

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Röntgenkristallstruktur der 5'-Nucleotidase (5'-NT) aus *Escherichia coli* mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes und der multiplen anomalen Dispersion bis zu einer maximalen Auflösung von 1.7 Å gelöst werden. Die 5'-NT besteht aus zwei Domänen, welche über eine lange  $\alpha$ -Helix verbunden sind. Das aktive Zentrum befindet sich in einer Spalte zwischen den beiden Domänen. Während die größere N-terminale Domäne, welche die Metalliganden enthält, eine starke Ähnlichkeit zu anderen bereits aufgeklärten Strukturen von Metallophosphoesterasen mit Dimetallzentrum aufweist, wie den Ser/Thr-Proteinphosphatasen (Goldberg *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1995), dem Calcineurin (Kissinger *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995) und den violetten sauren Phosphatasen (Sträter *et al.*, 1995; Klabunde *et al.*, 1996; Guddat *et al.*, 1999; Uppenberg *et al.*, 1999; Lindqvist *et al.*, 1999), so erscheint die Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne einzigartig zu sein. Eine Überlagerung der Liganden des aktiven Zentrums der 5'-NT, der violetten Phosphatase, der Proteinphosphatase 1 und der Proteinphosphatase 2B zeigt, daß die konservierten Metalliganden und das katalytische His-117 sehr gut mit identischen Konformationen überlagern.

Strukturen von insgesamt vier unterschiedlichen Kristallformen wurden analysiert, in denen die 5'-NT unterschiedliche Konformationen besitzt in Bezug auf die relativen Orientierungen der zwei Domänen. Die C-terminale Domäne ist in den Kristallformen III und IV um bis zu 96° relativ zu ihrer Orientierung in den Kristallformen I und II rotiert. Die Bindung von Substrat und Substrat-analogen Verbindungen an beide Enzymformen unterstellt die Vermutung, daß es sich bei den Kristallformen I und II um eine inaktive Form des Enzyms handelt, da das Substrat etwa 20 Å entfernt vom aktiven Zentrum bindet. Dagegen enthalten die Kristalle III und IV das Enzym in seiner aktiven Konformation. Die 5'-Nucleotidase wurde in der aktiven Konformation als Kokristallkomplex mit Adenosin und Phosphat (Kristallform III) sowie mit dem Inhibitor  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP (Kristallform IV) analysiert. In dieser Konformation binden Adenosin und Phosphat bzw. der Inhibitor am aktiven Zentrum. Der Vergleich der Bindungsmodi zeigt große Ähnlichkeiten der Bindung von ATP an die inaktiven Struktur I, und Adenosin sowie Phosphat bzw.  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP an die aktiven Konformationen. Auffällig sind dabei vor allem zwei Phenylalanine, die den Adeninring durch hydrophobe Stapelwechselwirkung stabilisieren, sowie drei Argininreste, die die Phosphatgruppen binden. Auch in den bereits strukturell charakterisierten Phosphatasen konnten mittels Kokristallstrukturen mit Phosphat und Wolframat Substratbindende und den Übergangszustand stabilisierende Reste identifiziert werden. In den Protein-

phosphatasen übernehmen diese Aufgaben zwei Argininreste und ein Tyrosin, während in den violetten Phosphatasen zwei Histidine und ein Tyrosin vorhanden sind.

Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus geht von einem Michaelis-Komplex aus, bei dem ein Wassermolekül die Rolle des am Phosphor angreifenden Nucleophils übernimmt. Der Substratbindungsmodus stützt sich im wesentlichen auf die strukturell beobachtete Anbindung von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP an die 5'-NT. Die Umsetzung des Substrats verläuft über einen Übergangszustand nach einem *inline*-Mechanismus, der mit einer Inversion der Konfiguration am Phosphoratom verbunden ist. Somit muß der Produktkomplex einen anderen Bindungsmodus der Phosphatgruppe aufweisen als der Substratkomplex.

Die in den 5'-NT Strukturen beobachtete relative Rotation der N- und C-terminalen Domänen um  $96^\circ$  beschreibt eine erstmalig beobachtete Art der Domänenbewegung, wobei die kleinere C-terminale Domäne annähernd um ihren Massenschwerpunkt rotiert. Dabei bewegen sich die Reste des Domäneninterfaces hauptsächlich in Richtung des Interfaces. Diese Art der Domänenrotation unterscheidet sich wesentlich von der klassischen gelenkartigen Domänenschließbewegung, bei der sich die Substrat- oder Liganden-Bindungsspalte zwischen den beiden Domänen öffnet, wobei sich die Aminosäuren in der Spalte vor allem senkrecht zum Domäneninterface bewegen. Es konnten Strukturen in der offenen (inaktiven) und geschlossenen (aktiven) Konformation mit Substraten und Inhibitoren beobachtet werden, die durch große Domänenrotationen ineinander überführt werden konnten. Dabei bewegt sich das Substrat um bis zu 20 Å auf das aktive Zentrum zu. Neun Konformere aus vier unterschiedlichen Kristallformen wurden untersucht. Die Analyse der Domänenrotation basierte zunächst auf einem Vergleich dieser Konformere. Dabei wurden Rotationsachsen erhalten, die etwa alle in einer Ebene liegen, in der sich auch die Domänenzentren und die Gelenkregion befinden. Hierbei bilden zwei Reste, Lys-355 und Gly-356, den Kernbereich der Gelenkregion und erfahren große Änderungen ihrer Hauptketten-Torsionswinkel. Auch konnte eine Domänenrotation um etwa  $2.8^\circ$  in einer Kristallform direkt beobachtet werden. Die dynamischen Informationen konnten aus den kristallographischen Temperaturfaktoren, also direkt aus der Kristallstrukturanalyse dieser Kristallform, erhalten werden.

Da ein Primärsequenzvergleich mit anderen bakteriellen und tierischen 5'-NTs viele konservierte Regionen aufweist, die sich besonders in der N-terminalen Domäne in Bereichen der Liganden des aktiven Zentrums befinden, handelt es sich bei der 5'-NT aus *E. coli* wahrscheinlich um ein gutes Modell für die noch unaufgeklärten Strukturen anderer 5'-NTs. Die

anderen 5'-NTs sind sehr wahrscheinlich ebenfalls aus zwei Domänen aufgebaut, die vielleicht auch eine Domänenrotation zur Kontrolle des Katalysemechanismus besitzen.

Um weitere Aufschlüsse über den genauen Reaktionsmechanismus zu bekommen, können weitere Komplexe des Proteins mit Substraten strukturell analysiert werden. Dazu sind durch ortsspezifische Mutagenese Enzyme zu präparieren, die eine nahezu unveränderte Substratbindung aber kaum noch katalytische Aktivität zeigen, so daß durch Inkubation von Kristallen mit Substrat und Schockfrieren der Kristalle Enzym-Substratkomplexe strukturell analysiert werden können. Die vorhandene geschlossene Kristallform III der 5'-NT ist hinsichtlich der maximalen Auflösung der Kristalle (2.1 Å) und der Möglichkeit des Schockfrierens für diese Untersuchungen geeignet. Zur Präparation eines inaktiven Enzyms bieten sich solche Reste des aktiven Zentrums an, die an den direkten Katalyseschritten aktiv beteiligt sind, also (i) Metallaustausch, (ii) Mutation von Metalliganden und (iii) Mutation von anderen katalytisch aktiven Resten des aktiven Zentrums, wie beispielsweise der drei Argininreste oder des katalytischen His/Asp-Paares. Auch Untersuchungen der Charakterisierung der Metallbindungsspezifität und der Einfluß von Metallionen auf die katalytische Aktivität sollten von Interesse sein. Obwohl durch Markierung mit <sup>65</sup>Zn ein Zinkgehalt des nativen Enzyms gezeigt werden konnte, ist die Besetzung beider Metallbindungsstellen *in vivo* unklar.

Sehr interessant wird die weitere Untersuchung der Domänenrotation sein. So ist beispielsweise unklar, ob die Domänenbewegung für die Katalyse von Substraten von Nöten ist, also ob nur die offene Konformation die Anbindung von Substraten erlaubt und anschließend nur die geschlossene Konformation in der Lage ist, das gebundene Substrat zu hydrolysieren. Zur Klärung dieser Frage sind Untersuchungen in Lösung durchzuführen, mit denen sich die dynamische Bewegung verfolgen läßt. Dazu bieten sich NMR- oder Fluoreszenzuntersuchungen an. Auch kann die Präparation von ortsspezifischen Mutanten, die das Enzym in eine von den beiden Konformationen „zwingen“, bei der Untersuchung der Domänenrotation hilfreich sein. So konnte R. Schultz-Heienbrock in ersten Versuchen zeigen, daß eine Mutante der 5'-NT aus *E. coli* inaktiv ist, die mittels einer Disulfidbrücke in der offenen Konformation gehalten wird. Die Reduktion der Disulfidbrücke mit Mercaptoethanol bewirkte dagegen eine Aktivierung des Proteins.