessiert und auch nicht vollständig glykosyliert wurden, siehe Abbildung 51C.

Das Verhalten der *Einzelmutanten* im Hinblick auf Laufverhalten und Empfindlichkeit gegenüber Endo H lag zwischen den Extrema „Wildtyp“ und „Tyr-GG/MeB“. Im normalen, glykosylierten Zustand allerdings zeigten die Einzelmutanten dasselbe Laufverhalten wie der Wildtyp, was eine abgeschlossene Prozessierung und ein reifes Protein ausweist (die jeweils linke Spalte eines dreispaltigen Versuchsblocks in Abbildung 51C).

Zusammenfassung der biochemischen Analyse

Die biochemische Analyse der Tyrosinase-Varianten zeigte, daß die Doppelmutante Tyr-GG enzymatisch inaktiv war. Die Mutante war nicht richtig prozessiert / glykosyliert, und der Verlust der enzymatischen Aktivität des Tyr-GG ist vor allem auf die M374G-Mutation zurückzuführen. Beide Einzelmutanten der Tyrosinase wiesen eine fast vollständige Glykosylierung und Faltung auf.

5.3.4. Analyse und Evaluation der Strukturmodelle

Die Strukturmodelle der Maustyrosinase sollten nun eine Erklärung für die beobachteten Eigenschaften der Doppel- und Einzelmutationen liefern. Gleichzeitig wurde auch die Plausibilität des Modells überprüft.

5.3.4.1. Das aktive Zentrum und seine Umgebung

Ein Hinweis für die Zuverlässigkeit des Modells ist die Topologie und Zusammensetzung der Aminosäuren, die das aktive Zentrum umschließen und typisch für die Typ-3-Kupferproteine sind. Wie schon von Yamashita beschrieben (Yamashita et al. 1990) und für die Kupferproteine durch Garcia-Borrón und Solano bestätigt (Garcia-Borrón und Solano 2002), binden Metallionen in Zentren mit hohem Hydrophobizitätskontrast. Die Ionen werden von einer hydrophilen Schale von Aminosäuren koordiniert, die wiederum von einer hydrophoben zweiten Schale umgeben ist. Ist die entsprechende Verteilung der Aminosäuren auch im Modell der Maustyrosinase gegeben?

Diese strukturelle Übereinstimmung zwischen den Proteinen in Abbildung 52 und Abbildung 53 zeigt, daß – trotz der geringen Gesamtsequenzidentität zwischen sTyr, mTyr und ibCO – die Zusammensetzung und Anordnung des aktiven Zentrums und der umgebenden Aminosäuren im Laufe der Evolution konserviert wurde. Daher kann das vorliegende Modell zur Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des aktiven Zentrums benutzt werden, um an ihm den Einfluß von Mutationen auf die Tyrosinase zu diskutieren.

Hier ein Vergleich der Topologie der Aminosäuren um das aktive Zentrum der verschiedenen Proteine:

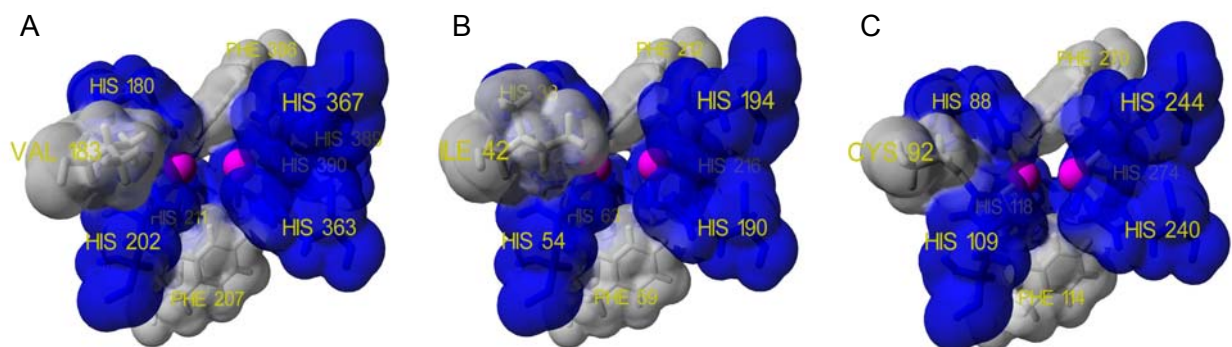


Abbildung 52: Topologie der Aminosäuren in den aktiven Zentren der untersuchten Proteine, innerste Schale, Distanz zum Kupfer maximal 4 Ångström.

A: Modell der Maustyrosinase, B: Kristallstruktur der Bakterientyrosinase (1wx4); C: Kristallstruktur der Kartoffel-Catecholoxidase (1bt1); Einfärbung nach Aminosäure-Eigenschaften. Grau: hydrophobe Aminosäuren, blau: hydrophile Aminosäuren, pink: Kupfer-Atome, links CuA, rechts CuB. Es werden alle Aminosäuren angezeigt, bei denen mindestens ein Atom im Abstand von bis zu 4 Ångström zu den Kupferionen liegt.

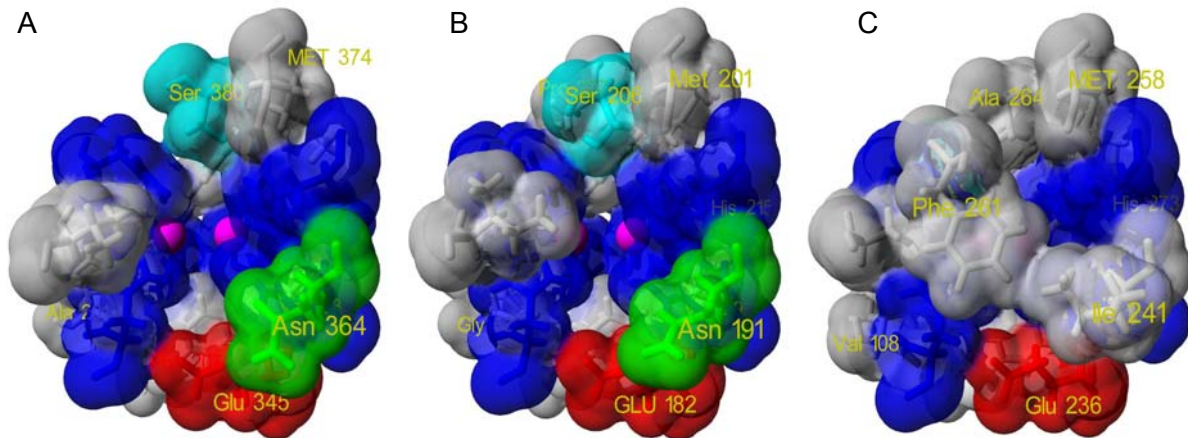


Abbildung 53: Topologie der Aminosäuren in den aktiven Zentren der untersuchten Proteine, sekundäre Schale mit größerer Distanz zum Kupfer.

A: Modell der Maustyrosinase, B: Kristallstruktur der Bakterientyrosinase (1wx4); C: Kristallstruktur der Kartoffel-Catecholoxidase (1bt1). Einfärbung nach Aminosäure-Eigenschaften. Grau: hydrophobe Aminosäuren, blau: basische Aminosäuren, rot: saure Aminosäuren, grün und türkis: polare Aminosäuren, pink: Kupfer-Atome, links CuA, rechts CuB; rote Beschriftung: innerste Schale, blaue Beschriftung: sekundäre Schale. Es werden alle Aminosäuren angezeigt, bei denen mindestens ein Atom im Abstand von bis zu 6 Ångström zu den Kupferionen liegt.

Im folgenden Abschnitt soll die Frage geklärt werden, welche Aminosäuren in der Maus-tyrosinase in unterschiedlichen Abständen zu den Kupferionen zu finden sind.

Innere Schale (bis 4Å)

Diese besteht aus den Aminosäuren

H180, V183, H202, F207, H211, H363, H367, F386, H389 und H390

Die unterstrichenen Aminosäuren sind die kupferbindenden Histidine. Sowohl F207 als auch F386 sind verbrückende Aminosäuren zwischen den Aminosäuren des CuA- und CuB-Zentrums. F207 liegt im unteren Teil des aktiven Zentrums, F386 im oberen Teil. Die äquivalenten Phenylalanine sind in allen drei Proteinen zu finden.

Sekundäre Schale (4-6Å)

Diese wird gebildet von:

A201, W210, V393. Hydrophile Aminosäuren : E345, N364, S380

Das **Glutamat 345** ist eine konservierte Aminosäure, die sowohl in Catecholoxidase, Bakterientyrosinase und Säugertyrosinasen vorkommt. Da verschiedene Studien darauf hinweisen, daß das phenolische Substrat vor Eintritt ins aktive Zentrum deprotoniert sein muß (Itoh et al. 2001; Battaini et al. 2003; Piquemal et al. 2003), wurde vermutet, daß dieses invariante Glutamat an der Deprotonierung und Bindung des Substrates beteiligt sein könnte (persönliche Mitteilung Prof. Decker).

Ob das Glutamat 345 als Elektronenakzeptor dient, lässt sich aus den Modellen nicht schließen, aber ein Vergleich der Röntgenstrukturen legt nahe, daß das E345 in

verschiedenen Proteinen unterschiedliche Aufgaben übernimmt. In der Bakterien-Tyrosinase (1wx4) ist es an der Stabilisierung der Schleife beteiligt, die das HA2 trägt. E345 verbindet die Schleife über Wasserstoffbrücken mit der Helix, in der HB1 und HB2 lokalisiert sind, siehe Kapitel 5.2.3.

Sowohl in der Bakterien-Tyrosinase als auch in der Kartoffel-Catecholoxidase koordiniert das Sauerstoffatom im Rückgrat des Glutamat 345 das HB1 (His190 in 1wx4 respektive His240 in 1bt1). Das Modell der Maus-Tyrosinase kann an dieser Stelle noch optimiert werden. Eine leichte Drehung der Histidinseitenkette um 11° lässt die Wasserstoffbrücke problemlos zustande kommen, ohne die Bindung des Kupfers zu kompromittieren.

Auch das **Asparagin 364** ist eine hochkonservierte Aminosäure - im Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses ist das homologe Asparagin325 mit einer Wasserstoffbrücke zur Seitenkette des His324 (HB1) an deren Stabilisierung beteiligt (vgl. Kapitel 5.2.2.4).

Serin 380 ist in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk im oberen Teil des aktiven Zentrums eingebunden, Asparagin 364 in das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des unteren Teils.

Die Rolle des angesprochenen Elektronenakzeptors könnte auch das Serin380 übernehmen, da es direkt am aktiven Zentrum liegt (siehe Kapitel 5.3.5.1). Aber auch das Asparagin (grün) wäre in der Tyrosinasen ein möglicher Reaktionspartner. Da es nur in den beiden Tyrosinasen enthalten ist, nicht aber in der Catecholoxidase, könnte es eine spezifische Bedeutung für die Tyrosinase-Aktivität haben. Das homologe Asparagin in der Bakterien-Tyrosinase van-der-Waals-Kontakt mit Tyr98 (=Substratäquivalent). Sowohl Asparagin stabilisieren also vermutlich das Substratmolekül. Beide Aminosäuren sind in der Catecholoxidase durch apolare Aminosäuren ersetzt. Dies könnte darauf hindeuten, daß eine genaue Positionierung und Stabilisierung von Diphenolen nicht notwendig ist, um ihre Umsetzung zu Chinonen zu katalysieren.

Zusammenfassung

Vergleicht man die Verteilung der verschiedenartigen Aminosäuren im aktiven Zentrum, so ist deutlich, daß das Modell ein aktives Zentrum zeigt, das nicht nur die Lage der kupferbindenden Histidine korrekt darstellt, sondern dessen gesamte Topologie mit der anderer Typ-3-Kuperproteine übereinstimmt. Dies wird als Zeichen einer erfolgreichen Modellierung betrachtet.

5.3.4.2. Die Thioether-Brücke

Aus Sequenzvergleichen mit Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Hämocyaninen ist bekannt, daß sich mindestens zwei verschiedene Typen von Tyrosinasen unabhängig voneinander entwickelt haben müssen: Arthropoden- und Molluskentyrosinasen (van Holde et al. 2001; Burmester 2002; Jaenicke und Decker 2004; Claus und Decker 2006). Bei letzteren ist das zweite kupfertragende Histidin des CuA (HA2) nicht in einer Helix, sondern in einer Schleife

lokalisiert, und kovalent mit einem N-terminal dazu gelegenen Cystein verbunden. Vermutlich dient diese Modifikation der Stabilisierung einer bestimmten Konformation des HA2.

Das beteiligte Cystein ist das zweite Cystein in einem CxxC-Motiv in der Nähe des aktiven Zentrums. Da ein solches CxxC-Motiv auch zweimal in der Maustyrosinase vorkommt (¹⁰⁰CGNC¹⁰³ und ²⁴³CDIC²⁴⁷), wurde spekuliert, daß auch dort eine solche Thioether-Brücke existiert (Garcia-Borron und Solano 2002).

Das Modell zeigt keine Cysteine in der Nähe des aktiven Zentrums der Maus-Tyrosinase, die eine Thioether-Brücke mit den Histidinen formen können. Es könnte natürlich ein Alignment-Fehler vorliegen, aber da die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum – wie im letzten Abschnitt gezeigt – sinnvoll erscheint, muß es einen anderen Grund für das Fehlen dieser strukturellen Eigenheit geben. Das an der Thioetherbrücke beteiligte Cystein könnte von einem der beiden vorgenannten CxxC-Motive stammen. Dagegen sprechen allerdings folgende Aspekte:

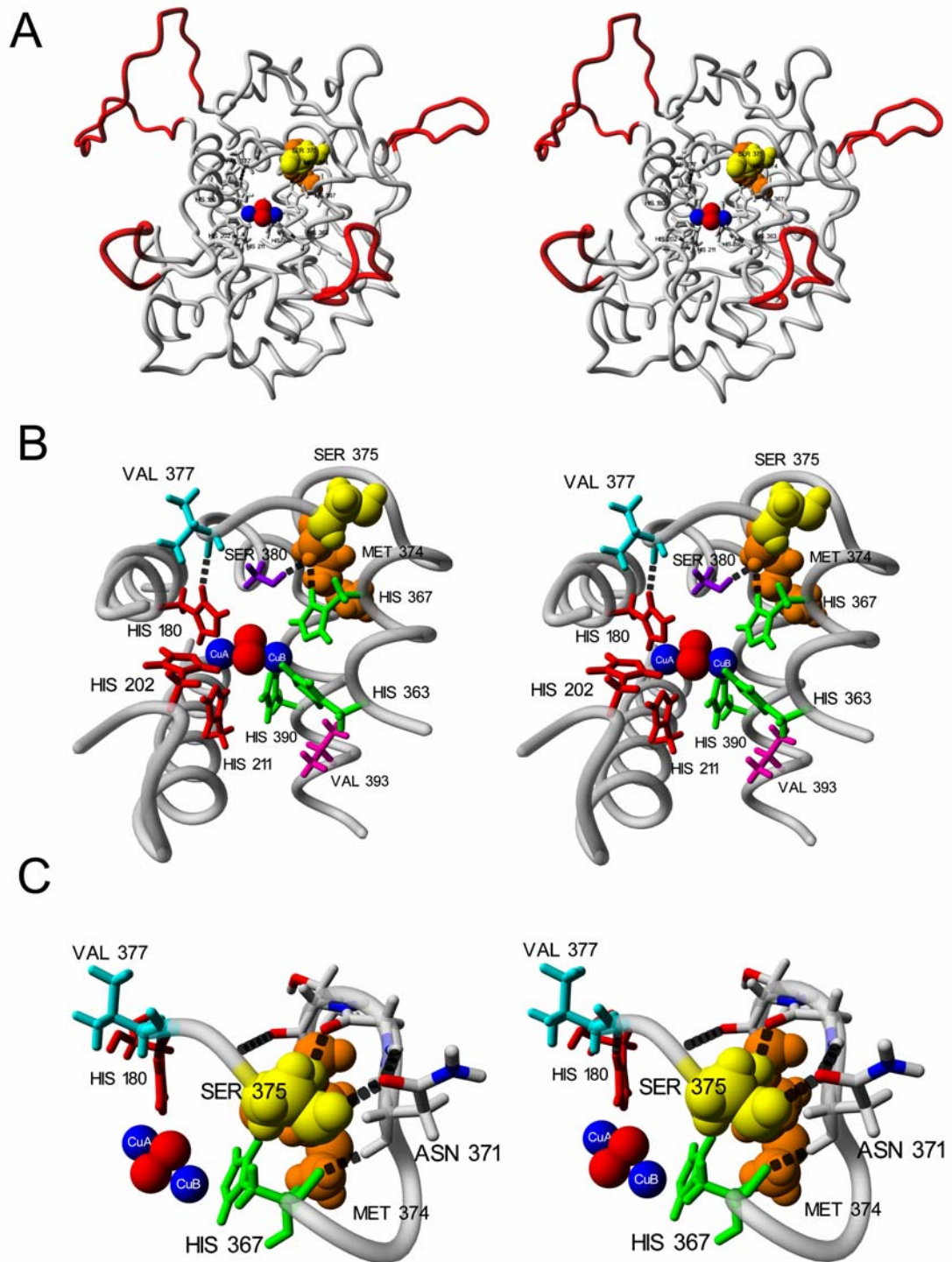
In der Kartoffel-Catecholoxidase sind die Aminosäuren C92 und H109 an der Bindung beteiligt, d.h. der Abstand zum Cystein aus dem CxxC-Motiv beträgt 17 Aminosäuren. Dieser Abstand beträgt in *Rapana* HC zwei Aminosäuren (C59-H61) und in *Octopus* HC (FU g) ebenfalls zwei Aminosäuren (C2560-H2562). In der Maustyrosinase hingegen ist das N-terminale CxxC-Motiv ¹⁰⁰CGNC¹⁰³ über 100 Aminosäuren vom aktiven Zentrum entfernt. Das zweite Motiv ²⁴³CDIC²⁴⁷ ist über 40 Aminosäuren weit entfernt und liegt C-terminal von CuA; topologisch gesehen also an der falschen Stelle.

Leider kann weder die Position des ersten noch des zweiten CxxC-Motivs vorhergesagt werden. Das Homologie-Modell beginnt erst bei Aminosäure Leucin118, also kurz nach der Position des ersten Motivs. Das zweite in Frage kommende CxxC-Motiv liegt in einem Insert der Maustyrosinase, für das mangels Vorlagenstruktur keine zuverlässige Konformation modelliert werden kann. Betrachtet man jedoch die dichte Packung der schon vorhandenen Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums, dann wird klar, daß die Bildung einer Thioether-Brücke mit HA2 sterisch nicht möglich ist. Dies bedeutet, daß HA2 in der Maustyrosinase eine höhere Beweglichkeit hat als in der Catecholoxidase. Da auch die bakterielle Tyrosinase kein Cystein im aktiven Zentrum aufweist, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß es sinnvoll ist, eben dieses Molekül als Vorlage für die Modellierung zu nehmen.

5.3.4.3. Strukturelle Grundlagen für das Verhalten der Doppel-Mutation

Kann das Strukturmodell den Aktivitätsverlust der Tyrosinase-Mutanten erklären?

Die Doppel-Mutante ³⁷⁴MS³⁷⁵ → ³⁷⁴GG³⁷⁵ entspricht der Sequenz des TYRP1. Dieses weist keine Tyrosinase-Aktivität auf und bindet auch kein Kupfer. Die Abbildung 54 zeigt unterschiedliche Aspekte des Maustyrosinase-Modells, die Gesamtstruktur mit den unzuverlässigen und damit nicht-interpretierbaren Bereichen in rot (A) sowie Detaildarstellungen des aktiven Zentrums (B und C). In Abbildung 54B erkennt man den generellen Aufbau des aktiven Zentrums und die Lage der wichtigen Aminosäuren: H180, 202 und 211 bilden das CuA-Zentrum; H363, 367 und 390 binden CuB.


Abbildung 54: Homologie-Modell der Maustyrosinase

A: Lokalisierung der Inserts im Maustyrosinase-Modell, weiß: mTyr Aminosäuren mit strukturell äquivalenten Gegenstücken in der Bakterientyrosinase, rot: Inserts im Maustyrosinase-Modell, für die keine verlässliche Strukturvorhersage gemacht werden kann.

B: Blick ins aktive Zentrum und auf den Stabilisierungs-Effekt des S380 (violett) im Wildtyp, rote Histidine: CuA-bindend, grüne Histidine: CuB-bindend, blau: Kupferionen, türkis: V377, gelb: S375, orange: M374, schwarze unterbrochene Linien: Wasserstoffbrücken.

C: Aktives Zentrum in einer Schrägansicht, um die stabilisierenden Wasserstoffbrücken zum Glykosylierungssequon bei Asn371 zu zeigen. Farbcode wie in B, Farbcode der Aminosäuren $^{371}\text{NGT}^{373}$: Kohlenstoff und Wasserstoff grau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau. Abbildung aus (Schweikardt et al. 2007) Stereo-Abbildung, Parallelblick.

5.3.4.4. Die Mutation M374G

Stabilisiert werden die beiden Kupferzentren zum Einen über die enge räumliche Packung und zum Anderen über Wasserstoffbrücken zu diversen Bindungspartnern. His180 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Rückgrat-Sauerstoff des Val377; His367 ist über eine ebensolche Brücke mit Met374 verbunden (siehe Abbildung 54C).

Dies ist der erste Hinweis auf einen möglichen Einfluß des Met374 auf die enzymatische Aktivität. Aber auch nach einer Mutation dieser Aminosäure sollte diese Wasserstoffbrücke bestehen bleiben, da diese zwischen dem N ϵ -Stickstoff des H367 und dem Rückgrat-Sauerstoff des Methionins liegt, welches bei jeder Aminosäure gleich ist. Also muß es einen zweiten Grund für die Wichtigkeit des Methionins geben, der in der Seitenkette begründet liegt. Betrachtet man die Stellung der Met-Seitenkette, so fällt auf, daß sie in van-der-Waals-Kontakt mit der Seitenkette des H367 liegt und deren Bewegungsfreiheit stark einschränkt. Dadurch wird die Seitenkette des His in eine bestimmte Konformation gezwungen, die offenbar die Kupfer-Bindung begünstigt.

Im Wildtyp befindet sich die Seitenkette des hochkonservierten M374 in mTyr (so wie das homologe M202 in sTyr) in der dichtgepackten Proteinmatrix, die das aktive Zentrum umgibt. Die Seitenkette reicht in den Raum zwischen den beiden Helices, aus denen die kupferbindenden Histidine des CuB-Zentrums entspringen. M374 hat daher vermutlich folgende Aufgaben: Es schränkt über den direkten Kontakt mit der Seitenkette des H367 dessen Bewegungsfreiheit ein, was zur Einnahme einer für die Kupfer-Bindung optimalen Konformation führt. Zum anderen verankert es mit seiner Seitenkette die nachfolgende Schleife, welche wiederum über die H88-V377-Wasserstoffbrücke CuA stabilisiert.

Die Mutation des Methionins in Glycin wird die räumliche Packungsdichte um das aktive Zentrum herum erniedrigen und gleichzeitig die Seitenkette des H367 sterisch nicht einschränken können. Damit fällt auch die Verankerung des Loops weg, der H88 in CuA stabilisiert. Natürlich würde keine Lücke im Protein entstehen, denn die anderen Aminosäuren in der Umgebung würden während der Proteinfaltung den freigewordenen Platz einnehmen. Diese Restrukturierung führt natürlich zu weiteren strukturellen Veränderungen im aktiven Zentrum, was die Struktur und damit die Funktion des Enzyms weiter stören würde. Die strukturelle Bedeutung des Methionins wird weiterhin durch die starke Konservierung innerhalb der Tyrosinase-Familie gestützt.

5.3.4.5. Die Mutation S375G

Die Konservierung des Serins scheint weniger strikt zu sein, aber auch seine Rolle wurde schon diskutiert: Furumura et al. vermutete 1998, daß S375 und S192 mit ihren Hydroxylgruppen eine Verbindung zwischen den beiden Kupfern herstellen und so die antiferromagnetische Kopplung gewährleisten, und führten als Beweis dieser Theorie an, daß es nur Austausch gegen Tyrosin gibt – eine Aminosäure, die ebenfalls eine Hydroxylgruppe trägt (Furumura et al. 1998).

Die Ergebnisse der Modellierung lassen allerdings darauf schließen, daß die von Serin gebildeten Wasserstoffbrücken bei Ser375 das angrenzende Glykosylierungssequon stabilisieren. Aufgrund der Tatsache, daß die Seitenkette zu weit entfernt und vom aktiven Zentrum abgewandt ist, kann sie keine Verknüpfung der beiden Kupferionen herstellen. (Dies könnte eventuell Serin 380 gelingen, welches in Kapitel 5.3.5.1 besprochen wird.)

Weiterhin verleihen die beiden Glycine als Strukturbrecher dem Protein eine größere Flexibilität, da die Backbone-Konformation von Glycinen weitaus weniger eingeschränkt ist als die von Methionin oder Serin. Die erhöhte Flexibilität wird sich auf die Stabilität des V377 auswirken, das den Imidazolring von H180 stabilisiert - und damit wird zusätzlich die Koordination des CuA gestört. Alle diese Effekte zusammengenommen werden das aktive Zentrum destabilisieren, den beobachteten Verlust der enzymatischen Aktivität verursachen und eventuell dazu führen, daß Kupferionen nicht gebunden werden.

Dies steht auch in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Spritz et al. 1997. Die Autoren beschrieben, daß die Kupfer-Bindung kooperativ ist. Die Bindung von Kupfer an CuB fördert die Bindung von Kupfer an CuA. Ohne Bindung an CuB wird gar kein Kupfer gebunden (Spritz et al. 1997a).

5.3.5. Analyse bekannter Mutationen am Homologie-Modell

Um den Beweis zu führen, daß das Modell die tatsächliche Struktur gut nachbildet und die Effekte von Mutationen auf molekularer Ebene erklären kann, wurden zwei bekannte Mutationen der menschlichen Tyrosinase untersucht. Beide Mutationen verursachen Typ 1 Albinismus: S380P (Spritz 1993; Spritz et al. 1997b) und V393F (Oetting et al. 1994). Diese Aminosäuren sind in den unterschiedlichen Reichen hochkonserviert und bei Mensch und Maus identisch.

5.3.5.1. Die Mutation S380P

Die Aminosäure S380 ist in den Tyrosinasen und Catecholoxidasen konserviert (vgl. siehe Abbildung 47). Dafür kann es unterschiedliche mechanistische Gründe: Bei Tyrosinasen ist das Serin vermutlich Teil des Wasserstoffbrückennetzwerkes, welches das kupfertragende H367 stabilisiert. Die entsprechenden Wasserstoffbrücken können im Modell mittels einer kurzen Moleküldynamik-Simulation von einigen hundert Femtosekunden untersucht werden. Der vorherrschende Bindungsmodus ist in Abbildung 55 zu sehen. Hier bildet der Wasserstoff der Hydroxylgruppe von S380 mit dem Rückgrat-Sauerstoffatom des M374 eine Wasserstoffbrücke und stabilisiert so die Geometrie des aktiven Zentrums.

In der Albino-Mutante S380P existiert keine Hydroxylgruppe. Somit kann auch keine Wasserstoffbrücke mit M374 gebildet werden. Außerdem schränkt die Struktur des Prolins die Rückgratkonformation des Enzyms nahe dem aktiven Zentrum stark ein, führt zu Problemen bei der Faltung, zur Destabilisierung des aktiven Zentrums und letztendlich zum Verlust

der enzymatischen Aktivität. Aber wie schon erwähnt ist dies nicht der einzige Grund für die negative Wirkung dieser Mutation, es gibt wenigstens zwei andere Gründe:

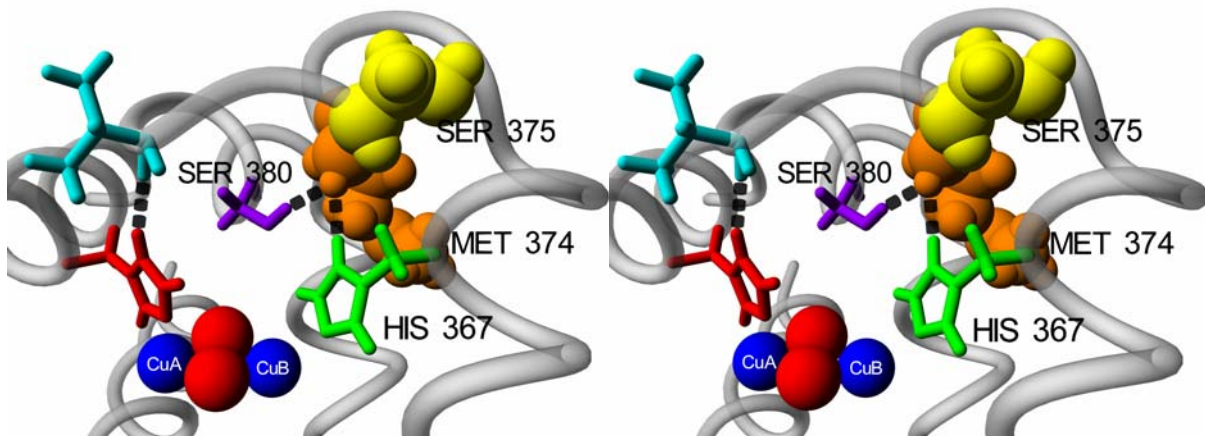


Abbildung 55: Rolle des Serin380 im Wildtyp der Maus-Tyrosinase, MD-Simulation

Der Austausch des Serins (violett) gegen Prolin in der Mutante S380P führt zu einer Störung des Wasserstoffbrückennetzwerks, das die Struktur des CuB-Zentrums stabilisiert. Prolin ist apolar und kann demnach auch keine Wasserstoffbrücken bilden. Rotes Histidin: CuA-bindend, grünes Histidin: CuB-bindend, blau: Kupferionen, türkis: V377, gelb: S375, orange: M374, schwarze unterbrochene Linien: Wasserstoffbrücken. Stereodarstellung, Parallelblick. Grafik aus (Schweikardt et al. 2007)

Das konservierte S380 spielt möglicherweise bei der Stabilisierung und Deprotonierung der Substratmoleküle eine Rolle. Die Hydroxylgruppe des umzusetzenden Monophenols muß deprotoniert sein, damit die Bindung an die Kupfer und die Hydroxylierung des Ringes in ortho-Stellung stattfinden kann (Itoh et al. 2001; Battaini et al. 2003; Piquemal et al. 2003). Auch beim enzymatischen Mechanismus der Catecholoxidase wird über die Frage diskutiert, wie die Deprotonierung ablaufen könnte (Torelli et al. 2002; Siegbahn 2004; Guell und Siegbahn 2007). Natürlich würden sich basische Aminosäuren am besten für diese Aufgabe eignen (persönliche Mitteilung Felix Tuczek), aber da es außer den Histidinen keine basischen Aminosäuren im aktiven Zentrum gibt, die nahe genug am gebundenen Substrat liegen, muß man alternative Szenarien in Betracht ziehen.

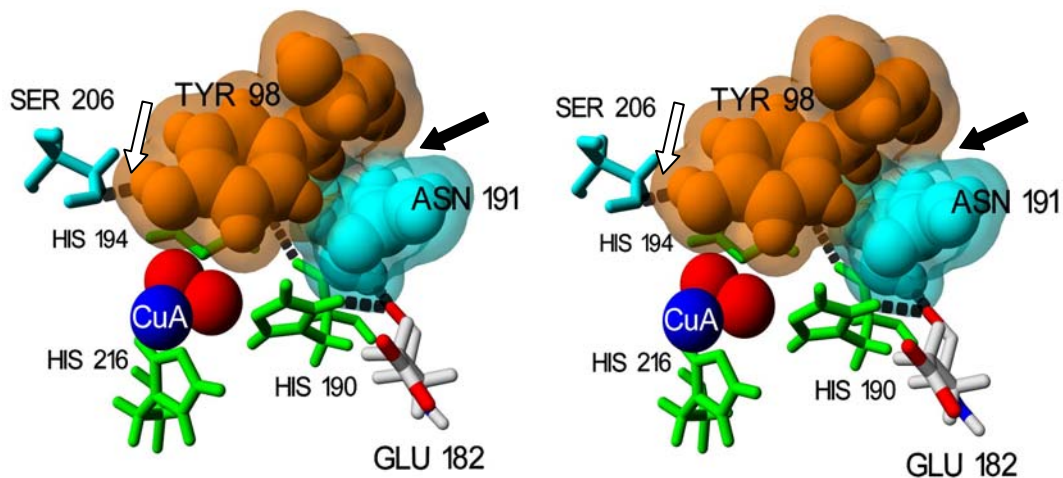


Abbildung 56: Ansicht des aktiven Zentrums der bakteriellen Tyrosinase, Blick von CuA in Richtung CuB. Gezeigt ist die Wasserstoffbrücke zwischen Ser206O der Tyrosinase und Tyr98OH des Caddieproteins (weißer Pfeil) sowie der van-der-Waals-Kontakt zwischen Asn191 der Tyrosinase und Tyr98 (schwarzer Pfeil). Türkis: Ser206 und Asn191, Glu182 nach Standardelementfarben eingefärbt; grün: CuB-bindende Histidine (CuB)

ist hinter dem Sauerstoffmolekül verborgen, die CuA-bindenden Histidine sind aus Übersichtlichkeitsgründen nicht gezeigt). Stereoansicht, Parallelblick.

Die Rolle des Protonenakzeptors könnte in der Tyrosinase dem Serin zufallen, wobei das aufgenommene Proton durch das umgebende Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert wird. In der Röntgenstruktur der bakteriellen Tyrosinase bildet das homologe Serin eine Wasserstoffbrücke mit dem Tyr98 des Caddie-Proteins, das die Position eines potentiellen Substrats einnimmt. Das Sauerstoffatom der Serin-Seitenkette und das Sauerstoffatom der Tyrosin-Hydroxylgruppe sind im passenden Abstand, um eine Wasserstoffbrücke zu bilden (weißer Pfeil in Abbildung 56). Damit werden zwei Ziele erreicht: zum einen wird das Substrat stabilisiert, zum anderen wäre das Wasserstoffatom exakt an der richtigen Position, um durch das Serin vom Phenol abstrahiert zu werden.

5.3.5.2. Die Mutation V393F

Die Aminosäure V393 befindet sich in der Nähe der Histidine 363 und 390, die das CuB binden. Die Seitenkette des V393 ragt in den Raum zwischen den Imidazolringen der beiden Histidine. Eine Phenylalaninseitenkette findet dort keinen Platz und würde sich mindestens mit drei verschiedenen Aminosäuren überschneiden: Leu208, Leu344 und F207.

Die Aminosäure F207 liegt im Interface zwischen CuA und CuB und verbrückt die beiden Zentren. Sie hat Kontakt zu vier der sechs kupfertragenden Histidine: H202, H211, H363 und H390 (Abbildung 57). Ohne Zweifel wird der Austausch des Valins durch ein größeres und unflexibleres Phenylalanin die Anordnung der Seitenketten im aktiven Zentrum während der Faltung im ER stören.

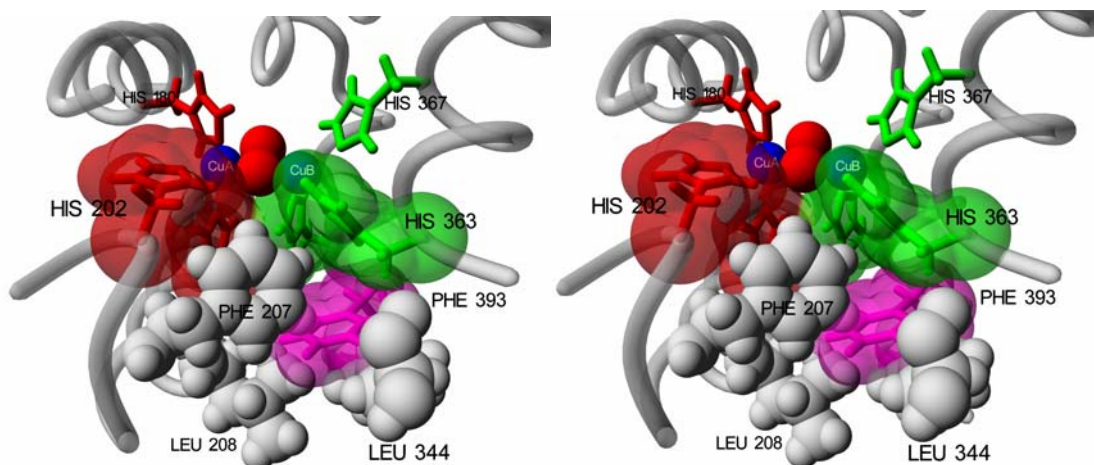


Abbildung 57: Einfluß der Mutation V393F auf das aktive Zentrum der Maus-Tyrosinase

Die Mutation V393F führt eine sehr große und starre Seitengruppe an einer Stelle ein, an der kein Platz für sie ist, und führt so zu Abweichungen von der optimalen Struktur des aktiven Zentrums. Rote Histidine: CuA-bindend, grüne Histidine: CuB-bindend, blau: Kupferionen, rote Kugeln: Sauerstoffmolekül, magenta: Mutation F393, überlappt mit F207 (grau). Stereodarstellung, Parallelblick.

5.3.6. Zusammenfassung

Das erzeugte Modell der Maus-Tyrosinase kann sowohl das Verhalten der in diesem Projekt erzeugten Mutanten M374G und S375G erklären als auch den Grund für die fehlende enzymatische Aktivität in bekannten Albino-Mutationen wie S380P und V393F. Man kann somit davon ausgehen, daß das Modell die tatsächliche Struktur der Maustyrosinase gut nachbildet und die Effekte von Mutationen auf molekularer Ebene erklären kann.

Die obigen Analysen wurden zum Teil schon veröffentlicht, siehe (Schweikardt et al. 2007).

6. Weitere Projekte

6.1. Rekonstruktion *Palinurus elephas* Tyrosinase

In diesem Projekt sollte die Durchführbarkeit einer dreidimensionalen Rekonstruktion auf Basis von negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen in unserer Gruppe gezeigt werden. Da schon negativ kontrastierte TEM-Aufnahmen aus der Dissertation von Herrn Elmar Jaenicke vorhanden waren, wurde die Möglichkeit einer 3D-Rekonstruktion aus diesen Aufnahmen angestrebt. Die Ziel war die Struktur der Tyrosinase der Europäischen Languste *Palinurus elephas*.

6.1.1. Probenpräparation

Die Hämolymphe wurde durch Punktierung des Perikards aus zwei Langusten (Fischhandlung Jakob, Mainz) entnommen, wie in Jaenicke und Decker 2003 beschrieben aufgereinigt und bei einer Konzentration von ca. 100 mg/ml und einer Temperatur von 4 °C in Stabilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.5) gelagert.

Für die Elektronenmikroskopie wurde diese Tyrosinase-Stammlösung auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und auf mit Kohlefilm beschichteten 400 Mesh-Kupfernetz (Structure Probe Inc., West Chester, PA, USA) aufgetragen. Die Kupfernetze wurden mit 2 % (w/v) wässriger Uranylacetat-Lösung (Fluka Chemie AG, Buchs) negativ kontrastiert, wie von Robin Harris als „droplet technique“ beschrieben (Harris 1997).

6.1.2. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde an einem Zeiss EM 900 TEM (Zeiss, Oberkochen), bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt. Ganz herzlichen Dank hierfür an Herrn Dirk Scheffler (Institut für Zoologie, Universität Mainz) für die Durchführung, sowie an Herrn Prof. Dr. Elmar Jaenicke (Institut für Molekulare Biophysik, Universität Mainz) für die Überlassung der Aufnahmen.

Die negativ kontrastierten Aufnahmen der Tyrosinase wurden bei 30.000 facher Vergrößerung mit Hilfe eines Kodak EM Film 4489 photographisch erfasst und mit einem Heidelberg 7100 Trommelscanner bei einer Pixelgröße von 3,53 Å digitalisiert.

6.1.3. Rekonstruktion der Proteinstruktur

Zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Tyrosinase wurde das Programmpaket EMAN 1.6 eingesetzt, sowohl während des halbautomatischen Pickens der Partikel als auch der Bildverarbeitung und der abschließenden Rekonstruktion sowie Bewertung des Ergebnisses. Um eine Verfälschung der Rekonstruktion zu vermeiden, wurde kein Startmodell

vorgegeben, sondern sogenannte „referenzfreie Klassenmittel“ (reference-free class averages) zur Erstellung des Startmodells benutzt.

Die einzige Vorgabe war die D3-Symmetrie, da Proteine derselben Familie – wie das Hämocyanin von *Panulirus interruptus* – eine D3-Symmetrie aufweisen und sowohl vorhergehende Studien als auch die TEM-Aufnahmen eine solche Symmetrie nahe legten. Durch die Vorgabe der Symmetrie konnte der Rechenaufwand für die Rekonstruktion beträchtlich gesenkt werden.

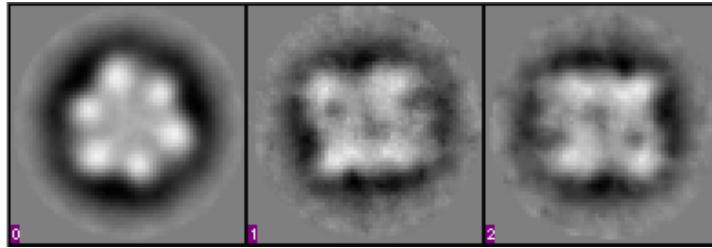


Abbildung 58: Ansichten der errechneten ersten Klassenmittel der *Palinurus elephas* Tyrosinase . Blick entlang der Symmetrieachsen des Tyrosinase-Moleküls in der Reihenfolge Aufsicht, Seitenansicht und Seitenansicht ausgerichtet an Aufsicht.

Abbildung 58 zeigt die ersten errechneten Klassenmittel, die zur Rekonstruktion des initialen Modells benutzt werden. Abbildung 59 zeigt in den ungeraden Spalten die Projektionen des endgültigen Tyrosinase-Modells, in den geraden Spalten die Klassenmittel, jeweils mit Angabe der entsprechenden Anzahl an Partikeln in der Klasse. Es wird deutlich, daß die Tyrosinase auf der Oberfläche des Kohlefilms mit deutlichen Orientierungspräferenzen adhärert. Der überwiegende Teil der Partikel ist in einer der ersten Klassen zu finden, die die Aufsicht oder der Aufsicht sehr winkelnahen Ansichten zeigen (über 1.800 Partikel). Schon weit weniger Partikel (ca. 250) zeigen eine der möglichen Seitenansichten.

Die Klassen, die die möglichen Orientierungen zwischen den Extremen „Aufsicht“ und „Seitenansicht“ zeigen, also die Schrägansichten, sind nur mit sehr wenigen Partikeln besetzt, manchmal sogar nur mit einem einzigen Partikel. Damit macht der Vergleich zwischen Projektion und Klassenmittel, das in diesem Fall nur aus einem einzigen Partikel besteht, im Sinne der Qualitätsüberprüfung nur wenig Sinn.

Normalerweise wird dieser Vergleich zwischen den Projektionen des endgültigen Modells und den Klassenmitteln dazu benutzt, um die Güte des Modells zu überprüfen. Weichen die Projektionen zu stark von den Klassenmitteln oder den Einzelpartikeln ab, dann muß die Rekonstruktion überprüft werden. Dies ist hier nur schwer möglich. Einige der Klassenmittel weichen deutlich von den Projektionen des Modells ab, z.B. Projektion 22 und das zugehörige Klassenmittel 23. Hier scheint das Alignment nicht funktioniert zu haben.

Die unterschiedlich gute Abdeckung der Eulerwinkel hat zur Folge, daß die Rekonstruktion an Auflösung und Genauigkeit verliert – wenn keine Ansichten aus einem bestimmten Winkel vorhanden sind, kann aus ihnen auch keine Strukturinformation für die Rekonstruktion gewonnen werden.

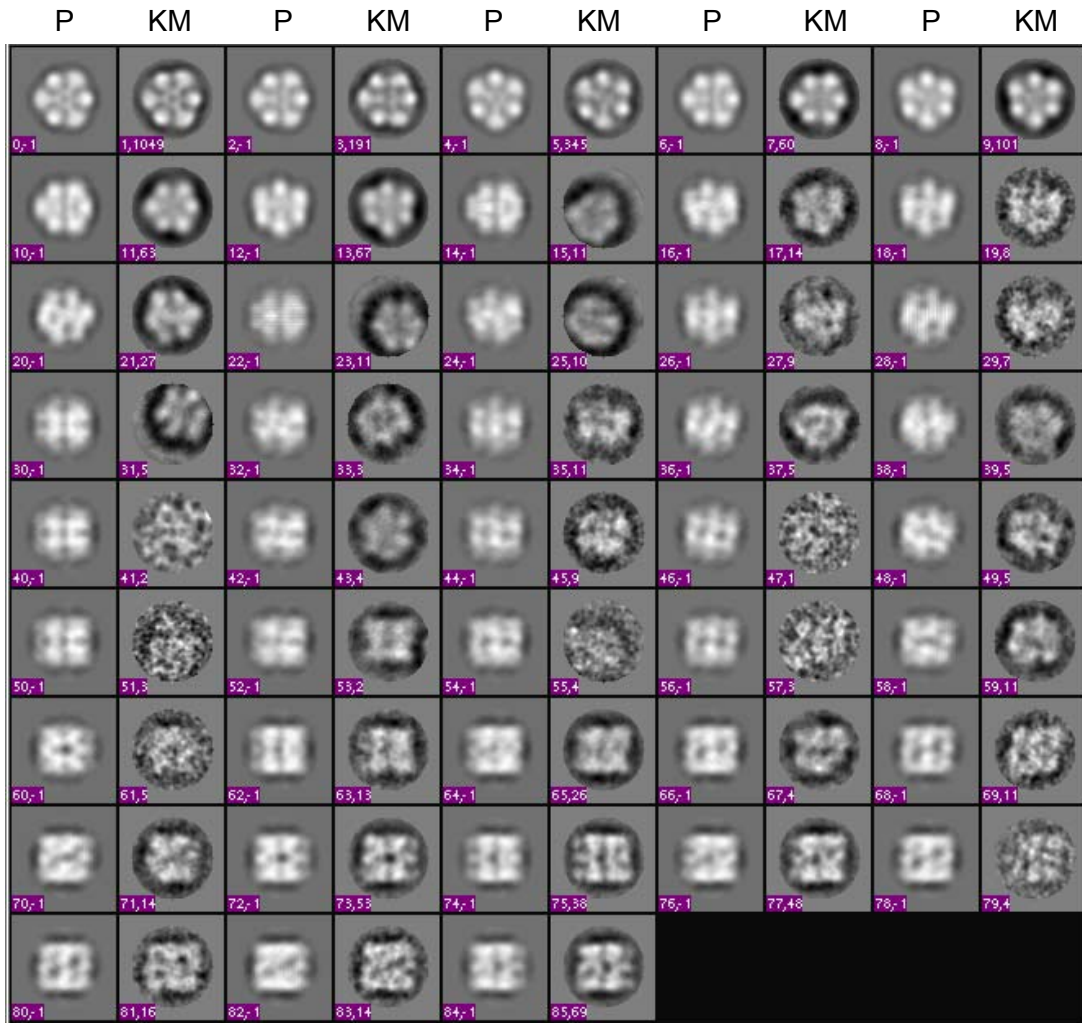


Abbildung 59: Projektionen der endgültigen Rekonstruktion der Tyrosinase von *Palinurus elephas*.

Projektionen (Spalten „P“) und jeweils rechts daneben die entsprechenden Klassenmittel der zugrundeliegenden Partikel (Spalten „KM“). Die erste Zahl ist ein fortlaufender Index; sie hat keine weitere Bedeutung. Die zweite Zahl hat zwei Verwendungen. Bei -1 handelt es sich um eine Projektion des Modells. In den danebenstehenden Klassenmitteln steht sie für die Anzahl der Einzelpartikel in der Klasse.

Die Rekonstruktion mit Hilfe von sehr verrauschten Klassenmitteln wird die Auflösung der Rekonstruktion zusätzlich verschlechtern, da das Rauschen mit in die Rekonstruktion einfließt. Besonders „körnige“ Klassenmittel sind ein Hinweis auf diesen Umstand. Abbildung 60 zeigt beispielhaft die Klassenmittel die zur Erstellung des Startmodells verwendet wurden, und drei in der jeweiligen Klasse enthaltene Einzelbilder (Partikel).

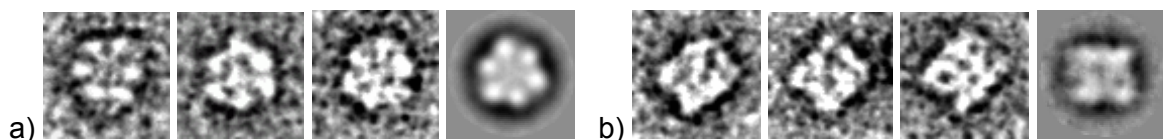


Abbildung 60: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Palinurus elephas* Tyrosinase

Je 3 Einzelbilder aus TEM-Aufnahmen und das gemittelte Bild der entsprechende Klasse, die aus einigen hundert Bildern bestehen kann; a) Aufsicht, b) Seitenansicht

Das Ergebnis der Rekonstruktion ist ein dreidimensionaler Körper. Jeder der Voxel hat eine bestimmte Dichte, und der nächste Schritt ist, das Molekül von der Umgebung abzugrenzen. Das Programm `Volume` aus EMAN 1.6 wurde dazu benutzt, die umhüllende Oberfläche für

die Tyrosinase festzulegen, so daß die gezeigte Oberfläche in Abbildung 61 und Abbildung 62 bei normaler Proteindichte in etwa eine Masse von 479 kDa umschließt, was der Molekülmasse des Hämocyanins von *Palinurus elephas* entspricht. Eine genauere Bestimmung der Masse und damit des Volumens war aufgrund der fehlenden Sequenzdaten für die Tyrosinase nicht möglich. Also wurde die Masse des Hämocyanins als erste Näherung verwendet.

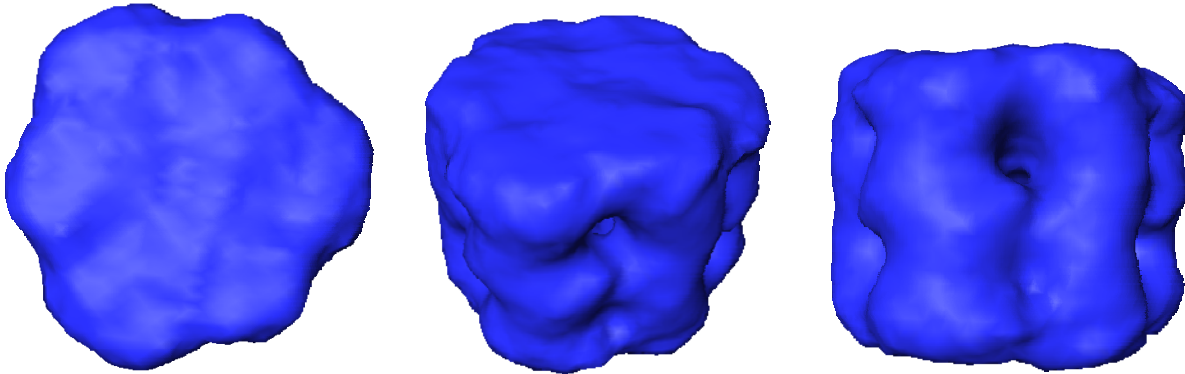


Abbildung 61: Rekonstruktion der *Palinurus elephas* Tyrosinase bei einer Auflösung von 21 Å.
Links: Aufsicht, Mitte: Schrägansicht, rechts: Seitenansicht

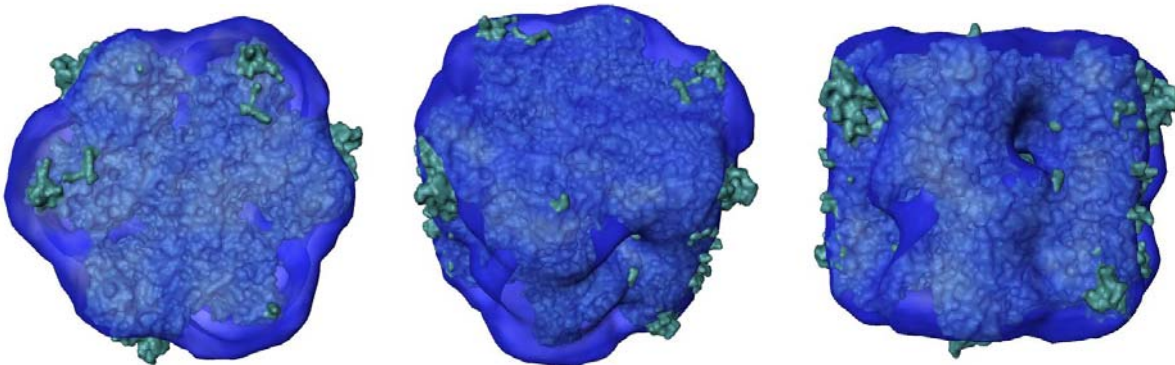


Abbildung 62: Vergleich der Rekonstruktion von *Palinurus elephas* Tyrosinase mit der Röntgenstruktur des Hämocyanins von *Panulirus interruptus*
Links: Aufsicht, Mitte: Schrägansicht, rechts: Seitenansicht. Blau: Rekonstruktion, grün: Röntgenstruktur des Hämocyanins von *Panulirus interruptus*

Das Hämocyanin der verwandten Art *Panulirus interruptus* zeigt eine D₃-Symmetrie: Zwei übereinander liegende, um 60° gegeneinander verdrehte Trimere. Die Rekonstruktion zeigt ebenfalls D₃-Symmetrie. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, schließlich war diese Symmetrie vorgegeben – die Anordnung der Trimere hingegen ist dem Programm unbekannt.

Trotzdem sieht man in Abbildung 63 deutlich, daß die Trimere nicht direkt übereinander liegen, sondern gegeneinander verdreht sind. Dort, wo sich im oberen Trimer eine Lücke zwischen den Monomeren befindet, ist im unteren Trimer keine Lücke. Die Rekonstruktion zeigt damit, daß die Anordnung der Trimere in der Tyrosinase identisch mit der Anordnung der Trimere im Hämocyanin sind. Sie bestätigt die generelle Richtigkeit der Annahme (Jaenicke und Decker 2003), daß es sich bei der Tyrosinase um ein hexamerer Molekül mit D₃-Symmetrie handelt.

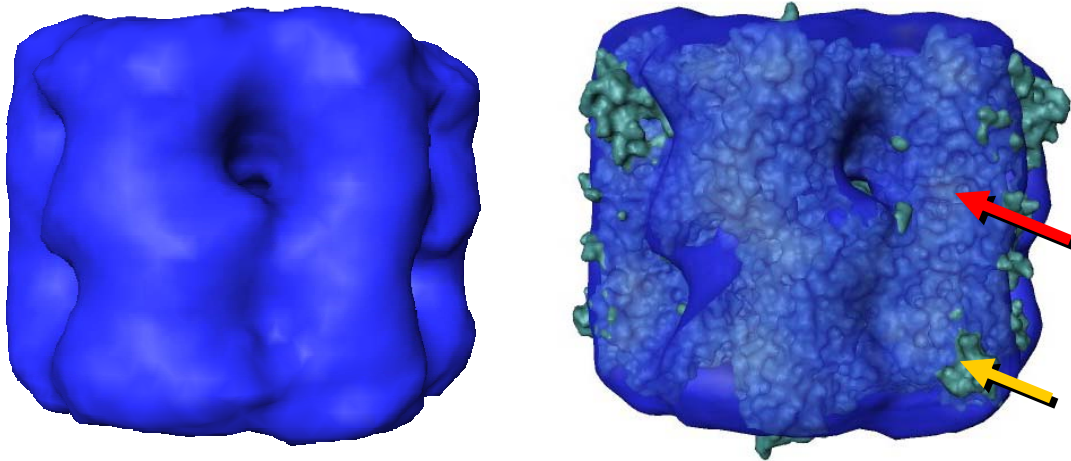


Abbildung 63: Ausschnittsvergrößerungen der Rekonstruktion aus den vorhergehenden Abbildungen
 Blau: Rekonstruktion, grün: Röntgenstruktur des Hämocyanins von *Panulirus interruptus*, roter Pfeil: Lücke zwischen Monomeren im oberen Trimer, gelber Pfeil: keine Lücke im unteren Trimer

Weiterhin zeigt der Vergleich zwischen Rekonstruktion und Röntgenstruktur, daß die Größe und Proportionen der Tyrosinase in etwa denen des Hämocyanins entsprechen.

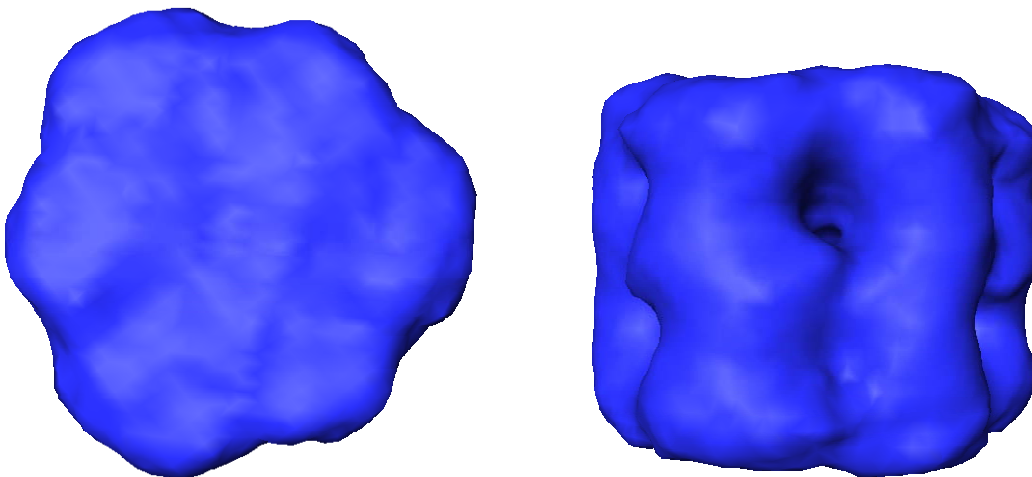


Abbildung 64: Symmetrieachsen in *Palinurus elephas* Tyrosinase.
 Links: 3-zählige Achse in der Aufsicht, rechts: 2-zählige Achse in der Seitenansicht

6.1.4. Auflösungsbestimmung

Zur Auflösungsbestimmung wird der Datensatz geteilt und zwei unabhängige 3D-Modelle berechnet, die danach mittels einer Fourier Shell Correlation-Funktion verglichen werden. (van Heel 1987a, 1987b). Die Auflösungsbestimmung wurde mit dem im Vergleich zum 3σ -Kriterium eher konservativen 0.5 FSC-Kriterium durchgeführt – man vergleicht die beiden Rekonstruktionen, zuerst die Form, dann immer mehr strukturelle Feinheiten. Der Punkt, an dem die beiden Rekonstruktionen um mehr als 50% voneinander abweichen, wird als Auflösung definiert – manchen Autoren ist dieses Kriterium allerdings zu pessimistisch (van Heel und Schatz 2005). Die so ermittelte Auflösung lag bei etwa 21 Å, siehe Abbildung 65.

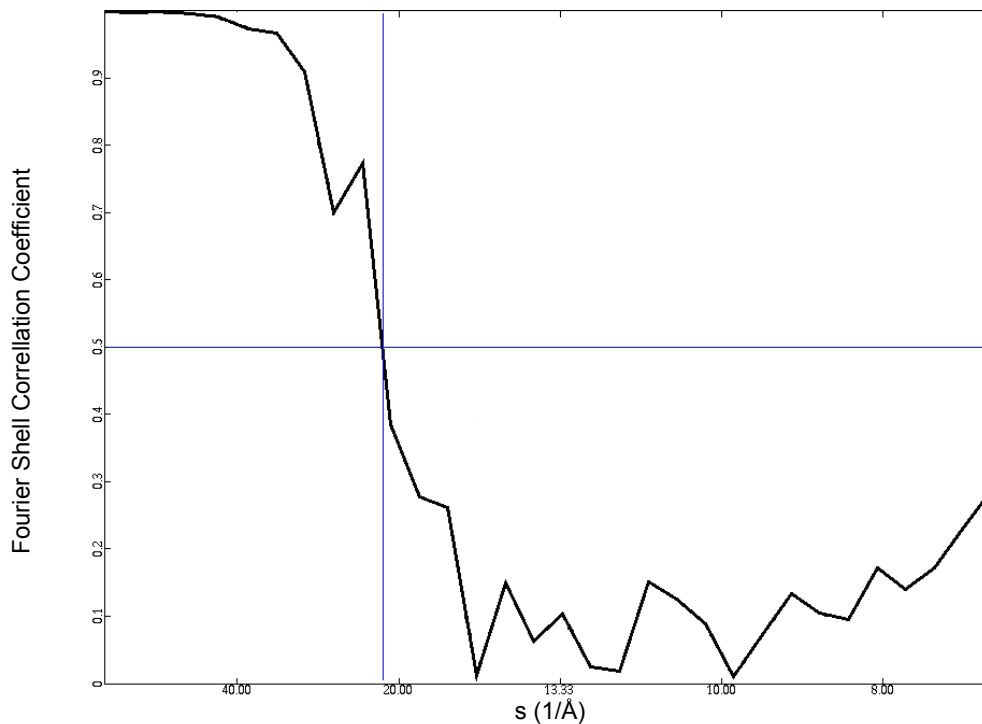


Abbildung 65: Fourier Shell Correlation als Ergebnis des Vergleichs zweier unabhängig voneinander errechneter Rekonstruktionen mittels FSC.

Die ermittelte Auflösung der *Palinurus elephas*-Tyrosinase bei 0.5 FSC beträgt 21Å.

Normalerweise sollte die FSC-Kurve, wenn Sie einmal den Nullpunkt berührt hat, nicht wieder ansteigen. Ein solcher Kurvenverlauf weist auf Probleme während der Rekonstruktion hin, hier kann z.B. die Filterung der Partikel und die Interpolation während der Rekonstruktion noch optimiert werden (Penczek 2005).

6.1.5. Zusammenfassung und Ausblick

Die dreidimensionale Struktur der Tyrosinase von *Palinurus elephas* (der Europäischen Languste) konnte durch eine Rekonstruktion aus negativ kontrastierten TEM-Aufnahmen aufgeklärt werden. Die Auflösung des Modells beträgt etwa 21 Å.

Wie man in den vorstehenden Abbildungen sieht, handelt es sich um ein hexamerer Protein mit einer D3-Symmetrie. In dieser Symmetrie wird eine dreizählige Rotationsachse mit einer dazu senkrecht stehenden Schraubenachse kombiniert (siehe Abbildung 64). Die Form und Größe des Moleküls ist ähnlich der eines strukturell nahverwandten Hämocyanins derselben Tierart. Beeindruckend ist die Tatsache, daß die Rekonstruktion bei dieser Auflösung die Lage der Trimere zueinander zeigen kann.

Wie könnte man die Rekonstruktion verbessern?

Die Anzahl der Einzelpartikel, die dieser Rekonstruktion zugrunde liegen, beträgt etwa 2500. Die Analyse von einer höheren Anzahl von Bildern könnte die Auflösung verbessern, aber die Anzahl der Bilder ist nur einer von vielen Parametern, die die Auflösung bestimmen. In diesem Fall wirkt sich auch die Präferenz des Moleküls, sich hauptsächlich in zwei

Orientierungen an den Kohlefilm des Objektträgers zu binden, negativ aus: Über 2.000 von 2.500 Partikeln wurden in der Aufsicht oder Seitenansicht aufgenommen. Durch die Einbettung in Eis sollte man auch andere Orientierungen beobachten können, um so die fehlende Strukturinformation zu erhalten.

Ein weiterer Faktor, der die Auflösung begrenzen kann, ist die Höhe des Kontrastmittels am beobachteten Partikel. Idealerweise wird jedes Molekül vollständig und gleichmäßig von Uranylacetat umgeben sein. Von diesem Fall kann jedoch nicht ausgegangen werden. So kann das Erscheinungsbild eines Moleküls trotz identischer Ausrichtung zum abbildenden Elektronenstrahl variieren. Letztlich sollte ein solches Projekt mit vitrifizierten Proben an einem EM mit Feldemissionskanone durchgeführt werden. Diese zeichnet sich im Vergleich zu anderen Elektronenquellen (Wolframkathode oder LaB₆-Kathode) durch eine hohe Strahlkohärenz und Strahlstärke aus, die für hochaufgelöste Aufnahmen unabdingbar ist. Nur solche Untersuchungen werden die noch ausstehenden Fragen, wie nach den Untereinheitenkontakten und dem Einfluß der Quartärstruktur auf die enzymatische Aktivität beantworten können.

Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln war keine im Verhältnis zum Aufwand stehende Verbesserung der Struktur zu erwarten. Daher wurde dieses Projekt als erste Bestätigung der Vermutung interpretiert, daß die Tyrosinase bei dieser Langustenart in hexameren Molekülen auftritt und nicht – wie in anderen Spezies – in monomerer Form (z.B. in Bakterien (Betancourt et al. 1992; Chen, L. Y. et al. 1992; Tepper et al. 2002; Claus und Decker 2006)), dimerer Form (Säugetiere (Watabe et al. 2004; Wang und Hebert 2006)) oder tetramerer Form (z.B. von Schaben (Durrant et al. 1993)).

6.2. Modellierung des *Eurypelma californicum* Hämocyanins zur Verwendung in der EM-Rekonstruktion

Das Hämocyanin der Amerikanischen Vogelspinne *Eurypelma californicum* gehört mit 24 Untereinheiten und über 1,7 MDa zu den größten bekannten Proteinkomplexen und sorgt für den Sauerstofftransport in der Hämolymphe. Seit Jahrzehnten wird eine Strukturauflösung versucht. Diese erweist sich allerdings als sehr schwierig, da die Größe des Moleküls der Grund dafür ist, daß das Hämocyanin sehr ungeordnet kristallisiert. Das Molekül zeigt außerdem bei der Bindung von Sauerstoff eine substantielle Konformationsänderung, die sich über sämtliche Quartärstrukturebenen fortsetzt. Eine weitere Hürde bei der Strukturauflösung ist sicherzustellen, daß alle Moleküle, die untersucht werden sollen, in derselben Konformation vorliegen: In der oxygenierten oder deoxygenierten Form.

Mit der Strukturänderung verändert sich auch die Affinität des Moleküls für Sauerstoff. Das zugrundeliegende Phänomen, die sogenannte Kooperativität, ist seit langem beschrieben (Robert et al. 1987; Decker und Sterner 1990). Zu beobachten sind beim Hämocyanin neben der Änderung der Sauerstoffaffinität auch die strukturellen Änderungen, z.B. im Elektronenmikroskop in negativ kontrastierten Aufnahmen (siehe Abbildung 66 aus (Hartmann et al. 2004)). Die Auflösung dieser Aufnahmen lässt allerdings keinerlei Spekulation über die konkrete dreidimensionale Struktur, den Mechanismus der Strukturänderung oder die daran beteiligten Aminosäuren zu.

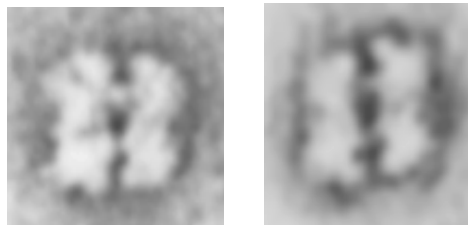


Abbildung 66: Konformationsunterschiede des Eurypelma-Hämocyanins im TEM-Bild

Links: deoxy-Konformation, rechts: oxy-Konformation, Abbildung von Tobias Müller, aus (Hartmann et al. 2004)

Um diese Fragen zu klären, wurde eine Studie durchgeführt und veröffentlicht, in der die oxy- und deoxy-Formen des Hämocyanins mit Röntgenkleinwinkelstreuung (Small angle xray scattering, SAXS) untersucht wurden (Decker et al. 1996; Hartmann und Decker 2002).

Wie aus der Studie hervorging, betrifft die Strukturänderung den Abstand der Dodekamere, Hexamere und Trimere, die Rotation der Hexamere und Dodekamere gegeneinander und den Gyrationradius des Gesamtmoleküls. Es handelt sich also um ein sehr komplexes, hochkooperatives System.

Welche Rückschlüsse auf die Struktur kann man aus diesen Parametern ziehen? Die Abbildung 67 zeigt die errechneten Strukturen der deoxygenierten und oxygenierten Form des *Eurypelma* Hämocyanins. Die Anordnung und Orientierung der Untereinheiten wurde auf Grundlage der SAXS-Messungen (Decker et al. 1996) vorgenommen, die Homologie-Modelle der Untereinheiten wurden in meiner Diplomarbeit (Schweikardt, T., Diplomarbeit 2001) errechnet und in (Voit et al. 2000) veröffentlicht.

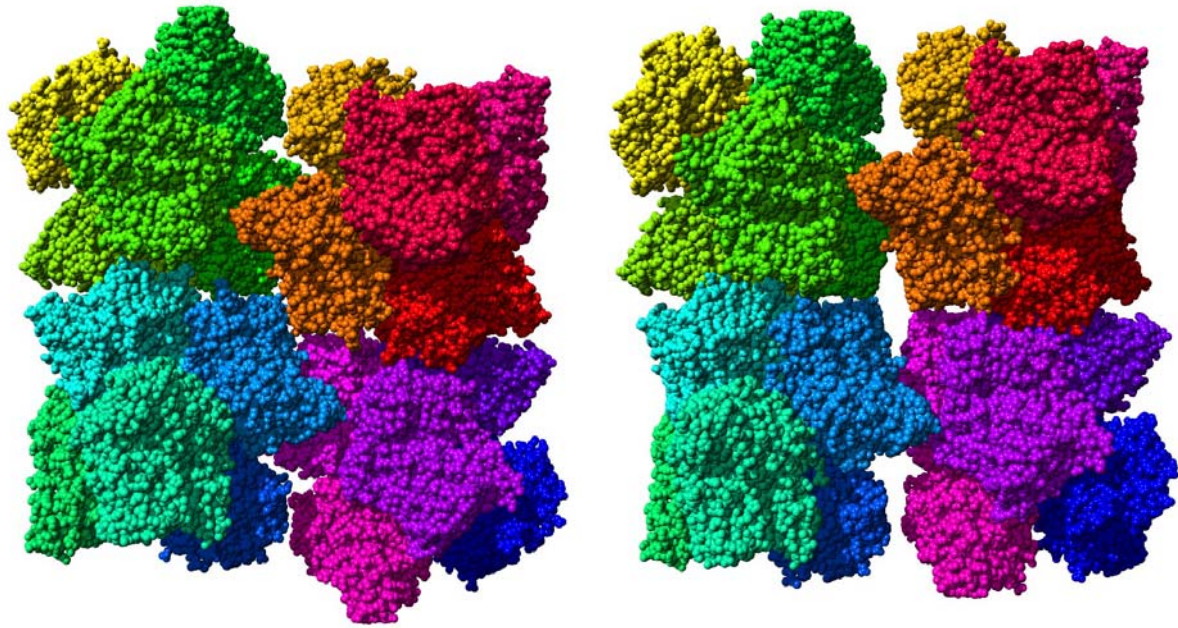


Abbildung 67: Errechnete Struktur des *Eurypelma californicum* Hämocyanins

Kombination aus SAXS-Analyse und Homologie-Modellierung. Links: oxygenierte Struktur, rechts: deoxygenierte Struktur. Jede Untereinheit ist zur besseren Übersicht in einer anderen Farbe eingefärbt (Voit et al. 2000).

Um eine hochauflösende Struktur zu generieren, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Markl, Fachbereich Zoologie der Universität Mainz, eine Rekonstruktion aus Cryo-EM-Aufnahmen erstellt.

6.2.1. Experimentelle Prozeduren

Hier erwies sich die strukturelle Variabilität des Hämocyanins als großes Problem. Die Methode der Rekonstruktion erfordert es, daß alle Moleküle, die in die Rekonstruktion *einer* Struktur eingehen sollen, in derselben Konformation vorliegen – entweder oxygeniert oder deoxygeniert. Hat man in der Lösung, die man untersuchen will, *beide* Konformationen vorliegen, muß man die Konformationen unterscheiden können – auch bei schlechtem Kontrast, wie er für die Cryo-Elektronenmikroskopie typisch ist.

Kann man die Formen nicht unterscheiden, dann wird die Rekonstruktion fehlerhaft sein und eine gewisse Auflösung nicht überschreiten können. Die Umwelt-Bedingungen während des Einfrierens der Probe zu kontrollieren – und damit den Zustand der Probe – ist eine zusätzliche Herausforderung. Die Probe wird auf ein Kupfernetzchen aufgebracht, das mit einem löchrigem Kohlefilm überzogen ist („Holey Carbon“). Die Lösung verteilt sich über den Kohlefilm, und man hofft, daß möglichst viele der Moleküle zusammen mit der Lösung in diese Löcher diffundieren. Man gibt der Lösung kurz Zeit, sich zu verteilen, nimmt die überschüssige Lösung mit Filterpapier ab und schießt dann den Probenträger in flüssiges Ethan. Auch wenn das Ethan durch flüssigen Stickstoff auf ca. 110 Kelvin gekühlt ist, besteht trotzdem Explosionsgefahr, wenn man eine reine Sauerstoff-Atmosphäre im Präparationsumfeld herstellt. Es war somit zuerst nicht möglich, das Protein zu 100% in die oxygenierte Form zu überführen.

Letztendlich wurden diese experimentellen Probleme durch einen hohen apparativen Aufwand (Absaugvorrichtungen für die Präparationskammer, Sicherheitsglas uvm.) gelöst, doch selbst wenn man die Bedingungen kontrollieren kann, kann man nicht zu 100% sicher sein, daß jedes Molekül in derselben Konformation vorliegt. Genau dieser Umstand ist vermutlich der Grund für die niedrige Auflösung der ersten Rekonstruktionen: Man muß davon ausgehen, daß sich nicht alle in den cryo-TEM-Aufnahmen sichtbaren Partikel in derselben Konformation befanden.

6.2.2. Lösungsansätze für die experimentellen Probleme

Da unserer Arbeitsgruppe die errechnete Struktur der beiden Konformationen vorlag, kam mir folgende Idee: Wenn wir die Genauigkeit des Auswahlprozesses (das sog. „Picking“) steigern könnten, so daß ein Suchalgorithmus schon bei der Auswahl der Partikel zwischen der oxy- und der deoxy-Form des Hämocyanins unterscheiden kann, müsste sich die Genauigkeit der Rekonstruktion steigern lassen.

Um dieses Ziel zu erreichen, mußten die entsprechenden Ansichten des Moleküls aus verschiedenen Eulerwinkeln errechnet werden, die dann als Suchmuster („Picking Templates“) eingesetzt werden können. Das Programm `boxer`, ein Teil des EMAN-Programmpakets, kann die Templates benutzen, um aus einem Gemisch an Konformationen die jeweils gewünschte herauszupicken und die unerwünschte Konformation zu ignorieren („reference-based picking“, (Ludtke et al. 1999)).

Nicht nur während der Partikelauswahl, sondern auch während der Rekonstruktion können die Templates eingesetzt werden und zwar während der Klassifikation der gepickten Partikel, um eine bessere Zuordnung der Partikel in eine bestimmte Klasse zu ermöglichen. Hier liegt aber auch eine Fehlerquelle: Die Klassifikation kann von diesen zusätzlichen Informationen profitieren, aber im nachfolgenden Schritt des Alignments der einzelnen Partikel in einer Klasse sollten die Templates nicht benutzt werden, um eine Beeinflussung des Modells durch die Templates zu verhindern.

Die errechneten Strukturen lagen im PDB-Format vor, waren also atomare Modelle des Eurypelma Hämocyanins (Voit et al. 2000; Hartmann und Decker 2002). Um ein möglichst realistisches Aussehen der Projektionen zu erreichen, wurden die 3D-Daten mit EMAN gefiltert (Douglas und Rao 1983), so daß sie Rekonstruktionen bei 10 Ångström Auflösung entsprechen (Abbildung 68). Danach wurden Projektionen aus allen Euler-Winkeln erzeugt, die für die vollständige Beschreibung eines Moleküls mit C2-Symmetrie notwendig sind, das Winkelinkrement zwischen den Projektionen betrug 5 Grad (Abbildung 69, Abbildung 70).

Die Projektionen wurden wie beschrieben im Verlauf der Partikelselektion und Klassifizierung eingesetzt.

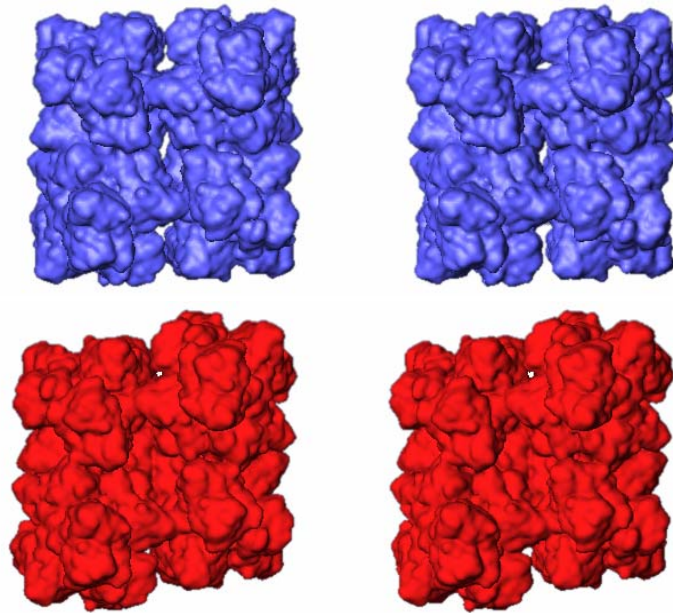


Abbildung 68: Auf 10Å Auflösung gefilterte 3D-Strukturen des Eurypelma-Hämocyanins
 Oben in blau: deoxy-Form, unten in rot: oxy-Form. Zur Methode siehe Kapitel 6.2.2, Abbildung erstellt mit AMIRA (www.amiravis.com). Stereoabbildungen, Parallelblick.

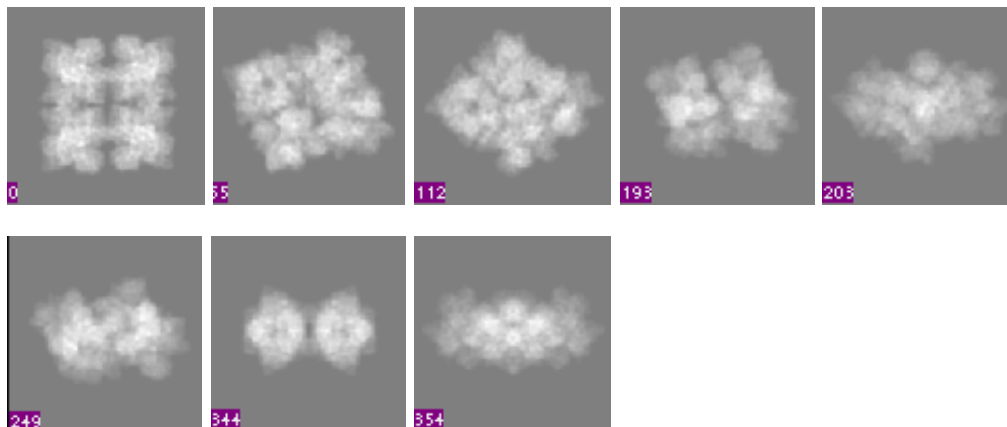


Abbildung 69: Projektionen der errechneten deoxy-Form des Hämocyanins als Suchvorlagen
 Erzeugt wurden über 360 Projektionen mit unterschiedlichen Eulerwinkeln. Zur Methode siehe Kapitel 6.2.2.

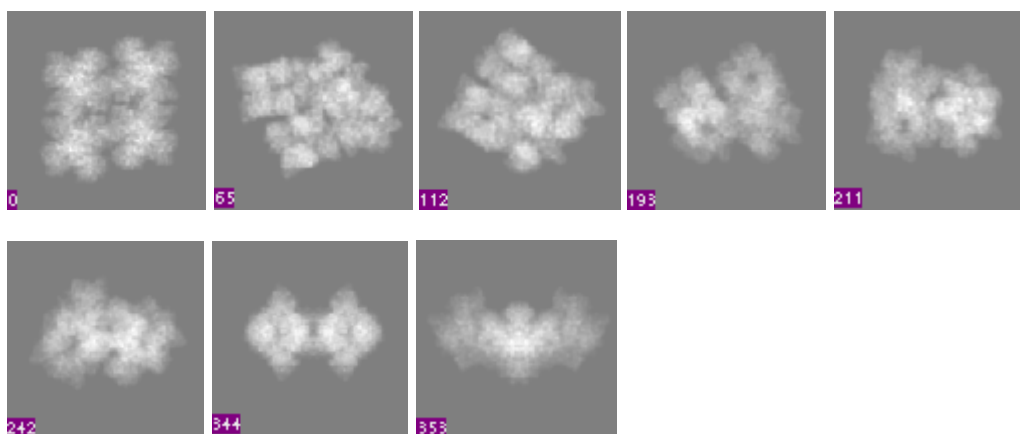


Abbildung 70: Projektionen der errechneten oxy-Form des Hämocyanins als Suchvorlagen
 Erzeugt wurden über 360 Projektionen mit unterschiedlichen Eulerwinkeln. Zur Methode siehe Kapitel 6.2.2.

6.2.3. Ergebnisse

Die Rekonstruktionen, die auf dieser neuen Suchroutine basierten, zeigten eine deutliche Verbesserung der Struktur, vor allem die der deoxy-Form (persönliche Mitteilungen Jürgen Markl und Ulrich Meissner, Zoologie, Universität Mainz).

Die Auflösung lag bei etwa 25 Ångström im Vergleich zu vorherigen Rekonstruktionen, die eine Auflösung von ca. 30-40 Ångström hatten und in denen Details der Molekülgestalt nur unzureichend zu erkennen waren.

In der neuen Rekonstruktion (siehe Abbildung 71) war es nun möglich, die Form des Moleküls sowie die Lage der Hexamere und der meisten Monomere zu erkennen. Probleme bereitete aber nach wie vor die Symmetrie innerhalb der Hexamere, wie man in Abbildung 71 erkennen kann. Dies war der Ausgangspunkt für die weitere Verbesserung der Rekonstruktion, die im Rahmen der Dissertation von Michael Stohr durchgeführt wurde.

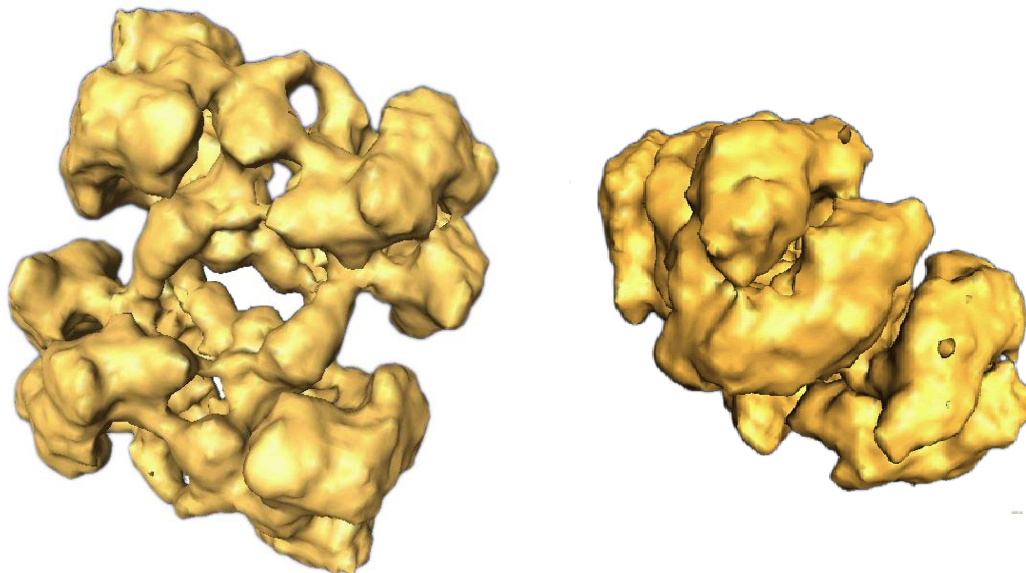


Abbildung 71: Rekonstruktion des 24meren Hämocyanins von *Eurypelma californicum*.

Links: Ansicht der C2-Symmetrie, rechts: um 90 Grad gedrehte Ansicht. Rekonstruktion noch ohne weitergehende Optimierung der Rekonstruktionsparameter. Abbildung erstellt in AMIRA (www.amiravis.com), Rekonstruktions-Datensatz von Michael Stohr, Zoologie, Universität Mainz.

Es wurden unter anderem mehrere Methoden zur Winkelbestimmung angewendet und das Molekül unter Angabe unterschiedlicher Symmetrien rekonstruiert. Die Überprüfung zahlreicher Parameter führte im Verlauf des Projektes zu einer deutlichen Steigerung der Rekonstruktionsqualität.

Momentan wird versucht, durch methodische Verbesserung und eine Erhöhung der Anzahl an analysierten Partikeln die Auflösung der Rekonstruktion auf unter 10 Ångström zu verbessern. Die endgültigen Rekonstruktionen des Hämocyanins liegen mir nicht vor und können daher nicht gezeigt werden.

6.3. Modellierung des *Drosophila melanogaster* LSP-2 zur Verwendung in der EM-Rekonstruktion

Das Larvale Serumprotein 2, abgekürzt LSP-2, kommt in der Taufliege *Drosophila melanogaster* vor, gehört zur Familie der Typ-3-Kupferproteine und zur Klasse der Hexamerine (Burmester und Scheller 1996; Burmester et al. 1998; Burmester 2001, 2002). Sequenzanalysen weisen darauf hin, daß sich die Hexamerine der Insekten von den hexameren Hämocyaninen der Crustaceen ableiten. Da die Sauerstoffversorgung in Insekten von den Tracheen übernommen wird, verzichten viele der weiterentwickelten Insekten auf den Sauerstofftransport in der Hämolymphe - nicht aber die basal stehenden und am nächsten mit den Crustaceen verwandten Insekten wie die Steinfliegen, diese besitzen nach wie vor ein funktionsfähiges Hämocyanin (Hagner-Holler et al. 2004; Burmester und Hankeln 2007; Hagner-Holler et al. 2007).

Der evolutionäre Druck auf die Funktionsfähigkeit des Hämocyanins ging soweit zurück, daß sich eine Proteinklasse mit anderer Funktion entwickelten konnte, die Hexamerine. Während dieser Entwicklung gingen fünf der sechs kupferbindenden Histidine (Telfer und Kunkel 1991) verloren und wurden durch andere Aminosäuren ersetzt. Dies bedeutet, daß Hexamerine wie das LSP-2 nicht in der Lage sind, Kupfer oder Sauerstoff zu binden.

Hexamerine dienen vermutlich der Speicherung von aromatischen Aminosäuren, die einen ungewöhnlich großen Anteil der Molekülmasse ausmachen. Das LSP-2 enthält z.B. doppelt so viele Tyrosine wie das Langusten-Hämocyanin. Hexamerine werden deswegen auch als Arylphorine bezeichnet.

6.3.1. Zielsetzung

Ziel dieses Projektes war die Vorhersage der hexameren Struktur des larvalen Serumproteins LSP-2, Variante CG6806-PA von *Drosophila melanogaster* zum Vergleich mit der 3D-Rekonstruktion, die von Andreas Martin (Zoologie Mainz, AG Markl) aus CryoEM-Aufnahmen erstellt wurden. Bei der Homologie-Modellierung wird das Augenmerk vor allem auf die methodenimmanente Variabilität an den Stellen in den Modellen gerichtet, die durch das Fehlen von äquivalenten Aminosäuren in der Vorlagenstruktur zustande kommen.

6.3.2. Alignment und Modellierung

Das Alignment von *Limulus polyphemus* Hämocyanin Untereinheit 2, *Panulirus interruptus* Hämocyanin Typ A und dem *Drosophila*-LSP-2 wurde mit ClustalX erstellt. Angewendet wurden die Standard-Alignment-Optionen, bis auf die Änderung der Bewertungs-Matrix für das „Pairwise Alignment“, hier wurde die *Blosum30*-Matrix verwendet.

Die statistische Analyse mit Genedoc für das Alignment der drei Proteine zeigt, daß LSP-2 mit dem Langusten-Hämocyanin geringfügig mehr Gemeinsamkeiten hat, etwa 2% mehr

isofunktionelle oder „homologe“ Aminosäuren und dafür weniger Lücken im Alignment aufweist (Abbildung 72). Daher wurde das Langusten-Hämocyanin als Vorlage zur Modellierung benutzt.

	LSP-2
1HCY	22% Identität 42% Homologie 10% Lücken im Alignment
1LLA	22% Identität 40% Homologie 12% Lücken im Alignment

Abbildung 72: Statistische Alignment-Analyse von GENEDOC

Proteine: *Panulirus*-Hämocyanin (1HCY), *Limulus*-Hämocyanin (1LLA) und *Drosophila*-LSP-2. Die Prozentwerte bezeichnen jeweils Sequenzidentität, Homologie und Lücken im Alignment. Dabei wird der Begriff Homologie definiert als Isofunktionalität der Aminosäuren nach (Nicholas et al. 1997).

Das mit ClustalX berechnete Alignment wurde mit Genedoc manuell optimiert (Abbildung 73) und zur simultanen Modellierung aller Untereinheiten des hexameren LSP-2 benutzt. In bestimmten Bereichen des Alignments gibt es Lücken, die der verwendeten Methode nach zur Folge haben, daß die in diesen Bereichen vorhergesagten Strukturen stark von den realen Strukturen abweichen können, aber nicht müssen.

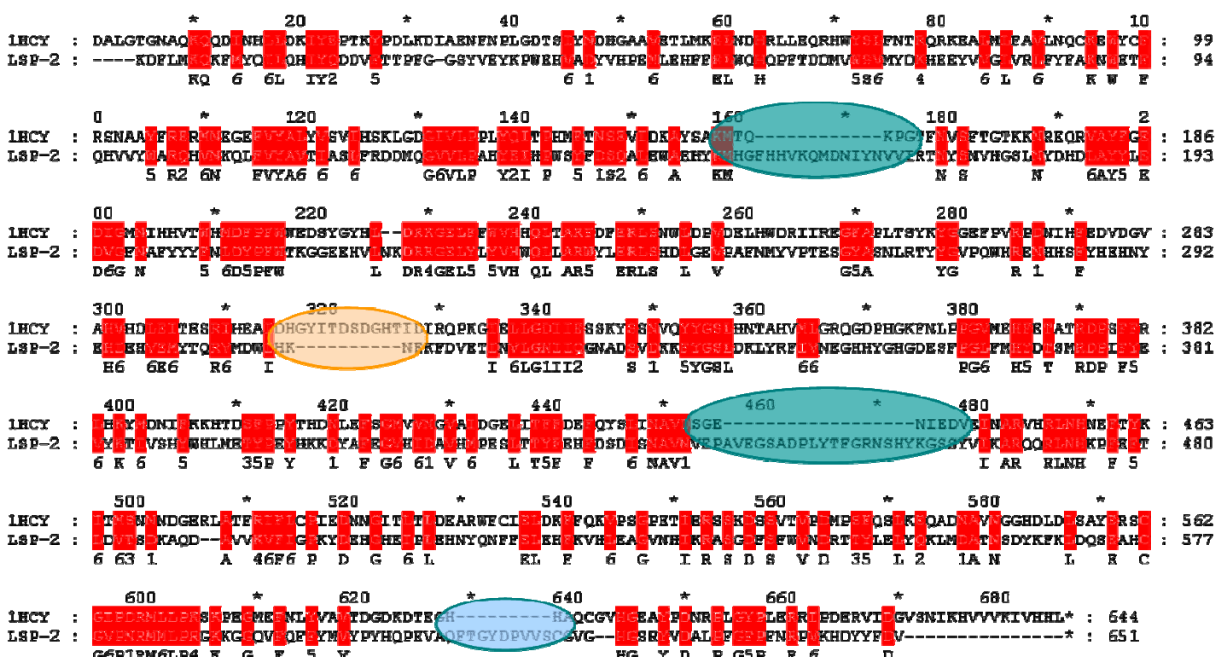


Abbildung 73: Sequenzalignment von *Drosophila melanogaster* LSP2 und *Panulirus interruptus* Hämocyanin 1HCY.

Rot hinterlegt: isofunktionelle Aminosäuren, grüne Ovale: größere Lücken im Alignment, blaues Oval: kleine Lücke im Alignment. Oranges Oval: Lücke im Alignment, aber diesmal eine Deletion in LSP-2.

Um die strukturelle Varianz an den Stellen ohne Vorlagestruktur zu zeigen, wurden 30 verschiedene Modelle des LSP-2 modelliert. Dazu wird die initial modellierte Struktur 30 mal kopiert, und jede der Strukturen einer Randomisierung unterzogen, die die Positionen aller Atome um wenige Bruchteile von Ångström ändert (Sali und Blundell 1993; Sali 1995a). Dies führt dazu, daß während der anschließenden Optimierung der Modelle nicht immer dieselben lokalen Energieminima von den Strukturen eingenommen werden. An den Stellen, die nicht durch Homologie-basierte Terme (die sog. „Restrains“) definiert sind, tritt eine erhöhte strukturelle Varianz auf. Diese kann man mit einer Ensemble-Analyse aller Modelle zeigen. Überlagert man alle Modelle, dann zeigt sich in den Regionen, die ohne eine entsprechende Vorlagenstruktur modelliert wurden oder in denen eine Deletion zu kompensieren ist, eine hohe Strukturvarianz (siehe Abbildung 74).

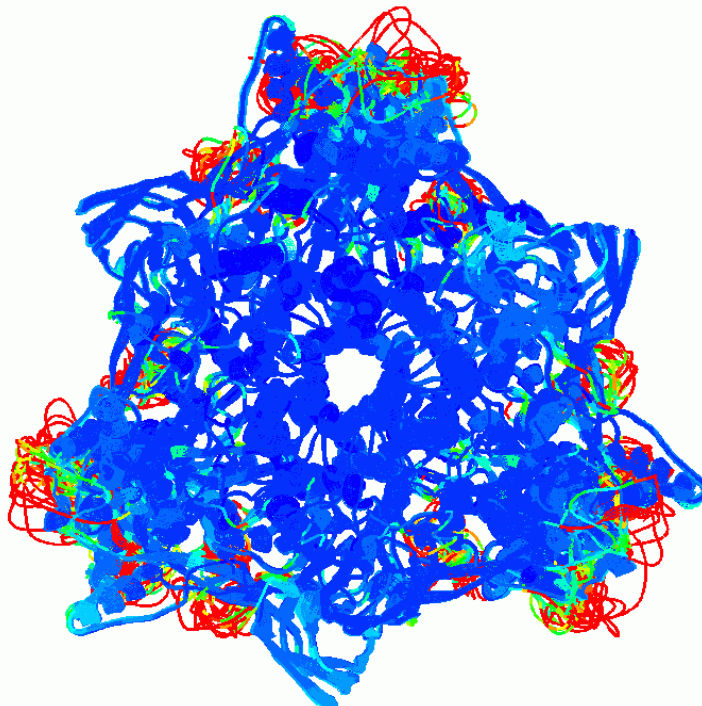


Abbildung 74: Ensemble-Analyse von 30 hexameren Homologie-Modellen des LSP-2.

Aufsicht mit Farbcodierung, Bereiche niedriger Varianz sind blau, Bereiche hoher Varianz sind grün, gelb und rot.

Zum Beispiel ist der Bereich der Aminosäuren Glu439-Gly453 im LSP-2 im Vergleich zum Hämocyanin von *Panulirus interruptus* eine Insertion von 15 Aminosäuren (vgl. Abbildung 73). Für diesen Bereich gibt es also keine Vorlagenstruktur im Hämocyanin, was bedeutet, daß die Konformation dieser 15 Aminosäuren langen Schleife von MODELLER extrapoliert werden muß. Wie schon bekannt, sind solche Stellen im Modell weniger verlässlich als andere, durch Homologie gut definierte Stellen. Diese Stellen zeigen eine erhöhte Varianz (vergleiche rote Bereiche in Abbildung 74) und sollten deshalb bei der Analyse der Proteinstruktur bzw. deren Funktion entsprechend berücksichtigt werden.

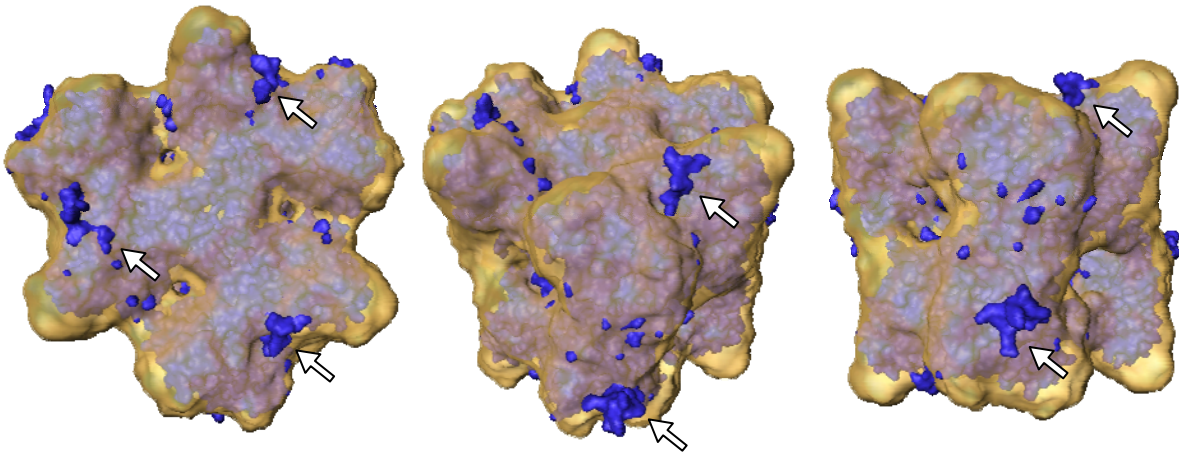


Abbildung 75: Eingepasstes Homologie-Modell (blau) in der EM-Rekonstruktion (gold)

Homologie-Modell aus dieser Arbeit, siehe Abbildung 74, Rekonstruktion von Andreas Martin, Institut für Zoologie. Links: Aufsicht, Mitte: Schrägansicht, rechts: Seitenansicht. Pfeile: die in Abbildung 74 rot eingefärbten Bereiche hoher struktureller Varianz; diese zeigen keine verlässlichen Strukturen, und ragen über die Rekonstruktion hinaus, siehe auch Abbildung 74.

6.3.3. Diskussion

Wie erwartet zeigen sich in den Bereichen des Modells, die mangels Vorlagenstruktur extrapoliert werden mußten, die meisten Abweichungen, auch zu erkennen an den aus der EM-Rekonstruktion herausragenden Peptiden (Pfeile in Abbildung 75). Ansonsten zeigt sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden, was als Hinweis gedeutet wurde, daß die Modellierung größtenteils zum korrekten Ergebnis geführt hat.

Der ausführliche Vergleich von EM-Rekonstruktion und Modell sowie die Analyse der Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten wurde von Andreas Martin in seiner Dissertation durchgeführt, auf die ich hier verweisen möchte (Martin 2006). Die endgültige Rekonstruktion soll in Kürze in Kooperation mit dem Institut für Zoologie veröffentlicht werden, liegt mir aber nicht vor und kann deshalb nicht gezeigt werden.

7. Ausblick

Die Tyrosinasen und Catecholoxidasen sind hervorragende Beispiele dafür, daß ein Protein nicht nur eine Funktion haben kann, sondern zwei oder mehr Funktionen anbietet. Um den molekularen Reaktionsmechanismen zu verstehen, gilt es herauszufinden, welche Aminosäuren die unterschiedliche Funktion dieser beiden strukturell so nahe verwandten Enzyme bestimmen. Die Erkenntnisse, die aus der Analyse der mutierten Maus-Tyrosinase und den entsprechenden Homologiemodellen gewonnen wurden, sind ein Ausgangspunkt für die strukturelle Analyse der enzymatischen Eigenschaften der Tyrosinase.

In der Kartoffel-Catecholoxidase blockiert das Phenylalanin 261, das der Schleife über dem aktiven Zentrum entspringt, den Zugang zum CuA-Zentrum. Im Modell der Maus-Tyrosinase ist diese Aminosäure durch ein weniger voluminöses Valin ersetzt, das den Weg zum CuA nicht versperrt. Es gilt nun dieses Valin in der Maustyrosinase durch zielgerichtete Mutagenese durch Phenylalanin zu ersetzen. Wenn dies dazu führt, daß die Monophenolhydroxylase-Aktivität verschwindet, aber die Diphenoloxidase-Aktivität erhalten bleibt, wäre das der endgültige Beweis für die Theorie, daß die Monophenolhydroxylase-Aktivität am CuA lokalisiert ist und die Diphenoloxidase-Aktivität an CuB.

Ebenso interessant wäre es, das blockierende Phenylalanin in der Kartoffel-Catecholoxidase durch eine andere, weniger große Aminosäure zu ersetzen, z.B. Alanin. Hier würde ich das Auftreten einer Monophenolhydroxylase-Aktivität in der Mutante erwarten. Grundlage für diese Versuche wäre allerdings ein funktionierendes Expressionssystem für die Kartoffel-Catecholoxidase, das momentan weder unserem Institut noch unseren Kooperationspartnern zur Verfügung steht.

Es wird vermutet, daß das Tyrosin, das vom Caddieprotein aus in das aktive Zentrum der Bakterien-Tyrosinase ragt, eine Rolle bei der Faltung der Tyrosinase spielt. Das Caddieprotein hätte somit auch Chaperon-Charakter, genauso wie die strukturell äquivalente Domäne 1 der Hämocyanine, aus der ein Phenylalanin ins aktive Zentrum ragt. Eine gerichtete Mutagenese dieser aromatischen Aminosäuren würde Aufschluß darüber geben, ob das Caddieprotein oder Domäne 1 tatsächlich Faltungshelfer sind, und welche Eigenschaft der Aminosäure im Nukleationszentrum wichtig ist – die Größe oder die Aromatizität. Eine Mutationsreihe gegen verschiedene Aminosäuren wäre hier ein sinnvoller Ansatz, am besten in dem schon etablierten Expressions-System.

Wie unsere Arbeiten gezeigt haben, ist eine Änderung der Sequenz nicht unbedingt notwendig, um eine Änderung der Aktivität hervorzurufen. Reine Strukturänderungen durch Detergentien, Komplexbildung mit anderen Proteinen oder Änderung des Lösungsmittels – wie im Kapitel 2.1.7 ausführlich beschrieben – haben mitunter dieselben Auswirkungen auf Proteine.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die bioinformatische Methode der Homologie-Modellierung dazu benutzt, die dreidimensionalen Strukturen verschiedener Proteine vorherzusagen und zu analysieren. Experimentelle Befunde aus Laborversuchen wurden dazu benutzt, die Genauigkeit der Homologie-Modelle zu erhöhen. Die Ergebnisse aus den Modellierungen wurden wiederum dazu benutzt, um neue experimentelle Versuche vorzuschlagen.

Anhand der erstellten Modelle und bekannten Kristallstrukturen aus der Protein-Datenbank PDB wurde die Struktur-Funktionsbeziehung verschiedener Tyrosinasen untersucht. Dazu gehörten sowohl die Tyrosinase des Bakteriums *Streptomyces* als auch die Tyrosinase der Hausmaus. Aus den vergleichenden Strukturanalysen der Tyrosinasen resultierten Mechanismen für die Monophenolhydroxylase-Aktivität der Tyrosinasen sowie für den Import der Kupferionen ins aktive Zentrum. Es konnte der Beweis geführt werden, daß die Blockade des CuA-Zentrums tatsächlich der Grund für die unterschiedliche Aktivität von Tyrosinasen und Catecholoxidasen ist. Zum ersten Mal konnte mit der Maus-Tyrosinase ein vollständiges Strukturmodell einer Säugetier-Tyrosinase erstellt werden, das dazu in der Lage ist, die Mechanismen bekannter Albino-Mutationen auf molekularer Ebene zu erklären. Die auf der Basis des ermittelten 3D-Modells gewonnenen Erkenntnisse über die Wichtigkeit bestimmter Aminosäuren für die Funktion wurde durch gerichtete Mutagenese an der rekombinant hergestellten Maus-Tyrosinase getestet und bestätigt. Weiterhin wurde die Struktur der Tyrosinase des Krebses *Palinurus elephas* durch eine niedrigaufgelöste 3D-Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Bildern aufgeklärt.

Der zweite große Themenkomplex umfasst die Strukturanalyse der Lichtsammelkomplexe LHCI-730 und LHCII. Im Falle des LHCII konnte der Oligomerisierungszustand der LHC-Moleküle mit diskreten Konformationen des N-Terminus korreliert werden. Auch hier kam eine Kombination von Homologie-Modellierung und einer experimentellen Methode, der Elektronen-Spin-Resonanz-Messung, zum Einsatz. Die Änderung des Oligomerisierungszustands des LHCII kontrolliert den Energiezufluß zu den Photosystemen PS I und PS II. Des Weiteren wurde ein vollständiges Modell des LHCI-730 erstellt, um die Auswirkungen gerichteter Mutagenese auf das Dimerisierungsverhalten zu untersuchen. Auf Basis dieses Modells wurden die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren Lhca1 und Lhca4 evaluiert und potentielle Bindungspartner identifiziert.

9. Literatur

Abola, Kuhn, Earnest und Stevens (2000). "Automation of X-ray crystallography." Nat Struct Biol **7 Suppl**: 973-7.

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller und Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.

Ashida und Soderhall (1984). "The Prophenoloxidase activating system in crayfish." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **77**(1): 21-26.

Aspan, Huang, Cerenius und Soderhall (1995). "cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 939-43.

Auer (2000). "Three-dimensional electron cryo-microscopy as a powerful structural tool in molecular medicine." J Mol Med **78**(4): 191-202.

Baird, Kelly, Price, Jaenicke, Meesters, Nillius, Decker und Nairn (2007). "Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation." Biochim Biophys Acta **1774**(11): 1380-94.

Baker und Sali (2001). "Protein structure prediction and structural genomics." Science **294**(5540): 93-6.

Ban, Nissen, Hansen, Moore und Steitz (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." Science **289**(5481): 905-20.

Bassi, Machold und Simpson (1985). "Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize." Carlsberg Res. Commun. **50**: 145–162.

Battaini, De Carolis, Monzani, Tucek und Casella (2003). "The phenol ortho-oxygenation by mononuclear copper(I) complexes requires a dinuclear μ -eta2:eta2-peroxodicopper(II) complex rather than mononuclear CuO₂ species." Chem. Commun.: 726 - 727.

Ben-Shem, Frolov und Nelson (2003). "Crystal structure of plant photosystem I." Nature **426**(6967): 630-5.

Ben-Shem, Frolov und Nelson (2004). "Light-harvesting features revealed by the structure of plant photosystem I." Photosynth Res **81**(3): 239-50.

Benson, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell und Wheeler (2005). "GenBank." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D34-8.

Benson, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell und Wheeler (2008). "GenBank." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D25-30.

Berendsen, Postma, Gunsteren, DiNola und Haak (1984). "Molecular dynamics with coupling to an external bath." The Journal of Chemical Physics **81**(8): 3684-3690.

Berman (2008). "The Protein Data Bank: a historical perspective." Acta Crystallogr A **64**(Pt 1): 88-95.

Betancourt, Bernan, Herber und Katz (1992). "Analysis of tyrosinase synthesis in streptomyces antibioticus." J General Microbiology **138**: 787-794.

Boissy, Sakai, Zhao, Kobayashi und Hearing (1998). "Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1." Exp Dermatol **7**(4): 198-204.

Boteva, Ricchelli, Sartor und Decker (1993). "Fluorescence properties of hemocyanin from tarantula (*Eurypelma californicum*): a comparison between the whole molecule and isolated subunits." J. Photochem. Photobiol. B. Biol. **17**: 145-153.

Branza-Nichita, Negroiu, Petrescu, Garman, Platt, Wormald, Dwek und Petrescu (2000). "Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control." J Biol Chem **275**(11): 8169-75.

Branza-Nichita, Petrescu, Dwek, Wormald, Platt und Petrescu (1999). "Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II." Biochem Biophys Res Commun **261**(3): 720-5.

Brilliant (2001). "The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH." Pigment Cell Res **14**(2): 86-93.

Brocklehurst und Perham (1993). "Prediction of the three-dimensional structures of the biotinylated domain from yeast pyruvate carboxylase and of the lipoylated H-protein from the pea leaf glycine cleavage system: a new automated method for the prediction of protein tertiary structure." Protein Sci **2**(4): 626-39.

Burmester (1999a). "Evolution and function of the insect hexamerins " Eur. J. Entomol. **96**(3): 213-225.

Burmester (1999b). "Identification, molecular cloning, and phylogenetic analysis of a non-respiratory pseudo-hemocyanin of *Homarus americanus*." J Biol Chem **274**(19): 13217-22.

Burmester (2001). "Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily." Mol Biol Evol **18**(2): 184-95.

Burmester (2002). "Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins." J Comp Physiol [B] **172**(2): 95-107.

Burmester und Hankeln (2007). "The respiratory proteins of insects." J Insect Physiol **53**(4): 285-94.

Burmester, Massey, Zakharkin und Benes (1998). "The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects." J Mol Evol **47**(1): 93-108.

Burmester und Scheller (1996). "Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor." J Mol Evol **42**(6): 713-28.

Chayen und Saridakis (2008). "Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal." Nat Methods **5**(2): 147-53.

Chen, Chen, Leu, Tsai und Lee (1993). "Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase." J Biol Chem **268**(25): 18710-6.

- Chen, Leu, Wang und Lee (1992). "Copper transfer and activation of the Streptomyces apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1." J Biol Chem **267**(28): 20100-7.
- Chen und Solomon (2004). "O₂ activation by binuclear Cu sites: noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13105-10.
- Chiu, Baker, Jiang, Dougherty und Schmid (2005). "Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution." Structure **13**(3): 363-72.
- Chothia und Lesk (1986). "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins." Embo J **5**(4): 823-6.
- Claessens, Van Cutsem, Lasters und Wodak (1989). "Modelling the polypeptide backbone with 'spare parts' from known protein structures." Protein Eng **2**(5): 335-45.
- Claus (2003). "Laccases and their occurrence in prokaryotes." Arch Microbiol **179**(3): 145-50.
- Claus und Decker (2006). "Bacterial tyrosinases." Syst Appl Microbiol **29**(1): 3-14.
- Cohen, Gregoret, Presnell und Kuntz (1989). "Protein structure predictions: new theoretical approaches." Prog Clin Biol Res **289**: 75-85.
- Cuff, Miller, van Holde und Hendrickson (1998). "Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin." J Mol Biol **278**(4): 855-70.
- Cyrklaff, Linaroudis, Boicu, Chlanda, Baumeister, Griffiths und Krijnse-Locker (2007). "Whole cell cryo-electron tomography reveals distinct disassembly intermediates of vaccinia virus." PLoS ONE **2**(5): e420.
- Dauter und Dauter (2007). "Phase determination using halide ions." Methods Mol Biol **364**: 149-58.
- De Rosier und Klug (1968). "Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs." Nature **217**(5124): 130-134.
- Decker (2005). Copper Proteins with Dinuclear Active Sites. Encyclopedia of Inorganic Chemistry 2nd Edition , Ed. R. Bruce King.
- Decker, Dillinger und Tuzek (2000). "How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology This work was supported by the Medicine and Science Center of the University of Mainz (H.D.) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (F.T., R.D.). The authors thank M.Moller for help with the graphical artwork." Angew Chem Int Ed Engl **39**(9): 1591-1595.
- Decker, Hartmann, Sterner, Schwarz und Pilz (1996). "Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin." FEBS Lett **393**(2-3): 226-30.
- Decker, Hellmann, Jaenicke, Lieb, Meissner und Markl (2007a). "Minireview: Recent progress in hemocyanin research." Integr. Comp. Biol.: icm063.
- Decker und Jaenicke (2004). "Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins." Dev Comp Immunol **28**(7-8): 673-87.
- Decker und Rimke (1998). "Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity." J Biol Chem **273**(40): 25889-92.

Decker, Ryan, Jaenicke und Terwilliger (2001). "SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*." J Biol Chem **276**(21): 17796-9.

Decker, Schweikardt, Nillius, Salzbrunn, Jaenicke und Tuczec (2007b). "Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases." Gene **398**(1-2): 183-91.

Decker, Schweikardt und Tuczec (2006). "The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?" Angew Chem Int Ed Engl **45**(28): 4546-50.

Decker und Sterner (1990). "Nested allostery of arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*). The role of protons." J Mol Biol **211**(1): 281-93.

Decker und Terwilliger (2000). "Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins." J Exp Biol **203**(Pt 12): 1777-82.

Decker und Tuczec (2000). "Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism." Trends Biochem Sci **25**(8): 392-7.

Douglas und Rao (1983). Fast Transforms: Algorithms, Analyses, Applications, Academic Press, Inc.

Drexel, Siegmund, Schneider, Linzen, Gielens, Preaux, Lontie, Kellermann und Lottspeich (1987). "Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*)." Biol Chem Hoppe Seyler **368**(6): 617-35.

Duan und Kollman (1998). "Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution." Science **282**(5389): 740-4.

Durrant, Ratcliffe, Hipkin, Aspan und Soderhall (1993). "Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*." Biochem J **289** (Pt 1): 87-91.

Eicken, Krebs und Sacchettini (1999). "Catechol oxidase - structure and activity." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 677-83.

Elrad, Niyogi und Grossman (2002). "A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation." Plant Cell **14**(8): 1801-16.

Erker, Schoen, Basche und Decker (2004). "Fluorescence labels as sensors for oxygen binding of arthropod hemocyanins." Biochem Biophys Res Commun **324**(2): 893-900.

Espin und Wichers (1999). "Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform." J Agric Food Chem **47**(9): 3518-25.

Fiaux, Bertelsen, Horwich und Wuthrich (2002). "NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex." Nature **418**(6894): 207-11.

Fiser und Sali (2003). "Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models." Methods Enzymol **374**: 461-91.

Fotin, Cheng, Sliz, Grigorieff, Harrison, Kirchhausen und Walz (2004). "Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy." Nature **432**(7017): 573-9.

Francis, Wang, Parag, Halaban und Hebert (2003). "Tyrosinase maturation and oligomerization in the endoplasmic reticulum require a melanocyte-specific factor." J Biol Chem **278**(28): 25607-17.

Frank (2006). Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, Oxford University Press.

Frank und Radermacher (1992). "Three-dimensional reconstruction of single particles negatively stained or in vitreous ice." Ultramicroscopy **46**(1-4): 241-62.

Furumura, Solano, Matsunaga, Sakai, Spritz und Hearing (1998). "Metal ligand-binding specificities of the tyrosinase-related proteins." Biochem Biophys Res Commun **242**(3): 579-85.

Garcia-Borron und Solano (2002). "Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center." Pigment Cell Res **15**(3): 162-73.

Gatsogiannis, Moeller, Depoix, Meissner und Markl (2007). "Nautilus pompilius hemocyanin: 9 A cryo-EM structure and molecular model reveal the subunit pathway and the interfaces between the 70 functional units." J Mol Biol **374**(2): 465-86.

Gentschev, Krebs und Möller (2000). "New functional models for catechol oxidases." Inorganica Chimica Acta **300-302**: 442-452.

Gerdemann, Eicken, Galla und Krebs (2002). "Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure." J Inorg Biochem **89**(1-2): 155-8.

Goldschmidt, Cooper, Derewenda und Eisenberg (2007). "Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants." Protein Sci **16**(8): 1569-76.

Guell und Siegbahn (2007). "Theoretical study of the catalytic mechanism of catechol oxidase." J Biol Inorg Chem **12**(8): 1251-64.

Hagner-Holler, Pick, Girgenrath, Marden und Burmester (2007). "Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins." Insect Biochem Mol Biol **37**(10): 1064-74.

Hagner-Holler, Schoen, Erker, Marden, Rupprecht, Decker und Burmester (2004). "A respiratory hemocyanin from an insect." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 871-4.

Halaban, Cheng, Svedine, Aron und Hebert (2001). "Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine." J Biol Chem **276**(15): 11933-8.

Halaban und Moellmann (1990). "Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4809-13.

Halaouli, Asther, Sigoillot, Hamdi und Lomascolo (2006). "Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications." J Appl Microbiol **100**(2): 219-32.

Harris (1997). Negative Staining and Cryoelectron Microscopy: The Thin Film Techniques. Oxford, Bios Scientific Publishers Ltd.

Harris, Meissner, Gebauer und Markl (2004). "3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*." Micron **35**(1-2): 23-6.

Hartmann und Decker (2002). "All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4 x 6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation." Biochim Biophys Acta **1601**(2): 132-7.

Hartmann, Muller und Decker (2004). "Modeling techniques for analysing conformational transitions in hemocyanins by small-angle scattering of X-rays and neutrons." Micron **35**(1-2): 11-3.

Havel (1993). "Predicting the structure of the flavodoxin from *E.coli* by homology modeling, distance geometry and molecular dynamics." Molec. Simul. **10**: 175-210

Hazes, Magnus, Bonaventura, Bonaventura, Dauter, Kalk und Hol (1993). "Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation." Protein Sci **2**(4): 597-619.

Hazes, Magnus, Kalk, Bonaventura und Hol (1996). "Nitrate binding to *Limulus polyphemus* subunit type II hemocyanin and its functional implications." J Mol Biol **262**(4): 532-41.

Hearing (1999). "Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization." J Investig Dermatol Symp Proc **4**(1): 24-8.

Hearing, Tsukamoto, Urabe, Kameyama, Montague und Jackson (1992). "Functional properties of cloned melanogenic proteins." Pigment Cell Res **5**(5 Pt 2): 264-70.

Henderson (1995). "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules." Q Rev Biophys **28**(2): 171-93.

Hernandez-Romero, Sanchez-Amat und Solano (2006). "A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio." Febs J **273**(2): 257-70.

Himmelwright, Eickman, LuBien, Solomon und Lerch (1980). "Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins" J Am Chem Soc **102**(24): 7339-7344.

Hiraki, Kato, Nagai, Satoh, Hirano, Ihara, Kudo, Nagae, Kobayashi, Inoue, Uejima, Oda, Chavas, Akutsu, Yamada, Kawasaki, Matsugaki, Igarashi, Suzuki und Wakatsuki (2006). "Development of an automated large-scale protein-crystallization and monitoring system for high-throughput protein-structure analyses." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 9): 1058-65.

Hoashi, Watabe, Muller, Yamaguchi, Vieira und Hearing (2005). "MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes." J Biol Chem **280**(14): 14006-16.

Holm und Sander (1991). "Database algorithm for generating protein backbone and side-chain co-ordinates from a C alpha trace application to model building and detection of coordinate errors." J Mol Biol **218**(1): 183-94.

Hoof, Vriend, Sander und Abola (1996). "Errors in protein structures." Nature **381**(6580): 272.

Hornak (2006). The Basics of NMR. <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>, Rochester Institute of Technology.

- Horton, Ruban und Walters (1996). "Regulation of Light Harvesting in Green Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 655-684.
- Huber und Lerch (1988). "Identification of two histidines as copper ligands in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase." Biochemistry **27**(15): 5610-5.
- Itoh, Kumei, Taki, Nagatomo, Kitagawa und Fukuzumi (2001). "Oxygenation of Phenols to Catechols by A (μ -eta²-eta²-Peroxo)dycopper(II) Complex: Mechanistic Insight into the Phenolase Activity of Tyrosinase." J. Am. Chem. Soc. **123**(27): 6708-6709.
- Iwanaga und Kawabata (1998). "Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab." Front Biosci **3**: D973-84.
- Jackman, Hajnal und Lerch (1991). "Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase." Biochem J **274** (Pt 3): 707-13.
- Jacobson, Tyeklar, Farooq, Karlin, Liu und Zubieta (1988). "A copper-oxygen (Cu₂-O₂) complex. Crystal structure and characterization of a reversible dioxygen binding system." J. Am. Chem. Soc. **110**(11): 3690-3692.
- Jaenicke und Decker (2003). "Tyrosinases from crustaceans form hexamers." Biochem J **371**(Pt 2): 515-23.
- Jaenicke und Decker (2004). "Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution." Chembiochem **5**(2): 163-9.
- Jang, Kim, Shin und Pak (2003). "Ab initio folding of helix bundle proteins using molecular dynamics simulations." J Am Chem Soc **125**(48): 14841-6.
- Jansson und Gustafsson (1990). "Type I and type II genes for the chlorophyll a/b-binding protein in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis." Plant Mol Biol **14**(3): 287-96.
- Jansson und Gustafsson (1991). "Evolutionary conservation of the chlorophyll a/b-binding proteins: cDNAs encoding type I, II and III LHC I polypeptides from the gymnosperm Scots pine." Mol Gen Genet **229**(1): 67-76.
- Jara, Solano und Lozano (1988). "Assays for mammalian tyrosinase: a comparative study." Pigment Cell Res **1**(5): 332-9.
- Jeanmougin, Thompson, Gouy, Higgins und Gibson (1998). "Multiple sequence alignment with Clustal X." Trends Biochem Sci **23**(10): 403-5.
- Jeschke, Bender, Schweikardt, Panek, Decker und Paulsen (2005). "Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll a/b protein by EPR measurements." J Biol Chem **280**(19): 18623-30.
- Jiang und Ludtke (2005). "Electron cryomicroscopy of single particles at subnanometer resolution." Curr Opin Struct Biol **15**(5): 571-7.
- Jiang, Wang, Yu und Kanost (2003). "Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains." J Biol Chem **278**(6): 3552-61.
- Jimenez-Cervantes, Garcia-Borron, Valverde, Solano und Lozano (1993). "Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes. 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma." Eur J Biochem **217**(2): 549-56.

Jimenez-Cervantes, Solano, Kobayashi, Urabe, Hearing, Lozano und Garcia-Borrón (1994). "A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1)." J Biol Chem **269**(27): 17993-8000.

Jimenez, Tsukamoto und Hearing (1991). "Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes." J Biol Chem **266**(2): 1147-56.

John und Sali (2003). "Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment." Nucleic Acids Res **31**(14): 3982-92.

Jolley, Evans, Makino und Mason (1974). "Oxytyrosinase." J Biol Chem **249**(2): 335-45.

Jones und Thirup (1986). "Using known substructures in protein model building and crystallography." Embo J **5**(4): 819-22.

Kalugin (2001). "A new phasing method based on the principle of minimum charge." Acta Crystallogr A **57**(Pt 6): 690-9.

Karlin-Neumann, Kohorn, Thornber und Tobin (1985). "A chlorophyll a/b-protein encoded by a gene containing an intron with characteristics of a transposable element." J Mol Appl Genet **3**(1): 45-61.

Karlin (1993). "Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models." Science **261**(5122): 701-8.

Karlin, Cohen, Jacobson und Zubieta (1987). "Dioxygen-copper reactivity: hydroxylation-induced methyl migration in a copper monooxygenase model system." J. Am. Chem. Soc. **109**(20): 6194-6196.

Karlin, Cruse, Gultneh, Hayes und Zubieta (1984a). "Peroxide coordination to a dicopper(II) center. Dioxygen binding to a structurally characterized phenoxide-bridged binuclear copper(I) complex." J. Am. Chem. Soc. **106**(11): 3372-3374.

Karlin, Gultneh, Hutchinson und Zubieta (1982). "Three-coordinate binuclear copper(I) complex: model compound for the copper sites in deoxyhemocyanin and deoxytyrosinase." J. Am. Chem. Soc. **104**(19): 5240-5242.

Karlin, Hayes, Gultneh, Cruse, McKown, Hutchinson und Zubieta (1984b). "Copper-mediated hydroxylation of an arene: model system for the action of copper monooxygenases. Structures of a binuclear copper(I) complex and its oxygenated product." J. Am. Chem. Soc. **106**(7): 2121-2128.

Karlin, Nasir, Cohen, Cruse, Kaderli und Zuberbuehler (1994). "Reversible Dioxygen Binding and Aromatic Hydroxylation in O₂-Reactions with Substituted Xylyl Dinuclear Copper(I) Complexes: Syntheses and Low-Temperature Kinetic/Thermodynamic and Spectroscopic Investigations of a Copper Monooxygenase Model System." J. Am. Chem. Soc. **116**(4): 1324-1336.

Kitajima, Fujisawa, Fujimoto, Morooka, Hashimoto, Kitagawa, Toriumi, Tatsumi und Nakamura (1992). "A new model for dioxygen binding in hemocyanin. Synthesis, characterization, and molecular structure of the μ - η^2 : η^2 peroxo dinuclear copper(II) complexes, [Cu(HB(3,5-R₂pz)₃]₂(O₂) (R = isopropyl and Ph)." J. Am. Chem. Soc. **114**(4): 1277-1291.

Kitajima und Moro-oka (1994). "Copper-Dioxygen Complexes. Inorganic and Bioinorganic Perspectives" Chem Rev **94**(3): 737-757.

- Klabunde, Eicken, Sacchettini und Krebs (1998). "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." Nat Struct Biol **5**(12): 1084-90.
- Kobayashi, Imokawa, Bennett und Hearing (1998). "Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein)." J Biol Chem **273**(48): 31801-5.
- Kobayashi, Urabe, Orlow, Higashi, Imokawa, Kwon, Potterf und Hearing (1994a). "The Pmel 17/silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function." J Biol Chem **269**(46): 29198-205.
- Kobayashi, Urabe, Winder, Jimenez-Cervantes, Imokawa, Brewington, Solano, Garcia-Borron und Hearing (1994b). "Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis." Embo J **13**(24): 5818-25.
- Kong, Park, Hong und Cho (2000). "Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **125**(4): 563-9.
- Koolman und Röhm (1998). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, Thieme.
- Kühlbrandt und Wang (1991). "Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography." Nature **350**(6314): 130-4.
- Kühlbrandt, Wang und Fujiyoshi (1994). "Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography." Nature **367**(6464): 614-21.
- Kurner, Frangakis und Baumeister (2005). "Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of Spiroplasma melliferum." Science **307**(5708): 436-8.
- Kwon, Chintamaneni, Kozak, Copeland, Gilbert, Jenkins, Barton, Francke, Kobayashi und Kim (1991). "A melanocyte-specific gene, Pmel 17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9228-32.
- Kwon, Kim, Halaban und Pickard (1994). "Characterization of mouse Pmel 17 gene and silver locus." Pigment Cell Res **7**(6): 394-7.
- Land, Ramsden und Riley (2003). "Tyrosinase autoactivation and the chemistry of ortho-quinone amines." Acc Chem Res **36**(5): 300-8.
- Laskowski, MacArthur, Moss und Thornton (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." J. Appl. Cryst. **26**: 283-291.
- Laskowski, Rullmann, MacArthur, Kaptein und Thornton (1996). "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR." J Biomol NMR **8**(4): 477-86.
- Lee, Lee und Soderhall (2004). "Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase." Biochem Biophys Res Commun **322**(2): 490-6.
- Lee und Soderhall (2002). "Early events in crustacean innate immunity." Fish Shellfish Immunol **12**(5): 421-37.
- Leu, Chen, Liaw und Lee (1992). "Secretion of the Streptomyces tyrosinase is mediated through its trans-activator protein, MelC1." J Biol Chem **267**(28): 20108-13.

Levitt (1992). "Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching." J Mol Biol **226**(2): 507-33.

Liaw und Lee (1995). "Histidine residues 102 and 117 of MelC1 play different roles in the chaperone function for *Streptomyces* apotyrosinase." Biochem Biophys Res Commun **214**(2): 447-53.

Lieb, Altenhein, Markl, Vincent, van Olden, van Holde und Miller (2001). "Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4546-51.

Lieb, Erteld, Poli, Palumbo und Markl (2000). "The sequence of sepiia tyrosinase." [qj|32452643|embl|CAC82191.1|\[32452643\]](#).

Linzen, Soeter, Riggs, Schneider, Schartau, Moore, Yokota, Behrens, Nakashima, Takagi und et al. (1985). "The structure of arthropod hemocyanins." Science **229**(4713): 519-24.

Liu, Yan, Wang, Kuang, Zhang, Gui, An und Chang (2004). "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution." Nature **428**(6980): 287-92.

Liwo, Khalili und Scheraga (2005). "Ab initio simulations of protein-folding pathways by molecular dynamics with the united-residue model of polypeptide chains." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2362-7.

Ludtke, Baldwin und Chiu (1999). "EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions." J Struct Biol **128**(1): 82-97.

Lunde, Jensen, Haldrup, Knoetzel und Scheller (2000). "The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis." Nature **408**(6812): 613-5.

MacKerell, Bashford, Bellott, Dunbrack, Evanseck, Field, Fischer, Gao, Guo, Ha, Joseph-McCarthy, Kuchnir, Kuczera, Lau, Mattos, Michnick, Ngo, Nguyen, Prodromou, Reiher, Roux, Schlenkrich, Smith, Stote, Straub, Watanabe, Wiorkiewicz-Kuczera, Yin und Karplus (1998). "All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins." J. Phys. Chem. B **102**(18): 3586-3616.

Magnus, Hazes, Ton-That, Bonaventura, Bonaventura und Hol (1994). "Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences." Proteins **19**(4): 302-9.

Markl und Decker (1992). "Molecular Structure of the Arthropod Hemocyanins." Advances in Comparative and Environmental Physiology **13**.

Markl, Lieb, Gebauer, Altenhein, Meissner und Harris (2001). "Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and htH." J Cancer Res Clin Oncol **127 Suppl 2**: R3-9.

Markl, Savel, Decker und Linzen (1980). "Hemocyanins in spiders, IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(5): 649-60.

Marshall (1974). "The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins." Biochem Soc Symp(40): 17-26.

Marti-Renom, Madhusudhan und Sali (2004). "Alignment of protein sequences by their profiles." Protein Sci **13**(4): 1071-87.

- Marti-Renom, Stuart, Fiser, Sanchez, Melo und Sali (2000). "Comparative protein structure modeling of genes and genomes." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 291-325.
- Martin (2006). 10 Å cryo-EM structure of *Drosophila melanogaster* hexamerin and *Limulus polyphemus* hemocyanin. Zoologie, Universität Mainz.
- Matoba, Kumagai, Yamamoto, Yoshitsu und Sugiyama (2006). "Crystallographic evidence that dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis." J Biol Chem.
- McPherson, Nguyen, Larson, Day und Cudney (2007). "Development of an alternative approach to protein crystallization." J Struct Funct Genomics **8**(4): 193-8.
- Meissner (2003). Molekül-Animation des Hämocyanins HtH1, Homepage Abt. Zoologie, Universität Mainz. http://www.uni-mainz.de/FB/Biologie/Zoologie/abt2/files/protem_1.htm.
- Meissner, Dube, Harris, Stark und Markl (2000). "Structure of a molluscan hemocyanin didecamer (HtH1 from *Haliothis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy." J Mol Biol **298**(1): 21-34.
- Melo, Sanchez und Sali (2002). "Statistical potentials for fold assessment." Protein Sci **11**(2): 430-48.
- Metz und Solomon (2001). "Dioxygen binding to deoxyhemocyanin: electronic structure and mechanism of the spin-forbidden two-electron reduction of $o(2)$." J Am Chem Soc **123**(21): 4938-50.
- Morris, MacArthur, Hutchinson und Thornton (1992). "Stereochemical quality of protein structure coordinates." Proteins **12**: 345-364.
- Nagai und Kawabata (2000). "A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense." J Biol Chem **275**(38): 29264-7.
- Nagai, Osaki und Kawabata (2001). "Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides." J Biol Chem **276**(29): 27166-70.
- Nagai, Yano, Morimoto und Miyamoto (2007). "Tyrosinase localization in mollusc shells." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **146**(2): 207-14.
- Nakamura, Nakajima, Ohba, Yamauchi, Lee und Ichishima (2000). "Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis." Biochem J **350 Pt 2**: 537-45.
- Nellaiappan und Sugumaran (1996). "On the presence of phenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*." Comp Biochem Physiol **113B**: 163-168.
- Nicastro, Frangakis, Typke und Baumeister (2000). "Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria." J Struct Biol **129**(1): 48-56.
- Nicholas, Nicholas und Deerfield (1997). "GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation." EMBNEW.NEWS **4**: 14.
- Nillius, Jaenicke und Decker (2008). "Switch between tyrosinase and catecholoxidase activity of scorpion hemocyanin by allosteric effectors." FEBS Lett **582**(5): 749-54.
- Nilsson, Stys, Drakenberg, Spangfort, Forsen und Allen (1997). "Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II." J Biol Chem **272**(29): 18350-7.

Oetting (2000). "The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation." Pigment Cell Res **13**(5): 320-5.

Oetting, Brilliant und King (1996). "The clinical spectrum of albinism in humans." Mol Med Today **2**(8): 330-5.

Oetting, Fryer, Oofuji, Middendorf, Brumbaugh, Summers und King (1994). "Analysis of tyrosinase gene mutations using direct automated infrared fluorescence DNA sequencing of amplified exons." Electrophoresis **15**(2): 159-64.

Oetting, Fryer, Shriram und King (2003). "Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years." Pigment Cell Res **16**(3): 307-11.

Oetting und King (1993). "Molecular basis of type I (tyrosinase-related) oculocutaneous albinism: mutations and polymorphisms of the human tyrosinase gene." Hum Mutat **2**(1): 1-6.

Olivares, Jimenez-Cervantes, Lozano, Solano und Garcia-Borron (2001). "The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase." Biochem J **354**(Pt 1): 131-9.

Orlow, Zhou, Chakraborty, Drucker, Pifko-Hirst und Pawelek (1994). "High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex." J Invest Dermatol **103**(2): 196-201.

Pate, Ross, Thamann, Reed, Karlin, Sorrell und Solomon (1989). "Spectroscopic studies of the charge transfer and vibrational features of binuclear copper(II) azide complexes: comparison to the coupled binuclear copper active site in met azide hemocyanin and tyrosinase." J. Am. Chem. Soc. **111**(14): 5198-5209.

Pauling (1960). The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals. Ithaca, New York, Cornell University Press.

Penczek (2005). "Resolution Measures in Single Particle Analysis." http://ncmi.bcm.edu/ncmi/events/workshops/workshops_7/proceeding/Wrks_EMAN_Resolution_05.pdf.

Penczek, Radermacher und Frank (1992). "Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice." Ultramicroscopy **40**(1): 33-53.

Perbandt, Guthohrlein, Rypniewski, Idakieva, Stoeva, Voelter, Genov und Betzel (2003). "The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity." Biochemistry **42**(21): 6341-6.

Pichersky und Jansson (1996). The Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Bindung Polypeptides and Their Genes in Angiosperm and Gymnosperm Species. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. D. R. Ort and C. F. Yocum, Kluwer Academic: 507-521.

Pidcock, Obias, Zhang, Karlin und Solomon (1998). "Investigation of the Reactive Oxygen Intermediate in an Arene Hydroxylation Reaction Performed by Xylyl-Bridged Binuclear Copper Complexes" J Am Chem Soc **120**(31): 7841-7847.

Pieper, Eswar, Braberg, Madhusudhan, Davis, Stuart, Mirkovic, Rossi, Marti-Renom, Fiser, Webb, Greenblatt, Huang, Ferrin und Sali (2004). "MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources." Nucleic Acids Res **32 Database issue**: D217-22.

- Piquemal, Maddaluno, Silvi und Giessner-Prettre (2003). "Theoretical study of phenol and 2-aminophenol docking at a model of the tyrosinase active site." New J. Chem. **27**: 909-913.
- Prota, Hu, Vincensi, McCormick und Napolitano (1998). "Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors." Exp Eye Res **67**(3): 293-9.
- Pusey, Liu, Tempel, Praissman, Lin, Wang, Gavira und Ng (2005). "Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography." Prog Biophys Mol Biol **88**(3): 359-86.
- Riley (1997). "Melanin." Int J Biochem Cell Biol **29**(11): 1235-9.
- Riley (2000). "Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates." J Theor Biol **203**(1): 1-12.
- Robert, Decker, Richey, Gill und Wyman (1987). "Nesting: Hierarchies of Allosteric Interactions." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(7): 1891-1895.
- Rost, Yachdav und Liu (2004). "The PredictProtein server." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W321-6.
- Saibil (2000). "Macromolecular structure determination by cryo-electron microscopy." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 10): 1215-22.
- Sali (1995a). "Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints." Mol Med Today **1**(6): 270-7.
- Sali (1995b). "Modeling mutations and homologous proteins." Curr Opin Biotechnol **6**(4): 437-51.
- Sali und Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
- Sali und Kuriyan (1999). "Challenges at the frontiers of structural biology." Trends Cell Biol **9**(12): M20-4.
- Salzbrunn (2007). Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus*. Molekulare Biophysik, Universität Mainz.
- Sanchez-Ferrer, Rodriguez-Lopez, Garcia-Canovas und Garcia-Carmona (1995). "Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism." Biochim Biophys Acta **1247**(1): 1-11.
- Sanchez und Sali (1997). "Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3." Proteins Suppl **1**: 50-8.
- Sanchez und Sali (1998). "Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13597-602.
- Sanchez und Sali (2000). "Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller." Methods Mol Biol **143**: 97-129.
- Sánchez und Sali (1997). "Comparative protein structure modeling as an optimization problem." Journal of Molecular Structure (Theochem) **398**: 489-496.
- Sarangarajan und Boissy (2001). "Typr1 and oculocutaneous albinism type 3." Pigment Cell Res **14**(6): 437-44.

Savel-Niemann, Markl und Linzen (1988). "Hemocyanins in spiders. XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Co-operativity and Bohr effect in dissociation intermediates." J Mol Biol **204**(2): 385-95.

Scheraga, Khalili und Liwo (2007). "Protein-folding dynamics: overview of molecular simulation techniques." Annu Rev Phys Chem **58**: 57-83.

Schmid, Cammarata, Bruns und Schmidt (1997). "In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCl-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7667-72.

Schweikardt, Olivares, Solano, Jaenicke, Garcia-Borron und Decker (2007). "A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations." Pigment Cell Res **20**(5): 394-401.

Setaluri (2003). "The melanosome: dark pigment granule shines bright light on vesicle biogenesis and more." J Invest Dermatol **121**(4): 650-60.

Shen und Sali (2006). "Statistical potential for assessment and prediction of protein structures." Protein Sci **15**(11): 2507-24.

Siegbahn (2004). "The catalytic cycle of catechol oxidase." J Biol Inorg Chem **9**(5): 577-90.

Sippl (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Proteins **17**(4): 355-62.

Soderhall und Cerenius (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity." Curr Opin Immunol **10**(1): 23-8.

Soderhall, Hall, Unestam und Nyhlen (1979). "Attachment of phenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity." J Invert. Pathology **34**: 285-294.

Solano, Martinez-Liarte, Jimenez-Cervantes, Garcia-Borron und Lozano (1994). "Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme." Biochem Biophys Res Commun **204**(3): 1243-50.

Solomon, Chen, Metz, Lee und Palmer (2001a). "Kupferproteine: Koordination und Aktivierung von Sauerstoff und seine Reduktion zu Wasser." Angewandte Chemie **113**(24): 4702-4724.

Solomon, Chen, Metz, Lee und Palmer (2001b). "Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins." Angew Chem Int Ed Engl **40**(24): 4570-4590.

Solomon, Sundaram und Machonkin (1996). "Multicopper Oxidases and Oxygenases." Chem Rev **96**(7): 2563-2606.

Solomon, Tuczec, Brown und Root (1994). "Spectroscopy of Binuclear Dioxygen Complexes." Chem Rev **94**: 827-856.

Spritz (1993). "Molecular genetics of oculocutaneous albinism." Semin Dermatol **12**(3): 167-72.

Spritz, Ho, Furumura und Hearing (1997a). "Mutational analysis of copper binding by human tyrosinase." J Invest Dermatol **109**(2): 207-12.

Spritz, Oh, Fukai, Holmes, Ho, Chitayat, France, Musarella, Orlow, Schnur, Weleber und Levin (1997b). "Novel mutations of the tyrosinase (TYR) gene in type I oculocutaneous albinism (OCA1)." Hum Mutat **10**(2): 171-4.

Srinivasan und Blundell (1993). "An evaluation of the performance of an automated procedure for comparative modelling of protein tertiary structure." Protein Eng **6**(5): 501-12.

Standfuss, Terwisscha van Scheltinga, Lamborghini und Kühlbrandt (2005). "Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution." Embo J **24**(5): 919-28.

Stark (2003). EM-Rekonstruktion des Hämocyanins HtH1, Homepage von Holger Stark, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen. http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/stark/Movies/VRML/hth1_12A_dimer.wrl.

Steven und Aebi (2003). "The next ice age: cryo-electron tomography of intact cells." Trends Cell Biol **13**(3): 107-10.

Stoffler, Feja, Fahrenkrog, Walz, Typke und Aebi (2003). "Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport." J Mol Biol **328**(1): 119-30.

Strub, Hoh, Sanchez, Strub, Bock, Aumelas und Dumas (2003). "Selenomethionine and selenocysteine double labeling strategy for crystallographic phasing." Structure **11**(11): 1359-67.

Sullivan (1896). "The tall office building artistically considered." Lippincott's Magazine.

Sutcliffe, Haneef, Carney und Blundell (1987a). "Knowledge based modelling of homologous proteins, Part I: Three-dimensional frameworks derived from the simultaneous superposition of multiple structures." Protein Eng **1**(5): 377-84.

Sutcliffe, Hayes und Blundell (1987b). "Knowledge based modelling of homologous proteins, Part II: Rules for the conformations of substituted sidechains." Protein Eng **1**(5): 385-92.

Tadokoro, Yamaguchi, Batzer, Coelho, Zmudzka, Miller, Wolber, Beer und Hearing (2005). "Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation." J Invest Dermatol **124**(6): 1326-32.

Telfer und Kunkel (1991). "The function and evolution of insect storage hexamers." Annu Rev Entomol **36**: 205-28.

Tepper, Bubacco und Canters (2002). "Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by halide ions." J Biol Chem **277**(34): 30436-44.

Tepper, Bubacco und Canters (2005). "Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue p-nitrophenol studied by NMR." J Am Chem Soc **127**(2): 567-75.

Terwilliger (2001). "Map-likelihood phasing." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **57**(Pt 12): 1763-75.

Terwilliger, Dangott und Ryan (1999). "Cryptocyanin, a crustacean molting protein: evolutionary link with arthropod hemocyanins and insect hexamerins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2013-8.

Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin und Higgins (1997). "The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-82.

Tolman (1997). "Making and Breaking the Dioxygen O-O Bond: New Insights from Studies of Synthetic Copper Complexes." Acc. Chem. Res. **30**(6): 227-237.

Topf, Baker, John, Chiu und Sali (2005). "Structural characterization of components of protein assemblies by comparative modeling and electron cryo-microscopy." J Struct Biol **149**(2): 191-203.

Torelli, Belle, Hamman, Pierre und Saint-Aman (2002). "Substrate binding in catechol oxidase activity: biomimetic approach." Inorg Chem **41**(15): 3983-9.

Tripathi, Hearing, Urabe, Aroca und Spritz (1992). "Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase." J Biol Chem **267**(33): 23707-12.

Tsai und Lee (1998). "Roles of copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces tyrosinase*." J Biol Chem **273**(30): 19243-50.

Unger, Harel, Wherland und Sussman (1989). "A 3D building blocks approach to analyzing and predicting structure of proteins." Proteins: Structure, Function, and Genetics **5**(4): 355-373.

Uson und Sheldrick (1999). "Advances in direct methods for protein crystallography." Curr Opin Struct Biol **9**(5): 643-8.

van Gelder, Flurkey und Wichers (1997). "Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases." Phytochemistry **45**(7): 1309-23.

van Heel (1987a). "Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction." Ultramicroscopy **21**(2): 111-23.

van Heel (1987b). "Similarity measures between images " Ultramicroscopy **21**(1): 95-100.

van Heel und Dube (1994). "Quaternary Structure of Multihexameric Arthropod Hemocyanins." Micron **25**(4): 387-418.

van Heel, Gowen, Matadeen, Orlova, Finn, Pape, Cohen, Stark, Schmidt, Schatz und Patwardhan (2000). "Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution." Q Rev Biophys **33**(4): 307-69.

van Heel und Schatz (2005). "Fourier shell correlation threshold criteria." J Struct Biol **151**(3): 250-62.

van Holde und Miller (1995). "Hemocyanins." Adv Protein Chem **47**: 1-81.

van Holde, Miller und Decker (2001). "Hemocyanins and invertebrate evolution." J Biol Chem **276**(19): 15563-6.

Vink, Zer, Alumot, Gaathon, Niyogi, Herrmann, Andersson und Ohad (2004). "Light-modulated exposure of the light-harvesting complex II (LHCII) to protein kinase(s) and state transition in *Chlamydomonas reinhardtii* xanthophyll mutants." Biochemistry **43**(24): 7824-33.

Voit, Feldmaier-Fuchs, Schweikardt, Decker und Burmester (2000). "Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits." J Biol Chem **275**(50): 39339-44.

-
- Volbeda und Hol (1989). "Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution." J Mol Biol **209**(2): 249-79.
- Vriend (1990). "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program." J Mol Graph **8**(1): 52-6, 29.
- Wang und Hebert (2006). "Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life." Pigment Cell Res **19**(1): 3-18.
- Watabe, Valencia, Yasumoto, Kushimoto, Ando, Muller, Vieira, Mizoguchi, Appella und Hearing (2004). "Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity." J Biol Chem **279**(9): 7971-81.
- Wilson und Doniach (1989). "A computer model to dynamically simulate protein folding: studies with crambin." Proteins **6**(2): 193-209.
- Xu und Hauptman (2004). "Statistical approach to the phase problem." Acta Crystallogr A **60**(Pt 2): 153-7.
- Yadav, Gerdt, Sanishvili, Smith, Roach, Ismagilov, Kuhn und Stevens (2005). "In situ data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization." J Appl Crystallogr **38**(6): 900-905.
- Yamada, Tamada, Kosaka, Miyata, Fujiki, Tano, Moriya, Yamanishi, Honjo, Tada, Ino, Yamaguchi, Futami, Seno, Nomoto, Hirata, Yoshimura und Kuroki (2007). "'Crystal lattice engineering,' an approach to engineer protein crystal contacts by creating intermolecular symmetry: crystallization and structure determination of a mutant human RNase 1 with a hydrophobic interface of leucines." Protein Sci **16**(7): 1389-97.
- Yamashita, Wesson, Eisenman und Eisenberg (1990). "Where metal ions bind in proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5648-52.
- Young und Frank (1996). "Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence." J Photochem Photobiol B **36**(1): 3-15.
- Zer, Vink, Keren, Dilly-Hartwig, Paulsen, Herrmann, Andersson und Ohad (1999). "Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8277-82.
- Zer, Vink, Shochat, Herrmann, Andersson und Ohad (2003). "Light affects the accessibility of the thylakoid light harvesting complex II (LHCII) phosphorylation site to the membrane protein kinase(s)." Biochemistry **42**(3): 728-38.

10. Anhang

10.1. Abkürzungen

Å	Ångström, 1 Å = 0,1 Nanometer = 10^{-10} m
Abs	Absorption
Apo-	Präfix für „Protein ohne Kofaktor“
CCD	Sensor für elektromagnetische Strahlung (Charge-Coupled Device)
CCF	Cross-Correlation-Function
Chl	Chlorophyll
CO	Catecholoxidase
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CTF	Kontrast-Transferfunktion
CuA	N-terminales Kupferzentrum
CuB	C-terminales Kupferzentrum
Da	Dalton, 1 Da = 1 / 12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops ^{12}C
Dct	Dopachromtautomerase
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EM	Elektronenmikroskop
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR / EPR	Elektronen-Spin-Resonanz (Electron Paramagnetic Resonance)
FEG	Feldemissionskanone (Field emission gun)
FSC	Fourier Shell Correlation
FT	Fouriertransformation
gi	GenInfo Identifier, eindeutige Identifikationsnummer für Gene
HAx	x-tes Histidin im CuA-Zentrum
HBx	x-tes Histidin im CuB-Zentrum
HC	Hämocyanin
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney)
Holo-	Präfix für „Protein inklusive Kofaktor“, z.B. Metallion
Indel	Insertion / Deletion
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LHC	Lichtsammlerkomplex (Light harvesting complex)
LSP	Larval Serum Protein (Larval serum protein)
MD	Molekulardynamik
MDa	Megadalton
mM	millimolar
MPI	Max-Planck-Institut
mTyr	Maus-Tyrosinase
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA

nm	Nanometer, 10^{-9} m
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
OCA	Oculo-cutaneous albinism, die Augen und Haut betreffender Albinismus
OF	Objective function
PDB	Protein-Datenbank
pdf	Probability density function = WDF, Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
PO	Phenoloxidase
PPO	Polyphenoloxidase
PS	Photosystem
Psa	Gene, die für Proteine des Photosystems I codieren
PTU	Phenylthioharnstoff
RCSB	Research Collaboration for Structural Biology
RMSD	Mittlere quadratische Abweichung (Root mean square deviation)
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (Small angle xray scattering)
SDS	Natriumdodecylsulfat, Detergenz
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
SS	Signalsequenz
sTyr	Bakterien-Tyrosinase
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TKR	Tyrosinkinase-Rezeptor
Tyr	Tyrosinase
TYRP	mit Tyrosinase assoziierte Proteine (Tyrosinase-related proteins)
VDW	van-der-Waals
WDF	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (Probability density function)

10.2. Artnamen

<i>Drosophila melanogaster</i>	Schwarzbäuchige Taufliege
<i>Eurypelma californicum</i>	Amerikanische Vogelspinne
<i>Homo sapiens</i>	Mensch
<i>Ipomoea batatas</i>	Süßkartoffel
<i>Limulus polyphemus</i>	Pfeilschwanzkrebs
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus
<i>Octopus dofleini</i>	Pazifischer Riesenkrake
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Signalkrebs
<i>Palinurus elephas</i>	Europäische Languste
<i>Pandinus imperator</i>	Kaiserskorpion
<i>Panulirus interruptus</i>	Kalifornische Languste
<i>Rapana thomasiana</i>	Schwarzmeerschnecke
<i>Spinacia oleracea</i>	Spinat

10.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der bekannten Gene in der Datenbank GenBank,	9
Abbildung 2: Anzahl der gelösten Proteinstrukturen in der Protein Datenbank PDB.....	9
Abbildung 3: Typisches Typ-3-Kupferzentrum im oxygenierten Zustand	15
Abbildung 4: Röntgenstrukturen des Hämocyanins von <i>Limulus polyphemus</i> , dem Pfeilschwanzkrebs.	18
Abbildung 5: Oxygenierungsabhängige, reversible Konformationsänderung des aktiven Zentrums von <i>Limulus polyphemus</i> Hämocyanin.....	18
Abbildung 6: Struktur des [Cu(HB(3,5- <i>i</i> -Pr ₂ pz) ₃) ₂ (O ₂)-Modellkomplexes im oxygenierten Zustand.....	19
Abbildung 7: Modellkomplex mit Side-on-Konformation des gebundenen Sauerstoffs.....	20
Abbildung 8: Reaktionsschemata der Tyrosinase- und Catecholoxidase-Aktivität.....	22
Abbildung 9: Bekannte Strukturen der Arthropoden-Hämocyanin- und Mollusken-Hämocyanin- Superfamilien ...	23
Abbildung 10: Domänenstruktur ausgewählter Typ-3-Kupferproteine.....	26
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Arthropoden-Hämocyanine.....	27
Abbildung 12: 20-meres Hämocyanin von <i>Haliothis tuberculata</i>	27
Abbildung 13: Struktur des monomeren LHCII aus <i>Spinacia oleracea</i> (Spinat)	29
Abbildung 14: Struktur des Lichtsammelkomplexes LHCII aus dem <i>Spinacia oleracea</i>	30
Abbildung 15: Struktur des Photosystems I mit dem Gürtel aus Lichtsammelkomplexen (LHCI).....	31
Abbildung 16: Prinzipielle Vorgehensweise von MODELLER.....	34
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Optimierung der Objective Function.....	37
Abbildung 18: Beispiel einer Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für den C _α -C _α -Abstand zweier Aminosäuren	39
Abbildung 19: Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Seitenkettenwinkel χ_1 , und angepasste WDF	40
Abbildung 20: Verwendungsmöglichkeiten für Modelle, die bei verschiedenen Sequenzidentitäten zur Vorlage modelliert wurden.....	44
Abbildung 21: Einbettung eines Proteins bei Negativkontrastierung und Vitrifizierung	45
Abbildung 22: Prinzip der Vitrifizierung für die Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
Abbildung 23: Flußdiagramm des Rekonstruktionsprozesses von EMAN	48
Abbildung 24: 3D-Rekonstruktion im Fourierraum	49
Abbildung 25: Sequenzalignment von <i>Streptomyces antibioticus</i> (Tyr-Sab) und <i>Streptomyces glaucescens</i> (Tyr-Sgl) Tyrosinase.....	69
Abbildung 26: Sequenzalignment der Kartoffel-Catecholoxidase und bakterieller Tyrosinase.	71
Abbildung 27: Homologiemodell der <i>Streptomyces antibioticus</i> Tyrosinase.....	72
Abbildung 28: Stabilisation des His344 im aktiven Zentrum des Langusten-Hämocyanins durch Asn345	73
Abbildung 29: Stabilisation des His240 im aktiven Zentrum der Kartoffel-Catecholoxidase durch Glu236	74
Abbildung 30: Farbcodierte Ansicht der <i>S. castaneoglobisporus</i> Tyrosinasen-Röntgenstruktur.....	75
Abbildung 31: Vergleich der Röntgenstrukturen der bakteriellen Tyrosinase, der Kartoffel-Catecholoxidase und dem Modell der bakteriellen Tyrosinase.	76
Abbildung 32: Zugänglichkeit des aktiven Zentrums in Tyrosinase und Catecholoxidase	76
Abbildung 33: Rolle von Glutamat und Asparagin im aktiven Zentrum von Holo- und Apo-Tyrosinase	77
Abbildung 34: Umgebung der aktiven Zentren von Hämocyaninen, Catecholoxidase und Tyrosinase	78

Abbildung 35: Überlagerung der aktiven Zentren von Hämocyaninen, Catecholoxidasen und Tyrosinase	79
Abbildung 36: Stereoansichten der aktiven Zentren von Tyrosinase, Hämocyanin und Catecholoxidase	81
Abbildung 37: Von Matoba vorgeschlagener katalytischer Mechanismus der bakteriellen Tyrosinase	82
Abbildung 38: Von Matoba vorgeschlagene Bindungsebene im aktiven Zentrum der Tyrosinase	84
Abbildung 39: Alternative Bindungsebene in der Tyrosinase mit His63 und His216 als axiale Liganden.....	85
Abbildung 40: Konformationen der Aminosäuren His54 und Ile42 im aktiven Zentrum der Apo-Tyrosinase	88
Abbildung 41: Kupferionen und flexible Aminosäuren in der bakteriellen Tyrosinase und im Caddieprotein	89
Abbildung 42: Vorschlag eines Mechanismus zum Einbau von Kupfer in die bakterielle Tyrosinase	91
Abbildung 43: Melaninsynthese durch Tyrosinase, Tyrp1 und Tyrp2/Dct	95
Abbildung 44: Reifung der Säugetier-Tyrosinase auf dem Weg vom ER zum Melanosom.....	97
Abbildung 45: Homologiemodell der Wildtyp-Maustyrosinase.....	99
Abbildung 46: Sequenzalignment der <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> Tyrosinase (sTyr) mit Maustyrosinase (mTyr).....	100
Abbildung 47: Sequenzalignment des CuB-Zentrums von Mitgliedern der Phenoloxidase-Familie	102
Abbildung 48: Sequenzalignment der CuA- und CuB-Kupferzentren von Maustyrosinase, mTYRP1, mTYRP2 (Dct), humaner Tyrosinase und bakterieller Tyrosinase	103
Abbildung 49: Glykosylierungsstellen in der humanen Tyrosinase	104
Abbildung 50: Aktives Zentrum und Glykosylierungssequon im Homologie-Modell der Wildtyp-Maustyrosinase	104
Abbildung 51: Biochemische Analyse der Wildtyp-Tyrosinase und den Tyrosinase-Mutanten	105
Abbildung 52: Topologie der Aminosäuren in den aktiven Zentren der untersuchten Proteine, innerste Schale, Distanz zum Kupfer maximal 4 Ångström.	107
Abbildung 53: Topologie der Aminosäuren in den aktiven Zentren der untersuchten Proteine, sekundäre Schale mit größerer Distanz zum Kupfer.	108
Abbildung 54: Homologie-Modell der Maustyrosinase	111
Abbildung 55: Rolle des Serin380 im Wildtyp der Maus-Tyrosinase, MD-Simulation.....	114
Abbildung 56: Ansicht des aktiven Zentrums der bakteriellen Tyrosinase, Blick von CuA in Richtung CuB.	114
Abbildung 57: Einfluß der Mutation V393F auf das aktive Zentrum der Maus-Tyrosinase	115
Abbildung 58: Ansichten der errechneten ersten Klassenmittel der <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase	118
Abbildung 59: Projektionen der endgültigen Rekonstruktion der Tyrosinase von <i>Palinurus elephas</i>	119
Abbildung 60: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase.....	119
Abbildung 61: Rekonstruktion der <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase bei einer Auflösung von 21 Å.....	120
Abbildung 62: Vergleich der Rekonstruktion von <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase mit der Röntgenstruktur des Hämocyanins von <i>Panulirus interruptus</i>	120
Abbildung 63: Ausschnittsvergrößerungen der Rekonstruktion aus den vorhergehenden Abbildungen	121
Abbildung 64: Symmetrieachsen in <i>Palinurus elephas</i> Tyrosinase.	121
Abbildung 65: Fourier Shell Correlation als Ergebnis des Vergleichs zweier unabhängig voneinander errechneter Rekonstruktionen mittels FSC.....	122
Abbildung 66: Konformationsunterschiede des Eurypelma-Hämocyanins im TEM-Bild.....	124
Abbildung 67: Errechnete Struktur des <i>Eurypelma californicum</i> Hämocyanins.....	125
Abbildung 68: Auf 10Å Auflösung gefilterte 3D-Strukturen des Eurypelma-Hämocyanins	127
Abbildung 69: Projektionen der errechneten deoxy-Form des Hämocyanins als Suchvorlagen	127

Abbildung 70: Projektionen der errechneten oxy-Form des Hämocyanins als Suchvorlagen	127
Abbildung 71: Rekonstruktion des 24meren Hämocyanins von <i>Eurypelma californicum</i>	128
Abbildung 72: Statistische Alignment-Analyse von GENEDOC	130
Abbildung 73: Sequenzalignment von <i>Drosophila melanogaster</i> LSP2 und <i>Panulirus interruptus</i> Hämocyanin 1HCY	130
Abbildung 74: Ensemble-Analyse von 30 hexameren Homologie-Modellen des LSP-2	131
Abbildung 75: Eingepasstes Homologie-Modell (blau) in der EM-Rekonstruktion (gold)	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten ε von verschiedenen Typ-3-Kupferproteinen.....	20
Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten ε von verschiedenen Modellkomplexen von Kitajima et al. 1992	21
Tabelle 3: Zur Erstellung der multidimensionalen Frequenztabellen W' verwendete Parameter.	36
Tabelle 4: Voraussagegenauigkeit von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen	38
Tabelle 5: Abstände aller His-N ε -Atome zu den von ihnen koordinierten Kupferionen CuA oder CuB	83
Tabelle 6: Zusammenstellung der B-Faktoren aller Röntgenstrukturen der bakteriellen Tyrosinase	87
Tabelle 7: Eignung möglicher Vorlagenproteine zur Modellierung der Maustyrosinase.....	99

10.4. Beiträge zu den Publikationen

Im Folgenden sollen meine Beiträge zu den einzelnen Veröffentlichungen erläutert werden:

Veröffentlichung 1 (Schweikardt et al. 2008) entspringt einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. José-Carlos García-Borrón, Institut für Biochemie, Molekularbiologie und Immunologie der Universität Murcia, Spanien.

Mein Beitrag als Erstautor war die in-silico-Analyse der Maustyrosinase – sowohl des Wildtyps als auch von teil- und nichtfunktionalen Mutanten – sowie die Erstellung eines Modellsystems des aktiven Zentrums von Säuger-Tyrosinasen. Die Aussagen über die molekularen Mechanismen der Auswirkungen von einzelnen Mutationen, M374G und S375G, wurde auf Grundlage der Analyse der Doppelmutante getroffen und durch die nachträgliche Produktion und Analyse der Einzelmутanten im Labor bestätigt. Die Validität des Modellsystems wurde weiterhin durch Vergleich mit bekannten, albinismusverursachenden Mutationen in der menschlichen Tyrosinase gezeigt. Damit wurde zum ersten Mal ein atomares Modell geschaffen, das es möglich macht, die Auswirkungen der Mutationen in Säugertyrosinasen auf molekularer Ebene zu analysieren. Bis auf Abbildung 2 wurden alle Abbildungen von mir illustriert.

Die Mutanten der Maustyrosinase wurden eigens für dieses Projekt in Murcia von Concepción Olivares mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt, mit Unterstützung von José-Carlos García-Borrón und Francisco Solano. Selbiges gilt für die rekombinante Herstellung und biochemischen Analysen der Tyrosinasen und für Abbildung 2.

Veröffentlichung 2 (Decker, Schweikardt et al. 2007) ist ein Review-Artikel und basiert vor allem auf den Ergebnissen aus meinen Veröffentlichungen 1 und 4, die in einen größeren Kontext gesetzt und um weitere Details ergänzt wurden.

Mein Beitrag hier war die vergleichende Analyse der Proteinstrukturen von Hämocyaninen, Tyrosinasen und Catecholoxidase im Bereich der Tertiärstruktur und der Konfiguration des aktiven Zentrums, ebenso wie der Reaktionsmechanismus und der Domänen-Vergleich auf Genebene. Weitere Details bitte ich bei Veröffentlichung 4 nachzulesen. Die Ergebnisse meiner Forschungen haben in den meisten Kapiteln des Reviews Verwendung gefunden. Alle Abbildungen bis auf Scheme 1, für das Felix Tuczek verantwortlich zeichnet, wurden von mir beigetragen.

Veröffentlichung 3 (Corbet, Schweikardt et al. 2007) ist eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Volkmar Schmid, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz.

Die rekombinante Expression, gerichtete Mutagenese, Rekonstitution und Analyse der lhca1- und lhca4-Mutanten sowie die Erstellung der Konsensussequenzen lag in den Händen von Dominik Corbet, Harald Paulsen und Volkmar Schmidt. Meine Aufgabe in diesem Projekt war die Generierung von Sequenzalignments, die Homologie-Modellierung und die Erstellung von strukturellen Fits der Modelle zu einem kompletten Modell des LHCI-730. Das Modell wurde dann analysiert und mögliche Interaktionspartner für die Aminosäuren ermittelt, die essentiell für das Self-Assembly des heterogenen Komplexes waren. Die Abbildungen der Modellstrukturen und ihrer Analysen wurden von mir erstellt.

Veröffentlichung 4 (Decker, Schweikardt und Tuczec 2006) ist ein Review und diskutiert die wichtigsten Ergebnisse meiner Arbeit im Tyrosinase-Feld. Die Analyse der Röntgenstruktur der bakteriellen Tyrosinase durch die veröffentlichende Arbeitsgruppe beinhaltete mehrere Fehler, die zu inkorrekten Schlussfolgerungen führten. Ich stellte vergleichende Studien der Tyrosinasestruktur mit bekannten Strukturen von Hämocyaninen und Catecholoxidasen an, charakterisierte die aktiven Zentren und arbeitete die Unterschiede heraus, die in der Geometrie der Kupferbindung und der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums lagen.

Dadurch konnte der Beweis geführt werden, daß der von Decker und Tuczec 2000 vorgeschlagene Mechanismus der Blockade des CuA-Zentrums tatsächlich der Grund für die unterschiedliche Aktivität von Tyrosinasen und Catecholoxidasen ist und nicht die von Matoba et al. 2006 angeführte Beweglichkeit des His54 im aktiven Zentrum. Diese hätte das aktive Zentrum unnötigerweise destabilisiert. Ich entwickelte mit Heinz Decker und Felix Tuczec (Institut für Anorganische Chemie, Universität Kiel) einen Reaktionsmechanismus, der sich konform mit den vorliegenden Daten zeigt, und für den eine reversible Cu-His-Bindung nicht notwendig ist. Auch alle Abbildungen außer den Reaktions-Schemata wurden von mir erstellt. Die Erkenntnisse aus dieser Publikation sind in verschiedene andere Veröffentlichungen eingeflossen, so auch in (Baird et al. 2007; Decker et al. 2007b; Schweikardt et al. 2007; Nillius et al. 2008).

Veröffentlichung 5 (Jeschke, Bender, Schweikardt et al. 2005) ist in Zusammenarbeit mit dem Institut für Allgemeine Botanik (Alexander Bender und Harald Paulsen) und dem MPI für Polymerforschung in Mainz (Gracina Panek und Gunnar Jeschke) entstanden. Die rekombinante Expression, zielgerichtete Mutation, Rekonstitution der LHC-Moleküle sowie die Markierung mit Spinsonden für das ESR wurde im Institut für Allgemeine Botanik durchgeführt. Die ESR-Messungen und deren Auswertung oblag unseren Kooperationspartnern aus dem MPI. Die ESR-Studien charakterisierten die Struktur des N-Terminus von LHCII durch diskrete Abstandsverteilungen, die mit Hilfe der Homologie-Modellierung analysiert wurden.

Mein Beitrag war die Erstellung von mehreren tausend Homologie-Modellen des trimeren LHCII-Komplexes unter Berücksichtigung der Abstandsverteilungen zwischen den markierten Aminosäuren. Die Einhaltung der vorgegebenen Parameter wurde mit Hilfe selbstgeschriebener DeepView-Skripte kontrolliert und dokumentiert. Die Auswertung der Ergebnisse wurde durch eine Microsoft Access-Datenbank von Alexander Bender und Matlab-Skripte von Gunnar Jeschke übernommen.

In **Veröffentlichung 6** (Schweikardt et al. 2004) wird auf die möglichen Probleme hingewiesen, die bei der Benutzung von automatisierten Strukturvorhersageprogrammen auftreten können. Sowohl Konzeption als auch Ausarbeitung der Publikation sowie die Erstellung der Grafiken wurden von mir durchgeführt, mit Hilfe meiner Co-Autoren, denen ich für ihre Hilfestellungen bei meiner ersten Publikation als federführender Autor danken möchte.

10.5. Weitere Veröffentlichungen

10.5.1. Originalarbeiten

- Voit R, Feldmaier-Fuchs G, Schweikardt T, Decker H, Burmester T.
Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula
Eurypelma californicum.
Structure and intramolecular evolution of the subunits.
J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39339-44.
- Winterpacht A, Hilbert K, Stelzer C, Schweikardt T, Decker H, Segerer H,
Spranger J, Zabel B.
A novel mutation in FGFR-3 disrupts a putative N-glycosylation site and results
in hypochondroplasia.
Physiol Genomics. 2000 Jan 24;2(1):9-12.

(Weitere Veröffentlichungen sind in Vorbereitung)

10.5.2. Illustrationen in Veröffentlichungen

- van Holde K., Miller K. und Decker H. (2001).
Hemocyanins and invertebrate evolution. J Biol Chem 276(19): 15563-6.
Erstellung der Abbildungen 1, 2a und 2b. Nachbearbeitung der Abbildungen 3 und 5.
- Weuffen W. und Decker H. (2004).
Thiocyanat - ein bioaktives Ion mit orthomolekularem Charakter., I.S.M.H.-Verlag,
Sarow.
Illustration der Beiträge von Herrn Prof. Decker
- Decker H. (2005)
Copper Proteins with Dinuclear Active Sites, in „Encyclopedia of Inorganic Chemistry,
2nd Edition“ (Editor R. Bruce King), Volume 2
Erstellung aller Abbildungen
- Rolff M. und Tuczec F. (2008)
How do copper enzymes hydroxylate aliphatic substrates? – Recent insights from the
chemistry of model systems“, Angew. Chem. Int. Ed., 47, 2344 – 2347
Erstellung der ersten Abbildung

10.5.3. Grafiken, Animationen und Druckerzeugnisse

- Promotion-CD „Blaues Blut - voll im Trend“ des Fachbereichs Biologie, AG Decker und AG Markl, September 2001
Erstellung von Grafiken und Molekül-Animationen
Nachbearbeitung und Optimierung der fertigen Präsentation
- Tagung „XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins“ in Mainz, September 2003
Erstellung des Tagungs-Logos und des Tagungsposters, Mitarbeit an der Website
- Hämocyanin unter dem Elektronenmikroskop, Magazin „energy forum“, 2005, Ausgabe 1/2005, BKW FMB Energie AG, Bern
Zusammenstellung von Bild- und Hintergrundmaterial über Hämocyanin
- Bericht des Instituts für Molekulare Biophysik:, 2. Report, 2004 und 3. Report, 2005
Redaktionelle Mitarbeit, Layout und Druck
- Kinder-Uni, Thema „Vom blauen Blut des Adels und der Spinnen“, Oktober 2005
Erstellung der Präsentation von Herrn Prof. Decker
Vorbereitung und Durchführung des Veranstaltungstages
- Jörn auf dem Kampe, Dr. Bettina von Brederlow (Editorin), 2006
GEO kompakt Nr.7: Der Mensch und seine Gene
Artikel „Vom Gen zum Protein: Werkstatt Zelle“, Gruner + Jahr Verlag
Zusammenstellung von Hintergrundmaterial über Proteine sowie Illustration des Artikels in Zusammenarbeit mit Jochen Stuhmann (Grafiker)

10.5.4. Tagungsbeiträge, Vorträge und Poster

10.5.4.1. Vorträge

Schweikardt T., Decker H.: „Homologie-Modellierung des humanen FGF-Rezeptors 3“; Erste Jahrestagung des „Interdisziplinären Arbeitskreises Bioinformatik“ der Universität Mainz. Bad Münster am Stein, 16.09.2002.

Schweikardt T., Jaenicke E., Decker H.: „Homologie-Modellierung von Hämocyaninen und Phenoloxidasen - sind automatisierte Server eine Alternative?“; Zweite Jahrestagung des „Interdisziplinären Arbeitskreises Bioinformatik“ der Universität Mainz. Mainz, 31.10.2003.

Schweikardt T.: „Out of the blue: The 24meric Hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*“; EMBO Practical Course 2003: Image Processing for Cryo-Electron Microscopy; Bloomsbury Centre for Structural Biology, Birckbeck College, University of London, 10.-17.09.2003

Schweikardt T., Bender A., Jeschke G., Paulsen H., Decker H.: „Lokalisation des N-Terminus des Lichtsammel-Komplexes LHCII durch Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) und Homologie-Modellierung“, Eröffnungsvortrag der Dritten Jahrestagung des „Interdisziplinären Arbeitskreises Bioinformatik“ der Universität Mainz, Kelkheim 12.11.2004

10.5.4.2. Poster und Vorträge

Schweikardt T., Jaenicke E., Hartmann H., Decker H.: Computermodellierung. 92. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Vortrag von Herrn Decker auf dem Workshop „Molekulare Methoden in der Zoologie“, 28.5.1999, Innsbruck, Österreich

Schweikardt T., Jaenicke E., Decker H.: Homology modelling revisited – common obstacles and solutions. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Universität Rostock. 31.5.-4.6.2004

Schweikardt T., Jaenicke E., Decker H.: Homology modelling revisited – common obstacles and solutions. International Symposium on Animal Physiology: Proteins in Adaptation and Evolution, Studiengruppe Physiologie (Symposium nach der Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Universität Greifswald. 03.-05.06.2004

Schweikardt T., Jaenicke E., Decker H.: Homology modelling of hemocyanins and phenoloxidases: pitfalls in automated approaches. XIIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins, Universität Mainz, 07.-12.09.2003

Schweikardt T., Decker H., Rupprecht J., Paulsen H.: Structure prediction of the LHC motif of Lhca4 from a tomato. Jahrestagung des Materialwissenschaftlichen Forschungszentrums (MWFZ), Universität Mainz, Juni 2002

Lafargue B., Jaenicke E., Schweikardt T., Decker H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach. 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock 31.05.2004-04.06.2004.

Lafargue B., Jaenicke E., Schweikardt T., Decker H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach. International Symposium on Animal Physiology: Proteins in Adaptation and Evolution, Greifswald 03.06.2004-05.06.2004.

Lafargue B., Jaenicke E., Cirak S., Schweikardt T., Decker H.: Physico-chemical and immunological analysis of Per a 3 allergen from the American cockroach. 17. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 11.05.2005-12.05.2005.

Schweikardt T., Hartmann H., Decker H.: 3D structure of hemocyanins based on homology modelling and small angle scattering. Jahrestagung des Materialwissenschaftlichen Forschungszentrums (MWFZ), Universität Mainz, Mai 2005

Lafargue B., Jaenicke E., Schweikardt T., Decker H.: Characterization of allergenic epitopes of Per a 3-allergens of the American cockroach *Periplaneta americana*. 19. World Allergy Organization Congress, München, 26.06.2005-01.07.2005.

Decker H., Schweikardt T., Tucek F.: The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? Jahrestagung des Materialwissenschaftlichen Forschungszentrums (MWFZ), Universität Mainz, Mai 2006

Lafargue B., Schweikardt T., Decker H.: Identification and localization of antigenic and allergenic epitopes of Per a 3, a major allergen of the American cockroach. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Mainz, 24.06.2006-27.06.2006.

Decker H., Nillius D., Schweikardt T., Jaenicke E.: Blue blood, noble alternatives: Conversion of an oxygen carrier to an enzyme. Vortrag von Herrn Decker auf dem First International Congress of Respiratory Biology, ICRB, Bonn 13.-18.08.2006

Decker H., Schweikardt T., Jaenicke E., Nillius D., Tucek F.: Tyrosinase versus catechol-oxidase: What makes the difference? Kurzpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Universität Münster. 16.-20.09.2006

Schweikardt T., Solano F., Jaenicke E., García-Borrón JC., Decker H.: Loss of mouse tyrosinase activity by a mutation destabilizing CuB, 13th meeting of the European Society for Pigment Cell Research, Barcelona, Spanien, 24.-27.09.2006

Lafargue B., Schweikardt T., Decker H.: Identification and localization of antigenic and allergenic epitopes of Per a 3, a major allergen of the American cockroach. 19. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 16.03.2007-17.03.2007.

10.5.5. Danksagungen in Veröffentlichungen

- Claus und Decker (2006).
"Bacterial tyrosinases."
Syst Appl Microbiol 29(1): 3-14.
Erstellung und Analyse des Homologie-Modells der bakteriellen Tyrosinase
- Höcker, Schmidt und Sterner (2002).
"A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds."
FEBS Lett 510(3): 133-5.
Kommentierung des Manuskripts

10.6. Danksagungen

10.7. Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine Hilfsmittel außer den Angegebenen verwendet habe. Inhalte und Abbildungen, die anderen Arbeiten entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mainz, April 2008

Thorsten Schweikardt

10.8. Lebenslauf