

4. Die Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase von *Homo sapiens*

4.1. Einleitung

4.1.1. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid NAD^+

Wohlbekannt und in vielen Lehrbüchern ausführlich beschrieben ist die Rolle des Coenzym $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ als Wasserstoffakzeptor/-donor in zellulären Stoffwechselreaktionen. Während NADPH im Allgemeinen bei der reduktiven Biosynthese, etwa bei der Photosynthese, der Cholesterin- oder bei der Fettsäuresynthese beteiligt ist, wird der reduzierende Wasserstoff von NADH meist an Enzyme der Atmungskette abgegeben und durch Übertragung auf Sauerstoff zur Synthese von ATP genutzt, siehe z.B. (Karlson *et al.*, 1994; Stryer, 1988). Durch Verlust des Wasserstoffs liegt das Coenzym in der oxidierten Form, NAD(P)^+ , vor und trägt eine positive Ladung am Ring-Stickstoff des Nicotinamids. Der Phosphatrest in NADP(H) befindet sich an der 2'-Position der Ribose des Adenosins, Abbildung 4.1.

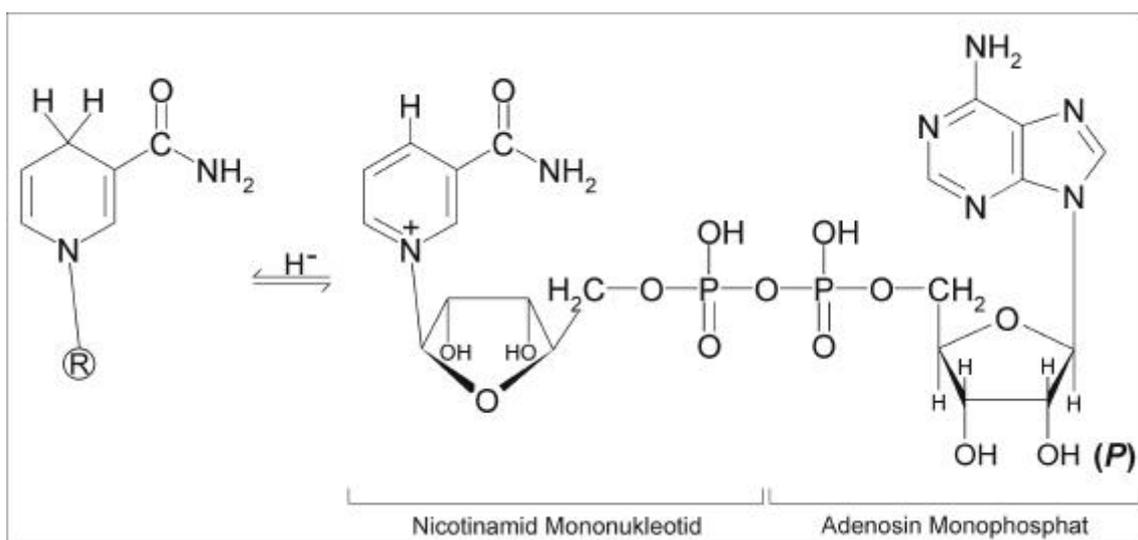


Abbildung 4.1: Strukturformel von $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$

R: Ribose-Diphosphat-Adenosin

Weitere Bedeutung besitzt NAD^+ in zellulären Signaltransduktionswegen (Review in (Ziegler, 2000)). Es dient z.B. als Substrat für die kovalente Modifikation von Proteinen. ADP-Ribose wird dabei etwa von bakteriellen Toxinen oder von eukaryotischen ADP-Ribosyltransferasen auf Zielproteine übertragen. NAD^+ kann zudem als Ausgangsstoff für die Synthese des Botenstoffes cyclo-ADP-Ribose (cADPR) dienen. Ein besonders gut studiertes Protein ist die Poly(ADP-Ribosyl)-Polymerase, PARP1, die Poly(ADP-Ribose) synthetisiert und auf ein Zielprotein überträgt. Zielproteine sind z.B. Histone, Topoisomerasen oder auch PARP1 selbst. Das Zellkern-Protein und sein Syntheseprodukt werden mit zahlreichen Reaktionen des DNA-Stoffwechsels in Zusammenhang gebracht, so z.B. mit der Rekrutierung von DNA-Reparaturenzymen, der Regulation der Genom-Stabilität, und der DNA-Replikation, aber auch mit der Transkription, der Genexpression und mit Apoptose (Reviews in (Bürkle, 2001; D'Amours *et al.*, 1999; Oei *et al.*, 1997)).

4.1.2. Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase NMNAT

NAD^+ kann *de novo* oder über den Bergungs-Stoffwechselweg, der Rückgewinnung aus Nukleotiden der Nukleinsäuren („salvage pathway“) synthetisiert werden (Magni *et al.*, 1999), Abbildung 4.2. Das Enzym Nicotinamid/Nicotinat-Mononukleotid-Adenylyltransferase, NMNAT/NaMNAT (E.C. 2.7.7.1), ist dabei an beiden Wegen beteiligt. Da es sowohl Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) als auch Nicotinat-Mononukleotid (NaMN) bindet und mit ATP umsetzt (Dahmen *et al.*, 1967; Emanuelli *et al.*, 2001; Emanuelli *et al.*, 1992), sind als Reaktionsprodukte sowohl NAD^+ als auch deamido- NAD^+ (NaAD^+) möglich. Letzteres kann durch die NAD^+ -Synthetase zu NAD^+ amidiert werden. Es handelt sich also bei NaMNAT und NMNAT um das gleiche Enzym. NMNAT ist ein 32 kDa-Protein, welches aus Plazenta (Emanuelli *et al.*, 1992) und als rekombinantes Protein (Emanuelli *et al.*, 2001; Schweiger *et al.*, 2001) gereinigt wurde. Seine Aktivität kann indirekt verfolgt werden. Das Endprodukt der Synthese, NAD^+ , wird dabei von Alkohol-Dehydrogenase zu NADH reduziert, eine Reaktion, die spektroskopisch nachvollzogen werden kann (Balducci *et al.*, 1995).

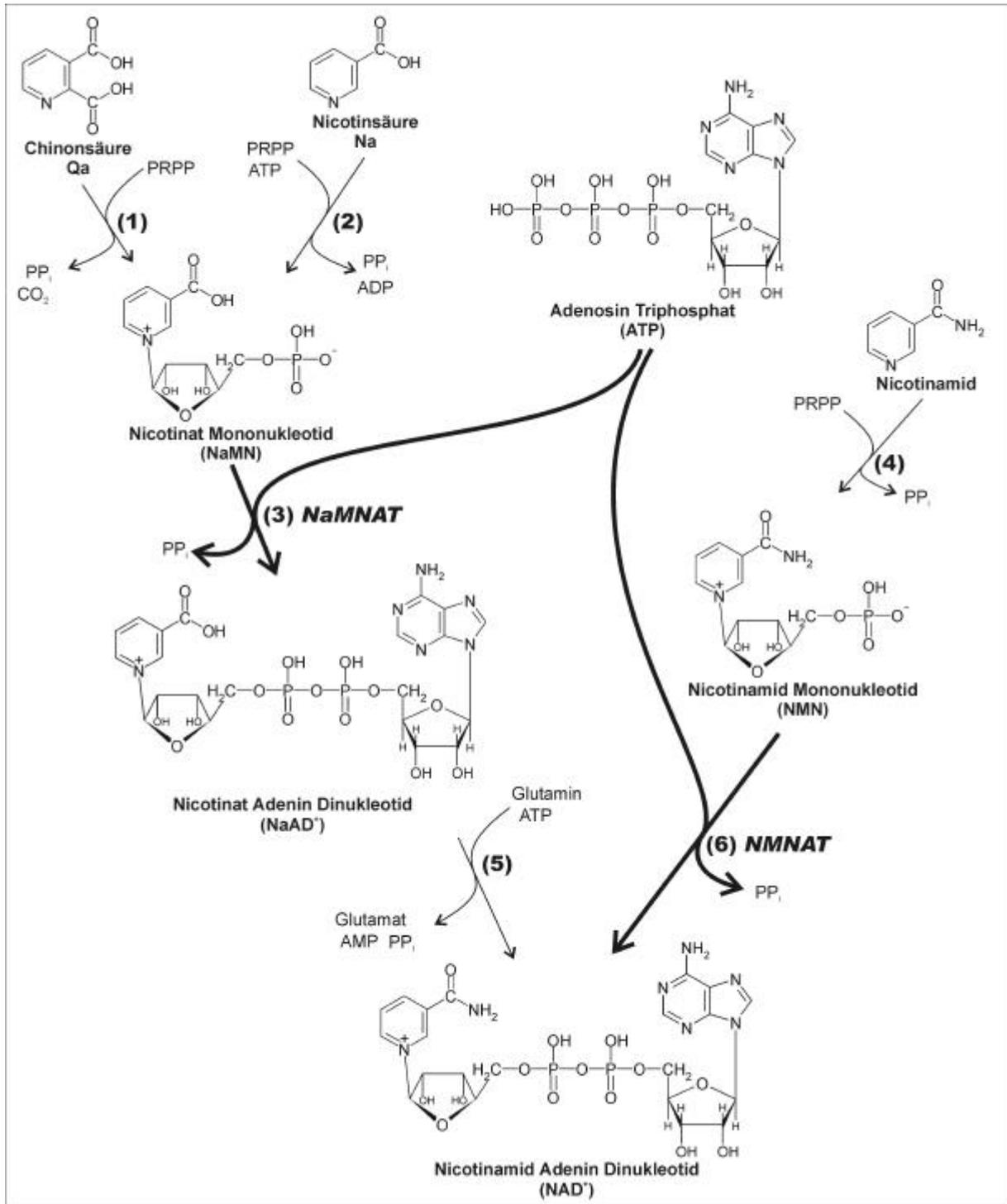


Abbildung 4.2: Biosynthese von NAD⁺

Die Reaktionen werden von den folgenden Enzymen katalysiert: (1) Chinolinat-Phosphoribosyltransferase, (2) Nicotinat-Phosphoribosyltransferase, (3) Nicotinat-Mononukleotid Adenylyltransferase (NaMNAT), (4) Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase, (5) NAD⁺-Synthetase, (6) Nicotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT). PRPP: Phosphoribosylpyrophosphat.

Humane NMNAT ist ausschließlich im Zellkern zu finden, wird dort phosphoryliert und ist mit PARP1 assoziiert, welche von NMNAT inhibiert wird (Balducci *et al.*, 1992; Ruggieri *et al.*, 1990; Schweiger *et al.*, 2001; Uhr und Smulson, 1982).

NMNAT wird daher eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrazellulären NAD⁺-Pools zugeschrieben, insbesondere in Episoden mit erhöhten DNA-Schäden. PARP1 ist unter anderem an der Basen-Excisions-Reparatur (BER) beteiligt (D'Amours *et al.*, 1999; Lindahl and Wood, 1999; Oei *et al.*, 1997) und könnte daher einen großen Teil des zellulären NAD⁺ unter den Bedingungen von genotoxischem Stress aufbrauchen.

Zudem wird die Expression von NMNAT in Tumorzellen, die resistent gegen Tiazofurin (2-β-D-Ribofuranosylthiazol-4-carboxamid) sind, herunter reguliert (Boulton *et al.*, 1997). NMNAT überträgt AMP auf Thiazofurin-Phosphat (TMN) im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese von Thiazofurin-Adenin-Dinukleotid, TAD (Cooney *et al.*, 1993). TAD inhibiert mit Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase ein wichtiges Enzym der GTP/dGTP Biosynthese und bewirkt somit eine Unterbrechung der DNA- und RNA-Synthese sowie eine Blockierung von G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionswegen (Jayaram *et al.*, 1999). Da NMNAT außerdem vom Chemotherapeutikum 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea (BCNU) inaktiviert wird (Emanuelli *et al.*, 1995), kann das Enzym als Ziel pharmakologischer Anwendungen in Betracht gezogen werden. Für die humane NMNAT aus Plazenta wurden Michaelis-Konstanten K_M gemessen von 23 μM für ATP, 38 μM für NMN, 180 μM für NaMN, 67 μM für NAD⁺ und 125 μM für PP_i (Emanuelli *et al.*, 1992). Damit scheint der Amido-Weg der Synthese hier bevorzugt zu sein, anders als in anderen Spezies (Dahmen *et al.*, 1967; Magni *et al.*, 1999). ATP inhibiert die Synthese von NAD⁺ genauso wie ADP-Ribose und verschiedene Schwermetalle (Emanuelli *et al.*, 2001; Emanuelli *et al.*, 1992). Der Vergleich von NMNAT-Proteinsequenzen verschiedener Spezies ergibt zwei konservierte Motive, deren Konsensus-Sequenz mit G¹⁵XXXP¹⁹X(H/T)²¹XXH²⁴- und S²²²XT²²⁴XXR²²⁷ angegeben werden (D'Angelo *et al.*, 2000; Garavaglia *et al.*, 2001; Olland *et al.*, 2001; Saridakis *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002).

4.1.3. Strukturen von NMNATs

Erste strukturelle Informationen zu NMNAT wurden im Jahr 2000 und Anfang 2001 aus dem Bereich der Archaea publiziert (drei Strukturen), bevor im Zeitraum Oktober 2001 bis März 2002 neun (!) weitere Strukturen aus drei

Spezies und von vier verschiedenen Gruppen hinzukamen. Sie alle wurden unabhängig voneinander produziert. Eine davon, die humane NMNAT im Komplex mit NMN wird in dieser Arbeit vorgestellt. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die insgesamt zwölf Strukturen und führt die immer wieder benutzten Codes der Protein-Datenbank (Berman *et al.*, 2000) ein. Ein Vergleich der kristallographischen Parameter und Struktureigenschaften findet sich zudem in Tabelle 4-6, Seite 40.

PDB-Code	Spezies	Ligand	Publikation (online zugänglich)	PDB- Deposition*	Referenz
1f9a	<i>M. jannaschii</i>	ATP	08/2000	07/2000	(D'Angelo <i>et al.</i> , 2000)
1ej2	<i>M. thermoautotrophicum</i>	NAD ⁺	10/2000	01/2000	(Christendat <i>et al.</i> , 2000)
1hyb		NMN	03/2001	02/2001	(Saridakis <i>et al.</i> , 2001)
1kam	<i>B. subtilis</i>	-	02/2002	11/2001	(Olland <i>et al.</i> , 2001)
1kaq		NaAD ⁺	(11/2001)		
1kku	<i>H. sapiens</i>	-	03/2002 (12/2001)	12/2001	(Garavaglia <i>et al.</i> , 2001)
1k4k	<i>E. coli</i>	-	01/2002	10/2001	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
1k4m		NaAD ⁺			
1kqo	<i>H. sapiens</i>	NaAD ⁺	04/2002 (01/2002)	01/2002	(Zhou <i>et al.</i> , 2002)
1kqn		NAD			
1kr2		TAD			
1gzu	<i>H. sapiens</i>	NMN	04/2002 (03/2002)	12/2001	(Werner <i>et al.</i>, 2002a) und diese Arbeit

Tabelle 4-1: Strukturelle Informationen zu NMNAT

* Alle Koordinaten außer denen der *B. subtilis* NMNAT liegen vor. Die Professoren Zhang und Rizzi stellten ihre Koordinaten (alle humanen und die von *E. coli*) dankenswerterweise zur Verfügung, bevor sie öffentlich in der Protein Datenbank zugänglich sind.

Zu Beginn des Projektes (Mitte 2000) gab es zunächst kaum strukturelle Informationen, überhaupt keine zum humanen Enzym, so dass die Strukturbestimmung von hNMNAT inklusive der Phasenbestimmung durch Schweratomderivate geplant und durchgeführt wurde.

4.2. Material und Methoden

4.2.1. Expressionsklonierung und Proteinreinigung

Gereinigtes Protein wurde vom Kooperationspartner (Klaus Hennig und Dr. Mathias Ziegler in der Gruppe von Prof. Dr. Manfred Schweiger, Institut für Biochemie, FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die cDNA von NMNAT wurde von ihnen in den Vektor pQE30 (Qiagen) einkloniert, das resultierende Plasmid in *E. coli* JM109-Zellen transfiziert und in TY-Medium exprimiert. Selektives Antibiotikum war Ampicillin. Die Genexpression wurde mit IPTG induziert, die Zellen mittels einer French Pressure Cell gebrochen und NMNAT, welches einen N-terminalen His₆-tag enthielt, wurde über eine Ni-NTA-Chromatographie entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt (Schweiger *et al.*, 2001). Dabei wurden die Histidin-Stickstoffatome von Nickel chelatiert und das Protein durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration wieder vom Säulenmaterial gelöst. NMNAT, in dem die Methionine durch Selenomethionine ausgetauscht waren, wurde auf die gleiche Art gereinigt. Lediglich das Wachstumsmedium und die Wachstumsbedingungen wurden entsprechend eines Protokolls von Van Duyne (Van Duyne *et al.*, 1993) verändert. Dabei wurden die Zellen in einem Minimal-Medium angezüchtet und dann das Plasmid in einem Medium exprimiert, welches Selenomethionin anstelle von Methionin enthielt.

Zum Pufferaustausch und um höher- und niedermolekulare Verunreinigungen abzutrennen wurde das von K.H./M.Z. erhaltene Protein noch mittels Gelchromatographie (Pharmacia Superdex200 und FastDesalting) gereinigt. Der Lagerungspuffer enthielt 100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 300 mM NaCl und 100 mM Imidazol.

4.2.2. Aktivitätstest und Massenspektrum

Die Aktivität von NMNAT, also die Synthese von NAD wurde indirekt mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase gemessen (Balducci *et al.*, 1995). Bei 37°C wurde die NMNAT-Probe in eine Lösung mit 16 mM Semicarbazid-HCl, 0.625 % (v/v) Ethanol, 30 mM HEPES pH 7.4, 12.25 mM MgCl₂, 1.17 mM ATP und 15 U Alkohol-

Dehydrogenase gegeben und die Reaktion durch Zugabe von NMN bis zu einer finalen Konzentration von 0.625 mM gestartet. NMNAT setzt NMN und ATP zu NAD⁺ um, welches von der Alkohol-Dehydrogenase zu NADH reduziert wird. Die Absorption wurde bei 340 über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen. Hier besitzt NADH, nicht jedoch NAD⁺ ein Absorptionsmaximum. Steigt also die Absorption bei 340 nm im Verlaufe der Zeit, beobachtet man indirekt die Synthese von NAD⁺, also die Aktivität von NMNAT. Die Massenspektren von SeMet-NMNAT wurden von Dr. Eva-Christina Müller, MDC Berlin, aufgenommen, nachdem das Protein zunächst tryptisch verdaut wurde. Siehe Ref. (Müller *et al.*, 2001) für experimentelle Details.

4.2.3. Kristallisation und Kryoprotektion

NMNAT wurde mit der sog. hanging-drop Dampfdiffusions-Methode kristallisiert. Dabei wird ein Tropfen eines Protein-Reservoir-Gemisches an der Unterseite eines silikonisierten Deckgläschens hängend luftdicht über ein Reservoir gebracht. Über die Dampfphase stellt sich ein Konzentrationsgleichgewicht ein (vapour diffusion). Die Kristallisationsbedingungen für NMNAT und SeMet-NMNAT wurden durch Screening gefunden (Hampton Screen I (Jancarik und Kim, 1991)) und dann optimiert. Kristalle mit den besten Diffraktionseigenschaften wurden durch Mischen von 1 µl Proteinlösung (30 mg/ml) in 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0, 0.3 M NaCl, 0.1 M Imidazol, 1 mM MgCl₂, 1 mM NAD⁺ und 2.5 mM DTT mit demselben Volumen Reservoir (2.0 M Na/KH₂PO₄, 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5, 5 % (v/v) 2-Propanol) produziert. Der Kristall, der für die Strukturaufklärung benutzt wurde, hatte eine Größe von 200 x 75 x 75 µm und wurde nach kurzem Einweichen in der Kryoprotektant-Lösung (Reservoir plus zusätzliche 20 % (v/v) Ethylenglycol) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

4.2.4. Röntgendiffraktion, Phasenbestimmung und Verfeinerung

Ein vollständiger Datensatz von SeMet-NMNAT wurde am ESRF in Grenoble aufgenommen, Strahlführung ID14-4. Bei einer Wellenlänge von 0.9795 Å (dem Maximum des Fluoreszenzspektrums) wurden 240 Diffraktionsbilder mit $\Delta\phi = 0.5^\circ$ bis zu einer maximalen Auflösung von 2.7 Å aufgenommen. Die Daten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK reduziert (Otwinowski und Minor, 1997).

Die Phasen wurden mit der single-wavelength anomalous dispersion (SAD) Methode im Programm SOLVE (Terwilliger und Berendzen, 1999) bestimmt und durch die sog. maximum-likelihood Dichtemodifikation (solvent flattening, Programm RESOLVE (Terwilliger, 1999)) verbessert. Außerdem wurde eine in der Elektronendichte beobachtete, nichtkristallographische Symmetrie (dreifache Rotationssymmetrie) während der Verfeinerung benutzt. Diese Beschränkung (NCS restraints) wurde für das Peptid-Rückgrat streng, für die Seitenketten locker gehalten, ebenso wie die Beschränkungen für die *B*-Faktoren. Lediglich Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.9 Å wurden in den Programmen REFMAC5 (Collaborative Computational Project, 1994) und CNS (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert, der Modellbau erfolgte im Programm ONO (Jones *et al.*, 1991).

4.3. Ergebnisse und Diskussion

4.3.1. Genexpression, Proteinqualität und -aktivität

Das vorliegende Konstrukt von humaner NMNAT, das komplette Protein mitsamt einem N-terminalen His₆-tag, lässt sich durch standardmäßige Affinitäts-Chromatographie in zufrieden stellender Reinheit gewinnen. In einer Gelchromatographie mit anschließendem Pufferaustausch (Abbildung 4.3) wird das Protein als einheitlicher Peak eluiert und ist in einem (mit 8 µg Protein deutlich überladenen) SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 4.4) als annähernd einzige Bande sichtbar. Die wenigen Verunreinigungen konnten auch durch sich

anschließende Chromatographie-Schritte (etwa Ionenaustauscher- oder Hydroxyapatit-Affinitäts-Chromatographie) nicht abgetrennt werden.

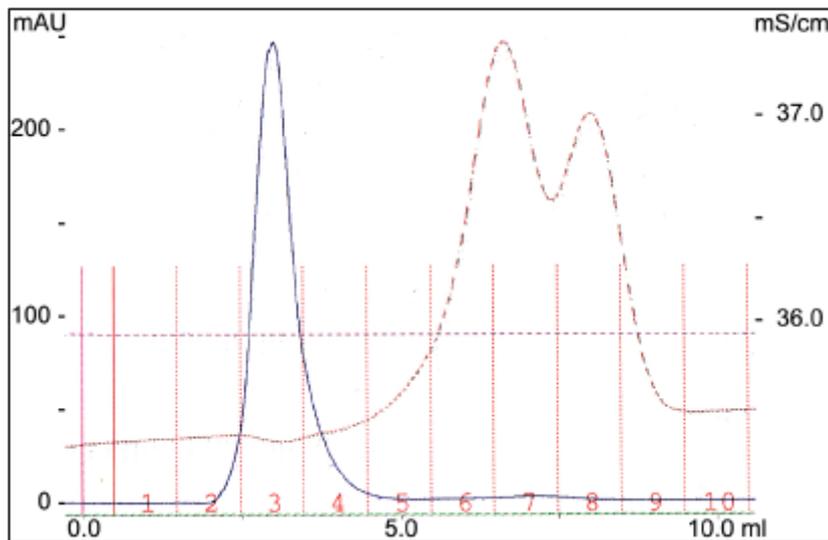


Abbildung 4.3:
Chromatogramm des
Pufferaustausches von
SeMet-NMNAT

Die durchgezogene Linie stellt die Absorption bei 280 nm (Skala links) dar, die gestrichelte Linie die Leitfähigkeit (Skala rechts). Die roten Nummern und Linien zeigen die Abgrenzungen der Fraktionen. Gezeigt ist das Chromatogramm für den Pufferaustausch mit der Pharmacia FastDesalting-Säule.

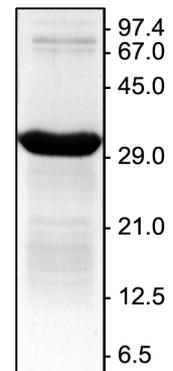


Abbildung 4.4: Reinheit von humaner NMNAT

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von 8 µg NMNAT in einem 16 %igen Gel, angefärbt mit Coomassie-Blau; Größenangaben rechts in kDa.

Humane NMNAT benötigt interessanterweise in jedem Puffer eine Salzkonzentration von mindestens 0.3 M (meist NaCl oder KCl), um nicht zu präzipitieren. Dies lässt auf einen hohen Anteil elektrostatischer Wechselwirkungen schließen, die auch für eine Oligomerisierung mitverantwortlich gemacht werden können. Humane NMNAT liegt in einem Hexamer als biologischer Einheit vor (siehe auch Kapitel 4.3.6, Seite 34 und Kapitel 4.3.8, Seite 39), was auch der Beobachtung aus der Gelfiltration entspricht. Die Aktivität von NMNAT (und in unveränderter Weise von SeMet-NMNAT) besteht im Umsatz von NMN und ATP zu NAD^+ (siehe auch Kapitel 4.2.2, Seite 22). NAD^+ wird von der Alkohol-Dehydrogenase zu NADH reduziert, was sich in einem zusätzlichen Maximum im Absorptionsspektrum bei 340 nm

bemerkbar macht (Abbildung 4.5). Verfolgt man demnach die Absorption bei 340 nm, erhält man auf indirekte Weise die Aktivität von NMNAT (Abbildung 4.6).

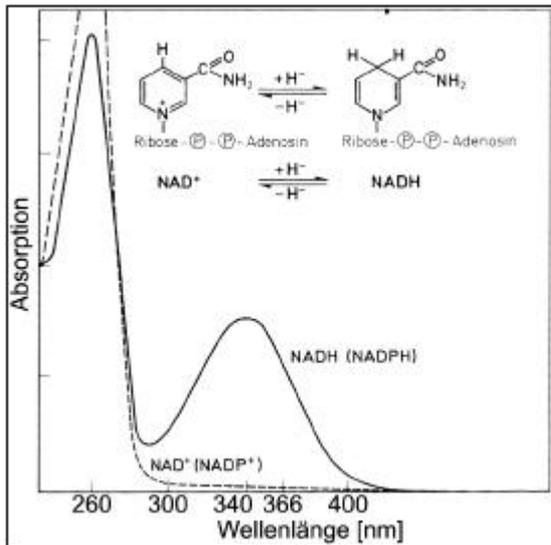


Abbildung 4.5: UV Absorptionsspektrum von NAD⁺ und NADH

Abbildung aus Dose (1994)

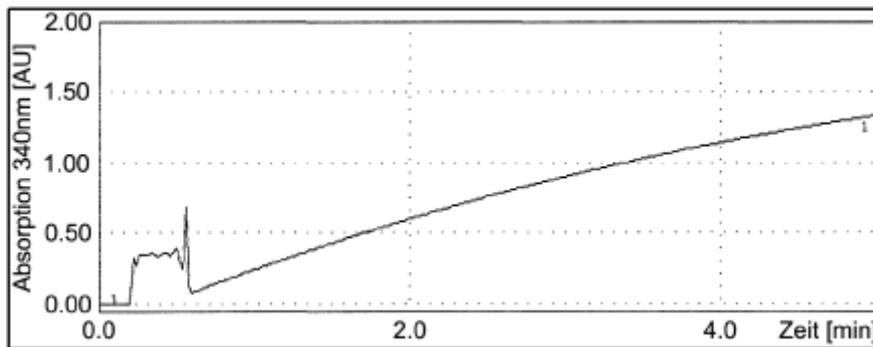


Abbildung 4.6: Aktivität von NMNAT

Absorption bei 340 nm, kontinuierlich gemessen bei 37°C über einen Zeitraum von 5 min. Die im Anfangsbereich (bis ca. 2.5 min) lineare Steigung entspricht 0.35 AU/min. In 720 µl Reaktionslösung befanden sich 10 µmol NMNAT, was etwa 0.04 Enzymeinheiten bedeutet. Eine Enzymeinheit katalysierte die Synthese von 1 µmol NAD⁺ pro Minute unter Standard-Reaktionsbedingungen; ϵ_{340} von NADH: 6.22 cm²M⁻¹ (Balducci *et al.*, 1995).

4.3.2. Nachweis von Selen

Selen in SeMet-NMNAT wurde mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Da das vollständige Protein nicht geeignet war, wurde es vor der Aufnahme des Massenspektrums tryptisch verdaut bevor die Fragmente untersucht wurden (Abbildung 4.7a) (beides durchgeführt von Dr. Eva-Christina Müller, MDC Berlin). Als einziges sichtbares Fragment, welches ein (Seleno-)Methionin enthält, wurde das Peptid Val⁶⁷-Ile-Met-Ala-Glu-Leu-Ala-Thr-Lys⁷⁵ identifiziert und im

Massenspektrum gezielt untersucht (Abbildung 4.7b). Das Fragment ist zweifach geladen (die Maxima sind im Abstand von 0.5 Skaleneinheiten angeordnet, d.h. $z = 2$), daher entspricht das Maxima bei 512 einer Atommasse von 1024 u. Dies ist genau die Atommasse des Peptids für den Fall, dass Selen enthalten ist, während es mit Schwefel 978 u wären. An dieser Stelle ($m/z = 489$) ist jedoch kein nennenswertes Maximum zu sehen. Zumindest für dieses Fragment kann daher angenommen werden, dass Methionin quantitativ durch Selenomethionin ersetzt worden ist.

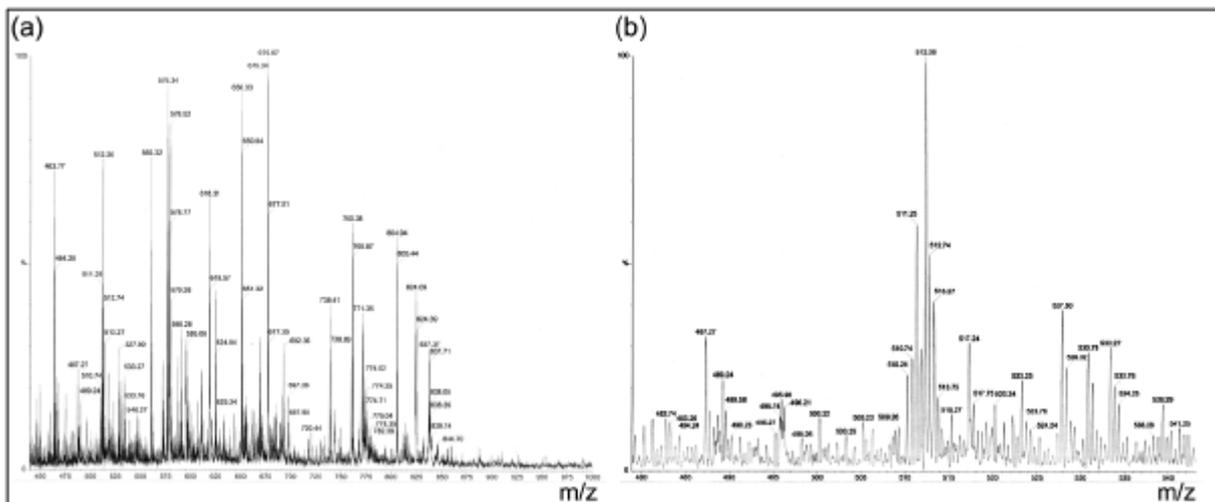


Abbildung 4.7: Massenspektrum von SeMet NMNAT

(a) Massenspektrum der Fragmente nach tryptischem Verdau von SeMet-NMNAT.

(b) Massenspektrum des Fragments Val⁶⁷-Ile-Met-Ala-Glu-Leu-Ala-Thr-Lys⁷⁵.

Weitere Bestätigung dafür, dass das Protein Selen enthält ist das Fluoreszenzspektrum, welches vom Kristall unmittelbar vor der Messung aufgenommen wurde (Abbildung 4.8). Das Absorptionsmaximum von Selen in der realen Umgebung von hNMNAT liegt in diesem Fall bei 0.9795 \AA ($12.3985 / \text{Energie [eV]} = \text{Wellenlänge } \lambda [\text{\AA}]$).

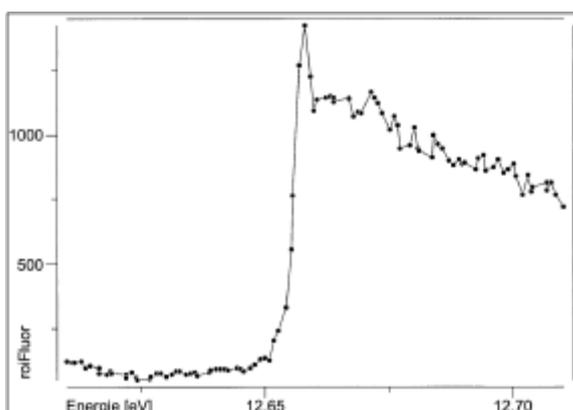


Abbildung 4.8: Fluoreszenzspektrum des Kristalls von SeMet-NMNAT

Aufgenommen an der Strahlführung ID14-4, ESRF, Grenoble.

4.3.3. Kristallisation und Kryoprotektion

Kristalle der vorliegenden humanen NMNAT wachsen in einer Anzahl von Hochsalz-Bedingungen des Hampton-Screens (Jancarik und Kim, 1991), darunter solche mit Li_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ und sogar NaCl . Proteinkristalle mit anderen Präzipitanten, etwa Alkoholen, wurden nicht beobachtet. Die Kristallisationsbedingungen wurden anhand der Diffraktionsqualität (maximale Auflösung und Isotropie, minimale Mosaizität) verfeinert. Die Kristalle, die oft bis zu einem Zentimeter (zumindest in einer Dimension) groß wurden, litten jedoch daran, ineinander zu wachsen und in mindestens einer Dimension sehr dünn zu sein. Das Kristallwachstum konnte vereinzelt werden durch Zugabe von 2-Propanol (3 bis 6 %). Die Größe der Kristalle und die tadellose Morphologie täuschen jedoch darüber hinweg, dass es gerade die dünne Dimension war, in der die Diffraktion die beste Qualität zeigte. Versuche, die Kristallpackung zu regularisieren, etwa durch Equilibrierung über Hoch- oder Niedrigsalz-Lösungen oder durch Einweichen der Kristalle in verschiedenen Kryoprotektantien (Saccharide, Glycerin u.a.), was alles für unterschiedliche Zeiträume ausprobiert wurde, hatten keinen deutlichen und reproduzierbaren Einfluss auf die Diffraktion. Es war vielmehr entscheidend, dass die erwähnte ‚dünne‘ Dimension besser ausgebildet, der Kristall also sozusagen ein reales dreidimensionales Gebilde war (Abbildung 4.9).

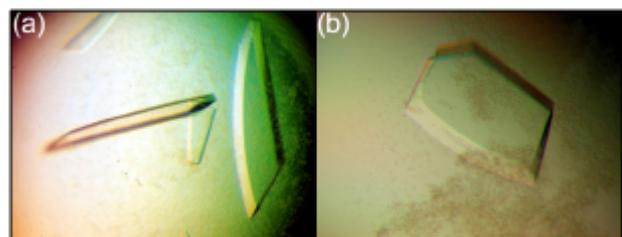


Abbildung 4.9: Kristalle von hNMNAT

(a) Typische flache Scheiben der Größe $1000 \times 300 \times 100 \mu\text{m}$. (b) Kristall der Größe $600 \times 350 \times 200 \mu\text{m}$, besser gewachsen in der dritten Dimension.

Von den etwa 140 getesteten Kristallen erfüllten nur etwa 5 bis 10 % diese Bedingung. Letztendlich wurden sogar alle entscheidenden Datensätze (siehe Kapitel 4.3.4) von ein und demselben Kristall aufgenommen, der zwar relativ klein ($200 \times 75 \times 75 \mu\text{m}$) aber in zwei Dimensionen gleich dick war und offenbar regelmäßiger gewachsen war als die meisten anderen Kristalle und daher die beste Diffraktion zeigte.

4.3.4. Diffraktion

Von besagtem Kristall, der SeMet-NMNAT enthielt, wurde sowohl am DESY, Hamburg (Strahlführung BW7B, feste Wellenlänge) ein kompletter Datensatz aufgenommen (und diese vorläufigen Ergebnisse publiziert (Werner *et al.*, 2002b)) als auch an der ESRF, Grenoble Strahlführung ID14-4. Da die Wellenlänge an letzterer Messstation verstellbar war, wurde ein kompletter MAD-Datensatz aufgenommen, also derselbe Kristallabschnitt (120° in 0.5° -Schritten) bei drei Wellenlängen vermessen. Abbildung 4.10 zeigt exemplarische Diffraktionsmuster beider Messungen, Tabelle 4-2 die Statistik der Datensammlungen.

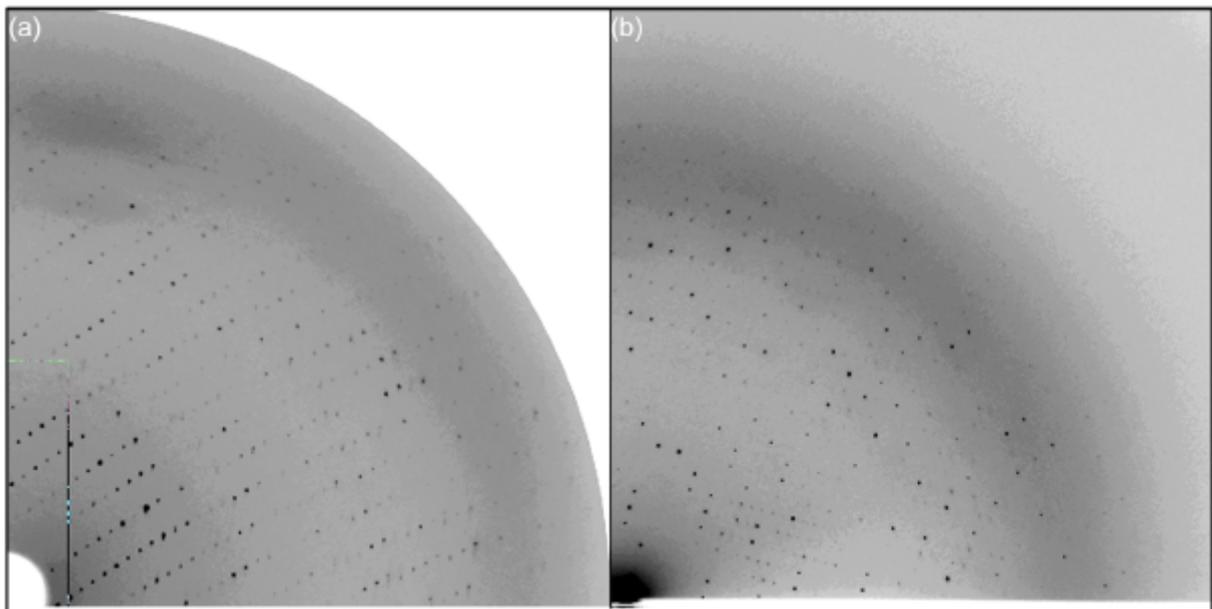


Abbildung 4.10: Diffraktionsmuster des NMNAT Kristalls

(a) DESY, Hamburg, Strahlführung BW7B, MAR345-Detektor. (b) ESRF, Grenoble, Strahlführung ID14-4, CCD-Detektor.

Es fällt auf, dass die Qualität der Diffraktion mit der Dauer der Messung abnimmt (steigende R_{sym} -Werte in Grenoble), was auf Strahlenschäden zurückzuführen ist. Außerdem weichen die Zellparameter um bis zu 0.35 % ab, was darauf zurückzuführen ist, dass der Synchrotronstrahl in Grenoble eine höhere Stärke und Fokussierung hatte als der in Hamburg. Dies wirkt sich wegen veränderter Reflex-Geometrien (auf unterschiedlichen Detektortypen) auf die Datenintegration aus. Allerdings scheinen alle untersuchten Kristalle dieser Art

ein natürliches Diffraktionslimit um die 2.7 bis 3.0 Å zu haben, worüber hinaus keine Reflexe mehr sichtbar sind, d.h. keine höhere Ordnung im Kristall herrscht.

Datensammlung	DESY BW7B	ESRF ID14-4		
Wellenlänge [Å]	0.8453	0.9795 (Peak)	0.9797 (Wendepunkt)	0.9393 (hohe Energie)
Auflösung [Å]	30 – 3.0 (3.03 – 3.00)	20 – 2.9 (3.0 – 2.9)		
Anzahl der beobachteten Reflexe	370484	632186	639155	633992
Anzahl der unabhängigen Reflexe	28373 (852)	62691 (5937)	63149 (6336)	62822 (6276)
Vollständigkeit [%]	94.8 (85.7)	98.3 (92.5)	98.9 (99.0)	99.1 (98.9)
durchschnittliche I/sI	12.8 (1.3)	11.2 (1.1)	12.1 (1.7)	10.5 (1.2)
R_{sym}^* [%]	9.1 (64.1)	7.0 (49.2)	8.3 (72.5)	9.2 (96.5)
Raumgruppe	C222 ₁ (#20, orthorhombisch)			
Zellparameter [Å]	$a = 140.3$ $b = 235.5$ $c = 89.3$	$a = 140.8$ $b = 235.7$ $c = 89.0$		

Tabelle 4-2: Datensammlungsstatistik des SeMet-hNMNAT-Kristalls

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die äußerste Auflösungsschale.

* $R_{sym} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ mit I_i der Intensität der Beobachtung des Reflexes hkl und $\langle I \rangle$ der durchschnittlichen Intensität dieses Reflexes.

4.3.5. Phasenbestimmung und Verfeinerung

Für die Phasenbestimmung wurde das Programm SOLVE benutzt (Terwilliger und Berendzen, 1999). Allerdings ergab die Verwendung der Datensätze aller drei Wellenlängen keine eindeutige Lösung. Das Programm fand zwar bis zu 14 Maxima in der anomalen Differenz-Patterson-Funktion, die jedoch nicht deutlich vom Rauschen abzugrenzen waren und bei unabhängigen Versuchen zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Die daraus resultierende Elektronendichte war nicht im Sinne eines Proteins zu interpretieren. Also wurde statt der MAD Methode (multiple-wavelength anomalous dispersion) die SAD-Methode (single-wavelength anomalous dispersion) angewandt, wofür der Datensatz mit dem größten anomalen Signal, der Peak-Datensatz, benutzt wurde. Da dieses anomale Signal nur bis zu einer maximalen Auflösung von ca. 3.7 Å zufrieden

stellend ausgeprägt war (Korrelation größer als 0.4, Tabelle 4-3) wurde zunächst nur dieser Teil für die Phasenbestimmung benutzt.

D	1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
5.80	0.89	0.77	0.79
4.35	0.72	0.51	0.51
4.06	0.58	0.35	0.40
3.84	0.47	0.26	0.30
3.63	0.36	0.14	0.18
3.48	0.23	0.15	0.16
3.34	0.17	0.10	0.10
3.19	0.11	0.09	0.00
3.05	0.10	0.05	0.04
2.90	0.10	0.04	-0.02
ALL	0.47	0.28	0.31

Tabelle 4-3: Korrelation für Wellenlängenpaare

Die Korrelationswerte geben für die Auflösungsschalen mit der maximalen Auflösung D an, wie groß die anomale Differenz zweier Wellenlängenpaare ist: 1: Peak, 2: Wendepunkt, 3: Hohe Energie.

Es wurden 9 Maxima in der anomalen Differenz-Patterson-Funktion gefunden, die sich auch deutlich vom Rauschen absetzten. Der SOLVE-Qualitätsfaktor Z betrug 26.2 (gegenüber 17.3 mit der MAD-Methode), die durchschnittliche normalisierte Peakhöhe war 1270 (im Vergleich zu 200 mit MAD; 1000 entsprechen 1σ). Da ein Monomer von hNMNAT drei interne Methionine besitzt, deuteten hier schon 9 Selen-Stellen auf ein Trimer in der asymmetrischen Einheit hin. Ein Peak für das N-terminale Methionin konnte hier nicht erwartet werden, und es stellte sich dann auch tatsächlich als nicht geordnet in der Elektronendichte heraus. Außerdem wurde zusätzlich an dieser Stelle zur Dichtemodifikation (solvent flattening) im Programm RESOLVE (Terwilliger, 1999) noch eine Mittelung der Dichte aufgrund der gefundenen dreifachen nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) mit dem Programm DM (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt. Letzteres Programm expandierte auch die Phasen zwischen 3.7 und 2.9 Å, der maximalen hier verwendbaren Auflösung. Daten zwischen 2.9 und 2.7 Å konnten aufgrund ihrer geringen Qualität nicht weiter berücksichtigt werden.

Im Programm ONO (Jones *et al.*, 1991) wurde dann ein Polyalanin-Modell in die resultierende Elektronendichte eingebaut, in der viele Helices und Faltblätter bereits deutlich zu erkennen waren. Aufgrund der Position der Selen, einem direkten Resultat aus SOLVE/RESOLVE, konnte die Richtung und die Sequenz der

Peptidkette konstruiert werden. Entsprechend der bekannten Aminosäureabfolge von humaner NMNAT wurden die Seitenketten entsprechend „mutiert“ und somit das erste Proteinmodell fertig gestellt. Um den Qualitätsverlust durch die Phasenerweiterung zu vermeiden, wurde an dieser Stelle nochmals das Programm SOLVE, diesmal mit allen Reflexen bis 2.9 Å, zur Berechnung der Phasen und Struktur faktoren benutzt. Außerdem wurde auf das Mitteln der Dichte verzichtet, das Programm DM also vollständig ausgespart. Die nichtkristallographische Symmetrie wurde dann jedoch für die Verfeinerung wieder benutzt, um zumindest das Peptid-Rückgrat innerhalb der drei Monomere der asymmetrischen Einheit annähernd konstant zu halten. Aufgrund der doch eher geringen maximalen Auflösung und der damit einher gehenden Unsicherheit bei der Interpretation der Elektronendichte wären größere Unterschiede zwischen den Monomeren nicht zu erklären. Hinzu kommt, dass die Flexibilität der Atompositionen ebenfalls eher hoch ist, was in hohen *B*-Faktoren zum Ausdruck kommt. Zur Verfeinerung wurde neben der sog. maximum-likelihood Methode des Programms REFMAC5 (Collaborative Computational Project, 1994) auch ein sog. simulated-annealing Schritt im Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt. Tabelle 4-4 fasst die Statistik der Verfeinerung zusammen, Abbildung 4.11 gibt den Verlauf der Qualitätsparameter R_{cryst} und R_{free} während der Verfeinerungsschritte an. Es wurden keine Solvens-Moleküle in das Modell aufgenommen, da in der Elektronendichte keine eindeutig zu identifizieren waren.

Strukturbestimmungsmethode	SAD
Anzahl der Monomere pro asymmetrischer Einheit	3
Anzahl der Seleno pro asymmetrischer Einheit	9
Anzahl der Proteinatome (ohne Wasserstoff) pro AU	5478
Anzahl der Ligandenatome (3 NMN, ohne Wasserstoffe) pro AU	66
$R_{\text{cryst}}^{\text{a}}$ [%]	24.6
$R_{\text{free}}^{\text{b}}$ [%]	28.6
r.m.s.d. Bindungslängen [Å]	0.017
r.m.s.d. Bindungswinkel [°]	1.593
durchschnittlicher <i>B</i> -Faktor ^c für alle Atome [Å ²]	53.6
durchschnittliche r.m.s.d. für alle Hauptketten <i>B</i> -Faktoren ^c [Å ²]	1.35
durchschnittliche r.m.s.d. für alle Seitenketten <i>B</i> -Faktoren ^c [Å ²]	4.18

Tabelle 4-4: Verfeinerungsstatistik von hNMNAT

^a $R_{\text{cryst}} = \Sigma |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \Sigma |F_{\text{obs}}|$, ^b berechnet mit 7 % zufällig ausgewählter Reflexe;
^c berechnet mit BAVEAGE (Collaborative Computational Project, 1994)

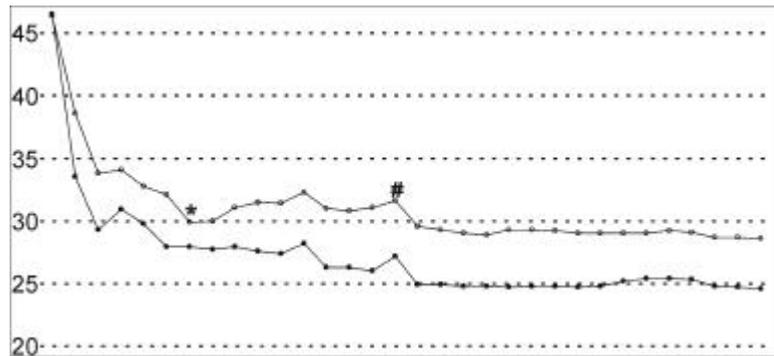


Abbildung 4.11: R_{cryst} und R_{free} im Verlauf der Verfeinerung

R_{cryst} (●) und R_{free} (○) der Verfeinerungsschritte mit Refmac5 in %; (*) zweite Anwendung von SOLVE mit vollständiger Auflösung und ohne anschließende Dichtemittelung; (#) Simulated-annealing Schritt in CNS. Die teilweise steigende Kurve spiegelt die Auffindung eines Gleichgewichtes von strengen Geometrievorgaben und Gewichtung der experimentellen Daten wider.

Die begrenzte Auflösung von maximal 2.9 Å und das relativ schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den äußeren Auflösungsbereichen (Daten von 2.7 bis 2.9 Å wurden sogar gar nicht benutzt) sowie die hohen durchschnittlichen *B*-Faktoren erlauben eine gute Definition der globalen Struktur, machen aber eine detaillierte Diskussion der Feinstruktur schwierig. Der Faltungstyp, das Protein-Rückgrat und viele Seitenketten sind gut definiert, genauso wie Teile des Liganden (siehe unten). Komplet ungeordnet in der Elektronendichte ist die Schleifenregion Ser109 bis Lys146 sowie die Termini (bis einschließlich Glu5 und ab Gln271). Im Ramachandran-Diagramm (Abbildung 4.12), der Verteilung der phi-psi-Winkel für das Peptid-Rückgrat des Proteins, befinden sich 84.9 % der Aminosäuren in den am meisten favorisierten Regionen (rot), weitere 10.2 bzw. 3.9 % in zusätzlich (gelb) bzw. allgemein (beige) „erlaubten“ Regionen. Lediglich 6 Aminosäuren (1.07 %) nehmen „unerlaubte“ phi-psi Winkel(-kombinationen) an (weiße Flächen). Diese lassen sich nur auf Kosten angrenzender Aminosäuren in „erlaubte“ Regionen bringen, so dass zu keinem Zeitpunkt der Verfeinerung alle Aminosäuren in „erlaubten“ Regionen aufzufinden waren.

120°) Abbildung 4.13 (Werner *et al.*, 2002b). Letztendlich konnte erst anhand der Elektronendichte erkannt werden, dass es sich um ein Trimer in der asymmetrischen Einheit handelt, welches durch die kristallographische zweizählige Rotationsachse dasjenige Trimer erzeugt, das die zweite Ebene des biologischen Hexamers bildet (Abbildung 4.14). Die beiden Trimere sind über eine 32 Punktsymmetrie miteinander verbunden, und ihre Elektronendichte grenzt sich deutlich von der der anderen Hexamere im Kristall ab. Wechselwirkungen innerhalb des Hexamers (der Monomere untereinander) sind deutlich ausgeprägter als diejenigen zwischen symmetrieverwandten Hexameren. Genau diese dreizählige Drehachse wurde als nichtkristallographische Symmetrie zunächst bei der ersten Dichtemodifikation, später bei der Verfeinerung benutzt (siehe Kapitel 4.3.5, Seite 30). Allerdings ist die Dreizähligkeit nicht perfekt (also „improper“), die Rotationswinkel zwischen den Monomeren weichen leicht von 120° ab (119.13° zwischen A und B, 121.29° zwischen A und C). Da die Monomere, insbesondere die Seitenketten in der Verfeinerung nicht auf absolute Identität beschränkt wurden, weichen sie auch etwas voneinander ab. Die strukturellen Abweichungen und *B*-Faktor-Verteilungen sind in Abbildung 4.15 zusammengefasst. Die gesamten r.m.s.-Abweichungen zwischen den Monomeren betragen 0.104/0.786 Å (Hauptkette/alle Atome) zwischen Kette A und B, 0.103/0.804 Å zwischen A und C und 0.105/0.693 Å zwischen B und C.

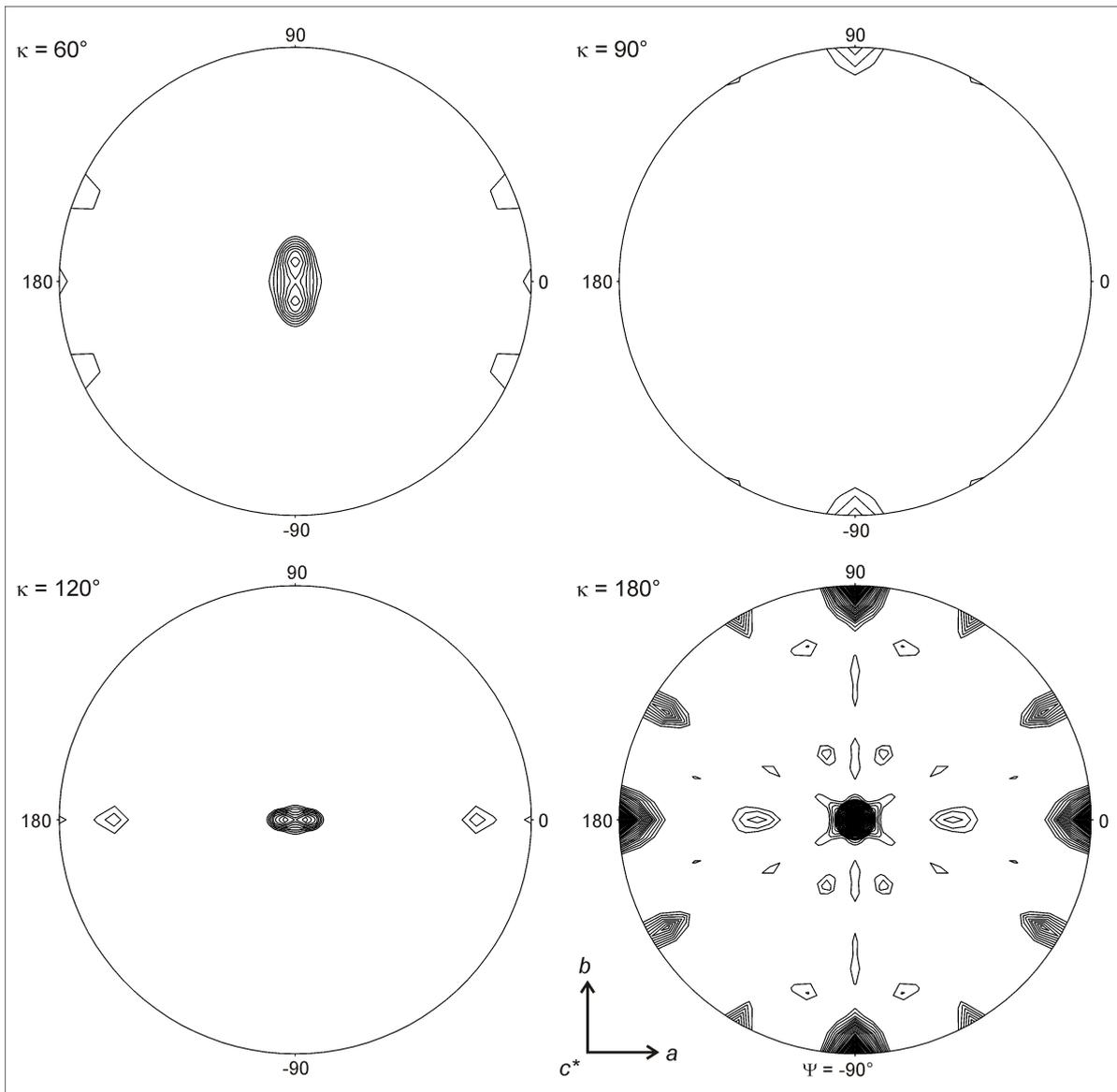


Abbildung 4.13: Selbstrotationsfunktion von hNMNAT

Projektion entlang der c -Achse. Achsen a und b sowie Winkel Ψ wie angezeigt. Der Auflösungsbereich betrug 20 bis 3.5 Å, der Integrationsradius war 25 Å. Hohe Maxima bei $\kappa = 180^\circ$ spiegeln die orthorhombische Kristallsymmetrie wider. Peaks bei anderen κ -Werten deuten auf nichtkristallographische Symmetrien der Art $360/\kappa$ hin, also dreizählige bei $\kappa = 120^\circ$, vierzählige bei $\kappa = 90^\circ$ und sechszählige bei $\kappa = 60^\circ$.

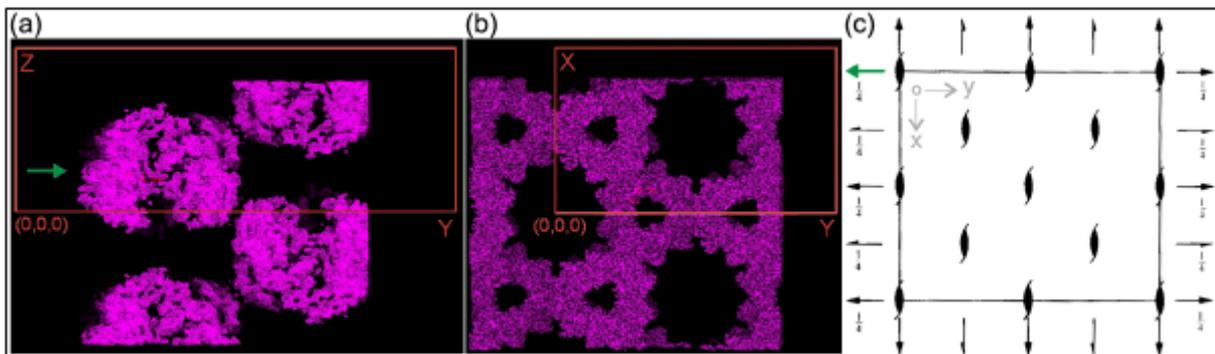


Abbildung 4.14: Elektronendichte im Kristallgitter

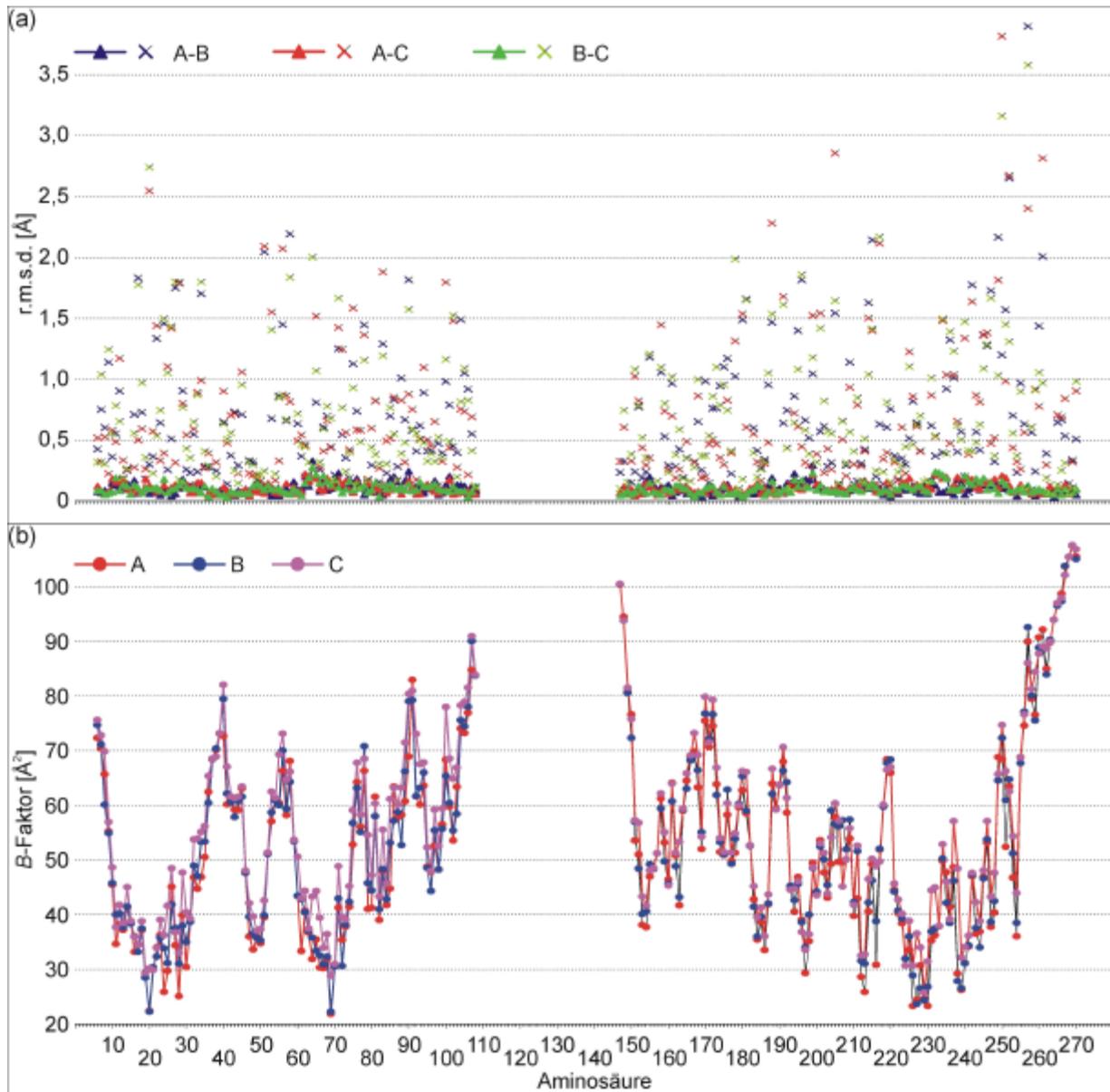


Abbildung 4.15: Strukturelle Abweichungen und *B*-Faktoren der Monomere in der asymmetrischen Einheit

(a) R.m.s.d. nach Überlagerung aller Atome der Monomere A und B (blau), A und C (rot) und B und C (grün), Hauptkettenatome als Dreiecke, Seitenkettenatome als Kreuze; berechnet mit LSQKAB (Collaborative Computational Project, 1994). (b) Durchschnittliche *B*-Faktoren der Aminosäuren, Monomer A in rot, B in blau und C in magenta; berechnet mit BAVRAGE (Collaborative Computational Project, 1994).

zu Abbildung 4.14:

Elektronendichte im Kristallgitter mit Blick in Richtung der X-Achse (a) bzw. Z-Achse (b). Die überlagerte rote Rahmen zeigt die Ränder der Elementarzelle, (0,0,0) bezeichnet deren Ursprung. Der grüne Pfeil (in a und c) kennzeichnet die zweizählige Drehachse (bei $\frac{1}{4}$ Z), die das Trimer der asymmetrischen Einheit mit dem zweiten Trimer des biologischen Hexamer verbindet. (c) Ausschnitt aus den International Tables (Hahn, 1987) mit den Symmetrieelementen dieser Raumgruppe $C22_1$ (#20).

4.3.7. Struktur von hNMNAT

Die Struktur der humanen NMNAT besteht aus einem großen, sechssträngigen parallelen β -Faltblatt (16.3 % der definierten Struktur), welches auf beiden Seiten von insgesamt 11 Helices (39.6 %) umgeben ist, Abbildung 4.16.

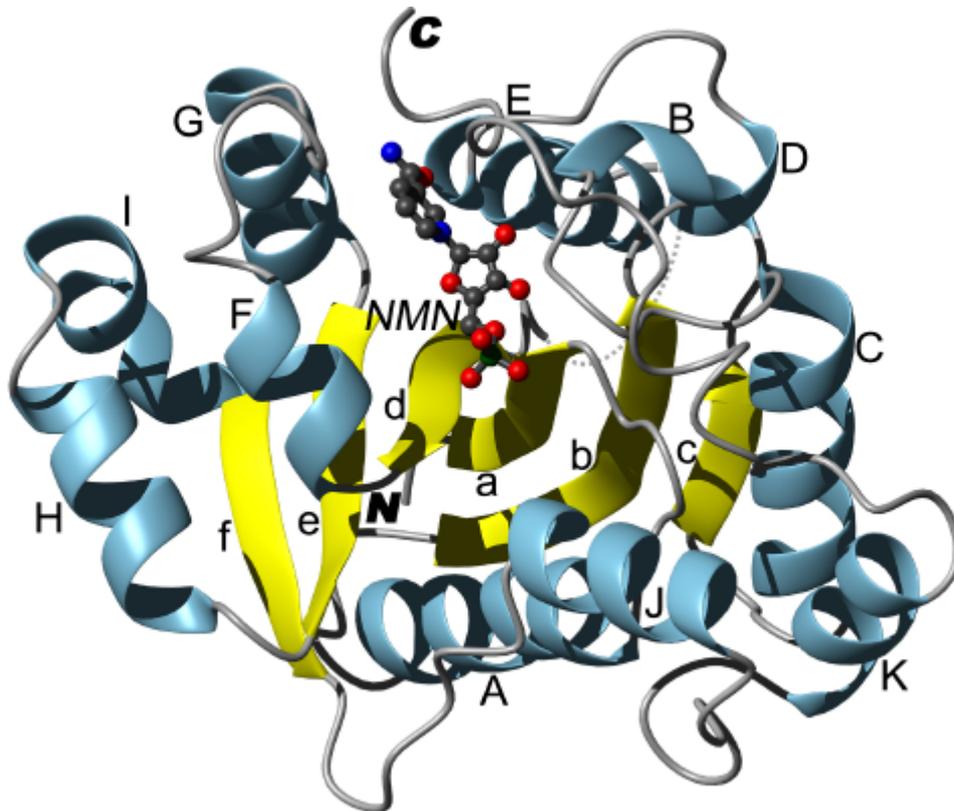


Abbildung 4.16: Struktur der humanen NMNAT im Komplex mit NMN

Schematische Darstellung mit Helices in blau, β -Stränge in gelb. Der Ligand Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) ist in der Kugelstab-Darstellung zu sehen mit den Atomfarben grau für C, blau für N, rot für O und grün für P. Die gepunktete Linie entspricht der fehlenden Schleife (Reste 109 bis 146).

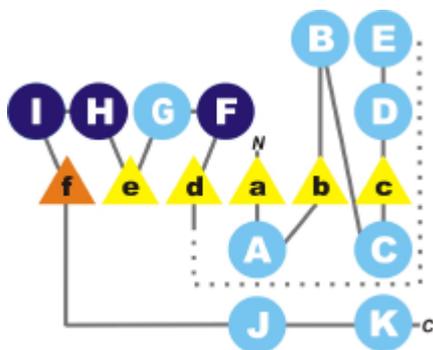


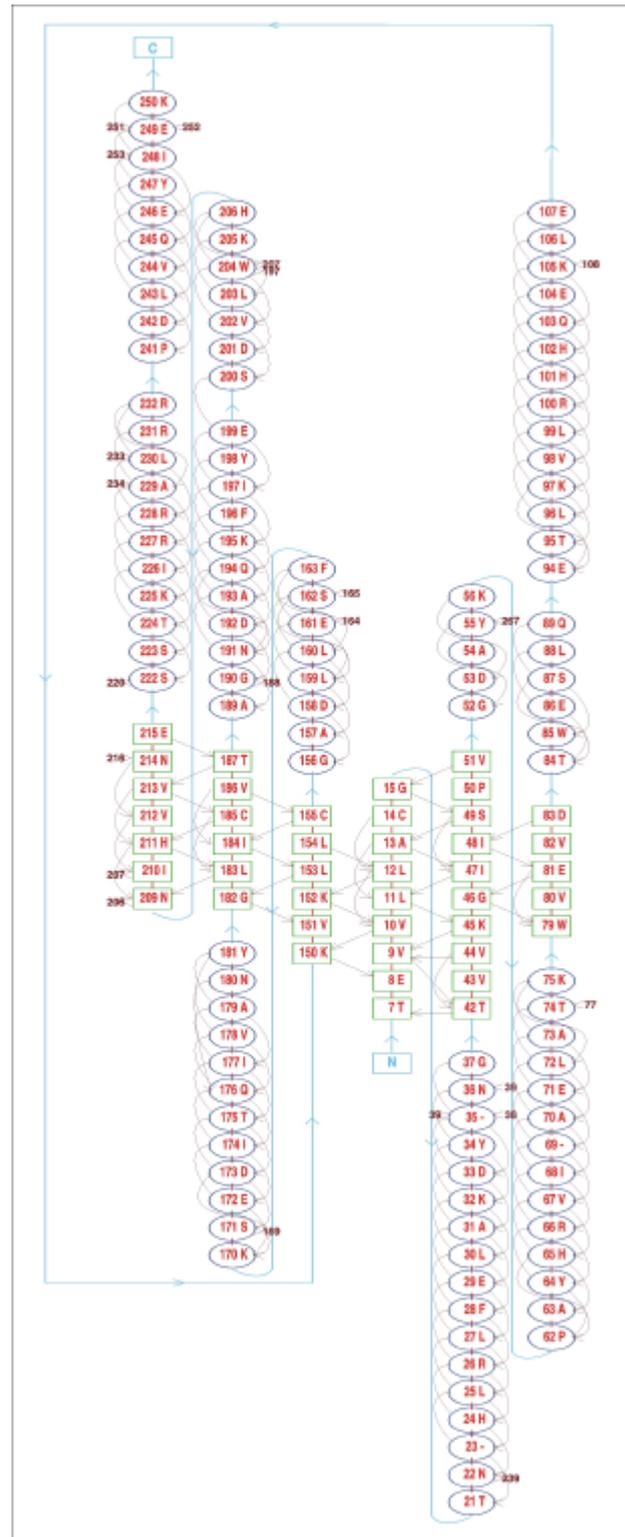
Abbildung 4.17: Topologie-Diagramm von hNMNAT

Kreise repräsentieren Helices, Dreiecke β -Stränge, die gestrichelte Linie die fehlende Schleife.

Abbildung 4.17 zeigt ein Topologie-Diagramm, Abbildung 4.18 ein Schema der Sekundärstrukturelemente.

Abbildung 4.18:
Sekundärstrukturelemente von hNMNAT

Sekundärstruktur-Diagramm des Programms PROMOTIF (Hutchinson und Thornton, 1996). Die Aminosäuren, deren Nummern in grünen Kästen stehen, gehören zu β -Strängen, die in blauen Ellipsen zu Helices. Schwarze Pfeile symbolisieren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den verbundenen Resten, hellblaue Pfeile die Schleifen-Regionen zwischen den Sekundärstrukturelementen (sowie die Laufrichtung der Peptidkette). Gezeigt ist das Diagramm für Monomer A, welches identisch ist mit dem für die anderen Monomere B und C.



4.3.8. Vergleich mit anderen Strukturen von humaner NMNAT

Die fast zeitgleich publizierten Strukturen der humanen NMNAT wurden unabhängig von der hier beschriebenen Struktur mit Hilfe von Schweratomderivaten bestimmt. Von Prof. Menico Rizzi (Pavia, Italien) und Prof. Hong Zhang (Dallas, USA) wurden dankens-werterweise die Koordinaten ihrer Strukturen zur Verfügung gestellt, bevor sie in der Protein-Datenbank (Berman *et al.*,

2000) zugänglich werden. Tabelle 4-6 fasst Details und statistische Werte der humanen NMNAT-Strukturen zusammen. Alle drei Autoren hatten Kristalle unterschiedlicher Raumgruppen und finden eine unterschiedliche Anzahl von Monomeren in der asymmetrischen Einheit. Dennoch ist in allen Fällen ein Hexamer sichtbar, das folglich als die biologische Einheit von hNMNAT angesehen werden kann (siehe auch Kapitel 4.3.6, Seite 34). Eine detaillierte Diskussion der

Protein-Protein-Kontakte ist in Kapitel 4.3.11, Seite 51 zu finden. Zudem gehen die Strukturen auf unterschiedliche Protein-Konstrukte zurück, und unterschiedliche Liganden sind sichtbar. Während in dieser Arbeit und von Zhou *et al.* (2002) ein (unterschiedlicher) His-tag benutzt wurde, haben Garavaglia *et al.* (2001) das Protein der nativen Sequenz benutzt. Es ist auffällig, dass je mehr C-terminale Reste in der Elektronendichte sichtbar sind, umso größer der gebundene Ligand ist. Offenbar hat die Ligandenbindung einen ordnenden Effekt auf den C-Terminus, der möglicherweise als eine Art Deckel auf der Bindungstasche dient (siehe die Diskussion in Kapitel 4.3.12, ab Seite 55).

	1gzu	1kku	1kqn	1kqo	1kr2
<i>Referenz</i>	(Werner <i>et al.</i> , 2002a)	(Garavaglia <i>et al.</i> , 2001)	(Zhou <i>et al.</i> , 2002)		
<i>Methode</i>	SAD (SeMet)	SIR (Hg)	MAD (SeMet)		
<i>Ligand</i>	NMN	--	NAD	NaAD	TAD
<i>Auflösung[Å]</i>	20 – 2.9	50 - 2.5	20 – 2.2	20 – 2.5	20 – 2.25
<i>Raumgruppe</i>	C222 ₁	P6 ₃ 22	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
<i>Monomere pro AU</i>	3	1	6	6	6
<i>Biologische Einheit</i>	Hexamer	Hexamer	Hexamer	Hexamer	Hexamer
<i>R_{sym} [%]</i>	7.0	7.5	8.0	7.0	4.3
<i>Vollständigkeit [%]</i>	98.3	99.8	91.8	95.9	98.7
<i>R_{cryst} [%]</i>	24.6	23.4	21.8	21.0	20.4
<i>R_{free} [%]</i>	28.6	28.6	25.0	24.6	23.2
<i>r.m.s.d. Bindungslängen [Å]</i>	0.017	0.018	0.014	0.012	0.014
<i>r.m.s.d Bindungswinkel [°]</i>	1.59	2.00	1.60	1.53	1.70
<i>Anzahl der Proteinatome (non H) pro AU</i>	5478	1750	11166	11125	11166
<i>Durchschnittlicher B-Faktor (alle Atome)* [Å²]</i>	53.7	58.6	38.9	51.0	38.2
<i>Anzahl der Solvensmoleküle</i>	0	58	747	481	627

Tabelle 4-6: Vergleich der Strukturen von humaner NMNAT

* Berechnet mit BAVEGAGE (Collaborative Computational Project, 1994)

Abbildung 4.19 fasst zusammen, welche Reste in den Strukturen sichtbar sind. Hier ist bemerkenswert, dass ein Schleife (die Reste Leu109 bis Lys146) mit geringen Abweichungen an den Rändern in keiner Struktur sichtbar war. Diese Region, die in archaealen und bakteriellen NMNATs gar nicht vorhanden ist (siehe Kapitel 4.3.9, Seite 45), enthält eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS; Pro123 bis Trp129 (Schweiger *et al.*, 2001)) und befindet sich an der Außenseite des biologischen Hexamers (Abbildung 4.28, Seite 52), ist also flexibel und gut zugänglich. Dies wird von der Beobachtung gestützt, dass Trypsin hNMNAT vorzugsweise an der Position Lys146 schneidet (M. Ziegler, persönliche Kommunikation).

#	5	108-147	217	258
	*	*****	*	*****
1gzua	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPL-----	
1gzub	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPL-----	
1gzuc	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPL-----	
1kku	EKT...EASD-----	V...WFA...	E-----	
1kqnA	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqnB	-KT...E-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqnC	-KT...E-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqnD	-KT...E-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqnE	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqnF	-KT...E-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoA	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoB	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoC	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoD	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoE	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kqoF	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2A	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2B	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2C	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2D	EKT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2E	-KT...EA-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	
1kr2F	-KT...E-----	AV...WIA...	ESEDRNAGVILAPLQRNTA	

Abbildung 4.19: Sequenzen der Proteinketten aller hNMNAT Strukturen

Die Namen der Proteinketten stehen in der ersten Spalte, identische Aminosäuren sind durch schwarze Buchstaben oder Punkte gekennzeichnet, unterschiedliche durch rote Buchstaben, Sterne und Nummern. Interpretierbare Elektronendichte gab es am N-Terminus ab Rest 5 oder 6, am C-Terminus bis Rest 257 (1kku), 270 (1gzu) oder 275 (1kqn, 1kqo, 1kr2). Die Schleife 109 bis 147 ist an den Rändern mal mehr, mal weniger sichtbar. Ile217 ist in 1kku zu einem Phenylalanin mutiert, einem SNP entsprechend (Schweiger *et al.*, 2001).

Ein Strukturvergleich aller humanen NMNAT (Abbildung 4.20) zeigt Übereinstimmung für den Großteil des Proteins mit einigen wenigen aber wichtigen Unterschieden. Neben den Termini (auch der der fehlenden Schleife) sind dies die Regionen 51 bis 60 (Schleife zwischen Helices **B** und **C**) und 156 bis 172 (Helices **F** und **G**). Während im Apoenzym (1kku) diese beiden Abschnitte weiter voneinander entfernt sind als in den Strukturen mit Liganden, sind die anderen Strukturen hier quasi identisch. Dies gilt auch für die Lage der Aminosäure-Seitenketten, insbesondere im Bereich des NMN aber auch mit etwas weniger stringenter Übereinstimmung im Bereich des AMP. Beide unterschiedliche Regionen enthalten wichtige Reste für die Ligandenbindung (Trp169 und Lys57) und erscheinen im Apoenzym in einer „geöffneten“ Konformation. Eine ausführliche Diskussion der Ligandenbindung befindet sich im Kapitel 4.3.12, Seite 55.

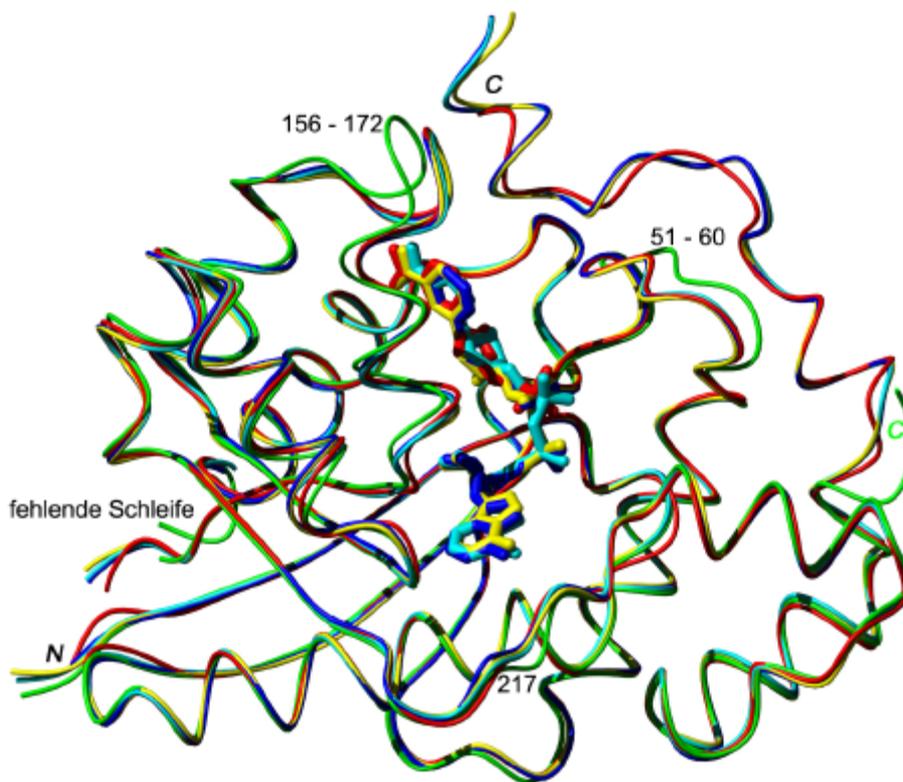


Abbildung 4.20: Strukturvergleich humaner NMNATs

Bänder-Darstellung der Strukturen aller humanen NMNATs nach struktureller Überlagerung. 1gzu_A/NMN in rot, 1kku (Apoenzym) in grün, 1kqn_A/NAD⁺ in blau, 1kqo_A/NaAD⁺ in gelb, 1kr2_A/TAD in cyan. Die jeweiligen Liganden sind mit ihren Bindungen gezeigt, die Zahlen beziehen sich auf die Nummern der Aminosäure-Reste.

R.m.s.-Abweichungen der humanen Strukturen sind zusammen mit einem Verlauf der *B*-Faktoren in Abbildung 4.21 zu sehen. Die r.m.s.-Abweichungen nach dem strukturellen Überlagerung aller Atome (Programm LSQKAB (Collaborative Computational Project, 1994)) liegen für 1gzu im Bereich 1.3 bis 1.5 Å (1gzu-1kku: 1.5 Å; 1gzu-1kqn/1kqo/1kr2: 1.3 – 1.4 Å). 1kku überlagert mit allen Proteinketten mit einem r.m.s.d. von 1.2 bis 1.5 Å während alle Proteinketten von 1kqn, 1kqo und 1kr2 untereinander keine r.m.s.d. größer als 0.8 Å besitzen. Die oben schon angesprochenen Unterschiede zwischen Apoenzym und Enzymen mit Ligand spiegeln sich auch in diesen Kurven wieder. Sie zeichnen sich durch eine erhöhte positionelle Flexibilität aus, was erhöhte *B*-Faktoren zur Folge hat. Strukturell sehr ähnlich, jedoch auch mit erhöhter Flexibilität sind drei weitere Bereiche, die alle funktionelle Bedeutung haben. Zum einen gehören neben den bereits besprochenen Regionen die Reste 85 bis 100 zur Ligandenbindungstasche, zum anderen findet sich erhöhte Flexibilität in den Bereichen um die Helix **A** (Reste 25 bis 40) und die Helices **G**, **I** und **H** (um die Reste 200 bzw. 220). Beide sind an Protein-Protein-Kontakten und somit an der Oligomerisierung von hNMNAT beteiligt.

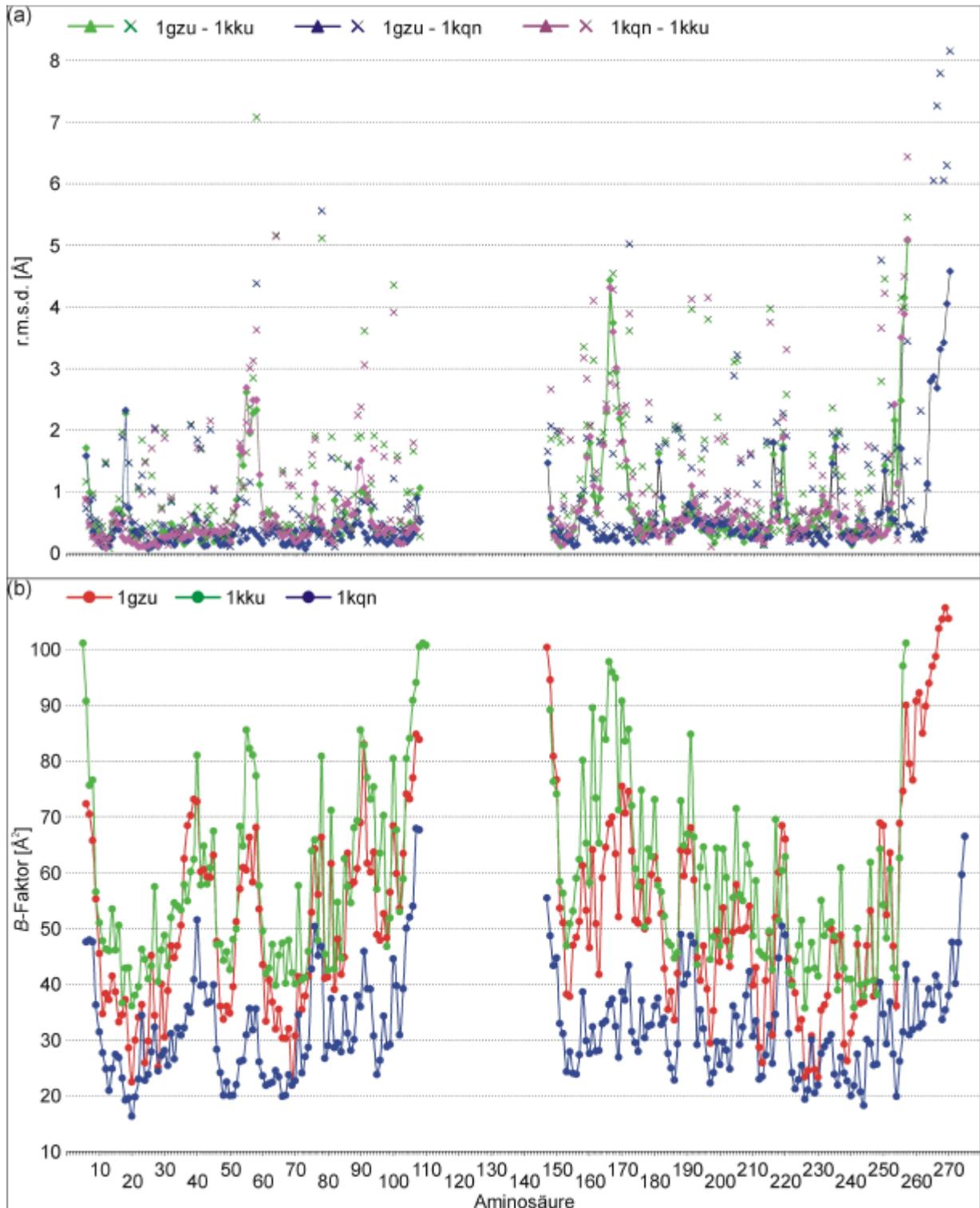


Abbildung 4.21: R.m.s.-Abweichung und B-Faktoren der humanen NMNAT-Strukturen

(a) R.m.s.d. nach optimierter Überlagerung aller Atome. Proteinketten 1gzu_A und 1kku (grün), 1gzu_A und 1kqn_A (blau) und 1kqn_A und 1kku (magenta), Hauptkettenatome als Dreiecke, Seitenkettenatome als Kreuze; berechnet mit LSQKAB (Collaborative Computational Project, 1994). (b) Durchschnittliche B-Faktoren der Aminosäuren, 1gzu_A rot, 1kku in grün und 1kqn_A in blau; berechnet mit BAVRAGE (Collaborative Computational Project, 1994).

4.3.9. Vergleich mit Strukturen von NMNAT anderer Spezies

Neben den insgesamt fünf humanen NMNAT-Strukturen sind weitere sieben von anderen Spezies gelöst und publiziert. Am längsten bekannt sind die archaealen Strukturen von NMNAT aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* im Komplex mit NAD⁺ bzw. ATP (PDB-Codes 1ej2 bzw. 1hyb (Christendat *et al.*, 2000; Saridakis *et al.*, 2001)) und von NMNAT aus *Methanococcus jannaschii* im Komplex mit NMN (PDB-Code 1f9a (D'Angelo *et al.*, 2000)). Ihre Sequenzen (55 % Identität) und Strukturen (r.m.s.d. jeweils 1.02 Å) sind untereinander sehr ähnlich, sie zeigen jedoch nur geringe Sequenzidentität zur humanen NMNAT, 15.5 % von *M. jannaschii* NMNAT, 15.4 % von *M. thermoautotrophicum* NMNAT (Werner *et al.*, 2002b). Dennoch wird bei einer strukturellen Überlagerung (Abbildung 4.22) sichtbar, dass eine Kernregion den gleichen Faltungstyp einnimmt. Die humane Struktur (1gz0) kann mit den NMNATs aus Archaea mit einem r.m.s.d. zwischen 1.55 und 1.65 Å überlagert werden (C α -Atome).

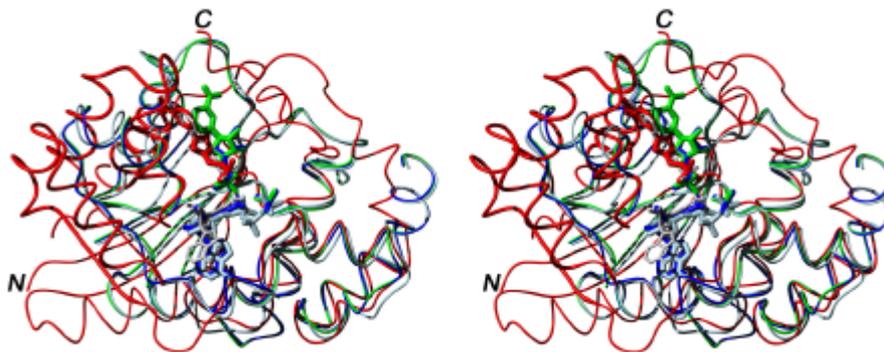


Abbildung 4.22: Strukturelle Überlagerung von humaner NMNAT und NMNATs von Archaea

Stereo-Bänder-Darstellung der Protein-Rückgrate von humaner NMNAT (1gz0, rot, mit NMN) und NMNAT von *M. thermoautotrophicum* (1ej0, blau, mit NAD⁺; 1hyb grün, mit NMN) und *M. jannaschii* (1f9a, hellblau, mit ATP) nach struktureller Überlagerung. Die im humanen Enzym zusätzlichen Sekundärstrukturelemente sind mit erhöhtem Radius dargestellt. Die archaealen NMNATs untereinander überlagern mit sehr geringen Abweichungen, der NMN-Teil der Liganden ist im Vergleich zum humanen Enzym verdreht.

Im Vergleich zu NMNAT von *M. thermoautotrophicum* besitzt das humane Enzym etwa 50 % mehr Reste, die neben der Schleife Leu106 - Lys146 für die zusätzlichen Sekundärstrukturelemente sorgen, die in Abbildung 4.23b in dunkler Farbe dargestellt sind: dunkelblau für die Helices **F**, **H** und **I**; orange für den Strang **f**. Ein Sequenzvergleich mit MSA (Gupta *et al.*, 1995), welches optimal in

Bezug auf die Scoring-Funktion ist („sum-of-pairs“-Überlagerung), ist in Abbildung 4.24 zu sehen. Obwohl die Sequenzähnlichkeit gering ist, überlagern viele Sekundärstrukturelemente, insbesondere in den terminalen Bereichen. Helix **G**, welche in der Nähe einiger Aminosäuren liegt, die wichtig für die Ligandenbindung sind oder sie enthält, überlagert mit Helix **a3**. Die strukturelle Überlagerung (Abbildung 4.22) zeigt jedoch, dass Helix **E** das Äquivalent zu dieser Helix **a3** ist. Dies und die Tatsache, dass NMN im humanen Enzym im Vergleich zu den Liganden in den archaealen NMNATs verdreht ist (Abbildung 4.22 und Abbildung 4.33, Seite 60) zeigt, dass die Art der Ligandenbindung im humanen und im archaealen NMNAT unterschiedlich ist. Helix **G**, die zusammen mit Helix **F** die *M. thermoautotrophicum* Helix **a4** ersetzt, liegt auf der anderen Seite des gabelartigen strukturellen Elements (Helices **G** und **E** in hNMNAT), das an der Ligandenbindung beteiligt ist. Die zusätzlichen Sekundärstrukturelemente sind auch verantwortlich für ein unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten, welches in Kapitel 4.3.11, Seite 51 diskutiert wird. Archaeale NMNATs liegen ebenfalls als Hexamere vor.

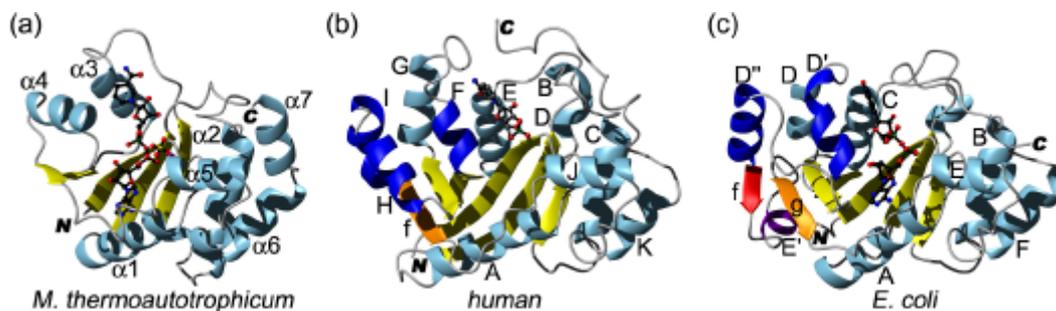


Abbildung 4.23: Sekundärstrukturelemente von NMNATs verschiedener Spezies

Schematische Darstellung der NMNAT-Strukturen von *M. thermoautotrophicum*/NAD⁺ (a, 1ej2), *H. sapiens*/NMN (b, 1gz_A) und *E. coli*/NaAD⁺ (c, 1k4m_A). Sekundärstrukturelemente, die im Vergleich zu den anderen Strukturen zusätzlich sind, sind farblich abgesetzt. C- und N-Termini sind durch fette kursive Buchstaben gekennzeichnet. Die Benennungen der Sekundärstrukturelemente entspricht denjenigen aus den Originalpublikationen.

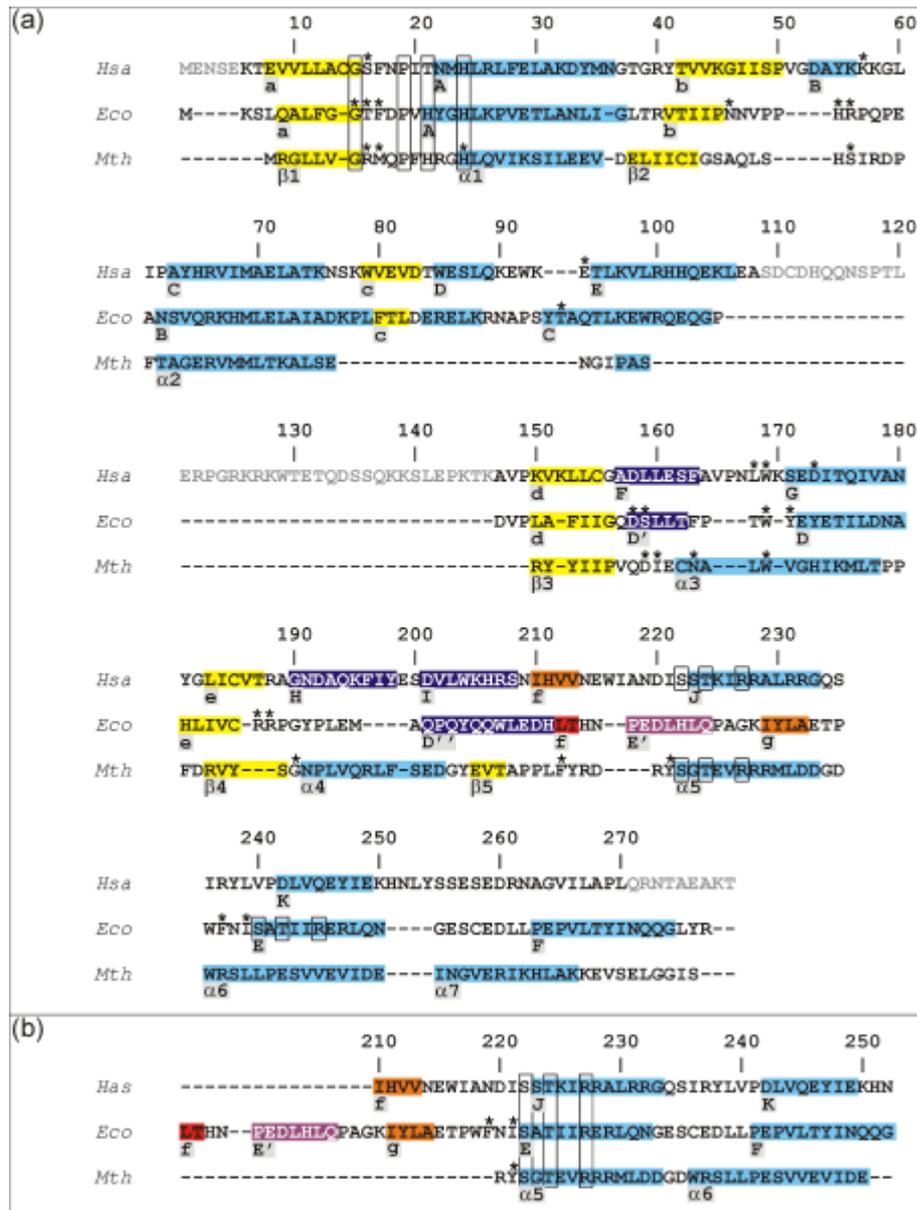


Abbildung 4.24: Sequenzüberlagerung von NMNATs und Sekundärstrukturelemente

(a) MSA-Sequenzüberlagerung von NMNAT aus *H. sapiens* (Hsa), *E. coli* (Eco) und *M. thermoautotrophicum* (Mth). Die Überlagerung wurde in zwei unabhängigen Schritten durchgeführt, jeweils vor und nach der Schleife, die nur in der humanen Sequenz vorhanden ist (109 bis 146). Überlagert wurden die Sequenzen 1-105 (Hsa) mit 1-98 (Eco) und 1-68 (Mth) sowie 147-279 (Hsa) mit 99-213 (Eco) und 69-178 (Mth). Die Aminosäure-Buchstaben wurden mit farbigen Kästen hinterlegt, die den Sekundärstrukturelementen entsprechen (gelb, orange und rot für β -Stränge, hellblau, dunkelblau und violett für Helices; Farbcode entsprechend Abbildung 4.23). Reste, die an der Ligandenbindung beteiligt sind, sind durch Sterne gekennzeichnet, die konservierten Reste der GXXPX(H/T)XXH- und SXTXXR-Motive sind mit schwarzen Rahmen umgeben. Die Nummerierung bezieht sich auf die humane Sequenz. (b) Vorschlag für eine strukturbasierte Sequenzüberlagerung des C-terminalen Bereiches. Hier werden Helix *E'* und Strang *f* von *E. coli* NMNAT als Insertion berücksichtigt.

Ebenfalls in Abbildung 4.24 enthalten ist die MSA-Überlagerung der humanen NMNAT-Sequenz mit der von *E. coli*. Mit 20.1 % Sequenzidentität ist die Ähnlichkeit zwar größer als die zu den Archaea-Sequenzen, jedoch immer noch gering. Dennoch sind die Übereinstimmungen deutliche größer als die mit der Sequenz von *M. thermoautotrophicum*. Die Helices **E**, **F**, **G** und **I** der humanen NMNAT (hNMNAT) entsprechen den Helices **C**, **D'**, **D** bzw. **D''** des *E. coli* Proteins (eNMNAT). Die „humane“ Helix **H** hat keine Entsprechung in *E. coli*. Unterschiede deuten sich jedoch im Bereich der Helix **E'** und Stränge **f** und **g** des *E. coli* Proteins an. So wird nach der strukturellen Überlagerung (Abbildung 4.24) klar, dass der humane Strang **f** von hNMNAT dem Strang **g** von eNMNAT entspricht und der Strang **f** von eNMNAT zusammen mit der Helix **E'** als zusätzliche Sekundärstrukturelemente angesehen werden können. Dies ist in Abbildung 4.24 (b) reflektiert, wo diese Insertion berücksichtigt ist. Erst dann überlagern auch die konservierten Aminosäuren des SXTXXR-Motifs (Helices **J** (Hsa), **E** (Eco) und **a5** (Mth)). Die Struktur der *E. coli* NMNAT wurde kürzlich als Apoenzym und im Komplex mit Deamido-NAD (NaAD⁺) publiziert (PDB-Codes 1k4k bzw. 1k4m (Zhang *et al.*, 2002)), die Koordinaten dankenswerterweise von Prof. Hong Zhang zur Verfügung gestellt.

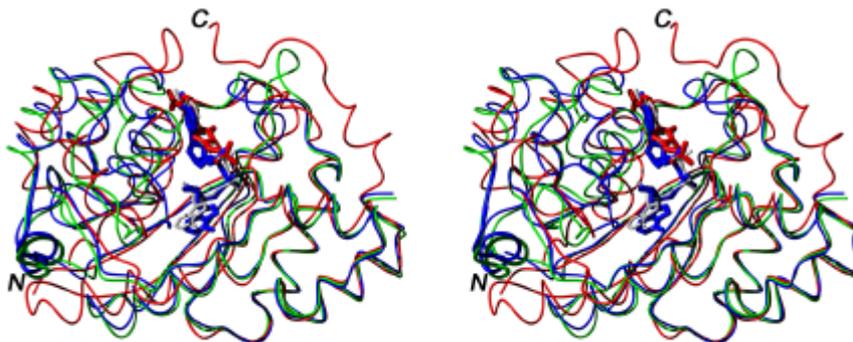


Abbildung 4.25: Strukturelle Überlagerung von humaner und *E. coli* NMNAT

Stereo-Bänder-Darstellung der Proteinrückgrate von humaner NMNAT (1gzu, rot, mit NMN) und NMNAT von *E. coli* (1k4m, blau, mit NaAD⁺; 1k4k, grün, Apoenzym) nach struktureller Überlagerung. Die im *E. coli* Protein zusätzlichen Sekundärstrukturelemente sind mit erhöhtem Radius dargestellt. NAD⁺ aus 1kqn ist ebenfalls gezeigt (hellgrau).

Humane NMNAT (1gzu) und *E. coli* NMNAT (1k4m mit NaAD⁺ und 1k4k ohne Ligand) lassen sich mit einer r.m.s. Abweichung von jeweils 1.34 Å (C α -Atome) überlagern, während 1k4k und 1k4m untereinander eine Abweichung von 1.98 Å

besitzen (alle Atome, berechnet mit LSQKAB (Collaborative Computational Project, 1994)).

Hatten die zusätzlichen Sekundärstrukturelemente von humaner NMNAT gegenüber den Proteinen aus Archaea eine unterschiedliche Art der Hexamerisierung zur Folge, so führt die weitere Insertion in *E. coli* offenbar dazu, dass kein Hexamer mehr ausgebildet werden kann (siehe Kapitel 4.3.11, Seite 51). NMNAT von *E. coli* wird demzufolge als Monomer beschrieben (Zhang *et al.*, 2002). Auch NMNAT von *B. subtilis* bildet kein Hexamer. Das Protein besitzt ein sechssträngiges β -Faltblatt sowie weitere sechs Helices und scheint eher Ähnlichkeit mit dem humanen Enzym zu haben. Beschrieben wird jedoch ein Dimer als funktionelle Einheit (Olland *et al.*, 2001). Ein detaillierte Vergleich ist zur Zeit jedoch nicht möglich, da die Koordinaten der *B. subtilis* NMNAT noch nicht zugänglich sind (PDB-Codes 1kam und 1kaq).

Alle Sequenzidentitäten wurden berechnet mit dem Programm ALIGN (GeneStream Server), die r.m.s.-Abweichungen in diesem Kapitel beziehen sich auf eine Überlagerung der C α -Atome, durchgeführt im SwissPDB Viewer (Guex and Peitsch, 1997), wenn nicht anders angegeben.

4.3.10. Superfamilie, Rossmann-Faltungstyp

In einer DALI-Suche (Holm und Sander, 1993) nach strukturellen Verwandten ergab für die hier präsentierte humane NMNAT die Phosphopantethein Adenylyltransferase (PPAT, PDB-Code 1b6t) (Izard und Geerlof, 1990) den höchsten Z-Score von 14.3. Die Strukturen lassen sich mit einer r.m.s.-Abweichung von 2.4 Å überlagern, haben jedoch lediglich eine Sequenzidentität von 19 %. Erstaunlicherweise ist die strukturelle Übereinstimmung mit PPAT größer als die mit NMNAT von *M. jannaschii* (Z-Score 12.0, r.m.s.d. 3.0 Å, Sequenzidentität 17 %; DALI Output). Weitere ähnliche Strukturen sind die CTP:Glycerol-3-phosphat Cytidylyltransferase (PDB-Code 1coz (Weber *et al.*, 1999); Z 8.5, 2.6 Å, 22 %), die ATP-Sulfonylase (1g8f (Ullrich *et al.*, 2001; Ullrich und Huber, 2001); Z 7.9, 3.3 Å, 19 %), die Pantothenat-Synthetase (1iho (von Delft *et al.*, 2001); Z 5.9, 4.9 Å, 13 %) und die Glutaminyl-tRNA-Synthetase (1gtr (Rould *et al.*, 1991); Z 5.5, 3.7 Å, 7 %). All diese Strukturen

haben einen strukturellen Kern gemeinsam, der aus einem fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt der Form 5-4-1-2-3 sowie Helices auf beiden Seiten des Faltblattes besteht. Es handelt sich um den Kernbereich des klassischen Nukleotid-bindenden Rossmann-Faltungstyps (Rossmann *et al.*, 1974), Abbildung 4.26.

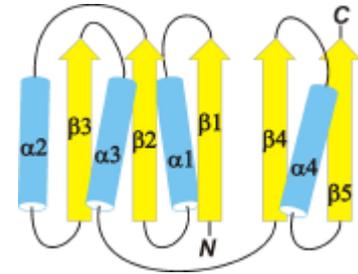


Abbildung 4.26: Kernbereich des Rossmann-Faltungstyps

Kernbereich des Rossmann-Faltungstyps. α -Helices sind als Zylinder dargestellt, β -Stränge als Pfeile.

NMNAT kann somit als Mitglied der Nukleotidyltransferase-Superfamilie von α/β -Phosphodiesterasen angesehen werden, die von Izard und Geelof vorgeschlagen wurde (Izard und Geelof, 1990). Die verwandte SCOP-Superfamilie ist die Nukleotidyltransferase-Superfamilie (Murzin *et al.*, 1995). Alle oben genannten Proteine (Abbildung 4.27) sind Mitglieder dieser Superfamilie.

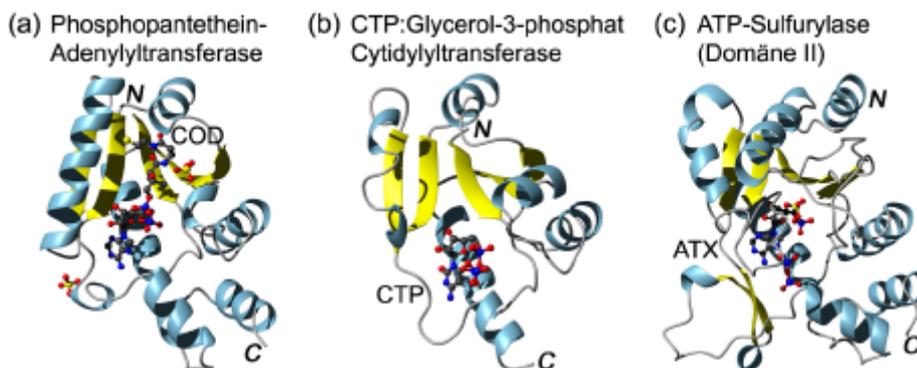


Abbildung 4.27: Mitglieder der Nukleotidyltransferase-Superfamilie

Schematische Darstellung der Proteine mit Helices in blau und Strängen in gelb. Die jeweiligen Liganden sind in der Kugelstab-Repräsentation dargestellt. Für die ATP-Sulfurylase ist der Komplex mit Adenosin-5'-Phosphosulfat (ADX), PDB-Code 1g8h gezeigt. COD: Deamino-CoA; CTP: Cytidin-5'-Triphosphat.

Sie alle katalysieren die Bildung einer Phosphodiester-Bindung durch einen nukleophilen Angriff an das α -Phosphat eines Nukleotid-Triphosphates (NTP). Unter Freigabe von Pyrophosphat PP_i wird dabei das Nukleotid-Monophosphat (NMP) auf einen variablen Rest übertragen, Nicotinamid-Monophosphat (NMN) im Falle der NMNATs, Phosphopantethein bei PPAT, Glycerol-3-phosphat im Falle der Cytidylyltransferase, anorganisches Sulfat für die Sulfurylase oder eine Aminosäure bei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Die Übertragung des NMP dient teilweise zur Aktivierung des Restes. Dabei befindet sich das α -Phosphat

generell in der Nähe der C-Termini der Stränge $\beta 1$ und $\beta 4$, das Faltblatt spaltet die Ligandenbindungstasche an der Reaktions-Stelle (siehe auch Abbildung 4.34, Seite 61).

4.3.11. Oligomerisierung, Protein-Protein-Kontakte

Die biologische Einheit von humaner NMNAT ist ein Hexamer, Abbildung 4.28 (siehe auch Kapitel 4.3.6, Seite 34). Die in der Struktur fehlende Schleife (Reste 109 bis 146) befindet sich auf der Außenseite des Hexamers, was die Zugängigkeit der Kern-Transportmaschinerie zur nukleären Lokalisations-Sequenz (NLS) sicherstellt. Die Ligandenbindungstaschen sind zum jeweils oberen inneren Rand des „Donut“-förmigen Hexamers geöffnet. Die Monomere A, B und C bilden den oberen Ring, die Monomere D, E und F den unteren Ring. Die Trimere sind über eine zweizählige Drehachse miteinander verbunden, die parallel zur Trimer-Ebene verläuft. Gleichzeitig sind die Trimere hinsichtlich der dazu senkrechten, nichtkristallographischen dreizähligen Achse gegeneinander verdreht. Dies ist auch der augenfälligste Unterschied, der zum Hexamer von NMNAT aus *M. thermoautotrophicum* besteht (Abbildung 4.28 (c)). Hier liegen die Untereinheiten der jeweiligen Trimer-Ebenen exakt übereinander. Außerdem zeigt das zentrale β -Faltblatt in Richtung des Hexamer-Zentrums und bildet eine Art Super-Sekundärstruktur mit dem Faltblatt der darunter liegenden Untereinheit. Die β -Stränge **b3** (die den humanen Strängen **d** entsprechen) der Untereinheiten A und E (bzw. B und D sowie C und F) treffen dabei in einer parallelen Anordnung aufeinander. Ganz anders im humanen Hexamer. Die Monomere sind im Vergleich zum archaealen Hexamer verdreht, so dass das β -Faltblatt eher seitwärts gerichtet ist. Es kommt zu einer extensiven Überlappung mit dem nächsten Monomer des Trimers der zweiten Ebene, etwa der Untereinheit A mit D. Dieser Kontakt ist im Hexamer aus Archaea gar nicht vorhanden.

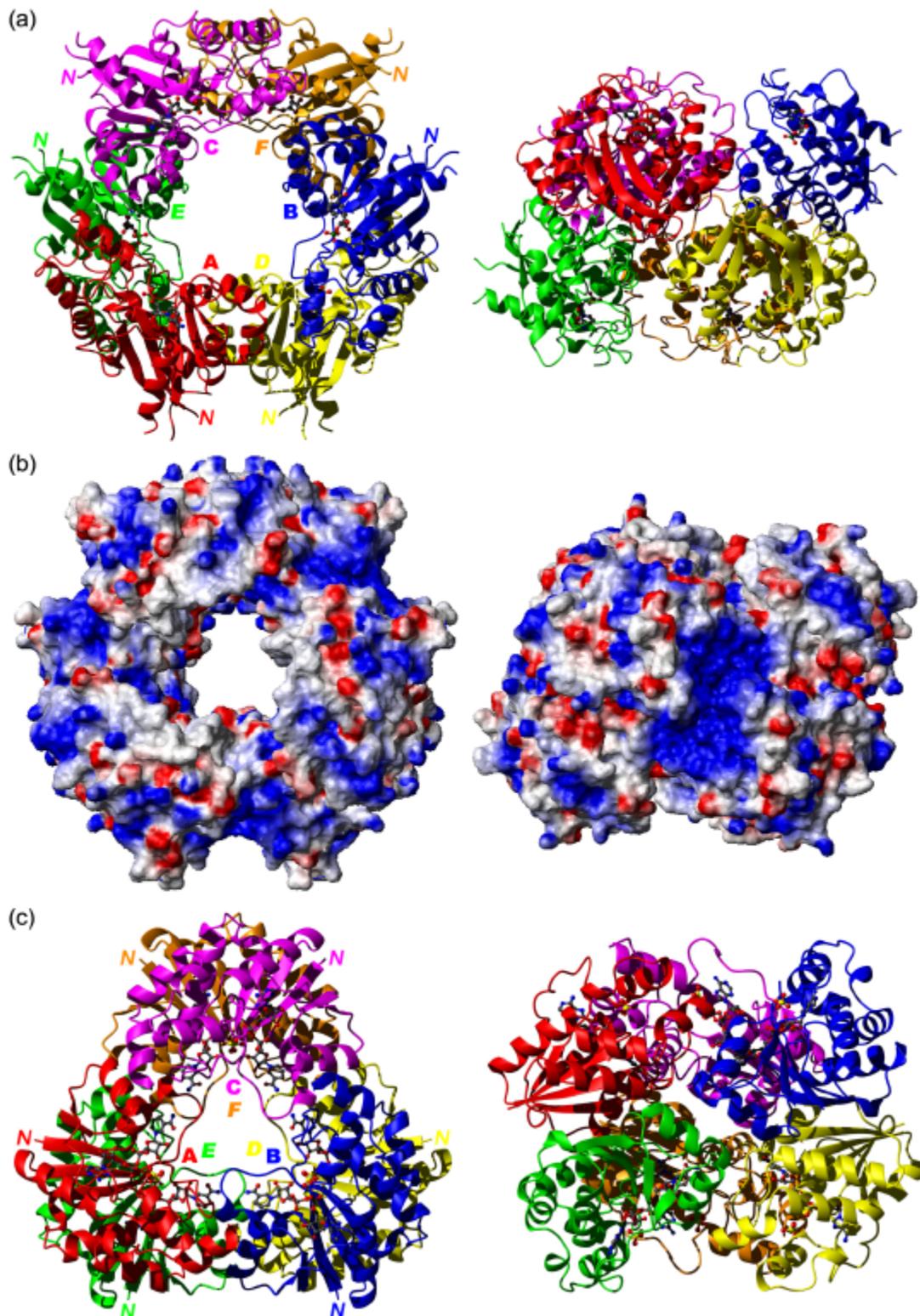


Abbildung 4.28: Biologische Einheit von NMNAT

(a) Schematische Darstellung von humaner NMNAT von oben (links) und von der Seite (rechts). Die Monomere A, B und C bilden das obere Trimer, welches durch eine zweizählige Drehachse in Beziehung zum unteren Trimer (Monomere D, E und F) steht. Die Drehachse befindet sich in der Seitenansicht senkrecht zur Papierebene. Die fehlende Schleife läge auf der Außenseite des Hexamers, die Ligandenbindungstasche ist von der oberen, inneren Seite des Protein-Ringes zugänglich. (b) Darstellung der Oberflächenladungen von humaner NMNAT. Blau repräsentiert positive, rot negative Ladungen (berechnet im Programm MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996)). In der Seitenansicht (rechts) ist

zu sehen, wie die Oligomerisierung ein Cluster von positiven Ladungen verursacht, die möglicherweise mit der Ligandenbindung zu tun hat. (c) Schematische Darstellung des Hexamers von NMNAT aus *M. thermoautotrophicum* (1ef0) zum Vergleich. Die Nummerierung der Monomere ist analog (a) und weicht von der in der Originalpublikation (Saridakis *et al.*, 2001) ab.

Dennoch ist die Gesamtoberfläche, die von benachbarten Monomeren durch die Oligomerisierung bedeckt wird, fast gleich in beiden Spezies und beträgt etwa 2000 Å² (Abbildung 4.29, berechnet mit NACCESS (Hubbard und Thornton, 1993)).

Abbildung 4.29: Kontaktoberflächen von NMNAT

Raumfüllendes Modell der NMNAT-Hexamere von *H. sapiens* und *M. thermoautotrophicum* in der Seitenansicht. Die zugängliche Oberfläche, die von den jeweils anderen Monomeren durch die Oligomerisierung abgedeckt werden, sind für die Untereinheit A an den jeweiligen Grenzflächen gezeigt (in Å²). Der Farbcode und Benennung entsprechen denen in Abbildung 4.28.

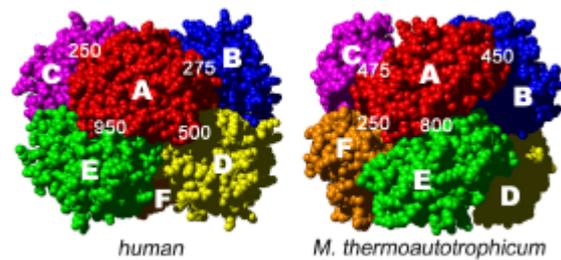


Abbildung 4.30 zeigt die Details der Protein-Protein Wechselwirkungen. Im humanen Hexamer sind es die β -Stränge **f** (die keine Äquivalente in archaealen NMNATs besitzen) anderer Untereinheiten (etwa von A und D), die in räumliche Nähe gelangen und zudem antiparallel angeordnet sind. Direkte Kontakte werden jedoch nicht beobachtet. Verantwortlich für diese Unterschiede sind die im Vergleich zur NMNAT aus Archaea zusätzlichen Reste, die die Helices **I** und **H** und den β -Strang **f** ausbilden. Sie sind direkt an den Protein-Protein-Kontakten beteiligt und positionieren sich zwischen Helix **G** (Monomer A) und den Resten C-terminal von Helix **K** (Monomer B), deren Äquivalente in *M. thermoautotrophicum*, Helices **a4** und **a7**, für die Protein-Protein-Kontakte sorgen. Diese Wechselwirkung wird somit im humanen Hexamer unmöglich, eine Verdrehung der Monomere quasi erzwungen.

Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Kontakte bilden ein weitläufiges Netzwerk von Wechselwirkungen aus. Zwischen Untereinheiten verschiedener Trimere (etwa zwischen den Monomeren A und E) bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren der Helix **A** (Reste 26 bis 33, Monomer A) und der Schleife zwischen den Helices **J** und **K** (Reste 234 bis 237, Monomer E) aus, genauso wie umgekehrt (Schleife von Monomer A mit Helix **A** von Monomer E). Außerdem ist durch die Wasserstoffbrücke zwischen GlyA37 und ArgD207 sowie

die hydrophobe Wechselwirkung von TrpD216 mit TyrA198 der Kontakt zur nächsten Untereinheit des unteren Trimers etabliert. Die Wechselwirkungen zwischen den Helices **H** und **I** der Untereinheit A (Reste 198 bis 207) mit der Schleife zwischen den Helices **J** und **K** der Untereinheit B (Reste 228 bis 232) verbinden die Monomere innerhalb der Trimer-Ebene. Insbesondere Wasserstoffbrücken zwischen TyrA198 und ArgB232 sowie zwischen AspA201 und ArgB231, sowie die hydrophobe Wechselwirkung von ArgA207, TrpA204 und ArgB232 stechen hervor. Im Allgemeinen werden diese Wechselwirkungen entsprechend der Symmetrieverhältnisse zwischen den Untereinheiten wiederholt und sind auch konsistent mit denjenigen, die für die anderen humanen NMNAT-Strukturen beschrieben werden (Garavaglia *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002). Lediglich die Nähe der Schleifen-Region 217 bis 220 (zwischen Strang **f** und Helix **J**) mit derselben Region des darüber liegenden Monomers ist im Apoenzym etwas ausgeprägter, da sich hier ein Phenylalanin statt eines Leucins befindet (ein single nucleotide polymorphism, SNP (Schweiger *et al.*, 2001)).

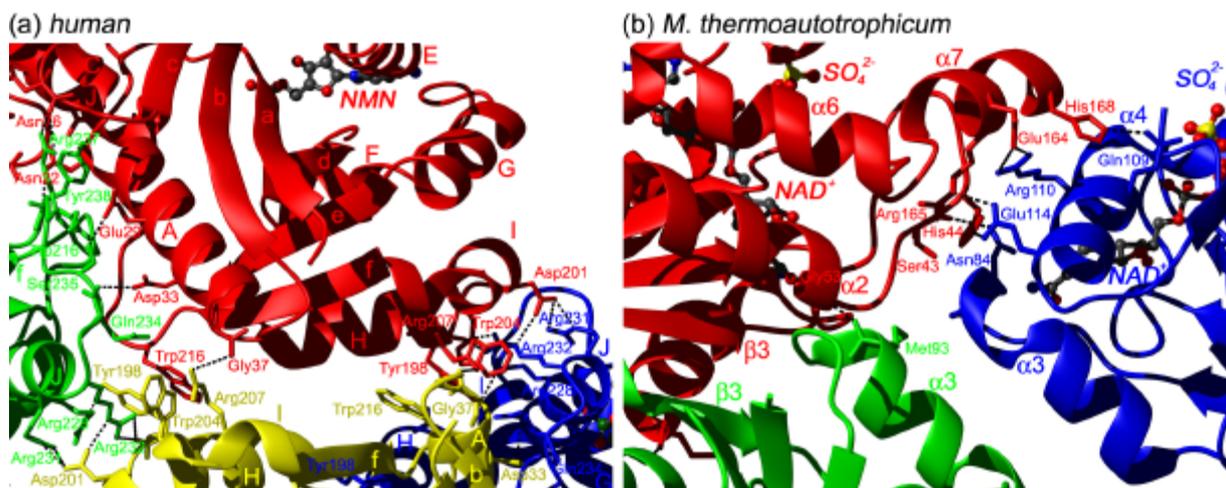


Abbildung 4.30: Protein-Protein Kontakte von NMNAT

(a) Wechselwirkungen der Monomere A (rot), B (blau), D (gelb) und E (grün) im humanen NMNAT-Hexamer. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gepunktete Linien gezeigt, die beteiligten Aminosäuren in der Farbe der jeweiligen Untereinheit. (b) Die Wechselwirkungen für das Hexamer von *M. thermoautotrophicum* NMNAT. Gezeigt ist die Grenzfläche der Monomere A, B und E. Aufgrund der Verdrehung gegenüber dem humanen Hexamer bilden sich Kontakte ganz anderer Aminosäuren aus. Kontakte von Monomer A mit Monomer D werden gar nicht beobachtet.

NMNAT aus *E. coli* dagegen wird durch die wiederum zusätzlichen Sekundärstrukturen Helix **E'** und Strang **f** (siehe Abbildung 4.23, Seite 46) offenbar generell daran gehindert, Oligomere zu bilden. Wie schon beim humanen Hexamer im Vergleich zu dem aus *M. thermoautotrophicum*, erfolgt

diese weitere Insertion an der Kontaktstelle der Monomere und verhindert somit gänzlich die Trimer-Bildung. Möglicherweise wird damit auch die Dimer-Bildung im Bereich der Helix **A** verhindert, obwohl dieser strukturell mit den NMNATs der anderen Spezies übereinstimmt. Beschriebene Kristallkontakte unterscheiden sich schon zwischen Apoenzym (vier Moleküle in der asymmetrischen Einheit) und Enzym-NaAD⁺ Komplex (drei Moleküle). Im Fall der *B. subtilis* NMNAT (Olland *et al.*, 2001) ist diese Region ebenfalls strukturell ähnlich und wird als Dimer-Dimer-Kontaktfläche beschrieben. Jedoch ist hier der Bereich der Reste 130 bis 150, der in etwa den Helices **I** und **J** sowie dem Strang **f** in humaner NMNAT entspricht, deutlich kleiner und somit offenbar nicht zu den oben beschriebenen Trimer-Kontakten fähig.

Auffällig am humanen Hexamer ist ein Cluster von positiven Ladungen, das sich erst durch die Oligomerisierung bildet (Abbildung 4.28 (b, Seitenansicht)). Es sind basische Aminosäuren von jeweils drei Untereinheiten (A, B und D in der Abbildung) beteiligt. Der Rand dieses Clusters wird von den Argininen 231 und 232 gebildet, deren Beteiligung an den Protein-Protein Wechselwirkungen oben beschrieben wurde. Gleichzeitig befindet sich in dieser Region der Teil der Ligandenbindungstasche, wo der AMP-Abschnitt von NAD⁺ bindet. Eine Bedeutung der Oligomerisierung für die Ligandenbindung, die im nächsten Kapitel diskutiert wird, und somit für den Reaktionsmechanismus des Enzyms kann daher vermutet werden.

4.3.12. Ligandenbindung in humaner NMNAT

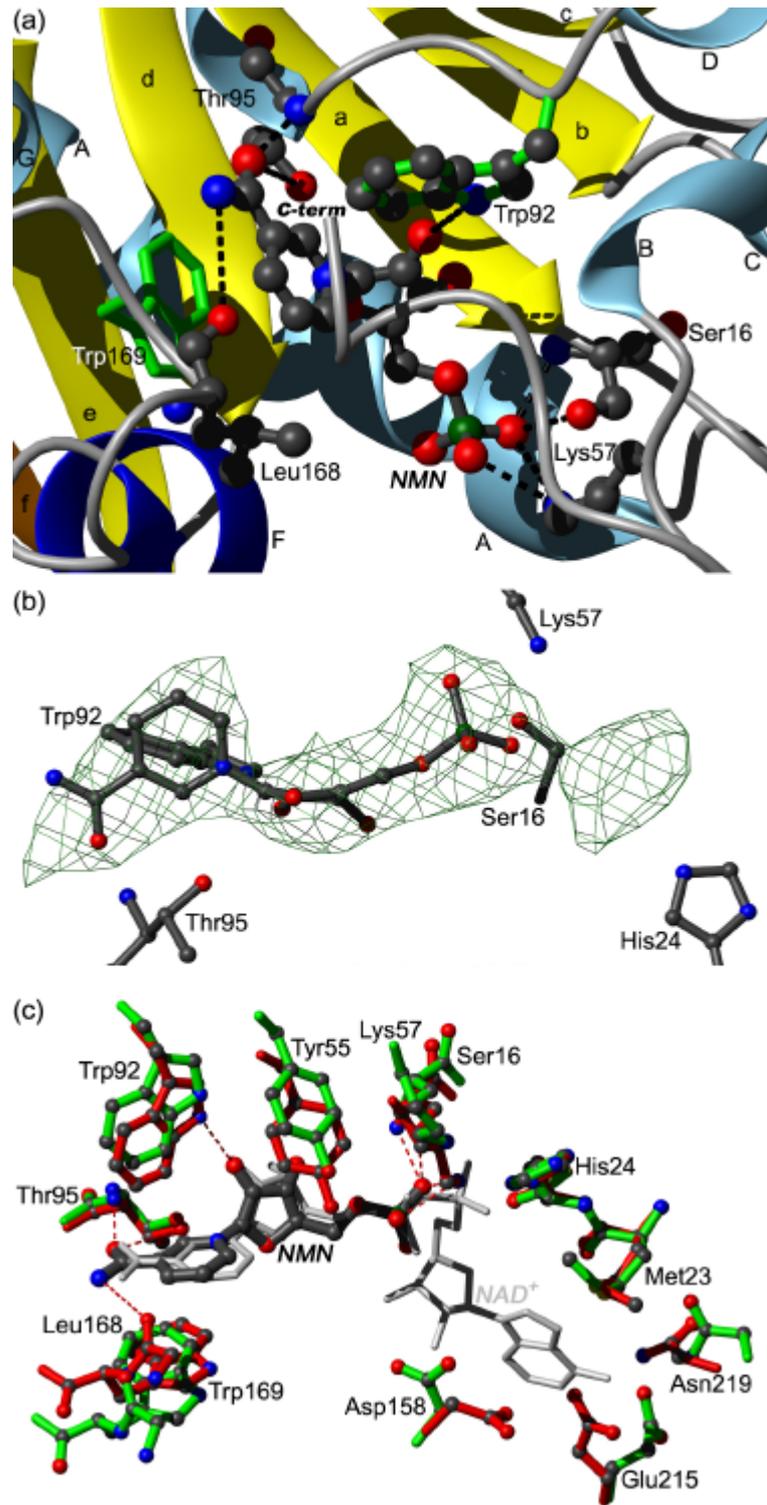
Der Kristallisationspuffer enthielt NAD⁺ als Cofaktor in einer Konzentration von 1 mM und damit in etwa 1.6-fachem molaren Überschuss zum Protein. Der Elektronendichte kann jedoch nur der NMN-Teil von NAD⁺ zuverlässig zugeordnet werden. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Enzym gebundenes NAD⁺ im Verlauf der Kristallisation hydrolysiert hat, ist es eher wahrscheinlich, dass der AMP- oder Adenosin-Teil aufgrund positioneller Flexibilität nicht kristallographisch aufgelöst ist. In der Tat wird Differenzelektronendichte an einer Stelle beobachtet, wo das zweite Phosphat oder die AMP-Ribose platziert werden könnte (Abbildung 4.31b). Sie befindet sich in der Nähe von His24, einem potenziell Liganden-bindenden Rest der auch Teil des hoch konservierten

GXXXPX(T/H)XHXXH Motivs in allen NMNAT-Sequenzen ist (siehe auch Abbildung 4.24, Seite 47). Die *B*-Faktoren der Ligandenatome sind vergleichbar mit denen der nahe gelegenen Proteinatome, steigen jedoch im Bereich des Phosphates leicht an, was als Hinweis für einen ungeordneten AMP-Anteil gesehen werden kann. Möglich ist jedoch auch, dass NMN schon in der Zelle gebunden und mit aufgereinigt wurde. Dies wurde schon im Falle der NMNAT von *M. thermoautotrophicum* beobachtet (Saridakis *et al.*, 2001). Die Zugabe von NAD⁺ kurz vor dem Kristallisationsansatz wäre dann ohne Bedeutung gewesen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die insgesamt sechs Bindungstaschen des biologischen Hexamers unterschiedlich gefüllt sind, also verschiedene Zustände der Katalyse einnehmen. Da die berechnete Elektronendichte ein Mittel über alle asymmetrische Einheiten eines Kristalls darstellt, wird der AMP-Teil möglicherweise durch eine Besetzung von weniger als 100 % herausgerechnet (bzw. als positionell flexibel beschrieben). Diese Möglichkeit könnte für die Abweichungen zwischen den einzelnen Monomeren sowie für die allgemein sehr hohe positionelle Flexibilität der Liganden bindenden Proteinabschnitte eine Erklärung sein (siehe auch Abbildung 4.21, Seite 44). Ganz gleich, ob der AMP-Teil von NAD⁺ in dieser Kristallstruktur ungeordnet oder nicht vorhanden ist, sie muss hier als Komplex von hNMNAT mit NMN diskutiert werden.

Die Ligandenbindungstasche ist in Richtung des inneren-oberen und -unteren Randes des Hexamers geöffnet, wobei der C-Terminus des Proteins als eine Art „Deckel“ für einen Teil der Bindungstasche dienen könnte (Abbildung 4.32, Seite 59). NMN wird durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen oberhalb des β -Faltblattes im Bereich der Stränge **a** und **d** gebunden, Abbildung 4.31. Wichtige Kontakte sind die des Nicotinamids mit Thr95-OG und Leu168-O, der Ribose-Einheit mit Trp92-NE1 sowie des Phosphates mit Lys57-NZ und Ser16-O und OG. Das Ringsystem des Nicotinamids geht eine Stapel-Wechselwirkung mit Trp169 auf der einen Seite sowie mit Trp92 in einer rechtwinkligen Art auf der anderen Seite ein (grüne Bindungen in der Abbildung).

Abbildung 4.31: NMN-Bindung in hNMNAT

(a) Schematische und Kugelstab-Darstellung von hNMNAT bzw. NMN. Farbcode wie in Abbildung 4.16, Seite 38. (b) F_o-F_c Differenzelektronendichte für den Liganden NMN. Berechnet nach Verfeinerung des finalen Modells ohne den Liganden, konturiert mit 2σ . Das Modell des Liganden und die angrenzenden Aminosäuren sind ebenfalls gezeigt. (c) Die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren nach Überlagerung des NMNAT-NMN Komplexes (1gzu, rot) mit dem Apoenzym (1kku, grün). Weitere Aminosäure-Seitenketten, die in ihrer funktionellen Gruppe Heteroatome besitzen und in Richtung der Liganden-bindungstasche zeigen, sind ebenfalls dargestellt: Asp158, Glu215, Asn219, Met23 und His24.



Der Vergleich mit der Struktur des Apoenzyms, Abbildung 4.31c, (1kku (Garavaglia *et al.*, 2001)), bestätigt die schon in Kapitel 4.3.8, Seite 39 beschriebene Sichtweise einer „geöffneten“ Ligandenbindungsstelle im Apoenzym. So sind die Seitenketten der Reste Trp169, Trp92 (Helices **F** und **G**), Tyr55 und Lys57 (Schleife zwischen den Helices **B** und **C**) jeweils etwa 2 Å weiter voneinander entfernt als im NMNAT-Ligand-Komplex, Tabelle 4-7.

Entfernung zwischen den Atomen (in Å)	NMNAT-NMN Komplex (1gz)	NMNAT Apoenzym (1kku)
Trp169-NE1 : Trp92-NE1	9.7	11.6
Trp169-NE1 : Tyr55-OH	8.1	10.3
Trp169-NE1 : Lys57-NZ	11.9	13.8

Tabelle 4-7: Entfernungen von Seitenketten in hNMNAT mit und ohne Ligand

Für die Bindung des AMP-Teils von NAD⁺ kommen die Aminosäuren Asp158, Glu215, Asn219, Met23 und His24 in Frage, die in ihren Seitenketten funktionelle Heteroatome besitzen und zudem ins Innere der Ligandenbindungstasche gerichtet sind. Insbesondere die Konformationen der Seitenketten von Asp158 und Glu215 sind im Komplex anders als im Apoenzym, was eine Bedeutung für die Ligandenbindung nahe legt. His24 ist sogar ein konservierter Rest in allen NMNATs. Asp158 befindet sich an einer exponierten Stelle, die Seitenkette liegt genau vor den C-Termini der β -Stränge **a** und **d** und damit im unmittelbaren Zentrum der Ligandenbindungstasche. Dies ist besonders gut sichtbar in der Oberflächendarstellung, Abbildung 4.32 (rechte Seite). Hier wird auch der mögliche Zusammenhang der Ligandenbindung mit der Ausbildung des Clusters von positiven Ladungen deutlich, das durch Oligomerisierung zustande kommt (siehe auch Abbildung 4.28, Seite 52). Es wird im Wesentlichen gebildet von den basischen Aminosäuren Lys6, Arg40, Lys150, Lys205, His206 und Arg207 der Untereinheiten A und D (sowie B/F und C/E). Der eine Rand (der obere in der Abbildung) liegt in räumlicher Nähe der Lysine 90, 93 und 97 der Untereinheit B, die eine Brücke zum Eingang der Ligandenbindungstasche bilden. Hier sind es Arg231 sowie die konservierten Reste Arg227 und His24, die sich unmittelbar anschließen. Möglicherweise wird das durch die Triphosphat-Gruppe negativ geladene ATP von diesen positiven Ladungen schon locker gebunden und dann sukzessive bis zum Reaktionszentrum weiter geleitet. Auch Lys58 könnte hier eine Rolle spielen. Diese Aminosäure zeigt eine deutlich unterschiedliche Positionen im Apoenzym (bedingt durch die veränderte Konformation der gesamten Schleife) und wird dort auch nicht vom (in der Struktur ungeordneten) C-Terminus abgedeckt. Ein Zusammenspiel mit Arg231 ist aufgrund der räumlichen Nähe denkbar. Der C-Terminus (Aminosäuren Glu257 bis Thr279; letzter geordneter Rest in 1gz: Leu270) ist im Apoenzym ungeordnet. Dies macht auch daher Sinn, dass er im Komplex einen Teil der Ligandenbindungstasche abdeckt, insbesondere den NMN-bindenden Teil aber auch teilweise die Reste His24 und Lys58. Außerdem liegt der C-Terminus der

benachbarten Untereinheit (Monomer A in Abbildung 4.32) ebenfalls am oben beschriebenen Eingang der Ligandenbindungstasche und könnte ebenfalls beteiligt sein, zudem nach Leu270 ja noch weitere neun Aminosäuren folgen, die in dieser Struktur (1gzv) ungeordnet sind.

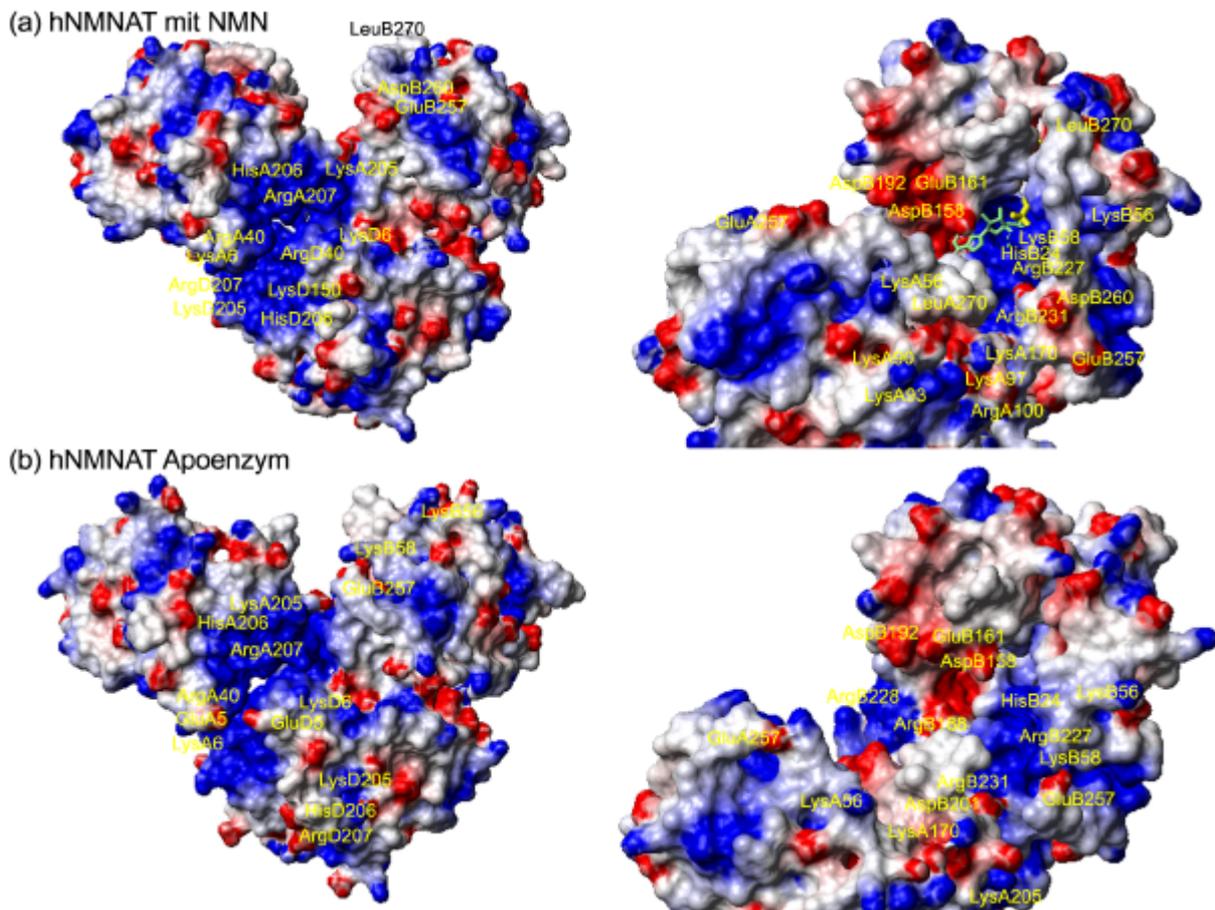


Abbildung 4.32: Oberflächenpotenzial und Ligandenbindungstasche im NMNAT-Hexamer

Oberflächenpotenzial der Hexamer-Untereinheiten A, B und D des NMNAT-NMN-Komplexes (a; 1gzv) und des Apoenzym (b, 1kku) in jeweils derselben Orientierung. Links jeweils der Blickwinkel in Richtung der Vorderseite des Hexamers (identisch zu Abbildung 4.28, Seite 52, rechts), rechts der Blickwinkel von hinten-oben in die Ligandenbindungstasche der Untereinheit B. Positive Ladungen sind in blau, negative in rot dargestellt, berechnet mit MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Der Vergleich mit den Komplex-Strukturen anderer NMNATs gibt Aufschluss über die weitere Ligandenbindung. Der Komplex der humanen NMNAT mit NAD^+ (PDB-Code 1kqn (Zhou *et al.*, 2002), Abbildung 4.33a) ist annähernd identisch zu dem mit NMN (1gzv, diese Arbeit). Zusätzlich ist der AMP-Teil von NAD^+ , der durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly156 (Ribose), Glu215 und Asn219 (Adenin) gebunden wird. Glu158 scheint keine Rolle für die Ligandenbindung zu spielen, aber auch His24 ist nicht direkt beteiligt.

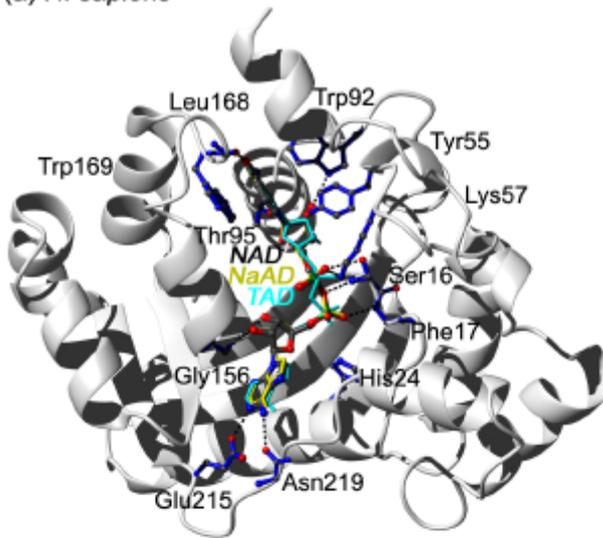
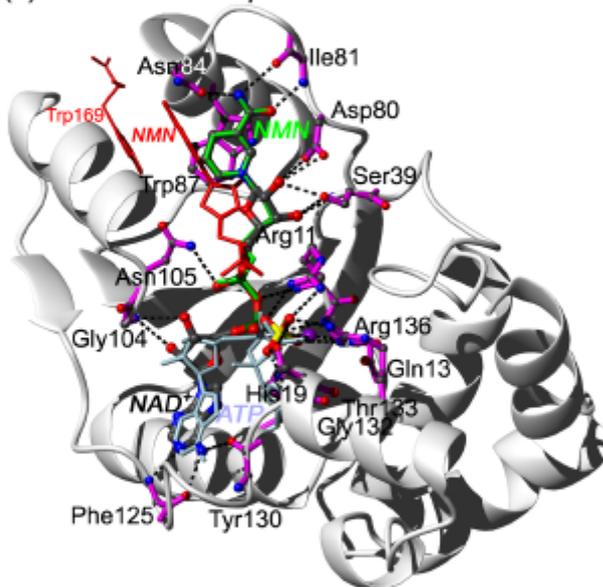
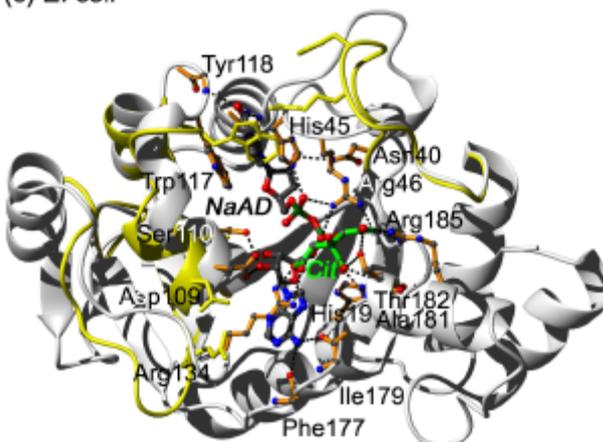
(a) *H. sapiens*(b) *M. thermoautotrophicum*(c) *E. coli*

Abbildung 4.33: Ligandenbindung von NMNAT verschiedener Spezies

(a) Schematische Darstellung des humanen NMNAT-NAD⁺ Komplexes (1kqn) mit den Liganden NAD⁺ (Kugelstab-Darstellung), Deamido-NAD (NaAD, aus 1kqo, gelb) und Thiazofurin-Adenin-Dinukleotid (TAD, aus 1kr2, cyan) nach Überlagerung.

(b) Schematische Darstellung des Komplexes NMNAT-NAD⁺ aus *M. thermoautotrophicum* (1ej2) mit den Liganden NAD⁺ (Kugelstab-Darstellung), NMN (aus 1hyb, grün) und ATP (aus der *M. jannaschii* Struktur, 1f9a, hellblau). Zum Vergleich ist NMN und Trp169 der humanen Struktur (1gzv) nach struktureller Überlagerung gezeigt (in rot). (c) Schematische Darstellung des NMNAT-NaAD⁺ Komplexes aus *E. coli* (1k4m) sowie Teile des entsprechenden Apoenzyms (1k4k, gelb) nach Überlagerung. Das ebenfalls im Komplex (1k4m) gefundene Citrat (CIT) ist grün dargestellt.

Neben NAD⁺ wird auch NaAD⁺ (Deamido-NAD⁺) und TAD (Thiazofurin-Adenin-Dinukleotid) in der gleichen Weise gebunden. Nur geringe konformationelle Änderungen werden beobachtet (Zhou *et al.*, 2002), die Zusammensetzung der Ligandenbindungstasche toleriert geringe strukturelle Änderungen des Liganden. Im Vergleich zur humanen NMNAT ist der NMN-Teil des Liganden in NMNAT von *M. thermoautotrophicum* (PDB-Code 1ej2 und 1hyb (Christendat *et al.*, 2000; Saridakis *et al.*, 2001) dagegen sehr unterschiedlich gebunden, Abbildung 4.33b. Die Stapel-Wechselwirkung geht von Trp87 aus, einem Rest der Helix **a3**. Diese Helix korrespondiert zur humanen Helix **E** und liegt auf der anderen Seite dieses gabelförmigen Strukturelementes (Helices **E** und **G** von hNMNAT).

(Christendat *et al.*, 2000; Saridakis *et al.*, 2001) dagegen sehr unterschiedlich gebunden, Abbildung 4.33b. Die Stapel-Wechselwirkung geht von Trp87 aus, einem Rest der Helix **a3**. Diese Helix korrespondiert zur humanen Helix **E** und liegt auf der anderen Seite dieses gabelförmigen Strukturelementes (Helices **E** und **G** von hNMNAT).

Abbildung 4.34: Ligandenbindung von Proteinen der Nukleotidylyl-Superfamilie

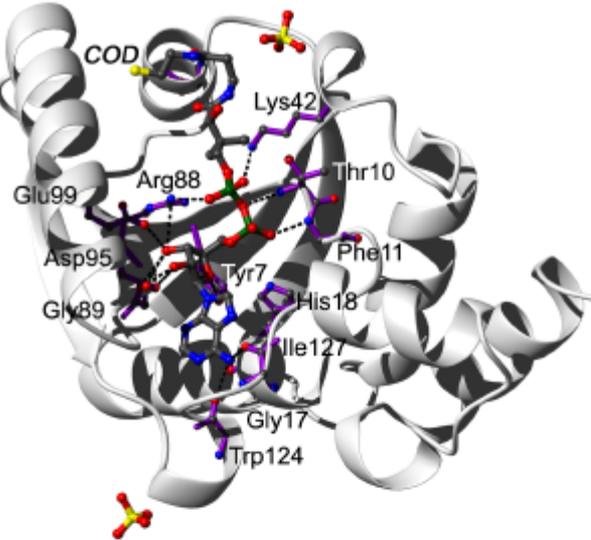
COD: Deamino-CoenzymA;
 CTP: Cytidyl-5'-Triphosphat;
 ADX: Adenosin-5'-Phosphosulfat.

Im humanen Enzym dagegen ist die strukturell entsprechende Aminosäure, Trp169, Teil der Schleife zwischen den Helices **F** und **G**. Der AMP-Teil der Bindungstasche dagegen ist sehr ähnlich. Die Rolle der konservierten Aminosäuren (His19, Thr133 und Arg136 in *M. thermoautotrophicum*, His24, Thr224 und Arg227 im humanen NMNAT) wird deutlich durch Betrachtung der Position von ATP in der NMNAT-Struktur aus *M. jannaschii*, die der von NMNAT aus *M. thermoautotrophicum* sehr ähnlich ist. Die β - und γ -Phosphate werden von genau diesen Resten durch Wasserstoffbrückenbindungen positioniert. So ist es sicher auch kein Zufall, dass in der Struktur 1ej2 (*M. thermoautotrophicum*, mit NAD^+) an vergleichbarer Position ein Sulfat-Anion gebunden wird.

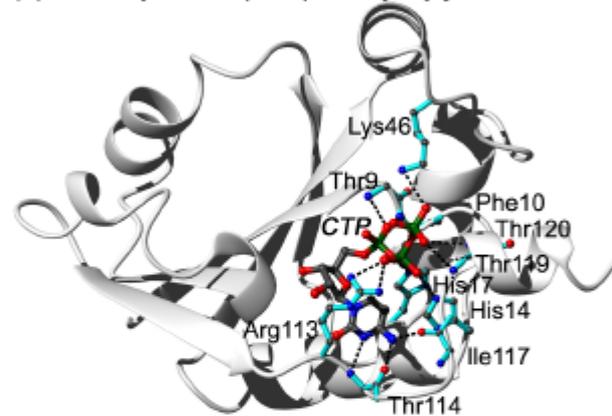
Ähnliches ist für NMNAT aus *E. coli* zu beobachten (PDB-Code 1k4m, Komplex mit NaAD^+ (Zhang *et al.*, 2002); Abbildung 4.33c), wo ein Citrat

unter anderem durch die konservierten Reste His19, Thr182 und Arg185 an der gleichen Stelle positioniert ist. Auch viele andere Kontakte finden sich für das *E. coli* Enzym wieder. Der Nicotinamid-Ring wird durch die Stapel-Wechselwirkung von Trp117 fixiert, welches in der Apoform eine deutlich andere

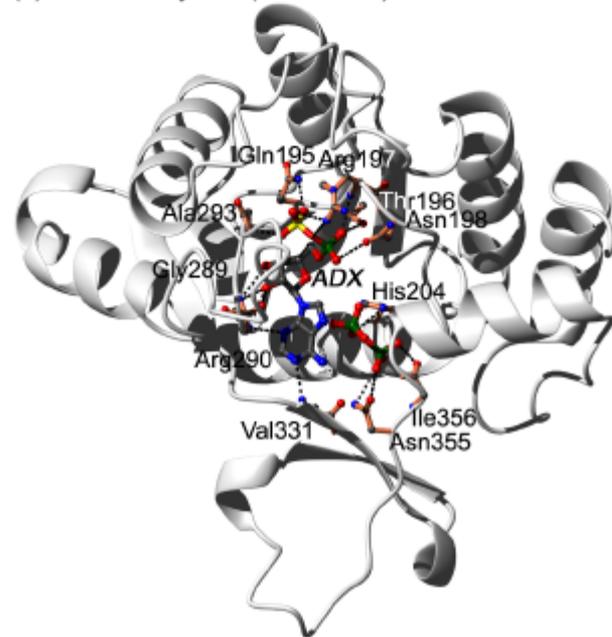
(a) Phosphopantethein-Adenylyltransferase



(b) CTP:Glycerol-3-phosphat Cytidylyltransferase



(c) ATP-Sulfurylase (Domäne II)



Konformation einnimmt. Der Adenosin-Teil wird durch Asp109/Ser110 sowie Phe177 und Ile179 gebunden, die strukturell vergleichbar zu Gly156, Glu215 und Asn219 des humanen Proteins sind.

Diese Form der Ligandenbindung ist in allen Mitgliedern der Nukleotidyltransferase-Superfamilie zu finden, wo der funktionell konstante Teil, verantwortlich für den Transfer einer Nukleotid-Monophosphat-Gruppe, auch strukturell konstant ist und an dem Aminosäuren vergleichbarer Proteinregionen beteiligt sind, Abbildung 4.34.

Aufgrund der oben dargelegten Überlegungen und Strukturvergleiche lässt sich das folgende Modell für die Ligandenbindung und Synthesereaktion entwickeln (Abbildung 4.35):

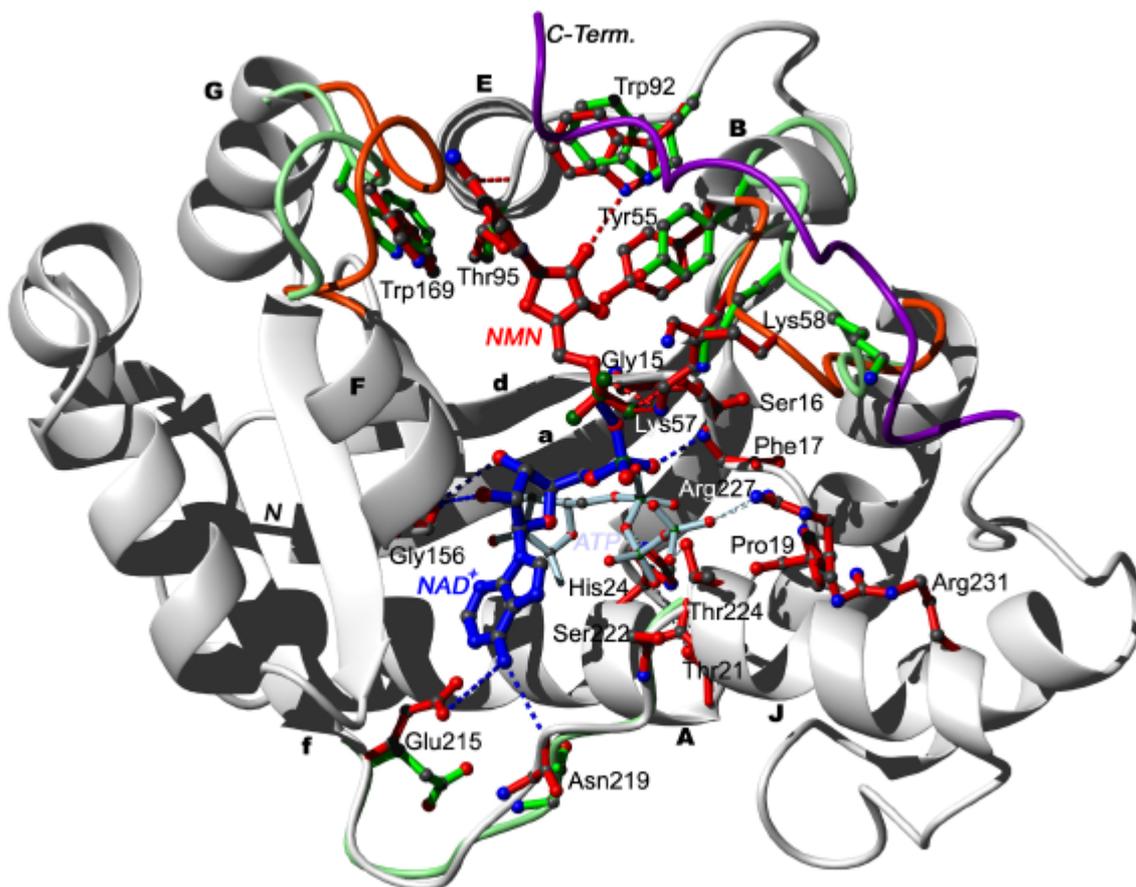


Abbildung 4.35: Bindungs- und Reaktionsmechanismus der NAD⁺-Synthese in humaner NMNAT

Schematische Darstellung der humanen NMNAT (1gzu, grau) und ausgewählter Teile des Apoenzyms (1kku, grün). Die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren in der Kugelstab-Darstellung (1gzu rot, 1kku grün). Dargestellt sind außerdem die Liganden NMN (aus 1gzu, rot), NAD⁺ (aus 1kqn, blau) und ATP (nur der Ribose-Phosphat-Teil, aus 1f9a, hellblau), jeweils nach struktureller Überlagerung der gesamten Proteine (siehe oben). Der C-Terminus ist violett dargestellt, Wasserstoffbrücken als gepunktete Linien in rot, wenn sie von der hier präsentierten Struktur (1gzu) herrühren, blau wenn sie aus dem NMNAT-NAD⁺-Komplex (1kqn) abgeleitet wurden.

(a) Im Apoenzym ist der obere, NMN-bindende Teil der Ligandenbindungstasche geweitet. Die Helices **F** und **G** auf der einen Seite und die Reste um Helix **B** haben einen größeren Abstand voneinander als später im Komplex. Der C-Terminus ist ungeordnet, weswegen die Seitenketten von Lys58 und Arg227 frei zugänglich sind. Sie sind möglicherweise beteiligt an der Attraktion des einen Bindungspartners, ATP, die am positiven Cluster an der Monomeren Schnittstelle beginnt und über die Lysine 90, 93 und 97 fortgesetzt werden könnte bis in die Ligandenbindungstasche. **(b)** Der Empfänger des Adenylyl-Restes, Nicotinamid-Mononukleotid, NMN, bindet oberhalb des β -Faltblattes. Helices **F** und **G** sowie die Reste um Helix **B** bewegen sich aufeinander zu, was die für die Bindung verantwortlichen Reste in Position bringt. Dies sind Trp169, Leu168, Thr92, Trp95, Lys57, Tyr55 und Ser16. **(c)** Gleichzeitig bindet Adenosin-5'-Triphosphat ATP unterhalb des β -Faltblattes. Gly156, Glu215 und Asn219 sind hier beteiligt, letztere beiden positionieren sich erst mit der Ligandenbindung. Fünf der sieben konservierten Reste, Thr21, His24, Ser222, Thr224 und Arg227 sind offenbar an der Bindung der β - und γ -Phosphate von ATP beteiligt, möglicherweise auch ein sechster, Pro19. Gly15 ist eventuell nur konserviert, weil jede Seitenkette eine sterische Hinderung für die Ligandenbindung darstellen würde. **(d)** Aufgrund ihrer räumlichen Nähe könnten die Seitenketten Ser16 und Lys57 an der Synthesereaktion, der Neuknüpfung der Phosphat-Sauerstoff-Bindung zwischen AMP und NMN, beteiligt sein. Aber auch das Peptidrückgrat von Gly15 bis Phe17 sowie die Seitenkette von His24 könnten an der Reaktion mitwirken, etwa bei der Stabilisierung von Übergangszuständen. **(e)** Nach der Synthese von NAD^+ wird es zusammen mit dem entstandenen Pyrophosphat PP_i wieder abgegeben, hNMNAT kehrt in den geöffneten Zustand des Apoenzyms zurück, der mit der Funktion eines „Deckels“ ausgestattete C-Terminus kehrt in den ungeordneten Zustand zurück, um neues Substrat aufnehmen zu können.

Um die Einzelheiten, insbesondere des Reaktionsmechanismus zu bestätigen, sind weitere Experimente nötig. Mutationen an den Stellen der potenziell und tatsächlich beteiligten Aminosäuren könnten unterschiedliche Affinität und Syntheseaktivität hervorrufen. Ein am C-Terminus verkürztes Protein würde die Bedeutung desselben zeigen, ein Protein ohne die äußeren Helices (I, H, K) würde möglicherweise nicht mehr als Hexamer vorliegen und könnte die Bedeutung des positiv geladenen Clusters klären.