

## 5 Kinetischen Untersuchungen

5'-NT wird kinetisch seit mehr als 40 Jahren untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben, sind hier besonders die Substratvielfalt und der Gebrauch der Metallionen als Kofaktoren von besonderem Interesse. Aus diesem Grunde war eine detaillierte kinetische Charakterisierung für die vorliegende Arbeit nicht vorgesehen. Mit Hilfe kinetischer Messungen sollte lediglich bestimmt werden, inwieweit die Domänenrotation für die Aktivität des Enzyms von Bedeutung ist. Diese Experimente sind in Abschnitt 5.2 "Reduktionsexperimente mit den disulfidverbrückten 5'-NT Enzymen" beschrieben. Bei den Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass die PL-Mutante auch in oxidiertem Form stark aktiv ist, wenngleich sie eine ausgeprägte Substratinhibierung zeigte. Diese Substratinhibierung wurde auch beim Wildtyp-Protein schon früher beobachtet (Ruiz et al.), aber nicht weiter charakterisiert. Aus diesem Grunde wurden für diese Arbeit einige kinetische Parameter erneut bestimmt, wobei dem Phänomen der Substratinhibierung Rechnung getragen werden sollte (Abschnitt 5.1).

### 5.1 *Kinetische Parameter der 5'-Nukleotidase*

Die Einführung von Disulfidbrücken in die 5'-NT sollte das Enzym in einer geschlossenen und in einer offenen Konformation fixieren. Eine Aktivierung des Enzyms durch Reduktion der Disulfidbrücken würde dann beweisen, dass die Rotationsbewegung integraler Bestandteil des katalytischen Mechanismus ist.

Die Kinetik der PL-Mutante, die das Enzym in einer geschlossenen Konformation festhalten sollte, ist jedoch sehr viel komplexer, wie sich bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivität vom Substrat AMP herausstellte. Ein Vergleich der Umsatzraten ( $k_{\text{cat}}$ ) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration zwischen dem Wildtyp-Protein (Abbildung 33A) und dem PL-Enzym (Abbildung 33B), zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit beider Enzyme nicht, wie üblich, eine Sättigung erreicht, sondern bei hohen Substratkonzentrationen wieder absinkt. Interessant ist, dass die Aktivität für die Mutante sowohl früher als auch viel stärker absinkt als beim Wildtyp-Protein. Dieses Verhalten der 5'-NT ist kompatibel mit einem Modell der Substrathemmung, wobei das erste Substratmolekül an eine hochaffine Bindungstasche bindet und das zweite, inhibierende Substratmolekül an eine niederaffine Bindestelle im Enzym-Substrat-Komplex bindet. Das zweite Substratmolekül würde dann als unkompetitiver Inhibitor fungieren.

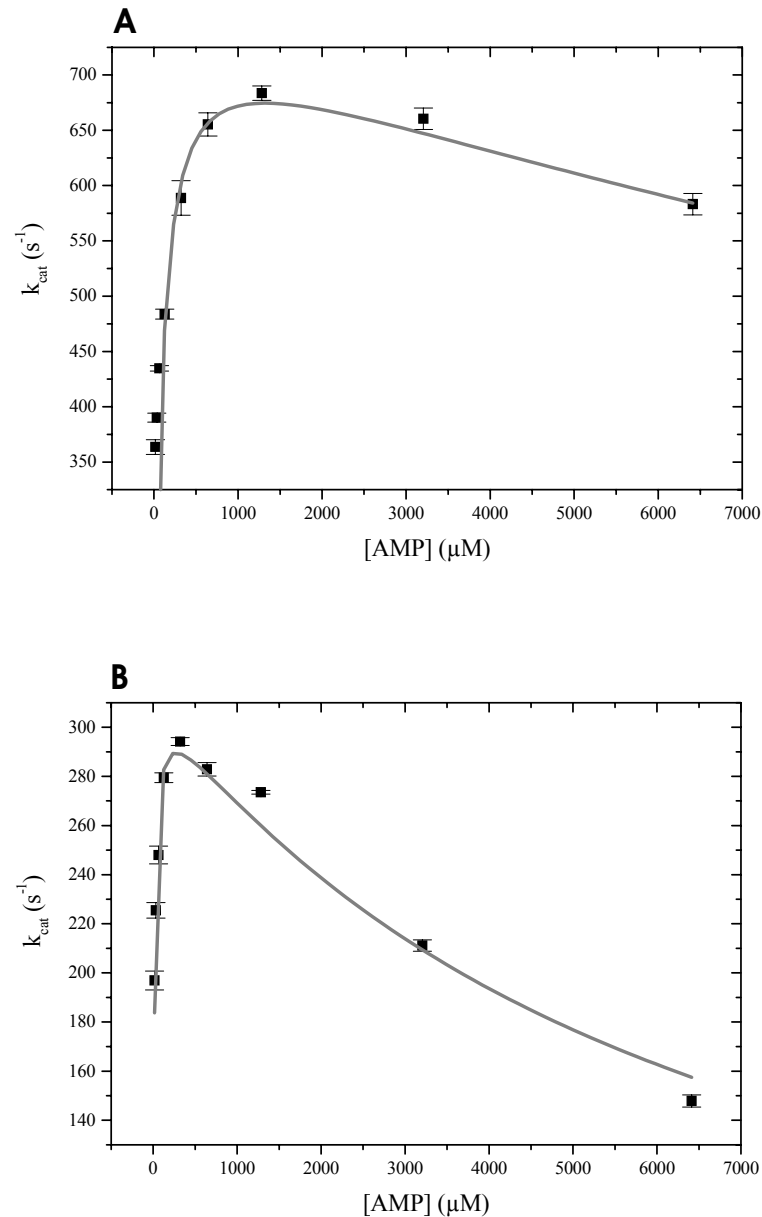


Abbildung 33. Abhängigkeit des Wildtyp-Proteins (A) und des PL-Enzyms (B) von der AMP-Konzentration. Aufgetragen ist die Aktivität als Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) gegen die Substratkonzentration (AMP in  $\mu\text{M}$ ). 5 mM  $\text{CoCl}_2$ , pH 7,5. Die Kurve passt die Messpunkte nach (Formel 10 an).

Das Modell der Substrathemmung lässt sich quantifizieren, indem eine Inhibitionskonstante in die Michaelis-Menten-Gleichung für unkompetitive Hemmung eingebaut wird und die Konzentration des Inhibitors durch die Substratkonzentration ersetzt wird (Bisswanger, 1994):

(Formel 10)

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + (1 + \frac{[S]}{K_i}) \cdot [S]}$$

wobei  $v$  die Reaktionsgeschwindigkeit,  $V_{\max}$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $[S]$  die Substratkonzentration,  $K_M$  die Michaelis-Menten-Konstante und  $K_i$  die Inhibitionskonstante ist. Die gemessenen Daten lassen sich sehr gut mit dieser Funktion beschreiben (vgl. Abbildung 33). In Tabelle 20 sind die über diese Formel ermittelten Parameter  $k_{\text{cat}}$  ( $V_{\max}/[E]$ ),  $K_M$  und  $K_i$  zusammengefasst. Besonders auffällig ist die nahezu 4-fach verringerte Inhibitionskonstante des PL-Enzyms (6,48 mM) gegenüber dem Wildtyp-Protein (23,52 mM) mit AMP als Substrat.

Tabelle 20. Kinetische Parameter von 5'-NT.

	AMP		PNPP	
	WT	PL	WT	PL
$k_{\text{cat}}$ in $\text{s}^{-1}$	750 +/- 18	314 +/- 9	60 +/- 11	350 +/- 40
$K_M$ in $\mu\text{M}$	74 +/- 9	11 +/- 2	4741 +/- 1738	5355 +/- 1190
$K_i$ in mM	24 +/- 4	6 +/- 1	N.A.	N.A.

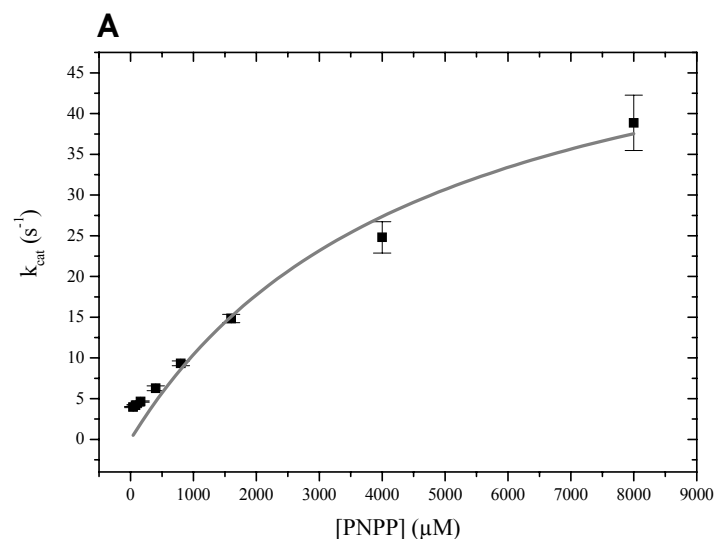
Viele kinetische Studien der 5'-NT bestätigen, dass das Enzym keiner Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Garcia et al., 1997; McMillen et al., 2003; Neu, 1967b; Ruiz et al., 1989). Hierbei haben vor allem Garcia et al. auf den Substrathemmungseffekt aufmerksam gemacht, wobei sie beobachtet haben, dass dieser Effekt bei den Substraten ADP und ATP stärker ist als bei AMP. Diese Daten zusammen mit Ergebnissen von Substrat-Verdrängungsstudien haben die Autoren dazu veranlasst, eine zweite Bindungsstelle im Enzym zu postulieren. Die kinetischen Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Vermutung. Eine mögliche zweite Bindestelle könnte auch die Bindung von Diadenosinphosphaten an das Enzym erleichtern. In Kapitel 7 wird eine hypothetische Funktionsweise des Enzyms vorgestellt, die diese Ergebnisse erklären kann.

Die hier bestimmten kinetischen Parameter für das Wildtyp-Protein mit AMP als Substrat weichen ab von früheren Publikationen. So finden Ruiz et al. einen  $K_M$ -Wert von 45  $\mu\text{M}$  und McMillen et al. einen von 93  $\mu\text{M}$ . Der hier bestimmte  $K_M$ -Wert liegt mit 74  $\mu\text{M}$  dazwischen. Beide Autoren haben jedoch die Konstante bestimmt, indem nur die Daten vor der Substratinhibierung ausgewertet wurden. Nimmt man diesen Ansatz für die hier gefundenen Werte errechnet sich ein  $K_M$ -Wert von 52  $\mu\text{M}$  (nach Eadie-Hofstee), was sehr nahe an dem von Ruiz ermittelten Wert liegt. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch im niedrigen Substrat-Bereich die zweite Bindestelle die Kinetik beeinflusst, scheint es sinnvoll zu sein, die Parameter über ein Substrathemmungsmodell zu bestimmen. Es sei al-

lerdings auch darauf hingewiesen, dass die unterschiedlichen mathematischen Methoden (Gleichunglinearisierungen gegen direktes Anpassen der Parameter in die Gleichung) zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können (Kakkar et al., 1999).

Eine Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) wurde zuvor lediglich von McMillen et al. bestimmt, die einen Wert von  $1,2 \text{ s}^{-1}$  Wert fanden. Dies steht in Kontrast zu den hier gefundenen  $750 \text{ s}^{-1}$ . Der Unterschied erklärt sich wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Metallionen, die im Reaktionsansatz verwendet wurden. McMillen et al. haben die erste Metallbindestelle mit  $\text{Zn}^{2+}$  besetzt und die zweite mit  $\text{Co}^{2+}$ , hier wurde lediglich  $\text{Co}^{2+}$  verwendet. Zink scheint das natürliche Metallion zu sein, da es aus dem Medium mit aufgereinigt wird (Dvorak und Heppe, 1968; McMillen et al., 2003). Auf der anderen Seite konnte auch gezeigt werden, dass  $\text{Zn}^{2+}$  das Enzym inhibiert (Neu, 1967a). Auch für  $\text{Mn}^{2+}$ , das für die Experimente unter reduzierenden Bedingungen verwendet wurde, findet sich eine etwa halbierte Aktivität.

Der Substrathemmungseffekt wurde auch für die Substrate ADP, ATP und Ap4A beobachtet (Daten nicht gezeigt), nicht aber für das artifizielle Substrat pNPP in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich (Abbildung 34).



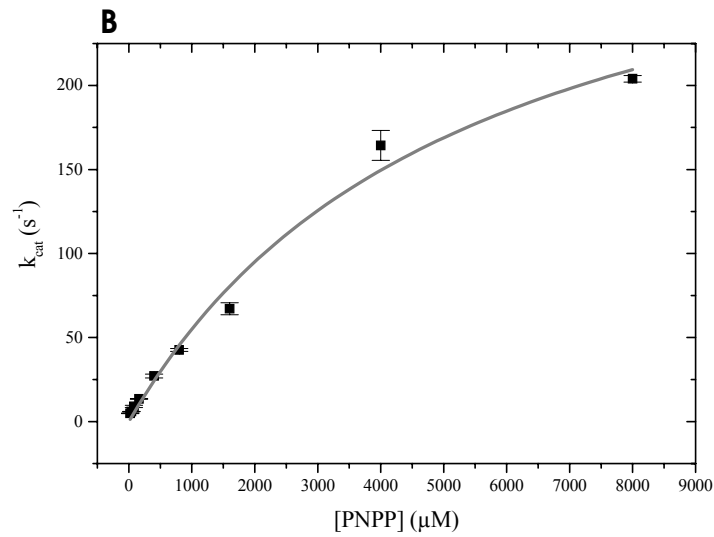


Abbildung 34. Abhängigkeit des Wildtyp-Proteins (A) und des PL-Enzyms (B) von der pNPP-Konzentration. Aufgetragen ist die Aktivität als Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) gegen die Substratkonzentration (AMP in  $\mu\text{M}$ ). 5 mM  $\text{CoCl}_2$ , pH 7,5. Die Kurve passt die Messpunkte nach der Michaelis-Menten-Gleichung an (s. (Formel 3, Abschnitt 2.6.2.2).

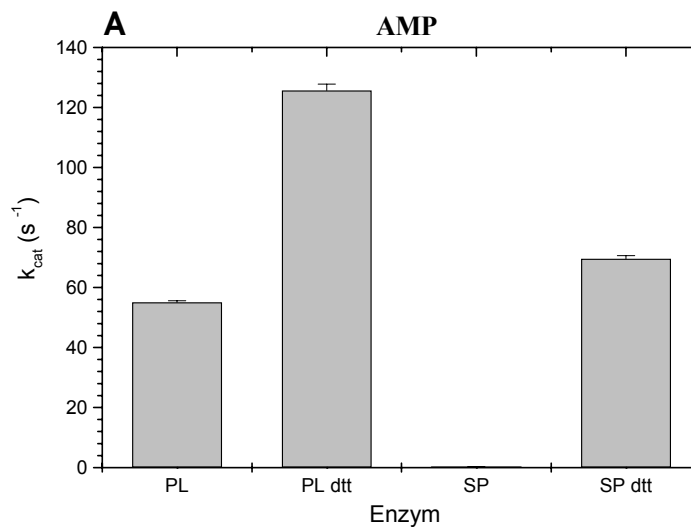
Für das Substrat pNPP ist grafisch keine Substratsättigung zu sehen. Mathematisch lassen sich im Gegensatz zu den AMP-Messungen jedoch durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben. Aufgrund der Autohydrolyse des Substrats unter den sauren Bedingungen des Assays kann nicht bei höheren Substratkonzentrationen gemessen werden. Die kinetischen Parameter für das Wildtyp-Protein und die PL-Mutante sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Es fällt auf, dass die  $K_M$ -Werte für das Substrat pNPP mit 4,7 mM für das Wildtyp-Protein und 5,4 mM für das PL-Enzym zwei Größenordnungen höher liegen als bei AMP. Dies deutet darauf hin, dass pNPP entweder sehr viel schwächer an die Bindungstasche der 5'-NT bindet oder aber eine zweite unbekannte Bindungsstelle im Enzym besetzt.

Ein weiterer wichtiger Unterschied im Vergleich zum AMP-Umsatz besteht darin, dass die PL-Mutante pNPP schneller umsetzt als das Wildtyp-Protein ( $k_{\text{cat}}$  350  $\text{s}^{-1}$  zu 60  $\text{s}^{-1}$ ) während AMP vom Wildtyp-Protein schneller umgesetzt wird ( $k_{\text{cat}}$  314  $\text{s}^{-1}$  zu 750  $\text{s}^{-1}$ ). Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass die Substrate unterschiedlich umgesetzt werden. Vgl. Kapitel 7 für eine mögliche Erklärung des kinetischen Verhaltens der 5'-NT.

## 5.2 Reduktionsexperimente mit den disulfidverbrückten 5'-NT Enzymen

Anders als die PL-Mutante zeigt das SP-Enzym unter oxidierenden Bedingungen nur eine sehr schwache Aktivität. Die Aktivität lässt sich auch nicht an das in Abschnitt 5.1 beschriebene Substrathemmungsmodell anpassen (Daten nicht gezeigt).

Es stellt sich die Frage, ob dieses veränderte kinetische Verhalten allein auf die Beschränkung in der Rotationsfreiheit aufgrund des Einbaus der Disulfidbrücken zurückzuführen ist, oder aber ob die eingeführten Punktmutationen an sich bereits zu den abweichenden Kinetiken führt. Um diese Frage zu entscheiden, wurden die disulfidverbrückten Enzyme mit DTT reduziert. Weil DTT  $\text{Co}^{2+}$  komplexiert, wurden die Experimente mit  $\text{MnCl}_2$  durchgeführt, wodurch die Resultate nicht mit denen im vorherigen Abschnitt besprochenen vergleichbar sind.



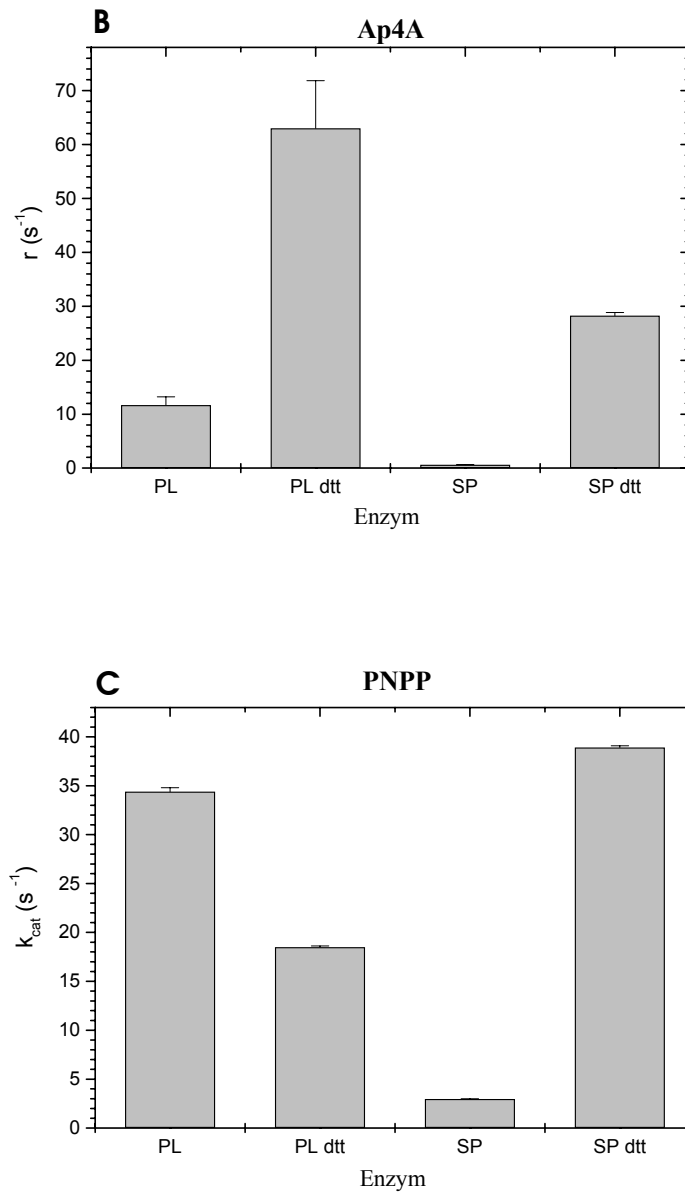


Abbildung 35. Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der disulfidverbrückten Mutanten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. Als Reduktionsmittel wurde DTT verwendet. A. AMP als Substrat, die Reaktionsgeschwindigkeit ist als Wechselzahl  $k_{cat}$  angegeben. B. Ap4A als Substrat, die Reaktionsgeschwindigkeit ist als Aktivität  $r$  angegeben. C. pNPP als Substrat, die Reaktionsgeschwindigkeit ist wieder als  $k_{cat}$  angegeben. Messungen bei 10 mM  $MnCl_2$ , pH 7,5, je Substrat wurden 760  $\mu M$  Substrat eingesetzt. In Tabelle 21 sind die Messwerte zusammengefasst.

Tabelle 21. Aktivitäten der disulfidverbrückten Enzymvarianten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen.

Enzym	Substrat		
	AMP	Ap4A	pNPP
PL	55,0 +/- 0,6	11,7 +/- 1,5	34,4 +/- 0,4
PL <sub>dt</sub>	125,6 +/- 2,1	63,0 +/- 8,9	18,5 +/- 0,1
SP	0,3 +/- 0,02	0,6 +/- 0,1	3,0 +/- 0,02
SP <sub>dt</sub>	69,6 +/- 1	28,3 +/- 0,6	38,9 +/- 0,2

Wird AMP als Substrat verwendet (Abbildung 35 A), können beide Enzymvarianten mit DTT aktiviert werden. Die Aktivität des PL-Enzyms verdoppelt sich, die der SP-Mutante steigt 250-fach an. Dieses Ergebnis zeigt, dass beide Enzyme durch Aufbrechen der Disulfidbrücke Rotationsfreiheit gewinnen und diese Freiheit in erhöhte Aktivität umsetzen können. Würden die Punktmutationen selber die Kinetik der 5'-NT beeinflussen, so würde man keine Aktivitätsveränderung zwischen dem oxidierten und dem reduzierten Zustand erwarten.

Interessant ist, dass das Aktivierungsmuster der PL-Mutante offensichtlich abhängig ist von der Größe des Substrats. Wird das wesentlich größere Substrat P<sup>1</sup>, P4-di-Adenosine-5'-tetrachosphat (Ap4A) verwendet (Abbildung 35 B), so findet sich für die PL-Mutante eine 6-fache Aktivitätssteigerung nach Reduktion der Disulfidbrücke. Bei dem sehr kleinen Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) kommt es sogar zu einer Reaktionsverlangsamung um 40 % unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 35 C). Hierfür bieten sich zwei Erklärungen an, die sich gegenseitig keinesfalls ausschließen, und beide davon ausgehen, dass das PL-Protein in Lösung in einer ähnlich halboffenen Konformation wie es die Röntgenstruktur zeigt (Abschnitt 4.3) vorliegt. 1) Die Bindungstasche in der C-terminalen Domäne ist in der halboffenen Konformation schlechter zugänglich als in der ganz offenen Konformation. Für das kleine Substrat pNPP ist die Zugänglichkeit aber bereits optimal, so dass ein Öffnen der Disulfidbrücke nur einen Zeitverlust durch die volle Rotationsbewegung bedeutet. 2) Die Umsetzung des pNPP-Substrats unterscheidet sich von der Umsetzung der anderen Substrate z.B. dadurch, dass pNPP eine andere Bindungstasche im Enzym besetzt oder aber gar keine Bindungstasche benötigt.

Die erste Erklärung wird dadurch unterstützt, dass die Aktivierung nach Reduktion der Disulfidbrücke stärker ist für das größere Substrat Ap4A gegenüber dem kleineren Substrat AMP. Die zweite Erklärung wird durch die kinetischen Daten des vorherigen Abschnitts unterstützt und dadurch, dass die SP-Mutante bei dem Substrat pNPP unter reduzierenden Bedingungen nur 10-fach aktiviert wird (Abbildung 35 C). Die hohe Aktivität der SP-Mutante unter oxidierenden Bedingungen spricht dafür, dass die C-terminale Domäne, auf der sich die Bindungstasche befindet (Knöfel und Sträter, 1999), nicht notwendig ist für



die Substratumsetzung. Eine schwache Bindung von pNPP an die N-terminale Domäne würde auch die hohen  $K_M$ -Werte des Substrats erklären (Tabelle 20, Abschnitt 5.1). Die Steigerung in der Aktivität würde dann dadurch erklärt werden, dass die Arginin-Reste 375, 379 und 410, die den Übergangszustand stabilisieren (Knöfel und Sträter, 2001b), durch Öffnen der Disulfidbrücke in das aktive Zentrum rotieren könnten und somit die Reaktion beschleunigen. Dies könnte auch erklären, warum pNPP von der PL-Mutante im oxidierten Zustand besser umgesetzt wird als im reduzierten Zustand. Die offene Konformation ist energetisch zweifellos günstiger als die halboffene Konformation weil sie nur in der disulfidverbrückten PL-Mutante gefunden wurde. Dadurch hat das Enzym eine höhere Neigung, in die geschlossene Konformation überzugehen, was wiederum die Reaktion mit dem Substrat pNPP beschleunigt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Domänenrotation ein integraler Bestandteil des katalytischen Mechanismus der 5'-NT ist. Dieses Ergebnis stützt sich jedoch auf die Experimente mit den disulfidverbrückten Proteinen. Hier muss man von der Annahme ausgehen, dass die eingeführten Disulfidbrücken das Protein nur durch die gewünschte, das heißt rotationsbeschränkende, Wirkung beeinflussen, nicht aber durch die Punktmutationen als solche. Durch die kristallographische Strukturanalyse (Kapitel 4) konnte gezeigt werden, dass die Punktmutationen die strukturelle Integrität des Proteins nicht kompromittieren und insbesondere das aktive Zentrum intakt geblieben ist. Es ist jedoch nicht möglich, alle Einflüsse einer Punktmutation strukturell zu erfassen. Auf der anderen Seite ist es in dem hier vorliegenden Fall auch nicht möglich, durch Kontrollexperimente den Einfluss einer einzelnen Mutation unabhängig von der Domänenbewegung zu analysieren. Das liegt daran, dass die Mutationen zwangsläufig an der Kontaktfläche der Domänen eingeführt werden mussten, damit die eingeführten Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden konnten. Damit ist es auch sehr wahrscheinlich, dass auch unter reduzierenden Bedingungen die Rotationsbewegung durch die Mutationen beeinflusst ist. Aus diesem Grunde ist es unmöglich, die Effekte, die die einzelnen Mutationen auf die Rotationsbewegung und auf andere funktionelle Aspekte des Proteins haben separat voneinander zu analysieren. Alle hier vorliegenden Daten deuten jedoch darauf hin, dass durch die Mutationen lediglich die Rotationsfreiheit beschränkt wird.