

Abbildung 76: Der Eingang zu der zentralen Kammer des Substratkanals in EE- und SS-ADH. (A) Der EE-ADH-NADH-DMSO-Komplex mit einer Auflösung von 1,8 Å. Der Dihydropyridinring ist purpur und DMSO grün. LeuEE116 ist der nächste Nachbar zu DMSO und PheEE110 blockiert den Zugang zum Inneren des Substratkanals. (B) Dieselbe Region im SS-Isozym. LeuSS115 übernimmt die Position des nicht mehr vorhandenen AspEE115 nach einer Strukturänderung in der Schlaufe. Die Mutation PheEE-110Leu vergrößert das aktive Zentrum und ermöglicht Bindung von Cholsäure, einem voluminösen Substrat.

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstation Hamburg–

Leitung: M. Wilmanns

Gruppenleiter: C. Hermes, M. Koch, V. Lamzin, W. Meyer-Klaucke, D. Svergun, P. Tucker

Im Laufe des Jahres 2000 wurden von EMBL Hamburg wieder sechs Messstationen betreut, davon vier für den Bereich der Biokristallographie und jeweils eine Messstation für Kleinwinkelstreuung an Biomakromolekülen und eine für biologische Röntgenabsorptions-Spektroskopie. Insgesamt wurden 310 Experimente von 134 Gruppen aus 20 Ländern durchgeführt. Die große Mehrzahl der Besucher konnte aus Mitteln des HPRI-Programms der Europäischen Union unterstützt werden.

Gleichzeitig wurde der Umbau der Messstation X13 (mit Unterstützung aus Mitteln des IMB Jena und der Universität Hamburg) fortgesetzt. Testergebnisse zeigten, dass der Photonfluss pro Fläche für diese Messstation besser ist als für die benachbarte Messstation X11.

Es wurden einige Testdatensätze von hoher Qualität gesammelt, die zeigten, dass die Anordnung der optischen Elemente an dieser neuen Messstation die Erwartungen vollständig erfüllt.

Gleichzeitig wurde die Umgestaltung der Messstation X12 mit wählbarer Energie/Wellenlänge für biokristallographische Experimente, einschließlich MAD-Experimente, geplant. In diesem Rahmen wurde ein neues Gesamtkonzept für den Fächer K ausgearbeitet, das eine symmetrische Anordnung der Messstationen X11 und X13 mit gleichem Winkel in Bezug auf den direkten Strahl (X12) ermöglichen wird. Mit den Umbauarbeiten wurde Ende des Jahres 2000 begonnen.

EMBL Hamburg nimmt eine wichtige Aufgabe im Bereich von fortgeschrittenem Training wahr. Seit 2000 wird die Außenstation als „Marie Curie Training Site“ von der Europäischen Union anerkannt. Dieses Programm ermöglicht die Vergabe von Stipendien (bis zu 12 Monaten) an Doktoranden/innen aus den EU-Mitgliedsländern einschließlich der assoziierten Staaten.

Parallel dazu werden weiterhin Trainingskurse angeboten. Die Mitgliedschaft in drei „Concerted Action“ Programmen der EU, Synchrotron-Rundtisch, MAX-INF und European Structural Biology Forum, ermöglichen die Bereitstellung von notwendigen finanziellen Ressourcen für diese Kurse.

Der sogenannte PEPSII Kurs mit dem Schwerpunkt auf Methoden der Probenvorbereitung (Expression, Reinigung und Kristallisation) fand letztes Jahr ein großartiges Echo.

Darüber hinaus wurde ein Workshop in Poznan (Polen) organisiert, bei dem Möglichkeiten für „High-Throughput“ Strukturbiologie diskutiert wurden.

Forschungsschwerpunkte

In der letzten EMBL-Ratssitzung im November 2000 wurde das wissenschaftliche Programm für EMBL in den Jahren 2001 bis 2005 verabschiedet. Dieses Programm wird die Bemühungen von EMBL unterstützen, die Genom- und Proteom-orientierte Forschung in das Zentrum seiner wissenschaftlichen Aktivitäten zu setzen, die Messstationen mit „State-of-the-Art“ Standards weiterzuentwickeln und die Infrastruktur an der Außenstation so zu verbessern, dass diese eine wichtige Funktion als Einrichtung in den derzeit beginnenden Strukturgenomikprojekten einnehmen kann.

Eine verbesserte Form der Bereitstellung von Synchrotronstrahlung auf dem DESY-Gelände könnte helfen, Hamburg noch mehr als in der Vergangenheit zu einem multi-institutionellen Spitzenzentrum im Bereich der hochaufgelösten Strukturbiologie und der damit verbundenen Strukturgenomikprojekte zu entwickeln.

Im weiteren Teil des Berichtes sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Berei-

chen Instrumentierung, Biokristallographie, Kleinwinkelstreuung und Röntgenabsorptionsspektroskopie zusammengefasst.

Weitere Projekte in Zusammenarbeit mit auswärtigen Gruppen und Einzelheiten sind im EMBL Jahresbericht dargestellt (http://www.embl-hamburg.de/annual_report_2000.html).

Instrumentierung der Synchrotron-Messstationen

Im Jahr 2000 bestand die Hauptaktivität im Umbau der Messstation X13, der ehemaligen Station für Kleinwinkelstreuung, in einen Messplatz für Proteinkristallographie (PX). Die im Vorjahr begonnenen Arbeiten wurden fortgesetzt, so dass Mitte des Jahres mit dem Testbetrieb begonnen werden konnte, und die letzte Strahlzeit bereits für regulären Nutzerbetrieb freigegeben war.

Im Folgenden sollen die Hauptmerkmale dieser Strahlung kurz aufgelistet werden:

- fixierte Wellenlänge von 0.9 Å, festgelegt durch die Strahlführungsgeometrie und einen fokussierenden Si(220) Monochromator,
- Rh-beschichteter 1 m langer Röntgenspiegel zur dynamischen Fokussierung in vertikaler Richtung und zur Unterdrückung harmonischer Wellenlängen,
- bei EMBL entwickelte kristallographische Messstation mit CCD-Detektor, Kristallkühlung und ϕ -Rotation.

Der Einsatz eines kontinuierlichen Spiegels, anstatt des bisher verwendeten segmentierten Spiegels, war mit einem beträchtlichen Intensitätsgewinn am Probenort verbunden. Die Umstellung der gesamten Experimentsteuerung von CAMAC auf ein PC-basiertes System und der Einsatz eines modernen Schrittmotorsystems wirkten sich positiv sowohl auf die Zuverlässigkeit als auch auf die Bedienerfreundlichkeit aus.

Im Winter Shutdown 2000/01 wurde der gesamte Strahlfächer K inklusive der Experimentierhütten abgebaut. Zusätzlich zu den bereits bestehenden Messplätzen X11 und X13 wird zwischen diesen beiden Strahlen eine Messstrecke mit variabler Wellenlänge aufgebaut, an der anomale Dispersionseffekte ausgenutzt werden

sollen (MAD). Im Rahmen der Umbaumaßnahmen werden die teilweise veralteten Komponenten von X11 auf den Stand von X13 gebracht.

Biokristallographie

Substratspezifität von Alkohol Dehydrogenase Isozymen aus Pferdeleber

Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) kommen als Ethanol (EE-ADH) und Steroid (SS-ADH) verarbeitende Isozyme zusammen mit einem Hybrid-Dimer (ES-ADH) vor. Im Enzym der Pferdeleber, das für diese Studie verwendet wurde, gibt es insgesamt 10 Unterschiede von Aminosäuren zwischen S und E Ketten, einschließlich der Deletion eines Restes in der EE-ADH (AspEE115). Die Substratspezifität von ADH ist durch die Beschaffenheit des Substratkanals gegeben, und es konnte durch Punktmutationen bewiesen werden, dass nach Deletion von AspEE115 das Enzym Aktivität an Steroiden zeigt. Nur die S-Untereinheit kann 3- β -Hydroxysteroiden verarbeiten, welche große, voluminöse Substrate sind.

In Zusammenarbeit mit den Universitäten Lund (Schweden) und Saarbrücken wurde die Röntgenkristallstruktur von SS-ADH als Komplex mit NAD/NADH und Cholsäure gelöst. Cholsäure ist in Gegenwart von NAD ein starker Inhibitor für SS-ADH, der sich nur in der Position der 3-Hydroxyl-Gruppe von einem 3- β -Hydroxysteroid unterscheidet. Kristallographische Daten bis zu einer Auflösung von 1.5 Å wurden bei 100 K an der Messstation BW7B bei EMBL/DESY gesammelt. Die Struktur zeigt, wie die meisten Aminosäure-Unterschiede zwischen EE- und SS-Enzymen die verschiedenen Eigenschaften beeinflussen:

- die Größe des Substratkanals,
- die Hydrophobizität der Substratbindungsregion,
- die Ladungsverteilung am Protein,
- große strukturelle Veränderungen in der steroidbindenden Schlaufe.

Dies alles trägt zur Anpassung des Substratkanals an die Bindung von Steroidsubstraten in SS-ADH bei. Der größte strukturelle Unterschied zwischen EE- und SS-ADH betrifft den Substratkanal selbst. Eine gewisse Flexibilität von hydrophoben Seitenketten lässt eine

begrenzte Gestaltveränderung des Kanals innerhalb der zentralen Kammer zu.

Phe110 und Leu116 in EE-ADH verkleinern diesen Raum, so dass er eher für kleine Substrate passt als für Steroide (Abb. 76A). AspEE115 hat den größten Einfluss auf die Weite des Kanals (Abb. 76B). Die Position von AspEE115 liegt innerhalb einer Schlaufe, zu der die Carboxylgruppe Wasserstoffbrücken über die Hauptketten-Amidstickstoffatome ausbildet. LeuEE116, das in der Nähe des Metallions im aktiven Zentrum sitzt, wird durch die verkürzte Schlaufe verdeckt. Das Cholsäure-Molekül im EE-Enzym belegt die volle Länge des Substratkanals. Das Zink-Ion im aktiven Zentrum wird von seiner Carboxylgruppe ligiert. Die erhaltenen Ergebnisse liefern eine solide strukturelle Basis für die Analyse von Unterschieden in der Substratspezifität und Stereoselektivität der ADH Isozyme.

Regulation der Genexpression durch anpassbare Strukturen des Transkriptionsfaktors OCT1

Ein beträchtlicher Teil der kodierten Genprodukte der bekannten Genome reguliert deren Konvertierung von passiven Informationsträgern, den Genen, zu Proteinen, die die Maschinen der biologischen Prozesse sind. Diese Proteinfaktoren interagieren mit der DNA in den verschiedensten Formen, oft als Homo- oder Heteromultimere. Sie regulieren die Expression spezifischer Gene durch Repression und/oder Aktivierung, und tragen zur kondensierten Verpackung von Genen in zellulären Organismen bei.

In Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe des New Boulton Centers (Philadelphia) werden die Transkriptionsfaktoren der OCT-Familie untersucht. Von herausragender Bedeutung ist der Faktor OCT4, der das weitere Zellprogramm von embryonalen Stammzellen maßgeblich bestimmt. Im Berichtsjahr wurden zwei Strukturanalysen des homologen und ubiquitär vorkommenden Faktors OCT1 im Komplex mit spezifischen DNA-Elementen, die als PORE und MORE bezeichnet werden, genommen. Die Datensätze für diese Komplexe, einschließlich einem MAD-Datensatz mit Brom-substituierter DNA, wurden an den Messstationen bei EMBL/DESY gewonnen. Aufgrund der großen

Sequenzähnlichkeit von OCT1 und OCT4 lassen sich die funktionellen Implikationen der OCT1-Strukturen im Wesentlichen auf OCT4 übertragen.

Frühere biochemische Arbeiten und Modellvorhersagen konnten nur unter der Annahme erklärt werden, dass OCT-Faktoren sich, je nach DNA-Motiv, völlig unterschiedlich an die DNA anlagern. Diese Unterschiede in den resultierenden Komplexen führen zu konformationsabhängigen Regulierungen dieser OCT-Faktoren durch weitere Koaktivatoren. Im Berichtsjahr konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass OCT4 nur in der MORE-Konfiguration, nicht aber in der PORE-Konfiguration, durch den Koaktivator OCA-B reguliert werden kann.

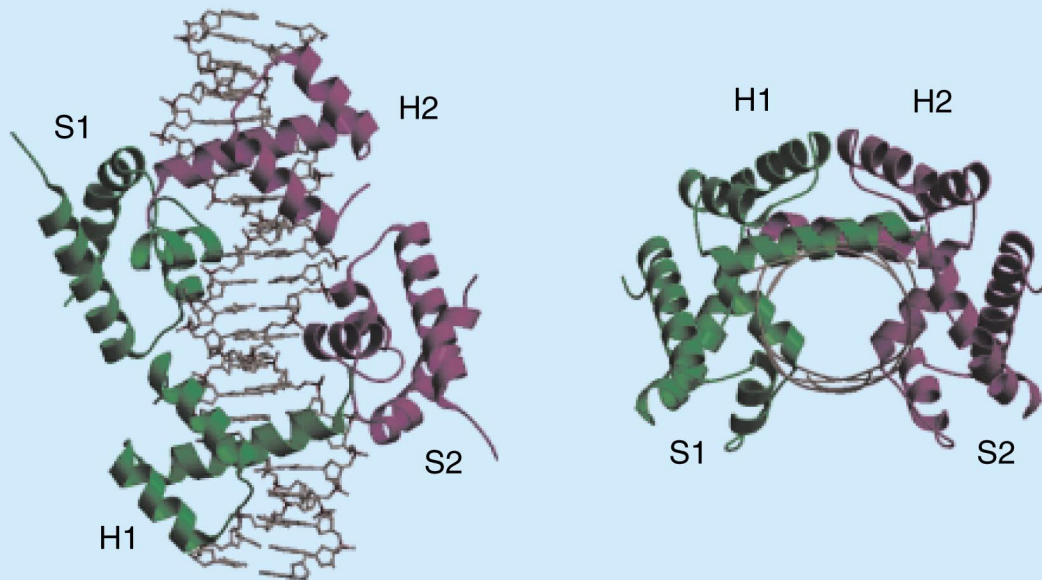
Die nunmehr gelösten Kristallstrukturen der beiden Komplexe OCT1:MORE und OCT1:PORE zeigen, dass tatsächlich der OCT1-Faktor zwei völlig unterschiedliche Komplexe in Gegenwart von unterschiedlichen DNA-Motiven bilden kann (Abb. 77). Dieses plastische strukturelle Verhalten des OCT-Faktors ist einzigartig und bis jetzt in keinem anderen vergleichbaren Faktor gefunden worden. Das erzielte Ergebnis macht deutlich, in welchem Ausmaß strukturelle Arrangements von Proteinkomplexen von deren Liganden, hier von spezifischen DNA-Motiven, induziert werden können.

Diese Arbeiten werden dazu beitragen, das plastische Strukturprogramm der weit verbreiteten Transkriptionsfaktoren besser zu verstehen.

Die Aktivität der Transkription und die sensorische Transduktion

Bakterien reagieren auf ihre Umweltbedingungen mit bestimmten Veränderungen von Gen-Expressionsmustern, insbesondere auf der Ebene der Transkription. Einer der wichtigen Mechanismen, der dabei verwendet wird, basiert auf dem alternativen Faktor $\sigma 54$, welcher für die Initiation der Transkription in verschiedenen Prozessen verantwortlich ist, zum Beispiel dem Kohlenwasserstoff-Abbau und der Stickstoff-Fixierung. Dieser σ -Faktor benötigt ein so genanntes Aktivator-Protein, dessen Konzentration durch Umweltbedingungen oder intrazelluläre Faktoren kontrolliert wird. In vielen Mikroorganismen sind die Gene,

POU:MORE



POU:PORE

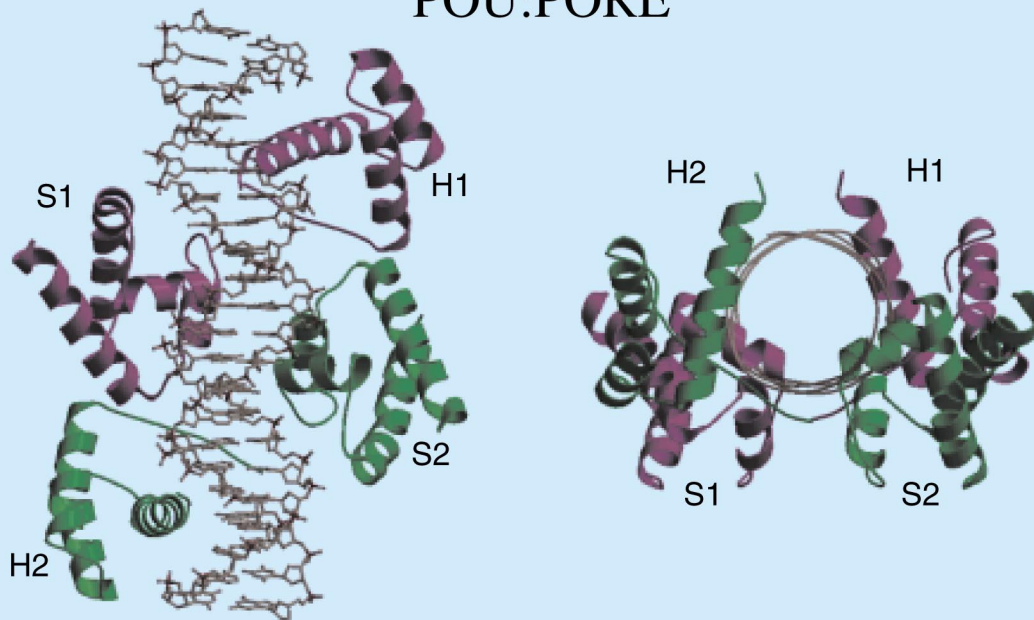


Abbildung 77: Schematische Darstellungen der beiden Protein-DNA Komplexstrukturen, OCT1:MORE und OCT1:PORE. Die Arrangements der Proteindomänen sind vollständig unterschiedlich in den beiden Komplexen.

die für die Stickstoff-Fixierung verantwortlich sind, transkriptional durch NifA aktiviert, dessen Aktivität wiederum durch NtrC kontrolliert wird. NifA sowie NtrL sind typische σ_{54} abhängige Aktivatoren. Jedes dieser Proteine besteht aus drei Domänen, einer DNA-bindenden Domäne, einer katalytischen (AAA) Domäne, und einer Empfänger-Domäne. NtrBC stellt ein typisches zwei-Komponenten System dar, in dem die Signal-Transduktion durch die Autophosphorylierung des Sensor-Proteins (NtrB) an ein Histidin in der Übertragungs-Domäne erfolgt. Anschließend wird die Phosphorgruppe auf die Empfänger-Domäne des regulatorischen Proteins (NtrC) übertragen. Obwohl NifL klare Ähnlichkeiten mit der Histidin Autokinase Übertragungs-Domäne zeigt, wird es nicht autophosphoryliert. Im Gegensatz dazu kontrolliert NifL wahrscheinlich die Aktivität von NifA durch eine stöchiometrische Protein:Protein Wechselwirkung. NtrB reagiert auf den Stickstoff-Status der Zelle durch eine Wechselwirkung mit dem PII Protein. NifL reagiert auf drei Effektoren: das Redox Potential der Zelle mit Hilfe einer FAD Gruppe in der sensorischen Domäne, das Stickstoff Potential und den Energiegehalt der Zelle durch ATP/ADP Bindung an der Übertragungs-Domäne. Folgende Strukturarbeiten an Proteinen dieses Systems werden zur Zeit durchgeführt:

- Die zentrale plus C-terminale Domäne eines NtrC Homologen wurde kristallisiert – die Kristalle streuen bis zu 3 Å. Produktion und Kristallisation des Selenomethionin markierten Proteins werden derzeit durchgeführt.
- Die N-terminale FAD bindende PAS/PAC (Sensor) Domäne von NifL von *Azobacter vinlandii* wurde kristallisiert. Die Kristalle streuen bis zu 3.1 Å Auflösung.
- Die Transkription des Phage-shock Protein (psp) Operons von *E. coli* steht ebenfalls unter Kontrolle des σ_{54} , und ist von dem Transkriptions-Faktor PspF abhängig. Das PspF Protein besteht aus 325 Aminosäuren und hat zwei Domänen, die eine Homologie zu der zentralen und der C-terminalen Domäne von NtrC zeigen. Es wurden vorläufige Kristallisationsexperimente eines PspF- Δ HtH Konstruktes, das das C-terminale „helix-turn-helix“ (HtH) Motiv nicht enthält, durchgeführt. Dabei sind nach 3–5 Wochen kleine, sehr schwach streuende Kristalle gewachsen.

- Das Phagen Schock Protein A (MW 25.5 kDa) ist ein peripheres Membran-Protein, das die Expression des psp Operons negativ reguliert. Da dem PspA ein erkennbares DNA-Bindungsmotiv fehlt, bindet es wahrscheinlich an die zentrale Domäne des PspF. Im Gegensatz zu anderen Signal-Transduktionssystemen, die zu der Zwei-Komponenten Familie gehören, spielt hier die Phosphorylierung an der Regulation des psp Operons keine Rolle. Die His-tag Version des PspA Proteins wurde hergestellt, das Protein überexprimiert und die Reinigungsschritte optimiert. Es wurden Mikrokristalle erhalten und es wird jetzt versucht, diese durch Anwendung bestimmter Konditionen zu verbessern.
- Da Proteine von thermophilen Organismen oft leichter kristallisieren als die von mesophilen, konzentrierte sich eine Untersuchung auf das NifA-analoge Protein des hyperthermophilen *Aquifex aeolicus*. Das Protein wurde überexprimiert und gereinigt. Nach Optimierung der Reinigungsprotokolle wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet, um Proteinkristalle zu bekommen. Nach einer Inkubation von 3–4 Wochen wurden einige kleine, sehr fragile Kristalle erhalten, die gegenwärtig verbessert werden.

Nichtkristalline Systeme

Die Arbeit der Gruppe konzentrierte sich auf zwei Hauptthemen: die Entwicklung eines Datenerfassungssystems auf der Grundlage der Zeit-Raum-Zeit Umwandlung und die Entwicklung von Dateninterpretationsmethoden.

Die Zeit-Raum-Zeit Umwandlung ist eine Methode zur Auslese von Gasdetektoren mit Verzögerungsleitungen, die die Nachteile der üblichen Analog/Digital oder Zeit/Digital Umwandlungsmethoden, wie niedrige Zählraten und Schwierigkeiten bei der Auslese zeitgleicher Ereignisse, umgeht. Als Folge der Ionisation des Gases im Detektor entsteht gleichzeitig auf der Anode ein elektrischer Puls, und kurz danach wird von der Ionenwolke ein Signal auf der Kathode induziert, die mit einer LC-Verzögerungsleitung mit Transitzeit T gekoppelt ist. Dieses Signal teilt sich in zwei identische

Pulse, die sich in Gegenrichtung auf der Verzögerungsleitung fortpflanzen. Üblicherweise wird die Zeitdifferenz zwischen der Ankunft der Pulse auf beiden Seiten der Verzögerungsleitung gemessen, um die Position des Ereignisses zu bestimmen.

Anders ist es in der Zeit-Raum-Zeit Methode. In diesem Fall werden die zwei Pulse auf einer zweiten Verzögerungsleitung mit identischen Eigenschaften rekombiniert. Diese zweite Leitung, die in einem speziell entwickelten ASIC („Application Specific Integrated Circuit“) eingebaut ist, besteht aus einer Kette von Invertoren, die mit Komparatoren und Zählern verbunden sind, wobei die 64 Elemente in jedem ASIC eine 20 ns lange Pseudo-Verzögerungsleitung bilden. In ihrem Prinzip ist die Methode analog zur Zeitsynchronisation in Einsteins Gedankenexperimenten oder zur Zwei-Weg Übertragungsmethode in der Zeitmetrologie. Im Rahmen des von der Europäischen Union finanzierten PASERO-Projekts wurde von der Firma Smart Silicon Systems (Lausanne) ein NIM-Modul mit 16 ASICs entwickelt. Dieses Modul, das ein universales Auslesesystem für lineare Detektoren bietet, wurde, in Zusammenarbeit mit EMBL-Grenoble und dem ESRF, mit einer Reihe verschiedener Detektortypen erfolgreich getestet. Die Ergebnisse dieser Messungen wurden auf der SRI-2000 Konferenz in Berlin vorgetragen.

Im Rahmen der Entwicklung neuer Dateninterpretationsmethoden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Kristallographie in Moskau wurde eine neue Version des CRY SOL-Programms (CRYDAM) geschrieben. Diese neue Version erlaubt es jetzt, neben Lösungsstreukskurven von Proteinen auch die von Nukleinsäuren und Sacchariden und ihren Komplexen anhand der Koordinaten in der Protein Datenbank unter Berücksichtigung der Hydratisierungsschale zu berechnen.

Weiter wurde ein Algorithmus entwickelt und in einem Programm (SUPCOMB) implementiert, um verschiedene Modelle, zum Beispiel aus hochaufgelösten Kristallstrukturen, Elektronenmikroskopie oder Kernresonanz, räumlich optimal aufeinander auszurichten.

Das DAMMIN-Programm wurde auch weiterentwickelt und angewandt, um Modelle von Proteinen und Nukleinsäuren, zum Beispiel 5S RNS, ab initio aus Lösungsstreukskurven zu berechnen.

Das neue Programm MASSHA für PC bietet eine Erweiterung des ASSA Systems, das auf UNIX-Rechnern läuft, um Modelle aus verschiedenen Quellen dreidimensional darzustellen, zu manipulieren und zu vergleichen. Es ist sehr bedienungsfreundlich und soll Biochemikern erleichtern, gezieltere Experimente zu planen und die Größe der Effekte abzuschätzen, die in Lösungsstreuungsexperimenten bei konformationellen Änderungen oder Komplexbildung zu erwarten sind.

EXAFS an biologischen Systemen

Die Röntgenabsorptionsspektroskopie ermöglicht die Bestimmung der Metallkoordination in Metalloproteinen. Die Methode ist sensitiv auf Änderungen in der ersten Koordinationssphäre durch Bindung von Substraten oder Inhibitoren. Des Weiteren erlaubt sie die Ermittlung des Oxidationszustands des Metallatoms.

Für die Anwendungen auf biologische Systeme betreibt EMBL Hamburg einen eigenen Messplatz. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Optimierung dieses Spektrometers. Alle Verbesserungen zielen auf die Erhöhung der Strahlungsintensität und -stabilität auf der Probe, bzw. die Automatisierung und Vereinfachung des Nutzerinterfaces. Dazu wurde ein neues Si(311) Kristallpaar eingesetzt, wobei der thermische Kontakt zwischen dem ersten Kristall und dem Kühlblock durch eine dünne Lage GaIn-Eutektikum optimiert wurde. Dies führt zu einer sehr guten Energiestabilität des Spektrometers, die jetzt hauptsächlich durch Strahlschwankungen des DORIS-Speicherrings beschränkt wird.

Des Weiteren konnte den Nutzern ein neuer Regelkreis für die Stabilisierung des Monochromator-Detunings zur Verfügung gestellt werden. Dieser verringert die Intensitätsschwankungen auf der Probe deutlich. Diese Verbesserungen resultierten in einer Erhöhung der Strahlungsintensität auf der Probe von bis zu 70%. Die Verbindung dieser Steuerung mit der Datennahme entlastet die Gäste stark. Somit können sie sich verstärkt den wissenschaftlichen Fragestellungen zuwenden.

Im Jahr 2000 wurde eine Vielzahl an Projekten durchgeführt, viele in Kooperation mit anderen Labors aus ganz Europa. Dieser Bericht skizziert ein Projekt in Zusammenarbeit mit den Universitäten Bayreuth und Lübeck.

Das Metalloenzym CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* ist ein Molybdän-haltiges Eisen-Schwefel-Flavoprotein, welches die Oxidation von CO zu CO₂ katalysiert. Es ist das Schlüsselenzym in der anäroben Nutzung von CO durch Bakterien in CO-Atmosphären. Um den katalytischen Mechanismus zu verstehen, wurden mit der Röntgenabsorptionsspektroskopie mehrere Zustände des Enzyms jeweils als gefrorene Lösung analysiert. Aus diesen Messungen resultiert eine radiale Abstandsverteilung der Nachbaratome des Mo-Zentralatoms. Dies erlaubt es, die Struktur des aktiven Zentrums zu verfeinern. Um die Funktionsweise des Enzyms zu verstehen, ist es sehr hilfreich, mehrere Zwischenzustände im katalytischen Zyklus zu modellieren. Hieraus ergibt sich am Ende ein Gesamtbild der Funktionsweise.

Skizziert man die Resultate im vorliegenden Fall, so fällt auf, dass das Mo-Atom stets an mindestens zwei Schwefelatome gebunden ist. Oxidierter und reduzierter Zustand unterscheiden sich insbesondere in der Anzahl an Sauerstoffliganden bei kurzen Abständen. Fol-

gerichtig ist dies einer der Schlüssel zum Verständnis der Prozesse.

Die Messungen zeigten jedoch noch eine andere wichtige Tatsache. Aus der Position der Absorptionskante wird der Oxidationszustand des Mo-Atoms bestimmt. Eine zu geringe Differenz wurde zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand ermittelt. Hieraus folgt, dass nicht alle Mo-Zentren in die katalytische Aktivität eingebunden sind. Aufgrund dieser Informationen war es möglich, gezielt nach molekularbiologischen Bedingungen zu suchen, die eine Erhöhung der Aktivität erlauben.

Letztendlich gelang es, die Aktivität zu verfünffachen. Aus einem Vergleich der Proben konnten die für die Aktivität essentiellen Komponenten des Metallclusters bestimmt werden. Neben einem weiteren vermutlich cyanolisierbaren Schwefelliganden, welcher in der inaktiven Spezies durch Sauerstoff substituiert ist, handelt es sich um ein Atom im Abstand von 3.7 Å, das vermutlich als 3d Metall identifiziert wurde.