

## 5 Strukturanalyse der geschlossenen Konformation

Die Kokristallisation der 5'-NT mit Adenosin und Phosphat in der Kristallform III führte zur Bildung eines Enzym-Produktkomplexes mit einer völlig veränderten Orientierung der C-terminalen Domäne relativ zur N-terminalen Domäne im Vergleich mit den beiden zuvor bestimmten Strukturen der Kristallformen I und II. Auch die Kokristallisation der 5'-NT mit dem Inhibitor  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP in der Kristallform IV unter Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes führte zu dieser neu beobachteten Orientierung der N- und C-terminalen Domänen. Die in den beiden Enzymkomplexen beobachtete Struktur wird im Folgenden als geschlossene oder aktive Konformation der 5'-NT bezeichnet, da sich die Bindungstasche, die sich in der C-terminalen Domäne befindet, nun mit dem darin gebundenen Produkt oder Inhibitor im Bereich des aktiven Zentrums befindet, wodurch eine Katalyse möglich wird.

### 5.1 Strukturlösung

#### 5.1.1 Datensammlung

Die Datensammlung des orthorhombischen Kristalls (III), der mit Adenosin und Phosphat in Gegenwart von Manganionen kokristallisiert und in einen Tieftemperaturpuffer überführt wurde, geschah am EMBL in Hamburg (DESY) an der Meßstation X11 an einem MAR Imageplate-Detektor bei 100 K. Die trikline Kristallform IV des Inhibitor-Komplexes wurde an Meßstation BW7B (DESY in Hamburg), die ebenfalls mit einer MAR Image-Plate ausgestattet war, aufgenommen. Auch hier wurde der Kristall zuvor in einen Tieftemperaturpuffer überführt und anschließend bei 100 K gemessen. Die Datenreduktion wurde mit den Programmen DENZO und SCALEPACK durchgeführt. Tabelle 16 listet die kristallographische Datenstatistik des Produkt- und Inhibitor-Komplexes.

#### 5.1.2 Inhalt der Elementarzelle und Molekularer Ersatz

Die Bestimmung der Raumgruppe zu  $P2_12_12_1$  konnte eindeutig mit Hilfe der Programme DENZO, SCALEPACK und XPREP für die orthorhombischen Kristalle III getroffen werden. Schwieriger war dagegen die Raumgruppenbestimmung der triklinen Kristalle IV. Neben dem triklinen Gitter wurde auch ein C-zentriertes monoklines Gitter vorgeschlagen (DENZO, XPREP). Die Datenreduktion und Skalierung der symmetrieäquivalenten Reflexe ergab jedoch für die Auswertung für das monokline Gitter wesentlich höhere  $R_{\text{sym}}$ -Werte (21.5 % für den gesamten

Auflösungsbereich und > 30 % ab einer Auflösung von  $d < 2.7 \text{ \AA}$ ). Zum Vergleich, der  $R_{\text{sym}}$ -Wert der letztendlich gewählten triklinen Raumgruppe P1 beträgt 3.8 % (> 30 % bei  $d < 1.90 \text{ \AA}$ ). Die hohen  $R_{\text{sym}}$ -Werte in C2 zeigen, daß der Datensatz nicht der Laue-Symmetrie 2/m entspricht und daher triklin ist.

Tabelle 16: Datenstatistik der Datensätze III-ADE und IV-AMPCP.

Datensammlung	III-ADE	IV-AMPCP
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P1
Temperatur (K)	100	100
Wellenlänge (Å)	0.9116	0.8445
max. Auflösung (Å)	2.10	1.85
Gemessene Reflexe	459251	763701
Unabhängige Reflexe	69235	203784
Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>	99.5 (97.2)	97.1 (93.2)
$R_{\text{sym}}$ (%) <sup>a, b</sup>	5.4 (29.8)	3.8 (39.0)

<sup>a</sup>In Klammern angegebene Werte beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung

<sup>b</sup> $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$ .

Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten  $V_m$  ergibt für die orthorhombische Kristallform einen Wert von 2.5 unter der Annahme, daß sich zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit befinden (die Anzahl der asymmetrischen Einheiten pro Zelle ist 4). Somit liegen in der asymmetrischen Einheit zwei Monomere vor und der Solvensgehalt berechnet sich zu etwa 51 % (berechnet mit einer Proteindichte von 1,23 g/ml). Für die triklin Kristallform berechnet sich  $V_m$  zu 2.7, da angenommen wird, daß sich vier kristallographisch unabhängige Monomere in der asymmetrischen Einheit befinden. Damit liegt der Solvensgehalt bei ungefähr 54 % (angenommene Proteindichte 1.23 g/ml).

Die Strukturaufklärung beider Enzymkomplexe erfolgte mit der Methode des molekularen Ersatzes. Als Suchmodell diente die vollständig verfeinerte Struktur der tetragonalen Kristallform I. Die Rotationssuche mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) ergab zuerst keine hervorstechenden Orientierungen für die zwei gesuchten Moleküle der Form III. Erst die Aufspaltung des Suchmodells in die N-terminale (Reste 25 bis 355) und C-terminale Domäne (Reste 356 bis 550) als separate Suchmodelle führte zum gewünschten Erfolg. Allerdings ergab die Rotationssuche nur eine Orientierung mit Peakhöhen von 20.4 und 10.6  $\sigma_{\text{rms}}$  für die Rota-

tionsfunktion der N- und C-terminalen Domänen. Die nachfolgende Orientierung besaß ein  $\sigma_{\text{rms}}$  von 12.5/7.9. Die Translationssuche in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  zeigte für die erste Orientierung eine Lage des N-Terminus mit einem klaren Maximum, das einen Korrelationskoeffizienten von 0.48 und einen kristallographischen R-Wert von 44.2 % besaß. Dagegen ergab die Translationssuche für die C-terminale Domäne (als Suchmodell diente alleine die C-terminale Domäne) keine so guten Werte (Korrelationskoeffizienten von 0.23, R-Wert von 53.7 %). Die Suche nach der Lage der zweiten N-terminalen und C-terminalen Domäne in der asymmetrischen Einheit führte mit der zweiten Orientierung ( $\sigma_{\text{rms}}$  von 12.5/7.9) zu keiner geeigneten Lage. Auch hier diente entweder die N-terminale oder die C-terminale Domäne als Suchmodell. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei 0.24 und die R-Werte berechneten sich zu 54 % für beide Domänen. Auch für andere gefundene Orientierungen ergaben sich keine besseren Lösungen. Zur Lösung dieses Problems wurde die dazugehörige symmetrieäquivalente Lösung der ersten Orientierung ( $\sigma_{\text{rms}} = 20.4/10.6$ ) aus der Rotationssuche, verwendet. Auf diesem Wege konnte die zweite Lage der zweiten N-terminalen bzw. der zweiten C-terminalen Domäne in der asymmetrischen Einheit identifiziert werden (Korrelationskoeffizient betrug 0.47/0.23 und R-Wert von 44.9/53.9 %). Mit Hilfe einer starren Körper Verfeinerung der Atomkoordinaten mit AMORE konnten die Orientierungen und Lagen der Domänen dahingehend verbessert werden, daß die Korrelationskoeffizienten auf 0.52/0.27 angehoben und der R-Wert auf 42.5/53.6 % gesenkt wurden. Die so erhaltenen Orientierungen und Lagen der zwei einzelnen N-terminalen und der zwei einzelnen C-terminalen Domänen wurden mit dem Programm PDBSET auf die benutzten Suchmodelle angewendet, um sie in die richtigen Orientierungen zu rotieren und in die richtigen Lagen zu translatieren. Die so erhaltenen Atomkoordinaten für die einzelnen N- und C-terminalen Domäne wurden anschließend im Programm O dargestellt, damit die beiden zusammengehörenden N- und C-terminalen Domänen identifiziert werden konnten. Diese wurden nun jeweils in einer Koordinatendatei für jedes Monomer (IIIa und IIIb) vereint.

Nachfolgend wurde der molekulare Ersatz mit einem der beiden so erhaltenen Monomere in AMORE durchgeführt. Die Rotationssuche ergab zwei symmetrieäquivalente Lösungen ( $\sigma_{\text{rms}}$  von 24.7), von der die erste bei der Translationssuche verwendet wurde und eine Korrelationskoeffizienten von 0.42 und einen kristallographischen R-Wert von 47.8 % ergab. Diese Lösung wurde nun in einer Translationssuche nach dem zweiten Molekül in der asymmetrischen Einheit festgehalten. Als zweite Orientierung wurde die zweite symmetrieäquivalente Lösung aus der Rotationssuche verwendet. Diese führte zur richtigen Lösung, da die Rotationsachse,

die aus der nicht-kristallographischen Symmetrie der beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit herrührt (NCS-Achse), parallel zu einer der 2<sub>1</sub>-Scharaubenachsen verläuft. Dies erklärt, warum die scheinbar „symmetrie-verwandten“ Lösungen die richtigen sind. Auf diesem Wege konnte also die Lage des zweiten Monomers identifiziert werden (Korrelationskoeffizient 0.57, R-Wert 44.9 %). Mit Hilfe einer Starrkörper-Verfeinerung der Atomkoordinaten konnten die Orientierungen und Lagen der beiden Moleküle verbessert werden (Korrelationskoeffizient 0.74, R-Wert 34.5 %).

Als Suchmodell der Kristallform IV mit vier voneinander unabhängigen Molekülen in der asymmetrischen Einheit diente für den molekularen Ersatz mit AMORE ein Molekül der noch nicht-vollständig verfeinerten Kristallform III. Die Rotationssuche ergab vier Orientierungen deren Peakhöhen 26.4, 23.4, 23.3 und 19.2  $\sigma_{\text{rms}}$  in der Rotationsfunktion betragen. Alle vier Orientierungen erwiesen sich bei der Translationssuche als richtig und konnten mittels einer Starrkörper-Verfeinerung, von Korrelationskoeffizienten um 0.24 und R-Werten um 51 % für die einzelnen Lösungen, gemeinsam auf einen Korrelationskoeffizienten von 0.62 und einen R-Wert von 37.6 % verfeinert werden.

### 5.1.3 Kristallographische Verfeinerung

Die kristallographische Verfeinerung erfolgte mittels Moleküldynamik mit dem Programmpaket CNSolve der Version 0.9. Diese wurde mit beiden aktiven Konformationen durchgeführt. Dabei wurde nach jedem Verfeinerungszyklus das erhaltene Modell mit dem Modellbauprogramm O optisch kontrolliert und korrekturbedürftige Bereiche verbessert. Durch Einbezug isotroper Temperaturfaktoren und den Einbau von Wassermolekülen, zweier Adenosinmoleküle und zweier Phosphatmoleküle (Struktur III-ADE) bzw. von vier Inhibitormolekülen in die Differenzelektronendichte der Struktur IV-AMPCP, verbesserte sich der  $R_{\text{free}}$  am Ende der Verfeinerung. Unrealistische Abweichungen der Temperaturfaktoren benachbarter Atome wurden auch hier beschränkt, wobei der Sollwert für die Standardabweichungen zwischen 1.5 und 2.0  $\text{Å}^2$  (unterschiedlich für Haupt- und Seitenkettenatome sowie für Atome, die über eine oder zwei Bindungen verknüpft sind). Es wurden insgesamt 8607 Atome in der orthorhombischen und 17735 Atome in der triklinen Struktur verfeinert. Von den Atomen sind 8200 bzw. 16400 (der erste Wert bezieht sich auf Struktur III-ADE und der zweite auf Struktur IV-AMPCP) Proteinatome, und 355 bzw. 1212 Atome stellen Wassermoleküle (etwa 0.3 bzw. 0.6 Wassermoleküle pro Aminosäurerest) dar. Die Metallionen sind jeweils als  $\text{Mn}^{2+}$  verfeinert

worden ( $\text{MnCl}_2$  wurde dem Kristallisationspuffer beigefügt). Das Ergebnis der Verfeinerung ist in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Tabelle 17: Kristallographische Verfeinerung der Strukturen III-ADE und IV-AMPCP. Die Abweichungen des Modells von der Standardgeometrie (Engh & Huber, 1991) sind als mittlere quadratische Standardabweichungen angegeben.

	III-ADE	IV-AMPCP
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	P1
Zellkonstanten (Å)	$a = 69.9, b = 75.7, c = 221.7$	$a = 89.6, b = 90.1, c = 96.4;$ $\alpha = 110.7^\circ, \beta = 106.5^\circ, \gamma = 107.7^\circ$
Anzahl Proteine pro AU <sup>a</sup>	2	4
Wasseranteil im Kristall (%)	51	54
$F/\sigma_F$ Schranke	-	-
Auflösungsbereich (Å)	50 - 2.10	50 - 1.85
R / $R_{\text{free}}$ (%)	24.1 / 27.8	20.8 / 23.5
Reflexe im Arbeits-/Test-Datensatz	67119 / 2116	196922 / 1981
Anzahl der Atome / $\langle B \rangle$ (Å <sup>2</sup> )		
Protein	8200 / 45.4	16400 / 33.7
Wassermoleküle	355 / 34.5	1219 / 36.6
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.013	0.011
Rmsd Winkel (°)	1.65	1.58
Ramachandran-Ausreißer	T87, H252, H289, W549a	T87, Q161a, H252, H289

<sup>a</sup>AU, asymmetrische Einheit

Am Ende der Verfeinerung enthält die asymmetrische Einheit der Kristallform III die Aminosäuren 26 bis 550 in beiden Molekülen IIIa und IIIb, zwei Phosphationen und zwei Adenosinmoleküle. In der asymmetrischen Einheit der Kristallform IV konnten alle vier Moleküle (IVa, IVb, IVc und IVd) mit den Resten 26 bis 550 einschließlich der vier Inhibitormoleküle in der Elektronendichte identifiziert werden. Auffällig sind die relativ hohen Temperaturfaktoren der Aminosäurereste in den C-terminalen Domänen des Produktkomplexes III, worauf in einem späteren Teil dieser Arbeit noch eingegangen wird. Interessant ist auch, daß im Inhibitor-komplex die Metallbindungsstelle 1, genauso wie in der tetragonalen Struktur I geringer besetzt ist als die benachbarte Bindungsstelle 2. Der Besetzungsunterschied wird bei der Betrachtung der B-Faktoren (in Å<sup>2</sup>) der zwei Metallionen Mn1/Mn2 der vier Monomere deutlich: IVa, 47/26; IVb, 45/24; IVc, 30/20; IVd, 36/22. Auch hier sind die B-Faktoren der Bindungsstelle 2 etwa genauso groß

wie die der Liganden, die beide Metallionen koordinieren. Es liegt also keine ungeordnete Koordinationssphäre des Metallions 1 vor. Im Substratkomplex sind die beiden Metallbindungsstellen dagegen gleich besetzt (IIIa, 23/25 Å<sup>2</sup>; IIIb, 38/40 Å<sup>2</sup>). In den beiden Kristallstrukturen III-ADE und IV-AMPCP liegen bis auf drei Ausnahmen (Thr-87, His-252 und His-289) in allen Molekülen alle ( $\phi$ ,  $\psi$ )-Winkelpaare in den energetisch bevorzugten oder erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms. Auch ist es nicht gelungen Trp-549 in IIIa und Asn-161 in IVa derartig in die Elektronendichte einzupassen, daß sie zu den energetisch begünstigten Regionen gehören (Abbildung 25).

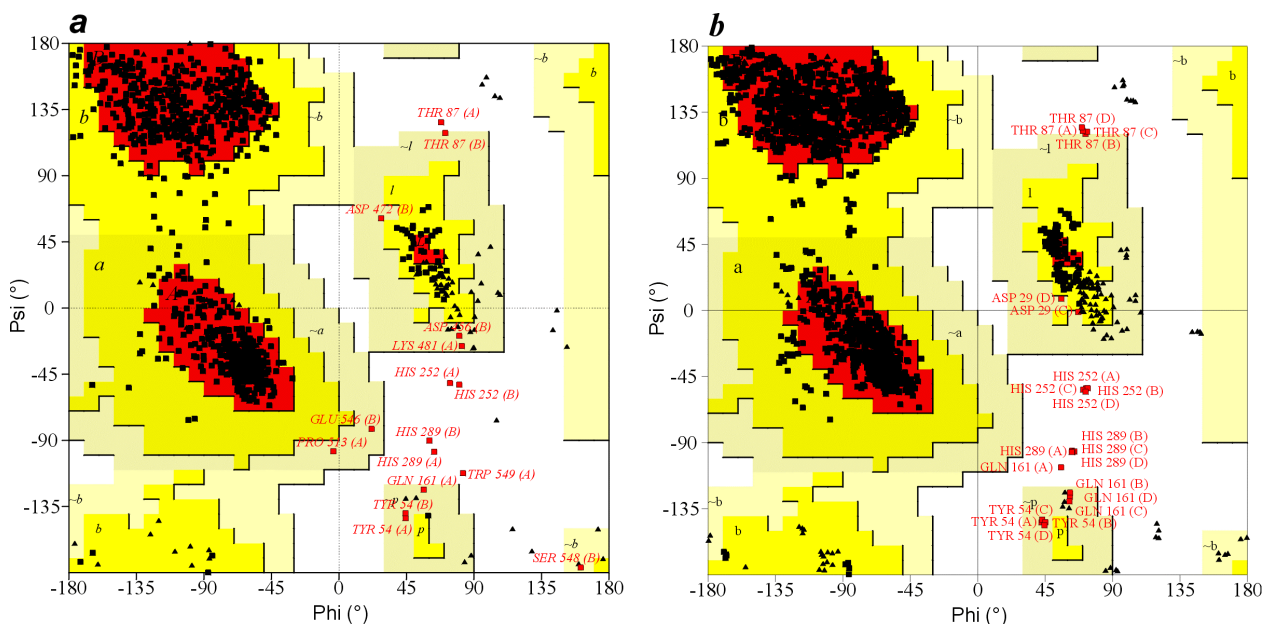


Abbildung 25: Ramachandran-Diagramme der Strukturen III-ADE (a) und IV-AMPCP (b). Die Bereiche sind in energetisch bevorzugte Regionen (A, B, L; rot), in zusätzlich erlaubte Regionen (a, b, l, p; gelb), in weniger erlaubte Regionen (~a, ~b, ~l, ~p; hellgelb) und in verbotene Regionen (weiß) unterteilt. Glycinreste werden durch Dreiecke symbolisiert.

## 5.2 Strukturbeschreibung der Enzymkomplexe

Wie schon erwähnt, liegen die Enzymkomplexe der Kristallform III und IV in einer anderen Konformation vor als in den beiden Kristallformen I und II. Die C-terminale Domäne ist um bis zu 96° in ihrer relativen Orientierung gegenüber der in den offenen Konformationen rotiert. Deshalb war es mit dem Suchmodell der tetragonalen hochaufgelösten Struktur auch nicht möglich, eine Lösung mit Hilfe des molekularen Ersatzes zu finden und erst die Aufspaltung in die N- und C-terminalen Domänen als separate Suchmodelle brachte die korrekten Lösungen. Der Unterschied zwischen den beiden Konformationen wird durch eine Überlagerung aller gemeinsamen

C<sub>α</sub>-Atome deutlich. Während die beiden geschlossenen Konformationen IIIa und IVc mit einer Standardabweichung (rms-Abweichung) von 0.45 Å kaum von einander abweichen, beträgt die Standardabweichung zwischen der offenen Konformation I und der geschlossenen Konformation IIIa 9.90 Å.

### 5.2.1 Tertiärstruktur

Die Untersuchung des inaktiven Substratkomplexes mit ATP in der Kristallform I ergab, daß das ATP-Molekül in einem Abstand von etwa 20 Å zum katalytischen Zentrum gebunden hat (Abbildung 21). Im Gegensatz dazu bindet der Inhibitor  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP in der Struktur IV-AMPCP nahe der Metallionen. In diesem Bindungsmodus ist die  $\beta$ -Phosphatgruppe an eines der beiden Metallionen koordiniert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß es sich bei der offenen Konformation des Enzyms um eine inaktive Form der 5'-NT handelt. Diese Aussage wird durch erste kinetische Untersuchungen an einer Mutante gestützt, die mittels Einführung einer Disulfidbrücke in der inaktiven Form („gefangen“) gehalten wird. Diese Mutante kann durch die Reduktion der Disulfidbrücke mit Mercaptoethanol aktiviert werden (Schultz-Heienbrok, persönliche Mitteilung).

In der geschlossenen Konformation ist die verbindende Helix ( $\alpha 8$ ) in zwei kürzere Helices (Aminosäuren 343 bis 354 und 357 bis 361) gespalten, die über eine kurze Verbindung aus den beiden Aminosäuren 355 und 356 miteinander verknüpft sind (Abbildung 27). Der Bereich zwischen den Aminosäuren 322 und 331, der in der offenen Konformation ungeordnet ist, besitzt in den geschlossenen Konformationen die Struktur eines  $\beta$ -Faltblattes, das sich aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen zusammensetzt. Eine weitere Konformationsänderung, als Folge der Domänenrotation, ist im Schlaufenbereich mit Aminosäurerest 180 zu beobachten (Abbildung 26). Dieser Bereich geht hydrophobe Kontakte mit dem Adeninring der in der geschlossenen Konformation gebundenen Substrate ein. Im Ganzen gesehen hat sich die Faltung der Domänen in der aktiven Konformation nicht verändert, dies zeigt die Überlagerung der N- und C-terminalen Domänen aus den Konformeren IVc und I, deren Standardabweichungen sich zu 0.40 und 0.34 Å berechnen. Die Auswirkungen der Domänenrotation auf die molekulare Oberfläche sind in Abbildung 27b gezeigt. Drei Argininseitenreste (Arg-375, Arg-379 und Arg-410), die an die Phosphatgruppen binden, werden samt Substrat ins aktive Zentrum rotiert. Dabei erhöhen die Argininreste das positive Potential am aktiven Zentrum.

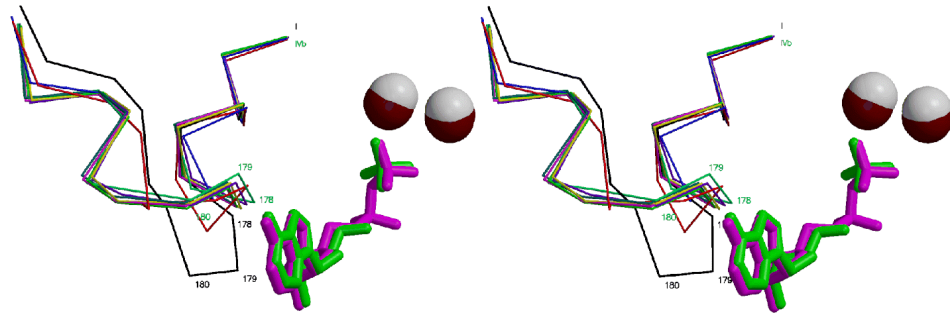


Abbildung 26: Überlagerung des 180iger-Schlaufenbereichs (stereo). Überlagert wurden die Aminosäuren 172 bis 186 der offenen und geschlossenen Konformationen. Konformer I der Struktur I-NAT-1 ist in schwarz dargestellt und Konformer VIb der Struktur IV-AMPCP ist aquamarin. Die Zink- bzw. Manganionen sind in grau bzw. weinrot gezeichnet. Auch überlagert wurden Adenosin und Phosphat (grün) aus Konformer IIIa der Struktur III-ADE mit  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP (magenta) des Konformer IVc der Struktur IV-AMPCP. Der Schlaufenbereich von Konformer IIa ist blau, von IIb rot, von IIIb gelb, von IVa violett und der von IVd ist schieferblau dargestellt.

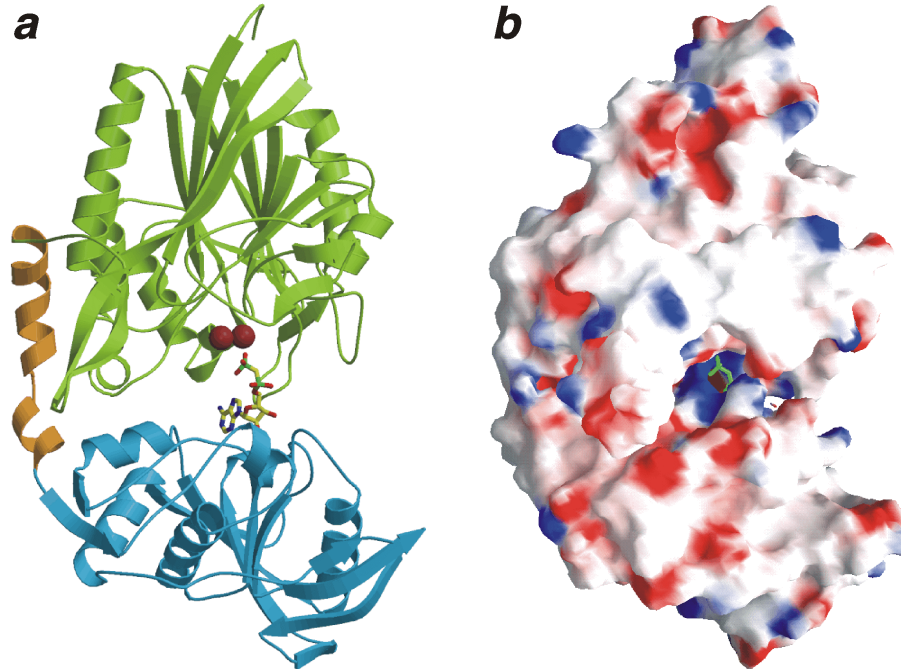


Abbildung 27: Tertiärstruktur und molekulare Oberfläche der aktiven Konformation. **a**, Tertiärstruktur von Konformer IVc mit gebundenem Inhibitormolekül  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP. Unterschiedliche Sekundärstrukturelemente in der offenen und geschlossenen Konformation sind gekennzeichnet. **b**, Molekulare Oberfläche von Konformer IVc (positives Potential ist blau und negatives rot gezeichnet). Drei Arginine sind Teil des aktiven Zentrums und erhöhen das positive Potential der katalytischen Tasche. Das aktive Zentrum ist durch die  $\beta$ -Phosphatgruppe (grün) des  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP, die an ein Metallion koordiniert, markiert.

### 5.2.2 Bindung von Adenosin und Phosphat an das katalytische Zentrum

Die Elektronendichtekarte mit den aus dem endgültigen Modell berechneten Phasen zeigt für das Phosphat und Adenosinmolekül eine starke, gut definierte Dichte (Abbildung 28b). Die



Position des Phosphat- und des Adenosinmoleküls, die aus der Verfeinerung resultiert, ist in Abbildung 28 dargestellt. Im Produktkomplex III-ADE besetzt das Manganion Mn1 die Metallbindungsstelle 1, die in der Kristallstruktur I-NAT, II-NAT und I-ATP-1/2 von Zn1 besetzt ist und Mn2 die Metallbindungsstelle 2, die in den eben genannten Kristallstrukturen von Zn2 besetzt ist. Das tetraedrische Oxoanion (Phosphation) bindet über das Sauerstoffatom O4 monodentat an das Manganion der zweiten Metallbindungsstelle. Die vollständige oktaedrische Koordinationsgeometrie des dinuklearen Metallzentrums ist in Tabelle 18 gelistet. Die oktaedrische Koordinationsgeometrie der beiden Manganionen wird durch zwei Wassermoleküle W1 und W2 vervollständigt. Dabei überbrückt das Wassermolekül W1 beide Metallionen bidentat und W2 bindet monodentat an das Manganion Mn2. Die beiden Metallionen besitzen in Monomer IIIa einen Abstand von 3.62 Å und in Monomer IIIb von 3.60 Å.

Die Region des aktiven Zentrums ist in Abbildung 28 dargestellt. Das bidentat verbrückende Wassermolekül W1 (rote Kugel) ist zwischen den beiden Manganionen (weinrote Kugeln) eingezeichnet und W2 befindet sich links darunter. Gut zu erkennen ist, wie der Adeninring des Adenosinmoleküls mit den beiden Phenylalaninen Phe-429 und Phe-498 eine Stapelwechselwirkung ausbildet und durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wird. Auch bildet der Adeninring mit Asn-431 eine polare Wechselwirkung (Wasserstoffbrückenbindung) aus. Der Ribosezucker wird von Asp-504, Gly-407, Gly-458 und zwei Argininreste Arg-379 und Arg-410 stabilisiert. Die Bindung des Adenosinmoleküls in der Bindungstasche der C-terminalen Domäne entspricht also in etwa der des ATP-Moleküls im Substratkomplex der Kristallform I (vgl. Kapitel 4.4).

Die Bindungsmodi von Adenosin und des Phosphatmoleküls sind in Abbildung 29 und Abbildung 30 schematisch dargestellt. Das O5'-Atom des Adenosinmoleküls, welches die Esterbindung mit dem Phosphat im AMP-Molekül ausbildet, befindet sich im Wasserstoffbrückenabstand zu Arg-379 und Arg-410, was darauf hindeutet, daß die Argininreste maßgeblich an der Katalyse beteiligt sind. Dafür spricht auch die Erhöhung des positiven elektrostatischen Potentials in der Umgebung der Phosphatgruppe durch die drei Argininreste Arg-375, Arg-379 und Arg-410. Sie befinden sich in einem Abstand zwischen 4.0 und 5.4 Å zum Phosphatmolekül. Interessant sind auch die hydrophoben Wechselwirkungen des Ile-178 mit Kohlenstoffatomen des Riboseringes. Damit diese Kontakte möglich sind, muß die 180iger-Proteinschleife mit diesem Rest eine Konformationsänderung durchlaufen. Auch bilden Wassermoleküle (W94 und W204) Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Adeninring aus. Dabei kann

W94 mit zwei Protonen von N6 des Adeninringes wechselwirken und ein Proton von W204 bildet eine Wasserstoffbrücke mit Stickstoffatom N7 des Adeninringes.

Tabelle 18: Koordinationsgeometrie des dinuklearen Metallzentrums des 5'-NT-Komplexes mit Adenosin und Phosphat. Angegeben sind die Mittelwerte über die zwei Monomere IIIa und IIIb der asymmetrischen Einheit.

<b>Koordinationsabstände (Å)</b>						
	Asp-41Oδ2	His-43Nε2	Asp-84Oδ2	Gln-254Oε1	W1	W2
Mn1	2.13	2.17	2.22	2.01	2.29	2.22
	Asp-84Oδ2	Asn-116Oδ1	His-217Nε2	His-252Nδ1	W1	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -O4
Mn2	2.32	2.11	2.20	2.20	2.57	2.24
<b>Koordinationswinkel (°)</b>						
D84-Mn1-Q254		177.4		D84-Mn2-H252		147.6
D41-Mn1-H43		105.1		H217-Mn2-N116		81.2
H43-Mn1-W1		161.5		H217-Mn2-W1		114.6
D41-Mn1-W2		168.2		N116-Mn2-O4		86.0
D84-Mn1-D41		83.0		D84-Mn2-H217		78.8
D84-Mn1-H43		96.4		D84-Mn2-N116		104.5
D84-Mn1-W1		82.8		D84-Mn2-W1		75.2
D84-Mn1-W2		92.1		D84-Mn2-O4		101.3
H43-Mn1-Q254		83.8		W1-Mn2-O4		77.3
W1-Mn1-Q254		97.3		O4-Mn2-H217		165.7
W2-Mn1-Q254		89.0		O4-Mn2-H252		97.4
D41-Mn1-Q254		96.6		W1-Mn2-N116		162.3
W1-Mn1-W2		76.7		W1-Mn2-H252		84.6
D43-Mn1-W2		83.6		N116-Mn2-H252		102.1
D41-Mn1-W1		92.9		H217-Mn2-H252		88.3

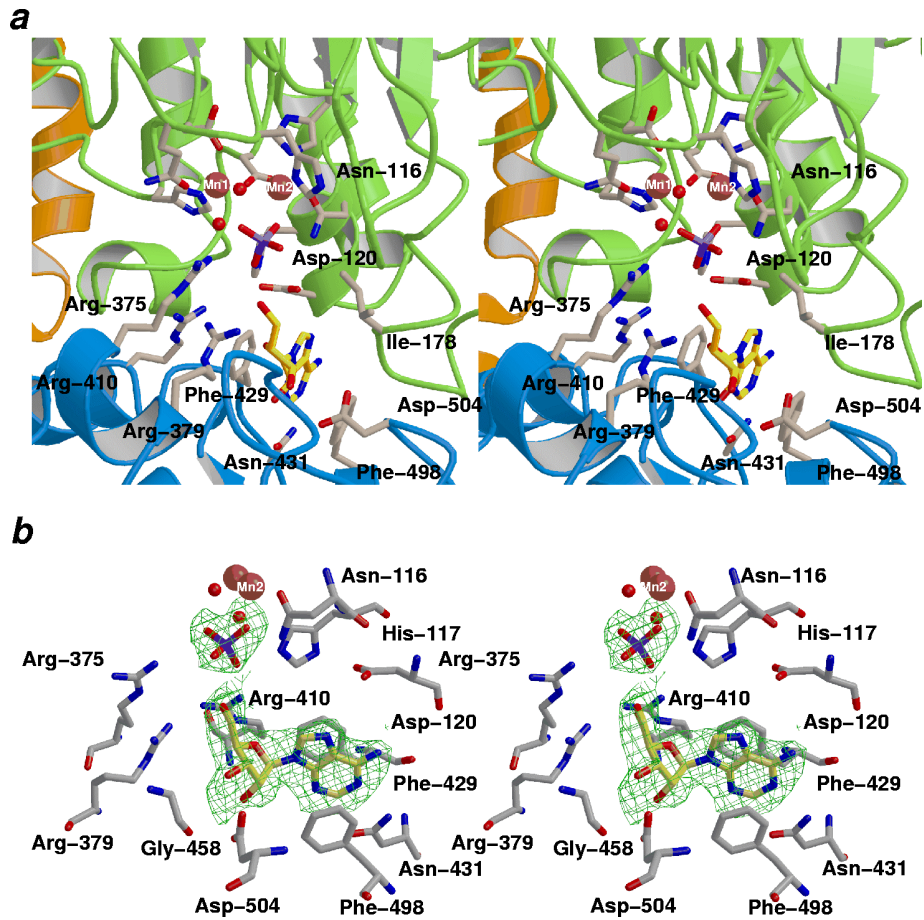


Abbildung 28: Region des aktiven Zentrums des Enzymproduktkomplexes. **a**, Darstellung des Produktkomplexes (Monomer IIIa) in stereo. Adenosin (gelb) und Phosphat (violett) haben in der Region des aktiven Zentrums gebunden. Der Adeninring befindet sich zwischen zwei Phenylalaninen der C-terminalen Domäne (blau). Die beiden Manganionen sind weinrot und die Wassermoleküle sind rot gezeichnet. Wichtige Aminosäurereste sind beschriftet. **b**, Stereodarstellung der  $|F_o| - |F_c| \Phi_c$  Elektronendichtekarte (*Omit*-Dichtekarte) des Adenosin- und Phosphatmoleküls in grün. Die Farbgebung der Moleküle ist die gleiche wie in **a**.

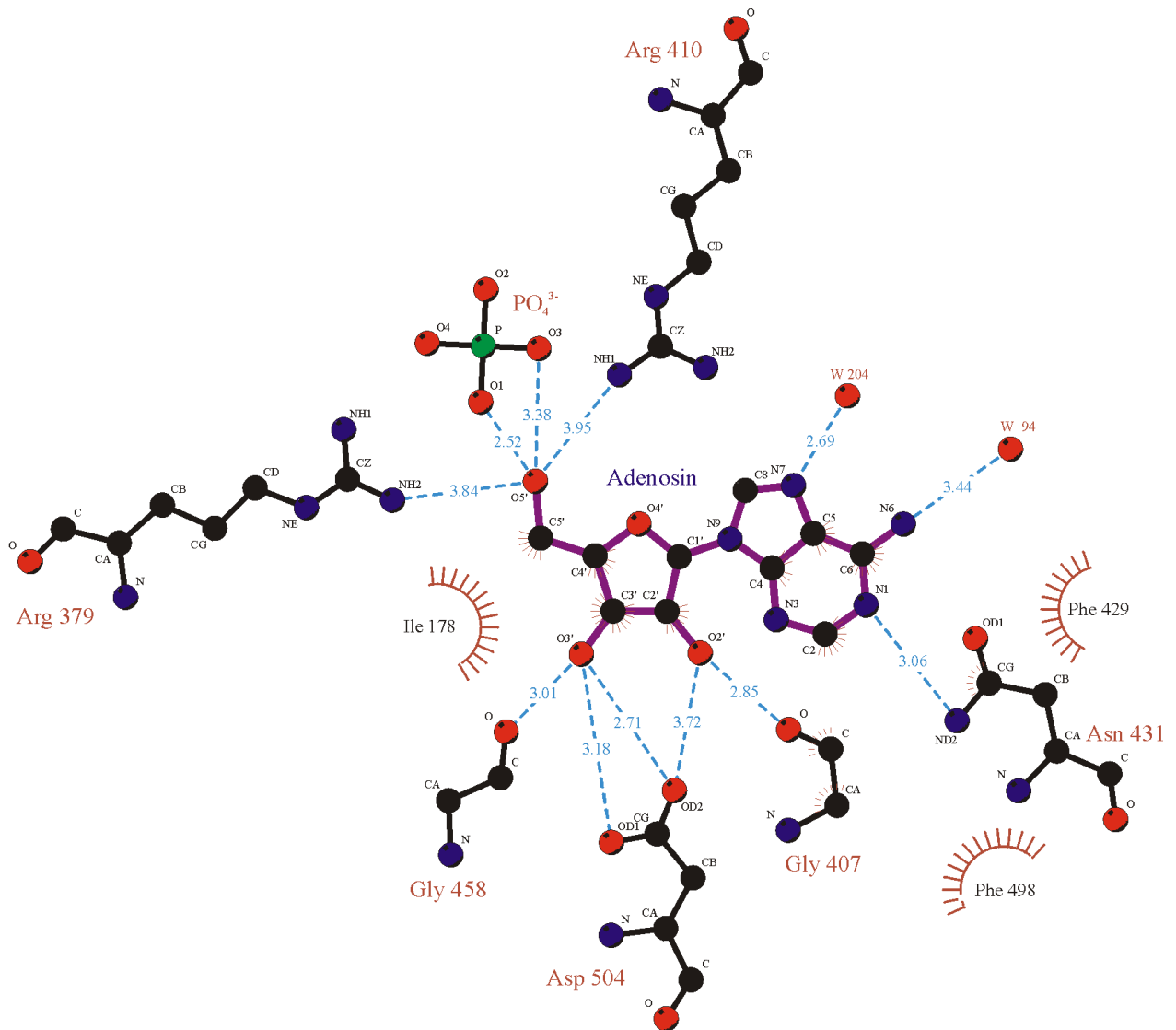


Abbildung 29: Bindungsmodus des Adenosinmoleküls im Enzymproduktkomplex. Schematische Darstellung der polaren (blaue gestrichelte Linien mit Bindungsabständen in Å) und hydrophoben (sonnenartige braune Halbkreise) Wechselwirkungen, die mit dem Programm LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) für Monomer IIIa erstellt wurde. Die Nachbearbeitung erfolgte mit dem Programm O und CORELDRAW (Version 8, Adobe, 1998).

Das Phosphat wird durch drei Wassermoleküle stabilisiert, von denen eines das überbrückende W1-Molekül ist und ein anderes das Molekül W2. Weiterhin ist es monodentat mit Mn2 verbunden, das in der Metallbindungsstelle 2 gebunden ist. Die Reste Asn-116 und His-117 befinden sich in geeigneten Abständen zum Oxoanion, um mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen das Phosphat zu stabilisieren.

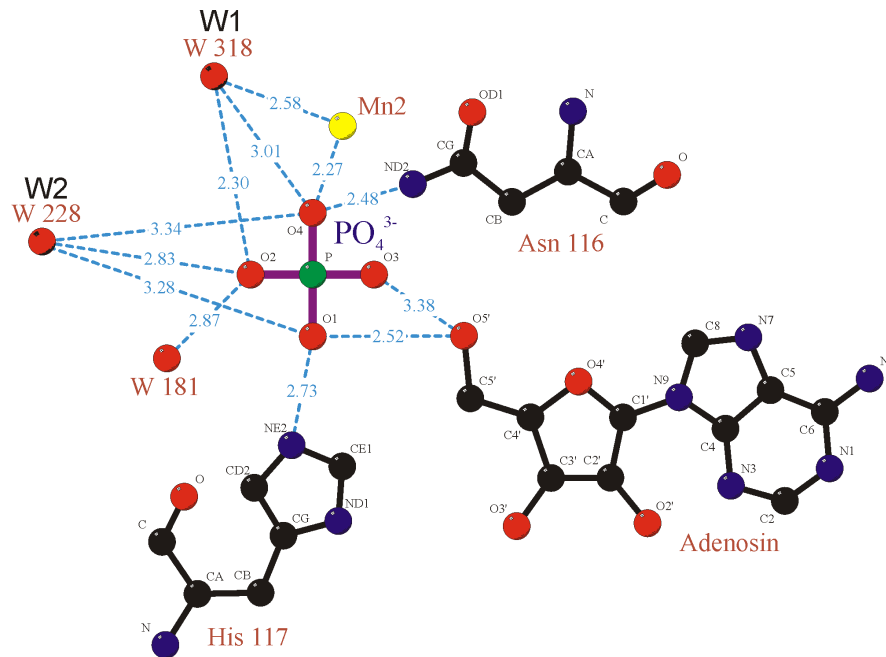


Abbildung 30: Bindungsmodus des Phosphations im Enzymproduktkomplex. Schematische Darstellung der polaren (blaue gestrichelte Linien mit Bindungsabständen in Å) Wechselwirkungen, die mit dem Programm LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) für Monomer IIIa erstellt wurde. Die Nachbearbeitung erfolgte mit dem Programm O und CORELDRAW (Version 8, Adobe, 1998). Die Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt und wurden entsprechend ihrer Bezeichnung in der Koordinatendatei (PDB-File) numeriert. Die beiden an die Metallionen koordinierenden Wassermoleküle sind mit W1 und W2 zusätzlich markiert.

### 5.2.3 Bindung von $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP an das Metallzentrum

Die Elektronendichtekarte mit den aus dem endgültigen Modell berechneten Phasen zeigt für das Inhibitor-molekül  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP eine starke, gut definierte Dichte (Abbildung 32b). Die Position des Inhibitor-moleküls, die aus der Verfeinerung resultiert, ist in Abbildung 32 dargestellt. Das  $\beta$ -Phosphat bindet über das Sauerstoffatom O1 monodentat an das Manganion, welches in der zweiten Metallbindungsstelle gebunden hat. Also bindet das Phosphation genauso wie im Produktkomplex nur an ein Metallion des aktiven Zentrums. Die vollständige oktaedrische Koordinationsgeometrie des dinuklearen Metallzentrums ist in Abbildung 31 dargestellt und in Tabelle 19 gelistet. Die oktaedrische Koordinationsgeometrie der beiden Manganionen wird durch zwei Wassermoleküle W1 und W2 vervollständigt. Dabei überbrückt das Wassermolekül W1 beide Metallionen bidentat und W2 bindet an das Manganion Mn2. Die Abstände der beiden Metallionen wurden in Monomer IVa zu einem Abstand von 3.47 Å, in Monomer IVb von 3.42 Å, in Monomer IVc von 3.47 Å und in Monomer IVc zu 3.40 Å verfeinert.

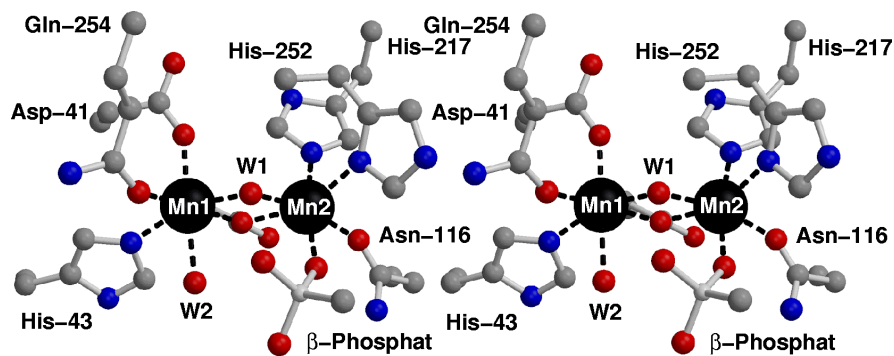


Abbildung 31: Struktur des Mn(II)-Mn(II)-Clusters der Struktur IV-AMPCP. Der Ligand Asp-84, der die beiden Manganionen überbrückt, ist nicht markiert.

Tabelle 19: Koordinationsgeometrie des dinuklearen Metallzentrums der Struktur IV-AMPCP. Angegeben sind die Mittelwerte über die vier Monomere IVa, IVb, IVc und IVd der asymmetrischen Einheit.

#### Koordinationsabstände (Å)

	Asp-41Oδ2	His-43Nε2	Asp-84Oδ2	Gln-254Oε1	W1	W2
Mn1	2.11	2.25	2.35	2.25	2.15	2.46
	Asp-84Oδ2	Asn-116Oδ1	His-217Nε2	His-252Nδ1	W1	P <sub>β</sub> O <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -O1
Mn2	2.31	2.18	2.26	2.28	2.26	2.23

#### Koordinationswinkel (°)

D84-Mn1-Q254	169.5	D84-Mn2-H252	156.6
D41-Mn1-H43	110.6	H217-Mn2-N116	83.8
H43-Mn1-W1	154.7	H217-Mn2-W1	111.6
D41-Mn1-W2	169.2	N116-Mn2-O1	86.1
D84-Mn1-D41	93.1	D84-Mn2-H217	80.2
D84-Mn1-H43	93.8	D84-Mn2-N116	101.8
D84-Mn1-W1	81.6	D84-Mn2-W1	80.3
D84-Mn1-W2	96.2	D84-Mn2-O1	105.6
H43-Mn1-Q254	87.8	W1-Mn2-O1	78.7
W1-Mn1-Q254	92.2	O1-Mn2-H217	169.1
W2-Mn1-Q254	80.2	O1-Mn2-H252	92.0
D41-Mn1-Q254	95.6	W1-Mn2-N116	164.6
W1-Mn1-W2	81.3	W1-Mn2-H252	88.4
D43-Mn1-W2	79.9	N116-Mn2-H252	94.6
D41-Mn1-W1	94.5	H217-Mn2-H252	85.1

In Abbildung 32 ist die Region des aktiven Zentrums wiedergegeben. Der Bindungsmodus des  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP in der Bindungstasche der C-terminalen Domäne ist sehr gut im Einklang mit dem Bindungsmodus des Adenosin-Phosphat-Komplexes und des ATP-Substratkomplexes (Abbildung 33). Auch hier tritt wieder die typische Stapelanordnung aus Phe-429, Adeninring und Phe-498 auf. Die drei Argininreste (Arg-375, Arg-379 und Arg-410) bilden polare Kontakte zu den Sauerstoffatomen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphatgruppe des Inhibitormoleküls aus und auch die bereits genannten Ribose und den Adeninring bindenden Reste (Asp-504, Gly-458 und Asn-431) befinden sich in geeigneten Abständen, um Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Inhibitor einzugehen.

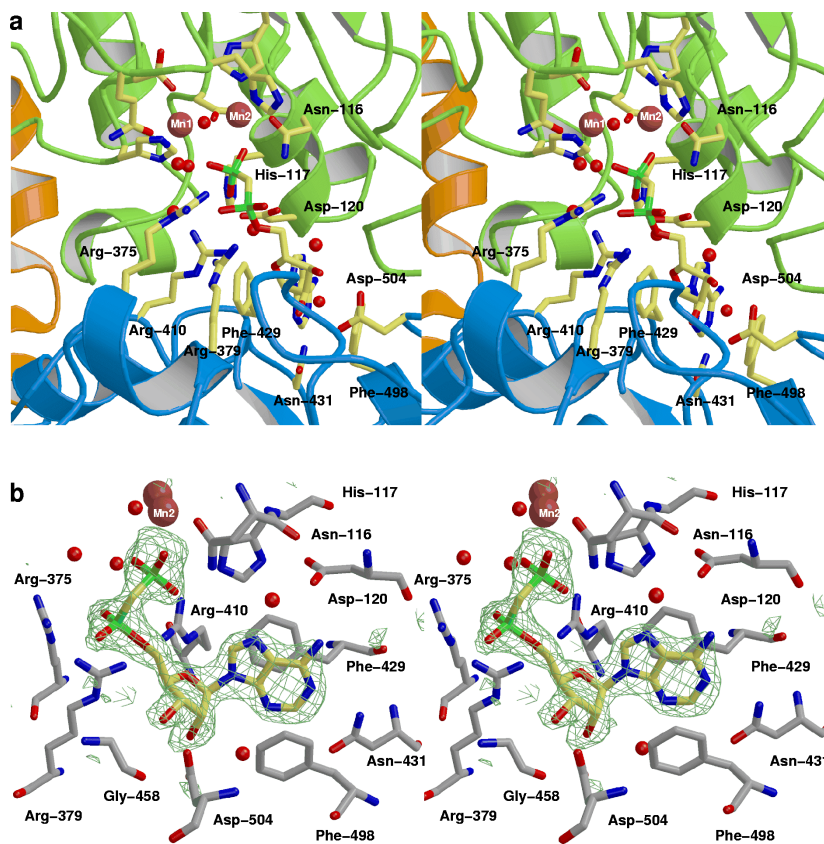


Abbildung 32: Region des aktiven Zentrums der Struktur IV-AMPCP. **a**, Darstellung des Inhibitorkomplexes (Monomer IVc) in stereo.  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP hat in der Region des aktiven Zentrums gebunden. Die beiden Manganionen sind weinrot und die Wassermoleküle sind rot gezeichnet. Wichtige Aminosäurereste sind beschriftet. **b**, Stereodarstellung der  $|F_o| - |F_c| \Phi_c$  Elektronendichtekarte (*Omit*-Dichtekarte) des Inhibitor-moleküls  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP in grün. Die Kohlenstoffatome des Inhibitors sind gelb und die der wechselwirkenden Reste sind grau dargestellt. Wassermoleküle sind als rote Kugeln und die Manganionen sind als weinrote Kugel gezeichnet.

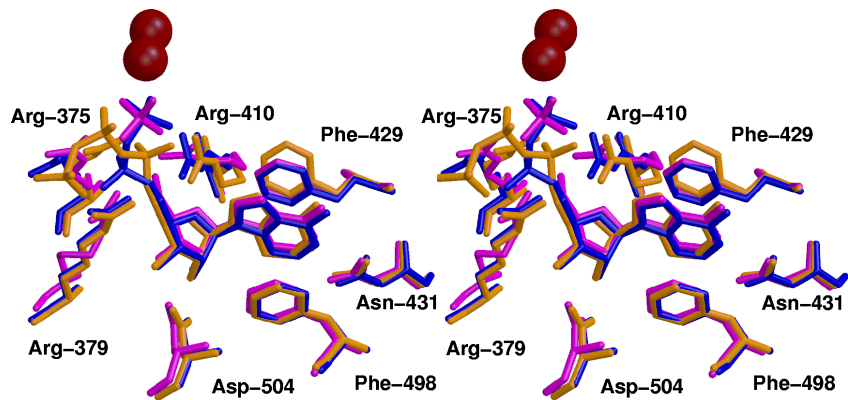


Abbildung 33: Stereoabbildung einer Überlagerung der Bindungstaschen. ATP und die für die Bindung verantwortlichen Reste sind in orange,  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP und seine bindenden Reste sind blau und Adenosin sowie Phosphat und deren bindende Reste sind in magenta dargestellt. Die Manganionen sind in weinrot gezeichnet. Überlagert wurden die Strukturen I-ATP, III-ADE (Monomer IIIa) und IV-AMPCP (Monomer IVc) anhand der  $C_{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren 26 bis 177 und 183 bis 321.

Eine Analyse der Abstände der Liganden (Abbildung 34), die an den Inhibitor binden können zeigt, daß Arg-410 in der Lage ist, sowohl die  $\alpha$ -Phosphatgruppe als auch die  $\beta$ -Phosphatgruppe zu binden, während die beiden restlichen Argininreste nur die  $\alpha$ -Phosphatgruppe binden. Die  $\beta$ -Phosphatgruppe bindet auch hier wieder nur an  $Mn^{2+}$ . Wie in Struktur III-ADE ist auch die hydrophobe Wechselwirkung des Isoleucinrestes Ile-178 mit der Ribose vorhanden.

## 5.3 Diskussion

### 5.3.1 Vergleich mit violetten Phosphatasen und Ser/Thr-Proteinphosphatasen

Die N-terminale Domäne der 5'-NT ist entfernt verwandt zu anderen Phosphoesterasen mit Dimetallzentrum (Sträter *et al.*, 1996). Hierzu gehören die Ser/Thr-Proteinphosphatasen (PPs) 1 und 2B (Calcineurin) (Goldberg *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1995) und die violetten sauren Phosphatasen (PAPs) (Sträter *et al.*, 1995, Guddat *et al.*, 1999; Uppenberg *et al.*, 1999; Lindqvist *et al.*, 1999), von denen bereits Kristallstrukturen bestimmt wurden. Im Gegensatz zur 5'-NT befindet sich das katalytische Zentrum der PPs und PAPs in einer breiten und flachen Vertiefung, welche im Fall der PPs durch die Größe des Proteinsubstrates bedingt wird.



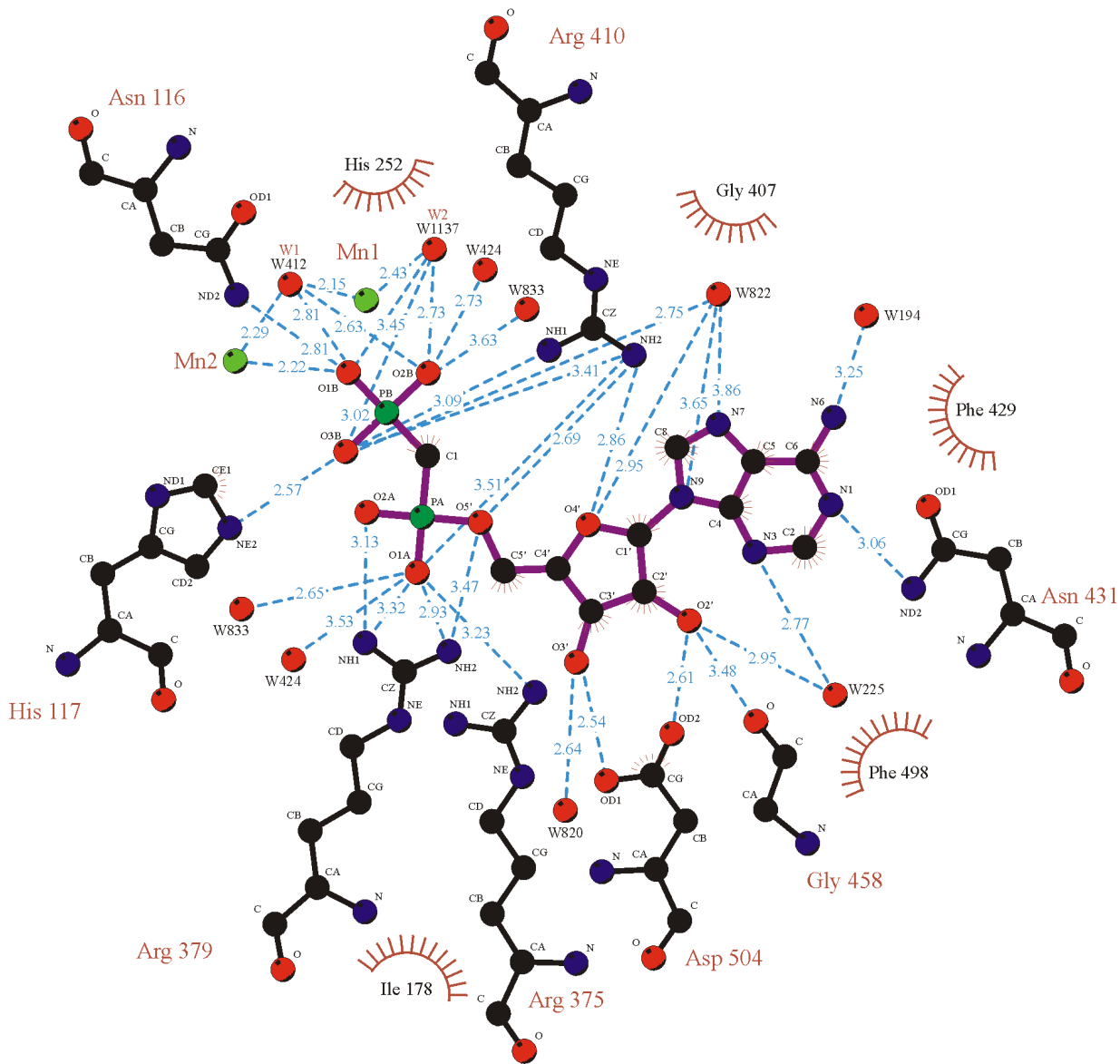


Abbildung 34: Bindungsmodus des Inhibormoleküls  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP. Schematische Darstellung der polaren (blaue gestrichelte Linien mit Bindungsabständen in Å) und hydrophoben (sonnenartige braune Halbkreise) Wechselwirkungen, die mit dem Programm LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) für Monomer IVc erstellt wurde. Die Nachbearbeitung erfolgte mit dem Programm O und CORELDRAW (Version 8, Adobe, 1998). Die beiden Manganionen sind als grüne und die Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. Sie wurden entsprechend ihrer Bezeichnung in der Koordinatendatei (PDB-File) nummeriert. Die beiden an die Metallionen koordinierenden Wassermoleküle sind mit W1 und W2 zusätzlich markiert.

Die Überlagerung aktiver Zentren der 5'-NT, PAP, PP-1 und PP-2B zeigt, daß die Metalliganden und das katalytische Histidin (His-117) mit nahezu identischen Konformationen überlagern (Abbildung 35, Tabelle 20). In all diesen Strukturen bildet ein Aspartat Seitenrest (Asp-84 in der 5'-NT) einen monodentaten Brückenliganden der beiden Metallionen. Die Röntgenstrukturuntersuchungen der Proteinphosphatasen zeigten weiterhin ein verbrückendes Wassermolekül,

dessen Position ungefähr der Lage des überbrückenden Wassermoleküls (oder des Carbonatsauerstoffatoms) in der 5'-NT entspricht (Goldberg *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1995). Spektroskopische Untersuchungen an der PAP (Klabunde & Krebs, 1997) deuten auch hier das Vorhandensein eines überbrückenden Wassermoleküls in der violetten sauren Phosphatase an, jedoch konnte es bis jetzt nicht in der Röntgenstruktur lokalisiert werden, da die Auflösung zu gering war (Sträter *et al.*, 1995; Klabunde *et al.*, 1996). Das verbrückende Wassermolekül wurde jedoch in der Struktur der PAP aus dem Schwein bei einer Auflösung von 1.55 Å eindeutig lokalisiert.

Während alle Proteinliganden der Metallionbindungsstelle 2 konserviert sind, gibt es einige Unterschiede bzw. einige zusätzliche Liganden (in der PAP und in den PPs) in der Koordination der Metallionbindungsstelle 1. Das an Zn1 koordinierte Gln-254 ist in der PAP zu einer Histidinseitenkette mutiert und in den PPs nicht metallkoordiniert, denn dort besetzt ein Wassermolekül diese Koordinierungsstelle. His-43 der 5'-NT ist durch Tyr-167 (von einer nicht-homologen Sequenzposition) in der PAP ersetzt.

Kokristallstrukturen der PAP aus der Kidneybohne (Klabunde *et al.*, 1996), PP-2B (Griffith *et al.*, 1995) aus dem Rind und der menschlichen PP-1 (Egloff *et al.*, 1995) mit dem Reaktionsprodukt Phosphat und dem inhibitoranalogen Wolframat, sowie PAP aus dem Schwein mit Phosphat (Guddat *et al.*, 1999) besitzen bidentat verbrückte Metallionen. Bei diesen Untersuchungen konnten auch Liganden des aktiven Zentrums identifiziert werden, die an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sind. Zwei Arginine (Arg-96 und Arg-221 in PP-1; Arg-122 und Arg-254 in PP-2B) der PPs und ebenso ein Tyrosin (Tyr-272 in PP-1 und Tyr-311 in PP-2B) tragen zur Substratbindung bei. In der violetten sauren Phosphatase der Kidneybohne übernehmen diese Aufgabe wahrscheinlich zwei Histidine (His-295 und His-296) sowie Tyr-365 (vgl. Abbildung 35). Von den eben beschriebenen Resten wird angenommen, daß die beiden Histidine der PAP sowie eines der Arginine und die Tyrosine der PPs eine wichtige katalytische Funktion bei der Stabilisierung des Übergangszustandes besitzen oder als allgemeine Säure oder Base fungieren. Diese Funktion wird in der 5'-NT wahrscheinlich von den drei Argininresten (Arg-375, Arg-379 und Arg-410) übernommen, die im Substratkomplex I-ATP und im  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP-Komplex IV-AMPCP an die  $\alpha$ -Phosphatreste binden. Bei der Überlagerung korreliert die räumliche Position einer Aminogruppe von Arg-375 sehr gut mit der des N $\epsilon$ 2-Atoms im His-295 aus der PAP. Die beiden Stickstoffatome der eben genannten Reste befinden sich in einem Abstand von 1.0 Å. Der Abstand einer Aminogruppe aus dem Rest Arg-410 zur Aminogruppe aus Arg-96 aus der PP-1 beträgt 1.39 Å und der zur Aminogruppe von Arg-122 beträgt 3.42 Å.

Auch befindet sich die Aminogruppe von Arg-410 in dichtem Abstand (2.0 Å) zur OH-Gruppe des Tyr-365 aus der PAP. Konserviert ist in allen Strukturen das katalytische Asp-His-Paar, von dem das Histidin (His-117 in der 5'-NT) Teil eines charakteristischen Sequenzmotivs innerhalb dieser Superfamilie ist. Auch zeigt die Überlagerung sehr ähnliche Konformationen für dieses Histidin. Im Gegensatz dazu besitzt der Aspartatrest, der über eine Wasserstoffbrücke mit dem Histidin verbunden ist, unterschiedliche Rotamerkonformationen (siehe Abbildung 35) und entstammt nicht-äquivalenten Sequenzpositionen der 5'-NT, PAPs und PPs. Allerdings unterstreicht das Vorkommen des His-Asp-Paares in allen Strukturen seine wichtige Rolle bei der Katalyse.

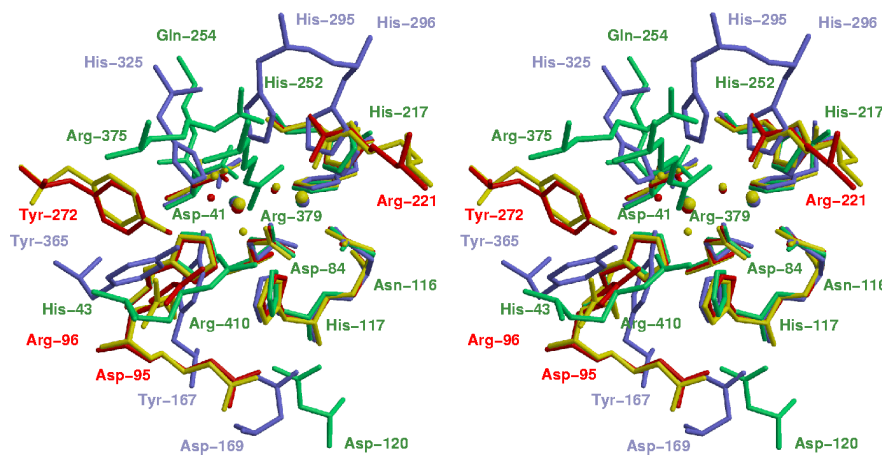


Abbildung 35: Überlagerung der Strukturen der aktiven Zentren. *E. coli* 5'-NT (grün), violette saure Phosphatase der Kidneybohne (blau, PDB-Code 4KBP (Sträter *et al.*, 1995; Klabunde *et al.*, 1996)), menschliches Calcineurin (gelb, PP-2B, PDB-Code 1AUI (Egloff *et al.*, 1995)) und die Proteinphosphatase 1 aus dem Hasen (rot, PDB-Code 1FJM (Goldberg *et al.*, 1995)). Die Strukturen wurden auf der Basis der Atomkoordinaten der zwei Metallionen und der C<sub>α</sub>-Atome konservierter Liganden sowie des katalytischen Histidins überlagert. Die meisten Reste der 5'-NT sind mit grünen Beschriftungen gekennzeichnet.

Der Vergleich der aktiven Zentren der 5'-NT, PAP und den PPs ergibt zusätzliche Histidin und Argininreste in den aktiven Zentren der PAP und PPs (Abbildung 36b und c). Deren Funktion übernehmen in der 5'-NT also sehr wahrscheinlich die drei Argininreste Arg-375, Arg-379 und Arg-410 (Abbildung 36a). Denn bei der Überlagerung der aktiven Zentren (Abbildung 35) konnte gezeigt werden, daß die funktionellen Gruppen von Arg-375 der 5'-NT und His-295 der PAP sowie die von Arg-410 der 5'-NT, Arg-96 der PP1, Arg-122 der PP2B und Tyr-365 der PAP, sehr ähnliche räumliche Positionen besitzen. Diese Reste stabilisieren wahrscheinlich den Übergangszustand bei der Katalyse von Substraten.

Tabelle 20: Vergleich der Reste der aktiven Zentren. Reste, die nicht-homologen Sequenzpositionen entstammen sind durch kursive Schrift oder Unterstreichungen voneinander unterschieden.

Funktion	5'-NT	PAP <sup>a</sup>	PP-1 <sup>a</sup>	PP-2B <sup>a</sup>
Ligand Metall 1	Asp-41	Asp-135	Asp-64	Asp-90
Ligand Metall 1	His-43	<i>Tyr-167</i>	His-66	His-92
Ligand Metall 1	Gln-254	His-325	<i>W1</i>	<i>W2</i>
Überbrückender Ligand	Asp-84	Asp-164	Asp-92	Asp-118
Ligand Metall 2	Asn-116	Asn-201	Asn-124	Asn-150
Ligand Metall 2	His-217	His-286	His-173	His-199
Ligand Metall 2	His-252	His-323	His-248	His-281
Katalytisches Asp-His-Paar	His-117	His-202	His-125	His-151
Katalytisches Asp-His-Paar	Asp-120	<i>Asp-169</i>	<u>Asp-95</u>	<u>Asp-121</u>
Stabilisierung des Übergangszustandes		His-296	<i>Arg-221</i>	<i>Arg-254</i>
Stabilisierung des Übergangszustandes	Arg-375	<i>His-295</i>		
		Tyr-365	<i>Tyr-272<sup>b</sup></i>	<i>Tyr-311<sup>b</sup></i>
	Arg-410		<i>Arg-96</i>	<i>Arg-122</i>
	Arg-379			

<sup>a</sup>Die hier gelisteten Reste entstammen denselben PDB-Codes und sind aus denselben Organismen wie in Abbildung 35.

<sup>b</sup>Die Tyrosine der PP-Strukturen sind von äquivalenten Schlaufenpositionen wie in der PAP, jedoch sind diese Bereiche zu verschieden und treten an nicht-homologen Sequenzpositionen auf.

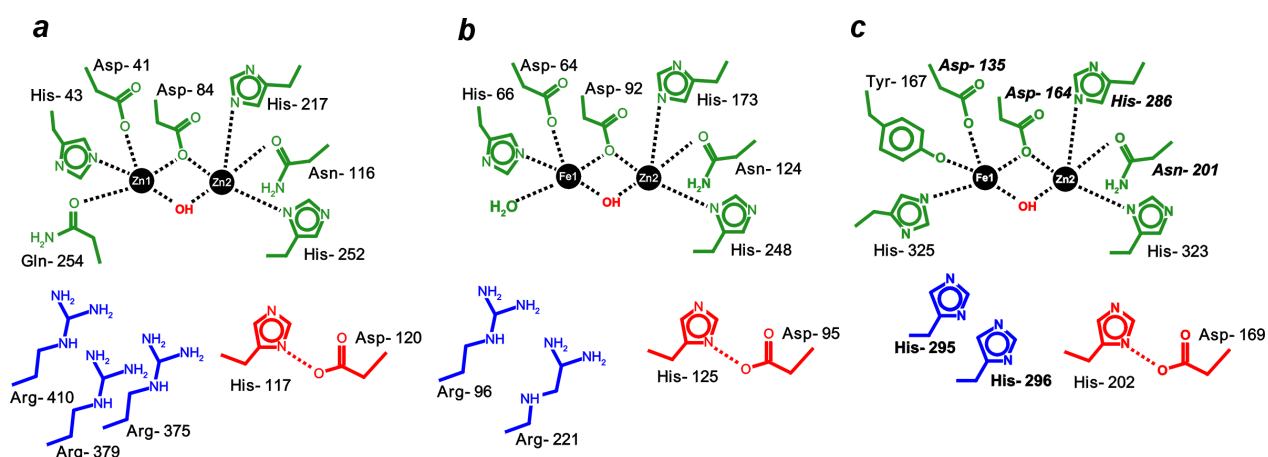


Abbildung 36: Aktive Zentren der 5'-NT, Ser/Thr-Proteinphosphatase 1 und der violetten sauren Phosphatase. **a**, das aktive Zentrum der 5'-NT. Metalliganden sind in grün, die beiden Metallionen in schwarz, das katalytische Asp/His-Paar in rot, das die beiden Metallionen überbrückende Wassermolekül ebenfalls in rot und zusätzliche nicht-konservierte katalytische Reste sind in blau dargestellt. **b**, das aktive Zentrum der PP-1. **c**, das aktive Zentrum der PAP. Die Farbgebung entspricht der in Teil a.

### 5.3.2 Metallionen-unterstützte Katalyse in den Phosphatasen

Bisher wurden verschiedene Mechanismen der Phosphatesterhydrolyse für die violetten Phosphatasen (Klabunde *et al.*, 1996; Klabunde & Krebs, 1997) und Ser/Thr-Proteinphosphatasen (Goldberg *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Egloff *et al.*, 1995) vorgeschlagen. Diese basieren auf strukturellen und biochemischen Untersuchungen und schließen die Beobachtung der Inversion der Konfiguration am Phosphoratom des Phosphates während der Katalyse mit ein (Mueller *et al.*, 1993). All diese Mechanismen gehen daher von einem direkten Transfer der Phosphorylgruppe auf ein Wassermolekül ohne Phosphoenzym-Zwischenstufe aus. Die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen unterscheiden sich vor allem im Bindungsmodus der Phosphatgruppe des Substrates an das Dimetallzentrum und in der Art des Angriffs des Nucleophils. Die Phosphatgruppe kann entweder monodentat an eines der beiden Metallionen gebunden sein, oder bidentat beide Metallionen überbrücken. Die Alternativen für den Angriff des Nucleophils sind (i) ein überbrückender Wasserligand, welcher in allen bisher gelösten Strukturen vorkommt, (ii) ein terminaler Wasserligand, oder (iii) ein anderes Wassermolekül, das nicht an die Metallionen koordiniert ist und sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet. Für das konservierte katalytische Histidin (His-117) wird diskutiert, ob es eine Rolle bei der Protonierung des Sauerstoffs der Abgangsgruppe, oder bei der Stabilisierung des Übergangszustandes spielt.

In der offenen Konformation der 5'-NT der Struktur I-NAT-1 ist nur ein Wasserligand (bzw. ein Sauerstoffatom des Carbonatanions) an die beiden Zinkionen gebunden und beide Zinkionen sind fünffach koordiniert. Also könnte jedes der beiden Metallionen noch ein zusätzliches Substratatom binden. Ein möglicher Mechanismus wäre, daß die Phosphatgruppe des Substrates bidentat an beide Zinkionen bindet und der überbrückende Wasserligand fungiert als angreifendes Nucleophil, ähnlich dem vorgeschlagenen Mechanismus für die menschliche PP-1 (Egloff *et al.*, 1995). Alternativ dazu könnte ein nucleophiles Wassermolekül gemeinsam mit dem Substrat in der Weise binden, daß das Sauerstoffatom des Phosphatrestes des Substrates an das eine Metallion bindet und das Wassermolekül an das andere Metallion. Dieser Mechanismus ähnelt dem, der für die violetten Phosphatasen vorgeschlagen wurde (Sträter *et al.*, 1995; Klabunde *et al.*, 1996; Klabunde & Krebs, 1997). Des weiteren konnte man eine höhere Aktivität der 5'-NT aus *E. coli* in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$  anstelle von  $Zn^{2+}$  beobachten (Glaser *et al.*, 1967; Neu, 1967). Dies könnte am höheren Bestreben der  $Mn^{2+}$ - und  $Co^{2+}$ -Ionen liegen, eine oktaedrische Koordination zu besitzen. Da  $Zn^{2+}$  nicht ein so hohes Bestreben zur sechsfachen Koordination besitzt, könnte es sein, daß die beiden erstgenannten

Ionen ein zusätzliches Wassermolekül koordinieren, wenn sie an die Metallbindungstellen der 5'-NT gebunden sind. In der Tat sind die Manganiolen der Strukturen III-ADE und IV-AMPCP oktaedrisch koordiniert.

### 5.3.3 Vorschlag eines Reaktionsmechanismus für die 5'-NT

Während die violetten Phosphatasen und die Ser/Thr-Proteinphosphatasen Phosphomonoesterasen sind, besitzt die 5'-NT Phosphodiesterase-, Diphosphatase-Aktivität und spaltet ebenso Bis(5'-Nucleosidyl)polyphosphate (Ruiz *et al.*, 1989). Es ist gegenwärtig unklar, ob diese Unterschiede nur auf verschiedenen Bindungstaschen beruhen, oder ob auch der katalytische Mechanismus im Detail Unterschiede aufweist.

Vergleicht man den Bindungsmodus des Adenosin- und des Phosphatmoleküls mit dem Bindungsmodus des Inhibitors  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP mittels einer Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome der N-terminalen Domänen, so ergeben sich für das Phosphatmolekül aus dem Produktkomplex und das  $\beta$ -Phosphat aus dem Inhibitor Komplex sehr ähnliche Bindungsmodi und räumliche Positionen (Abbildung 33). Auch die beiden Adenosin-Gruppen überlagern sehr gut. Im Unterschied zum aktiven Zentrum der offenen Konformation befinden sich in der geschlossenen Konformation drei Arginine (Arg-375, Arg-379 und Arg-410) im aktiven Zentrum, die ähnliche Aufgaben wie die nicht-homologen Arginine und Histidine in den aktiven Zentren der PAPs und PPs übernehmen können. Eine Überlagerung mit den PPs zeigt, daß Arg-410 eine ähnliche Funktion wie Arg-96 (aus PP1) und Arg-122 (aus PP2B) einnehmen könnte. Allerdings ist Arg-410 zwar über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem  $\beta$ -Phosphat des Inhibitors verbunden (3.1 Å), jedoch nicht mit dem Phosphat (4.0 Å) des Produktkomplexes. Dennoch wird Arg-410 im folgenden Vorschlag eines Reaktionsmechanismus eine Rolle in der Stabilisierung des Übergangszustandes zugewiesen.

Ein möglicher Reaktionsmechanismus wird in Abbildung 37 vorgeschlagen. Dieser stützt sich vor allem auf einen in Struktur IV-AMPCP beobachteten Substratbindungsmodus von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP an die 5'-NT. In diesem Mechanismus übernimmt das an Zn1 gebundene Wassermolekül W2 die Rolle des am Phosphor angreifenden Nucleophils im Michaelis-Komplex (Abbildung 37a). Die Reste Arg-410, His-117/Asp-120 und Asn-116 stabilisieren durch ihre positive Ladung bzw. durch Wasserstoffbrücken die negative Ladung auf den Sauerstoffatomen des Phosphats und erhöhen somit die positive Ladung des Phosphors, womit es noch attraktiver für das angreifende Nucleophil wird. Das überbrückende Wassermolekül W1 und das zweite

Metallion Zn2 stabilisieren das Phosphation ebenfalls. Das an Metallion Zn1 gebundene Wassermolekül befindet sich auf einer Linie zu der zu spaltenden Bindung zwischen dem Phosphatom und dem Sauerstoff der Abgangsgruppe. Dieses Wasser ist also ideal für einen nucleophilen Angriff nach einem „inline“-Mechanismus, also einem Mechanismus, bei dem Nucleophil und Abgangsgruppe im Übergangszustand die apicalen Positionen um das Phosphoratom einnehmen, positioniert. Es bildet sich ein fünf-bindiger Übergangszustand, in dem das Nucleophil und die Abgangsgruppe auf einer Geraden liegen. Der Übergangszustand wird durch dieselben Liganden wie zuvor stabilisiert (Abbildung 37b), die Phosphorylgruppe wird auf das Nucleophil übertragen und der Alkohol verläßt als Abgangsgruppe das gebildete Phosphation (Abbildung 37c), wodurch ein Produktkomplex entsteht. Damit verbunden ist eine Inversion der Konfiguration des Phosphoratoms in Bezug auf seine ihn umgebenden Sauerstoffatome, so wie sie in anderen biochemischen Untersuchungen beobachtet wurde (Mueller *et al.*, 1993).

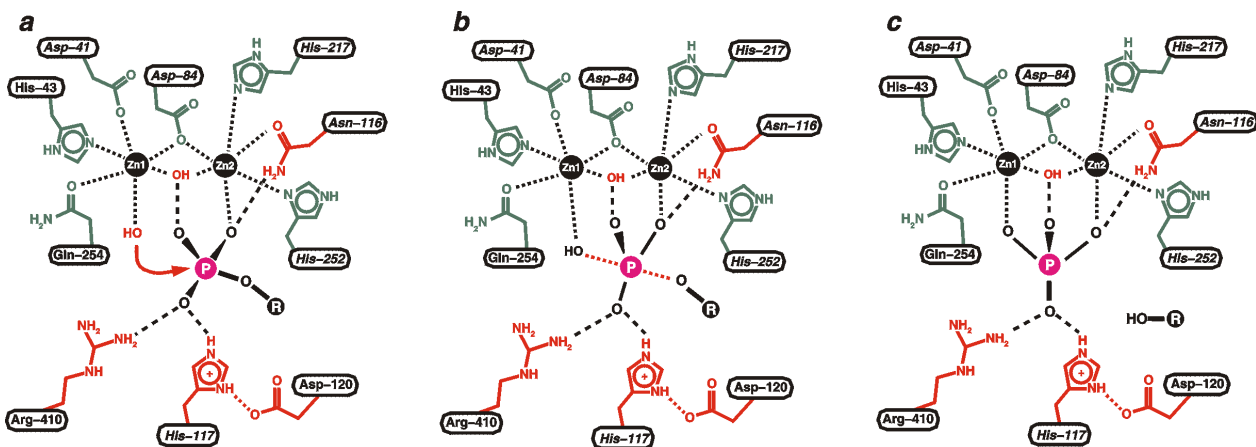


Abbildung 37: Vorschlag eines möglichen Reaktionsmechanismus. **a**, im Michaelis-Komplex greift W2 das Phosphat als Nucleophil an. **b**, im Übergangszustand liegen Nucleophil und Abgangsgruppe auf einer Geraden. **c**, im Produktkomplex liegt eine Inversion der Konfiguration am Phosphatatom vor und ein Alkohol als Produkt. Die Phosphatgruppe ist bidentat mit beiden Metallionen koordiniert.

Allerdings konnte die bidentate Verbrückung der Metallionen mit dem Phosphation im primären Produktkomplex in keinem der geschlossenen Konformere der 5'-NT beobachtet werden. An die 5'-NT bindet das Phosphation wie die Phosphatgruppe des Substrates an. Jedoch wurde in den Strukturen der PAP's und PP's mit Phosphat und Wolframat stets der verbrückende Bindungsmodus für das Oxoanion gefunden, der hier als primärer Produktkomplex postuliert wird. In einem „inline“-Mechanismus mit Inversion der Konfiguration am Phosphoratom muß allerdings der Produktkomplex einen anderen Bindungsmodus der Phosphatgruppe aufweisen als der Substratkomplex. Somit erscheint es wahrscheinlich, daß der in der 5'-NT beobachtete

Bindungsmodus für das Phosphation nach der Reaktion in einen dem Substratbindungsmodus ähnlichen Komplex umlagert.