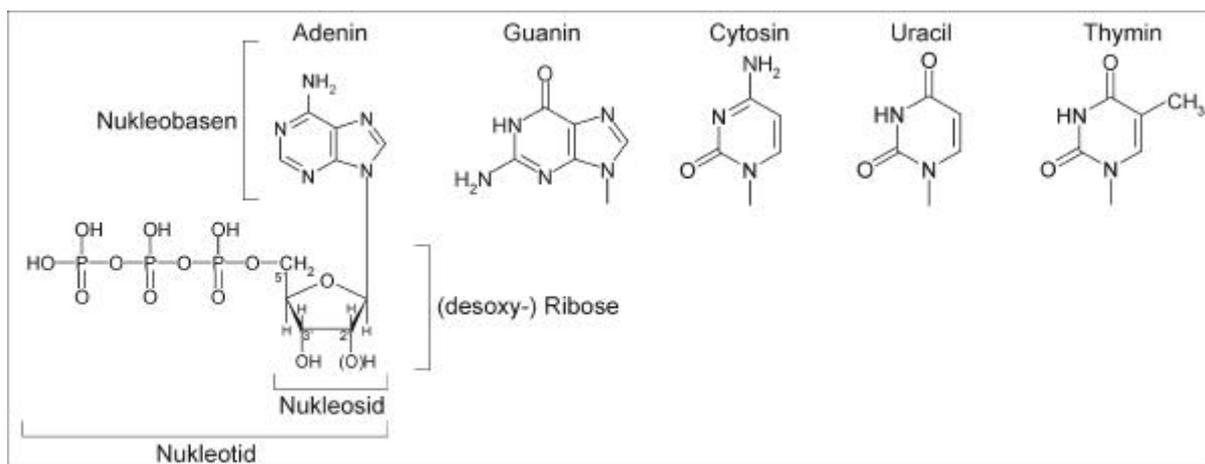


## 3. Einleitung

### 3.1. Nukleotide

Nukleotide (Nukleosid-5'-phosphate) sind die Phosphorsäureester von Nukleosiden, die wiederum aus Nucleobasen bestehen, die N-glykosidisch mit C1' der furanosiden  $\beta$ -D-Ribose oder 2-Desoxy-( $\beta$ )-D-Ribose verbunden sind, Abbildung 3.1. Namensgebend sind die in Nucleinsäuren vorkommenden Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Uracil, Cytosin und Thymin, die Nucleobasen (siehe z.B. (Beyer und Walter, 1991)).



**Abbildung 3.1: Strukturformeln der Nucleotide**

Nucleotide sind an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt. Sie sind Bausteine der Nucleinsäuren, aktivierte Intermediate in Biosynthesen (z.B. UDP-Glucose bei der Glycogen-Synthese), ATP dient als universeller Energielieferant der Zelle. Nucleotide sind Regulatoren von Stoffwechsel und Genexpression (z.B. cyclo-AMP) sowie als Bestandteile von Coenzymen und prosthetischen Gruppen an zahlreichen zellulären Reaktionen beteiligt. Letztere sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst (verkürzt aus (Karlson *et al.*, 1994)).

<b>Coenzym, prosthetische Gruppe</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Übertragene Gruppe</b>
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid	NAD <sup>+</sup>	Wasserstoff, ADP-Ribose
Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	NADP <sup>+</sup>	Wasserstoff
Flavin-Mononukleotid	FMN	Wasserstoff
Flavin-Adenin-Dinukleotid	FAD	Wasserstoff
Adenosin-Triphosphat	ATP	Phosphorsäure-Rest und AMP
Phospho-Adenosin-Phospho-Sulfat	PAPS	Schwefelsäure-Rest
Cytidin-Diphosphat	CDP	Phosphocholin und Verwandte
Uridin-Diphosphat	UDP	Zucker, Uronsäure
Adenosylmethionin	SAM	Methyl-Gruppe
Coenzym A	CoA	Acetyl-Gruppe
B <sub>12</sub> -Gruppen	B <sub>12</sub>	Umlagerungen

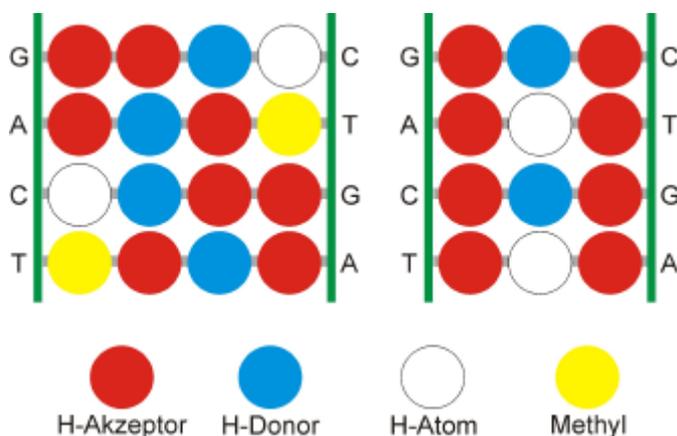
**Tabelle 3-1: Coenzyme und prosthetische Gruppen mit Nukleotid-Anteilen**

Auf einen bestimmten Nukleotid-Faltungstyp wird am Beispiel der Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase eingegangen (Kapitel 4, ab Seite 17).

### 3.2. Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind die Polymere der Nukleotide, die ein Polyester-Rückgrat, bestehend aus wiederkehrenden Phosphat-(Desoxy-)Ribose-Einheiten, besitzen. Verbunden sind jeweils das Phosphat des einen mit dem 3'-OH des Furanosids des nächsten Nukleotids. Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht aus den Nukleotiden Desoxy-Adenosin-Monophosphat (dAMP), Desoxy-Guanosin-Monophosphat (dGMP), Desoxy-Cytidin-Monophosphat (dCMP) und Desoxy-Thymidin-Monophosphat (dTMP) und liegt meist als antiparalleler Doppelstrang in der A-, B- oder Z-Form vor. Diese Formen unterscheiden sich unter anderem in der Gangrichtung, den geometrischen Parametern der Basenpaare und ihrer Stapelung und in der Zuckerwellung (C3'-endo für A-DNA, C2'-endo für B-DNA; beides kommt in Z-DNA vor). Dabei bilden im Allgemeinen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin die Basenpaare, die nach ihren Entdeckern auch Watson-Crick-Basenpaare genannt werden (Watson und Crick, 1953). Ribonukleinsäure (RNA) besteht aus den Nukleotiden Adenosin-Monophosphat (AMP), Guanosin-Monophosphat (GMP), Cytidin-Monophosphat (CMP) und Uridin-Monophosphat (UMP) und kommt meist einzelsträngig mit umfangreicher Sekundärstruktur, und wegen der 2'-OH Gruppe, auch Tertiärstruktur vor. Sie

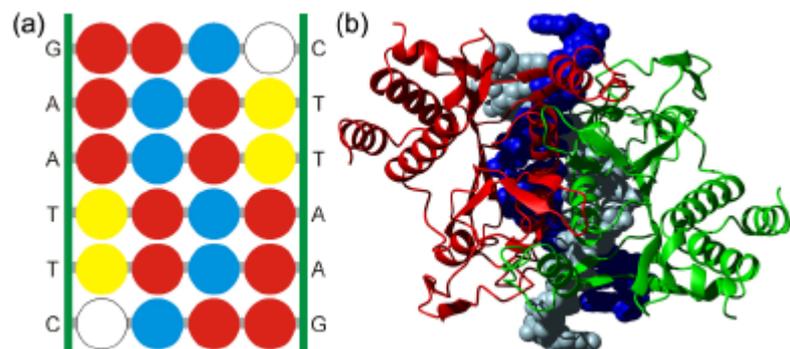
hat strukturelle und katalytische (ribosomale RNA, rRNA; Ribozyme) sowie funktionelle Aufgaben (transfer-RNA, tRNA bei der Proteinsynthese; Boten-RNA, mRNA beim Transport der genetischen Information vom Zellkern zu den Orten der Proteinsynthese, den Ribosomen). Proteine haben eine Vielzahl von Wegen gefunden, Nukleinsäuren zu binden. Durch die Erkennung von verschiedenartigen Wechselwirkungsmustern (Abbildung 3.2) kann diese Bindung hochspezifisch sein. Restriktionsendonukleasen wie z.B. *EcoRI* erkennen die palindromische Sequenz GAATTC, deren zweizählige Symmetrie sich im Enzym widerspiegelt (Horvath und Rosenberg, ) , Abbildung 3.3.



**Abbildung 3.2: Erkennungsmuster von Basenpaaren**

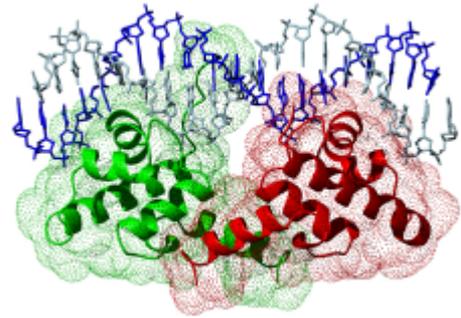
Adaptiert aus (Branden und Tooze, 1998).

**Abbildung 3.3: Erkennungsmuster und Protein-DNA-Komplex von *EcoRI***



(a) Erkennungsmuster nach dem Farbcode der Abbildung 3.2, adaptiert aus (Branden und Tooze, 1998). (b) Schematische Darstellung von *EcoRI*-Restriktionsendonuklease im Komplex mit der Erkennungssequenz (PDB-Code 1cl8).

Weitere wichtige Protein-DNA-Wechselwirkungen kommen bei der Regulation der Genexpression vor. Neben dem Leucin-Zipper, den Helix-Loop-Helix- und Zink-Finger-Motiven spielt das Helix-Turn-Helix-Motiv eine bedeutende Rolle. Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.4 exemplarisch der  $\lambda$ -Repressor im Komplex mit seiner Operator-DNA gezeigt (PDB-Code 1lmb (Beamer and Pabo, 1992)).



**Abbildung 3.4: Struktur des I-Repressors**

Für weitere Informationen siehe gängige Lehrbücher der Biochemie oder Strukturbiologie, z.B. (Alberts *et al.*, 1994; Branden und Tooze, 1998; Karlson *et al.*, 1994; Stryer, 1988).

### 3.3. Kristallographie als Methode der Strukturbestimmung

Die Röntgenkristallographie ist abhängig vom Vorliegen regelmäßiger Einzelkristalle. Die Moleküle einer übersättigten Lösung lagern sich in gleichförmiger, immer wiederkehrender Art und Weise aneinander an und bilden Kristallkeime, die Schichtenweise zu einem größeren Kristall anwachsen. Kristalle, beziehungsweise die in ihnen angeordneten Elektronen lenken elektromagnetische Strahlung einer Wellenlänge ab, die den Atomabständen in etwa entspricht. Bei biologischen Makromolekülen liegen die Bindungsabstände im Bereich einer Standard-Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindung ( $1.4 \text{ \AA} = 1.4 \times 10^{-10}$  Meter). Daher ist die Röntgenstrahlung einer rotierenden Kupfer-Anode (Cu-K $\alpha$  Strahlung:  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) oder Synchrotronstrahlung im Bereich  $\lambda = 1 \text{ \AA}$  geeignet. Die Diffraktion erfolgt nach dem Gesetz von Bragg

$$2d \sin \theta = n \lambda$$

mit  $d$ : Netzebenenabstand,  $\theta$ : Beugungswinkel und  $\lambda$ : Wellenlänge.

Im Experiment werden der Beugungswinkel und die Intensität der abgelenkten Welle (des Reflexes) gemessen und einer Netzebene im reziproken Raum des Kristallgitters zugeordnet, gekennzeichnet durch die Miller-Indizes  $h$ ,  $k$  und  $l$ . Diese experimentelle Fourier-Transformation (reales Kristallgitter  $\leftrightarrow$  reziprokes Kristallgitter) wird durch eine mathematische Fourier-Transformation behandelt, die aus den Struktur Faktoren die Elektronendichte berechnet. Der einzelne diffraktierte Röntgenstrahl kann als periodische Fourier-Reihe beschrieben

werden und ergibt aufsummiert über alle Reflexe  $hkl$  den Strukturfaktor  $\mathbf{F}_{hkl}$ . Dabei wird jedoch nur die Intensität gemessen, die dem Quadrat der Strukturfaktoramplitude entspricht:

$$I_{hkl} = \mathbf{F}_{hkl} \mathbf{F}_{hkl}^* = F_{hkl}^2$$

( $\mathbf{F}_{hkl}^*$ : komplex konjugierter Strukturfaktor des Reflexes  $hkl$ ). Der Strukturfaktor  $\mathbf{F}_{hkl}$  ist eine vektorielle, komplexe Größe und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] = F_{hkl} \exp(i \alpha_{hkl})$$

mit  $f_j$ : atomarer Streufaktor des Atoms  $j$ ,  $F_{hkl}$ : Strukturfaktoramplitude des Reflexes  $hkl$ ,  $\alpha_{hkl}$ : Phase des Reflexes  $hkl$ . Die Elektronendichte  $\rho$  wird dann durch Fourier-Transformation berechnet:

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

mit  $V$ : Volumen der Elementarzelle.

Die Phaseninformation  $\alpha_{hkl}$  geht beim Diffraktionsexperiment verloren und muss auf andere Weise bestimmt werden. Neben direkten Methoden und dem Isomorphen Ersatz sind die Methoden Molekularer Ersatz und Anomale Dispersion in der Anwendung. Beim Molekularen Ersatz muss ein Modell für die zu lösende Struktur vorliegen, das schon größere Ähnlichkeit aufweist. Das Modell (bzw. dessen Patterson-Funktion  $P_m$ ) wird mit der (Patterson-Funktion  $P_x$  der) Elektronendichte überlagert, wobei die gewünschte Orientierung (die Rotationswinkel  $\alpha, \beta, \gamma$ ) dem Maximum der Kreuzrotationsfunktion  $R$  entspricht:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P_m(\mathbf{u}_m) \times P_x(\mathbf{u}_x) d\mathbf{u}$$

mit  $U$ : Integrationsvolumen der Patterson-Funktion. Die Patterson-Funktion kann aus den experimentellen Daten berechnet werden und enthält keine komplexen Anteile:

$$P(u, v, w) = 1/V \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)]$$

Mit der richtigen Orientierung kann dann noch die Translationsfunktion bestimmt werden und somit das Modell entsprechend dem tatsächlichen Molekül in der Elementarzelle platziert werden.

Die Anomale Dispersion beruht auf der Absorption von Röntgenstrahlung bei bestimmten Wellenlängen durch die Elektronenhülle schwerer Atome, die

bewirkt, dass das Gesetz von Friedel nicht mehr gilt, demzufolge die Strukturfaktoramplituden der Reflexe mit den Indizes  $h,k,l$  und  $-h,-k,-l$  gleich sind. Die absorbierte Strahlung wird mit einer veränderten Phase wieder abgegeben und verändert somit auch die Amplitude des Strukturfaktors. Dies ist z.B. für Selen der Fall, welches anstelle des Schwefels in Methionin-Seitenketten von Proteinen eingebaut werden kann. Durch diesen anomalen Effekt können die Positionen der Schweratome aus Differenz-Patterson-Funktionen berechnet und somit die Phasen der Strukturfaktoren bestimmt werden.

Obwohl die Kristallstrukturanalyse eine Momentaufnahme eines biologischen Systems liefert, enthält sie dennoch Informationen über dynamische Vorgänge im Kristall in Form der sog.  $B$ -Faktoren. Sie sind ein Maß für die positionelle Auslenkung eines Atoms, das um die angegebenen Koordinaten oszilliert (und daher ehemals „Temperatur“-Faktoren genannt worden). D.h. je höher der  $B$ -Faktor, umso größer die räumliche Ausdehnung der Elektronenwolke.  $B$ -Faktoren werden genauso wie die Positionen der Atome und deren Besetzungsfraction während der Verfeinerung an die experimentellen Daten angepasst. Liegen ausreichend Messdaten vor, können individuelle  $B$ -Faktoren auch anisotrop verfeinert werden. Zu den drei positionellen Parametern ( $x, y, z$ ) kommen dann noch sechs weitere für den anisotropen  $B$ -Faktor eines Atoms. Das bedeutet, dass pro Atom mindestens neun (vier bei isotropen  $B$ -Faktoren) Messwerte vorliegen müssen, was meist nur bei hohen maximalen Auflösungen der Fall ist. Weitere Ausführungen findet man in den gängigen Lehrbüchern der Kristallographie, z.B. (Drenth, 1994).

In dieser Arbeit werden zwei Kristallstrukturen vorgestellt. Diejenige der humanen Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase wurde mit der SAD-Methode (single-wavelength anomalous dispersion) gelöst, die der Domäne I der Homing-Endonuklease PI-SceI mit Molekularem Ersatz.