

1 Einleitung

Das Protein 5'-NT aus dem Bakterium *Escherichia coli* ist ein Metalloenzym aus einer Superfamilie von Metallophosphoesterasen. In dieser Arbeit wurden röntgenkristallographische Untersuchungen an Kristallen der 5'-NT durchgeführt, mit dem Ziel die dreidimensionale Struktur der 5'-NT aus *E. coli* zu bestimmen und Unterschiede zu bereits strukturell charakterisierten Phosphatasen zu analysieren. Dabei soll die strukturelle Untersuchung dieses bakteriellen Enzyms auch Hinweise auf die Struktur von 5'-Nucleotidasen aus anderen Organismen liefern. Um Einblicke in den Reaktionsmechanismus der 5'-NT und verwandter Enzyme zu erhalten, wurden Komplexe der 5'-NT mit Substraten und Substratanaloga strukturell charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, daß die 5'-NT in zwei sich deutlich unterscheidenden Konformationen kristallisiert. Die Analyse dieser Konformationen ergab eine erstmalig beobachtete Art einer Domänenbewegung, die sich wesentlich von der klassischen gelenkartigen Domänenschließbewegung unterscheidet.

1.1 Metalloenzyme

Proteine bestehen aus 20 verschiedenen L-Aminosäuren, deren räumliche Anordnung die bemerkenswerte Fülle der Funktionen, die durch Proteine vermittelt wird, hervorbringen. Fast alle Katalysatoren der enormen Vielfalt biochemischer Reaktionen sind Proteine, die man Enzyme nennt. Sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten, milde Reaktionsbedingungen, eine hohe Substratspezifität und zahlreiche Regulationsmechanismen kennzeichnen die enzymatische Katalyse. Die Funktion zahlreicher Enzyme ist von der Gegenwart von Metallionen abhängig. Die Gruppe der Metalloproteine enthält fest gebundene Metallionen der Elemente Calcium, Magnesium, Eisen, Kobalt, Nickel, Mangan, Kupfer, Zink und Molybdän. Die Aktivität der Metalloenzyme beruht meist auf der Lewis-Acidität der Metallionen (z.B. Zn in der Carboanhydrase oder in der Alkohol-Dehydrogenase). Für Enzyme mit Metallionen, deren d-Schale nicht vollständig aufgefüllt ist, kommt aufgrund ihrer Fähigkeit zur π -Rückbindung noch eine Rolle in der Aktivierung kleiner, hochsymmetrischer Moleküle hinzu (z.B. Fe/Mo in der Nitrogenase, Fe/Ni in der Hydrogenase). Desweiteren sind redoxaktive Metallzentren häufig in Elektronentransport-Proteinen vertreten (z.B. Fe in den Ferredoxinen oder Cu in Plastocyanin).

1.2 Phosphoesterasen

Jede lebende Zelle enthält zahlreiche Phosphosäureester mit einer großen Funktionsvielfalt. Adenosintriphosphat (ATP) dient beispielsweise als Träger chemischer Energie. Nucleotide dienen als Bausteine für den Aufbau der Nucleinsäuren durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe am Zuckerrest eines Nucleotids und der 5'-Phosphatgruppe am nächsten. Phosphoglyceride bilden den Hauptbestandteil biologischer Membranen. Sie setzen sich aus Glycerin-3-phosphat mit zwei Fettsäuren an den Positionen C1 bzw. C2 und einem Alkohol an der Phosphorylgruppe zusammen. Proteine werden zur Steuerung ihrer Aktivität durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin modifiziert. Aber auch die Aminosäuren Aspartat, Histidin und Lysin können phosphoryliert vorliegen. Weiterhin finden sich als Stoffwechselprodukte jeder Zelle zahlreiche phosphorylierte Metabolite als Zwischenprodukte. Schließlich dienen Nucleotide auch als extrazelluläre Signalsubstanzen. Den Auf- und Abbau all dieser Verbindungen übernehmen Kinasen, Nucleasen, Ribonucleasen, Phospholipasen und Phosphatasen.

Die Substrate der Phosphatasen reichen von kleinen phosphorylierten Metaboliten, wie Glucose-6-phosphat und sekundären Botenstoffen (z.B. Phosphoinositole), bis hin zu phosphorylierten Proteinen. Die große Familie der Phosphatasen kann aufgrund der Spezifität in drei Gruppen eingeteilt werden: spezifische Phosphatasen, unspezifische Phosphatasen und Phosphoproteinphosphatasen.

1.3 Dinukleare Metallophosphoesterasen

Einige Phosphoesterasen nutzen einen nukleophilen Aminosäurerest des aktiven Zentrums als anfänglichen Akzeptor der Phosphorylgruppe des Substrats, während andere diese direkt auf ein Wassermolekül übertragen. Die erste Gruppe kann nach dem jeweiligen Phosphorylgruppen-Akzeptor unterteilt werden (z.B. Histidin in den sauren lysosomalen Phosphatasen; Cystein in den Phosphotyrosinphosphatasen). Enzyme der zweiten Gruppe sind typischerweise dinukleare Metalloproteine und nutzen einen Zwei-Metallionen-Mechanismus, um die Phosphatester zu binden und die folgende Hydrolyse zu katalysieren. Die Lewis-Acidität des einen Metalls sorgt hierbei für die Deprotonierung des nukleophil angreifenden Wassermoleküls (oder eines Serinrestes in der alkalischen Phosphatase, welche eine bemerkenswerte Ausnahme darstellt, da sie eine dinukleare Metallophosphatase ist, aber über ein Phosphoseryl-Intermediat reagiert), während das zweite Metallion die Katalyse durch Ladungsstabilisierung

am Übergangszustand unterstützt. In Tabelle 1 sind strukturell charakterisierte dinukleare (und trinukleare) Metallophosphoesterasen aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht von strukturell charakterisierten Metallophosphoesterasen mit Dimetallzentrum

Enzym	Metallionen	Metallabstand ^a (Å)	Literaturstelle
Phospholipase C	Zn, Zn, Zn	3.3	Hough <i>et al.</i> , 1989
Nuclease P1	Zn, Zn, Zn	3.2	Volbeda <i>et al.</i> , 1991
DNA-Polymerase I 3'-5' Exonuclease	Mg, Mg	3.9	Beese & Steitz, 1991
HIV Reverse Transkriptase RNase Domäne	Me(II), Me(II)	ca. 4	Davies <i>et al.</i> , 1991
Alkalische Phosphatase	Zn, Zn, Mg	3.9 - 4.2	Sowadski <i>et al.</i> , 1985
Fructose-1,6-bisphosphatase	Me(II), Me(II)	3.6 - 3.8	Ke <i>et al.</i> , 1989
Inositolmonophosphatase	Me(II), Me(II)	3.9	Atack <i>et al.</i> , 1995
Phosphotriesterase	Me(II), Me(II)	3.8	Benning <i>et al.</i> , 1995
Ser/Thr-Proteinphosphatase			
PP-1 (Kaninchen)	Me(II), Me(II)	3.3	Goldberg <i>et al.</i> , 1995
PP-1 (Mensch)	Mn, Fe	4.0	Egloff <i>et al.</i> , 1995
PP-2B (Calcineurin, Rind)	Fe, Zn	3.0	Griffith <i>et al.</i> , 1995
PP-2B (Calcineurin, Mensch)	Fe, Zn	3.2	Kissinger <i>et al.</i> , 1995
PP-2C	Mn, Mn	4.0	Das <i>et al.</i> , 1996
Violette saure Phosphatase			
Kidneybohne	Fe(III), Zn	3.1	Sträter <i>et al.</i> , 1995
Ratte	Fe(III), Fe(III)	3.5	Lindqvist <i>et al.</i> , 1999
Ratte	Fe(III), Fe(III)	3.1	Uppenberg <i>et al.</i> , 1999
Schwein	Fe(III), Fe(III)	3.3	Guddat <i>et al.</i> , 1999

^aFür die trinuklearen Metallzentren ist der kürzeste Abstand zitiert

1.4 Die 5'-Nucleotidase

Die in dieser Arbeit untersuchte 5'-Nucleotidase (5'-NT) ist eine Hydrolase und wird durch das Gen *ushA* im Bakterium *Escherichia coli* kodiert (Burns & Beacham, 1986). Die 5'-NT besitzt ein Molekulargewicht von 58 kDa (550 Aminosäurereste) und wird nach der Abspaltung einer Signalsequenz (25 Aminosäurereste) in das Periplasma der bakteriellen Zelle transportiert, wo

sie dann hydrolytisch aktiv ist (Abbildung 1). Das periplasmatische Protein von 525 Aminosäureresten besitzt eine berechnete Masse von 58.2 kDa.

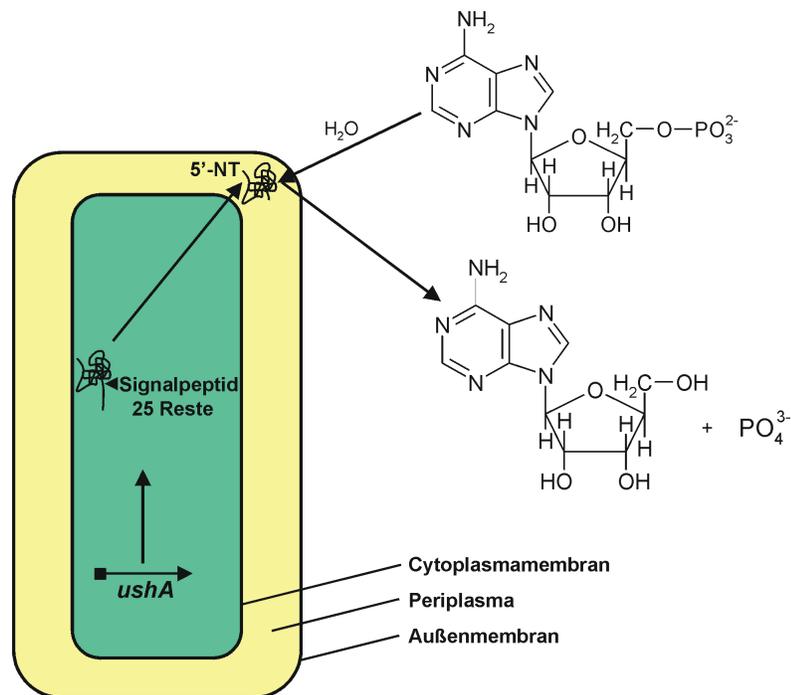


Abbildung 1: *E. coli* 5'-Nucleotidase (UDP-Zucker-Hydrolase). Das Gen *ushA* kodiert ein Protein, das nach der Translation in einer 550 Aminosäuren umfassenden Peptidkette resultiert. Davon sind die 25 N-terminalen Aminosäurereste ein Signalpeptid, welches den Transport der 5'-NT in das Periplasma bewirkt. Dort katalysiert sie die Hydrolyse von Nucleotiden zu Nucleosiden und Phosphat, wie beispielsweise die Hydrolyse von Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin und Phosphat.

1.4.1 Katalytische Eigenschaften

Die 5'-Nucleotidase ist ein multifunktionales Enzym und spielt eine wichtige Rolle im Nucleotidstoffwechsel. In Tabelle 2 sind einige von Neu (1967) untersuchte Nucleotide und die relative Aktivität ihrer Spaltung durch die 5'-Nucleotidase aus *E. coli* aufgelistet.

Das Zink enthaltene Enzym besitzt 5'-Nucleotidase (E.C. 3.1.3.5) sowie UDP-Zucker-Hydrolase-Aktivität (E.C. 3.6.1.45) (Glaser *et al.*, 1967; Neu, 1967; Burns & Beacham, 1986). Das im Periplasma von *E. coli* befindliche Protein bildet ein System zur Hydrolyse von extrazellulären Nucleosiddiphosphat-Zuckern über Nucleosidmonophosphat und Zucker-1-phosphat zu den entsprechenden Nucleosiden und unphosphorylierten Zuckern. So wird beispielsweise UDP-D-Glucose von der 5'-NT zu UMP, das seinerseits von der Nucleotidase in Uridin und Phosphat gespalten wird, und in α -D-Glucose-1-phosphat hydrolysiert (Abbildung 2). α -D-Glucose-1-phosphat wird nun von der Glucose-1-phosphatase in α -D-Glucose und Phosphat

hydrolysiert. Diese Produkte stehen anschließend dem Metabolismus der Zelle zur Verfügung, da sie leicht in das Zellinnere transportiert werden können.

Tabelle 2: *E. coli* 5'-Nucleotidase-Aktivität gegenüber ausgesuchten Nucleotiden (Neu, 1967)

Nucleotid	Relative Aktivität ^a
5'-AMP	100
5'-GMP	86
5'-CMP	56
5'-UMP	48
5'-DTMP	48
5'-DAMP	44
5'-DCMP	56
5'-DGMP	60
5'-Methyl-5'-CMP	48
5'-IMP	79
2'-AMP	0
3'-AMP	0
ATP	100
UTP	97
GTP	160
CTP	106
ADP	93
UDP	94

^abezogen auf ATP, 5'-NT-Aktivität gegenüber ATP wurde auf 100 gesetzt

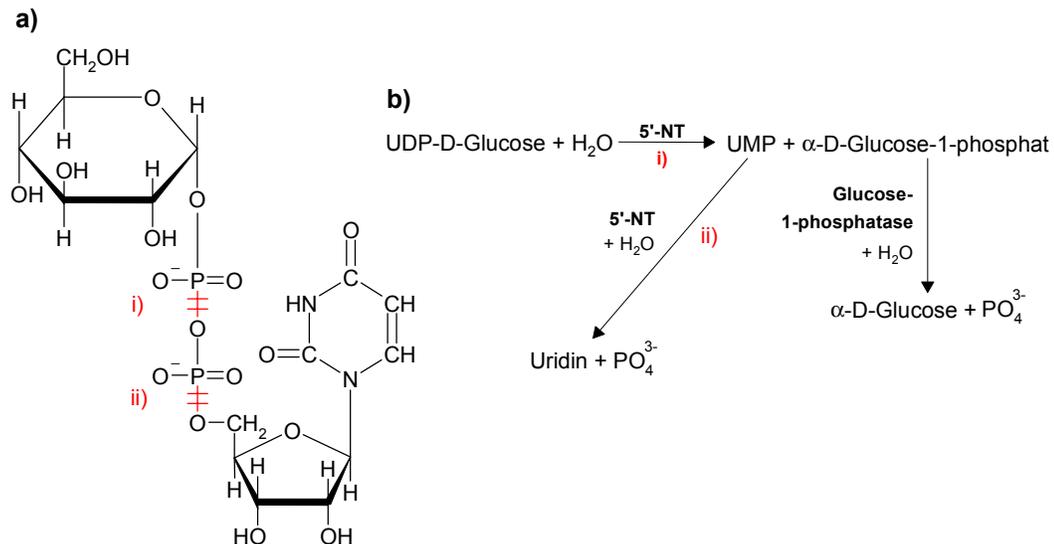


Abbildung 2: Hydrolyse der Uridindiphosphatglucose (α -D-UDP-Glucose). **a**, Formel der Uridindiphosphatglucose (UDP-Glucose). Die bei der Hydrolyse zu spaltenden Bindungen sind rot gekennzeichnet. i) Zuerst wird UDP-Glucose von der 5'-NT in UMP und Glucose-1-phosphat gespalten. ii) Danach wird UMP von der 5'-NT zu Uridin und Phosphat hydrolysiert. In Teil **b** ist der Reaktionsverlauf der Hydrolyse dargestellt. Die 5'-NT bildet zusammen mit der Glucose-1-phosphatase ein System, das Nucleosid-diphosphatzucker zu Nucleosiden und unphosphorylierten Zuckern hydrolysiert.

1.4.2 Verbreitung

Die 5'-Nucleotidase ist in Bakterien- und Pflanzenzellen weit verbreitet. Genauso kommt sie in fast allen Wirbeltiergeweben vor (als Überblick siehe Zimmermann, 1992). Während die in dieser Arbeit untersuchte 5'-NT, die auch als UDP-Zucker-Hydrolase bekannt ist, nur im Periplasma von *E. coli* vorkommt, existieren in tierischen Zellen cytoplasmatische und extrazelluläre Enzymformen, welche untereinander weder eine hohe Sequenzhomologie noch gleiche biochemische Eigenschaften aufweisen. Die an Membranen lokalisierten Ecto-5'-Nucleotidasen sind glykosyliert und werden über einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) mit der Membran verbunden. Bakterielle 5'-NTs weisen eine niedrige aber dennoch signifikante Sequenzhomologie zu den in tierischen Zellen vorkommenden Ecto-Nucleotidasen auf, was einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und ähnelnde Enzymstrukturen erwarten lässt (Volkmann *et al.*, 1991). Die tierischen cytoplasmatischen 5'-Nucleotidasen sind jedoch nicht mit der 5'-NT aus *E. coli* verwandt.

1.4.3 Physiologische Funktionen

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.4.1), dient die *E. coli* 5'-NT wahrscheinlich der Aufnahme von extrazellulären Nucleotiden zur Verwertung durch die Zelle. Menschliche Ecto-5'-NT (CD73) ist in der Lage, gemeinsam mit anderen GPI-verankerten Proteinen T-Zellen zu aktivieren (Thompson *et al.*, 1989) und spielt außerdem eine Rolle bei der Adhäsion von Lymphozyten an das Endothelium (Airas *et al.*, 1995). Diese Funktionen sind nicht von der Phosphatase-Aktivität der 5'-NT abhängig. Eine weitere wichtige Funktion der an Membranen verankerten 5'-Nucleotidasen ist die Beteiligung an der Hydrolysekaskade von ATP zu Adenosin, bei Zell-Zell-Interaktionen und der transmembranen Signalübertragung. Neben ihren vielen wichtigen zellulären Funktionen, wie beispielsweise im Energiestoffwechsel, dienen ATP und Adenosin als extrazelluläre Botenstoffe. Nicht nur ATP, sondern auch andere Nucleotide (ADP, UTP, Ap₄A) werden von Nerven- und Gliazellen als Neurotransmitter (extrazelluläre Botenstoffe) im Nervensystem ausgeschüttet. ATP wird dabei von der Präsynapse in den synaptischen Spalt entlassen und bindet an einen ATP-Rezeptor, der sich auf der Postsynapse befindet (Abbildung 3). Diese Rezeptoren (P₂-Rezeptoren) finden sich in einer großen Anzahl von Geweben, einschließlich dem Herzgefäßsystem, im Muskel und im Nervensystem (Zimmermann, 1992). Die Hydrolyse und die damit verbundene Beendigung der Neurotransmitteraktivität wird durch membrangebundene Ecto-Nucleotidasen oder ebenfalls in den synaptischen Spalt freigesetzte

Nucleotidasen (ATPase, ADPase, ATP-Diphosphohydrolase, 5'-Nucleotidase) katalysiert. Dabei wird ATP über ADP zu AMP und letztendlich zu Adenosin hydrolysiert (Abbildung 3).

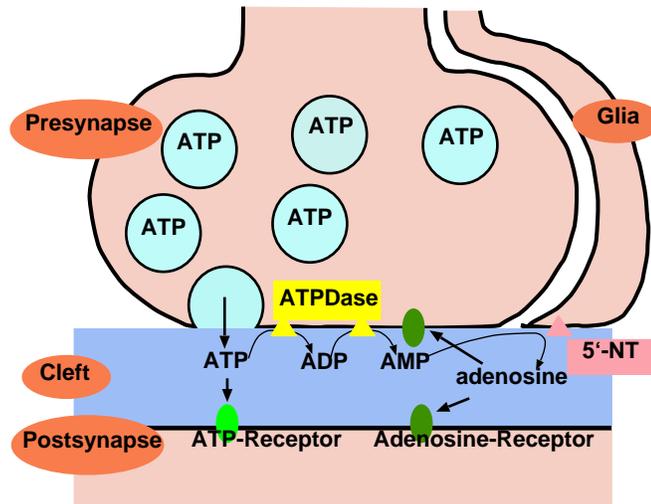


Abbildung 3: Funktion der Ecto-Nucleotidasen im Nervensystem. ATP spielt im Nervensystem eine wichtige Rolle als Neurotransmitter. Dort wird es von den Nerven- und Gliazellen in den synaptischen Spalt freigelassen. Membrangebundene oder lösliche, gemeinsam mit den Transmittern ausgeschüttete Nucleotidasen beenden mittels Hydrolyse die Neurotransmitteraktivität. Hierbei wird ATP über ADP zu AMP hydrolysiert und AMP schließlich durch Katalyse mittels 5'-NT zu Adenosin.

Generell wird angenommen, daß diese Enzyme die Neurotransmitteraktivität von ATP im Gehirn und im Körper regulieren bzw. beenden (Kennedy *et al.*, 1997). Da ATP mit einer Vielzahl von weiteren Neurotransmittern, wie beispielsweise Noradrenalin, Serotonin oder Acetylcholin, ausgeschüttet wird und deren Aktivität durch Adenosin inhibiert werden kann, wird den synaptischen Ecto-Nucleotidasen eine generelle Funktion bei der Autoinhibierung der nervlichen Impulsübertragung eingeräumt (Richardson *et al.*, 1987). Wie von Richardson und Mitarbeitern (1987) gezeigt werden konnte, ist die Hydrolyse von AMP durch Ecto-Nucleotidasen ein wichtiger Schritt in der von Adenosin ausgelösten Autoinhibierung der Neurotransmitterausschüttung von Acetylcholin und ATP in den cholinergischen Nervenenden des Striatums von Ratten. Gleichartige extrazelluläre Phosphohydrolase-Aktivitäten konnten ebenfalls in anderen Zellsystemen (Pearson *et al.*, 1987) einschließlich der cholinergischen Nervenenden im Zitterrochen (Zimmermann *et al.*, 1979) beobachtet werden. Bei der Untersuchung der striatalen cholinergischen Nervenenden kontrolliert die 5'-NT die Bildung von Adenosin aus freigesetztem ATP und bildet so den die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmenden Schritt bei der Hydrolyse von ATP (Richardson *et al.*, 1987). Somit stellen die löslichen, gemeinsam mit ATP ausgeschütteten Nucleotidasen einen neuen Mechanismus zur Inaktivierung der Neurotransmitteraktivität zur Verfügung (Kennedy *et al.*, 1997; Todorov *et al.*, 1997). Zusätzlich zu dieser

Funktion besitzt Adenosin eine Vielzahl von weiteren physiologischen Aufgaben. So ist Adenosin beispielsweise an der Inhibierung der Reninausschüttung, der Unterdrückung der allergischen Immunantwort und der Lipolyse über P₁-Rezeptoren beteiligt (Zimmermann, 1992).

1.4.4 Verwandte Enzyme

E. coli 5'-NT ist nicht nur verwandt mit tierischen 5'-Nucleotidasen, sondern ebenso mit 2'-3'-Phosphodiesterasen und Apyrasen, die zu der Familie der 5'-Nucleotidasen gehören. Charakteristische Sequenzmotive in der Sequenz der 5'-NT aus *E. coli* deuten weiterhin auf ihre Zugehörigkeit zu einer großen Superfamilie von Metallophosphoesterasen (Abbildung 4; Klabunde *et al.*, 1996; Koonin, 1994), welche ein dinukleares katalytisches Metallzentrum besitzen, das am Carboxy-Terminus eines $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motivs lokalisiert ist.

			*		*	*		*		*	*
KB PAP	PHAVU	131	GLIGDLGQSF	17	VLVFGDLSYADR	26	WTAGNHEIEF	76	VLMHSPLY	28	VFAGHMHAYE
UF	SCHWEIN	10	VAVGDWFFVFN	27	ILSLGDNFYFTG	25	VLAGNHDHLG	84	VAGHYPPVM	26	YLCGHDLNQLQ
			*	*	*		*		*		*
EXO1	BPT4	4	LNLGDMLGVK	29	WIQYGDIFDVRK	24	TIVGNHDLHY	60	CVGHWELN	23	VWSGHFHITIS
CPDP	ECOLI	27	METTDLHSNMM	33	LVDNGDLIQGSP	29	GTLGNHEFN	100	VLAHSGLS	23	IMFGHAHAVF
SBCD	ECOLI	4	LHTSDMLGQN	28	IIVAGDVFDTGS	23	VLAGNHDSVA	92	ATGHITTV	29	IALGHITHRAQ
ASM	MENSCH	202	LFLTDLHWDHD	16	VYWTGDIPAHDV	29	PAVGNHESIP	98	IIGHIPPG	23	QFFGHITHVDE
DBR1	HEFE	7	AVQGCCIGQLN	17	LILLGDFQSIRD	34	FIGGNHESMR				WLSAHLHVRF
			*	*	*		*		*		*
PP1	MENSCH	60	KICGDTHGQYY	16	YLFLGDYVDRGK	21	LLRGNHECAS	40	FCCHGGLS	66	ICRAHQVVED
PP2B	RIND	85	TVCGDTHGQFF	16	YLFLGDYVDRGY	21	LLRGNHECRH	40	LCVHGGLS	73	ILRAHEAQDA
PP1	BPL	16	WVVGDLHGQCYT	17	LISVGDLLVDRGA	13	LLRGNHEQMM	55	VICHADYP	38	FIFGHITPAVK
USHA	ECOLI	37	LHTNDHGHGFW	31	LLSGDINTGVP	21	MAIGNHEFDN	92	AATHMGHY	26	IVGGHSQDPV
APAH	ECOLI	4	YLIGDVHGQCYD	17	LWLTGDLVARGP	17	LVLGNHDLHL	53	AFGHWASL		
HNTD	MENSCH	32	LHTNDVHSRLE	37	LLDAGDQYQGTI	21	MALGNHEFDN	94	ALGHSGFE	14	VVGGHSNTFL
VNTD	VIBPA	41	LHTNDHGRFW	31	LLSGDINTGVP	21	MALGNHEFNP	94	HMGHYENG	22	IVGGHSQEPV
RDGC	DM	154	TVCGDLHGKLD	17	YVFNGDYVDRGK	21	LRNGNHEDSV	43	LIVHGGS	80	VIRSHHECKPN

Abbildung 4: Charakteristische Sequenzmotive von Metallophosphoesterasen (Klabunde *et al.*, 1996). Die Zahlen auf der linken Seite geben die Position der ersten aufgeführten Aminosäure an. Die Nummern zwischen den Regionen zeigen die Anzahl der Reste an, die zwischen den Regionen liegen. Konservierte Reste sind schwarz unterlegt und Metall-koordinierende Reste sind durch Sterne markiert. Die überlagerten Sequenzen sind: KB PAP, *P. vulgaris* (P80366); UF, Uteroferrin (P09889); EXO1, Bakteriophage T4 Exonucleaseprotein GP47 (P04521); CPDP, *E. coli* 2',3'-Nucleotid-2'-Phosphodiesterase (P08331); SBCD, *E. coli* Exonuclease (P13457); ASM, *H. sapiens* Sphingomyelin-Phosphodiesterase (P17405); DBR1, *S. cerevisiae* RNA debranching Enzym (P24309); PP1, *H. sapiens* Proteinphosphatase Typ-1 (A46240); PP2B, Rinder-Proteinphosphatase Typ-2B (Griffith *et al.*, 1995); PPI, Bakteriophage I-Proteinphosphatase (Zhuo *et al.*, 1993); USHA, *E. coli* UDP-Zucker-Hydrolase (P07024); APAH, *E. coli* Bis-(5'-Nucleosyl)-tetraphosphatase (P05637); HNTD, *H. sapiens* 5'-Nucleotidase (P21589); VNTD, *V. parahaemolyticus* 5'-Nucleotidase (P22848); RDGC, *D. melanogaster* retinales Abbauprotein (M89628).

Aus der Superfamilie der $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Metallophosphoesterasen sind bereits die Strukturen dreier Proteine mit Hilfe röntgenkristallographischer Methoden gelöst worden: (i) die violette saure Phosphatase aus der Kidneybohne (Sträter *et al.*, 1995; Klabunde *et al.*, 1996), aus der Ratte

(Lindqvist *et al.*, 1999; Uppenberg *et al.*, 1999) und aus dem Schwein (Guddat *et al.*, 1999), (ii) die Ser/Thr-Proteinphosphatase 1 (Goldberg *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1995) sowie (iii) die Ser/Thr-Proteinphosphatase 2B (Kissinger *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995), die auch unter dem Namen Calcineurin bekannt ist. Abbildung 5 zeigt ein Faltungsdiagramm der violetten sauren Phosphatase aus dem Schwein, welche das $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiv und zwei Eisen(III)-Atome im aktiven Zentrum besitzt.

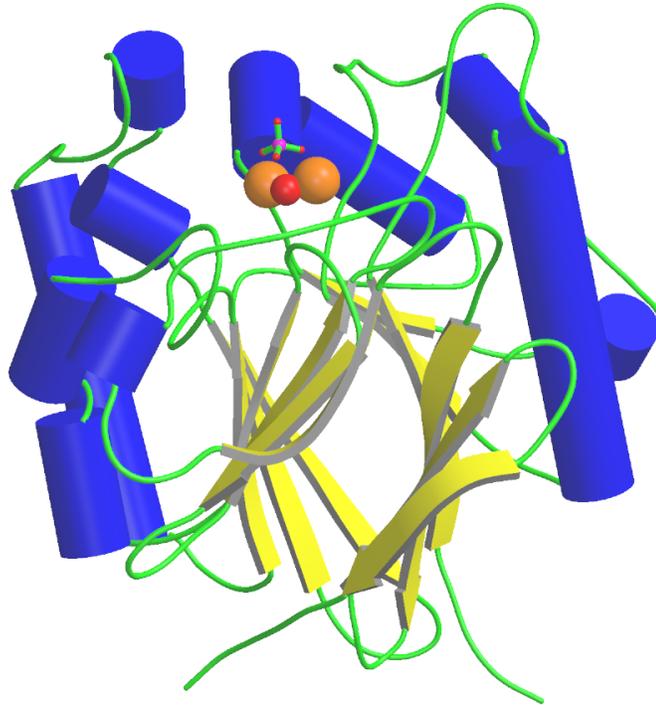


Abbildung 5: Faltungsdiagramm der violetten sauren Phosphatase aus dem Schwein (Guddat *et al.*, 1999). Helices sind als blaue Zylinder und β -Stränge sind gelb dargestellt, Biegungen (*turns*) und Schlaufen in grün. Die Fe-Atome sind als orangefarbene Kugeln und das Metall-verbückende Sauerstoffatom ist als rote Kugel gezeichnet (PDB-Code 1ute).

1.5 Domänenbewegung und Proteinfunktion

Nahezu alle großen Proteine bestehen aus kompakt gefalteten Domänen, die über wenige (oft nur ein) Sekundärstrukturelemente wie Schlaufen oder Helices miteinander verbunden sind. Betrachte man diese Domänen einzeln für sich, so können sie als relative starre unbewegliche Körper betrachtet werden, die oft über eine flexible Zwischendomänenregion verbunden sind. Dieser strukturelle Aufbau ermöglicht den Proteinen eine gewisse Dynamik, ohne Verlust ihres inneren Faltungsaufbaus und der damit verbundenen Funktionalität. Bewegungen einzelner Domänen, die durch Veränderungen der Struktur der Interdomänenregion hervorgerufen

werden, findet man bei vielen grundlegenden Funktionen der Proteine. Beispielsweise spielt die Domänenbewegung eine Rolle bei Motorproteinen, der Katalyse, Regulation der Proteinaktivität und dem Transport von Stoffwechselprodukten. Oft ist die Bindung von Substraten und das Freisetzen der Produkte mit einer Domänenbewegung verknüpft (Janin & Wodak, 1983; Benett & Huber, 1984).

Die Analyse von Proteinkristallstrukturen hat ergeben, daß Domänenbewegungen in zwei verschiedenen Formen auftreten: (i) gelenkartige Bewegungen in β -Strängen, β -Faltblättern und α -Helices, welche aufgrund der Tertiärstruktur des Proteins keinen Packungswechselwirkungen unterliegen und (ii) scherartige Bewegungen zwischen dicht gepackten Segmenten des Polypeptids (Gerstein *et al.*, 1994). Der typische Gelenkmechanismus gleicht einer Drehung um ein Gelenk, wobei die Bewegung senkrecht zur Ebene des Domäneninterfaces verläuft. Dabei kommt es zu starken Veränderungen von wenigen Hauptketten-Torsionswinkeln, die große Domänenrotationen von bis zu 150° zur Folge haben. Dagegen kommt es bei der Scherbewegung zu geringen Veränderungen von vielen Hauptketten-Torsionswinkeln, die eine Bewegung der Domänen parallel zur Ebene des Interfaces bewirken.

1.6 Ausgangspunkt und Gliederung dieser Arbeit

Die 5'-Nucleotidasen (5'-NTs) sind aufgrund ihres dinuklearen Metallzentrums von großem Interesse für die bioanorganische Chemie hinsichtlich des Verständnisses des Mechanismus der Phosphatesterhydrolyse mit zwei Metallionen. Sie gehört zur Gruppe der Metallophosphoesterasen, aus der bereits einige Ser/Thr-Proteinphosphatasen und violette saure Phosphatasen strukturell aufgeklärt wurden (Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Sträter *et al.*, 1995; Guddat *et al.*, 1999; Uppenberg *et al.*, 1999; Lindqvist *et al.*, 1999). Für diese Proteine wurden mehre prinzipiell unterschiedliche Reaktionsmechanismen vorgeschlagen (Sträter *et al.*, 1996), die besonders im Fall der Protein-Phosphatasen bisher kaum durch aufschlußreiche strukturelle Versuchsergebnisse gesichert werden konnten und im wesentlichen auf Strukturen der nativen Proteine oder Enzym-Phosphat bzw. Enzym-Wolframat-Komplexen beruhen. Für die violetten Phosphatasen liegen allerdings auch eine Vielzahl an kinetischen Untersuchungen vor (Sträter *et al.*, 1996).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die dreidimensionale Struktur der 5'-NT aus *E. coli* mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen. Dabei sollen insbesondere auch die Unterschiede zu den Ser/Thr-Proteinphosphatasen und den violetten Phosphatasen analysiert

werden. Um Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus der 5'-NT und möglicherweise der verwandten Enzyme zu erhalten, sollen Komplexe des Proteins mit Substraten oder Substratanaloga strukturell analysiert werden. Im Unterschied zu den Ser/Thr-PPs und den violetten Phosphatasen stehen für die 5'-NT Inhibitoren zur Verfügung, mit denen die Substratbindung strukturell untersucht werden kann. Dabei soll die strukturelle Untersuchung dieses bakteriellen Enzyms auch Hinweise auf die Struktur von 5'-NTs aus anderen Organismen liefern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in vier Abschnitten (3 bis 6) vorgestellt und diskutiert. Abschnitt 3 handelt von der Proteinreinigung und Kristallisation und beschreibt, auf welche Art die 5'-NT isoliert und fünf verschiedene Kristallformen erhalten wurden.

Wie sich herausstellte, kristallisiert die 5'-Nucleotidase in zwei sich deutlich unterscheidenden Konformationen. Sie werden als offene und geschlossene Konformation bezeichnet. Abschnitt 4 beschreibt die Strukturlösung und Struktur der offenen Konformation der Kristallform I und II, wobei Kristallform II die erste Struktur des Enzyms lieferte. Kristallform I wurde mit Hilfe von Struktur II gelöst, allerdings mit einer höheren Auflösung. In Abschnitt 5 wird die Strukturbestimmung der geschlossenen Konformationen des Proteins behandelt, in der auch die Strukturen eines Enzym-Produkt und Enzym-Inhibitor-Komplexes analysiert wurden. Diese besitzen aufgrund einer Domänenrotation eine grundlegend andere Konformation im Vergleich zur offenen Konformation der 5'-NT.

Einen weiteren Schwerpunkt bildet daher Abschnitt 6 mit der Beschreibung der Domänenrotation, in der die offene mit der geschlossenen Konformation verglichen und diskutiert wird. Insgesamt wurden neun Konformationen in vier Kristallformen untersucht. Die inaktive offene Konformation kristallisiert in einer orthorhombischen Kristallform II mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit (IIa und IIb), sowie in einer tetragonalen Kristallform I mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die geschlossenen aktiven Konformationen kristallisieren in einer orthorhombischen Kristallform III mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit (IIIa und IIIb), sowie in einer triklinen Kristallform IV mit vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit (IVa, IVb, IVc und IVd).