

Multidisziplinäre Methoden zur Bestimmung der Kristallstruktur der D-Ribose – Parallelen zur Ermittlung von Proteinstrukturen

Wolfram Saenger*

D-Ribose · DNA · Kohlenhydrate · Nucleoside ·
Strukturaufklärung

Die chemische Struktur der offenkettigen D-Ribose mit der Formel $C_5H_{10}O_5$ wirkt trivial, jedoch kann D-Ribose in vier verschiedenen cyclischen Formen kommen, zwei mit fünfgliedriger α - oder β -Furanose und zwei mit sechsgliedriger α - oder β -Pyranose (siehe Schema 1 in Lit. [1]). Die β -Furanosen sind Bestandteile der Ribonucleoside mit vier verschiedenen Nucleobasen (Adenin, Uracil, Guanin, Cytosin) in β -glycosidischer Bindung (Abbildung 1) und von Ribonucleotiden mit zusätzlicher Phosphatgruppe am O5'-Atom, die als Teile von Kofaktoren oder des Energiespeichers Adenosintri-phosphat (ATP) auftreten. Die Ribonucleotide sind die Bausteine der Ribonucleinsäure (RNA) und die verwandten 2'-Desoxyribonucleotide (O^{2'}-H ist durch H ersetzt) die Bausteine der 2'-Desoxyribonucleinsäure (DNA).

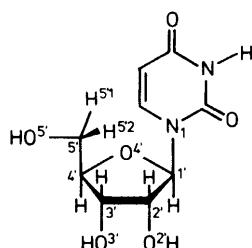


Abbildung 1. Uridin, eines der vier β -D-Ribonucleoside der RNA; seine 2'-Desoxy-Form ist einer der vier Bausteine der DNA. Uridin und die anderen Nucleoside sind Derivate der in Schema 1 von Lit. [1] gezeigten β -D-Furanose, die in vielen biologischen Molekülen vorkommt, während ausschließlich α - und β -Pyranose in kristallisierter D-Ribose vorliegen.^[1]

Ein wesentliches Merkmal der β -Furanose in Ribosen oder in 2'-Desoxyribosen der Nucleinsäuren ist, dass der fünfgliedrige Ring nicht planar sondern gewellt vorliegt, entweder in C2'-endo- oder in C3'-endo-Envelope-Konfor-

mation, und die Umwandlung zwischen den beiden Formen auf einer Pseudorotation beruht.^[2] Die Energiebarriere für die Umwandlung ist so klein, dass die beiden Konformationen in Lösung in einem Gleichgewicht koexistieren, in dem eine der beiden Formen je nach Bedingungen bevorzugt ist. In DNA kann die 2'-Desoxyribose diese beiden Zustände annehmen; die C2'-endo-Konformation (B-DNA) entspricht dem nativen Zustand in Chromatin, während die C3'-endo-Konformation (A-DNA) dann vorliegt, wenn DNA einen Komplex mit RNA während der Transkription bildet (die genetische Information, die in der Nucleotidsequenz der DNA verschlüsselt vorliegt, wird in die komplementäre Sequenz der Messenger-RNA übersetzt). Der Grund hierfür ist, dass D-Ribose-haltige RNA nur als doppelhelicale A-RNA mit ausschließlicher C3'-endo-Konformation vorliegen kann.

Das Vorkommen von β -Furanose statt β -Pyranose in den Nucleinsäuren ist eng verbunden mit der strukturellen Flexibilität der β -Furanose. β -Pyranose ist hingegen starr, weil der sechsgliedrige Ring nur eine Sesselform einnehmen kann und nicht zur Pseudorotation in der Lage ist. Wenn β -Pyranose mit den vier Nucleobasen in β -glycosidischer Bindung substituiert wird und die gebildeten Hexose-Nucleoside durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft werden, kann das entstandene polymere Molekül ebenfalls Doppelhelices wie die DNA bilden,^[3] doch können diese (wegen ihrer Starrheit) die DNA nicht in biologischer Hinsicht ersetzen.

Wegen des Vorkommens der D-Ribose in Nucleinsäuren war ihre Struktur von beträchtlichem Interesse und bereits 1956 das Ziel einer Röntgendiffraktionsstudie. Weil D-Ribose nur in mikrokristalliner Form erhalten werden konnte, gelang es zwar, die Raumgruppe und die Elementarzelle zu bestimmen, nicht aber die dreidimensionale Struktur.^[4] Einige Jahre zuvor hatte Furberg die erste Struktur des Nucleosids Cytidin im Kristall bestimmt,^[5] das β -Furanose und die Nucleobase Cytosin enthält (Cytidin ist analog zu Uridin in Abbildung 1 aufgebaut) und dessen Konfiguration von wesentlicher Bedeutung für den Aufbau der doppelhelicalen Struktur von DNA durch Watson und Crick war.^[6]

Kehren wir zur Struktur der D-Ribose im Kristall zurück. Seit den ersten Versuchen, dieses Molekül zu kristallisieren,^[4] muss es viele erfolglose (und deshalb nicht publizierte) Versuche gegeben haben, Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu züchten. Es vergingen 50 Jahre, bis ein multidiszipli-

[*] W. Saenger
Institut für Chemie und Biochemie/Kristallographie
Freie Universität Berlin
Takustraße 6, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: saenger@chemie.fu-berlin.de

närer Ansatz initiiert wurde, der moderne Methoden wie Pulver- und Einkristall-Diffraktometrie sowie Festkörper- ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie (MAS = magic angle spinning) umfasste, um die Struktur der D-Ribose zu ermitteln. Wie in der Arbeit von Šišak et al.^[1] beschrieben ist, schlugen viele Versuche fehl, D-Ribose in einer für die Einkristall-Röntgendiffraktometrie geeigneten Form zu züchten.^[1] Lediglich mikrokristalline Proben, die schon von Furberg et al.^[4] beschrieben worden waren, konnten in zahlreichen Versuchen erhalten werden, die mit Pulver-Röntgendiffraktometrie unter Anwendung von Synchrotron-Strahlung untersucht wurden. Weil die asymmetrische Einheit der Mikrokristalle groß genug ist, um zwei lineare D-Ribosen, zwei α - β -Furanosen, zwei α - β -Pyranosen oder Kombinationen von je zwei dieser Moleküle aufzunehmen, waren viele Versuche nötig, um mithilfe von Pulver-Diffraktionsanalysen zu ermitteln, welche zwei Moleküle tatsächlich in der asymmetrischen Einheit vorliegen.

Dies war sehr mühsam, weil all die möglichen Strukturen berücksichtigt und gegen die gemessenen Pulver-Diffraktionspektren getestet werden mussten. Hierbei spielte das Optimierungsprogramm FOX in Kombination mit Differenz-Fourier-Techniken eine wichtige Rolle, und nur nach vielen Zyklen der Strukturverfeinerung ergab sich schließlich ein konsistentes Bild.^[1] Die verwendeten Techniken sind übrigens so neu und vielversprechend, dass Lynne B. McCusker von der ETH Zürich, eine der Coautorinnen der Publikation,^[1] während des 25. European Crystallographic Meeting (ECM25) in Istanbul die angewendeten Methoden in einem viel beachteten Vortrag erläuterte.

Pulver-Röntgendiffraktometrie hatte zwar bereits gezeigt, dass die asymmetrische Einheit der D-Ribose nur Pyranosen (keine Furanosen) in $^4\text{C}_1$ -Sesselform enthält (je eine β -Pyranose mit äquatorialer OH-Gruppe am anomeren C1-Atom und eine α -Pyranose mit axialer OH-Gruppe),^[1] der endgültige Beweis für die Korrektheit der Struktur musste jedoch durch Einkristall-Röntgendiffraktometrie erbracht werden.

Weil nur mikrokristalline Pulver bei der Kristallisation der D-Ribose erhalten werden konnten, wurde die Gruppe um Boese von der Universität Duisburg-Essen mit an Bord geholt, die sich auf Zonenschmelze spezialisiert hatte, um Einkristalle aus mikrokristallinen Proben zu erhalten.^[7] Tatsächlich gelang es nun, Einkristalle zu züchten, die für die Röntgenstrukturanalyse geeignet waren und eindeutig zeigten, dass die aus der Pulver-Diffraktionsanalyse erhaltenen Daten im Wesentlichen korrekt waren. Es gibt jedoch einen Unterschied bezüglich der α -Pyranose-Moleküle in der Pulver- und in der Einkristallprobe, die, wie sich herausstellte, im Einkristall aus einer Mischung von β - und α -Pyranose im molaren Verhältnis 1:1 bestehen, wodurch sich letztlich ein β / α -Pyranose-Verhältnis von insgesamt 3:1 in der asymmetrischen Einheit ergibt.

Wie aus NMR-Spektren^[8] seit 1976 bekannt war, liegt in Wasser gelöste D-Ribose als Mischung der in Schema 1 (Lit. [1]) gezeigten Moleküle vor, unter denen β -Pyranose vorherrscht. In der jetzigen Studie wurden Festkörper- ^{13}C -MAS-NMR-Spektren von mikrokristalliner D-Ribose bei 20°C, bei der Schmelztemperatur der Mikrokristalle von 90°C, bei 20°C nach Abkühlung der Probe und einen Monat

später bei 4°C aufgenommen. Das integrierte Peak-Verhältnis der ^{13}C -Signale der anomeren C-Atome bei 94.9 und 92.5 ppm für β - und α -Pyranosen zeigte ein Verhältnis von 2:1 an. In der Schmelze lag eine Mischung aus Furanose- und Pyranose-Formen mit 46% β -Pyranose vor, und nach Abkühlung auf 20°C zeigte die Schmelze zwei breite und formlose Peaks, die sich nach einem Monat in ein Spektrum umgewandelt hatten, das dem bei 20°C aufgenommenen Originalspektrum glich, mit einem molaren Verhältnis von 2.5:1 für β - und α -Pyranosen und in annehmbarer Übereinstimmung mit dem 3:1-Verhältnis in Einkristallen.

Die NMR-Spektren und die Kristallstrukturdaten ließen es ratsam erscheinen, die Pulver-Diffraktionsanalyse zu wiederholen, die jetzt in der asymmetrischen Einheit statt reiner α -Pyranose ein β / α -Verhältnis von 0.27:0.73 andeutete, während die β -Pyranose nicht geändert war. Dies ergab ein β / α -Pyranose-Verhältnis von insgesamt 1.7:1 und war in Einklang mit dem obigen 2:1-Verhältnis aus NMR-Spektren. Das davon abweichende 3:1-Verhältnis der Einkristallstudie könnte auf das Zonenschmelz-Verfahren zurückgeführt werden.

Der hier beschriebene Ansatz für die Bestimmung der Kristallstruktur der D-Ribose ist ein Musterbeispiel für die Lösung eines wissenschaftlichen Problems, das sich mehrere Dekaden lang als äußerst hartnäckig erwiesen hatte. Der Durchbruch war nur möglich, weil sich die Methoden während der letzten 20 Jahre verbessert haben. Zu nennen sind hier vor allem die Anwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung in der Pulver- und Einkristall-Diffraktometrie (mit der Zonenschmelze, um mikrokristallines Material in Einkristalle zu überführen) sowie die Festkörper- ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie.

Diese Situation ähnelt jener auf Gebiet der makromolekularen (Protein-)Strukturbestimmung. Wegen der großen Zellvolumina können Pulver-Diffraktionsmethoden selbst mit Synchrotronstrahlung nur bis zu geringer Auflösung (5 Å) verwendet werden.^[9] Die Festkörper- ^{13}C -MAS-NMR-Spektroskopie von Proteinen wird stetig verbessert, erfordert aber mikrokristalline oder zweidimensionale kristalline Proben.^[10] In einem interdisziplinären Ansatz kann (Kryo-)Elektronenmikroskopie von einzelnen Proteinen oder von Multiproteinkomplexen eine erste Struktur bei niedriger Auflösung liefern, die anschließend verwendet werden kann, um zu einer höheren Auflösung zu gelangen, wenn Strukturen von einigen oder allen Proteinen des jeweiligen Komplexes im Kristall bekannt sind und mit dem elektronenmikroskopisch erhaltenen Bild kombiniert werden können.

Eine weitere Methode wird in naher Zukunft mit der Konstruktion von Freie-Elektronen-Lasern (davon einer am DESY/Hamburg) zur Verfügung stehen. Diese Laser stellen kohärente Röntgenstrahlung bereit, mit der ein mittel- bis hochaufgelöstes dreidimensionales Bild einer Molekülstruktur oder eines Molekülkomplexes jedweder Größe und Komplexität in sehr kurzer Zeit erhalten werden kann, bevor der hochenergetische Strahl des Lasers das Molekül zerstört.^[11,12] Das so erhaltene Bild kann genügend detailliert sein, um mithilfe von „molekularem Ersatz“ (einer geläufigen Methode in der Proteinkristallographie) und konventionellen Röntgendiffraktionsdaten der entsprechenden Kristalle eine hochaufgelöste Struktur des jeweiligen Proteins zu erhalten;

alternativ können individuelle Proteinstrukturen mit hoher Auflösung in das Bild eingepasst werden, wie oben für die Elektronenmikroskopie erläutert wurde.

Eingegangen am 12. Mai 2010

Online veröffentlicht am 29. Juli 2010

-
- [1] D. Šišak, L. B. McCusker, G. Zandomenighi, B. Meier, D. Bläser, R. Boese, W. B. Schweizer, R. Gilmour, J. D. Dunitz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4605–4608; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4503–4505.
 - [2] C. Altona, M. Sundralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205–8212.
 - [3] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118–2124.
 - [4] S. Furberg, A. Hordvik, K. Taulbøl, *Acta Chem. Scand.* **1956**, *10*, 135–136.
 - [5] S. Furberg, *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 751–761.
 - [6] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
 - [7] R. Boese, M. Nussbaumer in *In situ Crystallization Techniques In Organic Crystal Chemistry* (Hrsg.: D. W. Jones), Oxford University Press, Oxford **1994**, S. 20–37; OHCD: www.sci.ohcd.eu.
 - [8] E. Breitmaier, U. Hollstein, *Org. Magn. Reson.* **1976**, *8*, 573–575.
 - [9] S. Basso, C. Besnard, J. P. Wright, I. Margiolaki, A. Fitch, P. Pattison, M. Schultz, *Acta Crystallogr. D* **2010**, *66*, 756–761.
 - [10] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98–102.
 - [11] R. Neutze, R. Wouts, D. van der Speel, E. Weckert, J. Hajdu, *Nature* **2000**, *406*, 752–757.
 - [12] A. P. Mancuso, Th. Gorniak, F. Staier, O. M. Yefanov, R. Barth, C. Christophis, B. Reime, J. Gulden, A. Singer, M. E. Pettit, Th. Nisius, T. Wilhein, C. Gutt, G. Grübel, N. Guerassimova, R. Treusch, J. Feldhaus, S. Eisebitt, E. Weckert, M. Grunze, A. Rosenhahn, I. A. Vartanyants, *New J. Phys.* **2010**, *12*, 035003.
-