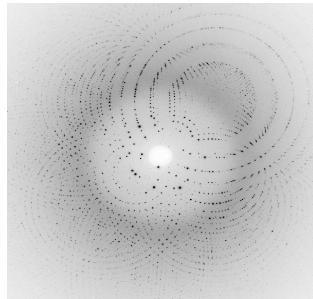


극초단 엑스선 펄스를 이용한 단백질 동영상 촬영

이효철 KAIST / hyotcherlihee@kaist.ac.kr

단백질의 정확한 3차원 구조를 아는 것은 단백질의 구조와 그 작용간의 상호 관계를 규명하는데 있어서 첫걸음이 된다. 예를 들어 효소의 작용에 대한 이해를 얻기 위해서 효소의 3차원적인 구조를 밝히기 위한 많은 노력들이 이루어져 왔다 [1]. 흔히 단백질의 구조는 단백질의 단결정의 단선 (Monochromatic) 엑스선 회절을 이용하여 밝혀낸다 [1–3]. 하지만 이 방법으로는 단백질의 정지상태에서의 구조만을 말해 줄 뿐 단백질이 작용할 때 일어나는 여러 구조들에 대한 직접적인 정보를 주지 못한다 [4]. 효소는 그 작용 과정에서 여러 가지 종류의 다른 중간체들에 대한 정보를 이해해야만 비로소 그 전체적인 작용을 이해할 수 있는 역동적인 구조체라 할 수 있으며, 따라서 이러한 중간 구조체에 대한 3차원적인 상세정보는 효소의 작용을 이해하는데 필수적이라 할 수 있다. 이러한 중간 구조체를 연구하기 위한 일환으로 흔히들 쓰는 방법은 다음과 같다. 하나는 이미 알고 있는 단백질의 작용에 중요하다고 생각되는 부분에 변이를 일으켜서 그 결과를 바탕으로 이미 세운 가정들을 검증하며 전체적인 메커니즘을 추론해 나가는 방법이고, 또 하나는 구조 중간체와 비슷할 것이라고 생각되는 치환체를 만들어서 그 구조를 연구하는 방법이며, 나머지 하나는 온도를 낮추어서 반응 속도를 줄여서 중간체를 트랩하여 그 구조를 연구하는 방법이다 [5–8]. 이러한 연구들도 물론 필요하지만 이러한 방법들의 치명적인 결점은 실온에서 일어나는 단백질의 반응에 대한 실시간적이고 직접적인 정보를 제공하지 못하며, 변이, 치환, 저온에 의한 메커니즘 자체의 변질 가능성을 배제할 수 없다는 점이다 [9].

이와 같은 문제점을 해소하기 위해 개발된 방법이 곧 단백질 단결정에 대한 시분해 엑스선 라우에 회절법 (Time-resolved x-ray Laue diffraction)이다. 라우에 회절법이 기존의 단선 (Monochromatic) 회절법과 다른 점은 곧 단선 엑스선 대신에 극히 짧은 복선 (Polychromatic) 엑스선이 사용된다는 점이다. 단선 회절법에서는 충분한 샘플링을 위해서 단결정을 진동시키는데 이와 같이 하여서는 높은 시분해 능력을 성취하기 힘들다. 라우에 회절법에서는 단 하나의 피장대신에 넓은 피장영역의 엑

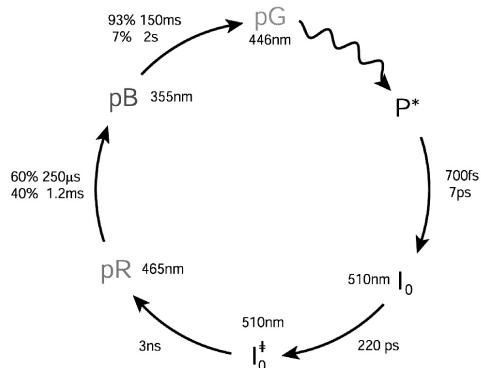


[그림 1] 시분해 라우에 회절 패턴의 예

스선이 사용되기 때문에 단결정을 진동시키지 않고 멈추어 있는 상태에서 회절 신호를 얻게 된다. 흔히 실험은 다음과 같이 진행된다. 먼저 단결정에 있는 단백질에 외부충격을 가하여 반응을 시작 시킨 후 일정시간 후 가속기에서 특수한 작동 모드에서 나오는 100 피코초 (10^{-12} 초) 정도의 극히 짧은 복선 엑스선 펄스를 보내서 단결정에서 나오는 라우에 회절 신호를 측정한다. 이 라우에 회절 신호는 곧 단백질의 구조에 대한 직접적인 정보를 담고 있으므로 시간에 따라 변하는 라우에 회절 신호를 적절히 분석하면 곧 시간에 따라 변하는 단백질의 3차원적인 상세 구조를 밝힐 수 있게 되는 것이다 [10–15]. 라우에 회절 패턴의 예를 그림 1에 나타내었다.

지금까지 이 방법을 이용하여 연구된 단백질의 종류는 그렇게 많지는 않다. 그 이유는 이 분야가 생성된 지 상대적으로 오래되지 않았고 지금까지는 실험이 용이하지 않았기 때문이다. 가장 처음 연구된 단백질은 마이오클로빈 단백질이다. 이 단백질은 가운데에 헬 그룹을 가지고 있고 이 헬 그룹이 산소나 일산화탄소 (CO)와 결합할 수 있는데 이러한 분자들이 헬 그룹에서 떨어진 후 어떻게 다시 헬 그룹에 붙는지, 혹은 어떠한 새로운 위치로 이동하는지에 대한 3차원적인 구조적 정보가 시간 분해되어 얻어졌으며 [14, 15], 최근에는 이 시간 분해능이 100 피코초대까지 발전하였다 [10]. 마이오클로빈 단백질이 두개 혹은 네 개가 붙어있다고 생각할 수 있는 헤모글로빈 단백질에 대한 시분해 라우에 결정법을 이용한 연구도 현재 활발하게 진행 중이며, 멤브레인에서 proton pump 의 역할을 감당하는 박테리아로돕신과 바이오-나노 연구에 흔히 사용되는 잘 알려진 GFP (Green Fluorescent Protein)에 대한 연구도 진행 중이다.

본 칼럼에서 좀 더 자세하게 소개할 단백질은 박테리아에서

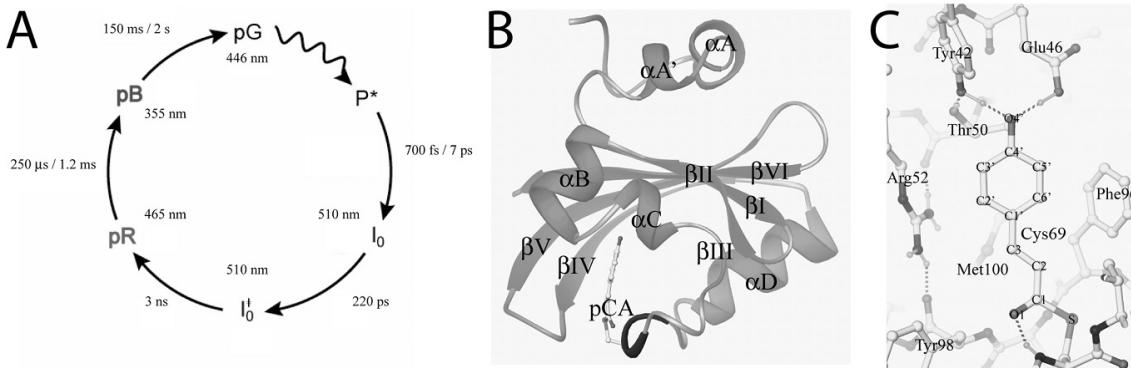


[그림 2] Photobactive Yellow Protein의 광순환도

발견되는 블루라이트 포토리셉터이다. *Halorhodopsipha halophila* [16]에서 나오는 포토액티브 엘로우 프로테인 (PYP)은 블루라이트 포토리셉터로 Cys69의 γ -황에 thioester 결합으로 공유결합되어 있는 4-hydroxycinnamic acid를 흡광단으로 가지고 있다. 이 생명체는 푸른색 빛을 비추어 주면 푸른색을 피하여 도망치기 때문에 [17] PYP는 여러 광합성 박테리아의 이러한 현상에 관여하는 전체적인 신호전달체계를 점화시키는 시작점으로 알려져 있다 [18]. 이 단백질은 크기가 작고 (14kDa) 잘 회절하는 단결정을 만들기가 쉬운 것으로 알려져 있기 때문에 [19] 신호전달 메카니즘을 분자적인 수준에서 자세히 연구하는데 있어서 우수한 모델 시스템의 역할을 해왔다. 그림 2에 나와 있는데도 평상 상태의 PYP (pG라고 표시되어 있음)는 446 nm에 흡수バンド를 가지고 있다. pG에 빛을 쪼이면 여기 상태 (P^*)가 되었다가 여러 중간 구조체를 거쳐서 레드 쉬프트된 465 nm에서 흡수하는 중간 구조체 (pR)로 변환된 후 다시 블루 쉬프트된 355 nm에서 흡수하는 pB로 변하는 것으로 알려져 있

다. 물론 이 광순환 과정의 도식은 대략적으로 표현된 것이다. 그림 3에는 엑스선 결정법으로 밝혀진 안정한 상태에서의 3차 구조와 흡광단 주위의 상세도를 나타낸 것이다. 흡광단이 주변에 있는 아미노산 그룹과 수소결합을 형성함으로써 안정한 상태에 있음을 볼 수 있다. PYP는 이미 시분해 분광학과 시분해 라우에 회절법에 의해 연구가 되어 왔다 [20-25]. 하지만 여전히 그 광순환 (포토 사이클) 중에 발생하는 여러 가지 중간체의 구조와 그 메카니즘이 최근까지만 해도 명확하게 규명되지 않은 상태였으며 정확한 중간 구조체의 숫자와 그 분자수준에서의 3차원적인 구조는 비교적 최근에 본 저자의 연구 결과에 의해 밝혀졌다.

일반적으로 시분해 분광법은 반응 중에 발생하는 중간체들의 구조에 대한 직접적이고도 자세한 정보를 제공하지 못한다. 원론적으로 말하면 분광학적인 측정 자체가 대부분, 분자의 구조보다는 여러 가지 에너지 레벨들 사이의 전이 과정에 기초한 것이므로 분광학적인 실험데이터는 구조체의 분포에 대한 정보보다는 에너지 레벨들의 분포변화에 대한 정보를 준다고 할 수 있다. 이러한 분광학적인 정보가 구조동력학적 정보를 도출하는데 이용되기 어려운 이유는 다음과 같다. 우선, 앞에서도 언급한 것과 같이 분광학적인 정보를 구조정보로 전환하기가 일반적으로 불가능하다는 점이다. 극히 작은 소분자의 경우, 적외선 분광법이나 라マン 분광법을 통해 경우에 따라서는 분자의 대칭구조등 기하학적인 구조에 대한 힌트를 제공하는 경우가 많으며 이러한 분광학적인 방법들이 시분해적인 차원에서 적용될 때에는 소분자의 구조변화에 대한 제한된 정보를 제공할 수 있다. 하지만 분자의 크기가 증대함에 따라 이러한 방법들은 곧 그 한계에 도달하게 되며, 단백질과 같은 거대분자의 경우 3차원적인 구조정보

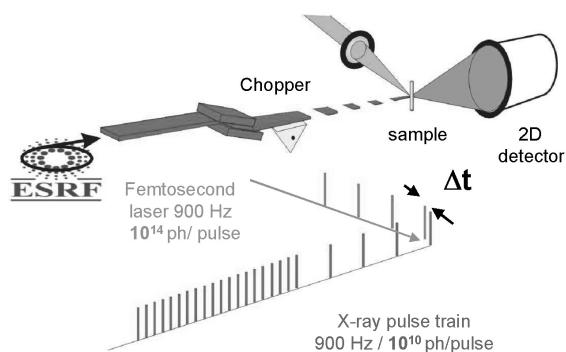


[그림 3] PYP 단백질의 안정한 상태에서의 3차 구조. 왼쪽은 전체적인 구조이고 오른쪽은 흡광단 주위의 수소 결합을 자세하게 나타낸 것임.

를 제공하는 방법은 NMR과 엑스선 단결정법(X-ray Crystallography)들에 제한되어 진다. 두 번째로, 분광학적인 신호는 에너지 레벨들 사이의 전이에 기초하므로 중간체들이 광학적 펄스에 민감하지 않은 경우 왜곡된 정보를 줄 수 있다는 것이다.

이러한 시분해 분광학의 문제점들을 극초단 시분해 회절법을 이용하여 피할 수 있으며 이율러 우리가 얻고자 하는 단백질의 3차원적인 구조변화에 대한 정보를 얻어낼 수 있다. 이 방법을 이용한 실험에서는 앞에서도 언급한 바와 같이 극히 짧은 레이저 펄스(예를 들어 펨토초)를 이용하여 연구하고자 하는 시료의 반응을 점화 시킨 후 일정 시간동안 반응이 진행되도록 한 후 극히 짧은 전자나 엑스선 펄스를 반응하고 있는 분자들에 보내어 그 회절 신호를 얻는다. 이 회절신호는 분자들의 결합각이나 결합길이와 같은 분자구조와 직접적인 연관이 있으므로 시간에 따른 회절신호를 분석함으로써 반응 중 일어나는 분자들의 구조변화에 대한 자세한 정보를 추출할 수 있으며 궁극적으로는 반응 메카니즘에 대한 확실한 답을 밝혀낼 수 있게 된다. 현재 가장 높은 시분해도(time resolution)는 프랑스의 그라노블에 있는 유럽방사광가속기(ESRF)에서 가능하며 미국 아르곤 국립 연구소에 있는 Advanced Photon Source에서도 비슷한 실험이 가능하다. 아직까지 활발한 연구는 이루어지지 않고 있으나 일본의 Photon Factory에 있는 고에너지 빔 물리학 연구에 사용되던 기존의 Advanced Ring을 최근에 개조하여 비슷한 실험을 추진하고 있는 것으로 알려져 있다.

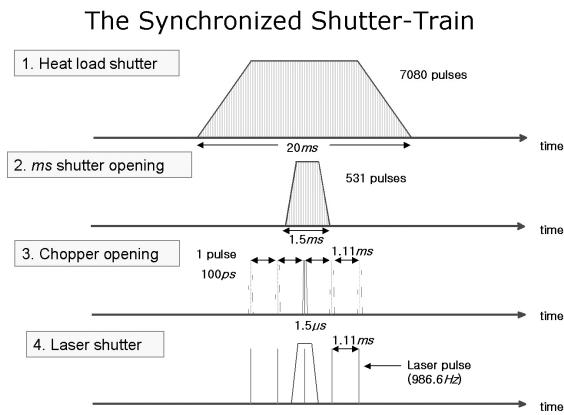
그림 4는 시분해 라우에 회절법의 대략적인 구조도이다. 그림에서 보는 바와 같이 ESRF의 ID09 빔라인에 있는 Ti:Sapphire 펨토초 레이저 시스템에서 나오는 펨토초 레이저 펄스에 의해 단결정에 있는 PYP 단백질의 광순환 과정을 점화 시킨 후 일정한 시간(Δt) 후에 ESRF에서 특수한 작동 모드에서 제공되는 100 피코초 정도의 극히 짧은 복선 엑스선 펄스를 단결정에 보내어 반응 중인 단백질의 구조를 회절신호에 담아내게 된다. 회절 신호 자체는 2차원적 디렉터인 CCD에서 측정된다. 전체적인 메카니즘 규명을 위해서는 레이저 펄스와 엑스선 펄스사이의 시간을 변화 시키면서 회절 신호를 얻어야 한다. 일반적인 반응과는 달리 단백질에서 일어나는 반응은 그 시간대가 짧게는 펨토초부터 길게는 수 분, 혹은 수 일이 걸리므로 이러한 실험에서는 시간대를 일반적인 시간 스케일보다는 로그 스케일에서 균등화



[그림 4] 시분해 라우에 회절법의 대략적인 구조도

게 나누어서 시간별 신호를 얻는다. 가장 좋은 조건에서는 물론 각 시간당 단 하나의 엑스선 펄스만으로 충분한 회절신호를 얻는 것이 최적이겠지만 일반적인 경우에 충분한 신호대 잡음비에 도달하기 위해서는 10번 이상의 엑스선 펄스를 이용하여 신호를 모으는 것이 필요하다. 문제는 펨토초 레이저 펄스는 약 900 Hz의 빈도로 만들어지는 반면 가속기에서 제공되는 엑스선은 그보다 훨씬 빈번한 빈도로 제공 된다는 점이다. 따라서 이 엑스선 펄스들 중 단결정의 반응을 점화하는데 사용되는 레이저 펄스에 해당되는 엑스선 펄스들만을 구별해 낼 필요가 있다. 이와 같은 이유 때문에 엑스선의 진행선상에 여러 개의 엑스선 셜터(shutter)와 차퍼(chopper)들을 배치하여 필요가 없는 엑스선 펄스들을 제외시키게 된다. 이 같은 복잡한 과정을 그림 5에 도식으로 표현하였다. 먼저 heat load shutter를 사용하여 약 20 밀리초정도에 해당하는 펄스 트레이인을 구별한 후 ms-shutter를 사용하여 그 중 1.5 밀리초에 해당하는 펄스 트레이만을 남기고 나머지는 쳐낸다. 마지막으로 가장 중요한 단계는 이 1.5 밀리초에 포함되어 있는 531개의 엑스선 펄스들 중 단 하나만의 엑스선 펄스만을 선별해 내는 일이다. 이 어려운 작업이 가능하기 위해서는 약 1.5 마이크로초 정도의 개구 시간을 가진 차퍼가 필요 한데 다행이 삼각형 차퍼의 개발로 인하여 현재의 기술로 가능하다. 펨토초 레이저 시스템에서 나오는 레이저 펄스들 중에서 필요한 펄스만을 뽑아 내는 것은 전자적인 신호로 충분히 가능 하며 레이저 펄스와 엑스선 펄스 사이의 간격, 즉 반응 시간 Δt 도 전자적인 신호를 이용하여 구현해 낸다.

가속기에 실험을 하려 가기 전에 먼저 단백질의 단결정을 모세유리관에 다른 버퍼와 함께 탑재한 후 공기가 통하지 않아서 건조해지지 않도록 한다. 빔라인에서는 이 단백질 단결정이 탑재

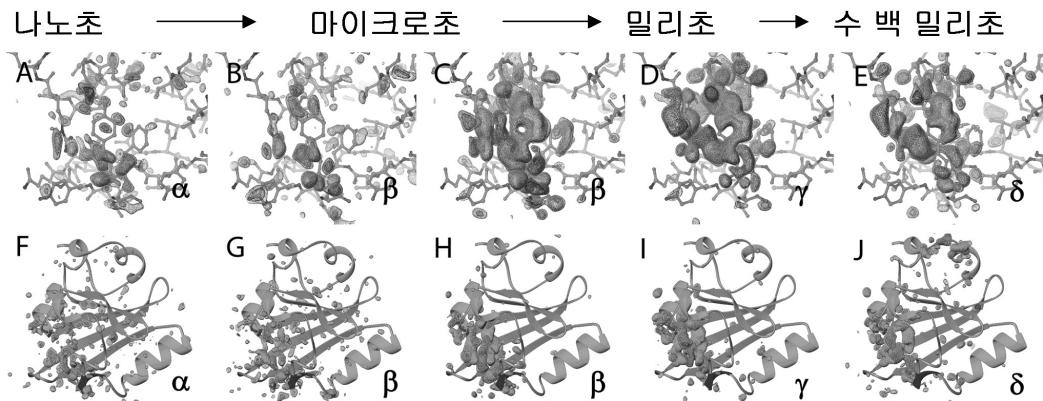


[그림 5] 시분해 실험을 실현시키기 위해 필요한 여러 필스들에 대한 도식도 된 모세유리관을 고니오미터 헤더 (goniometer head)에 고정 시킨다. 이 고니오미터는 단결정과 엑스선 사이의 상대적인 각도를 결정한다. 정해진 Δt 에서 단백질의 3차원 구조에 대한 정보를 구하기 위해서는 최대한 많은 reciprocal space를 커버할 필요가 있다. 이를 위해서는 단결정을 한 가지 각도에서 뿐 아니라 여러 가지 방향으로 배치한 상태에서의 회절 신호들을 모아서 조합할 필요가 있다. 따라서 원반한 시분해 라우에 회절을 위해서는 다중의 Δt 와 또 다중의 HKL (즉, 리씨프로칼 공간)의 정보를 수집할 필요가 있다. 다시 말해서, 다차원적인 정보를 얻어야 하는 것이다. 이를 위해서는 적어도 두 가지의 측정 전략을 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 Δt 를 고정시킨 후 필요한 만큼 각도를 변화시키면서 충분한 데이터를 얻은 후 다시 Δt 를 변화시키고 또 각도를 변화 시키면서 충분한 데이터를 얻는 방법이다. 바로 이 방법이 시분해 라우에 회절 실험에서 다른 실험자들에 의해 흔히들 사용되는 방법이다. 하지만 이 방법의 결정적인 문제점은 Δt 사이에 불필요한 잡음이 들어 갈 수 있다는 점이다. 예를 들어 Δt_1 에서의 회절 신호 측정시에는 레이저가 강하였다가 다음 Δt , 즉 Δt_2 에서의 회절 신호 측정시에 레이저가 약해지면 레이저에 의해 생성되는 중간체들의 절대적인 양에 변화가 생기며 이는 곧 중간체들의 분포변화를 통해 메카니즘을 규명하려는 시도에 타격적인 어려움을 유발하게 된다. 이를 보완하기 위해서는 다른 측정 전략이 필요하다. 즉, Δt 를 고정시키고 각도를 변화시키면서 충분한 데이터를 얻는 대신에 단결정의 엑스선에 대한 상대적인 각도를 고정시킨 후 필요한 Δt 들을 변화 시키면서 그 고정된 각도에 대한 여러 Δt 들에서의 회절 신호를 측정한 후, 상대적인 각도를 변화시키고 다시 그 고정된 각도에서의 여

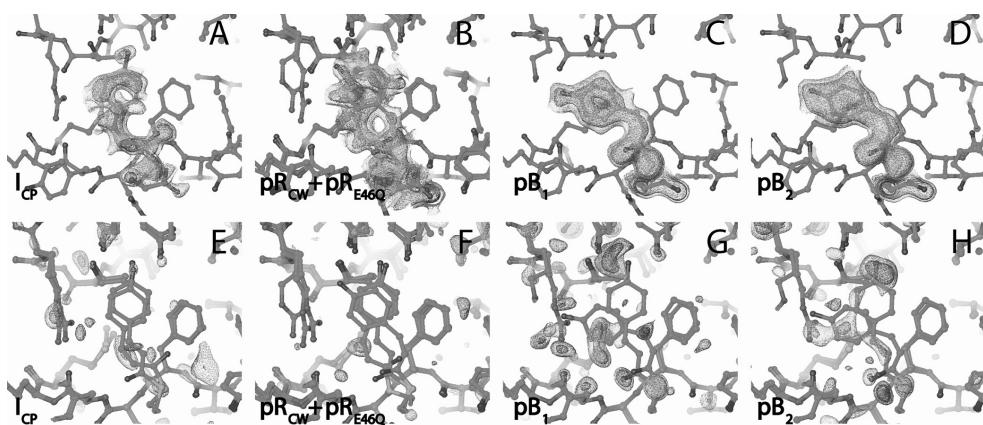
러 Δt 들에 대한 회절 신호를 측정하는 방식이다. 이와 같이 데이터를 수집하는 경우에는 레이저의 강도에 변화가 생기더라도 그것이 중간 구조체의 생성량에 미치는 영향은 모든 Δt 에 골고루 퍼지기 때문에 상관이 없게 된다.

이렇게 얻어진 데이터는 2D 이미지들이다. 즉 각 시간에서 여러 각도들에 대한 여러개의 이미지들을 모으게 되고 이 이미지는 그림 1에서 보는 것처럼 수 많은 점들로 이루어져 있다. 각 점은 각각의 hkl에 대한 정보를 담고 있고 각 점들의 세기를 적분하게 되면 결국 $F(hkl, t)$, 즉 각 시간 t 에서의 structure amplitude를 얻게 된다. 중요한 것은 이 $F(hkl, t)$ 보다는 기준 시간, 즉 반응이 일어나기 전인 마이너스 시간 (t_{ref})을 기준으로 한 $\Delta F(hkl, t) = F(hkl, t) - F(hkl, t_{\text{ref}})$ 이다. 이 ΔF 를 푸리에 변환하게 되면 $\Delta d_{xyz}, t$, 즉 시간에 따른 3차 공간에서의 전자 밀도 변화에 대한 정보를 주게 된다. 그림 6에 이러한 전자 밀도의 예를 나타내었다. 이 그림을 보면 나노초부터 시작해서, 마이크로 초, 밀리 초, 그리고 수백 밀리 초로 반응이 진행되는 동안 단백질의 전자 밀도의 변화를 알 수 있다. 전자 밀도란 곧 단백질을 이루는 원자들의 위치를 말해주므로 이러한 그림으로부터 원자들의 위치가 어떻게 변하는지, 즉 분자 구조가 어떻게 변하는지 알 수 있게 된다. 여기서 한 가지 주목할 것은 처음에는 신호가 흡광단에만 집중되어 있다가 수백 밀리초가 되면 N-터미널 말단으로 신호가 전달된다는 것이다. 이러한 신호전달을 눈으로 직접 확인할 수 있는 직접적인 정보를 제공한 것은 시분해 라우에 회절로만 가능하다.

반응이 진행됨에 따라 새로운 중간체들이 생성 소멸 하므로 각 시간에서는 여러개의 중간체들이 섞여 있다. 여러 가지 수학적인 분석 도구들, 예를 들어 Singular Value Decomposition (SVD)를 사용하게 되면 섞여 있는 데이터로부터 각각의 순수한 중간체들에 대한 정보를 추출해 낼 수가 있다. 그림 7은 이렇게 얻어진 중간체들을 나타낸 것이다. 그림 8에서는 이러한 중간체들이 어떠한 반응속도론적인 연결고리를 가지고 있는지 그리고 각 중간체들이 시간에 따라 어떠한 농도분포를 가지고 있는지를 나타내었다. 그림 8과 같은 정보는 흔히 시간분해 분광법을 통해서 얻는 정보와 비슷하다. 시간분해 회절법의 강점은 그림 8과 같은 정보외에도 그림 6과 그림 7과 같은 구조적인 정보를 제공한다는 것이다. 이러한 구조적인 정보가 있기 때문에 그림 9에서와 같이 흡광단이 시간에 따라 어떠한 구조적인 메커니즘을 가



[그림 6] 시간대에 따른 단백질내의 전자 밀도 변화. 원쪽 부터 오른쪽으로 갈수록 시간이 길어진다. 아랫쪽은 전체 단백질을 보여주고 윗쪽은 흡광단 주위를 상세하게 보여준다. 수 백 밀리초에서는 N-터미널 쪽에 신호가 나타난다.

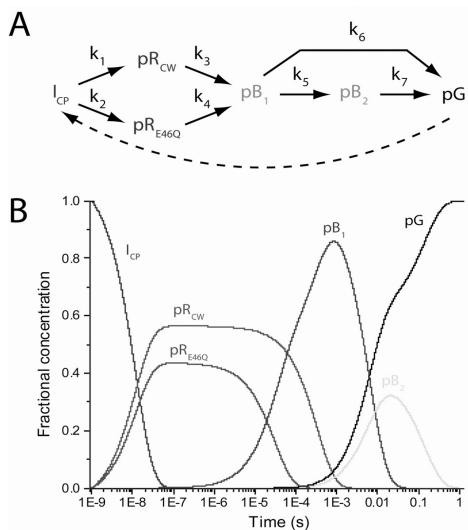


[그림 7] 데이터 분석에서 얻어진 중간체들의 구조

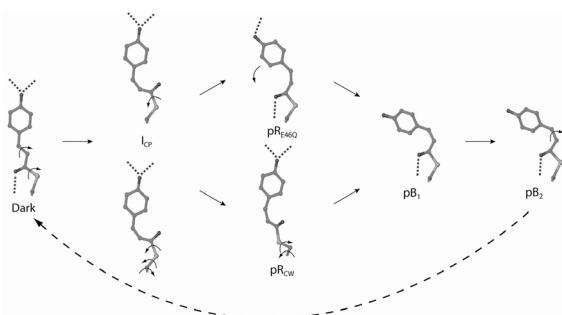
지고 변화하는지를 생생하게 보여 줄 수가 있는 것이다. 그림 9를 자세히 들여다 보면 흡광단이 빛을 받는 순간 두개의 결합이 동시에 회전하는 소위 “자전거 페달” 모션을 통해서 새로운 구조 (I_{CP})를 형성하게 된다. 이 새로운 구조는 두 개의 경로를 통해서 다음 단계의 구조로 넘어가는데 첫 번째는 C-S 결합의 회전을 통해 pR_{E46Q} 구조가 생기는 것이고 두 번째는 S-S 주변의 세 개의 결합의 회전을 통해 pR_{CW} 구조가 생기는 것이다. 재미있는 것은 이렇게 생긴 두개의 구조가 시간이 지나면 결국에는 똑 같은 pB_1 구조로 변한다는 것이다. pB 은 pB_2 구조로 변하게 되는데 이 구조는 그림에서 보는 바와 같이 pB_1 과 거의 유사하지만 그림 6에서 보이는 것처럼 흡광단이 아닌 N-터미널에서 신호를 보이는 것이 다르다. 시간이 더욱 많이 지나면 이 마지막 중간체

도 결국 원래 상태의 pG 로 돌아가서 광순환이 완성된다.

현재 한국에서는 단백질 단결정의 시분해 라우에 회절법을 이용한 단백질의 구조동력학적 연구를 진행하는 곳이 전무한 상태이다. 현재까지는 대부분의 단백질에 대한 연구가 정지된 상태의 구조를 밝히는 것에 집중되어 왔지만 이제 앞으로는 정지된 상태의 구조뿐 아니라 반응이 진행되는 상태에서의 구조변화에 대한 연구가 늘어날 전망이며, 앞으로 시분해 라우에 회절을 이용한 단백질의 구조동력학적 연구에 대한 관심이 높아지고 이 연구방법의 국내 확산을 통하여 이 분야에서의 한국의 연구수준이 세계선도 수준으로 나아가기를 기대한다. 현재 미국과 유럽에서는 시분해 회절법에 대한 관심이 고조되고 있는 추세이며 특히 현재 제 3 세대 가속기에서 제공될 수 있는 100 피코초 정



[그림 8] 데이터 분석을 통해 얻어진 최종적인 반응속도론적 기작과 중간체들의 시간에 따른 농도 변화



[그림 9] 콤팩트한 구조동력학적 메커니즘

도의 액스선 펄스보다 1000배 정도 더 짧고 그 강도도 적어도 1000배 정도 더 높은 자유전자레이저 (Free electron laser) 기술을 기반으로 한 펨토초 초강도 액스선 펄스 구현을 위하여 총력을 기울이며 서로 경쟁하며 경주하고 있다. 본 저자가 바라는 바는 우리나라로 자유전자레이저 기술의 시급한 개발에 대한 경각심을 높여서 세계적인 추세에 한국이 뒤쳐지지 않고 오히려 선구적인 역할을 감당하는 것이다. ☀

참고문헌

- [1] 2003년 현재까지 Protein Data Bank에 보고된 단백질의 구조는 12,000개가 넘으며 그 중 3000개 이상이 효소로 구분지어졌다. [H.M.Berman et al. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235]
- [2] J. Drench, *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer Verlag, **1994**.
- [3] International Tables for X-ray Crystallography, Kluwer Academic Pub., **1983**.
- [4] K. Moffat, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 1569
- [5] Bolduc et al., *Science*, **1995**, *268*, 1312
- [6] A. Ostermann, R. Waschikpy, F. G. Parak, G. U. Nienhaus, *Nature*, **1999**, *404*, 205
- [7] I. Schlichting et al., *Science*, **2000**, *287*, 1615
- [8] S. B. Long, P. J. Casey, L. S. Beese, *Nature*, **2002**, *419*, 645
- [9] K. Moffat, R. Henderson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1995**, *5*, 656
- [10] F. Schotte et al., *Science*, **2003**, *300*, 1944
- [11] U. Genick et al., *Science*, **1997**, *275*, 1471
- [12] B. Perman et al., *Science*, **1998**, *279*, 1946
- [13] Z. Ren et al., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 13788
- [14] V. Srager et al., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 3988
- [15] V. Srager et al., *Science*, **1996**, *274*, 1726
- [16] M. A. Cusanovich, T. E. Meyer, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 4750
- [17] W. W. Sprenger, W. D. Hoff, J. P. Armitage, K. J. Hellingwerf, *J. Bacteriol.*, **1993**, *175*, 3096
- [18] R. Kort et al., *Embo J.*, **1996**, *15*, 3209
- [19] G. E. O. Borgstahl, D. R. Williams, D. E. Getzoff, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 6278
- [20] T. E. Meyer, G. Tollin, J. H. Hazzard, E. Cusanovich, *Biophys. J.*, **1989**, *56*, 559
- [21] W. Hoff et al., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 13959
- [22] Ng, K., Getzoff, E. D. and Moffat, K. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 879
- [23] L.Ujj, S. Devanathan, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, G. Tollin, and G. H. Atkinson, *Biophys. J.*, **1998**, *75*, 406
- [24] R. Brudler, R. Rammelsberg, T. Woo, E. D. Getzoff, K. Gerwert, *Nat. struct. biol.*, **2001**, *8*, 265
- [25] K. Takeshita, Y. Immamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, M. Terazima, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3037