

Erik Werner

Zwei Wege, Nukleotide zu binden

Kristallstrukturen der

Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
von *Homo sapiens*

und der

Domäne I der Homing Endonuklease PI-SceI
von *Saccharomyces cerevisiae*



Zwei Wege, Nukleotide zu binden

Kristallstrukturen der
Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase von *Homo sapiens*
und der
Domäne I der Homing Endonuklease PI-SceI von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
- Dr. rer. nat. -
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von Diplom-Chemiker

ERIK WERNER

eingereichte Dissertation.

Berlin 2002

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Mai 1997 bis Mai 2002 unter der Anleitung von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann, MDC und FU Berlin

2. Gutachter: PD Dr. Mathias Ziegler, FU Berlin

Eingereicht am 20.06.02

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2002

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	6
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
3. EINLEITUNG	11
3.1. NUKLEOTIDE	11
3.2. NUKLEINSÄUREN	12
3.3. KRISTALLOGRAPHIE ALS METHODE DER STRUKTURBESTIMMUNG	14
4. DIE NICOTINAMID-MONONUKLEOTID-ADENYLYLTRANSFERASE VON HOMO SAPIENS	17
4.1. EINLEITUNG.....	17
4.1.1. <i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid NAD⁺</i>	17
4.1.2. <i>Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase NMNAT</i>	18
4.1.3. <i>Strukturen von NMNATs</i>	20
4.2. MATERIAL UND METHODEN	22
4.2.1. <i>Expressionsklonierung und Proteinreinigung</i>	22
4.2.2. <i>Aktivitätstest und Massenspektrum</i>	22
4.2.3. <i>Kristallisation und Kryoprotektion</i>	23
4.2.4. <i>Röntgendiffraktion, Phasenbestimmung und Verfeinerung</i>	24
4.3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
4.3.1. <i>Genexpression, Proteinqualität und -aktivität</i>	24
4.3.2. <i>Nachweis von Selen</i>	26
4.3.3. <i>Kristallisation und Kryoprotektion</i>	28
4.3.4. <i>Diffraction</i>	29
4.3.5. <i>Phasenbestimmung und Verfeinerung</i>	30
4.3.6. <i>Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit</i>	34
4.3.7. <i>Struktur von hNMNAT</i>	38
4.3.8. <i>Vergleich mit anderen Strukturen von humaner NMNAT</i>	39
4.3.9. <i>Vergleich mit Strukturen von NMNAT anderer Spezies</i>	45
4.3.10. <i>Superfamilie, Rossmann-Faltungstyp</i>	49
4.3.11. <i>Oligomerisierung, Protein-Protein-Kontakte</i>	51
4.3.12. <i>Ligandenbindung in humaner NMNAT</i>	55

5.	DIE HOMING ENDONUKLEASE PI-SCEI VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE	65
5.1.	EINLEITUNG.....	65
5.1.1.	<i>Inteine und Homing Endonukleasen</i>	65
5.1.2.	<i>Die Homing Endonuklease PI-SceI</i>	66
5.1.3.	<i>PI-SceI Domäne II: Endonuklease-Aktivität</i>	67
5.1.4.	<i>PI-SceI Domäne I: Protein-Splicing-Aktivität</i>	69
5.1.5.	<i>DNA-Bindung</i>	70
5.1.6.	<i>Warum Struktur Nummer Fünf?</i>	73
5.2.	MATERIAL UND METHODEN	76
5.2.1.	<i>Genexpression und Proteinreinigung</i>	76
5.2.2.	<i>DNA-Bindung</i>	77
5.2.3.	<i>Kristallisation</i>	78
5.2.4.	<i>Röntgendiffraktion, Datenreduktion und Strukturbestimmung</i>	78
5.3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	79
5.3.1.	<i>Expression, Proteinreinigung und Kristallisation</i>	79
5.3.2.	<i>DNA-Bindungsversuche</i>	81
5.3.3.	<i>Diffraction und Strukturbestimmung</i>	83
5.3.4.	<i>Struktur der Domäne I von S. cerevisiae PI-SceI</i>	87
5.3.5.	<i>Vergleich aller Strukturen von PI-SceI Domäne I</i>	89
5.3.6.	<i>Protein-Splicing-Stelle</i>	96
5.3.7.	<i>DNA-Bindung</i>	99
5.3.8.	<i>Geometriebasiertes Docking</i>	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	109
6.1.	DEUTSCH - GERMAN	109
6.1.1.	<i>Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase von Homo sapiens im Komplex mit Nicotinamid-Mononukleotid</i>	109
6.1.2.	<i>Domäne I der Homing Endonuclease PI-SceI von Saccharomyces cerevisiae</i> <i>111</i>	
6.2.	ENGLISCH - ENGLISH.....	113
6.2.1.	<i>Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of Homo sapiens in complex with nicotinamide mononucleotide</i>	113
6.2.2.	<i>Domain I of the homing endonuclease PI-SceI of Saccaromyces cerevisiae</i> <i>115</i>	
7.	VERÖFFENTLICHUNGEN	117
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	118
9.	TABELLENVERZEICHNIS	121
10.	LITERATURVERZEICHNIS	123
11.	DANKSAGUNG	131
12.	CURRICULUM VITAE	133
13.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135

2. Abkürzungsverzeichnis

(d)AMP	(Desoxy-) Adenosin-Monophosphat
(d)ATP	(Desoxy-) Adenosin-Triphosphat
(d)CMP	(Desoxy-) Cytidin-Monophosphat
(d)CTP	(Desoxy-) Cytidin-Triphosphat
(d)GMP	(Desoxy-) Guanosin-Monophosphat
(d)GTP	(Desoxy-) Guanosin-Triphosphat
Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Aspartat
AU	asymmetrische Einheit (asymmetric unit)
bp	Basenpaar
Cys, C	Cystein
DNA	Desoxy-ribonukleinsäure
dTMP	(Desoxy-) Thymidin-Monophosphat
dTTP	(Desoxy-) Thymidin-Triphosphat
g	Erdbeschleunigung
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutamat
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
kDa	kilodalton (1000 atomare Gewichtseinheiten)
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
MAD	multiple wavelength anomalous dispersion
Met, M	Methionin
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MR	Molekularer Ersatz (molecular replacement)
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Molekulargewichts-Ausschluss)

NaAD ⁺	Nicotinat-Adenin-Dinukleotid (deamido-NAD ⁺)
NAD(P) ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaMN	Nicotinat-Mononukleotid
NaMNAT	Nicotinat-Mononukleotid-Adenylyltransferase
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NMN	Nicotinamid-Mononukleotid
NMNAT	Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
Phe, F	Phenylalanin
PI-SceI-DI	Homing Endonuklease PI-SceI, Domäne I
Pro, P	Prolin
r.m.s.d.	mittleres Abweichungsquadrat (root-mean-square deviation)
RNA	Ribonukleinsäure
SAD	single-wavelength anomalous dispersion
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SeMet	Selenomethionin
Ser, S	Serin
SNP	single-nucleotide-polymorphism
TAD	Tiazofurin-Adenin-Dinukleotid
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
u	Atomare Masseneinheit
UMP	Uracil-Monophosphat
UTP	Uracil-Triphosphat
Val, V	Valin

6. Zusammenfassung - Summary

6.1. Deutsch - German

6.1.1. Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase von *Homo sapiens* im Komplex mit Nicotinamid-Mononukleotid

Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) ist ein bedeutendes Molekül als Coenzym bei zellulären Redox-Reaktionen und Signaltransduktionswegen. An seiner Biosynthese ist das Enzym Nicotinamid/Nicotinat-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT/NaMNAT) beteiligt, indem es den Adenosin-Monophosphat-Teil von ATP auf Nicotinamid- oder Nicotinat-Mononukleotid (NMN/NaMN) überträgt. Im Fall von NaMN ist das Produkt Nicotinat-Adenin-Dinukleotid (NaAD⁺), welches von der NAD⁺-Synthetase zu NAD⁺ amidiert wird. Im Fall von NMN wird direkt NAD⁺ synthetisiert.

Die Kristallstruktur von NMNAT von *Homo sapiens* im Komplex mit NMN wurde mit einer maximalen Auflösung von 2.9 Å durch die SAD-Methode (single-wavelength anomalous dispersion) gelöst. Finale R_{cryst} bzw. R_{free}-Werte betragen 24.6 bzw. 28.6 %. Die Struktur von NMNAT besteht aus einem sechssträngigen parallelen β-Faltblatt mit Helices auf beiden Seiten, welches im Kern dem Rossmann-Faltungstyp entspricht. Elektronendichte wird weiterhin für den Liganden NMN beobachtet, nicht jedoch für eine Schleife von 37 Aminosäuren, Reste 109 bis 146, die strukturell ungeordnet sind. Von den homologen Proteinen aus *M. thermoautotrophicum* und *M. jannaschii* unterscheidet es sich durch diese Schleife, die eine nukleäre Lokalisationssequenz NLS enthält, und durch zusätzliche Aminosäuren, die im humanen Enzym die Helices **H** und **I** sowie den Strang **f** bilden. Diese Sekundärstrukturelemente verursachen ein unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten als in den Proteinen aus Archaea, die jedoch alle als biologische Einheit ein Hexamer bilden. An Protein-Protein-Kontakten zwischen den Monomeren, die sich als zwei übereinander liegende Trimere formieren, sind die Helices **A**, **H** und **J** sowie die Schleife zwischen Helices **J** und **K** beteiligt. Die Trimere sind gegeneinander verdreht, die

Faltblätter von Untereinheiten verschiedener Trimere ordnen sich seitwärts gerichtet in einer antiparallelen Weise zu einer Art Super-Sekundärstruktur zusammen, ohne sich jedoch zu berühren. Bakterielle NMNAT kommt dagegen als Monomer (*E. coli*) oder Dimer (*B. subtilis*) vor und weist im Fall von *E. coli* NMNAT noch weitere zusätzliche Sekundärstrukturelemente auf.

An der Bindung des Liganden NMN sind die Aminosäuren Ser16, Lys57, Trp92, Thr95, Leu168 und Trp169 beteiligt, die sich alle auf einer Seite des β -Faltblattes befinden. Durch einen Vergleich mit weiteren, von anderen Gruppen publizierten Strukturen der humanen NMNAT (dem Apoenzym und dem NAD⁺-Komplex) sowie mit den Archaea- und Prokaria-Analoga wurde ein Model für die Ligandenbindung und Synthesereaktion entwickelt. Dabei befindet sich das Enzym in der Apo-Form in geöffnetem Zustand. Die Helices **F** und **G** auf der einen Seite und die Region um Helix **B** auf der anderen Seite sind weiter voneinander entfernt als im Komplex mit einem Liganden. In diesem Bereich der Ligandenbindungstasche, auf der einen Seite des Faltblattes, bindet NMN. ATP, der zweite Reaktionspartner, wird möglicherweise von einem positiv geladenen Cluster angezogen, der sich nur durch die Hexamer-Bildung formiert und könnte weitergeleitet werden bis zum Reaktionszentrum, eventuell unter Mitwirkung von Lys58 und Arg231. ATP bindet auf der anderen Seite des β -Faltblattes, beteiligt sind die Aminosäuren Phe17, Gly156, Glu215 und Asn219 sowie wahrscheinlich die konservierten Reste Thr21, His24, Ser222, Thr224 und Arg227, die wohl die β - und γ -Phosphate binden. Mit der Substratbindung nähern sich die oben genannten Elemente an und gleichzeitig ordnet sich der C-Terminus des Proteins (ab Rest 258). Er bedeckt dann Teile der NMN-Bindungstasche sowie die Aminosäuren His24 und Lys58. An der Synthesereaktion sind möglicherweise die Aminosäuren Gly15, Ser16, Phe17, His24 und Lys57 beteiligt, die in räumlicher Nähe der neu zu knüpfenden Phosphorester-Bindung liegen. Abdissoziation von NAD⁺ und Pyrophosphat PP_i gehen einher mit der Entspannung des Proteins und vervollständigen den Reaktionszyklus.

6.1.2. Domäne I der Homing Endonuclease PI-SceI von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Homing Endonuclease PI-SceI von *S. cerevisiae* ist ein Intein, eine *interne Proteinsequenz*, eingebettet in die Extein-Sequenzen der 69 kDa-Untereinheit der vakuolären Membran-H⁺-ATPase. In einem Protein-Splicing-Prozess schneidet sie sich selbst aus dem Vorläuferprotein heraus und verbindet die beiden Exteine. Verantwortlich hierfür ist die Domäne I von PI-SceI, die gleichzeitig den Hauptteil der Bindungsenergie für eine spezifische DNA-Sequenz von mindestens 31 bp liefert. Die Erkennungssequenz ist der *VMA1-Dvde*-Locus des *S. cerevisiae* Chromosoms 8. Dieser Locus ist dasjenige Allel für die *VMA1*-Gensequenz (*VMA*: vacuolar membrane H⁺-ATPase), das defizient für *vde* ist (VDE: *VMA*-derived endonuclease = PI-SceI). Die Domäne II von PI-SceI besitzt das endonukleolytische Zentrum, welches die spezifische Erkennungssequenz schneidet und die Insertion des *vde*-Gens initiiert („homing“). Sie gehört zur LAGLIDADG-Familie von Homing Endonukleasen und bindet die DNA nur locker. Die Kristallstruktur der Domäne I von PI-SceI wurde mit der Methode des Molekularen Ersatzes bei einer maximalen Auflösung von 1.35 Å gelöst. Finale R_{cryst} bzw. R_{free}-Werte betragen 15.0 bzw. 18.9 %. Obwohl schon vier weitere Kristallstrukturen des gesamten Proteins bekannt waren, geben die hohe Auflösung und die gute Definition von Bereichen, die in den anderen Strukturen nicht oder schlecht interpretierbar waren, einen Einblick auf weitere Details. Die Ziele, die gesamte Proteinsequenz in der Elektronendichte zu beobachten und einen Protein-DNA-Kokristall zu erzeugen, wurden jedoch nicht erreicht. Vielmehr wuchsen in Komplex-Ansätzen lediglich Proteinkristalle, die umfangreiche Kristallkontakte ausbilden. 96 von 217 Aminosäuren sind daran beteiligt. Domäne I von PI-SceI, bzw. der Kernbereich, nimmt den Hint-Faltungstyp der Hedgehog/Intein-Domäne ein und besteht hauptsächlich aus β-Strängen. Das aktive Zentrum der Domäne I, die Protein-Splicing-Stelle, zeigt neben Cystein1 noch zwei N-terminale Extein-Reste, ihm fehlt jedoch mit Asn454 der Intein-C-Terminus. Das gängige Modell für den ersten Schritt des Protein-Splicing-Reaktionsmechanismus' kann strukturell bestätigt werden. Dabei initiiert die Seitenkette von Cys1 durch einen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff von Ala(-1) den initialen N-S Acyl-Shift, dem eine

Transesterifizierung, eine Succinimid-Bildung und der finale S-N Acyl-Shift folgen.

Die Reste Gln55 bis Glu66 wurden aufgrund lokaler Unordnung nicht in der Elektronendichte beobachtet. Sie bilden offenbar eine flexible Schleife, die im Verdacht steht, an der festen DNA-Bindung der Domäne I beteiligt zu sein. Die weiteren Reste, denen aufgrund biochemischer Daten eine Beteiligung an der Bindung zugerechnet wird, befinden sich alle an der Vorderseite der zangenartigen Subdomäne, die von den Strängen **i**, **j** und **k** sowie von den Helices **B** und **C** gebildet wird. Wahrscheinlich können auch die Helices **D** und **E** sowie der Strang **I** dazugezählt werden, wo ebenfalls potenziell DNA bindende Aminosäuren liegen. Eine strukturelle Überlagerung aller bekannten Proteinketten von PI-SceI Domäne I legt nahe, dass neben den flexiblen Resten Gln55 bis Glu66 auch die Aminosäuren Arg94, Arg90 und Arg87 größere, Tyr130 und Lys173 immerhin deutliche strukturelle Unterschiede aufweisen. Tyr176, Tyr420, Arg172 und Arg162 dagegen, aber auch Lys112 und Lys124 sind strukturell konstant. Kann für die ersteren, flexiblen Bereiche der Domäne I angenommen werden, dass sie sich möglicherweise im Verlaufe der DNA-Bindung in Richtung des Bindungspartners bewegen, so könnten letztere, strukturell unflexible Reste an der initialen Positionierung der DNA beteiligt sein. Für diese Subdomäne wird aufgrund eines geometriebasierten Docking-Modells eine Flip-Bewegung für möglich gehalten, die etwa 60° relativ zum Kernbereich der Domäne I beträgt. Vier definitive Kontaktstellen jeweils von PI-SceI und der Erkennungssequenz wurden strukturell überlagert. Es handelt sich um Asp218 und C⁻³(unterer Strang), Asp326 und G⁺³ (oberer Strang), Tyr328 und G⁺⁴ (unterer Strang) sowie His333 und T⁺⁹ (oberer Strang), also um die endonukleolytischen Zentren und zwei Photo-Quervernetzungen ohne Abstandshalter. Das resultierende Modell führt zu einer Orientierung der DNA relativ zur Domäne I, die den biochemischen Daten und der Verteilung der Oberflächenladung widerspricht. Um in Übereinstimmung des Modells mit den biochemischen Daten zu kommen, wird eine Rotationsbewegung der zangenartigen Subdomäne (oder Teile davon) vorgeschlagen, die die Stränge **i**, **j** und **k** in Kontakt mit der großen Furche im Bereich der Basenpaare +16 bis +18 bringt sowie die Aminosäuren Arg90/Arg94 mit A¹⁴/T¹⁵/T¹⁶ des oberen Stranges und Lys170/Lys173 mit Nukleotiden 10 bis 12.

6.2. Englisch - English

6.2.1. Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of *Homo sapiens* in complex with nicotinamide mononucleotide

Nicotinamide adenin dinucleotide (NAD⁺) is an important molecule as coenzyme in cellular redox reactions and signal-transduction pathways. The enzyme nicotinamide/nicotinate mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT/NaMNAT) takes part in the biosynthesis of NAD⁺ by transferring the adenosine monophosphate moiety of ATP to nicotinamide/nicotinate mononucleotide. In the case of NaMN the product is nicotinate-adenin dinucleotide (NaAD⁺) which gets amidated by NAD⁺-synthetase. In the case of NMN, NAD⁺ gets synthesized directly.

The crystal structure of NMNAT from *Homo sapiens* in complex with NMN was solved to a maximum resolution of 2.9 Å with the SAD method (single wavelength anomalous dispersion). Final R_{cryst} and R_{free} values are 24.6 % and 28.6 % respectively. The structure of NMNAT consists of a six-stranded parallel β-sheet with helices on both sides, which in the core is the Rossmann fold. Electron density was observed for the ligand NMN but not for a loop of 37 amino acids, 109 to 146, that is positionally disordered. The structure of hNMNAT differs from the homologous proteins of *M. thermoautotrophicum* and *M. jannaschii* by this loop that contains a nuclear localization signal and by additional amino acids that form the helices **H** and **I** and the strand **f** in the human enzyme. Those secondary structure elements cause a different oligomerization compared to the archaeal proteins, but all occur as hexamer as biological unit. Protein-protein contacts between the monomers that form two trimers on top of each other are established between helices **A**, **H** and **J** as well as the loop between Helices **J** and **K**. The trimers are twisted with respect to each other, the β-sheets of subunits of different trimers arrange side by side in an antiparallel fashion and form a kind of a super-secondary structure but do not contact directly. Bacterial NMNAT occurs as monomer (*E. coli*) or dimer (*B. subtilis*) and in the case of *E. coli* NMNAT has further secondary structure elements.

The ligand NMN is bound by the amino acids Ser16, Lys57, Trp92, Thr95, Leu168 and Trp169, all on one side of the β -sheet. Comparison of the NMN complex with human NMNAT structures solved by other groups (the apoenzyme and the NAD⁺ complex) and with the archaeal and procarial homologs yield a model for ligand binding and synthesis. In the apoform, the enzyme is in an open state. Helices **F** and **G** on one side and the region around helix **B** on the other side have a greater distance than in the complex. NMN binds to this part of the ligand binding pocket, on one side of the β -sheet. ATP, the other reaction partner, is possibly attracted by a cluster of positively charged amino acids that only forms upon oligomerization. It could get transferred to the reaction center, possibly under participation of amino acids Lys58 and Arg231. ATP binds on the other side of the β -sheet. Binding is facilitated by Phe17, Gly156, Glu215 and Asn219 and most likely by the conserved residues Thr21, His24, Ser222, Thr224 and Arg227 which obviously bind the β - and γ -phosphates. Upon substrate binding, the above mentioned elements approach and at the same time the C-terminus gets ordered (from residue 258 on). It covers parts of the NMN-binding pocket and of His24 and Lys58. Amino acids Gly15, Ser16, Phe17, His24 and Lys57 might participate in the synthesis reaction because they are locally close to the phosphodiester bond that is going to be formed. Dissociation of NAD⁺ and pyrophosphate PP_i goes along with relaxation of the protein and completes the reaction cycle.

6.2.2. Domain I of the homing endonuclease PI-SceI of *Saccharomyces cerevisiae*

The homing endonuclease PI-SceI of *S. cerevisiae* is an intein, an *internal protein*, embedded into the extein sequences of the 69 kDa subunit of the vacuolar membrane H⁺-ATPase. In a protein splicing process it cuts itself out of the protein precursor and combines the two exteins. Responsible is domain I of PI-SceI that at the same time accounts for most of the binding energy to the specific DNA sequence of at least 31 bp. The recognition sequence is the *VMA1-Dvde* locus of *S. cerevisiae* chromosome 8. This locus is the allele of the *VMA1* genetic sequence (VMA: vacuolar membrane H⁺-ATPase) that is deficient for *vde* (VDE: VMA derived endonuclease = PI-SceI). Domain II of PI-SceI contains the nucleolytic center, which cuts the specific recognition sequence and initiates the insertion of the *vde*-gene ("homing"). It is a member of the LAGLIDADG family of homing endonucleases and binds the DNA only loosely.

The crystal structure of domain I of PI-SceI was solved with the molecular replacement method to a maximal resolution of 1.35 Å. Final R_{cryst} and R_{free} values are 15.0 % and 18.9 % respectively. Although four crystal structures of the whole protein were known already, the high resolution and the good definition of areas that were not or not well defined in the other structures give a view of further details. The goals to observe the whole protein sequence in the electron density and to produce protein-DNA cocrystals were not reached. Rather, protein crystals were observed in crystallization attempts with complexes. 96 of 217 amino acids take part in crystal contacts. Domain I of PI-SceI, or the core part of it, adopts the hint fold of the hedgehog/intein domain and consists mainly of β-strands. The active center of domain I, the protein splicing site, has cysteine 1 and two N-terminal extein residues but lacks the C-terminus of the intein, Asn454. The common model for the first step of the protein splicing reaction mechanism can be structurally confirmed. The side chain of Cys1 initiates the initial N-S acyl shift by a nucleophilic attack of the carbonyl carbon of Ala(-1). Subsequently follow a transesterification, formation of a succinimide and the final S-N acyl shift.

Residues Gln55 to Glu66 were not observed in the electron density due to local disorder. They obviously form a flexible loop that is suspected to take part in the tight binding of DNA by domain I. Further residues that are supposed to

participate in DNA binding because of biochemical data, lie at the front side of a tongs-like subdomain that is formed by strands *i*, *j* and *k* and helices **B** and **C**. Most likely, helices **D** and **E** as well as strand *l* are also part of this subdomain because they also contain potential DNA-binding residues. A structural alignment of all known protein chains of PI-SceI domain I suggests, that besides the flexible residues Gln55 to Glu66 the amino acids Arg94, Arg90 and Arg87 have bigger, Tyr130 and Lys173 at least significant structural differences. Tyr176, Tyr420, Arg172 and Arg162, but also Lys112 and Lys124 on the other side are structurally constant. For the first, flexible group it can be suggested, that they possibly rearrange to facilitate DNA binding, for the latter, inflexible residues that they might take part in the initial positioning of the DNA.

A geometry based docking model makes the possibility of a movement of about 60° relative to the core visible. Four proven contact sites of PI-SceI and the recognition sequence were structurally aligned. Those are Asp218 and C⁻³(bottom strand), Asp326 and G⁺³ (top strand), Tyr328 and G⁺⁴ (bottom strand) as well as His333 und T⁺⁹ (top strand), that means the nucleolytic active sites and two zero-length photo-crosslinks. The resulting model yields an orientation of the DNA relative to domain I that is not consistent with biochemical data and the distribution of surface charges. To reach agreement of biochemical data and the model, a rotational movement of the tongs-like subdomain (or parts thereof) was suggested that brings the strands *i*, *j* and *k* to close contact with the major groove of basepairs +16 to +18, the amino acids Arg90/Arg94 close to A¹⁴/T¹⁵/T¹⁶ of the top strand and Lys170/Lys173 close to the nucleotides 10 to 12.

7. Veröffentlichungen

Publikationen:

Erik Werner, Mathias Ziegler, Felicitas Lerner, Manfred Schweiger, Yves A. Muller, Udo Heinemann: Crystallization and preliminary X-ray analysis of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT).
Acta Crystallographica Section D **58**, 140 – 142 (2002)

Erik Werner, Mathias Ziegler, Felicitas Lerner, Manfred Schweiger, Udo Heinemann: Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN.
FEBS Letters **516**, 239 - 244 (2002)

Corrigendum* to: **Erik Werner, Mathias Ziegler, Felicitas Lerner, Manfred Schweiger, Udo Heinemann:** Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN.
FEBS Letters, **523**, 254 - 255 (2002)

* Durch einen Vergleich aller hNMNAT-Strukturen nach ihren Publikationen wurde der Bereich der Aminosäuren 86 bis 105(108) nachverfeinert. Dies führte zu einer leicht veränderten Erkennung von Sekundärstrukturelementen sowie zu einer deutlichen Veränderung der Ligandenbindungstasche. Dies ist in dem „Corrigendum“ dargestellt und im Datenbankeintrag reflektiert (der neue Eintrag, 1gzu, ersetzt den alten, 1gry). Die Bezeichnungen und Zahlenwerte in der ursprünglichen Publikation können daher von denen in dieser Doktorarbeit abweichen, die sich in jedem Fall auf die nachverfeinerten Koordinaten beziehen.

Erik Werner, Wolfgang Wende, Alfred Pingoud, Udo Heinemann: High resolution crystal structure of domain I of the *S. cerevisiae* homing endonuklease PI-SceI.
Nucleic Acids Research, **30(18)** (2002)

Datenbank-Einträge:

1gzu

Humane Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase im Komplex mit NMN, 2.9 Å.

1gpp

S. cerevisiae Homing Endonuklease PI-SceI Domäne I, 1.35 Å.

8. Abbildungsverzeichnis

Die Moleküldarstellungen wurden mit dem Program MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) erstellt und mit POV-Ray (<http://www.povray.org>) gerendert.

Abbildung 3.1: Strukturformeln der Nukleotide	11
Abbildung 3.2: Erkennungsmuster von Basenpaaren.....	13
Abbildung 3.3: Erkennungsmuster und Protein-DNA-Komplex von <i>EcoRI</i>	13
Abbildung 3.4: Struktur des λ -Repressors	14
Abbildung 4.1: Strukturformel von NAD(P) ⁺ /NAD(P)H.....	17
Abbildung 4.2: Biosynthese von NAD ⁺	19
Abbildung 4.3: Chromatogramm des Pufferaustausches von SeMet-NMNAT	25
Abbildung 4.4: Reinheit von humaner NMNAT.....	25
Abbildung 4.5: UV Absorptionsspektrum von NAD ⁺ und NADH.....	26
Abbildung 4.6: Aktivität von NMNAT.....	26
Abbildung 4.7: Massenspektrum von SeMet NMNAT.....	27
Abbildung 4.8: Fluoreszenzspektrum des Kristalls von SeMet-NMNAT	27
Abbildung 4.9: Kristalle von hNMNAT.....	28
Abbildung 4.10: Diffraktionsmuster des NMNAT Kristalls.....	29
Abbildung 4.11: R _{cryst} und R _{free} im Verlauf der Verfeinerung	33
Abbildung 4.12: Ramachandran-Diagramm von hNMNAT.....	34
Abbildung 4.13: Selbstrotationsfunktion von hNMNAT.....	36
Abbildung 4.14: Elektronendichte im Kristallgitter.....	36
Abbildung 4.15: Strukturelle Abweichungen und <i>B</i> -Faktoren der Monomere in der asymmetrischen Einheit.....	37
Abbildung 4.16: Struktur der humanen NMNAT im Komplex mit NMN	38
Abbildung 4.17: Topologie-Diagramm von hNMNAT	38
Abbildung 4.18: Sekundärstrukturelemente von hNMNAT.....	39
Abbildung 4.19: Sequenzen der Proteinketten aller hNMNAT Strukturen	41
Abbildung 4.20: Strukturvergleich humaner NMNATs.....	42
Abbildung 4.21: R.m.s.-Abweichung und <i>B</i> -Faktoren der humanen NMNAT-Strukturen... 44	
Abbildung 4.22: Strukturelle Überlagerung von humaner NMNAT und NMNATs von Archaea.....	45
Abbildung 4.23: Sekundärstrukturelemente von NMNATs verschiedener Spezies.....	46
Abbildung 4.24: Sequenzüberlagerung von NMNATs und Sekundärstrukturelemente.....	47
Abbildung 4.25: Strukturelle Überlagerung von humaner und <i>E. coli</i> NMNAT	48
Abbildung 4.26: Kernbereich des Rossmann-Faltungstyps.....	50
Abbildung 4.27: Mitglieder der Nukleotidylyltransferase-Superfamilie.....	50
Abbildung 4.28: Biologische Einheit von NMNAT.....	52
Abbildung 4.29: Kontaktoberflächen von NMNAT	53
Abbildung 4.30: Protein-Protein Kontakte-von NMNAT	54
Abbildung 4.31: NMN-Bindung in hNMNAT	57
Abbildung 4.32: Oberflächenpotenzial und Ligandenbindungstasche im NMNAT-Hexamer	59
Abbildung 4.33: Ligandenbindung von NMNAT verschiedener Spezies.....	60
Abbildung 4.34: Ligandenbindung von Proteinen der Nukleotidylyl-Superfamilie.....	61
Abbildung 4.35: Bindungs- und Reaktionsmechanismus der NAD ⁺ -Synthese in humaner NMNAT.....	62

Abbildung 5.1: Konservierte Aminosäuren von Homing Endonukleasen	66
Abbildung 5.2: Endonuklease-Aktivität von PI-SceI Domäne II.....	68
Abbildung 5.3: Aktives Zentrum der Endonukleasen PI-SceI und I-CreI	69
Abbildung 5.4: Protein-Splicing-Aktivität von PI-SceI Domäne I.....	70
Abbildung 5.5: Erkennungssequenz von PI-SceI	71
Abbildung 5.6: Biegung der PI-SceI-Erkennungssequenz.....	71
Abbildung 5.7: Bindungsmodelle.....	72
Abbildung 5.8: DNA-Bindung von PI-SceI, Zusammenfassung der biochemischen Daten	74
Abbildung 5.9: Expression und Proteinreinigung von PI-SceI Domäne I.....	80
Abbildung 5.10: Kristalle von PI-SceI-DI	81
Abbildung 5.11: DNA-Fragmente für Bindungsexperimente.....	81
Abbildung 5.12: Absorptionsspektren.....	82
Abbildung 5.13: Gelshift-Experiment.....	83
Abbildung 5.14: Diffraktionsmuster des PI-SceI-DI-Kristalls.....	83
Abbildung 5.15: R_{cryst} und R_{free} im Verlauf der Verfeinerung	85
Abbildung 5.16: Ramachandran-Diagramm der Struktur von PI-SceI-DI.....	86
Abbildung 5.17: Elektronendichte.....	86
Abbildung 5.18: Bänder-Modell der Struktur von PI-SceI Domäne I.....	87
Abbildung 5.19: Sekundärstruktur-Schema von PI-SceI-DI.....	88
Abbildung 5.20: Strukturüberlagerungen von PI-SceI Domäne I mit Proteinen der Superfamilie.....	89
Abbildung 5.21: Sequenzvergleich aller in den Strukturen vorkommender Aminosäuren (Domäne I)	91
Abbildung 5.22: Strukturelle Überlagerung von PI-SceI-DI	92
Abbildung 5.23: Unterschiede in den Sekundärstrukturelementen	93
Abbildung 5.24: Vergleich der Domäne I-Strukturen	95
Abbildung 5.25: Kristallkontakte von PI-SceI Domäne I	96
Abbildung 5.26: Aktives Zentrum von PI-SceI Domäne I	97
Abbildung 5.27: Aktives Zentrum von PI-SceI Domäne I	98
Abbildung 5.28: Protein-Splicing-Modell für den Reaktionsmechanismus.....	99
Abbildung 5.29: Bedeutsame Reste für die DNA-Bindung.....	101
Abbildung 5.30: Oberflächenpotenzial der PI-SceI Domäne I.....	102
Abbildung 5.31: GV-Konstrukt von PI-SceI	104
Abbildung 5.32: Geometriebasiertes Docking.....	107

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Coenzyme und prosthetische Gruppen mit Nukleotid-Anteilen	12
Tabelle 4-1: Strukturelle Informationen zu NMNAT	21
Tabelle 4-2: Datensammlungsstatistik des SeMet-hNMNAT-Kristalls	30
Tabelle 4-3: Korrelation für Wellenlängenpaare	31
Tabelle 4-4: Verfeinerungsstatistik von hNMNAT	32
Tabelle 4-5: Matthews-Koeffizient für Kristalle von hNMNAT	34
Tabelle 4-6: Vergleich der Strukturen von humaner NMNAT	40
Tabelle 4-7: Entfernungen von Seitenketten in hNMNAT mit und ohne Ligand.....	58
Tabelle 5-1: Datensammlungsstatistik des PI-SceI-DI Kristalls	84
Tabelle 5-2: Verfeinerungsstatistik von PI-SceI-DI.....	85
Tabelle 5-3: Zusammenfassung der fünf Strukturen von PI-SceI (Domäne I).....	90

10. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) *Molecular biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, London.
- Bairoch, A. Apweiler, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, **28**, 45-48.
- Balducci, E., Emanuelli, M., Magni, G., Raffaelli, N., Ruggieri, S., Vita, A. Natalini, P. (1992) Nuclear matrix-associated NMN adenylyltransferase activity in human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **189**, 1275-1279.
- Balducci, E., Emanuelli, M., Raffaelli, N., Ruggieri, S., Amici, A., Magni, G., Orsomando, G., Polzonetti, V. Natalini, P. (1995) Assay methods for nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase of wide applicability. *Analytical Biochemistry*, **228**, 64-68.
- Beamer, L.J. Pabo, C.O. (1992) Refined 1.8 Å crystal structure of the lambda repressor-operator complex. *Journal of Molecular Biology*, **227**, 177-196.
- Belfort, M. Perlman, P.S. (1995) Mechanisms of intron mobility. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30237-30240.
- Belfort, M. Roberts, R.J. (1997) Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3379-3388.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. Bourne, P.E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
- Beyer, H. Walter, W. (1991) *Lehrbuch der Organischen Chemie*. S. Hirzel, Stuttgart.
- Boulton, S., Kyle, S. Durkacz, B.W. (1997) Low nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity in a tiazofurin-resistant cell line: effects on NAD metabolism and DNA repair. *British Journal of Cancer*, **76**, 845-851.
- Branden, C., Tooze, J. (1998) *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, London.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D*, **54**, 905-921.
- Bürkle, A. (2001) PARP-1: a regulator of genomic stability linked with mammalian longevity. *Chem. Bio. Chem.*, **2**, 725-728.
- Carter, E.S. 2nd. Tung, C.S. (1996) NAMOT2 - a redesigned nucleic acid modeling tool: construction of non-canonical DNA structures. *Computational Applications in Bioscience*, **12**, 25-30.
- Chevalier, B.S. Stoddard, B.L. (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Research*, **29**, 3757-3774.
- Christ, F., Schoettler, S., Wende, W., Steuer, S., Pingoud, A. Pingoud, V. (1999) The monomeric homing endonuclease PI-SceI has two catalytic centres for cleavage of the two strands of its DNA substrate. *The EMBO Journal*, **18**, 6908-6916.
- Christ, F., Steuer, S., Thole, H., Wende, W., Pingoud, A. Pingoud, V. (2000) A model for the PI-SceI x DNA complex based on multiple base and phosphate backbone-specific photocross-links. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 867-875.
- Christendat, D., Yee, A., Dharamsi, A., Kluger, Y., Savchenko, A., Cort,

- J.R., Booth, V., Mackereth, C.D., Saridakis, V., Ekiel, I., Kozlov, G., Maxwell, K.L., Wu, N., McIntosh, L.P., Gehring, K., Kennedy, M.A., Davidson, A.R., Pai, E.F., Gerstein, M., Edwards, A.M. Arrowsmith, C.H. (2000) Structural proteomics of an archaeon. *Nature Structural Biology*, **7**, 903-909.
- Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, **50**, 760-763.
- Cooney, D.A., Jayaram, H.N., Glazer, R.I., Kelley, J.A., Marquez, V.E., Gebeyehu, G., Cott, A.C.V., Zwelling, L.A. Jones, D.G. (1993) Studies on the mechanism of action of tiazofurin metabolism to an analog of NAD with potent IMP dehydrogenase-inhibitory activity. *Advances in Enzyme Regulation*, **21**, 271-303.
- Dahmen, W., Webb, B. Preiss, J. (1967) The deamido-diphosphorydine nucleotide and diphosphopyridine nucleotide pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **120**, 440-450.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. Poirier, G.G. (1999) Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, **342**, 249-268.
- D'Angelo, I., Raffaelli, N., Dabusti, V., Lorenzi, T., Magni, G. Rizzi, M. (2000) Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD⁺ biosynthesis. *Structure*, **8**, 993-1004.
- Dose, K. (1994) *Biochemie - Eine Einführung*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Drenth, J. (1994) *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer-Verlag, New York.
- Duan, X., Gimble, F.S. Quijcho, F.A. (1997) Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity. *Cell*, **89**, 555-564.
- Emanuelli, M., Carnevali, F., Saccucci, F., Pierella, F., Amici, A., Raffaelli, N. Magni, G. (2001) Molecular cloning, chromosomal localization, tissue mRNA levels, bacterial expression, and enzymatic properties of human NMN adenylyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 406-412.
- Emanuelli, M., Natalini, P., Raffaelli, N., Ruggieri, S., Vita, A. Magni, G. (1992) NAD biosynthesis in human placenta: purification and characterization of homogeneous NMN adenylyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **298**, 29-34.
- Emanuelli, M., Raffaelli, N., Amici, A., Balducci, E., Natalini, P., Ruggieri, S. Magni, G. (1995) The antitumor drug, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, inactivates human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochemical Pharmacology*, **49**, 575-579.
- Flick, K.E., Jurica, M.S., Monnat Jr, R.J. Stoddard, B.L. (1998) DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-PpoI. *Nature*, **394**, 96-101.
- Garavaglia, S., D'Angelo, I., Emanuelli, M., Carnevali, F., Pierella, F., Magni, G. Rizzi, M. (2001) Structure of human NMN adenylyltransferase: a key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 8524-8530.
- Gimble, F.S. (2001) Degeneration of a homing endonuclease and its target sequence in a wild yeast strain. *Nucleic Acids Research*, **29**, 4215-4223.
- Gimble, F.S. Stephens, B.W. (1995) Substitutions in conserved dodecapeptide motifs that uncouple the DNA binding and DNA cleavage activities of PI-SceI endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 5849-5856.
- Gimble, F.S. Thorner, J. (1992) Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **357**, 301-306.

- Gimble, F.S. Thorner, J. (1993) Purification and characterization of VDE, a site-specific endonuclease from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 21844-21853.
- Gimble, F.S. Wang, J. (1996) Substrate recognition and induced DNA distortion by the PI-SceI endonuclease, an enzyme generated by protein splicing. *Journal of Molecular Biology*, **263**, 163-180.
- Grindl, W., Wende, W., Pingoud, V. Pingoud, A. (1998) The protein splicing domain of the homing endonuclease PI-SceI is responsible for specific DNA binding. *Nucleic Acids Research*, **26**, 1857-1862.
- Gueux, N. Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gupta, S.K., Kececioglu, J.D. Schaffer, A.A. (1995) Improving the practical space and time efficiency of the shortest-paths approach to sum-of-pairs multiple sequence alignment. *Journal of Computational Biology*, **2**, 459-472.
- Hahn, T. (ed.) (1987) *International Tables for Crystallography*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Hall, T.M.T., Porter, J.A., Young, K.E., Koonin, E.V., Beachy, P.A. Leahy, D.J. (1997) Crystal structure of a hedgehog autoprocessing domain: homology between hedgehog and self-splicing proteins. *Cell*, **91**, 85-97.
- He, Z., Crist, M., Yen, H.-c., Duan, X., Quioco, F.A. Gimble, F.S. (1998) Amino acid residues in both the protein splicing and endonuclease domains of the PI-SceI intein mediate DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 4607-4615.
- Heath, P.J., Stephens, K.M., Monnat Jr, R.J. Stoddard, B.L. (1997) The structure of I-CreI, a group I intron-encoded homing endonuclease. *Nature Structural Biology*, **4**, 468-476.
- Hirata, P., Ohsumi, Y., Nakano, A., Kawasaki, H., Suzuki, K. Anraku, Y. (1990) Molecular structure of a gene, *VMA1*, encoding the catalytic subunit of H⁺-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 6726-6733.
- Holm, L. Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *Journal of Molecular Biology*, **233**, 123-138.
- Horvath, M. Rosenberg, J.M. to be published. .
- Hu, D., Crist, M., Duan, X. Gimble, F.S. (1999) Mapping of a DNA binding region of the PI-SceI homing endonuclease by affinity cleavage and alanine-scanning mutagenesis. *Biochemistry*, **38**, 12621-12628.
- Hu, D., Crist, M., Duan, X., Quioco, F.A. Gimble, F.S. (2000) Probing the structure of the PI-SceI-DNA complex by affinity cleavage and affinity photocross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 2705-2712.
- Hubbard, S.J. Thornton, J.M. (1993) NACCESS, Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.
- Hutchinson, E.G. Thornton, J.M. (1996) PROMOTIF - a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science*, **5**, 212-220.
- Ichiyanagi, K., Ishino, Y., Ariyoshi, M., Komori, K. Morikawa, K. (2000) Crystal structure of an archaeal intein-encoded homing endonuclease PI-PfuI. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 889-901.
- Izard, T. Geerlof, A. (1990) The crystal structure of a novel bacterial adenylyltransferase reveals half of sites reactivity. *The EMBO Journal*, **18**, 2021-2030.
- Jancarik, J. Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of

- proteins. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 409-411.
- Jayaram, H.N., Grusch, M., Cooney, D.A. Krupitza, G. (1999) Consequences of IMP dehydrogenase inhibition, and its relationship to cancer and apoptosis. *Current Medical Chemistry*, **6**, 561-574.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica Section A*, **47**, 110-119.
- Jurica, M.S., Monnat Jr, R.J. Stoddard, B.L. (1998) DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-CreI. *Molecular Cell*, **2**, 469-476.
- Jurica, M.S. Stoddard, B.L. (1999) Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 1304-1326.
- Kane, P.M., Yamashiro, C.T., Wolczyk, D.F., Neff, N., Goebel, M. Stevens, T.H. (1990) Protein splicing converts the yeast *TFP1* gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H⁺-adenosine triphosphatase. *Science*, **250**, 651-657.
- Karlson, P., Doenecke, D. Koolman, J. (1994) *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Klabunde, T., Sharma, S., Telenti, A., Jacobs Jr., W.R. Sacchettini, J.C. (1998) Crystal structure of GyrA intein from *Mycobacterium xenopi* reveals structural basis of protein splicing. *Nature Structural Biology*, **31**, 31-36.
- Koradi, R., Billeter, M. Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, **14**, 51-55.
- Lambowitz, A.M. Belfort, M. (1993) Introns as mobile genetic elements. *Annual Reviews in Biochemistry*, **62**, 587-622.
- Lamzin, V.S. Wilson, K.S. (1993) Automated refinement of protein models. *Acta Crystallographica Section D*, **49**, 129-149.
- Lindahl, T. Wood, R.D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science*, **286**, 1897-1905.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N. Ruggieri, S. (1999) Enzymology of NAD⁺ synthesis. In Purich, D.L. (ed.) *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Vol. 73, pp. 135-160.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, **33**, 491-497.
- Mills, K.V. Paulus, H. (2001) Reversible inhibition of protein splicing by zinc ion. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 10832-10838.
- Mizutani, R., Nogami, S., Kawasaki, M., Ohya, Y., Anraku, Y. Satow, Y. (2002) Protein-splicing reaction via a thiazolidine intermediate: crystal structure of the VMA1-derived endonuclease bearing the N and C-terminal propeptides. *Journal of Molecular Biology*, **316**, 919-929.
- Mueller, J.E., Bryk, M., Loizos, N., Belfort, M., Lloyd, R.S. Roberts, R.J. (1993) Homing endonucleases. In Linn, S.M. (ed.) *Nucleases*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 111-143.
- Müller, E.-C., Lapko, A., Otto, A., Müller, J.J., Ruckpaul, K. Heinemann, U. (2001) Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{scc}. *European Journal of Biochemistry*, **268**, 1837-1843.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T.J.P. Chothia, C. (1995) SCOP: a structural classification of protein database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, **247**, 536-540.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica Section A*, **50**, 157-163.
- Noren, C.J., Wang, J. Perler, F.B. (2000) Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angewandte Chemie*

- International Edition*, **39**, 450-466.
- Norris, C.L., Meisenheimer, P.L. Kock, T.H. (1996) Mechanistic studies of the 5-iodouracil chromophore relevant to its use in nucleoprotein photo-cross-linking. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 5796-5803.
- Oei, S.L., Griesenbeck, J. Schweiger, M. (1997) The role of poly(ADP-ribosyl)ation. *Reviews in Physiology Biochemistry Pharmacology*, **131**, 127-174.
- Olland, A.M., Underwood, K.W., Czerwinski, R.M., Lo, M.-C., Aulabaugh, A., Bard, J., Stahl, M.L., Somers, W.S., Sullivan, F.X. Chopra, R. (2001) Identification, characterization and crystal structure of *Bacillus subtilis* nicotinic acid mononucleotide adenylyl transferase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 3698-3707.
- Orengo, C.A., Michie, A.D., Jones, S., Jones, D.T., Swindells, M.B. Thornton, J.M. (1997) CATH - A hierarchic classification of protein domain structures. *Structure*, **5**, 1093-1108.
- Otwinowski, Z. Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collection in oscillation mode. *Methods in Enzymology*, **276**, 307-326.
- Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J. Belfort, M. (1994) Protein splicing elements: inteins and exteins - a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Research*, **22**, 1125-1127.
- Pingoud, V., Grindl, W., Wende, W., Thole, H. Pingoud, A. (1998) Structural and functional analysis of the homing endonuclease PI-SceI by limited proteolytic cleavage and molecular cloning of partial digestion products. *Biochemistry*, **37**, 8233-8243.
- Pingoud, V., Thole, H., Christ, F., Grindl, W., Wende, W. Pingoud, A. (1999) Photocross-linking of the homing endonuclease PI-SceI to its recognition sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 10235-10243.
- Poland, B., Xu, M.-Q. Quioco, F.A. (2000) Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 16408-16413.
- Posey, K.L. Gimble, F.S. (2002) Insertion of a reversible redox switch into a rare-cutting DNA endonuclease. *Biochemistry*, **41**, 2184-2190.
- Rossmann, M. G., Moras, D. Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, **250**, 194-199.
- Rould, M.A., Perona, J.J. Steitz, T.A. (1991) Structural basis of anticodon loop recognition by glutamyl-tRNA synthetase. *Nature*, **352**, 213-218.
- Ruggieri, S., Gregori, L., Natalini, P., Vita, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N. Magni, G. (1990) Evidence for an inhibitory effect exerted by yeast NMN adenylyltransferase on poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Biochemistry*, **29**, 2501-2506.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saridakis, V., Christendat, D., Kimber, M.S., Dharamsi, A., Edwards, A.M. Pai, E.F. (2001) Insights into ligand binding and catalysis of a central step in NAD⁺ synthesis. Structures of *Methanobacterium thermoautotrophicum* NMN adenylyltransferase complexes. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7225-7232.
- Schöttler, S., Wende, W., Pingoud, V. Pingoud, A. (2000) Indication of Asp218 and Asp326 as the principal Mg²⁺ binding ligands of the homing endonuclease PI-SceI. *Biochemistry*, **39**, 15895-15900.
- Schweiger, M., Hennig, K., Lerner, F., Niere, M., Hirsch-Kaufmann, M., Specht, T., Weise, C., Oei, S.L. Ziegler, M. (2001) Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT), a

- nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Letters*, **492**, 95-100.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Terwilliger, T.C. (1999) Reciprocal-space solvent flattening. *Acta Crystallographica Section D*, **55**, 1863-1871.
- Terwilliger, T.C. Berendzen, J. (1999) Automated structure solution for MIR and MAD. *Acta Crystallographica Section D*, **55**, 849-861.
- Uhr, M.L. Smulson, M. (1982) NMN adenylyltransferase: its association with chromatin and with poly(ADP-ribose) polymerase. *European Journal of Biochemistry*, **128**, 435-443.
- Ullrich, T.C., Blaesse, M. Huber, R. (2001) Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *The EMBO Journal*, **20**, 316-329.
- Ullrich, T.C. Huber, R. (2001) The complex structures of ATP sulfurylase with thiosulfate, ADP and chlorate reveal new insights in inhibitory effects and the catalytic cycle. *Journal of Molecular Biology*, **313**, 1117-1125.
- Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L. Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *Journal of Molecular Biology*, **229**, 105-24.
- von Delft, F., Lewendon, A., Dhanaraj, V., Blundell, T.L., Abell, C. Smith, A.G. (2001) The crystal structure of *E. coli* pantothenate synthetase confirms it as a member of the cytidyltransferase superfamily. *Structure*, **9**, 316-329.
- Watson, J.D., Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **171**, 737-738.
- Weber, C.H., Park, Y.S., Sanker, S., Kent, C. Ludwig, M.L. (1999) A prototypical cytidyltransferase: CTP:glycerol-3phosphate cytidyltransferase from *Bacillus subtilis*. *Structure*, **7**, 1113-1124.
- Weiss, M.S. (2001) Global indicators of X-ray data quality. *Journal of Applied Crystallography*, **34**, 130-135.
- Wende, W., Grindl, W., Christ, F., Pingoud, A. Pingoud, V. (1996) Binding, bending and cleavage of DNA substrates by the homing endonuclease PI-SceI. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4123-4132.
- Wende, W., Schöttler, S., Grindl, W., Christ, F., Scheuer, S., Noel, A.J., Pingoud, V. Pingoud, A. (2000) A mutational analysis of DNA binding and cleavage by the homing endonuclease PI-SceI. *Molecular Biology*, **34**, 902-912.
- Werner, E., Ziegler, M., Lerner, F., Schweiger, M. Heinemann, U. (2002a) Crystal structure of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase in complex with NMN. *FEBS Letters*, **516**, 239-244.
- Werner, E., Ziegler, M., Lerner, F., Schweiger, M., Muller, Y.A. Heinemann, U. (2002b) Crystallization and preliminary X-ray analysis of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT). *Acta Crystallographica Section D*, **58**, 140-142.
- Yang, S.-W. Nash, H.A. (1994) Specific photocrosslinking of DNA-protein complexes: identification of contacts between integration host factor and its target DNA. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **91**, 12183-12187.
- Zhang, H., Zhou, T., Kurnasov, O., Cheek, S., Grishin, N.V. Osterman, A. (2002) Crystal structure of *E. coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD. *Structure*, **10**, 69-79.
- Zhou, T., Kurnasov, O., Tomchick, D.R., Binns, D.D., Grishin, N.V., Marquez, V.E., Osterman, A.L. Zhang, H. (2002) Structure of human NMN/NaMN adenylyltransferase: basis for the

dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 13148-13154.

Ziegler, M. (2000) New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, **257**, 1550-1564.

11. Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Udo Heinemann für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung sowie die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Kristallographie am MDC für ihre Unterstützung. Insbesondere hervorzuheben sind Dr. Jürgen J. Müller für seine besondere Hilfe bei allen Problemen, Dr. Yves A. Müller für entscheidende kristallographisch-computertechnische Hilfen und Anette Feske für den Beginn der Kristallisationsversuche mit hNMNAT. Weiterer Dank an Dr. Eva Müller und Dr. Rolf Misselwitz, beide MDC, für die Durchführung der Massenspektren bzw. die Hilfe bei der Aktivitätskurve sowie an Andreas Knespel für technische Hilfe jeder Art.

Auf Seiten der Kooperationspartner geht der Dank an die Gruppen von PD Dr. Mathias Ziegler / Prof. Dr. Manfred Schweiger, FU Berlin und Prof. Dr. Alfred Pingoud, Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Klaus Hennig (FU Berlin) für hervorragende technische Unterstützung bei der Proteinreinigung von hNMNAT und Dr. Wolfgang Wende (Uni Gießen) u.a. für die Bereitstellung des PI-SceI-DI Plasmids.

Den Professoren Hong Zhang (Dallas, USA), Menico Rizzi (Pavia, Italien) und Yoshinori Satow (Tokyo, Japan) gilt der Dank für die Bereitstellung ihrer jeweiligen Koordinaten; 1kqn, 1kqo, 1kr2, 1k4k, 1k4m (Zhang), 1kku (Rizzi) und 1jva (Satow).

Für fruchtbare Diskussionen über den Tellerrand der Kristallographie hinaus danke ich den Mitgliedern des Graduiertenkollegs „Modellstudien“, insbesondere dessen Sprecher Prof. Dr. Wolfgang Höhne, Charité Berlin.

Für die Hilfe bei der Messung von Datensätzen danke ich den Mitarbeitern der Elektronensynchrotrons in Hamburg (DESY/EMBL) und Grenoble (ESRF) sowie Dr. Uwe Müller (Proteinstrukturfabrik/BESSY II Berlin).

Die Arbeit und mein Lebensunterhalt wurden im Verlaufe der Zeit finanziell unterstützt von: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Max-Delbrück-Centrum, Bundesministerium für Bildung und Forschung, Thyssen Stiftung, Fonds der chemischen Industrie und Arbeitsamt Berlin-Nord. Herzlichen Dank.

12. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Erik Werner
Anschrift: Ramlerstr. 32a
13355 Berlin
Geburtsdatum, Ort: 27.03.1971 in Oberwesel am Mittelrhein

Schulbildung

1977 - 1981 Grundschole Oberwesel
1981 - 1990 Kant-Gymnasium Boppard

Hochschulstudium

Okt.1991 bis Mär.1997 Studium der Chemie (Diplom) an der Johannes
Gutenberg- Universität, Mainz
Sep.1993 Abschluss der mündlichen Vordiplom-Prüfungen
Jul.1996 mündliche Hauptdiplom-Prüfungen
Aug.1996 - Mär.1997 Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für
Toxikologie
Klinikum der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
Mai 1997 - Aug.2002 Promotion in der Arbeitsgruppe Kristallographie,
Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch

Sonstiges

Jun.1990 - Aug.1991 Zivildienst:
Pflegedienst auf einer internistische Station der
I. Medizinischen Klinik (Leiter: Prof. K.-H. Meyer um
Büschensfelde), Klinikum der Johannes Gutenberg-
Universität, Mainz
Sep.1994 - Mär.1995 Auslandsstudium als Stipendiat des Deutschen
Akademischen Austauschdienstes (DAAD) an der
Universität von Kalifornien, Irvine
Homepage <http://www.ewerner.de>

Berlin, August 2002

13. Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt

Berlin, August 2002