

1 Einleitung

1.1 Ausgangspunkt und Gliederung dieser Arbeit

Das Protein 5'-Nukleotidase (5'-NT) aus dem Bakterium *Escherichia coli* ist ein Metalloenzym aus der Superfamilie der Metallophosphoesterasen. Das Enzym ist ein Monomer mit 58,1 kDa bestehend aus einer größeren N-terminalen Domäne und einer kleineren C-terminalen Domäne. Die Röntgenstrukturanalyse des Proteins ergab, dass die Substratbindestelle in der C-terminalen Domäne liegt, während das aktive Zentrum mit zwei Metallionen in der N-terminalen Domäne liegt (Knöfel und Sträter, 1999). Die kristallographischen Strukturen des Enzyms zeigen, dass es eine Rotationsbewegung um über 96° der C-terminalen Domäne in Bezug auf die N-terminale Domäne gibt. Diese Rotationsbewegung lässt sich nicht mit der klassischen gelenkartigen Domänenschließbewegung beschreiben, sondern entspricht einer Rotation um eine Achse, die das Massenzentrum der C-terminalen Domäne mit der domänenverbrückenden Helix verbindet (Knöfel und Sträter, 2001a).

In dieser Arbeit wurden röntgenkristallographische, kinetische und spektroskopische Methoden mit dem Ziel angewandt, diese Domänenbewegung und ihre Beziehung zum katalytischen Mechanismus des Enzyms zu analysieren. Hierzu wurde das Enzym genetisch derart modifiziert, dass die Domänen in zwei unterscheidbaren Konformationen über Disulfidbrücken miteinander verbunden wurden. Wenngleich die röntgenkristallographischen Untersuchungen dieser Proteinvarianten zeigen, dass das Enzym auch mit domänenverbrückender Disulfidbindung noch unerwartet stark flexibel ist, so konnte doch mit Hilfe der modifizierten Proteine gezeigt werden, dass die Rotationsbewegung notwendig ist für die Substratumsetzung. Auch konnte gezeigt werden, dass die Enzymvarianten geeignet sind, um in Lösung als Referenz zu dienen, so dass spektroskopische Signale des Wildtyp-Proteins distinkte Konformationen zugeordnet werden könnten.

Der Arbeit liegt folgende Gliederung zugrunde:

In der Einleitung wird zunächst die grundlegende Bedeutung der Proteinklasse der Metallophosphoesterasen dargelegt. Als nächstes wird allgemein die Bedeutung von Proteinflexibilität und insbesondere von Domänenbewegungen für die Funktionalität von Proteinen beschrieben. Das führt zu einer Beschreibung der Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Bewegungsphänomenen in Proteinen. Als Letztes werden alle drei eingeführten Themen zusammengeführt in einer zusammenfassenden Beschreibung der bisherigen Forschung an der 5'-NT.

Der Ergebnisteil (Kapitel 3-6) ist nach den Methoden aufgebaut, die verwendet wurden, um weiterführende Erkenntnisse über die 5'-NT zu erlangen. In Kapitel 3 wird die

Herstellung der Proben beschrieben. Die Ergebnisse der Mutagenese, Proteinaufreinigung und Kristallisation sind in Auswertung und Diskussion kurz gehalten, da sie keine Kernaussagen der vorliegenden Arbeit bilden. Die Beschreibungen sind vornehmlich in Hinsicht auf weitergehende Experimente an der 5'-NT verfasst. Das Kapitel 4 beschreibt die Kristallstrukturen der disulfidverbrückten Enzymvarianten und macht den Hauptteil der Arbeit aus. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Kapitel zu den drei besprochenen Strukturen parallel aufgebaut. Der Abschnitt 4.4 diskutiert die Ergebnisse nochmal zusammenfassend in Hinblick auf die Flexibilität der Strukturen. In diesem Abschnitt werden auch die Ergebnisse der TLS-Analyse besprochen. Der Abschnitt 4.5 diskutiert die Disulfidbrücken der drei Kristallstrukturen zusammenfassend. Die Kapitel 5 und 6 beschreiben dann die biochemischen Erkenntnisse, die mit den Enzymvarianten gewonnen werden konnten. Hier wird deutlich, dass die biochemischen Daten nur mit Kenntnis der Strukturen sinnvoll interpretiert werden können. Es ist naturgemäß schwierig, einer Beschreibung mit vielen verschiedenen Kristallstrukturen, die jeweils voneinander unabhängige Konformere beinhalten, zu folgen. Aus diesem Grunde ist in Tabelle 5 auf Seite 53 eine Übersicht über die bisher beschriebenen und die in dieser Arbeit diskutierten Kristallstrukturen der 5'-NT aufgenommen.

Die Arbeit ist nicht nur in Hinblick auf eine möglichst schlüssige Dokumentation wissenschaftlicher Leistungen verfasst, sondern soll auch als Nachschlagmöglichkeit künftige Arbeiten an der 5'-NT erleichtern. Aus diesem Grunde wurde der Aufbau so gewählt, dass die Arbeit als Referenz hilfreich ist. So wird beispielsweise im Kapitel „Röntgenstrukturanalysen“ jede Strukturlösung einzeln besprochen, wodurch sich teilweise Redundanzen ergeben haben, die aber durch Querverweise so selten wie möglich gehalten wurden.

1.2 *Dinukleare Metallophosphoesterasen*

Leben, wie es heute biologisch verstanden wird, ist ohne Phosphatstoffwechsel nicht denkbar. Neben den Bikarbonationen sind die Phosphationen das wichtigste Puffersystem in biologischen Systemen (Schmidt und Thews, 1995). Phosphat hat aber auch eine bedeutende Funktion bei der Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen, die bei allen zellulären Prozessen eine Rolle spielen (Barford et al., 1998). So werden schätzungsweise 30% der intrazellulären Proteine über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert (Hunter, 1995). Durch Phosphorylierungen werden Nährstoffe in die Zelle aufgenommen und Biomoleküle synthetisiert. Phosphorsäureester wie das Adenosintriphosphat sind nicht nur die Bausteine der DNA, sie dienen auch als Energieträger in biologischen Systemen und als extrazelluläre Signalsubstanzen.

Angesichts der herausragenden Bedeutung des Phosphats ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl von Enzymen in den Phosphathaushalt eingreift. Diese Enzyme werden unterschieden in Kinasen, die die Phosphorylierungsreaktion ausführen und solche, die die Spaltung der Phosphatesterbindung katalysieren, die Phosphatasen (EC 3.1.3). Die Phosphatspezifität der Phosphatasen ist aufgrund der überragenden Bedeutung des Phosphats in der Biologie konvergent evolviert und Phosphatasen werden daher zumeist nach funktionalen Kriterien klassifiziert (Vincent et al. 1992). Es kann unterschieden werden in unspezifische Phosphatasen, die beinahe jede Phosphatesterbindung hydrolysieren, und spezifischen Phosphatasen, wie Proteinphosphatasen, die entweder Phosphate von Tyrosin-Resten entfernen (Protein-Tyrosin-Phosphatasen, EC 3.1.3.48) oder von Serin/Threonin-Resten (Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen, EC 3.1.3.16).

Einen weiteren Klassifizierungsschritt stellt die Unterteilung der Enzyme nach ihrem katalytischen Mechanismus dar. Der Mechanismus kann in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Lippard und Berg, 1995): 1) Die Phosphorylgruppe des Substrats wird auf einen nukleophilen Aminosäurerest des aktiven Zentrums als anfänglichen Akzeptor übertragen. Diese Gruppe kann weiter unterschieden werden nach Art des Aminosäurerests, z.B. Histidin in den sauren lysosomalen Phosphatasen oder Cystein in den Protein-Tyrosin-Phosphatasen. 2) Phosphorylgruppe des Substrats wird direkt auf ein Wassermolekül im aktiven Zentrum übertragen. Mitglieder dieser Gruppe sind typischerweise dinukleare Metalloproteine, die einen Zwei-Metallionen-Mechanismus verwenden, um die Phosphatester zu binden und die folgende Hydrolyse zu katalysieren (Sträter et al., 1996). Die positive Ladung der Metallionen erniedrigt den pK_a koordinierter Wassermoleküle und sorgt für eine lokal erhöhte Konzentration von Hydroxidionen, die andernfalls nicht als Reaktanten zur Verfügung stünden. In ähnlicher Weise kann das positiv geladene Metallzentrum bei der Aktivierung eines Substratmoleküls als allgemeine Lewis-Säure dienen und dessen Reaktivität nach der Koordination modulieren.

Auch die Metallophosphoesterasen sind nicht alle strukturell verwandt. Eine große Gruppe jedoch zeichnet sich durch ein gemeinsames Faltungsprinzip und ein charakteristisches „Metallophosphoesterase Motiv“ aus, das aus zwei konservierten Sequenzen besteht, die die meisten der metallkoordinierenden Reste umfassen: Motiv A “DXH(X)~25GDXXD(X) ~25GNH[D/E]” (Zhuo et al., 1994) und ein kürzeres Motiv B “GH(X)~50GHX[H/X]” (Klabunde et al., 1996).

In der SCOP (structural classification of proteins) Datenbank (Lo Conte et al., 2002; Murzin et al., 1995) werden diese Proteine in der Superfamilie der „metallabhängigen Phosphatasen“ als strukturell verwandte Enzyme zu einer Superfamilie zusammengefasst. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bislang strukturell charakterisierten Proteine aus dieser Superfamilie. Die Enzymgruppe hydrolysiert eine große Vielfalt an Substraten wie Phosphoproteine, Nukleotide sowie DNA und RNA. Nur die 5'-NT aus dieser Gruppe ist jedoch in der Lage, neben terminalen Phosphatgruppen auch Phosphoanhydrid-Bindungen zu hydrolysieren.

Interessant ist, dass sich bei der 5'-NT die Substratbindetasche in der C-terminalen Domäne befindet, die keinerlei Ähnlichkeit zu den hier aufgeführten Proteinen aufweist und auch in der SCOP-Datenbank einen eigenen Eintrag hat, d.h. dass bisher keine strukturell homologen Domänen charakterisiert wurden. Das Substrat wird über eine Rotationsbewegung der C-terminalen Domäne im aktiven Zentrum der N-terminalen Domäne positioniert.

Neben dem allgemeinen Faltungsmotiv ist auch das aktive Zentrum in der Gruppe der Metallophosphoesterasen konserviert. So lassen sich alle Metallliganden sowie der katalytische Rest His-117 strukturell überlagern. Hierbei sind die Liganden der hochaffinen Metallbindestelle 2 alle konserviert.

Tabelle 1. Übersicht über strukturell charakterisierte Mitglieder der Superfamilie der metallabhängige Phosphatasen.

Familie	Protein	Spezies	Metall	Substrate	PDB	Literaturstellen
Violette saure Phosphatase	Violette saure Phosphatase aus Pflanzen	Rote Kidneybohne (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Zn ²⁺ , Fe ³⁺	Phosphorsäureester, besonders ATP	4kbp, 1kbp, 3kbp	(Cashikar et al., 1997; Klabunde et al., 1996; Sträter et al., 1995)
	Violette saure Phosphatase aus Säugetieren	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>) Schwein (<i>Sus scrofa</i>)	Fe ³⁺ , Fe ³⁺ *	Phosphoesters, auch Phosphopeptide	1qhw, 1qfc	(Lindqvist et al., 1999; Marshall et al., 1997; Uppenberg et al., 1999)
DNA Doppelstrangbruch Reparatur Nuklease	Mre11	<i>Archaeon Pyrococcus furiosus</i>	Mn ²⁺ , Mn ²⁺	DNA Endo- und Exonuclease Aktivität	1ii7	(Hopfner et al., 2001)
5'-Nukleotidase	5'-Nukleotidase	<i>Escherichia coli</i>	Zn ²⁺ , Zn ²⁺ ?	Phosphomonoester und Phosphoanhydride	1hp1, 1ho5, 1hpu	(Knöfel und Sträter 1999, 2001a, 2001b)
Protein Serin/Threonin Phosphatase	Protein Phosphatase-1 (PP-1)	Hase (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Me(II), Me(II)	Ser/Thr phosphorylierte Proteine	1fjm	(Goldberg et al., 1995)
		Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Mn, Fe	Ser/Thr phosphorylierte Proteine	1jk7, lit6	(Egloff et al., 1995)
	Protein phosphatase-2B (PP-2B) (Calcineurin)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	Fe, Zn	Ser/Thr phosphorylierte Proteine	1tco	(Griffith et al., 1995)
Phosphoesterase verwandt	Hypothetisches Protein PF1291	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Fe, Zn	Ser/Thr phosphorylierte Proteine	1aui, 1m63, 1mf8	(Kissinger et al., 1995)
		Bakteriophage lambda	Mn, Ni	Ser/Thr phosphorylierte Proteine	1g5b	(Voegtli et al., 2000)
		<i>Archaeon Pyrococcus furiosus</i>	?	?	1nnw	Southeast Collaboratory for Structural Genomics

*aktiv in Fe(III)-Fe(II)-Form

1.3 Domänenbewegung und Proteinfunktion

Die meisten großen Proteine bestehen aus mehreren Domänen. Eine Domäne kann als eine sich selbständig faltende durch Sekundärstrukturelemente rigide Untereinheit eines Proteins betrachtet werden. Domänen sind in der Regel über flexible Zwischendomänenregionen verbunden. Dieser strukturelle Aufbau ermöglicht den Proteinen eine gewisse Dynamik, ohne Verlust ihres inneren Faltungsaufbaus. Diese Konformationsänderung ist häufig notwendig für die Funktion des Proteins (Janin und Wodak, 1983).

Über 60% der experimentell gefundenen Proteinbewegungen lassen sich als Domänenbewegungen beschreiben; Bewegungen von Untereinheiten machen 20%, Fragmentbewegungen 10% und andere nicht klassifizierte Bewegungen machen nochmals 5% aus (Echols et al., 2003; Gerstein, 1998).

Die Domänenbewegungen wiederum lassen sich in zwei grundsätzlich verschiedene Formen untergliedern (Gerstein et al., 1994): 1) Einfache Gelenkbewegungen, bei denen zwei rigide Strukturelemente (starre Körper) ihre räumliche Anordnung zueinander verändern, ohne dass sie dabei ihre Struktur verändern. Der typische Gelenkmechanismus ist eine Schließbewegung, die einer Drehung um ein Gelenk gleicht, wobei die Bewegung senkrecht zur Ebene der Grenzfläche der beiden starren Körper verläuft. Es kommt dabei zu großen Veränderungen von Hauptketten-Torsionswinkeln in den sie verbindenden Strukturelementen (die Gelenkregion). Lactoferrin, Myosin und auch die 5'-NT sind Beispiele für diese Bewegung. Typisches Merkmal dieser Bewegung ist, dass eine Koordinatenüberlagerung zweier Konformere kleine Abweichungen gibt, wenn die starren Körper einzeln miteinander überlagert werden, jedoch große Abweichungen, wenn das gesamte Protein miteinander überlagert wird.

2) Die Scherbewegung ist eine kompliziertere Form der Domänenbewegung. Hierbei ist die freie Beweglichkeit der starren Körper zueinander durch dichte Packung an deren Grenzfläche eingeschränkt. Die Bewegung wird hier durch viele kleine Änderungen von Hauptketten-Torsionswinkeln vermittelt, in der Regel so, dass die starren Körper sich parallel zur Ebene der Grenzfläche bewegen. Prominentes Beispiel dieser Bewegung ist das Insulin, eine sehr große Scherbewegung führt die Citrat Synthase aus, bei der sich einige Atome um bis zu 10 Å verschieben.

Wie Krebs et al. anhand einer Datenbankanalyse beispielhaft aufgezeigt haben hat das wissenschaftliche Interesse an Proteinbewegungen in den letzten Jahren stark zugenommen (Krebs et al., 2003). Dies hat nicht nur mit der Erkenntnis der biologischen Bedeutung von Proteinbewegungen zu tun, sondern auch mit der stetig steigenden Anzahl an veröffentlichten Proteinstrukturen. Nur durch den Vergleich von proteinkristallographischen Strukturmodellen wurde es möglich, Proteinbewegungen als ubiquitäres Phänomen wahrzunehmen. So wurde auch die Domänenbewegung der 5'-NT erst über den Vergleich

von mehreren Strukturmodellen, die aus unterschiedlichen Kristallformen gewonnen wurden, entdeckt.

1.4 Methodische Probleme bei der Untersuchung von Domänenbewegungen

Die Dominanz der Röntgenstrukturanalyse bei der Beschreibung von Proteinbewegungen zeigt die Datenbank für Makromolekulare Bewegung (<http://molmovdb.mbb.yale.edu/molmovdb/>), die 95% aller bislang beobachteten Proteinbewegungen methodisch auf die Röntgenstrukturanalyse zurückführt (Echols et al., 2003). Hieraus ergibt sich ein methodisches Paradox bei der Untersuchung von Proteinbewegungen, da ein Röntgenbeugungsbild typischerweise aus einem Kristall mit Molekülen in identischer Konformation gewonnen wird. In der Regel wird also eine Proteinbewegung durch den Vergleich zweier Kristallstrukturen postuliert. Eine weitere Schwierigkeit hier ist, dass ein Kristall im biologischen Sinne ein artifizielles System darstellt, die physiologischen Bedingungen nur bedingt wiedergibt und kleinere Konformationsänderungen auch durch die Kristallpackung hervorgerufen werden können. Der vermuteten Bewegung muss dann in Lösung mit spektroskopischen Methoden wie der EPR, NMR, CD, Fluoreszenz nachgegangen werden. Die Beschreibung einer Proteinbewegung ist also immer auch auf komplementäre biophysikalischer Methoden angewiesen. Da in der Regel auch mit spektroskopischen Methoden nur distinkte Einzelzustände voneinander unterschieden werden können, können auch molekular-dynamische Rechnungen noch einbezogen werden, um zu einer kompletten Beschreibung einer Bewegungs-Trajektorie zu gelangen.

Eine weitere Schwierigkeit mit spektroskopischen Methoden besteht darin, dass die erhaltenen Signale nicht immer zweifelsfrei einem definierten Konformationszustand zugewiesen werden können. Klassischerweise geht man davon aus, dass das Enzym in Abwesenheit eines Substratmoleküls in einer geöffneten Konformation vorliegt, nach Anbindung des Substrats an die Bindungstasche in eine geschlossene Konformation übergeht und sich dann wieder öffnet, um das Produkt zu entlassen und neue Substrate aufnehmen zu können. Dieses Modell erlaubt somit die Zuordnung der Signale für die offene Konformation (kein Substrat/Inhibitor anwesend) und für die geschlossene Konformation (nach Zugabe von Substrat/Inhibitor). Es zeigt sich jedoch, dass die Wirklichkeit sehr viel komplexer ist. So konnte für Lysozym (Goto et al., 2001) und für die Citrat-Synthase (Liao et al., 1991) gezeigt werden, dass die Enzyme in einem Gleichgewicht von mindestens zwei energetisch günstigen Zuständen liegen.

Aus den geschilderten Problemen bei der Untersuchung von Proteinbewegungen ergibt sich der methodische Ansatz dieser Arbeit. Die Rotationsbewegung der 5'-NT sollte in zwei unterschiedlichen Konformationen, die als „offen“ und „geschlossen“ angesehen

werden können, durch Einführung von zwei Cysteinresten, wovon eines N-terminal und das andere C-terminal gelegen sein müssen, eingefangen werden. Die Cysteine mussten dafür so gewählt werden, dass sie sich in einer gegebenen Konformation dicht genug kommen, um eine Disulfidbindung einzugehen, die dann beide Domänen miteinander verbrückt und so die Rotationsbewegung stoppt. Diese konformations-fixierten Proteinvarianten sollten dann strukturell analysiert werden, um die exakten Konformationen zu kennen. Die spektroskopische Analyse des Wildtyp-Proteins kann dann verglichen werden mit den spektroskopischen Signalen der Konformationsmutanten.

Obwohl die Domänenverbrückung mit Cysteinresten eine häufig verwendete Methode ist, um die Bedeutung der Proteinbewegungen für die Funktion des Proteins nachzuweisen oder gar die Bewegung als solche zu beweisen (Chervitz und Falke, 1995; Kawate und Gouaux, 2003; Lee et al., 1995), wurde diese Methode bislang nie systematisch mit den Röntgenstrukturen der Cysteindoppelmutanten analysiert. Die vorliegende Arbeit zeigt auch, wie wertvoll die Röntgenstrukturanalyse der mutierten Proteine in Bezug auf die Interpretation der biochemischen Daten sein kann.

1.5 Die 5'-Nukleotidase aus *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit untersuchte 5'-Nukleotidase (5'-NT) wurde erstmals von Neu und Heppel als ein bakterielles periplasmatisches Enzym in *Escherichia coli* beschrieben (Neu und Heppel, 1964; Neu und Heppel, 1965). Die Bezeichnung UDP-Zucker-Hydrolase ist synonym. Das Enzym ist eine Hydrolase und wird durch das Gen *ushA* kodiert (Burns und Beacham, 1986). Nach Abspaltung der Signalsequenz besitzt die 5'-NT eine berechnete molekulare Masse von 58,2 kDa (525 Aminosäurereste).

Die 5'-Nukleotidase ist sowohl prokaryontisch als auch in eukaryontischen ein- und vielzelligen Organismen weit verbreitet (Zimmermann, 1992). In *E.coli* kommt das Enzym nur im Periplasma vor, während in tierischen Zellen neben einer membranständigen Ekto-5'-Nukleotidase auch eine zytosolische Nukleotidase existiert. Das bakterielle Enzym ist lediglich zu der Ekto-5'-Nukleotidase homolog.

Über die biologische Bedeutung des Proteins in *E. coli* ist wenig bekannt, seine erstaunliche katalytische Vielseitigkeit lässt jedoch vermuten, dass die Funktion in der Hydrolyse extrazellulärer Nucleotide besteht, die dann ins Zellinnere aufgenommen werden können (Zimmermann, 1992). Die tierische Ekto-5'-Nukleotidase spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem und in der neurophysiologischen Signalübertragung.

Dem hier untersuchten bakteriellen Enzym kommt somit ein dreifacher Modellcharakter zuteil: Für den Mechanismus der Phosphat-Hydrolyse über ein dinukleares Metallzentrum, als homologes Protein zu der humanen Ekto-5'-NT und als Modellsystem für eine Domänenrotation.

1.5.1 Die Struktur der 5'-NT und verwandter Enzyme

Die 5'-NT ist ein monomeres Protein, das sich in zwei Domänen unterteilt. Die N-terminale Domäne (Reste 26-355) ist dabei etwas größer als die C-terminale (356-550) Domäne. Die beiden Domänen sind durch eine 18 Reste lange α -Helix (344-361) miteinander verbunden. Sequenzvergleiche lassen darauf schließen, dass die tierischen Ekto-5'-Nukleotidasen, die glykosyliert sind und über einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) mit der zellulären Außenmembran verbunden sind, evolutionär und strukturell mit den bakteriellen 5'-Nukleotidasen verwandt sind (Volkmandt et al., 1991).

Als wichtige katalytische Reste konnten neben den Metallliganden die Reste His-117 und Asp-120 identifiziert werden (Knöfel und Sträter, 1999; Knöfel und Sträter, 2001b). Diese, wie auch andere Reste des aktiven Zentrums, sind zwischen allen bakteriellen, pflanzlichen und tierischen 5'-NTs stark konserviert. Eine Ausnahme stellt der Rest Gln-254 dar, der in den tierischen Enzymen ein Asparagin-Rest ist, in *Haemophilus influenzae*, *Boophilus microplus* und *Archaeoglobus fulgidus* ein Histidin-Rest. Auch die Substratbindungstasche mit den Resten Arg-379, Arg-410, Gly-407, Phe-429, Gly-458 und Asp-504 ist stark konserviert.

Da die Verknüpfung der Cysteine wie auch die Glykosylierungsstellen in den tierischen Ekto-5'-Nukleotidasen bekannt sind (Fini et al., 2000), lassen sich diese Stellen mit der homologen bakteriellen Struktur vergleichen. Es zeigt sich, dass die den Cysteinen homologen Reste Abstände zueinander haben, die ebenfalls eine Disulfidbindung erlauben würden, als auch dass die humanen Glykosylierungsstellen im bakteriellen Enzym ebenfalls an der Oberfläche liegen und damit einer Glykosylierung zugänglich wären. Es wurde auch tatsächlich für die bovine 5'-NT ein Homologie-Modell auf Basis der bakteriellen Struktur vorgeschlagen, das ohne grobe stereochemische Verstöße der Tertiärstruktur der bakteriellen Nukleotidase entspricht (Fini et al., 2003).

1.5.2 Katalytische Eigenschaften

Der katalytische Mechanismus der 5'-NT ist besonders in Hinblick auf die Substratvielfalt interessant. Das Enzym hydrolysiert alle 5'-Ribo- und 5'-Desoxyribonukleotide (Neu, 1967a) einschließlich bis-5'-Nucleosidylpolyphosphate (Ruiz et al., 1989), sowie die synthetischen Substrate bis-para-Nitrophenylphosphat and para-Nitrophenylphosphat (Neu, 1967a). Damit hydrolysiert es nicht nur chemisch verschiedene Substanzen wie Phosphomonoester und Phosphoanhydride, sondern auch Substrate, die in ihrer Größe sehr stark variieren (Abbildung 1).

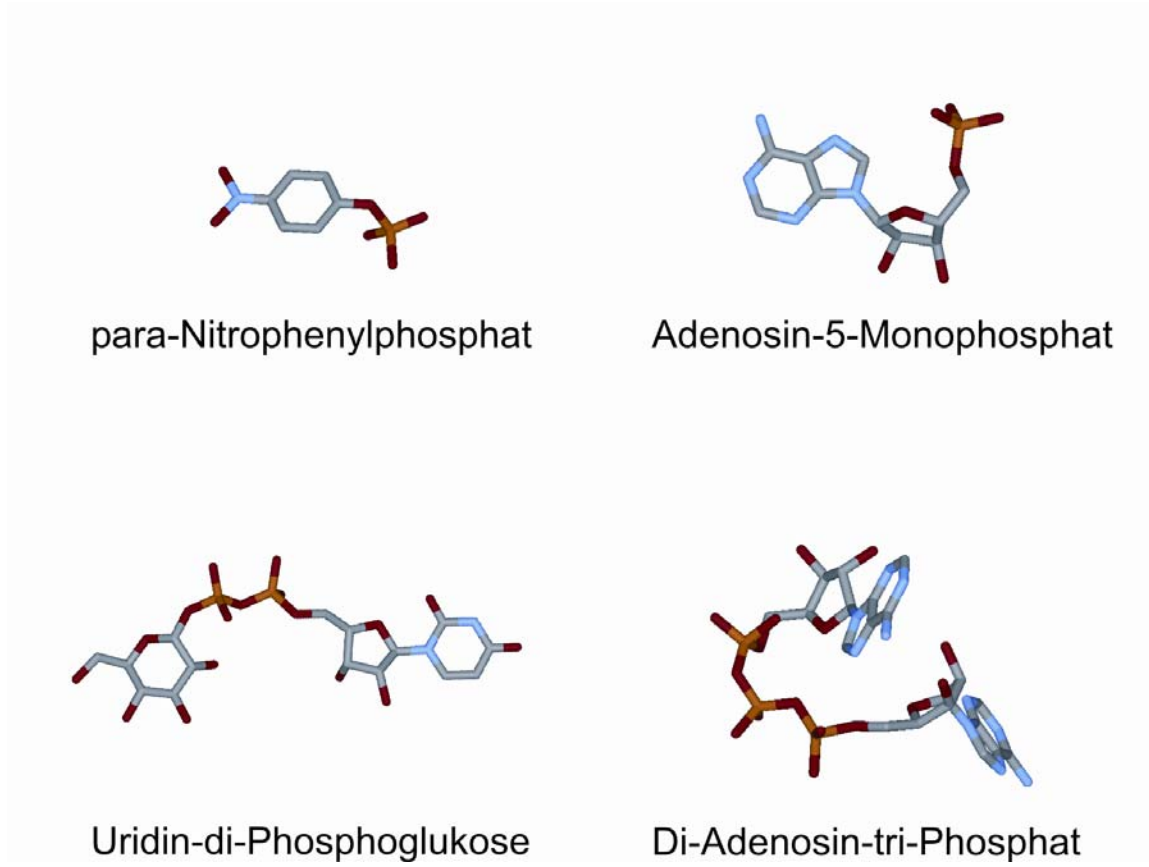


Abbildung 1. Substratbeispiele der 5'-NT. Oben: Phosphomonoester, unten: Phosphoanhydride. Phosphoratome sind in orange gezeigt, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in hellblau und Kohlenstoffatome in grau.

Durch diese Substratvielfalt ist es möglich, dass die Substrate bis zu den Nucleosiden und phosphorylierten Zuckern abgebaut werden. So wird beispielsweise UDP-D-Glukose zu UMP und α -D-Glukose-1-Phosphat hydrolysiert und das Zwischenprodukt UMP weiter zu Uridin und Phosphat. Auch bei ATP werden die Substrate sequentiell bis zum freien Adenosin abgebaut (Neu, 1967a). Trotz dieser großen Substratvielfalt, ist das Enzym sehr spezifisch. So werden viele den Substraten ähnliche Nucleotide nicht hydrolysiert und wirken inhibitorisch wie beispielsweise Adenosin-di-Phosphoglukose.

Durch die Strukturbestimmung eines Komplexes mit dem Substratanalogon AMPCP (α,β -Methylen-ADP) und mit den Produkten konnten wichtige Einblicke in den katalytischen Mechanismus gewonnen werden (Knöfel und Sträter, 2001b). Dieser Mechanismus ist in Abbildung 2 dargestellt.

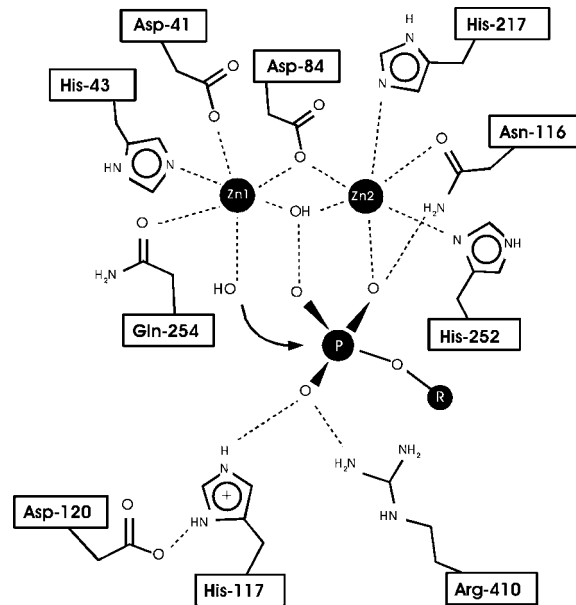


Abbildung 2. Katalytischer Mechanismus der 5'-NT. Gezeigt ist nur die Bindung eines Substrats mit terminaler Phosphatgruppe und der Angriff des Nucleophils (Knöfel und Sträter, 2001b).

Die terminale Phosphatgruppe bindet an das Metallion 2 und ein metallverbrückendes Wassermolekül. Für den nukleophilen Angriff eines zweiten Wassermoleküls, das an das Metallion 1 gebunden ist, wird die Phosphatgruppe von den Aminosäureresten Arg-410 und His-117 polarisiert. Der Übergangszustand ist stabilisiert durch die zwei Metallionen, Arg-410 und His-117. Es ist unklar, wie die alkoholische Abgangsgruppe protoniert wird, da keine saure Aminosäure sich in der Nähe befindet, so dass voraussichtlich ein Wassermolekül die Abgangsgruppe protoniert. Nachdem der Alkohol-Rest abdissoziiert ist, bleibt das Phosphat bidentat an die beiden Metallionen gebunden.

Interessanterweise sieht der Bindungsmodus der Primärprodukte in der Struktur mit den Produkten Phosphat und Adenosin (1ho5) anders aus. Hier ist das Phosphat so gebunden wie die Phosphatgruppe im Substrat. Nach einer Phosphoryl-Übertragung nach einem Inline-Mechanismus mit Umkehrung der Konfiguration am Phosphor-Atom, sollte der Bindungsmodus des Produktphosphats sich jedoch von dem des Substratphosphats unterscheiden. Es wurde postuliert, dass dies ein sekundärer Bindungsmodus der Produkte ist, in der sich das Phosphat ausgehend von einem bidentat verbrückenden Mechanismus umlagert. Dafür spricht auch, dass in Kristallstrukturen anderer Metallophosphoesterasen (PAP, Ser/Thr Proteinphosphatase) ebenfalls das Produktphosphat die Metallionen verbrückt.

Der Vergleich verschiedener Kristallformen der 5'-NT lässt darauf schließen, dass in diesem Enzym die Substratumsetzung einhergeht mit einer Domänenrotation, die als eine Gelenkbewegung beschrieben werden kann.

1.5.3 Domänenrotation

Die Strukturanalyse von vier verschiedenen Kristallformen der 5'-NT mit insgesamt neun Konformeren hat ergeben, dass sich bei einer Überlagerung der N-terminalen Domänen, sich alle C-terminalen Domänen bezüglich ihrer Konformation unterscheiden (Knöfel und Sträter, 2001a). Die größten Unterschiede wurden beobachtet zwischen der Kristallform 1hp1 und 1hpu Kette C mit einer Drehung von $96,7^\circ$ (Abbildung 3).

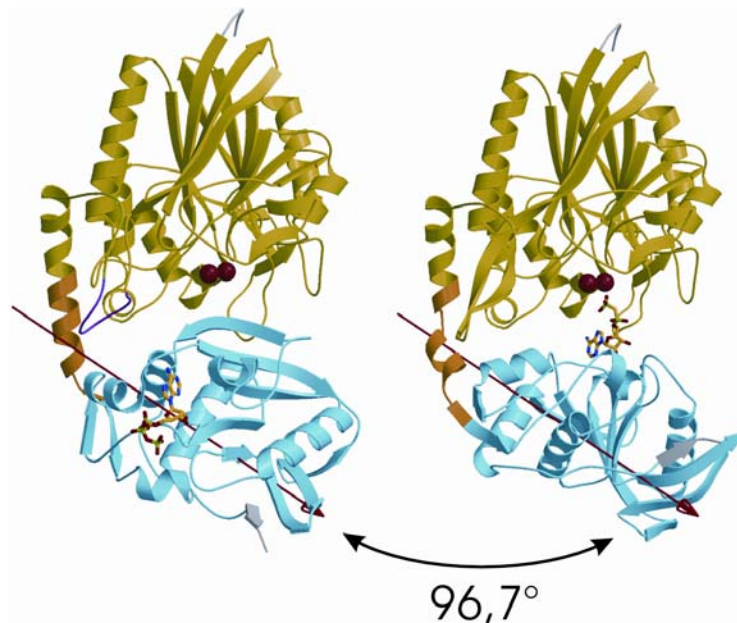


Abbildung 3. Maximale Drehung der 5'-NT. Die Strukturdarstellung basiert auf einer Überlagerung der N-terminalen Domänen (grün). Die C-terminalen Domänen (blau) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Drehung um die rot eingezeichnete Achse. Links: die am meisten geöffnete Konformation 1hp1, rechts: die am meisten geschlossene Konformation 1hpu Kette C. Die Metallionen sind als rotes Kalottenmodell gezeichnet und geben die Position des aktiven Zentrums an. Um die Drehung verfolgen zu können, ist in beiden Strukturen ein Substrat (1hp1) bzw. Substratanalogon (1hpuC) eingezeichnet.

Die Bewegung der C-terminalen Domäne kann beschrieben werden als Drehung um eine Rotationsachse, die die domänenverbindende Helix mit dem Massenschwerpunkt der C-terminalen Domäne verbindet. Diese Bewegung steht im Gegensatz zu der klassischen Schließbewegung, bei der sich die Domänen auseinander bewegen, so dass die Domänengrenzfläche der offenen Struktur deutlich größer ist als bei der geschlossenen Struktur. In der 5'-NT ändert sich die Domänengrenzfläche nicht.

Diese Art der Bewegung, bei der die Aminosäurereste an der Domänengrenzfläche an dieser Grenzfläche entlanggleiten, wurde bei allen Konformeren der offenen und geschlossenen Form gefunden. Von allen untersuchten Kristallformen befanden sich drei Konformere in einer offenen Stellung und sechs Konformere in einer geschlossenen Position. Die Konformere der offenen Form unterscheiden sich um maximal $10,4^\circ$ voneinander, die geschlossenen Konformere um maximal $8,4^\circ$. Zwischen jeder einzelnen geschlossenen und jeder einzelnen offenen Konformation ist ein Rotationsunterschied von mindestens 80° zu beobachten. Da der Übergang zwischen der offenen und der geschlossenen Form wahrscheinlich keine lineare Rotation um eine Drehachse ist, liegen die Achsen zwischen den einzelnen Konformeren nicht kollinear zueinander. Es kann aber gezeigt werden, dass alle Achsen näherungsweise in einer Ebene liegen, die Massenschwerpunkte der beiden Domänen und die Gelenkreste der domänenverbindenden Helix umfasst.

Interessanterweise konnte die geschlossene Konformation auch in Abwesenheit eines Inhibitors kristallisiert werden. Da keine Strukturen gefunden wurden, mit einer intermediären Konformation, wurde postuliert, dass die offene und die geschlossene Konformation Energieminima darstellen, zwischen denen sich das Enzym im Gleichgewicht befindet.

Eine Auswertung der Temperaturfaktoren sowie eine Analyse der Normalmoden haben gezeigt, dass die Bewegung des Proteins im Kristall der Bewegung zwischen den verschiedenen Konformationen wahrscheinlich entspricht. Die Analyse der Domänenbewegung insgesamt ergab die Hypothese, dass die Rotationsbewegung ein integraler Bestandteil des katalytischen Mechanismus der 5'-NT sein muss.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Domänenbewegung auf die Enzymfunktion zu beschreiben. Hierbei waren insbesondere die Fragen interessant, in welchem Ausmaß die Rotationsbewegung für den katalytischen Mechanismus notwendig ist, in welcher Konformation das Enzym in Lösung vorliegt und welche Faktoren die Rotationsbewegung beeinflussen.