

Kapitel 6

Zusammenfassung

Strukturuntersuchungen an Proteinen bilden die Grundlage für ein molekulares Verständnis enzymatischer Mechanismen. Die EPR-Spektroskopie hat sich dabei zu einer Methode entwickelt, welche die Proteine in ihrem funktionalen Zustand untersuchen kann. Da selektiv die Umgebung paramagnetischer Zentren beobachtet wird, können einerseits proteinogene Metallzentren und paramagnetische Intermediate untersucht werden, andererseits können mittels ortsgerechterer Mutagenese Spinsonden eingebracht werden, welche die ausgewählte Umgebung beobachten. Für weitreichendere Strukturuntersuchungen werden Abstandsmessungen zwischen zwei Spinlabeln eingesetzt. Diese Anwendung wurde in dieser Arbeit in verschiedenen Hinsichten methodisch erweitert.

Orientierungsbestimmung an *de novo* Peptiden

EPR-Untersuchungen an zweifach spinmarkierten *de novo* Peptiden wurden zur Bestimmung der Sekundärstruktur eingesetzt. Sekundärstrukturen werden in der Literatur meist über Abstandsmessungen an mehreren Spinlabelpaaren durchgeführt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß den EPR-Messungen mehr Parameter entnommen werden können, so daß die Zahl der markierten Peptide prinzipiell verringert werden kann. Es wurde nicht nur der Abstand, sondern auch die Orientierung der Spinlabel ermittelt, indem die Abhängigkeit des g -Tensors von der Molekülstruktur mit der Orientierungsabhängigkeit der dipolaren Kopplung verknüpft wurde. Es werden methodische Ansätze zur präzisen Bestimmung von Abstand und Orientierungsparametern unter Einsatz von Messungen in verschiedenen Frequenzbändern und unterschiedlichen Temperaturregimen vorgestellt. Die Struktur insbesondere kurz-

er Peptide hängt stark von ihrer Umgebung ab, jedoch gibt es bisher keine hinreichende physikalische Beschreibung dieser Effekte, welche eine Strukturvorhersage möglich machen würde. Daher wurden die *de novo* Peptide in Lösemitteln unterschiedlicher Polarität und Protizität untersucht. Es wird gezeigt, daß die ermittelten Peptidkonformationen nicht durch die klassischen Typen von Sekundärstruktur beschrieben werden können. Die EPR-Spektroskopie bietet eine genauere Beschreibung der Peptidkonformation, welche genutzt werden kann, um den Einfluß unterschiedlicher Umgebung auf die Konformation eindeutig zu charakterisieren.

Domänenbewegung in der 5'-Nucleotidase

Die 5'-Nucleotidase ist ein Enzym mit zwei Untereinheiten, für die eine Rotation im katalytischen Prozeß vermutet wurde. Die Struktur beider Untereinheiten ist aus Röntgenstrukturuntersuchungen bekannt, deren relative Anordnung hängt jedoch von den Kristallisationsbedingungen ab. Für EPR-Messungen wurde an der einen Untereinheit ein Spinlabel angebracht. Um die Proteinstruktur möglichst wenig zu stören wurde als zweites Spinsystem das katalytische Zentrum in der anderen Untereinheit genutzt und mit einem Mn^{II} besetzt. Es konnte die Konformation des Enzyms in Lösung ermittelt werden und daß sich die Konformation des Enzyms bei Substratzugabe ändert.

Es wurden Methoden beschrieben wie eine proteinogene Metallbindungsstelle als *Spinlabel* bei Abstandsmessungen genutzt werden kann. Dies ist bei der Untersuchung von Proteinen interessant für die noch kein Expressionssystem vorhanden ist oder die Struktur durch eingebrachte Spinlabel gestört wird. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin wie die EPR Abstandsrestriktionen schaffen kann, welche in Kombination mit Kristallographiedaten funktionale Strukturen und Strukturänderungen beschreiben.

ELDOR an mehrkernigen Metallzentren in der Hydrogenase

Mittels gepulster ELDOR-(Elektron-Elektron Doppelresonanz) Untersuchungen wurde die dipolare Kopplung zwischen zwei paramagnetischen Zentren, einem $[3Fe-4S]^+$ -Cluster und einem $[NiFe]$ -Zentrum in der Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F bestimmt. Der Abstand zwischen den Metallzentren ist aus Röntgenstrukturuntersuchungen bekannt. Die experimen-

tell ermittelte dipolare Spin-Spin-Wechselwirkung weicht von dem erwarteten Wert für je einen Punkt-Dipol in den Zentren der beiden Metallcluster ab. Ein erweitertes Spinkopplungsmodell, welches die Spinkopplung im $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster berücksichtigt, liefert die beobachtete Wechselwirkung unter der Annahme eines speziellen magnetischen Kopplungsverhaltens für die drei Fe-Ionen. Diese Ergebnisse zeigen, daß das gepulste ELDOR Experiment genutzt werden kann, um Einblick in die innere Struktur von mehrkernigen Metallzentren zu erhalten. Für eine Abstandsbestimmung zwischen Metallzentren ist die Kenntnis der Spinkopplung im Metall-Cluster notwendig.

Die Abhängigkeit der dipolaren Kopplung zwischen einem mehrkernigen Metallcluster und einem Beobachterspin von der inneren Struktur des Metallclusters muß auch in anderen Systemen berücksichtigt werden. Ein prominentes Beispiel ist der tetramere Mangancluster im Photosystem II. Die dort bestimmten Abstände [11] und Abstandsänderungen [128] sollten unter Einbeziehung der Spinkopplung im Mangancluster und deren Änderung im Kock-Zyklus neu interpretiert werden.

Die hier beschriebenen Methoden erweitern den Anwendungsbereich der EPR für Strukturuntersuchungen an Makromolekülen. Sie eignen sich insbesondere für ein Verständnis von strukturellen Änderungen in Proteinen und den damit verbundenen strukturdynamischen Grundlagen der enzymatischen Katalyse.

