

Abbildung 58: Modell der Protein- und RNS-Verteilung in den 30S (links) und 50S (rechts) Untereinheiten des 70S Ribosoms, basierend auf der simultanen Interpretation von 42 unabhängigen Röntgen- und Neutronen-Kontrastvariationskurven. Die blauen und grünen Kugeln stellen die Proteinanteile dar, die magenta und roten Kugeln die RNS-Anteile. Die Modelle in der unteren und mittleren Reihe sind um  $120^\circ$  und  $240^\circ$  um die Y-Achse gedreht worden.

# Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie EMBL –Außenstelle Hamburg–

**Leitung:** M. Wilmanns

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

Im Laufe des Jahres 1999 wurden von der EMBL-Außenstation wieder insgesamt sechs Messstationen für die Bereiche Kristallographie an biologischen Makromolekülen, Kleinwinkelstreuung und Röntgenabsorptions-Spektroskopie an nicht-kristallinen biologischen Systemen zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden von der Außenstelle Hamburg 311 Projekte von Forschungsgruppen aus 21 Ländern betreut. Eine große Zahl dieser Projekte konnte mit Mitteln aus dem TMR/LSF-Programm der EU unterstützt werden. Diese Unterstützung kann auch zukünftig mit Mitteln aus dem VI. Rahmenprogramm der EU fortgeführt werden.

Im Sommer 1999 wurde mit dem Umbau der Messstation X13 zu einer kristallographisch orientierten Messstation (unter anderem mit Unterstützung des IMB Jena und BMBF-Verbundmitteln an die Universität Hamburg) begonnen, nachdem die Aktivitäten im Bereich Kleinwinkelstreuung an Lipiden und Muskeln bei EMBL beendet worden waren.

Ein hervorragendes wissenschaftliches Programm ist für die EMBL-Außenstation mit ihren intensiven Aufgaben in der Nutzerbetreuung von essentieller Bedeutung.

Im Laufe des Berichtsjahres wurde bei EMBL ein neues Labor für eukaryontische Expression für Baculovirus infizierte Insektenzellen erfolgreich etabliert. Außerdem wurde eine neue, kleine Bibliothek mit Zugang zu elektronisch erhältlichen Zeitschriften eingerichtet.

Im Laufe des Jahres 1999 wurden von EMBL Hamburg drei Workshops angeboten mit dem Ziel, fortgeschrittenes Training für die Benutzung der Messstationen an der EMBL-Außenstation und die damit verbundenen technischen und wissenschaftlichen Fragestellungen anzubieten. Im Sommer 1999

wurde mit Unterstützung von EMBO ein Internationaler Workshop für die potentiellen Nutzungen des von DESY an TESLA geplanten Röntgenlasers im Bereich der Biologie organisiert.

Die meisten Vorträge dieses Workshops sind in einem Buch zusammengefasst, das vom EMBL-Sekretariat bezogen werden kann.

## Forschungsschwerpunkte

Im Jahre 1999 wurde eine Vielzahl an Projekten durchgeführt, ein Großteil davon in Kooperation mit anderen Labors aus ganz Europa.

Im Folgenden sind die wissenschaftlichen Aktivitäten der Forschungsgruppen aus den Bereichen Instrumentierung, Proteinkristallographie, Kleinwinkelstreuung und Röntgenabsorptionsspektroskopie kurz zusammengefasst.

Für alle weiteren Projekte und Einzelheiten wird auf den HASYLAB-Jahresbericht und auf den EMBL-Forschungsbericht verwiesen.

## Instrumentierung

Im Jahr 1999 wurde eine Reihe von signifikanten Verbesserungen und Änderungen an den von der EMBL-Außenstelle betriebenen Messstationen durchgeführt. In besonderem Maße traf dies auf die von der Proteinkristallographie genutzten Strahlführungen zu. Wie in den vorhergehenden Jahren lag hierbei das Augenmerk auf einer Verbesserung der Gesamteffizienz der Messplätze durch Erhöhung der Photonenzahl auf der Probe, schnellere Detektorsysteme und eine erhöhte Benutzerfreundlichkeit. Die bedeutsamste Änderung fand

am Wiggler-Messplatz BW7A statt, an dem ein sagittal fokussierender Monochromator aufgebaut wurde, von dem einige wesentliche Konstruktionsmerkmale im Folgenden beschrieben werden.

Der neuartige Monochromator ist in Abbildung 59 dargestellt. Das System basiert auf einem ebenen, wassergekühlten ersten Kristall und einem besonders geformtem zweiten Kristall, welcher der Fokussierung dient. Die Kristalle sind in einer pseudo „channel-cut“ Konfiguration angeordnet, die eine konstante Höhe des monochromatisierten Strahls gewährleistet („fixed exit“) und außerdem sehr schnelle Änderungen der Strahlenergie ermöglicht. Entscheidend ist die direkte Wasserkühlung des ersten Kristalls mittels 0.5 mm breiter Kühlkanäle, die bis 0.6 mm an die reflektierende Oberfläche heranreichen. Auf diese Weise sind die extremen thermischen Belastungen im Wigglerstrahl ohne erkennbare Verschlechterung der Reflexionseigenschaften zu bewälti-

gen. Wie in Abbildung 59 zu sehen ist, besitzt der zweite Kristall die Form von zwei an der Basis verbundenen gleichschenkligen Dreiecken, deren Rückseite durch eine Reihe von Stegen verstärkt wird. Diese besondere Form und die Anordnung der Stege auf der nicht reflektierenden Seite des Kristalls bewirken, dass sich dieser bei der Fokussierung rein zylindrisch verformt, ohne unerwünschte Biegungen in andere Richtungen zuzulassen („anticlastic bending“), die das Reflexionsvermögen stark beeinträchtigen würden. Nach eingehenden Tests zu Beginn des Jahres wurde der Monochromator nach der Sommerpause an die Nutzerschaft übergeben. Durch den jetzt weitaus höheren Photonenfluss sowie die Installation eines MAR CCD Detektors entspricht die Strahlführung BW7A nun anspruchsvollen internationalen Standards.

Auch am Messplatz X11 wurde die MAR 345 „Image plate“ durch einen MAR CCD Detektor ersetzt und die

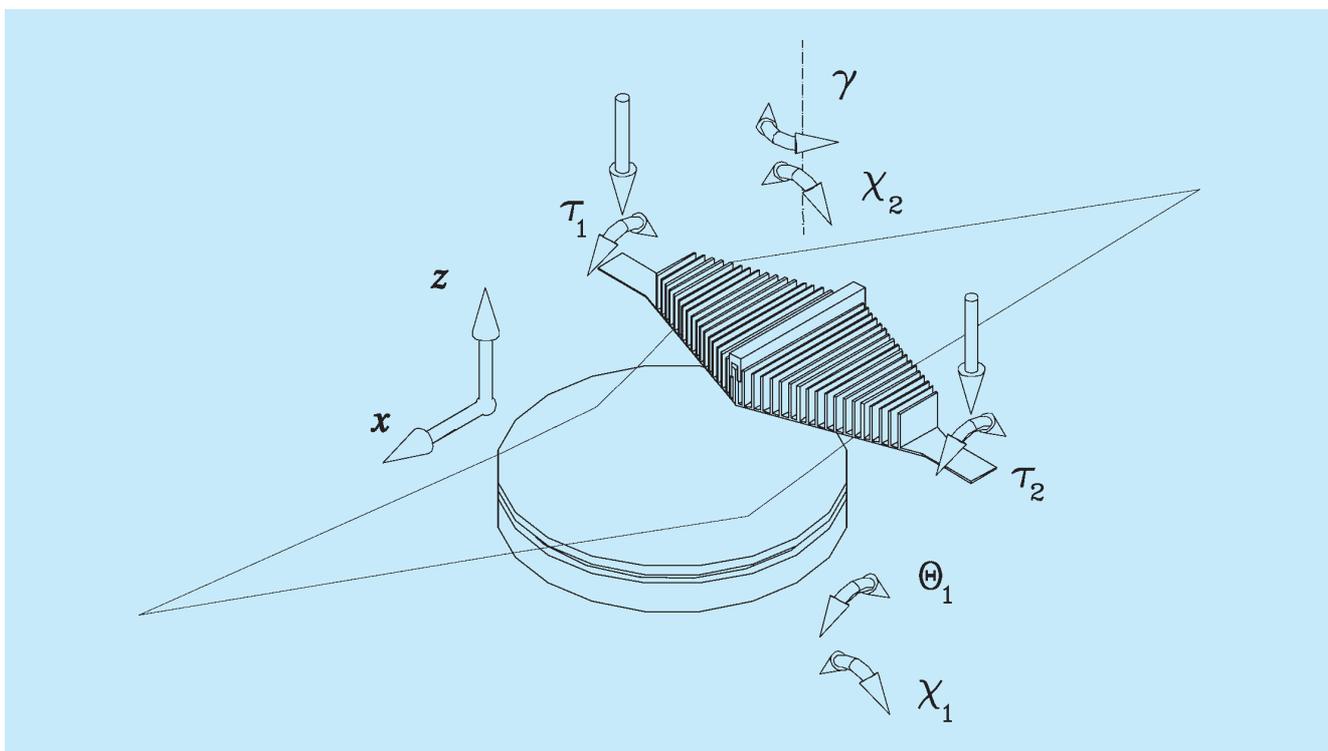


Abbildung 59: Schematische Darstellung des fokussierenden Doppel-Monochromators am EMBL Messplatz BW7A. Der „weiße“ Röntgenstrahl fällt von links auf den ersten wassergekühlten Kristall. Anschließend wird er vom zweiten diamantförmigen Kristall horizontal fokussiert. Die verfügbaren Freiheitsgrade, die für eine optimale Justierung benötigt werden, sind durch Pfeile angedeutet.

so frei gewordene „Image plate“ an den MAD Messplatz X31 transferiert. An beiden Stellen konnte der Datendurchsatz dadurch erheblich gesteigert werden. Der Umbau von X13, dem ehemaligen Messplatz für Kleinwinkelstreuung, in einen Messplatz für Proteinkristallographie wurde begonnen. Die Kleinwinkelapparatur wurde durch eine bei EMBL entwickelte Röntgenkamera ersetzt, und der Si(220) Monochromator für die horizontale Fokussierung ist bereits in sein Vakuumgefäß eingebaut und wird Anfang 2000 getestet werden. Außerdem wurden der Rhodium-beschichtete Röntgenspiegel (vertikale Fokussierung) sowie ein modernes Schrittmotorsystem bestellt. Beide Komponenten sollten bis Mitte nächsten Jahres geliefert sein, so dass die weitere Umgestaltung der Strahlführung in einer längeren Betriebspause durchgeführt werden kann.

### Proteintitration im kristallinen Zustand

Proteine haben komplexe Strukturen, deren Stabilität abhängig ist von einem Gleichgewicht vielfacher Interaktionen vergleichbarer Stärke, die wiederum in Relation zur äußeren Umgebung stehen. Die Anwesenheit von Lösungsmitteln in Proteinkristallen erlaubt, die physiko-chemischen Eigenschaften eines Proteins zu verändern. Dies ermöglicht es, Prozesse zu studieren, bei denen Protonen-Transfer eine zentrale Rolle spielt, oder bei denen Ligandbindungsaffinitäten durch den pH-Wert oder die Ionenstärke der Lösung reguliert werden.

Röntgendiffraktion kann benutzt werden, um subtile Änderungen zu identifizieren, die durch geringe Verschiebungen von physiko-chemischen Parametern verursacht werden. Im Fall eines pH-kontrollierten Prozesses kann die Lokalisierung von Wasserstoff-Atomen eine direkte Bestimmung der Protonierung von Resten erlauben, die essentiell für die Stabilität oder Funktion eines Makromoleküls sind.

Mit dieser Idee wurden pH-Effekte in einer Proteinstruktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse entdeckt, die zu Rückschlüssen auf die Rolle eines Protonen-Gleichgewichts in biologischen Prozessen führen können.

Der Effekt des pH-Werts wurde anhand der kristallinen Struktur der RNase A als Modellsystem unter-

sucht. Dieses Enzym katalysiert eine pH-abhängige Reaktion mit einem Mechanismus, der einen „2-Protonen-Shift“ involviert. Obwohl RNase A bereits in vielerlei Hinsicht untersucht wurde, wurde der von diesem Enzym katalysierte 2-Schritt Reaktionsmechanismus kürzlich neu interpretiert. RNase A-Kristalle wurden in einer stufenweisen Prozedur in gepufferte Lösungen überführt, wobei der pH-Wert in Schritten von 0.2 pH-Einheiten angeglichen wurde. Die Diffraktionsexperimente wurden an der Messstation X11 am DORIS-Speicherring durchgeführt. Datensätze bei atomarer Auflösung (1.1 Å) wurden von Kristallen bei sechs verschiedenen pH-Werten im Bereich von 5.2 bis 8.8 durchgeführt und die korrespondierenden Strukturen verfeinert. Die geänderten pH-Werte induzierten die größten strukturellen Änderungen im Bereich des aktiven Zentrums. Vorhergehende kristallographische Untersuchungen zeigten bereits, dass das Histidin-12 in der Proteinmatrix verankert ist. Die neuen Daten zeigen ebenfalls, dass die Konformation der His-12 Seitenkette nicht durch Änderungen der pH-Werte beeinflusst wird. Die Mobilität dieser Seitenkette ist in allen sechs Modellen relativ gering, wie den atomaren Temperaturfaktoren entnommen werden kann. Ein Vergleich der sechs Elektronendichtekarten bei den verschiedenen pH-Werten erlaubt die direkte Beobachtung des Deprotonierungsprozesses von His-12.

Abbildung 60 zeigt die Präsenz eines Wasserstoffes am proximalen Stickstoff  $N_{\delta 1}$ . Im Gegensatz dazu ist der Wasserstoff an  $N_{\epsilon 2}$  bei azidischem pH präsent, nicht aber bei höheren pH-Werten. Diese Daten unterstützen den vorgeschlagenen Mechanismus, der einen Austausch eines Protons zwischen dem  $N_{\epsilon 2}$  von His-12 und dem Substrat annimmt. Nach unserer Kenntnis ist das die erste Demonstration für eine Restedeprotonierung in einer kristallinen Umgebung. Generell wird angenommen, dass Röntgendiffraktion auf die Entschlüsselung von statischen Prozessen beschränkt ist. Die vorgestellte Sequenz von Strukturen bei verschiedenen pH-Werten erlaubt Aufschlüsse über einen dynamischen Prozess. Die strukturellen Änderungen sind klein, aber signifikant, bezogen auf die Genauigkeit der verfeinerten Strukturen (Koordinatenfehler ist etwa 0.02 Å). Diese Studie verdeutlicht die Vorteile von kristallographischen Analysen bei atomarer Auflösung, um strukturelle Änderungen zu entdecken, die Entschlüsselungen von biologischen Funktionen erlauben.

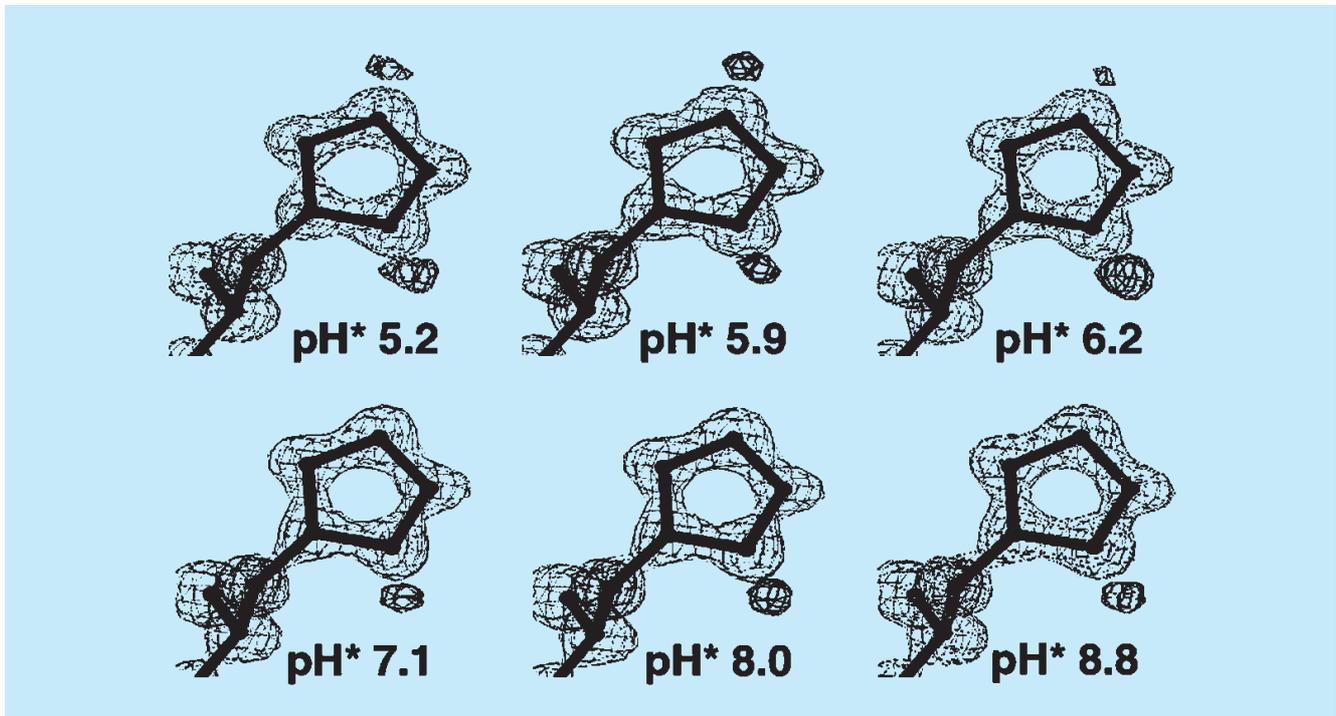


Abbildung 60: Reihe von Aufnahmen, die die Deprotonierung des Imidazolrings des  $N_{\epsilon 2}$  Atoms von His-12 zeigen: die Differenzelektronendichtekarte ist bei  $1.6 \sigma$  konturiert.

## Virale Replikationsproteine

Ziel der Untersuchungen ist es, den Prozess der DNS-Replikation am Beispiel von zwei Klassen von doppelsträngigen DNS-Viren auf molekularer Ebene zu verstehen. Von Interesse sind repräsentative Modelle für den komplizierten DNS-Replikationsprozess der Eukaryonten sowie strukturelle Information über Targets/Oberflächen für das Design von antiviralen Wirkstoffen.

In der ersten Klasse der Adenoviren findet die DNS-Replikation durch den sogenannten „Strand Displacement“-Mechanismus statt, in dem ein Protein und nicht RNS als „Primer“ eingesetzt wird. Diese Virusfamilie kodiert für drei Proteine, die wichtig für die Replikation der viralen DNS sind: die Polymerase (pol), das präterminale Protein (pTP), das einzelsträngige DNS-bindende Protein (DBP), sowie eine Protease, die für die Umwandlung von pTP in TP notwendig ist. Der Ad-5 pol-pTP Komplex wurde amplifiziert und gereinigt, und erste Kristallisationsansätze wurden durchgeführt. Geplant ist, auch das pTP der

Ad-4 zu kristallisieren. Die Expression von pol allein in Insektenzellen war sehr gering, da es toxisch für die Zellen und instabil gegen eine oder mehrere zelluläre Proteasen ist. Deshalb wurden Insektenzellen mit zwei rekombinierten Bakuloviren infiziert, die pTP bzw. pol produzieren. Hierdurch wurde eine größere Proteinproduktion des 1:1 pTP-pol Komplexes erlangt, und es konnte gezeigt werden, dass pol durch die Komplexbildung stabilisiert wird. Das pol Protein befindet sich nun in Kristallisationsansätzen. Ebenfalls wird daran gearbeitet, pol und pTP unter der Kontrolle von pol- und p10-Promotoren im selben rekombinanten Bakulovirus gemeinsam zu exprimieren (Koexpression).

Der Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) kodiert sieben Proteine, die für die Replikation der viralen DNS während der lytischen Phase notwendig sind. Das Interesse gilt der Struktur des einzelsträngigen DNS-bindenden Proteins (SSB) des Herpes Simplex Virus-1 (ICP8), welches für ein SSB Protein ungewöhnlich groß ist (128 kDa). Schon früher wurde das vollständige Protein in Insektenzellen exprimiert und ein Protokoll für die Protein-Reinigung etabliert. Das Protein wurde als

dünne Plättchen innerhalb eines engen pH-Bereichs und in Anwesenheit von Magnesium oder Kalzium kristallisiert. Die derzeitigen Kristalle diffraktieren jedoch nur bis zu einer Auflösung von 7 Å. Proteolytische Experimente mit und ohne DNS und massenspektrometrische Analysen zeigen, dass die 300 N-terminalen Reste nicht in die DNS-Protein-Interaktionen involviert sind. Sequenzanalysen und biochemische Studien deuten darauf hin, dass der C-Terminus das Lokalisationssignal für den Zellkern (NLS) beinhaltet und nicht strukturiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass diese C-terminale Region der Hauptgrund der kooperativen Bindung ist. Kristalle der C-terminalen Mutante sind größer, und es konnten Diffraktionsdaten bis 2.8 Å Auflösung gesammelt werden. Das schwache Streuvermögen der Kristalle erfordert die Nutzung von Synchrotronstrahlen, um die Phase entweder durch klassische Schweratomderivate oder durch Seleno-Methionine enthaltende Proteine zu bestimmen.

### Evolution von Proteinen in der Histidinbiosynthese

Nicht erst seit Forschungen durch Darwin im 19. Jahrhundert ist das Verstehen von Evolution über einen Zeitraum von mehreren Millionen Jahren eines der packendsten Gebiete in der Biologie. Nachdem experimentelle Aussagen über die Evolution von lebenden Organismen bis in die jüngste Vergangenheit vor allem mit paläontologischen Methoden erzielt wurden, wurde diese Forschung in den letzten Jahren durch die Kenntnis einer Vielzahl von DNS- bzw. Proteinsequenzen revolutioniert, so dass genaue phylogenetische Stammbäume der drei Königreiche der Lebewesen, der Archaeabakterien, der Eubakterien und der Eukaryonten, aufgestellt werden konnten. Diese Methoden werden zur Zeit durch die vollständige Sequenzierung der Genome verschiedener Organismen mit einer riesigen Quantität von Sequenzdaten untermauert, die vorhandene Vorstellungen von biologischen Datenmengen völlig sprengt. Die meisten kodierten Gene dieser Sequenzen sind in definierte, molekulare Raumstrukturen gefaltet. Diese Strukturen können mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und Synchrotronstrahlung bestimmt werden. Seit einigen Jahren stellt sich heraus, dass die Kenntnis dieser Strukturen für die Evolutionsforschung von größter Bedeutung ist, da das Ausmaß der Konservierung von erkennbaren gemeinsamen

strukturellen Eigenschaften größer ist als die Konservierung von nachweisbaren Sequenzähnlichkeiten.

Wegen ihrer Überschaubarkeit sind metabolische Biosynthesewege für evolutionäre Studien besonders geeignet. Das Interesse gilt den Biosynthesewegen von zwei aromatischen Aminosäuren, Histidin und Tryptophan. Beide Aminosäuren gehören zu den insgesamt zwanzig Aminosäuren, aus denen die Polypeptidketten von Proteinen aufgebaut sind, und müssen vom Menschen, nicht aber von Bakterien, mit der Nahrung aufgenommen werden. Schon vor Jahren fiel eine Häufung von sogenannten TIM-Barrelstrukturen in der Tryptophan-Biosynthese auf. Mit Hilfe dieser Strukturen wurden TIM-Barrelstrukturen für zumindest zwei Genprodukte aus der Histidinbiosynthese vorhergesagt. Die Strukturen dieser beiden Genprodukte, HisA und HisF, aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima* wurden nun aufgeklärt (Abb. 61). Tatsächlich sind beide Proteine als TIM-Barrels gefaltet, was frühere Vorhersagen bestätigt.

Darüber hinaus zeigen beide Strukturen, HisA und HisF, eine zweifache Wiederholung von Faltungsmustern in den beiden Strukturen. Diese Wiederholungen werden an charakteristischen Mustern der Schlaufen auf beiden Seiten der Barrel, identischen Resten in mehreren Positionen und praktisch identischen Phosphatbindungsstellen, deutlich. Tatsächlich können charakteristische Merkmale in allen vier Hälften (zwei von HisA, zwei von HisF) wieder gefunden werden, wenn sie übereinander gelegt werden. Somit liefern diese beiden Strukturen starke Indizien, dass beide Proteine, HisA und HisF, durch eine Genduplikation eines Halb-Barrels zu einem vollständigen primitiven Barrel, das dann weiter diversifiziert wurde, entstanden sind. Die Ergebnisse zeigen, dass die Strukturbiologie nicht nur eine Methode mit großer Zukunft ist, sondern auch Erkenntnisse in die lange Geschichte der Evolution vermittelt.

### Nichtkristalline Systeme

Röntgenstreuung an nichtkristallinen Proben wird in vielen Gebieten der Grundlagen- und angewandten Forschung in den Biowissenschaften eingesetzt. Messungen an Lösungen von Biomakromolekülen ermöglichen

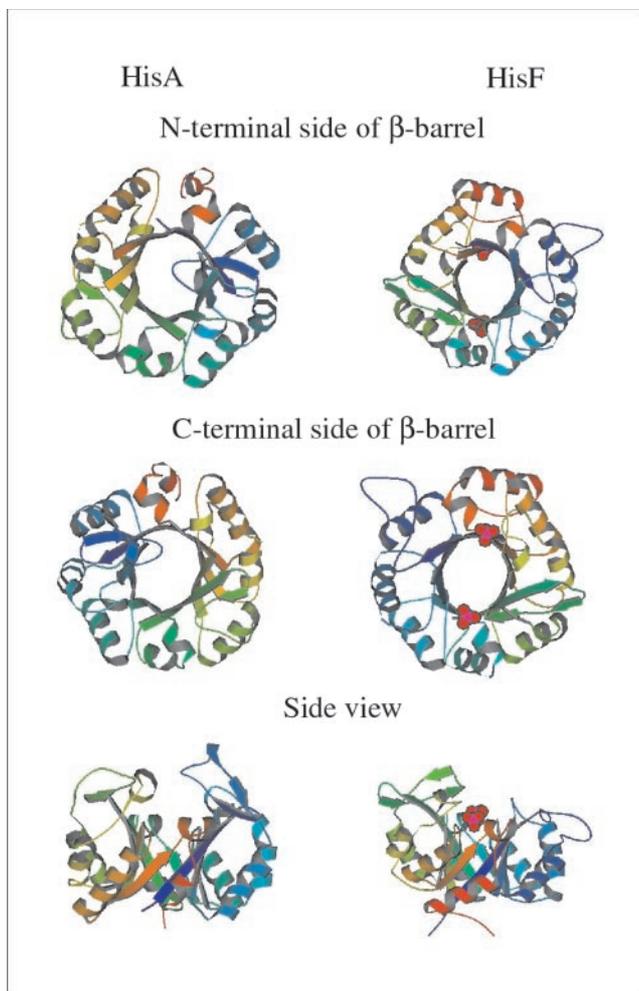


Abbildung 61: *Ribbon-Darstellungen der beiden Barrel-Strukturen von HisA und HisF aus drei unterschiedlichen Perspektiven.*

es, die Form der Moleküle oder ihrer Komplexe im nativen Zustand in Lösung zu bestimmen und eventuelle Unterschiede zu Kristallstrukturen oder elektronenmikroskopischen Modellen festzustellen. Das Interesse an diesen Anwendungen wächst, und im November fand eine von der EU finanzierte Tagung über Formbestimmung von Biomakromolekülen in Lösung statt, an der 50 Wissenschaftler aus der ganzen Welt teilnahmen.

In den eher angewandten Bereichen bieten Studien am thermischen Verhalten von potenziellen Arzneistoffträgern, von bioabbaubaren Polymeren und biokompatiblen Materialien eine Fülle an interessanten Projekten.

Die Entwicklung von ASICs („Application Specific Integrated Circuit“) für die Parallelauslese von Detektoren mit Verzögerungsleitungen und ihre Anwendung wurde im Rahmen des von der EU finanzierten PAsERO Projekts in Zusammenarbeit mit EMBL (Grenoble), Smart Silicon Systems (Lausanne), dem Institut für Biophysik und Röntgenstrukturforschung der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (Graz) und der Firma HECUS M. Braun Graz X-Ray Systems (Graz) weitergeführt.

Von den Ergebnissen der Anwendung von Synchrotronstrahlung an biologischen Systemen oder synthetischen Polymeren, die in Zusammenarbeit mit auswärtigen Gruppen erzielt wurden, werden hier nur zwei Beispiele kurz erwähnt.

Das erste ist ein neues Modell der Protein-rRNS-Verteilung im 70S Ribosom von *Escherichia coli*, das in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin) entwickelt wurde. 42 Röntgen- und Neutronenstreu Kurven von *E. coli* Ribosomen mit allen möglichen Kombinationen von deuterierten und protonierten Protein- und RNS-Anteilen in den Untereinheiten wurden simultan, mittels einer neuen Methode, analysiert. Das kryoelektronenmikroskopische Modell von Frank et al. wurde in 7890 Kugeln mit 0.5 nm Radius aufgeteilt. Jede Kugel wurde während der Verfeinerung entweder dem Lösungsmittel, dem Protein- oder dem RNS-Anteil zugeschrieben. Unabhängige Simulationen mit unterschiedlichen Startkonfigurationen gaben sehr ähnliche Resultate. Das endgültige Modell ist in Abbildung 58 abgebildet. Es zeigt die Regionen, wo es mit 95%iger Wahrscheinlichkeit Protein oder RNS gibt. 17 Proteine, deren Kristallstruktur bekannt ist, können in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Methoden positioniert werden. Dieses Modell sollte auch bei der weiteren Interpretation der Kristallstrukturen des 70S-Ribosoms und seiner 50S und 30S Untereinheiten, die in diesem Jahr erschienen sind, nützlich sein.

Das zweite, eine Studie der Teilchengrößenabhängigkeit der thermischen Eigenschaften von Lipid-Nanopartikeln der Universität Jena, ist ein Beispiel dafür, dass manchmal angewandte Projekte auch zu grundlegenden Erkenntnissen führen.

Diese Nanopartikel werden als potenzielle Arzneimittelträger erforscht. Die Ergebnisse der Röntgenmes-

sungen zeigen, dass die getrennten DSC („Differential Scanning Calorimetry“) Signale während der Aufheizung einer Suspension von Trimyristin-Nanopartikeln auf das Schmelzen von Teilchen, die sich in der Größe nur um eine Einheitszelle unterscheiden, zurückzuführen sind. Die große Ausdehnung der Gitterkonstanten bei kleineren Teilchengrößen zeigt auch, dass die klassische Oberflächenthermodynamik bei Teilchen, die nur einige Einheitszellen groß sind, nicht mehr anwendbar ist.

## Röntgenabsorptionsspektroskopie

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 Oxidationszustandes 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 Nutzer-Interfaces. Dazu wurde ein neues Si(111) 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 ein neuer Regelkreis für die Stabilisierung des Monochromator Detunings den Nutzern zur Verfügung gestellt werden. Dieser verringert die Intensitätsschwankungen auf der Probe deutlich.

Diese Verbesserungen resultierten in einer Erhöhung der Strahlintensität auf der Probe von bis zu 70%.

Von der Vielzahl der im Berichtsjahr durchgeführten Projekte wird hier ein internes Projekt skizziert.

Das Metalloenzym CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* ist ein molybdänhaltiges Eisen-Schwefel-Flavoprotein, welches die Oxidation von CO zu CO<sub>2</sub> 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. Folgerichtig 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 reduzierten 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. Mit diesen Proben wird im Jahre 2000 die Funktion aufgeklärt werden.