

Protonierung und biologische Funktion

Die Grenzen der Röntgenstrukturanalyse

vorgelegt zur Erlangung

der

Venia legendi

für das Fachgebiet

Physikalische Biologie

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

von

Jörg Labahn

Juli 2003

I. Einleitung.....	1
Möglichkeiten und Grenzen kristallographischer Analyse.....	1
Untersuchung biochemischer Reaktionen und biologischer Prozesse durch Röntgenstrukturanalyse.....	4
 II. Die Peptid-Amidase pam: Mechanistische Diversizität.....	6
Die Amidase-Signatur Familie.....	6
Struktur der Peptidamidase pam.....	7
Topologische Klassifikation.....	8
Substratspezifität: Der Chymostatin Komplex von pam.....	11
Protonierung: Mechanismus der Hydrolyse.....	14
Die Strukturinterpretation.....	15
Literatur	16
 III. Die Glykosylase AlkA: Strukturelle Basis der DNA-Reparatur.....	17
Die DNA-Glykosylase II AlkA.....	17
Struktur von AlkA.....	18
Das Reaktionszentrum von AlkA.....	19
Mechanismus der DNA-Glykosylasen.....	21
Die Protonierungsreaktion.....	24
Die DNA-Bindung durch AlkA.....	24
Die Strukturinterpretation.....	25
Literatur.....	26
 IV. Der SRII-HtrII-Komplex: Das Proton in der Signaltransduktion ?.....	28
Die Familie photoaktiver 7-Helix Membranproteine.....	28
Der SRII-Transducer Komplex in der Signalkaskade.....	29
Die Struktur des Sensory Rhodopsin - Transducer Komplexes.....	30
Wirkmodell der Signaltransduktion des Komplexes.....	32
Modell der Bewegungsmöglichkeiten des Transducerfragments.....	34
Die Rolle der Protonierung bei der Signaltransduktion.....	37
Die Strukturinterpretation.....	38
Literatur.....	39
 V. Die Protonen in der Struktur.....	40
Die Protonen und Wasser.....	40
Das gebundene Proton.....	41
Das katalytische Protom.....	42
Das transportierte Proton.....	43

I. Einleitung

Möglichkeiten und Grenzen kristallographischer Analyse

Die Strukturaufklärung von biogenen Polymeren dient im Wesentlichen der Erhellung der molekularen Details von biologischen Prozessen. Die Dynamik solcher Prozesse realisiert sich auf molekularer Ebene als Zustandsveränderung der einzelnen Moleküle des Polymers. Physiko-chemisch untersucht und beschrieben wird jedoch im Allgemeinen nicht das Einzelmolekül sondern ein Ensemble.

Die kristallographische Untersuchung durch Streuung von Röntgenphotonen an den Elektronen des Moleküls stellt hier einen Sonderfall dar. Die symmetrische und periodische Anordnung der Moleküle im Kristall bewirkt, daß alle kristallographisch äquivalenten Moleküle exakt den gleichen Kräften unterliegen. Somit weisen sie im Prinzip dieselbe Struktur auf, d.h. dieselben relativen Positionen der Atome.

Lediglich kleine, thermisch angeregte Schwingungen der Atome um ihre Gleichgewichtslagen induzieren temporäre Abweichungen von der Gleichgewichtsstruktur. Im Zeitfenster einer Datennahme mitteln sich diese Schwingungen einzelner Atome jedoch aus, so daß die Atomkoordinaten unberührt bleiben. Die dem jeweiligen Atom zugehörige Elektronendichte wird aber über ein durch die Schwingungsamplitude bestimmtes Gebiet verteilt sein. Im Besonderen kann durch erhöhte Temperaturfaktoren der Fall auftreten, daß für derart mobile Atome bzw. Atomgruppen keine interpretierbare Elektronendichte auftritt.

Anders gelagert ist der Fall der Rotationsfehlordnung. Hier rotieren Atomgruppen koordiniert um eine Einfachbindung. So wird zum Beispiel oft nur Elektronendichte bis zum C_β-Atom für Lysinreste an der Proteinoberfläche beobachtet, da im Kristall eine Vielzahl von Konformeren auftritt.

Die präzisesten Strukturen, die mit gegenwärtigen Methoden erhältlich sind, werden durch Röntgenstrukturanalyse von Kristallen erhalten. Es stellt sich aber die Frage, inwieweit kristallographische Strukturen die biologischen Molekülstrukturen repräsentieren.

Ein Proteinkristall enthält im allgemeinen zwischen 35 und 65 % überwiegend ungeordnete Solvensmoleküle. Damit entspricht der Proteingehalt eines Kristalls etwa dem Proteingehalt von lebenden Zellen. Andererseits müssen zur Kristallisation oft unphysiologische Bedingungen gewählt werden. Betrachtet man z.B. die Vielzahl von

Lysozymstrukturen in der Protein Data Bank, welche von Kristallen mit unterschiedlichen Molekülpackungen erhalten wurden, so finden sich nur geringfügige Unterschiede im Bereich der Kontaktzonen der Moleküle. Diese kleinen Unterschiede beeinträchtigen nur in speziellen Fällen die Aussagekraft kristallographischer Strukturen für biologische bzw. biochemische Fragestellungen.

Häufig beobachtet man mehr als ein Molekül in der asymmetrischen Einheit der Elementarzelle eines Kristalls. Hierbei muß es sich nicht um ein biologisches Multimer handeln. Der Vergleich solcher Strukturen zeigt in der Regel kleine, aber signifikante Unterschiede zwischen diesen kristallographisch nicht äquivalenten Molekülen auf. Diese Veränderungen sind in der Regel so klein, daß das Netzwerk der Wasserstoff-Brückenbindungen sich nicht verändert. Die beobachteten Unterschiede sind kleiner als die mittels NMR-Spektroskopie gefundenen.

Die Untersuchung durch NMR erfolgt in Lösung an einem Ensemble von Strukturen. Inwieweit dieses Ensemble für die molekulare Charakterisierung einer biochemischen Reaktion aussagekräftiger ist als die eine, präzise Struktur der kristallographischen Analyse, muß sich im Einzelfall erweisen.

Durch Strukturaufklärung **eines** Moleküls erhält man keine Repräsentation des biologischen Prozesses, bzw. der biochemischen Reaktion, an dem das untersuchte Molekül beteiligt ist. Entsprechend können aus einer Einzelstruktur in der Regel nur wenige Erkenntnisse über biochemische Reaktionen oder biologische Zusammenhänge abgeleitet werden.

Der Prozeß, bzw. die Reaktionen können im allgemeinen erst durch die in ihrem Verlauf auftretenden Strukturveränderungen charakterisiert werden. Dies erfordert der exzellenten räumlichen Auflösung der kristallographischen Methode eine zeitliche hinzuzufügen, indem entweder ergänzende nicht-kristallographische Methoden eingesetzt werden, oder die anfänglichen Strukturveränderungen durch zeitaufgelöste Laue-Kristallographie bestimmt werden, oder diskrete Zustände des Polymers in der Abfolge der Strukturveränderungen eingefangen und untersucht werden.

Charakterisierende diskrete Zustände können im einfachsten Fall z.B. die Struktur eines Proteins und die Struktur des Komplexes des Proteins mit einem Liganden sein. Ein anderer Ansatz ist das Einfrieren der Zustände, die ein Protein im Verlauf einer Reaktion durchläuft, um diese separat untersuchen zu können, wie im Falle der Arbeiten an den Photointermediaten des Bacteriorhodopsin.

Die vergleichende Analyse der Einzelstrukturen erlaubt dann Rückschlüsse auf die Biochemie. Die beim Vergleich diskreter Zustände beobachtbaren Unterschiede können von gänzlich veränderter Quartärstruktur bis zu kleinsten Veränderungen von Aminosäure-Seitengruppen reichen:

- Position von Domänen oder Untereinheiten
- Relokation von Segmenten (oft α -Helices oder Loop-Strukturen)
- Reorientierung von Aminosäuren
- Übergang zwischen Seitengruppen-Rotameren
- Veränderungen der Wasserstoff-Brückenbindungen
- Veränderung des Protonierungszustands von Aminosäuren

Diese Veränderungsebenen sind hierarchisch und in der Regel einschließend. Eine Segmentrelokation zum Beispiel erfordert die Reorientierung einiger Aminosäuren, welche für weitere Reste eine Veränderung der Seitengruppen-Rotamere mit sich bringt. Das Ausmaß der Veränderung der Proteinstruktur steht oft in Relation zur Stärke der Wechselwirkung, bzw. der räumlichen Ausdehnung des Reaktionspartners.

Der Nachweis von Protonierung ist im Rahmen der Röntgenkristallographie nur ausnahmsweise möglich. Die geringe Elektronendichte von Wasserstoff erfordert sehr hohe Datenauflösung ($<1.0 \text{ \AA}$), die in der Regel nicht erhältlich ist. Zum Auffinden der Positionen der Atome dieses Elementes stellt die Kristallographie mit Neutronen eine geeignete Alternative dar, wenn sehr große Kristalle ($V > 10 \text{ mm}^3$) erhältlich sind. Hierbei erfolgt die Streuung nicht an Elektronen sondern an Kernen.

Ein analoges Zuordnungsproblem besteht zwischen Elementen, die sich nur durch ein Elektron unterscheiden, wie Sauerstoff und Stickstoff. So ist es anhand der Elekt-

ronendichte in der Regel schwierig, ein Aspartat von einem Asparagin zu unterscheiden.

Untersuchung biochemischer Reaktionen und biologischer Prozesse durch Röntgenstrukturanalyse

Diese Schrift befaßt sich mit der Fragestellung, in welcher Weise Strukturanalyse eingesetzt werden kann, um Aufschluß über biologische Prozesse und die ihnen zugrunde liegenden Interaktionen und biochemische Reaktionen zu erhalten. Im Besonderen soll beleuchtet werden, welche Informationen über Protonierungsreaktion zu erhalten sind und welcher Art die gewonnenen Erkenntnisse sind.

Strukturen sind statisch. Sie können für sich genommen also nicht direkt der Beschreibung von Vorgängen dienen. Die Strukturen sind aber nicht nur Abbildungen stabiler Zustände, die im Ablauf einer biochemischen Reaktion durchlaufen werden. Jeder Zustand zeigt auch Einschränkungen der Art der Prozesse auf, an denen das beschriebene Molekül beteiligt sein kann. Die Abwesenheit von Nukleophilen oder sauren Gruppen im Reaktionszentrum bedeutet beispielsweise, daß bestimmte Reaktionstypen nicht mit der Struktur des Enzyms vereinbar sind.

Eines der wesentlichen Probleme der Strukturanalyse stellt die Ableitung dieser Einschränkung aus der gelösten Struktur dar. Betrachtet man ein Enzym, so besteht die Erwartung anhand der Struktur des Proteins Aussagen über den Interaktionsbereich von Enzym und Substrat, und speziell über die katalytischen Aminosäuren zu erhalten. Weiterhin ist der katalytische Mechanismus und die molekulare Grundlage von Substrat- und Produktspezifität von Interesse.

Die Ableitung der Wirkmodelle orientiert sich hierbei in der Regel natürlich nicht allein an chemischen Erwägungen, sondern sollte alle relevanten Kenntnisse über das jeweilige System integrieren.

In biologische Prozessen tritt ein Vielzahl verschiedener Moleküle auf. Letzteres legt eine Klassifizierung nach der Art der wechselwirkenden Moleküle nahe. Die verschiedenen Polymere, wie Nukleinsäuren, Proteine und Kohlenhydrate und die sehr diverse Kategorie niedermolekularer Verbindungen sind zu unterscheiden. Die chemische Klassifikation ist hier einer biologisch orientierten vorzuziehen, denn die Interaktionen, welche den Strukturveränderungen zu Grunde liegen, sind chemischer Natur.

Dies macht klar, daß im Allgemeinen den Strukturmodellen keine Information über biologische Funktionen entnommen werden kann. So können zum Beispiel strukturell begründete Einschränkungen des Substratspektrums nur Hinweise auf die biologische Funktion des betrachteten Moleküls liefern.

Die verschiedenen Kategorien werden überwiegend anhand eigener Arbeiten präsentiert werden:

- Als typisches Beispiel für die Wechselwirkung von Proteinen mit niedermolekulare Verbindungen wird eine periplasmatische Peptide Amidase vorgestellt.
- Protein-DNA Wechselwirkungen durch die Struktur der DNA-Glykosylase AlkA
- Protein-Protein Wechselwirkung durch den membranständigen Komplex von Sensory Rhodopsin II und einem Signal-Transducer Fragment

Diese Beispiele verdeutlichen auch wesentliche biologische Kategorien wie zelluläre Lokalisation und Funktion.

II. Die Peptid-Amidase pam: Mechanistische Diversizität

J.Labahn, S.Neumann, G.Büldt, M.-R.Kula, J.Granzin, J.Mol. Biol (2002) **322**, 1053-1064

An alternative Mechanism for Amidase Signature Enzymes

S.Neumann, J.Granzin, M.-R. Kula, J.Labahn, Acta Cryst. (2001) **D58**, 333-335

Crystallisation and preliminary X-ray data of the recombinant peptide amidase from *Stenotrophomonas maltophilia*

Die Amidase-Signatur Familie

Die Amidase-Signatur Familie [1] besteht bisher aus mehr als 200 Proteinen aus mehr als 90 Organismen (Bacteriae, Archae und Eucaryae). Diese Enzyme sind durch das Auftreten von konservierten Aminosäuren in einem Sequenzbereich von 160 Aminosäuren charakterisiert (s. Abb.1). Alle untersuchten Mitglieder dieser Familie hydrolysieren die Bindung von Acylkohlenstoff zu Amidstickstoff in Säureamiden [2]. Die Substrate bzw. Substratspektren und die biologischen Funktionalitäten sind divers. Sie reichen von der Utilisierung von Acetamid in Prokaroten und Eukaryoten als alleinige Kohlestoff- bzw. Stickstoffquelle [3], der Katabolisierung neuromodulativer Fettsäureamide in Säugern [4] bis zur Transamidation mißacylierter Glu-tRNA in Bakterien [5].

G-[GA]-S-[GS]-[GS]-G-x-[GSA]-[GSAVY]-x-[LIVM]-[GSA]-
x(6)-[GSAT]-x-[GA]-x-[DE]-x-[GA]-x-S[LIVM]-R-x-P-[GSAC]

Abb.1 Amidase-Signatur

(NCBI Blast Taxonomy report)

In eckigen Klammern alternative Aminosäure.

x: beliebige Aminosäure

Die Peptid-Amidase pam wird durch das ubiquitäre, pathogene, Gram-negative Y-Proteobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* produziert [2]. Das Enzym hydrolysiert spezifisch die C-terminale Peptid-Bindung in Peptid-Amiden. Die biologische

Funktion des periplasmatischen Enzyms ist unbekannt. Es besteht aus 503 Aminosäuren [6].

Struktur der Peptid-Amidase pam

Kristalle von pam lieferten Daten bis zu einer Auflösung von 1.4 Å. Die gelöste Struktur zeigt, daß das Protein eine Kegelform mit Abmessungen von 56 Å * 56 Å * 38 Å hat. Das Protein faltet sich in ein zentrales, gemischtes β -Faltblatt, welches beidseits von jeweils zwei Lagen von α -Helices bedeckt wird (s. Abb.2).

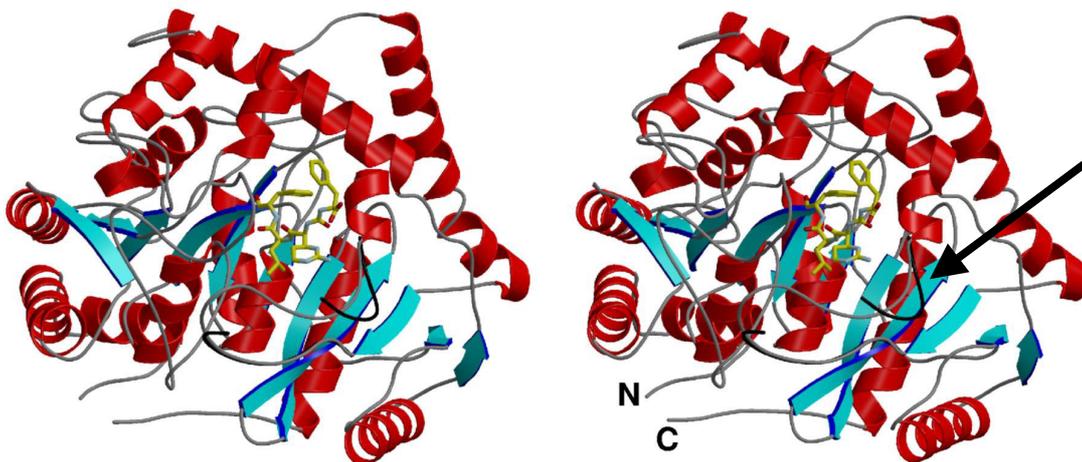


Abb.2 Stereoansicht der pam-Struktur

(Protein Data Bank 1M21, 1M22)

Kolorierung: α -helicale Struktur in rot, β -Struktur in cyan, Inhibitor Chymostatin in gelb koloriert

Pfeil: Das schwarz gezeigte unterbrochene Segment zeigt die Struktur vor Bindung des Inhibitors. Der zugehörige Bereich im Komplex ist wie alle Verbindungen zwischen Sekundärstrukturelementen grau koloriert.

In der Grundfläche des Kegels befindet sich eine ausgeprägte Vertiefung, die durch parallel und rechtwinklig zueinander stehende Helices gebildet wird. In dieser Vertie-

Eine Datenbanksuche nach Proteinen, die eine Faltung aufweisen, die der für pam gefundenen topologisch identischen ist, ergibt zwei Phosphoinositol-phosphatasen. Diese PIPasen (Protein Data Bank: 1imb [7], 1jp4 [8]) zeigen mit pam identische Topologie für einen Sequenzbereich, der den Bereich der Amidase Signatur einschließt. Dieser Bereich stellt in den Pipasen eine unabhängige Domäne dar. Da die Sequenzhomologie der Amidase Signatur Proteine den Bereich der Signatur überschreitet und den gesamten Bereich der topologisch äquivalenten Domäne der Pipasen einschließt (s. Abb.4), ist es angebracht von einer Hydrolasedomäne zu sprechen. Diese Hydrolasedomäne weist in ihrer Aminosäuresequenz die Amidasesignatur auf und ist der bewußten Pipasedomäne topologisch äquivalent. Da es sich sowohl bei den Amidasen als auch den PIPasen um Hydrolasen handelt, liegt hier wahrscheinlich eine entfernte evolutionäre Verwandtschaft vor. Diese Verwandtschaft ist allerdings auf der Ebene von Sequenzhomologien nicht erkennbar (s. Abb.3).

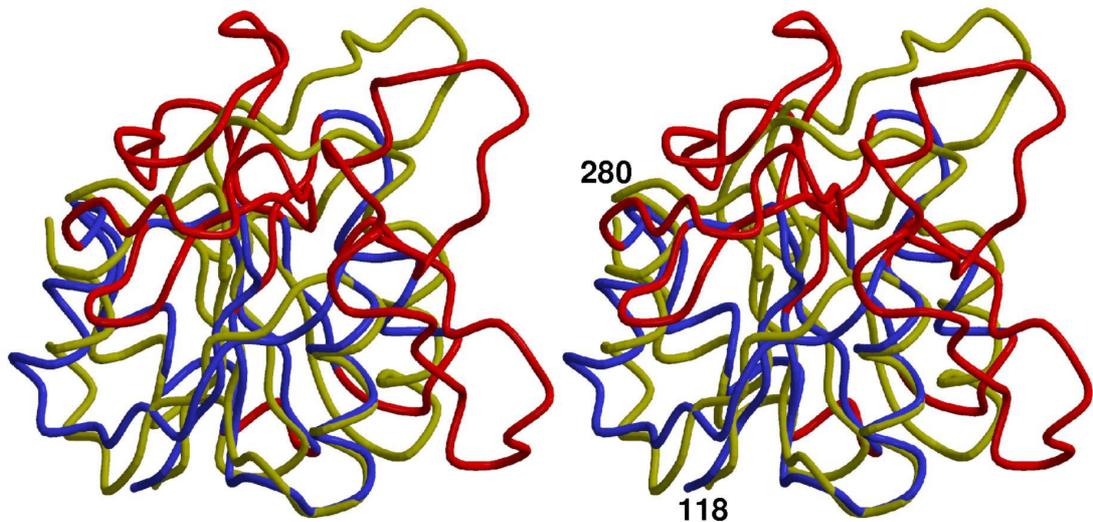


Abb.4 Stereoansicht der Superposition von pam und PIPase (1jp4)

Aminosäurebereich 118 bis 280 vom pam überlagert mit dem topologisch äquivalenten Bereich der Phosphoinositol-bindenden Domäne (gelb). Segmente von pam, die Insertionen in Bezug auf die Hydrolasedomäne der PIPase darstellen sind rot koloriert.

Die superpositionierten Proteine besitzen dieselbe Topologie. Insertionen treten in den Verbindungen zwischen Sekundärstrukturelementen auf.

Eine detaillierte Analyse zeigt, daß die Bindungsstelle für Phospho-Inositolphosphat (PIP) in den PIPasen topologisch dem Bereich von pam entspricht, in dem die katalytischen Aminosäuren von pam liegen.

Das Volumen der Inositolphosphat-Bindestelle in pam ist jedoch im Vergleich zu den Pipasen durch verlängerte Loop-Segmente erheblich verkleinert, so daß dieser Typ von Liganden durch pam nicht gebunden werden kann (s. Abb.5).

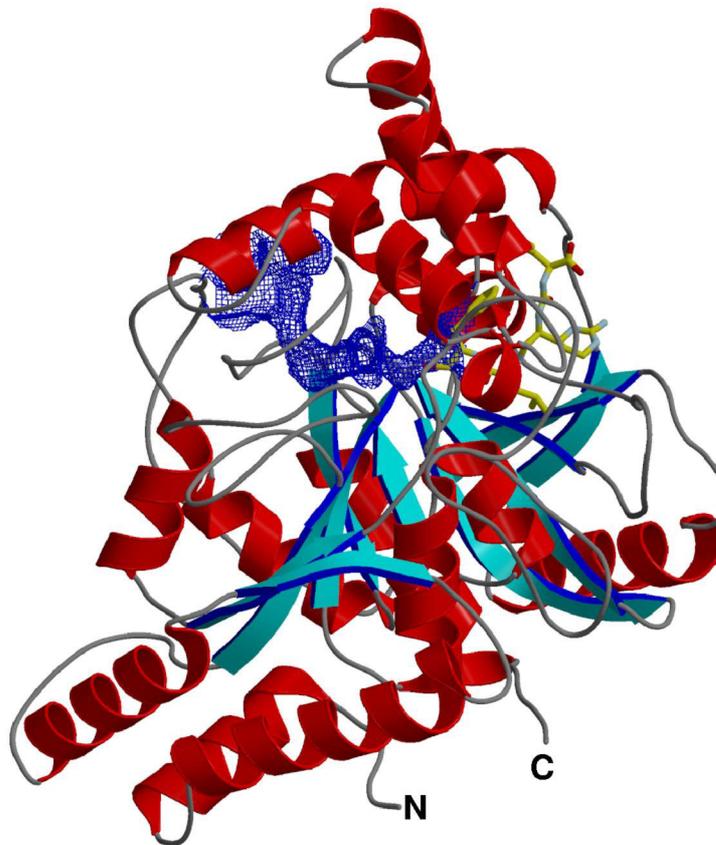


Abb.5 Kanal vom aktiven Zentrum an die Proteinoberfläche

Ansicht rotiert um 90° um die vertikale Achse in Abb.2

Der mit Wassermolekülen gefüllte Kanal (blaues Netz) reicht von O1 des Chymostatin durch das innere des Protein bis an die Oberfläche. Hier erweitert sich der Kanal trichterförmig. An dieser Stelle findet sich in der Struktur des Proteins, nicht aber des Komplexes mit Chymostatin, ein gebundenes Puffermolekül (HEPES).

In pam ist die PIP-Bindestelle zu einem mit Wassermolekülen gefüllter Kanal verändert, der die Struktur durchzieht und sich an der Moleküloberfläche zu einem Trichter weitet, in welchem ein Puffermolekül gebunden ist. Die Enge des Kanals erlaubt nur die Migration kleiner Moleküle wie Wasser oder Ammoniak oder von Ionen. Die positiven Ladungen an der trichterförmigen Öffnung des Kanals behindern den Austritt von Ammonium durch diesen Kanal.

Die homologe Hydrolasedomäne ist in pam erweitert durch weitere β -Sekundärstruktur und eingehüllt durch die α -Helices, welche die Oberfläche des Moleküls und Teile des Reaktionszentrums bilden.

Weitere Proteinstrukturen, welche der Gruppe der Amidasesignatur-Proteine zuzuordnen sind, bestätigen die Hypothese, daß die Topologie des Gesamtproteins innerhalb dieser Familie über den gesamten Sequenzbereich konserviert ist [9,10].

Substratspezifität: Der Chymostatin-Komplex von pam

pam wird nicht inhibiert durch Inhibitoren wie Diisopropylfluorophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid oder Methylarachidonylfluorophosphonat, welche kovalente Verbindungen mit Nukleophilen bilden [6]. Dies unterscheidet pam deutlich von FAAH, die nicht nur Amide sondern auch Ester hydrolysiert [11].

Untersuchungen an FAAH durch *site-directed-mutagenesis* [12], *affinity labelling* [11] und *steady-state kinetics* erlaubte es, eine Serin-Lysin-Dyade als charakterisierendes Merkmal des Reaktionsmechanismus zu postulieren [13]. Lysin-142 soll nach diesem Mechanismus als allgemeine Base und Serin-241 als Nukleophil wirken. Der Angriff des durch die Base aktivierten Nukleophils auf den terminalen Carbonyl-Kohlenstoff des Substrates erzeugt hierbei ein kovalentes Acyl-Protein-Intermediat, welches im zweiten Schritt hydrolysiert wird [12].

Für die Amidase pam konnte eine Inaktivierung lediglich durch Chymostatin (Cst) beobachtet werden. Chymostatin ist ein Gemisch von (N-[(S)-1-carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl]- α -[2-iminohexahydro-4-(S)-pyrimidyl]-L-leucyl-L-phenylalaninal (s. Abb.6) und zwei anderen Verbindungen, bei denen der Leucylrest durch L-Valin bzw. L-Isoleucin ersetzt ist. Diese Peptidaldehyde sind bekannte Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen. In diesen Fällen bilden sich Hemiacetale bzw. Hemithioacetale mit den nukleophilen Hydroxyl- bzw. Thiolgruppen der Enzyme. Diese

kovalenten Komplexe werden als Analoge des Übergangszustandes der proteolytischen Reaktion interpretiert [14]. In der pam-Cst Struktur wird jedoch weder Elektronendichte für einen tetrahedralen Übergangszustand noch für eine hydratisierte Aldehydfunktion gefunden. Der pam-Cst Komplex ist also als ein Enzym-Substrat-Komplex aufzufassen. Hierbei ersetzt der Wasserstoff der Aldehydfunktion die Aminogruppe des Substrates.

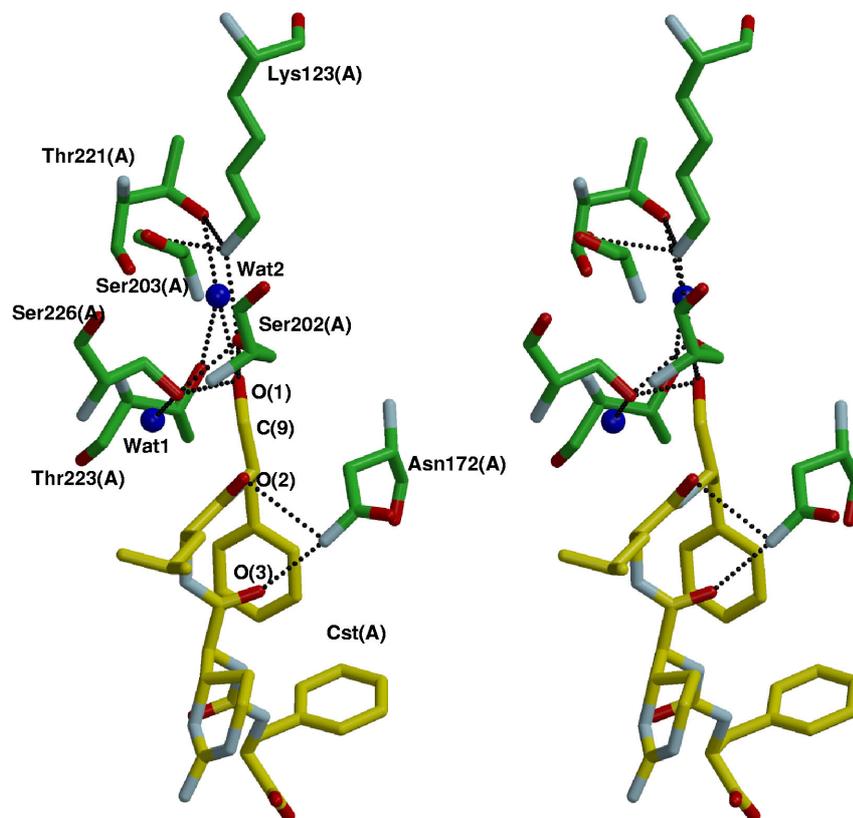


Abb.6 Stereoansicht des Chymostatin-pam Komplexes (Detail)

katalytische Triade Serin-226-cisSerin-202-Lysin-123, ohne Seitengruppen, welche nur v. d. Waals Kontakte zu Chymostatin aufweisen

Kohlenstoffe: grün (pam) und gelb (Chymostatin), Sauerstoffe in rot, Stickstoffe in blau, Wassermoleküle (O-Position) in dunkelblau, Wasserstoff-Brückenbindungen punktiert dargestellt. Zwischen Chymostatin und pam tritt keine Elektronendichte für eine kovalente Bindung auf. Es handelt sich also um den Protein-Substrat-Komplex, nicht um den Zwischenzustand, da weder ein Aldehydhydrat noch ein Hemiacetal vorliegt.

Die Abwesenheit des kovalenten Produktes weist ebenso wie das Inhibitionsspektrum darauf hin, daß anders als bei FAAH bei pam kein reaktives Nukleophil bei der Substratbindung vorliegt.

Das Sauerstoffatom (O_y) von Serin-226 weist einen Abstand von 2,51 Å zum Carbonyl-Kohlenstoff auf, wie es für das primäre Nukleophil erwartet wird. Der Rest Lysin-123 jedoch ist nicht in Kontakt mit dem Inhibitor (s. Abb.6).

Eine direkte Übertragung von Protonen zwischen der Carbonylgruppe und diesem Lysin ist nicht möglich. Sie ist an ihrem Platz fixiert durch Wasserstoffbrücken zu den O_y-Atomen von Threonin-221, Serin-202 und Serin-203. Serine-226 und Serine-202 liegen dem Carbonyl-O des Chymostatin am nächsten. Die Abstände von jeweils 2,9 Å erlauben Protonenübertragungsreaktionen zwischen diesen Gruppen.

Eine weitere Gruppe gerichteter Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protein ist durch die Wasserstoffbrückenbindungen von Asparagin-172 mit den Carbonylsauerstoffen O(3) und O(2) gegeben. Zur Ausbildung dieser Bindungen muß es sich bei dem Liganden um eine Acyl-dipeptid oder Tripeptid handeln. Tatsächlich ist die Aktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat Ac-L-Phe-NH₂ 57 mal größer als gegenüber L-Phenylalanylamid [6].

In der ligandfreien Struktur von pam ist das Segment 464-466 fehlgeordnet. Dieser Bereich zeigt im Komplex interpretierbare Elektronendichte. Die cArg-Einheit (2-iminihexahydro-4-pyrimdyl; s. Abb.6, unten links) des Inhibitors bewirkt durch Coulomb-Interaktion eine Strukturierung des stark negativ geladenen Segmentes 464-467 (GDDE).

Wechselwirkung vom van-der-Waals-Typ und sterische Exklusion sind offenbar wesentlich für die bevorzugte Bindung von Chymostatin A im Vergleich zu den Valin- und Isoleucinvarianten Chymostatin B bzw. C. Solche Wechselwirkungen, welche die bevorzugte Bindung von Substraten mit hydrophoben Resten begünstigen, erklären das breite Substratspektrum von pam. Im besonderen sollte die Bindung von Peptidamiden mit β-verzweigten Resten behindert sein. Aminosäuren und Peptide dieser Gruppe werden deutlich langsamer umgesetzt [6].

Protonierung: Mechanismus der Hydrolyse

Die pam-Strukturen unterstützen nicht den für Amidase-Signatur Enzyme von Paticelli und Cravatt vorgeschlagenen Mechanismus [11]. Lysin-123 ist zwar ebenso wie im Falle von FAAH notwendig für den Ablauf der Reaktion, es befindet sich aber nicht im Kontakt mit dem primären Nukleophil Serin-226. Eine Aktivierung des Serins durch Deprotonierung von Lysin-123 kann also nicht erfolgen. Weiterhin liefern die Strukturen keine Hinweis darauf, daß der pK des Lysins sich vom pK 10,8 der freien Aminosäure signifikant unterscheidet. Auch das Fehlen der kovalenten Bindung zwischen Serin-226 und Chymostatin widerspricht der Vorstellung eines durch eine Base aktivierten Nukleophils.

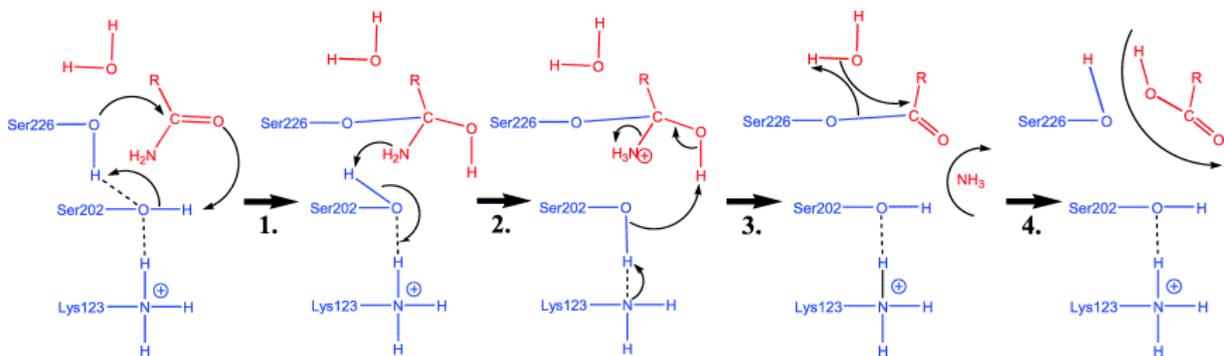


Abb.7 **Wahrscheinlicher Mechanismus der Amidhydrolyse durch pam**

1. Der protonierte Zustand von Lysin-123 vermindert die Nucleophilie von Serin-202, erhöht aber die Fähigkeit dieser Aminosäure den Carbonylsauerstoff zu protonieren und aktiviert damit die Carbonylgruppe für den nucleophilen Angriff durch Serin-226.
2. Das bei Serin-202 verbliebene Proton von Serin-226 wird auf den durch Rehybridisierung näher gerückten Amidstickstoff übertragen und vervollständigt die Abgangsgruppe.
3. Das Acyl-Enzym-Intermediat wird unter Rehydrierung von Serin-202/Lysin-123 ausgebildet.
4. Das Intermediat wird hydrolysiert.

Es fehlt also jeder Hinweis auf, ein deprotoniertes Lysin-123, welches als allgemeine Base fungiert. Tatsächlich muß im Gegenteil angenommen werden, daß das Lysin-123 protoniert vorliegt. Ein protoniertes Lysin wirkt auf das primäre Nukleophil mittel-

bar deaktivierend und erklärt die fehlende Reaktivität von pam in Bezug auf Inhibitoren (s.Abb.7).

Die Funktion der katalytische Triade Serin-cisSerine-Lysin, die mit dem Mechanismus von pam eingeführt ist, wird auch durch Mutagenese der Malonamidase E2 bestätigt [15]. Während alles dafür spricht, daß im Falle von FAAH ein basenkatalysierter Mechanismus vorliegt, ergibt die Untersuchung von pam keine Evidenz für einen solchen Mechanismus. Auch im Falle der Amidase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 sprechen alle Ergebnisse gegen einen basenkatalysierten Reaktionsmechanismus [16].

Dies bedeutet, daß innerhalb der Amidase-Familie zwei Enzymgruppen auftreten, welche die Hydrolyse nach unterschiedlichen Mechanismen katalysieren. Der basenkatalysierte Mechanismus von FAAH erfordert einen der pK-Wert des katalytischen Lysinrestes, der stark von dem Wert für die freie Aminosäure abweicht. Eine solche pK-Verschiebung kann durch die Wechselwirkung mit Ladungen auftreten. Der Vergleich von pam und FAAH zeigt, daß in FAAH in unmittelbarer Nähe des Lysins mit Glutamat-221 ein negativ geladener Rest auftritt, der einen solchen Effekt bewirken könnte.

Die Strukturinterpretation

Die ligand-freie Struktur von pam erlaubt bereits das Reaktionszentrum und die wahrscheinlichen katalytische Reste zu identifizieren. Die Struktur des Komplexes mit Chymostatin bestätigt nicht nur das Reaktionszentrum, sondern erlaubt auch den einzelnen Seitengruppen im Reaktionszentrum Funktionen zuzuordnen und gibt Aufschluß über das Substratspektrum des Enzyms. Die Identifikation des Chymostatin-Komplexes als Analogon des initialen Enzym-Substratkomplexes erlaubt die Formulierung eines Reaktionsmechanismus. Die mechanistische Hypothese aus der Strukturinterpretation wird durch alle bekannten biochemischen Daten sowie die Mutagenese gestützt.

Der durch vergleichende Analyse der Topologie erkannte Solvenskanal könnte die Funktion besitzen das Reaktionsprodukt Ammoniak zu protonieren. Hier sind weitere Studien nötig. Die Mutagenese der Arginine am Ende des Kanals wird zeigen, ob und für welche Substrate eine solche Protonenquelle eine Rolle spielt.

Literatur

- [1] J.F.Mayaux, E.Cerbelaud, F.Soubrier, P.Yeh, F.Blanche, D.Petre (1991)
J.Bacteriol. **173**, 6694-6704
- [2] M.Denton, K.G.Kerr (1998) Clin.Micobiol.Rev. **11**,57-80
- [3] K.Gomi, K.Kitamoto, C.Kumagai (1991) Gene **108**, 91-98
- [4] B.F.Cravatt, D.K.Giang, S.P.Mayfield, D.L.Boger, R.A.Lerner, N.B.Gilula (1996)
Nature **384**, 83-87
- [5] A.W.Curnow, K.Hong, R.Yuan, S.Kim, O.Martins, W.Winkler, T.M.Henkin, D.Soll
(1997) Proc.Natl.Acad.Sci USA **94**, 11819-11826
- [6] S.Neuman, M.R.Kula (2002) Appl.Microbiol.Biotechnol. **58**, 772-780
- [7] R.Bone, L.Frank, J.P.Springer, S.J.Pollack, S.A.Osborne,J.R.Atask (1994)
Biochemistry **33**, 9460-9467
- [8] S.Patel, L.Yenush, P.L.Rodriguez, R.Serano, T.L.Blundell (2002)
J.Mol.Biol. **315**, 677-685
- [9] S.Shin, T.H.Lee, N.C.Ha, H.M.Koo, S.Y.Kim,H.S.Lee,Y.S.Kim, B.H.Oh (2002)
EMBO J. **21**, 2509-2516
- [10] M.H.Bracey, M.A.Hanson, K.R.Masuda, R.C.Stevens, B.F.Cravatt (2002)
Science **298**, 1793-1796
- [11] M.P.Patricelli, B.F.Cravatt (1999) Biochemistry **38**, 14125-14130
- [12] M.P.Patricelli, M.A.Lovato, B.F.Cravatt (1999) Biochemistry, **38**, 9804-9812
- [13] M.P.Patricelli, B.F.Cravatt (2000) J.Mol.Biol. **275**, 19177-19184
- [14] T.L.Bullock, K.Breddam, S.J.Remington (1996)) J.Mol.Biol. **255**, 714-725
- [15] S.Shin, Y.S.Yun, H.M.Koo,Y.S.Kim, K.Y.Choi, B.H.Oh (2003)
J.Biol.Chem. **278**, 24937-24943
- [16] M.Kobayashi, Y.Fujiwara, M.Goda, H.Komeda, S.Shimizu (1997)
Proc.Nat.Acad.Sci. USA **94**, 11986-11991

III. Die Glykosylase AlkA: Strukturelle Basis von DNA-Reparatur

J.Labahn, O.D.Schaerer, A.Long, K.Ezaz-Nikpay, G.L.Verdine, T.E.Ellenberger, (1996)

Cell **86**, 321-329

Structural basis for excision repair of alkylation damaged DNA

Die DNA-Glykosylase II AlkA

Die Veränderbarkeit von DNA durch Oxydation, Hydrolyse und Alkylierung beruht auf der chemischen Reaktivität der Basen [17]. Diese Basenmodifikationen können sowohl spontan auftreten als auch durch exogene Chemikalien bewirkt werden. Bleiben sie unkorrigiert treten nicht nur Mutationen auf, sie können auch die DNA-Replikation bzw. Transkription unterdrücken und damit letal sein [18].

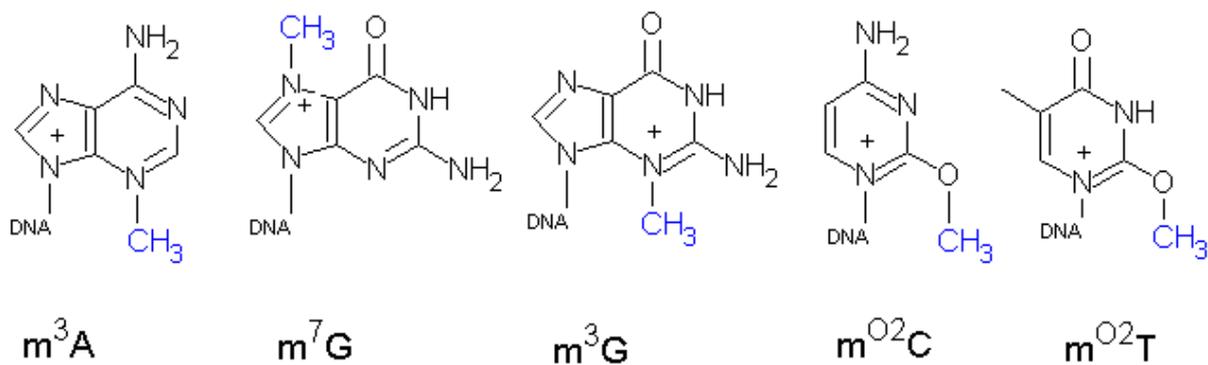


Abb.8 Typische Substrate der DNA-Glykosylase AlkA

Eine besondere Rolle nimmt hier die Alkylierung von DNA ein. Die enzymatische Methylierung von DNA wirkt regulativ. Der zelluläre Methyl donor S-Adenosylmethionin reagiert aber auch direkt mit DNA (s. Abb.8). Hierbei entstehen bevorzugt 7-Methylguanin (m⁷G) und 3-Methyladenin (m³A), welche die Bindung regulatorischer Proteine an die DNA behindern [19]. Die Reparatur solcher Läsionen erfolgt durch *Excision Repair* [20]. Monofunktionale DNA-N-Glykosylasen spalten die C1'-N glykosylische Bindung und setzen die beschädigte Base frei. Es entsteht eine **AP-site** (*apurinic site*). Im folgenden wird ein Teil des beschädigten DNA-Stranges ausge-

schnitten und entsprechend der Sequenz des Gegenstranges durch DNA-Polymerase neu synthetisiert [21].

Escherichia coli besitzt zwei Alkylpurin-DNA-Glykosylasen, das konstitutiv exprimierte Tag Protein (DNA-Glykosylase I), welches selektiv m³A hydrolysiert, und das induzierbare AlkA Protein (DNA-Glykosylase II, 31 kDa), welches durch kleine Alkylreste modifizierte Basen ausschneidet [22].

Struktur von AlkA

Die Röntgenstrukturanalyse der Glykosylase AlkA zeigt, daß es sich um ein globulär gefaltetes Protein mit Abmessungen von 50 * 45 * 25 Å handelt, welches aus zwei etwa gleich großen Domänen besteht. Die N-terminale Domäne besitzt eine gemischte α - β -Struktur bestehend aus einem 5-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und flankierenden Helices (dunkelblau bis türkis, Abb9). In Form und Topologie ähnelt diese Domäne sehr dem konserviertem *Tandem Repeat* des TATA-bindenden Proteins [23]. Es ist nicht klar, ob diese Ähnlichkeit von funktionaler Bedeutung

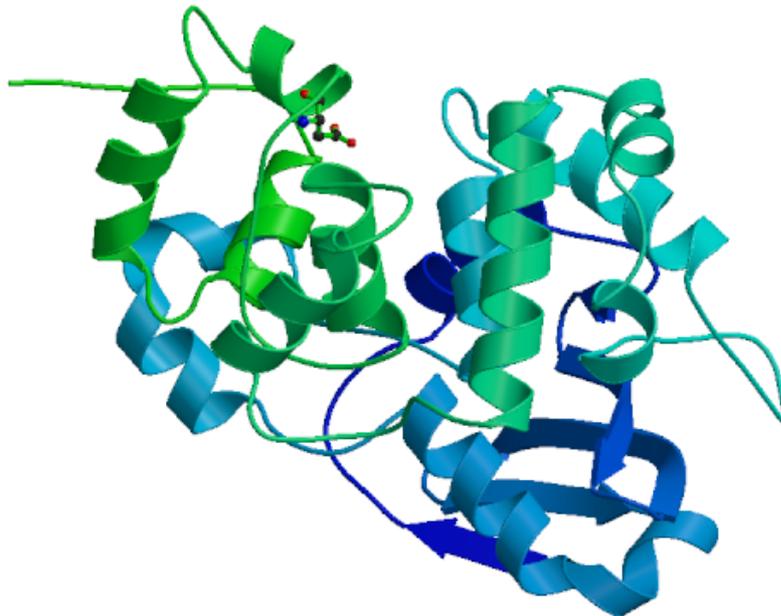


Abb.9

Die DNA-Glykosylase II AlkA

Protein Data Bank: 1MPG

Der Kettenverlauf ist durch Farbabstufung von blau (N-Terminus) nach grün (C-Terminus) dargestellt. Die katalytische Aminosäure Aspartat-238 (ball-and-stick) liegt in der C-terminalen Domäne am Rand des Reaktionszentrums, welches sich in Richtung der Kontaktzone der Domänen erstreckt.

Domäne 2 ist ein globuläres Bündel von sieben Helices mit einem ausgedehnten hydrophoben Kernbereich. Eine genauere Betrachtung zeigt, daß Domäne 2 aus dem C-terminalen Segment und dem N-terminalen Segment des Proteins zusammengesetzt ist.

Das C-terminale Segment, welches Aspartat-238 enthält, wird von der C-terminalen α -Helices gebildet (lindgrün, Abb.9) und den Helices (dunkelgrün, Abb.9), welche die Verbindung zur N-terminalen Domäne herstellen. Die Helices bilden ein rechtshändiges 4-Helix-Bündel. Zwischen diesem C-terminalen Segment und dem N-terminalen Segment (himmelblau, Abb.9) befindet sich eine hydrophobe Tasche, an deren Rand Aspartat-238 lokalisiert ist.

Diese hydrophobe Tasche zeigt für Schweratomderivate von AlkA Kristallen eine Größenveränderung. Eine scharnierartige Bewegung erlaubt eine Rotation des C-terminalen Segments. Hierdurch vergrößert sich die Spalte zwischen den Segmenten dieser Domäne.

Das Reaktionszentrum von AlkA

Im Allgemeinen verlaufen Glykosyltransferreaktion derart, daß das Enzym ein aktives Nukleophil bereitstellt, welches das anomere Kohlenstoffatom des Substrates angreift. Die Stereochemie der Reaktion erfordert typischerweise eine Tasche im Protein, in welcher die Reaktion abläuft - das Reaktionszentrum [33].

Die hydrophobe Spalte zwischen den Domänen 2 und 3 weist die für das Reaktionszentrum notwendigen Eigenschaften auf. Ihre hydrophobe Oberfläche von ca. 800 \AA^2 erlaubt maximale Wechselwirkung mit der ebenfalls hydrophoben alkylierten Base. Hier finden sich auch zwei Aspartate, die geeignet sind das positiv geladene Substrat durch Coloumb-Wechselwirkung zu binden, und als Nukleophil zu fungieren.

Durch Mutagenese läßt sich zeigen, daß beide Aminosäuren für die katalytische Aktivität wichtig sind. Notwendig ist jedoch nur Aspartat-238, bei dem es sich also um das Nukleophil handeln könnte. Untersuchung der Affinität von AlkA und Mutanten (D237N, D238N) zu Pyrrolidin-DNA zeigen auf, daß die Bindung dieses Übergangszustands-analogen nur bei Mutagenese von Aspartat-238 um Größenordnungen abnimmt, während die Bindung des Reaktionsproduktes verstärkt wird.

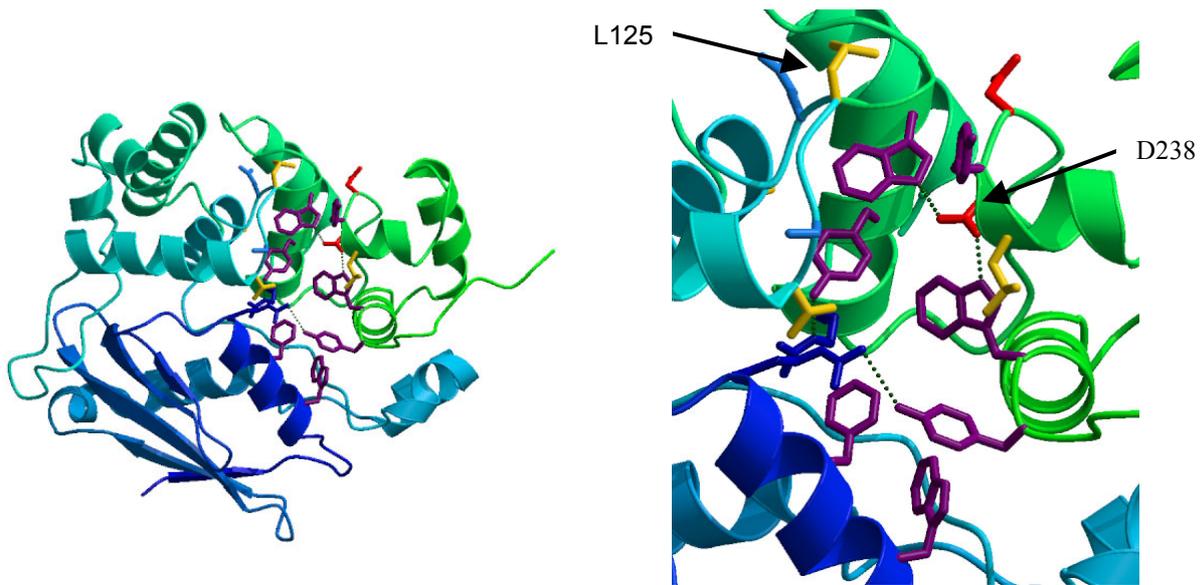


Abb.10 Das Reaktionszentrum von AlkA

Links: Übersicht, um Vertikale in Abb.9 180° gedreht
Rechts: Detailvergrößerung mit wichtigen Seitenketten

Aromatische Seitengruppen sind in magenta dargestellt, aliphatische gelb, polare hellblau. Positiv (negativ) geladene Seitengruppen im aktiven Zentrum sind blau (rot) koloriert. Wasserstoffbrücken zwischen Seitengruppen sind durch gebrochene, grüne Verbindungen repräsentiert. Aspartat-238 ist durch Brückenbindungen an Tryptophane in seiner Position fixiert. Leucin-125 nimmt eine solvensexponierte Position an der Oberfläche des Moleküls ein.

Von entscheidender Bedeutung für den Ablauf der Reaktion ist also die direkte elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Aspartatrest und der positiven Ladung der Pyrrolidin-AP-site. Der Angriff des Aspartats auf die glykosidische Bindung erfordert jedoch, daß die modifizierte Base des Substrats aus der DNA-Helix herausrotiert und in die Bindungstasche des Protein inseriert ist. Eine solche Dynamik von DNA-Basen ist für die enzymatische Methylierung von DNA nachgewiesen, welche Substrate von AlkA erzeugt [24,36]. Auch im Falle dieser Reaktion spielt die Wechselwirkung zwischen der auf der Base delokalisierten positiven Ladung und den Aromaten des Reaktionszentrums eine entscheidende Rolle [25,35]. Im Falle von AlkA bewirkt die starke π -Donor/Akzeptor Wechselwirkung zwischen der elektronenarmen, alkylierten Base des Substrates und den elektronenreichen aromatischen Ringen des Reaktionszentrums (F22, W218, Y222, W272, Y273) offenbar die Selektion der modifizierten Base, d.h. das Auffinden der Läsion auf dem DNA-Strang. Auch die Aspartatreste (D237, D238) tragen sicher zur Bindung des positiv geladenen Substrats bei. Darüberhinaus sind sie geeignet als direkte oder mittelbare Nukleophi-

le die Hydrolyse durch einen Angriff auf den anomeren Kohlenstoff des Substrates einzuleiten. Auffällig ist das Auftreten einer Ansammlung positiver geladener Arginine (R22,R226), die geeignet sind Protonen für die Hydrolyse bereitzustellen.

Mechanismus der DNA-Glykosylasen

Neben den monofunktionalen Glykosylasen wie AlkA ist eine weitere Klasse von Enzymen bekannt, welche beschädigte Basen in DNA abbauen. Die Glykosylasen vom Lyase-Typ wie Endonuklease III bauen die Läsion an der Zuckereinheit durch β -Eliminierung des 3'-Phosphates ab. Hierbei greift ein durch Aspartat aktivierter Lysinrest den anomeren Kohlenstoff an. Das kovalente Intermediat durchläuft eine Reihe chemische Transformationen, die schließlich zur Degradierung der Desoxyribose führen [26].

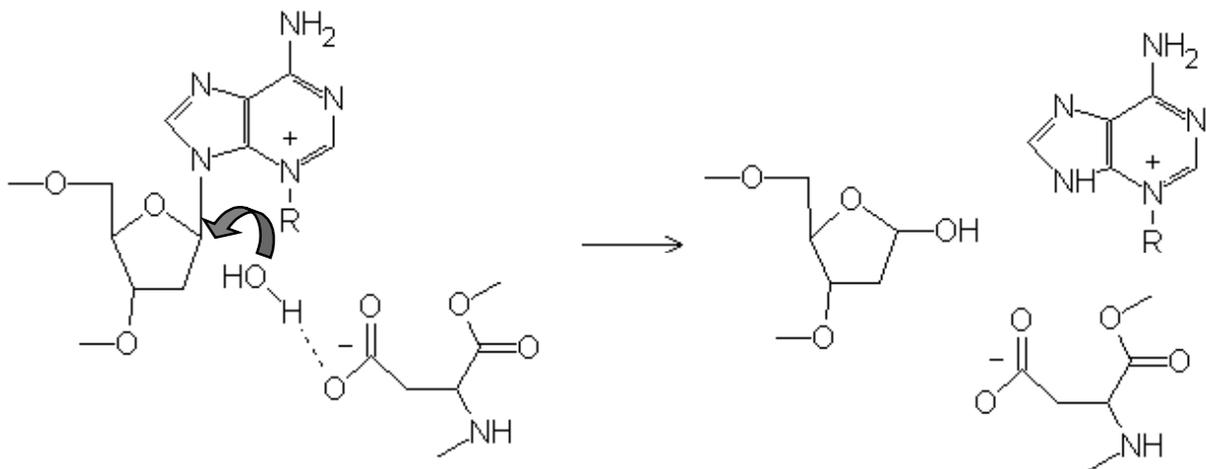


Abb.11 Hydrolyse nach S_N2

Hydrolytische Abspaltung der alkylierten Base durch Angriff eines aktivierten Wassermoleküls. Aspartat-238 unterstützt die Positionierung der alkylierten Base durch elektrostatische Anziehung und aktiviert das primäre Nucleophil Wasser.

Die topologischen Ähnlichkeiten von AlkA und EndoIII legen die Hypothese nahe, daß die anfänglichen Schritte der Reaktion für beide Enzymklassen analog verlaufen, d.h. das Aspartat aktiviert das unmittelbare Nucleophil. Da anders als für die Lyasen

kein kovalentes Protein-DNA-Intermediat nachgewiesen werden konnte, müßte es sich bei dem unmittelbaren Nukleophil bei AlkA um ein Wassermolekül handeln. Die Struktur von AlkA im Komplex mit einer modifizierten DNA, welche die *AP-site* in Form einer basenlosen 1-Azariboseeinheit enthält [27], bestätigt im Wesentlichen die bereits aus der AlkA-Struktur gewonnenen Erkenntnisse [28]. Die *AP-site* ist aus der DNA-Helix herausgedreht und an der erwarteten Position in AlkA gebunden.

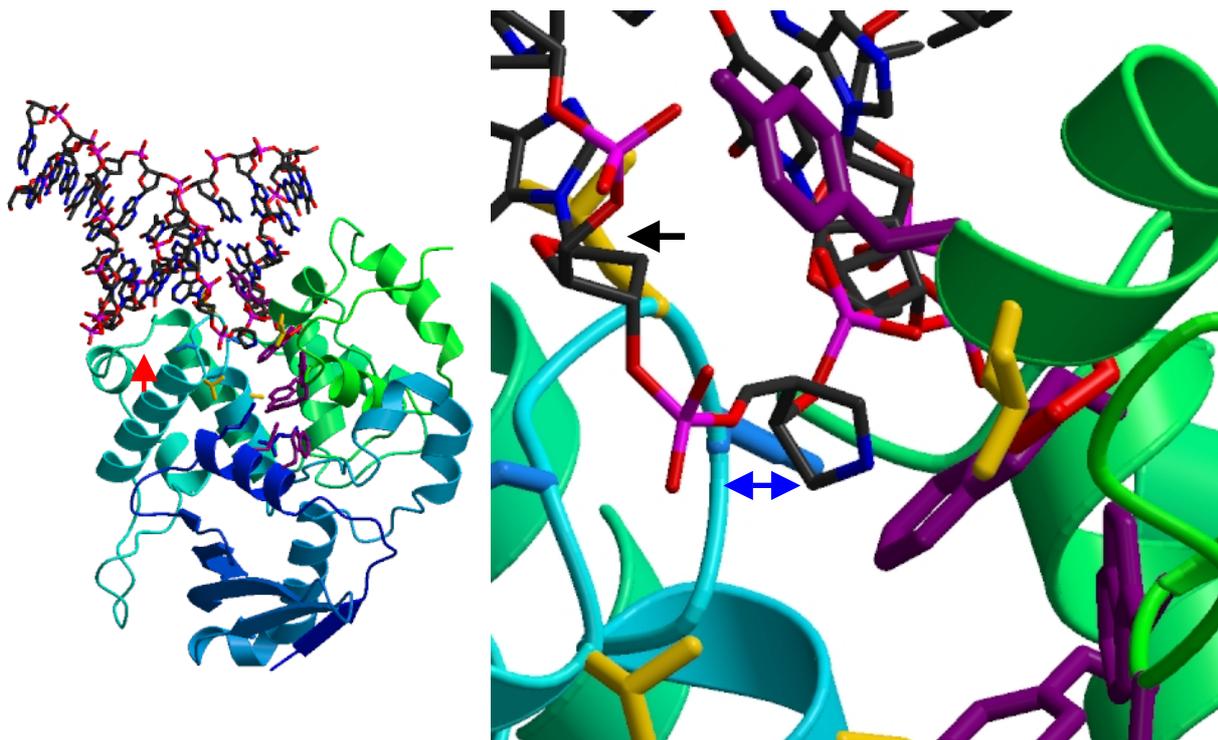


Abb.12 **Komplex von AlkA mit 1-Aziridin-DNA-Oligomer**

Protein Data Bank 1DIZ [28]

Links: Übersicht, um Vertikale in Abb.10 90° gedreht.

Rechts: Detailansicht, DNA-Kohlenstoff in schwarz

Der Aziridin-Ring (rechts, Bildmitte) enthält durch den Stickstoff (blau) eine positive Ladung. Der Komplex entspricht damit dem Karbo-kationischen Komplex nach Abspaltung der alkylierten Base in einem S_N1 -Mechanismus. Die Packung des Aziridin-Ringes relativ zum Protein erlaubt keinen Zugang für ein Wassermolekül (blauer Pfeil), so daß ein S_N2 -Mechanismus sterisch ausgeschlossen ist. Die Seitengruppe von Leucin-125 (schwarzer Pfeil) nimmt den Platz der fehlenden Base innerhalb der DNA-Helix ein.

Da HhH-motiv ist in der Übersicht (links) durch einen roten Pfeil markiert.

Die Position der *AP-site* innerhalb des Reaktionszentrums ist nicht vereinbar mit einem Verdrängungsmechanismus vom Typ S_N2 . Ein solcher Mechanismus verlangt

ein durch das konservierte, katalytische Aspartat aktiviertes Wassermolekül, welches nahe C1' lokalisiert ist. Die Kristallstruktur von AlkA im Komplex mit 1-Azaribose-DNA zeigt jedoch, daß das N1'-Atom der 1-Azaribose, welches dem C1' des Substrates entspricht, im direkten Kontakt (Abstand 3,2 Å) mit Aspartat-238 ist. Aus sterischen Gründen ist die Beteiligung eines aktivierten Wassermoleküls also ausgeschlossen [28].

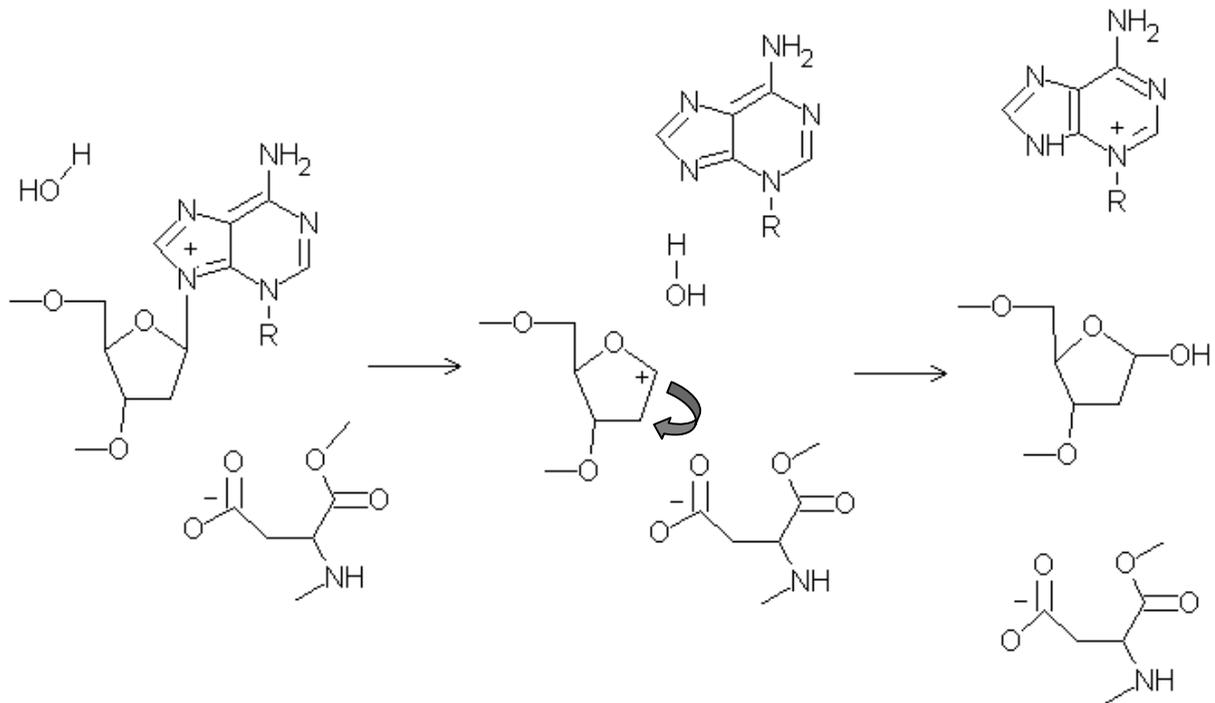


Abb.13 Hydrolyse nach S_N1

Abspaltung der alkylierten Base durch Stabilisierung des Carbokations durch Aspartat-238, welches als Base geeignet ist das am Carbokation angreifende Wassermolekül zu deprotonieren.

Alternativ wird ein S_N1 -Mechanismus diskutiert (s. Abb13). Die positive Zusatzladung der alkylierten Base verlagert sich unter dem Einfluß der negativen Ladung des katalytischen Aspartats nach dem diesem am nächsten liegenden anomeren C1' der Ribose. Die Abspaltung der Base erfolgt über die Ausbildung eines durch Aspartat-238 stabilisierten Carbokations bzw. Oxoniumions, welches durch Wasser hydroxyliert wird [28].

Die Protonierungsreaktion

Zur Abspaltung der alkylierten Base von der DNA ist keine Protonierung zur Ausbildung einer Abgangsgruppe nötig. Da die Base durch die Alkylierung bereits positiv geladen ist, wird erst das neutrale Spaltprodukt protoniert werden. Hierfür kommen neben dem Wassermolekül, welches die am anomeren Kohlenstoff angreifende Hydroxylgruppe liefert, die Arginine im Reaktionszentrum in Frage. Eine direkte Protonierung des Stickstoffs der Base (N^9 bei Adenin) ist allerdings nur möglich, wenn sich die Base nach Abspaltung den Argininen nähert. Diese Möglichkeit besteht im Falle der S_N1 -Reaktion. Die Deprotonierung des am anomeren Kohlenstoff angreifenden Wassermoleküls kann nur durch Aspartat-238 erfolgen. Aspartat-237 kann auch durch Reorientierung der Seitengruppe nicht auf ein Wassermolekül am Carbokation einwirken.

Die negative Ladung des Aspartats (D238) begünstigt also nicht nur die Bindung der alkylierten Base im Reaktionszentrum, sondern bewirkt auch die Stabilisierung des Carbokations und die Aktivierung des Wassermoleküls.

Das Auftreten einer S_N1 -Hydolyse am anomeren Kohlenstoff ist ungewöhnlich. Ein solcher Mechanismus kann nur auftreten, wenn die glykosidische Bindung geschwächt ist. Die Substrate von AlkA zeigen tatsächlich erhöhte Hydrolyseraten unter sauren Bedingungen [29]. Daher könnte die Substratselektivität von AlkA weniger durch selektive Erkennung bzw. Bindung des Substrates als durch die geschwächte glykosidische Bindung verursacht sein [30]. Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von Substraten, die keine geschwächte glykosidische Bindung aufweisen. Substrate mit alkylierten Basen wie 1- N^6 -Ethenoadenosin, die nicht elektronendefizient sind, zeigen mit AlkA deutlich schwächere Reaktion [31].

Die DNA-Bindung durch AlkA

Die Bedeutung der topologischen Verwandtschaft von AlkA und EndoIII mußte auf der Basis des AlkA-DNA-Komplexes revidiert werden. Die Interaktionzone von AlkA mit dem Substrat fällt in den topologisch konservierten Bereich. Dies bedeutet, daß die konservierte Topologie die Ursache einer speziellen Verzerrung der DNA ist, wel-

che die Bindung der DNA und die Zugänglichkeit des im Reaktionsverlauf zu modifizieren Bereiches der DNA begünstigt [28]. Das sogenannte HhH-Motiv (helix-hairpin-helix) bindet die DNA an der 3'-Seite der AP-site (s. Abb.12). Das in der Spitze der Verbindung zweier Helices sitzende Leucin-125 nimmt die Position der fehlenden Base innerhalb der DNA ein und verursacht eine Krümmung der DNA von ca. 66° und eine Aufweitung der kleinen Furche der DNA auf ca. 15 Å (s. Abb.12). Das HhH-Motiv wird für die Deformation der DNA verantwortlich gemacht (s. Abb.12), die das Herausdrehen der Base ermöglicht [32].

Dieses in DNA-Glykosylase konservierte HhH-Motiv stellt eine Variation des DNA bindenden HtH-Motiv (Helix-turn-Helix) dar [37]. Das HtH-Motiv tritt bei DNA-bindenden Proteinen auf, die keine andere Funktion besitzen, als die Struktur der DNA zu verändern [38]. Diese Proteine krümmen die DNA als Dimere [38]. Die Bindung und Krümmung der negativ geladenen DNA erfolgt beim HtH-Motiv wesentlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von positiv geladener Aminosäureseitenketten des Proteins [39]. Eine solche Bindung der DNA durch die DNA-Glykosylase würde aber die Erkennung der positiven Ladung an der alkylierten Base und ihr herausdrehen aus der DNA-Helix erschweren. Tatsächlich erfolgt die Bindung durch Wasserstoff-Brückenbindung und hydrophobe Wechselwirkungen [28].

Eine andere Enzymklasse, die DNA-methyl-transferasen, übertragen eine Methylgruppe von S-Adenosyl-methionin auf eine bestimmte Base innerhalb einer Erkennungssequenz der DNA. Die einfachsten, bakteriellen Vertreter dieser Gruppe binden die DNA zwischen zwei Domänen durch elektrostatische Wechselwirkung mit einer Vielzahl von positiv geladenen Seitengruppen [40]. In diesem Fall ist das Substrat an der zu alkylierenden Base ungeladen. Erst durch ihrer Alkylierung tritt eine abstoßende Wechselwirkung mit dem Protein auf. Dies begünstigt die Freisetzung des Produktes.

Es besteht also ein klarer Zusammenhang zwischen der Art der Substratbindung und der Ladung des Substrates bzw. Produktes.

Die Strukturinterpretation

Die Struktur des DNA-Glykosylase weist zwei Regionen auf, die zunächst als Reaktionszentrum in Frage kommen. Der Bereich zwischen der all-helikalen Domäne (links

in Abb.9) und der gemischten α - β -Domäne (recht in Abb.9) und die Tasche zwischen dem N-terminale und dem C-terminalen Segment in der all-helikalen Domäne. Auf Basis der Seitengruppenverteilung, d.h. der Ladungsverteilung, wurde die hydrophobe Tasche in der all-helikalen Domäne als Reaktionszentrum identifiziert und das Aspartat-238 als (sekundäres) Nukleophil. Da Mutagenese in dieser Region diese Interpretation bestätigte, wurde auf der Basis dieser Einzelstruktur in Anlehnung an andere Hydrolysemechanismen [33], die typischerweise nach S_N2 ablaufen, ein solcher Mechanismus vorgeschlagen [34].

Die Struktur des Komplexes von AlkA mit einem AP-site analogen Substrat zeigt zwar einen Bindungszustand des DNA-Derivats, welcher wie erwartet eine exponierte AP-site aufweist. Es ist jedoch nicht genug Raum vorhanden für eine Wassermolekül, welches als Nukleophil wirken könnte. Daher muß anstelle eines Verdrängungsmechanismus nach S_N2 ein Zerfallsmechanismus nach S_N1 angenommen werden.

Literatur

- [17] T.Lindahl (1993) Nature **362**, 709-715
- [18] E.C.Friedberg, G.C.Walker, W.Siede (1995),
DNA Repair and Mutagenesis (Washington,D.C., Am.Soc.Microbol.)
- [19] B.Rydberg, T.Lindahl (1982) EMBO J. **1**, 211-216
- [20] E.Seeberg, L.Eide, M.Bjæros (1995) Trends Biochem. Sci. **20**, 391-397
- [21] K.Sakumi,M.Sekiguchi (1990) Mutation Res. **236**, 161-172
- [22]L.Thomas, C.-H.Yang,D.A.Goldthwait (1982) Biochemistry **21**, 1162-1169
- [23] J.Kim, D.B.Nikolov, S.K.Burley (1993) Nature **365**, 520-527
- [24] R.J.Roberts, X.Cheng (1998) Annu.Rev..Biochem. **67**, 181-191
- [25] J.B.O. Mitchell, C.L.Nandi,I.K.McDonald, J.M.Thornton (1994)
J.Mol.Biol. **239**, 315-331
- [26] M.M.Thayer, H.Ahern, D.Xing,R.P.Cunningham, J.A.Trainer (1995)
EMBO J. **14**, 4108-4120
- [27] O.D.Schärer, J.-Y.Ortholand, A.Ganesan, K.Ezaz-Nikpay, G.L.Verdine
(1995) J.Am.Chem.Soc.**117**,6623-6624
- [28] T.Hollis, Y.Ichikawa, T.E.Ellenberger (2000), EMBO J. **19**, 758-766
- [29] P.D.Lawley, P.Brookes (1963) Biochem J. **89**,127-138

-
- [30] K.G.Berdal, R.F.Johansen, E.Seeberg (1998) EMBO J. **17**, 362-367
- [31] B.Hang, B.Singer, G.P.Margison, R.H.Elder (1997)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **94**, 12869-12874
- [32] Y.Guan, R.C.Manuel, A.S.Arva, S.S.Parikh, C.D.Mol, J.H.Miller, S.Lloyd,
J.A.Trainer, (1998) Nature Struct.Biol. **5**, 1058-1064
- [33] B.Sun, K.A.Latham, M.L.Dodson, R.S.Lloyd (1995)
J.Biol.Chem. **270**, 19501-19508
- [34] O.D.Schärer, H.M.Nash, J.Jiricny, J.Laval, G.Verdine (1998)
J.Biol.Chem. **273**, 8592-8597
- [35] G.Schluckebier, J.Labahn, J.Granzin, I.Schildtkraut, W.Saenger (1995)
Gene **157**, 131-134
- [36] G.Schluckebier, J.Labahn, W.Saenger (1998)
Biol.Chem. **391**, 918-921
- [37] D.Kostrewa, J.Granzin, C.Koch,H.W.Choe, S.Ragunathan, W.Wolf, J.Labahn,
R.Kahman, W.Saenger (1999) Nature **349**, 178-180
- [38] W.Saenger, C.Sandmann, K.Theis, E.B.Starikov, D.Kostrewa, J.Labahn,
J.Granzin (1993) Nucleic Acids and Molecular Biology **7**, 158-169, Springer Vlg.
- [39] D.Kostrewa, J.Granzin, C.Koch,H.W.Choe, S.Ragunathan, W.Wolf, J.Labahn,
R.Kahman, W.Saenger (1992) Structure and Functions **2**, 11-16, Adenine Press
- [40] J.Labahn, J.Granzin, G.Schluckebier, D.P.Robinson, W.E.Jack, I.Schildtkraut,
W.Saenger (1994) Proc.Natl.Acad.Sci. USA **91**, 10957-10961

IV. Der SRII-HtrII-Komplex: Das Proton in der Signaltransduktion ?

V.I.Gordeliy, J.Labahn, R.Moukhametzianow, R.Efremov, J.Granzin, R.Schlesinger, G.Büldt, T.Savopol, A.J.Scheidig, J.P.Klare, M.Engelhard, *Nature* (2002) **419**, 484-487
Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II – transducer complex

Die Familie photoaktiver 7-Helix Membranproteine

Rhodopsine gehören zur Klasse der membranständigen 7-Helix Proteine mit Retinal als prosthetischer Gruppe. Der Chromophor all-trans-Retinal ist als Schiff'sche Base (Azomethin) an einem Lysinrest gebunden [41].

Diese Familie photoaktiver Proteine zerfällt nach ihrer Funktion in verschiedene Untergruppen. Die bekanntesten Vertreter sind das visuelle Rhodopsin der Vertebraten, die Protonenpumpen wie das Bacteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum* und die phototaktischen Proteine wie das Sensory Rhodopsin (SRII) aus *Natronobacterium pharaonis*.

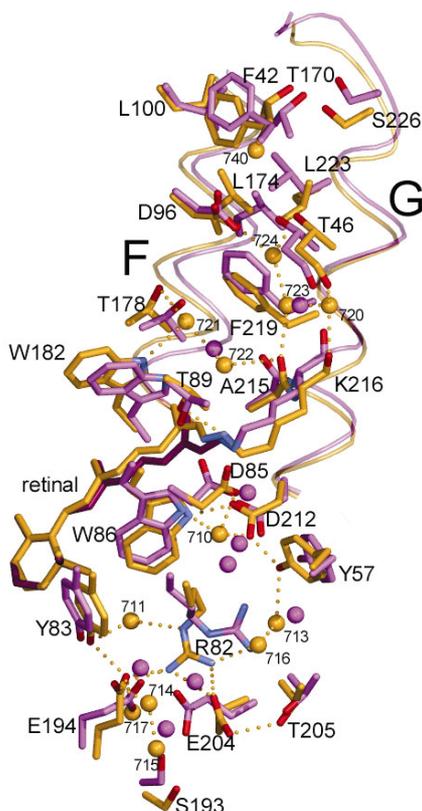


Abb.14 Protonenleitung im Bacteriorhodopsin
Protein Data Bank: 1C3W, 1CWQ

Superposition der Grundzustandsstruktur (magenta) und des M-Zustandes (gelb) von Bacteriorhodopsin. Gezeigt ist der Hauptkettenverlauf des zytoplasmatischen Teils der Helices F und G als Spiralförmige Strukturen. Die zytoplasmatische Seite des Proteins befindet sich am oberen Bildrand, die extrazelluläre unten. Die Mehrzahl der gezeigten Seitengruppen sind Teil des Protonenkanals bzw. direkt an der Protonenleitung beteiligt.

Der M-Zustand von Bacteriorhodopsin ist der Zustand des Proteins im Photozyklus in dem die großen Veränderungen im Vergleich zum Grundzustand auftreten. Neben der Retinalisomerisierung und Seitengruppenreorientierungen wird eine Relokalisation der Helices F und G beobachtet. Die Relokalisation von Wassermolekülen im Protonenkanal ist besonders signifikant im Bereich um Arginin-82 und Glutamat-204. Diese Aminosäuren zeigen eine Änderung des Konformers beim Übergang in den M-Zustand, der mit einer signifikanten Ladungsverschiebung einhergeht [51].

Visuelles Rhodopsin gibt das Lichtsignal über eine G-Protein gekoppelte Signalverstärkungskaskade weiter, die durch Arrestin unterbrochen wird [42,43].

Für Bacteriorhodopsin ist der Photozyklus besonders gut untersucht [44]. Anregung durch Lichteinfall isomerisiert das all-trans-Retinal (L-Zustand). Beim Übergang in den M-Zustand geht das Proton des 13-cis-Retinals auf Aspartat-85 über. Gleichzeitig wird an der extrazellulären Membranoberfläche ein Proton freigesetzt. In diesem M-Zustand treten auch bedeutende strukturelle Veränderungen im Protein auf (s. Abb.14). Die Reptonierung des Retinals erfolgt von der zytoplasmatischen Seite durch Aspartat-96, welches seinerseits von der zytoplasmatischen Oberfläche reptoniert wird. Das Bacteriorhodopsin bewirkt also einen Nettoprotonentransport durch die Membran. Der entstehende Protonengradient treibt die Synthese von ATP.

Der SRII-Transducer Komplex in der Signalkaskade

Der Photozyklus der phototaktischen Proteine wie Sensory Rhodopsin II aus *Natrobacterium pharaonis* leistet dagegen keine Energieumwandlung zum Nutzen des Organismus sondern Signaltransduktion. Hier werden strukturelle Änderungen des Proteins an einen Transducer (HtrII) übertragen, welcher biochemische Prozesse steuert (s. Abb.15).

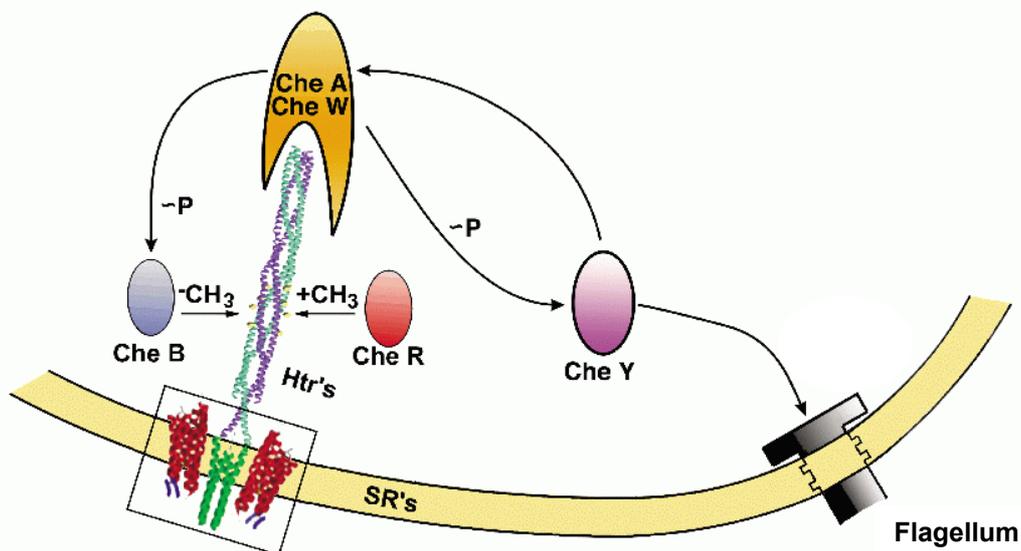


Abb.15 Die phototaktische Signalkaskade

Der homodimere Sensory Rhodopsin – Transducer Komplex überträgt das Signal auf den CheA/CheW-Komplex. Der ebenfalls homodimere Histidinkinase-Komplex (CheA) phosphoryliert die Methylesterase CheB und die Aspartatkinase CheY. Phosphoryliertes CheY bindet an den Flagellennotors und ändert damit die Bewegungsrichtung der Zelle. Das Zusammenspiel von CheB und der Methylase CheR steuert den Lichtadaptionsprozess der Bakterien [45].

Die Photoisomerisierung des Retinals dient dem Aufbau struktureller Veränderungen des Komplexes und führt nicht zu einem Netto-Protonengradienten über die Membran [46].

Die Struktur des Sensory Rhodopsin-Transducer Komplexes

Der Komplex besteht aus jeweils zwei Molekülen Sensory Rhodopsin und Transducer. Er weist eine zwei-zählige Symmetrieachse auf, die von den beiden Transducermolekülen umgeben ist. Die Transmembranhelices des Transducers verlaufen parallel den Helices F und G des SR II (s. Abb.16).

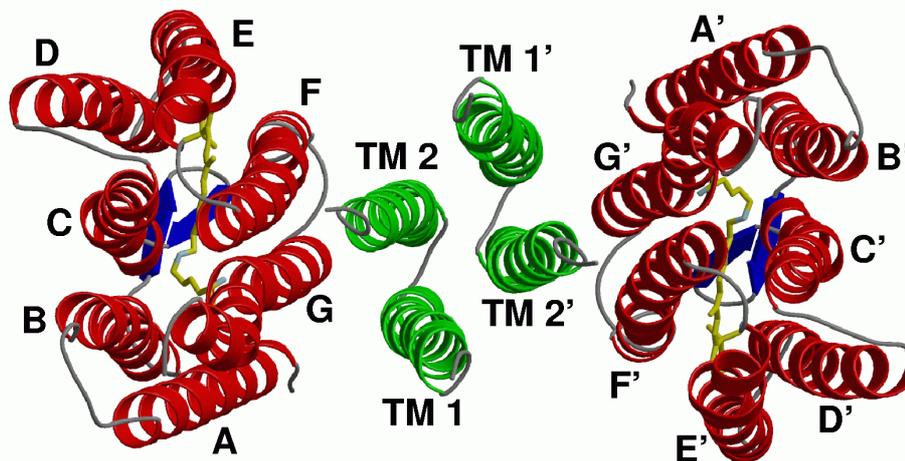


Abb.16 **Sensory Rhodopsin-Transducer Komplex**

Protein Data Bank:1H2S

Sensory Rhodopsin II (α -Helices in rot, β -Faltblattstruktur in blau, Retinal in gelb) bindet das Transducer-Fragment an den Helices F und G. Die Transducerhelices (grün) TM2 und TM2' vermitteln nicht nur den Hauptanteil der Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und Transducer sondern auch zwischen den Transducermolekülen des Homodimers.

Die Transducer-Helices erscheinen um drei Windungen versetzt gegen die Rhodopsin-Helices, d.h. sie reichen weiter in das extrazelluläre Medium. Eine Analyse der Ladungsverteilung auf diesen Helices zeigt jedoch, daß für beide Moleküle die Ladungen außerhalb des hydrophoben Membranbereiches liegen (s. Abb.17). Die betroffenen Aminosäuren 44-59 sind im homologen Protein HtrI aus *Halobacterium salinarum* nicht vorhanden. Dagegen findet sich ein solcher Sequenzbereich an der extrazellulären Seite des Chemorezeptors HtrII aus *H. salinarum*. HtrII enthält hier

eine zusätzliche Serin-bindende Domäne [47]. Bei der extrazellulären Extension des Transducers aus *N. pharaonis* handelt es sich also möglicherweise um ein evolutionäres Relikt eines Proto-Chememorezeptors [48].

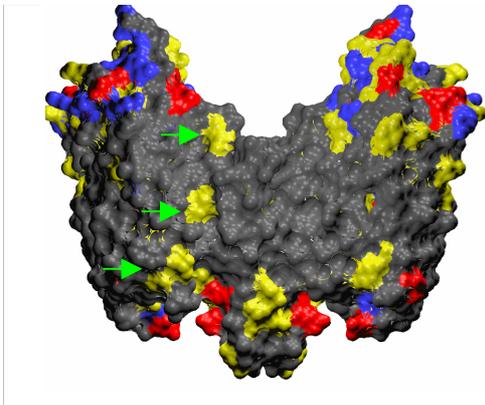


Abb.17 Aminosäureverteilung im Komplex

Positiv (blau) und negativ (rot) geladene Seitengruppen verteilen sich außerhalb des Membranbereiches. Der innere hydrophobe Membranbereich weist überwiegend unpolare (grau) und wenige polare (gelb) Aminosäuren auf.

Die Grenzfläche zwischen Rhodopsin und Transducer besitzt im hydrophoben Membranbereich drei polare Bereiche (Pfeile). Hier sind die Moleküle durch Wasserstoff-Brückenbindungen verknüpft.

Die Bindung des Transducers an das SRII erfolgt im Wesentlichen durch die van-der-Waals-Wechselwirkung von hydrophoben Seitengruppen. Die verzahnte Packung der Seitengruppen der Moleküle maximiert die Wechselwirkung und minimiert den relativen Bewegungsspielraum der Helices (s. Abb. 18,19).

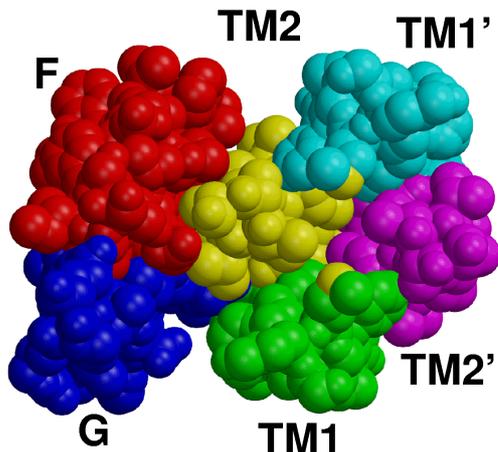


Abb.18 Helixpackung an der Molekülgrenze

Kalottenmodell mit v.d.Waals Radien
Cytoplasmatische Ansicht

Es bestehen keine Kontakte zwischen TM1 und TM1'. Die Dimerisierung beruht auf der Wechselwirkung der Helices TM2 und TM2'.

Die Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und dem Transducer werden von Helix F,G und TM2 getragen.

Die hydrophoben Seitengruppen von Helix F des Rhodopsins und TM2 des Transducers formen eine interkalierende Packung. Alternative Packungen sind denkbar. Sie entstehen durch Verschiebung der Transducer-Helices relativ zu Helix F um ganze Windungen entlang der Membrannormalen. In solchen Packungen können sich die beobachteten Wasserstoffbrücken jedoch nicht ausbilden. Diesen Wasserstoff-

brücken ist also nicht nur ein Beitrag zur Bindungsstärke sondern auch ein orientierender Effekt für die relative Positionierung der Moleküle zuzuordnen (s. Abb.19).

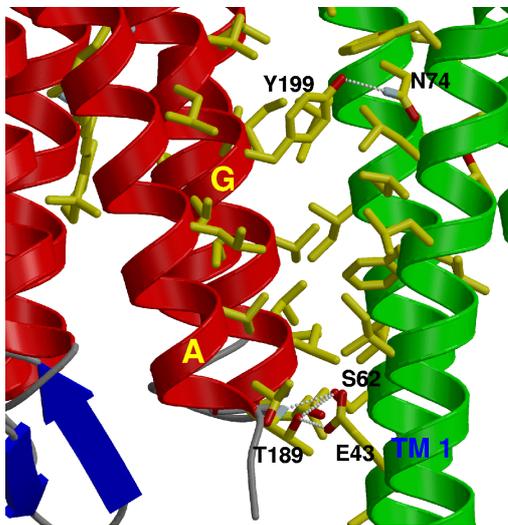


Abb.19 Komplexstabilisierende H-Brücken
(H-Brücken grau gepunktet)

Die relative Position des Transducers und des Rhodopsin wird durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert.

Im hydrophoben Membranbereich liegt die Brücke zwischen Tyrosin-199 des Sensory Rhodopsins und Asparagin-74 des Transducers.

Die Reorientierung der Seitengruppe von Tyrosin-199 ist die auffälligste Veränderung im Rhodopsin durch die Bindung des Transducers.

Die Struktur des Sensory Rhodopsins im Komplex ähnelt außerordentlich der Struktur des freien SRII [49,50]. Unterschiede finden sich im Interaktionsbereich von Rezeptor und Transducer. Insbesondere Tyrosin-199 zeigt eine deutlich veränderte Konformation, so daß die Wasserstoff-Brücke zum Transducer ausgebildet werden kann.

Wirkmodell der Signaltransduktion des Komplexes

Zur Zeit liegt keine Struktur des M-Zustandes aus dem Photozyklus des Sensory Rhodopsins vor. Das weitgehend homologe Bacteriorhodopsin (BR) erlaubt jedoch einige Schlußfolgerungen, die auch auf das Sensory Rhodopsin zutreffen sollten (s. Abb.20).

Die im Verlauf des Photozyklus von Bacteriorhodopsin auftretenden Strukturänderungen des M-Zustands [51], die auf die Isomerisierung des Retinals zurückzuführen sind [52], d.h. im Besonderen die Veränderungen der Helices F und G, werden auch für das Sensory Rhodopsin erwartet. Solche Strukturveränderungen, wie die Verschiebung der Helices F und G, die dem Transducer am nächsten liegen bzw. mit ihm im direkten Kontakt sind, werden auf den Transducer wirken und seine Interaktion mit dem CheA/CheW-Komplex beeinflussen.

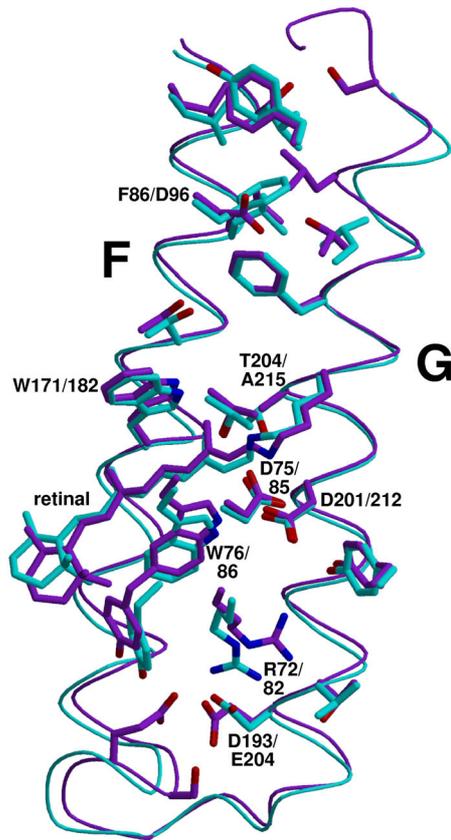


Abb.20 Die Helices F und G in BR und SRII
Protein Data Bank:1C3W,1H68

Superposition des Grundzustands von Bacteriorhodopsin (magenta) und des Grundzustands von Sensory Rhodopsin (cyan).

Der Hauptkettenverlauf (ribbon) der Grundzustände von Bacteriorhodopsin und Sensory Rhodopsin und die Seitenkettenkonformationen zeigen gute Übereinstimmung.

Der signifikanteste Unterschied sind die Relokalisation des β -Iononringes im Retinal, Unterschiede in der Konformation an der Azomethin-Gruppe des Retinals und die Substitution eines Aspartat (D96) in Bacteriorhodopsin durch Phenylalanin (F86) in Sensory Rhodopsin.

Auffällig ist auch die unterschiedliche Orientierung der Kopfgruppen der Arginine (R72 bzw. R82). Hier ähnelt dieses SRII-Modell dem M-Zustand von BR. Im SRII-Transducer-Komplex dagegen findet sich die gleiche Konformation wie im BR-Grundzustand.

Die abgebildete Konformation des Arginins im freien SRII ist auf die Bindung eines Chlorid-Ions zurückzuführen, welche durch die Kristallisationsbedingungen verursacht ist. Dieser Effekt wird unter anderen Kristallisationsbedingungen nicht beobachtet (protein data bank:1JGJ).

Das für die Strukturaufklärung benutzte Transducer-Fragment bewirkt ebenso wie der komplette Transducer, eine Unterdrückung der Protonen-Pumpaktivität des Sensory Rhodopsins im Komplex [53,54]. Weiterhin zeigen EPR-Messungen (*electron paramagnetic resonance*), daß im M-Zustand des Komplexes Strukturänderungen in Form von Abstandsänderungen zwischen Helix F in SRII und TM2 in HtrII auftreten, die als Rotationsbewegung des Transducers interpretiert wurden [57].

Anders als die Protonenpumpe Bacteriorhodopsin dient das Sensory Rhodopsin der Signaltransduktion. Es ist also zu erwarten, daß diese verschiedenen biologischen Funktionen sich auch strukturell manifestieren. Im Sensory Rhodopsin liegt mit Phenylalanin-86 eine Seitengruppe vor, die nicht an der Protonenleitung beteiligt sein kann. Dagegen ist das in der homologen Position befindliche Aspartat-96 im Bacteriorhodopsin der Protonendonator zur Reprotonierung der Schiff-Base, also Teil des Protonenleitweges [52].

Auffällig ist auch die unterschiedliche Lage des β -Iononringes in Bacteriorhodopsin und SRII [56]. Im Sensory Rhodopsin liegt dieser deutlich näher an Prolin-175 in He-

lix F. Aufgrund der am Prolin fehlenden Wasserstoffbrücke ist Helix F hier am leichtesten deformierbar (s. Abb.21).

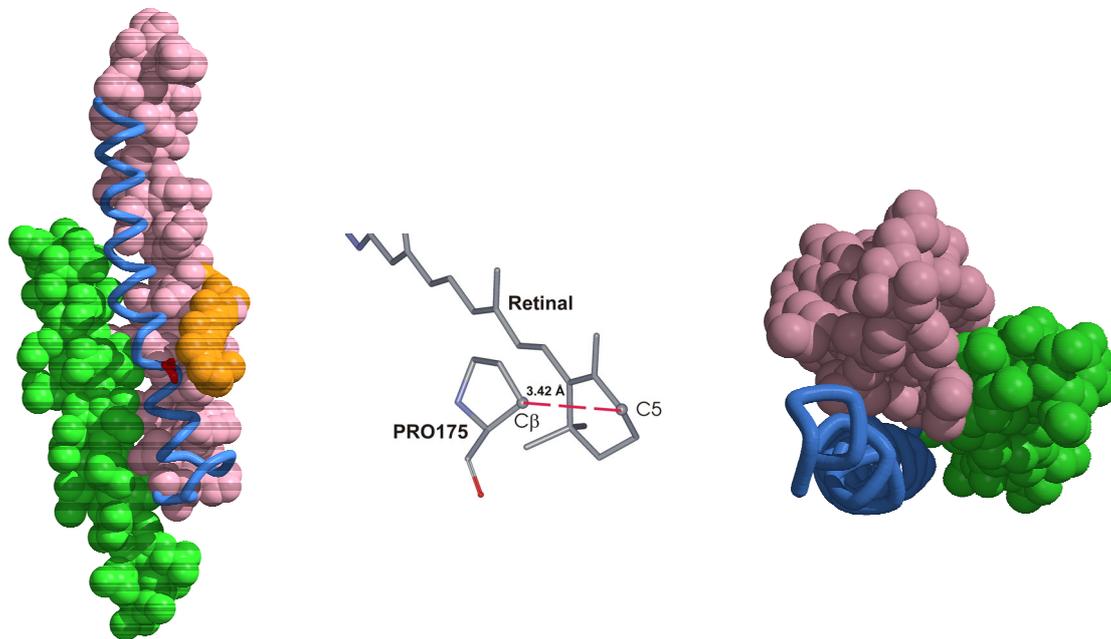


Abb.21 Beeinflussung der Lage des Transducers durch Helix F und Retinal
Detail des SRII-Transducer-Komplexes

Links/Rechts: TM2 in grün, Helix G in graurot, Helix F in blau (Pro-175 in rot)
Mitte: Abstand Prolin-Retinal im Sensory Rhodopsin

Der im Vergleich zu BR um 0,7 Å verkürzte Abstand zwischen Prolin-175 und dem β -Iononring läßt für das Sensory Rhodopsin eine stärkere Wechselwirkung mit Helix F und damit größere Strukturveränderungen erwarten als für das Bacteriorhodopsin.

Für die Übertragung des Signals auf den Transducer und die Weiterleitung zum CheA/CheW-Komplex bietet sich also ein mechanisches Modell an. Die lichtinduzierten strukturellen Veränderungen des Sensory Rhodopsins II verändern die Struktur des Transducers oder seine Bewegungsmöglichkeiten, so daß der CheA/CheW-Komplex beeinflußt werden kann.

Modell der Bewegungsmöglichkeiten des Transducerfragments

Die interkalierende Packung von Seitengruppen an der Grenzfläche von Sensory Rhodopsin und Transducer im Komplex bewirkt eine Beschränkung der Bewe-

gungsmöglichkeiten des Transducers relativ zum SR11. Schon ein einfaches Packungsmodell mit nur zwei Freiheitsgraden, einer Translation und einer Rotation, erschließt die Bedeutung der Kopplung von Rotation und Translation des Transducers für die Signaltransduktion in Richtung der Membrannormalen.

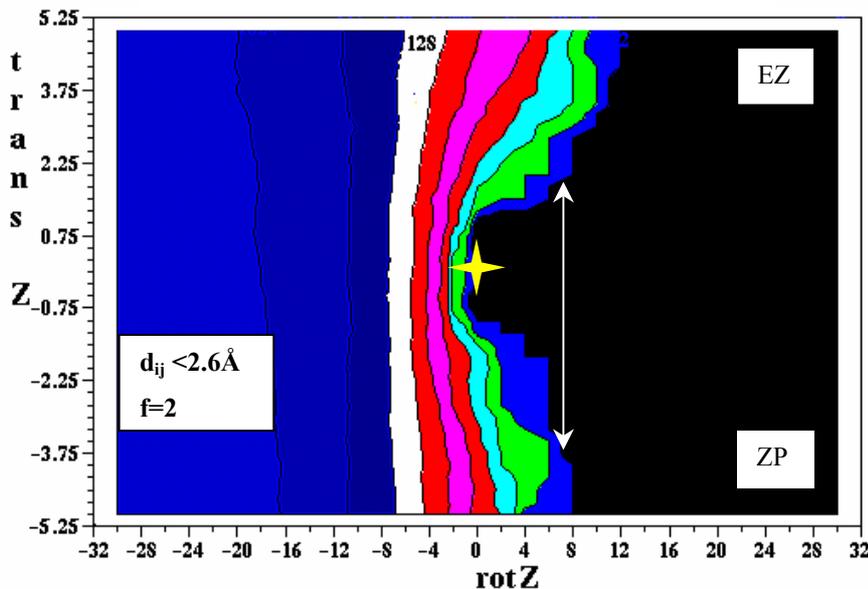


Abb.22 Packungsanalyse von Sensory-Rhodopsin-Transducer-Komplexen

trans Z: Translation in der Membrannormalen

rot Z: Rotation um die Dimerachse

kristallographisches Koordinatensystem: Extrazelluläre Seite oben (EZ),
Zytoplasmatische unten (ZP)

Für Kombinationen von Translationen und Rotationen des Transducer-Dimers in Bezug auf die Sensory Rhodopsin Moleküle werden sterisch verbotene Orientierungen durch das Auftreten von einander in zunehmender Zahl durchdringender Atome ermittelt (Abstand $d_{ij} < 2.6 \text{ \AA}$). Angegeben ist die Anzahl ungünstiger Atom-Atom-Abstände (die Flächenkolorierung entspricht dualen Potenzen der Kontaktzahl). Die schwarze Sektion gibt den erlaubten Bewegungsspielraum für zwei Freiheitsgrade ($f=2$) an. Das gelbe Kreuz markiert die kristallographische Gleichgewichtslage. Die Größe des Kreuzes entspricht einer Bewegungsamplitude von ca. 0.9 \AA , die sich aus dem mittlere Temperaturfaktor des Transducers im Komplex errechnet.

Der gebundenen Grundzustand bleibt erhalten bei Rotation bis zu $4-6^\circ$. In diesem gebundenen Zustand sind Translationen von $\pm 1,5 \text{ \AA}$ in Richtung der Membrannormalen erlaubt, welche im Komplex mit der Symmetrieachse des Dimers zusammenfällt. Rotationen von $6-8^\circ$ erweitern den erlaubten Translationsbereich auf $+2,0$ bis $-4,2 \text{ \AA}$ (weißer Pfeil), d.h. der Transducer kann sich verstärkt in Richtung des Che-Komplexes bewegen. Bei Rotationen größer $8-12^\circ$ wird ein ungebundener Zustand erwartet.

Die Verzahnung der Seitengruppen der Transducer-Helices und des Sensory Rhodopsins erlaubt eine Mobilität des Transducers in Richtung der Membrannormalen von etwa $\pm 1,5 \text{ \AA}$ im Grundzustand (s. Abb.22). Eine Rotationsbewegung des Transducer-Dimers um seine Symmetrieachse ist nur in eine Richtung möglich, führt aber schon für kleine Rotationen zur Auflösung des Komplexes. Der Bewegungs-

spielraum des Transducers aus der Packungsanalyse entspricht der kristallographischen Analyse. Der mittlere Temperaturfaktoren von ca. 60 \AA^2 des Transducers entspricht einer Bewegungsamplitude von ca. $0,9 \text{ \AA}$.

Für Rotationen von $6-8^\circ$ ergibt sich ein Zustand vergrößerter Bewegungsmöglichkeit des Transducers, der dem signalgebenden Zustand des Komplexes entsprechen könnte. Die Packungsanalyse mit zwei Freiheitsgraden berücksichtigt keine Verkipfung der Helices gegeneinander, daher sind insbesondere die ermittelten Rotationswinkel nur als Abschätzungen zu verstehen.

Die Analyse der Wasserstoff-Brücken zwischen den Molekülen für die verschiedenen Packungen ergibt für die Grundzustandsmodelle der Packungsanalyse keine signifikante Beeinträchtigung dieser Bindungen. In den Modellen der potentiell signalgebenden Zustände dagegen sind für alle Protonendonator-Akzeptor-Paare die Abstände auf mehr als $3,5 \text{ \AA}$ angewachsen. Die Wasserstoff-Brücken sind also gelöst (s. Abb.23).

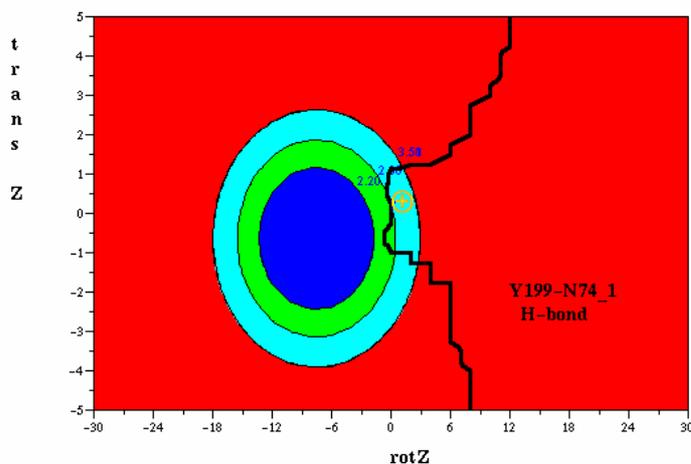


Abb.23 Kontourdiagramm der H-Brücke Asparagin-74 nach Tyrosin-199 für Sensory Rhodopsin-Transducer-Komplexe der Packungsanalyse

Die schwarze Linie trennt den sterisch erlaubten vom verbotenen Bereich (s. Abb.22). Die Länge der H-Brücke ist in Abhängigkeit von der relativen Positionierung der Moleküle durch Kontourlinien angegeben. Die dunkelblaue Fläche für Bindungslängen kleiner $2,2 \text{ \AA}$ stellt den Bereich sterischer Hinderung für die an der H-Brücke beteiligten Atome dar.

Sterisch erlaubte Translation in der Membrannormalen läßt die H-Brücke praktisch unbeeinflusst. Bei Rotation um mehr als 3° trägt die H-Brücke nicht mehr zur Bindung des Transducers an das Sensory Rhodopsin bei.

Es ist denkbar, daß allein eine Bewegung von Helix F des Sensory Rhodopsins, analog dem für Bacteriorhodopsin strukturell charakterisierten M-Zustand, dem Transdu-

cer-Bündel ein Drehmoment beibringt, daß eine signalgebende Translation des Transducers in der Membrannormalen erlaubt.

Die Rolle der Protonierung bei der Signaltransduktion

Die Untersuchung der strukturellen und mechanistischen Details der Signaltransduktion ist noch nicht sehr weit fortgeschritten. Obgleich durch eine Vielzahl von Untersuchungen mit unterschiedlichsten Methoden viele Details bekannt sind, sind die molekular-mechanistischen Zusammenhänge nicht aufgeklärt. Speziell für die Signaltransduktion durch den Sensory Rhodopsin - Transducer Komplex ist z.B. unklar, ob die zur Zeit favorisierte Hypothese zutrifft, daß die photoinduzierten, strukturellen Änderungen des Sensory Rhodopsins in kausalem Zusammenhang mit der Signaltransduktion stehen und die Protonenpumpaktivität des SRII ein evolutionäres Relikt ist. Für solche mechanischen Modelle stellt sich im Wesentlichen die Frage, wie die Bewegung der Rezeptorhelices und eine Kolben- oder Schraubenbewegung des Transducers gekoppelt sind.

Alternativ könnte vermutet werden, daß eine transiente Protonentransferaktivität des Rezeptors von ausschlaggebender Bedeutung ist und die beobachteten strukturellen Änderungen des SRII von sekundäre Bedeutung sind. In einem solchen Modell tritt der Transducer als Protonensensor auf. Für einen solchen Zusammenhang spricht neben der Verwandtschaft des Transducers zu Chemorezeptoren, vor allem die Tatsache, daß die Fähigkeit des SRII Protonen zu pumpen durch Bindung des Transducers unterdrückt wird. Dies könnte bedeuten, daß Seitengruppen des Transducer als Protonenakzeptoren fungieren. Die extrazellulären Aspartate (D53), welche im Komplex an der Symmetrieachse des Dimers liegen, und Glutamat-43 an der extrazellulären Wasserstoff-Brücke (s. Abb. 19) zwischen SRII und dem Transducer sind die einzigen Protonenakzeptoren an der extrazellulären Seite des Transducers. Strukturveränderungen durch die veränderte elektrostatische Wechselwirkung würden in diesem Falle die Signalleitung durch den Transducer verursachen.

Die Ursache für den fehlenden Netto-Transport von Protonen im Komplex wäre ein Nachbarschaftseffekt. Das vom SRII gepumpte Proton würde am Transducer gespeichert und nicht irreversibel in den extrazellulären Raum abgegeben, sondern es würde im Verlauf des Photozyklus zum SRII zurückgehen. Eine Reprotonierung des SRII

durch Aufnahme eines Protons an der zytoplasmatischen Seite wäre unnötig. Hiermit wäre der Protonenleitungsweg auf der zytoplasmatischen Seite des Retinals ohne Bedeutung für die Signaltransduktion. Von der zytoplasmatischen Seite erfolgt in BR die Reprotonierung des Retinals durch Aspartat-96 im N-Zustand [55].

Die Unterschiede zwischen BR und SR II sind klein bis einschließlich des K-Zustands, in dem die Isomerisierung des Retinals beobachtet wird [56]. Die signifikantesten Unterschiede zwischen den Photozyklen von BR und SR II werden nach dem Eintritt der großen Strukturänderungen des M-Zustandes beobachtet. Der folgende N-Zustand kann für SR II nicht beobachtet werden [55]. Die Substitution des Aspartats der Protonenpumpen (D96) durch Phenylalanin-86 in SR II, welche zu einer Beeinträchtigung der Pumpleistung von SR II führt, hätte damit eine funktionelle Bedeutung.

Die Strukturinterpretation

Die Struktur des Komplexes von SR II und Htr II zeigt, daß die Bindung im Komplex im Wesentlichen auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Molekülen üben einen orientierenden Effekt aus, welcher den Transducer tiefer in den extrazellulären Raum eintauchen läßt als das SR II. Die Interkalation der Seitengruppen beschränkt die Mobilität der Transducer-Helix TM2 in Bezug auf die SR-Helix F auf $\pm 1,5 \text{ \AA}$ in Richtung der Membrannormalen für den kristallographisch charakterisierten Grundzustand.

Die Packungsanalyse des Komplexes ergibt ein plausibles Modell für einen signalgebenden Zustand des Komplexes. Dieser Zustand ist durch eine Translation des Transducers von maximal $4,2 \text{ \AA}$ in Richtung des Che-Komplexes charakterisiert. Sterische Beschränkungen erfordern zum Erreichen dieses Zustands eine kleine Rotation des Transducer um die Symmetrieachse des Komplexes und die Lösung der drei Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Molekülen.

Beeinflussungen der Aminosäuren, die den Protonenleitungsweg im SR II bilden, werden nicht beobachtet. Insbesondere werden keine strukturellen Änderungen beobachtet, die das Verschwinden der Protonen-Pumpleistung des SR II durch Bindung des Transducers erklären könnten.

Literatur

- [41] O.Beja, E.N.Spudich, J.L.Spudich, M.Leclerc, E.F.DeLong (2000)
Science **289**, 1902-1906
- [42] T.Okada, Y.Fujiyoshi, M.Silow, J.Navarro, E.M.Landau, Y.Shichida (2002)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **99**, 5982-5987
- [43] J.Granzin, U.Wilden, H.-W. Choe, J.Labahn, B.Krafft, G.Büldt (1998)
Nature **391**, 918-921
- [44] J.Rudolph, D.Oesterhelt (1996)
J.Mol.Biol **258**, 548-554
- [45] A.A.Wegener, I.Chizhov, M.Engelhard, H.J.Steinhoff (2000)
J.Mol.Biol. **301**, 881-891
- [46] X.N.Zhang, J.Zhu, J.L.Spudich (1999)
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **96**, 857-862
- [47] S.B.Hou, A.Brooun, H.S.Yu, T.Freitas, M.Alam (1998)
J.Bacteriol. **180**, 1600-1602
- [48] K.Ihara, T.Umemura, I.Katagiri, T.Kitajima-Ihara, Y.Sugiyama, Y.Kimura,
Y.Mukohata (1999) J.Mol.Biol. **285**, 163-174
- [49] A.Royant, P.Nollert, K.Edman, R.Neutze, E.M.Landau, E.Pebay-Peroula,
J.Navarro (2001) Proc.Natl.Acad.Sci.USA **98**, 10131-10136
- [50] H.Luecke, B.Schobert, J.K.Lanyi, E.N.Spudich, J.L.Spudich (2001)
Science **293**, 1499-1503
- [51] H.J.Sass, G.Büldt, R.Gessenich, D.Hehn, D.Neff, R.Schlesinger, J.Berenszen,
P.Ormos (2000) Nature **406**, 649-653
- [52] J.Heberle (2000), Biochim.Biophys.Acta **1458**, 135-147
- [53] G.Schmies, M.Engelhard, P.G.Wood, G.Nagel, E.Bamberg (2001)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **98**, 1555-1559
- [54] Y.Sudo, I.Iwamoto, K.Shimono, M.Sumii, N.Kamo (2001)
Biophys.J. **80**, 916-922
- [55] M.Iwamoto, Y.Furutani, N.Kamo, H.Kandori (2003) Biochemistry **42**, 2790-2796
- [56] K.Edman, A.Royant, P.Nollert, C.A.Maxwell, E.Pebay-Peyroula, J.Navarro,
R.Neutze, E.M.Landau (2002) Structure **10**, 473-482
- [57] A.A.Wegener, J.P.Klare, M.Engelhard, H.J.Steinhoff (2001) EMBO J. **20**, 5312-5319

V. Die Protonen in der Struktur

Protonen und Wasser

Die Wichtigkeit der Protonierungsreaktion ist kaum zu überschätzen. Das Proton ist als *nackte* Ladung im Vergleich zu anderen Ladungsträgern enorm klein. Es weist daher eine sehr große Feldstärke auf, durch die in jedem Falle die Anordnung der umgebenden Atome bzw. Moleküle beeinflusst, wenn nicht sogar bestimmt wird.

In wässrigem Medium bewirkt die hohe Feldstärke eine Solvatisierung des Protons. Die protonierte Wasserstruktur kann allein durch die schnell verlaufende Relokalisation von Elektronen eine Nettoverschiebung der positiven Ladung erzeugen. Diese apparente Wanderungsgeschwindigkeit des Protons ist also deutlich größer als die jedes anderen Ions, das in biologischen Systemen auftritt.

Hinreichende Datenauflösung vorausgesetzt, zeigt jede kristallographisch bestimmte Proteinstruktur mehrere Schalen geordneter Wassermoleküle, die das Protein umgeben. Ketten von Wassern verbinden alle geladenen bzw. polaren Gruppen an der Oberfläche des Proteins durch Netzwerke von Wasserstoff-Brückenbindungen. Derart strukturiertes Wasser ist etwas von gewöhnlichem, sogenannten *Bulk-Wasser* völlig Verschiedenes, denn dieses weist keine zeitstabilen Strukturen auf. Es ist kristallographisch nicht aufgelöst.

In welchem Maße spezielle Wasserstrukturen in Protonierungsreaktionen eine Rolle spielen, sei es in Reaktionsmechanismen oder in der Signaltransduktion, ist in der Regel unklar. Die statische Abbildung der Moleküle durch Röntgenstrukturanalyse kann nur zeigen, ob an einer bestimmten Stelle ein Wassermolekül stabil gebunden ist. Sie sagt aber wegen der meist zu geringen Auflösung nichts über den Protonierungszustand dieses Moleküls oder irgend einer Gruppe des Proteins aus. Aussagen aus der Proteinkristallographie über den Protonierungszustand von Gruppen in Proteinstrukturen sind also im Allgemeinen chemische Plausibilitätsargumente, die sich auf die tabellierten pK-Werte der Aminosäuren und den pH-Wert bei der Kristallisation beziehen. Streng genommen wird also mit solchen Aussagen impliziert, daß die diskutierte Gruppe mit der freien (Bulk) Wasserphase im Protolysegleichgewicht steht, wie es die Definition des pK-Wertes verlangt.

Das gebundene Proton

Die auf Grund der pK-Werte für die ionisierbaren Gruppen formulierten Ladungen erlauben es Modelle zu formulieren, die die Bindung von Molekülen durch elektrostatische Anziehung beschreiben. Die Stärke dieser Wechselwirkung kann zu deutlichen Strukturänderungen führen. Im pam z.B. ändert ein dreifach negativ geladenes Segment des Enzyms durch Bindung des Chymostatins seine Struktur und trägt zur Ligandbindung im Chymostatin-Komplex bei.

Großräumige Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Gruppen finden sich besonders bei DNA-bindenden Proteinen, die häufig sehr viele positiv geladene Arginin- und Lysinreste enthalten. Das Beispiel der DNA-Glykosylase AlkA zeigt, daß eine solche Bindungsweise keineswegs für DNA-bindenden Proteine generalisierbar ist. In dieser Glykosylase wäre eine Häufung positiver Ladungen am Protein ungünstig, da das Herausdrehen (*flipping-out*) der positiv geladenen Base aus der DNA und ihre Erkennung behindert würde. Bei DNA-Methylasen, welche die zu methylierende Base im neutralen Zustand erkennen, kann die DNA dagegen durch Anhäufung positiver Ladung gebunden werden. Die Freisetzung des Produkts wird durch die Abstoßung zwischen der methylierten Base und der Ladung des Proteins sogar begünstigt. Obgleich die beiden Enzyme große Ähnlichkeit in der Art der Stabilisierung der positiven Ladung an der Base durch Aromaten des Enzyms aufweisen und scheinbar ähnliche Reaktionen in entgegengesetzter Richtung katalysieren, sind ihre Mechanismen völlig verschieden.

Im Nachhinein ist der durch den Aziridin-DNA-Glykosylase-Komplex erkannte S_N1-Mechanismus für die Abspaltung der alkylierten Base durch DNA-Glykosylase II nicht überraschend. Die Alkylierung der Base macht diese bereits zu einer guten Abgangsgruppe mit labiler Bindung. Der Angriff des Wassers auf das erzeugte Carbokation mit abschließender Deprotonierung ist allein deshalb ungewöhnlich, da S_N1-Mechanismen über Carbokationen zu Razemisierung führen. Biochemische Reaktionen sind aber bemerkenswert stereo- und enantioselektiv. In diesem Falle führt die Abspaltung der Base aber in jedem Fall zu einer freien glykosidischen Hydroxylgruppe, so daß es zum Verlust der anomere Konfiguration unabhängig vom Reaktionsmechanismus kommt. Dies mag letztlich der Grund dafür sein, daß die

Reparatur nicht durch Austausch der alkylierten Base erfolgt, sondern im Folgeschritt die DNA über einen größeren Bereich abgebaut wird und vollständig neusynthetisiert.

Das katalytische Proton

Für die Amidase pam wurde der pK-Wert des katalytischen Lysins zur Erklärung der geringen Reaktivität des Proteins gegen Elektrophile herangezogen. FAAH ein anderes Protein der Amidase Familie mit homologer Struktur und den gleichen katalytischen Aminosäuren zeigt ein gänzlich anderes Verhalten gegen Elektrophile. Der Unterschied in der Biochemie der Enzyme wird auf den Protonierungszustand des katalytischen Lysins zurückgeführt, der nur durch den Einfluß nicht-konservierter Aminosäurereste in der Umgebung unterschiedlich sein kann. Eine nicht-konservierter Ladungsträger nahe dem Lysin in FAAH ist die plausibelste monokausale Erklärung.

Die unterschiedlichen Mechanismen der beide Enzyme stehen offensichtlich im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Substratspektren. Die Beobachtung das FAAH anders als pam nicht nur Amide sondern auch Ester hydrolysiert, weist daraufhin, daß FAAH relativ indifferent gegen die Art der Abgangsgruppe des Substrates ist. Die Ursache hierfür ist die Acylierungsreaktion. Sie führt für FAAH zu beobachtbaren kovalenten Intermediaten. Der Acylkomplex ist also relativ stabil. Für pam werden solche Intermediate nicht beobachtet. Das Gleichgewicht von Enzym-Substrat-Komplex und acylierten Enzym liegt bei pam auf der Eduktseite, d.h. die Hydrolyse des acylierten Enzyms zu den Produkten treibt die Gesamtreaktion. Diese Unterschiede in der Acylierungsreaktion erklären sich durch den säurekatalysierten Zerfall des Acyl-Enzym-Komplexes in die Edukte, der leicht erfolgen kann, wenn die katalytische Triade protoniert vorliegt, wie für pam formuliert; nicht aber für ein deprotoniertes Lysin (FAAH).

Die erstaunliche Variation des Mechanismus und des damit verknüpften Substratspektrums legt es nahe die biologische Funktion von FAAH zu überdenken. Die Amidase Familie hat Enzyme hervorgebracht die nur Amide hydrolysiert. Mindestens ein Mitglied dieser Familie besitzt ein abweichendes Substratspektrum. Die Substrate, Fettsäureamide und Fettsäureester, kommen im Wirkungsbereich des

Enzyms gemeinsam vor. Der große Überschuß von Estern gegenüber Amiden in den Membranen wirft also die Frage auf, ob die biologische Funktion der membranassoziierten FAAH der neuromodulative Abbau von Fettsäureamiden oder der Abbau von Fettsäureestern ist. Die zweite Alternative bedeutet, daß die FAAH innerhalb der Amidase Familie einen evolutionären Abzweig darstellt, nämlich die Entwicklung einer Esterase aus einer Amidase.

Das transportierte Proton

Im Unterschied zum katalytischen Proton, welches direkt benachbarte Protonenquellen und -senken für seine Wirkung benötigt, handelt es sich bei dem transportierten Proton um große Strecken, die zurückgelegt werden. Die Analyse der Protonenpumpe Bacteriorhodopsin durch zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie hat ergeben, daß es sich nicht um ein einzelnes Proton handelt, welches während eines Pumpzyklus durch das Protein befördert wird. Vielmehr leitet die Abgabe eines Protons durch das isomerisierte Retinal und die bei der Dissipation des eingestrahlt Lichtquants auftretenden Strukturänderungen eine Kaskade von Ladungsverschiebungen ein. Diese führt zur Relokalisation von mindestens vier Protonen innerhalb des BR, so daß Netto ein Proton über die Membran transportiert wird. Im Detail scheint das transportierte Proton also dem katalytischen Proton vergleichbar. Das besondere beim Protonentransport ist der geordnete Ablauf von räumlich getrennten Schritten. Eine solche Koordination über große Strecken kann die Coloumb-Kraft leisten.

Das Sensory Rhodopsin zeigt zwar in den späteren Phasen des Photozyklus deutliche Abweichungen vom Bacteriorhodopsin, aber es pumpt Protonen wie BR, wenn auch deutlich langsamer. Da bis zum M-Zustand die Abläufe für die beiden Proteine ähnlich sind, ist es nicht verwunderlich, daß auf der Basis der Grundzustandsstruktur des SRII-HtrII-Komplexes, des SRII sowie der Struktur des K-Zustandes des SRII keine Ursache für das Fehlen der Pumpaktivität des Komplexes gefunden werden kann. Auf der Basis der bekannten Strukturen und charakterisierten Zustände des Sensory Rhodopsins kann also allein die Licht-induzierte Strukturveränderung des Rezeptors zur Erklärung der Signaltransduktion herangezogen werden.

Das Modell der transienten Protonen-Transferaktivität steht zwar nicht im Widerspruch zu Beobachtungen, wird aber allein durch die Deutung der fehlenden Nettopumpaktivität als transiente Transferaktivität gestützt. Experimente die diese Deutung belegen könnten, liegen zur Zeit nicht vor.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mit mir im Laufe der Zeit zusammengearbeitet haben. Ausnahmslos haben sie – über die jeweilige Projektarbeit hinaus – mit ihren Kenntnissen und ihren Ansichten dazu beigetragen mein Bewußtsein für das Wesentliche, das Machbare und das Neue zu schärfen.

Ich danke für Bereitstellung von Proteinen für die Kristallisation PD Dr M.Engelhard, Prof. Dr. T. Friedrich, Dr. A.Krishnan, Prof. Dr M.R. Kula, Prof. Dr. W. Gärtner, Prof. Dr. C. Hollenberg und Prof. Dr. H.Weiss.

Für die Unterstützung meiner Arbeit danke ich den Doktoranden: Dr. U.Eidhoff, Dr. K.S.Park, Dr. S.Neumann, D.G.Jong, R.Moukametianov und R. Efremov.

Für hilfreiche Diskussion zum Thema dieser Schrift danke ich insbesondere PD Dr. J. Heberle, Dr. V.I.Gordeliy und J. Klare

Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. R. Schlesinger und PD Dr. J.Granzin

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. W. Saenger, bei dem ich die Strukturanalyse erlernt habe. Bei ihm hatte ich Möglichkeiten und Freiheiten, die nicht selbstverständlich sind.

Prof. Dr. H. W. Choe hat mir alles beigebracht, daß nötig ist von einem Stückchen Plasmid-DNA zu einem Proteinkristall zu gelangen. Meine Geduld ist seine Tugend.

Ich danke Prof. Dr. T. E. Ellenberger, der mich wie einen Verwandten bei sich aufgenommen hat. Meine Zeit in Boston ist unvergessen.

Prof. Dr. G. Büldt danke ich für exzellente Arbeitsmöglichkeiten. Er ist immer bereit alles zu tun, um wissenschaftliche Arbeit zu befördern und ihr einen angenehmen Rahmen zu geben. Besonderer Dank gilt ihm für hilfreiche Diskussionen zum Thema dieser Schrift.

