

# Kapitel 1

## Einleitung

In allen lebenden Organismen werden chemische Reaktionen durch Enzyme katalysiert. Proteine sind Polypeptidketten, deren Bausteine die 20 natürlichen Aminosäuren bilden. Die in ihrer Primärstruktur linearen Peptidketten falten zu dreidimensionalen Proteinen, in die Metallionen oder organische Moleküle eingebunden werden können, welche oft das katalytische Zentrum des Enzyms bilden. Um die Funktionsweise eines Enzyms zu verstehen, sind sowohl Kenntnisse der Proteinstruktur als auch die Möglichkeit Proteindynamik zu beobachten, unerlässlich. Röntgen-Kristallstrukturanalyse liefert dreidimensionale statische Strukturen von Proteinen zum Teil mit einer hohen Auflösung. Kompakt gefaltete Strukturen können oft gut beschrieben werden, da sich ihre definierte Struktur durch die Kristallisation kaum ändert. Dagegen entziehen sich flexible Regionen, nicht kristallisierbare Proteine, bewegliche Untereinheiten und Proteine, deren Struktur durch die Umgebung bestimmt wird, einer Kristallstrukturanalyse. Oft ist die Funktionalität eines Enzyms an strukturelle Freiheitsgrade geknüpft, welche in der Kristallpackung eingefroren werden oder eine Kristallisation verhindern. Nur Methoden, mit denen Enzyme in Lösung untersucht werden, können eine funktionale Struktur der Protein liefern. Zu diesen Methoden gehören Kernspin-Resonanz (NMR), Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) sowie Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET). Während die NMR prinzipiell vollständige Lösungsstrukturen von Proteinen liefern kann, werden EPR und FRET zur Bestimmung lokaler Geometrien verwandt.

EPR wird insbesondere bei Enzymen mit metallischen Katalysezentren sowie bei Kofaktoren in Elektronentransferreaktionen eingesetzt, da dort Strukturen katalytischer Zentren, paramagnetischer Intermediate und Triplettzuständen

sowie Geschwindigkeiten von Elektronentransferschritten bestimmt werden können.

Durch das Konzept der Spinsonde – stabile paramagnetische, kleine Moleküle, welche sich am zu untersuchenden Makromolekül anlagern oder sich mit ihm in definierter Weise verbinden – wurden auch an sich diamagnetische Moleküle der EPR-Spektroskopie zugänglich. Vor über 20 Jahren wurde die Abstandsbestimmung zwischen zwei paramagnetischen Zentren mittels gepulster EPR auf einen Abstandsbereich bis zu 8 nm erweitert [1, 2]. In demselben Zeitraum wurde die Punktmutagenese von Proteinen und damit die ortsgerichtete Spinmarkierung etabliert [3, 4, 5]. Die Kombination dieser beiden Methoden hat sich zu einem wichtigen Werkzeug in der Strukturuntersuchung von Proteinen entwickelt und gehört heute zum Standardrepertoire der EPR-Spektroskopie [6]. Über die elektronischen Eigenschaften des Spinlabels kann die Zugänglichkeit des Labels sowie die Polarität der Proteinumgebung untersucht werden. Die Beweglichkeit des Spinlabels gibt Anhaltspunkte zur Proteindynamik. Bei zweifacher Spinmarkierung kann aus der dipolaren Kopplung der Abstand zwischen den Spinlabels ermittelt werden.

Die EPR-Untersuchung der geometrischen Struktur einzelner paramagnetischer Zentren und der dipolaren Kopplung zweier Spinzentren kann kombiniert werden, damit ist nicht nur eine Bestimmung des Abstands sondern auch der relativen Orientierung der beiden Spinsysteme möglich. Diese Methodik wird im ersten Teil der Arbeit vorgestellt und soll zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen angewandt werden. Um eine Verbindung zwischen der Geometrie der Spinsysteme und der Sekundärstruktur des Peptids schaffen zu können, wurde ein Spinlabel gewählt, welches in starrer geometrischer Beziehung zum Proteinrückgrat steht. Dieses Spinlabel ist eine artifizelle Aminosäure, daher wurden als Modellsysteme chemisch synthetisierte *de novo* Peptide untersucht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen an dem Enzym 5'-Nucleotidase, welches Phosphate von Nucleosiden abspaltet, durchgeführt. Dieses besteht aus zwei Untereinheiten, welche gegeneinander drehbar sind [7]. Es wird vermutet, daß die Domänenbewegung für den katalytischen Prozeß des Enzyms von Bedeutung ist. Die Struktur der beiden Untereinheiten wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt, der Drehwinkel jedoch hängt von den Kristallisationsbedingungen ab [8]. Es soll gezeigt werden, wie mit EPR-Messungen zwischen einem paramagnetischen Zentrum in der einen Untereinheit und einem weiteren Spinzentrum in der zweiten Untereinheit Ab-

---

standsrestriktionen geschaffen werden können, welche die Konformation des Enzyms beschreiben. Weiterhin soll untersucht werden, ob durch das Enzymsubstrat eine Änderung der Konformation induziert wird, und damit dynamische Proteinstrukturen beobachtet werden können.

In dieser Art Strukturbestimmung ist der Einsatz von Spinsonden nur sinnvoll, solange die räumliche Struktur des Protein nicht durch die Spinsonde geändert wird. Dies kann schon durch die Mutation des Proteins, aber auch durch die sterischen bzw. elektrostatischen Wechselwirkungen des Spinlabels bedingt werden. Es wird daher die in der einen Untereinheit vorhandene Metallbindungsstelle genutzt und mit einem  $\text{Mn}^{\text{II}}$  besetzt, nur an der anderen Untereinheit wurde ein Spinlabel angebracht. Bei diesen Untersuchungen sollen auch methodische Ansätze erarbeitet werden, da Abstandsmessungen meistens zwischen zwei Spinlabeln, aber selten zwischen Metallzentren [9], insbesondere kaum zwischen Hochspinzentren, durchgeführt werden [10]. Auch die in Proteinen häufig auftretenden Metallcluster werden selten zu einer Strukturanalyse des Proteins herangezogen. ELDOR-Experimente an mehrkernigen Metallzentren wurden bisher nur am  $\text{Mn}_4$ -Cluster im Photosystem II beschrieben [11]. Daher wurde im dritten Teil der Arbeit die dipolare Kopplung zwischen zwei komplexen Metallzentren, einem  $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Cluster und einem  $[\text{NiFe}]$ -Zentrum, in der Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F bestimmt. Die Struktur des Enzyms ist aus Röntgenstrukturanalysen mit hoher Auflösung sowie EPR- und ENDOR-Messungen an den paramagnetischen Metallclustern bekannt [12]. Die experimentell ermittelte dipolare Kopplung zwischen den beiden Spinzentren stimmt nicht mit dem Wert überein, der für zwei Punkt-Dipole in den Zentren der Metallcluster erwartet wird. Daher wird untersucht inwieweit die elektronische Struktur eines gekoppelten Metallclusters die Spin-Spin Kopplung zwischen verschiedenen Spinzentren beeinflusst und welche Information aus der Abweichung der dipolaren Kopplung vom Idealfall zweier Punktdipole gewonnen werden kann.

