

Blick auf den pentakoordinierten Übergangszustand, der für die durch die saure violette Phosphatase katalysierte Reaktion angenommen wird. A kennzeichnet das am Phosphor des Substrates angreifende Nucleophil, und B zeigt das Sauerstoffatom der austretenden Alkoholatgruppe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur das Estersauerstoffatom der Alkoholgruppe dargestellt.

Enzymatische Acyl- und Phosphoryltransferreaktionen unter Beteiligung von zwei Metallionen

Norbert Sträter, William N. Lipscomb*, Thomas Klabunde und Bernt Krebs*

Sowohl bei enzymatischen als auch bei nichtenzymatischen Katalysen sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, um zu verstehen, wie Metallionen – besonders Zinkionen – die Hydrolyse von Phosphorsäureester- und Amidbindungen unterstützen. Hydrolasen mit einem Metallion im aktiven Zentrum, sogenannte mononukleare Metallohydrolasen, z. B. die Carboxypeptidase A oder Thermolysin, zählen zu den ersten Enzymen, deren Strukturen röntgenographisch aufgeklärt werden konnten. In den letzten Jahren wurden zunehmend mehr Metalloenzyme charakterisiert, in denen zwei oder mehrere benachbarte Metallionen die Katalyse von Phosphoryl- ($\text{ROPO}_3 + \text{R}'\text{OH} \rightarrow \text{R}'\text{OPO}_3 + \text{ROH}$; im Fall der Phosphatasereaktion ist $\text{R}'\text{OH}$ ein Wasser-

molekül) und von Carbonyltransferreaktionen unterstützen, z. B. in Peptidases und anderen Amidasen. Diese dinuklearen Metalloenzyme katalysieren enorm viele Reaktionen dieser Art: die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäuremono-, di- und triesterbindungen, von Phosphorsäureanhydridbindungen sowie die Spaltung von Peptidbindungen oder Harnstoff. Auch die Bildung der Phosphodiesterbindung in RNA und DNA wird von Polymerasen über einen Zwei-Metallionen-Mechanismus katalysiert. Erstaunlich vielfältig sind auch die Strukturen der aktiven Zentren dieser di- oder trinuklearen Metalloenzyme, selbst für Enzyme, die sehr ähnliche Reaktionen katalysieren. Die Strukturbestimmung des aktiven und inaktivierten Enzyms mit gebundenem

Substrat oder Produkt, einem stabilen Intermediat oder einem Analogon einer sich im Verlauf der Reaktion bildenden Zwischenstufe ist eine leistungsstarke Methode zur Aufklärung der mechanistischen Details der Enzymkatalyse. Strukturbestimmungen sind für viele der in diesem Artikel beschriebenen Metalloenzyme durchgeführt worden und liefern zusammen mit anderen biochemischen Untersuchungen einen immer besseren Einblick in die Fragestellung, wie die zwei (oder mehr) Metallionen zusammenwirken, um die Reaktionen effizient zu katalysieren.

Stichworte: Enzymkatalyse · Metallohydrolasen · Katalyse

1. Einleitung

Enzyme mit zwei etwa 3 bis 5 Å voneinander entfernten Metallionen im aktiven Zentrum, dinukleare Metalloenzyme, katalysieren in der Natur viele verschiedene chemische Reaktionen. Zu den bekanntesten Beispielen zählen die dinuklearen Eisenproteine Hämerythrin, Ribonucleotid-Reduktase sowie Methan-Monooxygenase^[1] und die Kupferproteine Superoxid-Dismutase, Hämocyanin, Tyrosinase und Cytochrom-c-Oxidase, die alle eine Rolle beim Transport bzw. bei der Aktivierung von Sauerstoff spielen. Als Beispiele für redoxinaktive dinukleare Metalloenzyme seien Enolase, Xylose-Isomerase und Ar-

ginase genannt. Beide Metallionen sollen katalytisch aktiv oder im Fall des Hämerythrins und des Hämocyanins an der Bindung des Sauerstoffs beteiligt sein, und keines der nahe benachbarten Metallionen scheint eine rein strukturelle Funktion zu haben. Inzwischen sind viele dinukleare Metalloenzyme, die Hydrolysen katalysieren, charakterisiert worden (Tabelle 1). Erst in den letzten Jahren wurden detaillierte dreidimensionale Strukturinformationen für einige dieser Enzyme verfügbar.

Eine Katalyse mit zwei Metallionen wird mittlerweile für zahlreiche biologische Transferreaktionen von Phosphoryl- und Acyl- oder anderen Carbonylgruppen beobachtet, wobei diese meistens auf ein Wassermolekül übertragen werden (Phosphatasen, Peptidases, Amidasen). Angesichts der Ähnlichkeit dieser Reaktionen erscheint eine vergleichende Übersicht über die angenommenen Reaktionsmechanismen und über ihre strukturelle Grundlage wünschenswert. Ziel dieses Artikels ist es, die strukturellen und mechanistischen Aspekte der Katalyse von Phosphoryl- und Carbonyltransferreaktionen durch Metalloenzyme, die zwei oder mehrere katalytische Metallionen enthalten, darzustellen. Der Vergleich soll sich nicht auf ein bestimmtes Metallion (z. B. Zn^{2+}), das für die Katalyse *in vivo* einge-

* Prof. Dr. W. N. Lipscomb, Dr. N. Sträter
Department of Chemistry and Chemical Biology
Harvard University
12 Oxford Street, Cambridge, MA 02138 (USA)
Telefax: Int. +617/495-3330
E-mail: lipscomb@chemistry.harvard.edu
Prof. Dr. B. Krebs, Dr. T. Klabunde
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Wilhelm-Klemm-Straße 8, 48149 Münster
Telefax: Int. +251/838366
E-mail: Krebs@nwz.uni-muenster.de

Tabelle 1. In diesem Beitrag vorkommende Enzyme, deren Kurzbezeichnungen sowie in vivo vorhandene Metallionen und Metall-Metall-Abstände d (in Klammern sind die bei der Strukturanalyse vorhandenen Metallionen genannt). Die Bezeichnung M weist darauf hin, daß entweder Mn^{2+} , Mg^{2+} oder Zn^{2+} das aktive Metallion in vivo sein könnte [a].

Enzym	Abk.	Gehalt in vivo	d [Å]
alkalische Phosphatase	AP	Zn1-Zn2-Mg3	4.1 (Zn1-Zn2)
violette saure Phosphatase	PAP	Fe-Zn (Fe-Fe)	3.1 (Fe1-Zn2)
Ser/Thr-Proteinphosphatase 1	PP-1	Fe-Zn (?)	3.3 (Mn1-Mn2), 4.0 (Fe1-Mn2)
Calcineurin	PP-2B	Fe-Zn	3.0 (Fe1-Zn2) 3.1 (Fe1-Zn2)
DNA-Polymerase β	Pol- β	M-M	4.7 [a] (MgA-MgB)
3',5'-Exonuclease der DNA-Polymerase 1	(Pol-I)	M-M	3.9 [a] (ZnA-MgB)
Ribonuclease H (HIV-RT)	RNase H	M-M	ca. 4 (Mn-Mn)
Fructose-1,6-diphosphatase	FBP	M-M	3.7 [a] (Mn1-Mn2)
Inositol-Monophosphatase	IMP	M-M	3.9 [a] (Mn1-Mn2)
Inositolpolyphosphat-1-phosphatase	IPP	M-M	3.9 (Mn1-Mn2)
Phospholipase C	PLC	Zn1-Zn2-Zn3	3.3 (Zn1-Zn3)
Nuclease P1	P1	Zn1-Zn2-Zn3	3.2 (Zn1-Zn3)
(S)-Adenosylmethionin-Synthetase	AMS	M-M	5 [a] (Mg1-Mg2)
Glutamin-Synthetase	GLS	Mg-Mg	5.8 (Mn1-Mn2)
Phosphotriesterase	PTE	Zn-Zn	3.8 (Cd1-Cd2)
Leucin-Aminopeptidase	LAP	Zn-Zn	3.0 (Zn1-Zn2)
Aminopeptidase aus <i>Acromonas proteolytica</i>	AAP	Zn-Zn	3.5 (Zn1-Zn2)
Methionin-Aminopeptidase	MAP	Co-Co (?)	2.9 (Co1-Co2)
Urease		Ni-Ni	3.5 (Ni1-Ni2)

[a] Der Abstand konnte in der Struktur des ligandfreien Enzyms nicht bestimmt werden, da beide Metallionen nur in der Gegenwart von Substraten, Produkten oder Inhibitoren binden.

setzt wird, beschränken, zumal die meisten der beschriebenen Enzyme ohnehin mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen katalytische Aktivität aufweisen. Die Enzyme werden hauptsächlich auf der Grundlage von Strukturuntersuchungen diskutiert und verglichen. Kinetische und spektroskopische Ergebnisse, die für den Zwei-Metallionen-Mechanismus von Bedeutung sind, wurden jedoch auch aufgenommen. Wegen der großen Anzahl der hier diskutierten Enzyme ist es einsichtig, daß eine vollständige Zusammenstellung der jeweils verfügbaren Literatur nicht erreicht werden konnte. Für die meisten dieser Enzyme wird jedoch ein aktueller und umfassender Übersichtsartikel zitiert. Ebenso bedauern wir, daß Untersuchungen an dinuclearen Metallkomplexen kleinerer Molekulargröße, von denen viele als strukturelle und funktionelle Modelle der hier diskutierten Enzyme synthetisiert wurden, nicht in diesen Artikel eingeschlossen werden konnten. Für Zinkenzyme mit zwei oder mehr benachbarten Metallionen, die als co-katalytische

Norbert Sträter, geboren 1965 in Soest, studierte Chemie an der Universität Münster und promovierte im Jahr 1994. In der Arbeitsgruppe von Bernt Krebs arbeitete er an der Röntgenstrukturanalyse der violetten Phosphatase. Als Postdoc in der Arbeitsgruppe von William N. Lipscomb in Harvard untersucht er derzeit die Zwei-Metallionen-Mechanismen der Leucin-Aminopeptidase und der Aminopeptidase A durch Röntgenstrukturanalyse.



N. Sträter



W. N. Lipscomb



T. Klabunde



B. Krebs

William N. Lipscomb wurde 1919 in Cleveland, Ohio, geboren. Er erhielt den BSc an der Universität von Kentucky und den PhD am California Institute of Technology für Untersuchungen zur Röntgen- und Elektronenbeugung in der Gruppe von Linus Pauling. Er trat dann der Fakultät der University of Minnesota bei und untersuchte die Struktur und die chemische Bindung flüchtiger Borhydride röntgenographisch bei tiefen Temperaturen. Auch nach 1959, als er eine Professur für Chemie an der Harvard University annahm, führte er diese Arbeiten fort, für deren Ergebnisse er im Jahre 1976 mit dem Nobel-Preis für Chemie ausgezeichnet wurde. Röntgenographische Untersuchungen der Struktur und Funktion von Enzymen nahm er 1962 auf, hauptsächlich an Metalloenzymen und allosterischen Enzymen. Seine Forschungsarbeiten an den Metalloenzymen schließen die Carboxypeptidase A, die Carboanhydrase, die Leucin-Aminopeptidase und die Fructose-1,6-diphosphatase ein.

Thomas Klabunde, geboren 1968 in Lüdenscheid, studierte in Münster Chemie und promovierte 1996 bei Bernt Krebs über biochemische und kristallographische Untersuchungen an der violetten Phosphatase. Seitdem verfolgt er kristallographische Strukturuntersuchungen als Postdoc in der Forschungsgruppe von James C. Sacchettini an der Texas A & M University.

Bernt Krebs, geboren 1938 in Gotha, studierte Chemie an der Universität Göttingen und promovierte 1965 über Untersuchungen der Chemie und Kristallstruktur der Trithiokohlensäure unter Anleitung von D. Gattow. Es folgten Forschungsarbeiten als Postdoc am Brookhaven National Laboratory (Röntgen- und Neutronenbeugung an biologischen Makromolekülen) und die Habilitation in Anorganischer Chemie in Göttingen. Nach Berufungen an die Universitäten Kiel und Bielefeld ist er seit 1977 Professor für Chemie in Münster. Seine wichtigsten Forschungsgebiete sind die Chemie und Struktur von Thio- und Selenoverbindungen, Chalkogenhalogeniden, Chalkogen-Festkörperverbindungen, Sauerstoffverbindungen der Übergangsmetalle, cis-Platin-Analoga und von Metalloproteinen sowie Modellkomplexe für diese Metalloproteine.

sche Zink-Motive bezeichnet wurden, sei auf eine aktuelle Analyse hinsichtlich ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften hingewiesen^[2].

2. Phosphoryltransferreaktionen

Wegen ihrer fundamentalen biologischen Bedeutung sind Phosphoryltransfermechanismen sowohl in enzymatischen als auch in nichtenzymatischen Reaktionen intensiv untersucht worden. Es liegen einige umfassende Übersichtsartikel über diese Reaktionen im allgemeinen^[3-5] und speziell über die Rolle von Metallionen vor^[6]. Eine erste Einteilung der Enzymkatalysierten Phosphoryltransferreaktionen erfolgt nach dem Kriterium, ob die Reaktion über ein kovalentes Phosphoenzym-Intermediat verläuft, oder ob die Phosphorylgruppe direkt auf den finalen Acceptor übertragen wird. Sofern jeder elementare Schritt die Inversion der chiralen Konfiguration am Phosphoratom zur Folge hat (siehe unten), würde somit ein direkter Transfer zur Inversion der Konfiguration führen, während die Bildung eines Phosphoenzym-Intermediates in der Gesamtbilanz eine Retention der Konfiguration mit sich bringen würde. Von den nucleophilen Aminosäuren, die dem Enzym zur Bildung eines Phosphoenzym-Intermediates zur Verfügung stehen, sind es Histidin, Serin, Threonin, Cystein und Tyrosin, die bekannterweise phosphoryliert werden. Aber auch Aspartat, Glutamat und Lysin können als Nucleophil fungieren. Ein Enzymgebundenes Intermediat kann bei einem bestimmten pH-Wert abgefangen oder für eine Metall-ausgetauschte Form des Enzyms charakterisiert werden, wie es für die Cd-ausgetauschte alkalische Phosphatase gezeigt werden konnte^[7].

Ein zweites Hauptmerkmal der Mechanismen betrifft den Charakter der einzelnen Elementarschritte. Jeder Austauschschritt kann entweder nach einem weitgehend dissoziativen Mechanismus über ein Metaphosphat-ähnliches Intermediat verlaufen^[8] oder nach einem assoziativen Reaktionsweg über eine penta-koordinierte Zwischenstufe (oder Übergangszustand) (Abb. 1). Beide Möglichkeiten konnten für nichtenzymatische Phosphoryltransferreaktionen nachgewiesen werden^[3, 9, 10].

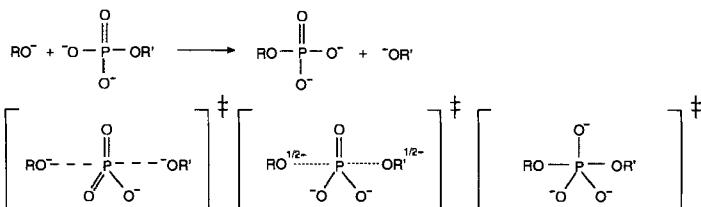


Abb. 1. Phosphoryltransferreaktion eines Phosphomonoesterdianions mit einem deprotonierten Nucleophil (oben). Struktur des Übergangszustands bei einem dissoziativen (unten links), gemischten (unten Mitte) und assoziativen (unten rechts) Mechanismus.

Die Inversion der Konfiguration am Phosphoratom ist charakteristisch für eine assoziative S_N2 -Reaktion, vorausgesetzt es findet keine Umordnung der Liganden des penta-koordinierten Intermediates statt. Während derartige Umordnungen, wie die Berry-Pseudorotation^[10] in nichtenzymatischen Reaktionen möglich sind, wurden sie bislang nicht in der enzymatischen Katalyse beobachtet.

Die experimentelle Unterscheidung zwischen einem über ein kurzlebiges Metaphosphat-Ion verlaufenden Reaktionsweg und einem assoziativen Reaktionsweg erweist sich als äußerst schwierig. Falls die Geschwindigkeitskonstante als Funktion des pK_a -Wertes des angreifenden Nucleophils bzw. der Abgangsgruppe bestimmt werden kann, liefert die Auftragung von $\log(k)$ gegen pK_a üblicherweise eine lineare Abhängigkeit (Brønsted-Diagramm)^[11]. Eine deutliche Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Nucleophilie der angreifenden Gruppe kann für einen assoziativen Mechanismus erwartet werden, während keine Abhängigkeit für einen rein dissoziativen Reaktionsweg zu erwarten ist. Beide Reaktionswege werden durch die Nucleophilie der Abgangsgruppe beeinflußt.

Aus Abbildung 1 geht hervor, daß sich für den Übergangszustand des assoziativen und des dissoziativen Reaktionsweges die Bindungsordnung der nicht-verbrückenden Phosphoryl-Sauerstoffatome relativ zum Grundzustand verändert. Eine Isotopensubstitution dieser Sauerstoffatome kann daher die Geschwindigkeitskonstante beeinflussen^[9, 12, 13]. Die Substitution durch ^{18}O wird die Reaktion in einem assoziativen Reaktionsweg verlangsamen (normaler sekundärer Isotopeneffekt), während die gleiche Substitution für einen dissoziativen Mechanismus zur Erhöhung der Geschwindigkeit führt. Ebenso kann der Einfluß einer Isotopensubstitution des verbrückenden Sauerstoffs der Abgangsgruppe den Grad des Bindungsbruchs im Übergangszustand anzeigen^[12, 13]. Untersuchungen des Isotopeneffekts wurden auf die alkalische Phosphatase, das Calcineurin und die Phosphotriesterase angewandt (siehe Abschnitte 2.1, 2.2.2 und 2.9).

Weiterhin wurden von verschiedenen Autoren fundierte Überlegungen zu den energetischen Aspekten der Enzymkatalyse vorgebracht, um die Faktoren abzuschätzen, die die verschiedenen Reaktionswege begünstigen. Dazu werden hauptsächlich die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat und zwischen Enzym und Übergangszustand oder Zwischenstufe herangezogen, was besonders auf der Grundlage von detaillierten Strukturanalysen, vorzugsweise von Komplexen des Enzyms mit Verbindungen, die dem Substrat oder Intermediaten ähneln, möglich ist. Ein struktureller Gesichtspunkt betrifft den Abstand zwischen dem Intermediat und dem endgültigen Acceptor: Da selbst ein stabilisiertes Metaphosphat-Intermediat ein äußerst reaktives chemisches Teilchen ist, muß es vom Enzym-gebundenen Nucleophil einen gewissen Abstand haben, um für eine begrenzte Lebenszeit stabil zu sein. Nach Mildvan^[14] ist für einen dissoziativen Reaktionsweg eine Entfernung von mehr als 4.9 Å notwendig.

Einige bedeutsame Schlußfolgerungen können auf der Grundlage möglicher Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Reaktanten getroffen werden (Abb. 2). Wegen der hohen Reaktivität des Metaphosphat-Intermediates ist eine Aktivierung des Nucleophils nicht notwendig und würde einen assoziativen

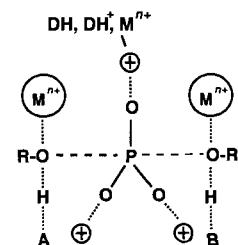


Abb. 2. Mögliche Wechselwirkungen mit Metallionen (M^{n+}), allgemeinen Säuren (AH), allgemeinen Basen (B) und Wasserstoffbrückendonen (DH) bei der Stabilisierung des Übergangszustands eines S_N2 -artigen Austauschs bei einem Phosphomonoester. OR ist die Abgangsgruppe und OR' das eintretende Nucleophil.

Reaktionsweg begünstigen. Die Aktivierung der Abgangsgruppe beschleunigt beide Reaktionswege und ist somit nur von geringem diagnostischen Nutzen, auch wenn sie einen größeren Einfluß auf den Metaphosphat-Reaktionsweg zeigt. Die Wechselwirkung der äquatorialen Phosphoryl-Sauerstoffatome mit positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten oder Metallionen stabilisiert das Intermediat beider Reaktionswege durch die Erniedrigung der negativen Ladung an den Sauerstoffatomen. Es ist nun aus Abbildung 1 ersichtlich, daß ein assoziativer Reaktionsverlauf die negative Ladung an den äquatorialen Sauerstoffatomen des Intermediates erhöht, während bei einem dissoziativen Reaktionsverlauf die negative Ladung des Metaphosphat-Intermediates relativ zum Substrat verringert wird. Die Wechselwirkung von Metallionen oder positiv geladenen Aminosäure-Seitenketten mit den Phosphoryl-Sauerstoffatomen stabilisiert somit das Substrat stärker als das Metaphosphat-Intermediat, so daß das Metaphosphat-Ion durch diese Wechselwirkungen relativ zum Grundzustand destabilisiert wird, während das penta-koordinierte Intermediat relativ zum Grundzustand stabilisiert wird. Vernachlässigt man den Einfluß der unterschiedlichen geometrischen Strukturen des Grund- und des Übergangszustandes (siehe unten) könnten daher elektrostatische Interaktionen der Phosphoryl-Sauerstoffatome mit positiv geladenen Gruppen für einen assoziativen Reaktionsverlauf sprechen.

Da in den aktiven Zentren der Enzyme häufig positiv geladene Metallionen und Aminosäure-Seitenketten in Wechselwirkung mit den Phosphoryl-Sauerstoffatomen stehen, nehmen die meisten Autoren zum Teil wegen der oben genannten Gründe einen assoziativen Phosphoryltransfermechanismus an. Die nichtenzymatische Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, Phosphorsäurediestern^[5] und der γ -Phosphorylgruppe von ATP^[15] in Lösung erfolgt jedoch größtenteils oder partiell über einen Metaphosphat-Reaktionsweg. Eine offene Frage ist, ob das Enzym den dissoziativen Charakter dieser Reaktionen durch den Einsatz von Metallionen oder positiv geladenen Seitenketten in der Katalyse ändert, oder ob es die Katalyse durch weitere Stabilisierung des gleichen Übergangszustandes der Reaktion in Lösung steigert. Metallionen verändern offensichtlich nicht den Charakter des Übergangszustands nichtenzymatischer Reaktionen und haben auch nur einen geringen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstanten^[15, 16]. Daher wurde argumentiert, daß die Koordination der Metallionen zu den Phosphoryl-Sauerstoffatomen einen viel geringeren Einfluß hat als generell angenommen wird und daß sie den Charakter des Übergangszustands nicht verändert^[15]. Auch werden die Metallionen normalerweise von einem oder mehreren negativ geladenen Liganden koordiniert (meistens von Carboxylatgruppen), die die Gesamtladung neutralisieren können. Die Funktion der Metallionen könnte in erster Linie darin bestehen, eine günstige Orientierung der Reaktanten zu erzielen. Dabei vernachlässigt die Annahme, daß ein Metaphosphat-ähnlicher Übergangszustand in einem positiv geladenen elektrostatischen Feld relativ zum Substrat destabilisiert wird, geometrische Faktoren, wie die unterschiedlichen Strukturen der tetraedrischen Phosphatgruppe des Substrats und des trigonal-planaren Metaphosphates. Diese Faktoren können die Stabilisierung des Metaphosphates durch eine bessere strukturelle Anpassung des Intermediates an das aktive Zentrum des Enzyms bedingen.

Besonders Orbitalwechselwirkungen können stark von der komplementären Struktur von Intermediat und aktivem Zentrum abhängen.

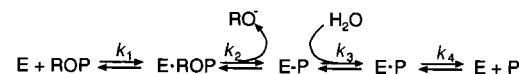
Abbildung 2 faßt die möglichen Wechselwirkungen von Proteingruppen und Metallcofaktoren in der Stabilisierung von Phosphoryltransferreaktionen zusammen. Metallionen (M^{n+}) erniedrigen den pK_a -Wert des Nucleophils (HOR'), so daß es zum deutlich besseren Nucleophil OR'^- deprotoniert werden kann – möglicherweise mit Hilfe einer allgemeinen Base B ($B = Glu^-, Asp^-, His$) als Protonenacceptor. Der Austritt der Abgangsgruppe (OR) wird durch die Protonierung durch eine allgemeine Säure AH ($AH = Glu, Asp, His^+$) und/oder durch die Erniedrigung der Nucleophilie von OR durch Metallkoordination ermöglicht. Die Energie des Übergangszustandes kann durch die Wechselwirkung der äquatorialen Phosphoryl-Sauerstoffatome mit Wasserstoffbrückendonoren DH ($DH = NH, Thr, Ser, Tyr, Cys, Asn, Gln, His, H_2O$), welche ebenso positiv geladen sein können ($DH^+ = His^+, Arg^+, Lys^+$), oder mit Metallionen vermindert werden.

2.1. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (AP) ist sicherlich das am besten charakterisierte Enzym aller in diesem Artikel beschriebenen Metallohydrolasen^[17]. Das Enzym ist eine unspezifische Phosphomonoesterase, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommt. Die zum freien „anorganischen“ Phosphat führende Hydrolyse konkurriert mit dem Transfer der Phosphorylgruppe zu anderen Alkoholen, z. B. im Puffer enthaltenem 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris). Obwohl die spezifische Funktion der AP in Säugetieren gegenwärtig nicht bekannt ist, wird die biologische Bedeutung durch den weit verbreiteten Gebrauch der im menschlichen Serum enthaltenen AP-Aktivität als enzymatisches Signal für eine Vielzahl von Krankheitsszuständen deutlich.

Die homodimere AP (94 kDa) aus *E. coli* enthält zwei Zn^{2+} - und ein Mg^{2+} -Ion in jedem aktiven Zentrum. Die Aktivität weist ein sigmoides pH-Profil auf ($pK_a = 7.5$), wobei ein Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes von der Freisetzung von Phosphat bei hohem pH-Wert zur Dephosphorylierung bei niedrigem pH-Wert stattfindet^[18, 19].

Die Reaktion verläuft über ein Phosphoenzym-Intermediat (E·P), in welchem Ser-102 phosphoryliert wird (Schema 1)^[18, 20]. Das Zwischenprodukt konnte bei $pH < 5.5$ isoliert werden, da hier das Gleichgewicht $E \cdot P \rightleftharpoons E \cdot P'$ auf der Seite des phosphorylierten Intermediates liegt. E·ROP und E·P beziehen sich hierbei auf nichtkovalente Komplexe des Enzyms mit Substrat bzw. Produkt. R kann von einer Methylgruppe bis zu einem großen Proteinmolekül ohne großen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion k_{cat} variieren, so lange der pK_a -Wert der Abgangsgruppe kleiner als 10 ist^[21]. Dies zeigt, daß die Dissoziation von P, dem Produkt (Phos-



Schema 1. Reaktionsverlauf bei der Hydrolyse von Phosphatresten durch die alkalische Phosphatase.

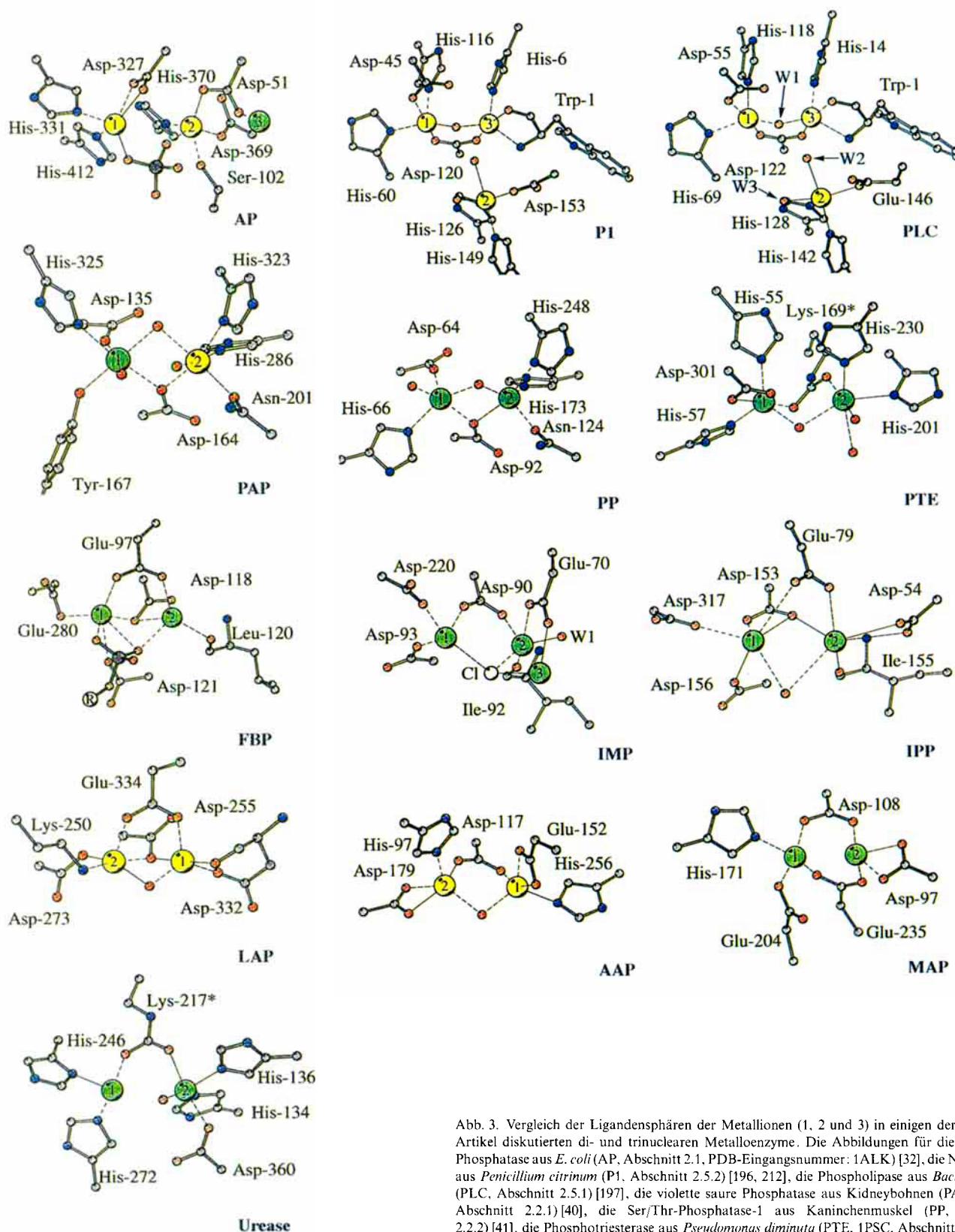


Abb. 3. Vergleich der Ligandensphären der Metallionen (1, 2 und 3) in einigen der in diesem Artikel diskutierten di- und trinuklearen Metalloenzyme. Die Abbildungen für die alkalische Phosphatase aus *E. coli* (AP, Abschnitt 2.1, PDB-Eingangsnummer: 1ALK) [32], die Nuklease aus *Penicillium citrinum* (P1, Abschnitt 2.5.2) [196, 212], die Phospholipase aus *Bacillus cereus* (PLC, Abschnitt 2.5.1) [197], die violette saure Phosphatase aus Kidneybohnen (PAP, 1KBP, Abschnitt 2.2.1) [40], die Ser/Thr-Phosphatase-1 aus Kaninchenmuskel (PP, Abschnitt 2.2.2) [41], die Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* (PTE, 1PSC, Abschnitt 2.9) [257], die Fructose-1,6-diphosphatase aus Schweinenieren (FBP, 1FBD, Abschnitt 2.4.1) [169], die Inositol-Monophosphatase aus Menschen (IMP, 1IMC, Abschnitt 2.4.2) [184], die Inositolpolyphosphat-1-phosphatase aus Rindern (IPP, 1INP, Abschnitt 2.4.3) [151], die Leucin-Aminopeptidase aus Rinderaugen (LAP, 1LAM, Abschnitt 3.1.1) [284, 286], die Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (AAP, 1AMP, Abschnitt 3.1.2) [292], die Methionin-Aminopeptidase aus *E. coli* (MAP, 1MAT, Abschnitt 3.1.3) [300] und für die Urease (1KAU, Abschnitt 3.2) [260] wurden basierend auf den Atomkoordinaten der Strukturbestimmungen erstellt. Zinkionen sind gelb, alle anderen Metallionen grün, Kohlenstoffatome grau, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau dargestellt [320].

phat), der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im alkalischen pH-Bereich ist. Dies konnte durch NMR-Untersuchungen nach mehreren Methoden nachgewiesen werden^[17, 22]. Für die Hydrolyse von Phosphatestern bei pH 8.0 hängt die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k_{cat}/K_m von der Viskosität der Lösung ab. Dies deutet auf eine Begrenzung der maximalen Aktivität der AP durch den diffusionskontrollierten Zusammenstoß mit dem Substrat hin^[23].

Die durch die AP katalysierte Reaktion verläuft unter Retention der Konfiguration am Phosphoratom^[24]. Dies lässt darauf schließen, daß die Reaktion über zwei nucleophile Substitutionen verläuft: Bei der ersten reagiert Ser-OH (oder Ser-O⁻) mit dem Substrat und bei der zweiten H₂O (oder OH⁻) mit dem Phosphoseryl-Intermediat. Brønsted-Beziehungen zur Charakterisierung der Art des Übergangszustands wurden von verschiedenen Forschergruppen mit widersprüchlichen Ergebnissen aufgestellt. Die erste dieser Studien an der AP ergab einen kleinen Wert für $\beta_{1g} = -0.2$ für einige Aryl- und Alkylmonoester^[25]. Ein β_{1g} -Wert von -0.6 für die Abgangsgruppe wurde für eine Reihe von Phosphorsäuremonoestern mit $pK_a > 15$ für die Alkoholgruppe bestimmt^[21]. Die Tatsache, daß dieser Wert für eine Mutante, in welcher der nucleophile Serinrest in einen Cysteinrest mutiert wurde, nur -0.3 betrug, wurde zusammen mit der für diese Mutante 50fach geringeren Geschwindigkeitskonstante als Hinweis für einen größtenteils assoziativen Phosphorylierungsschritt interpretiert. Im Gegensatz hierzu führte ein β_{1g} von -0.8 für eine Reihe von Arylphosphothioaten im Vergleich mit einem Wert von $\beta_{1g} = -1.1$ für die nicht-enzymatische, bekannterweise über einen dissoziativen Reaktionsweg verlaufende Reaktion zum Vorschlag, daß sowohl enzymatische, als auch nichtenzymatische Übergangszustände einen beträchtlichen dissoziativen Charakter aufweisen^[26]. Ein inverser sekundärer ¹⁸O-Isotopeneffekt, der für die Hydrolyse von Glucose-6-phosphat durch AP beobachtet werden konnte, deutet ebenfalls auf einen dissoziativen Mechanismus hin^[27]. Untersuchungen des Isotopeneffektes mit *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat lieferten Werte um eins und deuten darauf hin, daß ein nichtchemischer Schritt für die Hydrolyse dieses Substrates geschwindigkeitsbestimmend ist^[28].

Die Metallatome der nativen Zn1-Zn2-Mg3-AP können gegen verschiedene zweiwertige Metallionen ausgetauscht werden^[17]. Das native Enzym zeigt maximale Aktivität, wobei das Mg²⁺-Ion in der Bindungsstelle 3 nur einen geringen Einfluß auf die Aktivität der bakteriellen APs zeigt^[17, 29]. Die Gegenwart von Magnesium in dieser Bindungsstelle beeinflußt jedoch die Aktivität der APs aus Säugetieren, wahrscheinlich weil in diesen Enzymen ein Histidinrest Asp-153 ersetzt^[30]. Der Austausch eines oder beider Zinkionen in den Bindungsstellen 1 und 2 durch Mg²⁺-, Co²⁺- oder Mn²⁺-Ionen ist mit einer beträchtlichen Verminderung der Aktivität verbunden. Die Substitution von Zn²⁺ durch Cd²⁺ hat einen drastischen Effekt auf die Dephosphorylierung von E-P und ermöglicht die Isolierung des E-P-Intermediates^[7]. Dieses Ergebnis kann ohne weiteres durch die verminderte Fähigkeit des „weicheren“ und größeren Cd²⁺-Ions erklärt werden, ein OH⁻-Nucleophil zu erzeugen oder den Übergangszustand zu stabilisieren.

Die Struktur nativer AP konnte mit einer Auflösung von 2.8 Å, die des Komplexes mit Phosphat (E·P) mit einer von 2.0 Å sowie die des Cd-substituierten Enzyms mit kovalent ge-

bundenem Phosphat (E·P) mit einer Auflösung von 2.5 Å bestimmt werden^[31, 32]. Die Struktur des mit Phosphat komplexierten, nativen Enzyms (E·P) lieferte einen detaillierten Einblick in die Struktur des aktiven Zentrums (Abb. 3 und 4).

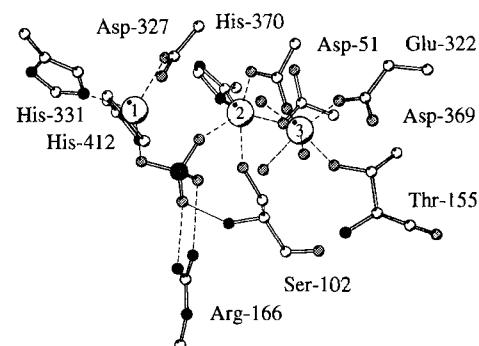


Abb. 4. Struktur des aktiven Zentrums der alkalischen Phosphatase mit einem gebundenen Phosphat-Ion (die Koordinaten wurden dem Datenfile 1ALK [32] entnommen). Die Seitenkette von Ser-102, die hier so dargestellt ist, daß sie mit Zn wechselwirkt, ist in dieser Struktur fehlgeordnet (siehe Abb. 6).

Zn1 ist fünffach koordiniert durch His-331, His-412, die beiden Carboxylat-Sauerstoffatome des Asp-327 und ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe. In der Gegend des aktiven Zentrums wurden einige Wassermoleküle lokalisiert, jedoch ohne direkte Koordination zu Zn1. Am nativen Enzym durchgeföhrte Wasser-Relaxationsmessungen^[33] sowie ¹¹³Cd- und ³⁵Cl-NMR-Untersuchungen^[34] lassen auf die Koordination von einem oder zwei Wassermolekülen am Metall 1 in Abwesenheit von Phosphat schließen. Im E·P-Komplex wird Zn2 tetraedrisch durch His-370, durch zwei monodentat bindende Carboxylat-Seitenketten (Asp-51 und Asp-369), sowie durch ein weiteres Sauerstoffatom der Phosphatgruppe koordiniert. Beide Zinkionen werden somit durch das Phosphat-Ion bidentat verbrückt. Die anderen beiden Phosphat-Sauerstoffatome werden durch die Guanidylgruppe von Arg-166 gebunden. Asp-51, Glu-322, Thr-155 und drei Wassermoleküle koordinieren am Mg in der Bindungsstelle 3. Asp-51 verbrückt bidentat Zn2 und Mg3. Die Abstände der Metallionen betragen 4.1 Å zwischen Zn1 und Zn2, 4.8 Å zwischen Zn2 und Mg3 und 7.1 Å zwischen Zn1 und Mg3^[35]. Die Seitenkette von Ser-102 ist fehlgeordnet. Die vorliegende Struktur dient als Modell für den Produktkomplex E·P und auch für den Komplex mit gebundenem Substrat (E·ROP), da das Enzym offensichtlich keine spezifischen Wechselwirkungen zur Abgangsgruppe ausbildet.

Der Austausch beider Zink- gegen Cadmiumionen ermöglichte die strukturelle Charakterisierung des E-P-Intermediates mit einer Auflösung von 2.5 Å bei pH 7.5^[32]. Abbildung 5 zeigt

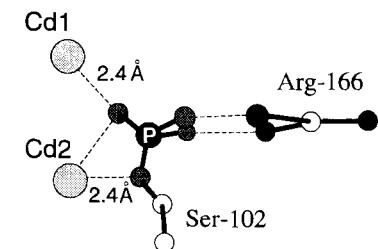


Abb. 5. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen im Phosphoserin-Intermediat der Cd-Cd-Form der alkalischen Phosphatase [32]. Diese Struktur gilt ebenso als Modell für den Bindungsmodus der phosphorylierten Seitenkette von Ser-102 im katalytisch aktiven Zn-Zn-Zentrum (siehe Abb. 6).

eine schematische Zeichnung der Wechselwirkungen der phosphorylierten Seitenkette von Ser-102 mit den Zinkionen und Arg-166.

Das Substrat bindet wahrscheinlich an beide Zinkionen, wobei das Ester-Sauerstoffatom an Zn1 auf der dem Ser-102 gegenüberliegenden Seite koordiniert (Abb. 6b) [17, 32]. Die Koordina-

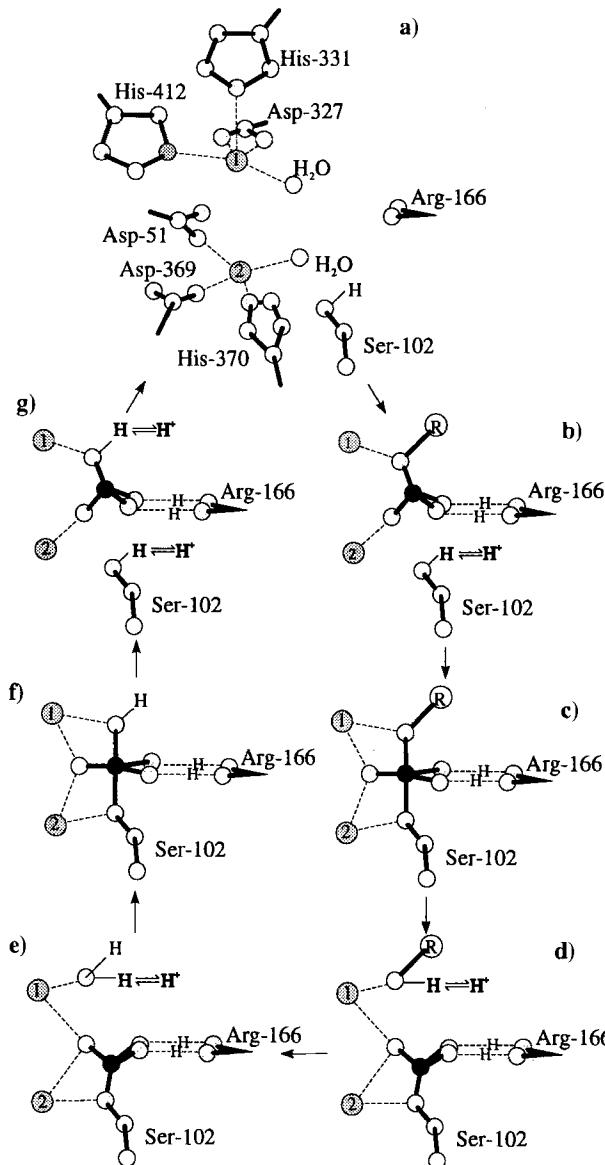


Abb. 6. Auf der Grundlage von Struktur- [32] und biochemischen Daten postulierter Mechanismus für die Hydrolyse eines Phosphomonoesters durch die alkalische Phosphatase.

tion des Sauerstoffatoms des Serins am Zn2 ermöglicht die Deprotonierung dieser Seitenkette und den Angriff des Ser-O^- -Nucleophils. Das Zn1 aktiviert die austretende Alkoholgruppe. Nachdem sich das Phosphoenzym-Intermediat gebildet hat (Abb. 6d) tritt das Alkoxid aus, und seine Koordinationsstelle am Zn1 wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Dieses kann ein Proton abstrahieren und das Zn-OH^- im nächsten Schritt als Nucleophil für die Hydrolyse des Phosphoserin-Intermediates fungieren (Abb. 6e). Die Struktur dieses Intermediates ist durch die Röntgenstrukturanalyse bekannt. Die Dephosphorylierung des E-P-Intermediates erfolgt in einem Austauschschritt, wobei

die beiden Metallionen vertauschte Rollen besitzen: Das Sauerstoffatom der Abgangsgruppe (Ser-O^-) wird nun durch Zn2 aktiviert und die verbleibenden Sauerstoffatome sind, um die Elektrophilie des Phosphoratoms zu erhöhen, an beiden Metallionen koordiniert bzw. bilden Wasserstoffbrücken zu Arg-166.

Neben den Metallionen spielen offensichtlich die Seitenketten von Ser-102 und Arg-166 wichtige Rollen in der Katalyse durch die AP. Die Mutation von Ser-102 zu einem nichtnucleophilen Alanin- und Leucinrest bedingte eine deutlich verminderte Aktivität in der Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern [36]. Für beide Mutanten betragen die Werte von k_{cat} ca. 1/1000 bzw. 1/500 der Aktivität des Wildtyps, mit nur geringem Einfluß auf K_m . Obwohl die Aktivität dieser Mutanten deutlich reduziert ist, wird die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat verglichen mit der Geschwindigkeit der nichtkatalysierten Reaktion dennoch um den Faktor ca. 10⁷ beschleunigt [36]. Bei diesen Mutanten verläuft die Hydrolyse wahrscheinlich nach einem anderen Mechanismus, z. B. durch den direkten Angriff eines Zink-aktivierten Wassermoleküls, ähnlich dem für andere Phosphatasen beobachteten Mechanismus. Der Austausch von Arg-166 gegen Serin, Alanin, Lysin und Glutamin zeigte, daß Arg-166 zwar für die Aktivität wichtig, aber keineswegs unentbehrlich ist [37]. Der Verlust von Arg-166 ist mit einem Anstieg von K_m und einem reduzierten k_{cat} verbunden (2.4% des Wildtyp-Wertes für R166A).

Mit der Aktivierung der Abgangsgruppe durch ein Metallion hat der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus einen dissoziativen Charakter. Mit der Deprotonierung durch ein Metallion wird jedoch auch das Nucleophil aktiviert. Einmalig am AP-Mechanismus ist die vertauschte Rolle der beiden Metallionen in den beiden Austauschschritten: Der zweite Schritt der Reaktion ist nahezu ein Spiegelbild des ersten Schrittes.

2.2. Die Familie der $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Metallophosphoesterasen

Bereits vor der Strukturaufklärung einer violetten Phosphatase (PAP, purple acid phosphatase) oder der Ser/Thr-Proteinphosphatasen (PPs) wurde ein Phosphoesterase-Erkennungsmotiv, DX[G/H]-(X)_n-GXGX[Y/X]-(X)_n-GNH[E/D] (Motiv A), in den Sequenzen vieler Phosphoesterasen festgestellt (Abb. 7). Dieses ist in den Sequenzen der PAPs, PPs, Diadenosin-Tetraphosphatasen, einiger Exonucleaseen, 5'-Nucleotidasen, Sphingomyelin-Phosphodiesterasen und anderer Phosphoesterasen zu finden [38, 39]. Aus den Strukturen der PAP [40] und der PPs [41–44] geht hervor, daß die Kernstruktur aller dieser Enzyme durch zwei übereinander gelagerte β -Faltblätter gebildet wird. Die Metallionen befinden sich an den C-Termini der zentralen Stränge. In der PAP aus Kidneybohnen enthält das Motiv A vier der Metall-koordinierenden Reste: Asp-135, Asp-164, Tyr-167 und Asn-201. In allen anderen Phosphoesterasen scheint der Tyrosinrest der zweiten loop-Region ausgetauscht zu sein, und diese Position in der Koordinationsphäre des Metallzentrums wird durch einen Histidinrest der ersten loop-Region ausgefüllt (welcher in der PAP ein Glycinrest ist). Basierend auf der PAP-Struktur ergaben Sequenzvergleiche ein zweites Erkennungsmotiv (Motiv B), H-(X)_n-[G/A]HX[H/X] (in Abb. 7 sind nur die streng konservierten Reste unterlegt), welches in der PAP die Reste His-286, His-323 und His-325 umfaßt [45].

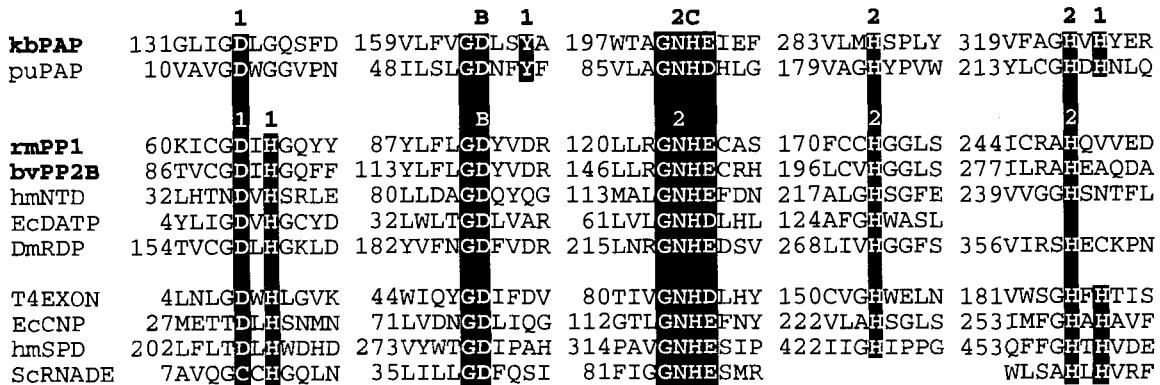


Abb. 7. Sequenzvergleich der Metall-koordinierenden Aminosäurebereiche einiger Enzyme der Gruppe der $\beta\beta\alpha\beta$ -Metallophosphoesterasen (eine vollständigere Analyse ist in Lit. [38, 39, 45] enthalten). Die Sequenzen der violetten Phosphatase aus Kidneybohnen (kbPAP), der Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenmuskel (rmPP1) und des Calcineurins aus Rindern (bvPP2B), für die Kristallstrukturanalysen vorliegen, sind zusammen mit denen der PAP aus Schweineuterus (puPAP), der menschlicher 5'-Nucleotidase (hmNTD), der Diadenosin-Tetraphosphatase aus *E. coli* (EcDATP), des retinalen Abbauproteins aus *Drosophila melanogaster* (DmRDP), des Exonucleaseproteins GP47 aus der Bakteriophage T4 (T4EXON), der 2',3'-cNucleotid-2'-phosphodiesterase aus *E. coli* (EccNP), der menschlichen Sphingomyelin-Phosphodiesterase (hmSPD), des RNA-debranching enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScRNADE) dargestellt. Die die Metallionen 1 und 2 koordinierenden Reste sind mit 1 bzw. 2, die verbrückenden Aspartatreste mit B und die konservierten katalytischen Histidinreste mit C markiert. Die ersten drei Blöcke enthalten Motiv A und die letzten beiden Motiv B. Näheres siehe Text.

2.2.1. Violette saure Phosphatase

Die violetten Phosphatasen (PAPs) sind weit verbreitete Phosphomonoesterasen, die durch das niedrige pH-Optimum, ihre Resistenz gegenüber der Hemmung durch Tartrat und durch ihre intensive violette Farbe, hervorgerufen durch einen Tyrosinat \rightarrow Fe^{III}-Charge-Transfer-Übergang, charakterisiert sind. Für die tierischen PAPs wurde eine biologische Funktion bei Abbauprozessen, z. B. bei der Phagozytose gealterter Erythrocyten^[46] und bei der aktiven Knochenresorption^[47], vorgeschlagen. Möglicherweise sind phosphorylierte Proteine die eigentlichen Substrate. Die monomer vorliegenden PAPs aus Säugetieren enthalten in ihrer aktiven Form alle ein Fe³⁺-Fe²⁺-Zentrum. Dieses Dieisen-Zentrum hat beachtliches Interesse erweckt und ist mittlerweile durch Mößbauer-^[48, 49], EPR-^[48, 50-53], NMR-^[53, 54], EXAFS-^[55], magnetische^[48, 56, 57], elektrochemische^[58] und Resonanz-Raman-Untersuchungen^[59] spektroskopisch gut charakterisiert worden. Die meisten Studien wurden an den PAPs aus der Rindermilz und aus dem Schweineuterus (auch bekannt als Uteroferrin) durchgeführt, die eine Sequenzhomologie von 90 % aufweisen.

Im Unterschied zu den tierischen PAPs besetzt in der Kidneybohnen-Phosphatase ein Zinkion die Bindungsstelle des zweiwertigen Metallions^[60]. Dieses pflanzliche Enzym ist ein homodimeres Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 111 kDa und weist eine Disulfidbrücke auf, die beide Monomere verbindet^[60, 61]. Das Zinkion der PAP aus Kidneybohnen kann gegen andere zweiwertige Metallionen unter Erhalt (z. B. beim Ersatz gegen Fe²⁺ oder Co²⁺) oder mit leicht verminderter Aktivität ausgetauscht werden^[62]. Nach dem Austausch von Zn²⁺ gegen Fe²⁺ zeigt das Kidneybohnenenzym ein verglichen mit den tierischen PAPs nahezu identisches spektroskopisches und kinetisches Verhalten^[62, 63]. Trotz der nur geringen Homologie in der Gesamtsequenz konnten, besonders in den Regionen um die Reste des aktiven Zentrums, signifikante Ähnlichkeiten der lokalen Sequenzbereiche aufgedeckt werden, die auf eine evolutionäre Verwandtschaft tierischer und pflanzlicher PAPs sowie auf Ähnlichkeiten in der dreidimensionalen Kernstruktur hindeu-

ten^[64]. Weiterhin sind alle Reste, die Liganden der Metallzentren sind, zwischen den pflanzlichen und den tierischen PAPs konserviert.

Für das gemischvalente Eisenzentrum ($S = 1/2$) konnte eine kleine antiferromagnetische Kopplungskonstante über die Temperaturabhängigkeit der EPR-Signalintensitäten^[48], durch ¹H-NMR Untersuchungen^[65] und durch Messungen der magnetischen Suszeptibilität^[56] bestimmt werden. Diese kleine Kopplungskonstante deutet auf die Gegenwart einer μ -Hydroxo-Brücke, aber keiner μ -Oxo-Brücke hin. Die antiferromagnetische Kopplung des oxidierten Enzyms ist stärker; das Vorhandensein einer μ -Oxo-Brücke im Fe³⁺-Fe³⁺-Enzym ist jedoch noch umstritten.

An das dinucleare Zentrum koordinierende Wassermoleküle konnten ESEEM- (ESEEM = electron spin echo envelope modulation spectroscopy) und ENDOR-spektroskopisch (ENDOR = electron nuclear double resonance)^[51] sowie durch elektrochemische Untersuchungen^[58] nachgewiesen werden. Wegen der bei niedrigerem pH-Wert geringeren Aktivität und der pH-Abhängigkeit des EPR-Signals wurde ein am Fe³⁺-Zentrum koordinierendes Wassermolekül mit einem pK_a -Wert von ca. 4.5 postuliert^[50]. Kinetikuntersuchungen (Stopped-flow-Methode) am Uteroferrin deuten auf eine schnelle Bindung des Phosphats am Fe²⁺-Zentrum hin^[66, 67]. Für die Substrate wird eine ähnlich schnelle Bindung an das Fe²⁺-Zentrum und ein Angriff am Phosphoratom des Substrats durch das Fe³⁺-gebundene Hydroxidion vorgeschlagen. Die festgestellte Inversion der absoluten Konfiguration am Phosphoratom bei der Hydrolyse der Phosphorsäuremonoester durch PAP stützt die Vorstellung, daß die Phosphorylgruppe direkt auf das Wassermolekül übertragen wird^[68]. Weiterhin konnte eine kürzlich erschienene Untersuchung keinen Hinweis für die Bildung eines Phosphoenzym-Intermediates liefern^[69].

Die mit einer Auflösung von 2.9 Å erhaltene Röntgenstrukturanalyse der PAP aus Kidneybohnen zeigt, daß das Fe³⁺-Zentrum von Tyr-167, His-325 und Asp-135 und das Zn²⁺-Zentrum von His-286, His-323 und dem Amidsauerstoffatom von Asn-201 koordiniert wird^[40] (siehe Abb. 3). Asp-164 verbrückt die

beiden Metallionen, die 3.1 Å voneinander entfernt sind. In der Kristallstruktur konnten wegen der mäßigen Auflösung keine Wassermoleküle lokalisiert werden. Auf der Grundlage von biochemischen Ergebnissen (siehe oben) und wegen der beobachteten Koordinationen positionierten die Autoren drei exogene Liganden in die Koordinationssphäre der beiden Metallionen^[40]: das als Nucleophil vorgeschlagene OH⁻-Ion am Fe³⁺-Zentrum, ein am Zn²⁺-Zentrum koordiniertes Wassermolekül und eine μ -Hydroxobrücke (siehe Abb. 3). Die Koordinationssphäre des Fe³⁺-Ions ist nahezu perfekt oktaedrisch, und die des Zn²⁺-Ions ähnelt der eines stärker verzerrten Oktaeders.

Die Röntgenstrukturanalyse der PAP aus Kidneybohnen in Gegenwart von Phosphat ergab, daß das Phosphat-Ion beide Metallatome bidentat verbrückt (Abb. 8)^[45]. Die beiden nicht-

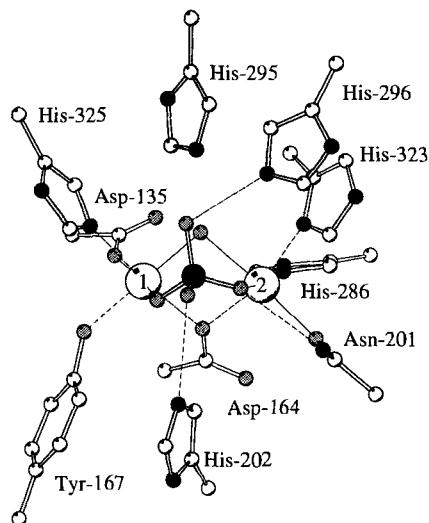


Abb. 8. Struktur des aktiven Zentrums der violetten Phosphatase mit einem gebundenen Phosphat-Ion (Koordinaten aus dem Datenfile 4KBP [45]). Das Fe³⁺-Ion befindet sich an der Bindungsstelle 1 und das Zn²⁺-Ion an der Stelle 2. Das verbrückende Wassermoleköl wurde nicht röntgenographisch lokalisiert, sondern auf der Grundlage von biochemischen Untersuchungen und der beobachteten Koordinationspolyeder positioniert.

koordinierenden Sauerstoffatome des Phosphat-Ions bilden Wasserstoffbrücken zu His-202 und His-296, deren Positionen gegenüber denen im phosphatfreien Enzym um ca. 1 Å verschoben sind.

Dem postulierten Mechanismus zufolge^[40, 50, 66] bindet die Phosphatgruppe des Substrats an das zweiwertige Metallion, welches zusammen mit den Histidinresten die Phosphatgruppe vororientiert und die Elektrophilie am Phosphoratom erhöht (Abb. 9). Hierauf greift der am Fe³⁺-Zentrum gebundene Hydroxidligand nucleophil am Phosphoratom an. Die Reaktion verläuft über einen pentakoordinierten Übergangszustand, in welchem die Abgangsgruppe und das angreifende Nucleophil die apicalen Positionen besetzen, so daß die Konfiguration am Phosphoratom invertiert wird. Neben den Bindungen zu den Metallionen erniedrigen die H-Brücken zu Seitenketten von His-202 und His-296 die Energie des Übergangszustands. Nach einer geringen Verschiebung könnte auch His-295 mit dem Substrat in Wechselwirkung treten und His-296 so die austretende Alkoholgruppe protonieren.

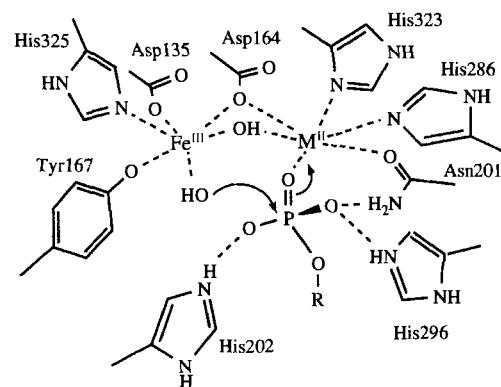


Abb. 9. Substratbindungsmodus und Angriff des Fe³⁺-gebundenen Nucleophils für den postulierten Reaktionsmechanismus der Phosphomonoesterhydrolyse durch die violette Phosphatase [40, 45, 50, 66].

2.2.2. Serin/Threonin-Proteinphosphatasen

Die Proteinphosphorylierung spielt eine grundlegende Rolle bei der Regulation vieler Prozesse in Eukaryontenzellen. Die Phosphorylierung eines Proteins ist ein dynamischer Prozeß, der durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen kontrolliert wird. Die Serin/Threonin-Phosphatasen sind hinsichtlich ihrer Sequenz und Struktur nicht mit den Tyrosin-Phosphatasen verwandt. Auf der Grundlage ihrer biochemischen Eigenschaften werden erstere in vier Gruppen eingeteilt (1, 2A, 2B, 2C)^[70]. Die PPs 1, 2A und 2B – letztere ist auch unter dem Namen Calcineurin bekannt – weisen weitgehend homologe katalytische Domänen auf^[38], unterscheiden sich jedoch in ihren Wechselwirkungen mit regulierenden Untereinheiten und hinsichtlich ihrer Substratspezifität^[71].

Calcineurin, ein aus einer katalytischen 60 kDa Untereinheit (Calcineurin A) und einer 19 kDa Calmodulin-ähnlichen regulierenden Untereinheit (Calcineurin B) bestehendes Heterodimer, kann durch verschiedene zweiwertige Metallionen aktiviert werden^[72, 73]. Wahrscheinlich enthält das aktive Zentrum des nativen Enzyms ein dinucleares Fe-Zn-Zentrum^[72]. Widersprüchliche Ergebnisse liegen hinsichtlich der Oxidationsstufe des Eisenions vor^[74]. Durch Manganionen aktivierte Calcineurin weist ein breites pH-Optimum um 7 auf^[75]. Ein in deuteriertem Wasser für V_{max}/K_m beobachteter (Lösungsmittel-)Isotopeneffekt von 1.35 steht im Einklang mit einem oder zwei Protonentransferschritten in der enzymatischen Reaktion^[76]. Weiterhin unterstützen zahlreiche kinetische und chemische Untersuchungen einen Mechanismus ohne ein Phosphoenzym-Intermediat^[75–77].

Mittlerweile liegen für folgende Ser/Thr-Proteinphosphatasen Röntgenstrukturanalysen vor: für die katalytische Untereinheit der PP-1 aus Kaninchenmuskel, komplexiert mit dem Toxin Microcystin (Auflösung 2.1 Å)^[41], für die menschliche PP-1 und für deren Komplex mit Wolframat (beide 2.5 Å Auflösung)^[44], weiterhin für Calcineurin aus Rinderhirn, komplexiert mit dem Immunophilin-Immunosuppressivum-Komplex FKBP12-FK506 (2.5 Å Auflösung)^[42] sowie für menschliches Calcineurin mit und ohne gebundenen FKBP12-FK506-Komplex (3.5 bzw. 2.1 Å)^[43]. In Übereinstimmung mit den beträchtlichen Sequenzhomologien, die zwischen diesen Proteinen bestehen, erweist sich die Art der Faltung der homologen Domänen aller drei Strukturen als identisch.

In der Kristallstruktur der PP-1 aus Kaninchen sind wahrscheinlich beide Metallbindungsstellen mit Mn^{2+} -Ionen besetzt, welche für die Wiederherstellung der vollen Aktivität des rekombinanten Proteins notwendig sind und im Kristallisationspuffer enthalten waren^[41, 78]. Dennoch deutet eine kürzlich erschienene Untersuchung darauf hin, daß die PP-1 in vivo ebenso wie Calcineurin ein Fe-Zn-Metalloenzym ist^[79]. Metallion 1 wird von Asp-64, His-66 und Asp-92, Metallion 2 von Asp-92, Asn-124, His-173 und His-248 koordiniert (siehe Abb. 3 und 10)^[41]. Zusätzlich koordinieren zwei exogene

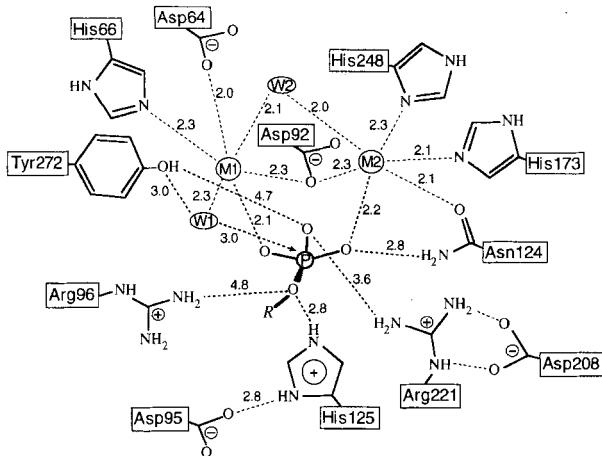


Abb. 10. Struktur des aktiven Zentrums der Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenmuskel und modellierter Bindungsmodus eines Phosphomonoesters [41] (Atomabstände [Å] über den gestrichelten Linien). W1 könnte das am Phosphoratom angreifende Nucleophil sein. In menschlicher PP-1 bindet (ähnlich wie das Substrat in diesem Beispiel) ein Wolframat-Ion zweizähnig an die Metallionen [44]. Diese Struktur deutet darauf hin, daß auch W2 das Nucleophil sein könnte. In beiden Mechanismen könnte His-125 die Abgangsgruppe protonieren.

Wassermoleküle die Metallionen, wobei eines an das Metallion 1 gebunden ist und das andere die beiden Metallionen verbrückt. Ein drittes Wassermolekül befindet sich in einem größeren Abstand von 3.4 Å zum Metallion 2. Die Koordinationsphäre der beiden Metallionen, die 3.3 Å voneinander entfernt sind, ist beim ersten näherungsweise quadratisch-pyramidal und beim zweiten trigonal-bipyramidal. Untersuchungen mittels Protonen-induzierter Röntgenemissions-Spektroskopie (PIXE) und die Kristallstruktur der menschlichen PP-1 deuten darauf hin, daß es sich beim Metallion 1 um ein Eisen- und bei Metallion 2 um ein Manganion handelt^[44]. Interessanterweise wurde der Metall-Metall-Abstand ligandfreier menschlicher PP-1 basierend auf einem Datensatz, der mit einem gefrorenem Kristall in Gegenwart von 30 % Glycerin erhalten wurde, zu 4.0 Å verfeinert. Im Komplex mit Wolframat verringert sich der Abstand auf 3.5 Å.

Eine sehr ähnliche Anordnung der die Metallionen koordinierenden Proteinreste liegt in den beiden Calcineurin-Strukturen vor^[42, 43]. Hier wurde der Abstand der beiden Metallionen zu 3.0 Å für das Rinderenzym und zu 3.1 Å für das menschliche Calcineurin verfeinert. In beiden Strukturen wurde das Metallion 1 als Eisenion und das Metallion 2 als Zinkion angepaßt, basierend auf der Homologie zur PAP. Ein Phosphat-Ion aus dem Kristallisationspuffer verbrückt die beiden Ionen zweizähnig in der Struktur des Rinder-Calcineurins^[42]. Außerdem deu-

tet eine schwache Elektronendichte auf ein die Metallzentren verbrückendes Wassermolekül hin. In der Struktur menschlichen Calcineurins konnten drei an Metallionen gebundene Wassermoleküle lokalisiert werden: ein verbrückendes und ein Fe^{3+} -gebundenes (ähnlich wie bei PP-1) sowie ein weiteres Fe^{3+} -gebundenes, das zudem eine Wasserstoffbrücke zu His-151 bildet. Letzteres wurde nicht in der Struktur der PP-1 lokalisiert, möglicherweise da hier der in der Nähe gebundene Microcystin-Inhibitor die Bindung dieses Wassermoleküls aus sterischen Gründen ausschließt. Bei menschlicher PP-1 liegt ein zweizähnig verbrückender Bindungsmodus für ein am Dimetallzentrum gebundenes Wolframat-Ion vor^[44].

Mutationsanalysen an den Ser/Thr-Phosphatasen wurden mit der kleinsten PP, der aus der Bakteriophage λ , durchgeführt^[39]. Die Mutation des katalytisch wirksamen Histidinrestes (in Abb. 7 mit C bezeichnet), für den eine Wechselwirkung mit der Phosphatgruppe des Substrates angenommen wird, hat eine deutlich negative Wirkung auf die Aktivität: k_{cat} wird um den Faktor 10⁵ vermindert. Die Mutation eines der beiden Argininreste des aktiven Zentrums (Arg-53 in PP-1) deutet darauf hin, daß dieser Rest bei der Bindung des Substrates und der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt ist.

Trotz der Ähnlichkeit der Strukturen der aktiven Zentren der drei Ser/Thr-Phosphatasen unterscheiden sich die von den Autoren diskutierten mutmaßlichen Reaktionsmechanismen deutlich. In der Struktur des Calcineurins aus Rindern befindet sich die μ -Hydroxobrücke in einem Abstand von 2.9 Å zum Phosphoratom des zweizähnig bindenden Phosphat-Ions, colinear mit einer der P-O-Bindungen. Unter der Annahme, daß die Phosphatgruppe des Substrates genauso wie das Phosphat-Ion am aktiven Zentrum bindet, könnte in einem S_N2 -Mechanismus das verbrückende Hydroxidion (W2 in der PP-1 aus Kaninchen in Abb. 11) das angreifende Nucleophil sein^[42]. Basierend auf dem Bindungsmodus von Wolframat wird von Egloff et al. ein ähnlicher Mechanismus angenommen^[44]. Die negative Ladung

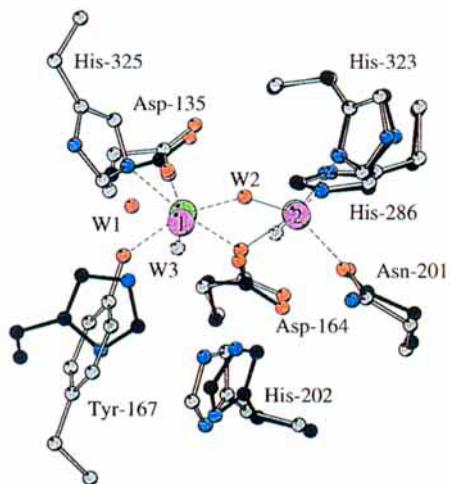


Abb. 11. Überlagerung eines Ausschnitts des aktiven Zentrums (Metallionen und katalytisch aktive His-Reste) der Proteinphosphatase-1 (C-Atome schwarz) [41] und der violetten Phosphatase (C-Atome grau) [40]. Beschriftungen der Proteinseitenketten und Metall-koordinierende Bindungen sind nur für die PAP gezeigt. In der PAP aus Kidneybohnen befindet sich Fe^{3+} an der Stelle 1 und Zn^{2+} an der Stelle 2. Die in rot dargestellten Wassermoleküle W1 und W2 (beschriftet wie in Abb. 10) gehören zu PP-1. Die zwei terminalen, Metall-gebundenen Wassermoleküle in grau sind vermutlich auch in PAP als Liganden zusätzlich zu einem verbrückenden Wassermolekül an der Position von W2 vorhanden.

des Intermediates wird vermutlich durch die Wechselwirkungen mit den Metallionen und durch Arg-122 und Arg-254, die sich in einem für Wasserstoffbrücken typischen Abstand zu zwei Sauerstoffatomen des Phosphat-Ions befinden, stabilisiert. His-151, das mit dem vom Lösungsmittel am leichtesten zugänglichen Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke bildet, protoniert vermutlich das austretende Alkoholat. Eine ähnliche Unterstützung bei der Stabilisierung des Übergangszustandes und bei der Protonierung der Abgangsgruppe durch die beiden Argininreste und den konservierten Histidinrest wird auch in einem alternativen Mechanismus vorgeschlagen (siehe Abb. 10)^[41]. Auch hier wird eine zweizähnig verbrückende Bindung der Phosphatgruppe des Substrates angenommen. Basierend auf einem modellierten Bindungsmodus der Phosphatgruppe wird jedoch ein Angriff des terminal an das Metallion 1 koordinierenden Wassermoleküls W1 diskutiert. In einer dritten Alternative geht man davon aus, daß das in Abbildung 11 gezeigte Wassermolekül W3 das katalytisch wirksame Nucleophil ist^[43]. Das katalytisch aktive Histidin könnte dabei als allgemeine Base fungieren und ein Proton vom Fe-koordinierten Wassermolekül übernehmen.

2.2.3. Vergleich der Strukturen der PAP und der Ser/Thr-PP

Die Überlagerung der aktiven Zentren der PAP aus Kidneybohnen und der PP-1 aus Kaninchen zeigt, daß die konservierten Liganden der Metallionen und ebenso der katalytisch aktive Histidinrest (His-202 in PAP) identische Konformationen annehmen und sehr gut zur Deckung kommen (Abb. 11). Das Fe³⁺-koordinierte Tyrosin ist in den Ser/Thr-PPs durch Histidin ersetzt, und die Position des Fe³⁺-gebundenen Histidins in der PAP ist in der PP-1 und den Calcineurin-Strukturen durch ein Wassermolekül (W1) besetzt. Das für die PAP postulierte verbrückende Wassermolekül befindet sich an einer Position, die der des verbrückenden Wassermoleküls W2 in den PP-1 ähnelt. Bei der PAP wurde angenommen, daß beide Metallionen durch jeweils ein zusätzliches Wassermolekül als sechstem Ligand koordiniert werden. Dieser sechste Ligand am Fe³⁺-Zentrum konnte in der Struktur des menschlichen Calcineurins tatsächlich lokalisiert werden (W3). Im Rinder-Calcineurin wird diese Position durch die gebundene Phosphatgruppe besetzt, während sie in Kaninchen-PP-1 frei bleibt, wahrscheinlich wegen des Einflusses des in der Nähe gebundenen Inhibitors Microcystin. Die Zinkionen weisen in allen PP-Strukturen nur eine fünffache Koordination auf. Die wesentlichen Strukturunterschiede der aktiven Zentren von PP-1 und der PAP sind das am Eisen gebundene Wassermolekül im Fall der PP-1, welches in der PAP durch ein Histidin substituiert ist, und die Gegenwart von zwei Argininresten in den PP-1s. Letztere könnten mit der Phosphatgruppe des Substrates wechselwirken. In der PAP könnten die Reste His-295 und His-296 ähnliche Rollen übernehmen.

Aus den Strukturen der PAP, des Rinder-Calcineurins und der menschlichen PP-1 geht hervor, daß Phosphat als Reaktionsprodukt und auch der Inhibitor Wolframat im zweizähnig verbrückenden Bindungsmodus an beide Metallionen gebunden sind. Mehrere mögliche Mechanismen wurden für die Reaktionen der PAP und der PP-1 vorgeschlagen, die sich hauptsächlich im Bindungsmodus des Substrates und in der Identität des Wassernucleophils unterscheiden; jedes der in der Struktur des

menschlichen Calcineurins lokalisierten Wassermoleküle W1, W2 und W3 kommt hierfür in Frage. Nach allen für die PP-1 postulierten Mechanismen bindet das Substrat im gleichen, zweizähnig verbrückenden Modus, der im Produkt-Enzym-Komplex auftritt, während für die PAP angenommen wird, daß das Substrat einzähnig an das zweiwertige Metallion gebunden ist. Es muß also noch gezeigt werden, ob die PAP und die Ser/Thr-PPs, trotz ihrer ähnlichen aktiven Zentren, tatsächlich einen unterschiedlichen Mechanismus einsetzen.

2.3. RNA- und DNA-Polymerasen und andere Nucleotidyl-Transferasen

Ihre Aufgabe in der zuverlässigen Übertragung genetischer Information macht die RNA- und DNA-Polymerasen zu einigen der wichtigsten Enzyme in allen lebenden Organismen^[80, 81]. Diese Enzyme weisen neben der Polymerase-Aktivität oft eine oder mehrere Nuclease-Aktivitäten auf. Zum Beispiel katalysiert die DNA-Polymerase I aus *E. coli* die Templatgesteuerte DNA-Synthese, die 3',5'-DNA-Hydrolyse und die 5',3'-DNA-Hydrolyse in drei verschiedenen Domänen einer einzigen Polypeptidkette von 103 kDa. Alle drei Aktivitäten erfordern zweiwertige Metallionen. Außerdem verlaufen die Polymerase-, die 3',5'-Exonuclease- und möglicherweise auch die 5',3'-Nuclease-Aktivität nach einem Zwei-Metallionen-Mechanismus (siehe unten). Die reverse Transkriptase des HIV-Virus-1 (HIV-RT) enthält neben dem aktiven Zentrum der Polymerase auch eine Ribonuclease-H(RNaseH)-Aktivität. Es muß noch gezeigt werden, ob die HIV-RT und die RNase H aus *E. coli* oder aus anderen Organismen ein oder zwei Metallionen zur Katalyse verwenden.

Ein Zwei-Metallionen-Mechanismus wird über die Polymerasen hinaus auch für andere Nucleotidyl-Transferasen diskutiert, z. B. für die Restriktions-Endonucleasen. Ein gemeinsames Merkmal dieser aktiven Zentren ist die nur geringe Affinität zu den Metallionen bei Abwesenheit von Substraten. Mit der Substratbindung werden die beiden Metallionen durch wenige (zwei oder drei) Carboxylat-Seitenketten gebunden. Dieses Charakteristikum unterscheidet diese Enzyme von anderen Nucleaseen, z. B. von der Nuclease P1.

Dennoch ist Vorsicht bezüglich der Frage angebracht, ob die katalytischen Reaktionen mit allen in diesem Abschnitt erwähnten Enzymen tatsächlich unter Beteiligung von zwei Metallionen verlaufen. In den meisten Fällen sind die Gegenwart einiger konservierter Carboxylat-Seitenketten und der Bedarf zweiwertiger Metallionen, oft zusammen mit der Homologie zu einem anderem Enzym, in dem voraussichtlich zwei Metallionen katalytisch aktiv sind, die einzigen Hinweise für einen Zwei-Metallionen-Mechanismus. Untersuchungen zur Bindung von Metallionen zum Apoenzym haben in einigen Fällen zu gegensätzlichen Ergebnissen geführt, möglicherweise durch den Gebrauch von kristallographischen Differenz-Fourier-Techniken bei der Lokalisation der Metallionen ohne weitere Verfeinerung. Biochemische und kristallographische Untersuchungen mit Substratanaloga oder Produkten in der Gegenwart von verschiedenen Metallionen können helfen, mechanistische Details aufzuklären. Bedenkt man, daß viele Enzyme ähnliche Nucleotidyltransferreaktionen mit nur einem oder keinem Metallion

katalysieren, erscheint es denkbar, daß einige der hier diskutierten Enzyme nur ein Metallion und eine freie Carboxylat-Seitenkette als allgemeine Base benutzen.

2.3.1. Die aktiven Zentren der Polymerasen

Es wurden inzwischen Strukturen von mehreren Enzymen aufgeklärt, die ein Polymerase-Zentrum enthalten: das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase-I aus *E. coli* (Pol-I)^[82-87], die reverse Transkriptase des Virus HIV-1 (HIV-RT)^[88-91], die DNA-Polymerase- β aus der Ratte (Pol- β)^[92-94], die RNA-Polymerase aus der Bakteriophage T7 (Pol-T7)^[95] und die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Pol)^[96]. Obwohl diese Polymerasen sich deutlich in ihrer Größe und Komplexität unterscheiden und einige von ihnen eine äußerst geringe oder keine Homologie der Gesamtsequenz aufweisen^[97], zeigt der Kern der katalytischen Einheiten aller Polymerasen einen auffallend ähnlichen molekularen Aufbau^[81, 91, 96, 98, 99]. Durch Vergleich der Sequenzen zahlreicher Polymerasen wurden drei ähnliche Sequenzmotive A bis C aufgedeckt, die drei streng konservierte Carboxylatreste und ein Lysin enthalten^[81, 100]. Die Pol- β ist jedoch sehr wahrscheinlich nicht mit den anderen Polymerasen über ein gemeinsames Urprotein verwandt.

Welche Rolle spielen diese Carboxylat-Seitenketten im Polymerase-Mechanismus? Ortspezifische Mutationen vieler der konservierten Aminosäuren ergaben, daß die Mutation dieser drei Carboxylatgruppen aus den Motiven A und C den deutlichsten Effekt auf die katalytische Aktivität zeigen^[101, 102]. Die Kristallstruktur der gemeinsam mit einem Oligonucleotid kristallisierten HIV-RT zeigt, daß die 3'-Hydroxylgruppe des Terminus des DNA-Primers in der Nähe der drei katalytischen Aspartat-Seitenketten bindet^[89]. Zweiwertige Metallionen, besonders Mn²⁺ und Mg²⁺, sind als Aktivatoren der Polymerase-Aktivität bekannt^[103-105]. Einige Polymerasen, einschließlich der RNA-Polymerase aus *E. coli*, enthalten fest gebundene Zinkionen, benötigen aber auch andere zweiwertige Kationen als Aktivatoren^[103, 106]. Die Beschaffenheit des Metallions beeinflußt auch die Genauigkeit der Polymerase-Reaktion^[107, 108]. Als Folge hiervon werden einige Metallionen, z. B. Mn²⁺ und Ni²⁺ als mutagen oder carcinogen angesehen. Mg²⁺ könnte daher für die meisten Polymerasen das katalytisch aktive Metall in vivo sein^[104, 108].

Basierend auf kinetischen und NMR-Untersuchungen der Bindung der Metallionen und des Substrats an die Pol-I wird ein Zwei-Metallionen-Mechanismus für die Polymerase-Reaktion vorgeschlagen^[103, 109, 110]. Tatsächlich zeigte die Kristallstruktur von Ratten-Pol- β mit einem DNA-Templat-Primer und 2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat (ddCTP) in der Gegenwart von 10 mM MgCl₂, daß zwei Metallionen durch die drei konservierten Carboxylatgruppen koordiniert werden^[93]. ddCTP fehlt die nucleophile 3'-Hydroxygruppe des natürlichen 2'-Desoxy-cytidin-triphosphat(dCTP)-Substrates. Nach einem Katalysezyklus und dem Einbau dieses Polymerase-Inhibitors in den wachsenden Primer-Strang ist somit keine 3'-Hydroxygruppe des Primers für den nächsten Katalysezyklus vorhanden. In der röntgenographisch bestimmten Struktur binden das 3'-Kohlenstoffatom, das in der katalytisch aktiven Anordnung die nucleophile Hydroxygruppe tragen würde, und die Phosphatgruppen des ddCTP in unmittelbarer Nähe der Metallionen

(Abb. 12). Am Magnesiumion B, das sich nahe dem 3'-Kohlenstoffatom des Primer-Strangs befindet, koordinieren Asp-256, Asp-190, Asp-192, eines der nichtveresterten Phosphoryl-Sauerstoffatome der α -Phosphatgruppe des ddCTPs und vermutlich ein Wassermolekül (Abb. 12). Im Komplex mit dem

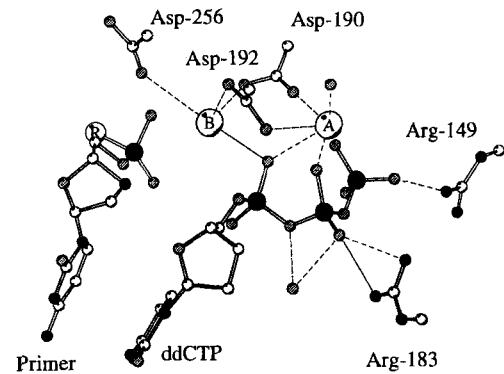


Abb. 12. Bindungsmodus von ddCTP und 3'-ddCTP des Primer-Strangs zum Di-metallzentrum von DNA-Polymerase β (Koordinaten aus dem Datenfile 2BPF [93]). Das in schwarz dargestellte C-Atom des 3'-ddCTP des Primers trägt die nucleophile 3'-Hydroxygruppe in der katalytisch aktiven Anordnung mit einem normalen dNTP-Nucleotid anstelle von ddCTP am 3'-Primer-Ende.

intakten Primer-Terminus würde vermutlich auch die 3'-Hydroxygruppe zum Magnesiumion B koordinieren. Am Magnesiumion A binden Asp-190, Asp-192, drei Phosphoryl-Sauerstoffatome der α -, β - und γ -Phosphatgruppen des ddCTP und ein Wassermolekül (Abb. 12). Beide Metallionen, die 4.7 Å voneinander entfernt sind, weisen eine Koordinationssphäre auf, die nicht durch höher symmetrische Koordinationspolyeder beschrieben werden kann. Weiterhin treten in der Koordinationsphäre von Magnesiumion B einige relativ große Metall-Ligand-Abstände auf. Interessant an dieser Struktur ist, daß keine Protein-Seitenkette mit den Sauerstoffatomen der α -Phosphatgruppe in Wechselwirkung tritt. Der Übergangszustand könnte somit allein durch die Metallionen, durch Wassermoleküle in der Region des aktiven Zentrums und durch schwächere van-der-Waals-Kräfte stabilisiert werden.

Die Struktur der Ratten-Pol- β wurde unabhängig auch von einer anderen Arbeitsgruppe gelöst^[92]. Nach Eindiffundieren von Mn²⁺-Ionen in die Kristalle zeigten sich zwei Metallbindungsstellen im nativen Enzym^[111] wie auch im Komplex mit 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP). Überraschenderweise werden in dieser Strukturbeschreibung des nativen Enzyms beide Metallionen durch nur eine zweizählig verbrückende Carboxylat-Seitenkette (Asp-190) koordiniert, wobei die Strukturen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfeinert waren. Die meisten der anderen Polymerase-Strukturen^[82-91, 94-96] sind ebenfalls ohne zweiwertige Metallionen im Kristallisationspuffer bestimmt worden und enthalten keine gebundenen Metallionen, oder die Bindungstellen der Metallionen wurden bis jetzt noch nicht abschließend verfeinert. Diese Strukturen werden daher in diesem Artikel nicht beschrieben, da detailliertere Ergebnisse in der nahen Zukunft erwartet werden können.

Auf der Struktur der Ratten-Pol- β basierend, wurde ein Polymerase-Mechanismus vorgeschlagen, in dem das Magnesium-

ion B die Deprotonierung der 3'-Hydroxygruppe des Primer-Nucleophils unterstützt und den Übergangszustand durch die Koordination zu einem der äquatorialen Phosphoryl-Sauerstoffatome stabilisiert (Abb. 13)^[93]. In diesem Mechanismus ist

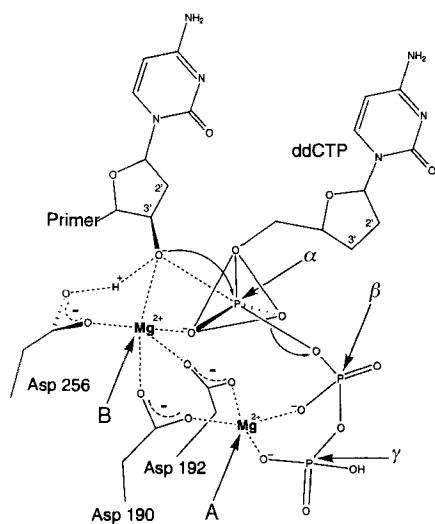


Abb. 13. Vorschlag für den Mechanismus der Polymerase-Reaktion auf der Grundlage des ternären Komplexes aus Polymerase β , DNA-Primer und ddCTP, wie in Abb. 12 gezeigt [93]. In einem ähnlichen alternativen Polymerase-Mechanismus [112] nimmt das Mg^{2+} -Ion A auch an der Aktivierung der Abgangsgruppe durch Koordination zum Sauerstoffatom der Anhydridbindung zwischen den α - und β -Phosphatgruppen teil.

das Magnesiumion A weder an der Stabilisierung des penta-koordinierten Übergangszustandes noch an der Aktivierung der Abgangsgruppe durch die Koordination des Sauerstoffatoms zwischen der α - und der β -Phosphatgruppe beteiligt. Stattdessen bindet und orientiert das Magnesiumion A die β - und γ -Phosphatgruppen. In einem alternativen Polymerase-Mechanismus, der dem eines direkten Austauschschriftes des AP-Mechanismus ähnelt, weist das Magnesiumion A im Übergangszustand zusätzliche Wechselwirkungen zu einem der äquatorialen Phosphoryl-Sauerstoffatome und zum verbrückenden Sauerstoffatom der Abgangsgruppe auf^[112]. Bisher wurde in allen stereo-chemischen Untersuchungen für Polymerase-Reaktionen eine Inversion der Konfiguration am Phosphoratom nachgewiesen^[113], in Übereinstimmung mit den vorgeschlagenen einstufigen S_N2 -artigen Mechanismen. Für einige Reste des aktiven Zentrums, einschließlich für den konservierten Lysinrest aus dem Motiv B, konnte eine Funktion im Polymerase-Mechanismus durch Mutationsanalyse aufgezeigt werden^[101, 114].

2.3.2. Das aktive Zentrum der 3',5'-Exonuclease in der DNA-Polymerase I

Das Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase-I enthält neben der Polymerase-Aktivität auch ein 3',5'-Exonuclease-Zentrum, das ungefähr 33 Å vom aktiven Zentrum der Polymerase entfernt ist^[82, 115–117]. Die beiden aktiven Zentren agieren unabhängig voneinander und haben getrennte Bindungsstellen für DNA. Die Exonuclease-Aktivität dient der Entfernung von Polymerase-Fehlern durch das Herausschneiden von unpassenden Basenpaaren. Andere Polymerasen weisen ebenfalls homo-

logie Domänen mit 3',5'-Exonuclease-Aktivität auf^[97, 118]. Zahlreiche kristallographische Studien machen den Reaktionsverlauf der Exonuclease zu einem der durch Strukturuntersuchungen am besten charakterisierten Zwei-Metallionen-Mechanismen^[81–86, 110, 117].

Die Exonuclease-Reaktion verläuft unter Inversion der Konfiguration des Phosphoratoms^[119], im Einklang mit einem S_N2 -artigen Austauschschnitt. Zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} oder Co^{2+}) sind für die Exonuclease-Aktivität essentiell^[120]. Zwei Metallbindungsstellen konnten in den Kristallstrukturen des Komplexes aus Enzym und den Produkten dCMP oder dTMP lokalisiert werden^[84, 85]. Die Gegenwart von mehr als einer Metallbindungsstelle wurde auch NMR-spektroskopisch^[105] und durch den kooperativen Effekt der Metallbindung auf die Exonuclease-Aktivität gezeigt^[120]. In dem dTMP-Produktkomplex sind die beiden Metallionen 3.9 Å voneinander entfernt und werden durch Asp-355 und durch eines der Phosphoryl-Sauerstoffatome zweizählig verbrückt (Abb. 14). Bindungsstelle A ist verzerrt tetraedrisch von Liganden

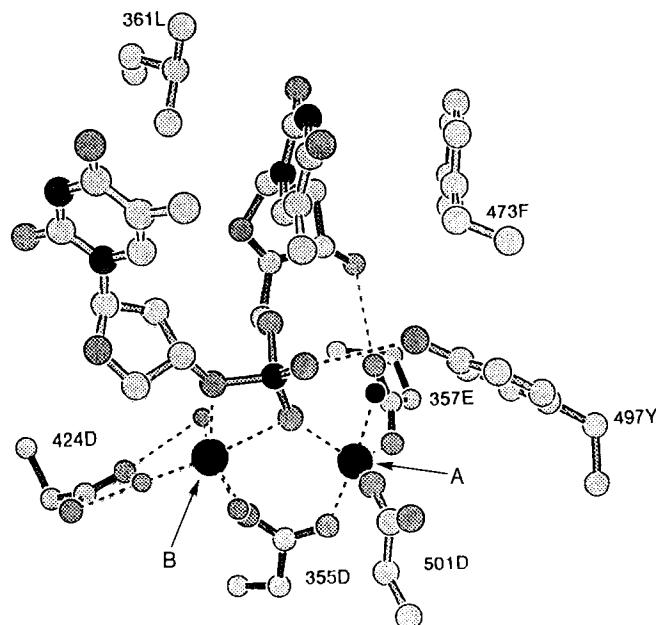


Abb. 14. Bindungsmodus eines Dinucleosidphosphats zum aktiven Zentrum der 3',5'-Exonuclease von Pol-I (aus Lit. [85]). Die Koordinaten des Dinucleosidphosphats stammen aus der Strukturanalyse der inaktiven D424A-Mutante mit einem Mg^{2+} -Ion in der Bindungsstelle A, keinem Metallion in B und gebundenem Tetranucleotid. Diese Koordinaten sind zusammen mit der Struktur des Proteins mit zwei gebundenen Metallionen aus einem Komplex des Wildtyp-Enzyms mit dTMP (dTTP nicht gezeigt) dargestellt. Das am Metall A koordinierte Wassermolekül (in schwarz) ist in einer für einen Angriff auf das Phosphoratom geeigneten Position.

den umgeben, während das Metallion in der Bindungsstelle B oktaedrisch koordiniert wird. Der Komplex wurde in Gegenwart von 20 mM $MgSO_4$ und 1 mM $ZnSO_4$ kristallisiert. Unter diesen Bedingungen bildet sich ein $Zn(A)-Mg(B)$ -Zentrum^[85], im Einklang mit den von Zink- und Magnesiumionen bevorzugten Koordinationssphären.

Im nativen Enzym ist die Metallbindungsstelle B in Abwesenheit von gebundenem dNMP nicht besetzt, auch wenn die Kristallisation in Gegenwart zweiwertiger Metallionen durchgeführt wird^[82, 85]. Dies deutet darauf hin, daß die Bindung der Metallionen an die Stelle B zusammen mit oder nach der Sub-

stratbindung erfolgt, unter Bildung des katalytisch aktiven Komplexes. Im Unterschied hierzu ist die Metallbindungsstelle A auch im nativen Enzym besetzt, sofern die Kristallisation in Gegenwart von Metallionen durchgeführt wurde. An dieser Stelle (A) ist die Bindung von Zinkionen stark bevorzugt^[82, 85]. Die Mutation des Liganden Asp-424 zu Alanin an der Stelle B führte, wegen der ausbleibenden Metallbindung an dieser Stelle, zu einem inaktiven Enzym^[82, 84]. Diese inaktive Mutante ermöglichte die Strukturbestimmung eines Komplexes mit einem gebundenem Tetranucleotid (dT)₄ als Substrat in Gegenwart von Mg^{2+} an der Bindungsstelle A (Abb. 14)^[85]. Das 3'-terminale Nucleotid des Tetranucleotids bindet in der gleichen Weise wie das dTMP des Produktkomplexes.

Unter der Annahme, daß die Bindung des Substrats im katalytisch aktiven Komplex in Gegenwart eines Metallions an der Bindungsstelle B in gleicher Weise erfolgt, ermöglicht die Struktur mit gebundenem (dT)₄ einen detaillierten Einblick in die Anordnung der Reaktanten vor dem Übergangszustand (Abb. 14). Das am Metallion A koordinierte Wassermolekül liegt der austretenden Gruppe gegenüber und befindet sich daher in einer für einen nucleophilen Angriff optimalen Position. Beide Metallionen werden durch eines der nichtveresterten Phosphoryl-Sauerstoffatome koordiniert, und am Metallion B koordiniert außerdem das Sauerstoffatom der Abgangsgruppe. Als bemerkenswertes Ergebnis der kristallographischen Untersuchung der Substratbindung der D424A-Mutante ist festzuhalten, daß der Verlust des Metallions B zu einem nahezu vollständigen Verlust der Aktivität führt (um mindestens fünf Größenordnungen)^[84], obwohl das elektrophile Phosphoratom vermutlich durch das Metallion A hinsichtlich des am Metallion A gebundenen Nucleophils noch richtig positioniert und aktiviert wird. Dies unterstreicht die Bedeutung der Stabilisierung des Übergangszustandes und der Aktivierung der Abgangsgruppe durch das Metallion B.

Abbildung 15 zeigt einen plausiblen Mechanismus für die Exonuclease-Reaktion. Die Rollen der beiden Metallionen

ähneln denen in den einzelnen Austauschschritten der AP. Das Metallion A unterstützt die Erzeugung des angreifenden Hydroxidion-Nucleophils, das überdies durch Wasserstoffbrücken zu Glu-357 und Tyr-497 stabilisiert wird. Da Glu-357 zudem am Metallion A koordiniert, wird sein pK_a -Wert derart erniedrigt, daß für diesen Rest keine Basenfunktion angenommen wird. Diese Annahme wird durch Struktur-Energie-Berechnungen unter Verwendung der empirischen Valenzbindungs-Methode unterstützt^[121]. Auch für Tyr-497 ist eine Funktion als Protonenacceptor unwahrscheinlich, da die Mutation dieses Restes zu Phenylalanin ein dem nativen Enzym ähnliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert ergibt und auch nur eine geringe Abnahme der Aktivität zur Folge hat^[116]. Ein bemerkenswertes Merkmal dieses Mechanismus ist, daß im Unterschied zur alkalischen Phosphatase keine Protein-Seitenkette eine bedeutsame Funktion in der Stabilisierung des Übergangszustandes ähnlich dem Arg-166 in der AP hat. Die Hauptaufgabe der Proteinliganden scheint die Bindung und Orientierung der Metallionen und der Reaktanten zu sein. Dieser Mechanismus ist somit vereinbar mit dem Ergebnis, daß die Mutationen von Asp-355, Asp-424 und Asp-501 den größten Einfluß auf die Exonuclease-Aktivität haben^[116].

2.3.3. Die 5',3'-Nuclease-Aktivität der Polymerase aus *Thermus aquaticus*

Die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, bekannt durch ihre Verwendung in der Polymerase-Kettenreaktion^[122], ist homolog zur Pol-I und enthält in ihrer N-terminalen Domäne ebenso eine 5',3'-Nuclease-Aktivität, aber keine 3',5'-Exonuclease-Aktivität. Die Kristallstruktur der Taq-Pol ließ eine Metallbindungsstelle I erkennen, sofern die Kristalle mit 1 mM Zn^{2+} inkubiert wurden^[96]. Mit 20 mM Mn^{2+} inkubierte Kristalle wiesen zwei zusätzliche Metallbindungsstellen auf, II und III. I und II sind 5 Å voneinander entfernt, während der Abstand zwischen III und I sowie II 10 Å beträgt. Die Strukturen mit Metallionen sind gegenwärtig noch nicht abschließend verfeinert und demnach hier noch nicht im größeren Detail beschrieben. Dennoch deutet die Lokalisierung zweier benachbarter Metallbindungsstellen in der 5',3'-Nuclease-Domäne der Taq-Pol darauf hin, daß bei dieser ebenfalls zwei Metallionen an der Katalyse beteiligt sind.

2.3.4. Ribonuclease H

Die HIV-RT weist eine Ribonuclease-H(RNaseH)-Aktivität auf^[123], die als Endonuclease fungiert, um den viralen RNA-Templat-Strang bei der DNA-Synthese abzubauen^[124]. Das aktive Zentrum der RNase H befindet sich ungefähr 60 Å vom aktiven Zentrum der Polymerase entfernt auf einer separaten Domäne der 66 kDa schweren Untereinheit^[81, 88]. Die Kristallstruktur der isolierten Domäne, die stabil, aber nicht katalytisch aktiv ist^[125], konnte mit einer Auflösung von 2.4 Å bestimmt werden^[126, 127]. Zweiwertige Metallionen sind für die RNaseH-Aktivität unentbehrlich^[128]. In Gegenwart von 45 mM $MnCl_2$ wurden in 2.8 Å-Differenz-Elektronendichtheckarten zwei Metallionen im Abstand von ca. 4 Å lokalisiert (Abb. 16)^[126]. Die Seitenketten von Asp-443, Glu-478, Asp-498 und Asp-549 befinden sich in der Nähe der beiden Metallionen. Diese vier

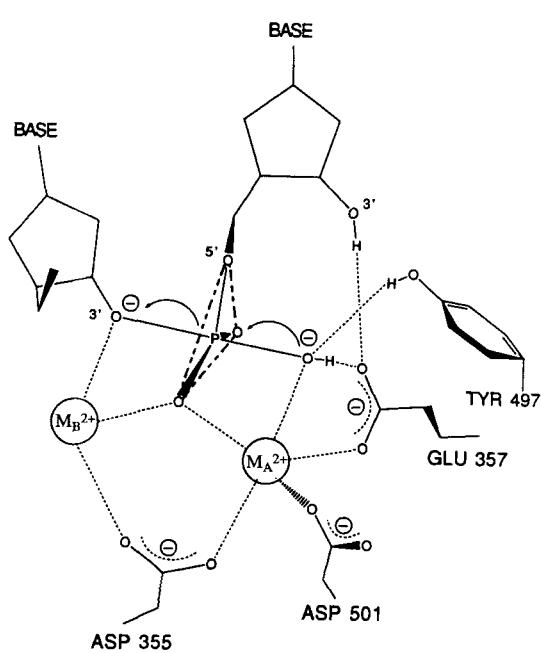


Abb. 15. Postulierte Wechselwirkungen im Übergangszustand der 3',5'-Exonuclease-Reaktion von Pol-I mit dem Protein [85].

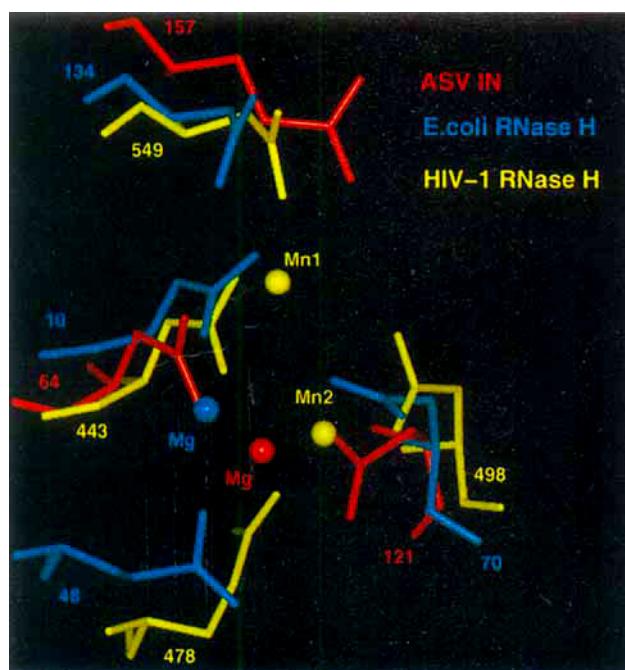


Abb. 16. Vergleich der Metallbindungsstellen in der Avian-Sarcoma-Virus-Integrase (rot) und RNaseH aus *E. coli* (blau) und HIV-1 (gelb) (aus Lit. [136]).

Carboxylatgruppen sind auch unter den Retroviren strikt konserviert^[129].

Die RNaseH-Domäne der HIV-RT weist zur RNaseH aus *E. coli* signifikante Homologien in Sequenz und Struktur auf^[130, 131]. Die die Metallionen koordinierenden Reste Asp-443, Glu-478, Asp-498 und Asp-549 der HIV-RT-RNaseH sind den Resten Asp-10, Glu-48, Asp-70 und Asp-134 der RNaseH aus *E. coli* analog. Die Mutagenese von Asp-10, Glu-48 und Asp-70 des bakteriellen Enzyms hat ebenso einen deutlichen Verlust der Aktivität zur Folge^[132]. Im Unterschied zum viralen Enzym wurde in RNaseH aus *E. coli* durch kristallographische^[131] und NMR-Untersuchungen^[133] selbst in Gegenwart von Nucleotiden nur eine Mg^{2+} -Bindungsstelle lokalisiert (Abb. 16). Diese Ergebnisse unterstützen einen Ein-Metallionen-Mechanismus für die RNaseH, wobei eine Carboxylatgruppe als allgemeine Base fungiert, um das Wassernucleophil zu deprotonieren, und in dem das Metallion an den beiden nichtveresterten Phosphoryl-Sauerstoffatomen des Polynucleotids koordiniert^[131]. Somit bleibt die Frage offen, ob bei den RNasen ein oder zwei Metallatome in der Katalyse beteiligt sind oder ob die Reaktionen an den homologen RNasen nach unterschiedlichen Reaktionsmechanismen verlaufen.

Die Kristallstrukturen der Integrasen aus dem HIV-1^[134] und dem Avian-sarcoma-Virus (ASV)^[135, 136], der Bakteriophage Mu Transposase, MuA^[137], wie auch der Holliday-junction-Resolvase-RuvC aus *E. coli*^[138] sind der RNase aus HIV und *E. coli*^[139] strukturell ähnlich. Drei strikt konservierte Carboxylat-Seitenketten an ihren aktiven Zentren und die Abhängigkeit der Aktivität aller Enzyme von zweiwertigen Metallionen, meist Mg^{2+} und Mn^{2+} , deuten darauf hin, daß diese Nucleotidyl-Transferasen nur mit einem oder mehreren Metallionen aktiv sind. In Gegenwart von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen bindet eines an die ASV-Integrase nahe der Position, die auch in der

RNase H aus *E. coli* besetzt wird (Abb. 16)^[136]. Ein detaillierter Einblick in die Katalyse mit diesen Enzymen kann für die Zukunft erwartet werden, sobald weitere Strukturen mit gebundenen Substratanaloga oder Produkten in der Gegenwart von Metallionen vorliegen.

2.3.5. Restriktions-Endonucleasen

Restriktions-Endonucleasen, die Phosphodiesterbindungen der DNA an spezifischen Sequenzen spalten, benötigen für die Katalyse Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor. Es liegen sowohl biochemische als auch strukturelle Hinweise vor, daß mit diesen Nucleasen, die trotz nur geringer oder fehlender Homologien in den Primärstrukturen konservierte Carboxylatreste in der Region des aktiven Zentrums aufweisen, die Reaktion nach einem Zwei-Metallionen-Mechanismus verläuft^[140–143]. Der Kristallstruktur eines Enzym-Produkt- Mg^{2+} -Komplexes der EcoRV-Endonuclease zufolge sind im aktiven Zentrum zwei Magnesium-Ionen benachbart, die durch die Phosphatgruppe des Produktes zweizähnig verbrückt werden^[141, 144]. Basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten der aktiven Zentren unterstützen die Strukturen von EcoRI^[145], PvuII^[146], BamHI^[140] und Cfr10I^[143] trotz einiger Unterschiede einen möglichen Zwei-Metallionen-Mechanismus (für eine Überlagerung der aktiven Zentren siehe Lit.^[143]).

2.3.6. Ribozyme

Trotz der Abwesenheit funktioneller Gruppen mit pK_a -Werten und chemischen Eigenschaften, ähnlich denen der Aminosäure-Seitenketten in Proteinen, kann RNA chemische Reaktionen katalysieren, z. B. als Nuclease oder beim Spleißen von RNA^[147]. Der Bedarf von zweiwertigen Metallionen und der Vergleich mit anderen Nucleasen, die nach einem Zwei-Metallionen-Mechanismus katalysieren, führte zu der Hypothese, daß Ribozyme die Nucleinsäuren-Hydrolyse oder das RNA-Spleißen ebenfalls mit Hilfe von zwei Metallionen katalysieren^[148].

2.4. Die Lithium-inhibierten Metallophosphatasen FBP, IMP und IPP

Die drei strukturell charakterisierten Phosphatasen Fructose-1,6-diphosphatase (FBP), Inositol-Monophosphatase (IMP) und Inositolpolyphosphat-1-phosphatase (IPP) bilden eine Gruppe von entfernt verwandten Enzymen. Für die FBP konnte als erstes Enzym dieser Gruppe die Struktur röntgenographisch aufgeklärt werden^[149]. Die Strukturanalyse zeigte ein charakteristisches Faltungsmotiv aus fünf Schichten von Sekundärstrukturelementen der Reihenfolge $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, welches später auch in den Strukturen der IMP^[150] und IPP^[151] gefunden wurde. Die strukturelle Ähnlichkeit erstreckt sich auch auf die aktiven Zentren, in denen alle bis auf einen (ein Asp/Glu-Austausch) der Metall-bindenden Reste konserviert sind^[152]. Diese konservierten Reste wurden in drei Motive gruppiert, die die Liganden der Metallionen und andere Reste des aktiven Zentrums enthalten (Abb. 17)^[152, 153]. Alle drei Enzyme weisen auch gemeinsame

	Motiv A B 21	Motiv B 1	Motiv C 2
FBP	115VCF D PLDGSSN	279YECNPMAYVMEKAGG	96SEED
IMP	87WIIDP D LDGTTN	219WDVAGAGIIVTEAGG	69GEES
IPP	151W-V D PIDSTYQ	316WDS C AAHAILRAMGG	78GEES

Abb. 17. Sequenzvergleich von drei homologen Motiven mit den Liganden in der Fructose-1,6-diphosphatase (FBP), Inositol-Monophosphatase (IMP) und Inositolpolyphosphat-1-Phosphatase (IPP) (eine Liste von weiteren homologen Proteinen siehe Lit. [152, 322]). Die schwache Homologie erstreckt sich über eine Kernstruktur aus 5 α -Helices und 11 β -Strängen. Die an den Metallionen 1 und 2 koordinierten Reste und die verbrückende Aspartat-Seitenkette (B) sind markiert.

biochemische Eigenschaften auf, wie die Inhibierung durch einwertige Ionen, insbesondere Lithium, und die Abhängigkeit der Aktivität von zweiwertigen Kationen. Obwohl aktive Enzymformen in Gegenwart mehrerer Ionen, einschließlich Zn^{2+} und Mn^{2+} , vorliegen, sprechen die Metallbindungskonstanten sowie die viel höhere Konzentration von Magnesiumionen in der Zelle für Magnesium als gebundenes Metallion in vivo. Die FBP könnte jedoch auch Zinkionen bevorzugen^[154].

2.4.1. Fructose-1,6-diphosphatase

Die Fructose-1,6-diphosphatase (FBP) ist ein Schlüsselenzym in der Regulierung des Stoffwechsels der Gluconeogenese^[155-157]. Es konvertiert D-Fructose-1,6-diphosphat zu D-Fructose-6-phosphat, wobei Kaninchenleber-FBP ihre maximale Aktivität bei pH 7.6 erreicht. Die Gegenwart von zweiwertigen Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} oder Co^{2+}) ist für die katalytische Aktivität unentbehrlich^[154, 156, 158-160]. Eine bis drei Zink-Bindungsstellen wurden in jedem Monomer in der Gegenwart bzw. Abwesenheit von Substrat, Produkt oder deren Analoga gefunden^[154, 159, 161]. Ein Mn^{2+} -Ion bindet pro Monomer in Abwesenheit von Substrat, während zwei Metallionen in Gegenwart von Substrat oder Analoga binden^[159, 162]. Im Einklang mit einem S_N2 -Austausch verläuft die Hydrolyse unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom^[163].

Das Substrat Fructose-1,6-bisphosphat liegt in Lösung als Gemisch aus 15% der α -Form, 81% der β -Form, 2% der Ketoform und zu 1.3% als *gem*-Diol vor (Abb. 18)^[164]. Kinetische

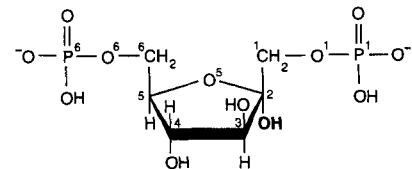


Abb. 18. Struktur des α -Anomers von Fructose-1,6-diphosphat. In dem analogen Inhibitor AhG-1,6-P₂ ist die 2-Hydroxygruppe (fett gedruckt) durch ein Wasserstoffatom ersetzt. In dem β -Anomer und seinem Analogon AhM-1,6-P₂ ist die Konfiguration an C2 invertiert.

Untersuchungen (Rapid-quench-Technik) deuten darauf hin, daß das α -Anomer das eigentliche Substrat ist^[165]. Im Gegensatz dazu zeigt jedoch 2,5-Anhydro-D-mannitol-1,6-diphosphat (AhM-1,6-P₂), ein zum β -Substrat analoger Inhibitor (Abb. 18), eine 20fach niedrigere Inhibierungskonstante gegenüber FBP als der entsprechende α -analoge Inhibitor^[166].

Die Enzyme aus Säugetieren werden von AMP an einer allosterischen Bindungsstelle und von Fructose-1,6-diphosphat am

aktiven Zentrum reguliert. Kristallstrukturanalysen sind für die FBP aus Schweinenieren^[149, 167-171], menschlicher Leber^[172] und aus den Chloroplasten von Spinat^[173] verfügbar. Das 144-kDa-Enzym aus Schweinenieren ist ein Homotetramer der Symmetrie 222. Eine Seitenkette des benachbarten Monomers, Arg-243, nimmt an der Substratbindung an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren teil.

In der Kristallstruktur des Komplexes aus Mn-Mn-FBP mit dem zum α -Anomer analogen Inhibitor sind die zwei Metallionen 3.7 Å voneinander entfernt und werden von zwei zweizähnig koordinierenden Carboxylatgruppen (Glu-97 und Asp-118) sowie von der 1-Phosphatgruppe des Inhibitors zweizähnig verbrückt (siehe Abb. 3 und 19)^[169]. Weitere Liganden der Metall-

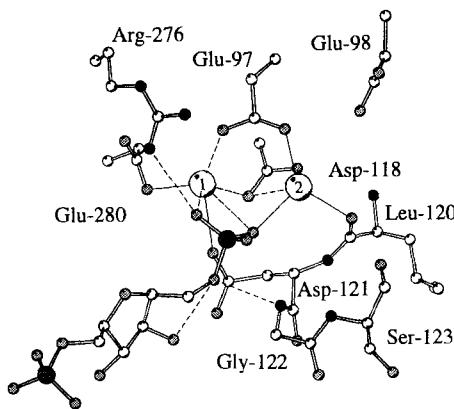


Abb. 19. Bindung des Substrat-analogen Inhibitors AhG-1,6-P₂ (siehe Abb. 18) am aktiven Zentrum der Fructose-1,6-diphosphatase (Koordinaten aus dem Datenfile 1FBD [169]).

ionen sind Glu-280 an Mn1 und die Carbonylgruppe von Leu-120 an Mn2. Unter Vernachlässigung von Metall-koordinierten Wassermolekülen, die in den Elektronendichtheckarten von 2.9 Å Auflösung nicht lokalisiert werden konnten, ähneln die Koordinationssphären beider Metallionen einem verzerrten Tetraeder. Neben den Bindungen zum Metallzentrum tritt eines der Phosphoryl-Sauerstoffatome der 1-Phosphatgruppe des Inhibitors mit der Seitenkette von Arg-276 in Wechselwirkung, und das Ester-Sauerstoffatom bildet eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe von Gly-122 (Abb. 19). Die Tatsache, daß das Substrat Fructose-1,6-bisphosphat in der α -Form in Abwesenheit von Metallionen in ähnlicher Weise wie AhG-1,6-P₂ bindet, zeigt, daß dieser Inhibitor ein gutes Modell für den Bindungsmodus des Substrates darstellt.

In Gegenwart von Zn^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen enthält das freie Enzym zwei Bindungsstellen, von denen eine mit der Position des Metalls 1 übereinstimmt, während die zweite Metallbindungsstelle, die als Metall 3 bezeichnet wurde, sich von der Metallbindungsstelle 2, die in Gegenwart eines Substratanalogs lokalisiert wurde, unterscheidet^[174]. Der Bindungsmodus des Produktes wurde durch eine Kristallstruktur der FBP, die mit Fructose-6-phosphat und Mn^{2+} - oder Zn^{2+} -Ionen kristallisiert wurde, aufgedeckt^[155]. Unter diesen Bedingungen ist nur die Metallbindungsstelle 1 besetzt, und es wird keine Bindung von Metallionen an den Stellen 2 oder 3 beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Bindung von Mn^{2+} - oder Zn^{2+} -Ionen an der Stelle 2 die Gegenwart der 1-Phosphatgrup-

pe des Substrats voraussetzt, und daß die Bindung an der Stelle 3 durch die Gegenwart von Substratanaloga oder Produkten gehemmt wird. Somit binden das erste Metallion und das Substrat unabhängig voneinander an das aktive Zentrum, gefolgt von der Bindung des zweiten Metallions. Es erscheint außerdem wahrscheinlich, daß nach der Hydrolyse das Metallion der Bindungsstelle 2 das aktive Zentrum vor dem Produkt verläßt.

Einem postulierten Reaktionsmechanismus zufolge bindet das Substrat in einem zweizähnig verbrückenden Bindungsmodus, wie es in der Kristallstruktur mit dem Inhibitor AhG-1,6-P₂ beobachtet wurde. Die zwei Metallionen orientieren das Substrat für einen Angriff des Nucleophils und stabilisieren den Übergangszustand (Abb. 20)^[169]. Die Deprotonierung des

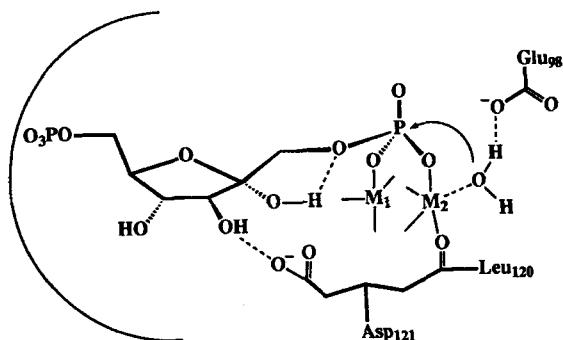


Abb. 20. Bindungsmodus des Substrats und Angriff eines Metallionen-koordinierten Wassermoleküls bei der Fructose-1,6-diphosphatase-katalysierten Reaktion [169].

Wassernucleophils wird durch Koordination am Metallion 2 und durch Wechselwirkung mit Glu-98 als allgemeine Base ermöglicht. Weitere Wechselwirkungen von Proteinresten mit anderen Atomen des Substrats bringen das Substrat in eine Konformation, in der die 2-Hydroxygruppe mit dem veresterten Sauerstoffatom der 1-Phosphatgruppe in Wechselwirkung treten kann. Die Bedeutung dieser Wechselwirkung für die Katalyse wird durch die ausbleibende enzymatische Spaltung von Substraten ohne 2-Hydroxygruppe offensichtlich^[166]. Weiterhin könnten die NH-Gruppe von Gly-122 und die Seitenkette von Arg-276 eine Rolle in der Stabilisierung des Übergangszustands spielen. In Übereinstimmung mit den röntgenographischen Untersuchungen zeigten Mutationsanalysen, daß die Substitution von Arg-276 zu Methionin k_{cat} auf weniger als 1 % des ursprünglichen Wertes reduziert^[175], während Asn-212, Arg-243, Tyr-244, Tyr-264 und Lys-274 hauptsächlich an der Substratbindung beteiligt sind^[176]. Die Mutation der katalytischen Base Glu-98 zu Gln verringert k_{cat}/K_m 12000fach^[177].

Die Bindung von AMP an die allosterische Bindungsstelle, im Abstand von 28 Å zum aktiven Zentrum, führt zur katalytisch inaktiven T-Form des Enzyms. Der allosterische Übergang wird von einer Rotation der zwei Dimere des Tetramers um 15–17° relativ zueinander begleitet^[168]. Infolgedessen findet eine Bewegung der Reste Glu-97, Asp-118 und Leu-120 statt, wodurch auch Metallion 2 um 1.4 Å verschoben wird^[171]. Dieses Metallion ist dadurch nicht mehr geeignet positioniert, um die 1-Phosphatgruppe des Substrats in einer katalytisch wirksamen Position zu koordinieren. Weiterhin wird die Aktivität von FBP durch einwertige Ionen beeinflusst: K⁺- und Tl⁺-Ionen sind Auslöser, während Li⁺ ein Inhibitor ist^[178]. Die Aktivatoren

binden an drei Bindungsstellen im aktiven Zentrum, von denen zwei sehr nahe zu den katalytischen Metallbindungsstellen 1 und 2 gelegen sind^[170]. Die dritte Bindungsstelle ist 3.8 Å von einem der Sauerstoffatome der 1-Phosphatgruppe des Substrats entfernt und könnte die Aktivierungsstelle sein. Interessanterweise ist die Stelle 3 in der Abwesenheit von K^+ -oder Tl^+ -Ionen von der Guanidylgruppe des Arg-276 besetzt. Die Aktivatoren könnten daher ein katalytisch effektiver Ersatz für Arg-276 sein^[170]. Li^+ inhibiert die FBP durch Bindung an die Stelle 1. Dies liefert ein Modell zum Verständnis der Rolle von Lithium in der Behandlung der manischen Depression durch Inhibierung der Inositol-Monophosphatase (siehe Abschnitt 2.4.2).

2.4.2. Inositol-Monophosphatase

Die Inositol-Monophosphatase (IMP) katalysiert die Hydrolyse der Inositolmonophosphate Ins(1)P, Ins(3)P und Ins(4)P zu *myo*-Inositol und nimmt so an der Phosphatidylinositol-Signalleitung in der Zelle teil^[179]. Da die IMP aus Menschen von therapeutisch relevanten Konzentrationen an Lithiumionen gehemmt wird (0.5–1.0 mM), hat die mögliche Rolle dieses Enzyms in der Lithiumtherapie der manischen Depression erhebliches Interesse gefunden.

Die IMP ist nur in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen aktiv, obwohl andere zweiwertige Metallionen, wie Mn^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} , ebenfalls die Katalyse unterstützen^[180, 181]. Das kooperative Bindungsverhalten von Mn^{2+} mit einem Hill-Koeffizienten von 1.9 wurde zunächst auf der Grundlage von zwei nichtbenachbarten Metallbindungsstellen in der homodimeren IMP (Molekularmasse 60 kDa) interpretiert^[182, 183]. Basierend auf der Kristallstruktur^[184] und den Ergebnissen von Titrationen^[181] sind diese Resultate nun hinsichtlich einer kooperativen Bindung an zwei benachbarten Metallbindungsstellen innerhalb jedes aktiven Zentrums neu interpretiert worden. Die Tatsache, daß die strukturell homologe Rinder-Inositol-Monophosphatase trotz ihrer monomeren Struktur auch eine kooperative Metallbindung zeigt, unterstützt diese Ansicht^[151, 185]. Die IMP katalysiert den ^{18}O -Austausch zwischen H_2O und Phosphat nur in der Gegenwart von Inositol^[183]. Dies deutet darauf hin, daß die Reaktion nicht über ein Phosphoenzym-Intermediat verläuft. Außerdem sind alle Versuche, ein solches Intermediat zu isolieren, fehlgeschlagen^[183, 186], und die Kristallstrukturen zeigen keine nucleophile Seitenkette, die für einen Angriff auf die Phosphorylgruppe in der geeigneten Position ist^[150].

Mehrere Kristallstrukturen der IMP in Gegenwart verschiedener Metallionen und Substratanaloga sind bestimmt worden, um den Reaktionsweg und die Art der Inhibition durch Lithiumionen zu charakterisieren^[150, 184, 187]. Die Struktur des freien Enzyms in Gegenwart von Manganionen weist drei Metallbindungsstellen auf (siehe Abb. 3)^[184]. Mn1 und Mn2 sind 3.9 Å voneinander entfernt und werden zweizählig durch Asp-90 verbrückt^[45]. Mn2 wird außerdem von Glu-70, Thr-95, dem Sauerstoffatom von Ile-92, einem terminalen Wassermolekül (W1) und einem Chloridion, welches 2.8 Å von allen drei Metallzentren entfernt ist, koordiniert. Weitere Liganden am Mn1 sind Asp-93 und Asp-220. Außer O₁ des Glu-70 und dem Chloridion sind nur drei Wasserliganden in der Koordinationsphäre des Metallions 3 vorhanden. Diese Stelle ist im Produktkomplex mit Phosphat nicht besetzt und ist wahrscheinlich eine

Metallbindungsstelle mit sehr niedriger Affinität, die nicht an der Katalyse beteiligt ist.

Neben der Struktur des freien Enzyms lieferten die Strukturen von Komplexen mit sowohl der D- als auch der L-Form von *myo*-Inositol-1-phosphat^[187] sowie mit dem Produkt, Phosphat^[184], einen detaillierten Einblick in den Katalysemechanismus. Beide Substratmoleküle konnten an ein Enzym gebunden werden, daß durch die Gegenwart von Gd^{3+} - und Li^+ -Ionen im Kristallisationspuffer inaktiviert war. Das Gd^{3+} -Ion bindet an der Stelle 2 und Li^+ wahrscheinlich an der Stelle 1^[188]. Abbildung 21 zeigt den Bindungsmodus des Substrates D-Ins(1)P aus dem Komplex mit dem inaktivierten Enzym zusammen mit der Struktur der aktiven Mn-Mn-IMP, wodurch ein Modell für die katalytisch produktive Substratanbindung erhalten wird^[187]. Die Phosphatgruppe wechselt mit den Metallionen, den NH-Gruppen von Gly-94 und Thr-95 sowie mit zwei Wassermolekülen. Ein Phosphat-Ion bindet derart an die Mn-Mn-IMP, daß die Phosphatgruppe im Vergleich zum Substrat invertiert ist (Abb. 21)^[184]. Solch eine invertierte Bindung des Phosphat-Ions als Produkt kann auch nach dem Angriff eines Wassernucleophils auf die Phosphatgruppe des Substrats aus apicaler Stellung zur Inositol-Abgangsgruppe erwartet werden.

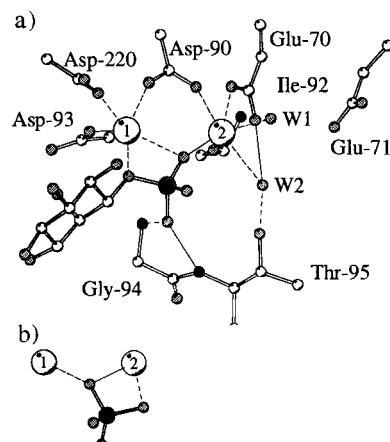


Abb. 21. a) Überlagerung von D-Ins(1)P (aus einer Struktur der Li-Gd-inaktivierten IMP) mit der Struktur des aktiven Mn1-Mn2-Enzyms (Koordinaten aus den Datenfiles 1IMA bzw. 1IMC [184, 321]; das Li^+ -Ion befindet sich im aktiven Enzym an Stelle 1, das Gd^{3+} -Ion an Stelle 2). Das Wassermolekül W2 ist vermutlich das Metallion-koordinierte Nucleophil im Mechanismus der Reaktion mit IMP [184]. b) Bindung eines Phosphat-Ions an Mn1-Mn2-IMP.

Die Vielzahl an biochemischen und strukturellen Daten, die zur Katalyse durch die IMP verfügbar sind, wurde als konsistent mit einem direkten Austauschmechanismus interpretiert, in dem W2, das am Metallion 2 koordinierte Wassermolekül, das Nucleophil ist^[179, 181]. Dieses Wassermolekül wird zudem durch Wasserstoffbrücken zu Glu-70 und Thr-95 stabilisiert. Die Bedeutung von Thr-95 für die Katalyse wurde durch die Mutation dieses Restes zu einem Alanin demonstriert, wodurch die Enzymaktivität um den Faktor 14000 reduziert wurde^[189]. Auch die Mutation von Glu-70 zu Glutamin, wodurch die Metallbindungsähnlichkeit des Enzyms nicht beeinflußt werden sollte, resultierte in einer 7000fachen Verminderung der Aktivität. Das Metallion 1 bindet möglicherweise erst nach dem Substrat, da einige Ligandatome zum Substrat gehören: die zwei Phos-

phat-Sauerstoffatome und Modeling-Studien zum Mechanismus^[181] zufolge die 6-Hydroxygruppe des Inositzols. Die Bedeutung der 6-Hydroxygruppe des Substrats für den Mechanismus zeigt sich auch daran, daß 6-Desoxyinositol-1-phosphat durch die IMP nicht gespalten wird^[190]. Die Stabilisierung des Übergangszustands könnte durch die Wechselwirkung der äquatorialen Phosphoryl-Sauerstoffatome mit beiden Metallionen und mit den NH-Gruppen von Gly-94 und Thr-95 erreicht werden. Die Freisetzung der Abgangsgruppe könnte durch die Koordination des veresterten Sauerstoffatoms der Phosphatgruppe zum Metallion 1 erleichtert werden.

2.4.3. Inositolpolyphosphat-1-phosphatase

Die Inositolpolyphosphat-1-phosphatase (IPP) ist ein weiteres Enzym des Phosphatidylinositol-Signalwegs^[191], welches die 1-Phosphatgruppe von Inositol-1,4-diphosphat und Inositol-1,3,4-triphosphat abspaltet^[192, 193]. Die IPP benötigt Mg^{2+} -Ionen zur Aktivität und wird durch Lithium- und Calciumionen inhibiert^[185, 192]. Die Bindung von Magnesiumionen zeigt eine Kooperativität mit einem Hill-Koeffizienten von 1.9. Dies deutet auf die Gegenwart von zwei oder mehreren Bindungsstellen für Mg^{2+} -Ionen hin.

Die Kristallstrukturanalyse der Rinder-IPP zeigte bei einer Auflösung von 2.3 Å in der Gegenwart von Magnesiumionen zwei Metallbindungsstellen im Abstand von 3.9 Å^[151]. Beide Metallionen sind ungewöhnlich koordiniert, und die Metall-Ligand-Abstände sind sehr groß (siehe Abb. 3). Nur zwei Liganden sind weniger als 3 Å vom koordinierten Metall entfernt. Definiert man großzügig eine Ligandsphäre von 4 Å um die Metallionen, sind beide Magnesiumionen von sechs Liganden verzerrt oktaedrisch umgeben. Wie auch bei der IMP ergab die Strukturanalyse des mit Gd^{3+} -Ionen komplexierten Enzyms, daß sich die Gadoliniumionen an der Stelle 1 befindet. Die Hydroxygruppe des Thr-158, das zwischen den Phosphatasen dieser Gruppe stark konserviert ist, bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Wassermolekül nahe den beiden Mg^{2+} -Ionen sowie auch zu der benachbarten Seitenkette von Lys-37. Durch Mutationen konnte gezeigt werden, daß beide Reste für die katalytische Aktivität notwendig sind^[194].

2.4.4. Vergleich der aktiven Zentren von FBP, IMP und IPP

Eine Überlagerung der aktiven Zentren von FBP, IMP und IPP auf der Grundlage der C_α -Koordinaten der fünf konservierten koordinierenden Liganden (siehe Abb. 17) und der zwei Metallionen zeigt, daß diese Reste mit Abweichungen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) von 0.7–0.8 Å zur Deckung kommen (Abb. 22)^[195]. Somit sind in dieser Familie die Abweichungen in den Positionen der konservierten Seitenketten und der Metallionen größer als die der konservierten Reste in der PAP und den PPs (siehe Abb. 11). Jedoch weisen die meisten dieser Reste ähnliche Konformationen auf und koordinieren die Metallionen in ähnlicher Weise. Glu-280 hat eine andere Konformation in der FBP als die homologen Reste in der IMP und der IPP. Obwohl die Liganden in den drei Proteinen ähnlich angeordnet sind, führt eine Verschiebung der Liganden und Metallionen zu einigen ungewöhnlich langen Metall-Ligand-Abständen in der IPP. Glu-98 in der FBP, welches als allgemeine Base

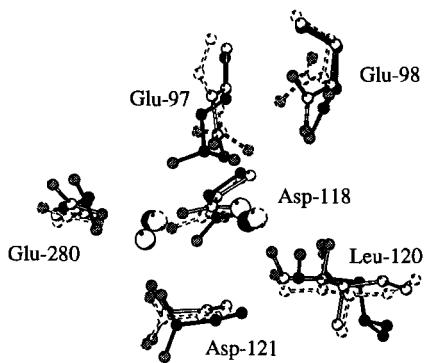


Abb. 22. Überlagerung der aktiven Zentren der FBP (Kohlenstoffatome in schwarz), der IMP (Kohlenstoffatome in weiß) und der IPP (unterbrochene Linien) [195]. Die Beschriftungen beziehen sich auf die Reste in der FBP.

fungieren soll, und die homologen Glutamat-Seitenketten in der IMP und der IPP befinden sich an ähnlichen Positionen.

Für die FBP und die IMP konnten Modelle für die Substratbindung von den Kristallstrukturen mit gebundenen Substratanaloga bzw. mit am inaktivierten Enzym gebundenen Substrat abgeleitet werden (Abb. 19 und 21). Diese Untersuchungen deuten auf einen unterschiedlichen Bindungsmodus des Substrates an beiden Enzymen hin: in der FBP bindet die Phosphorylgruppe zweizähnig über zwei nichtveresterte Sauerstoffatome, während in der IMP ein Metallion mit dem veresterten Sauerstoffatom der Abgangsgruppe in Wechselwirkung tritt, ähnlich einem der Austauschschritte in der AP. Trotz der deutlichen strukturellen Homologie der aktiven Zentren und der Ähnlichkeit der katalysierten Reaktionen könnten die zwei Enzyme daher unterschiedliche Mechanismen aufweisen.

2.5. Die trinuclearen Zink-Phosphodiesterasen PLC und P1

Obwohl die Phospholipase C aus *Bacillus cereus* (PLC) und die Nuclease P1 aus *Penicillium citrinum* (P1) nur geringe, in den Zink-bindenden Regionen lokalisierte Sequenzhomologien aufweisen, ist die Struktur der P1^[196] der der zuvor charakterisierten Phospholipase C^[197] hinsichtlich der Faltung und des Aufbaus des aktiven Zentrums ähnlich. Mit 145 C_a-Atomen können die zwei Strukturen mit einer Abweichung von 1.8 Å (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) überlagert werden^[196]. Die Sequenzhomologie beträgt in den überlagerten Bereichen 18%. Die Anordnung der Zinkionen und ihre Koordinationsphäre ist einschließlich der Lage der drei Wassermoleküle sehr ähnlich, und alle Liganden sind mit Ausnahme von Asp-153, das dem Glu-146 in der PLC analog ist, konserviert (siehe Abb. 3).

2.5.1. Phospholipase C

Die Phospholipase C (PLC) hydrolysiert Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin und ist an der Bildung von Sekundärbotenstoffen in Säugetierzellen beteiligt. Die monomeren, 28 kDa schweren PLC aus *Bacillus cereus*^[198] ähnelt den Säugetierenzymen, so daß sie als Modell für diese bislang weniger charakterisierten PLCs dient^[199]. Der Bestimmung des Metall-

gehaltes sowie der Entfernung und dem Austausch der Metallionen zufolge handelt es sich bei der PLC aus *B. cereus* um ein Zinkenzym mit zwei fest gebundenen Zinkionen pro Molekül^[200]. Ein drittes konnte bei der Röntgenstrukturanalyse (Auflösung 1.5 Å) der PLC lokalisiert werden^[197]. Die Zinkionen können gegen Cobalt-, Mangan- und Magnesiumionen ausgetauscht werden, die erhaltenen Enzyme sind aber weniger aktiv und weisen eine veränderte Substratspezifität auf^[200, 201]. Spektroskopische Untersuchungen deuten darauf hin, daß im Cobalt(II)-substituierten Enzym zwei Metallionen in einer verzerrt oktaedrischen Umgebung vorhanden sind^[202]. In der röntgenographisch bestimmten Struktur des nativen Enzyms haben jedoch alle drei Zinkionen eine verzerrte trigonal-bipyramidal Umgebung (Abschnitt 2.1)^[197]. Die drei Metallionen liegen mit Abständen von 3.3 (Zn1-Zn3), 6.0 (Zn1-Zn2) und 4.7 Å (Zn2-Zn3) relativ nahe zusammen. Zn1 und Zn3 werden zweizähnig von Asp-122 und von einem Wassermolekül (W1) verbrückt. Zn1 wird weiterhin von His-69, His-118 und Asp-55 koordiniert. Die Ligandsphäre von Zn3 wird von His-14 sowie dem Carbonyl-Sauerstoffatom und der terminalen Aminogruppe von Trp-1 vervollständigt. Zn2 wird von His-142, His-128, Glu-146 und zwei Wassermolekülen (W2 und W3) koordiniert.

Neben der Struktur des nativen Enzyms wurden die der Komplexe mit einem Phospholipid als Substratanalogon, mit Phosphat, mit Iodat, mit Iodid und mit Tris bestimmt^[203–205]. In der Phosphorylgruppe des nichthydrolysierbaren Substratanalogen Inhibitors^[206] ist eines der veresterten Sauerstoffatome der Phosphatgruppe des Substrats durch eine Methylenegruppe ersetzt. Dieses Analogon bindet so, daß eines der freien Phosphoryl-Sauerstoffatome Zn1 und Zn3 verbrückt, während das andere Phosphoryl-Sauerstoffatom an Zn2 koordiniert (Abb. 23)^[203]. Alle drei Wasserliganden des Metallzentrums werden beim Binden des Inhibitors verdrängt, da die Elektronendichtekarten bei 1.9 Å Auflösung keine Hinweise auf Zinkkoordinierte Wassermoleküle enthielten. Es wurde daher vorge-

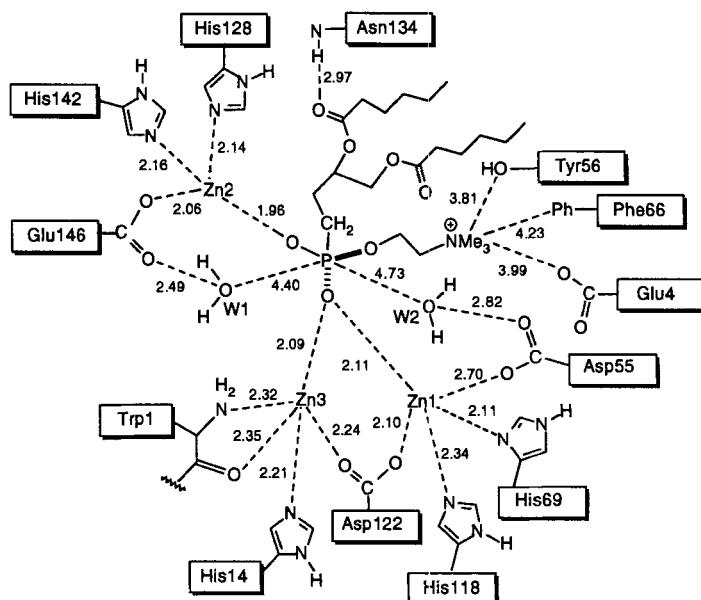


Abb. 23. Schematische Darstellung des Bindungsmodus des substratanalogen Inhibitors 3(S),4-Dihexanoyloxybutyl-1-phosphorylcholin am aktiven Zentrum der Phospholipase C (aus Lit. [206], angegeben sind die Atomabstände [Å]). Die Bezeichnung der Wassermoleküle W1 und W2 entspricht nicht der in Abb. 3.

schlagen, daß das Nucleophil nicht durch Koordination zu einem der Zinkionen erzeugt wird. Ein Wassermolekül, das im Abstand von 4.4 Å zum Phosphoratom und in einer apicalen Position zur Diacylglycerol-Abgangsgruppe positioniert ist, könnte als Nucleophil fungieren. Dieses Wassermolekül bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Carboxylat-Sauerstoffatom des Zn2-koordinierten Glu-146, für das eine Funktion als allgemeine Base vorgeschlagen wurde. Alle drei Zinkionen spielen wahrscheinlich eine Rolle in der Stabilisierung des Übergangszustands. In diesem Mechanismus wirken die Zinkionen nicht an der Erzeugung des Nucleophils mit, jedoch möglicherweise an der Aktivierung der Abgangsgruppe. Es sind keine Seitenketten des Proteins in der für eine Protonierung der Diacylglycerol-Abgangsgruppe oder für die Wechselwirkung mit den Phosphoryl-Sauerstoffatomen geeigneten Position, abgesehen von den Metallion-koordinierten Seitenketten Asp-55 und Glu-146. Somit spielen offensichtlich alle drei Metallionen eine dominierende Rolle in der Katalyse der PLC. Eine rechnergestützte Auswertung der Bindungsenergie des Substrats, in verschiedenen Konformationen am aktiven Zentrum gebunden, ergab einen alternativen Vorschlag für den Bindungsmodus des Substrats^[207]. Hiernach bindet das Substrat an Zn2, und das Nucleophil ist das Zn1-Zn3-verbrückende Wassermolekül. Dies deutet darauf hin, daß der Bindungsmodus des Substrat-analogen Inhibitors (Abb. 23) möglicherweise kein Modell für die katalytisch produktive Substratanbindung ist. Phosphat-Ionen binden ähnlich wie die Phosphonylgruppe des Substratanaologons an allen drei Zinkionen^[204].

2.5.2. Nuclease P1

Die Nuclease P1 (P1) ist eine Phosphodiesterase, die die Bindung zwischen der 3'-Hydroxy- und der 5'-Phosphatgruppe von vorzugsweise einzelsträngiger RNA und DNA unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom spaltet^[208]. P1 wirkt auch als Phosphomonoesterase an der 3'-terminalen Phosphatgruppe eines (Poly)nucleotids^[209], und liefert somit 5'-Mononucleotide als endgültige Spaltungsprodukte. Beide Funktionen erfordern die Gegenwart von drei Zinkionen pro Molekül und sind recht unspezifisch gegenüber der Nucleotidsequenz^[210]. Die Struktur der monomeren, 36 kDa schweren Nuclease P1 aus *Penicillium citrinum* wurde röntgenographisch bei einer Auflösung von 2.8 Å bestimmt^[196]. Drei Zinkionen, die 3.2 Å (Zn1-Zn3), 5.8 Å (Zn1-Zn2) und 4.7 Å (Zn2-Zn3) voneinander entfernt sind (siehe Abb. 3), wurden im aktiven Zentrum der P1 lokalisiert. Alle drei Zinkionen weisen drei Sauerstoff- und zwei Stickstoffliganden mit trigonal-bipyramidalen Koordinationspolyedern auf.

Um die Art der Substratbindung zu bestimmen, wurde die Strukturanalyse der P1 mit dem gebundenen (R)-Diastereomer des Thiophosphodinucleotids dAP(S)dA, einem vermeintlich nichtspaltbaren Substratanaologon^[211], bei einer Auflösung von 3.0 Å durchgeführt^[196]. Das Nucleotid bindet an zwei Stellen, die ca. 20 Å voneinander entfernt sind. An beiden konnte jedoch

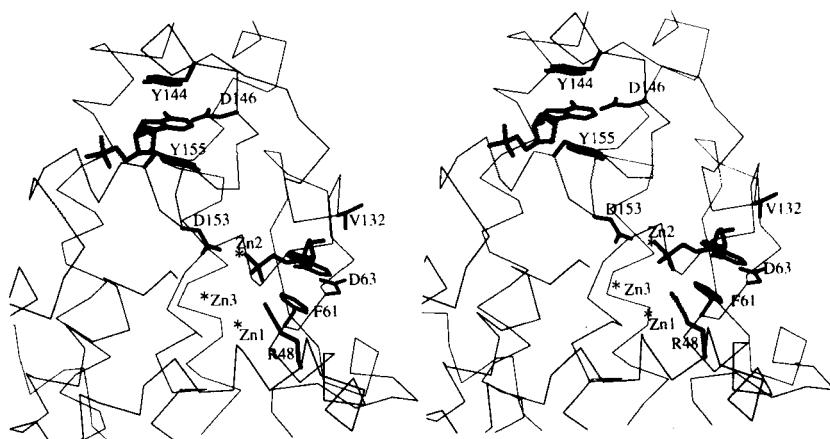


Abb. 24. Stereodarstellung der beiden Mononucleotid-Bindungsstellen der Nuclease P1 (aus Lit. [196]).

nur ein Mononucleotid lokalisiert werden; die zweite Hälfte des Dinucleotids ist entweder ungeordnet oder wurde vom Enzym abgespalten (Abb. 24)^[212]. Die Phosphatgruppe des Mononucleotids koordiniert an Zn2 und hat keine Kontakte zu den anderen zwei Zinkionen. Arg-48 zeigt eine Wasserstoffbrücke zu einem oder zwei Phosphat-Sauerstoffatomen. Verglichen mit dem auf der Grundlage der PLC-Inhibitorstrukturen angenommenen Bindungsmodus des Substrates^[203, 204] bindet in der P1 die Phosphatgruppe des Mononucleotids auf eine andere Weise. Daher diskutieren die Autoren einen anderen Reaktionsmechanismus für die P1, in dem eines der zwei Zn2-koordinierten Wassermoleküle das Nucleophil ist^[196]. Neuere Resultate deuten jedoch darauf hin, daß das Wassermolekül, welches Zn1 und Zn3 verbrückt, als Nucleophil fungiert^[212]. Dieser Mechanismus würde dem ähneln, der auf der Grundlage von Modeling-Untersuchungen für die PLC vorgeschlagen wurde^[207]. Arg-48 und Zn2 stabilisieren offensichtlich den Übergangszustand und/oder aktivieren die Abgangsgruppe.

Die Sequenz der Nuclease P1 ist zu 50 % mit der der Nuclease S1 aus *Aspergillus oryzae* identisch. Die Nuclease S1 benötigt ebenfalls drei Zinkionen zur Aktivität^[213], und die Nuclease-Aktivität invertiert die Konfiguration am Phosphoratom^[214]. Die Phosphatesterhydrolyse könnte daher an beiden Nucleasen nach ähnlichen Mechanismen verlaufen.

2.6. Die anorganische Pyrophosphatase und das *MutT*-Enzym

Die Spaltung von Pyrophosphat verschiebt das Gleichgewicht mehrerer, hauptsächlich ATP-abhängiger, biosynthetischer Reaktionen, z. B. der DNA- und der RNA-Synthese, auf die Produktseite. Diese Hydrolyse wird in Gegenwart zweiwertiger Metallionen von der anorganischen Pyrophosphatase (IPY) katalysiert^[215]. Die höchste Aktivität wird mit Mg^{2+} -Ionen erreicht, aber Mn^{2+} -, Zn^{2+} - und Co^{2+} -Ionen fördern die Katalyse ebenfalls.^[216] Am intensivsten untersucht wurden die IPYs aus *E. coli* und Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*. Kristallstrukturen des homohexameren Enzyms aus *E. coli*^[217–219], der homodimeren IPY aus Hefe^[220] und der homohexameren IPY aus *Thermus thermophilus*^[221] liegen vor. Die Strukturen der homologen Monomere aller drei IPYs zeigen eine große Ähnlichkeit.

lichkeit (siehe Lit.^[219] für eine Überlagerung)^[222]. Weiterhin sind die katalytischen Mechanismen der Enzyme aus *E. coli* und Hefe offenbar sehr ähnlich.

Die Inversion der Konfiguration am Phosphoratom deutet auf einen direkten Phosphoryltransfer zum Wassermolekül hin, wobei das erste vom Enzym freigesetzte Phosphat das Sauerstoffatom aus dem Lösungsmittel enthält^[223]. Untersuchungen an der IPY aus *E. coli* zeigten, daß in Abhängigkeit vom Protierungszustand des Enzyms 3 bis 5 Mg²⁺-Ionen an der Reaktion beteiligt sind^[224]. IPY aus Hefe bindet zwei Mn²⁺-Ionen pro Untereinheit im freien Enzym und drei Mn²⁺-Ionen in Gegenwart von Phosphat^[225]. Die Mutationsanalyse von Resten des aktiven Zentrums des Enzyms aus *E. coli* zeigte, daß diese Mutationen die Aktivität durch Erhöhung des pK_a -Wertes einer katalytisch wichtigen basischen Gruppe beeinflussen^[226]. Bei dieser Gruppe handelt es sich wahrscheinlich um ein Metallgebundenes Hydroxidion-Nucleophil.

In der Kristallstruktur der IPY aus Hefe mit drei Mn²⁺-Ionen und zwei Phosphat-Ionen (P1 und P2) haben die Metallionen folgende Umgebung. M1 wird von Glu-58 sowie von einem Sauerstoffatom von P2 koordiniert; Asp-116, Asp-119, Glu-48 und P2 koordinieren M2, und M3 ist von Asp-114, Asp-151, je einem Sauerstoffatom von P1 und P2 sowie einem Wassermolekül umgeben^[220]. M2 und M3 sind 3.5 Å voneinander entfernt, während M1 einen Abstand von 4.2 Å und 5.3 Å zu M2 bzw. M3 aufweist. Drei positiv geladene Seitenketten, Lys-56, Lys-153 und Arg-77, befinden sich nahe den zwei Phosphatgruppen und könnten zur Substratbindung und Stabilisierung des Übergangszustands beitragen.

Das *MutT*-Enzym, eine Pyrophosphohydrolase von 129 Resten, die die Hydrolyse von Nucleosidtriphosphaten zu Nucleosidmonophosphaten und Pyrophosphat katalysiert, ähnelt IPY hinsichtlich des Reaktionstyps. Die NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur des *MutT*-Proteins, das zweiwertige Kationen zur Aktivität benötigt^[227], enthält einen Cluster von fünf Glutamatresten (41, 53, 56, 57 und 98), die ein oder beide Metallionen binden könnten^[228]. Detailliertere Informationen über die Metallbindungsstellen sind gegenwärtig noch nicht verfügbar. *MutT* und IPY haben eine ähnliche $\alpha + \beta$ -Faltung, obwohl sie keine signifikante Sequenzhomologie zeigen.

2.7. (S)-Adenosylmethionin-Synthetase

Die (S)-Adenosylmethionin-Synthetase (AMS) katalysiert die Bildung der Sulfonverbindung (S)-Adenosylmethionin (AdoMet), die als bedeutendes Methylierungsreagens in biologischen Systemen fungiert, aus L-Methionin und ATP (Abb. 25)^[229]. Diese Synthese verläuft über einen einzigartigen, zweistufigen Prozeß: Im ersten Schritt wird die gesamte Tripolyphosphatkette von ATP durch Methionin ersetzt, unter Erhalt von AdoMet und Tripolyphosphat (PPP). Durch kinetische Isotopeneffekte wurde dieser Schritt als eine S_N2-artige Reaktion unter Angriff des Schwefelnucleophils auf das C5'-Atom von ATP charakterisiert. In einem zweiten Schritt wird Tripolyphosphat zu Pyrophosphat (PP_i) und Phosphat (P_i) hydrolysiert, bevor AdoMet das aktive Zentrum als erstes verläßt^[230].

Zweiwertige Metallionen (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ oder Ni²⁺) sind für die Aktivität der AMS notwendig^[231]. Da Vana-

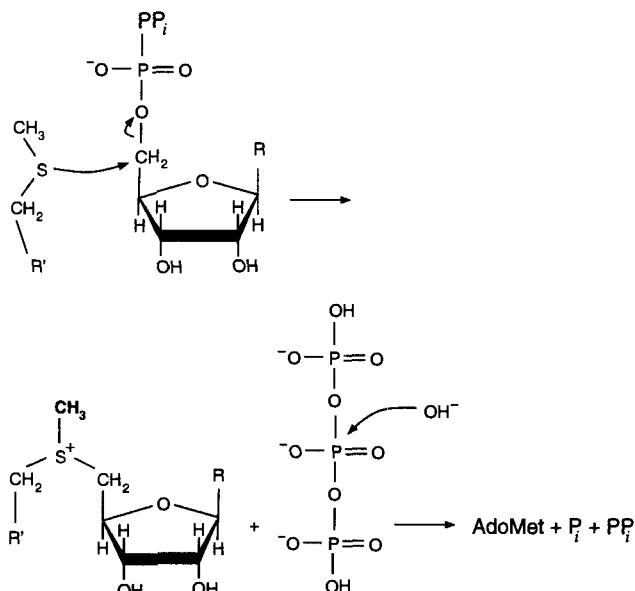


Abb. 25. Die durch die (S)-Adenosylmethionin-Synthetase katalysierte zweistufige Reaktion. R' bezeichnet den nicht dargestellten Teil von Methionin, und R ist die Adenylygruppe von ATP.

dylkationen (VO²⁺) an denselben Stellen binden, konnten sie als spektroskopische Sonden genutzt werden^[232]. Weiterhin wurde an mit Mn²⁺-Ionen komplexierter AMS eine räumliche Nachbarschaft der zwei Bindungsstellen durch EPR-Spektroskopie nachgewiesen^[233]. Einwertige Kationen (hauptsächlich K⁺) aktivieren die AMS ebenfalls. ²⁰⁵Tl-NMR-Spektren zufolge wird der Bindungszustand von gebundenen Tl⁺-Ionen nicht von Methionin, einem ATP-Analogon oder Pyrophosphat beeinflußt. Dies läßt vermuten, daß Substrate und Produkte nicht an diesem einwertigen Aktivator koordinieren^[234]. Auf die Bindung von zwei Phosphat-Ionen am Dimetallzentrum deutete das Inhibierungsprofil dieses Produkts hin^[230].

In guter Übereinstimmung damit wurden in der Struktur der in Gegenwart von Mg²⁺-, K⁺- und Phosphat-Ionen kristallisierten AMS bei 3.0 Å Auflösung ein Kaliumion und zwei 5 Å voneinander entfernte Magnesiumionen im aktiven Zentrum lokalisiert^[235]. Die zweiwertigen Metallionen werden von zwei Phosphat-Ionen verbrückt, so daß jedes Metallion von zwei Sauerstoffatomen eines Phosphats und von einem Sauerstoffatom des anderen Phosphats koordiniert ist. Weiterhin wurden Kristallstrukturen des Enzyms mit ADP und Phosphat sowie mit Pyrophosphat und Phosphat in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen bestimmt^[236]. In allen Fällen enthalten die aktiven Zentren zwei Mg²⁺-Ionen. ADP und Phosphat, Produkte der AMS-katalysierten Spaltung von ATP, binden so, daß alle drei Phosphatgruppen die zwei Metallionen zweizählig verbrücken (Abb. 26). Weitere Liganden sind Asp-A271 an Mg1 und Asp-B16 an Mg2 (A und B beziehen sich auf unterschiedliche Untereinheiten des Homotetramers). Die positiv geladenen Seitenketten von His-B14, Lys-B165, Lys-A265, Arg-B244 und Lys-B245 wechselwirken mit den Produkten und könnten somit bedeutenden katalytischen Einfluß haben.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten klar auf einen Zwei-Metallionen-Mechanismus für einen oder beide Schritte des Reak-

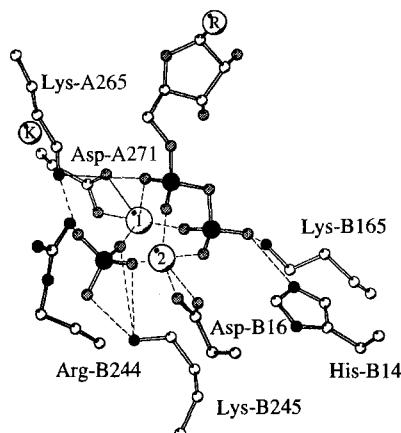


Abb. 26. Struktur von ADP und Phosphat, gebunden an das aktive Zentrum der (S)-Adenosylmethionin-Synthetase [236]. R bezeichnet die Adenylgruppe von ADP.

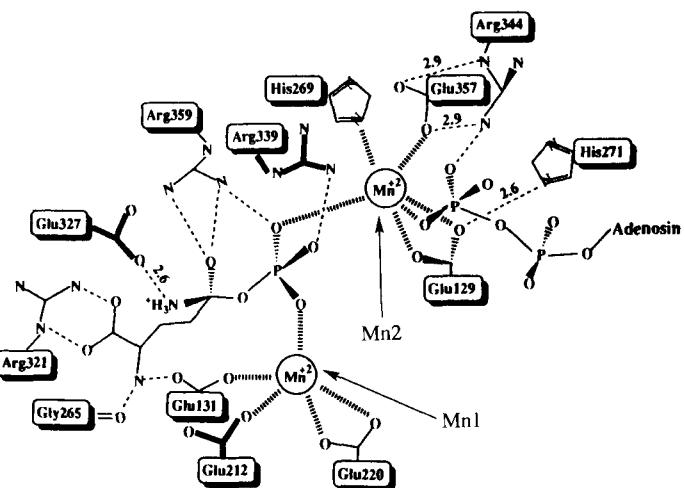
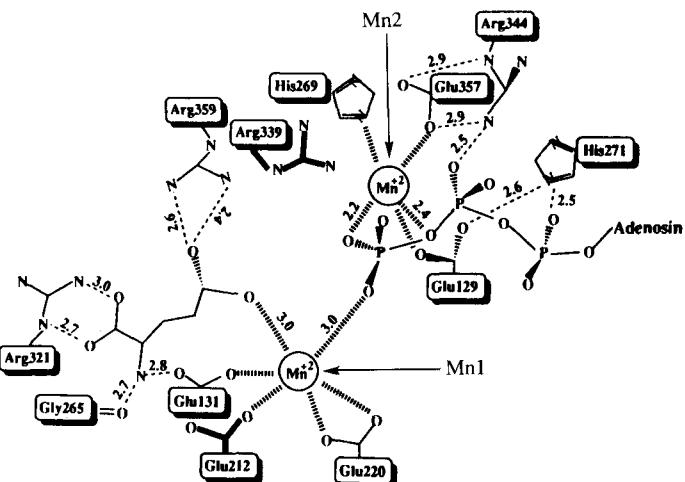


Abb. 28. Strukturmodelle für den Phosphoryltransferschritt bei der Katalyse durch Glutamin-Synthetase (aus Lit. [240]).

His-269, Glu-357 und Glu-129 als Proteinliganden aufweist (Abb. 28, oben). Die zwei Metallionen sind in Übereinstimmung mit spektroskopischen Ergebnissen^[241] 5.8 Å voneinander entfernt. Mn2 aktiviert auch die Abgangsgruppe AMP. Nachdem die Phosphorylgruppe auf die Carboxylatgruppe des Substrats übertragen wurde, greift ein Ammonium an das Carboxylat-Kohlenstoffatom an, und das tetraedrische Intermediat wird gebildet (Abb. 28, unten). Im letzten Schritt tritt die Phosphatgruppe durch Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung aus. Arg-339 und Arg-359 könnten den Übergangszustand der Phosphoryltransferreaktion stabilisieren. Mutationen von jedem der beiden Argininreste vermindern deutlich die katalytische Aktivität^[242]. Interessanterweise katalysiert die GLS auch die Arsenolyse von Glutamin, wahrscheinlich über einen Mechanismus, in dem Phosphat durch Arsenat ersetzt ist, unter Umkehr der Synthese von Glutamin.

2.9. Phosphotriesterase

Organophosphotriester sind keine natürlich vorkommenden Verbindungen, aber sie werden durch Gebrauch als Pestizide und Insektizide jährlich im Maßstab von Millionen von Kilogramm in die Natur freigesetzt. Auch sind mehrere Nervengase,

tionsweges der AMS hin. Ein möglicher Mechanismus für den zweiten Schritt, die Hydrolyse von Triphosphat, sieht eine Rolle von Lys-265 in der Protonierung des α - β -verbrückenden Sauerstoffatoms und in der nachfolgenden Deprotonierung des Wasser-nucleophils vor^[236]. Weitere biochemische und strukturelle Untersuchungen sind jedoch notwendig, um Details der ungewöhnlichen zweistufigen Katalyse dieses Enzyms aufzuklären.

2.8. Glutamin-Synthetase

Die Glutamin-Synthetase (GLS) katalysiert die Synthese von Glutamin aus Ammoniak, Glutamat und ATP (Abb. 27). Die Reaktion verläuft über ein Enzym-gebundenes tetraedrisches

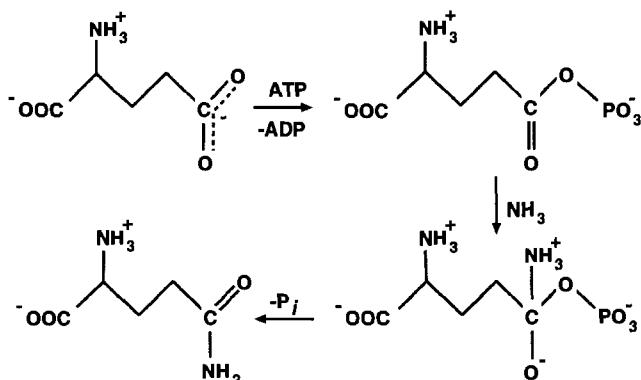


Abb. 27. Die durch die Glutamin-Synthetase katalysierte Reaktion.

Intermediat^[237]. Zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+}) sind für die Aktivität notwendig^[238]. Röntgenstrukturanalysen der nativen GLS aus *Salmonella typhimurium* und von Komplexen mit Verbindungen, die zum Substrat, zum Produkt oder zum Intermediat analog sind, einschließlich dem vom Enzym phosphorylierten L-Methionin-S-sulfoximin, ergaben Strukturmodelle für mehrere Stadien des Reaktionsweges (Abb. 28)^[239, 240].

Mn1, das von drei Glutamatresten (131, 212 und 220) koordiniert wird, bindet die nucleophile Carboxylatgruppe des Substrats Glutamat. Die γ -Phosphorylgruppe von ATP wird von beiden Metallionen polarisiert, jedoch stärker von Mn2, das

die als chemische Kampfstoffe gelagert werden, Verbindungen dieser Art. Die Resistenz einiger Insekten gegenüber Insektiziden und der Abbau von Pestiziden durch Bodenmikroben führte zur Entdeckung der Phosphotriesterasen, die die Hydrolyse von vielen Organophosphotriestern katalysieren^[243–245]. Das Enzym aus dem Bodenbakterium *Pseudomonas diminuta* ist die bei weitem am besten charakterisierte Phosphotriesterase (PTE). Es ist ein monomeres, 39 kDa schweres Metalloprotein, das eine ziemlich breite Substratspezifität aufweist und P-O, P-F, P-CN sowie P-S Bindungen zwischen dem Phosphorzentrum und der Abgangsgruppe hydrolysiert^[244, 246]. Phosphomonoester und Phosphodiester werden von der PTE jedoch nicht gespalten^[247]. Obwohl die PTE mit Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ oder Mn²⁺ ähnliche Aktivitäten aufweist, deuten ihre Bindungsaffinität für Metallionen und Atomabsorptionsmessungen am nativen Enzym auf ein dinucleares Zinkenzym in vivo hin^[244, 248]. Die Umgebung der Metallionen wurde EPR-^[249] und ¹¹³Cd-NMR-spektroskopisch^[250] als eine gemischte N,O-Ligandensphäre mit einem oder mehreren, die zwei Metallionen verbrückenden Liganden charakterisiert. Einige dieser Liganden sowie andere Reste des aktiven Zentrums wurden durch Histidin-modifizierende Verbindungen und durch Mutagenese als Histidinreste identifiziert^[251, 252].

Die Hydrolyse von Phosphotriestern durch die PTE findet unter Inversion der Konfiguration am Phosphoratom statt, im Einklang mit einem S_N2-artigen Austausch^[253]. Die pH-Abhängigkeit der Aktivität deutet darauf hin, daß ein ionisierbarer Rest mit $pK_a = 6.1$ bei der Katalyse eine Rolle spielt^[251]. Brønsted-Auftragungen des Einflusses des pK_a -Wertes der Abgangsgruppe auf die Geschwindigkeitskonstanten, die β_{lg} -Werte um -1.8 ergaben^[254], sowie primäre und sekundäre ¹⁸O-Isotopeneffekte^[255] deuten auf eine größtenteils gespaltene Bindung zur Abgangsgruppe im Übergangszustand hin (sehr später Übergangszustand). Obwohl die PTE-katalysierte Reaktion somit nicht in dem Maße assoziativ ist wie die alkalische Hydrolyse in Lösung, wurden diese Daten als übereinstimmend mit einem S_N2-artigen konzertierten assoziativen Mechanismus sowohl bei enzymatischer als auch bei nichtenzymatischer Hydrolyse von Phosphotriestern interpretiert.

Die beiden Cadmiumionen in der Cd-Cd-Form^[257] der PTE sind 3.8 Å voneinander entfernt und befinden sich am C-Terminus der β -Stränge der α/β -Faßstruktur. Beide werden von der carbamylierten Seitenkette von Lys-169 und von einem Wassermolekül verbrückt (siehe Abb. 3). In der Struktur des Apoenzyms^[256] ist Lys-169 nicht carbamyliert. Es wurde daraufhin gezeigt, daß CO₂ für den Zusammenbau des Dimetallzentrums notwendig ist^[258]. Eine carbamylierte Lysin-Seitenkette ist auch Ligand des Magnesiumions in der Ribulose-1,5-diphosphat-Carboxylase^[259] und zweizählig verbrückender Ligand der zwei Nickelionen der Urease^[260]. Die Koordination von Cd1 wird von His-55, His-57 und Asp-301 zu einer verzerrten trigonalen Bipyramide ergänzt, während Cd2 noch von His-201, His-230 und zwei terminalen Wassermolekülen koordiniert ist. Interessanterweise führt der Zusammenbau des dinuclearen Zentrums in der PTE auch zu drastischen Veränderungen im Verlauf der Polypeptidkette in einigen Regionen; daraus ergeben sich Abweichungen (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) von 3.4 Å für die Überlagerung der C_α-Atome des Apoenzyms und des Holoenzymes.

3. Acyl- und andere Carbonyltransferreaktionen

Carbonyltransferreaktionen zeigen mit der Chemie des Phosphoryltransfers viele Gemeinsamkeiten. Prinzipiell sind auch hier ein assoziativer Mechanismus über ein *gem*-Diolat-Intermediate und ein dissoziativer Reaktionsweg über ein Acylumion (RCO⁺), das als Intermediate im Mechanismus der Friedel-Crafts-Acylierung angenommen wird^[261], möglich^[262]. Wegen der Polarität und Elektrophilie der Carbonylgruppe dominiert jedoch die nucleophile Substitution über einen tetraedrischen Übergangszustand bzw. ein tetraedrisches Intermediate die enzymatischen und nichtenzymatischen Reaktionen dieser Gruppe. Isotopeneffekte und Struktur-Aktivitätskorrelationen unterstützen einen solchen tetraedrischen Übergangszustand^[13].

3.1. Aminopeptidasen

Aminopeptidasen sind in der Natur weit verbreitet und wegen ihrer Schlüsselrolle in der Modifizierung und im Abbau von Proteinen sowie im Metabolismus biologisch aktiver Peptide von großer biologischer und medizinischer Bedeutung^[263, 264]. Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Aminosäuren vom Aminoterminus eines Peptids und weisen generell eine breite Substratspezifität auf. Die Kristallstrukturen von drei Aminopeptidasen sind bekannt: Leucin-Aminopeptidase, Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* und Methionin-Aminopeptidase. Diese drei Proteine haben keine feststellbare Sequenzhomologie und stellen somit unterschiedliche Prototypen proteolytischer Enzyme dar.

Eine Anzahl von natürlichen und synthetischen Inhibitoren, die dem Substrat oder dem Intermediate analog sind, sind für die Aminopeptidasen charakterisiert worden. Diese Inhibitoren können zur Untersuchung von mechanistischen Aspekten der hydrolytischen Reaktion durch biochemische und strukturelle Methoden genutzt werden. Als Beispiele seien hier Bestatin und Amastatin^[265, 266], Aminoboronate^[267, 268], Aminophosphate^[269], Aminoaldehyde^[270], Methylketone^[271], Chlormethylketone^[272] und Peptide mit einer Ketomethylgruppe anstelle der Amidbindung^[273] als Übergangszustandsanaloge für eine assoziative Acyltransferreaktion (Abb. 29) genannt. Thionopeptide können als Substratanaloge dienen^[274].

3.1.1. Leucin-Aminopeptidase

Zahlreiche biochemische und strukturelle Untersuchungen machen die Leucin-Aminopeptidase (LAP) zur gegenwärtig am besten charakterisierten Aminopeptidase mit einem dinuclearen Metallzentrum^[275]. Die Rinderaugen-LAP ist ein hexameres Enzym mit einer Molekulargmasse von 324 kDa und zeigt bei pH 8–9 maximale Aktivität. Jede der sechs identischen, 54 kDa schweren Untereinheiten enthält zwei Zinkionen^[276], die für die katalytische Aktivität notwendig sind und eine unterschiedliche Kinetik beim Ionenaustausch aufweisen. Die leicht austauschbare Bindungsstelle 1 bindet Zn²⁺-, Mn²⁺-, Mg²⁺- oder Co²⁺-Ionen^[276–279] in stöchiometrischen Mengen und wurde durch die Strukturbestimmung des Zn²⁺-Mg²⁺-Metallohybrid-Enzyms als Zn1 (aus der Röntgenstrukturanalyse, Abb. 3) identifiziert^[280]. Das fest gebundene Zinkion in der Bindungsstelle 2

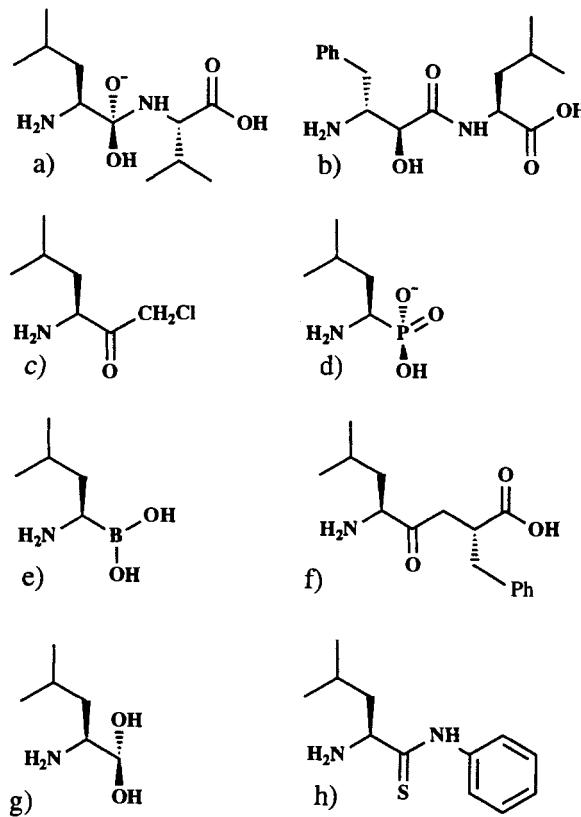


Abb. 29. Struktur des postulierten *gem*-Diol-Intermediats (a) der Hydrolyse von L-Leucyl-L-leucin und einige analoge Inhibitoren der Aminopeptidetasen. Die Inhibitionskonstanten für die LAP aus Schweinenieren sind: b) Bestatin 0.6 nM [265]. c) DL-Leucylchlormethyleketon 12 μ M [323]. d) L-Leucylphosphonsäure 0.23 μ M [324]. e) DL-Leucylboronsäure 20 nM (IC_{50}) [267]. f) L-Leu-CO-CH₂-(DL)Phe 57 μ M [273]. g) L-Leucinal 60 nM [325]. h) L-Leucylthioanilid 0.19 mM [274].

kann nur dann gegen Co^{2+} ausgetauscht werden, wenn beide Bindungsstellen nicht besetzt sind^[278, 279]. Im Gegensatz zu einigen früheren Ergebnissen ist es nun offensichtlich, daß ein Metallaustausch in beiden Bindungsstellen sowohl K_m als auch k_{cat} signifikant beeinflußt^[279]. Somit sind beide Metallatome an der Substratbindung und Aktivierung beteiligt, einschließlich einer möglichen Rolle in der Aktivierung des Nucleophils. Obwohl Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen die LAP hyperaktivieren^[281], wurde gezeigt, daß das Enzym eine signifikant höhere Affinität für Zn^{2+} - als für Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -Ionen aufweist^[277] und daß das isolierte Enzym Zinktionen enthält^[282]. Die Rinder-LAP zeigt 31 % Sequenzidentität zur Aminopeptidase A aus *E. coli*^[283], die als Hilfsprotein in Xer-ortsspezifischer Rekombination in *E. coli* dient. Die Homologie in der katalytischen Domäne beträgt 52 % und alle Reste des aktiven Zentrums sind zwischen der LAP und der Aminopeptidase A konserviert.

Die Kristallstruktur der Rinderaugen-LAP zeigte bei einer Auflösung von 1.6 Å, daß die beiden Zinktionen 3.0 Å voneinander entfernt sind und zweizählig von Glu-334, einzählig von Asp-255 sowie von einem exogenen Wassermolekül oder Hydroxidion verbrückt werden (siehe Abb. 3)^[284-286]. Als weitere Liganden sind das Carboxylat- und das Carbonyl-Sauerstoffatom von Asp-332 am Zn1 und Asp-273 sowie die Aminogruppe von Lys-250 an Zn2 vorhanden. Beide Zinktionen sind somit fünffach koordiniert in einer Anordnung, die am besten als Oktaeder mit einer unbesetzten Position beschrieben wird.

Mit vier Übergangszustandsanaloga wurden Kristallstrukturen der LAP bestimmt: mit den natürlich vorkommenden Inhibitoren Bestatin^[285, 287] und Amastatin^[288], L-Leucylphosphonsäure^[289] und L-Leucinal^[286]. All diese Übergangszustandsanaloga binden ähnlich an das aktive Zentrum der LAP (Abb. 30). Selbst Bestatin, welches eine D-Konfiguration am N-terminalen Phenylalanin aufweist und eine zusätzliche Carbonylgruppe neben der Hydroxygruppe enthält (Abb. 29), unterscheidet sich in seinem Bindungsmodus nur im Fehlen einer vierten Koordination an Zn1. Zusammen ergeben diese Strukturen ein gutes Modell für den Bindungsmodus des Übergangszustands.

In allen diesen Inhibitorstrukturen ist die terminale Aminogruppe an Zn2 koordiniert. Bei der Bindung des Inhibitors vergrößert sich der Zn-Zn-Abstand auf etwa 3.3 Å. Umordnungen in den Ligandensphären der Metallionen finden jedoch nicht statt.

Leucinal ähnelt dem vermuteten tetraedrischen *gem*-Diolat-Intermediat eines assoziativen Acyltransfermechanismus mehr als jeder der anderen Inhibitoren. Die zwei *gem*-Diol-Sauerstoffatome des Hydrats der Aldehydgruppe befinden sich wahrscheinlich auf denselben Positionen wie die zwei *gem*-Diol-Sauerstoffatome des Intermediats (Abb. 30). Eins der Sauerstoffatome verbrückt die beiden Metallionen, während das andere nur an Zn1 koordiniert. Die Bindungsmodi von Bestatin und Amastatin stimmen mit diesem Modell für die Bindung des Intermediats überein, da sie die Abgangsgruppe des Peptids in einer Position enthalten, welche vom Dizink-Zentrum weg zum zentralen Lösungsmittelkanal des LAP-Hexamers zeigt. Im aktiven Zentrum ist kein Proteinerest geeignet positioniert, um als allgemeine Base zu fungieren. Weiterhin zeigte die Kristallstruktur (1.6 Å Auflösung) des ligandfreien Enzyms^[286], daß nur ein exogener Wasserligand am Dizink-Zentrum koordiniert ist: ein Wassermolekül oder Hydroxidion, welches die beiden Metallionen symmetrisch verbrückt (siehe Abb. 3). Die Position dieses Wasserliganden ist identisch mit der Position des verbrückenden Sauerstoffliganden in den Inhibitorstrukturen.

Auf der Grundlage der Kristallstrukturen und der biochemischen Daten wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, in dem das verbrückende Hydroxidion als Nucleophil fungiert (Abb. 31)^[286, 289]. In diesem Mechanismus nehmen beide Metallionen an der Substratbindung und an der Katalyse teil. Zn2 bindet die terminale Aminogruppe, aktiviert das Wassernucleophil und stabilisiert den Übergangszustand. Zn1 polarisiert die Carbonylgruppe, aktiviert das Wassernucleophil und stabilisiert den Übergangszustand durch Koordination zu beiden *gem*-Diolat-Sauerstoffatomen. Zusätzlich spielen wahrscheinlich auch zwei Aminosäurereste eine wichtige Rolle in der Katalyse: Lys-262 in der Polarisierung der Carbonylgruppe und in der Stabilisierung des Übergangszustandes sowie Arg-336, das mit

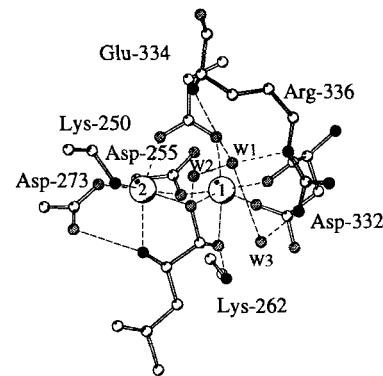


Abb. 30. Bindungsmodus des Inhibitors L-Leucinal am aktiven Zentrum der Leucin-Aminopeptidase (Koordinaten aus Datenfile 1LAN [286]). Die Bindungsstellen 1 und 2 sind mit Zinktionen besetzt.

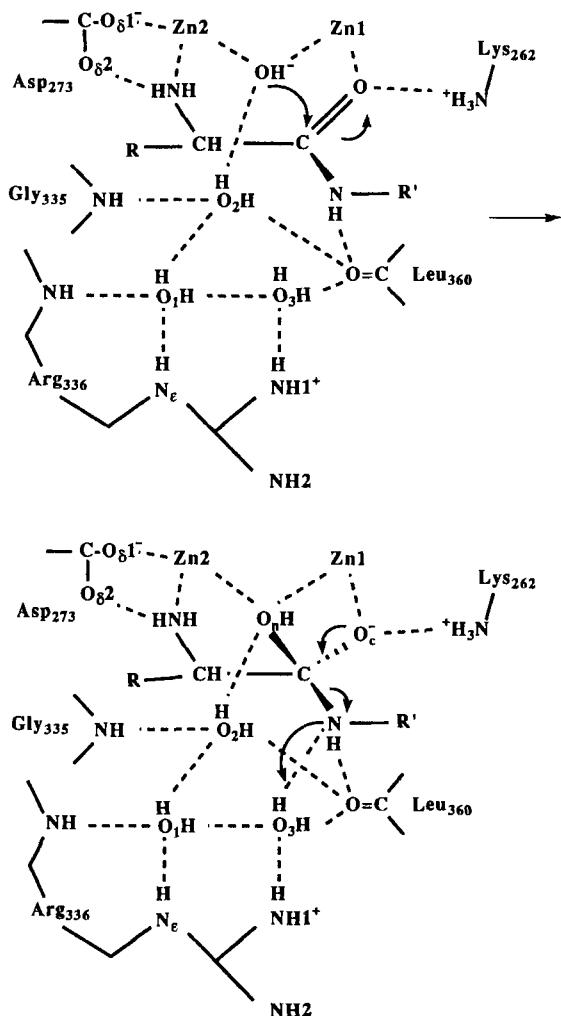


Abb. 31. Auf der Grundlage von Kristallstrukturen und biochemischen Untersuchungen postulierter Reaktionsmechanismus für die Leucin-Aminopeptidase [286].

dem Substrat und Intermediat über drei Wassermoleküle in Wechselwirkung tritt. Diese Wassermoleküle können die Energie des Übergangszustandes durch Wasserstoffsbrücken erniedrigen. Eines dieser Wassermoleküle protoniert wahrscheinlich die Abgangsgruppe (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.4).

3.1.2. Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica*

Im Gegensatz zu den Aminopeptidasen aus Säugetieren ist die Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolytica* (AAP) ein kleines, monomeres, 29.5 kDa schweres Protein^[290]. Aus dem Bakterium isolierte AAP enthält zwei Zinkionen. Ausgehend vom inaktiven Apoenzym können außer Zn^{2+} - auch Co^{2+} - Ni^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen die Aktivität wiederherstellen^[291]. Diese Metall-ausgetauschten Enzymformen sind gegenüber einigen Substraten aktiver als das native Zn-Zn-Enzym. Eine noch höhere Hyperaktivität wird für die gemischten Ni-Zn- und Cu-Zn-Formen der AAP erhalten. Diese hängt wiederum stark von der Art des Substrats und von der Reihenfolge ab, in der die Metallionen zugegeben werden: Die aktiveren Formen wurden durch Zugabe von einem Äquivalent Cu^{2+} - oder Ni^{2+} -Ionen vor Zugabe von Zn^{2+} -Ionen erhalten; dies ist mit dem Vorhandensein von zwei nichtidentischen Metallbindungsstellen vereinbar.

Wie auch in der LAP beeinflussen Substitutionen beider Metallionen sowohl k_{cat} als auch K_m .

In der mit 1.8 Å Auflösung bestimmten Struktur der Zn-Zn-Form von ligandfreier AAP konnten zwei Zinkionen im Abstand von 3.5 Å lokalisiert werden^[292]. Asp-117 (zweizähnig) und ein Wassermolekül verbrücken die beiden Zinkionen, die fünffach koordiniert sind, wenn man die etwas weiter entfernten zweiten Carboxylat-Sauerstoffatome von Glu-152 an Zn1 (2.4 Å) und Asp-179 an Zn2 (2.3 Å) berücksichtigt (siehe Abb. 3). Zusätzlich zu den verbrückenden Liganden wird Zn1 dann von Glu-152 und His-256, Zn2 von His-97 und Asp-179 koordiniert. Ein erstaunliches Merkmal dieses Metallzentrums ist die Ähnlichkeit der Koordinationssphären der beiden Zinkionen. Die Carboxylatgruppe von Glu-151 zeigt zum 3.3 Å entfernten verbrückenden Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung.

3.1.3. Methionin-Aminopeptidase

Die meisten Proteine werden N-terminal beginnend mit Methionin (in Eukaryonten) oder Formylmethionin (in Prokaryonten) synthetisiert. Die Abspaltung der N-terminalen Methioningruppe kann von der Methionin-Aminopeptidase (MAP) katalysiert werden, in Abhängigkeit von der Art des benachbarten Restes. MAPs, die aus mammalen und mikrobiellen Quellen isoliert werden konnten, haben ähnliche Substratspezifitäten und spalten, wenn der vorletzte Rest klein ist^[293, 294]. An aus mehreren Quellen stammenden MAPs wurde nachgewiesen, daß das Enzym, welches zweiwertige Metallionen benötigt, in der Gegenwart von Cobaltionen die maximale Aktivität aufweist. Dennoch muß noch gezeigt werden, ob die MAP auch *in vivo* ein Cobaltenzym ist. Die MAP ist ein lösliches Monomer mit optimaler Aktivität bei neutralem pH. Die MAPs aus Prokaryonten und Hefe weisen eine signifikante Sequenzhomologie auf. Alle Liganden sind konserviert, mit der Ausnahme eines Glutamatrestes, der in der MAP aus Hefe durch ein Glutaminrest ausgetauscht ist. Weiterhin zeigen Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen, daß die Aminopeptidase P^[295], die Proline-Dipeptidase^[296] und p67^[297] eine ähnliche Faltung wie die MAP haben und wahrscheinlich ebenfalls dinukleare Metallzentren enthalten^[298, 299].

Die Kristallstrukturanalyse (Auflösung 2.4 Å)^[300] der MAP^[293] aus *E. coli* zeigte die Gegenwart von zwei Metallionen im Abstand von 2.9 Å. Diese Metallionen befinden sich im Zentrum des zentralen gewundenen antiparallelen β -Faltblatts der gemischten α/β -Struktur. Die Reste Glu-235 und Asp-108 verbrücken die zwei Metallionen zweizähnig (siehe Abb. 3). Weitere Liganden sind Glu-204 und His-171 an Co1 und beide Carboxylat-Sauerstoffatome des Asp-97 an Co2. Somit haben sowohl Co1 als auch Co2 vier Proteinliganden. Die Koordination beider Metallatome kann als oktaedrisch beschrieben werden, wobei eine der unbesetzten Ligandenpositionen sterisch von dem anderen Cobaltion besetzt ist^[300]. Schwache Elektronendichtebereiche deuten darauf hin, daß Wassermoleküle die übrigen zwei Ligandenpositionen (eine an jedem Cobaltion) besetzen könnten. Diese Wasserliganden würden dann mit His-178 oder Thr-99 in Wechselwirkung treten, die somit auch wichtige Funktionen in der Katalyse übernehmen könnten. Alternativ könnte der kurze Abstand zwischen den

beiden Metallionen ein verbrückendes Wassermolekül oder Hydroxidion zulassen.

3.1.4. Vergleich der Strukturen der Aminopeptidasen

Die AAP und die carboxyterminale, katalytische Domäne der LAP sind trotz nur nichtsignifikanter Sequenzhomologie ähnlich gefaltet^[292]. Diese strukturelle Ähnlichkeit erstreckt sich nicht auf den genauen Ort des aktiven Zentrums. Die Metall-Koordinationssphären der zwei Zink-Aminopeptidasen weisen signifikante Unterschiede auf. Auch enthält das aktive Zentrum der AAP keine Seitenkette eines Lysin- oder Argininrestes, um ähnliche Rollen wie die Reste Lys-262 und Arg-336 in der LAP zu übernehmen. Ein gemeinsames Merkmal der AAP und der LAP ist jedoch die Gegenwart eines dinuclearen Metallzentrums, welches einen, die zwei Metallionen verbrückenden Wasserglied enthält. Weiterhin sind beide Metallionen in beiden Strukturen fünffach koordiniert und weisen so eine Koordinationslücke auf. Die zwei aktiven Zentren können auf der Grundlage der Zinkionen und des verbrückenden Wassermoleküls so überlagert werden (nicht gezeigt), daß das schlechter zugängliche Zn2-Zentrum der AAP mit dem schlechter zugänglichen Zn2-Zentrum der LAP zur Deckung kommt, welches den Aminoterminus des Substrates koordiniert. Interessanterweise bringt diese Überlagerung auch die hydrophobe Substratbindungstasche für die N-terminale Seitenkette der LAP mit der angenommenen Bindungstasche für diesen Rest in der AAP zur Deckung. Im einzelnen haben Met-270, Met-454 und Thr-359 in der LAP ähnliche Positionen wie Met-180, Phe-244 und Met-242 in der AAP. Weiterhin befindet sich die Carboxylatgruppe von Glu-151 in der AAP in einer Position, die von Wassermolekülen oder einem Carbonat-Ion nahe Arg-336 in der Struktur von LAP besetzt ist. Es liegen indirekte Hinweise vor, daß zwei dieser Wassermoleküle in der LAP tatsächlich ein H_3O^- -Ion sind, das im aktiven Zentrum der LAP stabilisiert ist und eine chemische Funktion hat. Diese könnte der für Glu-151 in der AAP postulierten Basenfunktion ähneln. Andererseits hat in dieser Überlagerung Lys-262 in der LAP keinen analogen Rest in der AAP, denn die Seitenkette von Ile-255 befindet sich in der AAP an dieser Stelle.

In der MAP haben beide Metallionen ebenfalls vier Proteinliganden, ähnlich der Situation in der AAP und der LAP. Leider erlaubte die kristallographische Auflösung hier keine eindeutige Bestimmung von koordinierten Wassergliedern. Ob die AAP, die LAP und die MAP trotz der ausgeprägten Unterschiede in den Koordinationssphären der Metallionen und in den Strukturen der aktiven Zentren ähnliche Reaktionsmechanismen aufweisen, muß noch gezeigt werden, z. B. durch die Strukturbestimmung von geeigneten Enzym-Inhibitor-Komplexen.

3.2. Urease

Die Urease ist ein Metalloenzym, welches die Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat katalysiert^[301–304]. Dieses Enzym erlaubt es Bakterien, Pilzen und auch höheren Pflanzen, Harnstoff als Stickstoffquelle zu nutzen. 1975 wurde die Urease als erstes Nickelenzym identifiziert^[305], und seitdem wurde Nickel in allen bisher charakterisierten Ureasen nachge-

wiesen. Somit spielt Nickel offensichtlich eine einzigartige Rolle in der Katalyse durch die Urease. Wenn man die Ähnlichkeit der Harnstoffhydrolyse zu anderen Hydrolysen bedenkt, ist es überraschend, daß diese Rolle nicht von anderen, einfacher verfügbaren Ionen, wie Zink-, Cobalt-, Magnesium- oder Eisenionen, übernommen werden kann. Tatsächlich können Zn^{2+} -, Cu^{2+} - und Co^{2+} -Ionen die Aktivität des inaktiven Apoenzyms der Urease aus *Klebsiella aerogenes* nicht wiederherstellen^[306]. Nur das Manganprotein hat 2% der Aktivität des Nickel-aktivierten Apoproteins. Spektroskopische Untersuchungen und Titrationsen mit einem stark bindenden Inhibitor charakterisierten das aktive Zentrum weiterhin als ein dinucleares Nickel-Zentrum^[307, 308]. Die Urease ist auch hinsichtlich der Selektivität im Aufbau des Metallzentrums interessant: mehrere Hilfsproteine, die in Bakterien von benachbarten Genen des Urease-Genclusters kodiert werden^[302, 309], werden in vivo zum Einbau von Nickel in das Apoenzym benötigt. Weiterhin kann die Entdeckung, daß Kohlendioxid für die Bindung von Nickel an die Urease notwendig ist^[310], nun durch die Gegenwart eines carbamylierten Lysinrestes als Ligand zu beiden Metallionen erklärt werden^[260]. Die Bindung von Nickel und die Carbamyllierung dieses Lysinrestes (Lys-217) ist ein synergistischer Prozeß, denn im Apoenzym ist Lys-217 trotz der Gegenwart von CO_2 nicht carbamyliert^[260].

Kristalle der Urease aus Schwerbohnen wurden bereits 1926 von Sumner erhalten^[311]. Es waren die ersten Kristalle eines zu dieser Zeit erkannten Enzyms. Die Kristallisation war ein historischer Meilenstein in der Enzymologie, da sie bewies, daß Enzyme definierte chemische Verbindungen sind. Die Kristallstruktur (2.2 Å Auflösung)^[260] der Urease aus *Klebsiella aerogenes*^[312] zeigt ein fest assoziiertes Trimer der Zusammensetzung $(\alpha\beta\gamma)_3$. Da andere Ureasen eine Sequenzhomologie von etwa 50% zu dem aus *K. aerogenes* isolierten Enzym aufweisen, haben möglicherweise alle bekannten Ureasen eine ähnliche trimere Struktur^[260]. Die zwei Nickelionen sind 3.5 Å voneinander entfernt und werden zweizählig von der carbamylierten Seitenkette von Lys-217 verbrückt (Abb. 3). Weitere Liganden zu den Metallionen sind His-246 und His-272 am Ni1 sowie His-134, His-136, Asp-360 und ein Wassermolekül an Ni2. Somit wird Ni1 von drei Liganden in einer tetraedrischen Geometrie, wobei ein Ligand fehlt, koordiniert. Die Koordinationssphäre um Ni2 kann als verzerrte trigonale Bipyramide beschrieben werden.

Die Seitenketten von His-219, Cys-319 und His-320 umgeben – neben anderen Resten – eine mögliche Bindungstasche für Harnstoff^[260]. Chemische Modifikation und Mutagenesestudien zeigten, daß diese drei Reste die katalytische Effizienz beeinflussen^[313–315]. Hiernach spielt His-219 eine Rolle bei der Substratbindung, während vorgeschlagen wurde, daß His-320 als Protonenacceptor fungiert^[314]. Für die katalytische Aktivität ist Cys-319 nicht essentiell, die Mutation oder Modifikation zu größeren Seitenketten kann die Aktivität jedoch stark reduzieren^[313].

Für die Katalyse der Urease wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, in dem eines der Nickelionen das Hydroxidion-Nucleophil bindet und das andere Nickelion die Carbonylgruppe des Substrats bindet und polarisiert (Abb. 32)^[316]. Die Kristallstruktur der Urease unterstützt dieses Modell insofern, als daß das an Ni2 koordinierte Wassermolekül (oder Hydroxid-

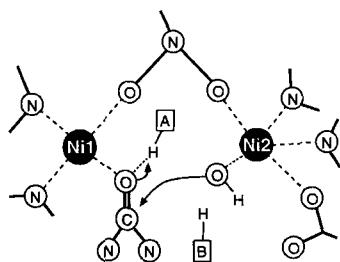


Abb. 32. Auf der Grundlage der Kristallstruktur und biochemischer Untersuchungen postulierter Mechanismus für die Reaktion der Urease [260, 304, 316]. A = allgemeine Säure. B = allgemeine Base.

negativ geladene tetraedrische Intermediat zu stabilisieren, das nach Angriff des Hydroxidions gebildet wird. Abgesehen von O_{41} der Ni1-koordinierten Seitenkette von Asp-360 befindet sich kein anderer Rest in einer Position, um als allgemeine Base zu fungieren. Es sind einige Inhibitoren für die Urease verfügbar, die als Analoga des Substrats oder Intermediats für Strukturstudien geeignet sind. Phosphat inhibiert die Urease in einer stark pH-abhängigen Weise^[307, 317]. Borsäure und Boronsäuren sind ebenfalls mögliche Analoga, jedoch ist nicht klar, ob diese als Substratanaloga mit einer trigonal-planaren $RB(OH)_2$ -Gruppe oder in Analogie zur Struktur des Übergangszustands als tetraedrische $RB(OH)_3^-$ -Ionen binden^[307, 318]. Ein weiterer starker Inhibitor ist Phenylphosphodiamidat, welches die Urease aus *K. aerogenes* mit einer Dissoziationskonstante von 94 pm inhibiert^[307].

Die Struktur der Urease zeigte eine erstaunliche Ähnlichkeit^[260] ihrer $(\alpha\beta)_8$ -Fäßstruktur der katalytischen α -Domäne zu der der Adenosin-Desaminase (ADA), einem mononuklearen Zinkenzym^[319]. Diese Homologie erstreckt sich auch auf die Lage des aktiven Zentrums: Ni2 liegt nahe dem Zink in der ADA und drei der Liganden am Ni2 der Urease koordinieren in ähnlicher Weise wie die entsprechenden Liganden am Zink in der ADA (Abb. 33). Auch die Position des Wasser- oder Hydroxidion-Nucleophils ist in diesen beiden Enzymen ähnlich. His-246, einer der Liganden am Ni1 in der Urease weist in der ADA eine andere Position auf. Der entsprechende Rest His-214 ist in der ADA am Zink koordiniert. Die Verwandtschaft zwischen der ADA und der Urease liefert ein aufschlußreiches Beispiel für die Entwicklung eines dinuklearen Metallzentrums (hier der Urease) ausgehend von einem möglichen Urprotein mit einem

mononuklearen Metallzentrum (hier ähnlich dem in ADA). Es wurde vorgeschlagen, daß die Mutation des Aspartatrestes der ADA zum Lys-217 in der Urease und die Carbamylierung dieses Restes notwendig war, um eine Seitenkette zu erhalten, die lang genug ist, um beide Metallionen verbrücken zu können (die analoge Seitenkette von Asp-181 in der ADA ist nicht Metallkoordiniert)^[260].

4. Ein gemeinsames Motiv in Struktur oder Reaktionsmechanismus?

Die zwei benachbarten Metallionen sind in den meisten Fällen 3 bis 4 Å voneinander entfernt (dies gilt auch für die drei Metallionen enthaltenden Zentren, wenn man nur die zwei dichtest benachbarten Metallatome dieser Zentren betrachtet). Ein längerer Abstand wird jedoch in den Strukturen der Pol- β (4.7 Å)^[93], der 5'-Nuclease der Taq-Pol (5 Å)^[96], und der AMS (5 Å)^[235] beobachtet. In diesen drei Enzymen haben beide Metallbindungsstellen eine sehr niedrige Affinität zu den Metallionen oder sind nur in der Gegenwart von Substraten oder Analoga besetzt (wie in den Strukturen beobachtet). In der Regel erleichtern eine oder mehrere verbrückende Carboxylat-Seitenketten oder carbamylierte Lysinreste den Aufbau eines solchen dinuklearen oder trimukulären Metallzentrums. Die AP und die AMS enthalten keine derartige Brücke. Während bei fast allen Enzymen mit einer verbrückenden Carboxylatgruppe zumindest eine der Carboxylatgruppen zweizähnig verbrückend bindet, enthalten die PAP und die PPs nur eine einzähnig verbrückende Carboxylat-Seitenkette. Eine große Vielfalt zeigt sich in der Art der Liganden und in den Koordinationspolyedern der Metallionen, selbst in Enzymen, die eine ähnliche oder identische Reaktion katalysieren, z. B. in der Gruppe der Aminopeptidasen. Für die Zinkenzyme wurde eine Tendenz zu Koordinationszahlen größer als vier (drei Proteinliganden und ein Wassernucleophil), die in vielen mononuklearen zinkhaltigen Hydrolasen gefunden wird, beobachtet^[2].

Für einige der hier besprochenen Enzyme konnten Strukturen mit gebundenen Substraten, Produkten, Intermediaten oder nichtnatürlichen Analoga erhalten werden. Sie liefern ein gutes Modell für die möglichen Wechselwirkungen, welche die Reaktanten aktivieren und den Übergangszustand stabilisieren. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, daß in allen diesen Metalloenzyme mit zwei benachbarten Metallionen im aktiven Zentrum beide Metallionen an der Katalyse beteiligt sind und keines nur eine rein strukturelle Aufgabe erfüllt. Ebenso sind wahrscheinlich alle drei Metallionen in den Phosphodiesterasen P1 und PLC an der Bindung und Aktivierung der Reaktanten beteiligt. Im Gegensatz dazu hat das Magnesiumion in der AP wahrscheinlich eine eher indirekte Rolle bei der Katalyse. Die AP ist einzigartig unter den hier diskutierten Enzymen hinsichtlich des zweistufigen Mechanismus mit

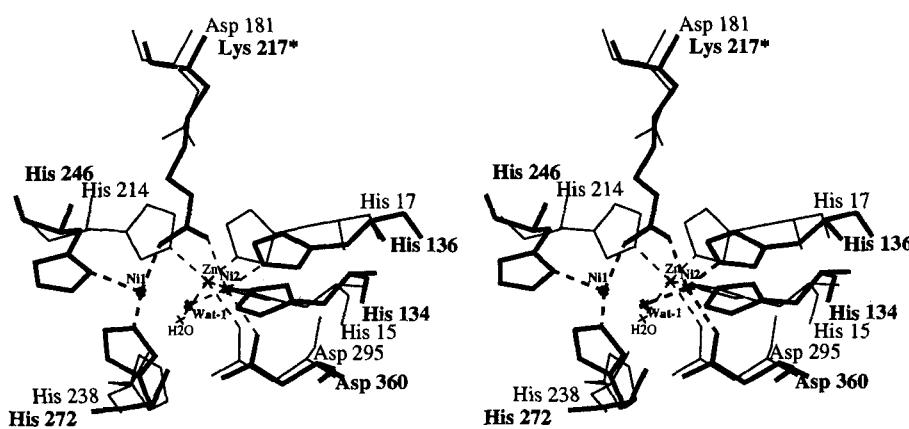


Abb. 33. Überlagerung der Strukturen der aktiven Zentren der Urease (fette Linien) und des mononuklearen Zinkenzymens Adenosin-Desaminase (dünne Linien; Stereodarstellung; aus Lit. [260]).

Bildung eines Phosphoenzym-Zwischenprodukts. Alle anderen Enzyme übertragen die Phosphorylgruppe offensichtlich direkt auf das Wassermolekül (bzw. auf den Acceptor) in nur einem S_N2 -artigen Austausch. Jedoch ist der Mechanismus für jeden der beiden Austauschschritte in der AP ein Prototyp für einen Zwei-Metallionen-Mechanismus, von dem angenommen wird, daß er in ähnlicher Weise auch bei Reaktionen mit anderen Enzymen abläuft (siehe unten). Eine Schwierigkeit bei der Bestimmung des Substratbindungsmodus mit Hilfe der Strukturbestimmung von Komplexen mit Phosphat oder Substratanaloga mit einer Phosphatgruppe ist, daß der Bindungsmodus des Inhibitors dem des Produkts ähneln oder der thermodynamisch stabilste sein könnte, ohne daß er notwendigerweise der katalytisch aktive Substratbindungsmodus ist (siehe dazu Abschnitt 2.2.1-2.2.3 und 2.5.1).

Tabelle 2 zeigt, daß jede der in Abschnitt 2 (Abb. 2) erwähnten möglichen Wechselwirkungen der Reaktanten mit den Metallionen oder Proteinresten wahrscheinlich in einem oder mehreren

Tabelle 2. Reste und Metallionen M, die das Nucleophil oder die Abgangsgruppe aktivieren oder den Übergangszustand (bzw. das Intermediat) stabilisieren, basierend auf geeigneten Enzym-Inhibitor-Strukturen.

Enzym	Übergangszustandsstabilisierung	Abgangsgruppenaktivierung	Nucleophil-Aktivierung
AP	Zn1, Zn2, Arg-166, NH ₁₀₂	Zn1, Zn2 [a]	Zn2, Zn1 [a]
PAP	M ^{II} , His-202, His-296	His-296	Fe ^{III}
PP-1	Zn2, Fe1	His-125	Fe1 oder Fe1 und Zn2
Pol- β	MgB	(H ₂ O)	MgB, Asp-256 [b, c]
Pol-1	Mg1, Mg2	Mg2	Mg1
EXO	M _A , M _B	M _B	M _A , Glu-357 [b], Tyr-497
FBP	M1, M2, Arg-276	2-OH des Substrats, NH ₁₂₂	M2, Glu-98 [c]
IMP	M1, M2, NH ₉₄ , NH ₉₅ , (H ₂ O)	M2	M1, Glu-70 [b, c], Thr-95
PLC	Zn1, Zn2, Zn3	Zn2 (?)	Glu-146 [b, c]
P1	Zn2, Arg-48	Zn2 (?)	Zn1 und Zn3 oder Zn2
GLS	Mg1, Mg2, Arg-339, Arg-359	Mg2	Mg1
LAP	Zn1, Zn2, Lys-262, (H ₂ O)	(H ₂ O)	Zn1 und Zn2

[a] Im ersten, zweiten Phosphoryltransferschritt. [b] Ligand am Metallion. [c] Der Rest wirkt vermutlich als allgemeine Base (Protonenacceptor).

eren der vorgeschlagenen Zwei-Metallionen-Mechanismen verwirklicht ist. In den Mechanismen der AP, der PAP, der PPs, der FBP und der LAP beteiligen sich offensichtlich zusätzlich zu den Metallionen positiv geladene Seitenketten (Arg, His oder Lys) an der Stabilisierung des Übergangszustands. Im Unterschied hierzu scheinen die Metallionen in den Polymerasen, der 3',5'-Exonuclease, der IMP und der PLC den Großteil der Stabilisierung des Übergangszustands allein zu leisten, da keine anderen Proteinreste geeignete Positionen aufweisen, um mit den Phosphoryl-Sauerstoffatomen in Wechselwirkung zu treten. In der IMP könnten auch zwei NH-Gruppen der Hauptkette die Stabilisierung des Übergangszustands unterstützen.

Für alle der hier besprochenen di- und trinuclearen Metalloenzyme wurde vorgeschlagen, daß ein Metallion bei der Deprotonierung des Nucleophils hilft. Für die LAP, die Scr/Thr-PPs, die Nuclease P1 und die Phospholipase C wird eine Deprotonierung des Nucleophils durch zwei Metallionen diskutiert (Metallion-verbrückendes Nucleophil). Da zwei Metallionen den pK_a -Wert eines koordinierten Wassermoleküls noch stärker herabsetzen können als ein Metallion, könnte ein solches verbrückendes Wassernucleophil ohne die Hilfe eines Proteinrestes als Protonenacceptor deprotoniert werden. Auf der anderen Seite sollte

die durch die koordinierten Liganden modulierte Lewis-Acidität der Metallionen gerade stark genug sein, um beim pH-Wert der natürlichen Enzymumgebung ein Metall-gebundenes Hydroxidion zu erzeugen, aber nicht stärker, da die Lewis-Acidität auch die Nucleophilie des erzeugten Hydroxidions herabsetzt. Eine offene Frage bleibt, ob es wahrscheinlich ist, daß eine Metallion-koordinierte Carboxylatgruppe ein Proton von dem Nucleophil akzeptiert, wie in den Mechanismen der Pol- β und der IMP vorgeschlagen. Eine rechnergestützte Untersuchung der 3',5'-Exonuclease-Aktivität der Pol-I deutet darauf hin, daß die Metallion-koordinierte Seitenkette von Glu-357 wahrscheinlich nicht während der Reaktion protoniert wird, da die Basizität der Carboxylgruppe durch die Metallkoordination stark erniedrigt wird^[150]. Weiterhin wird eine Aktivierung der Abgangsgruppe durch Metallionen oder Seitenketten des Proteins für die meisten Enzyme vorgeschlagen (Tabelle 2). Oft können Wassermoleküle in für Wasserstoffbrücken typischen Abständen zu Phosphoryl-Sauerstoffatomen (z. B. in der IMP oder der Pol- β) oder zu den *gem*-Diolat-Sauerstoffatomen der zum Übergangszustand analogen Inhibitoren für die LAP lokalisiert werden. Diese Wassermoleküle können ebenfalls einen signifikanten Beitrag zur Stabilisierung des Übergangszustands leisten oder die Abgangsgruppe protonieren. Solche, für die Katalyse wichtigen Wassermoleküle können in Kristallstrukturen der Verbindungen vorhanden sein, auch wenn sie bei niedriger Auflösung (größer als etwa 2.5 Å) nicht in den Elektronendichtekarten gefunden wurden.

Tabelle 2 zeigt, daß für die meisten Reaktionswege eine dominierende Rolle für beide Metallionen vorgeschlagen wurde. In einem Versuch, die vorgeschlagenen Zwei-Metallionen-Mechanismen des Phosphoryltransfers vereinfachend darzustellen, können wir diese daher auf der Grundlage des Bindungsmodus

der Reaktanten zu den Metallionen vergleichen, wie in Abbildung 34 gezeigt. Alle Wechselwirkungen mit anderen Proteinresten wurden in dieser Abbildung vernachlässigt. Eine Art der Substratbindung, in der ein Metallion das deprotonierte Nucleophil erzeugt, während das andere Metallion die Abgangsgruppe aktiviert und beide Metallionen die Phosphorylgruppe polarisieren, ist für beide Austauschschritte der AP, für die IMP, die 3',5'-Exonuclease und als eine Möglichkeit für die RNA/DNA-Polymerasen angedeutet (Abb. 34a). Ein solcher Mechanismus wird von mehreren Strukturuntersuchungen für diese Enzyme gestützt und er scheint der vorherrschende Zwei-Metallionen-Mechanismus zu sein. Ein Mechanismus, in dem ein Metallion die Phosphorylgruppe des Substrats bindet und das andere Metallion das Nucleophil deprotoniert, wird für die PAP diskutiert. In einer modifizierten Form mit dem Zn1-Zn3-verbrückenden Wassermolekül als Nucleophil wird dieser Mechanismus auch als eine Möglichkeit für die P1 und die PLC angenommen (Abb. 34b). In einer dritten Alternative für den Substratbindungsmodus verbrückt die Phosphorylgruppe die zwei Metallionen (Abb. 34c und d). Das Nucleophil kann dann ein terminaler Ligand zu einem Metallion sein, wie für FBP und für PP-1 vorgeschlagen, oder ein verbrückendes

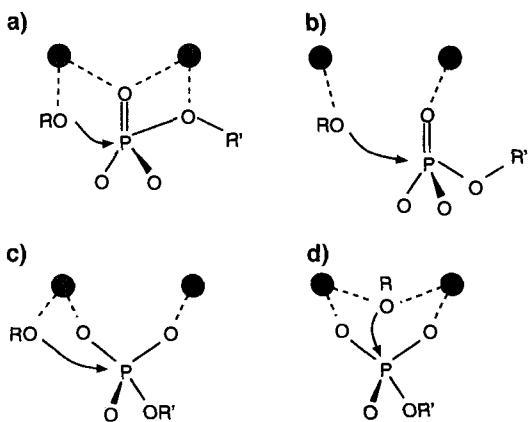


Abb. 34. Vereinfachte Darstellung von vier möglichen Bindungsmodi eines Phosphomonoesters und eines Nucleophils an einem Dimetallzentrum. In den Mechanismen a) und b) bindet das Substrat einzähnig verbrückend oder terminal mit einem nichtveresterten Phosphoryl-Sauerstoffatom an den Metallionen, während in den Mechanismen c) und d) der Substratbindungsmodus zweizähnig verbrückend ist.

Wassermolekül, eine Möglichkeit für den Mechanismus der Ser/Thr-PPs.

Wir wissen nicht, wie gut diese Mechanismusmodelle den realen Reaktionsverlauf beschreiben oder in welchem Ausmaß zukünftige Struktur- oder andere Untersuchungen Korrekturen an den vorgeschlagenen Mechanismen nötig machen werden. Anscheinend können jedoch deutlich verschiedene Mechanismen an einem Dimetallzentrum ablaufen. Selbst für verwandte Enzyme, wie PAP und die PPs, FBP und IMP oder P1 und PLC, treten Unterschiede in den Reaktionswegen hinsichtlich der Identität des Nucleophils oder hinsichtlich des Substratbindungsmodus auf oder sind zumindest angedeutet oder möglich. Wir wissen, daß Raumstrukturen besser konserviert sind als Proteinsequenzen, aber es muß noch gezeigt werden, wie gut Enzymmechanismen konserviert werden.

Wir danken Hazel Holden, Fusao Takusagawa, Dietrich Suck, Edward Hough, Sissel Hansen, Zdenek Hostomsky, Andy Karplus, Stephen Martin, Alexander Wlodawer, Harold Wyckoff, Tom Steitz, Jonathan Goldberg und John Kuriyan für die Überlassung von Abbildungen und Koordinaten zur Erstellung von Abbildungen vor der Freigabe durch die PDB. Huguette Pelletier, Fusao Takusagawa und Dietrich Suck sei für die Mitteilung von Ergebnissen vor der Publikation und für hilfreiche Kommentare gedankt. Die Forschung in den Laboratorien der Autoren wurde durch die Projektbeihilfen NIH GM06920 an W. N. L. sowie DFG 406/13/15 und BMFT(BMBF) 05648PMA an B. K. unterstützt. N. S. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung. B. K., N. S. und T. K. danken Herbert Witzel für viele Ratschläge und hilfreiche Diskussionen.

Eingegangen am 12. März 1996 [A 157]

- R. G. Wilkins, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 171; J. B. Vincent, G. L. Olivier-Liley, B. A. Averill, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1447; P. Nordlund, H. Eklund, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 758.
- B. L. Vallee, D. S. Auld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 2715; B. L. Vallee, D. S. Auld, *Biochemistry* **1993**, 32, 6493.
- a) J. R. Knowles, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 877; b) S. J. Benkovic, K. J. Schray in *The Enzymes*, Vol. 8, 3. Aufl. (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, 1973, S. 201–238; c) J. A. Gerlt in *The Enzymes*, Vol. 20, 3. Aufl. (Hrsg.: D. S. Sigman), Academic Press, San Diego, **1992**, S. 95–139.
- J. B. Vincent, M. W. Crowder, B. A. Averill, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 105; D. Gani, J. Wilkie, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 55.

- S. J. Benkovic, K. J. Schray in *Transition States of Biochemical Processes*, Vol. 1, 1. Aufl. (Hrsg.: R. D. Gandour), Plenum, New York, **1978**, S. 493–527; G. J. Thatcher, R. Kluger, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1989**, 25, 99.
- J. J. Villafranca, T. Nowak in Lit. [3c], S. 63–94; A. S. Mildvan, C. M. Grisham, *Struct. Bonding (Berlin)* **1974**, 20, 1; A. S. Mildvan, *Adv. Enzymol.* **1979**, 49, 103; B. S. Cooperman, *Met. Ions Biol. Syst.* **1976**, 5, 79–126.
- J. F. Chlebowski, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 1202; J. F. Chlebowski, I. M. Armitage, P. P. Tusa, J. E. Coleman, *ibid.* **1976**, 251, 1207.
- A. J. Kirby, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3209; W. W. Butcher, F. H. Westheimer, *ibid.* **1955**, 77, 2420.
- W. W. Cleland, *FASEB J.* **1990**, 4, 2899.
- F. H. Westheimer, *Acc. Chem. Res.* **1968**, 1, 70.
- A. Williams, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1992**, 27, 1; W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**.
- W. W. Cleland, *Bioorg. Chem.* **1987**, 15, 283.
- W. W. Cleland, A. C. Hengge, *FASEB J.* **1995**, 9, 1585.
- A. S. Mildvan, D. C. Fry, *Adv. Enzymol.* **1987**, 59, 241.
- S. J. Admiraal, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 729.
- D. Herschlag, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4665; R. M. Milburn, M. Gautam-Basak, R. Tribolet, H. Sigel, *ibid.* **1985**, 107, 3315; P. E. Amsler, H. Sigel, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 63, 569; M. Tetas, J. M. Lowenstein, *Biochemistry* **1963**, 2, 350; L. B. Nanninga, *J. Phys. Chem.* **1957**, 61, 1144.
- J. E. Coleman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441.
- H. N. Fernley, P. G. Walker, *Nature* **1966**, 212, 1435.
- W. N. Aldridge, T. E. Barman, H. Gutfrund, *Biochem. J.* **1964**, 92, 23C.
- J. H. Schwartz, A. M. Crestfield, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, 49, 723; J. H. Schwartz, F. Lipmann, *ibid.* **1961**, 47, 1996; L. Engström, *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 52, 604.
- R. Han, J. E. Coleman, *Biochemistry* **1995**, 34, 4238.
- P. Gettins, M. Metzler, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 2875; W. E. Hull, S. E. Halford, H. Gutfrund, B. D. Sykes, *Biochemistry* **1976**, 15, 1547; W. Bloch, M. J. Schlesinger, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 5794.
- T. T. Simopoulos, W. P. Jencks, *Biochemistry* **1994**, 33, 10375.
- S. R. Jones, L. A. Kindman, J. R. Knowles, *Nature* **1978**, 275, 564.
- A. D. Hall, A. Williams, *Biochemistry* **1986**, 25, 4784.
- F. Hollfelder, D. Herschlag, *Biochemistry* **1995**, 34, 12255.
- P. M. Weiss, W. W. Cleland, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 1928.
- A. C. Hengge, W. A. Edens, H. Elsing, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5045.
- R. A. Anderson, W. F. Boston, F. S. Kennedy, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 2989.
- J. E. Murphy, X. Xu, E. R. Kantrowitz, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21497; J. E. Murphy, T. T. Tibbitts, E. R. Kantrowitz, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 604; J. E. Murphy, E. R. Kantrowitz, *Mol. Microbiol.* **1994**, 12, 351; C. M. Janeway, X. Xu, J. E. Murphy, A. Chaidaroglou, E. R. Kantrowitz, *Biochemistry* **1993**, 32, 1601.
- J. M. Sowadski, M. D. Handschumacher, H. Murthy, B. A. Foster, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 417.
- E. E. Kim, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 449.
- C. Schulz, I. Bertini, M. S. Viezzoli, R. D. Brown III, S. H. Koenig, J. E. Coleman, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 1490.
- P. Gettins, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 11036.
- Diese Abstände sind über die zwei unabhängigen Monomere in der asymmetrischen Einheit gemittelt.
- J. E. Butler-Ranshoff, S. E. Rokita, D. A. Kendall, J. A. Banzon, K. S. Carano, E. Kaiser, A. R. Matlin, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 142.
- A. Chaidaroglou, D. J. Brezinski, S. A. Middleton, E. R. Kantrowitz, *Biochemistry* **1988**, 27, 8338; J. E. Butler-Ranshoff, D. A. Kendall, E. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4276.
- E. V. Koonin, *Protein Sci.* **1994**, 3, 356; G. J. Barton, P. T. Cohen, D. Barford, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 220, 225.
- S. Zhuo, J. C. Clemens, R. L. Stone, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26234.
- N. Sträter, T. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs, *Science* **1995**, 268, 1489.
- J. Goldberg, H. Huang, Y. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan, *Nature* **1995**, 376, 745.
- J. P. Griffith, J. L. Kim, E. E. Kim, M. D. Sintchak, J. A. Thomson, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, P. R. Caron, K. Hsiao, M. A. Navia, *Cell* **1995**, 82, 507.
- C. R. Kissinger, H. E. Parge, D. R. Knighton, C. T. Lewis, L. A. Pelletier, A. Tempezyk, V. J. Kalish, K. D. Tucker, R. E. Showalter, E. W. Moomaw, L. N. Gastinel, N. Habuka, X. Chen, F. Maldonado, J. E. Barker, R. Bacquet, J. E. Villafranca, *Nature* **1995**, 378, 641.
- M. Egloff, P. T. Cohen, P. Reinemer, D. Barford, *J. Mol. Biol.* **1995**, 254, 942.
- T. Klabunde, N. Sträter, H. Witzel, B. Krebs, *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 737.
- J. Schindelmeiser, D. Münstermann, H. Witzel, *Histochemistry* **1987**, 87, 13; J. Schindelmeiser, P. Schewe, T. Zonka, D. Münstermann, *ibid.* **1989**, 92, 81.

- [47] M. Zaidi, B. Moonga, D. W. Moss, I. MacIntyre, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *159*, 68; K. W. Lau, T. K. Freeman, D. J. Baylink, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1389.
- [48] B. A. Averill, J. C. Davis, S. Burman, T. Zirino, J. Sanders-Loehr, T. M. Loehr, J. T. Sage, P. G. Debrunner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3760.
- [49] J. W. Pyrz, J. T. Sage, P. G. Debrunner, L. Que, Jr., *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11015.
- [50] M. Dietrich, D. Münstermann, H. Suerbaum, H. Witzel, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 105.
- [51] K. Doi, J. McCracken, J. Peisach, P. Aisen, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5757.
- [52] J. B. Vincent, M. W. Crowder, B. A. Averill, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3025; D. C. Crans, C. M. Simone, R. C. Holz, L. Que, Jr., *ibid.* **1992**, *31*, 11731; M. W. Crowder, J. B. Vincent, B. A. Averill, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9603; E. P. Day, S. S. David, J. Peterson, W. R. Dunham, J. J. Bonvoisin, R. H. Sands, L. Que, Jr., *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15561; J. C. Davis, B. A. Averill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 4623.
- [53] K. Doi, R. Gupta, P. Aisen, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6982.
- [54] Z. Wang, L. Ming, L. Que, Jr., J. B. Vincent, M. W. Crowder, B. A. Averill, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5263; R. C. Holz, L. Que, Jr., L. Ming, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4434.
- [55] S. M. Kauzlarich, B. K. Teo, T. Zirino, S. Burman, J. C. Davis, B. A. Averill, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2781; A. E. True, R. C. Scarrow, C. R. Randall, R. C. Holz, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4246.
- [56] S. Gehring, P. Fleischhauer, W. Haase, M. Dietrich, H. Witzel, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 786.
- [57] E. Sinn, C. J. O'Connor, *Inorg. Chim. Acta* **1983**, *78*, L13.
- [58] D. L. Wang, R. C. Holz, S. S. David, L. Que, Jr., M. T. Stankovich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8187.
- [59] B. C. Antanaitis, T. Strelakas, P. Aisen, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3766; M. P. Allen, A. H. Yamada, F. H. Carpenter, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3778.
- [60] J. L. Beck, L. A. McConachie, A. C. Summors, W. N. Arnold, J. De Jersey, B. Zerner, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *869*, 61.
- [61] N. Sträter, R. Fröhlich, A. Schiemann, B. Krebs, M. Körner, H. Suerbaum, H. Witzel, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 511; B. Stahl, T. Klabunde, H. Witzel, B. Krebs, M. Steup, M. Karas, F. Hillenkamp, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *220*, 321.
- [62] J. L. Beck, M. J. McArthur, J. de Jersey, B. Zerner, *Inorg. Chim. Acta* **1988**, *153*, 39.
- [63] H. Suerbaum, M. Körner, H. Witzel, E. Althaus, B. Mosel, W. Müller-Warmuth, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 313; J. L. Beck, J. de Jersey, B. Zerner, M. P. Hendrich, P. G. Debrunner, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3317.
- [64] T. Klabunde, N. Sträter, B. Krebs, H. Witzel, *FEBS Lett.* **1995**, *367*, 56.
- [65] R. B. Lauffer, B. C. Antanaitis, P. Aisen, L. Que, Jr., *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14212.
- [66] M. A. Aquino, J. Lim, A. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 2135.
- [67] M. A. Aquino, J. Lim, A. Sykes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 429.
- [68] E. G. Mueller, M. W. Crowder, B. A. Averill, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2974.
- [69] C. J. Wynne, S. E. Hamilton, D. A. Dionysius, J. L. Beck, J. De Jersey, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 133.
- [70] P. Cohen, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 453; C. B. Klee, G. F. Draetta, M. J. Hubbard, *Adv. Enzymol.* **1988**, *61*, 149; S. Shenolikar, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1994**, *10*, 55; S. Wera, B. A. Hemmings, *Biochem. J.* **1995**, *311*, 17; D. L. Lohse, J. M. Denu, J. E. Dixon, *Structure* **1995**, *3*, 987; W. P. Taylor, T. S. Widlanski, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 713; L. M. Ballou, E. H. Fischer in *The Enzymes*, Vol. 17, 3. Aufl. (Hrsg.: P. D. Boyer, E. G. Krebs), Academic Press, Orlando, **1986**, S. 311; D. Barford, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 728.
- [71] T. S. Ingebritsen, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *132*, 255.
- [72] M. M. King, C. Y. Huang, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8847.
- [73] D. J. Wolff, D. W. Sved, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4195; C. J. Pallen, J. H. Wang, *ibid.* **1984**, *259*, 6134; R. C. Gupta, R. L. Khandelwal, P. V. Sulakhe, *FEBS Lett.* **1984**, *169*, 251.
- [74] K. F. Qin, S. Khangulov, C. Liu, C. Y. Huang, *FASEB J.* **1995**, *9*, A1347; L. Yu, A. Haddy, F. Rusnak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10147.
- [75] B. L. Martin, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14545.
- [76] B. L. Martin, D. J. Graves, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 136.
- [77] B. Martin, C. J. Pallen, J. H. Wang, D. J. Graves, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14932.
- [78] D. R. Alessi, A. J. Street, P. Cohen, P. T. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1055.
- [79] Y. Chu, E. Y. Lee, K. K. Schlender, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2574.
- [80] T. S. Wang, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 513; K. J. Marians, *ibid.* **1992**, *61*, 673.
- [81] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777.
- [82] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature* **1985**, *313*, 762.
- [83] P. S. Freemont, J. M. Friedman, L. S. Beese, M. R. Sanderson, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8924.
- [84] V. Derbyshire, P. S. Freemont, M. R. Sanderson, L. Beese, J. M. Friedman, C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Science* **1988**, *240*, 199.
- [85] L. S. Beese, T. A. Steitz, *EMBO J.* **1991**, *10*, 25.
- [86] L. S. Beese, V. Derbyshire, T. A. Steitz, *Science* **1993**, *260*, 352.
- [87] L. S. Beese, J. M. Friedman, T. A. Steitz, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14095.
- [88] L. A. Kohlstaedt, J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, T. A. Steitz, *Science* **1992**, *256*, 1783.
- [89] A. Jacobo-Molina, J. Ding, R. G. Nanni, A. D. Clark, X. Lu, C. Tantillo, R. L. Williams, G. Kamer, A. L. Ferris, P. Clark, A. Hizi, S. H. Hughes, E. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6320.
- [90] S. J. Smerdon, J. Jäger, J. Wang, L. A. Kohlstaedt, A. J. Chirino, J. M. Friedman, P. A. Rice, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3911; J. Wang, S. J. Smerdon, J. Jäger, L. A. Kohlstaedt, P. A. Rice, J. M. Friedman, T. A. Steitz, *ibid.* **1994**, *91*, 7242; P. H. Patel, A. Jacobo-Molina, J. Ding, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., R. Raag, R. G. Nanni, S. H. Hughes, E. Arnold, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5351; R. Esnouf, J. Ren, C. Ross, Y. Jones, D. Stammers, D. Stuart, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 303.
- [91] D. W. Rodgers, S. J. Gamblin, B. A. Harris, S. Ray, J. S. Culp, B. Hellmig, D. J. Woolf, C. Debouck, S. C. Harrison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1222.
- [92] J. F. Davies II, R. J. Almasy, Z. Hostomska, R. Ferre, Z. Hostomsky, *Cell* **1994**, *76*, 1123.
- [93] H. Pelletier, M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, *264*, 1891.
- [94] M. R. Sawaya, H. Pelletier, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, *264*, 1930.
- [95] R. Sousa, Y. Chung, J. P. Rose, B. Wang, *Nature* **1993**, *364*, 593.
- [96] Y. Kim, S. H. Eom, J. Wang, D. Lee, S. W. Suh, T. A. Steitz, *Nature* **1995**, *376*, 612.
- [97] L. Blanco, A. Bernad, M. A. Blasco, M. Salas, *Gene* **1991**, *100*, 27; O. Poch, I. Sauvaget, M. Delarue, N. Tordo, *EMBO J.* **1989**, *8*, 3867; D. K. Braithwaite, J. Ito, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 787; M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos, *Protein Eng.: Proc. Int. Conf. Protein Eng. 2nd Conf.* **1990**, *3*, 461.
- [98] E. Arnold, J. Ding, S. H. Hughes, Z. Hostomsky, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 27.
- [99] T. A. Steitz, S. Smerdon, J. Jäger, J. Wang, L. A. Kohlstaedt, J. M. Friedman, L. S. Beese, P. A. Rice, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1993**, *63*, 495.
- [100] C. M. Joyce, X. Sun, N. D. Grindley, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24485.
- [101] A. H. Polesky, M. E. Dahlberg, S. J. Benkovic, N. D. Grindley, C. M. Joyce, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8417; A. H. Polesky, T. A. Steitz, N. D. Grindley, C. M. Joyce, *ibid.* **1990**, *265*, 14579; W. C. Copeland, T. S. Wang, *ibid.* **1993**, *268*, 11028; A. Bernad, J. M. Lazaro, M. Salas, L. Blanco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4610; S. Sankar, A. G. Porter, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10168; M. A. Blasco, J. M. Lazaro, L. Blanco, M. Salas, *ibid.* **1993**, *268*, 24106; G. Jung, M. C. Leavitt, M. Schultz, J. Ito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 1294.
- [102] K. L. Menge, Z. Hostomsky, B. R. Nodes, G. O. Hudson, S. Rahmati, E. W. Moomaw, R. J. Almasy, Z. Hostomska, *Biochemistry* **1995**, *34*, 15934.
- [103] A. S. Mildvan, L. A. Loeb, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1979**, *6*, 219.
- [104] F. Focher, A. Verri, G. Maga, S. Spadari, U. Hübscher, *FEBS Lett.* **1990**, *259*, 349.
- [105] G. P. Mullen, E. H. Serpersu, L. J. Ferrin, L. A. Loeb, A. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 14327; S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4076.
- [106] D. Solaiman, F. Y. Wu, *Biochemistry* **1985**, *24*, 5077; D. P. Giedroc, J. E. Coleman, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4969; L. J. Ferrin, A. S. Mildvan, L. A. Loeb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 723.
- [107] M. F. Goodman, S. Creighton, L. B. Bloom, J. Petruska, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 83; M. D. Lai, K. L. Beattie, *Mutat. Res.* **1988**, *198*, 27; W. S. El-Deiry, A. G. So, K. M. Downey, *Biochemistry* **1988**, *27*, 546; G. G. Hillebrand, K. L. Beattie, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 3173; S. K. Niyogi, R. P. Feldman, *ibid.* **1981**, *9*, 2615; H. Pelletier, M. R. Sawaya, W. Wolfe, S. H. Wilson, J. Kraut, *Biochemistry*, eingereicht (2 Veröffentlichungen).
- [108] N. T. Christie, D. M. Tummolo, *Biol. Trace Elem. Res.* **1989**, *21*, 3.
- [109] J. P. Slater, I. Tamir, L. A. Loeb, A. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 6784.
- [110] T. A. Steitz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 31.
- [111] Pelletier et al., UCSF, weisen darauf hin, daß sie diese Ergebnisse der Metallionenbindung zu Kristallen des 31-kDa-Apoenzym von $\text{pol-}\beta$ nicht reproduzieren konnten (unveröffentlichte Versuchsergebnisse [107]).
- [112] T. A. Steitz, S. J. Smerdon, J. Jäger, C. M. Joyce, *Science* **1994**, *266*, 2022.
- [113] R. S. Brody, S. Adler, P. Modrich, W. J. Stec, Z. J. Leznikowski, P. A. Frey, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2570; P. M. Burgers, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6889; P. J. Romaniuk, F. Eckstein, *ibid.* **1982**, *257*, 7684; R. S. Brody, P. A. Frey, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1245; P. A. Bartlett, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8879; S. Hopkins, P. A. Furman, G. R. Painter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 106.
- [114] P. A. Osumi-Davis, M. C. de Aguilera, R. W. Woody, A. Woody, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 37; I. Joung, M. S. Horwitz, J. A. Engler, *Virology* **1991**, *184*, 235; Q. Dong, W. C. Copeland, T. S. Wang, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24163.
- [115] P. S. Freemont, D. L. Ollis, T. A. Steitz, C. M. Joyce, *Proteins* **1986**, *1*, 66.
- [116] V. Derbyshire, N. D. Grindley, C. M. Joyce, *EMBO J.* **1991**, *10*, 17.
- [117] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 288.

- [118] J. A. Esteban, M. S. Soengas, M. Salas, L. Blanco, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31946; A. Bernad, L. Blanco, J. M. Lazaro, G. Martin, M. Salas, *Cell* **1989**, *59*, 219; L. J. Reha-Krantz, *Gene* **1992**, *112*, 133.
- [119] A. P. Gupta, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5874.
- [120] I. R. Lehman, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 233; H. Han, J. M. Rifkind, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11104.
- [121] M. Fothergill, M. F. Goodman, J. Petruska, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11619.
- [122] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Ehrlich, *Science* **1988**, *239*, 487.
- [123] R. J. Crouch, *New Biol.* **1990**, *2*, 771.
- [124] F. Oyama, R. Kikuchi, R. J. Crouch, T. Uchida, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18808; M. S. Krug, S. L. Berger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3539.
- [125] Z. Hostomsky, Z. Hostomska, G. O. Hudson, E. W. Moomaw, B. R. Nodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1148.
- [126] J. F. Davies, Z. Hostomska, Z. Hostomsky, S. R. Jordan, D. A. Matthews, *Science* **1991**, *252*, 88.
- [127] Eine Kristallstruktur der aktiven Domäne der RNase H A aus HIV-RT wurde später erhalten von D. Chattopadhyay, B. C. Finzel, S. H. Munson, D. B. Evans, S. K. Sharma, N. A. Strakalaitis, D. P. Brunner, F. M. Eckenrode, Z. Dauter, Ch. Betzel, H. M. Einspahr, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1993**, *49*, 423. In dieser Strukturbestimmung sind keine Metallionen am Enzym gebunden.
- [128] M. Starnes, Y. Cheng, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7073.
- [129] R. F. Doolittle, D. Feng, M. S. Johnson, M. A. McClure, *Q. Rev. Biol.* **1989**, *64*, 1.
- [130] M. S. Johnson, M. A. McClure, D. Feng, J. Gray, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 7648; W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch, Y. Satow, *Science* **1990**, *249*, 1398; K. Katayanagi, M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishikawa, S. Kanaya, M. Ikebara, T. Matsuzaki, K. Morikawa, *Nature* **1990**, *347*, 306.
- [131] K. Katayanagi, M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishikawa, S. Kanaya, H. Nakamura, M. Ikebara, T. Matsuzaki, K. Morikawa, *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 1029; K. Katayanagi, M. Okumura, K. Morikawa, *Proteins* **1993**, *17*, 337.
- [132] S. Kanaya, A. Kohara, Y. Miura, A. Sekiguchi, S. Iwai, H. Inoue, E. Ohtsuka, M. Ikebara, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4615.
- [133] H. W. Huang, J. A. Cowan, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 253.
- [134] F. Dyda, A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelmann, R. Craigie, D. R. Davies, *Science* **1994**, *266*, 1981.
- [135] G. Bujacz, M. Jaskolski, J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, R. A. Katz, A. M. Skalka, *J. Mol. Biol.* **1995**, *253*, 333.
- [136] G. Bujacz, M. Jaskolski, J. Alexandratos, A. Wlodawer, G. Merkel, R. A. Katz, A. M. Skalka, *Structure* **1996**, *4*, 89.
- [137] P. Rice, K. Mizuuchi, *Cell* **1995**, *82*, 209.
- [138] M. Ariyoshi, D. G. Vassilyev, H. Iwasaki, H. Nakamura, H. Shinagawa, K. Morikawa, *Cell* **1994**, *78*, 1063.
- [139] W. Yang, T. A. Steitz, *Structure* **1995**, *3*, 131.
- [140] M. Newman, T. Strzelecka, L. F. Dornier, I. Schildkraut, A. K. Aggarwal, *Science* **1995**, *269*, 656.
- [141] D. Kostrewa, F. K. Winkler, *Biochemistry* **1995**, *34*, 683.
- [142] I. Vipond, G. S. Baldwin, S. E. Halford, *Biochemistry* **1995**, *34*, 697; G. S. Baldwin, I. Vipond, S. E. Halford, *ibid.* **1995**, *34*, 705.
- [143] D. Bozic, S. Grazulis, V. Siksny, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 176.
- [144] F. K. Winkler, D. W. Banner, C. Oefner, D. Tsernoglou, R. S. Brown, S. P. Heathman, R. K. Bryan, P. D. Martin, K. Petratous, K. S. Wilson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 1781.
- [145] Y. Kim, J. C. Grable, P. J. Choi, P. Greene, J. M. Rosenberg, *Science* **1990**, *249*, 1307.
- [146] X. Cheng, K. Balendiran, I. Schildkraut, J. E. Anderson, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3927.
- [147] S. Altman, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 735; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 749; T. R. Cech, *ibid.* **1990**, *102*, 745 bzw. **1990**, *29*, 759; B. L. Iverson, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 67; T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, *27*, 487; C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *ibid.* **1983**, *35*, 849.
- [148] T. A. Steitz, J. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6498; J. A. Piccirilli, J. S. Vyle, M. H. Caruthers, T. R. Cech, *Nature* **1993**, *361*, 85; T. Shimayama, S. Nishikawa, K. Taira, *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 304.
- [149] H. Ke, C. M. Thorpe, B. A. Seaton, F. Marcus, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 1475.
- [150] R. Bone, J. P. Springer, J. R. Atack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10031; M. Fothergill, M. F. Goodman, J. Petruska, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11619.
- [151] J. D. York, J. W. Ponder, Z. Chen, F. Matthews, P. W. Majerus, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13164.
- [152] Y. Zhang, J. Liang, W. N. Lipscomb, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *190*, 1080.
- [153] A. F. Neuwald, J. D. York, P. W. Majerus, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 16; R. E. Diehl, P. Whiting, J. Potter, N. Gee, C. I. Ragan, D. Linemeyer, R. Schoepfer, C. Bennett, R. A. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5946; J. D. York, J. W. Ponder, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5149.
- [154] P. A. Benkovic, C. A. Caperelli, M. M. de Maine, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 2185.
- [155] J. Liang, Y. Zhang, S. Huang, H. Ke, W. N. Lipscomb, *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* **1992**, *36*, 57.
- [156] S. J. Benkovic, M. M. de Maine, *Adv. Enzymol.* **1982**, *53*, 45.
- [157] S. J. Pilks, T. H. Claus, P. D. Kountz, M. El-Maghrabi in *The Enzymes*, Vol. *18*, 3. Aufl. (Hrsg.: P. D. Boyer, E. G. Krebs), Academic Press, Orlando, **1987**, S. 3.
- [158] G. Gomori, *J. Biol. Chem.* **1943**, *148*, 139; H. G. Nimmo, K. F. Tipton, *Biochem. J.* **1975**, *145*, 323.
- [159] C. B. Libby, W. A. Frey, J. J. Villafranca, S. J. Benkovic, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7564; S. Pontremoli, E. Melloni, F. Salamino, B. Sparatore, B. L. Horecker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *188*, 90.
- [160] S. Pontremoli, B. Sparatore, F. Salamino, E. Melloni, B. L. Horecker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *194*, 481.
- [161] F. O. Pedrosa, S. Pontremoli, B. L. Horecker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2742; G. A. Tejwani, F. O. Pedrosa, S. Pontremoli, B. L. Horecker, *ibid.* **1976**, *73*, 2692; T. Ikeda, K. Kimura, T. Hama, N. Tamaki, *J. Biochem.* **1980**, *87*, 179.
- [162] S. Pontremoli, E. Grazi, A. Accorsi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *37*, 597; E. Grazi, A. Accorsi, S. Pontremoli, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 6651; P. A. Benkovic, W. A. Frey, S. J. Benkovic, *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *191*, 719.
- [163] P. L. Domanico, J. F. Rahil, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1623.
- [164] S. J. Benkovic, J. L. Engle, A. S. Mildvan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *47*, 852; T. A. Koerner, Jr., L. W. Cary, N. S. Bhacca, E. S. Younathan, *ibid.* **1973**, *51*, 543; C. F. Midelfort, R. K. Gupta, I. A. Rose, *Biochemistry* **1976**, *15*, 2178.
- [165] W. A. Frey, R. Fishbein, M. M. de Maine, S. J. Benkovic, *ibid.* **1977**, *16*, 2479.
- [166] C. J. Marcus, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 2963.
- [167] H. Ke, C. M. Thorpe, B. A. Seaton, W. N. Lipscomb, F. Marcus, *J. Mol. Biol.* **1989**, *212*, 513; H. Ke, Y. Zhang, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5243; H. Ke, Y. Zhang, J. Liang, W. N. Lipscomb, *ibid.* **1991**, *88*, 2989; J. Liang, S. Huang, Y. Zhang, H. Ke, W. N. Lipscomb, *ibid.* **1992**, *89*, 2404.
- [168] H. Ke, J. Liang, Y. Zhang, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4412; J. Liang, Y. Zhang, S. Huang, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2132.
- [169] Y. Zhang, J. Liang, S. Huang, H. Ke, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1844.
- [170] V. Villeret, S. Huang, H. J. Fromm, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8916.
- [171] V. Villeret, S. Huang, Y. Zhang, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4307.
- [172] M. Gidh-Jain, Y. Zhang, P. D. van Poelje, J. Liang, S. Huang, J. Kim, J. T. Elliott, M. D. Erion, S. J. Pilks, M. R. El-Maghrabi, W. N. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27732.
- [173] V. Villeret, S. Huang, Y. Zhang, Y. Xue, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4299.
- [174] H. Ke, W. N. Lipscomb, noch unveröffentlicht.
- [175] R. Zhang, H. J. Fromm, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8190.
- [176] L. Shyur, R. Zhang, H. J. Fromm, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *319*, 123; M. Chen, L. Chen, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5554; L. Chen, R. Hegde, M. Chen, H. J. Fromm, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *307*, 350; R. Zhang, L. Chen, V. Villeret, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 54; M. El-Maghrabi, M. Gidh-Jain, L. R. Austin, S. J. Pilks, *ibid.* **1993**, *268*, 9466; M. El-Maghrabi, L. R. Austin, J. J. Correia, S. J. Pilks, *ibid.* **1992**, *267*, 6526; M. Gidh-Jain, Y. Zhang, P. D. van Poelje, J. Liang, S. Huang, J. Kim, J. T. Elliott, M. D. Erion, S. J. Pilks, M. El-Maghrabi, W. N. Lipscomb, *ibid.* **1994**, *269*, 27732.
- [177] N. Kelley, E. L. Giroux, G. Lu, E. R. Kantrowitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 848.
- [178] E. Hubert, J. Villanueva, A. Gonzalez, F. Marcus, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *138*, 590; W. J. Black, A. Van Tol, J. Fernando, B. L. Horecker, *ibid.* **1972**, *151*, 576; G. Colombo, F. Marcus, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2743; K. Nakashima, S. Tuboi, *ibid.* **1976**, *251*, 4315; F. Marcus, M. M. Hosey, *ibid.* **1980**, *255*, 2481.
- [179] J. R. Atack, H. B. Broughton, S. J. Pollack, *FEBS Lett.* **1995**, *361*, 1.
- [180] F. Strasser, P. D. Pelton, A. J. Ganzhorn, *Biochem. J.* **1995**, *307*, 585.
- [181] S. J. Pollack, J. R. Atack, M. R. Knowles, G. McAllister, C. Ragan, R. Baker, S. R. Fletcher, L. L. Iversen, H. B. Broughton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5766.
- [182] A. J. Ganzhorn, M. Chanal, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6065.
- [183] A. P. Leech, G. R. Baker, J. K. Shute, M. A. Cohen, D. Gani, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 693.
- [184] R. Bone, L. Frank, J. P. Springer, J. R. Atack, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9468.
- [185] R. C. Inhorn, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 15946.
- [186] J. K. Shute, R. Baker, D. C. Billington, D. Gani, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, *626*.
- [187] R. Bone, L. Frank, J. P. Springer, S. J. Pollack, S. Osborne, J. R. Atack, M. R. Knowles, G. McAllister, C. Ragan, H. B. Broughton, R. Baker, S. R. Fletcher, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9460.

- [188] Wegen seiner geringen Streukraft ist Lithium nur schwer in Proteinstrukturanalysen zu bestimmen.
- [189] S. J. Pollock, M. R. Knowles, J. R. Attack, H. B. Broughton, I. Ragan, S. Osborne, G. McAllister, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 281.
- [190] R. Baker, J. J. Kulagowski, D. C. Billington, P. D. Leeson, I. C. Lennon, N. Liverton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1383.
- [191] B. V. Potter, D. Lampe, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2085; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1933; P. W. Majerus, T. S. Ross, T. W. Cunningham, K. K. Caldwell, A. B. Jefferson, V. S. Bansal, *Cell* **1990**, *63*, 459; P. W. Majerus, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 225.
- [192] R. C. Inhorn, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14559.
- [193] R. C. Inhorn, V. S. Bansal, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2170.
- [194] J. D. York, J. E. Saffitz, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19992.
- [195] Die aktiven Zentren wurden ausschließlich anhand der zwei Metallionen und der C_z-Koordinaten, die in der Abbildung dargestellt sind, überlagert. Es wurde ein Kleinstes-Quadrat-Algorithmus benutzt, wie er in dem Programm O implementiert ist: T. A. Jones, M. Kjeldgaard in *From First Map to Final Model. Proceedings of the CCP4 Study Weekend* (Hrsg.: S. Bailey, R. Hubbard, D. Waller), Daresbury Laboratory, Warrington, **1994**, S. 1.
- [196] A. Volbeda, A. Lahm, F. Sakiyama, D. Suck, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1607.
- [197] E. Hough, L. K. Hansen, B. Birknes, K. Jynge, S. Hansen, A. Hordvik, C. Little, E. Dodson, Z. Derewenda, *Nature* **1989**, *338*, 357.
- [198] A. C. Ottolenghi, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *106*, 510.
- [199] M. A. Clark, R. G. Shorr, J. S. Bomalaski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *140*, 114.
- [200] C. Little, A. Otnaess, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *391*, 326; C. Little, *Acta Chem. Scand. B* **1981**, *35*, 39.
- [201] C. Little, S. Aakre, M. G. Rumsby, K. Gwarsha, *Biochem. J.* **1982**, *207*, 117; A. Otnaess, *FEBS Lett.* **1980**, *114*, 202.
- [202] R. Bicknell, G. R. Hanson, B. Holmquist, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4219.
- [203] S. Hansen, E. Hough, L. A. Svensson, Y. Wong, S. F. Martin, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 179.
- [204] S. Hansen, L. K. Hansen, E. Hough, *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*, 543.
- [205] S. Hansen, L. K. Hansen, E. Hough, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 870.
- [206] S. F. Martin, Y. Wong, A. S. Wagman, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4821.
- [207] S. Sundell, S. Hansen, E. Hough, *Protein Eng.: Proc. Int. Conf. Protein Eng. 2nd* **1994**, *7*, 571.
- [208] K. Shishido, T. Ando in *Nucleases* (Hrsg.: S. M. Linn, R. J. Roberts), Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1982**, S. 155; B. V. Potter, B. A. Connolly, F. Eckstein, *Biochemistry* **1983**, *22*, 1369; D. Suck in *Molecular Structure and Life* (Hrsg.: T. Kyogaku, Y. Nishimura), CRC, Boca Raton, FL, **1992**, S. 141; M. A. Chaudhry, M. Weinfeld, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3805; H. C. Box, E. E. Budzinski, M. S. Evans, J. B. French, A. E. Maccubbin, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1161*, 291.
- [209] M. Fujimoto, A. Kuninaka, H. Yoshino, *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 785.
- [210] M. Fujimoto, A. Kuninaka, H. Yoshino, *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1555; M. Fujimoto, K. Fujiyama, A. Kuninaka, H. Yoshino, *ibid.* **1974**, *38*, 2141; M. Fujimoto, A. Kuninaka, H. Yoshino, *ibid.* **1975**, *39*, 1991; *ibid.* **1975**, *39*, 2145.
- [211] S. Spitzer, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11691.
- [212] D. Suck, EMBL Heidelberg, persönliche Mitteilung. Die zur Darstellung des aktiven Zentrums der Nuclease P1 in Abbildung 3 verwandten Koordinaten sind die der orthorhombischen Kristallform der Nuclease P1 aus *Penicillium citrinum* [193].
- [213] K. Shishido, N. Habuka, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *884*, 215.
- [214] B. V. Potter, P. J. Romanuk, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1758.
- [215] S. S. Cooperman, *Methods Enzymol.* **1982**, *87*, 526; R. Lahti, *Microbiol. Rev.* **1983**, *47*, 169.
- [216] K. M. Welsh, A. Jacobyansky, B. Springs, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **1983**, *22*, 2243.
- [217] J. Kankare, T. Salminen, R. Lahti, B. S. Cooperman, A. B. Baykov, A. Goldman, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1996**, *52*, 551; J. Kankare, G. S. Neal, T. Salminen, T. Glumhoff, B. S. Cooperman, R. Lahti, A. Goldman, *Protein Eng.: Proc. Int. Conf. Protein Eng. 2nd* **1994**, *7*, 823; V. Yu. Oganessyan, S. A. Kurilova, N. N. Vorob'eva, T. I. Nazarova, A. N. Popov, A. A. Lebedev, S. M. Avaeva, E. H. Harutyunyan, *FEBS Lett.* **1994**, *348*, 301.
- [218] J. Kankare, T. Salminen, R. Lahti, B. S. Cooperman, A. A. Baykov, A. Goldman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4670.
- [219] E. G. Harutyunyan, V. Yu. Oganessyan, N. N. Oganessyan, S. S. Terzyan, A. N. Popov, S. V. Rubinskii, B. K. Vainshtein, T. I. Nazarova, S. A. Kurilova, N. N. Vorob'eva, S. M. Avaeva, *Crystallogr. Rep.* **1996**, *41*, 77 (*Kristallografiya* **1996**, *41*, 96).
- [220] N. Y. Chirgadze, I. P. Kuranova, N. A. Nevskaia, A. V. Teplyakov, K. Wilson, B. V. Strokopytov, E. G. Arutyunyan, V. Khene, *Sov. Phys. Crystallogr. Engl. Transl.* **1991**, *36*, 72 (*Kristallografiya* **1991**, *36*, 128).
- [221] A. Teplyakov, G. Obmolova, K. S. Wilson, K. Ishii, H. Kaji, T. Samejima, I. Kuranova, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1098.
- [222] B. S. Cooperman, A. A. Baykov, R. Lahti, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 262.
- [223] M. A. Gonzalcz, M. R. Webb, K. M. Welsh, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **1984**, *23*, 797.
- [224] A. A. Baykov, T. Hyttia, S. E. Volk, V. N. Kasho, A. V. Vener, A. Goldman, R. Lahti, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 4655.
- [225] W. B. Knight, D. Dunaway-Mariano, S. C. Ranson, J. J. Villafranca, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2886.
- [226] T. Salminen, J. Käpylä, P. Heikinheimo, J. Kankare, A. Goldman, J. Heinonen, A. A. Baykov, B. S. Cooperman, R. Lahti, *Biochemistry* **1995**, *34*, 782.
- [227] D. N. Frick, D. J. Weber, C. Abeeyunawardana, A. G. Gittis, M. J. Bessman, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5577.
- [228] C. Abeeyunawardana, D. J. Weber, A. G. Gittis, D. N. Frick, J. Lin, A.-F. Miller, M. J. Bessman, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14997.
- [229] G. D. Markham, E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *Methods Enzymol.* **1983**, *94*, 219.
- [230] M. Kotb, N. M. Kredich, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1039*, 253.
- [231] S. H. Mudd, G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* **1958**, *231*, 481.
- [232] C. Zhang, G. D. Markham, R. LoBrutto, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9866; G. D. Markham, *ibid.* **1984**, *23*, 470.
- [233] G. D. Markham, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1903.
- [234] G. D. Markham, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1507.
- [235] F. Takusagawa, S. Kamitori, S. Misaki, G. D. Markham, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 136.
- [236] F. Takusagawa, S. Kamitori, G. D. Markham, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2568.
- [237] T. D. Meek, J. J. Villafranca, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5513; R. E. Weisbrod, A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3997.
- [238] L. M. Abell, J. J. Villafranca, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1413.
- [239] M. M. Yamashita, R. J. Almassy, C. A. Janson, D. Cascio, D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17681; S. Liaw, C. Pan, D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4996; R. J. Almassy, C. A. Janson, R. Hamlin, N. H. Xuong, D. Eisenberg, *Nature* **1986**, *323*, 304; S. Liaw, G. Jun, D. Eisenberg, *Biochemistry* **1994**, *33*, 11184.
- [240] S. Liaw, D. Eisenberg, *Biochemistry* **1994**, *33*, 675.
- [241] J. J. Villafranca, M. S. Balakrishnan, F. C. Wedler *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *75*, 464.
- [242] A. M. Dhalla, B. Li, M. F. Alibhai, K. J. Yost, J. M. Hemmingsen, W. M. Atkins, J. Schineller, J. J. Villafranca, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 476.
- [243] M. Watanabe, S. Takebe, K. Kobashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 980; D. P. Dumas, J. R. Wild, F. M. Raushel, *Experientia* **1990**, *46*, 729.
- [244] D. P. Dumas, S. R. Caldwell, J. R. Wild, F. M. Raushel, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19659.
- [245] T. S. Scanlan, R. C. Reid, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 71.
- [246] K. Lai, N. J. Stolowich, J. R. Wild, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 59; D. P. Dumas, H. D. Durst, W. G. Landis, F. M. Raushel, J. R. Wild, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *277*, 155.
- [247] W. J. Donarski, D. P. Dumas, D. P. Heitmeyer, V. E. Lewis, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4650.
- [248] G. A. Omburo, J. M. Kuo, L. S. Mullins, F. M. Raushel, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13278.
- [249] M. Y. Chae, G. A. Omburo, P. A. Lindahl, F. M. Raushel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *316*, 765.
- [250] G. A. Omburo, L. S. Mullins, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9148.
- [251] D. P. Dumas, F. M. Raushel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 21498.
- [252] J. A. Banzon, J. M. Kuo, D. R. Fischer, P. J. Stang, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1995**, *34*, 750; K. Lai, K. I. Dave, J. R. Wild, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16579.
- [253] V. E. Lewis, W. J. Donarski, J. R. Wild, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1591.
- [254] S. R. Caldwell, J. R. Newcomb, K. A. Schlecht, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7438.
- [255] S. R. Caldwell, F. M. Raushel, P. M. Weiss, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7444.
- [256] M. M. Benning, J. M. Kuo, F. M. Raushel, H. M. Holden, *Biochemistry* **1994**, *33*, 15001.
- [257] M. M. Benning, J. M. Kuo, F. M. Raushel, H. M. Holden, *Biochemistry* **1995**, *34*, 7973.
- [258] S. Hong, J. M. Kuo, L. S. Mullins, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7580.
- [259] T. Lundqvist, G. Schneider, *Biochemistry* **1991**, *30*, 904; G. H. Lorimer, M. R. Badger, T. J. Andrews, *ibid.* **1976**, *15*, 529.
- [260] E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Science* **1995**, *268*, 998.
- [261] R. T. Morrison, R. N. Boyd, *Organic Chemistry*, 5. Aufl., Allyn and Bacon, Boston, **1987**, S. 768.
- [262] a) *Enzyme Mechanisms* (Hrsg.: M. Page, A. Williams), The Royal Society of Chemistry, London, **1987**; b) A. Williams in Lit [262a], S. 123; c) D. S. Auld in Lit. [262a] S. 240.
- [263] A. Taylor, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 167.
- [264] A. Taylor, *FASEB J.* **1993**, *7*, 290.
- [265] S. H. Wilkes, J. M. Prescott, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13154.
- [266] A. Taylor, C. Z. Peltier, F. J. Torre, N. Hakamian, *Biochemistry* **1993**, *32*, 784.
- [267] A. B. Shenvi, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1286.
- [268] J. O. Baker, J. M. Prescott, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *130*, 1154.
- [269] B. Lejczak, P. Kafarski, J. Zygmunt, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3549; P. P. Gianousis, P. A. Bartlett, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1603.

- [270] L. Andersson, J. MacNeela, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1985**, *24*, 330; L. Frick, R. Wolfenden, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *829*, 311.
- [271] C. Kettner, G. I. Glover, J. M. Prescott, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 739.
- [272] P. L. Birch, H. A. El-Obeid, M. Akhtar, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *148*, 447.
- [273] S. L. Harbeson, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1378.
- [274] R. E. Beattie, D. T. Elmore, C. H. Williams, D. J. Guthrie, *Biochem. J.* **1987**, *245*.
- [275] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Adv. Enzymol.* **1994**, *68*, 153; R. J. Delange, E. L. Smith in *The Enzymes*, Vol. 3, 3. Aufl. (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1971**, S. 81; E. L. Smith, R. L. Hill in *The Enzymes*, Vol. 4, 2. Aufl. (Hrsg.: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck), Academic Press, New York, **1960**, S. 37.
- [276] F. H. Carpenter, J. M. Vahl, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 294.
- [277] G. A. Thompson, F. H. Carpenter, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 53.
- [278] G. A. Thompson, F. H. Carpenter, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1618.
- [279] M. P. Allen, A. H. Yamada, F. H. Carpenter, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3778.
- [280] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5006.
- [281] J. Berger, M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1939**, *130*, 641; M. J. Johnson, G. Johnson, W. H. Peterson, *ibid.* **1936**, *116*, 515; E. L. Smith, D. H. Spackman, *ibid.* **1955**, *212*, 271; E. L. Smith, *ibid.* **1946**, *163*, 15; H. E. Van Wart, S. H. Lin, *Biochemistry* **1981**, *20*, 5682.
- [282] S. Himmelhoch, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *134*, 597.
- [283] C. J. Stirling, S. D. Colloms, J. F. Collins, G. Szatmari, D. J. Sherratt, *EMBO J.* **1989**, *8*, 1623; R. McCulloch, M. E. Burke, D. J. Sherratt, *Mol. Microbiol.* **1994**, *12*, 241.
- [284] S. K. Burley, P. R. David, A. Taylor, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6878.
- [285] S. K. Burley, P. R. David, R. M. Sweet, A. Taylor, W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 113.
- [286] N. Sträter, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14792.
- [287] S. K. Burley, P. R. David, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6916.
- [288] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8465.
- [289] N. Sträter, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9200.
- [290] J. M. Prescott, S. H. Wilkes, *Methods Enzymol.* **1976**, *45*, 530; J. M. Prescott, S. H. Wilkes, F. W. Wagner, K. J. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1756; J. M. Prescott, S. H. Wilkes, *Methods Enzymol.* **1976**, *45*, 530.
- [291] M. E. Bayliss, J. M. Prescott, *Biochemistry* **1986**, *25*, 8113; J. M. Prescott, F. W. Wagner, B. Holmquist, B. L. Vallee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *114*, 646; J. M. Prescott, F. W. Wagner, B. Holmquist, B. L. Vallee, *Biochemistry* **1985**, *24*, 5350.
- [292] B. Chevrier, C. Schalk, H. D'Orchymont, J. Rondeau, D. Moras, C. Tarnus, *Structure* **1994**, *2*, 283.
- [293] A. Ben-Bassat, K. Bauer, S. Y. Chang, K. Myambo, A. Boosman, S. Chang, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 751.
- [294] C. G. Miller, K. L. Strauch, A. M. Kukral, J. L. Miller, P. T. Wingfield, G. J. Mazzei, R. C. Werlen, P. Gruber, N. R. Movva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2718; R. L. Kendall, R. A. Bradshaw, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20667; R. P. Moerschell, Y. Hosokawa, S. Tsunasawa, F. Sherman, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 19638; P. H. Hirel, M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8247.
- [295] M. J. Butler, A. Bergeron, G. Soostmeyer, T. Zimny, L. T. Malek, *Gene* **1993**, *123*, 115.
- [296] F. Endo, A. Tanoue, H. Nakai, Y. Indo, K. Titani, I. Matsuda, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4476.
- [297] S. Wu, S. Gupta, N. Chatterjee, R. E. Hileman, T. G. Kinzy, N. D. Denslow, W. C. Merrick, D. Chakrabarti, J. C. Osterman, N. K. Gupta, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10796.
- [298] J. F. Bazan, L. H. Weaver, S. L. Roderick, R. Huber, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2473.
- [299] S. M. Arfin, R. L. Kendall, L. Hall, L. H. Weaver, A. E. Stewart, B. W. Matthews, R. A. Bradshaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7714.
- [300] S. L. Roderick, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3907.
- [301] N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Science* **1976**, *191*, 1144.
- [302] C. M. Collins, S. E. D'Orazio, *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 907.
- [303] C. T. Walsh, W. H. Orme-Johnson, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4901; R. L. Blakeley, J. A. Hinds, H. E. Kunze, E. C. Webb, B. Zerner, *ibid.* **1969**, *8*, 1991.
- [304] S. J. Lippard, *Science* **1995**, *268*, 996.
- [305] N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4131.
- [306] I.-S. Park, R. P. Hausinger, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5345.
- [307] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15835.
- [308] M. G. Finnegan, A. T. Kowal, M. T. Werth, P. A. Clark, D. E. Wilcox, M. K. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4030; S. S. Hasnain, B. Piggott, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 279; L. Alagna, S. S. Hasnain, B. Piggott, D. J. Williams, *Biochem. J.* **1984**, *220*, 591; S. Wang, M. H. Lee, R. P. Hausinger, P. A. Clark, D. E. Wilcox, R. A. Scott, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1589.
- [309] S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 5837; M. H. Lee, S. B. Mulrooney, M. J. Renner, Y. Markowicz, R. P. Hausinger, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 4324; I. S. Park, M. B. Carr, R. P. Hausinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3233.
- [310] I. S. Park, R. P. Hausinger, *Science* **1995**, *267*, 1156.
- [311] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1926**, *69*, 435.
- [312] M. J. Todd, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5963.
- [313] P. R. Martin, R. P. Hausinger, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 20024; M. J. Todd, R. P. Hausinger, *ibid.* **1991**, *266*, 24327.
- [314] I. Park, R. P. Hausinger, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1034.
- [315] I. S. Park, R. P. Hausinger, *J. Protein Chem.* **1993**, *12*, 51.
- [316] N. E. Dixon, P. W. Riddles, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 1335.
- [317] K. M. Harmon, C. Niemann, *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 601.
- [318] J. M. Breitenbach, R. P. Hausinger, *Biochem. J.* **1988**, *250*, 917.
- [319] D. K. Wilson, F. B. Rudolph, F. A. Quiroga, *Science* **1991**, *252*, 1278.
- [320] Die Farbgebung bezieht sich auf den in vivo angenommenen Metallgehalt (siehe Tabelle 1).
- [321] Die Nummern der beiden Metallbindungsstellen in IMP sind vertauscht gegenüber denen aus der Veröffentlichung, die diese Struktur beschreibt [208], um gleiche Nummern der homologen Bindungsstellen in FBP und IMP zu erhalten.
- [322] A. F. Neuwald, J. D. York, P. W. Majerus, *FEBS Lett.* **1991**, *294*, 16; R. E. Diehl, P. Whiting, J. Potter, N. Gee, C. I. Ragan, D. Linemeyer, R. Schoepfer, C. Bennett, R. A. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5946; J. D. York, J. W. Ponder, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5149.
- [323] P. L. Birch, H. A. El-Obeid, M. Akhtar, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *148*, 447.
- [324] P. P. Giannousis, P. A. Bartlett, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1603.
- [325] L. Andersson, T. C. Isley, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4177.