

7 Domänenbewegung und katalytischer Mechanismus

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Kristallformen der 5'-NT beschrieben (SP-I, SP-II und PL). Hinzu kommen noch vier weitere bereits beschriebene Kristallformen (1ush, 2ush, 1ho5, 1hpu) und zwei weitere gelöste Strukturen, die noch nicht näher beschrieben worden sind (Mutation His-117 → Ala-117 und die Kokristallisation des Wildtyp-Proteins mit dem Substrat Ap3A). Bis auf die Kristallformen SP-I und 1ush (bzw. 1hp1) sind alle gefundenen Strukturen unterschiedlich bezüglich der Orientierung ihrer beiden Domänen zueinander. Darüber hinaus unterscheiden sich in dieser Hinsicht auch alle Monomere einer jeden asymmetrischen Einheit voneinander, wenn auch in geringerem Ausmaß. Es kann ausgeschlossen werden, dass diese Domänenflexibilität durch die unterschiedlichen Kristallpackungen hervorgerufen worden ist. Die Beobachtung, dass Moleküle in unterschiedlichen Packungsumgebungen ähnliche Temperaturfaktoren-Verteilungen besitzen (Artymiuk et al., 1979), impliziert, dass Kristallkontakte in der Regel keine größeren Bewegungen induzieren. Diese Beobachtung wird durch die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass der Verlauf der Temperaturfaktoren zwei völlig verschiedener Konformationen (SP-II B und 1ho5 B) sehr ähnlich ist, obwohl beide Moleküle sehr unterschiedliche Konformationen einnehmen. Im Falle der 5'-NT scheint es eher so zu sein, dass die große Beweglichkeit die vielen verschiedenen Kristallformen ermöglicht. Eindrucksvolles Beispiel ist hierfür eine Röntgenstruktur des Wildtyp-Proteins, die mit dem Substrat Di-Adenosin-tri-Phosphat kokristallisiert wurde (vorläufige Ergebnisse, Struktur noch nicht vollständig verfeinert). Hier wurde unter den Kristallisationsbedingungen der geschlossenen Konformation 1ho5 eine neue Kristallform erhalten, die darauf zurückzuführen ist, dass sich die Domänen aufgrund des relativ großen Substrats nicht vollständig schließen konnten.

In dieser Arbeit sollte insbesondere der Zusammenhang zwischen der Domänenbewegung und der katalytischen Funktion des Enzyms untersucht werden. Die vergleichenden kinetischen Experimente unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen mit den disulfid-quervernetzten Mutanten haben gezeigt, dass die Rotationsbewegung für die Substrathydrolyse notwendig ist. Die spektroskopischen Daten deuten des Weiteren darauf hin, dass das Enzym in Lösung der offenen Konformation gleicht. Hieraus ergibt sich ein hypothetisches Reaktionsmodell, das auf einer ligandeninduzierten Konformationsänderung beruht. Das Substrat bindet in der offenen Konformation an das Enzym (vgl. Abbildung 42 A). Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung hin zur geschlossenen Konformation des Moleküls Abbildung 42 C). Auf Basis der vorhandenen Daten kann nicht entschieden werden, ob diese Konformationsänderung induziert ist oder durch ein verschobenes Gleichgewicht zustande kommt. Im ersten Fall würde die Bindung des Inhibitors/Substrat direkt den Konformationsübergang ermöglichen, im zweiten Fall würde sich lediglich das Gleichgewicht hin zu der geschlossenen Konformation verschieben, et-

wa dadurch, dass die geschlossene Konformation energetisch günstiger wird. Diese Konformationsänderung hin zu einer geschlossenen Konformation geschieht nur in Anwesenheit eines Inhibitors (AMPCP) und in Anwesenheit von Metallionen, woraus sich ergibt, dass die Rotationsbewegung zumindest zum großen Teil durch den Inhibitor (bzw. das Substrat) induziert wird. Die Notwendigkeit der Metallionen für die Konformationsänderung lässt sich elektrostatisch verstehen. Die Phosphatgruppe des Inhibitors bindet an die Metallionen, wodurch die geschlossene Form stabilisiert wird. Nach der Substrathydrolyse öffnet sich das Enzym wieder und entlässt die Produkte. Wie bereits von Knöfel und Sträter vermutet wurde, ist die Rotationsbewegung also nötig, um das Substrat in das im Proteininneren verborgene aktive Zentrum hereinzudrehen und die Produkte wieder an die Proteinoberfläche zu bringen, damit sie von der Substratbindestelle dissoziieren können (Knöfel und Sträter, 2001a).

Unter der Annahme einer zweiten, schwach-affinen, Substratbindestelle in der C-terminalen Domäne, erlaubt dieses Modell auch eine Erklärung des kinetischen Verhaltens des PL-Enzyms (Abbildung 42). Diese Mutante zeichnet sich kinetisch dadurch aus, dass sie im oxidierten Zustand kleine Substrate schneller hydrolysiert als größere und im oxidierten Zustand die Substratinhibierung sehr viel stärker auftritt als im Wildtyp-Protein. In Abbildung 42 sind die Strukturen SP-I (ganz offen, A), PL (halb-geschlossen, B) und 1hpu (ganz geschlossen, C) einander gegenübergestellt. Nur in A hat das Substrat (hier ATP) freien Zugang zur Substratbindestelle. In B ist der Zugang noch möglich, jedoch sterisch beeinträchtigt durch Reste der N-terminalen Domäne. In C ist ein Zugang des Substrats oder Abgang des Produkts sterisch nicht mehr möglich. Neben der sterischen Beeinträchtigung spielen mit Sicherheit auch elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle (Abbildung 42). Nur in der offenen Konformation liegen die positiv geladenen Argininreste der Substratbindestelle (Arg-375, 379, 410) an der Proteinoberfläche, um die negativ geladenen Substrate binden zu können, in der halb-geschlossenen Konformation sind die Argininreste bereits weiter innen, so dass sie nicht mehr frei zugänglich sind. Vor allem aber kommt es in dieser Konformation zu elektrostatischer Abstoßung zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe des Substrats und dem ebenfalls negativen Rest Asp-268, der in dieser Konformation durchschnittliche interatomare Abstände zwischen 6 und 7 Å zur Phosphatgruppe des Substrats aufweist (s. Abbildung 42, Ausschnittsvergrößerung).

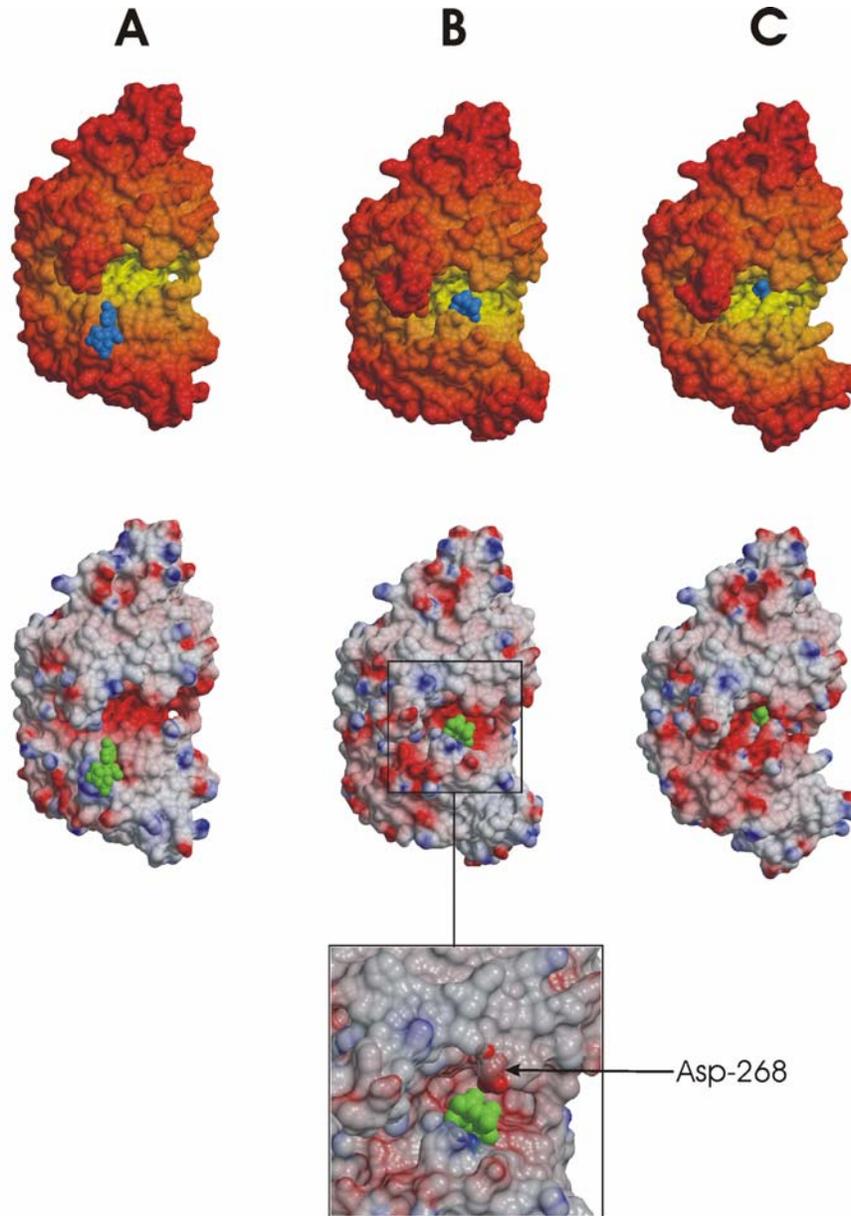


Abbildung 42. Zugang zur Substratbindestelle in den verschiedenen Konformationen. Überlagerung auf 1hpu Kette C. ATP eingefügt durch Überlagerung auf 1hp1. A. SP-I, B. PL Kette A, C. 1hpu Kette C. Die Moleküloberfläche ist in der oberen Reihe eingefärbt nach dem Abstand zum aktiven Zentrum (von gelb (dicht) bis dunkelrot) und in der unteren Reihe nach dem elektrostatischen Potential (rot für negative und blau für positives Potential). In der Ausschnittsvergrößerung in der unteren Abbildung B ist die Oberfläche semitransparent gezeichnet, um den Aspartat-Rest 268 sichtbar zu machen, der als rotes Kalottenmodell gezeichnet ist.

Die sterisch-elektrostatischen Behinderungen in der PL-Mutante erklären, warum hier die Aktivität nach Reduktion der Disulfidbrücke mit der Substratgröße stärker zunimmt.

Daneben erklärt dies auch die stärkere Substratinhibierung der PL-Mutante gegenüber dem Wildtyp-Protein. Da die Ablösung des Substrats oder Produkts aus der Bindungstasche länger dauert, wird die postulierte schwach-affine Bindestelle von einem zweiten Substratmolekül schneller besetzt. Dieser Bindungsmodus ist jedoch unproduktiv, so dass das Substrat dann nicht mehr umgesetzt wird. Je höher die Substratkonzentration, umso mehr ist die zweite Bindestelle besetzt.

In der Tat konnte durch Kokristallisation mit Ap3A (Di-Adenosin-tri-Phosphat) in einem metallfreien Kristallisationsansatz mit dem Wildtyp-Protein eine potentielle zweite Bindestelle für einen zweiten Adenosinring identifiziert werden (vorläufige Ergebnisse, Struktur noch nicht vollständig verfeinert). Obwohl der zweite Adeninring des Ap3A lediglich dem einen Rest Arg-375 eine π - π -Stapelwechselwirkung eingeht, so ist doch dessen Dichte sehr gut definiert, was für eine stabile Bindung spricht, wenngleich die Bindung natürlich schwächer ist, als die des ersten Adeninrings, das mit den beiden Phenylresten 429 und 498 eine hydrophobe Stapelwechselwirkung eingeht. So liegen die durchschnittlichen B -Werte des zweiten Adeninrings $64,0 \text{ \AA}^2$ auch deutlich höher als die des ersten Adeninrings mit $39,2 \text{ \AA}^2$.

Das hier vorgeschlagene Rotationsmodell entspricht somit der Theorie der liganden-induzierten Konformationsänderung, wie es klassischerweise für Hämoglobin beschrieben wurde (Baldwin und Chothia, 1979; Perutz et al., 1998), und auch für viele andere allosterische Enzyme gefunden wurde (Mattevi et al., 1996). Viele induzierte Konformationsänderungen sind auch für Domänenbewegungen in monomeren Proteinen beschrieben wurden. So wird beispielsweise die Citrat Synthase durch Bindung des Koenzyms A zu einer großen Scherbewegung veranlasst (Wiegand und Remington, 1986) und Lactoferrin zeigt eine gelenkartige Domänenrotation um 54° nach Bindung von Eisen (Anderson et al., 1990).

Es häufen sich allerdings Ergebnisse, die belegen, dass Konformationsänderungen auch spontan ohne Anbindung eines Liganden auftreten. So konnte für β -2-Adrenozeptoren gezeigt werden, dass die Signalübertragung, die normalerweise durch eine liganden-induzierte Konformationsänderung herbeigeführt wird, auch bei Überexpression des Rezeptors in transgenen Mäusen auftritt (Bond et al., 1995). Das Enzym Citrat-Synthase wurde in denselben Kristallisationstropfen in einer offenen und einer geschlossenen Konformation gefunden, was beweist, dass beide Konformationen unter den gegebenen Bedingungen im Gleichgewicht stehen (Liao et al., 1991). Für Lysozym konnte mittels NMR-Spektroskopie ebenfalls ein Konformationsgleichgewicht in Lösung bestimmt werden (Goto et al., 2001).

Der 5'-NT scheint ein sehr ähnlicher Mechanismus zugrunde zu liegen. Auch hier haben die spektroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass das Wildtyp-Enzym unter physiologischen Bedingungen in der offenen Konformation vorliegt. Ein spontaner Konformationswechsel scheint allerdings auch hier möglich, da das Enzym ohne Liganden in der

geschlossenen Konformation (1ho5) kristallisieren kann (Knöfel und Sträter, 2001a; Knöfel und Sträter, 2001b).

Die Erkenntnis, dass die 5'-NT sehr überwiegend in einer offenen Konformation vorliegt, war nur möglich durch einen Spektren-Vergleich mit den disulfidverbrückten Mutanten. Obwohl die Zirkulardichroismus-Spektroskopie im UV-nahen Bereich keine quantitativen Aussagen zulässt, ist die Ähnlichkeit der Spektren des SP-Enzyms und des Wildtyp-Proteins derart beeindruckend, dass kein Zweifel an einer identischen Konformation bestehen kann. Schwieriger ist die Konformationsänderung unter den Bedingungen mit Metallionen und Inhibitor einzuschätzen. Das Spektrum des Wildtyp-Proteins gleicht dann sehr dem Verlauf der PL-Mutante, allerdings war es leider nicht möglich, noch vergleichende Messungen mit dem PL-Enzym zu machen, so dass die Spektren nicht direkt miteinander verglichen werden können. Es ist jedoch möglich, dass das PL-Spektrum tatsächlich die Konformation des geschlossenen Enzyms wiedergibt und nicht die, die der in der Kristallstruktur beobachteten entspricht. Wenn man von einem Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation ausgeht, das deutlich auf der Seite der offenen Konformation liegt, so sollte die intermediäre Position der Kristallstruktur PL energetisch ungünstiger sein als die der offenen Konformation. Da das PL-Enzym aufgrund der Disulfidbrücke nicht in die offene Konformation übergehen kann, sollte das Gleichgewicht sich deutlich mehr zu der geschlossenen Konformation verschieben. Dies würde die Ähnlichkeit des PL-Spektrums und des Wildtyp-Spektrums mit Inhibitor und Metallionen erklären. Wie die kinetischen Ergebnisse zeigten und in den Abschnitten 4.4 und 4.5 diskutiert wird, ist eine Beschränkung der Beweglichkeit zwischen der geschlossenen Konformation und der intermediären Konformation aufgrund der eingeführten Disulfidbrücke nicht zu erwarten.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind auch im Zusammenhang mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie aufschlussreich. Die CD-Daten lassen darauf schließen, dass die Metallionen notwendig sind, um das Wildtyp-Protein in Gegenwart von AMPCP in einer geschlossenen Konformation zu halten. Die Metallionen wirken somit als Gegenionen, um der elektrostatische Abstoßung zwischen dem Substrat und dem stark negativen Potential des aktiven Zentrums ohne Metallionen (vgl. Abbildung 42) entgegenzuwirken.

Sind keine Metallionen vorhanden, so bleibt das Wildtyp-Protein auch mit gebundenem Inhibitor in einer offenen Konformation. Es bleibt offen, ob die Bindung des Substratanalogons einen Konformationswechsel induziert, der jedoch nur transient ist aufgrund des fehlenden Metallions oder ob tatsächlich beide Metallionen notwendig sind, um eine Konformationsänderung zu ermöglichen.

8 Zusammenfassung

Das Protein 5'-Nukleotidase (5'-NT) aus *Escherichia coli* hydrolysiert eine große Anzahl verschiedener Nukleotide und Polynukleotide, wobei die Katalyse abhängig ist von zwei Metallionen im aktiven Zentrum. Das bakterielle Protein dient als Modellenzym zum einen, um den Mechanismus der Zweimetallionen-Katalyse von Phosphoestern zu untersuchen und zum anderen, um die Funktionsweise des humanen Homologs Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) zu analysieren.

Die hier vorgelegte Arbeit basiert auf den Röntgenstrukturanalysen der 5'-NT, die gezeigt haben, dass das Enzym in verschiedenen Konformationen kristallisiert. Die Konformationen unterscheiden sich hinsichtlich der Rotation der kleineren C-terminalen Domäne des Proteins relativ zur größeren N-terminalen Domäne. Die größte bislang beobachtete Rotation entspricht einer Drehung der C-terminalen Domäne um $96,7^\circ$. Die Domänenbewegung lässt sich als eine Gelenkbewegung beschreiben, bei der die Reste an der Domänengrenzfläche entlang der Grenzfläche gleiten und nicht - wie bei einer typischen Schließbewegung - sich von der Grenzfläche entfernen (offene Konformation) oder sich ihr nähern (geschlossene Konformation).

Um die funktionelle Bedeutung von Proteinbewegungen nachzuweisen, werden häufig die beweglichen Proteinfragmente über Disulfidbrücken unter der Annahme quervernetzt, dass unter oxidierenden Bedingungen das Protein inaktiv ist, durch Reduktion der Cysteine das Protein aber aktiviert werden kann. In der vorliegenden Arbeit gelang es, ein solches System für die 5'-NT zu entwickeln und sowohl strukturell wie auch biochemisch zu analysieren.

Die Cysteine, die die 5'-NT in einer offenen Konformation (Substratbindestelle weit entfernt vom aktiven Zentrum) fixieren sollten wurden an den Stellen Serin-228 und Prolin-513 eingeführt (Protein SP) und die Cysteine, die das Protein in einer geschlossenen Konformation (Substratbindestelle dicht bei dem aktiven Zentrum) fixieren sollten, wurden an den Stellen Prolin-90 und Leucin-424 eingeführt (Protein PL). Es gelang, die derart modifizierten Gene zu exprimieren, die Proteine zu isolieren und zu kristallisieren. Das PL-Protein kristallisierte in einer tetragonalen Kristallform, das SP-Protein kristallisierte in zwei verschiedenen Kristallformen: einer tetragonalen und einer monoklinen. Die Strukturbestimmung dieser Proteine zeigte, dass das Protein trotz der eingebauten Disulfidquervernetzung noch erstaunlich flexibel ist. So zeigt ein Vergleich der SP-Strukturen, dass sich die C-terminalen Domänen trotz der Domänenquervernetzung um eine Rotation von $11,5^\circ$ unterscheiden. Die Struktur des PL-Enzyms unterscheidet sich um eine Drehung von 43° gegenüber der anvisierten geschlossenen Struktur. Mit Hilfe theoretischer Berechnungen und kinetischer Daten wird gezeigt, dass das PL-Enzym trotz der Disulfidbrücke um diese 43° rotieren kann.

Die strukturelle Integrität des Proteins wurde durch die Einführung der Disulfidbrücken nicht angetastet. Dies konnte strukturell mittels Überlagerungen zu den Wildtyp-Strukturen, der Koordination von Metallionen im aktiven Zentrum, sowie durch den Vergleich der Rotationsachsen, die alle in der gleichen Ebene wie die der Wildtyp-Strukturen liegen, gezeigt werden.

Obwohl die quervernetzten Proteine sich als äußerst beweglich herausstellten, sind sie dennoch in ihrer Rotationsfreiheit stark eingeschränkt und konnten für kinetische und spektroskopische Untersuchungen eingesetzt werden. Die kinetischen Untersuchungen ergaben, dass beide Enzyme sich durch Reduktion aktivieren ließen, wodurch bewiesen werden konnte, dass die Rotationsbewegung wichtiger Bestandteil des katalytischen Mechanismus ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Rotationsbewegung auch ursächlich ist für das Phänomen der Substratinhibierung, die für das Wildtyp-Protein charakteristisch ist.

Durch Vergleichende CD-spektroskopische Messungen des Wildtyp-Proteins mit den quervernetzten Enzymvarianten konnten dem Wildtyp-Protein Konformationen in Lösung zugewiesen werden. Auf diese Weise konnte zweifelsfrei festgestellt werden, dass die 5'-NT in Lösung in einer offenen Konformation vorliegt. Desweiteren wurde beobachtet, dass sich die Konformation des Wildtyps ändert, wenn Metallionen und Inhibitor anwesend sind, nicht aber wenn nur der Inhibitor ohne Metallionen anwesend ist.

Durch die Strukturbestimmung der disulfidverbrückten Proteine evaluiert diese Arbeit die Methode der Quervernetzung kritisch, indem sie auf die hohe Beweglichkeit der quervernetzten Proteine aufmerksam macht. Gleichzeitig gelang es jedoch, diese Enzymvarianten einzusetzen, um wichtige biochemische Erkenntnisse zu gewinnen. Ausschlaggebend für eine sinnvolle Interpretation der biochemischen Daten war die Kenntnis der Struktur der Enzyme.

9 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, durch disulfidquervernetzte Enzymvarianten ein System zu entwickeln, das geeignet ist, die Proteinbewegung der 5'-NT in Lösung zu beobachten, da es gelang, Zirkulardichroismus-Spektren des Wildtyp-Proteins den Konformationen der bewegungsfixierten Mutanten zuzuweisen. Damit kann die 5'-NT zu einem wichtigen Modellsystem werden, um Domänenrotationen zu untersuchen.

Durch Punktmutationen in der Gelenkregion kann so die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Vermittlung der Rotationsbewegung untersucht werden. Interessant ist auch die Frage, ob das human homologe Protein Ekto-5'-NT (CD73) eine Rotationsbewegung zeigt wie es kürzlich auf Basis einer Homologiemodulierung postuliert wurde. Durch Austausch der humanen domänenverbindenden Helix mit der bakteriellen kann untersucht werden, ob sich auch in diesem Hybrid-Molekül noch eine Rotationsbewegung stattfindet. Auf ähnliche Weise können andere Gelenkregionen von unterschiedlichen Bewegungstypen mit der bakteriellen Gelenkregion ausgetauscht werden. Auf diese Weise können sehr wichtige generelle Erkenntnisse über die Rolle von Gelenkregionen in Proteinbewegungen gewonnen werden, die nicht nur von allgemeinen akademischen Interesse sind, sondern auch nanotechnologische Bedeutung haben, da sich Proteinbewegungen eignen, um atomare Signale zu amplifizieren.

Die Möglichkeit, CD-spektroskopische Signale distinkten Konformationen zuzuweisen, kann auch genutzt werden, um zeitaufgelöste Messungen interpretieren zu können. Die Bestimmung einer Zeitkonstante für die Rotationsbewegung kann helfen, die wichtige Frage zu klären, ob die Anbindung eines Substrats die Rotationsbewegung induziert oder lediglich das Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation beeinflusst.

Da gezeigt werden konnte, dass die Rotationsbewegung integraler Bestandteil der katalytischen Funktion des Enzyms ist, sind die rotationsbehinderten Mutanten auch nützliche Referenzpunkte in der weiteren kinetischen Analyse der 5'-NT. Ungeklärt ist nach wie vor die Frage, welche Metallionen im aktiven Zentrum biologisch die relevantesten sind. Die stärkste Aktivität wurde mit Co^{2+} beobachtet, allerdings sind hier die für die Aktivierung nötigen Konzentrationen physiologisch nicht gegeben. Es besteht die Möglichkeit, dass andere Metallionen im unteren mikromolaren sowie submikromolaren Bereich ihr Aktivitätsmaximum aufweisen. Dieser Bereich kann jedoch mit dem hier (und bislang für alle kinetischen Untersuchungen der 5'-NT) verwendeten Assay nicht beobachtet werden. Die Etablierung eines sensitiveren Aktivitätstest könnte diese Frage klären. Da die Metallionen im aktiven Zentrum sehr wahrscheinlich einen Einfluss haben auf die Rotationsbewegung und das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Konformation bestimmen, wären hier wiederum zeitaufgelöste Messungen mit unterschiedlichen Metallionen und Metallion-Kombinationen wichtige begleitende Experimente.

Bei der Weiterarbeit mit der 5'-NT sollte auch bedacht werden, dass die vielen verschiedenen Kristallformen des Enzyms Gelegenheit bieten, um einerseits generelle Phänomene der Kristallisation und Kristallpackung zu studieren wie etwa den Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit einzelner Proteinfragmente und den Kristallkontakten auf der anderen Seite können die vielen verschiedenen Konformationen aber auch als Ausgangsmodelle für molekulardynamische Berechnungen genutzt werden. Unter der Annahme, dass die Kristallstrukturen jeweils konformationelle Energieminima darstellen, könnte molekulardynamisch eine komplette Bewegungstrajektorie simuliert werden, die einen wichtigen Schritt hin zu einer stärkeren quantitativen Beschreibung der Domänenrotation der 5'-NT bedeuten würden.