

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Substratbeispiele der 5'-NT.....	18
Abbildung 2. Katalytischer Mechanismus der 5'-NT..	19
Abbildung 3. Maximale Drehung der 5'-NT.....	20
Abbildung 4. Schematische Darstellung des Aktivitätsbestimmungstests.	31
Abbildung 5. Strukturformel von Malachitgrün.	32
Abbildung 6. Kalibrierung zur Phosphatquantifizierung..	35
Abbildung 7. Kolinearität des elektrischen (μ^{el}) und des magnetischen (μ^{magn}) Dipolmoments.....	37
Abbildung 8. Die Fasman Standard-Spektren	39
Abbildung 9. IPTG-Konzentrationen und Induktionszeiten für die Proteinaufreinigung..	44
Abbildung 10. Chromatogramme der neuen Aufreinigung der 5'-NT.....	48
Abbildung 11. Einführung der Disulfidquervernetzung.....	52
Abbildung 12. Stereoabbildung der Disulfidbrücke in der Struktur SP-I.	59
Abbildung 13. Rotationswinkel zwischen SP-I (B) und den nativen Strukturen 1hp1 (C) und 1hpu C (A)..	60
Abbildung 14. Vergleich der Temperaturfaktoren von 1hp1 und SP-I.	61
Abbildung 15. Rmsd-Werte der Überlagerung der Strukturen SP-I auf 1hp1.	62
Abbildung 16. Stereoabbildung der Zn^{2+} - Koordinierung in der Struktur SP-I.....	64
Abbildung 17. Vergleich der Kontaktflächen zwischen den Kristallstrukturen SP-I (A) und 1hp1 (B)..	65
Abbildung 18. Stereoabbildung der Disulfidbrücke in der Struktur SP-II.	72
Abbildung 19. A. Vergleich der Rotation der C-terminalen Domäne zwischen den Kristallstrukturen SP-I und SP-II und 1hpu C.	74
Abbildung 20. Vergleich der Temperaturfaktoren der Hauptkettenatome zwischen den Protein A und B der Struktur SP-II.....	76
Abbildung 21. Rmsd-Abweichungen der Struktur SP-II gegenüber der Struktur 1hp1	78
Abbildung 22. Stereoabbildung der Metallkoordinierung in der Struktur SP-II A.	80
Abbildung 23. Kristallkontakte der Struktur SP-II.....	82
Abbildung 24. Stereoabbildung der eingeführten Disulfidbrücke Pro-90 \rightarrow Cys, Leu-424 \rightarrow Cys	88
Abbildung 25. Rotationswinkel zwischen der Struktur PL Kette A und der geschlossenen Referenzstruktur 1hpu Kette C sowie der offen verbrückten Mutante SP-I.	90
Abbildung 26. Temperaturfaktoren der beiden Monomere der PL-Struktur.	92
Abbildung 27. Rmsd der Struktur PL basierend auf separaten Überlagerungen der N- und C-terminalen Domänen mit der Zielstruktur 1hpu Kette C.	93

Abbildung 28. Vergleich der Metallkoordinierung zwischen der Struktur PL Kette A und deren Zielstruktur 1hpu Kette C.....	96
Abbildung 29. Berechnung des theoretischen $C\alpha$ -Abstands der Cystein-Punktmutationen nach einem Morph-Modell.	101
Abbildung 30. Kumulative Eigenwerte aus der TLS Verfeinerung.....	103
Abbildung 31. Ellipsen-Darstellung der Librations-Komponente in der SP-II TLS- Verfeinerung.	105
Abbildung 32. Geometrie der Disulfidbrücken.	107
Abbildung 33. Abhängigkeit des Wildtyp-Proteins (A) und des PL-Enzyms (B) von der AMP-Konzentration	111
Abbildung 34. Abhängigkeit des Wildtyp-Proteins (A) und des PL-Enzyms (B) von der pNPP-Konzentration.....	114
Abbildung 35. Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der disulfidverbrückten Mutanten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen.....	116
Abbildung 36. CD-Spektren im fernen UV-Bereich.....	120
Abbildung 37. CD-Spektren im UV-nahen Bereich.....	122
Abbildung 38. CD-Spektren der PL Mutante (PL) im UV-nahen Bereich mit und ohne DTT.....	124
Abbildung 39. CD-Spektren der SP-Mutante im UV-nahen Bereich mit und ohne DTT.....	125
Abbildung 40. CD-Spektren im UV-nahen Bereich mit dem Inhibitor AMPCP, ohne Metallionen.	125
Abbildung 41. CD-Spektren des Wildtyp-Proteins in Anwesenheit von Metallionen und Inhibitor (AMPCP).....	126
Abbildung 42. Zugang zur Substratbindestelle in den verschiedenen Konformationen.	129

Sämtliche Abbildungen sind mit den für ihre Erstellung notwendigen Daten wie folgt im Benutzerverzeichnis rsh hinterlegt:

VERZEICHNIS	UNTERVERZEICHNIS	ORDNER	ABBILDUNG	
Arbeit	Einleitung		1-3	
	Material_und_Methoden		4,5,7,8	
	Proteinaufreinigung	Chromatogramme		9,10
		Kristallbilder		Suppl.
	Strukturbeschreibungen	Übersicht		11, 42
		SP41212		12-17
		SP21		18-23
		PL		24-28
		MORPH		29
		TLS		30, 31
	Kinetik	SS-Bond		32
		Parameter		6, 33, 34, Suppl.
		Reduktionsexperimente		35
CD-Spektren	UV-fern		36	
	UV-nah		37-41	
	Helixmutanten		Suppl.	

Die Bezeichnung Suppl. bezieht sich auf Daten, die nicht in dieser Arbeit besprochen wurden, aber dennoch interessant sein könnten.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über strukturell charakterisierte Mitglieder der Superfamilie der metallabhängige Phosphatasen.	13
Tabelle 2. Oligonukleotide für die Mutagenese	24
Tabelle 3. Überblick Proteinaufreinigung.....	45
Tabelle 4. Kristallisationsbedingungen und Tieftemperaturpuffer.....	50
Tabelle 5. Übersicht über die bestimmten Röntgenstrukturen der 5'-NT.....	53
Tabelle 6. Zusammenfassung der Konformeranalyse nach DYNDOM.	54
Tabelle 7. Kristallographische Datensammlung der Kristallform SP-I.	56
Tabelle 8. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes SP-I.....	58
Tabelle 9. Koordinationsgeometrie des Zn ²⁺ Atoms in der Struktur SP-I.	64
Tabelle 10. Vergleich der polaren Kristallkontakte unter 3,8 Å zwischen SP-I und 1ush..	67
Tabelle 11. Datensammlung Kristall SP-II.	68
Tabelle 12. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes SP-II.....	71
Tabelle 13. Kristallkontakte der Struktur SP-II.....	83
Tabelle 14. Datensammlung Kristall PL.....	84
Tabelle 15. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes PL.	87
Tabelle 16. Vergleich der Metallkoordinierung der Strukturen PL A und 1hpu.....	95
Tabelle 17. Kristallkontakte in der Struktur PL.....	98
Tabelle 18. Vergleich der Kristallkontaktanzahl in allen 5'-NT – Strukturen.	99
Tabelle 19. Parameter der Disulfidbrücken.	106
Tabelle 20. Kinetische Parameter von 5'-NT.	112
Tabelle 21. Aktivitäten der disulfidverbrückten Enzymvarianten unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen.	117
Tabelle 22. Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes.	121

Zusammenfassung für Laien

In der Erforschung und Erklärung der Lebensprozesse nehmen gegenwärtig die Proteine (Eiweiße) eine zentrale Rolle ein. So wie der Biologe heute Leben versteht, werden alle denkbaren Lebensäußerungen von Proteinen vermittelt. Aus diesem Grunde war die Sequenzierung des menschlichen Genoms (also der kompletten menschlichen DNA) so bedeutsam, weil in der DNA der Bauplan jedes einzelnen Proteins festgelegt ist. Dieser Bauplan ist die Aneinanderreihung von vielen Aminosäuren. Da 20 verschiedene Aminosäuren in ein Protein eingebaut werden können sind die theoretischen Verknüpfungsmöglichkeiten auch nur kurzer Proteine (z. B. 100 Aminosäuren) unvorstellbar groß. Aus dieser unendlich großen Variationspanne schöpft die Natur, um immer wieder neue Lebensformen zu schaffen.

So bedeutsam das von der DNA-Sequenz abgeleitete Wissen um die Aminosäuren-Zusammensetzung eines Proteins ist, so wenig hilft es doch, um einen direkten Einblick zu gewinnen, wie ein Protein seine Funktion(en) ausübt. Hierfür muss die Raumstruktur, also die Faltung der Aminosäuren im Raum, eines Proteins bekannt sein. Weil Proteine zu klein sind, um sie elektronen- oder gar lichtmikroskopisch zu beobachten, müssen sie im Labor unter sehr künstlichen Bedingungen als Kristalle gezüchtet werden. Einen Proteinkristall kann man sich als eine extrem hochkonzentrierte Proteinlösung vorstellen, in der die einzelnen Proteinmoleküle in perfekter Periodizität in allen Raumrichtungen aneinandergelagert sind. Röntgenstrahlen brechen sich an einem solchen Kristall und bilden ein Beugungsbild, aus dem man mit viel Rechenaufwand eine Raumstruktur des Proteins erzeugen kann.

Mittlerweile sind einige tausend Strukturen von Proteinen gelöst worden. Dadurch können Lebensprozesse auf atomarem Niveau verstanden werden, was nicht nur intellektuell befriedigend ist, sondern auch praktische Bedeutung, etwa in der Medikamentenentwicklung oder im biotechnologischen Einsatz von Enzymen, hat.

Eine interessante Erkenntnis, die aus der Analyse von Proteinstrukturen gewonnen wurde, ist die, dass viele Proteine nicht als starre Körper betrachtet werden können, sondern nur durch Bewegungen ihre Funktion ausüben können. Es ist allerdings ausgesprochen schwierig, diese Bewegungen zu untersuchen. Die Röntgenstrukturanalyse gibt die genauesten Einsichten in *eine* der vielen möglichen Strukturen (Konformation), die ein Protein annehmen kann, stellt damit jedoch immer nur einen Schnappschuss dar. Das Problem ist vergleichbar mit einem Leichtathletikrennen, das nur durch Fotos dokumentiert werden kann; allerdings mit der zusätzlichen Schwierigkeit, nicht zu wissen, wo das Rennen beginnt und wo es endet und zu welchem Zeitpunkt des Rennens die Fotos gemacht wurden. Es gibt keine Kamera für Proteine, die einen kompletten Verlauf der Bewegung wiedergeben könnte. Spektroskopische Methoden erlauben jedoch im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse, Proteine während der Bewegung zu beobachten, nur geht bei diesen Methoden die strukturelle Information verloren.

Die vorliegende Arbeit versucht, am Beispiel eines bakteriellen Enzyms, der 5'-Nukleotidase, von dem mehrere Röntgenstrukturen existieren, die das Protein in verschiedenen Konformationen zeigen, dieses methodische Problem anzugehen. Über gentechnisch realisierte Mutationen wurden zwei Enzymvarianten hergestellt, die das Protein in unterschiedlichen Konformationen fixieren sollten. Diese Enzymvarianten wurden röntgenkristallographisch untersucht, so dass ihre genaue Struktur bekannt war, um sie dann als Referenzmoleküle in spektroskopischen Messungen einsetzen zu können. Die Idee hierbei ist, dass ein spektroskopisches Signal eindeutig einer bestimmten Konformation zugeordnet werden kann. Auf diese Weise können Bedingungen untersucht werden, unter denen das Wildtyp-Protein seine Konformation ändert und es können Aussagen darüber getroffen werden, in welcher Konformation das Wildtyp-Protein unter den gegebenen Bedingungen ist.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass es gelungen ist, derartige Enzymvarianten der 5'-Nukleotidase herzustellen und sie strukturell zu bestimmen. Diese Strukturanalysen sind über das Projekt mit dem hier verwendeten Enzym von Bedeutung, da sie die Methode der Proteinquervernetzung in bislang nicht beschriebenen Detail beleuchten und zeigen, dass die hergestellten Enzymvarianten noch eine erstaunlich hohe Flexibilität aufweisen. Dennoch gelang es, die Enzymvarianten für die Charakterisierung der Proteinbewegung heranzuziehen. Es konnte gezeigt werden, dass durch chemisches Aufbrechen der Quervernetzung die Enzyme an Aktivität gewinnen, wodurch bewiesen werden konnte, dass die Bewegung in den mutierten Proteinen trotz der Restflexibilität stark eingeschränkt ist und die Bewegung für die Enzymfunktion von Bedeutung ist. Die eingeschränkte Beweglichkeit war auch ausreichend, um die Enzymvarianten für spektroskopische Messungen einzusetzen. Hierbei konnte dem Wildtyp-Protein auch eine Konformation zugewiesen werden, in der es sich in „Ruhelage“ befindet. Auch konnte spektroskopisch ein Konformationsübergang beobachtet werden.

Es ist damit gelungen, ein System zu entwickeln, das sinnvolle Aussagen über die Proteinbewegung der 5'-Nukleotidase zulässt. Durch den Einsatz weiterer Methoden wie etwa theoretischen Berechnungen kann auf diese Weise irgendwann tatsächlich ein Film über einen kompletten Bewegungsablauf der bakteriellen 5'-Nukleotidase entstehen.