

**Die Domänenbewegung der
5'-Nukleotidase aus *Escherichia coli*:**

**Strukturelle und biochemische
Untersuchungen
mittels disulfidverbrückter
Enzymvarianten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem Fachbereich Chemie, Biologie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von Robert Schultz-Heienbrok

Berlin, im März 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis März 2004 unter Anleitung von Prof. Dr. N. Sträter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Saenger im Institut für Chemie/Kristallographie der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sträter
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Multhaup

Eingereicht am 23. März 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2004

ABSTRACT

The enzyme 5'-nucleotidase from *E. coli* hydrolyses phosphoester and phosphoanhydride bonds of various nucleotides. Four different crystal structures of the enzyme revealed that the two domains of the monomeric protein can assume different conformations with a maximum rotation of 96° of the C-terminal domain relative to the N-terminal domain.

In this thesis the two domains of the proteins were cross-linked via two genetically introduced cysteine residues that form a disulfide bridge. To trap the protein in both an open and closed conformation two double mutants were created: Ser-228→Cys, Pro-513→Cys (open conformation, referred to as SP-protein) and Leu-424→Cys (closed conformation, referred to as PL-protein). The modified genes could be expressed and the proteins could be purified. The PL-protein crystallised in a tetragonal crystal form, whereas two different crystal forms (one tetragonal and one monoclinic) of the SP-protein were obtained.

Structure analysis revealed that the cross-linked enzyme variants were still very flexible. This is apparent from a comparison of the molecules within the two structures of the SP-protein that differ by $11,5^\circ$ from each other. Moreover, the structure of the PL-enzyme differs by a rotation of $43,2^\circ$ from the targeted closed conformation. Both kinetic data and theoretical calculations demonstrate that the PL-protein can indeed rotate more than 40° despite the movement constraining disulfide bridge.

Introducing the disulfide bridge into the protein did not compromise its structural integrity. This conclusion is drawn on basis of structural superpositions and analysis of the metal ion coordination in the active centre where no differences in the mutant structures as compared to the wild-type structures could be found. Furthermore, the interdomain screw axes between the engineered proteins and the wild type protein were all located approximately in the same plane as all screw axes relating the wild-type conformations indicating that the enzyme was trapped in a conformation that belongs to the rotational landscape of the wild-type protein.

Although the mutant proteins were unexpectedly flexible they could be used for kinetic and spectroscopic analysis. Both enzymes could be kinetically activated upon reduction of the disulfide bridges, which proved that the domain rotation is an integral part of the catalytic functioning of the enzyme. Moreover, the data show that the substrate inhibition observed in the wild-type protein is linked to the domain rotation of the enzyme.

The cross-linked proteins were also used as conformational reference states in CD-spectroscopy. With the help of these reference states it was possible to assign the wild-type protein to an open conformation. Furthermore, a conformational change has been observed for the wild-type protein after adding both inhibitor and metal ions.

Taken together this thesis gives a detailed exemplary structural description on engineered disulfide bridges in proteins and shows that biochemical analysis of the cross-linked proteins provides valuable information on the interplay between protein movement and catalytic functioning in *E. coli* 5'-nucleotidase. The structural information greatly facilitated the interpretation of the biochemical data.

DANKSAGUNG

Während der Promotionsarbeit habe ich das Ringen um wissenschaftliche Erkenntnisse dankenswerter Weise als einen kollektiven Prozess erfahren dürfen. Nachstehend möchte ich mich bei all den guten und gutwilligen Menschen bedanken, ohne deren Zutun die Erstellung dieser Arbeit unmöglich gewesen wäre.

Professor Norbert Sträter hat diese Arbeit mit unnachahmlicher intellektueller Schärfe begleitet und auch vorbereitet. Seine unvoreingenommene Art, Forschungsergebnisse zu betrachten hat mich nachhaltig beeindruckt und (hoffentlich) geprägt.

Professor Wolfram Saenger hat die Arbeit ebenfalls sehr wohlwollend begleitet und mich in seinem exzellent ausgestatteten Labor arbeiten lassen, dessen technisch hochwertigen Geräte und dessen hochqualifiziertes Personal wissenschaftliches Arbeiten auf hohem Niveau erlaubt. Aus seiner Arbeitsgruppe seien besonders **Claudia Alings** für ihre zahlreichen Ratschläge zur Proteinkristallisation und **Carsten Jakob** für sein stetes Bemühen um arbeitende Rechner (inkl. Drucker!), Generatoren und Image Plates gedankt.

In **Dr. Timm Maier** habe ich nicht nur den wahrscheinlich hilfsbereitesten Kollegen der Welt kennengelernt, sondern auch einen guten Freund gefunden, der sich für meine Probleme stets so interessierte, als wären es seine eigenen.

Dr. Thomas Knöfel hat als mein Vorgänger auf dem Projekt ein hervorragend bestelltes Feld hinterlassen, sowie mich geduldig in die Nukleotidase-Forschung eingeführt. **Dr. Jacinta Lodge** hat für mich den einzigen unverzwilligten Datensatz des PL-Proteins am DESY in Hamburg aufgenommen. **Sascha Marek** hat mir bei der Proteinkristallisation entscheidend weitergeholfen. Bei der CD-Spektroskopie am BESSY in Berlin waren **Dr. Peter Baumgärtel** und **Jan Lengefeld** weit über die notwendige technische Unterstützung hinaus hilfreich. **Maxim Rossokha** hat sich lange sehr verdient gemacht um die Klonierung und Expression der humanen Ekto-5'-Nukleotidase.

Für die Mitarbeit im Labor danke ich den Studenten **Miriam Carl** und **Dietrich von Richthofen** sowie den Auszubildenden **Martina Runge**, **Melanie Rosenkranz** und **Stefanie Boy**. Ich hoffe, ihnen allen hat die Arbeit mit mir an der 5'-Nukleotidase Freude bereitet und Lust auf mehr Wissenschaft gemacht.

Nicht elementar für die Arbeit aber dennoch erfrischend waren die scharfsinnigen Montag-Morgen-Analysen der Kollegen **Sebastian Stork**, **Wilhelm von Weihofen** und **Bernhard Loll** zum Thema Hertha BSC.

Ganz besonderem Dank aber empfinde ich gegenüber meiner Frau **Meike Waechter** und meinen Kindern **Joris** und **Alice**, die mit viel Vertrauen mir die Zeit ließen, die nötig war, um die Arbeit zu erstellen und die mit viel Liebe mir die Kraft gaben, auch in den schwierigen Phasen des Projektes frohgemuts die Arbeit fortzusetzen.

ABKÜRZUNGEN

5'-NT	5'-Nucleotidase
Å	Ångstrom, 0.1 nm
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPCP	α,β -Methylen-ADP
Ap3A	P ¹ , P ⁴ -di-Adenosin-5'- triphosphat
Ap4A	P ¹ , P ⁴ -di-Adenosin-5'- tetraphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Asymmetrische Einheit (<i>asymmetric unit</i>)
BESSY	Berliner Elektronen-Synchrotron
B-Faktor	Temperaturfaktor
BPNP	bis-para-Nitrophenylphosphat
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
C-terminal	Carboxyl-terminal
Da	Dalton, g/mol
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Labor
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
MPEGXXX	Monomethylether-Polyethylenglycol mit einer mittleren Molekularmasse von XXX g/mol
N-terminal	Amino-terminal
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein-Datenbank
PL	5'-NT mit den Mutationen Prolin 90 zu Cystein und Leucin 424 zu Cystein
PEGXXX	Polyethylenglykol mit einer mittleren Molmasse von XXX g/mol
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
R _{free}	freier kristallographischer R-Wert
Rmsd	Mittlere quadratische Standard-Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
σ_{rms}	Mittlere quadratische Standard-Abweichung auf eins normiert.

Abkürzungen

SP	5'-NT mit den Mutationen Serin 228 zu Cystein und Prolin 513 zu Cystein
SV	Säulenvolumen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Durch Zugabe von Salzsäure auf einen bestimmten pH-Wert eingestellte Lösung von Tris
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV ₂₈₀	Ultraviolette Absorption bei 280 nm
v/v	Verhältnis des Volumen einer Substanz zum Gesamtvolumen
w/v	Verhältnis der Masse [kg] einer Substanz zum Gesamtvolumen [l].

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	5
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 AUSGANGSPUNKT UND GLIEDERUNG DIESER ARBEIT	9
1.2 DINUKLEARE METALLOPHOSPHOESTERASEN	11
1.3 DOMÄNENBEWEGUNG UND PROTEINFUNKTION.....	14
1.4 METHODISCHE PROBLEME BEI DER UNTERSUCHUNG VON DOMÄNENBEWEGUNGEN	15
1.5 DIE 5'-NUKLEOTIDASE AUS ESCHERICHIA COLI	16
1.5.1 <i>Die Struktur der 5'-NT und verwandter Enzyme</i>	17
1.5.2 <i>Katalytische Eigenschaften</i>	17
1.5.3 <i>Domänenrotation</i>	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 PROBENBEREITUNG	22
2.2 KRISTALLOGRAPHISCHE DATENSAMMLUNG	26
2.3 STRUKTURBESTIMMUNG DURCH MOLEKULAREN ERSATZ.....	27
2.4 MODELLBAU UND MODELLVERFEINERUNG.....	27
2.5 MODELLANALYSE	29
2.6 KINETISCHE MESSUNGEN	30
2.6.1 <i>Theorie des Aktivitätsbestimmungstest</i>	30
2.6.2 <i>Experimentelles Vorgehen</i>	32
2.6.2.1 <i>Ansatz</i>	32
2.6.2.2 <i>Auswertung</i>	33
2.6.2.3 <i>Kalibrierung</i>	34
2.7 ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	36
2.7.1 <i>Theorie der Zirkulardichroismus-Spektroskopie</i>	37
2.7.2 <i>Experimentelles Vorgehen</i>	40
2.7.2.1 <i>Messungen im fernen UV-Bereich</i>	40
2.7.2.2 <i>Messungen im nahen UV-Bereich</i>	40
3 PROTEINAUFREINIGUNG UND KRISTALLISATION.....	42
3.1 MUTAGENESE UND PROTEINAUFREINIGUNG	42
3.1.1 <i>Mutagenese</i>	42
3.1.2 <i>Überexpression</i>	44
3.1.3 <i>Proteinaufreinigung</i>	45
3.1.4 <i>Kristallisation</i>	49
4 RÖNTGENSTRUKTURANALYSEN	51

4.1	ÜBERSICHT ÜBER DIE BESTIMMTEN RÖNTGENSTRUKTUREN	51
4.2	STRUKTUREN DES DISULFIDVERBRÜCKTEN ENZYMS 5'-NT-SP	55
4.2.1	<i>Die tetragonale Kristallform: SP-I</i>	55
4.2.1.1	Molekularer Ersatz	56
4.2.1.2	Kristallographische Verfeinerung und Modellbau	57
4.2.1.3	Strukturbeschreibung	58
4.2.1.4	Kristallkontakte	65
4.2.2	<i>Die monokline Kristallform: SP-II</i>	68
4.2.2.1	Molekularer Ersatz	68
4.2.2.2	Kristallographische Verfeinerung und Modellbau	69
4.2.2.3	Strukturbeschreibung.....	71
4.2.2.4	Kristallkontakte	81
4.3	STRUKTUR DES DISULFIDVERBRÜCKTEN ENZYMS PL	84
4.3.1	<i>Molekularer Ersatz</i>	85
4.3.2	<i>Kristallographische Verfeinerung und Modellbau</i>	86
4.3.3	<i>Strukturbeschreibung</i>	88
4.3.4	<i>Kristallkontakte</i>	96
4.4	DOMÄNENQUERVERNETZUNG UND DOMÄNEN-FLEXIBILITÄT	100
4.4.1	<i>Theoretische Flexibilität</i>	100
4.4.2	<i>TLS-Analyse</i>	102
4.5	GEOMETRIE DER DISULFIDBRÜCKEN	106
5	KINETISCHEN UNTERSUCHUNGEN	110
5.1	KINETISCHE PARAMETER DER 5'-NUKLEOTIDASE	110
5.2	REDUKTIONSEXPERIMENTE MIT DEN DISULFIDVERBRÜCKTEN 5'-NT ENZYMEN	115
6	ZIRKULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	119
6.1	5'-NT-SPEKTREN IM UV-FERNEN BEREICH	119
6.2	5'-NT-SPEKTREN IM UV-NAHEN BEREICH.....	122
7	DOMÄNENBEWEGUNG UND KATALYTISCHER MECHANISMUS	127
8	ZUSAMMENFASSUNG	132
9	AUSBLICK	134
	LITERATURVERZEICHNIS	136
	ANHANG	148
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	148
	TABELLENVERZEICHNIS	151
	ZUSAMMENFASSUNG FÜR LAIEN	152
	LEBENS LAUF.....	154