

**Struktur-Aktivitätsuntersuchungen antiviraler Vorläufer-  
medikamente an Thymidylatkinasen**

**Proteindesign für die gentherapeutische Pharmakomodulation der  
zellulären AZT-Aktivierung in der HIV-Therapie**

genehmigte  
Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

eingereicht von

Dipl.-Chem. Nils Ostermann  
aus Münster

Dortmund, März 2000

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 02. März 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1997 bis März 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. S. Goody durchgeführt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. R. S. Goody**

**2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	VII
<b>Tabellenverzeichnis</b>	XII
<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Ein globales Bild der AIDS Pandemie - Zahlen und Fakten	1
1.2 Aufbau und Lebenszyklus des HI-Virus	3
1.3 Anti AIDS Medikamente in klinischer Anwendung und in der Entwicklung	5
1.4 Metabolisierung der nukleosidischen HIV-RT-Hemmer AZT, d4T und FLT in der Zelle	12
1.5 Genetische Pharmakomodulation zur Verbesserung der Aktivierung nukleosidischer RT-Hemmer	17
1.6 Die Thymidylatkinase - das Schlüsselenzym bei der AZT- und FLT-Aktivierung; TMPK aus Hefe als Modell für das menschliche Enzym	20
1.7 Thymidylatkinase aus <i>E. coli</i>	25
<b>2 Aufgabenstellung und Zielsetzung</b>	28
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	30
3.1 AZTMP, ein gutes Substrat der <i>E. coli</i> TMPK - die strukturelle Erklärung	30
3.1.1 Synthese der Binukleotidinhibitoren $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Thymidyl)- pentaphosphat (Tp5A) und $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Azidothymidyl)- pentaphosphat (AZTp5A)	31
3.1.2 Affinitätsbestimmung der Inhibitoren Tp5A und AZTp5A zu <i>E. coli</i> TPMK	33
3.1.3 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung des <i>E. coli</i> TMPK-AZTp5A-Komplexes	35
3.1.4 Die Struktur der <i>E. coli</i> TMPK im Komplex mit AZTp5A	39
3.1.5 Die strukturelle Erklärung der guten AZTMP-Substrateigenschaften von <i>E. coli</i> TMPK	43

3.2 Die menschliche Thymidylatkinase - Strukturen verschiedener Nukleotidkomplexe offenbaren Einblicke in den katalytischen Mechanismus	47
3.2.1 Überexpression und Aufreinigung der R200A-Mutante der menschlichen TMPK	49
3.2.2 Kinetischer Vergleich der Wildtyp TMPK mit der R200A-Mutante und Affinitätsbestimmung von Tp5A-mant und Tp5A zu der R200A-Mutante	50
3.2.3 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK-R200A-Mutante im Komplex mit TMP-ADP, TMP-AppNHp, TMP-ADP-AIF <sub>3</sub> , TDP-ADP und Tp5A	54
3.2.4 Die Topologie und die dreidimensionale Struktur der menschlichen TMPK	60
3.2.5 Verschiedene Substratzustände offenbaren einzigartige P-Loop- und LID-Bewegungen der menschlichen TMPK innerhalb der global geschlossenen und substratgebundenen Protein Konformation.	63
3.2.6 Substratbindung und -spezifität der menschlichen TMPK	66
3.2.7 Die Funktion der Magnesiumionen	68
3.2.8 Die TMP-ADP-Struktur – Stabilisation der P-loop offenen Konformation durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen	72
3.2.9 Die TMP-AppNHp-Struktur - die P-loop partiell-geschlossene Konformation	74
3.2.10 Ist AppNHp ein gutes ATP-Analogon für die menschliche TMPK?	79
3.2.11 Die TMP-ADP-AIF <sub>3</sub> -Struktur	80
3.2.12 Die TDP-ADP-Struktur	82
3.2.13 Die Tp5A-Struktur	85
3.2.14 Phosphoryltransfermechanismen	87
3.2.15 Mechanistische Diskussion	91
- Die $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp induziert den Übergang von der P-loop offenen in eine aktive, P-loop partiell-geschlossene Konformation	91
- Die AIF <sub>3</sub> -Struktur zeigt eine aktive Konformation der menschlichen TMPK und der Nukleotide	94
- Interpretation der TDP-ADP-Struktur als Produktkomplex nach einer Konformationsänderung nach der chemischen Reaktion	98
- Die Tp5A-Struktur als Mimik einer aktiven Enzymprodukt-	

konformation	99
- Interpretation der Strukturen als Schnappschüsse entlang der Reaktionskoordinate der menschlichen TMPK	100
3.3 Substrateigenschaften der AZT-Metaboliten AZTMP und NH <sub>2</sub> TMP zu der menschlichen TMPK	106
3.3.1 Herstellung von NH <sub>2</sub> TMP, kinetische Charakterisierung der AZT-Metaboliten AZTMP und NH <sub>2</sub> TMP und K <sub>d</sub> -Wert Bestimmung von AZTp5A zu menschlicher TMPK	107
3.3.2 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und ADP, AZTMP und AppNHp, NH <sub>2</sub> TMP und AppNHp und AZTp5A	109
3.3.3 Die AZTMP-ADP und AZTMP-AppNHp Strukturen	112
3.3.4 Die AZTp5A-Struktur	115
3.3.5 Mechanistische Diskussion - Die strukturelle Erklärung der schlechten AZTMP-Phosphorylierung durch die menschliche TMPK	117
3.3.6 Die NH <sub>2</sub> TMP-AppNHp Struktur offenbart die Gründe, warum NH <sub>2</sub> TMP im Gegensatz zu AZTMP ein gutes Substrat der menschlichen TMPK ist	119
3.4 Struktur-Aktivitätsbeziehungen der antiviralen Vorläufermedikamente FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK	121
3.4.1 Steady-state kinetische Untersuchungen von FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK	122
3.4.2 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP-ADP, d4TMP-AppNHp, FLTMP-ADP, FLTMP-AppNHp, ddTMP-ADP und ddTMP-AppNHp	124
3.4.3 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP und ADP bzw. FLTMP und AppNHp	126
3.4.4 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und ADP bzw. d4TMP und AppNHp	129
3.4.5 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit ddTMP und ADP bzw. ddTMP und AppNHp	134

---

3.5 Design von Nukleotidanaloga basierend auf die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen verschiedener NMPs an menschlicher TMPK	136
3.5.1 Einfluß des 3'-Substituenten des NMPs auf die P-loop Konformation der menschlichen TMPK, die auch mit der Aktivität korreliert	138
3.5.2 N-alkylierte NH <sub>2</sub> TMP-Derivate als potentielle Kandidaten für einen Einsatz in der HIV-Therapie	139
3.5.3 Azyklische Thymidinderivate	141
3.6 Rationales Design von Mutanten der menschlichen TMPK mit umgekehrter AZTMP- und TMP-Substratspezifität für den Einsatz in der genetischen Pharmakomodulation	144
3.6.1 Initiale Mutationsstudien	145
3.6.2 Die F105Y-Mutante – eine Mutante mit umgekehrter AZTMP und TMP Substratspezifität	145
3.6.3 Die <i>E. coli</i> -LID in der menschlichen TMPK - eine Mutante mit höherer Aktivität und gleichzeitig umgekehrter AZTMP- und TMP-Substratspezifität	151
3.6.4 Die UMPK-LID in der menschlichen TMPK - ein alternativer Vorschlag zur Verbesserung der AZTMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit aufgrund eines weiteren Arginins	155
3.6.5 Genetische Pharmakomodulation zur Verbesserung der zellulären AZTMP-Aktivierung mit den Mutanten (F105Y und <i>E. coli</i> -LID) der menschlichen TMPK	157
<b>4 Zusammenfassung</b>	<b>159</b>
<b>5 Experimenteller Teil – Material, Methoden und chemische Synthese</b>	<b>164</b>
5.1 Biochemische, proteinchemische und biophysikalische Methoden	164
5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	164
5.1.2 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE)	164

5.1.3	Überexpression der menschlichen TMPK (R200A-Mutante und R200A-F105Y-Doppelmutante) als GST-Fusionsprotein in <i>E. coli</i> -Zellkulturen	166
5.1.4	Zellaufschluß und Reinigung der GST-Fusionsproteine (R200A- bzw. R200A-F105Y-Mutanten der menschlichen TMPK)	167
5.1.5	Fluoreszenzspektroskopie zur Affinitätsbestimmung der Komplexe aus TMPK und den Binukleotidinhibitoren Tp5A-mant, Tp5A und AZTp5A	168
5.1.6	Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{cat}$ ) verschiedener Substrate an menschlicher TMPK	171
5.1.7	Proteinkristallographie	173
5.2	Allgemein chemische und analytische Methoden und chemische Synthese	174
5.2.1	Chemikalien und Enzyme	174
5.2.2	Anionenaustauschchromatographie	174
5.2.3	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	174
5.2.4	Nukleotidkonzentrationsbestimmungen	175
5.2.5	Lyophilisation	175
5.2.6	Massenspektrometrie	176
5.2.7	Synthese von Azidothymidinmonophosphat	176
3.2.8	Synthese von Adenosintetraphosphat	178
5.2.9	Synthese von P <sup>1</sup> -(5'-Adenosin)-P <sup>5</sup> -(5'-Azidothymidin)-pentaphosphat	180
5.2.10	Synthese von P <sup>1</sup> -(5'-Adenosin)-P <sup>5</sup> -(5'-Thymidin)-pentaphosphat	183
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>186</b>
6.1	Ein- und Dreibuchstabencode von L-Aminosäuren	186
6.2	Tabellarische Zusammenfassung der $k_{cat}$ -Werte der Monophosphate TMP, AZTMP, FLTMP, d4TMP, ddTMP und NH <sub>2</sub> TMP an menschlicher TMPK und die P-loop Konformationen der in dieser Arbeit untersuchten Komplexe der menschlichen TMPK	187



---

6.3 Tabellarische Zusammenfassung der Aminosäuren, die in den Modellen der Strukturen der menschlichen TMPK in zwei Konformationen, als Alanin oder nicht modelliert sind.	188
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>189</b>

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1.1</b>	Aufbau des HI-Virus (schematische Darstellung).	3
<b>Abb. 1.2</b>	Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HIV.	4
<b>Abb. 1.3</b>	Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen nukleosidischen HIV-RT-Hemmer.	6
<b>Abb. 1.4</b>	Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen nicht-nukleosidische HIV-RT-Hemmer.	8
<b>Abb. 1.5</b>	Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen HIV-Protease Hemmer.	9
<b>Abb. 1.6</b>	Schematische Darstellung der intrazellulären Metabolisierung von AZT.	13
<b>Abb. 1.7</b>	Effekt der Herpes-Simplex-Thymidinkinase Expression auf intrazelluläre AZT-Metabolitkonzentrationen und auf die HIV-1 Replikation in HuT 78-Zellen.	19
<b>Abb. 1.8</b>	Schematische Darstellung der Biosynthesewege von Thymidintriphosphat.	22
<b>Abb. 1.9</b>	Überlagerung der TMP und AZTMP Hefe TMPK-Strukturen.	24
<b>Abb. 1.10</b>	Strukturbezogener Sequenzvergleich der P-loops und der LID-Regionen von TMPKs aus Mensch, Hefe und <i>E. coli</i> , AMPK aus Schwein und UMPK aus <i>Dictyostelium</i> .	25
<b>Abb. 1.11</b>	Stereodiagramm der überlagerten Tp5A-TMPK-Strukturen aus Hefe und <i>E. coli</i> .	27
<b>Abb. 3.1</b>	Reaktionsschema für die Herstellung der Binukleotidinhibitoren Tp5A und AZTp5A.	32
<b>Abb. 3.2</b>	$K_d$ -Wert Bestimmung der Binukleotide Tp5A-mant, Tp5A und AZTp5A zu <i>E. coli</i> TMPK mittels Fluoreszenztitrationen.	34
<b>Abb. 3.3</b>	Typische Einkristalle der <i>E. coli</i> TMPK im Komplex mit AZTp5A.	35
<b>Abb. 3.4</b>	Darstellung des Dimeren der <i>E. coli</i> TMPK im Komplex mit AZTp5A als Ribbon-Diagramm.	39
<b>Abb. 3.5</b>	Abstandskarte aller Kontakte zwischen AZTp5A und <i>E. coli</i> TMPK mit einem kleineren Abstand als 3.2 Å.	41
<b>Abb. 3.6</b>	Stereobild der Monophosphatbindungstasche der <i>E. coli</i> TMPK-AZTp5A-Struktur.	42
<b>Abb. 3.7</b>	Stereobild der ATP-Bindungstasche der <i>E. coli</i> TMPK-AZTp5A-Struktur.	43
<b>Abb. 3.8</b>	Stereodiagramm der Überlagerung der Tp5A- und AZTp5A- <i>E. coli</i> TMPK Strukturen.	44

<b>Abb. 3.9</b>	$k_{cat}$ -Wert Bestimmung der TMP-Phosphorylierung durch menschliche TMPK.	51
<b>Abb. 3.10</b>	$K_d$ -Wert Bestimmung der Komplexe der R200A-Mutante der menschliche TMPK und Tp5A-mant bzw. Tp5A mittels Fluoreszenztitrationen.	53
<b>Abb. 3.11</b>	Typische Einkristalle der menschlichen TMPK im Komplex mit Substraten.	55
<b>Abb. 3.12</b>	Ramachandran Plot des Modells der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP.	60
<b>Abb. 3.13</b>	Strukturbezogene Sequenzüberlagerung der TMPKs aus Hefe, <i>E. coli</i> und Mensch.	61
<b>Abb. 3.14</b>	Topologie der Sekundärstrukturelemente der menschlichen TMPK.	61
<b>Abb. 3.15</b>	Stereopräsentation eines Ribbondiagramms des aktiven Homodimeren der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp.	62
<b>Abb. 3.16</b>	Darstellung der Oberfläche der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A.	63
<b>Abb. 3.17</b>	Überlagerung von drei Strukturen der menschlichen TMPK offenbart Konformationsänderungen innerhalb der global geschlossenen Konformation als Funktion der gebundenen Substrate.	64
<b>Abb. 3.18</b>	Vergrößerung der farbigen Bereiche der TMP-ADP-Struktur von Abb. 3.17. Gezeigt ist die wichtige Funktion des Arg143 aus der LID-Region für die Kommunikation der drei an der komplexen Bewegung beteiligten Bereiche (P-loop, LID und die Adenin-bindende Region) und dem Phosphoryldonor.	65
<b>Abb. 3.19</b>	Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP-Mg <sup>2+</sup> und den Nukleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å.	67
<b>Abb. 3.20</b>	Koordinatin des katalytischen Magnesiumions in der TMP-ADP-Struktur (Stereobild).	69
<b>Abb. 3.21</b>	Koordinatin des katalytischen Magnesiumions in der TMP-AppNHp-Struktur (Stereobild).	70
<b>Abb. 3.22</b>	Positionierung der $\beta$ - und $\gamma$ -Phosphorylgruppen des Phosphoryldonors durch das Magnesiumion.	71
<b>Abb. 3.23</b>	Stereobild der P-loop offenen Konformation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP.	72
<b>Abb. 3.24</b>	Stereobild der Positionierung der TMP-Phosphorylgruppe in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP.	74

- Abb. 3.25** Stereobild der Positionierung der TMP-Phosphorylgruppe in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp. 76
- Abb. 3.26** Stereobild der P-loop partiell-geschlossenen Konformation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp. 77
- Abb. 3.27** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp-Mg<sup>2+</sup> und den Nukleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. 78
- Abb. 3.28** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP, ADP-Mg<sup>2+</sup> und AlF<sub>3</sub> und den Nukleotiden bzw. AlF<sub>3</sub> mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. 81
- Abb. 3.29** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TDP und ADP-Mg<sup>2+</sup> und den Nukleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. 83
- Abb. 3.30** Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP-ADP-AlF<sub>3</sub> und TDP-ADP (Arg97 Bewegung). 84
- Abb. 3.31** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A-Mg<sup>2+</sup> und dem Inhibitor mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. 86
- Abb. 3.32** Schematische Darstellung verschiedener Phosphoryltransfermechanismen am Beispiel der Phosphoryltransferreaktion von TMP und ATP zu TDP und ADP. 88
- Abb. 3.33** Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP bzw. TMP und AppNHp (Stereobild). 92
- Abb. 3.34** Vergleich der unterschiedlichen Positionierung der TMP- und AMP-Phosphorylgruppen durch die menschlichen TMPK bzw. AMPK. 96
- Abb. 3.35** Schematische Darstellung eines Random Bi-Bi-Mechanismus für die menschliche TMPK. 101
- Abb. 3.36**  $k_{\text{cat}}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP durch die menschliche TMPK. 108
- Abb. 3.37** Fluoreszenztitration zur  $K_d$ -Wert Bestimmung des Komplexes aus menschlicher TMPK und AZTp5A. 109
- Abb. 3.38** Ausschnitt aus der  $2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte (konturiert bei  $1.5 \sigma$ ; Auflösung 1.8 Å) der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und ADP für die Substrate und den P-loop in der P-loop offenen Konformation 112

- Abb. 3.39** Vergleich der  $2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarten für die Substrate TMP (A; Auflösung 1.65 Å) und AZTMP (B; Auflösung 1.8 Å) der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP bzw. AZTMP und ADP. 113
- Abb. 3.40** Überlagerung der TMP-ADP und AZTMP-ADP-Strukturen der menschlichen TMPK. 113
- Abb. 3.41** Überlagerung der TMP-AppNHp und AZTMP-AppNHp-Strukturen der menschlichen TMPK. 115
- Abb. 3.42** Überlagerung der Tp5A und AZTp5A-Strukturen der menschlichen TMPK. 116
- Abb. 3.43**  $k_{\text{cat}}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von d4TMP, FLTMP und ddTMP durch die menschliche TMPK 123
- Abb. 3.44** Bestimmung der Besetzung von doppelten Konformationen am Beispiel der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und ADP bei einer Auflösung von 1.55 Å (Stereobilder). 130
- Abb. 3.45** Planare Anordnung der Atome C1', C2', C3' und C4' in d4TMP aus der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und AppNHp (Stereobild). 131
- Abb. 3.46** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wechselwirkungen des Arg97 in den Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP und d4TMP und ADP. 132
- Abb. 3.47** Korrelation des P-loop Zustandes der menschlichen TMPK im Substrat-gebundenen Zustand (NMP-AppNHp) mit der Zahl der nicht-bindenden Elektronenpaare bzw. des Protonierungsgrades des 3'-Substituenten verschiedener NMPs. 138
- Abb. 3.48** Strukturformeln der vorgeschlagenen N-alkylierten  $\text{NH}_2$ TMP-Derivate als potentielle Kandidaten für einen Einsatz in der HIV-Therapie. 140
- Abb. 3.49** Strukturformeln der vorgeschlagenen azyklischen TMP, AZTMP, und  $\text{NH}_2$ TMP-Derivate. 142
- Abb. 3.50**  $k_{\text{cat}}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von TMP und AZTMP durch die F105Y-Mutante der menschliche TMPK. 147
- Abb. 3.51** Mögliche Gründe für die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen bzw. Destabilisation der P-loop offenen Konformation und die damit verbundene verbesserte AZTMP-Aktivität der F105Y-Mutante der menschlichen TMPK (Stereobilder). 150

- 
- Abb. 3.52**  $k_{cat}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von TMP und AZTMP durch die LID-Mutante der menschliche TMPK 154
- Abb. 3.53** Modelierte UMPK-LID in die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A. 157

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 3.1</b>	Statistik der Datensammlung und Datenreduktion des <i>E. coli</i> TMPK-AZTp5A-Komplexes	36
<b>Tab. 3.2</b>	Statistik der Strukturverfeinerung des <i>E. coli</i> TMPK-AZTp5A-Komplexes	38
<b>Tab. 3.3</b>	Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen TMP-Substratkombinationen	57
<b>Tab. 3.4</b>	Statistik der Strukturverfeinerungen der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen TMP-Substratkombinationen	59
<b>Tab. 3.5</b>	Vergleich der $k_{\text{cat}}$ -Werte von TMP, AZTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$	108
<b>Tab. 3.6</b>	Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Substratkombinationen der AZT-Metaboliten AZTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$	110
<b>Tab. 3.7</b>	Statistik der Strukturverfeinerungen der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Substratkombinationen der AZT Metaboliten AZTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$	111
<b>Tab. 3.8</b>	Vergleich der $k_{\text{cat}}$ -Werte von TMP, AZTMP, $\text{NH}_2\text{TMP}$ , FLTMP, d4TMP und ddTMP	123
<b>Tab. 3.9</b>	Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP, d4TMP und ddTMP	125
<b>Tab. 3.10</b>	Statistik der Strukturverfeinerungen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP, d4TMP und ddTMP	126
<b>Tab. 3.11</b>	Vergleich der $k_{\text{cat}}$ -Werte der TMP- und AZTMP-Phosphorylierung durch Wildtyp TMPK und der F105Y-Mutante	147
<b>Tab. 3.12</b>	Vergleich der $k_{\text{cat}}$ -Werte der TMP- und AZTMP-Phosphorylierung durch Wildtyp TMPK, der F105Y-Mutante und der LID-Mutante	154
<b>Tab. 3.13</b>	Konzentrationen der AZT-Metaboliten in mit (Mutanten) der menschlichen TMPK transfizierten P4CCR6-Zellen	158
<b>Tab. 6.1</b>	Ein- und Dreibuchstabencode von L-Aminosäuren	187
<b>Tab. 6.2</b>	Zusammenfassung der $k_{\text{cat}}$ -Werte der Substrate TMP, AZTMP, FLTMP, d4TMP, ddTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$ und die P-loop Konformation der in dieser Arbeit untersuchten Komplexe der menschlichen TMPK	188

---

<b>Tab. 6.3</b>	Zusammenfassung der Aminosäuren die in den Modellen der Strukturen der verschiedenen Komplexe der menschlichen TMPK in zwei Konformationen, als Alanin oder nicht modelliert sind.	189
-----------------	--	-----



## 1 Einleitung

### 1.1 Ein globales Bild der AIDS Pandemie - Zahlen und Fakten

Seit der Entdeckung einer neuartigen Immunschwäche mit schweren opportunistischen Infektionen 1981 bei Menschen in Entwicklungsländern (Gottlieb et al., 1981), starben bis heute weltweit über 12 Millionen Menschen an den Folgen dieser als AIDS (acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immunschwäche-Syndrom) bezeichneten Krankheit, darunter vier Millionen Frauen und 2.7 Millionen Kinder (Mann und Tarantola, 1998; Turner et al., 1999). 1983 wurde das menschliche Immunschwäche-Virus (human immunodeficiency virus, HIV) aus Lymphozyten von AIDS Patienten isoliert und als Ursache von AIDS identifiziert (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984). HIV gehört zu der Unterfamilie der Lentiviren. Bis heute sind zwei unterschiedliche Typen, HIV-1 und HIV-2, bekannt. Von HIV-1 existieren weltweit mehr als zehn Subtypen, von HIV-2 mindestens zwei (Rübsamen-Waigmann, 1995). HIV-2 ist sehr ähnlich zu dem analogen SI-Virus (simian immunodeficiency virus, SIV), der in bestimmten Affenarten nachgewiesen werden konnte. Nach einer symptomfreien Latenzzeit von ca. 2 bis 10 Jahren führt eine HIV-Infektion beim Menschen zum Ausbruch von AIDS und letztlich zum Tod (Bartlett und Moore, 1998). Übertragen wird HIV in der Regel durch Samen- und Vaginalflüssigkeit bei Geschlechtsverkehr, durch infiziertes Blut oder verseuchte Blutprodukte sowie von Mutter zu Kind vor (ist nicht eindeutig geklärt), während oder nach der Geburt durch Muttermilch.

Bis heute sind weltweit mehr als 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert (Balter, 1998). Über 90 % der HIV infizierten Menschen leben in Entwicklungsländern, davon ca. zwei Drittel in südlich der Sahara gelegenen Ländern Afrikas, wo in manchen Provinzen ca. jeder vierte Einwohner mit HIV infiziert ist. In diesen Regionen hat die Epidemie ein solches Ausmaß, daß die Lebenserwartung, die seit den 50er Jahren stetig steigend war, wieder fällt. In Südost-Asien dominiert die AIDS Epidemie insbesondere in Indien und Thailand mit ca. 3-5 Millionen HIV-infizierten Menschen und weitet sich jetzt auch in Vietnam und China schnell aus (Balter, 1998). Obwohl über 90 % der HIV-infizierten Menschen in Entwicklungsländern leben, werden weit über 90 % der Gelder für die Behandlung und Prävention von HIV in Industrieländern Europas und in Nordamerika ausgegeben. Diese Diskrepanz zwischen der räumlichen Verteilung der HIV-infizierten

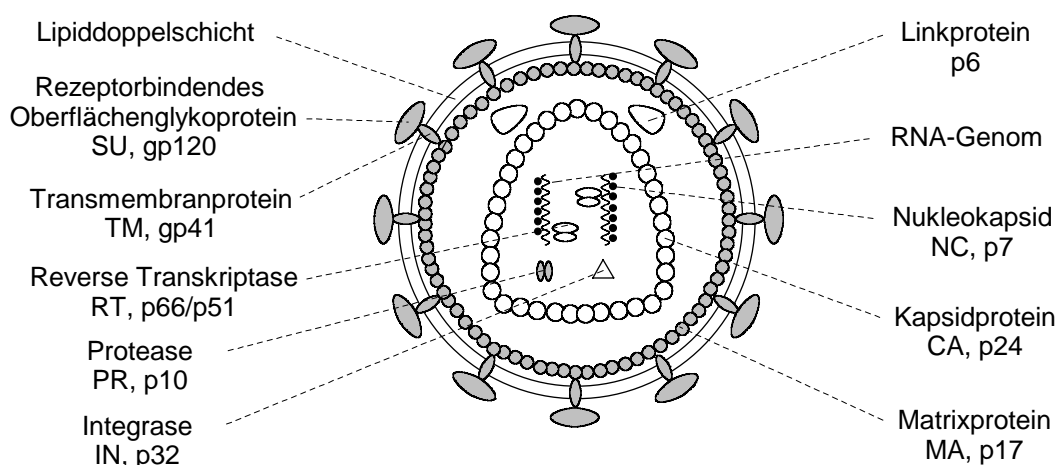
Menschen und der aufgewendeten Gelder für die Behandlung und Prävention von HIV zwischen Entwicklungsländern und Industrieländern wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Behandlung eines HIV-Patienten mit den heute zur Verfügung stehenden Kombinationstherapien weit über 20.000 DM pro Jahr kostet. Das Aufbringen einer solchen Summe ist für Menschen in Entwicklungsländern in den seltensten Fällen möglich. Hinzu kommt, daß die heute zugänglichen Kombinationstherapien derart komplexe Verabreichungsschemata beinhalten, daß allein aufgrund des sozialen Umfeldes vieler HIV-infizierter Menschen eine dauerhafte Therapie nicht praktikabel ist.

Diese ernüchternden Zahlen und Fakten zeigen, wie wichtig es ist, neue Strategien für die Bekämpfung von HIV zu entwickeln oder bestehende Therapien zu optimieren. Ein ideales Ziel wäre die Entwicklung eines Impfstoffes oder die Entwicklung von Medikamenten, die einer Infektion vorbeugen oder eine Heilung von HIV ermöglichen würden. Eine andere, nicht ideale, aber dennoch ausreichende Alternative stellt die Entwicklung neuer, oder die Optimierung zur Verfügung stehender Medikamente dar, die zwar keine Heilung von HIV bewirken, jedoch diese Infektionskrankheit therapierbar machen und so ein Leben mit HIV ermöglichen, wie es für andere chronische Krankheiten (zum Beispiel Diabetes) bekannt ist und erfolgreich angewendet wird. Zwingende Bedingung für die Entwicklung neuer Medikamente oder die Optimierung bestehender Therapien ist jedoch, daß diese preisgünstig und in einer möglichst einfachen und unkomplizierten Form verabreichbar sind, um diese allen betroffenen Menschen zugänglich zu machen.

Das Fernziel des Projektes, zu dem diese Arbeit beiträgt, zielt auf die Optimierung bestehender Therapieformen ab. Durch einen gentherapeutischen Ansatz soll die intrazelluläre Aktivierung bekannter Vorläufermedikamente verbessert werden. Die Kombination aus Chemotherapie und Gentherapie könnte die Wirkung der entsprechenden Substanzen erhöhen, Nebenwirkungen reduzieren und die Therapie an sich praktikabler machen (siehe die folgenden Kapitel). Grundvoraussetzung für die hier gewählte Strategie ist die Entwicklung von effizienter Gentransfertechnologie. Durch Verwendung modifizierter hematopoietischer Stammzellen, die Quelle der meisten Zellen, die mit HIV infiziert werden, könnte dies jedoch in diesem speziellen Fall in naher Zukunft zugänglich sein (Clay et al., 1999).

## 1.2 Aufbau und Lebenszyklus des HI-Virus

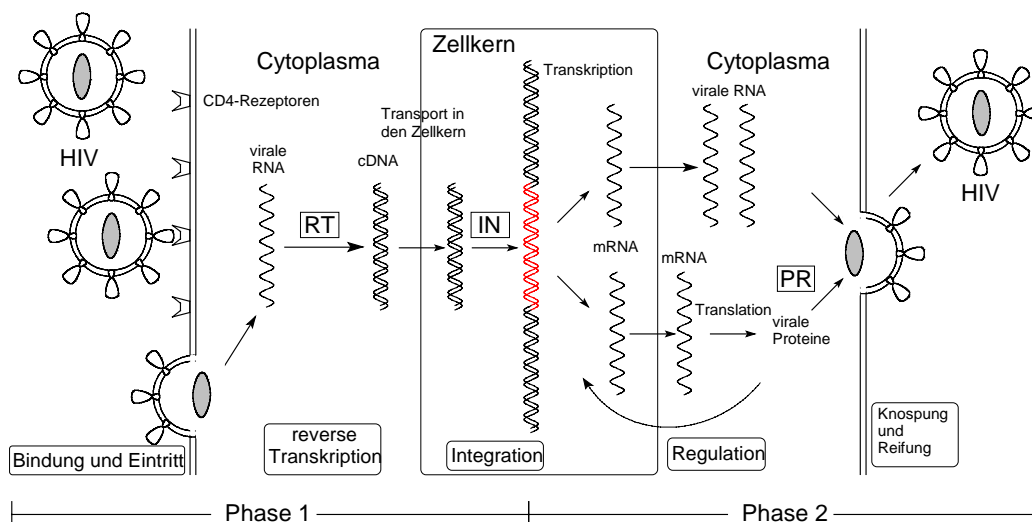
HIV ist ein sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm, dessen Aufbau schematisch in Abb. 1.1 dargestellt ist.



**Abb. 1.1:** Aufbau des HI-Virus (schematische Darstellung verändert nach Modrow und Falke, 1997).

Wie bei allen Lentiviren besteht auch die Hülle von HIV aus einer Lipiddoppelschicht. Diese stammt aus der Membran der Wirtszelle aus der das Viruspartikel entsprungen ist. Exponierte Oberflächenglykoproteine (gp120) sind über Wechselwirkungen zu den Transmembranproteinen (gp41) an das Virus gebunden. An die innere Oberfläche der Membran grenzt eine ringförmige Proteinmatrix bestehend aus ca. 2000 Kopien des Matrixproteins p17, welche wiederum über Linkproteine (p6) mit dem konischen Kapsid, bestehend aus ca. 2000 Kapsidproteinen verbunden ist. Das Kapsid liegt im Inneren des Virus und beinhaltet zwei Kopien des Virusgenoms in Form von zwei ungespleißten RNA-Strängen, die durch Nukleokapsidproteine stabilisiert sind, zelluläre tRNA<sup>Lys,3</sup>-Moleküle, die als Replikationsprimer genutzt werden und die viralen Proteine Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) (für einen Übersichtsartikel siehe Turner und Summers, 1999).

Der Lebenszyklus von HIV kann, wie schematisch in Abb. 1.2 dargestellt, in zwei Phasen unterteilt werden (Jeffries und De Clercq, 1995; Turner und Summers, 1999): in der ersten Phase findet die chronische Infektion neuer Zellen statt, in der zweiten Phase die Produktion neuer Viruspartikel von chronisch infizierten Zellen.



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HIV (Verändert nach Jeffries und De Clercq, 1995 und Modrow und Falke, 1997). Die Abkürzungen RT (Reverse Transkriptase), IN (Integrase) und PR (Protease) bezeichnen virale Proteine.

Die erste Phase beginnt mit der spezifischen Bindung von HIV über seine exponierten Oberflächenglykoproteine (gp120) an CD4-Rezeptoren von z. B. T-Zellen. Diese Wechselwirkung reicht zwar aus, um das Virus an die Zellen zu binden, jedoch nicht, um diese zu infizieren. Für die Fusion der zellulären und viralen Membranen und damit verbunden das unwiderrufliche Eindringen des Virus in die Wirtszelle, wird abhängig von dem entsprechenden Zelltyp ein weiterer Corezeptor (CCR5, CCR3, CXCR4) (Choe et al., 1996; Endres et al., 1996) benötigt. Nach Fusion und Freisetzung der viralen Komponenten ins Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt dort die reverse Transkription der viralen RNA in doppelsträngige DNA durch die HIV-Reverse Transkriptase (HIV-RT oder einfach RT). Nach der Synthese wird die doppelsträngige DNA in den Zellkern transportiert und dort von der viralen Integrase an einer beliebigen Stelle in das Wirtsgenom eingebaut. Ab diesem Zeitpunkt ist die Wirtszelle chronisch HIV infiziert und dient als Produktionsstätte neuer Viruspartikel.

In der zweiten Phase des Replikationszyklus findet die Produktion neuer Viruspartikel von chronisch infizierten Zellen statt. Eingeleitet wird diese mit der Transkription der proviralen DNA durch zelluläre DNA-Polymerasen zu mRNA, die teilweise gespleißt und aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Die Proteinprodukte der viralen *tat* und *rev* Gene spielen bei der Regulation der Transkription eine entscheidende Rolle (Kingsman und Kingsman, 1996). Im Zytoplasma erfolgt die

Translation der mRNA zu Polyproteinen. Für die Knospung und Freisetzung von unfertigen, nicht infektiösen Viruspartikeln an der Zellmembran folgt die Zusammenlagerung der Proteinkomponenten mit zwei ungespleißten RNA-Molekülen. Durch post-translationale Modifikationen, wozu auch die Spaltung der Polyproteine zu den viralen Proteinen durch die virale Protease (PR) zählt, reifen die unfertigen Viruspartikel zu infektiösen HI-Viren. Die reifen Viruspartikel können jetzt neue Zellen infizieren und einen neuen Zyklus beginnen.

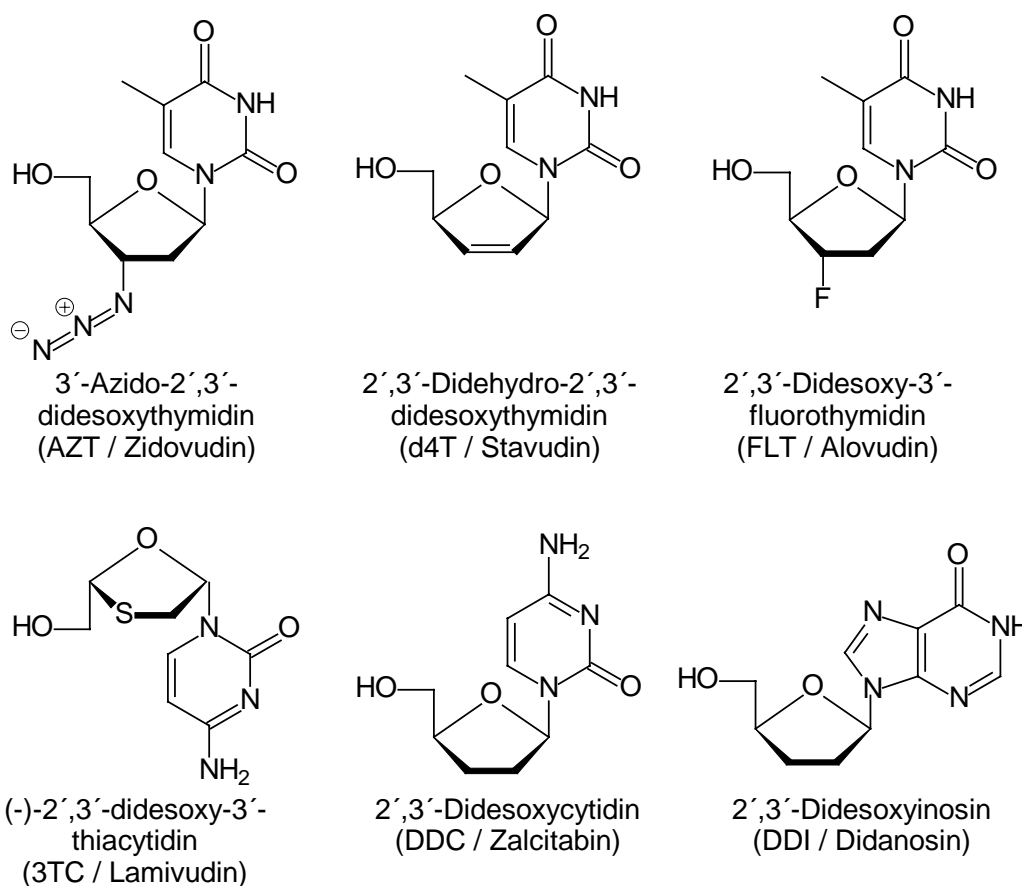
### 1.3 Anti AIDS Medikamente in klinischer Anwendung und in der Entwicklung

Die bis heute für die Behandlung von HIV zugelassenen Medikamente greifen entweder in die erste Phase des Replikationszyklus ein und richten sich gegen die HIV-RT oder sie greifen in die zweite Phase des Replikationszyklus ein und richten sich gegen die virale Protease. Damit stehen sowohl Medikamente, die die chronische Infektion neuer Zellen verhindern sollen (erste Phase des Replikationszyklus), als auch Medikamente, die die Produktion neuer infektiöser Viruspartikel von chronisch infizierten Zellen verhindern sollen (zweite Phase des Replikationszyklus), für die Behandlung von HIV zur Verfügung (Bartlett und Moore, 1998).

Die gegen die RT gerichtenden Medikamente werden in zwei Klassen unterteilt. Erstens die nukleosidischen HIV-RT-Hemmer, von denen bis heute fünf für die klinische Anwendung zugelassen sind (AZT (Zidovudin, Retrovir), d4T (Stavudin, Zerit), 3TC (Lamivudin, Epivir), ddI (Didanosin, Videx), ddC (Zalcitabin, HIVID)) und weitere, die sich in der klinischen Erprobung befinden, darunter 3'-Desoxy-3'-fluorothymidin (FLT, Alovubin) (Abb. 1.3). Zweitens die nicht-nukleosidischen HIV-RT-Hemmer, von denen bis heute zwei (Nevirapin (Viramune) und Delavirdin (Rescriptor)) für die klinische Anwendung zugelassen sind (Abb. 1.4).

Die nukleosidischen RT-Inhibitoren sind Derivate zellulärer Nucleoside mit Modifikationen an der Ribose. Häufig fehlt die 3'-OH-Gruppe oder sie ist durch einen anderen Rest substituiert (Abb. 1.3). In ihrer verabreichten Form sind es Vorläufermedikamente (Prodrugs), die, nachdem sie von den Zielzellen aufgenommen wurden, über mehrere Stufen von zellulären Enzymen in die aktiven triphosphorylierten Formen überführt werden müssen, um antiviral wirken zu können. Als Triphosphate sind es selektive Inhibitoren der HIV-RT. Sie können prinzipiell auf zwei unterschiedliche, sich ergänzende Mechanismen ihre antivirale Aktivität ausüben (Arts und Wainberg, 1996).

Zum einen können sie kompetitiv den Einbau natürlicher Nucleotide in einen wachsenden viralen DNA-Strang inhibieren, zum anderen können sie als alternative Substrate in einen wachsenden viralen DNA-Strang eingebaut werden, wo sie dann aufgrund der chemischen Modifikation (des Fehlens der 3'-OH-Gruppe) irreversibel die Kettenverlängerung stoppen.



**Abb. 1.3:** Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen nukleosidischen HIV-RT-Hemmer (FLT befindet sich in Phase 3 der klinischen Erprobung).

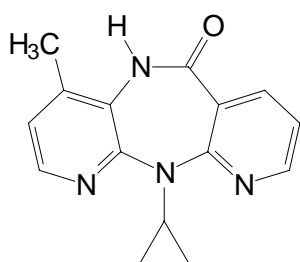
Die effiziente Aktivierung durch zelluläre Enzyme ist entscheidend für die potente Wirksamkeit dieser Medikamente. Eine unzureichende Aktivierung wird sowohl mit der Entwicklung resistenter Varianten des Virus, als auch für das Auftreten von toxischen Nebenwirkungen durch Anreicherung partiell aktivierter Intermediate der entsprechenden Medikamente in Verbindung gebracht (Bridges et al., 1993, Harrington et al., 1993, Törnevik et al., 1995). Die direkte Verabreichung der aktiven triphosphorylierten Spezies ist nicht möglich, da polare, geladene Moleküle nur sehr schlecht oder gar nicht von den

Zielzellen aufgenommen werden können (Neuhard et al., 1987) und somit eine effektive Wirksamkeit nicht gegeben wäre. Die Notwendigkeit der Aktivierung dieser Klasse von RT-Hemmern stellt hohe Ansprüche an diese Nukleosidderivate. Einerseits müssen sie für eine effiziente Aktivierung von verschiedenen zellulären Enzymen als Substrate akzeptiert werden, andererseits müssen sie selektive Substrate der RT sein, um toxische Nebenwirkungen durch Einbau in die DNA von zellulären DNA-Polymerasen vorzubeugen. Daher ist die erforderliche zelluläre Metabolisierung dieser nukleosidischen HIV-RT-Hemmer, solange sie nicht optimal ist, als Nachteil für diese Klasse von Medikamenten anzusehen.

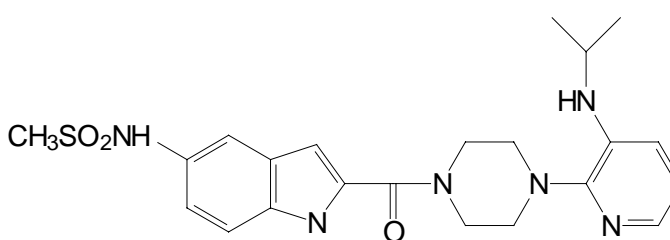
Im Gegensatz dazu macht man sich die erforderliche Aktivierung bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Herpes Simplex Viren (HSV) von nutzen. HSV codiert im Gegensatz zu HIV ein eigenes Enzym (HSV-Thymidinkinase, HSV-TK), das an der Metabolisierung von Thymidin beteiligt ist, so daß man hier gezielt Nukleosidderivate entwickeln kann, die von der viralen Thymidinkinase aktiviert werden, nicht aber von der zellulären. Das bedeutet, daß diese Medikamente nur in HSV infizierten Zellen aktiviert werden, so daß die hohe Selektivität dieser Substrate gegenüber der viralen DNA-Polymerase, die im Fall von HIV zwingend notwendig ist, für HSV in dem Maße nicht gegeben sein muß. Sie können sowohl die Virusreplikation durch Inhibition der viralen DNA-Polymerase als auch die Vermehrung der infizierten Zelle durch Inhibition der zellulären DNA-Polymerasen verhindern. Durch die selektive Aktivierung in HSV-infizierten Zellen werden toxische Effekte auf nicht infizierte Zellen minimiert. Der Einsatz von Nukleosidderivaten stellt bei der Behandlung von viralen Infektionskrankheiten, wie HIV und HSV, eine effektive Therapiemöglichkeit dar und war für HSV das erste Beispiel für die erfolgreiche und spezifische Behandlung einer viralen Krankheit.

Bei den nicht-nukleosidischen HIV-RT-Hemmern handelt es sich um hydrophobe Moleküle (Abb. 1.4), die alle in einer hydrophoben Bindungstasche in der Nähe des aktiven Zentrums der RT binden, obwohl sie sich in ihrer chemischen Struktur stark unterscheiden (Kohlstaedt et al., 1992, Smerdon et al., 1994, Ding et al., 1995, Ren et al., 1995, Ren et al., 1999). Dort hemmen sie als nicht-kompetitive Inhibitoren die RT (Tantillo et al., 1994). Durch die Bindung an RT verringern sie geringfügig die Affinität für Nukleosidtriphosphate zu einem Primer-Template-RT-Komplex (Rittinger et al., 1995). Der Haupteffekt ist jedoch die Verlangsamung der Nukleotidübertragung, also der chemische Schritt, in einen wachsenden DNA-Strang (Spence et al., 1995). Der Vorteil

dieser nicht-nukleosidischen RT-Hemmer gegenüber nukleosidischen liegt darin, daß diese Moleküle direkt in der aktiven Form verabreicht werden und nicht erst in der Zelle zu den aktiven Spezies metabolisiert werden müssen. Ein großer Nachteil ist jedoch, daß häufig eine einzige Punktmutation in der RT ausreicht, um die Affinität dieser Substanzen gegenüber RT so zu vermindern, daß die RT gegen diese Substanzen resistent ist, ohne einen merklichen Einfluß auf die Polymerasegeschwindigkeit zu haben. Des weiteren ist diese Klasse von Inhibitoren nur gegen HIV-1, nicht aber gegen HIV-2 wirksam.



Nevirapin (Viramun)



Delavirdin (Rescriptor, BHAP)

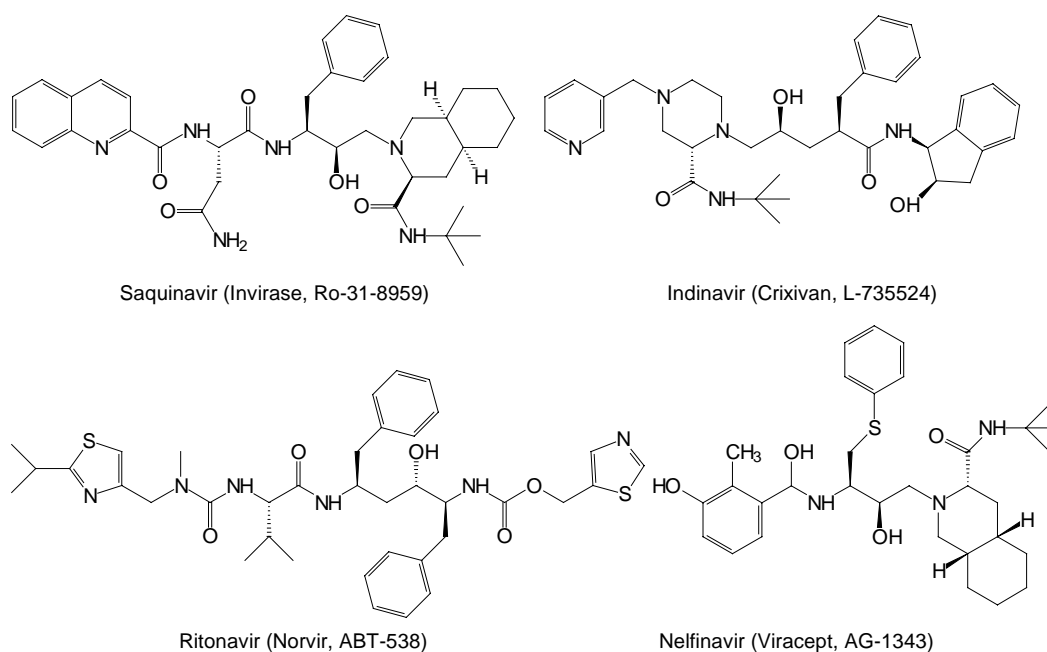
**Abb. 1.4:** Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen nicht-nukleosidischen HIV-RT-Hemmer.

Bei den in die zweite Phase des Replikationszyklus eingreifenden Protease-Hemmern handelt es sich um eine neue Klasse von Medikamenten, von denen bis heute vier (Indinavir (Crixivan), Nelfinavir (Viracept), Ritonavir (Norvir) und Saquinavir (Invirase)) für die klinische Anwendung zugelassen sind und die seit 1996 in der HIV-Therapie eingesetzt werden (Rübsamen-Waigmann, 1995) (Abb. 1.5).

Da bei der Entwicklung dieser Substanzen die Röntgenkristallstrukturen der HIV-Protease allein und im Komplex mit Inhibitoren eine entscheidende Rolle spielten, wird sie häufig als Paradebeispiel für das rationale „*structure-based drug design*“ angeführt (Gait und Karn, 1995, Jeffries und De Clercq, 1995). Durch zyklisches Optimieren von Leitsubstanzen unter Zuhilfenahme der Röntgenstrukturen der HIV-Protease im Komplex mit diesen Komponenten in Kombination mit kinetischen Inhibitionsstudien gelang das gezielte Design potenter Inhibitoren. Die Schlüsselpunkte dabei sind folgende: Im Gegensatz zu zellulären, monomeren Aspartat-Proteasen ist die HIV-Protease ein Dimer, dessen aktives Zentrum zwischen der Kontaktfläche der beiden Monomere liegt. Bei der Bindung von Substraten oder Substratanaloga orientieren sich zwei flexible



Schleifen (Loops) über das aktive Zentrum, wodurch zwei Aspartatseitenketten (aus jedem Monomer eins) in die Nähe der zu spaltenden Amidbindung gebracht werden. Zudem dirigiert ein zwischen den Loops (Carboxylgruppen der Aspartate) und dem Substrat positioniertes Wasser das Protein in eine geschlossene, aktive Konformation. Man konnte anhand dieser Beobachtungen einerseits symmetrische Inhibitoren ableiten, die einfacher zu synthetisieren sind als unsymmetrische Moleküle, andererseits konnten Übergangszustandsanaloga entwickelt werden, bei denen das Wasser zwischen den beiden Loops und dem Substrat durch eine funktionelle Gruppe ersetzt ist (Gait und Karn, 1995). Da ein Enzym den Übergangszustand stabilisiert, zeichnen sich Übergangszustandsanaloga durch eine besonders hohe Affinität zu dem Enzym aus. Durch den Ersatz des katalytischen Wassers durch eine funktionelle Gruppe konnte aufgrund entropischer Effekte die Affinität deutlich verbessert werden, so daß diese Substrate effektiv als kompetitive Inhibitoren das aktive Zentrum blockieren.



**Abb. 1.5:** Strukturformeln der für die klinische Anwendung zugelassenen HIV-Protease Hemmer.

Ein Vorteil dieser Klasse von HIV-Medikamenten gegenüber nukleosidischen RT-Hemmern ist, daß sie, wie die nicht-nukleosidischen RT-Hemmer, direkt in der aktiven Form verabreicht werden und intrazellulär nicht aktiviert werden müssen. Wahrscheinlich unterdrücken sie deshalb potenter als die RT-Inhibitoren die Virusvermehrung in HIV-Patienten. Vermutlich bilden sich als Folge der potenten Replikationsunterdrückung nicht

so schnell resistente Varianten des Virus gegenüber diesen Medikamenten. Große Nachteile sind, daß sie meistens relativ aufwendig herzustellen sind und daß die Bioverfügbarkeit dieser Proteasehemmer aufgrund ihres stark hydrophoben Charakters sehr gering ist.

Alle zugelassenen Medikamente bewirken nach den oben beschriebenen Mechanismen eine Verringerung der Viruskonzentration im Blut von HIV-infizierten Menschen und führen gleichzeitig zu einem Anstieg der CD4-positiven Zellen. Das Auftreten resistenter Varianten des Virus gegen diese Medikamente bei der Behandlung von Patienten mit nur einem dieser Inhibitoren, in den sogenannten Monotherapien, begrenzt eine effektive Behandlung nach dieser Strategie. Aufgrund des Problems der Entwicklung bzw. Selektion resistenter Varianten begann man früher erst mit einer Therapie, nachdem die Zahl der CD4-Zellen unter 500 pro  $\mu\text{l}$  Blut gesunken war und die ersten Symptome von AIDS ausbrachen.

Nach den heutigen Kenntnissen scheint es jedoch effektiver und sinnvoller zu sein, möglichst früh mit der Behandlung von HIV zu beginnen (am besten in der akuten Phase direkt nach der Infektion), um zu versuchen, die Vermehrung des Erregers maximal zu unterdrücken. Im Körper eines HIV-Patienten werden täglich ca.  $10^8 - 10^9$  Viruspartikel produziert und die Fehlerrate der reversen Transkription liegt bei ca. 1/10000 Base, d. h. es finden ca. 2 Mutationen pro Genomreplikation statt (Bebenek et al., 1993, Coffin, 1995). Durch eine möglichst geringe Replikationsrate des Virus wird das Auftreten unzähliger Mutanten verhindert und damit die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung resistenter Varianten minimiert. Um dieses Ziel zu erreichen, behandelt man neuerdings HIV-Patienten in den sogenannten Kombinationstherapien gleichzeitig mit verschiedenen Medikamenten (Jeffries und De Clercq, 1995, Bartlett und Moore, 1998). Dabei unterscheidet man konvergierende Therapien, bei denen alle verwendeten Medikamente aus der gleichen Klasse kommen (z. B. nur die nukleosidische RT-Hemmer ddI/ddC und AZT) und divergierende Therapien, bei denen die verwendeten Medikamente aus unterschiedlichen Klassen kommen (z. B. zwei nukleosidische RT-Hemmer und ein Protease-Hemmer).

Ähnlich wie bei der Behandlung von Patienten in Form von Monotherapien, wird auch bei der Behandlung von Patienten mit konvergierenden Therapien die Entwicklung von sogenannten kreuzresistenten Viren, die gegen beide verwendeten Nukleosidanaloga resistent sind, beobachtet. Divergierende Therapien hingegen scheinen zur Zeit die beste Strategie bei der Behandlung von HIV zu sein (Montaner,

1998, Gulick et al., 1997, Hammer et al., 1997). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß sogar bei Patienten, die bereits an AIDS erkrankt waren, durch sehr konsequente und komplexe divergierende Therapien, die auch als HAART (hochaktive antiretrovirale Therapien) bezeichnet werden, die Viruszahl auf einen nicht nachweisbaren Wert reduziert werden konnte und die Krankheitssymptome abklagen. Hierbei verwendet man häufig zwei nukleosidische RT- und einen Protease-Hemmer (z. B. AZT, 3TC und Indinavir), wobei diese idealerweise so ausgewählt sind, daß deren Wirkung synergistisch ist und somit keine kreuzresistenten Viren auftreten. Neben der oben genannten Kombination werden weitere getestet, darunter auch solche aus nicht-nukleosidischen RT-Inhibitoren oder Kombinationen aus vier oder mehr verschiedenen Medikamenten.

Der Nachteil solcher komplexen Therapien ist, daß erstens die Therapien sehr teuer sind (über 20.000 DM pro Jahr nur für die Medikamente), zweitens die Therapien sehr unpraktikabel sind, da täglich 20 oder mehr Tabletten zu ganz bestimmten Zeiten über einen sehr langen Zeitraum oder sogar für immer eingenommen werden müssen, drittens diese Therapien nicht bei jedem Patienten anschlagen und viertens diese konzentrierte Masse an Medikamenten zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen führt, die sogar zu einem limitierenden Faktor in der Therapie werden können.

Neben diesen sieben gegen die RT (fünf nukleosidische und zwei nicht-nukleosidische Inhibitoren) und vier gegen die virale Protease gerichteten Medikamente, die zur Zeit für die klinische Anwendung zugelassen sind, befinden sich viele weitere bzw. Ansatzpunkte für eine Therapie in der Entwicklung oder in der klinischen Erprobung. Dazu gehören

1) Integrase-Hemmer, die den Einbau der viralen DNA in zelluläre Chromosomen verhindern sollen (Farnet et al., 1996), und damit ebenso wie die RT-Inhibitoren in die erste Phase des Replikationszyklus eingreifen,

2) sogenannte Antisense Therapien, bei denen Antisense-DNAs die HIV Regulatorgene *tat* und *rev* blockieren sollen, deren Proteine für die effiziente Herstellung anderer viraler Proteine nötig sind (zweite Phase des Replikationszyklus) (Akhtar et al., 1996),

3) Blockierung der CD4-Rezeptoren und der Co-Rezeptoren der T-Zellen, wodurch versucht wird, das Andocken des Virus an diese Rezeptoren zu unterbinden oder zu stören, um so den Eintritt des Virus in die Zelle zu verhindern (erste Phase des Replikationszyklus) (Singer et al., 1986; Spektrum der Wissenschaft 1998, Februar S.

38),

4) Immun-Therapien, die darauf abzielen, verbliebene Immunfunktionen zu stärken, zum Beispiel durch Gabe von gentechnisch hergestelltem Interleukin-2, das die Teilung reifer T-Lymphocyten anregt und die Teilung und Reifung von Blutstammzellen fördert. Dabei entstünde ein breites Spektrum verschiedener Immunzellen - darunter T-Zellen und antikörper-produzierende Lymphocyten, die HIV erkennen und eliminieren könnten (Bartlett und Moore, 1998).

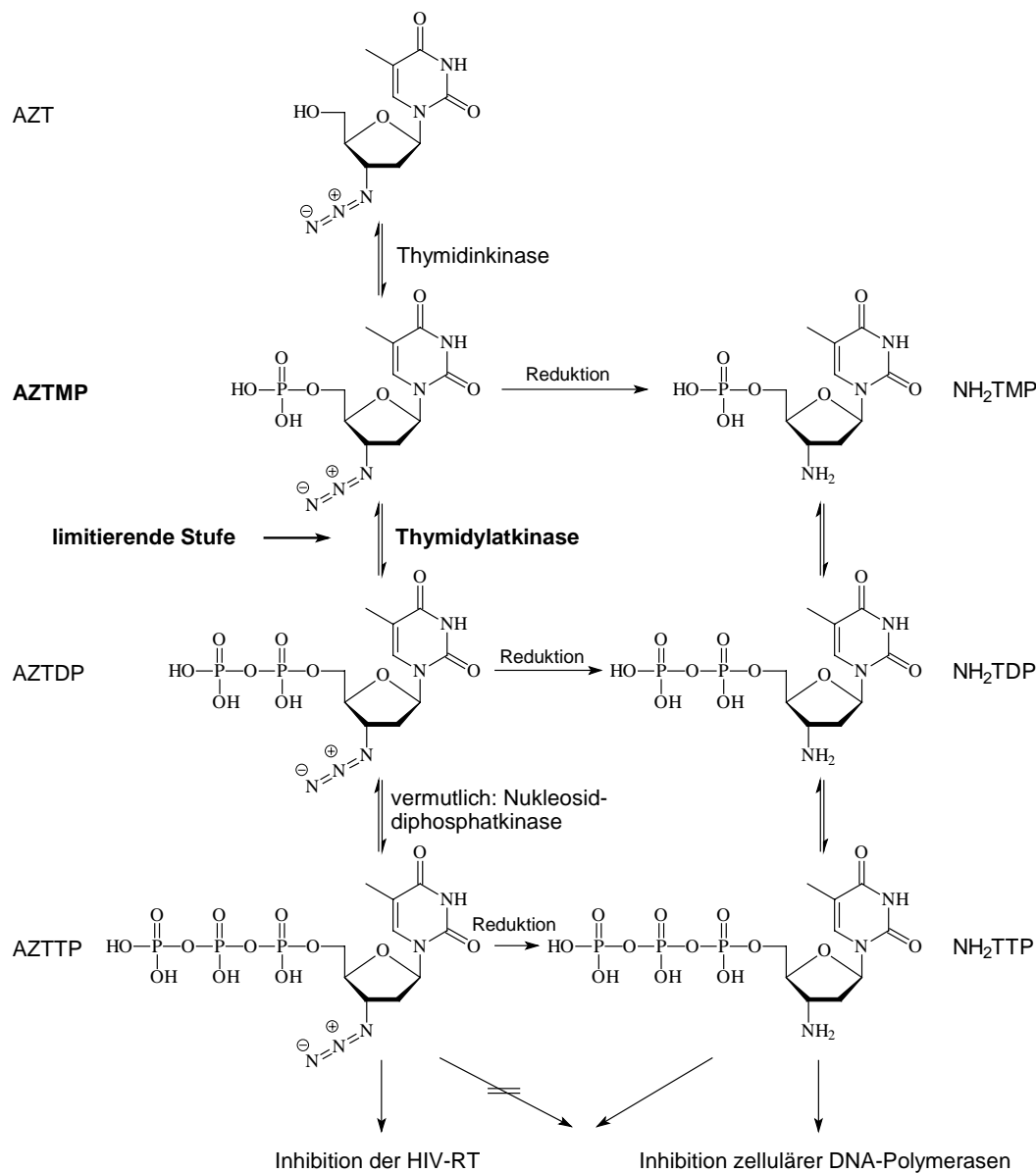
#### **1.4 Metabolisierung der nukleosidischen HIV-RT-Hemmer AZT, d4T und FLT in der Zelle**

Die nukleosidischen HIV-RT-Hemmer waren die ersten für die HIV-Therapie zugelassenen Medikamente und finden auch heute noch in Kombinationstherapien breite Anwendung. Insbesondere zeichnen sich die Triphosphate der Thymidinanaloga durch ihre hohe Selektivität gegenüber der RT aus, wodurch toxische Effekte auf nicht infizierte Zellen minimiert werden. Wie im vorangehenden Kapitel erwähnt, sind die Nukleosidanaloga Vorläufermedikamente (Prodrugs), die, nachdem sie in die Zelle aufgenommen sind, durch zelluläre Enzyme zu den triphosphorylierten Nukleosidtriphosphaten (NTPs) aktiviert werden müssen, um antiviral wirken zu können. Eine ineffiziente Aktivierung kann die Wirksamkeit und Toxizität dieser Klasse von Medikamenten drastisch beeinflussen und dadurch zum limitierenden Faktor in einer Therapie werden. Im folgenden wird dieses für die beiden Medikamente AZT und d4T sowie für das in der klinischen Erprobung befindliche FLT verdeutlicht und diskutiert.

Metabolisierung von AZT: AZT (3'-Azido-3'-desoxythymidin) ist seit 1987 für die klinische Anwendung in der HIV Therapie zugelassen und war damit das erste lizenzierte anti-AIDS Medikament (Rübsamen-Waigmann, 1995). Unter den bis heute zugelassenen nukleosidischen RT-Inhibitoren nimmt es eine Sonderstellung ein, da es das einzige Analogon ist, bei dem die 3'-OH-Gruppe durch einen größeren Rest (einer Azido-Gruppe, N<sub>3</sub>) substituiert ist. Bei der Metabolisierung von AZT spielt die im Vergleich zur Hydroxylgruppe in TMP um ca. 1.5 Å längere Azidogruppe eine Schlüsselrolle.

AZT gelangt durch Diffusion in die Zellen (Zimmermann et al., 1987) und wird anschließend durch drei zelluläre Kinasen zum Triphosphat (AZTTP) phosphoryliert (Furman et al., 1986; Balzarini et al., 1988; Qian et al., 1994). Die erste Stufe der

Aktivierung ist die Phosphorylierung von AZT zu AZT-monophosphat (AZTMP). Dieser Schritt wird durch die Thymidinkinase (TK) katalysiert. Die zweite Stufe, die Phosphorylierung von AZTMP zu AZT-diphosphat (AZTDP) wird durch die Thymidylatkinase (TMPK) und die letzte Stufe, die Phosphorylierung von AZTDP zu AZT-triphosphat (AZTTP) vermutlich durch die Basen-unspezifische Nucleosiddiphosphatkinase (NDPK) katalysiert (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung der intrazellulären Metabolisierung von AZT

Es konnte gezeigt werden, daß der zweite Schritt der Aktivierung, die Phosphorylierung von AZTMP zu ATZDP durch TMPK, den limitierenden Schritt bei der Aktivierung darstellt. In Zellen, die mit AZT inkubiert werden, reichert sich das partiell aktivierte AZTMP in millimolaren Konzentrationen an, wohingegen die Konzentrationen von AZTDP und des aktiven Metaboliten AZTTP insgesamt weniger als 4 % des phosphorylierten AZT ausmachen (Qian et al., 1994). Die Anreicherung dieses partiell aktivierten Metaboliten in mit AZT inkubierten Zellen führt zu verschiedenen Konsequenzen. Erstens wird die Anreicherung von AZTMP mit einer Reihe von Nebenwirkungen, die bei der Behandlung von Patienten mit AZT auftreten, in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, daß AZTMP sowohl Glykosylierungsreaktionen (Hall et al., 1994, Yan et al., 1995) als auch zelluläre Exonukleasereaktionen, die für die Reparatur fehlerhafter zellulärer DNA verantwortlich sind (z. B. Herausschneiden von AZT aus AZT terminierter DNA), inhibiert (Bridges et al., 1993, Harrington et al., 1993). Zweitens hemmt AZTMP in so hohen intrazellulären Konzentrationen die Thymidylatkinase durch Bindung an beide Substratbindestellen (siehe folgendes Kapitel) und blockiert dadurch sowohl die eigene Metabolisierung, als auch die Biosynthese von TTP, was wiederum zu toxischen Nebenwirkungen in nicht infizierten Zellen führt (Furman et al., 1986). Drittens bewirkt die hohe AZTMP-Konzentration die Expression eines spezifischen ATP-abhängigen Transportmechanismus, so daß das Medikament in der AZTMP-Form aus der Zelle ausgeschleust wird. Dies ist vermutlich ein Grund für die zelluläre Resistenz gegen AZT. Viertens wird keine ausreichende Menge des aktiven Triphosphates AZTTP erreicht, um die Virusvermehrung optimal zu unterdrücken, was für das Virus ideale Voraussetzungen für die Entwicklung AZT-resistenter RT-Varianten darstellt.

Da TTP und AZTTP ähnlich gute Substrate der RT sind, kann die potente Inhibition der RT durch so geringe zellulär erreichbare AZTTP-Konzentration im wesentlichen nur auf den zufälligen Einbau von AZTTP in einen wachsenden viralen DNA-Strang zurückzuführen sein und nicht auf kompetitive Inhibition. Für die Entwicklung von AZT-resistenten RT-Mutanten bedeutet das folgendes: Verringert eine Mutation in der RT die Einbaugeschwindigkeit von AZTTP in einen wachsenden viralen DNA-Strang geringfügig, kann das bei sehr geringer AZTTP Konzentration *in vivo* dazu führen, daß keine Inhibition der RT mehr stattfindet. Für isolierte, *in vivo* nachweisbar AZT-resistente Mutanten der RT konnte *in vitro* kein Effekt auf die Einbaugeschwindigkeit von AZTTP im Vergleich zu Wildtyp RT beobachtet werden

(Krebs et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, daß ein kleiner, *in vitro* nicht meßbarer Effekt der AZTTP-Einbaugeschwindigkeit bei resistenten RT-Mutanten *in vivo* drastische Auswirkungen (Resistenz gegenüber dem Medikament) haben kann, kann man folgendes überlegen. Es ist möglich, daß unter den gegebenen zellulären AZTTP-Konzentrationen resistente RT-Mutanten bei einer höheren AZTTP-Konzentration vielleicht gar nicht mehr resistent sind, weil dann einerseits der selektive Druck durch eine höhere Einbauwahrscheinlichkeit von AZTTP auf die RT erhöht wird und andererseits die kompetitive Inhibierung stärker zum Tragen kommt. Eine Erhöhung der zellulären AZTTP-Konzentration durch Erhöhung der eingesetzten AZT-Menge ist aufgrund der schlechten Metabolisierung des AZTMPs durch Thymidylatkinase nicht möglich. Dieses würde lediglich zu einer stärkeren Anreicherung von AZTMP in der Zelle führen, wodurch nur toxische Effekte, nicht aber die Wirksamkeit von AZT erhöht würde. Daher ist es notwendig, die intrazelluläre Metabolisierung zu optimieren.

Neben der Phosphorylierung von AZT zu AZTTP stellt die Reduktion der Azidogruppe auf jeder Stufe der Phosphorylierung eine metabolische Nebenreaktion dar (Abb. 1.6). Es konnte gezeigt werden, daß 3'-NH<sub>2</sub>-3'-desoxythymidintriphosphat (NH<sub>2</sub>TTP) nicht nur ein Substrat der HIV-RT, sondern auch der zellulären DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\beta$  ist (Jasko et al., 1995). Das bedeutet, daß die Reduktion der Azidogruppe auch für toxische Nebenwirkungen verantwortlich sein kann, wenn diese Metaboliten intrazellulär zu NH<sub>2</sub>TTP phosphoryliert werden. Eine konstant hohe Konzentration an AZTMP erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß auf dieser Stufe viel NH<sub>2</sub>TMP gebildet wird. Eine effiziente Phosphorylierung von NH<sub>2</sub>TMP zu NH<sub>2</sub>TTP verhindert die selektive Inhibierung der RT. Das bedeutet, daß eine bessere Aktivierung von AZT einerseits die Wirksamkeit (mögliche Unterdrückung resistenter Varianten) von AZT erhöhen und andererseits toxische Nebenwirkungen reduzieren könnte.

Metabolisierung von FLT: FLT ist ein ähnlich selektiver und geringfügig wirkungsvollerer Inhibitor der HIV-RT als AZT (Herdewijn et al., 1987; Pan et al., 1992). Bei diesem Nukleosidanalogon ist die 3'-OH-Gruppe durch ein Fluoratom ersetzt. Es ist noch nicht für die Anwendung zugelassen, befindet sich aber in der klinischen Erprobung.

Im Gegensatz zu AZT, das nur durch Diffusion in die Zelle gelangt, wird FLT sowohl durch Diffusion als auch aktiv durch einen gesteuerten Transportmechanismus in die Zellen geschleust (Schinazi et al., 1990; Kong et al., 1992). Die intrazelluläre Aktivierung erfolgt durch die gleichen Enzyme, die auch bei der Aktivierung von AZT

beteiligt sind, und ist von ähnlicher Effizienz zu der von AZT. Auch hier akkumuliert das Monophosphat FLTMP in mit FLT inkubierten Zelle zu relativ hohen Konzentrationen, jedoch nicht in dem Maße, wie es bei der Phosphorylierung von AZT beobachtet wird (Lehmann et al., 1988). Aufgrund dieser geringfügig besseren Metabolisierung ist die intrazelluläre FLTTP-Konzentration in MT4 Zellen 2 - 3fach höher als die AZTTP-Konzentration nach Inkubation von Zellen mit vergleichbaren Mengen des entsprechenden Nukleosids (Kong et al., 1992). Diese geringfügig bessere Metabolisierung kann auf die Wirksamkeit des Medikamentes *in vivo* beträchtliche Auswirkungen haben (siehe folgendes Kapitel: Genetische Pharmakomodulation). Auch für andere wichtige Zelllinien ist die zelluläre FLT-Phosphorylierung ausreichend, so daß stabile Konzentrationen an FLTTP erreicht werden. Eine optimale Aktivierung, die für die Unterdrückung resistenter RT-Varianten notwendig wäre, findet jedoch auch bei diesem Nukleosidanalogen nicht statt.

Metabolisierung von d4T: d4T (3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin) ist ein weiteres Thymidinanalogon, das für die klinische Anwendung zugelassen ist. Bei diesem Derivat fehlt die 3'-OH-Gruppe und zwischen den beiden sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoffatomen C2' und C3' der Ribose ist eine Doppelbindung.

Analog zu FLT wird auch d4T sowohl durch Diffusion als auch aktiv durch einen gesteuerten Mechanismus in die Zelle geschleust. Die Bioverfügbarkeit beträgt ca. 42 % (Schinazi et al., 1990) und ist damit unvollständig. Die intrazelluläre Metabolisierung verhält sich vollständig anders als die der beiden erstgenannten Nukleosidanaloga AZT und FLT. Zwar sind auch hier die gleichen Enzyme für die intrazelluläre Phosphorylierung zu dem aktiven Triphosphat (d4TTP) verantwortlich, jedoch ist hier die erste Stufe der Aktivierung, die Phosphorylierung von d4T zu d4T-monophosphat (d4TMP) katalysiert durch Thymidinkinase, der limitierende Faktor und nicht, wie bei der Phosphorylierung von AZT, der zweite von Thymidylatkinase katalysierte Schritt (Balzarini et al., 1989). Bei der Inkubation von Zellen mit relativ niedrigen d4T-Konzentrationen (1 µM oder weniger) ist die erreichbare d4TTP-Konzentration aufgrund der schlechten Phosphorylierung von d4T zu d4TMP durch Thymidinkinase noch geringer als die erreichbare AZTTP-Konzentration bei analogen Experimenten mit AZT. Bei einer Erhöhung der verabreichten Nukleosidkonzentrationen auf mehr als 10 µM erhöht sich auch die d4TTP-Konzentration, nicht jedoch die AZTTP-Konzentration, so daß dann die erreichbare d4TTP-Konzentration höher ist als die AZTTP-Konzentration. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, daß die schlechten Substrateigenschaften von



d4T zu Thymidinkinase auf eine relativ niedrige Affinität und eine relativ niedrige maximale Umsatzgeschwindigkeit zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu AZT inhibiert weder d4T noch eines seiner metabolischen Intermediate eine der an der Aktivierung beteiligten Kinasen, so daß eine Erhöhung der d4T-Konzentration auch zu einer höheren d4TTP-Konzentration führt. Eine Erhöhung der AZT-Konzentration hat im Gegensatz dazu keine Auswirkungen auf die AZTTP-Konzentrationen, da in diesem Fall das sich anreichernde AZTMP eine Inhibition der Thymidylatkinase bewirkt (Balzarini et al., 1989).

Um jedoch intrazellulär eine effektive Erhöhung der d4TTP-Konzentrationen zu erreichen, muß der erste Schritt der Phosphorylierung, katalysiert durch Thymidinkinase, verbessert oder umgangen werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde von Meier et al. (1997a, 1997b, 1998) ein Pronukleotidkonzept entwickelt. Bei diesem Konzept werden derivatisierte Phosphotriester von d4TMP, sogenannte Cyclosal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidinmonophosphate, verwendet, die im Gegensatz zu polarem, geladenem d4TMP von Zellen aufgenommen werden können und anschließend intrazellulär durch Hydrolyse in Form einer pH gesteuerten, chemisch induzierten Tandemreaktion d4TMP freisetzen. Dadurch wird der ineffiziente Phosphorylierungsschritt durch Thymidinkinase umgangen. Das Pronukleotidkonzept ist auch auf andere Nukleosidanaloga (AZT) übertragbar (Meier et al., 1997c, 1999), so daß die erste Stufe der Aktivierung prinzipiell auch bei anderen Nukleosidanaloga umgangen werden kann und demnach die erste Stufe der Aktivierung nicht mehr limitierend ist. Bei dem rationalen Design neuer Derivate muß daher die Struktur der TK, die die erste Stufe der Aktivierung katalysiert, nicht zwingend berücksichtigt werden.

In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, daß die d4TTP-Konzentration nicht beliebig stark erhöht werden kann. Im Vergleich zu AZTTP sind die Inhibitoreigenschaften von d4TTP gegenüber der DNA-Polymerase  $\alpha$  ca. dreifach höher, so daß zu hohe d4TTP-Konzentrationen schneller zu einer Inhibition der zellulären Polymerasen und damit wieder zu toxischen Nebenwirkungen führen können.

### **1.5 Genetische Pharmakomodulation zur Verbesserung der Aktivierung nukleosidischer RT-Hemmer**

Um das Problem der schlechten Aktivierung von nukleosidischen HIV-RT-Hemmern zu lösen, gibt es im Prinzip zwei Möglichkeiten. Entweder sucht man neue Nukleosidanaloga, die die geforderten Bedingungen (optimale zelluläre Metabolisierung

zu den medizinisch aktiven Verbindungen und hohe Selektivität gegenüber der RT) erfüllen, oder man optimiert die zelluläre Metabolisierung bekannter Medikamente, deren antivirale Aktivität durch eine unzureichende Aktivierung limitiert wird.

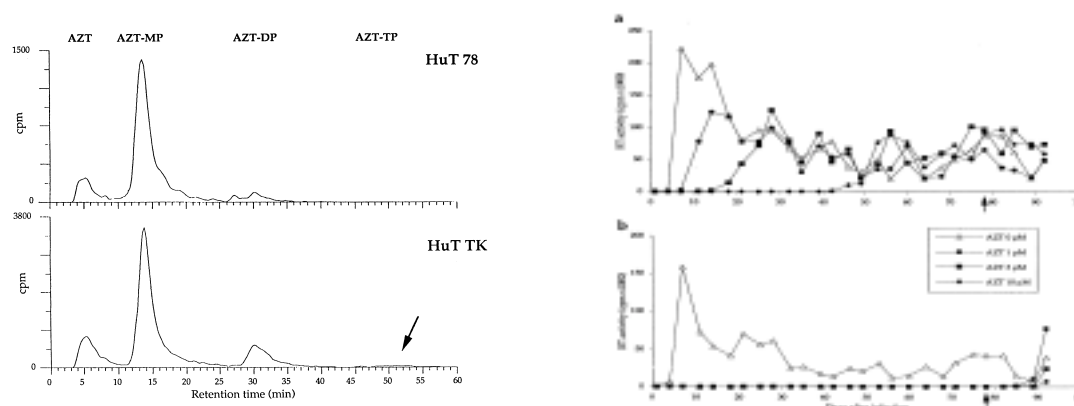
Die Suche nach neuen, besseren Substanzen wurde von vielen pharmazeutischen Unternehmen in den letzten Jahren intensiv betrieben, jedoch ohne größere Erfolge. Das bedeutet nicht, daß es nicht möglich ist, neue Substanzen zu finden, jedoch scheint es für die Entwicklung neuer Derivate notwendig zu sein, sowohl die Raumstruktur der RT als auch die Strukturen der an der Aktivierung beteiligten Kinasen stärker zu berücksichtigen, wie es auch für das Design der potenten Protease-Hemmer durchgeführt wird.

Da die zugelassenen Thymidinanaloga (insbesondere AZTTP und FLTTP) sehr selektive Substrate der RT sind und damit prinzipiell optimale Medikamente darstellen, deren Wirkung lediglich durch die schlechte Metabolisierung durch Thymidylatkinase limitiert ist, scheint die zweite Möglichkeit, die Optimierung der schlechten intrazellulären Metabolisierung ein sinnvoller und vielversprechender Ansatz zu sein.

Die erste Stufe der Aktivierung (die Phosphorylierung vom Nukleosid zum Monophosphat) kann durch das oben beschriebene Pronukleotidkonzept umgangen werden (Meier et al., 1997, Meier et al., 1998). Die letzte Stufe der Aktivierung (Phosphorylierung des Diphosphates zum Triphosphat) ist, wie *in vivo* Experimente zeigen, in den meisten Fällen nicht problematisch. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß NDPK Basen-unspezifisch und darüber hinaus ein sehr schnelles Enzym ist, so daß auch schlechte Substrate mit ausreichender Effizienz zu dem entsprechenden Triphosphat phosphoryliert werden. Da z. B. AZTDP ein sehr schlechtes Substrat der NDPK ist, muß jedoch auch in Erwägung gezogen werden, daß möglicherweise nicht nur NDPK sondern auch andere Enzyme diese Stufe der Aktivierung phosphorylieren. Die zweite Stufe der Aktivierung (die Phosphorylierung des Monophosphates zum Diphosphat) ist jedoch, wie für AZT und FLT gezeigt, problematisch und limitierend. Dieses Problem könnte durch sogenannte genetische Pharmakomodulation gelöst werden (Caruso und Klatzmann, 1994). Im Fall von AZT müßte dazu ein Gen spezifisch in die Zielzellen geschleust werden, das für eine TMPK codiert, die im Idealfall selektiv und effektiv AZTMP zu AZTDP, nicht aber TMP zu TDP phosphoryliert. Dadurch würden mehrere Ziele gleichzeitig erreicht. Erstens würde AZT viel effektiver zu der aktiven AZTTP-Form umgesetzt, so daß viel höhere AZTTP-Konzentrationen erreicht und damit die Wirksamkeit von AZT erhöht werden könnte.

Zweitens wäre die intrazelluläre AZTMP-Konzentration viel niedriger und toxische Nebenwirkungen würden minimiert. Drittens könnten die verabreichten AZT-Konzentrationen so reguliert (reduziert) werden, daß die erreichbare AZTTP-Konzentration optimal hoch ist, um die Virusreplikation maximal zu unterdrücken, ohne jedoch toxische Nebenwirkungen durch Einbau von zellulären Polymerasen in nicht infizierten Zellen zu haben.

Daß genetische Pharmakomodulation prinzipiell und speziell auch in diesem Fall möglich ist, konnte von Guettari et al. (1997) gezeigt werden. Dabei wurden menschliche Zellen in Zellkultur mit einem Vektor transformiert, der die HSV-Thymidinkinase, die auch TMP- und AZTMP-Kinaseaktivität besitzt, codiert. Ein Vergleich mit nicht transformierten Zellen zeigt, daß nach Inkubation der Zellen mit AZT die AZTTP-Konzentrationen in den transformierten Zellen höher ist, als in den nicht transformierten Zellen (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7:** links) Effekt der Herpes-Simplex-Thymidinkinase Expression auf intrazelluläre AZT-Metabolitkonzentrationen in HuT 78-Zellen. Dargestellt sind Chromatographie-Profile von Zellextrakten nicht transformierter Zellen (links, oben) und von mit HSV-TK transformierten Zellen (links, unten) nach Inkubation mit [ $^3$ H]AZT. Die AZTTP-Konzentrationen der transformierten Zellen ist geringfügig höher als die der nichttransformierten Zellen. rechts) Effekt von verschiedenen AZT-Konzentrationen auf die HIV-1-Replikation in nicht transformierten (rechts, a) und mit HSV-TK transformierten (rechts, b) HIV-infizierten HuT 78-Zellen. In transformierten Zellen kann die HIV-Replikation über einen Zeitraum von 78 (nach 78 Tagen wurde die AZT Behandlung abgebrochen) im Gegensatz zu nicht transformierten Zellen mit 10fach geringeren AZT-Konzentrationen unterdrückt werden (aus Guettari et al., 1997).

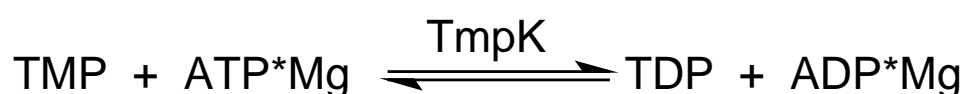
Der Effekt auf die erreichbaren AZTTP-Konzentrationen ist aufgrund der schlechten Substrateigenschaften von AZTMP zu HSV-Thymidinkinase zwar relativ gering, reicht jedoch aus, um in HIV-infizierten Zellen in einer Studie über einen Zeitraum

von 80 Tagen die Virusreplikation auf einen nicht nachweisbaren Wert zu unterdrücken. In nicht transformierten Zellen steigt die Virusreplikation nach 40 Tagen bei einer 10fach höheren Konzentration von AZT auf einen nachweisbaren Wert an. Da einerseits AZT kein gutes Substrat der HSV-Thymidinkinase ist und andererseits die HSV-Thymidinkinase nicht selektiv AZTMP phosphoryliert, sollte der beobachtete Effekt durch Gebrauch von geeigneteren TMPKs deutlich besser sein. Die Beobachtung, daß in Mauszellen AZTMP nicht akkumuliert (Balzarini et al., 1988; Guettari et al., 1997), deutet daraufhin, daß eine der beiden Maus TMPKs AZTMP besser phosphoryliert und damit einen möglichen Kandidaten für einen gentherapeutischen Ansatz darstellt (Balzarini et al., 1997). Auch die TMPK aus *E. coli* scheint ein möglicher Kandidat für einen solchen Ansatz zu sein. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß AZTMP ein gutes Substrat der *E. coli* TMPK ist und nur 2.5fach langsamer phosphoryliert wird als TMP (Lavie et al., 1998a). Ein idealer Kandidat wäre jedoch eine Mutante der menschlichen TMPK, die nur AZTMP nicht aber TMP phosphoryliert. Durch eine Mutante der menschlichen TMPK mit möglichst wenig Veränderungen wird die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion auf das fremde Enzym minimiert. Das Design einer Mutante der menschlichen TMPK mit den geforderten Eigenschaften (selektive Phosphorylierung von AZTMP) für den gentherapeutischen Einsatz in der HIV-Therapie ist Gegenstand des Projektes zu dem diese Arbeit wesentlich beiträgt.

### **1.6 Die Thymidylatkinase - das Schlüsselenzym bei der AZT- und FLT-Aktivierung; TMPK aus Hefe als Modell für das menschliche Enzym**

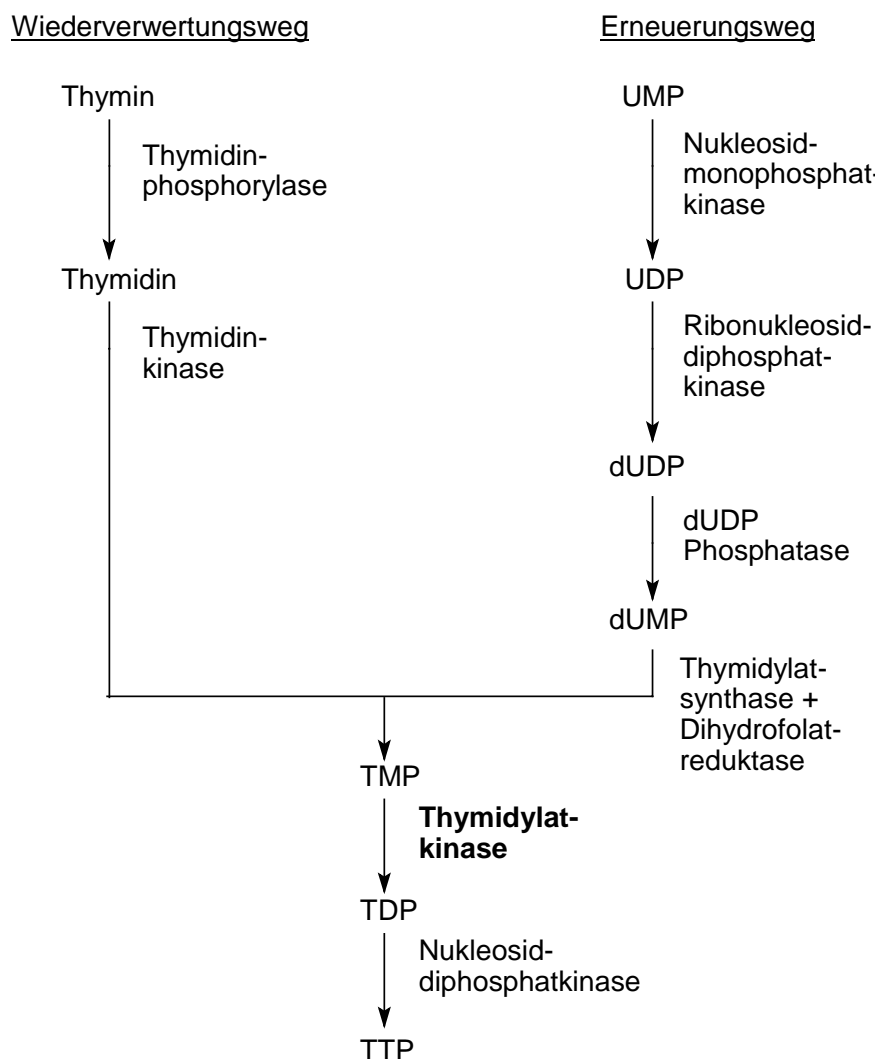
Um die Wirksamkeit von AZT oder anderen nukleosidischen Prodrugs gezielt und effizient durch Optimierung der Metabolisierung zu verbessern, müssen die Gründe der schlechten Aktivierung auf molekularer Ebene bekannt sein. Sowohl für AZT als auch für FLT ist der limitierende Faktor bei der Metabolisierung die durch die zelluläre TMPK katalysierte Phosphorylierung des entsprechenden Monophosphates zum Diphosphat (Furman et al., 1986, Qian et al., 1994). Wenn man auf molekularer Ebene versteht, warum die menschliche TMPK AZTMP gegenüber TMP viel schlechter als Substrat akzeptiert und ebenso versteht, warum beispielsweise die *E. coli* TMPK dahingegen AZTMP fast ebenso gut phosphoryliert wie TMP, sollte es möglich sein, die menschliche TMPK durch gezielte Mutationen so zu verändern, daß sie AZTMP besser phosphoryliert.

Die Thymidylatkinase gehört zu der Klasse der Nukleosidmonophosphatkinasen (NMPK) und sie katalysiert in ihrer physiologischen Funktion reversibel die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf Thymidinmonophosphat (TMP). Der kinetische Mechanismus für die Hefe, *E. coli* und die menschliche TMPK ist noch nicht eindeutig bestimmt. Vermutlich ist er ähnlich wie bei anderen NMPKs (Adenylatkinase (AMPK), Guanylatkinase (GMPK) und Maus TMPK) und verläuft nach einem Random-Bi-Bi-Mechanismus (Rhoads und Lowenstein, 1968; Cheng und Prusoff, 1973; Li et al., 1996; Sheng et al., 1999). Die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  ist für die katalytische Aktivität entscheidend.



Im Gegensatz zu anderen NMPKs ist die Expression der TMPK durch den Zellzyklus reguliert und auf die S-Phase des Zellzyklus limitiert (Su und Scalfani, 1991). TMPK agiert am Verbindungspunkt des Erneuerungs- (*de novo*) und des Wiederverwertungsweges (*salvage pathway*) der Thymidintriphosphat (TTP)-Biosynthese (Abb. 1.8). Da TTP ein Baustein für die DNA-Synthese und damit des Genoms ist, ist TMPK ein essentielles Enzym für die Zellvermehrung und stellt neben der Schlüsselrolle bei der Aktivierung nukleosidischer Prodrugs auch ein attraktives Zielenzym für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente dar. Potente Inhibitoren der TMPK könnten wirksam die TTP-Synthese und damit die Zellreplikation verhindern und so das Wachstum von Tumoren unterbinden.

Da die menschliche TMPK zu Beginn dieses Projektes nicht zur Verfügung stand, wurde die TMPK aus Hefe als Modell für die menschliche TMPK verwendet. Beide TMPKs weisen eine 44 %ige Sequenzidentität und über 78 %ige Sequenzhomologie auf, so daß angenommen wurde, daß beide TMPKs mechanistisch ähnlich funktionieren. Es konnte gezeigt werden, daß Hefe TMPK *in vitro* AZTMP 200fach langsamer phosphoryliert als das natürliche Substrat TMP (Lavie et al., 1997a). Die Hefe TMPK besteht aus 216 Aminosäuren und ist, wie alle anderen Nukleosidmonophosphatkinasen (NMPKs), ein globuläres Protein. Es besteht aus einem zentralen 5-strängigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von 8  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Im Gegensatz zu den meisten anderen monomeren NMPKs, ist TMPK ein Dimer bestehend aus zwei gleichen Untereinheiten (*homodimer*) deren Kontaktfläche (*dimer interface*) aus jeweils hydrophoben Resten drei paralleler Helices beider Monomer besteht.



**Abb. 1.8:** Schematische Darstellung der Biosynthesewege von Thymidintriphosphat.

(Verändert nach Su und Scalfani, 1991)

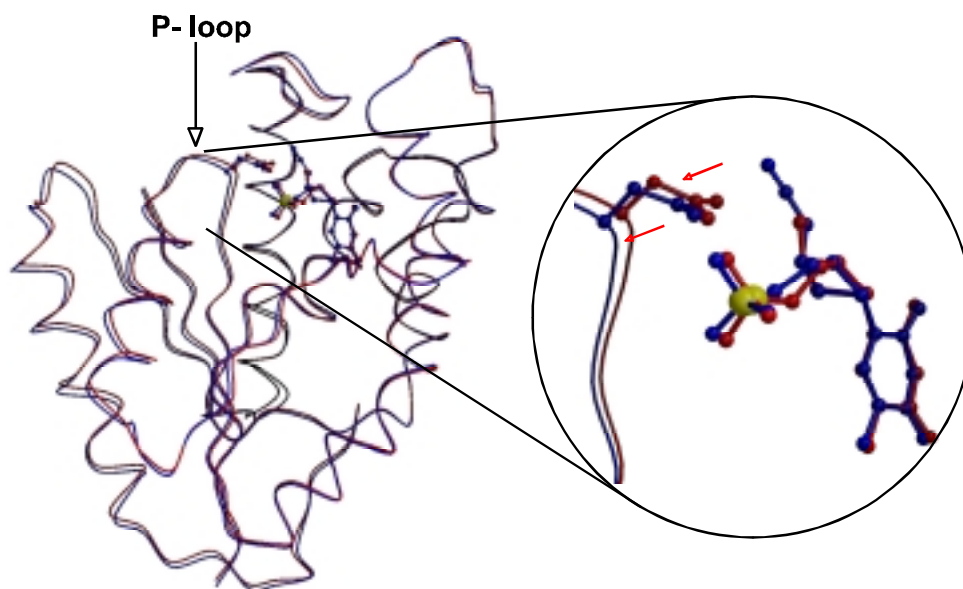
Umfangreiche Studien insbesondere an AMPK, UMPK und GMPK zeigen, daß NMPKs in Abhängigkeit der gebundenen Substrate große Konformationsänderungen vollziehen (Vornrhein et al., 1995). Man unterscheidet eine vollständig offene Konformation, wenn keine Substrate gebunden sind, eine partiell oder halb geschlossene Konformation, wenn eines der beiden Substrate gebunden ist und eine voll geschlossene, aktive Konformation, wenn beide Substrate gebunden sind. Für die Funktion der NMPKs spielen drei Sequenzmotive eine entscheidende Rolle. Das Erste ist der sogenannte P-loop (für Phosphat bindende Schleife, phosphate binding loop) mit dem für alle NMPKs und viele andere GTP- und ATP-bindenden Proteine hochkonserviertem  $Gx_1x_2x_3x_4GK(S/T)$ -Sequenzmotiv ( $x$  steht für eine beliebige Aminosäure) (Saraste et al., 1990). Die Aufgabe des P-loops ist es, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Phosphate des Phosphoryldonors zu binden und zu positionieren. Das Zweite ist die sogenannte LID-Region, die sich über das Triphosphat positioniert und eine geordnete Struktur annimmt, sobald der Phosphoryldonor bindet. Die Sequenzen der LID-Regionen von AMPK und UMPK beinhalten viele basische Seitenketten (Lysine und Arginine), die in das aktive Zentrum gerichtet sind, wenn beide Substrate gebunden sind (Müller und Schulz, 1992; Berry et al., 1994; Abele und Schulz, 1995; Scheffzek et al., 1996; Schlichting und Reinstein, 1997). Durch Abschirmen von negativen Ladungen stabilisieren sie den Übergangszustand und haben demnach katalytische Funktionen. Das Dritte ist das insbesondere für TMPKs charakteristische DR(Y/H)-Motiv. Das Aspartat ist durch Wechselwirkungen zu Wassermolekülen, die als Liganden des Magnesiumions dienen, an der Positionierung des Magnesiumions beteiligt. Das Arginin ist ins aktive Zentrum gerichtet und interagiert sowohl mit den Phosphatgruppen des Phosphoryldonors als auch des Phosphorylakzeptors und wirkt scheinbar als Klammer zwischen den beiden Substraten und schirmt gleichzeitig negative Ladungen ab.

Die Studien an Hefe TMPK zeigen, daß sich Hefe TMPK in mehreren Punkten wesentlich von den aufgeführten charakteristischen Merkmalen der AMPK und UMPK unterscheidet (Lavie et al. 1997a, 1997b, 1998a). Dies läßt vermuten, daß sich TMPK auch mechanistisch von anderen NMPKs unterscheidet. Erstens sind die Aminosäuren  $x_2$  und  $x_3$  des P-loops nicht wie bei AMPK und UMPK Glycin und Prolin, sondern eine Carboxylsäure (Asp14) und ein Arginin (Arg15). Zweitens befinden sich in der LID-Region keine basischen Reste (Lysine oder Arginine), die mit den Phosphaten der Substrate interagieren und somit eine katalytische Funktion einnehmen könnten. Die Strukturen der Hefe TMPK im Komplex mit TMP bzw. Tp5A ( $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Thymidyl)-pentaphosphat, ein Binukleotidinhibitor, siehe S.187) zeigen, daß das Asp14 aus dem P-loop eine zweizählige Wechselwirkung zu der 3'-OH-Gruppe der TMP-Ribose macht. Eine direkte Wechselwirkung der Ribose des Phosphorylakzeptors mit dem P-loop ist für TMPK einzigartig und wurde zuvor bei keiner anderen NMPK beobachtet. Die Seitenkette des Arg15 ist in der Tp5A-Struktur ins aktive Zentrum orientiert, so daß die Guanidiniumgruppe eine Wechselwirkung mit dem mittleren Phosphat von Tp5A macht. Der Wechselwirkung des Arg15 zu dem mittleren Phosphat von Tp5A wird eine analoge katalytische Rolle zugesprochen, wie den Argininen aus den LID-Regionen in AMPK und UMPK. Mutationen des Arg15 reduzieren die katalytische Aktivität der Hefe TMPK um den Faktor 200 (Brundiers et al., 1999). Eine strukturelle Überlagerung der Hefe TMPK mit AMPK oder UMPK zeigt, daß die Guanidiniumgruppe

des Arg15 von TMPK räumlich ungefähr die gleiche Position einnimmt wie Arg137 von UMPK oder Arg132 von AMPK. Da im Vergleich zu AMPK und UMPK in TMPK weniger Arginine ins aktive Zentrum gerichtet sind, die den Übergangszustand stabilisieren können, nimmt darüber hinaus das Arginin des DR(Y/H)-Motivs vermutlich nur für TMPK eine Schlüsselrolle bei der Katalyse ein.

Die Struktur der Hefe TMPK im Komplex mit AZTMP läßt vermuten, warum AZTMP von Hefe TMPK 200fach langsamer phosphoryliert wird als TMP (Lavie et al., 1997a; 1997b). Eine Überlagerung der beiden Monophosphat-Strukturen zeigt eine nahezu identische Positionierung von TMP und AZTMP mit allen dazugehörigen Wechselwirkungen zwischen TMPK und den Substraten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den gemessenen  $K_M$ -Werten der beiden Substrate ( $9 \mu\text{M}$  für TMP und  $6 \mu\text{M}$  für AZTMP) zur Hefe TMPK. Auch die Wechselwirkung zwischen Asp14 und der 3'-OH-Gruppe in TMP bzw. der Azidogruppe in AZTMP ist gleich und führt zu der Vermutung, daß im Fall von AZTMP der  $pK_A$ -Wert der Carboxylatgruppe des Asp14 verschoben ist und die Seitenkette protoniert ist. Um jedoch die ca.  $1.5 \text{ \AA}$  längere Azidogruppe in AZTMP unterzubringen, ist in der AZTMP-Struktur der gesamte P-loop im Vergleich zu der TMP-Struktur um  $0.5 \text{ \AA}$  verschoben (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9:** Überlagerung der TMP-(rot) und AZTMP-(blau) Hefe TMPK-Strukturen. Dargestellt sind die  $C_{\alpha}$ -traces der beiden Komplexe in den angegebenen Farben. Die Seitenketten von Asp14 und die Substrate TMP bzw. AZTMP sind in beiden Strukturen als *ball and stick* Präsentation dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt deutlich die Verschiebung des P-loop um  $0.5 \text{ \AA}$ , induziert durch die größere Azidogruppe in AZTMP (aus Lavie et al., 1997a).



Aufgrund folgender Faktoren scheint die durch die größere Azidogruppe induzierte P-loop Bewegung für die 200fach reduzierte AZTMP-Phosphorylierung durch Hefe TMPK verantwortlich zu sein. Erstens hat der P-loop die Aufgabe die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate des Phosphoryldonors ATP zu binden und zu positionieren, so daß eine Verschiebung des P-loops die relative Positionierung der beiden Substrate zueinander beeinflußt, was zu einer verlangsamten Katalyse führen kann. Zweitens wird mit dem P-loop auch Arg15 verschoben, so daß ein vermutlich katalytischer Rest direkt von dieser Bewegung betroffen ist und dadurch für die Stabilisation des Übergangszustandes nicht mehr optimal positioniert ist. Drittens kann die Verschiebung des Asp14 selbst für eine verminderte Aktivität der Hefe TMPK verantwortlich sein. Die Rolle des Restes ist noch nicht vollständig geklärt und verstanden. Es ist möglich, daß dieses Aspartat eine entscheidende Rolle bei der Katalyse spielt und eventuell selbst ein katalytischer Rest ist. Mutationsstudien zeigen, daß Mutationen dieses Restes die katalytische Aktivität der Hefe TMPK auf einen nicht meßbaren Wert reduzieren (Brundiers et al., 1999)

### 1.7 Thymidylatkinase aus *E. coli*

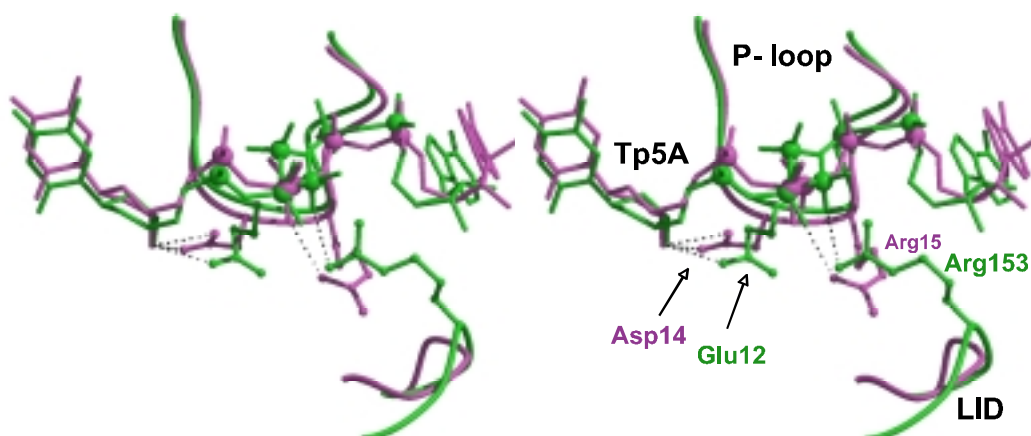
Ein Sequenzvergleich der P-loops und der LID-Regionen der TMPKs aus Hefe, Mensch und *E. coli* mit AMPK aus Schwein und UMPK aus *Dictyostelium* (Abb. 1.10) zeigt, daß sich *E. coli* TMPK von denen aus Hefe und Mensch unterscheidet.

	<b>P-loop</b>	<b>LID</b>
TMPK <sub><i>E. coli</i></sub>	<sup>9</sup> EGLE <u>GAG</u> <u>K</u> TT <sup>18</sup>	<sup>147</sup> L <u>K</u> R <u>A</u> R <u>A</u> R <u>G</u> E <u>L</u> D- <u>R</u> I <sup>159</sup>
TMPK <sub>Hefe</sub>	<sup>11</sup> EGLD <u>R</u> T <u>G</u> KTT <sup>20</sup>	<sup>141</sup> A <u>E</u> K <u>S</u> -G <u>F</u> G <u>D</u> -E- <u>R</u> Y <sup>151</sup>
TMPK <sub>Mensch</sub>	<sup>12</sup> EGV <u>D</u> R <u>A</u> G <u>K</u> ST <sup>21</sup>	<sup>142</sup> - <u>K</u> R <u>G</u> -A <u>F</u> G <u>H</u> -E- <u>R</u> Y <sup>151</sup>
AMPK <sub>Schwein</sub>	<sup>14</sup> VGGP <u>G</u> S <u>G</u> <u>K</u> GT <sup>23</sup>	<sup>126</sup> T <u>K</u> R <u>L</u> L <u>K</u> R <u>G</u> E <u>T</u> S <u>G</u> R <u>V</u> <sup>139</sup>
UMPK <sub>dicty</sub>	<sup>12</sup> LGGP <u>G</u> S <u>G</u> <u>K</u> GT <sup>21</sup>	<sup>125</sup> T <u>Q</u> R <u>L</u> L <u>K</u> R <u>G</u> E <u>S</u> S <u>G</u> R <u>S</u> <sup>138</sup>

**Abb. 1.10:** Strukturbezogener Sequenzvergleich der P-loops und der LID-Regionen von TMPKs aus Mensch, Hefe und *E. coli*, AMPK aus Schwein und UMPK aus *Dictyostelium*. Alle basischen Reste (Lysine und Arginine) sind fett markiert, diejenigen, die mit Phosphatgruppen interagieren, sind zusätzlich doppelt unterstrichen, diejenigen, die mit der Adeninbase eine hydrophobe *stacking* Wechselwirkung machen, sind zusätzlich einfach unterstrichen. Carboxylsäuren aus dem P-loop, die eine Wechselwirkung mit der 3'-OH-Gruppe von TMP machen, sind gestrichelt unterstrichen (aus Lavie et al., 1998).

Aufgrund der Verteilung der basischen Reste in diesen Sequenzmotiven ist die *E. coli* TMPK den AMP- und UMP-Kinasen ähnlicher als den TMPKs aus Mensch und Hefe. Die *E. coli* TMPK hat zwar auch eine Carboxylsäure an Position  $x_2$  in dem P-loop-Motiv, jedoch ist es im Gegensatz zu den Aspartaten in Hefe (Asp14) und Mensch (Asp15) ein Glutamat (Glu12). Die darauffolgende Aminosäure ( $x_3$ ) ist in *E. coli* TMPK, wie auch in UMPK und AMPK, ein Glycin (Gly13) und nicht wie in Hefe und Mensch TMPK ein Arginin (Arg15 (Hefe) bzw. Arg16 (Mensch)). In Analogie zu UMPK und AMPK sind in der LID-Region der *E. coli* TMPK mehrere basische Reste, die in Hefe und menschlicher TMPK nicht vorhanden sind. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, daß die katalytische Funktion, die dem Arg15 in der Hefe TMPK zugesprochen wird, in *E. coli* TMPK von einem Arginin aus der LID-Region übernommen wird, wie es auch für UMPK und AMPK gezeigt wurde. Diese Überlegung veranlaßte zu der Hypothese, daß eine mögliche P-loop Verschiebung durch Bindung von AZTMP an *E. coli* TMPK keine so drastischen Auswirkungen auf die AZTMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit haben sollte, wie im Fall von Hefe TMPK, da von dieser Bewegung das vermeintlich katalytische Arginin aus der LID-Region nicht direkt betroffen sein sollte.

Kinetische Messungen an rekombinant hergestellter *E. coli* TMPK mit TMP und AZTMP bestätigten diese Vermutung insofern, daß die AZTMP-Phosphorylierung nur 2.5fach langsamer ist als die TMP-Phosphorylierung (Lavie et al., 1998a). Bei Hefe TMPK beträgt dieser Faktor 200. Die Röntgenkristallstruktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit Tp5A zeigt, daß das Arg153 aus der LID-Region mit dem mittleren Phosphat von Tp5A eine Wechselwirkung macht (Lavie et al., 1998b). Eine Überlagerung der Hefe und *E. coli* TMPK-Tp5A-Strukturen verdeutlicht, daß die Guanidiniumgruppen der Arginine 15 (aus dem P-loop der Hefe TMPK) und 153 (aus der LID-Region der *E. coli* TMPK) räumlich ungefähr die gleiche Position einnehmen und dementsprechend vermutlich auch die gleiche katalytische Funktion haben (Abb. 1.11). Diese Beobachtung stärkt die Hypothese, daß die Bindung von AZTMP an *E. coli* TMPK die Position des Arginin 153 nicht beeinflußt, da dieses von einer etwaigen P-loop Bewegung nicht betroffen sein sollte. Weiter führte diese Beobachtung zu der Unterteilung der TMPKs in zwei verschiedene Typen: Bei Typ I TMPKs stammt das vermutlich katalytische Arginin aus dem P-loop und bei Typ II TMPKs aus der LID-Region.



**Abb. 1.11:** Stereodiagramm der überlagerten Tp5A-TMPK-Strukturen aus Hefe (pink) und *E. coli* (grün). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind jeweils Tp5A (links Thymidin, rechts Adenin; in der *E. coli* Struktur sind für das mittlere Phosphat beide beobachteten Konformationen dargestellt), die Seitenketten von Asp14 und Arg15 aus dem P-loop der Hefe TMPK sowie Glu12 und Arg153 aus dem P-loop bzw. der LID-Region der *E. coli* TMPK. Als gestrichelte Linien sind die zweizählige Wechselwirkung zwischen Asp14 und der 3'-OH Gruppe von TMP in Hefe TMPK gegenüber der „side on“ Wechselwirkung zwischen Glu12 und der 3'-OH Gruppe von TMP in *E. coli* TMPK sowie die Wechselwirkungen der Arginine (Arg15 aus dem P-loop (Hefe) und Arg153 aus der LID-Region (*E. coli*)) zu dem mittleren Phosphat von Tp5A dargestellt. Der P-loop und die LID-Region sind als  $C_{\alpha}$ -trace gezeigt.

Ebenso wurde deutlich, daß Glu12 in *E. coli* TMPK eine einfache „side-on“ Wechselwirkung zu der 3'-OH Gruppe der TMP-Ribose macht. In Hefe TMPK ist die analoge Wechselwirkung von Asp14 zweizählig (Abb. 1.11). Inwiefern sich die unterschiedliche Wechselwirkung der P-loop Carboxylatgruppen in Hefe bzw. *E. coli* TMPK zu der 3'-OH-Gruppe von TMP auf die Unterbringung der größeren Azidogruppe in AZTMP und auf die Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der *E. coli* TMPK auswirkt, kann allein anhand dieser Ergebnisse nicht verifiziert werden.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf Struktur-Aktivitätsuntersuchungen antiviraler Vorläufermedikamente an Thymidylatkinasen aus *E. coli* und Mensch, Mutanten des menschlichen Enzyms zu entwerfen, die spezifisch und effizient AZTMP phosphorylieren und die demnach geeignete Kandidaten für die gentherapeutische Pharmakomodulation von AZT in der HIV-Therapie sind.

Aufbauend auf die in der Einleitung aufgeführten Ergebnisse der Studien an Hefe und *E. coli* TMPK, sollten im ersten Teil dieser Arbeit die guten Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der *E. coli* TMPK stärker analysiert werden. Dazu sollte der Binukleotidinhibitor AZTp5A ( $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphat) synthetisiert und die Röntgenstruktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A gelöst werden. Ein Vergleich dieser Struktur mit der bekannten Struktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit Tp5A sollte die Gründe der guten Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der *E. coli* TMPK verdeutlichen.

Da das Zielenzym des Projektes die menschliche TMPK ist, sollten im zweiten Teil dieser Arbeit die Studien auf das menschliche Enzym erweitert werden. Um auf molekularer Ebene möglichst viele Informationen über die Funktionsweise des katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK zu erhalten, sollten zum einen die Aktivität der menschlichen TMPK mit den natürlichen Substraten TMP und ATP bestimmt und zum anderen Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Nukleotidkombinationen, die verschiedene Zustände entlang der Reaktionskoordinate repräsentieren, gelöst werden. Insbesondere sollten die Röntgenstrukturen der menschlichen TMPK von Nukleotidkomplexen gelöst und verglichen werden, die den substrat- oder produktgebundenen Zustand oder den Übergangszustand der Phosphoryltransferreaktion simulieren.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollten darüber hinaus Struktur-Aktivitätsuntersuchungen der AZT-Metaboliten AZTMP und  $NH_2$ TMP an menschlicher TMPK durchgeführt werden. Ähnlich wie für das natürliche Substrat TMP sollten auch für AZTMP und  $NH_2$ TMP die  $k_{cat}$ -Werte bestimmt und verschiedene Nukleotidkomplexstrukturen der menschlichen TMPK mit AZTMP und  $NH_2$ TMP gelöst werden. Ein Vergleich dieser Raumstrukturen mit denen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle sollte zum Verständnis der unterschiedlichen Substrateigenschaften von TMP und der AZT-Metaboliten gegenüber der menschlichen TMPK beitragen.

Um den Einfluß des 3'-Substituenten des Phosphorylakzeptors auf die katalytische Aktivität der menschlichen TMPK detaillierter zu verstehen, sollten im vierten Teil dieser Arbeit analoge Struktur-Aktivitätsuntersuchungen mit den partiell aktivierten antiviralen Vorläufermedikamenten FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK durchgeführt werden.

Basierend auf die Ergebnisse dieser Arbeit, zusammen mit bekannten Ergebnissen über die NDPK und die HIV-RT, sollten im fünften Kapitel dieser Arbeit Nukleotidanaloga entworfen werden, die möglicherweise besser zu der aktiven Form phosphoryliert werden und gleichzeitig selektive Substrate der HIV-RT sind.

Im abschließenden und sechsten Kapitel sollten anhand der Struktur-Aktivitätsuntersuchungen dieser Arbeit, zusammen mit den bekannten Studien über die Hefe und *E. coli* TMPKs, Mutanten der menschlichen TMPK entworfen werden, die selektiv und effizient AZTMP phosphorylieren und geeignete Kandidaten für die gentherapeutische Pharmakomodulation von AZT in der HIV-Therapie sind.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 AZTMP, ein gutes Substrat der *E. coli* TMPK - die strukturelle Erklärung

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Arbeiten zur Analyse der guten Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der bakteriellen TMPK vorgestellt und diskutiert. Durch Lösen der Röntgenstruktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTMP auf der Monophosphatbindungsstelle sollte deutlich werden, wie die *E. coli* TMPK auf die Bindung der im Vergleich zur OH-Gruppe von TMP ca. 1.5 Å längeren Azidogruppe in AZTMP strukturell reagiert. Die Hefe TMPK reagiert auf die Bindung von AZTMP aufgrund der zweizähligen Wechselwirkung des Asp14 zur funktionellen Gruppe an der 3'-Position mit der Verschiebung des P-loops um 0.5 Å. Dieses ist vermutlich der strukturelle Grund für die ca. 200fach langsamere maximale Umsatzgeschwindigkeit der AZTMP-Phosphorylierung im Vergleich zu der TMP-Phosphorylierung unter *steady-state* Bedingungen (siehe Kapitel 1.6).

Eine hypothetische P-loop Bewegung der bakteriellen TMPK bei der Bindung von AZTMP sollte im Gegensatz zu der Verschiebung des vermutlich katalytischen Arg15 aus dem P-loop in Hefe TMPK keinen direkten Einfluß auf die Position des vermutlich katalytischen Arg153 aus der LID-Region haben. Um dieses zu überprüfen, sollte die Röntgenstruktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit dem Binukleotidinhibitor AZTp5A (Abb. 3.1) gelöst werden. Eine Überlagerung dieser Struktur mit der bekannten Tp5A-Struktur sollte die strukturellen Unterschiede zwischen der TMP- und AZTMP-Bindung zeigen und so eine detaillierte Erklärung liefern, warum AZTMP ein gutes Substrat der *E. coli* TMPK ist. Im einzelnen wurde dazu AZTp5A synthetisiert, die Affinität zu der *E. coli* TMPK bestimmt und die Struktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A gelöst.

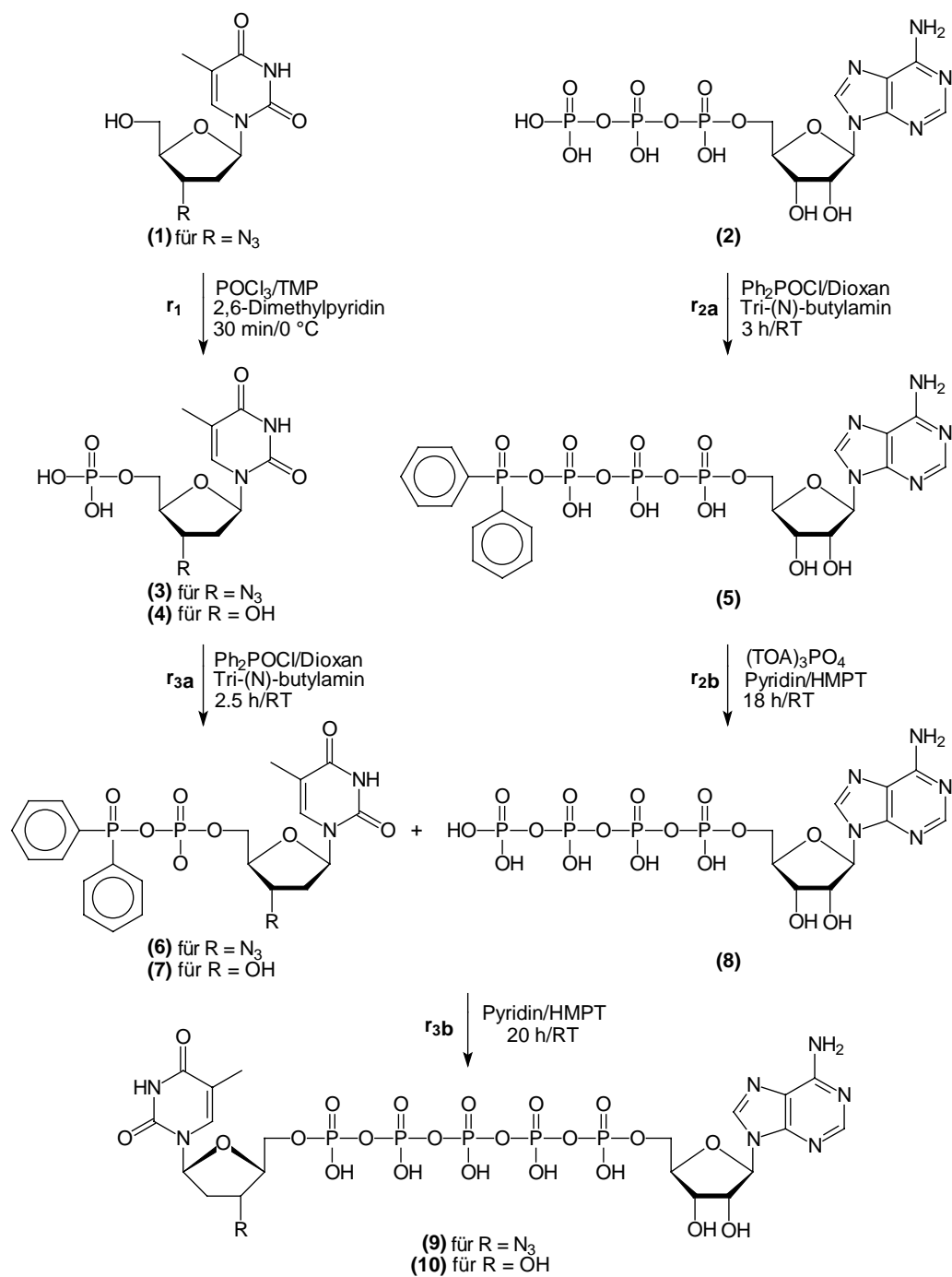
### 3.1.1 Synthese der Binukleotidinhibitoren $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Thymidyl)-pentaphosphat (Tp5A) (10) und $P^1$ -(5'-Adenosyl)- $P^5$ -(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphat (AZTp5A) (9)

Die Herstellung der Binukleotidinhibitoren Tp5A **10** und AZTp5A **9** ausgehend von Thymidinmonophosphat (**4**) bzw. Azidothymidinmonophosphat (**3**) und Adenosintriphosphat (**2**) basierte auf eine von Feldhaus et al. (1975) entwickelte Synthesesequenz für die Herstellung von Ap5A (Abb. 3.1).

Azidothymidinmonophosphat (**3**) wurde im einleitenden Reaktionsschritt  $r_1$  ausgehend von Azidothymidin (**1**) unter basischer Katalyse (2,6-Dimethylpyridin) durch Phosphorylierung mit 2 Äquivalenten Phosphoroxidtrichlorid in wasserfreiem Trimethylphosphat hergestellt. Adenosintetraphosphat (**8**) wurde durch Phosphorylierung von Adenosintriphosphat (**2**) erhalten. Dafür wurde ATP **2** als Tri-(N)-oktylammoniumsalz mit Diphenylphosphorochloridat in wasserfreiem Dioxan in Gegenwart von Tri-(N)-butylamin aktiviert  $r_{2a}$  und anschließend das aktivierte ATP **5** durch Substitution der Diphenylphosphorylgruppe durch Tri-(N)-oktylammoniumphosphat in Pyridin zu dem entsprechenden Ap4 **8** umgesetzt  $r_{2b}$ .

Im abschließenden Reaktionsschritt  $r_3$  wurden die Monophosphate TMP **4** bzw. AZTMP **3** mit dem synthetisierten Ap4 **8** zu den entsprechenden Binukleotidinhibitoren Tp5A **10** bzw. AZTp5A **9** kondensiert. Dafür wurden die Monophosphate TMP **4** bzw. AZTMP **3** mit Diphenylphosphorochloridat in wasserfreiem Dioxan in Gegenwart von Tri-(N)-butylamin aktiviert  $r_{3a}$  und durch Substitution der Diphenylphosphorylgruppe mit Ap4 in Pyridin zu den entsprechenden Binukleotiden Tp5A **10** und AZTp5A **9** umgesetzt  $r_{3b}$ .

Bei diesen Substanzen (Tp5A und AZTp5A) sind beide Substrate der TMPK (TMP und ATP bzw. AZTMP und ATP) durch eine zusätzliche Phosphorylgruppe verbunden. Aus bekannten Strukturen (AMPK im Komplex mit Ap5A bzw. UMPK im Komplex mit Up5A) ist bekannt, daß diese Moleküle sowohl als Bisubstrate (Müller und Schulz, 1992; Abele und Schulz, 1995) (TMP/AZTMP und ATP über eine zusätzliche Phosphorylgruppe verbunden) oder Biprodukte (Scheffzek et al., 1996) (TDP/AZTDP und ADP über eine zusätzliche Phosphorylgruppe verbunden) angesehen werden können, nicht jedoch als Übergangszustandsanaloge.



**Abb. 3.1:** Reaktionsschema für die Herstellung der Binucleotidinhibitoren Tp5A **10** und AZTp5A **9**.



### 3.1.2 Affinitätsbestimmung der Inhibitoren Tp5A und AZTp5A zu *E. coli* TPMK

Die *E. coli* TPMK wurde von Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiers von genomischer DNA in einen pJC20 Vektor kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert (Lavie et al., 1998a). Die Expression und Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) und anschließender Gelfiltration (S-200) erfolgte von Dr. A. Lavie und lieferte *E. coli* TPMK mit einer Reinheit von über 95% (Lavie et al., 1998a).

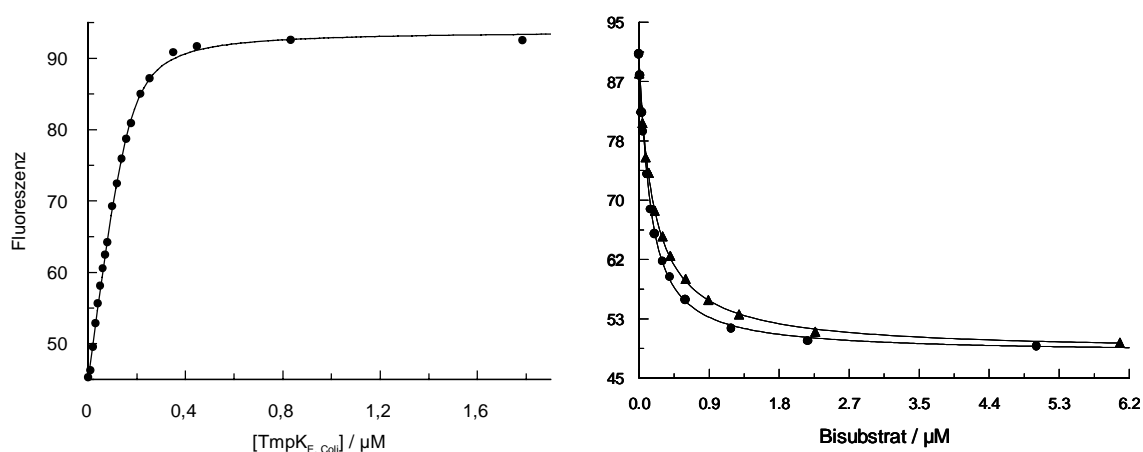
Für die Kristallisation der *E. coli* TPMK im Komplex mit AZTp5A müssen die Konzentrationen der beiden Komponenten so gewählt sein, daß die Bildung eines stöchiometrischen Komplexes möglich ist. Dazu ist es hilfreich, die Gleichgewichtskonstante des Komplexes zu kennen. Die Affinitätsbestimmung von Tp5A und AZTp5A zu *E. coli* TPMK konnte nicht durch direkte Fluoreszenztitrationen erfolgen, da bei der Bindung der Substrate an *E. coli* TPMK keine Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz zu beobachten ist, die man als Meßsignal verwenden könnte. Daher wurde sie indirekt durch Verdrängung von Tp5A-mant (fluoreszenzmarkiertes Tp5A-Analogon, bei dem die N-methylantraniloylgruppe an die 2',3'-Position der Ribose von Adenosin gebunden ist) aus einem Komplex mit *E. coli* TPMK durch Zutitration des zu untersuchenden Binukleotids ermittelt.

Der Fluorophor (N-methylantraniloylat) hat sehr gute Fluoreszenzeigenschaften (hohe Quantenausbeute, hohe Photostabilität und eine Anregung bei Wellenlängen, die außerhalb des Absorptionsspektrums von Proteinen liegt) und eignet sich daher sehr gut, um mit diesem Messungen an Proteinen unter Ausnutzung der extrinsischen Fluoreszenz durchzuführen.

Um mit dem Programm SCIENTIST die erhaltenen Meßpunkte der Verdrängungstitration auszuwerten, muß die Gleichgewichtskonstante des Komplexes von *E. coli* TPMK und Tp5A-mant bekannt sein. Daher wurde zunächst der  $K_d$ -Wert von Tp5A-mant zu *E. coli* TPMK durch direkte Fluoreszenztitration bestimmt. Dazu wurden 100 nM Tp5A-mant vorgelegt und TPMK solange zutitriert, bis keine Fluoreszenzänderung mehr zu beobachten war, bis also alles Tp5A-mant gebunden war. In dem linken Graphen der Abb. 3.2 sind die erhaltenen Fluoreszenzwerte der einzelnen Titrationsschritte gegen die entsprechende Proteinkonzentration aufgetragen. Die Meßpunkte zeigen einen Fluoreszenzanstieg um ca. 100 % bei der vollständigen Bindung des Fluorophors an *E. coli* TPMK. Ein Kurvenangleich unter Verwendung einer

quadratischen Gleichung (siehe experimenteller Teil) mit dem Programm GRAFIT an die erhaltenen Meßpunkte lieferte einen  $K_d$ -Wert von  $17 \pm 2$  nM.

Die Kenntnis der Affinität von Tp5A-mant zu *E. coli* TMPK ermöglichte die Bestimmung der Affinitäten von Tp5A und AZTp5A zu diesem Enzym durch kompetitive Verdrängung von Tp5A-mant aus einem Komplex mit *E. coli* TMPK. Dazu wurde ein Komplex aus 50 nM Tp5A-mant und 150 nM *E. coli* TMPK vorgelegt und Tp5A bzw. AZTp5A stufenweise zutitriert, bis keine Fluoreszenzänderung mehr zu beobachten war. Der rechte Graph der Abb. 3.2 zeigt die erwartete ca. 100 %ige Fluoreszenzabnahme, die auf die Verdrängung des Fluorophors aus dem Komplex mit *E. coli* TMPK durch Bindung von Tp5A bzw. AZTp5A zurückzuführen ist. Durch iterativen Kurvenangleich an die Meßdaten mit dem Programm SCIENTIST (Gleichungssystem siehe experimenteller Teil) wurden die  $K_d$ -Werte bestimmt. Die in dem rechten Graphen der Abb. 3.2 dargestellten Kurven liefern  $K_d$ -Werte von  $20 \pm 1$  nM für Tp5A und  $34 \pm 2$  nM für AZTp5A.



**Abb. 3.2:**  $K_d$ -Wert Bestimmung der Binukleotide Tp5A-mant, Tp5A und AZTp5A zu *E. coli* TMPK mittels Fluoreszenztitrations. Links) Gleichgewichtstitration von 100 nM Tp5A-mant mit steigenden *E. coli* TMPK-Konzentrationen. Rechts) Verdrängungstitrationen von 50 nM Tp5A-mant aus einem Komplex mit 150 nM *E. coli* TMPK mit steigenden Konzentrationen von Tp5A (●) bzw. AZTp5A (▲). Die Bedingungen sind im experimentellen Teil aufgeführt.

Die Affinität von AZTp5A zu *E. coli* TMPK ist 1.7fach geringer als die von Tp5A. Das bedeutet, daß der Ersatz der 3'-OH-Gruppe der TMP-Ribose durch die größere Azidogruppe kaum einen Einfluß auf die Affinität des Binukleotids hat und demnach vermutlich auch der Großteil der in der *E. coli* TMPK-Tp5A-Struktur beobachteten

Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand in dem Komplex mit AZTp5A identisch sein sollten.

### 3.1.3 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung des *E. coli* TMPK-AZTp5A-Komplexes

Da die hohe Affinität von AZTp5A zu *E. coli* TMPK die Bildung eines stöchiometrischen Komplexes unter den Bedingungen, die für die Kristallisation von *E. coli* TMPK-Tp5A verwendet wurden (Lavie et al., 1998b), erlaubt, wurde die Cokristallisation dieses Komplexes unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Die Kristallisation der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A erfolgte nach der Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen. Dazu wurde zunächst eine Proteinlösung mit AZTp5A zu Endkonzentrationen von 480  $\mu\text{M}$  Protein und 2 mM AZTp5A hergestellt. Anschließend wurden 4  $\mu\text{l}$  dieser Protein/Nukleotidlösung mit 2  $\mu\text{l}$  einer 1.25 M Ammoniumphosphatlösung (pH 8.0) gemischt und gegen eine Reservoirlösung, bestehend aus 2.5 M Ammoniumphosphat (pH 8.0), bei 20 °C equilibriert. Nach ca. 3 bis 4 Tagen wuchsen Kristalle mit typischen Abmessungen von ca. 500 x 400 x 200  $\mu\text{m}^3$  (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Typische Einkristalle der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A. Die Abmessungen des Kristalls des linken Bildes betragen ca. 500 x 400 x 200  $\mu\text{m}^3$ .

Für die Datensammlung wurde ein Kristall in eine Kapillare auf einen Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls und der Drehachse montiert. Die Messung wurde bei 4 °C an einer Kupferdrehanode (MAC Science) bei 45 kV, 100 mA und einer Wellenlänge von 1.5419 Å mit einem Siemens Hi-Star Flächenzähler durchgeführt. Die Indizierung und Integration der gemessenen Reflexe sowie die Skalierung verschiedener Meßläufe wurden mit den Programmen XDS und XSCALE

durchgeführt (Kabsch, 1993). Die Raumgruppe ist R32 und die maximale Auflösung beträgt 2.2 Å. Eine Zusammenfassung der Statistik der Datensammlung und -auswertung ist in Tab. 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1:** Statistik der Datensammlung und Datenreduktion des *E. coli* TMPK-AZTp5A-Komplexes

Röntgenquelle	Kupferdrehanode, Dortmund
Wellenlänge (Å)	1.5419
Detektor	Siemens Hi-Star Flächenzähler
Temperatur (K)	277
Auflösung (Å)	2.2
Zahl der Reflexe	
alle gemessenen	56386
unabhängigen	15949
Vollständigkeit (%)	
alle Reflexe	90.4
äußere Schale	80.0
$R_{\text{sym}}^1$ (%)	
alle Reflexe	6.5
äußere Schale	24.8
Signal/Rausch-Verhältnis ( $I/\sigma$ )	
alle Reflexe	17.6
äußere Schale	2.6
Raumgruppe	R32
Elementarzelle (Å)	
a = b	152.1
c	75.6
$\alpha = \beta \neq \gamma$	90/120
Moleküle/asymmetrische Einheit	1

$$^1 R_{\text{sym}} = \sum_{hkl, i} |I_{hkl, i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl, i} I_{hkl, i}$$

Für die Strukturbestimmung werden neben den gemessenen Intensitäten auch Informationen über die Phasen der einzelnen Reflexe benötigt. Diese können entweder experimentell durch a) multiplen isomorphen Ersatz, MIR (Übersichtsartikel: Watenpugh, 1985) oder b) anomale Dispersion, MAD (Hendrickson et al., 1985, 1991) oder durch Verwenden eines Modells mit sehr ähnlicher Struktur (molekularer Ersatz, MR, Rossmann, 1972) erhalten werden. Voraussetzung für die Methode des molekularen Ersatzes ist die korrekte Orientierung des strukturell homologen Modells in der Einheitszelle des gemessenen Datensatzes. Diese kann durch Rotation und Translation der Pattersonfunktion eines Suchmodells gegen diejenige des gemessenen Datensatzes erhalten werden.

Da die *E. coli* TMPK-Tp5A-Struktur bekannt ist und der TMPK-AZTp5A-Kristall isomorph zu dem TMPK-Tp5A-Kristall ist, wurde das Modell der TMPK-Tp5A-Struktur direkt, ohne erforderliche Rotations- und Translationssuche als Startmodell für die Strukturverfeinerung verwendet. Dazu wurde das gesamte Modell, einschließlich der beiden Nucleoside Thymidin und Adenosin des Binucleotids Tp5A benutzt. Lediglich die Phosphorylgruppen von Tp5A wurden in der ersten Runde der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Die Verfeinerung wurde mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1993) durchgeführt und folgende Strategie wurde verwendet: In der ersten Runde der Strukturverfeinerung wurde das Startmodell zuerst mittels einer *rigid body*-Verfeinerung insgesamt als starrer Körper in die richtige Position und Orientierung in der Einheitszelle gebracht. Anschließend wurde eine Lösungsmittelkorrektur (*bulk solvent-correction*) durchgeführt, um die Beiträge der Elektronendichte der beweglichen, nicht statischen Wassermoleküle (tragen zu den gemessenen und zeitlich gemittelten Beugungsintensitäten bei) um das Proteinmolekül in der asymmetrischen Einheit bei der Verfeinerung zu berücksichtigen und zu glätten. Um den Einfluß des Startmodells (*model bias*) auf die Verfeinerung zu minimieren und um lokale Energieminima zu überwinden wurde nachfolgend ein *simulated annealing* bei einer Starttemperatur von 3000 K durchgeführt. Bei diesem Verfahren können die einzelnen Atome größere Abstände zurücklegen (größerer Radius der Konvergenz), als in anderen Verfeinerungsprozeduren. Dadurch wurde das manuelle Korrigieren des Modells minimiert. Abschließend wurde eine individuelle Temperaturfaktor- (B-Faktor)-Verfeinerung durchgeführt. Die R-Faktoren nach der ersten Verfeinerungsrunde betragen 22.0 % für den kristallographischen R-Faktor ( $R_{\text{crist}}$ , Definition siehe Tab. 3.2) und 29.0 % für den freien R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ , Definition siehe Tab. 3.2) (Brünger, 1992). Mittels des so erhaltenen Modells wurde eine erste Elektronendichtekarte berechnet. Manuelles Anpassen fehlerhafter Teile des Modells an die Elektronendichte und Einfügen fehlender Reste (Phosphorylgruppen, Wasser, Seitenketten) erfolgte mit dem Programm O (Jones et al., 1991). Das nach mehreren Zyklen automatischer und manueller Strukturverfeinerung erhaltene Modell, läßt sich nach diesem Verfahren nicht weiter optimieren. Der kristallographische R-Faktor beträgt 20.9 % und der freie R-Faktor 27.0 %. Die Statistiken der Strukturverfeinerung und der geometrischen Eigenschaften des Endmodells sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

Die erhaltenen mittleren Temperaturfaktoren für das Protein ( $28.4 \text{ \AA}^2$  für Hauptkettenatome und  $31.5 \text{ \AA}^2$  für Seitenkettenatome) stimmen sehr gut mit dem aus

einem Wilson-Diagramm (Frensch und Wilson, 1978) abgeschätzten mittleren Temperaturfaktor für das gesamte Molekül ( $28.8 \text{ \AA}^2$ ) überein.

**Tab. 3.2:** Statistik der Strukturverfeinerung des *E. coli* TMPK-AZTp5A-Komplexes

Auflösungsbereich ( $\text{\AA}$ )	15.0 – 2.2
Zahl der Reflexe mit $F > 0 \sigma$	
Arbeitssatz	13854
Testsatz	717
$R_{\text{cryst}}$ (%) <sup>1</sup>	20.9
$R_{\text{free}}$ (%) <sup>2</sup>	27.0
Standardabweichung der	
Bindungslängen ( $\text{\AA}$ )	0.011
Bindungswinkel ( $^\circ$ )	1.487
Dihedralen Winkel ( $^\circ$ )	23.30
Anzahl der Atome	
Protein	1679 <sup>3</sup>
Nukleotide	72 <sup>4</sup>
Wasser	72
Temperaturfaktoren ( $\text{\AA}^2$ )	
Hauptkettenatome	28.4
Seitenkettenatome	31.5
Nukleotide	30.1
Wassermoleküle	33.6

<sup>1</sup>  $R_{\text{cryst}} = \sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - |F_{\text{calc}}(\text{hkl})|| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|$

<sup>2</sup>  $R_{\text{free}} = R_{\text{cryst}}$ , berechnet für ca. 5 % willkürlich ausgewählter Reflexe (Testsatz), die bei der Verfeinerung ausgeschlossen wurden (dient als Kontrolle der Konvergenz der Verfeinerung (Brünger, 1992))

<sup>3</sup> Zahl beinhaltet Atome von Aminosäuren, die in zwei Konformationen (Arg33, Phe164), als Alanin (Arg2, Lys182) oder gar nicht modelliert wurden (Met1).

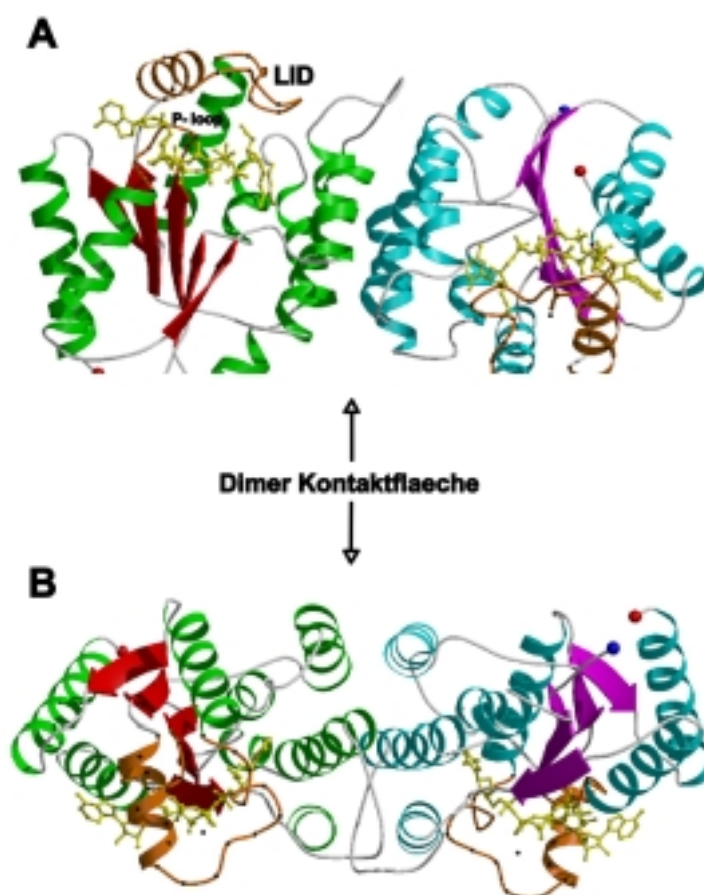
<sup>4</sup> Zahl beinhaltet 15 Atome, die in 2 Konformationen gebaut sind (alle Phosphorylgruppen, bis auf die des Monophosphates von AZT).

Ein Ramachandran-Diagramm (Ramachandran und Sasisekharan, 1968; Laskowski et al., 1993) des Moleküls aus der asymmetrischen Einheit zeigt, daß alle Aminosäuren (Glycine ausgeschlossen)  $\phi/\psi$ -Winkel in den bevorzugten oder zusätzlich erlaubten Bereichen haben (Auf S.60 ist in Abb. 3.12 exemplarisch ein Ramachandran-Diagramm der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP gezeigt). Ausnahme ist Arginin 100. Dessen  $\phi/\psi$ -Winkel liegen mit ca.  $80^\circ$  und  $150^\circ$  im nicht erlaubten Bereich des Ramachandran-Diagramms. Auffallend ist, daß dieses auch in den Tp5A-Strukturen sowohl der *E. coli* als auch der Hefe TMPK (Arginin 94) beobachtet wird. Diese gespannte Konformation des Arginins ist vermutlich für die Katalyse sehr wichtig und wird in den Kapiteln der menschlichen TMPK diskutiert. Auch in Strukturen der HSV-Thymidinkinase gibt es ein Arginin (Arg163), das im aktiven Zentrum lokalisiert ist, und

dessen  $\phi/\psi$ -Winkel im nicht erlaubten Bereich des Ramachandran-Diagramms (Wild et al., 1997; Champness et al., 1998) liegen.

### 3.1.4 Die Struktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A

*E. coli* TMPK besteht aus 213 Aminosäuren, deren Sequenz 29 % identisch zu der von Hefe TMPK ist. Ähnlich wie die Hefe TMPK baut sich die bakterielle TMPK aus einem 5-strängigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt auf, das von 9  $\alpha$ -Helices umgeben ist. In Analogie zu der Hefe TMPK ist auch die *E. coli* TMPK ein Homodimer, dessen Kontaktfläche aus den hydrophoben Resten dreier paralleler Helices von jedem Monomer besteht (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Darstellung des Dimeren der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A als Ribbon-Diagramm. Zur Unterscheidung der beiden Monomere des Dimers ist das zentrale parallele 5-strängige  $\beta$ -Faltblatt in einem Monomer rot in dem anderen pink und die  $\alpha$ -Helices grün bzw. cyan dargestellt. Die P-loops und LID-Regionen der beiden Monomeren sind braun mit jedem  $C_{\alpha}$ -Atom schwarz gepunktet dargestellt. AZTp5A ist gelb als *ball and stick* Präsentation gezeigt. A) Ansicht

auf die TMPK ungefähr entlang einer zweizähligen Drehachse senkrecht zur Papierebene. B) Gleiche Ansicht  $90^\circ$  um die X-Achse gedreht, so daß die Dimerkontaktfläche, bestehend aus drei  $\alpha$ -Helices von jedem Monomer, deutlich sichtbar ist.

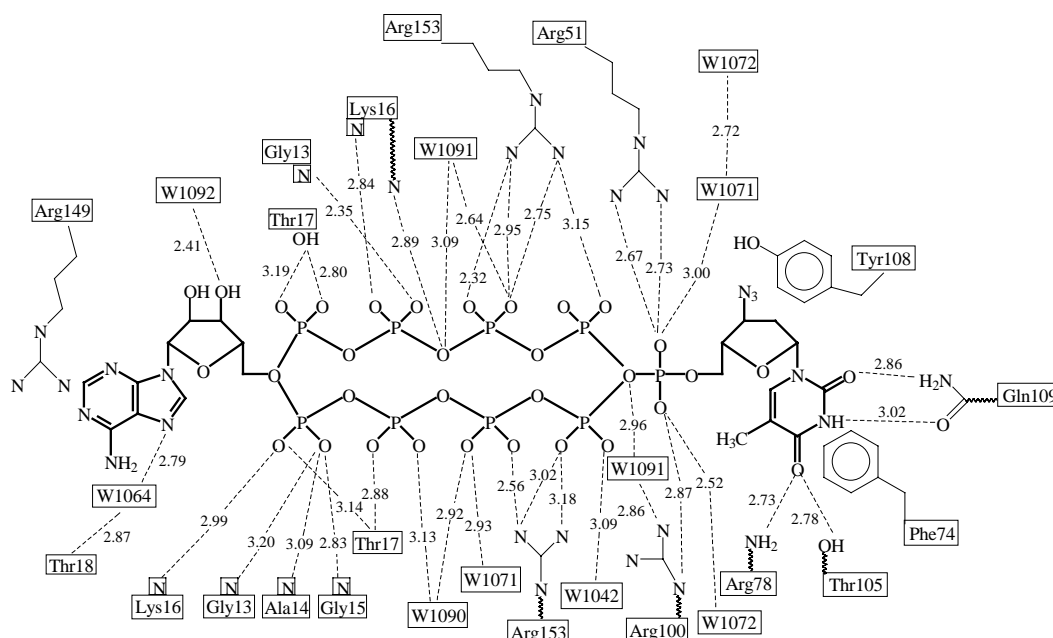
Durch die Bindung des Binukleotids AZTp5A sind beide Substratbindungsstellen des Enzyms besetzt und als Folge dessen liegt das Enzym in der vollständig geschlossenen Konformation vor. Versuche, die *E. coli* TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp (Adenosin- $\beta$ - $\gamma$ -imidotriphosphat, ein ATP-Analogon bei dem das Brücken O-Atom zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat durch eine NH-Gruppe ersetzt ist) bzw. AZTMP und AppNHp zu kristallisieren, schlugen fehl. Aufgrund der hohen Phosphatkonzentration (2.5 M) unter den verwendeten Kristallisationsbedingungen bindet anstelle des Triphosphatanalogen ein Phosphat aus dem Puffer an der Stelle, wo man das  $\beta$ -Phosphat von AppNHp erwarten würde. Da unter diesen Bedingungen nur das Monophosphat bindet, sind die Binukleotide Tp5A bzw. AZTp5A erforderlich, um beide Bindungsstellen unter diesen Kristallisationsbedingungen gleichzeitig mit Nukleotiden zu besetzen.

Nukleotidbindung und Substratspezifität: Der niedrige  $K_d$ -Wert von AZTp5A (34 nM) ist ein quantitativer Ausdruck der hohen Affinität von AZTp5A an *E. coli* TMPK. Dieses steht im Einklang mit den relativ niedrigen B-Faktoren ( $30.1 \text{ \AA}^2$ ) von AZTp5A in der Struktur. Der Monophosphatteil AZTMP von AZTp5A bindet analog zu TMP in Tp5A in einer tiefen Tasche des Enzyms, so daß die Nukleobase vollständig von Proteinresten umgeben ist. Der ATP-Teil von AZTp5A ist hauptsächlich über den P-Loop an das Enzym gebunden, wobei der Adenosinrest an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert ist. Wie auch in dem Komplex mit Tp5A ist keine Elektronendichte für ein Magnesiumion zu beobachten, so daß dieses in dem Modell nicht berücksichtigt ist. Das Fehlen des Magnesiumions ist vermutlich auf die hohen Phosphatkonzentrationen der Kristallisationsbedingungen zurückzuführen. In Abb. 3.5 sind alle Kontakte zwischen AZTp5A und *E. coli* TMPK in Form einer Abstandskarte dargestellt.

Vier Phosphatgruppen sind nicht eindeutig durch die Elektronendichte definiert und sind in zwei Konformationen modelliert (die ersten vier ausgehend von der Adenosinseite; das Phosphat von AZTMP ist eindeutig und nur in einer Konformation dargestellt). Das Phänomen von mehreren Konformationen wurde auch in der Tp5A-Struktur beobachtet. Dort ist das mittlere Phosphat in zwei Konformationen gebaut (Lavie et al., 1998b). Auch in einer früheren Struktur der AMPK im Komplex mit Ap5A



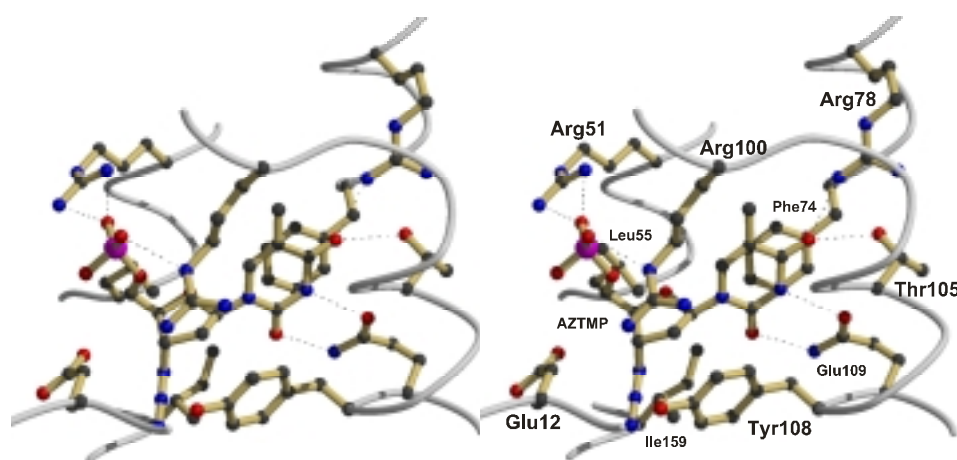
(Müller und Schulz, 1992) wurde das Brückenphosphat zwischen AMP und ATP in zwei Konformationen modelliert. Zurückzuführen ist dieses Phänomen vermutlich auf das Fehlen des Magnesiumions. Die Anwesenheit eines Magnesiumions würde vermutlich nur eine der beiden Konformationen stabilisieren.



**Abb. 3.5:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen AZTp5A und *E. coli* TMPK mit einem kleineren Abstand als 3.2 Å. Die ersten vier Phosphate von der Adenosinseite aus gesehen sind durch die Elektronendichte nicht eindeutig definiert und sind in zwei Konformationen gebaut. Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode umrandet dargestellt, Wassermoleküle sind mit W bezeichnet.

Viele Wechselwirkungen zwischen AZTp5A und *E. coli* TMPK sind identisch zu denen, die auch in der Tp5A-Struktur beobachtet werden (Lavie et al., 1998b). Für die Thymidinbase sind dies die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung (hydrophobe *stacking* Wechselwirkung) mit Phe74 und zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylgruppe an Position 4 und Arg78 (NH<sub>2</sub>; 2.7 Å) bzw. der Seitenkette von Thr105 (OG1; 2.8 Å). Die beiden Wasserstoffbrückenbindungen zu der Carbonylgruppe an Position 4 der Thymidinbase erklären die bevorzugte Bindung von Thymidin oder Uracil gegenüber Cytidin (Abb. 3.6). Die Phenolgruppe von Tyr108 ist so positioniert, daß sie gegen Ribonucleotide diskriminiert mit der Folge, daß Thymidin gegenüber Uracil bevorzugt bindet. Für eine 2'-OH-Gruppe in Ribonucleotiden ist aufgrund dieses Restes sterisch kein Platz. Weitere direkte Wechselwirkungen zwischen AZTMP und *E. coli* TMPK sind H-Brücken zwischen der Amidseitenkette von Gln109 und NH-3 bzw. der

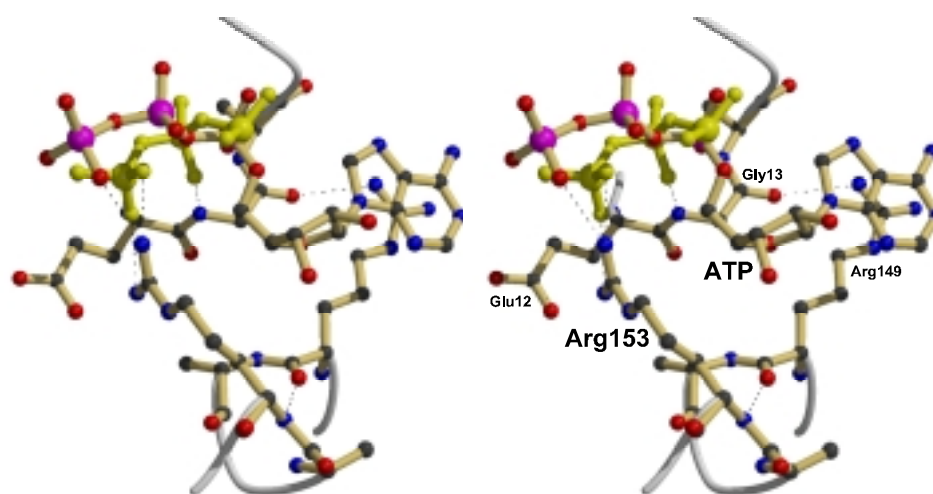
Carbonylgruppe an Position 2 der Thymidinbase (Abb. 3.6). Diese direkten Wechselwirkungen der Seitenkette von Gln109 diskriminieren gegenüber die größeren Purinbasen Adenin und Guanin, für die räumlich nicht genug Platz ist. Zusätzlich zu den sterischen Gründen bei der Diskriminierung gegenüber Adenin- und Guaninnukleotiden kommt, daß die zweizählige Wechselwirkung zu Gln109 bei beiden Purinbasen nicht stattfinden kann. In Hefe TMPK sind im Unterschied dazu die beiden letztgenannten Wechselwirkungen indirekt über zwei stark gebundene Wassermoleküle. Die Phosphorylgruppe von AZTMP wird durch die Guanidiniumgruppen der Arginine 100 und 51 positioniert. Lediglich die „side-on“ Wechselwirkung des Glu12 ist in der AZTp5A-Struktur im Vergleich zu der Tp5A-Struktur nicht vorhanden (siehe unten).



**Abb. 3.6:** Stereobild der Monophosphatbindungstasche der *E. coli* TMPK-AZTp5A-Struktur. Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind der AZTMP-Teil des Binukleotids AZTp5A, die Seitenketten der Aminosäuren, die entweder Wasserstoffbrückenbindungen (als gestrichelte schwarze Linien dargestellt) zu AZTMP eingehen (Arg78, Thr105, Gln109, Arg100 und Arg51), die sterisch zur Positionierung (Leu55 und Ile159) bzw. Substratspezifität (Tyr108) beitragen oder die durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen die Position der Thymidinbase stabilisieren (Phe74). Zusätzlich ist noch die Seitenkette von Glu12, die keine Wechselwirkung macht, dargestellt. Das Rückgrat der beteiligten Aminosäuren ist als graue Schleife durch die  $C_{\alpha}$ -Atome der entsprechenden Reste dargestellt.

Der ATP-Teil von AZTp5A ist hauptsächlich über viele Wechselwirkungen der Phosphate zu dem P-loop an *E. coli* TMPK gebunden. Die Adeninbase ist nur über eine hydrophobe *stacking* Wechselwirkung zu Arg149 aus der LID-Region direkt an das Enzym gebunden (Abb. 3.7). Diese Wechselwirkung scheint jedoch sehr wichtig zu sein, da dadurch neben einer direkten Wechselwirkung der Guanidiniumgruppe von Arg149

zu der Carbonylgruppe von Gly13 des P-loops auch über das Triphosphat eine Kommunikation zwischen dem P-loop (Bindung der Phosphate) und der LID-Region (*base-stacking* von Arg149 zu der Adenin Base) stattfindet, die dann synergistisch auf die Bindung des Phosphoryldonors reagieren können. Desweiteren macht Arg149 über die Hauptkettencarbonylgruppe eine Wechselwirkung zu dem N-Atom der Amidbindung von Arg153 und zwingt dieses so in eine Position, daß die Seitenkette ins aktive Zentrum gerichtet ist und dort eine Wechselwirkung zu dem mittleren Phosphat von AZTp5A macht. Die Seitenkette des dritten Arginins (Arg151) des sehr basischen Sequenzmotivs ( $^{148}\text{KRARAR}^{153}$ ) der *E. coli*-LID ist nicht ins aktive Zentrum gerichtet, sondern ist dem Lösungsmittel exponiert.

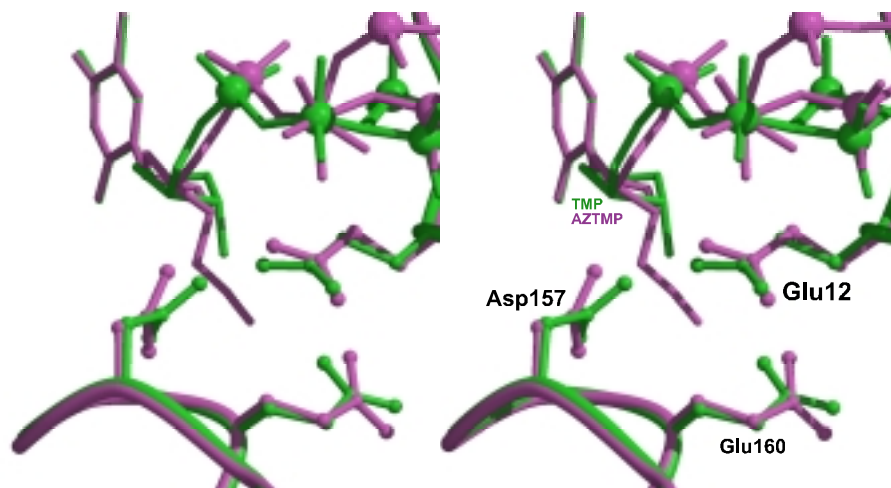


**Abb. 3.7:** Stereobild der ATP-Bindungstasche der *E. coli* TMPK-AZTp5A-Struktur. Dargestellt als *ball and stick* Präsentation ist der ATP-Teil von AZTp5A, sowie die Aminosäuren Glu12 und Gly13 des P-loops und Arg149, Ala150, Ala152 und Arg153 der LID-Region. Stickstoffatome sind in blau, Sauerstoffatome in rot, Kohlenstoffatome in schwarz und Phosphoratome in pink dargestellt. Die Phosphorylgruppen der zweiten Konformation von ATP sind in gelb koloriert. Wasserstoffbrücken sind als schwarze gestrichelte Linie abgebildet.

### 3.1.5 Die strukturelle Erklärung der guten AZTMP-Substrateigenschaften von *E. coli* TMPK

Ein struktureller Vergleich der beiden *E. coli* TMPK Strukturen (Tp5A und AZTp5A) sollte zeigen, wie *E. coli* TMPK auf den Ersatz der 3'-OH-Gruppe durch die größere Azidogruppe in AZTMP reagiert. Dazu werden beide Strukturen mit allen C $\alpha$ -Atomen überlagert. Die Überlagerung von 208 C $\alpha$ -Atomen führt zu einer sehr guten

Übereinstimmung der beiden Strukturen mit einer Standardabweichung (rmsd) von 0.23 Å. Beide Proteinstrukturen sind bis auf drei signifikante Unterschiede, die auf die größere Azidogruppe in AZTp5A zurückzuführen sind, nahezu identisch. Erstens sind die gesamte Desoxyribose von AZTMP sowie drei Carboxylsäureseitenketten, die in der Nähe der 3'-Position der Ribose lokalisiert sind, leicht gegeneinander verdreht (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Stereodiagramm der Überlagerung der Tp5A- (grün) und AZTp5A- (pink) *E. coli* TMPK Strukturen. Gezeigt als *ball and stick* Präsentation sind die TMP- bzw. AZTMP-Teile von Tp5A und AZTp5A, sowie die Aminosäureseitenketten von Glu12, Glu160 und Asp157. Deutlich zu sehen ist die Rotation der Desoxyribose von AZTMP um die Atome C1' und C4' als Rotationsachse und die Rotation der drei Carboxylsäureseitenketten in die entgegengesetzte Richtung als strukturelle Reaktion der Substitution der 3'-OH-Gruppe durch die größere Azidogruppe in AZTMP.

Die Rotation der Desoxyribose als starrer Körper um die Atome C1' und C4' als Rotationsachse um ca. 21° ist auf die Azidogruppe zurückzuführen, die andernfalls den Seitenketten von Glu12 und Glu160 zu nahe käme. Gleichzeitig drehen sich die Carboxylatgruppen von Glu12 (31°) und Glu160 (39°) in die entgegengesetzte Richtung, so als ob sie für die größere Azidogruppe in AZTMP Platz machen wollen. Die Rotation der Seitenkette von Glu12 bewirkt ihrerseits wiederum eine Rotation der Carboxylatgruppe von Asp157 (36°), so daß der Abstand zwischen beiden Seitenketten 3.1 Å beträgt. In der Tp5A-Struktur beträgt der Abstand zwischen diesen beiden Carboxylatgruppen 2.6 Å, so daß möglicherweise die  $pK_A$ -Werte dieser beiden Carboxylatgruppen verschoben sind, und eine der beiden Seitenketten protoniert ist. Die Seitenkette von Glu12 in der AZTp5A-Struktur ist aufgrund der Rotation so orientiert, daß

sie keine Wechselwirkung zu der Azidogruppe macht. Es sieht vielmehr so aus, als ob sie in dieser Position mit möglichst wenig struktureller Veränderung der Azidogruppe ausweicht.

Die unterschiedlichen Phosphatkonformationen der Binukleotide zeigen den zweiten signifikanten Unterschied zwischen den beiden Strukturen. Über die Phosphatgruppen des ATP-Teils kann aufgrund der nicht eindeutigen Elektronendichte und damit der nicht eindeutigen Zuordnung nur einer Konformation nur schwierig eine Aussage gemacht werden. Die unterschiedliche Positionierung der Phosphatgruppen von TMP bzw. AZTMP in den beiden Binukleotiden ist jedoch eindeutig definiert und ist auf die leichte Rotation der Desoxyribose in AZTMP zurückzuführen (Abb. 3.8). Die Positionierung der Nukleobasen wird von dieser Rotation nicht beeinflusst, so daß diese in beiden Strukturen eindeutig und identisch sind.

Der dritte Unterschied zwischen beiden Strukturen ist eine leichte Bewegung der Spitze des P-loops, vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Phosphatkonformationen beider Komplexe. Diese Bewegung des P-loops ist aber nicht mit der zu vergleichen, die in Hefe TMPK beobachtet wurde, da dort der gesamte P-loop und die nachfolgende  $\alpha$ -Helix als starrer Körper bewegt werden. Im Gegensatz dazu ist bei der bakteriellen TMPK diese Bewegung auf ein oder zwei Aminosäuren begrenzt. Die Positionierung des Arg153 aus der LID-Region ist in beiden Strukturen nahezu identisch und wird demnach nicht von der größeren Azidogruppe in AZTMP beeinflusst.

Zusammenfassend kann man die Gründe für die guten Substrateigenschaften von AZTMP *E. coli* TMPK folgendermaßen charakterisieren. Im Gegensatz zu der Verschiebung des gesamten P-loops in Hefe TMPK aufgrund der zweizähligen Wechselwirkung von Asp14 zu der funktionellen Gruppe an der 3'-Position von TMP bzw. AZTMP, beobachtet man bei dem Vergleich der beiden *E. coli*-Strukturen keine signifikante P-loop Bewegung. Die für die Unterbringung der Azidogruppe in AZTMP notwendigen strukturellen Änderungen begrenzen sich auf eine leichte Rotation der Desoxyribose und dreier Carboxylatgruppen in der Nähe der 3'-Position, darunter Glu12 aus dem P-loop. Dieses ist leicht möglich, da die Wechselwirkung zwischen der P-loop Carboxylsäure und der 3'-OH-Gruppe in TMP einfach und nicht zweizählig ist. Das bedeutet, daß das Triphosphat in seiner Positionierung relativ zu dem Monophosphat nicht durch eine P-loop Bewegung beeinflusst wird. Die geringe unterschiedliche Positionierung der Monophosphatgruppen von TMP bzw. AZTMP (hervorgerufen durch die Rotation der Desoxyribose in AZTMP) der *E. coli*-Strukturen, kann für die 2.5fach

langsamere Phosphorylierung von AZTMP gegenüber TMP verantwortlich sein. Das vermutlich katalytische Arg153 in *E. coli*-TMPK entspringt der LID-Region (im Gegensatz zum Arg15 des P-loops in Hefe TMPK) und wird von der Substitution der 3'-OH-Gruppe durch die Azidogruppe strukturell nicht beeinflusst. Die geringen notwendigen strukturellen Anpassungen der *E. coli* TMPK bei der Bindung von AZTMP gegenüber der komplexen P-loop Bewegung in Hefe TMPK, zusammen mit dem unterschiedlichen Ursprung des katalytischen Arginins (Arg153 aus der LID in *E. coli* TMPK gegenüber Arg15 aus dem P-loop in Hefe TMPK) sind die strukturellen Gründe der guten AZTMP-Substrateigenschaften von *E. coli* TMPK.

### 3.2 Die menschliche Thymidylatkinase - Strukturen verschiedener Nukleotidkomplexe offenbaren Einblicke in den katalytischen Mechanismus

Die Studien an Hefe TMPK als Modell für das menschliche Enzym erfolgten unter der Annahme, daß beide Enzyme aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie katalytisch ähnlich funktionieren. Aus dem Sequenzvergleich (Abb. 1.10) der beiden TMPKs wird deutlich, daß sowohl die menschliche als auch die Hefe TMPK zu Typ I TMPKs gehören. Bei beiden TMPKs stammt das vermutlich katalytische Arginin, Arg16 bei Mensch bzw. Arg15 bei Hefe, aus dem P-loop. Die vorangehende Aminosäure ist in beiden TMPKs ein Aspartat, welches in Hefe TMPK eine zweizählige Wechselwirkung zu der 3'-OH-Gruppe von TMP macht. In beiden TMPKs gibt es keine basischen Aminosäuren in der LID-Region, die mit den Phosphatgruppen der Substrate interagieren können und demnach eine katalytische Funktion einnehmen könnten.

Nachdem die guten AZTMP-Substrateigenschaften der *E. coli* TMPK im ersten Teil dieser Arbeit aufgeklärt werden konnten, sollten im zweiten Teil die Studien auf das menschliche Enzym erweitert und vertieft werden. Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiers gelang während der strukturellen Arbeiten an *E. coli* TMPK die Klonierung (Plasmid pGEX-2T), Transformation und Expression der menschlichen TMPK als Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen (Brundiers et al., 1999). Dr. I. Schlichting und Dr. A. Lavie gelang die Kristallisation der Wildtyp TMPK sowohl im Komplex mit TMP und  $\text{ADP} \cdot \text{Mg}^{2+}$  als auch mit AZTMP und  $\text{ADP} \cdot \text{Mg}^{2+}$ . Dr. A. Lavie löste nach der Methode des molekularen Ersatzes mit dem Modell der Hefe-Struktur die Strukturen der beiden Komplexe. Es wurde schnell deutlich, daß aufgrund der Kristallpackung die Seitenkette eines nicht konservierten Arginins (Arg200) in das aktive Zentrum eines symmetrieverwandten Moleküls (nicht das zweite Monomer des aktiven Dimers) gerichtet ist. Die Guanidiniumgruppe dieses Arginins ist räumlich sehr nah zu der Position, wo man das  $\gamma$ -Phosphat von ATP erwarten würde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, daß die Kristallisation der menschlichen Wildtyp TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp oder Tp5A nicht gelang. In diesen Strukturen würde das  $\gamma$ -Phosphat von AppNHp bzw. das mittlere Phosphat von Tp5A sterisch mit der Guanidiniumgruppe des Arg200 des symmetrieverwandten Moleküls interferieren. Da dieses Arginin nicht konserviert ist, die menschliche TMPK ebenso wie Hefe und *E. coli* TMPK als Dimer aktiv ist und dieses Arginin aus einem dritten Molekül stammt und nicht von dem zweiten Monomer des aktiven Dimers, liegt die Vermutung nahe, daß es sich nicht um ein katalytisch wichtiges Arginin handelt. Vermutlich ist die Seitenkette des

Arg200 allein aufgrund der Kristallpackung in das aktive Zentrum eines symmetrieverwandten Moleküls gerichtet. Aufgrund dieser Überlegungen wurde dieses Arginin zu Alanin mutiert und die R200A-Mutante für alle weiteren kristallographischen Arbeiten verwendet. Der molekularbiologische Teil der Herstellung der R200A-Mutante wurde von Dr. A. Lavie in Zusammenarbeit mit Dr. R. Brundier und Dr. M. Konrad durchgeführt und die transformierte Zelllinie zur Verfügung gestellt.

In diesem Teil dieser Arbeit sollte zunächst die menschliche TMPK-R200A-Mutante in ausreichenden Mengen überexprimiert und aufgereinigt werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob die R200A-Mutation einen Einfluß auf die kinetischen oder strukturellen Eigenschaften der menschlichen TMPK hat, oder ob sich diese Mutante, wie zu erwarten ist, gleich verhält, wie die menschliche Wildtyp TMPK. Dazu sollten einerseits die apparenten  $k_{\text{cat}}$ -Werte beider Enzyme gemessen und verglichen werden. Andererseits sollte die Struktur der menschlichen TMPK-R200A-Mutante im Komplex mit TMP und ADP mit dem analogen Komplex der Wildtyp-TMPK verglichen werden.

Für ein detailliertes mechanistisches Verständnis einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist einerseits eine vollständige kinetische Charakterisierung (Geschwindigkeitskonstanten aller auftretenden Teilreaktionen wie einstufige oder zweistufige Substratbindung, Produktfreisetzung und chemische Reaktion) der Reaktion notwendig. Dadurch können alle an der Reaktion beteiligten dynamischen Prozesse quantifiziert werden und letztlich verifiziert werden, nach welchem Mechanismus (z. B. Random-Bi-Bi) ein Enzym arbeitet und welcher Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Andererseits ist die strukturelle Kenntnis aller an der Reaktion beteiligten statischen Substrat-, Intermediat- und Übergangszustände (Edukt-, Produkt- und Übergangszustandkonformationen des Enzyms) erforderlich, um zum einen die kinetischen Ergebnisse strukturell zu erklären und zu untermauern und zum anderen die Substratspezifität des Enzyms und die Funktion einzelner für die Katalyse wichtigen Aminosäuren sowie weiterer Hilfsmoleküle bzw. Atome wie Magnesiumionen zu verstehen und zu verifizieren. Durch die Kombination kinetischer und struktureller Studien erhält man ein vollständiges Bild aller an einer Reaktion beteiligten Teilreaktionen und Zustände des Enzyms. Insbesondere die strukturellen Informationen sind erforderlich, um auf rationalem Wege durch gezielte Mutationen die Funktion und/oder Substratspezifität eines Enzyms zu verändern.

Daher sollte die R200A-Mutante auch im Komplex a) mit den Substraten/Substratanaloga TMP und AppNHp (ein ATP-Analog, das aufgrund der Substitution des Brücken-O-Atoms zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten durch eine



Imidogruppe (NH) ein viel schlechterer Phosphoryldonor ist als ATP und demnach die substratgebundene Konformation widerspiegeln kann, ohne abzureagieren), b) den Produkten TDP und ADP entweder ausgehend von den natürlichen Substraten TMP und ATP aufgrund der Beobachtung, daß bei der Kristallisation der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ATP- $\gamma$ S nur Elektronendichte für TDP- $\beta$ S und ADP beobachtet wird (persönliche Mitteilung von Dr. A. Lavie) oder für den Fall, daß dieses nicht funktioniert mit dem Produktanalogon Thymidin- $\alpha,\beta$ -imidodiphosphat und ADP, c) mit TMP, ADP und  $\text{AlF}_x$  ( $X = 3$  oder  $4$ ) als Übergangszustandsmimik (Aluminiumfluorid ist in der Lage, die zu übertragende Phosphorylgruppe zu simulieren und wurde schon in verschiedenen Strukturen als Übergangszustandsanalogon verwendet (Wittinghofer, 1997, Schlichting et al., 1997; Scheffzek et al., 1997)) sowie d) mit dem Binukleotidinhibitor Tp5A kristallisiert werden. Ein Vergleich dieser Strukturen sollte detaillierte Informationen über die Funktionsweise der menschlichen TMPK auf molekularer Ebene liefern und zugleich zeigen, ob die Hefe TMPK ein gutes Model für die menschliche TMPK ist.

### 3.2.1 Überexpression und Aufreinigung der R200A-Mutante der menschlichen TMPK

Für die Überexpression der menschlichen TMPK-R200A-Mutante wurden *E. coli*-BL21 (DE3)-Zellen, die mit einem die TMPK als GST-Fusionsprotein kodierenden rekombinanten Plasmidvektor (pGexRB) transformiert sind, verwendet (Brundiers et al., 1999). Die transformierten Zellen wurden in 5 l LB-Medium unter Zusatz von 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.6-0.9 hochgezogen. Anschließend erfolgte die Überexpression durch Induktion mit 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) für ca. 12 – 15 h bei 30 °C. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mechanisch am Microfluidizer aufgeschlossen. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer wurde der Überstand mit dem TMPK-Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein zur Aufreinigung und zum Abspalten des Fusionsproteins auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen. Bei diesem affinitätschromatographischen Aufreinigungsschritt bindet Glutathion-S-Transferase spezifisch an dem Substrat Glutathion, welches wiederum kovalent an das Säulenmaterial gebunden ist. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit Hochsalzpuffer eluiert und anschließend die TMPK durch die Protease Thrombin von dem Fusionspartner geschnitten. Der Verdau mit Thrombin führte zu einer am N-Terminus um 3 Aminosäuren (Gly-Ser-His) verlängerten TMPK. Um die Protease Thrombin zu entfernen, erfolgte die

Elution über eine Benzamidinsepharose B6-Säule. Eine abschließende Gelfiltration (S-200-Säule) lieferte 350 – 450 mg TMPK mit einer Reinheit von über 95 %. Eine HPLC Analyse zeigte, daß das Protein nicht vollständig nukleotidfrei ist und noch ca. 35 % TMP und 25 % ADP gebunden sind. Auch eine Ammoniumsulfatfällung vor der Gelfiltration lieferte kein nukleotidfreies Protein, so daß dieses bei der Durchführung kinetischer Messungen und auch bei der Kristallisation (verwendete Nukleotidkonzentrationen) berücksichtigt werden mußte.

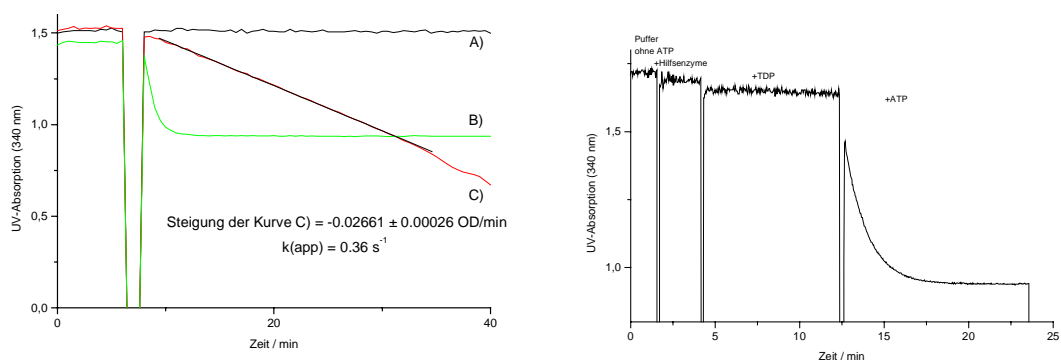
### **3.2.2 Kinetischer Vergleich der Wildtyp TMPK mit der R200A-Mutante und Affinitätsbestimmung von Tp5A-mant und Tp5A zu der R200A-Mutante**

Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung der R200A-Mutante der menschlichen TMPK wurde überprüft, ob die Mutation einen Einfluß auf die Umsatzgeschwindigkeit der Phosphorylierung von TMP hat, oder ob sich die Vermutung bestätigt, daß es sich bei dem zum Alanin mutierten Arg200 um ein für die Katalyse unwichtiges Arginin handelt, welches in der Kristallstruktur der Wildtyp TMPK nur aufgrund der Kristallpackung in das aktive Zentrum eines symmetrieverwandten Moleküls gerichtet ist. Dafür wurden die apparenten  $k_{cat}$ -Werte sowohl von Wildtyp TMPK als auch der R200A-Mutante mittels eines gekoppelten Enzymtests gemessen und verglichen. Für diesen von Berghäuser (1975) entwickelten Assay werden neben Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) und Phosphoenolpyruvat (PEP) auch die Hilfsenzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Pyruvatkinase (PK) benötigt (für eine detaillierte Beschreibung des Tests siehe experimentellen Teil; Kapitel 5.1.6).

Das aus der TMPK-Reaktion gebildete ADP wird durch Pyruvatkinase mit PEP als Phosphoryldonor zum ATP phosphoryliert. Laktatdehydrogenase hydriert das sich dabei bildende Pyruvat mit NADH in einer nachfolgenden Reaktion zum L-Laktat. Die oxidierte Form von NADH,  $NAD^+$ , absorbiert im Gegensatz zu NADH nicht bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Abnahme der UV-Absorption bei dieser Wellenlänge diente als indirektes Meßsignal der TMPK-Reaktion. Voraussetzung für den Gebrauch dieses Assays ist, daß die beiden durch die Hilfsenzyme katalysierten Reaktionen viel schneller sind, als die der TMPK. Desweiteren muß man für die Auswertung der Messungen wissen, ob TDP unter Verbrauch von ATP oder PEP durch eines der beteiligten Enzyme oder einer Verunreinigung (z. B. Nukleosiddiphosphatkinase) zum Triphosphat umgesetzt wird. Dieses würde dazu führen, daß pro TMPK-Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente

NADH verbraucht würden, so daß man diesen Faktor bei der Auswertung berücksichtigen müßte.

Zur Durchführung der Messungen wurde der Puffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 0.25 mM NADH, 0.5 mM PEP und 5 mM MgCl<sub>2</sub> vorgelegt und nacheinander ATP (1 mM), die Hilfsenzyme (11 Units LDH und 10 Units PK), die entsprechende TMPK (99 nM Wildtyp oder R200A) und zum Starten der Reaktion das zu untersuchende TMP (277 µM) zugegeben. Vor der Zugabe von TMP wurde gewartet, bis ein stabiles Signal zu beobachten war. Dadurch wurde gewährleistet, daß die Nukleotide TMP und ADP von dem nicht vollständig nukleotidfreien Protein abreagiert waren und die Messung nicht verfälschten. Im linken Graphen der Abb. 3.9 ist in Kurve C eine typische Kurve für eine solche Messung am Beispiel der R200A-Mutante dargestellt. Eine lineare Regression mit dem Programm Origin lieferte die im Graphen angegebene Steigung mit der man nach der Formel im experimentellen Teil (S. 173) den  $k_{\text{cat}}$ -Wert berechnen kann.



**Abb. 3.9:**  $k_{\text{cat}}$ -Wert Bestimmung der TMP-Phosphorylierung durch menschliche TMPK mittels eines gekoppelten, UV-spektroskopischen Enzymtests mit den Hilfsenzymen LDH und PK unter *steady-state* Bedingungen (für eine Beschreibung des Tests siehe experimentellen Teil Kapitel 5.1.6; die verwendeten Konzentrationen sind im Text genannt). Links) A) Kontrollreaktion ohne TMP, B) Kontrollreaktion die zeigt, daß pro TMPK-Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente NADH oxidiert werden, so daß man diesen Faktor bei der Auswertung berücksichtigen muß, C) lineare UV-Absorptionsabnahme aufgrund der durch die TMPK-Reaktion ausgelösten Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup>; aus der Steigung der Geraden kann man nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel den  $k_{\text{cat}}$ -Wert berechnen. Rechts) Kontrollreaktion die zeigt, daß das aus der TMPK-Reaktion gebildete TDP vermutlich durch eine Verunreinigung der Hilfsenzyme mit NDPK unter Verbrauch von ATP weiter umgesetzt wird und das sich dabei bildende ADP für die Oxidation des zweiten Äquivalentes NADH verantwortlich ist.

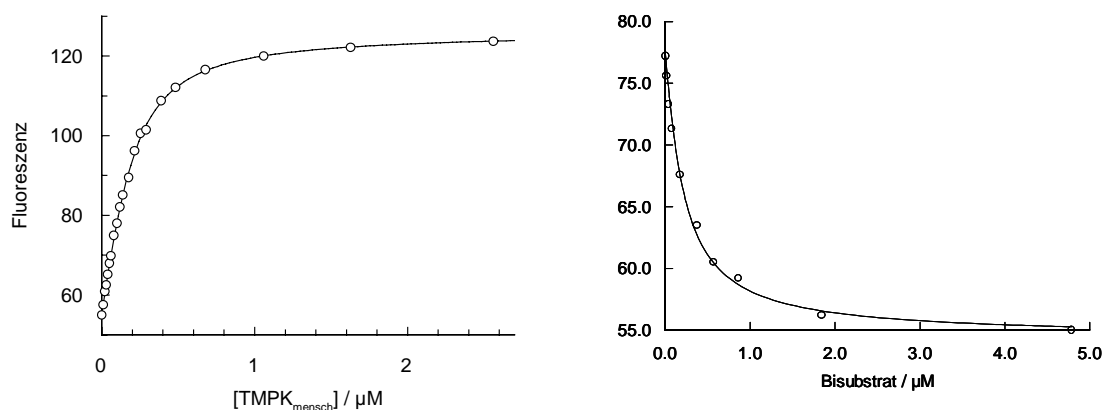
Um zu überprüfen, ob TDP unter Verbrauch eines zusätzlichen Äquivalentes NADH weiter umgesetzt wird, wurde ein analoges Experiment mit 1  $\mu\text{M}$  TMPK und 46  $\mu\text{M}$  TMP (Kurve B des linken Graphen) durchgeführt. Da die Abreaktion von 160  $\mu\text{M}$  NADH einer OD-Abnahme von 1 entsprechen, erwartet man bei diesem Experiment für den Fall, daß ein Äquivalent NADH pro eingesetztem TMP-Äquivalent verbraucht werden, eine Abnahme der UV-Absorption von 0.28 OD und für den Fall das 2 Äquivalente NADH pro eingesetztem TMP-Äquivalent verbraucht werden, eine Abnahme der UV-Absorption von 0.56 OD. Kurve B des linken Graphen der Abb. 3.9 zeigt eine UV-Absorptionsabnahme von 0.55 OD. Das bedeutet, daß 2 Äquivalente NADH pro TMPK-Reaktionsäquivalent verbraucht werden, so daß man bei der Auswertung die gemessene Rate durch 2 teilen muß, um die richtige Geschwindigkeitskonstante von  $0.36 \text{ s}^{-1}$  zu erhalten. Kurve A des linken Grafen zeigt eine Kontrollreaktion ohne TMP.

Um zu überprüfen, welches Enzym, eines der Hilfsenzyme (z. B. PK mit PEP als Phosphoryldonor) oder eine Verunreinigung der Hilfsenzyme (z. B. NDPK mit ATP als Phosphoryldonor), für die Weiterphosphorylierung von TDP verantwortlich ist, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Es wurde der Puffer mit NADH und PEP vorgelegt, anschließend nacheinander die Hilfsenzyme, TDP und anschließend ATP zugegeben. Der gesamte Test wurde ohne TMPK durchgeführt. Vor jeder Zugabe wurde gewartet, bis ein stabiles Signal zu beobachten war. Die Kurve des rechten Graphen der Abb. 3.9 zeigt, daß erst bei der Zugabe von ATP eine UV-Absorptionsabnahme stattfand. Das bedeutet, daß keines der beiden Hilfsenzyme TDP phosphoryliert, sondern vermutlich eine Verunreinigung der Hilfsenzyme (vermutlich NDPK) unter Verbrauch von ATP.

Analoge Experimente mit Wildtyp TMPK lieferten identische Ergebnisse. Das bedeutet, daß die R200A-Mutation keinen Einfluß auf die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Gesamtreaktion von TMPK hat und demnach das nicht konservierte Arg200 vermutlich keine katalytische Funktion einnimmt.

Die Affinitätsbestimmung von Tp5A zu der menschlichen TMPK erfolgte nach der gleichen Methode, die in dem Kapitel 3.1.2 für analoge Experimente an *E. coli* TMPK vorgestellt und angewendet wurde. Auch bei der menschlichen TMPK wurde bei der Bindung von Tp5A keine Änderung des intrinsischen Tryptophanfluoreszenzsignals beobachtet. Daher wurde auch hier auf die Verdrängung des fluoreszenzmarkierten Tp5A-mant aus einem Komplex mit menschlicher TMPK zurückgegriffen. Den für die Auswertung der Verdrängungstitration notwendigen  $K_d$ -Wert des Komplexes aus menschlicher TMPK und Tp5A-mant wurde durch direkte Gleichgewichtstitration von

100 nM Tp5A-mant mit steigenden Konzentrationen der TMPK erhalten. Der linke Graph der Abb. 3.10 zeigt exemplarisch eine Titrationskurve einer solchen Messung. Beobachtet wird ein ca. 110 %iger Anstieg der Fluoreszenz als Resultat der Bindung von Tp5A-mant an menschlicher TMPK. Die Auswertung erfolgte durch Kurvenangleich einer quadratischen Gleichung an die Meßpunkte und lieferte einen  $K_d$ -Wert von  $84 \pm 7$  nM.



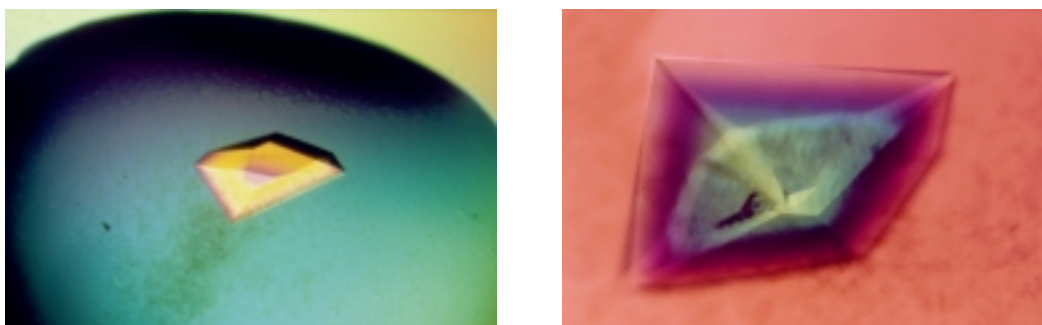
**Abb. 3.10:**  $K_d$ -Wert Bestimmung der Komplexe der R200A-Mutante der menschliche TMPK und Tp5A-mant bzw. Tp5A mittels Fluoreszenztitrations. Links) Gleichgewichtstitration von 100 nM Tp5A-mant mit steigenden Konzentrationen der R200A-Mutante. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GRAFIT durch Kurvenangleich einer quadratischen Gleichung. Rechts) Verdrängungstitration von 100 nM Tp5A-mant aus einem stöchiometrischen Komplex mit der R200A-Mutante der menschlichen TMPK mit steigenden Konzentrationen von Tp5A. Die Auswertung erfolgte durch einen iterativen Kurvenangleich mit dem Programm SCIENTIST. Die Bedingungen sind im experimentellen Teil aufgeführt.

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten des Komplexes aus menschlicher TMPK und Tp5A erfolgte durch Verdrängung von Tp5A-mant (100 nM) aus einem stöchiometrischen Komplex mit menschlicher TMPK durch schrittweise Erhöhung der Tp5A-Konzentration. Ein iterativer Kurvenangleich an die Meßpunkte mit dem Programm SCIENTIST (Gleichungssystem siehe experimenteller Teil; Kapitel 5.1.5) lieferte einen  $K_d$ -Wert von 62 nM (rechter Graph der Abb. 3.10). Der gemessene  $K_d$ -Wert von 62 nM erlaubt die Bildung eines stöchiometrischen Komplexes bei den für die Kristallisation verwendeten Protein und Nukleotidkonzentrationen von ca. 1 - 2 mM.

### 3.2.3 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK-R200A-Mutante im Komplex mit TMP-ADP, TMP-AppNHp, TMP-ADP-AIF<sub>3</sub>, TDP-ADP und Tp5A

Nachdem gezeigt war, daß die R200A-Mutation keinen Einfluß auf  $k_{\text{cat}}$  hat, sollte überprüft werden, ob die Mutation einen strukturellen Einfluß auf die menschliche TMPK hat. Dazu wurde die R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP kristallisiert, die Struktur gelöst und mit der analogen Struktur der Wildtyp TMPK verglichen. Um möglichst viele Informationen über die funktionsweise der TMPK zu erhalten, wurden darüber hinaus verschieden Nukleotidkomplexe der menschlichen TMPK kristallisiert, die verschiedene Substratzustände entlang der Reaktionskoordinate von menschlicher TMPK simulieren. Um die Eduktkonformation nach der Substratbindung an TMPK zu simulieren, wurde dazu erstens die TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp kristallisiert. Diese Struktur sollte gleichzeitig den strukturellen Einfluß eines  $\gamma$ -Phosphates in AppNHp im Vergleich zu der TMP-ADP-Struktur zeigen. Die Beobachtung, daß bei der Kristallisation der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ATP- $\gamma$ S nur Elektronendichte für die Nukleotide TDP- $\beta$ S und ADP (also für die Produkte) beobachtet wird, deutet darauf hin, daß der produktgebundene Zustand der menschlichen TMPK scheinbar energieärmer ist als der substratgebundene Zustand. Dieses führte zu der Idee die TMPK auch mit den Substraten TMP und ATP zu kristallisieren. Man erwartet in dieser Struktur eine Mischung der Nukleotide TMP und TDP auf der Monophosphatbindungsstelle und ADP und ATP auf der Triphosphatbindungsstelle für den Fall, daß die substrat- bzw. produktgebundenen Zustände der TMPK energetisch gleich sind. Sollte jedoch auf dem Enzym das Gleichgewicht geringfügig von eins abweichen, könnte es möglich sein, daß sich in der Kristallstruktur der energieärmere Zustand anreichert, so daß im extremen Fall nur dieser Zustand in der Kristallstruktur zu beobachten ist. Eine solche Beobachtung könnte wichtige Informationen für den katalytischen Mechanismus der TMPK liefern. Drittens wurde die TMPK im Komplex mit TMP, ADP und AIF<sub>x</sub> kristallisiert. Für UMPK im Komplex mit UMP, ADP und AIF<sub>3</sub> konnte gezeigt werden, daß ein solcher Komplex den Übergangszustand einer NMPK mimiken kann (Schlichting et al., 1997). Auch wurde die TMPK im Komplex mit dem Binukleotidinhibitor Tp5A kristallisiert. Mit dieser Struktur sollte untersucht werden, ob Tp5A bei der Bindung an menschlicher TMPK das Enzym eher in die Edukt-, Produkt- oder vielleicht sogar eher in eine dem Übergangszustand ähnliche Konformation zwingt.

Einkristalle der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit den oben aufgeführten Substratkombinationen erhält man durch die Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen in Zellkulturschalen (Linbro, Flow Laboratories Inc., Virginia, USA) durch Mischen von 2  $\mu$ l einer zuvor hergestellten Lösung aus 25 mg/ml TMPK (Endkonzentration), 50 mM  $MgCl_2$ , 200 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) und die entsprechenden Nukleotide (Endkonzentrationen von: 1 mM TMP und ADP; 1 mM TMP und 20 mM AppNHp; 1 mM TMP und 20 mM ATP; 2 mM Tp5A) mit 2  $\mu$ l einer Lösung (Reservoirlösung) aus 15 - 22 % (w/v) PEG 3350, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 5 % (v/v) steril filtriertes Wasser aus dem toten Meer und anschließender Äquilibration gegen die Reservoirlösung (800  $\mu$ l) bei 20 °C. Die Kristalle wachsen innerhalb von 1-2 Wochen mit einer durchschnittlichen Größe von 500 x 300 x 300  $\mu m^3$  (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11:** Typische Einkristalle der menschlichen TMPK im Komplex mit Substraten. Die Abmessungen betragen ca. 500 x 300 x 300  $\mu m^3$ .

Für die Kristallisation des Komplexes aus menschlicher TMPK und Tp5A wurde die *microseeding* Technik verwendet, da unter den angegebenen Kristallisationsbedingungen keine oder nur sehr kleine Einkristalle wuchsen, die sich nicht eigneten, einen hochaufgelösten Datensatz zu messen. Vier Stunden nach dem Ansatz der Kristallisationslösungen wurden die Tropfen mit Mikrokristallen eines zerstoßenen TMPK-TMP-ADP Kristalls angeimpft. Durch diese Methode reduzierte sich die Kristallisationszeit auf 2-3 Tage und es wuchsen Einkristalle von diesem Komplex von ausreichender Größe, um einen hochaufgelösten Datensatz aufzunehmen. Da in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp die Besetzung der Phosphoryldonorbindungsstelle zu 50 % mit jeweils ADP und AppNHp besetzt ist (siehe folgende Kapitel), wurde dieses Experiment ebenfalls unter Gebrauch der *microseeding* Technik wiederholt, so daß auch hier die

Kristallisationszeit auf 2 Tage reduziert werden konnte. Diese Prozedur führte dazu, daß die Phosphoryldonorbindungsstelle zu 2/3 mit AppNHp und zu 1/3 mit ADP besetzt ist (weitere Erläuterungen siehe folgende Kapitel). Die Cokristallisation des Komplexes der menschlichen TMPK mit TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  (1 mM  $\text{AlCl}_3$  und 10 mM NaF) gelang unter den angegebenen Bedingungen nicht. Es wurde keine zusätzliche Elektronendichte im aktiven Zentrum für  $\text{AlF}_3$  beobachtet. Daher wurde dieser Komplex mittels der *soaking* Technik hergestellt. Dazu wurde ein Kristall der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP über Nacht mit einer Lösung bestehend aus 85 mM  $\text{AlCl}_3$  und 250 mM NaF getränkt. Das *soaking* Experiment wurde von Dr. I. Schlichting durchgeführt. Durch Wasserkanäle im Kristall können die sich in Lösung gebildeten  $\text{AlF}_3$ -Moleküle (bei dem verwendeten pH Wert von 8.0 liegt bevorzugt  $\text{AlF}_3$  und nicht  $\text{AlF}_4^-$  vor (Schlichting et al., 1999)) ins aktive Zentrum des Enzyms diffundieren und dort binden.

Zur Vermeidung von Strahlenschäden während der Datensammlung wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 100 K im Kryo-Stickstoff-Strahl (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) gemessen. Als Kryolösungsmittel wurde eine Lösung aus 10 % (w/v) Xylitol, 10 % (w/v) Glucose, 22 % (w/v) PEG 3350 und 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) verwendet. Die Datensätze wurden entweder am X11-Strahl/BW7b-Strahl des DORIS Speicherrings an der EMBL-Außenstation am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg mit einem MAR345 Imaging-Plate System, am X25 Strahl der National Synchrotron Light Source (NSLS) in Brookhaven (von Dr. I. Schlichting) mit einem B4-CCD-Detektor, an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble (von Dr. I. Schlichting) mit einem MARCCD-Detektor oder an einer Mac Science Röntgendrehanode bei 45 kV und 100 mA mit einem MAR345 Imaging-Plate System in Dortmund gemessen. In Tab. 3.3 sind die Statistiken der Datensammlung und -reduktion zusammengefaßt.

Die Indizierung und Integration der gemessenen Intensitäten sowie die Skalierung verschiedener Einzelmessungen wurden mit den Programmen XDS und XSCALE (Kabsch 1993) durchgeführt. Die Indizierung aller Datensätze ist konsistent mit der tetragonalen Raumgruppe  $P4_32_12$  (charakterisiert durch eine vierzählige und zwei dazu senkrechte zweizählige Kristallachsen ( $P422$ ); durch systematisch abwesende Reflexe konnte auf die vierzählige und zweizählige Schraubenachsen geschlossen werden). Die maximale Auflösung aller Datensätze liegt zwischen 1.75 Å und 1.60 Å, so daß alle Strukturen als hochaufgelöst gelten. Ausnahme ist der TMP-



ADP-AIF<sub>3</sub>-Datensatz, bei dem die hohe Auflösung aufgrund der *soaking* Prozedur auf 2.0 Å beschränkt ist.

**Tab. 3.3:** Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen TMP-Substratkombinationen

	TMP ADP	TMP AppNHp (A)	TMP AppNHp (B)	TMP ADP AlCl <sub>3</sub> /NaF	TMP ATP	TP5A
Röntgenquelle	X25/NSLS Brookhaven	X25/NSLS Brookhaven	BW7b/DESY Hamburg	ID14.3/ESRF Grenoble	Drehanode Dortmund	X11/DESY Hamburg
Wellenlänge (Å)	1.100	1.100	0.847	0.931	CuKα	0.9076
Detektor	B4-CCD	B4-CCD	MAR345	MARCCD	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100	100	100	100	100
Auflösung (Å)	1.63	1.75	1.6	1.9	1.7	1.70
Zahl der Reflexe						
alle gemessenen	325999	183028	103211	106992	139922	148714
unabhängigen	31064	25980	33305	20787	28445	27940
Vollständigkeit (%)						
alle Reflexe	95.7	96.9	96.6	99.4	99.4	97.4
äußere Schale	75.3	77.8	98.0	99.5	99.6	89.3
R <sub>sym</sub> <sup>1</sup> (%)						
alle Reflexe	6.1	6.5	4.6	7.5	5.2	3.3
äußere Schale	20.3	33.3	15.5	46.3	29.6	22.2
Signal/Rausch- Verhältnis (I/σ)						
alle Reflexe	23.38	19.36	20.93	11.50	19.03	24.23
äußere Schale	3.96	4.53	4.41	2.12	3.66	5.32
Raumgruppe	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Elementarzelle (Å)						
a = b	101.045	101.600	101.341	101.593	101.091	101.100
c	49.788	49.700	49.310	49.293	49.196	49.300
α = β = γ	90	90	90	90	90	90
Moleküle/asy. Einheit	1	1	1	1	1	1

$$^1 R_{\text{sym}} = \sum_{hkl, i} |I_{hkl, i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl, i} I_{hkl, i}$$

Für die Strukturverfeinerung wurde das Modell des TMP-ADP-Komplexes der Wildtyp TMPK für die Bestimmung der Anfangsphasen verwendet. Da alle Kristalle der menschlichen TMPK isomorph sind, konnte das Modell direkt, ohne notwendige Translations- und Rotationssuche verwendet werden. Die allgemeine Strategie der Strukturverfeinerung war folgende (notwendige spezielle Strategien sind bei den einzelnen Datensätzen erläutert): Die erste Runde der automatischen Strukturverfeinerung wurde mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1993) durchgeführt. Dazu wurde zuerst das Startmodell (alle Aminosäuren mit den Substraten TMP und ADP, ohne Wassermoleküle) des strukturell homologen Moleküls (menschliche Wildtyp TMPK) mittels einer *rigid body*-Verfeinerung insgesamt als starrer Körper in die richtige Position und Orientierung in die Einheitszelle gebracht. Anschließend wurde eine

Lösungsmittelkorrektur (*bulk solvent-correction*), ein *simulated annealing* bei einer Starttemperatur von 3000 K und abschließend eine individuelle, isotrope Temperaturfaktor- (B-Faktor)-Verfeinerung durchgeführt. Manuelles Korrigieren des so erhaltenen Modells erfolgte mit dem Programm O (Jones et al., 1991). Für nachfolgende Zyklen automatischer Verfeinerungen wurde das Programm REFMAC (Collaborative Computational Project, Nr. 4, 1994) verwendet. Automatisches Einfügen von Wassermolekülen erfolgte mit dem Programm ARP (Collaborative Computational Project, Nr. 4, 1994). Nach mehreren Zyklen automatischer und manueller Verfeinerung ließen sich die Strukturen nach diesem Verfahren nicht weiter verbessern. Die Statistiken der Strukturverfeinerungen sind in Tab. 3.4 zusammengefaßt.

Die Richtigkeit und Qualität der verfeinerten Modelle (Überprüfung der Stereochemie und der Geometrie der Modelle) wurde mit den Programmen *Procheck* und *whatcheck* (Collaborative Computational Project, Nr. 4, 1994) überprüft. Ramachandran-Diagramme (Ramachandran und Sasisekharan, 1968; Laskowski et al., 1993) der verfeinerten Strukturen zeigen, daß in allen Strukturen alle Aminosäuren (Glycine ausgeschlossen)  $\phi/\psi$ -Winkel in den bevorzugten oder zusätzlich erlaubten Bereichen haben. Ausnahme ist Arginin 97, dessen  $\phi/\psi$ -Winkel (ca.  $80^\circ$  und  $150^\circ$ ) im nicht erlaubten Bereich liegen. Das in allen TMPKs hoch konservierte Arginin aus dem DR(Y/H)-Motif ist, wie schon in Kapitel 3.1 erwähnt, vermutlich für die Katalyse sehr wichtig und wird in dem Kapitel mechanistische Diskussion 3.2.15 diskutiert. In Abb. 3.12 ist exemplarisch ein Ramachandran-Diagramm der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP dargestellt.

**Tab. 3.4:** Statistik der Strukturverfeinerungen der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen TMP-Substratkombinationen

	TMP ADP	TMP AppNHp (A)	TMP AppNHp (B)	TMP ADP AlCl <sub>3</sub> /NaF	TMP ATP	TP5A
Auflösungsbereich (Å)	33.5-1.65	25.4-1.75	71.7-1.60	71.8-2.00	50.5-1.70	35.3-1.71
Zahl der Reflexe (F > 0 σ)						
Arbeitssatz	27897	23392	29949	16955	25586	25079
Testsatz	3109	2587	3355	930	2859	2772
R <sub>cryst</sub> <sup>1</sup> (%)	20.1	18.1	19.8	21.4	19.1	19.2
R <sub>free</sub> <sup>2</sup> (%)	24.2	23.6	23.6	27.2	24.0	23.0
Standardabweichung der						
Bindungslängen (Å)	0.012	0.012	0.011	0.018	0.012	0.012
Bindungswinkel (°)	1.6	1.5	1.7	1.6	1.3	1.5
Anzahl der Atome						
Protein <sup>3</sup>	1647	1750	1709	1617	1627	1646
Nukleotide <sup>4</sup>	48	100*	100*	48 / 4	73*	52**
Metalle (Mg-Ionen)	3	2	2	2	2	2
Wasser	293	219	300	173	277	250
Durchschnittliche						
B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )						
Hauptkettenatome	17.6	17.2	21.9	38.8	22.2	24.5
Seitenkettenatome	21.6	22.4	26.4	42.0	26.1	28.2
Nukleotide	16.9	17.6	20.1	40.0 / 64.0	19.8	25.0
Mg-Ionen	22.9	16.8	21.0	39.5	22.0	25.0
Wassermoleküle	30.7	29.8	39.5	51.1	38.3	38.7

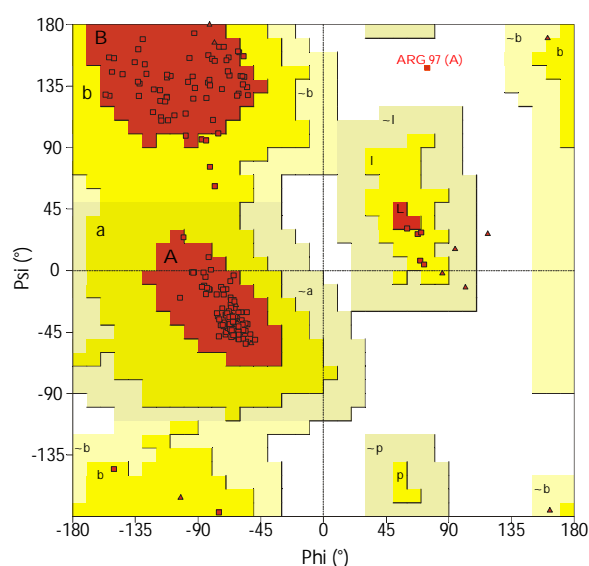
<sup>1</sup>  $R_{\text{cryst}} = \sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - |F_{\text{calc}}(\text{hkl})|) / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|$

<sup>2</sup>  $R_{\text{free}} = R_{\text{cryst}}$ , berechnet für ca. 10 % willkürlich ausgewählter Reflexe (Testsatz), die bei der Verfeinerung ausgeschlossen wurden (Brünger, 1992)

<sup>3</sup> Zahlen beinhaltet Atome von Aminosäuren, die in zwei Konformationen, als Alanin oder gar nicht modelliert wurden (siehe für eine detaillierte Auflistung Anhang Kapitel 6.3).

<sup>4</sup> Die mit \* gekennzeichneten Zahlen beinhalten Atome, die in 2 Konformationen modelliert sind; bei der mit \*\* gekennzeichneten Zahl sind Atome des Binukleotids nicht modelliert.

Die durchschnittlichen B-Faktoren der Hauptketten- bzw. Seitenkettenatome wurden mit dem Programm act (Collaborative Computational Project, Nr. 4, 1994) berechnet und sind in der Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Eine Auftragung der B-Faktoren der Aminosäuren gegen die Aminosäurenummern zeigt, daß zwei Bereiche der Struktur, die LID-Region (doppelt bis dreifach so hohe B-Faktoren) und der P-loop (bis zu doppelt so hohe B-Faktoren), in allen Strukturen im Vergleich zu dem durchschnittlichen Wert besonders hohe Temperaturfaktoren haben. Dieses läßt sich damit erklären, daß es sich bei diesen beiden Regionen um flexible Schleifen handelt, die je nach Substratzustand des Proteins verschiedene Konformationen (siehe unten) einnehmen und aufgrund ihrer Flexibilität relativ schlecht durch die Elektronendichte definiert sind. In manchen Strukturen (siehe Anhang Kapitel 6.3) sind Teile der LID-Region nicht im Modell, oder beide Sequenzmotive sind in zwei Konformationen modelliert.



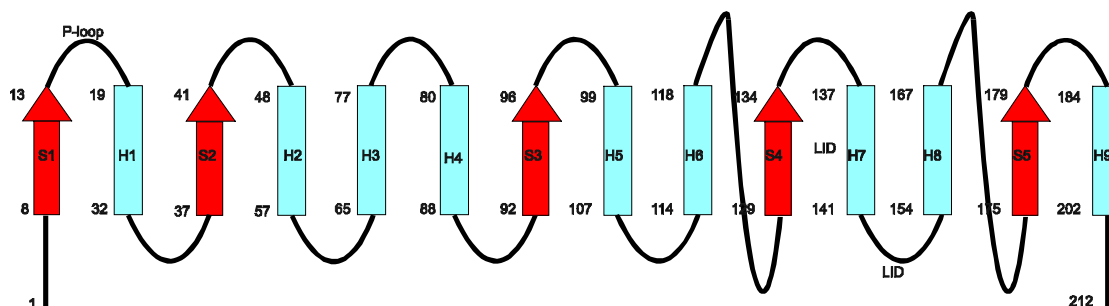
**Abb. 3.12:** Ramachandran Plot des Modells der R200A-Mutante der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP nach PROCHECK (Laskowski et al., 1992). Von den nicht Glycin und Prolin Aminosäuren haben 177 Aminosäuren  $\phi/\psi$ -Winkel in den bevorzugten Bereichen (in rot und mit A, B, L bezeichnet), 10 Aminosäuren in den zusätzlich erlaubten Bereichen (dunkel gelb und mit a, b, l, und p bezeichnet), und eine Aminosäure (Arg97) im nicht erlaubten Bereich des Ramachandran Diagramms. 13 Aminosäuren sind Glycine (Dreiecke) und 6 Aminosäuren sind Proline. Basierend auf eine Analyse von 118 Strukturen mit einer Auflösung von mindestens 2 Å und R-Faktoren von unter 20 % werden, für ein Modell mit guter Qualität, über 90 % der Aminosäuren in den bevorzugten Bereichen erwartet. Dieses ist in diesem Modell und in allen anderen in dieser Arbeit verfeinerten Modellen gegeben.

### 3.2.4 Die Topologie und die dreidimensionale Struktur der menschlichen TMPK

Die menschliche TMPK besteht aus 212 Aminosäuren und hat ein relatives Molekulargewicht von 24 kD. In Abb. 3.13 ist ein auf die dreidimensionalen Strukturen basierender Sequenzvergleich der TMPKs aus Hefe, Mensch und *E. coli* abgebildet. Aufgrund der Expression der menschlichen TMPK als Fusionsprotein ist der N-Terminus der verwendeten menschlichen TMPK um drei Aminosäuren (Gly-Ser-His) länger als in dem Sequenzvergleich dargestellt. Ebenso wie Hefe und *E. coli* TMPK ist die menschliche TMPK ein globuläres Protein mit einer sehr ähnlichen Faltung. Der Kern des Enzyms besteht aus einem 5 strängigem parallelen  $\beta$ -Faltblatt, daß von 9  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die Topologie der Sekundärstrukturelemente ist in Abb. 3.14 grafisch dargestellt.

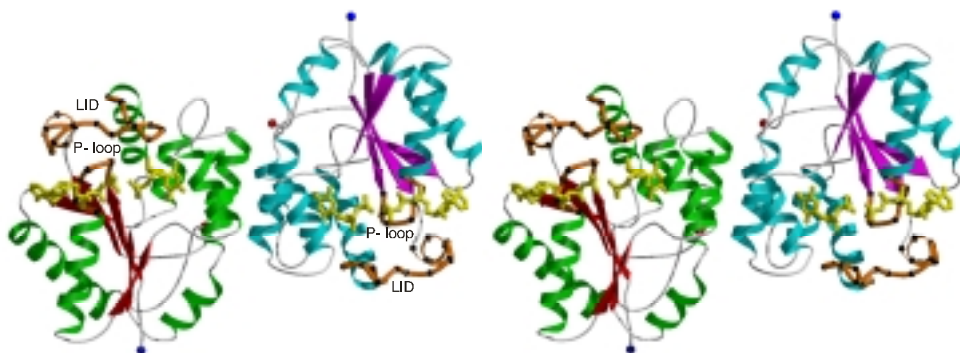
	P-loop					
	*****					
	1					49
TMPK (Mensch)	MAARRGALIV	LEGVDRAGKS	TQSRKLVEAL	CAAGHRAE.L	LRFPERSTEI	
TMPK (Hefe)	MMG.RGKLIL	IEGLDRTGKT	TQCNILYKKL	...QPNCK.L	LKFPERSTRI	
TMPK (E.coli)	...MRSKYIV	IEGLEGAGKT	TARNVVVETL	EQLGIRDMVF	TREP.GGTQL	
	50					93
TMPK (Mensch)	GKLLSSYLQK	.KS..D..VE	DHSVHLLFSA	NRWEQVP.LI	KEKLSQGVTL	
TMPK (Hefe)	GGLINEYLTD	.DSF.Q..LS	DQAIHLLFSA	NRWEIVD.KI	KKDLLEGKNI	
TMPK (E.coli)	AEKLRSLVLD	IKSVGDEVIT	DKAEVLMFYA	ARVQLVETVI	KPALANGTWW	
	94					*****139
TMPK (Mensch)	VVDRYAFSGV	AFT.GAK.EN	.FSLDWCKQP	DVGLPKPDLV	LFLQLQLAD.	
TMPK (Hefe)	VMDRYVYSGV	AYS.AAKGTN	GMDLDWCLQP	DVGLLKPDLT	LFLSTQDVDN	
TMPK (E.coli)	IGDRHDLSTQ	AYQGGGRGID	QHMLATLRDA	VLGDFRPDLT	LYLDV.TPEV	
	140	LID				180
TMPK (Mensch)	AAKRG.AFG.	HERYENGAFQ	ERALRCFHQL	M....K.DT	TLNWKMVD.A	
TMPK (Hefe)	NAEKS.GFG.	DERYETVKFQ	EKVKQTFMKL	LDKEIRKGDE	SIT..IVDVT	
TMPK (E.coli)	GLKRARARGE	LDRIEQESF.	DFFNRRARY	L..ELAAQDK	SI..HTID.A	
	181					212
TMPK (Mensch)	SKSIEAVHED	IRVLSEDAIR	TATEKPLGEL	WK		
TMPK (Hefe)	NKGIQEVEAL	IWQIVEPVLS	THIDHDKFSF	F.		
TMPK (E.coli)	TQPLEAVMDA	IRTTVTHWVK	.ELDA.....	..		

**Abb. 3.13:** Strukturbezogene Sequenzüberlagerung der TMPKs aus Hefe, *E. coli* und Mensch. Die P-loop und LID-Sequenzen sind mit Sternchen markiert, die Numerierung bezieht sich auf die menschliche TMPK. Die P-loop Arginine der menschlichen und Hefe TMPKs sowie das Arg153 der *E. coli*-LID sind in fett geschrieben.



**Abb. 3.14:** Topologie der Sekundärstrukturelemente der menschlichen TMPK.  $\alpha$ -Helices sind als blaue Säulen,  $\beta$ -Stränge als rote Pfeile und Loops als schwarze Schleifen dargestellt. Der Beginn und das Ende eines Sekundärstrukturelements ist mit der Nummer der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet.

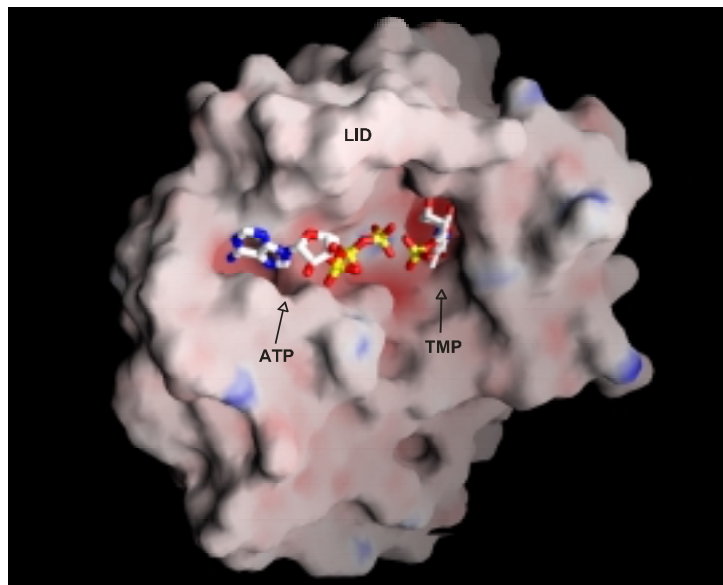
Die menschliche TMPK ist als Dimer aktiv und besteht aus zwei gleichen Untereinheiten, deren Kontaktfläche, ähnlich wie bei Hefe TMPK, aus hydrophoben Resten dreier nahezu paralleler Helices aus jedem Monomer besteht (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15:** Stereopräsentation eines Ribbondiagramms des aktiven Homodimeren der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp. Zur Unterscheidung der beiden Monomere des Dimers ist das zentrale parallele 5-strängige  $\beta$ -Faltblatt in einem Monomer rot in dem anderen pink und die  $\alpha$ -Helices grün bzw. cyan dargestellt. Die P-loops und LID-Regionen der beiden Monomeren sind braun mit jedem C $\alpha$ -Atom schwarz gepunktet, alle anderen Loops in grau gezeigt. Die Nukleotide sind in gelb und als *ball and stick* Präsentation wiedergegeben.

Auch bei der menschlichen TMPK binden beide Substrate simultan und in der Form, daß die Phosphatgruppen aufeinander zugerichtet sind. Die Thymidinbase ist vollständig von Proteinresten umgeben und ins Proteininnere gerichtet. Die Base des Phosphoryldonors ist an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert und dem Lösungsmittel exponiert. In Abb. 3.16 ist exemplarisch für die Tp5A-TMPK-R200A-Struktur die Oberfläche eines Monomeren der menschlichen TMPK mit den Substraten TMP und ATP dargestellt, um einen räumlichen Eindruck von der Bindung und Positionierung der beiden Substrate an TMPK zu vermitteln.

Ein Vergleich der Strukturen der menschlichen Wildtyp TMPK und der R200A-Mutante im Komplex mit TMP und ADP zeigt innerhalb des Koordinatenfehlers eine absolute Übereinstimmung. Aufgrund der kinetischen und strukturellen Identität des Wildtyps und der R200A-Mutante der menschlichen TMPK, zusammen mit der Tatsache, daß die menschliche TMPK als Dimer aktiv ist und das zum Alanin mutierte, nicht konservierte Arg200 aus einem symmetrieverwandten Molekül stammt, das nicht das zweite Monomer des physiologisch aktiven Dimers ist, wird im folgenden angenommen, daß sich die R200A-Mutante wie Wildtyp TMPK verhält. Alle weiteren Arbeiten werden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, mit der R200A-Mutante durchgeführt und diese wird als menschliche TMPK bezeichnet.

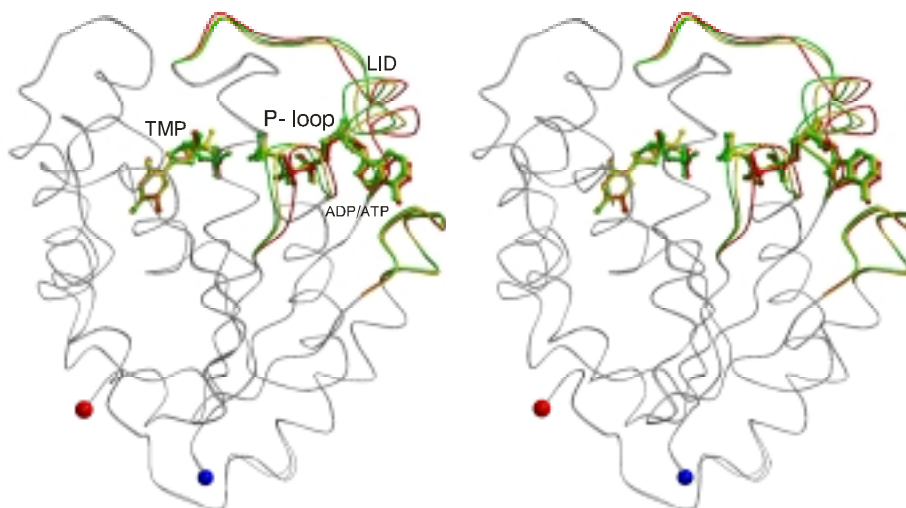


**Abb. 3.16:** Darstellung der Oberfläche der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A (verwendetes Programm: GRASP (Nicholls et al., 1991)) coloriert nach dem elektrostatischen Potential. Die Substrate TMP und ATP sind als *ball and stick* mit allen N-Atomen in blau, O-Atomen in rot, C-Atomen in weiß und P-Atomen in gelb dargestellt.

### 3.2.5 Verschiedene Substratzustände offenbaren einzigartige P-Loop- und LID-Bewegungen der menschlichen TMPK innerhalb der global geschlossenen und substratgebundenen Protein Konformation

Wie in der Einleitung erwähnt und insbesondere für AMPK gezeigt (Vonnheim et al., 1995), vollziehen NMPKs als Antwort auf die Bindung eines oder beider Substrate große Konformationsänderungen. Man unterscheidet zwischen einer offenen Konformation, wenn kein Substrat gebunden ist, eine halb geschlossene Konformation, wenn eines der beiden Substrate gebunden ist und eine voll geschlossene, aktive Konformation, wenn beide Substrate oder ein Binukleotidanalogen (Ap5A an AMPK, Up5A an UMPK) gebunden sind.

In allen fünf Substratkomplexen, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind beide Substratbindungsstellen der menschlichen TMPK besetzt, so daß das Protein in einer global geschlossenen Konformation vorliegt. Aus der Überlagerung der Strukturen wird deutlich, daß drei Sequenzmotive der menschlichen TMPK zusammen mit dem Phosphoryldonor innerhalb der global geschlossenen Konformation in Abhängigkeit der gebundenen Substrate weitere Konformationsänderungen vollziehen (Abb. 3.17).

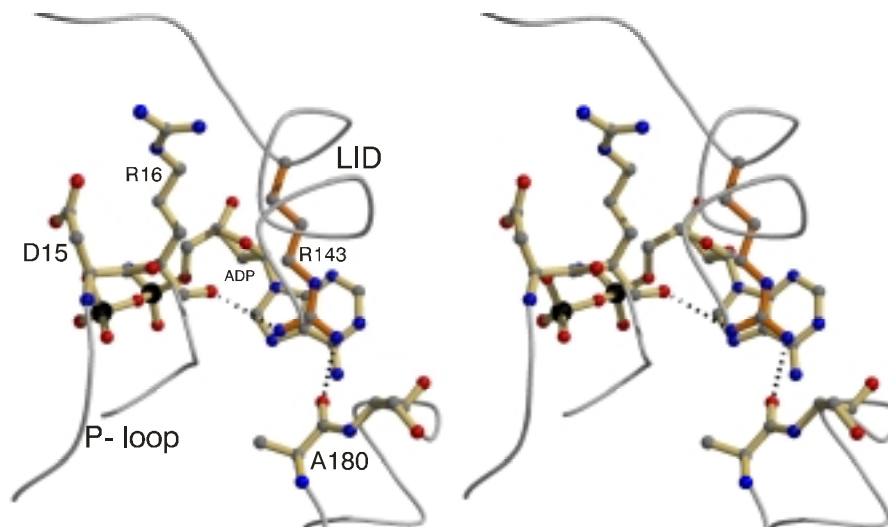


**Abb. 3.17:** Überlagerung von drei Strukturen der menschlichen TMPK (Standardabweichung (rmsd) für alle C $\alpha$ -Atome außer denen der farbig markierten Bereichen beträgt  $< 0.17 \text{ \AA}$ ) offenbart Konformationsänderungen innerhalb der global geschlossenen Konformation als Funktion der gebundenen Substrate (Stereopräsentation). Dargestellt sind die C $\alpha$ -Traces (grau) der Monomeren der TMPK im Komplex mit TMP-ADP (rot), TMP-AppNHp (gelb) und Tp5A (grün) mit den Nukleotiden als *ball and stick* Präsentation. Die farbigen Bereiche zeigen die Regionen (P-loop, LID und die Adenin-bindende Region), die in Abhängigkeit der Substrate Konformationsänderungen vollziehen.

Zu diesen drei Regionen zählen erstens der P-loop (Aminosäuren 13 – 18), zweitens die LID-Region (Aminosäuren 135 – 150) und drittens eine Region zwischen den Aminosäuren 178 – 188, die an der Bindung und Positionierung der Adeninbase beteiligt ist und im folgenden als Adenin-bindende Region bezeichnet wird. Die Guanidiniumgruppe des Arg143 aus der LID-Region macht neben einer hydrophoben *stacking* Wechselwirkung zu der Adeninbase gleichzeitig auch Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu der Carbonylgruppe des Arg16 aus dem P-loop ( $3.1 \text{ \AA}$ ) als auch zu Ala180 ( $2.7 \text{ \AA}$ ) aus der Adenin-bindenden Region und trägt damit im wesentlichen zu der Kommunikation dieser Bereiche und des Phosphoryldonors bei (Abb. 3.18). Innerhalb der global geschlossenen Proteinkonformation unterscheiden wir zwischen einer sogenannten “P-loop offenen“ Konformation, wenn TMP und ADP gebunden sind, einer “P-loop partiell-geschlossenen“ Konformation, wenn TMP und AppNHp bzw. TMP-ADP und AlF<sub>3</sub> gebunden sind und einer “P-loop geschlossenen“ Konformation wenn Tp5A oder TDP und ADP gebunden sind. Die sich auf den P-loop beziehende Terminologie wurde aufgrund der besonderen Wichtigkeit des P-loop gewählt. Eine P-loop Bewegung beinhaltet gleichzeitig jedoch auch eine Bewegung der



LID-Region sowie der Adenin-bindende Region, auch wenn dieses nicht jedesmal extra erwähnt wird.



**Abb. 3.18:** Vergrößerung der farbigen Bereiche der TMP-ADP-Struktur von Abb. 3.17 (gleiche Orientierung, Stereobild). Gezeigt ist die wichtige Funktion des Arg143 (braun) aus der LID-Region für die Kommunikation der drei an der komplexen Bewegung beteiligten Bereiche (gezeigt als graue Schleifen: P-loop, LID und die Adenin-bindende Region) und dem Phosphoryldonor. Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind die Aminosäuren Asp15 und Arg16 aus dem P-loop, die Seitenkette des Arg143 aus der LID-Region sowie Ala180 und Ser181 aus der Adenin-bindenden Region mit allen N-Atomen in blau, O-Atomen in rot und C-Atomen in grau. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg143 und Arg16 bzw. Ala180 sind als gestrichelte Linien gezeigt.

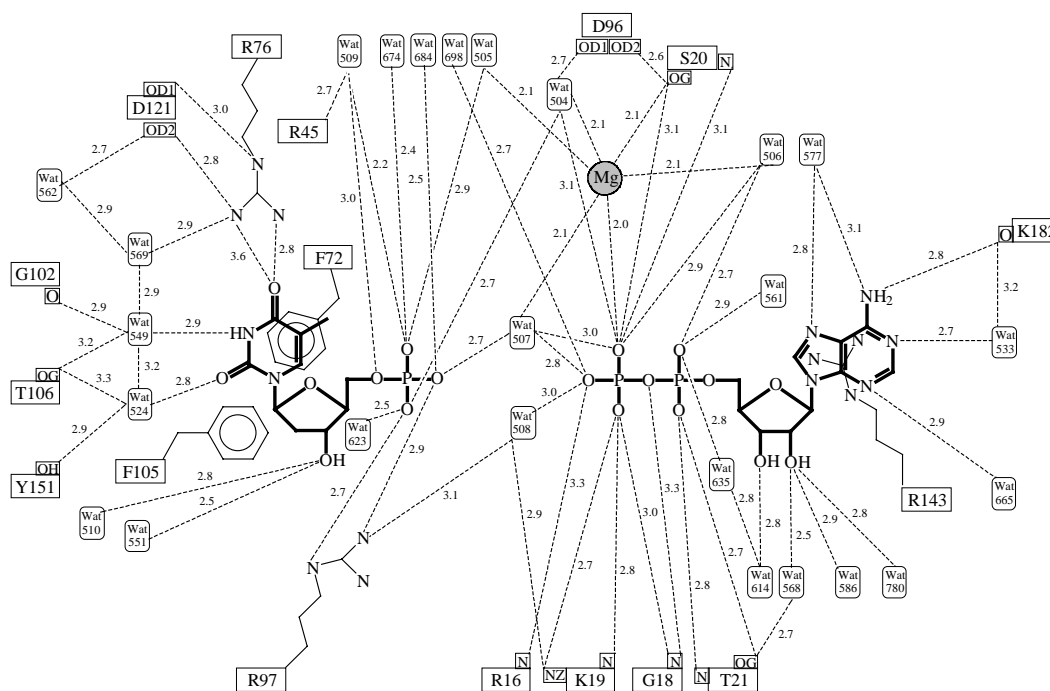
Die Bewegung des P-loops als starrer Körper erfolgt um die als Scharnier wirkenden hochkonservierten Aminosäuren Glutamat 12 und Lysin 19 und ist als Antwort auf die Verdrängung eines Di- durch ein Triphosphat für die menschliche TMPK einzigartig. Eine analoge Beobachtung wurde zuvor bei keiner anderen NMPK gemacht. In AMPK und UMPK gibt es keinen Unterschied zwischen der Positionierung der Hauptkettenatome der Strukturen im Komplex mit AMP-ADP (pdb code 2eck) und AMP-AppNHp (Berry et al., 1994) bzw. UMP-ADP und UMP-ADP-AIF<sub>3</sub> (Schlichting und Reinstein, 1997). Auch für andere GTP- oder ATP-bindende Proteine, die das P-loop Motiv enthalten und aufgrund des di- oder triphosphatgebundenen Zustandes wichtige Schalterfunktionen beispielsweise innerhalb der Signaltransduktion einnehmen (z. B. das Onkogen Ras), wurde eine solche P-loop Bewegung bisher nicht beobachtet. Auf eine

detaillierte Beschreibung und Analyse der verschiedenen Zustände und eine mögliche Bedeutung dieses Phänomens wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

### 3.2.6 Substratbindung und –spezifität der menschlichen TMPK

Die menschliche TMPK hat hohe Substratspezifität auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle (bevorzugt werden TMP und dUMP als Substrate akzeptiert) und geringere Substratspezifität auf der Phosphoryldonorbindungsstelle, wobei ATP oder dATP bevorzugt als Phosphoryldonor akzeptiert werden. Erklären lässt sich die Substratspezifität durch die vielen Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Substraten, die am Beispiel der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP-Mg<sup>2+</sup> in Abb. 3.19 in Form einer Abstandskarte dargestellt sind. TMP bindet ähnlich wie an Hefe TMPK in einer tiefen Tasche der menschlichen TMPK, so daß die Thymidinbase vollständig von Proteinresten umgeben ist. Die Positionen der TMP-Base und –Ribose sind in allen fünf Strukturen identisch und werden durch die komplexe P-loop Bewegung nicht bzw. nur geringfügig beeinflusst. Die glykosidische Bindung von TMP ist in der anti-Konformation und die Packung der Desoxyribose ist 2'-endo. Stabilisiert ist die anti-Konformation der glykosidischen Bindung durch viele Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat, die in der syn-Konformation nicht möglich wären.

In Analogie zu Hefe und *E. Coli* TMPK macht ein Phenylalanin (Phe72) eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung (hydrophobe *stacking* Wechselwirkung) zu der Thymidinbase. Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen NH1 der Seitenkette von Arg76 und Carbonyl O4 der Thymidinbase diskriminiert gegenüber Cytidin und erklärt die bevorzugte Bindung von Thymidin- und Uracilnukleotiden. Die Diskriminierung gegenüber Ribonukleotide ist sterisch bedingt und erfolgt durch die Positionierung des Benzolrings von Phe105 (eine modellierte 2'-OH-Gruppe würde ca. 2.5 Å von dem aromatischen Ring des Phe105 entfernt sein). Die homologen Aminosäuren in Hefe und *E. Coli* TMPK sind im Gegensatz zu dem Phenylalanin in menschlicher TMPK Tyrosine. Es sind die Hydroxylgruppen dieser Tyrosine, die Wechselwirkungen zu den Carboxylatgruppen des Asp14 bzw. Glu12 aus den P-loop-Motiven der Hefe und *E. Coli* TMPK machen. Auf die Bedeutung dieser Beobachtung im Hinblick auf das Design von Mutanten der menschlichen TMPK wird in Kapitel 3.6 eingegangen.



**Abb. 3.19:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und  $\text{ADP-Mg}^{2+}$  und den gebundenen Nucleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode und Wasser als Wat gekennzeichnet dargestellt. Ein eingekästetes N bedeutet, daß die Wechselwirkung über das Amid-N, ein eingekästetes O, daß die Wechselwirkung über die Rückgrat-Carbonylgruppe stattfindet. Andere eingekästete Buchstaben geben das Atom der Seitenkette, über das die Wechselwirkung stattfindet, an.

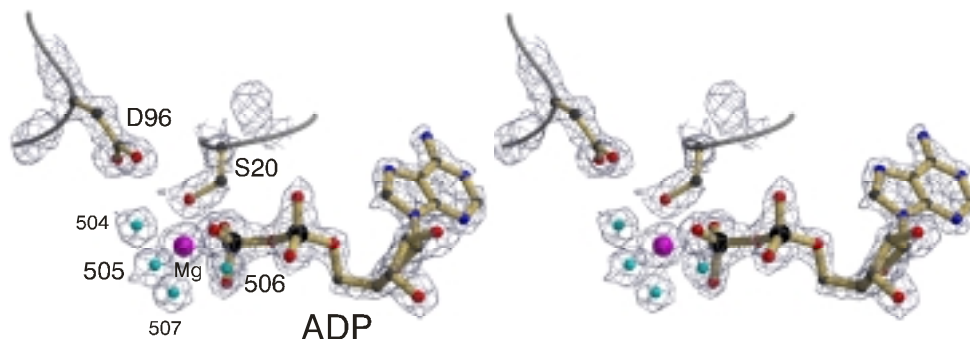
Die indirekten Wechselwirkungen zwischen N3 der Thymidinbase und Gly102 bzw. Thr106, sowie O2 der Thymidinbase und Thr106 bzw. Tyr151 über die beiden stark gebundenen Wassermoleküle 549 und 524 (sehr niedrige B-Faktoren in allen Komplexen und sehr gute Elektronendichte) diskriminieren gegenüber die größeren Purinbasen Adenin und Guanin für die sterisch kein Platz ist. Die 3'-Hydroxylgruppe der TMP-Ribose spielt sowohl eine Schlüsselrolle während der Reaktion als auch im Hinblick auf das Design neuer Nucleosidderivate mit verbesserten Substrateigenschaften für die menschliche TMPK. Die Wechselwirkungen zwischen dieser funktionellen Gruppe und dem Enzym ändern sich in den verschiedenen Substratkomplexen (keine Wechselwirkung zum Enzym in diesem Komplex und eine zweizählige Wechselwirkung zu Asp15 in dem Komplex mit TDP und ADP), so daß diese detailliert bei den entsprechenden Komplexen beschrieben und erläutert werden. Auch variiert die Position der TMP-Phosphorylgruppe in den verschiedenen Strukturen und wird daher in den Kapiteln der entsprechenden Nucleotidkomplexe beschrieben und diskutiert.

Die Adeninbase von ADP ist, neben einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der exozyklischen Aminogruppe der Adeninbase und Carbonyl O von Lys182, ähnlich wie auch in Hefe und *E. Coli* TMPK, nur über eine hydrophobe *stacking* Wechselwirkung der Guanidiniumgruppe von Arg143 aus der LID-Region direkt an das Protein gebunden. Die direkte Wechselwirkung zwischen Lys182 und der Aminogruppe der Adeninbase erklärt die bevorzugte Akzeptanz von Adenin- gegenüber Guanosinnukleotiden (in Guanosin ist an Position 6 der Base eine Carbonylgruppe anstelle der Aminogruppe in Adenosin). Die Hydroxylgruppen der ADP-Ribose machen keine direkten Wechselwirkungen zu dem Protein. Die Phosphatgruppen von ADP werden über viele Wechselwirkungen zwischen den Sauerstoffatomen der Phosphate und den Amidgruppen des P-loops positioniert. Auch die Seitenkette des hochkonservierten Lys19 aus dem P-loop Motiv faltet zurück in das aktive Zentrum und macht eine 2.7 Å Wechselwirkung zu OP3 des  $\beta$ -Phosphates von ADP.

### 3.2.7 Die Funktion der Magnesiumionen

In allen Strukturen der menschlichen TMPK ist deutliche Elektronendichte für zwei Magnesiumionen zu sehen, die auch in den Strukturmodellen berücksichtigt sind. Das in allen Strukturen mit Mg402 bezeichnete Magnesiumion ist auf die Kristallpackung zurückzuführen und ist nicht für die katalytische Funktion der TMPK erforderlich. Für die Kristallpackung ist es wichtig, da es auf einer zweizähligen Drehachse lokalisiert ist und durch Wechselwirkungen zu zwei symmetrieverwandten Molekülen die Kristallpackung stabilisiert. Das als Mg401 bezeichnete Magnesiumion befindet sich im aktiven Zentrum der TMPK und ist für die Katalyse entscheidend. Dieses ist die erste Struktur einer TMPK im Komplex mit beiden Substraten/Substratanaloga (TMP-AppNHp) in Gegenwart des katalytischen Magnesiumions. Beide Magnesiumionen sind oktaedrisch koordiniert. Liganden des katalytischen Magnesiumions sind in den Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP-ADP bzw. TDP-ADP neben vier Wassermolekülen (504, 505, 506 und 507), die Hydroxylgruppe des hochkonservierten Ser20 aus dem P-loop Motiv (GxxxxGKS/T) und ein Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphates von ADP (Abb. 3.20). Das Wasser 507 ist so positioniert, daß es gleichzeitig auch Wechselwirkungen zu jeweils einem O-Atom der terminalen Phosphorylgruppen beider Substrate macht. Dieses Wasser, zusammen mit dem Wasser 508, das ebenfalls eine Wechselwirkung zu dem  $\beta$ -Phosphat von ADP macht, dienen als Platzhalter für ein potentielles  $\gamma$ -Phosphat in ATP

und sind von entscheidender Bedeutung für die beobachtete P-loop- und LID-Bewegung (siehe folgende Kapitel).

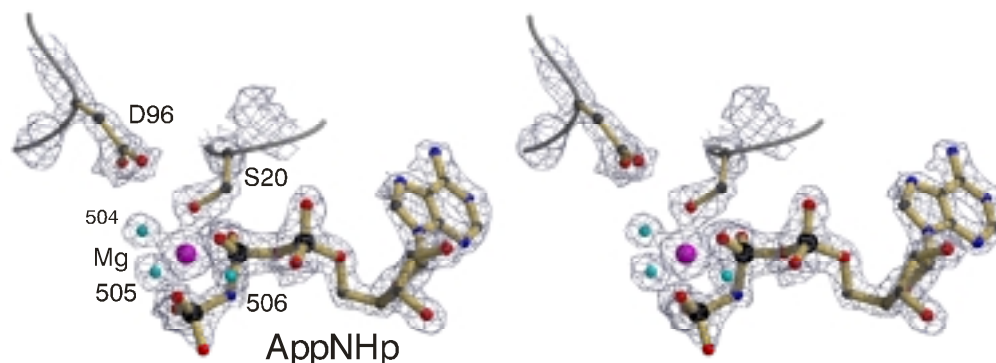


**Abb. 3.20:** Koordination des katalytischen Magnesiumions in der TMP-ADP-Struktur (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind ADP, die Seitenketten der Aminosäuren Asp96 und Ser20, sowie das Magnesiumion (pink) und die an der Koordination beteiligten Wassermoleküle (cyan) 504, 505, 506 und 507. Für ADP und die Aminosäuren sind O-Atome in rot, C-Atome in grau, P-Atome in schwarz und N-Atome in blau dargestellt. Überlagert ist die den entsprechenden Resten zugrunde liegende Elektronendichtekarte (SigmaA gewichtete  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ) konturiert bei  $1.5 \sigma$ .

In der TMP-ADP-Struktur gibt es ein weiteres Magnesiumion, das auch in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist. Da die Elektronendichte dieses Magnesiumions jedoch sehr schwach ist, der B-Faktor des Ions, sowie die der an der Koordination beteiligten Wassermoleküle, im Vergleich zu dem katalytischen Magnesiumion 2.5mal so hoch sind und dieses die einzige Struktur ist (auch in allen anderen Diphosphatstrukturen gibt es keine Elektronendichte für dieses Mg-Ion, siehe folgende Kapitel), in der dieses Ion beobachtet wird, ist es für die Funktion der TMPK vermutlich unwichtig und ein kristallographischer Artefact. Durch seine Anwesenheit bewirkt es jedoch, daß die Seitenkette des Glu149 in dieser Struktur eine andere Konformation einnimmt, als in allen anderen Strukturen.

Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und dem ATP-Analogon AppNHp verdeutlicht die Funktion des katalytischen Magnesiumions. Die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp verdrängt das Wassermolekül 507, daß in der TMP-ADP-Struktur an der Koordination des Magnesiumions beteiligt ist. In diesem Komplex sind daher neben den verbleibenden Wassermolekülen 504, 505 und 506 und der

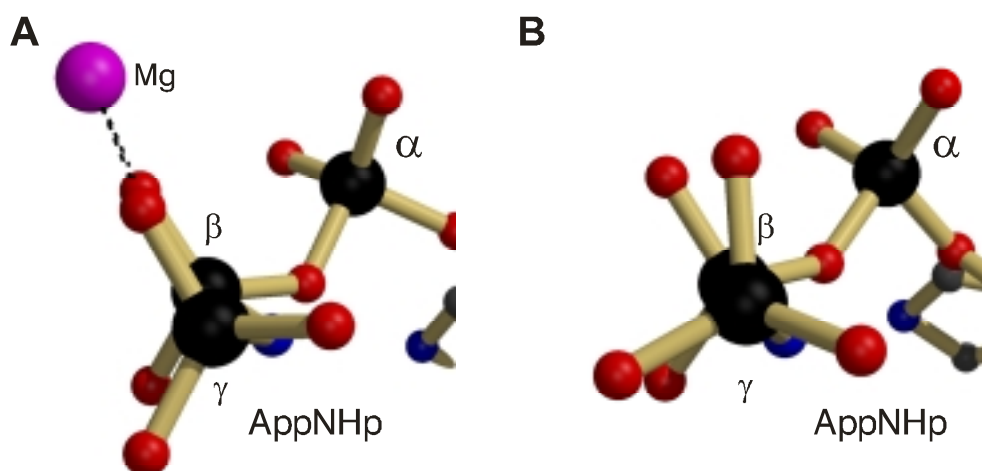
Hydroxylgruppe des konservierten Ser20 aus dem P-loop jeweils ein O-Atom der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen von AppNHp an der Koordination beteiligt (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Koordination des katalytischen Magnesiumions in der TMP-AppNHp-Struktur (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind AppNHp, die Seitenketten der Aminosäuren Asp96 und Ser20, sowie das Magnesiumion (pink) und die an der Koordination beteiligten Wassermoleküle (cyan) 504, 505 und 506. Für AppNHp und die Aminosäuren sind O-Atome in rot, C-Atome in grau, P-Atome in schwarz und N-Atome in blau dargestellt. Überlagert ist die den entsprechenden Resten zugrunde liegende Elektronendichtekarte (SigmaA gewichtete  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ) konturiert bei  $1.5 \sigma$ .

Die Wechselwirkungen zwischen dem Magnesiumion und den Sauerstoffatomen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen haben wichtige Funktionen für die Phosphoryltransferreaktion. Erstens werden negative Ladungen dieser Sauerstoffatome abgeschirmt, so daß die Abstoßung zwischen dem angreifenden O-Atom von TMP und den Sauerstoffatomen der zu transferierenden Phosphorylgruppe minimiert wird. Gleichzeitig wird der Übergangszustand während der Reaktion durch die Ladungsabschirmung stabilisiert. Zweitens wird die P-O-Bindung zwischen dem Sauerstoff- und Phosphoratom der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe durch die Wechselwirkung des O-Atoms zu dem Magnesiumion stärker polarisiert, so daß das Phosphoratom partiell positiv geladen wird. Dadurch wird ein nukleophiler Angriff begünstigt und die Aktivierungsenergie für die Reaktion reduziert. Drittens werden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen durch die Wechselwirkung zu dem Magnesiumion so orientiert, daß die Sauerstoffatome der beiden Gruppen in einer ekliptischen (auf Deckung stehende) Konformation stabilisiert werden (Abb. 3.22A). Im Gegensatz dazu sind in der bekannten Struktur der AMPK im Komplex mit AMP und AppNHp ohne Magnesiumion die  $\beta$ - und  $\gamma$ -

Phosphorylgruppen von AppNHp in der normalerweise (wenn keine anderen Faktoren zu der Stabilisierung einer anderen Konformation beitragen) energieärmeren gauche Konformation (Abb. 3.22B) angeordnet. Die ekliptische Konformation in Anwesenheit eines Magnesiumions bewirkt eine maximale Abstoßung der nicht an das Magnesiumion gebundenen Sauerstoffatome der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen des ATP-Analogons bzw. von ATP. Dieses kann zu einer Lockerung der Bindung zwischen dem Brückenatom zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen und dem  $\gamma$ -Phosphoratom in ATP führen und stärkt damit die Funktion dieses O-Atoms als Abgangsgruppe während der Phosphoryltransferreaktion.

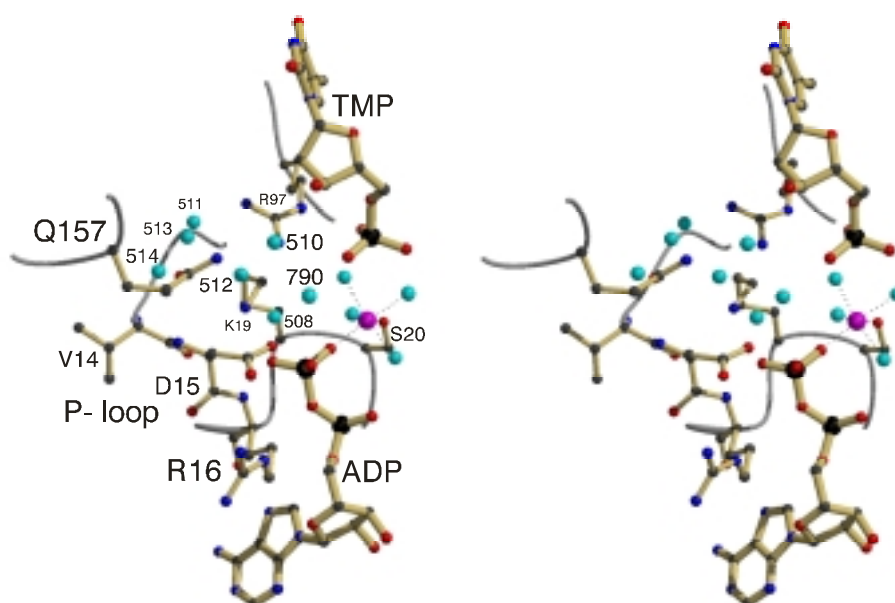


**Abb. 3.22:** Positionierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen des Phosphoryldonors durch das Magnesiumion. A) Blick von dem  $\gamma$ - auf das  $\beta$ -Phosphat von AppNHp (O-Atome sind in rot, N-Atome in blau und P-Atome in schwarz dargestellt) in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP, AppNHp und dem katalytischen Magnesiumion (pink). Jeweils ein O-Atom der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen von AppNHp interagiert mit dem gebundenen Magnesiumion (gestrichelte Linien). Dadurch werden die O-Atome der beiden Phosphorylgruppen in einer ekliptischen Konformation stabilisiert. B) Blick von dem  $\gamma$ - auf das  $\beta$ -Phosphat von AppNHp (gleiche Colorierung) in der Struktur der AMPK im Komplex mit AMP und AppNHp ohne Magnesiumion. Ohne Magnesiumion stehen die O-Atome der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Phosphate in einer gauche Konformation.

Darüber hinaus macht das Wassermolekül 505, das an der Koordination des Magnesiumions beteiligt ist auch eine Wechselwirkung zu einem Sauerstoffatom des Phosphorylakzeptors und trägt damit zu der Positionierung dieser Gruppe bei. Zu der Positionierung des Magnesiumions trägt wesentlich das hochkonservierte Asp96 aus dem DR(Y/H)-Motiv durch Wechselwirkungen zu Wasser 504 und Ser20 bei (Abb. 3.20 und 3.21).

### 3.2.8 Die TMP-ADP-Struktur – Stabilisation der P-loop offenen Konformation durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen

Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP zeigt innerhalb der global geschlossenen Protein Konformation die P-loop offene Konformation (siehe Abb. 3.17). Diese Konformation scheint durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert zu sein, das von sieben Wassermolekülen, die zwischen dem P-loop und dem Monophosphat lokalisiert sind, aufgebaut ist (Abb. 3.23).



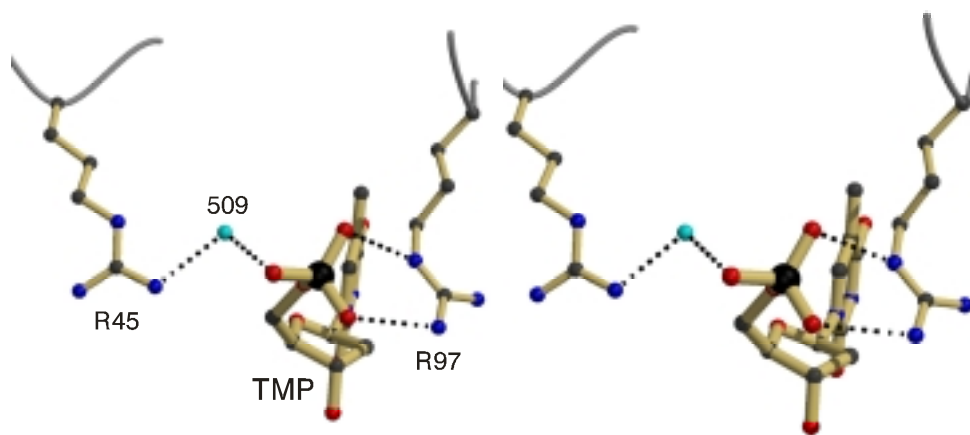
**Abb. 3.23:** Stereobild der P-loop offenen Konformation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP. Dargestellt ist das aktive Zentrum mit beiden Nucleotiden, den Seitenketten der Aminosäuren Lys19, Ser20, Gln157 und Arg97 und den Aminosäuren Val14, Asp15 und Arg16 als *ball and stick* Präsentation (C-Atome sind in schwarz, N-Atome in blau, O-Atome in rot und P-Atome als große schwarze Kugeln dargestellt). Die das Magnesiumion (pink) koordinierenden Liganden sind durch dünne gestrichelte Linien mit dem Magnesiumion verbunden. Deutlich zu sehen sind sieben Wassermoleküle (cyan), die die P-loop offene Konformation stabilisierenden.

Die 3'-Hydroxylgruppe der TMP-Ribose macht eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem dieser Wassermoleküle (Wasser 510), das weitere Wechselwirkungen zu zwei anderen Wassermolekülen (512 und 790) macht. Diese interagieren ihrerseits wiederum mit den Aminosäuren Arg97 und Gln157 (beides sind hoch konservierte Reste). Das Wasser 512 verbindet das Wasser 508, daß zusammen mit Wasser 507 als Platzhalter



für ein  $\gamma$ -Phosphat dient und das Wasser 510, daß die Wechselwirkung zu der 3'-Hydroxylgruppe von TMP macht. Weitere Wassermoleküle (511, 513 und 514) sind zwischen dem P-loop und TMP positioniert und sind durch Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zum P-loop, als auch zu Arg97 stark gebunden (niedrige B-Faktoren und sehr gute Elektronendichte). Das für die katalytische Aktivität der menschlichen TMPK scheinbar entscheidende Asp15 aus dem P-loop (Mutationen zu Alanin, Glutamin und Glutamat reduzieren die Aktivität auf einen nicht meßbaren Wert, Brundiers et al., 1999) macht im Gegensatz zu der P-loop geschlossenen Konformation (siehe Kapitel 3.2.12) in der P-loop offenen Konformation keine Wechselwirkung mit der 3'-OH-Gruppe von TMP. Dieses ist bemerkenswert, da alle in dieser Arbeit untersuchten antiviralen Nucleotidanaloga an der 3'-Position modifiziert sind und die Aktivität der menschlichen TMPK in Abhängigkeit der Modifikation variiert (siehe folgenden Kapitel). Daher scheint eine Wechselwirkung zwischen Enzym (dem Asp15) und dem 3'-Substituenten des NMPs für die Phosphorylierungsaktivität der TMPK entscheidend zu sein. In der P-loop offenen Konformation beträgt jedoch der Abstand zwischen dem nächsten O-Atom des P-loop Aspartats und der Hydroxylgruppe der TMP-Ribose 6.8 Å. Alleine basierend auf dieser Beobachtung kann man die Hypothese aufstellen, daß die P-loop offene Konformation vermutlich keinen aktiven Zustand (interpretiert als der Zustand unmittelbar vor dem chemischen Schritt) repräsentiert, da sonst der Einfluß des 3'-Substituenten auf die Aktivität der menschlichen TMPK nicht so gravierend sein sollte.

Die Phosphatgruppe von TMP wird sowohl durch zwei direkte Wechselwirkungen der Sauerstoffatome OP1 und OP2 zu der Guanidiniumgruppe von Arg97 (NH2 und NE), als auch einer indirekten Wechselwirkung zwischen OP3 und Arg45 (NH2) über das Wasser 509 positioniert (siehe Abb. 3.24). Zusätzlich macht jedes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe von TMP eine Wechselwirkung zu einem Wassermolekül, das an der Koordination des Magnesiumions beteiligt ist. In Hefe und *E. Coli* TMPK wird im Gegensatz dazu die Phosphatgruppe jeweils durch direkte Wechselwirkungen zu zwei Argininen (Arg41 und Arg94 bzw. Arg51 und Arg100) positioniert.



**Abb. 3.24:** Stereobild der Positionierung der TMP-Phosphorylgruppe in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP. Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind TMP, die Seitenketten der Arginine 45 und 97 (C-Atome sind in schwarz, O-Atome in rot, N-Atome in blau und das P-Atom als dicke schwarze Kugel dargestellt) und das Wassermolekül 509 (cyan). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte schwarze Linie dargestellt.

### 3.2.9 Die TMP-AppNHp-Struktur - die P-loop partiell-geschlossene Konformation

Für die Verfeinerung der TMP-AppNHp-Struktur wurde das Endmodell der TMP-ADP-Struktur mit beiden Nukleotiden (TMP und ADP) und allen Wassermolekülen verwendet. Die Verfeinerungsstrategie war im wesentlichen gleich zu der oben beschriebenen. Nach der ersten Runde der Verfeinerung mit XPLOR (*Rigid-body*-Verfeinerung, *simulated annealing* (Starttemperatur 3000 K), individuelle B-Faktor-Verfeinerung) wurde das resultierende Modell direkt mit einem REFMAC-Zyklus weiter verfeinert. Die visuelle Analyse der berechneten Elektronendichtekarten (sigmaA-gewichtete  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$  und sigmaA-gewichtete  $2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ ) zeigten deutliche Elektronendichte für ein  $\gamma$ -Phosphat. Da die Elektronendichte jedoch nicht so stark ist, wie die für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate, wurde die Besetzung der Phosphoryldonorbindungsstelle zu 2/3 mit AppNHp und zu 1/3 mit ADP bestimmt. Für die Konformation in der ADP modelliert ist, sind auch die Wassermoleküle 507 und 508 mit der gleichen Besetzung wie ADP in das Modell eingebaut. Die Beobachtung der Substratmischung auf der Phosphoryldonorbindungsstelle ist vermutlich auf einen nicht vollständigen Nukleotidaustausch zurückzuführen, da die verwendete Proteinlösung nicht vollständig nukleotidfrei war und noch ca. 25 % ADP enthielt. Denkbar ist jedoch auch, daß gebundenes AppNHp hydrolysiert ist, bevor die Kristalle eingefroren wurden. Eine HPLC-Analyse von aufgelösten Kristallen liefert jedoch nur Signale bei Retentionszeiten, die denen von ADP und AppNHp entsprechen. Da die Signale jedoch sehr nah an die

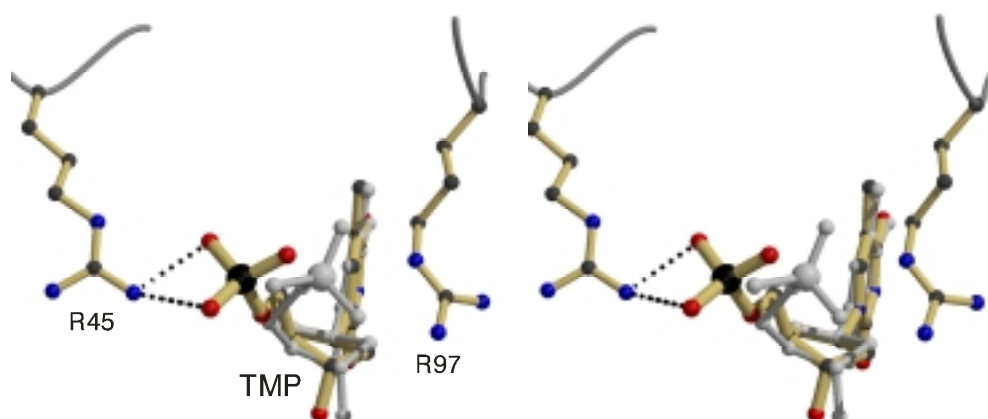
Empfindlichkeitsgrenze der HPLC gehen, kann die Anwesenheit von geringen Mengen ADP- $\beta$ -NH<sub>2</sub>, was man bei der Hydrolyse von AppNHp erwarten würde, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Elektronendichte für die Phosphorylgruppe des Monophosphates, sowie die des P-loops (Reste 14-16) und der LID-Region (Reste 136 – 141) ist von schlechter Qualität und definiert nicht eindeutig die zu bauende Konformation. Durch intensiven Gebrauch von *omit maps* (Elektronendichtekarten bei denen die entsprechenden Reste für die Verfeinerung von dem Modell ausgeschlossen wurden und demnach für die herausgenommenen Atome eine nahezu unbeeinflusste Elektronendichte zeigen) wurde während der weiteren Verfeinerung deutlich, daß sowohl die Phosphorylgruppe des Monophosphates, als auch die entsprechenden Bereiche des P-loops und der LID-Region in zwei Konformationen vorliegen. Eine Konformation (P-loop offen, modelliert mit einer Besetzung von 1/3) ist identisch zu der aus der Struktur der TMPK im Komplex mit TMP und ADP und wird gebundenem ADP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle zugeordnet. Die zweite Konformation zeigt die P-loop partiell-geschlossene Konformation (gemodelt mit einer Besetzung von 2/3). Im Vergleich zu der P-loop offenen sind in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation der gesamte P-loop und die LID-Region mit maximalen Bewegungen um 1.4 Å bei Val14 aus dem P-loop und 2.3 Å für Leu137 aus der LID-Region (jeweils am C $\alpha$ -Atom gemessen) in Richtung auf das Monophosphat verschoben (siehe Abb. 3.17). Da dieses Experiment mit verschiedenen Kristallisationsstrategien wiederholt wurde (ohne *microseeding* ist die Phosphoryldonorbindungsstelle jeweils zu 50 % mit ADP und AppNHp besetzt, mit *microseeding* zu 2/3 mit AppNHp und zu 1/3 mit ADP) erhält man den Beweis, daß die Besetzung der P-loop partiell-geschlossenen Konformation mit der Besetzung der Triphosphatbindungsstelle mit AppNHp korreliert. Daher wird die P-loop partiell-geschlossene Konformation der menschlichen TMPK dem Komplex bestehend aus TMP und AppNHp zugeordnet. Die hohe Auflösung von 1.75 Å und 1.6 Å beider Datensätze erlaubt und ermöglicht die Beobachtung mehrerer Konformationen und die relativ genaue Abschätzung der Besetzung der verschiedenen Konformationen (in Kapitel 3.4.4 wird dieses am Beispiel der d4TMP-ADP-Struktur gezeigt; höchste Auflösung mit 1.5 Å). Bei der Abschätzung der Besetzungen wurden auch die B-Faktoren der entsprechenden Atome berücksichtigt, so daß diese in beiden Konformationen relativ ähnlich sind.

Das bedeutet, daß durch die Anwesenheit des  $\gamma$ -Phosphates in AppNHp der P-loop in die geschlossene Konformation gebracht wird. Zusammen mit dem P-loop und der LID-Region verschiebt sich auch die Adenin-bindende Region (Aminosäuren 180-187) um

0.3 Å, gemessen am C $\alpha$ -Atom von Lys182, und der gesamte Phosphoryldonor mit dem gebundenen Magnesiumion um 0.2 Å in Richtung auf das Monophosphat. Diese Bewegungen liegen zwar im Bereich des Koordinatenfehlers, können jedoch als echte Bewegungen angesehen werden, da sich die Bewegung auf einen ganzen Bereich als starrer Körper ausdehnt und nicht auf einzelne Atome beschränkt ist.

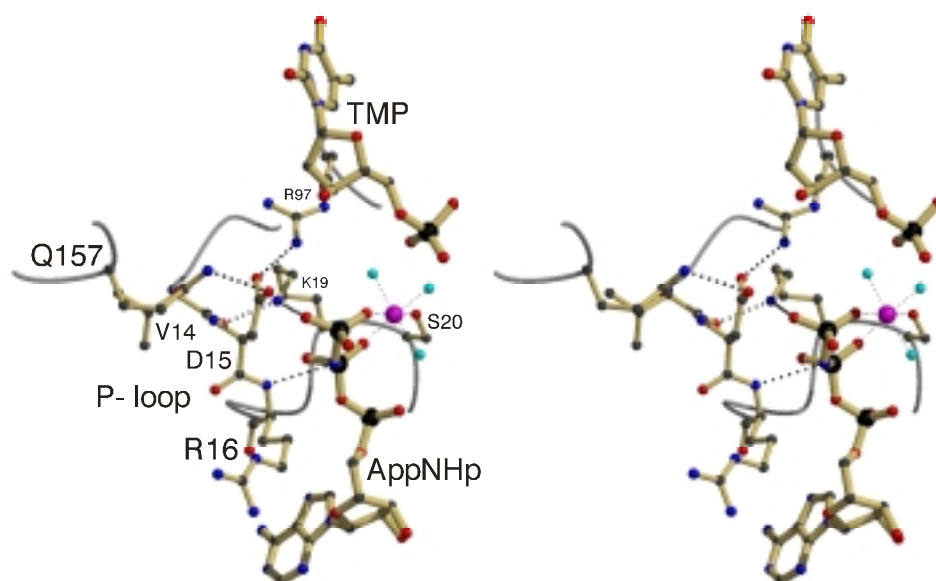
Auch die Positionierung der Phosphorylgruppe von TMP variiert in Abhängigkeit davon, ob ADP oder AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle gebunden ist. Daher wurden zwei TMP-Konformationen modelliert. Die eine Konformation (Besetzung 1/3) ist identisch zu der in dem Komplex mit TMP und ADP und entspricht der P-loop offenen Konformation mit ADP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle. In der anderen Konformation (Besetzung 2/3) ist das Monophosphat in einer verschobenen Position (2.2 Å zwischen den Phosphoratomen beider Konformationen) und korreliert mit der Besetzung von AppNHp. In dieser Position macht die Phosphorylgruppe von TMP keine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu Arg97, sondern zu NH<sub>2</sub> von Arg45 (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Stereobild der Positionierung der TMP-Phosphorylgruppe in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp. Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind TMP und die Seitenketten der Arginine 45 und 97 (C-Atome sind in schwarz, O-Atome in rot, N-Atome in blau und das P-Atom als dicke schwarze Kugel gezeigt). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte schwarze Linie dargestellt. Zum Vergleich ist in grau die TMP-Konformation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP überlagert.

Das bedeutet, daß diese Struktur der menschlichen TMPK zwei diskrete Zustände repräsentiert: Der Erste ist ein TMP und ADP gebundener Zustand in der P-loop offenen Konformation (Besetzung 1/3), ein identischer Zustand der für die TMP-ADP Struktur beobachtet wird. Der Zweite ist ein TMP-AppNHp gebundenen Zustand (Besetzung 2/3)

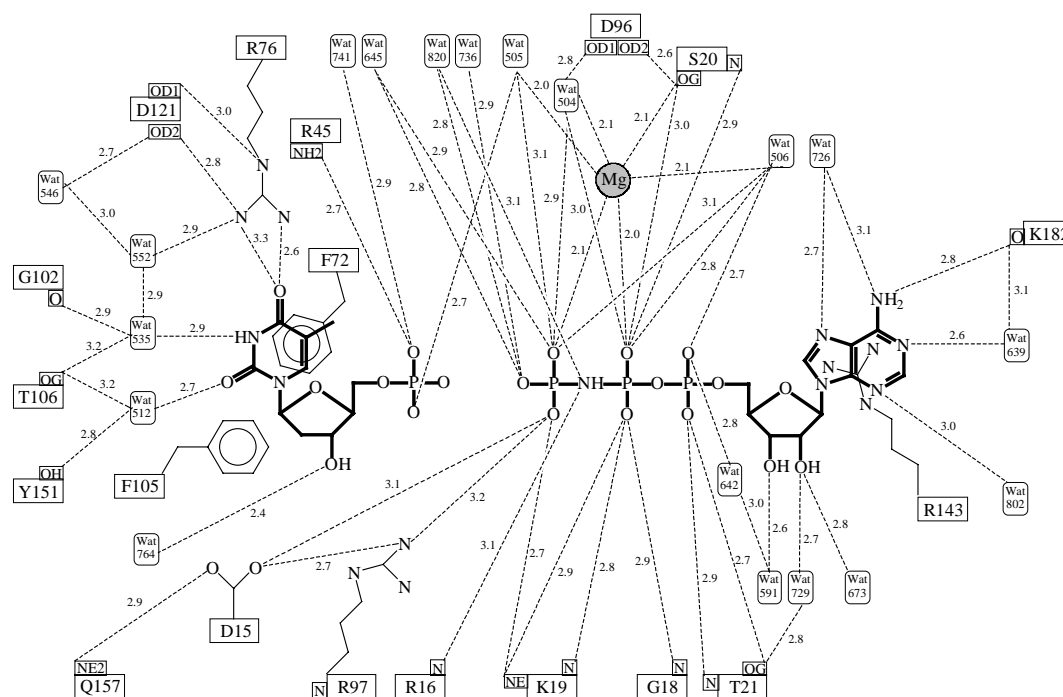
in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation mit der TMP-Phosphorylgruppe in der leicht verschobenen Konformation (Abb. 3.26).



**Abb. 3.26:** Stereobild der P-loop partiell-geschlossenen Konformation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp. Dargestellt ist das aktive Zentrum mit beiden Nucleotiden, den Seitenketten der Aminosäuren Lys19, Ser20, Gln157 und Arg97 und den Aminosäuren Val14, Asp15 und Arg16 als *ball and stick* Präsentation (C-Atome sind in schwarz, N-Atome in blau, O-Atome in rot und P-Atome als große schwarze Kugeln dargestellt). Die das Magnesiumion (pink) koordinierenden Liganden sind durch dünne gestrichelte Linien mit dem Magnesiumion verbunden. Im Gegensatz zu der P-loop offenen Konformation sind in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation (charakteristische H-Brücken sind mit dicken gestrichelten Linien gezeigt) keine Wassermoleküle zwischen dem P-loop und TMP positioniert. Die Asp15-Seitenkette ist der 3'-OH-Gruppe von TMP zugewandt und interagiert mit Glu157 und Arg97.

In Abb. 3.27 sind die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Substraten der menschlichen TMPK in dem TMP und AppNHp gebundenen Zustand in Form einer Abstandskarte dargestellt. Die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp ist so positioniert, daß die Atome O2G und O3G die Positionen der Wassermoleküle 507 und 508 aus der TMP-ADP-Struktur einnehmen. In dieser Position macht AppNHp über O3G der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe sowohl eine Wechselwirkung zu Arg97 (NH2, 3.2 Å) als auch zu Lys19 (NZ, 2.8 Å) aus dem P-loop. Zusätzlich zu diesen Wechselwirkungen ist die P-loop partiell-geschlossene Konformation durch weitere Wechselwirkungen stabilisiert, die in der P-loop offenen Konformation nicht beobachtet werden. Dazu gehören Wasserstoffbrückenbindungen zwischen a) dem hochkonservierten Lys19 und

der Rückgrat-Carbonylgruppe von Val14 des P-loop (2.6 Å im Vergleich zu 3.6 Å in der P-loop offenen Konformation), b) dem Amidstickstoff von Arginin 16 und der Imidogruppe zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten von AppNHp (3.1 Å im Vergleich zu 3.4 Å in der P-loop offenen Konformation), c) der Carboxylatgruppe von Asp15 und NH<sub>2</sub> von Arg97 (2.7 Å), d) der Carboxylatgruppe von Asp15 und Gln157 (2.9 Å) sowie e) dem Gln157 (OE1) und dem Amidstickstoffatom von Asp15 (3.2 Å). Die Wechselwirkungen der Asp15-Seitenkette sind darauf zurückzuführen, daß zusätzlich zu der Bewegung des gesamten P-loops auch die Seitenkette des Aspartats um 90° in Richtung auf das Monophosphat rotiert ist (Abb. 3.26). In dieser Proteinkonformation befinden sich keine Wassermoleküle zwischen dem P-loop und dem Monophosphat, wie es in der P-loop offenen Konformation beobachtet wird. Anstelle der direkten Wechselwirkung zwischen dem P-loop und der LID-Region in der P-loop offenen Konformation zwischen Val14 und der Carbonylgruppe von Leu133, ist diese Wechselwirkung in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation indirekt über ein Wassermolekül (Wasser 511).



**Abb. 3.27:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp-Mg<sup>2+</sup> und den Nukleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode und Wasser als Wat gekennzeichnet dargestellt. Ein eingekästetes N bedeutet, daß die Wechselwirkung über das Amid-N, ein eingekästetes O, daß die Wechselwirkung über die Rückgrat-Carbonylgruppe stattfindet. Andere eingekästeten Buchstaben geben das Atom der Seitenkette, über das die Wechselwirkung stattfindet, an.

### 3.2.10 Ist AppNHp ein gutes ATP-Analogon für die menschliche TMPK?

Eine stichhaltige Interpretation der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp im Hinblick auf den katalytischen Mechanismus der TMPK ist davon abhängig, ob AppNHp ein gutes ATP-Analogon für die menschliche TMPK ist oder nicht. Entscheidend dafür ist, ob die Substitution des Brücken-O-Atoms zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten durch die Imidogruppe notwendige Wechselwirkungen zum Protein verhindert oder nicht. Das Brücken-O-Atom in ATP hat zwei nicht-bindende Elektronenpaare, die als Protonenakzeptoren agieren können. Im Gegensatz dazu hat das entsprechende N-Atom in AppNHp nur ein nicht-bindendes Elektronenpaar und ein Proton, so daß es einmal als Protonenakzeptor und einmal als Protonendonator agieren kann. In der TMP-AppNHp-Struktur wird eine Wechselwirkung zwischen Enzym (Amidgruppe von Arg16) und der Imidogruppe von AppNHp beobachtet (3.1 Å), wobei die Imidogruppe als Protonenakzeptor fungiert. Eine analoge Wechselwirkung wird in allen das P-loop-Motiv enthaltenden Enzymen im triphosphatgebundenen Zustand beobachtet. Diese Wechselwirkung ist sehr wichtig für die Phosphoryltransferreaktion, da dadurch die während der Reaktion an diesem O-Atom entstehende negative Ladung stabilisiert wird (siehe Kapitel 3.2.14). Daher ist eine Korrelation zwischen der chemischen Struktur dieser Gruppe und der P-loop Konformation für den Mechanismus der TMPK sehr wichtig. Eine kürzlich durchgeführte Analyse des GTP-bindenden Proteins Ras im Komplex mit GTP und dem GTP-Analogon GppNHp zeigt, daß es zwischen beiden Strukturen keine signifikanten Unterschiede gibt, weder in der Position des P-loop noch in der Position der Nukleotide (Scheidig et al., 1999). Diese detaillierte Analyse führte zu dem Schluß, daß GppNHp für Ras ein gutes GTP-Analogon ist. Für AppNHp gibt es im Gegensatz dazu jedoch auch Systeme, in denen AppNHp kein gutes ATP-Analogon ist. Das am besten untersuchte Beispiel ist die Myosin ATPase. Es konnte gezeigt werden, daß AppNHp um mehrere Größenordnungen schlechter bindet als ATP und demnach nur einige Konsequenzen der Bindung von ATP in physiologischen und biochemischen Experimenten simulieren kann (Smith und Rayment, 1996). Jedoch lassen sich in diesem Fall die schlechten Eigenschaften von AppNHp auf die chemische Struktur von AppNHp zurückführen und erklären. In diesem System muß das Atom zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten (O in ATP, NH in AppNHp) neben der Wechselwirkung zu dem P-loop Rückgrat eine weitere Wechselwirkung zu einer Asparaginseitenkette ausbilden, so daß es 2mal als Protonenakzeptor agieren muß, was im Fall von AppNHp nicht

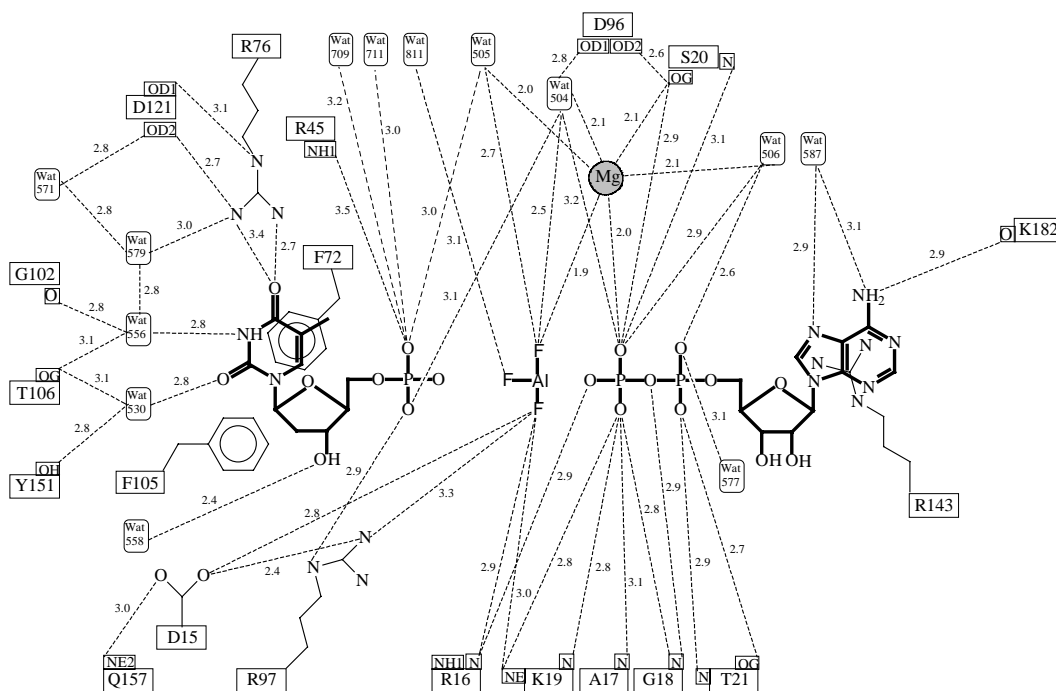
möglich ist. Eine analoge Wechselwirkung wird im Fall der menschlichen TMPK nicht beobachtet. Darüber hinaus ist die Affinität von AppNHp nur ca. um den Faktor 30 (persönliche Mitteilung von Dr. J. Reinstein) geringer als die von ATP, ähnlich, wie es auch für Ras mit GppNHp und GTP beobachtet wird. Da die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit NH<sub>2</sub>TMP und AppNHp die P-loop geschlossene Konformation zeigt (siehe Kapitel 3.3.6), kann die Überlegung ausgeschlossen werden, daß AppNHp die menschliche TMPK daran hindert, die P-loop geschlossene Konformation einzunehmen. Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppCH<sub>2</sub>p (diese Struktur wurde von Dr. A. Lavie gelöst; in AppCH<sub>2</sub>p ist das Brücken-O-Atom zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen durch eine Methylengruppe ersetzt) zeigt im Gegensatz dazu die P-loop offene Konformation. Dieses ist verständlich, da die Methylengruppe in AppCH<sub>2</sub>p im Gegensatz zu dem O-Atom in ATP oder der Imidogruppe in AppNHp nicht als Protonenakzeptor agieren kann, was für die P-loop partiell-geschlossene Konformation erforderlich ist. Basierend auf diese Überlegungen kann man AppNHp als gutes ATP-Analogon für die menschliche TMPK ansehen. Die beobachtete P-loop partiell-geschlossene Konformation der TMP-AppNHp-Struktur spiegelt vermutlich den wahren ATP-gebundenen Zustand wider und dieser Zustand scheint eine wichtige Rolle für den katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK zu spielen.

### 3.2.11 Die TMP-ADP-AIF<sub>3</sub>-Struktur

Auch bei der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP, ADP und AIF<sub>3</sub> liegt die P-loop partiell-geschlossene Protein Konformation vor, wobei im Vergleich zu der TMP-AppNHp-Struktur der P-loop geringfügig (maximale Bewegung 0.3 Å) weiter in Richtung auf das Monophosphat verschoben ist. Dieses ist bemerkenswert, da als Ausgangsmaterial für das *soaking* Experiment ein Kristall der TMPK im Komplex mit TMP und ADP in der P-loop offenen Konformation verwendet wurde. Das bedeutet, daß das Enzym auch im Kristall aktiv ist und Konformationsänderungen vollziehen kann. Die Position des ADPs ist identisch zu dem analogen Teil von AppNHp in der TMP-AppNHp-Struktur. Die Wechselwirkung zwischen OP5 von ADP – das Abgangssauerstoffatom während der Phosphoryltransferreaktion – und dem Amidstickstoff von Arg16 aus dem P-loop beträgt 2.9 Å. Der größte Unterschied zwischen dieser und der TMP-AppNHp-Struktur liegt in der Position der TMP-Phosphorylgruppe. Die TMP-Phosphorylgruppe in der TMP-ADP-AIF<sub>3</sub>-Struktur ist so plziert, daß das Sauerstoffatom OP3 eine 2.9 Å



Wechselwirkung zu NE von Arg97 macht und OP2 in einem Abstand von 3.5 Å zu NH2 von Arg45 lokalisiert ist. Das dritte Sauerstoffatom ist dem  $\text{AlF}_3$  zugerichtet und macht keine Wechselwirkungen zu der TMPK. In dieser Position ist es in einer optimalen Position für einen nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe (bzw.  $\text{AlF}_3$  in diesem Komplex) (siehe Abb. 3.34, S.96). Die zusätzliche Elektronendichte für  $\text{AlF}_3$  zwischen TMP und ADP ist nicht eindeutig (vermutlich aufgrund der geringen Affinität von  $\text{AlF}_3$ ) und machte daher das präzise Modellieren von  $\text{AlF}_3$  schwierig. Schließlich wurde in der letzten Runde der Verfeinerung  $\text{AlF}_3$  in die zurückbleibende positive, sigmaA-gewichtete  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte gebaut. In Abb. 3.28 ist eine Abstandskarte aller Kontakte zwischen TMPK und den Liganden TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  dargestellt.



**Abb. 3.28:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP, ADP-Mg<sup>2+</sup> und  $\text{AlF}_3$  und den Nucleotiden bzw.  $\text{AlF}_3$  mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode und Wasser als Wat gekennzeichnet dargestellt. Ein eingekästetes N bedeutet, daß die Wechselwirkung über das Amid-N, ein eingekästetes O, daß die Wechselwirkung über die Rückgrat-Carbonylgruppe stattfindet. Andere eingekästete Buchstaben geben das Atom der Seitenkette, über das die Wechselwirkung stattfindet, an.

Da die Elektronendichte für die Wassermoleküle, die an der Koordination des Magnesiumions beteiligt sind, bei dieser Auflösung (2.0 Å) nicht so gut ist, wie in allen

anderen Strukturen, wurden die Bindungsabstände zwischen dem Magnesiumion und allen sechs Liganden fixiert. Aufgrund der nicht eindeutigen Elektronendichte für  $\text{AlF}_3$ , kann die Position dieses Moleküls nur als Anhaltspunkt benutzt werden. In dieser Position beträgt der Abstand zwischen dem attackierenden Sauerstoffatom der TMP-Phosphorylgruppe und dem Aluminiumatom von  $\text{AlF}_3$  2.6 Å und der des abgehenden Sauerstoffatoms von ADP zu dem Aluminiumatom des  $\text{AlF}_3$  2.2 Å. Ein Fluoratom ist Ligand des Magnesiumions und ist durch eine fixierte 2.0 Å Bindung an das Magnesiumion gebunden. Das zweite Fluoratom macht Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu Lys19 (3.0 Å) als auch zu Arg97 (3.3 Å). Im Gegensatz dazu macht das dritte Fluoratom keine Wechselwirkungen zur TMPK.

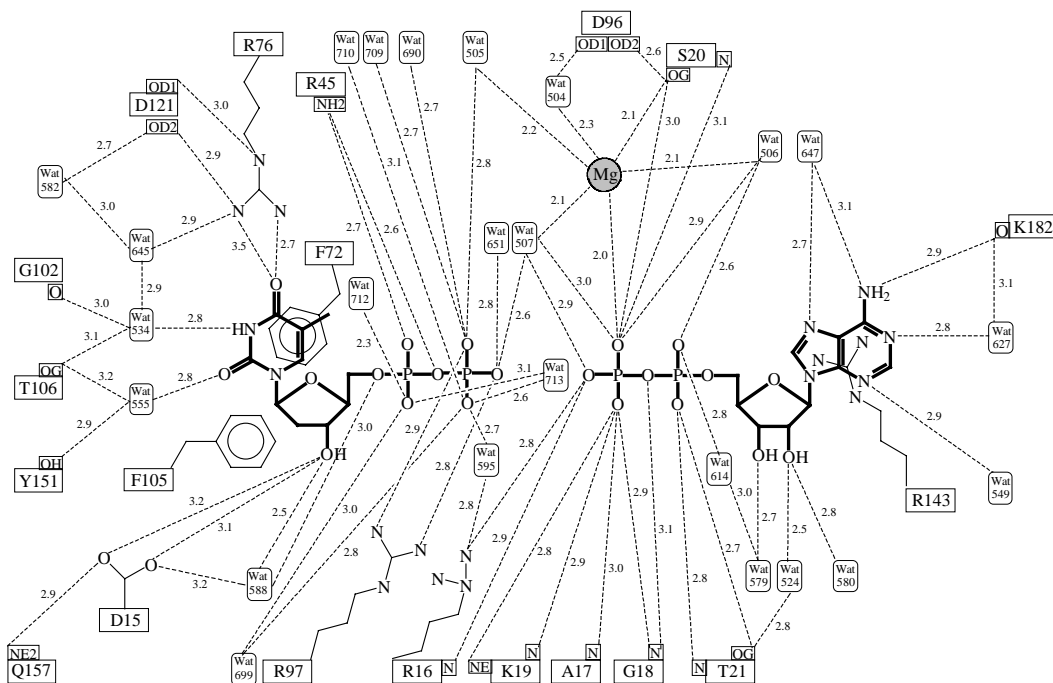
Bei einer alternativen Interpretation der Elektronendichte für das  $\text{AlF}_3$ -Molekül kann man das  $\text{AlF}_3$  als mimik der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP interpretieren, so daß die Koordination des Al-Atoms tetraedrisch ist, wobei ein O-Atom des  $\beta$ -Phosphates von ADP als vierter Ligand dient. Bei dieser Interpretation würde die Struktur nicht den Übergangszustand repräsentieren, sondern eher den Michaelis-Komplex, der als Zustand unmittelbar vor der chemischen Reaktion definiert ist (d. h. für die Phosphorylgruppenübertragung müssen keine weiteren Konformationsänderungen vollzogen werden). Bei der Interpretation dieser Struktur sollte man berücksichtigen, daß die Elektronendichte für das  $\text{AlF}_3$ -Molekül möglicherweise verschiedene Zustände während der Phosphorylgruppenübertragung gleichzeitig widerspiegelt, auch wenn in dem Modell nur eine Konformation wiedergegeben ist.

Im Gegensatz zu der nicht eindeutig bestimmbarer Position des  $\text{AlF}_3$ -Moleküls werden die Positionen der Nukleotide und die des P-loops eindeutig durch die Elektronendichte definiert. Der Abstand zwischen dem nukleophil angreifenden Sauerstoffatom von TMP und dem des abgehenden Sauerstoffatoms von ADP beträgt 4.8 Å. Auch wenn die Position des  $\text{AlF}_3$ -Moleküls nicht eindeutig ist, spiegelt diese Struktur sowohl von der Nukleotid als auch der Proteinseite her einen aktiven, dem Übergangszustand ähnlichen Zustand wider.

### 3.2.12 Die TDP-ADP-Struktur

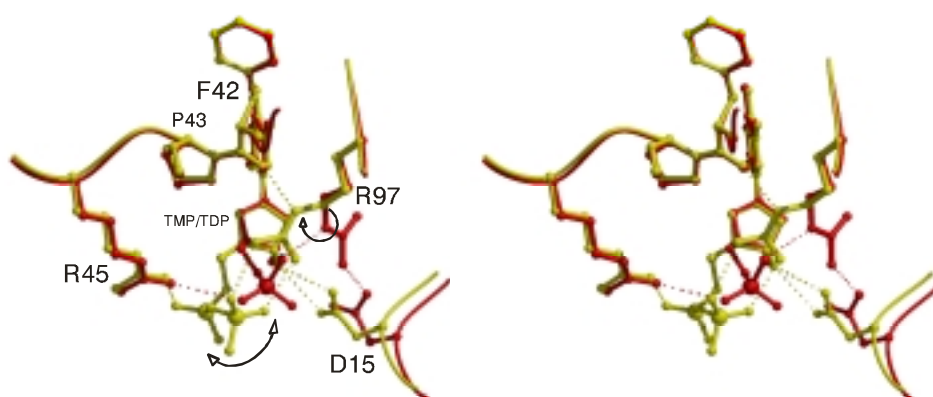
Da die Kristallisation des TDP-ADP-Komplexes ausgehend von den Substraten TMP und ATP erfolgte, erwartet man in dieser Struktur der menschlichen TMPK eine Mischung von vier Nukleotiden (TMP und TDP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP und ATP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle) unter der Voraussetzung, daß

die substrat- bzw. produktgebundenen Zustände energetisch gleich sind. Auf der Phosphoryldonorbindungsstelle wird jedoch keine Elektronendichte für eine  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP beobachtet, so daß die Phosphoryldonorbindungsstelle zu 100 % mit ADP besetzt ist. Auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle wird hauptsächlich Elektronendichte für TDP (gemodelt mit einer Besetzung von 2/3; TMP wird mit einer Besetzung von 1/3 modelliert) beobachtet. Die Unterscheidung der beiden Zustände ist relativ einfach, da die Phosphatgruppen von TMP bzw. TDP unterschiedlich positioniert sind (die  $\alpha$ -Phosphatgruppe von TDP ist 3.8 Å im Vergleich zu der TMP-Phosphorylgruppe verschoben). In diesem Komplex liegt das Protein in der P-loop geschlossenen Konformation vor. Im Vergleich zu der P-loop offenen bzw. P-loop partiell-geschlossenen Konformation ist der P-loop um 2.1 Å bzw. 1.1 Å (gemessen an den C $\alpha$ -Atomen von Asp15) in Richtung auf das TDP verschoben (siehe Abb. 3.17, S. 64). Zusammen mit dem P-loop ist auch das ADP mit dem gebundenen Magnesiumion um 0.5 Å in Richtung auf das TDP verschoben, so daß der Abstand zwischen dem Amidstickstoffatom von Arg16 und dem Abgangssauerstoffatom von ADP bei 2.9 Å bleibt (analog zu dem TMP-ADP-AlF<sub>3</sub>-Komplex). In Abb. 3.29 ist eine Abstandskarte der Kontakte der menschlichen TMPK im Komplex mit TDP und ADP zu den Nukleotiden TDP und ADP dargestellt.



**Abb. 3.29:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit TDP und ADP-Mg<sup>2+</sup> und den Nukleotiden mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. Die Beschriftung ist gleich zu denen der anderen Abstandskarten (siehe Abb. 3.27 oder Abb. 3.28).

Im Vergleich zu den Komplexen der TMPK mit TMP und AppNHp oder TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  ist die Carboxylatgruppe des Asp15 in dieser P-loop Konformation um  $30^\circ$  gedreht und in einer Position, in der eine zweizählige Wechselwirkung zu der 3'-OH-Gruppe von TDP beobachtet wird. Die auffälligste Konformationsänderung zwischen diesem Komplex im Vergleich zu den zuvor beschriebenen ist eine Rotation der Seitenkette des Arg97 um  $90^\circ$  um die Bindung zwischen den Atome CG und CD zusammen mit einer Bewegung der Phosphatgruppen von TDP (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30:** Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP-ADP- $\text{AlF}_3$  (rot) und TDP-ADP (gel) (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind TMP/TDP, die Seitenketten der Aminosäuren Asp15, Arg45 und Arg97, sowie die Aminosäuren Phe42 und Pro43. Deutlich zu sehen ist die Rotation der Arg97-Seitenkette, der Asp15 Seitenkette, sowie die Verschiebung der Phosphatgruppen und des P-loops in der TDP-Struktur. Charakteristische Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Strukturen sind in den entsprechenden Farben als gestrichelte Linien dargestellt.

In dieser Konformation ist kein Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphates von TDP (der übertragenen Phosphorylgruppe) an das Magnesiumion gebunden. Die Rotation der Seitenkette des Arg97 hat jedoch keinen Einfluß auf die Konformation der Hauptkette, so daß auch in diesem Komplex die  $\phi/\psi$ -Winkel von Arg97 im nicht erlaubten Bereich des Ramachandran Diagramms liegen. Da die gespannte Konformation von Arg97 in allen Strukturen, in denen beide Substrate gebunden sind, beobachtet wird, ist diese Rückgratkonformation vermutlich nicht nur für die Katalyse, sondern auch für die Produktfreisetzung wichtig. In der TDP-ADP gebundenen Konformation macht Arg97 über NE eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Carbonylgruppe von Phe42. Die Carbonylgruppe von Phe42 ist in dieser Position fixiert, da die folgende Aminosäure ein

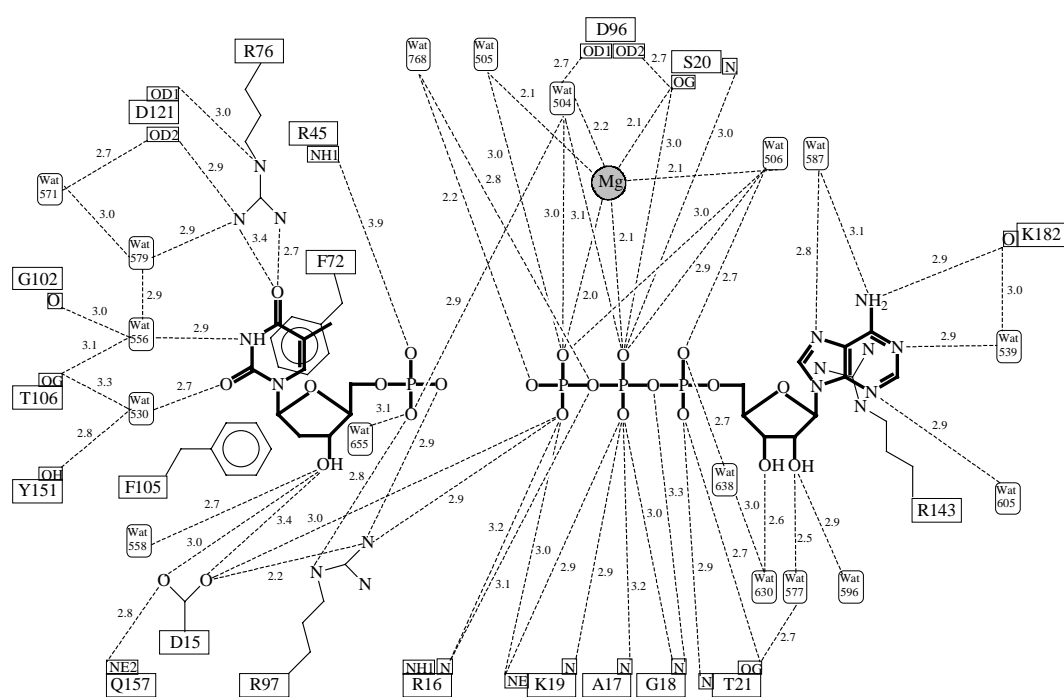
hoch konserviertes cis-Prolin (Pro43) ist. Diese Wechselwirkung erklärt, warum dieses hoch konservierte Prolin in der cis-Konformation vorliegt. Gleichzeitig sind die Phosphorylgruppen des TDP in einer verschobenen Konformation, so daß das Arg97 mit NH1 und NH2 der Guanidiniumgruppe zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu dem  $\beta$ -Phosphat von TDP macht (zu den Sauerstoffatomen OP3 (2.9 Å) und OP4 (2.8 Å)). In der Position, in der die Seitenkette des Arg97 in den anderen Komplexen positioniert ist, sind in dieser Struktur zwei Wassermoleküle lokalisiert, die durch Wechselwirkungen zu dem P-loop zu der Stabilisation dieser Konformation beitragen und als Platzhalter für das Arg97 dienen.

### 3.2.13 Die Tp5A-Struktur

Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A zeigt die P-loop geschlossene Konformation. Eine Überlagerung des verfeinerten Modells mit den zuvor beschriebenen Strukturen zeigt, daß die Proteinkonformation sehr ähnlich zu der des Komplexes der TMPK mit TDP und ADP ist. Lediglich die Seitenkette des Arg97 ist nicht in der rotierten Konformation, sondern bleibt in der gleichen Konformation, die auch in den TMP-AppNHp und TMP-ADP-AIF<sub>3</sub>-Strukturen beobachtet wird. Diese Konformation der Arg97 Seitenkette kann auf die kovalente Phosphatkette zwischen Thymin und Adenin in Tp5A zurückgeführt werden, da diese eine solche Rotation mit der gleichzeitigen Verschiebung der Phosphatpositionen auf der TMP-Seite nicht zuläßt. In der beobachteten Konformation beträgt der Abstand zwischen OD1 von Asp15 zu NH2 von Arg97 2.2 Å und zu O2G des mittleren Phosphates von Tp5A 3.0 Å. Der zuletzt genannte Abstand zwischen den beiden negativ geladenen Resten Asp15 und dem Sauerstoffatom der mittleren Phosphorylgruppe von Tp5A läßt sich dadurch erklären, daß O2G gleichzeitig auch Wechselwirkungen zu Lys19 (NZ, 3.0 Å) und Arg97 (NH2, 2.9 Å) macht, so daß eine negative Ladung an diesem Atom gut abgeschirmt wird.

Sowohl die Elektronendichte für die erste Phosphatgruppe ausgehend von der Thyminseite als auch die des mittleren Phosphates in Tp5A ist von schlechter Qualität (diese beiden modellierten Phosphatgruppen haben doppelt so hohe B-Faktoren, wie die anderen) und für die zweite Phosphorylgruppe ausgehend von der Thyminseite ist keine Elektronendichte zu beobachten. Daher wurde die zuletzt genannte Phosphorylgruppe aus dem Modell für Tp5A ausgeschlossen. Vermutlich ist dieses darauf zurückzuführen, das Tp5A etwas zu groß für die Nukleotidbindungstasche der TMPK ist und daher die Phosphatgruppen in Tp5A, die die wenigsten Wechselwirkungen zu TMPK machen,

flexibel sind und keine geordnete Struktur einnehmen. Daß Tp5A in diesem Komplex gebunden ist, wird durch die folgenden drei Gründe bewiesen: Erstens liegt die TMPK in der P-loop geschlossenen Konformation vor (in Gegenwart von TMP und ADP wäre es die P-loop offene Konformation), zweitens beträgt der  $K_d$ -Wert von menschlicher TMPK und Tp5A 62 nM, was unter den für die Kristallisation verwendeten Konzentrationen die Bildung eines stöchiometrischen Komplexes erlauben sollte und drittens zeigte eine HPLC-Analyse von aufgelösten Kristallen eindeutig die Anwesenheit von TP5A. Zur Vollständigkeit ist in Abb. 3.31 auch von dieser Struktur eine Abstandskarte von allen Kontakten zwischen TMPK und Tp5A (gemodelt als TMP und ATP) abgebildet.



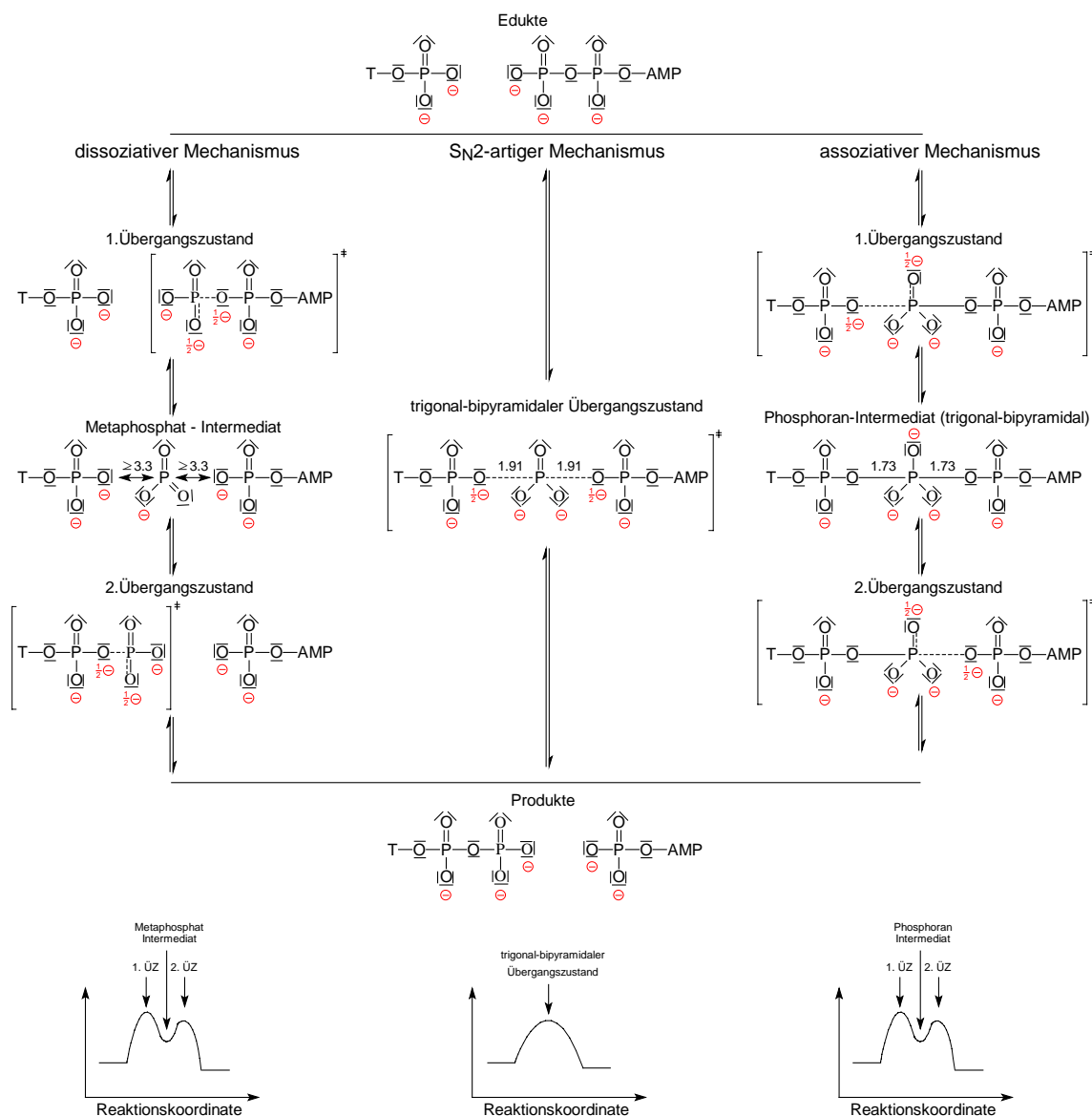
**Abb. 3.31:** Abstandskarte aller Kontakte zwischen der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A- $Mg^{2+}$  und dem Inhibitor mit einem Abstand von maximal 3.2 Å. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode und Wasser als Wat gekennzeichnet dargestellt. Ein eingekästetes N bedeutet, daß die Wechselwirkung über das Amid-N, ein eingekästetes O, daß die Wechselwirkung über die Rückgrat-Carbonylgruppe stattfindet. Andere eingekästete Buchstaben geben das Atom der Seitenkette, über das die Wechselwirkung stattfindet, an.

### 3.2.14 Phosphoryltransfermechanismen

Bevor die fünf Strukturen im Hinblick auf den katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK diskutiert werden, werden allgemein diskutierte Grenzfälle von enzymatisch katalysierten Phosphoryltransfermechanismen vorgestellt. Man unterscheidet generell zwei Extreme: Erstens einen vollständig assoziativen Mechanismus, in dem ein pentavalentes Phosphoran als Intermediat auftritt und zweitens einen vollständig dissoziativen Mechanismus, in dem ein hochreaktives trigonal planares Metaphosphat als Intermediat auftritt. Neben diesen beiden Extremen kann ein in der klassischen organischen Chemie weit verbreiteter  $S_N2$ -artiger Mechanismus, in dem ein trigonal bipyramidaler Übergangszustand ohne Intermediat auftritt, diskutiert werden. Die Unterscheidung dieser drei Extreme ist in Abb. 3.32 graphisch dargestellt. Insbesondere sind neben der Verteilung der negativen Ladungen während der Reaktion auch die Abstände der angreifenden und abgehenden Sauerstoffatome zu dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe vor, während und nach der Reaktion für die Klassifizierung eines Mechanismus von entscheidender Bedeutung.

Dissoziativer Phosphoryltransfermechanismus: Bei dem vollständig dissoziativen Mechanismus findet erst der Bindungsbruch zwischen dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe (die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP) und dem Sauerstoffatom der Abgangsgruppe (ADP) statt, bevor sich die neue Bindung zwischen dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe und dem Sauerstoffatom des angreifenden Nukleophils (z. B. TMP) bildet (Abb. 3.32, linke Spalte). Das bedeutet, daß zwei Übergangszustände (Übergangszustand 1: Bindungsbruch zwischen der Abgangsgruppe und der zu übertragenden Phosphorylgruppe zu einem instabilen Intermediat; Übergangszustand 2: Bindungsbildung zwischen dem angreifenden Nukleophil und dem reaktiven Intermediat) durchlaufen werden und dazwischen ein trigonal planares Methaphosphat als Intermediat auftritt. Betrachtet man die Abstände der angreifenden und abgehenden Sauerstoffatome zu dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe auf der Stufe des Intermediates während der katalytischen Reaktion, müssen diese mindestens so groß wie die Summe der Van-der-Waals-Radien der beteiligten Atome (1.9 Å für Phosphor und 1.4 Å für Sauerstoff) sein (Mildvan, 1997), damit keine Wechselwirkungen zwischen diesen stattfinden können. Das heißt, daß für einen vollständig dissoziativen Phosphoryltransfermechanismus die Abstände zwischen den angreifenden und abgehenden Sauerstoffatomen und dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe mindestens 3.3 Å betragen

müssen. Für die Annahme, daß sich während der Reaktion nur die zu übertragende Phosphorylgruppe bewegt, bedeutet das, daß der Abstand zwischen dem angreifenden und abgehenden Sauerstoffatom mindestens 6.6 Å betragen muß.



**Abb. 3.32:** Schematische Darstellung verschiedener Phosphoryltransfermechanismen am Beispiel der Phosphoryltransferreaktion von TMP und ATP zu TDP und ADP. In der linken Spalte ist ein dissoziativer, in der mittleren ein S<sub>N</sub>2-artiger und in der rechten ein vollständig assoziativer Phosphoryltransfermechanismus dargestellt. Für jeden Mechanismus ist ein qualitatives Energiediagramm als Funktion des Reaktionsfortschrittes unter der entsprechenden Spalte dargestellt.



Die formale Verteilung der negativen Ladungen während der Hinreaktion ist folgendermaßen. Während des ersten Übergangszustandes übernimmt das abgehende Sauerstoffatom formal eine halbe negative Ladung eines Sauerstoffatoms der zu übertragenden Phosphorylgruppe. Das angreifende Sauerstoffatom bleibt unverändert. Im Intermediatzustand ist das abgehende Sauerstoffatom formal einfach negativ geladen. Das trigonale Methaphosphat trägt im Gegensatz zu der gleichen Gruppe im Edukt eine negative Ladung weniger und ist einfach negativ geladen. Im zweiten Übergangszustand übernimmt das Methaphosphat eine halbe negative Ladung des attackierenden Sauerstoffatoms, um dann im Produkt die ganze negative Ladung zu übernehmen.

Für die enzymatische Katalyse bedeutet das, daß zu Beginn der Hinreaktion und im Intermediatzustand die entstehende negative Ladung des abgehenden Sauerstoffatoms stabilisiert werden muß. Das Intermediat selbst ist einfach negativ geladen, so daß in diesem Fall nicht viele basische Reste (Arginine, Lysine) für die Stabilisation der Reaktion notwendig sind. Zu viele Wechselwirkungen von basischen Seitenketten zu der zu übertragenden Phosphorylgruppe würden bei diesem Mechanismus nicht das Intermediat, sondern die Edukte bzw. Produkte stabilisieren, da in den Edukten bzw. Produkten die zu übertragende Phosphorylgruppe mehr Ladungen trägt als im Intermediatzustand.

Assoziativer Phosphoryltransfermechanismus: Bei dem vollständig assoziativen Mechanismus bildet sich erst eine kovalente Bindung zwischen dem angreifenden O-Atom des Nucleophils und dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe aus, bevor der Bindungsbruch zwischen dem Sauerstoffatom der Abgangsgruppe und dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe stattfindet (Abb. 3.32, rechte Spalte). Das bedeutet, daß auch bei diesem Mechanismus zwei Übergangszustände (Übergangszustand 1: Bindungsbildung zwischen dem angreifenden Nucleophil und der zu übertragenden Phosphorylgruppe; Übergangszustand 2: Bindungsbruch zwischen der Abgangsgruppe und dem reaktiven Intermediat zu den Produkten) durchlaufen werden und dazwischen ein reaktives, pentavalentes Phosphoran als Intermediat auftritt.

Für die Abstände der angreifenden und abgehenden O-Atome zu dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe auf der Stufe des Intermediates bedeutet das, daß beide kovalenten Bindungen vollständig ausgebildet sind und somit für beide Bindungen ein Abstand von 1.73 Å (Abstand einer P-O-Bindung) zwischen den beteiligten Atomen beobachtet werden sollte.

Die Verteilung der negativen Ladungen während der Reaktion läßt sich für die Hinreaktion formal folgendermaßen beschreiben. Im Übergangszustand 1 übernimmt die

zu übertragende Phosphorylgruppe formal eine halbe negative Ladung des angreifenden O-Atoms. Die Abgangsgruppe bleibt unverändert. Auf der Stufe des pentavalenten Intermediates übernimmt die zu übertragende Phosphorylgruppe formal die ganze negative Ladung des angreifenden O-Atoms und ist insgesamt dreifach negativ geladen. Im Übergangszustand 2 übernimmt das abgehende Sauerstoffatom der Abgangsgruppe formal eine halbe negative Ladung der im Intermediat dreifach geladenen zu übertragenden Phosphorylgruppe, um nach dem Bindungsbruch im Produkt diese Ladung ganz zu übernehmen.

Für die enzymatisch katalysierte Reaktion bedeutet das, daß die zu Beginn der Hinreaktion an der zu übertragenden Phosphorylgruppe entstehenden Ladungen stabilisiert werden müssen. Jedes der drei freien O-Atome dieser Gruppe ist im pentavalenten Intermediat formal negativ geladen, so daß für eine optimale Katalyse nach diesem Mechanismus viele basische Reste diese Ladungen abschirmen sollten. Die negative Ladung an der Abgangsgruppe entsteht erst im zweiten Übergangszustand, so daß sich hier erst während der Reaktion eine stabilisierende Gruppe des Proteins formieren muß.

S<sub>N</sub>2-artiger Phosphoryltransfermechanismus: Bei dem S<sub>N</sub>2-artigen Mechanismus findet der Bindungsbruch und die Bindungsbildung der abgehenden und angreifenden Sauerstoffatome zu dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe simultan statt (Abb. 3.32, mittlere Spalte). Es wird ein pentavalenter Übergangszustand, in dem der Bindungsgrad beider Bindungen 0.5 beträgt, durchlaufen. Im Gegensatz zu den beiden erst genannten Mechanismen existiert kein Intermediat.

Nach Pauling (1960) gibt folgende Formel den Zusammenhang zwischen dem Bindungsabstand und dem Bindungsgrad zweier Atome wieder:

$$D(n) = D(1) - 0.60 \log (n)$$

Dabei ist D(n) der Bindungsabstand zweier Atome, D(1) der Abstand einer kovalenten Bindung zwischen diesen beiden Atomen (für eine P-O-Bindung 1.73 Å) und (n) der Bindungsgrad bei einem Bindungsabstand D(n). Für eine halb ausgebildete P-O-Bindung (Bindungsordnung von 0.5, wie z. B. im Übergangszustand eines S<sub>N</sub>2-artigen Mechanismus) ergibt sich aus dieser Formel ein Bindungsabstand von 1.91 Å. Daher sollte für die Annahme, daß sich während der chemischen Reaktion nur die zu übertragende Phosphorylgruppe bewegt, der Abstand der angreifenden und abgehenden

Sauerstoffatome zu dem Phosphoratom der zu übertragenden Phosphorylgruppe im Übergangszustand jeweils 1.91 Å betragen. Das bedeutet, daß der Abstand zwischen dem angreifenden und abgehenden Sauerstoffatom 3.82 Å betragen sollte.

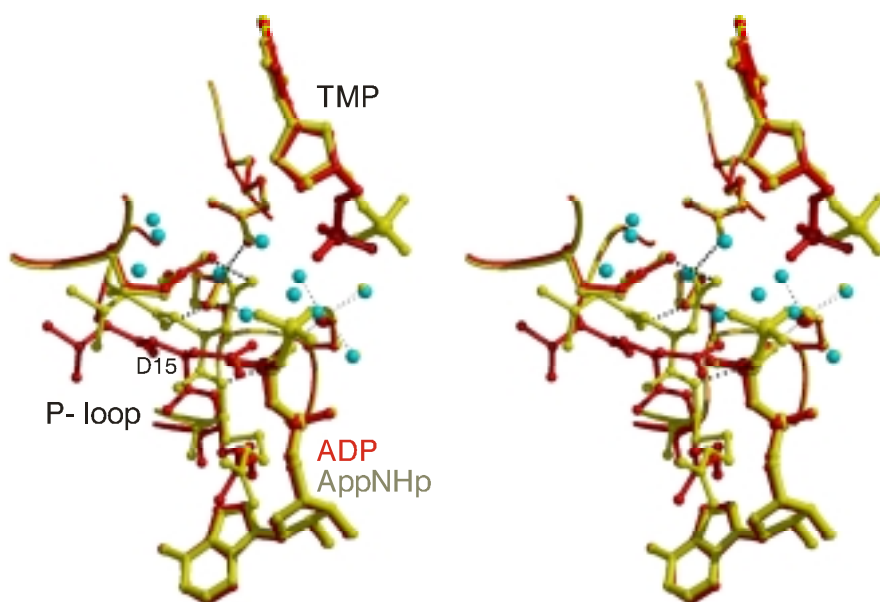
Die Verteilung der negativen Ladungen während der Hinreaktion verhält sich in einem  $S_N2$ -artigen Mechanismus folgendermaßen. An dem Ladungszustand der zu übertragende Phosphorylgruppe ändert sich formal während der Reaktion nichts. Sie ist während der gesamten Reaktion zweifach negativ geladen. Im Übergangszustand übernimmt das abgehende Sauerstoffatom der Abgangsgruppe formal eine halbe negative Ladung des angreifenden Sauerstoffatoms, die es anschließend ganz übernimmt. Für eine nach diesem Mechanismus enzymatisch katalysierte Reaktion bedeutet das, daß sich an der Stabilisation der beiden negativen Ladungen der zu übertragenden Phosphorylgruppe während der Reaktion nichts ändert. Wichtig ist jedoch, daß für die Stabilisation der an der Abgangsgruppe entstehenden negativen Ladungen ein Rest des Enzyms von Beginn der Reaktion an zur Verfügung steht.

### 3.2.15 Mechanistische Diskussion

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln sowohl die einzelnen Substratkomplexe als auch mögliche Phosphoryltransfermechanismen vorgestellt wurden, sollen in diesem Kapitel die Strukturen mit Blick auf den katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK diskutiert werden.

**Die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp induziert den Übergang von der P-loop offenen in eine aktive, P-loop partiell-geschlossene Konformation.** Aus der Überlagerung der beiden Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP bzw. TMP und AppNHp kann man die Gründe für das Schließen des P-loops in dem triphosphatgebundenen Zustand ableiten (Abb. 3.33). Die P-loop offene Konformation der TMPK im Komplex mit TMP und ADP wird durch das Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, aufgebaut aus sieben Wassermolekülen, die zwischen dem P-loop und TMP positioniert sind, stabilisiert. Bei der Bindung von AppNHp werden die Wassermoleküle 507 (Ligand des Magnesiumions) und 508 durch die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp verdrängt. Beide Wassermoleküle fungieren als Platzhalter für die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe in der TMP-ADP-Struktur. Gleichzeitig induziert die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe eine Rotation der Seitenkette des Asp15 in Richtung auf die 3'-OH-Gruppe der TMP-Ribose um ca. 90°. Der Abstand zwischen Asp15 und der TMP-

Hydroxylgruppe ist jedoch zu groß, damit sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen beiden Gruppen ausbilden kann.



**Abb. 3.33:** Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP (rot) bzw. TMP und AppNHp (gelb) (Stereobild). Als *ball and stick* Präsentation dargestellt sind die Nucleotide TMP und ADP/AppNHp, die Seitenketten der Aminosäuren Lys19, Ser20, Arg97, Gln157 und die Aminosäuren Val14, Asp15 und Arg16 (übersichtshalber sind nicht alle Reste beschriftet, siehe dazu auch Abb. 3.23 und 3.26). Deutlich zu sehen ist, daß die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp die Wassermoleküle 507 und 508 verdrängt und gleichzeitig die Rotation der Asp15 Seitenkette in Richtung auf das Monophosphat induziert. Durch die Rotation der Asp15 Seitenkette werden weitere Wassermoleküle, die an der Stabilisation der P-loop offenen Konformation beteiligt sind, verdrängt. Auch bewirkt die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp eine Konformationsänderung der TMP-Phosphorylgruppe.

Würde das Asp15 in der gleichen Position wie in der TMP-ADP-Struktur verbleiben, würde der Abstand zwischen Atom OD1 der Carboxylatseitenkette nur 2.9 Å bzw. 3.1 Å zu den Sauerstoffatomen O3G bzw. O1G von AppNHp betragen. Die Rotation der Aspartatseitenkette bewirkt ihrerseits die Verdrängung der Wassermoleküle 510, 512, 513, 514 und 790, die ebenfalls an der Stabilisation der P-loop offenen Konformation in der TMP-ADP-Struktur beteiligt sind. Die Wassermoleküle 510 und 512 der TMP-ADP-Struktur können als Platzhalter für die Asp15 Seitenkette angesehen werden. Das bedeutet, daß die Anwesenheit der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe in AppNHp die P-loop offene Konformation destabilisiert, da die Wassermoleküle, die an dem

Wasserstoffbrückennetzwerk, das die P-loop offene Konformation stabilisiert, verdrängt werden. Darüber hinaus wird die P-loop partiell-geschlossene Konformation durch neue Wechselwirkungen zwischen Asp15 und Arg97 bzw. Gln157 stabilisiert, die in der offenen Konformation nicht möglich sind.

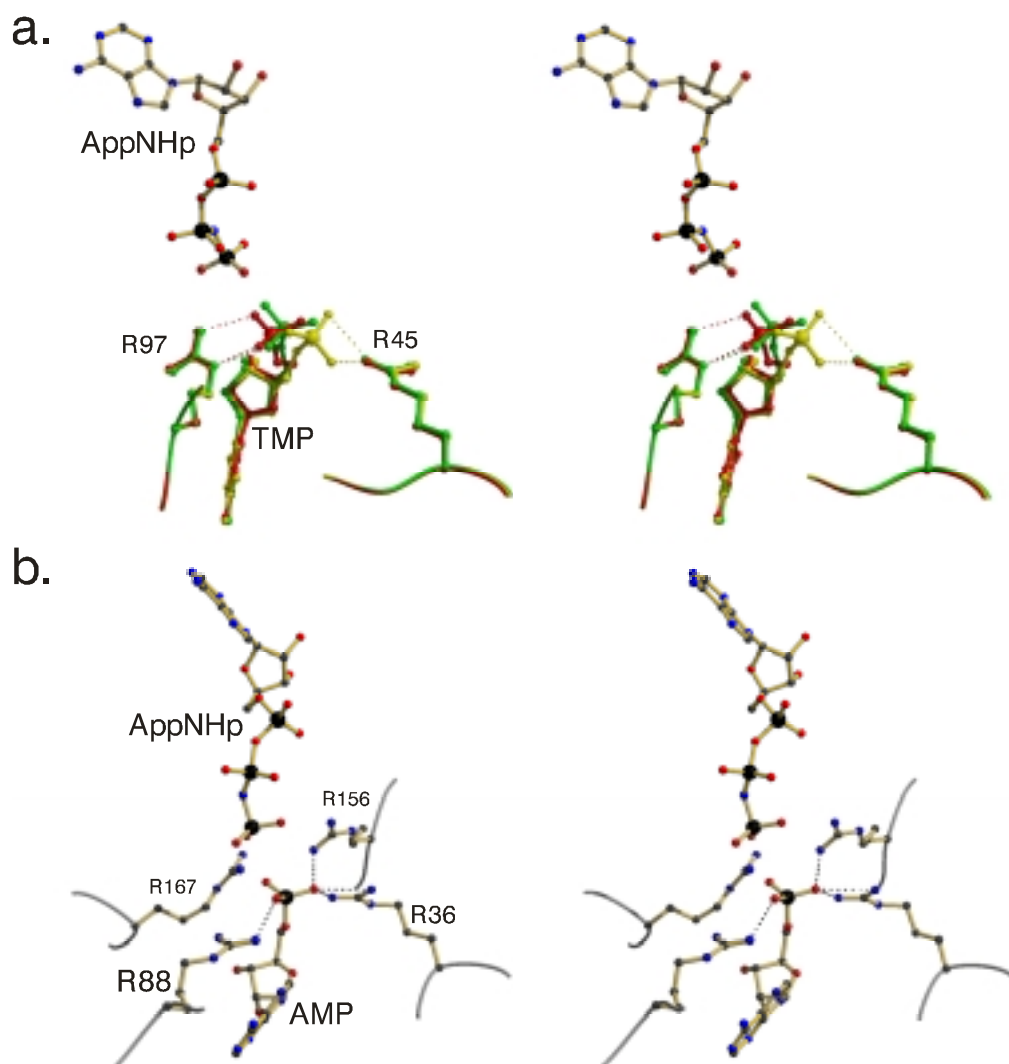
Interessanterweise ist das Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe von Asp15, das eine Wechselwirkung zu Arg97 macht, in einem 3.1 Å Abstand zu O3G der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp. Eine mögliche Interpretation dieses relativ kurzen Abstandes ist, daß die Seitenkette des Asp15 protoniert ist und zwischen beiden Gruppen eine Wasserstoffbrückenbindung vorliegt. Eine solche Interpretation könnte bedeuten, daß Asp15 durch eine Wechselwirkung zu der zu transferierenden Phosphorylgruppe direkt an der Katalyse beteiligt wäre und somit einen katalytischen Rest darstellt. Gegen die Protonierung der Carboxylatgruppe von Asp15 spricht jedoch die starke Wechselwirkung zu NH<sub>2</sub> von Arg97 (2.6 Å), die in den Komplexen mit TMP-ADP und AlF<sub>3</sub> bzw. Tp5A sogar noch stärker ausgeprägt ist. Die zusätzliche Wechselwirkung zwischen Asp15 und Gln157 kann als Unterstützung von Arg97 interpretiert werden, so daß das Asp15 in seiner Position auch ohne daß es protoniert ist, in der Nähe der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp gehalten wird. Da Asp15 für die Aktivität des Enzyms essentiell ist, sind vermutlich die Wechselwirkungen des Asp15 in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation entscheidend für den Phosphoryltransfermechanismus der menschlichen TMPK. Die Wechselwirkung zwischen Asp15 und NH<sub>2</sub> von Arg97 in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation ist nur möglich, da auch die TMP-Phosphorylgruppe bei der Bindung von AppNHp eine Konformationsänderung vollzieht und in der neuen Position nicht mehr mit NH<sub>2</sub> von Arg97 interagiert, so daß NH<sub>2</sub> von Arg97 als Protonendonator bei der Wechselwirkung mit Asp15 agieren kann. Das bedeutet, daß die durch die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp induzierte Rotation der Asp15-Seitenkette zusammen mit der Verschiebung der TMP-Phosphorylgruppe und dem Verdrängen der Wassermoleküle, die die P-loop offene Konformation stabilisieren, die Auslöser der komplexen Strukturänderung bei dem Austausch eines Di- gegen ein Triphosphat zu sein scheinen.

Aus den folgenden Gründen wird die P-loop partiell-geschlossene Proteinkonformation im Gegensatz zu der P-loop offenen Konformation als ein aktiver Zustand interpretiert. Erstens ist die kritische Wechselwirkung zwischen dem Amidstickstoff von Arg16 und der Imidogruppe zwischen den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphorylgruppen in AppNHp (bzw. dem entsprechenden O-Atom in ADP) in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation auf 3.1 Å im Vergleich zu 3.4 Å in der P-loop

offenen Konformation verkürzt. Diese Wechselwirkung ist wichtig für die Stabilisation der negativen Ladung an dem Abgangssauerstoffatom in ATP während der Phosphoryltransferreaktion (siehe Kapitel 3.2.14). In dem Komplex mit  $\text{AlF}_3$  (ebenfalls P-loop partiell-geschlossene Konformation) beträgt der Abstand sogar nur 2.9 Å. Eine analoge Wechselwirkung wird in allen Enzymen beobachtet, die das P-loop-Motiv enthalten und von denen eine Struktur im triphosphatgebundenen Zustand gelöst wurde. Zweitens macht nur in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation das für die Katalyse essentielle Asp15 Wechselwirkungen zu Arg97 und Gln157. Neben der Rolle für die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation scheint die Wechselwirkung zu Arg97 auch wichtig zu sein, das nukleophil angreifende Sauerstoffatom des Monophosphates während der Reaktion davor zu bewahren mit Arg97 zu interagieren, was eine Verminderung der Nukleophilie dieses Sauerstoffatoms zur Folge hätte und damit einen nukleophilen Angriff abschwächen würde. Eine solche Wechselwirkung wird dahingegen in der P-loop offenen Konformation beobachtet. Drittens wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der *in vitro* Phosphorylierungsgeschwindigkeit verschiedener NMPs und TMPK-Mutanten unter *steady-state* Bedingungen und der Fähigkeit der TMPK die P-loop partiell-geschlossene oder geschlossene Konformation einnehmen zu können, festgestellt (siehe auch die folgenden Kapitel). Viertens liegt auch in der Struktur mit TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  die P-loop partiell-geschlossene Konformation vor. Diese Struktur wird als Mimik des Übergangszustandes interpretiert und sollte demnach einen aktiven Zustand repräsentieren. Dieses gilt auch, wenn die  $\text{AlF}_3$ -Struktur aufgrund der nicht eindeutigen Position des  $\text{AlF}_3$ -Moleküls als Michaelis-Komplex interpretiert würde.

**Die  $\text{AlF}_3$ -Struktur zeigt eine aktive Konformation der menschliche TMPK und der Nukleotide.** Die Position des  $\text{AlF}_3$ -Moleküls in der quartären Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  ist nicht gut definiert, so daß man diese nur schwierig für die Interpretation der Struktur heranziehen kann. Im Gegensatz dazu sind die Positionen der TMPK und die der Nukleotide jedoch sehr gut definiert und zeigen einen Zustand, wie man ihn für einen Mechanismus mit assoziativen Charakter erwarten würde (Abb. 3.34). Der P-loop ist in der partiell-geschlossenen Konformation, so daß sich zwischen dem Abgangssauerstoffatom in ADP (das O-Atom, daß in Richtung auf das  $\text{AlF}_3$  gerichtet ist) und dem Rückgratamid von Arg16 eine 2.9 Å Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann. Diese Wechselwirkung ist wichtig für die Stabilisation der negativen Ladung, die während der Reaktion an diesem O-Atom von ATP/ADP entsteht (siehe Abb. 3.32). Im Gegensatz zu den Strukturen der menschlichen

TMPK im Komplex mit TMP-ADP und TMP-AppNHp scheint nur in der Struktur im Komplex mit TMP-ADP und  $\text{AlF}_3$  die TMP-Phosphorylgruppe in einer optimalen Position für einen nukleophilen Angriff auf die zu übertragende Phosphorylgruppe zu sein (Abb. 3.34a). Das die zu übertragende Phosphorylgruppe von ATP angreifende Sauerstoffatom des TMPs macht keine Wechselwirkung zur TMPK, so daß es frei ist für einen nukleophilen Angriff. Im Gegensatz dazu macht dieses Sauerstoffatom in der TMP-ADP Struktur eine Wechselwirkung zu Arg97, so daß in dieser Konformation die negative Ladung teilweise abgeschirmt wird. Als Folge dessen ist das Sauerstoffatom in diesem Fall ein schwächeres Nukleophil. Auch ist die TMP-Phosphorylgruppe in der TMP-AppNHp-Struktur nicht in einer guten Position für einen nukleophilen Angriff, da der Abstand zwischen dem O-Atom und dem Phosphoratom der zu transferierenden Phosphorylgruppe in dieser Konformation länger ist, als der analoge Abstand in der  $\text{AlF}_3$ -Konformation. Darüber hinaus kann nur in dieser TMP-Konformation das Arg97 als Klammer zwischen beiden Substraten wirken, indem es zum einen über NE mit einem Sauerstoffatom der TMP-Phosphorylgruppe (nicht das nukleophil angreifende O-Atom) und zum anderen über NH2 mit einem O-Atom der zu übertragenden Phosphorylgruppe interagieren kann, ohne die negative Ladung des attackierenden O-Atoms von TMP abzuschirmen. In der bekannten Struktur der AMPK im Komplex mit AMP und AppNHp ist die Phosphorylgruppe des AMPs in einer ähnlichen Position, wie in der TMPK-TMP-ADP- $\text{AlF}_3$ -Struktur. Da in AMPK im Gegensatz zu der menschlichen TMPK weder eine P-loop Bewegung noch eine Bewegung des Monophosphates beobachtet wird (da die AMP-Phosphorylgruppe in AMPK durch zwei zusätzliche Argininseitenketten in einer Position fixiert wird, die in TMPK nicht vorhanden sind), zeigt dieser AMPK-Komplex die aktive AMP-Konformation (Abb. 3.34b). Aus diesen Gründen scheint die TMP-Konformation der  $\text{AlF}_3$ -Struktur die aktive Konformation für dieses Nukleotid im gebundenen Zustand an menschlicher TMPK am ehesten widerzuspiegeln.



**Abb. 3.34:** Vergleich der unterschiedlichen Positionierung der TMP- und AMP-Phosphorylgruppen durch die menschlichen TMPK bzw. AMPK (Stereobilder). A) Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP (rot), TMP und AppNHp (gelb) und TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  (grün). Von allen drei Strukturen sind TMP, Arg45 und Arg97 als *ball and stick* Präsentation dargestellt. Zur Orientierung für den nukleophilen Angriff ist in bunt AppNHp der TMP-AppNHp-Struktur gezeigt. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den O-Atomen der TMP-Phosphorylgruppe und den Argininen 45 und 97 sind in den entsprechenden Farben als gestrichelte Linien dargestellt. Deutlich zu sehen ist, daß nur in der TMP-ADP- $\text{AlF}_3$ -Struktur die TMP-Phosphorylgruppe in einer optimalen Position für einen nukleophilen Angriff auf das  $\gamma$ -Phosphat von AppNHp ist und das angreifende Sauerstoffatom keine Wechselwirkungen zu Arg97 macht, so daß es frei ist für einen nukleophilen Angriff. B) Positionierung der AMP-Phosphorylgruppe der Struktur der AMPK im Komplex mit AMP und AppNHp durch die Arginine 36, 88, 156 und 167. Im Gegensatz zu der TMP-Phosphorylgruppe in menschlichen TMPK ist die AMP-Phosphorylgruppe in AMPK durch zwei zusätzliche Arginine in ihrer Position fixiert.



Basierend auf der Interpretation, daß die TMP-ADP- $\text{AlF}_3$ -Struktur sowohl einen aktiven Zustand der TMPK als auch der Nukleotide TMP und ADP widerspiegelt und unabhängig davon, wo genau das  $\text{AlF}_3$ -Molekül in dieser Struktur lokalisiert ist, kann man für den katalytischen Mechanismus folgende Überlegungen anstellen. Der Abstand zwischen dem attackierenden O-Atom des TMPs und dem abgehenden O-Atom des ADPs beträgt in dieser Struktur 4.8 Å. Dieser Abstand ist kürzer als der erwartete Abstand von 6.6 Å in einem vollständig dissoziativen Mechanismus mit einem Metaphosphat als Intermediat. Gleichzeitig ist er zu lang für einen vollständig assoziativen Mechanismus mit einem Phosphoran als Intermediat (erwarteter Abstand 3.4 Å) oder einem idealen  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen Mechanismus (erwarteter Abstand 3.8 Å). Das heißt, alleine basierend auf die Betrachtung der Abstände kann der Phosphoryltransfermechanismus der menschlichen TMPK als  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artig mit partiell dissoziativen Charakter bezeichnet werden, ohne ein Intermediat, wie es für einen rein dissoziativen oder vollständig assoziativen Mechanismus gefordert wird. Auch die Beobachtung, daß in dem Produktkomplex (siehe unten) der P-loop in der geschlossenen Konformation vorliegt und das ADP weiter in Richtung auf das Monophosphat verschoben ist, ist konsistent mit der Klassifizierung des Phosphoryltransfermechanismus der TMPK als  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artig. Unabhängig davon, ob sich der P-loop vor (dann könnte die Interpretation des  $\text{AlF}_3$ -Komplexes als Mimik des Übergangszustandes nicht länger aufrecht erhalten werden), während oder nach der Reaktion von der P-loop partiell-geschlossenen in die geschlossene Konformation bewegt, würde sich der Abstand zwischen den angreifenden und abgehenden Sauerstoffatomen nicht so stark ändern, daß ein Metaphosphat oder ein Phosphoran als Intermediat auftreten könnte. Auch ist die Klassifizierung des Mechanismus als  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artig konsistent mit der Ladungsabschirmung bzw. Ladungsstabilisation. Sowohl in der AppNHp-Struktur als auch in der  $\text{AlF}_3$ -Struktur (unabhängig davon, ob man  $\text{AlF}_3$  als  $\gamma$ -Phosphat von ATP oder als Phosphorylgruppe des Übergangszustandes modelliert) machen zwei Sauerstoffatome (Fluoratome) der zu Übertragenden Gruppe Wechselwirkungen zur TMPK, so daß Ladungen an diesen Sauerstoffatomen stabilisiert werden könnten. Ein Sauerstoffatom macht Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg97 und Lys19, das andere zu dem Magnesiumion. Im Gegensatz dazu macht das dritte O-Atom keine Wechselwirkung zum Protein, so daß eine negative Ladung, wie es für einen vollständig assoziativen Mechanismus erwartet würde, nicht durch das Protein stabilisiert werden könnte. Im Gegensatz dazu ist in der Struktur der UMPK im Komplex mit UMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  der Abstand zwischen dem angreifenden und abgehenden Sauerstoffatom mit 4.2 Å kürzer als bei menschlicher TMPK (4.8 Å) und es werden zusätzliche Arginine

im aktiven Zentrum beobachtet, die mit dem  $\text{AlF}_3$  interagieren. Das bedeutet, daß für die UMPK der Phosphoryltransfer vermutlich zwar auch nach einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen Mechanismus abläuft, jedoch mit einem stärker ausgeprägtem assoziativen Charakter als bei der menschlichen TMPK.

**Interpretation der TDP-ADP-Struktur als Produktkomplex nach einer Konformationsänderung nach der chemischen Reaktion.** Das Gesetz der mikroskopischen Reversibilität erfordert, daß eine Reaktion unter identischen Bedingungen für die Hin- und die Rückreaktion den gleichen Reaktionsweg durchlaufen muß. Basierend auf dieses Gesetz und den oben aufgeführten Interpretationen (1. der katalytische Mechanismus der menschliche TMPK funktioniert, ohne daß ein Intermediat auftritt (also mit nur einem Übergangszustand) und 2. daß die Struktur im Komplex mit TMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  einen aktiven Zustand repräsentiert) kann man für diesen Komplex folgende Interpretation ableiten. In der TDP-ADP-Struktur sind das Arg97 und die  $\beta$ -Phosphorylgruppe von TDP (die übertragene Phosphorylgruppe) in einer Konformation, in der sie Wechselwirkungen, die für die Katalyse essentiell sind, nicht ausbilden können. Das Arg97 kann in der rotierten Konformation nicht als Klammer zwischen beiden Nukleotiden wirken, um diese zusammenzubringen. Im Gegensatz dazu macht es zwei Wechselwirkungen zu dem  $\beta$ -Phosphat von TDP und über NZ eine Wechselwirkung zu Phe42 (Abb. 3.30). Gleichzeitig sind auch die Phosphorylgruppen von TDP in einer Konformation, in der das  $\beta$ -Phosphat keine Wechselwirkungen mit dem katalytischen Magnesiumion eingehen kann. Darüber hinaus ist das  $\beta$ -Phosphat von TDP nicht in einer Position in der das  $\beta$ -Phosphat von ADP einen nukleophilen Angriff auf das  $\beta$ -Phosphat von TDP für die Rückreaktion vollziehen könnte. Die beobachtete Konformation (Protein und TDP) dieses Komplexes unterscheidet sich daher sehr stark von dem als aktiv interpretierten Zustand der  $\text{AlF}_3$ -Struktur. Das veranlaßt zu der Überlegung, daß diese Struktur nicht den Zustand unmittelbar nach der chemischen Reaktion repräsentiert, sondern einen Zustand nach einer weiteren Konformationsänderung nach dem chemischen Schritt. Eine Konformationsänderung des Proteins und der Nukleotide nach der chemischen Reaktion zu einem energieärmeren Zustand im Vergleich zu den Zuständen vor oder unmittelbar nach der Reaktion könnte erklären, warum in dieser Kristallstruktur keine Mischung aus Substraten und Produkten, sondern nur der produktgebundene Zustand beobachtet wird. Vermutlich repräsentiert diese Struktur jedoch einen wahren Zustand auf der Reaktionskoordinate der menschlichen TMPK, da sie die Funktion des hoch konservierten cis-Pro43 erklärt. Nur aufgrund der cis-

Konformation ist die Carbonylgruppe der vorangehenden Aminosäure (Phe42) in seiner Position fixiert, so daß sie mit Arg97 in der rotierten Konformation interagieren kann.

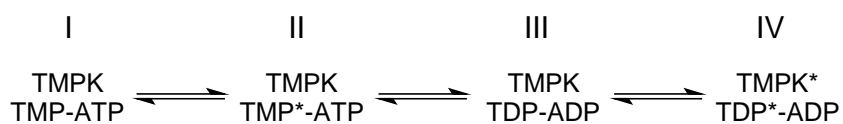
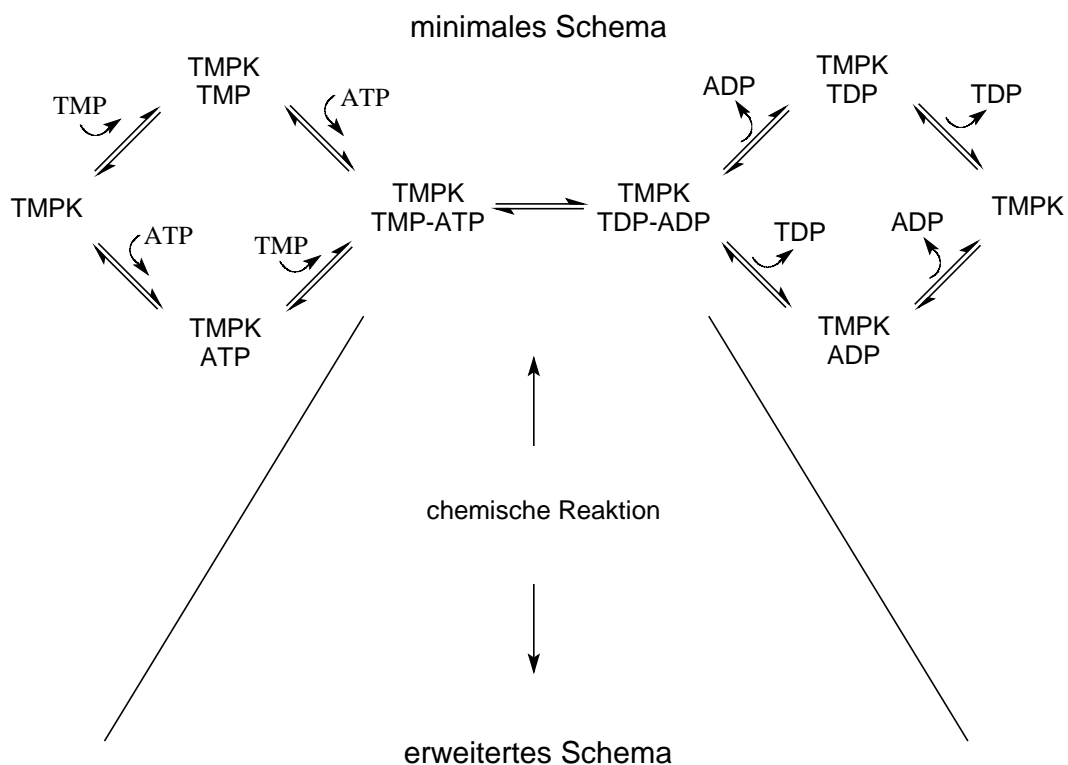
**Die Tp5A-Struktur als Mimik einer aktiven Enzymproduktkonformation.**

Phosphat verknüpfte Dinukleotidinhibitoren wie Ap5A, Up5A und Tp5A wurden schon zuvor für die Studien an NMPKs benutzt und als Übergangszustands-, Bisubstrat- oder Biproductmimika interpretiert (Müller und Schulz, 1992, Scheffzek et al., 1996, Lavie et al., 1998a, Lavie et al., 1998b, Abele und Schulz, 1995). Für UMPK wurde eine Struktur im Komplex mit Up5A als Mimik der Produktkonformation interpretiert (Scheffzek et al., 1996), für AMPK im Gegensatz dazu eine Struktur im Komplex mit Ap5A als Bisubstratkonformation (Müller und Schulz, 1992). Für die menschliche TMPK zeigt eine Überlagerung mit den zuvor beschriebenen Strukturen, daß die Proteinkonformation nahezu identisch zu der P-loop geschlossenen Konformation der TDP-ADP-Struktur ist. Auch der ADP-Teil von Tp5A ist in einer identischen Position wie in der TDP-ADP-Struktur (anstelle von Tp5A wurden nur die Substrate TMP und ATP in das Modell gebaut, da für die zusätzliche Phosphorylgruppe keine Elektronendichte zu beobachten ist; da jedoch sowohl die Elektronendichte für das  $\gamma$ -Phosphat sehr schlecht ist und die B-Faktoren für diese Gruppe sehr hoch sind, kann diese Gruppe für die Interpretation dieses Komplexes nur sehr schwierig berücksichtigt werden). Der größte Unterschied zwischen diesen beiden Strukturen liegt in den Konformationen von Arg97. Im Gegensatz zu der rotierten Konformation in der TDP-ADP-Struktur ist in der Tp5A-Struktur die Seitenkette des Arg97 in der gleichen Konformation, wie in den anderen Strukturen. Basierend auf diese Beobachtungen kann man diese Struktur als den Zustand nach der chemischen Reaktion jedoch vor der Konformationsänderung zu der stabilen Produktkonformation der TDP-ADP-Struktur interpretieren. Die kovalente Natur des Phosphatlinkers in Tp5A ermöglicht die Beobachtung dieses Zustandes, da in diesem Binukleotidinhibitor-Komplex die Phosphatgruppen das Arg97 davor bewahren, eine Konformationsänderung zu vollziehen.

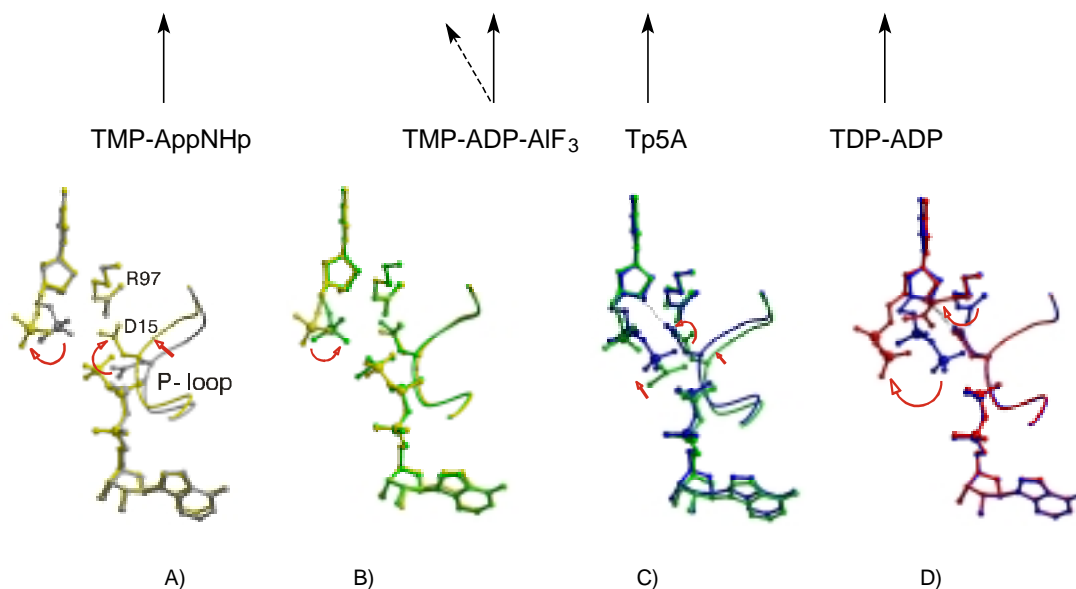
Für den katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK bleibt jedoch unklar, wann genau die Konformationsänderung von der P-loop partiell-geschlossenen in die P-loop geschlossene Konformation stattfindet. In der  $\text{AlF}_3$ -Struktur ist der P-loop etwas weiter geschlossen als in der TMP-AppNHp-Struktur, so daß man vermuten kann, daß der P-loop simultan zu der chemischen Reaktion (auch wenn der chemische Schritt schneller sein sollte als eine Konformationsänderung im Protein) die Konformationsänderung vollzieht. Denkbar ist jedoch auch, daß der P-loop erst nachdem die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP übertragen ist, die Konformationsänderung vollzieht, so

daß in diesem Fall die Tp5A-Struktur nicht den unmittelbaren Zustand nach der chemischen Reaktion simuliert. Für die Rückreaktion müßte in diesem Fall erst der P-loop wieder in die partiell-geschlossene Konformation übergehen, bevor die Phosphorylgruppe von TDP auf ADP übertragen werden könnte. Auch sollte man in Erwägung ziehen, daß es möglich ist, daß die Konformationsänderung vor der chemischen Reaktion stattfindet, was bedeuten würde, daß die  $\text{AlF}_3$ -Struktur nicht den wahren aktiven Zustand vor oder während der Reaktion widerspiegelt. Diese Möglichkeit scheint jedoch sehr unwahrscheinlich zu sein, da in dieser Arbeit eine deutliche Korrelation zwischen der Aktivität verschiedener NMPs und auch verschiedener TMPK-Mutanten und der Möglichkeit, die P-loop partiell-geschlossenen Konformation einnehmen zu können, festgestellt wurde (siehe auch folgende Kapitel). Darüber hinaus sollte man bedenken, daß die Tp5A-Struktur aufgrund der kovalenten Phosphatkette zwischen beiden Nucleotiden einen sehr künstlichen Zustand darstellt, der starke Zwänge auf die Nucleotidkonformation und auch die Proteinkonformation haben kann, was in den anderen Strukturen nicht gegeben ist.

**Interpretation der Strukturen als Schnappschüsse entlang der Reaktionskoordinate der menschlichen TMPK.** Die hier vorgestellten Strukturen der menschlichen TMPK können so interpretiert werden, daß sie verschiedene Zustände entlang der Reaktionskoordinate der menschlichen TMPK repräsentieren. Sie veranschaulichen, welche Konformationsänderungen (sowohl für das Enzym als auch für die Nucleotide) offensichtlich während der Gesamtreaktion stattfinden. Für die Annahme, daß die menschliche TMPK, ähnlich wie die Maus TMPK (Cheng und Prusoff, 1973), die GMPK (Li et al., 1996) oder die AMPK (Rhoads und Lowenstein, 1968), den Phosphoryltransfer nach einem Random Bi-Bi-Mechanismus katalysiert, kann man ein minimales Reaktionsschema, wie in Abb. 3.35 dargestellt, zeichnen. Die hier vorgestellte Interpretation der Ergebnisse legt nahe, daß dieses Reaktionsschema um mindestens zwei Schritte erweitert werden muß (Abb. 3.35).



repräsentativer Komplex der TMPK



Überlagerungen der Strukturen (von links nach rechts): A) TMP-ADP (grau) und TMP-AppNHp (gelb); B) TMP-AppNHp und TMP-ADP-AIF<sub>3</sub> (grün); C) TMP-ADP-AIF<sub>3</sub> und Tp5A (blau, die β-Phosphatgruppe von Tp5A ist modelliert und eigentlich nicht im Modell und die mittlere Phosphatgruppe ist nicht dargestellt); D) Tp5A und TDP-ADP (rot).

**Abb. 3.35:** Schematische Darstellung eines Random Bi-Bi-Mechanismus für die menschliche TMPK. Oben ist ein minimales Schema für die Reaktion der menschlichen TMPK nach einem solchen Mechanismus dargestellt. Basierend auf die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wird ein erweitertes Schema vorgeschlagen, bei dem im substratgebundenen Zustand weitere Konformationsänderungen erfolgen (erweitertes Schema; Sternchen bedeutet, daß dieses Molekül Konformationsänderungen vollzieht). Die die entsprechenden Zustände repräsentierenden Komplexe sind unter dem erweiterten Schema angegeben. Die Überlagerungen der verschiedenen Zustände (von links nach rechts) lassen die während der Reaktion notwendige Dynamik des Proteins und der Nukleotide erahnen. Die Struktur des TMP-ADP-Komplexes des linken Bildes repräsentiert nicht unmittelbar einen Zustand entlang der Reaktionskoordinate, zeigt jedoch die strukturelle Reaktion der TMPK auf den Austausch eines Di- gegen ein Triphosphat auf der Phosphoryldonorbindungsstelle.

Da in allen Strukturen beide Nukleotidbindungsstellen besetzt sind, kann man über Konformationsänderungen, die für die Substratbindung oder Produktfreisetzung erforderlich sind, nichts sagen, so daß sich die folgende Interpretation auf Konformationsänderungen im substratgebundenen Zustand begrenzen. Die TMP-AppNHp-Struktur zeigt den substratgebundenen Zustand der menschlichen TMPK (Zustand I, Abb. 3.35) mit dem P-loop in der partiell-geschlossenen Konformation. Die TMP-Phosphorylgruppe ist nicht in einer idealen Position für einen nukleophilen Angriff auf die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP. Auch macht sie in dieser Position keine Wechselwirkung zu Arg97, so daß dieses hochkonservierte Arginin nicht als Klammer zwischen beiden Substraten wirken kann. Daher ist für die TMP-Phosphorylgruppe eine Konformationsänderung vor der Reaktion zwingend erforderlich, die den Abstand zu dem Phosphoryldonor verkürzt (Zustand II, Abb. 3.35) und in der eine Wechselwirkung zu Arg97 beobachtet wird. Einen solchen Zustand zeigt die TMP-ADP-AlF<sub>3</sub> Struktur, unabhängig davon, ob diese Struktur als Michaelis-Komplex oder als Übergangszustandsmimik interpretiert wird. In diesem Komplex macht die TMP-Phosphorylgruppe (nicht über das nukleophil angreifende Sauerstoffatom) eine Wechselwirkung zu Arg97 und das angreifende O-Atom ist in einer optimalen Position für einen nukleophilen Angriff auf die zu übertragende Phosphorylgruppe. Simultan macht Arg97 eine Wechselwirkung zu der zu transferierenden Phosphorylgruppe von ATP (AlF<sub>3</sub> in dieser Struktur), so daß es als Klammer zwischen beiden Substraten wirken kann und gleichzeitig negative Ladungen während der Reaktion abschirmt, wie es auch für Hefe und *E. coli* TMPK in den Tp5A-Strukturen beobachtet wird. Der P-loop ist in der partiell-geschlossenen Konformation, jedoch etwas weiter geschlossen als in der TMP-AppNHp

Struktur. Die nicht eindeutige Elektronendichte für das  $\text{AlF}_3$ -Molekül deutet darauf hin, daß diese Struktur möglicherweise mehrere Zustände (Zustand a: unmittelbar vor der Reaktion mit  $\text{AlF}_3$  als  $\gamma$ -Phosphat Mimik, Zustand b: während der Reaktion mit  $\text{AlF}_3$  als Mimik der zu übertragenden Phosphorylgruppe) gleichzeitig repräsentiert. Die Tp5A-Struktur repräsentiert einen Zustand nach der chemischen Reaktion mit dem P-loop in der voll geschlossenen Konformation (Zustand III, Abb. 3.35) und einer Wechselwirkung zwischen dem P-loop Aspartat und der 3'-OH-Gruppe von TMP. Nachdem sich die Produkte gebildet haben, erfolgt anschließend eine gemeinsame Rotation der Arg97 Seitenkette und der TDP-Phosphorylgruppen zu der stabilen Produktkonformation (Zustand IV, Abb. 3.35), die durch die TDP-ADP-Struktur repräsentiert wird. Die Abbildungen unter den einzelnen Zuständen des Schemas der Abb. 3.35 zeigen die notwendigen Konformationsänderungen des Proteins und der Nukleotide, die während der Reaktion (zwischen den dargestellten Zuständen) vollzogen werden. Eine analoge Reaktion, die von der AMPK katalysiert wird, würde sich von dieser Reaktionssequenz aufgrund drei zusätzlicher Arginine stark unterscheiden. Beispielsweise müßte bei AMPK die AMP-Phosphorylgruppe keine Konformationsänderung vor der Reaktion vollziehen, da in der Struktur der AMPK im Komplex mit AMP und AppNHp die AMP-Phosphorylgruppe schon in einer optimalen Position für den nukleophilen Angriff auf die zu übertragende Phosphorylgruppe von AppNHp ist. Die Bindung der Nukleotide an AMPK induziert den Übergang von einer global offenen Konformation zu einem geschlossenen Zustand der unmittelbar zu der chemischen Reaktion führt. Im Gegensatz dazu erfordert das aktive Zentrum der menschlichen TMPK im global geschlossenen, substratgebundenen Zustand weitere Konformationsänderungen, um eine aktive Konformation einzunehmen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die in diesem Kapitel vorgestellten Strukturen der menschlichen TMPK die notwendigen Konformationsänderungen der TMPK und der Nukleotide offenbaren, die möglicherweise während der Reaktion vollzogen werden. Obwohl sich die hier vorgestellten Ergebnisse auf die klassische Technik der Kristallographie beschränken, in der nur statische Strukturen beobachtet werden können, kann man durch die Kombination der Informationen aus den verschiedenen Strukturen die erforderliche Dynamik der Reaktion erahnen. Darüber hinaus erklären diese Strukturen die Funktion vieler Aminosäuren, sowohl für die Substratspezifität als auch für die Katalyse der TMPK (siehe vorangehende Kapitel). Gleichzeitig lassen diese Strukturen jedoch auch verschiedene Fragen offen und liefern keine endgültige Klarheit über die Funktion einzelner Aminosäuren (z. B. ob Asp15

protoniert ist und ob es direkt an der Katalyse beteiligt ist, oder nicht) und offenbaren darüber hinaus neue Fragen. Beispielsweise stellen sich die Fragen, warum wir bei der menschlichen TMPK im Gegensatz zu allen anderen NMPKs und anderen ATP- und GTP-bindenden Proteinen, die daraufhin ausreichend untersucht sind, eine P-loop Bewegung als Antwort auf den Austausch eines Di- gegen ein Triphosphat auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle beobachten oder warum die TMPK im Gegensatz zu anderen NMPKs ein Dimer ist. Zu diesem Zeitpunkt gibt es keine experimentellen Ergebnisse, die dieses Phänomen erklären könnten, jedoch ist es denkbar, daß *in vivo* ein zusätzlicher Faktor an der Katalyse beteiligt ist. Denkbar ist ein Protein (das dann vielleicht ebenso ein Dimer ist und nur in der S1-Phase des Zellzyklus exprimiert wird), daß nur im triphosphatgebunden Zustand an TMPK bindet und dadurch die katalytische Aktivität der sehr langsamen menschlichen TMPK beschleunigt. Das würde bedeuten, daß nicht nur die Expression, sondern auch die Aktivität der menschlichen TMPK reguliert würde. Letzteres würde zu einer ähnlichen Situation führen, wie es für die Aktivierung der sehr langsamen intrinsischen GTP-Hydrolyse von Ras durch GAP bekannt ist (Scheffzek, 1997).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der menschlichen und der Hefe TMPK liegt möglicherweise in der Funktion des P-loop Arginins. In der Struktur der Hefe TMPK im Komplex mit Tp5A wurde eine Wechselwirkung zwischen der Seitenkette des Arg15 und dem mittleren Phosphat von Tp5A beobachtet. Diese Beobachtung zusammen mit der Tatsache, daß die Mutation des Arg15 zu Glycin die Aktivität der Hefe TMPK um den Faktor 200 reduziert (von  $35 \text{ s}^{-1}$  auf  $0.175 \text{ s}^{-1}$  (Brundiars et al., 1999)) führte zu der Hypothese, daß dieses ein katalytisches Arginin ist. Im Gegensatz dazu wird in keiner Struktur der menschlichen TMPK eine analoge Wechselwirkung zwischen Arg16 und den Phosphaten der Substrate beobachtet. Auch führt die Mutation von Arg16 zu Glycin nicht zu einer verminderten Aktivität der menschlichen TMPK (Brundiars et al., 1999). Diese Beobachtung, zusammen mit der Tatsache, daß die Aktivität der R15G-Mutante der Hefe TMPK ungefähr gleich der Aktivität der menschlichen Wildtyp TMPK ( $0.36 \text{ s}^{-1}$ ) ist, führt zu der Vermutung, daß das P-loop Arginin nur für die Hefe TMPK katalytisch wichtig ist, nicht jedoch für die menschliche TMPK. Da die Elektronendichte für die Seitenkette des Arg16 in den Strukturen der menschlichen TMPK jedoch sehr schlecht ist und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion vermutlich eine Konformationsänderung nach der Reaktion bzw. die Produktfreisetzung ist, so daß eine Mutation eines katalytischen Restes (Arg16) eventuell keine Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion hat, ist diese Vermutung jedoch nicht sicher. Es ist



denkbar, daß das Arg16 möglicherweise doch für die Aktivität der menschlichen TMPK notwendig ist, daß es aber gehindert ist, seine katalytische Funktion auszuüben. Der zusätzliche Faktor (siehe oben) könnte dieses Hindernis beseitigen.

### 3.3 Substrateigenschaften der AZT-Metaboliten AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP zu der menschlichen TMPK

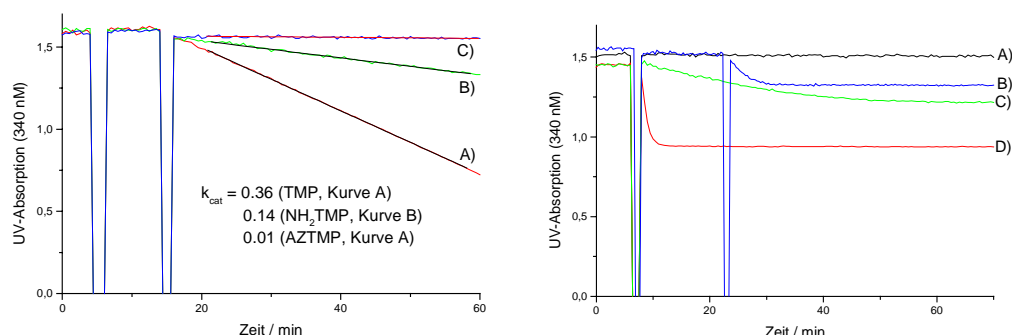
Die intrazelluläre AZT-Metabolisierung wird, wie in der Einleitung erläutert, durch die zweite Stufe der Aktivierung, katalysiert durch TMPK, limitiert. Dieser Flaschenhals bei der Aktivierung führt zu einer Anreicherung des toxischen AZTMPs in millimolaren Konzentrationen in Zellen, die mit AZT inkubiert werden. Nachdem im vorangehenden Kapitel sowohl die TMP-Substrateigenschaften gegenüber der menschlichen TMPK, als auch der katalytische Mechanismus der menschlichen TMPK anhand der Strukturen verschiedener Substratzustände diskutiert wurde, werden in diesem Kapitel die Substrateigenschaften der AZT-Metaboliten AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP gegenüber der menschlichen TMPK untersucht. Dazu sollten zum einen die  $k_{\text{cat}}$ -Werte beider Substrate, zum anderen die Röntgenkristallstrukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP gelöst werden. Für AZTMP sollten, ähnlich wie für das natürliche Substrat TMP, verschiedene AZTMP-Nukleotidkomplexe, die verschiedene Zustände entlang der Reaktionskoordinate repräsentieren, kristallisiert und die Strukturen gelöst werden (Komplexe der menschlichen TMPK mit AZTMP und ADP, AZTMP und AppNHp (als substratgebundener Komplex vor der Reaktion), AZTMP-ADP und AIF<sub>3</sub> (als Übergangszustandsmimik), AZTDP und ADP ausgehend von AZTMP und ATP (als Produktkomplex) und im Komplex mit AZTp5A). Ein Vergleich dieser Strukturen mit den analogen TMP-Strukturen sollte detaillierte Informationen über die differenzierten Substrateigenschaften beider Substrate gegenüber der menschlichen TMPK liefern.

Da NH<sub>2</sub>TTP (3'-Amino-2',3'-dideoxythymidintriphosphat) nicht nur ein gutes Substrat der RT, sondern auch der zellulären DNA-Polymerasen  $\alpha$  und  $\beta$  ist (Jasko et al., 1995), ist der Einsatz von NH<sub>2</sub>T aufgrund seiner toxischen Nebenwirkungen auf nicht infizierte Zellen für die HIV-Therapie nicht geeignet. Da die phosphorylierten Intermediate von NH<sub>2</sub>T jedoch metabolische Nebenprodukte von AZT (durch Reduktion der Azidogruppe) in mit AZT inkubierten Zellen sind, haben diese medizinische Relevanz. Wenn gebildetes NH<sub>2</sub>TMP durch zelluläre Enzyme effizient zu NH<sub>2</sub>TTP phosphoryliert wird, ist die selektive Inhibition der RT, die durch AZTTP gegeben ist, nicht mehr gegeben. Daher wurde auch die Phosphorylierung von NH<sub>2</sub>TMP durch die menschliche TMPK untersucht. Dazu sollte NH<sub>2</sub>TMP hergestellt, der  $k_{\text{cat}}$ -Wert zu der menschlichen TMPK bestimmt, die menschliche TMPK im Komplex mit NH<sub>2</sub>TMP und AppNHp kristallisiert und die Struktur gelöst werden. Die Untersuchungen der AZT-Metaboliten an TMPK sollten neben dem Verständnis der Eigenschaften zu TMPK auch wichtige

Informationen für das Design neuer Nukleosidanaloga mit besseren Substrateigenschaften zu TMPK und auch für das Design von Mutanten der menschlichen TMPK mit besseren AZTMP-Substrateigenschaften liefern.

### 3.3.1 Herstellung von $\text{NH}_2\text{TMP}$ , kinetische Charakterisierung der AZT-Metaboliten AZTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$ und $K_d$ -Wert Bestimmung von AZTp5A zu menschlicher TMPK

Die chemische Synthese von AZTMP ausgehend von AZT wurde in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Im Gegensatz zu der chemischen Synthese von AZTMP wurde  $\text{NH}_2\text{TMP}$  enzymatisch durch Dephosphorylierung ausgehend von dem Triphosphat ( $\text{NH}_2\text{TTP}$ , von der Firma USB) mit Phosphodiesterase hergestellt. Die Bestimmung der  $k_{\text{cat}}$ -Werte für AZTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  erfolgte nach der gleichen Methode und unter den gleichen Bedingungen, die für TMP vorgestellt und angewendet wurden. Zur Kontrolle wurden stets Kontrollreaktionen mit TMP durchgeführt. Die verwendeten NMP-Konzentrationen waren  $277 \mu\text{M}$  TMP,  $201 \mu\text{M}$   $\text{NH}_2\text{TMP}$  und  $350 \mu\text{M}$  AZTMP. Im linken Graphen der Abb. 3.36 sind exemplarisch Kurven für diese Messungen von allen drei Monophosphaten (Kurve A für TMP; Kurve B für  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und Kurve C für AZTMP) dargestellt. Eine lineare Regression mit dem Programm Origin lieferte die im Graphen dargestellten Geraden, aus deren Steigung nach der Formel im experimentellen Teil (Kapitel 5.1.6) die  $k_{\text{cat}}$ -Werte berechnet wurden. Für TMP wurde in Kapitel 3.2.2 gezeigt, daß, aufgrund der Weiterreaktion des entsprechenden Diphosphates (TDP) unter Verbrauch von ATP, pro Reaktionsäquivalent TMP zwei Äquivalente NADH oxidiert werden, so daß man diesen Faktor bei der Auswertung der Messung berücksichtigen mußte. Um zu überprüfen, ob analoges auch für AZTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  gilt, wurden die oben aufgeführten Experimente mit  $1 \mu\text{M}$  TMPK und  $33.5 \mu\text{M}$   $\text{NH}_2\text{TMP}$  (Kurve B des rechten Graphen) bzw.  $58 \mu\text{M}$  AZTMP (Kurve C des rechten Graphen) wiederholt. Die in dem rechten Graphen der Abb. 3.36 dargestellten Kurven (B für  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und C für AZTMP) zeigen OD-Abnahmen von 0.21 bzw. 0.36 (entsprechend der Oxidation von  $33.6 \mu\text{M}$  bzw.  $57.6 \mu\text{M}$  NADH). Das heißt, daß pro eingesetztem Äquivalent  $\text{NH}_2\text{TMP}$  bzw. AZTMP auch nur ein Äquivalent NADH oxidiert wurde. Im Gegensatz zu der Auswertung der Daten der TMP-Reaktion, konnten daher für  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und AZTMP die Steigungen der Geraden der linearen Regression ohne Korrekturfaktor für die Berechnung der beobachteten  $k_{\text{cat}}$ -Werte verwendet werden. In Tabelle 3.5 sind die  $k_{\text{cat}}$ -Werte von TMP,  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und AZTMP im Vergleich dargestellt.



**Abb. 3.36:**  $k_{cat}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von AZTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  durch die menschliche TMPK (siehe auch Kapitel 5.1.6; die verwendeten Konzentrationen sind im Text genannt). Links) Lineare UV-Absorptionsabnahmen aufgrund der durch die TMPK-Reaktion initiierten Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  für A) TMP, B)  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und C) AZTMP; aus der Steigung der Geraden wurden nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel die  $k_{cat}$ -Werte berechnet; Rechts) Kontrollreaktionen die zeigen, daß pro  $\text{NH}_2\text{TMP}$ - (B) und AZTMP- (C) Reaktionsäquivalent ein Äquivalent und pro TMP- (D) Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente NADH oxidiert werden. A) Kontrollreaktion ohne NMP.

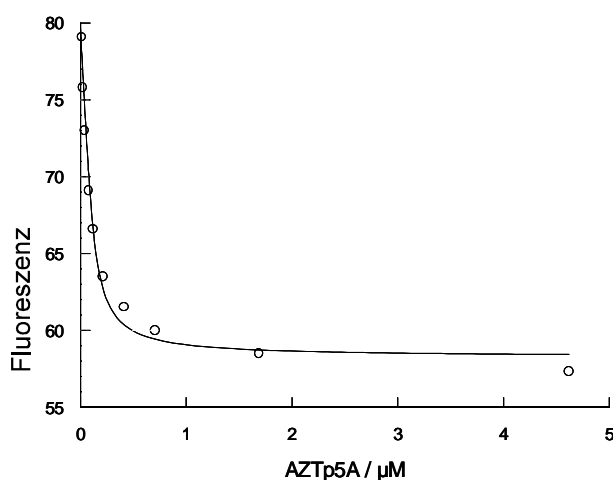
**Tab. 3.5:** Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte von TMP, AZTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$

Nukleotid	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$
TMP	0.36
$\text{NH}_2\text{TMP}$	0.14
AZTMP	0.01

Die erhaltenen  $k_{cat}$ -Werte zeigen, daß die Umsatzgeschwindigkeit der AZTMP-Phosphorylierung durch die menschliche TMPK unter *steady-state* Bedingungen 36fach langsamer ist, als die des natürlichen Substrates TMP. Bei Hefe TMPK beträgt dieser Faktor 200, wobei anzumerken ist, daß Hefe TMPK ( $k_{cat} = 35 \text{ s}^{-1}$ ) TMP um den Faktor 100 schneller phosphoryliert als die menschliche TMPK. Im Gegensatz zu AZTMP wird  $\text{NH}_2\text{TMP}$  von menschlicher TMPK nur um den Faktor 2.5 langsamer zum Diphosphat umgesetzt als TMP und ist demnach ein gutes Substratanalogon für die menschliche TMPK.

Der  $K_d$ -Wert von AZTp5A zu menschlicher TMPK wurde durch Verdrängung von Tp5A-mant (100 nM) aus einem stöchiometrischen Komplex mit menschlicher TMPK bestimmt (Abb. 3.37). Die Auswertung erfolgte durch iterativen Kurvenangleich mit dem Programm Scientist und lieferte einen  $K_d$ -Wert von 12 nM. Diese Affinität ermöglicht die

Bildung eines stöchiometrischen Komplexes bestehend aus menschlicher TMPK und AZTp5A unter den für die Kristallisation verwendeten Konzentration.



**Abb. 3.37:** Fluoreszenztitration zur  $K_d$ -Wert Bestimmung des Komplexes aus menschlicher TMPK und AZTp5A. Gezeigt ist eine Verdrängungstitration von 100 nM Tp5A-mant aus einem stöchiometrischen Komplex mit der menschlichen TMPK mit steigenden Konzentrationen von AZTp5A. Die Auswertung erfolgte durch einen iterativen Kurvenangleich mit dem Programm SCIENTIST. Die Bedingungen sind im experimentellen Teil aufgeführt.

### 3.3.2 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und ADP, AZTMP und AppNHp, $\text{NH}_2\text{TMP}$ und AppNHp und AZTp5A

Die Cokristallisation der menschlichen TMPK im Komplex mit den oben aufgeführten Nukleotidkombinationen erfolgte nach der gleichen Methode und unter den gleichen Bedingungen, die für die analogen Komplexe mit TMP vorgestellt wurden (Kapitel 3.2.3). Die Endkonzentrationen der verwendeten Nukleotide waren: 2 mM AZTMP und ADP; 2 mM AZTMP und 20 mM AppNHp; 1 mM AZTMP und 20 mM ATP; 2 mM AZTp5A. Für die Kristallisation des Komplexes der menschlichen TMPK mit AZTp5A wurde die *microseeding* Technik verwendet, da sonst keine Einkristalle von ausreichender Qualität für die Aufnahme eines hochaufgelösten Datensatzes wuchsen. Die Präparation von Kristallen der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  gelang weder durch Cokristallisation noch durch *soaking* Experimente mit hohen Konzentrationen von  $\text{AlF}_3$  (85 mM  $\text{AlCl}_3$  und 250 mM NaF) ausgehend von Kristallen im Komplex mit AZTMP und ADP, wie es für die Präparation von TMPK-TMP-ADP- $\text{AlF}_3$  Kristallen erfolgreich war. In beiden Fällen wird in der resultierenden

Elektronendichtekarte keine zusätzliche Elektronendichte zwischen den beiden Nukleotiden AZTMP und ADP beobachtet und beide Strukturen, die im folgenden daher nicht aufgeführt werden, sind identisch zu der Struktur im Komplex mit AZTMP und ADP (siehe unten). Auch gelangt nicht die Kristallisation der menschlichen TMPK im Komplex mit den Produkten AZTDP und ADP ausgehend von den Substraten AZTMP und ATP. In der resultierenden Elektronendichtekarte wird nur Elektronendichte für die Nukleotide AZTMP und ADP beobachtet und die Struktur ist identisch zu der im Komplex mit AZTMP und ADP.

Die Datensammlung sowie die Indizierung und Integration der Datensätze erfolgte nach der gleichen Methode, die in Kapitel 3.2.3 für die analogen Komplexe mit TMP vorgestellt wurden. Die Statistiken der Datensammlung und -auswertung sind in Tab. 3.6 zusammengefaßt.

**Tab. 3.6:** Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Substratkombinationen der AZT-Metaboliten AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP

	AZTMP ADP	AZTMP AppNHp	AZTp5A	NH <sub>2</sub> TMP AppNHp
Röntgenquelle	rot. Anode Dortmund	X11/DESY Hamburg	X11/DESY Hamburg	rot. Anode Dortmund
Wellenlänge (Å)	CuKα	0.9076	0.9076	CuKα
Detektor	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100	100	100
Auflösung (Å)	1.80	1.70	1.60	1.75
Zahl der Reflexe				
alle gemessenen	78141	156764	180754	142253
unabhängigen	23183	28032	34575	48214
Vollständigkeit (%)				
alle Reflexe	95.2	98.9	98.9	97.1
äußere Schale	85.8	95.6	98.6	97.2
R <sub>sym</sub> <sup>1</sup> (%)				
alle Reflexe	4.4	3.9	4.9	4.5
äußere Schale	17.9	24.5	36.1	35.2
Signal/Rausch- Verhältnis (I/σ)				
alle Reflexe	21.98	20.95	16.27	14.13
äußere Schale	3.80	5.34	3.49	2.21
Raumgruppe	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Elementarzelle (Å)				
a = b	101.000	100.100	101.580	101.301
c	49.600	49.700	49.850	49.513
α = β = γ	90	90	90	90
Moleküle/asy. Einheit	1	1	1	1

<sup>1</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl, i} |I_{hkl, i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl, i} I_{hkl, i}$

In der Struktur mit AZTMP und AppNHp ist ähnlich wie in dem Komplex mit TMP und AppNHp die Phosphoryldonorbindungsstelle zu 2/3 mit AppNHp besetzt und zu 1/3 mit ADP. Zurückzuführen ist dieses vermutlich auf einen nicht vollständigen Nukleotidaustausch von AppNHp gegen ADP aus der nicht vollständig nukleotidfreien Proteinlösung. Für den Komplex mit NH<sub>2</sub>TMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle kann aufgrund der visuellen Inspektion der Elektronendichtekarte nicht zwischen TMP und NH<sub>2</sub>TMP unterschieden werden. Eine HPLC-Analyse von aufgelösten Kristallen zeigte jedoch eindeutig, daß die Phosphorylakzeptorbindungsstelle zu 100 % mit NH<sub>2</sub>TMP besetzt ist. Auch ist die Phosphoryldonorbindungsstelle, im Gegensatz zu den analogen Komplexen mit TMP oder AZTMP, in der Struktur mit NH<sub>2</sub>TMP zu 100 % mit AppNHp besetzt. In Tab. 3.7 sind die Statistiken der Strukturverfeinerung für die in diesem Kapitel vorgestellten Komplexe zusammengefaßt. Die Überprüfung der Richtigkeit und Qualität der Modelle erfolgte auf die gleiche Art und Weise, wie es für die Strukturen im Komplex mit TMP vorgestellt wurde (mit den Programmen *Procheck* und *whatcheck*).

**Tab. 3.7:** Statistik der Strukturverfeinerungen der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Substratkombinationen der AZT Metaboliten AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP

	AZTMP ADP	AZTMP AppNHp	AZTp5A	NH <sub>2</sub> TMP AppNHp
Auflösungsbereich (Å)	40.8-1.80	44.5-1.70	24.5-1.60	71.6-1.75
Zahl der Reflexe (F > 0 σ)				
Arbeitssatz	20897	25247	30973	23213
Testsatz	2285	2784	3427	2615
R <sub>cryst</sub> <sup>1</sup> (%)	17.6	17.6	18.4	18.6
R <sub>free</sub> <sup>2</sup> (%)	22.5	23.1	21.7	24.3
Standardabweichung der				
Bindungslängen (Å)	0.012	0.011	0.011	0.012
Bindungswinkel (°)	1.5	1.7	1.4	1.8
Anzahl der Atome				
Protein <sup>3</sup>	1646	1646	1758	1645
Nukleotide <sup>4</sup>	50	104*	54**	52
Metalle (Mg-Ionen)	2	2	2	2
Wasser	295	298	294	282
Durchschnittliche B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )				
Hauptkettenatome	15.1	22.3	20.3	22.8
Seitenkettenatome	18.3	25.5	26.3	26.7
Nukleotide	15.2	21.3	23.8	21.9
Mg-Ionen	15.3	20.9	22.2	22.5
Wassermoleküle	30.0	39.4	37.0	39.1

<sup>1</sup>  $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - |F_{\text{calc}}(\text{hkl})||}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|}$

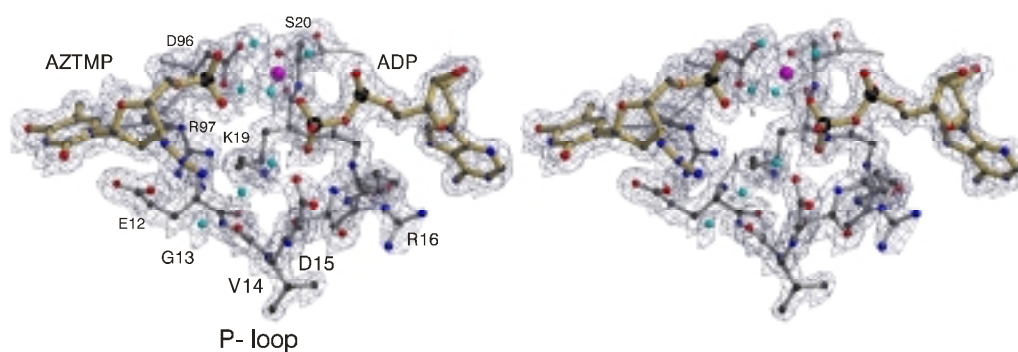
<sup>2</sup>  $R_{\text{free}} = R_{\text{cryst}}$ , berechnet für ca. 10 % willkürlich ausgewählter Reflexe (Testsatz), die bei der Verfeinerung ausgeschlossen wurden (Brünger, 1992)

<sup>3</sup> Zahlen beinhaltet Atome von Aminosäuren, die in zwei Konformationen, als Alanin oder gar nicht modelliert wurden (für eine detaillierte Auflistung siehe Kapitel 6.3).

<sup>4</sup> Die mit \* gekennzeichneten Zahlen beinhalten Atome, die in 2 Konformationen modelliert sind; bei der mit \*\* gekennzeichneten Zahl sind Atome des Binukleotids nicht modelliert.

### 3.3.3 Die AZTMP-ADP und AZTMP-AppNHp Strukturen

Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und ADP zeigt innerhalb der global geschlossenen Proteinkonformation die P-loop offene Konformation. Beide Nukleotide werden mit voller Besetzung beobachtet und die zu modellierende Konformation wird eindeutig durch die Elektronendichte definiert (Abb. 3.38). Die Struktur ist nahezu identisch zu der analogen Struktur in der AZTMP durch TMP ersetzt ist (siehe Kapitel 3.2.8). Auch die Positionierung und Konformation des AZTMPs ist identisch zu der von TMP in der TMPK-TMP-ADP-Struktur (Abb. 3.39). Die Ribose ist in der 2'-endo Konformation und die Phosphorylgruppe interagiert durch Wasserstoffbrückenbindungen über zwei Sauerstoffatome (OP1 und OP2) mit Arg97 (NE 2.7 Å und NH2 2.8 Å).

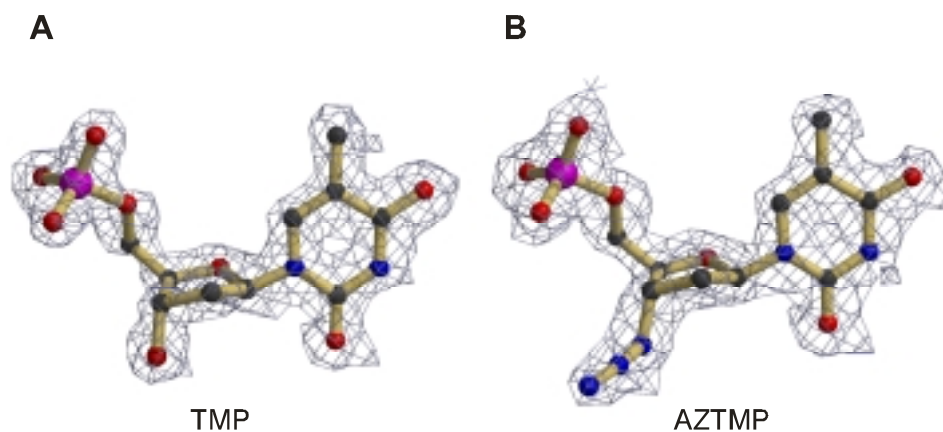


**Abb. 3.38:** Ausschnitt aus der sigma A gewichteten  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte (konturiert bei  $1.5 \sigma$ ; Auflösung  $1.8 \text{ \AA}$ ) der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP und ADP für die Substrate und den P-loop in der P-loop offenen Konformation (Stereobild). Als *ball and stick* Präsentation dargestellt sind die entsprechenden Reste des Modells für diesen Bereich (C-Atome sind schwarz, N-Atome blau, O-Atome rot, Wassermoleküle cyan, P-Atome groß und schwarz und das Magnesiumion pink koloriert).

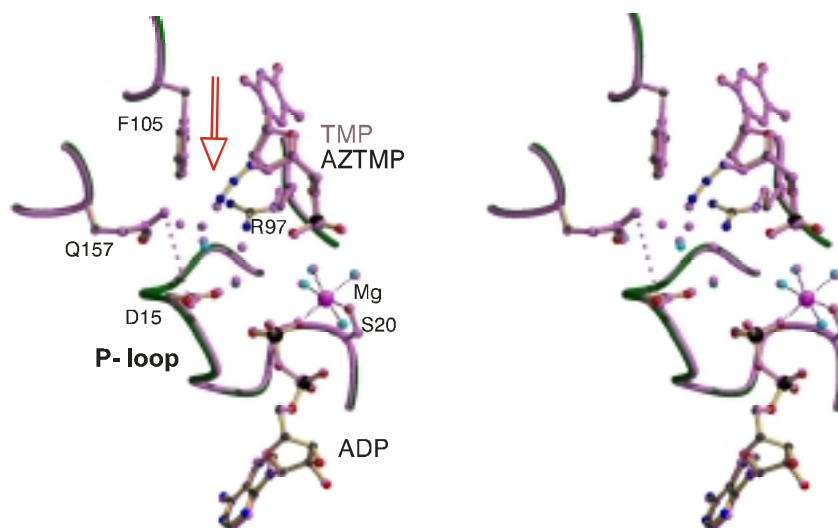
Die im Vergleich zu der 3'-Hydroxylgruppe in TMP um ca.  $1.5 \text{ \AA}$  längere Azidogruppe in AZTMP ist so positioniert, daß die Spitze der Azidogruppe die Position des Wassermoleküls 510 aus der TMP-ADP-Struktur einnimmt (Abb. 3.40). Dieses ist das Wassermolekül, das in der P-loop offenen, TMP-ADP gebundenen Struktur eine Wasserstoffbrückenbindung zu der 3'-Hydroxylgruppe in TMP macht und das bei der Bindung von AppNHp durch die Rotation der Asp15 Seitenkette zusammen mit den Wassermolekülen 512 und 790 verdrängt wird. Alle anderen Wassermoleküle, die in der



TMP-ADP-Struktur an der Stabilisation der P-loop offenen Konformation beteiligt sind, werden auch in der AZTMP-ADP-Struktur beobachtet und sind bis auf geringe Verschiebungen – induziert durch die Azidogruppe – identisch zu denen in der TMP-ADP-Struktur.



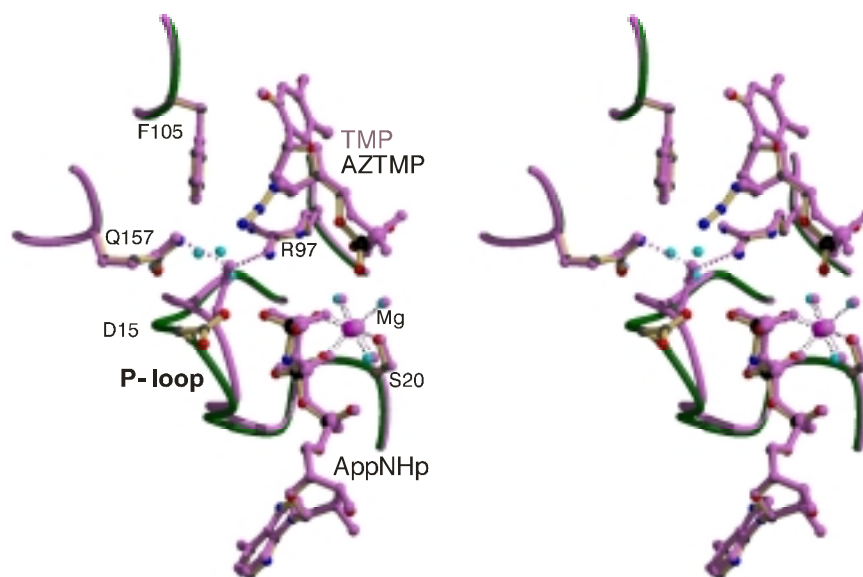
**Abb. 3.39:** Vergleich der sigma A gewichteten  $2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarten (konturiert bei  $1.5 \sigma$ ) für die Substrate TMP (A; Auflösung 1.65 Å) und AZTMP (B; Auflösung 1.8 Å) der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP bzw. AZTMP und ADP. Überlagert sind die in diese Elektronendichtekarten gebauten Modelle für TMP und AZTMP als *ball and stick* Präsentation (Farben der Atome siehe Abb. 3.38). Für AZTMP ist deutlich die Elektronendichte für die Azidogruppe sichtbar.



**Abb. 3.40:** Überlagerung der TMP-ADP (pink) und AZTMP-ADP-Strukturen (bunt) der menschlichen TMPK (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind die Substrate TMP/AZMP und ADP sowie die Seitenketten der Aminosäuren Asp15, Arg97, Phe105 und Gln157. Die Azidogruppe in AZTMP und das Wassermolekül 510 der TMP-ADP-Struktur sind durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

In dem Komplex mit AZTMP und AppNHp wird eine Mischung von AppNHp (Besetzung 2/3) und ADP (Besetzung 1/3) auf der Phosphoryldonorbindungsstelle beobachtet. Konsistent mit dieser Beobachtung ist, daß auch die Phosphorylgruppe von AZTMP in zwei Konformationen beobachtet wird. Die erste Konformation von AZTMP (modelliert mit einer Besetzung von 1/3) ist identisch zu der im Komplex mit AZTMP und ADP, die zweite Konformation (modelliert mit einer Besetzung von 2/3) wird der Besetzung der Triphosphatbindungsstelle mit AppNHp zugeordnet und hat die Phosphorylgruppe in einer leicht verschobenen Position (1.2 Å Bewegung zwischen den Phosphoratomen in beiden Konformationen). In dieser Konformation macht die Phosphorylgruppe von AZTMP (über OP1) nur eine Wechselwirkung zu Arg97 (NE, 3.1 Å). Zurückzuführen ist die Verschiebung der Phosphorylgruppe auf die Abstoßung der negativ geladenen Sauerstoffatome der terminalen Phosphorylgruppen beider Substrate, deren Abstand 3.0 Å betragen würde, wenn die Phosphorylgruppe von AZTMP in der ursprünglichen Position bleiben würde. In der verschobenen, AppNHp gebundenen Position beträgt der Abstand 3.5 Å. Das heißt, die Elektronendichte für diesen Komplex wird so interpretiert, daß sie zwei diskrete Zustände repräsentiert: Der Erste zeigt den AZTMP und ADP gebundenen Zustand mit einer Besetzung von 1/3, ein identischer Zustand zu dem des Komplexes der menschlichen TMPK mit AZTMP und ADP. Der zweite repräsentiert einen AZTMP und AppNHp gebundenen Zustand mit einer Besetzung von 2/3 und der AZTMP-Phosphorylgruppe in der leicht verschobenen Konformation. Überraschenderweise wird der P-loop mit voller Besetzung in der offenen Konformation beobachtet, obwohl die Phosphoryldonorbindungsstelle partiell mit AppNHp besetzt ist (Abb. 3.41). Im Gegensatz dazu, wird in dem analogen Komplex der TMPK mit TMP und AppNHp die P-loop partiell-geschlossene Konformation beobachtet (siehe Kapitel 3.2.9). Auch die Seitenkette des Asp15 verbleibt in der AZTMP-AppNHp-Struktur in der AZTMP-ADP gebundenen Position und rotiert nicht, wie in der TMP-AppNHp-Struktur in Richtung auf die funktionelle Gruppe an der 3'-Position des Monophosphates. Es wird lediglich eine leichte Rotation der Carboxylatgruppe von Asp15 um ca. 30° in der AZTMP-AppNHp-Struktur beobachtet, um die Abstoßung zu den Sauerstoffatomen der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe zu minimieren. Diese Rotation beschränkt sich jedoch auf die Carboxylatgruppe und unterscheidet sich drastisch von der Rotation der gesamten Seitenkette, die bei dem Komplex der TMPK mit TMP und AppNHp beobachtet wird. In dieser Position kann die Aspartatseitenkette weder mit Arg97 noch mit Gln157

interagieren, was zu der Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation in der TMP-AppNHp-Struktur entscheidend beiträgt.

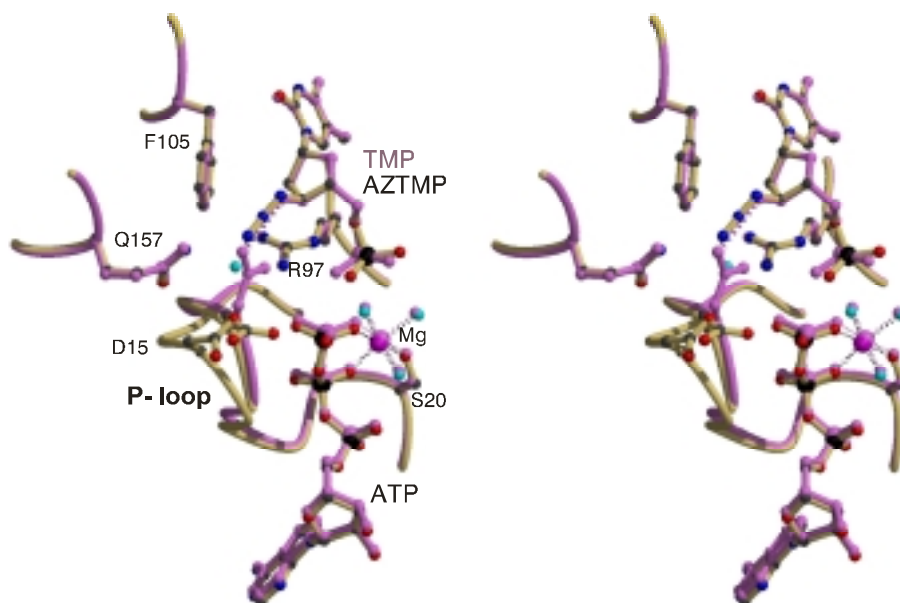


**Abb. 3.41:** Überlagerung der TMP-AppNHp (pink) und AZTMP-AppNHp-Strukturen (bunt) der menschlichen TMPK (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind die Nukleotide TMP/AZMP und AppNHp sowie die Seitenketten der Aminosäuren Asp15, Arg97, Phe105 und Gln157. In der AZTMP-AppNHp-Struktur verbleibt der P-loop aufgrund der Azidogruppe in der offenen Konformation und die Asp15 Seitenkette rotiert nicht in Richtung auf die Azidogruppe, da sie sonst mit dieser sterisch kollidieren würde. In dieser Konformation kann Asp15 weder mit Arg97 noch mit Gln157 interagieren. Für die TMP-AppNHp-Struktur sind die Wechselwirkungen zwischen Asp15 und Arg97 bzw. Gln157 als dicke gestrichelte Linien (pink) dargestellt.

### 3.3.4 Die AZTp5A-Struktur

Für die Struktur der menschlichen TMPK in Komplex mit AZTp5A ist ähnlich, wie für die Struktur mit Tp5A, keine Elektronendichte für die zweite Phosphorylgruppe ausgehend von der AZT-Seite sichtbar, so daß diese Phosphorylgruppe in dem Modell für AZTp5A nicht modelliert wurde. Die Elektronendichte für das mittlere Phosphat in AZTp5A ist sehr schwach, wurde jedoch in dem Modell für AZTp5A berücksichtigt. Im Gegensatz zu der Struktur im Komplex mit Tp5A ist die Elektronendichte für den P-loop in dieser Struktur von schlechter Qualität und bestimmt nicht eindeutig die zu bauende Konformation. Schließlich wurden zwei Konformationen des P-loops - die P-loop offene Konformation und die P-loop partiell-geschlossene Konformation - jeweils mit einer Besetzung von 0.5 modelliert. In der P-loop partiell geschlossenen Konformation verbleibt

die Carboxylatgruppe des Asp15 in der gleichen Position, wie in der P-loop offenen Konformation, so daß keine Wechselwirkungen zwischen Asp15 und Arg97 oder Gln157 stattfinden können. Eine modellierte Rotation würde zu einer sterischen Kollision zwischen Asp15 und der Azidogruppe führen. Im Gegensatz dazu wird in der Tp5A-Struktur die P-loop geschlossene Konformation mit voller Besetzung und eine Wechselwirkung zwischen Asp15 und der 3'-Hydroxylgruppe beobachtet (Abb. 3.42).



**Abb. 3.42:** Überlagerung der Tp5A (pink) und AZTp5A-Strukturen (bunt) der menschlichen TMPK (Stereobild). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind die im Modell berücksichtigten Gruppen der Binukleotide Tp5A und AZTp5A (gebaut sind TMP/AZTMP und ATP) sowie die Seitenketten der Aminosäuren Asp15, Arg97, Phe105 und Gln157. In der Tp5A-Struktur ist der P-loop in der geschlossenen Konformation und die Asp15 Seitenkette ist so positioniert, daß sie eine Wechselwirkung zu der 3'-OH-Gruppe von Tp5A und zu Arg97 macht (gestrichelte Linie (pink)). In der AZTp5A-Struktur ist der P-loop zu jeweils 50 % in der offenen bzw. partiell-geschlossenen Konformation. Auch in der partiell-geschlossenen Konformation verbleibt die Asp15 Seitenkette ungefähr an der gleichen Position, wie in der P-loop offenen Konformation, da sie sonst mit der Azidogruppe kollidieren würde. In dieser Konformation kann sie weder mit Arg97 noch mit Gln157 interagieren.

### 3.3.5 Mechanistische Diskussion - Die strukturelle Erklärung der schlechten AZTMP-Phosphorylierung durch die menschliche TMPK

Ein Vergleich der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP bzw. AZTMP verdeutlicht, warum AZTMP ein schlechtes Substrat der menschlichen TMPK ist. Im Gegensatz zu der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und AppNHp, in der die P-loop partiell-geschlossene Konformation beobachtet wird, induziert die Bindung des ATP-Analogen AppNHp in Gegenwart von AZTMP nicht den Übergang von der P-loop offenen zu der P-loop partiell-geschlossenen Konformation. Der P-loop verbleibt in der offenen Konformation. Gleichzeitig verbleibt die Asp15 Seitenkette in der ADP-gebundenen Position und rotiert nicht, wie in der TMP-AppNHp-Struktur, in Richtung auf das Monophosphat. In dieser Position kann Asp15 keine Wechselwirkungen mit Arg97 und Gln157 bzw. mit der funktionellen Gruppe an der 3'-Position ausbilden. Dieses sind Wechselwirkungen, die die P-loop partiell-geschlossene und P-loop geschlossene Konformation stabilisieren (siehe Kapitel 3.2.9). Würde die Aspartatseitenkette in der AZTMP-AppNHp-Struktur die gleiche Position einnehmen, wie in der TMP-AppNHp-Struktur, würde die Carboxylatgruppe mit der Azidogruppe von AZTMP kollidieren (modellierter Abstand 1.5 Å).

Da die P-loop partiell-geschlossenen und die P-loop geschlossenen Konformationen im Gegensatz zu der P-loop offenen Konformation als die katalytisch aktiven Zustände interpretiert werden (siehe Kapitel 3.2.15), und die Umsatzgeschwindigkeit der AZTMP-Phosphorylierung „nur“ um den Faktor 36 schlechter ist, als die von TMP, bedeutet das, daß die menschliche TMPK in Gegenwart von AZTMP trotz der größeren Azidogruppe eine aktive P-loop Konformation einnehmen kann. Sonst wäre AZTMP entweder kein Substrat der TMPK oder die Interpretation, daß nur die partiell-geschlossene oder geschlossene P-loop Konformation aktive Zustände sind, könnte nicht länger aufrecht erhalten werden. Eine solche "aktive" Konformation für das Substrat AZTMP zeigt die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTp5A. In dieser Struktur ist der P-loop teilweise (zu 50 %) in der partiell-geschlossenen Konformation mit der Asp15 Seitenkette in der nicht rotierten Konformation. Im Gegensatz dazu liegt in der Tp5A-Struktur die P-loop geschlossene Konformation vor und Asp15 macht eine Wasserstoffbrückenbindung zu der 3'-OH-Gruppe von TMP. Das bedeutet, daß die Azidogruppe in AZTMP die TMPK hemmt, die P-loop partiell-geschlossene und P-loop geschlossene Konformation einzunehmen. Dieses ist darauf zurückzuführen, daß die

Carboxylatgruppe von Asp15 in Gegenwart von ATZMP aus sterischen Gründen keine Wechselwirkungen zu Arg97 und Gln157 oder zu dem 3'-Substituenten eingehen kann, so daß wichtige Wechselwirkungen, die zu der Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen oder P-loop geschlossenen Konformation beitragen, nicht stattfinden können. Dieses steht im Einklang mit der Beobachtung, daß sich weder Kristalle der TMPK im Komplex mit AZTMP, ADP und  $\text{AlF}_3$  (für TMP wurde dieser Komplex entweder als substratgebundener, aktiver Komplex unmittelbar vor der Reaktion oder als Übergangszustandsmimik in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation interpretiert) noch mit den Produkten AZTDP und ADP (in dem analogen Komplex mit TDP wird eine zweizählige Wechselwirkung zwischen Asp15 und der 3'-Hydroxylgruppe und die P-loop geschlossene Konformation beobachtet) herstellen lassen.

Basierend auf die hier vorgestellten strukturellen Ergebnissen kann man für den katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK mit dem Substrat AZTMP folgende Hypothesen ableiten und diskutieren. Für TMP konnte gezeigt werden, daß im substratgebundenen Zustand (TMP-AppNHp-Struktur) die TMPK in einer aktiven, P-loop partiell-geschlossenen Konformation vorliegt und lediglich die TMP-Phosphorylgruppe eine leichte Bewegung durchführen muß, um in einer optimalen Position für den nukleophilen Angriff auf das  $\gamma$ -Phosphat des Phosphoryldonors zu sein. Für AZTMP ist in dem substratgebundenen Zustand neben der Phosphorylgruppe von AZTMP auch die TMPK in einer nicht aktiven P-loop offenen Konformation, so daß für die chemische Reaktion neben der Phosphorylgruppe von AZTMP auch das Protein eine Konformationsänderung zu der P-loop partiell-geschlossenen Konformation vollziehen muß. Es scheint, daß für AZTMP eine solche Konformationsänderung vor der chemischen Reaktion den limitierenden (geschwindigkeitsbestimmenden) Schritt der Gesamtreaktion darstellt und dieses AZTMP zu einem schlechten Substrat der menschlichen TMPK macht. Die Azidogruppe bewirkt, daß auch in dem substratgebundenen Zustand die P-loop partiell-geschlossene Konformation energetisch ungünstiger ist, als die P-loop offene Konformation, da viele Wechselwirkungen, die zu der Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation beitragen, aufgrund der Azidogruppe nicht stattfinden können. Die schlechten Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der menschlichen TMPK können jedoch nicht auf eine geringere Affinität von AZTMP im Vergleich zu TMP zurückgeführt werden, da die  $K_d$ -Werte beider Substrate (TMP und AZTMP) zu menschlicher TMPK relativ ähnlich sind (TMP  $27 \pm 3 \mu\text{M}$ , AZTMP  $8 \pm 3 \mu\text{M}$ , persönliche Mitteilung von Dr. Jochen Reinstein) und AZTMP sogar etwas stärker bindet als TMP.

### 3.3.6 Die NH<sub>2</sub>TMP-AppNHp Struktur offenbart die Gründe, warum NH<sub>2</sub>TMP im Gegensatz zu AZTMP ein gutes Substrat der menschlichen TMPK ist

Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit NH<sub>2</sub>TMP und AppNHp zeigt im Gegensatz zu den analogen Strukturen mit TMP (P-loop partiell-geschlossene Konformation) und AZTMP (P-loop offene Konformation) die P-loop geschlossene Konformation. Sowohl für beide Nukleotide als auch für den P-loop ist die Elektronendichte eindeutig, so daß beide Nukleotide mit voller Besetzung und ebenso wie der P-loop in nur einer Konformation modelliert wurden. Die Phosphorylgruppe von NH<sub>2</sub>TMP ist durch Wechselwirkungen zwischen OP1 und Arg97 (NE, 2.8 Å) sowie OP3 und Arg45 (NH<sub>2</sub>, 3.3 Å) positioniert. Das dritte Sauerstoffatom ist im 3.9 Å Abstand zu dem Phosphoratom der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp und macht keine Wechselwirkung zur TMPK. Arg97 macht über die Protonen des Stickstoffatoms NH<sub>2</sub> Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu einem Sauerstoffatom der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe (O3G, 2.8 Å) als auch zu der Seitenkette von Asp15 (OD1, 2.3 Å). Asp15 ist ähnlich positioniert, wie in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit Tp5A. Der Abstand zwischen der Aminogruppe von NH<sub>2</sub>TMP und beiden Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppe von Asp15 beträgt 3.4 Å. Diese Entfernung ist zu groß für Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Resten, die die beobachtete P-loop geschlossene Konformation erklären könnten. Es ist jedoch denkbar, daß bei dem für die Kristallisation verwendeten pH-Wert von 8.0 die Aminogruppe von NH<sub>2</sub>TMP protoniert ist und demnach auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Asp15 und der protonierten Aminogruppe von NH<sub>2</sub>TMP zu der Stabilisation der P-loop geschlossenen Konformation beitragen könnten.

Das heißt, daß NH<sub>2</sub>TMP, ähnlich wie das natürliche Substrat TMP und im Gegensatz zu AZTMP, im substratgebundenen Zustand die TMPK in einer aktiven Konformation stabilisiert, so daß die Hinreaktion ohne weitere Konformationsänderungen der TMPK stattfinden kann. Dieses erklärt warum NH<sub>2</sub>TMP ein gutes Substrat der menschlichen TMPK ist, aber nicht die 2.5mal langsamere Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zu TMP. Eine sichere Erklärung läßt sich aus dieser Struktur nicht ableiten. Man kann jedoch aufgrund der Struktur der TMPK im Komplex mit TDP und ADP, in der eine zweizählige Wechselwirkung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe von TMP und Asp15 beobachtet wird, folgendes überlegen. In einem hypothetischen Produktkomplex der TMPK mit NH<sub>2</sub>TDP und ADP sollte eine analoge Wechselwirkung aufgrund der zusätzlichen elektrostatischen Wechselwirkung stärker

sein, als in TMP. Demnach könnte die Produktfreisetzung von  $\text{NH}_2\text{TDP}$  langsamer sein als bei TMP und dieses der limitierende Faktor der Gesamtreaktion von  $\text{NH}_2\text{TMP}$  an TMPK sein. Für diese Hypothese gibt es zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine experimentellen Nachweise.

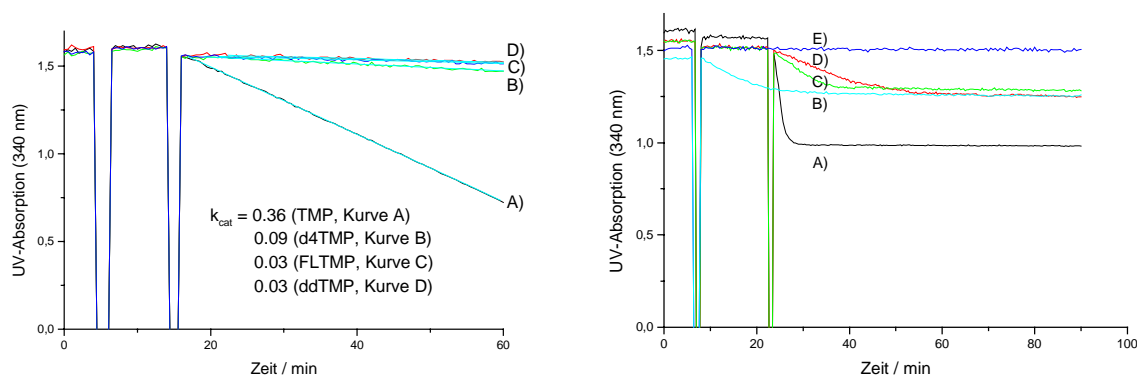


### 3.4 Struktur-Aktivitätsbeziehungen der antiviralen Vorläufermedikamente FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK

Neben AZT sind auch die meisten anderen nukleosidischen anti-AIDS Medikamente an der 3'-Position der Ribose modifiziert (siehe Abb. 1.3). Durch den Einbau in einen wachsenden DNA-Strang bewirken solche Nukleotide aufgrund des Fehlens der 3'-OH-Gruppe den Abbruch der Kettenverlängerung und zeichnen sich so durch eine besonders potente Wirksamkeit aus. Die intrazelluläre Aktivierung solcher nukleosidischer Vorläufermedikamente ist für die verschiedenen Medikamente jedoch sehr unterschiedlich effizient, wodurch die antivirale Wirksamkeit stark beeinträchtigt oder sogar verhindert werden kann. Für das rationale Design neuer und besserer nukleosidischer anti-AIDS Medikamente scheint es daher notwendig zu sein, neben der Kenntnis der Raumstruktur des Zielenzym RT, auch die Strukturen der an der Aktivierung beteiligten Kinasen zu berücksichtigen. Auch sollten die Informationen aus Struktur-Aktivitätsuntersuchungen möglichst vieler Nukleotidanaloga auf allen Stufen der Aktivierung in den Entwurf neuer Substrate mit einbezogen werden. Um den Einfluß des 3'-Substituenten des entsprechenden Nukleotids auf die Aktivität der menschlichen TMPK stärker zu durchleuchten, werden daher in diesem Kapitel durchgeführte Struktur-Aktivitätsuntersuchungen von FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK vorgestellt. Es wurden die  $k_{cat}$ -Werte aller drei Nukleotide zu menschlicher TMPK bestimmt und das kinetische Verhalten anhand der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit diesen drei Nukleotiden auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP bzw. AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle analysiert. Diese Ergebnisse, zusammen mit denen der vorangehenden Kapitel und den bekannten Strukturen der RT und der NDPK, sollten es ermöglichen oder dazu beitragen, neue Nukleosidderivate mit optimierten Eigenschaften zu entwerfen. Darüber hinaus sollten die Ergebnisse der menschlichen TMPK zusammen mit den Studien an Hefe und *E. coli* TMPK das Design von Mutanten der menschlichen TMPK mit verbesserten AZTMP-Substrateigenschaften und im Idealfall von Mutanten mit umgekehrter TMP- und AZTMP-Substratspezifität ermöglichen.

### 3.4.1 Steady-state kinetische Untersuchungen von FLTMP, d4TMP und ddTMP an menschlicher TMPK

FLTMP und d4TMP wurden von Dr. C. Meier synthetisiert und zur Verfügung gestellt. ddTMP wurde in Analogie zu  $\text{NH}_2\text{TMP}$  durch enzymatische Dephosphorylierung mit Phosphodiesterase aus dem Triphosphat erhalten. Die Bestimmung der  $k_{\text{cat}}$ -Werte erfolgte mit dem schon beschriebenen gekoppelten Enzymtest unter identischen Bedingungen. Die verwendeten Nukleosidmonophosphatkonzentrationen waren 250  $\mu\text{M}$  ddTMP, 181  $\mu\text{M}$  d4TMP oder 209  $\mu\text{M}$  FLTMP. Im linken Graphen der Abb. 3.43 sind exemplarisch Kurven für solche Messungen für alle drei Monophosphate (Kurve B für d4TMP, Kurve C für FLTMP und Kurve D für ddTMP), sowie zur Kontrolle von TMP (Kurve A) dargestellt. Eine lineare Regression mit dem Programm Origin lieferte die im Graphen dargestellten Geraden aus deren Steigungen die  $k_{\text{cat}}$ -Werte berechnet wurden (siehe dazu auch Kapitel 5.1.6). Um zu überprüfen, ob bei der Auswertung der Messungen für eines dieser Nukleotide ein Korrekturfaktor (aufgrund der Weiterreaktion des entsprechenden Diphosphates unter Verbrauch von NADH) eingeführt werden muß, wurden die Experimente mit 1  $\mu\text{M}$  TMPK und 41.5  $\mu\text{M}$  ddTMP (Kurve D des rechten Graphen), 30.1  $\mu\text{M}$  d4TMP (Kurve B des rechten Graphen) bzw. 34.8  $\mu\text{M}$  FLTMP (Kurve C des rechten Graphen) wiederholt. Die Kurven des rechten Graphen der Abb. 3.43 zeigen Abnahmen der optischen Dichte von 0.26 für ddTMP (Kurve D), 0.19 für d4TMP (Kurve C) und 0.22 für FLTMP (Kurve B), was der Oxidation von 41.6  $\mu\text{M}$ , 30.4  $\mu\text{M}$  bzw. 35.2  $\mu\text{M}$  NADH entspricht. Das bedeutet, daß die Abreaktion eines Äquivalentes des entsprechenden NMPs der Abreaktion eines Äquivalentes NADH entspricht und demnach die Kurven des linken Graphen der Abb. 3.43 ohne Korrekturfaktor nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel ausgewertet werden können. Die erhaltenen  $k_{\text{cat}}$ -Werte sind in Tabelle 3.8 im Vergleich zu denen von TMP, AZTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  wiedergegeben.



**Abb. 3.43:**  $k_{cat}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von d4TMP, FLTMP und ddTMP durch die menschliche TMPK. (siehe auch experimenteller Teil Kapitel 5.1.6; die verwendeten Konzentrationen sind im Text genannt). Links) Lineare UV-Absorptionsabnahmen aufgrund der durch die TMPK-Reaktion initiierten Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> für A) TMP, B) d4TMP, C) FLTMP und D) ddTMP; aus der Steigung der Geraden wurden nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel die  $k_{cat}$ -Wert berechnet; Rechts) Kontrollreaktionen die zeigen, daß pro FLTMP- (B), d4TMP- (C), und ddTMP- (D) Reaktionsäquivalent ein Äquivalent und pro TMP- (A) Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente NADH oxidiert werden. E) Kontrollreaktion ohne NMP.

**Tab. 3.8:** Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte von TMP, AZTMP, NH<sub>2</sub>TMP, FLTMP, d4TMP und ddTMP

Nukleotid	$k_{cat} / s^{-1}$
TMP	0.36
AZTMP	0.01
NH <sub>2</sub> TMP	0.14
FLTMP	0.03
d4TMP	0.09
ddTMP	0.03

Aus dem Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte wird deutlich, daß die Phosphorylierungsgeschwindigkeit von FLTMP und ddTMP unter den verwendeten Bedingungen gleich ist. Diese beiden NMPs werden unter den verwendeten Bedingungen 12fach langsamer durch die menschliche TMPK zu den entsprechenden Diphosphaten phosphoryliert als das natürliche Substrat TMP, aber 3fach schneller als AZTMP. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, daß sich FLTMP zwar auch in mit FLT inkubierten Zellen anreichert, aber die erreichbare FLTMP-Konzentration in MT4-Zellen (Kong et al., 1992) 2-3fach höher ist als die von AZTMP nach Inkubation von Zellen mit vergleichbaren Mengen des entsprechenden Nucleosids. Die *in vitro* Phosphorylierung

von d4TMP unter *steady-state* Bedingungen ist im Gegensatz dazu nur 4fach langsamer als die des TMPs und 3fach bzw. 9fach schneller als die von FLTMP und ddTMP bzw. AZTMP. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, daß sich d4TMP in mit d4T inkubierten Zellen, im Gegensatz zu FLTMP und AZTMP, nicht anreichert, sondern effizienter zu d4TDP umgesetzt wird. Bemerkenswert, aber nicht ungewöhnlich (Tourneux et al., 1998), ist jedoch, daß sich ein Unterschied in der *in vitro* Phosphorylierungsgeschwindigkeit um jeweils den Faktor 3 (in der Reihenfolge AZTMP < FLTMP < d4TMP) *in vivo* auf die Anreicherung des entsprechenden Monophosphates so drastisch auswirken kann, wie es oben beschrieben ist. Es ist denkbar, daß diese *in vitro* Experimente zwar die tendenzielle Richtung der *in vivo* Phosphorylierung richtig widerspiegeln, daß *in vivo* jedoch weitere Faktoren diesen Effekt verstärken. Um eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche kinetische Verhalten der Nukleotide zu erhalten und um den Einfluß des 3'-Substituenten auf die Aktivität der menschlichen TMPK stärker zu durchleuchten, werden in den folgenden Kapiteln die Strukturen der menschlichen TMPK mit FLTMP, d4TMP und ddTMP gelöst und mit denen der schon zuvor bestimmten Strukturen verglichen.

### **3.4.2 Kristallisation, Datensammlung und Strukturverfeinerung der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP-ADP, d4TMP-AppNHp, FLTMP-ADP, FLTMP-AppNHp, ddTMP-ADP und ddTMP-AppNHp**

Die Cokristallisation der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und ADP, d4TMP und AppNHp, FLTMP und ADP, FLTMP und AppNHp, ddTMP und ADP und ddTMP und AppNHp erfolgte nach der gleichen Methode und unter den gleichen Bedingungen, wie für die analogen Komplexe mit TMP bzw. AZTMP. Die Endkonzentrationen der Nukleotide in den einzelnen Komplexen waren jeweils 2 mM des entsprechenden Monophosphates (FLTMP, d4TMP oder ddTMP) und 2 mM ADP bzw. 20 mM AppNHp. Die Statistiken der Datensammlung sowie die verwendeten Röntgenquellen und Detektoren sind in Tabelle 3.9 zusammengefaßt.

Auch bei diesen Datensätzen handelt es sich um hoch aufgelöste Strukturen. Die Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und AppNHp ist mit einer Auflösung von 1.5 Å die am höchsten aufgelöste Struktur dieser Arbeit. Jedoch handelt es sich auch bei dieser Struktur noch nicht um eine atomar aufgelöste Struktur. Die Strukturverfeinerungen dieser Komplexe erfolgte nach der gleichen Methode, die auch für die zuvor beschriebenen Komplexe angewendet wurde. Die erste Runde der

Strukturverfeinerung erfolgte mit dem Programm XPLOR, gefolgt von wechselndem manuellem Verfeinern mit dem Programm O und automatischem Verfeinern mit dem Programm REFMAC. Automatisches Einfügen von Wassermolekülen erfolgte mit dem Programm ARP (siehe auch Kapitel 3.2.3). Die Bestimmung der Besetzung von Aminosäuren bzw. Nukleotiden in mehreren Konformationen erfolgte auch hier durch die visuelle Beurteilung von Differenzelektronendichtekarten, bei denen die entsprechenden Reste aus dem Modell herausgenommen oder mit unterschiedlichen Besetzungen modelliert wurden. Die Statistiken der verfeinerten Strukturen der in diesem Kapitel vorgestellten Komplexe sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

**Tab. 3.9:** Statistik der Datensammlung und Datenreduktion der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP, d4TMP und ddTMP

	FLTMP ADP	FLTMP AppNHp	d4TMP ADP	d4TMP AppNHp	ddTMP ADP	ddTMP AppNHp
Röntgenquelle	X11/DESY Hamburg	X11/DESY Hamburg	X11/DESY Hamburg	X11/DESY Hamburg	ID2/ESRI	Drehanode Dortmund
Wellenlänge (Å)	0.9076	0.9076	0.9076	0.9076	0.9887	CuK $\alpha$
Detektor	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345	MAR345
Temperatur (K)	100	100	100	100	100	100
Auflösung (Å)	1.70	1.60	1.55	1.50	1.55	1.90
Zahl der Reflexe						
alle gemessenen	137414	169968	165795	182998	119378	127182
unabhängigen	28602	34069	37349	41213	35723	20663
Vollständigkeit (%)						
alle Reflexe	97.5	98.1	98.4	98.4	96.4	99.1
äußere Schale	99.3	98.9	96.8	99.8	94.7	99.8
R <sub>sym</sub> <sup>1</sup> (%)						
alle Reflexe	8.0	5.0	4.2	5.0	7.3	4.9
äußere Schale	28.3	26.4	32.2	31.1	36.4	30.5
Signal/Rausch- Verhältnis (I/ $\sigma$ )						
alle Reflexe	10.61	16.54	40.29	15.11	7.24	18.96
äußere Schale	X3.94	4.78	8.49	3.65	1.32	3.31
Raumgruppe	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P <sub>4</sub> <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Elementarzelle (Å)						
a = b	101.510	101.260	101.000	101.100	100.535	101.426
c	50.010	49.780	49.840	49.800	49.963	49.322
$\alpha = \beta = \gamma$	90	90	90	90	90	90
Moleküle/asy. Einheit	1	1	1	1	1	1

<sup>1</sup>  $R_{\text{sym}} = \sum_{hkl, i} |I_{hkl, i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl, i} I_{hkl, i}$

**Tab. 3.10:** Statistik der Strukturverfeinerungen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP, d4TMP und ddTMP

	FLTMP ADP	FLTMP AppNHp	d4TMP ADP	d4TMP AppNHp	ddTMP ADP	ddTMP AppNHp
Auflösungsbereich (Å)	32.1-1.70	35.8-1.60	35.7-1.55	35.5-1.50	50.3-1.60	71.7-1.90
Zahl der Reflexe ( $F > 0 \sigma$ )						
Arbeitssatz	25759	30665	33602	37062	29245	18558
Testsatz	2842	3400	3748	4146	3235	2103
$R_{\text{cryst}}^1$ (%)	18.3	17.5	18.5	19.2	21.1	17.8
$R_{\text{free}}^2$ (%)	22.8	22.0	22.5	21.5	26.5	24.1
Standardabweichung der						
Bindungslängen (Å)	0.013	0.010	0.010	0.009	0.014	0.013
Bindungswinkel (°)	1.4	1.5	1.5	1.6	1.7	1.9
Anzahl der Atome						
Protein <sup>3</sup>	1651	1642	1771	1611	1642	1708
Nukleotide <sup>4</sup>	48	100*	47	51	47	51
Metalle (Mg-Ionen)	2	2	2	2	2	2
Wasser	323	353	317	297	305	281
Durchschnittliche						
B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )						
Hauptkettenatome	20.3	16.1	14.6	16.2	24.9	24.0
Seitenkettenatome	23.4	18.6	19.7	19.6	28.5	28.3
Nukleotide	18.7	14.7	15.2	16.6	24.5	24.8
Mg-Ionen	19.7	14.2	15.5	16.8	25.7	26.4
Wassermoleküle	36.1	33.7	33.0	33.3	41.8	39.8

<sup>1</sup>  $R_{\text{cryst}} = \sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - |F_{\text{calc}}(\text{hkl})| | / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})|$

<sup>2</sup>  $R_{\text{free}} = R_{\text{cryst}}$ , berechnet für ca. 10 % willkürlich ausgewählter Reflexe (Testsatz), die bei der Verfeinerung ausgeschlossen wurden (Brünger, 1992)

<sup>3</sup> Zahlen beinhaltet Atome von Aminosäuren, die in zwei Konformationen, als Alanin oder gar nicht modelliert wurden (für eine detaillierte Auflistung siehe Anhang Kapitel 6.3).

<sup>4</sup> Die mit \* gekennzeichnete Zahl beinhalten Atome, die in 2 Konformationen modelliert sind.

### 3.4.3 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP und ADP bzw. FLTMP und AppNHp

Beide Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und entweder ADP oder AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle sind nahezu identisch und zeigen die P-loop offene Konformation innerhalb der global geschlossenen Proteinkonformation. In der FLTMP-ADP-Struktur sind die Nukleotidbindungsstellen zu 100 % mit FLTMP und ADP besetzt und die Elektronendichte definiert eindeutig die Konformationen beider Nukleotide. Die FLTMP-Ribose ist ebenso wie die von TMP und AZTMP in den analogen Strukturen in der 2'-endo Konformation. Ein Vergleich der FLTMP-ADP-Struktur mit der TMP-ADP-Struktur zeigt, daß beide Strukturen nahezu identisch sind (sowohl die Proteinreste als auch die Nukleotide). In beiden ADP-Strukturen liegt eine sehr ähnliche Wasserstruktur zwischen dem P-loop und dem jeweiligen Monophosphat vor, einschließlich des

Wassermoleküls 510, daß in beiden Strukturen in einem Abstand für eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem 3'-Substituenten in TMP bzw. FLTMP ist. Diese Wasserstruktur trägt in beiden Komplexen entscheidend zu der Stabilisation der P-loop offenen Konformation bei. Lediglich Teile der LID-Region (Aminosäuren 144 - 149) sind nicht in der identischen Position in beiden Strukturen. Dieses ist auf die schlechten Qualität der Elektronendichte für diesen Bereich insbesondere in der FLTMP-ADP-Struktur zurückzuführen. Dieses kommt auch durch die sehr hohen B-Faktoren in diesem Bereich (ca. 3mal so hohe B-Faktoren, wie der Durchschnitt des gesamten Proteins) für diese Struktur zum Ausdruck.

In der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP und AppNHp ist im Gegensatz zu der FLTMP-ADP-Struktur die Besetzung der Nukleotide nicht eindeutig definiert und es wird eine Mischung von ADP und AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle und zwei Konformationen für die Phosphorylgruppe von FLTMP beobachtet. Die visuelle Inspektion von Differenzelektronendichtekarten, bei denen die entsprechenden Bereiche aus dem Modell entfernt wurden, ergibt schließlich, daß, ähnlich wie bei den TMP-AppNHp und AZTMP-AppNHp-Strukturen, die Elektronendichte zwei diskrete Substratzustände beschreibt. Der Erste ist (Besetzung von 1/3) identisch zu dem der zuvor beschriebenen FLTMP-ADP-Struktur mit ADP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle und der FLTMP-Phosphorylgruppe in der gleichen Position, wie in der FLTMP-ADP-Struktur. Der Zweite ist (Besetzung von 2/3) mit AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle und der FLTMP-Phosphorylgruppe in einer leicht verschobenen Position, so daß die Sauerstoffatome keine Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg97, sondern zu Arg45 ausbilden. Diese FLTMP-Konformation ist identisch zu der TMP-Konformation in dem analogen Komplex mit TMP und AppNHp.

In der FLTMP-AppNHp-Struktur verdrängt die  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp zwar auch die Wassermoleküle 507 und 508, jedoch induziert sie nicht den Übergang von der P-loop offenen in die P-loop partiell-geschlossene Konformation. Im Gegenteil, der P-loop verbleibt nahezu an der identischen Position, wie in der FLTMP-ADP-Struktur. Lediglich die Carboxylatgruppe des Asp15 dreht sich um  $45^\circ$  im Vergleich zu der FLTMP-ADP-Struktur, um die Abstoßung zu der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp zu minimieren. Im Gegensatz dazu induziert die Anwesenheit der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp in der TMP-AppNHp-Struktur den Übergang von der P-loop offenen zu der P-loop partiell-geschlossenen Konformation und eine Rotation der gesamten Asp15 Seitenkette in das aktive Zentrum in Richtung auf die 3'-OH-Gruppe von TMP. Für AZTMP ist aus sterischen Gründen eine analoge Bewegung des P-loops zusammen mit der Rotation der

Asp15 Seitenkette nicht möglich, da die Carboxylatgruppe des Asp15 mit der Azidogruppe kollidieren würde. Da das Fluoratom an der 3'-Position in FLTMP jedoch kleiner ist als die Hydroxylgruppe in TMP, kann das Verbleiben des P-loop in der offenen Konformation in dem FLTMP-AppNHp Komplex nicht auf sterische Hinderungen zwischen Asp15 und dem 3'-Substituent zurückgeführt werden. Aus diesen Strukturen wird nicht unmittelbar deutlich, warum der P-loop in der FLTMP-AppNHp-Struktur in der offenen Konformation verbleibt. Möglich ist jedoch, daß im Fall von FLTMP elektrostatische Gründe eine entscheidende Rolle spielen. Das Fluoratom trägt drei nicht bindende Elektronenpaare, die in der P-loop geschlossenen Konformation zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den nichtbindenden Valenzelektronenpaaren des Fluoratoms und denen der Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe führen können. In der P-loop partiell-geschlossenen Konformation würde die Entfernung zwischen Asp15 und dem Fluoratom jedoch noch ca. 3.4 Å betragen, so daß die Abstoßung sehr schwach wäre, was anscheinend jedoch ausreicht, um die P-loop partiell-geschlossene Konformation energetisch ungünstiger zu machen, als die P-loop offene Konformation. Diese Interpretation bedeutet, daß beide P-loop Konformationen (offen und partiell-geschlossen) energetisch sehr ähnlich sein müssen, und daß sehr geringe Einflüsse ausreichen (z. B. eine einzige Wasserstoffbrückenbindung), um die energetische Lage zwischen beiden Konformationen umzukehren.

Mit dieser Interpretation kann auch das differenzierte kinetische Verhalten zwischen FLTMP, TMP und AZTMP erklärt werden. Unter *steady-state* Bedingungen wird FLTMP im Gegensatz zu AZTMP (36fach langsamer als TMP) nur 12fach langsamer durch die menschliche TMPK zum Diphosphat phosphoryliert als TMP, aber 3fach schneller als AZTMP. Basierend auf die hier vorgestellten Ergebnisse kann man folgern, daß vermutlich auch für FLTMP eine Konformationsänderung vor der chemischen Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist, ähnlich wie für AZTMP. Jedoch scheint für FLTMP die Energiebarriere zwischen den beiden P-loop Konformationen nicht so groß zu sein, wie für AZTMP, da bei FLTMP keine sterischen Hinderungen in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation auftreten. Alternativ zu dieser Erklärung kann man jedoch auch in Erwägung ziehen, daß eine Konformationsänderung während oder nach der chemischen Reaktion zu der im TDP-ADP-Komplex beobachteten P-loop geschlossenen Konformation den limitierenden Faktor der Gesamtreaktion darstellt. Mit FLTMP kann die in der TDP-ADP-Struktur beobachtete zweizählige Wechselwirkung zwischen Asp15 und der 3'-OH-Gruppe (3'-



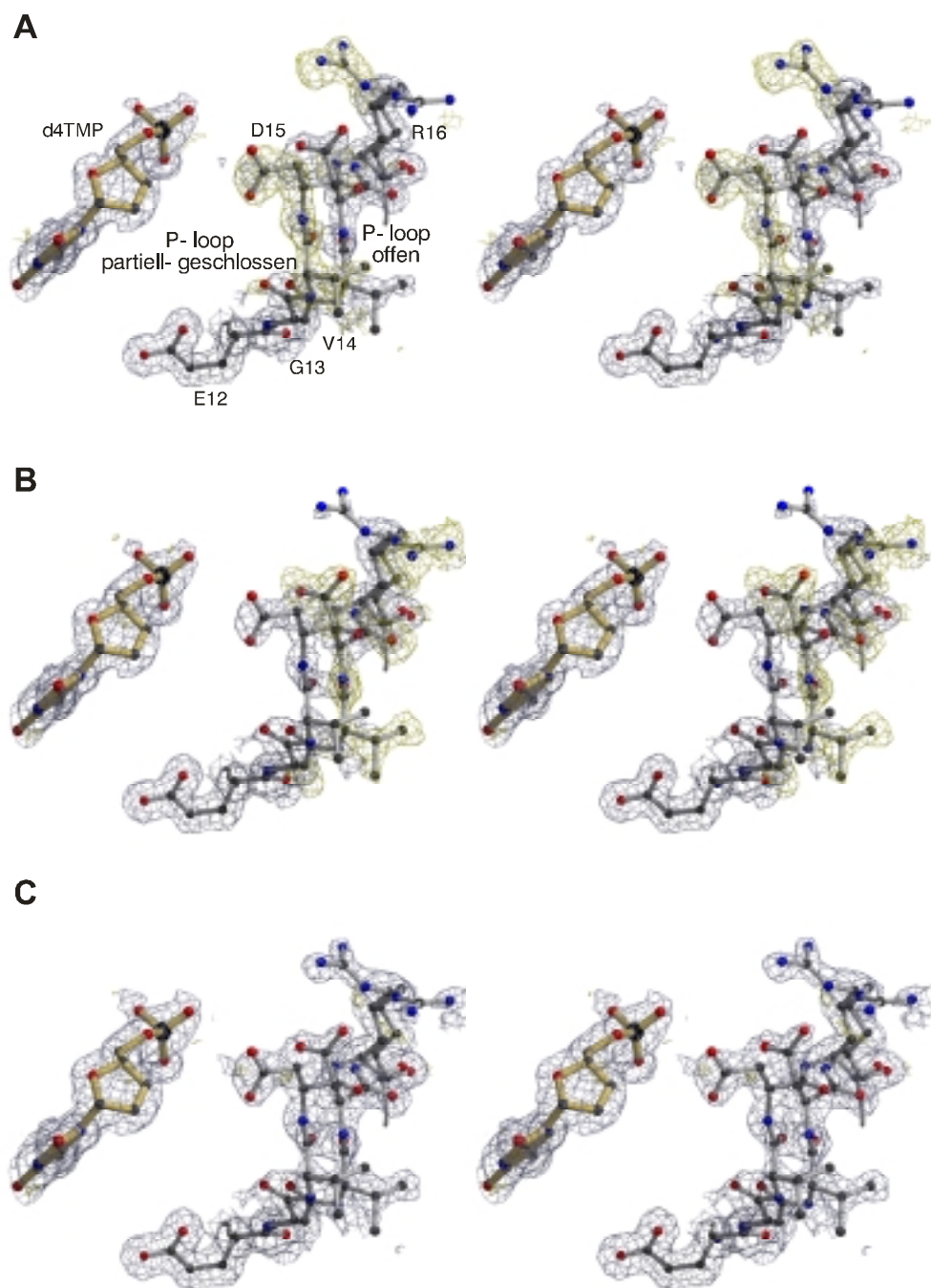
Fluoratom in FLTMP) nicht stattfinden, außer man nimmt an, daß Asp15 protoniert ist. Für eine solche Interpretation liegen jedoch keine experimentellen Daten vor.

#### 3.4.4 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und ADP bzw. d4TMP und AppNHp

Im Gegensatz zu AZTMP und FLTMP reichert sich d4TMP nicht in mit d4T inkubierten Zellen an, sondern wird durch TMPK effizienter zu d4TDP phosphoryliert als die beiden erst genannten Derivate (siehe Kapitel 1.4). Diese *in vivo* Beobachtung ist konsistent mit den in dieser Arbeit bestimmten *steady-state* kinetischen Daten der Umsatzgeschwindigkeiten der genannten NMPs an isolierter menschlicher TMPK. d4TMP wird nur 4fach langsamer phosphoryliert als das natürliche Substrat TMP, 9fach schneller als AZTMP und 3fach schneller als FLTMP und ddTMP. Um den strukturellen Einfluß des Fehlens der 3'-OH-Gruppe und der unterschiedlichen Zuckerpackung aufgrund der Doppelbindung zwischen den Atomen C2' und C3' zu untersuchen, wurden auch die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP bzw. AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle gelöst.

In der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex d4TMP und ADP wird volle Besetzung für beide Nukleotide und jeweils nur eine Konformation für beide Substrate beobachtet. Im Gegensatz zu der eindeutigen Konformation der Nukleotide liegt der P-loop in zwei Konformationen vor. Eine Konformation ist die P-loop offene Konformation (Besetzung von 0.5), die auch in allen anderen Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit einem NMP und ADP vorliegt. Die andere Konformation ist die P-loop partiell-geschlossene Konformation, die mit dem natürlichen Substrat TMP nur in Anwesenheit eines Triphosphates (AppNHp) auf der Phosphoryldonorbindungsstelle beobachtet wird. Da die d4TMP-ADP-Struktur die Struktur mit der höchsten Auflösung (1.55 Å) ist, bei der der P-loop in zwei Konformationen vorliegt, wird in Abb. 3.44 an diesem Beispiel verdeutlicht, wie die Ermittlung der Besetzung von doppelten Konformationen erfolgte. Zuerst wurden jeweils Differenzelektronendichtekarte (sigma A gewichtete  $2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$  und  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarten) für jeweils eine der beiden Konformationen mit voller Besetzung berechnet. In beiden Fällen ist deutlich Elektronendichte für die nicht modellierte P-loop Konformation sichtbar, so daß anschließend beide Konformationen gleichzeitig mit partieller Besetzung modelliert wurden. Die Besetzungen wurde solange variiert, bis für beide Konformationen in der

$mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte keine Elektronendichte mehr zu beobachten war. Auch wurden die B-Faktoren der entsprechenden Reste beider Konformationen berücksichtigt.

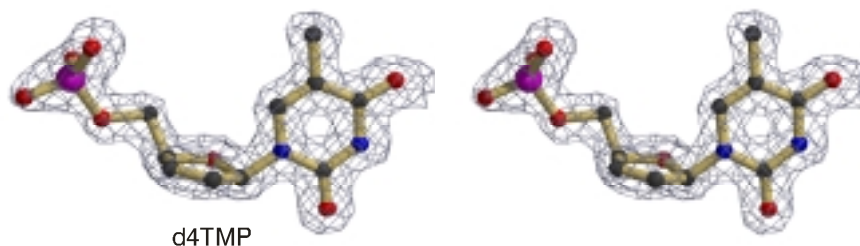


**Abb. 3.44:** Bestimmung der Besetzung von doppelten Konformationen am Beispiel der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und ADP bei einer Auflösung von 1.55 Å (Stereobilder). Dargestellt als *ball and stick* Präsentation sind die Aminosäuren Glu12, Gly13, Val14, Asp15 und Arg16 des P-loops und d4TMP. Dem Endmodell überlagert sind die zugrundeliegenden sigma A gewichteten  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$  (grau, konturiert bei 1.2  $\sigma$  für A und B bzw.

0.8  $\sigma$  für C) und  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$  (gelb, konturiert bei 2.5  $\sigma$ ) Elektronendichtekarten nach der Verfeinerung mit verschiedenen Besetzungen für die P-loop offene bzw. partiell-geschlossene Konformation. A) 100 % Besetzung der P-loop offenen Konformation; in der  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte ist deutlich Dichte für die nicht modellierte P-loop partiell-geschlossene Konformation sichtbar. B) 100 % Besetzung der P-loop partiell-geschlossenen Konformation; in der  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte ist deutlich Dichte für die nicht modellierte P-loop offene Konformation sichtbar. C) 50 % Besetzung der P-loop offenen und 50 % Besetzung der P-loop partiell-geschlossenen Konformation (berechnet für das Endmodell); in der  $mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarte ist keine Dichte sichtbar. Deutlich zu sehen ist, dass für Glu12 die Elektronendichte eindeutig ist.

Die doppelte Konformation des P-loop in diesem Komplex ist bemerkenswert, da in allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit einem anderen NMP außer d4TMP (also TMP, AZTMP, FLTMP und ddTMP) auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle die P-loop offene Konformation vorliegt. Das bedeutet, daß diese Beobachtung ausschließlich auf die Anwesenheit von d4TMP zurückzuführen ist und daß der Zustand des P-loops (offen, partiell-geschlossen oder geschlossen) durch die Variation der Nukleotide auf beiden Nukleotidbindungsstellen beeinflusst wird.

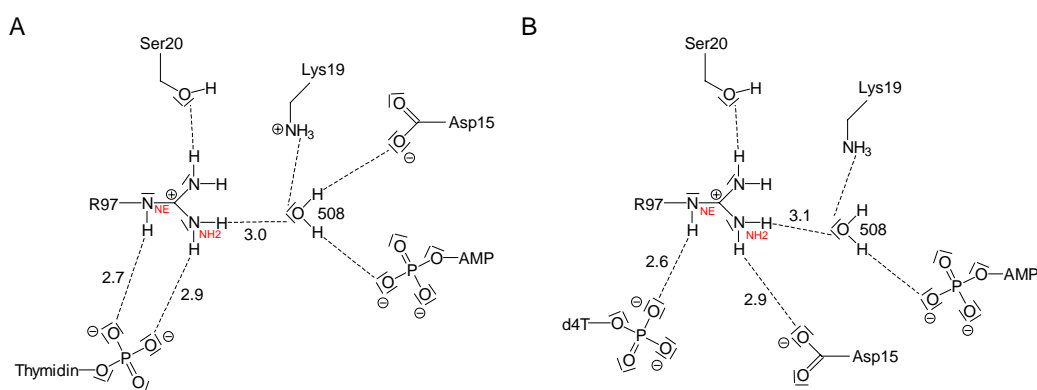
Die Position der d4TMP-Base wird durch die Modifikation des Zuckers nicht beeinflusst. Alle Wechselwirkungen zwischen TMPK und der d4TMP-Base sind identisch zu denen, die für TMP in Kapitel 3.2.6 vorgestellt wurden. Im Gegensatz zu der 2'-endo Konformation der TMP-, FLTMP-, AZTMP- und  $\text{NH}_2$ TMP-Ribosen sind in d4TMP die Atome C1', C2', C3' und C4' aufgrund der Doppelbindung zwischen den Atomen C2' und C3' in einer Ebene angeordnet (Abb. 3.45).



**Abb. 3.45:** Planare Anordnung der Atome C1', C2', C3' und C4' in d4TMP aus der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit d4TMP und AppNhp (Stereobild). Überlagert ist die dem

Modell für d4TMP zugrundeliegende sigma A gewichtete  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte bei einer Auflösung von  $1.5 \text{ \AA}$  (konturiert bei  $1.5 \sigma$ ).

Die Phosphorylgruppe von d4TMP macht nur eine Wasserstoffbrückenbindung über OP3 zu NE von Arg97 ( $2.6 \text{ \AA}$ ). Die Phosphorylgruppe ist so positioniert, daß gleichzeitig eine Wechselwirkung über OP1 zu NH2 von Arg45 ( $3.1 \text{ \AA}$ ) vorliegt und das dritte ungebundene Sauerstoffatom der Phosphorylgruppe keine Wechselwirkung zu der TMPK macht. Es ist dieses Sauerstoffatom, daß dem Phosphoryldonor zugerichtet ist. Die Position der Phosphorylgruppe ist ähnlich zu der von TMP in der TMP-ADP- $\text{AlF}_3$ -Struktur. In allen anderen NMP-ADP-Strukturen macht das angreifende Sauerstoffatom eine Wechselwirkung zu NH2 von Arg97. Gleichzeitig macht NH2 von Arg97 in allen NMP-ADP-Strukturen eine Wechselwirkung zu Wasser 508. Für beide Bindungen muß das Stickstoffatom (NH2) des Arg97 als Protonendonator fungieren. Da dieses Stickstoffatom lediglich zwei Protonen zur Verfügung hat, kann es keine weitere Wasserstoffbrückenbindung eingehen, in der es als Protonendonator fungieren muß. In dem Komplex mit d4TMP und ADP macht NH2 von Arg97 dahingegen aufgrund der unterschiedlichen Position der d4TMP-Phosphorylgruppe nur eine Wechselwirkung zu Wasser 508, so daß das andere H-Atom von NH2 für eine weitere H-Brücke zur Verfügung steht. Eine solche Wechselwirkung wird in der P-loop partiell-geschlossenen Konformation zu der Carboxylatgruppe der rotierten Asp15 Seitenkette beobachtet (Abb. 3.46).



**Abb. 3.46:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wechselwirkungen des Arg97 in den Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP (A) und d4TMP und ADP (B) aufgrund der unterschiedlichen Positionierung der Phosphorylgruppe des entsprechenden Monophosphates.

Das heißt, aufgrund der anderen Konformation der Phosphorylgruppe in d4TMP ist NH<sub>2</sub> von Arg97 auch in dem ADP gebundenen Zustand in der Lage mit Asp15 zu interagieren und so die P-loop partiell-geschlossene Konformation zu stabilisieren. Für TMP muß zunächst ADP durch AppNHp verdrängt werden, was zu einer Verschiebung der TMP-Phosphorylgruppe führt, so daß im Fall von TMP das Arg97 nur im AppNHp gebundenen Zustand mit Asp15 interagieren kann. Darüber hinaus kann d4TMP keine Wechselwirkung zu Wasser 510 machen, da die 3'-OH-Gruppe fehlt. In der TMP-ADP-Struktur wird jedoch eine solche Wechselwirkung beobachtet, die zu der Stabilisation des Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen dem P-loop und TMP beiträgt und so auch zu der Stabilisation der P-loop offenen Konformation. Das Resultat dieser beiden Beobachtungen (mögliche Wechselwirkung von Arg97 zu Asp15 für die Stabilisierung der P-loop partiell-geschlossenen Konformation aufgrund der Positionierung der Phosphorylgruppe von d4TMP und das Fehlen der Wechselwirkung zwischen Wasser 510 und der nicht vorhandenen 3'-OH-Gruppe in d4TMP) ist, daß im ADP gebundenen Zustand beide Konformationen (P-loop offen und P-loop partiell-geschlossen) energetisch gleich zu sein scheinen, da beide Konformationen mit gleicher Besetzung beobachtet werden. In dem AppNHp gebundenen Zustand liegt nur die P-loop partiell-geschlossene Konformation vor, da durch die Bindung von AppNHp die P-loop offene Konformation weiter destabilisiert wird (siehe Kapitel 3.2.15).

Die d4TMP-Strukturen erklären, warum d4TMP ein besseres Substrat ist als AZTMP und FLTMP. Im Gegensatz zu AZTMP und FLTMP ist die P-loop partiell-geschlossene Konformation im d4TMP-AppNHp gebundenen Zustand die begünstigte Konformation, so daß vor der chemischen Reaktion keine Änderung der Proteinkonformation stattfinden muß, was für die beiden anderen Substrate als limitierender Faktor der Gesamtreaktion vermutet wird. Über die Gründe warum d4TMP 4fach langsamer als TMP durch die menschliche TMPK phosphoryliert wird, kann nur spekuliert werden. Für TMP wurde gezeigt, daß in dem produktgebundenen Zustand (TDP-ADP-Struktur) eine zweizählige Wechselwirkung zwischen Asp15 und der 3'-OH-Gruppe vorliegt. Das heißt, daß sich diese Wechselwirkung entweder während der Reaktion oder während einer Konformationsänderung nach der Reaktion ausbildet. Für d4TMP ist dieses nicht möglich, da die 3'-OH-Gruppe fehlt und demnach steht die Energie aus der Bildung einer solchen Wechselwirkung für die Reaktion bzw. einer Konformationsänderung nach der Reaktion nicht zur Verfügung. Denkbar ist auch, daß die Konformationsänderung des Produktes d4TDP zu einer analogen TDP-Konformation in dem TDP-ADP-Komplex aufgrund der planaren Zuckerpackung gehemmt ist und daher

die verminderte Aktivität stammt. Eine Konformationsänderung vor der Reaktion als limitierender Faktor der Gesamtreaktion für d4TMP kann aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse jedoch nahezu ausgeschlossen werden.

### **3.4.5 Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit ddTMP und ADP bzw. ddTMP und AppNHp**

Um die im vorangehenden Kapitel gemachten Aussagen zu überprüfen und daraufhin zu untersuchen welcher Faktor, das Fehlen der 3'-OH-Gruppe oder die Doppelbindung in der Zuckerpackung und die damit verknüpfte Positionierung der d4TMP-Phosphorylgruppe, stärker zum schließen des P-loops beiträgt und sich damit positiv auf die Katalyse auswirkt und welcher Faktor eher die katalytische Aktivität beeinträchtigt, wurden auch die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit ddTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP bzw. AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle gelöst. In ddTMP fehlt die 3'-OH-Gruppe, der Rest des Zuckers ist jedoch unverändert.

Die ddTMP-ADP-Struktur zeigt die P-loop offene Konformation der TMPK und beide Nukleotide mit voller Besetzung in nur einer Konformation. Die ddTMP-Ribose ist in der 2'-endo Konformation und die Phosphorylgruppe in einer ähnlichen Position, wie auch bei den analogen Komplexen mit den Substraten TMP, AZTMP und FLTMP, und sie macht zwei Wechselwirkungen zu Arg97 (2.8 Å zwischen OP3 und NH2 bzw. 2.8 Å zwischen OP1 und NE). Das heißt, daß das Fehlen der 3'-OH-Gruppe mit der damit verbundenen Destabilisation des Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen dem P-loop und ddTMP (aufgrund der fehlenden Wechselwirkung zwischen ddTMP und Wasser 510) nicht ausreicht, um die P-loop partiell-geschlossene Konformation energieärmer als die P-loop offenen Konformation zu machen. Das bedeutet, daß für d4TMP die Positionierung der Phosphorylgruppe aufgrund der modifizierten Zuckerpackung der entscheidende Grund für die beobachtete P-loop Konformation ist.

In der ddTMP-AppNHp-Struktur werden beide Nukleotide mit voller Besetzung und in nur einer Konformation beobachtet. Die Phosphorylgruppe von ddTMP ist in der verschobenen Position, ähnlich wie es auch für die anderen NMP-AppNHp-Strukturen beobachtet wird, und sie macht eine Wechselwirkung zu Arg45. Der P-loop wird in zwei Konformationen (P-loop offen und P-loop partiell-geschlossen) mit jeweils gleicher Besetzung (0.5) beobachtet. Im Gegensatz zu d4TMP ist selbst in Gegenwart von AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle für ddTMP die P-loop partiell-

geschlossene Konformation gegenüber der P-loop offenen nicht begünstigt, was die unterschiedlichen Aktivitäten beider Substrate gegenüber menschlicher TMPK erklären kann. Jedoch kann man anhand dieser Strukturen nicht erklären, warum die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten von ddTMP und FLTMP an menschlicher TMPK gleich langsam sind. Eine detaillierte kinetische Analyse ist erforderlich, um zu untersuchen, ob für beide Substrate der gleiche Schritt (z. B. eine Konformationsänderung vor der Reaktion) der Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen von ddTMP und d4TMP an menschlicher TMPK Hinweise darauf geben, wie das Fehlen der 3'-OH-Gruppe der Ribose des Phosphorylakzeptors die Substrateigenschaften des entsprechenden NMPs gegenüber der menschlichen TMPK vermindern. Die planare Anordnung der Atome C1', C2', C3' und C4' der d4TMP-Ribose aufgrund der Doppelbindung zwischen den Atomen C2' und C3' bewirkt, daß die d4TMP-Phosphorylgruppe keine Wechselwirkung zu NH<sub>2</sub> von Arg97 macht und demnach ein H-Atom von NH<sub>2</sub> des Arg97 für eine Wechselwirkung mit Asp15 zur Verfügung steht. Dadurch ist die P-loop partiell-geschlossene Konformation gegenüber der P-loop offenen Konformation begünstigt, so daß für d4TMP im substratgebundenen Zustand keine Änderung der Proteinkonformation für die chemische Reaktion erforderlich ist. Die aufgezwungene Zuckerkonformation in d4TMP scheint die aufgrund des Fehlens der 3'-OH-Gruppe verminderte Aktivität von ddTMP teilweise zu kompensieren. Aus diesen Strukturen wird deutlich sichtbar, daß die Aktivität der untersuchten Nukleotide mit der P-loop Konformation im substratgebundenen Zustand korreliert. Die Substrate, die die menschliche TMPK im substratgebundenen Zustand in die P-loop partiell-geschlossene oder P-loop geschlossene Konformation drängen, haben höhere Aktivität als die Substrate, die die menschliche TMPK im substratgebundenen Zustand in die P-loop offene Konformation drängen.

### 3.5 Design von Nukleotidanaloga basierend auf die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen verschiedener NMPs an menschlicher TMPK

Die in dieser Arbeit vorgestellten Struktur-Aktivitätsuntersuchungen der verschiedenen NMPs (TMP, AZMTP, NH<sub>2</sub>TMP, FLTMP, d4TMP und ddTMP) an Thymidylatkinase sollten es ermöglichen, neue Derivate zu entwerfen, die besser von menschlicher TMPK zu den entsprechenden NDPs phosphoryliert werden. Wenn sich diese Derivate für einen Einsatz in der HIV-Therapie bewähren sollen, müssen die Diphosphate dieser Derivate durch NDPK effektiv zu den entsprechenden Triphosphaten phosphoryliert werden, welche ihrerseits selektive Inhibitoren der HIV-RT sein müssen. Daher sollen gleichzeitig auch die Kenntnisse aus den Strukturen der NDPK im Komplex mit AZTDP (Bourdais et al., 1996) und der RT im Komplex mit einem DNA-Template:Primer und einem Desoxynukleosidtriphosphat (Huang et al., 1998) mit in den Entwurf dieser Derivate einfließen. Kenntnisse über die TK müssen nicht zwingend berücksichtigt werden, da die erste Stufe der Aktivierung, die Phosphorylierung des entsprechenden Nucleosids zum NMP durch das von Meier et al. (1997, 1998) entwickelte Pronucleotidkonzept umgangen werden kann (siehe Einleitung, Kapitel 1.3). Da die menschliche TMPK im Vergleich zu der NDPK eine höhere Substratspezifität hat (bevorzugt werden TMP und dUMP als Substrate akzeptiert) und darüber hinaus TMPK ( $0.36 \text{ s}^{-1}$  für TMP mit ATP als Phosphoryldonor) eine ca. 2200fach langsamere Kinase als NDPK ( $800 \text{ s}^{-1}$  für TDP mit ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-GTP als Phosphoryldonor, Bourdais et al., 1996) ist, ist die effiziente Phosphorylierung durch TMPK entscheidend für die ausreichende Aktivierung des entsprechenden Nucleosids.

Die hohe Substratspezifität der menschlichen TMPK limitiert die möglichen Positionen für das Einfügen von Modifikationen in Thymidinanaloga. Eine Überlagerung aller in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen der menschlichen TMPK zeigt, daß die Positionierung der Thymidinbase durch die Modifikationen an der Ribose in den verschiedenen NMPs nicht beeinflusst wird und in allen Strukturen identisch ist (siehe Kapitel 3.2.6). Die direkte Wechselwirkung von Carbonyl O4 zu Arg76 und die indirekten Wechselwirkungen von N3 und Carbonyl O2 der Thymidinbase zu Tyr151, Thr106 und Gly102 über stark gebundene Wassermoleküle, zusammen mit der Notwendigkeit von Carbonyl O4 und N3 für die Erkennung der richtigen Base während der DNA-Synthese und der Watson-Crick-Basenpaarung nach Einbau in einen DNA-Strang mit der komplementären Base, verhindern Modifikationen an diesen Positionen der Thymidinbase. Im Gegensatz dazu ist die Methylengruppe an Position 5 nicht in direktem

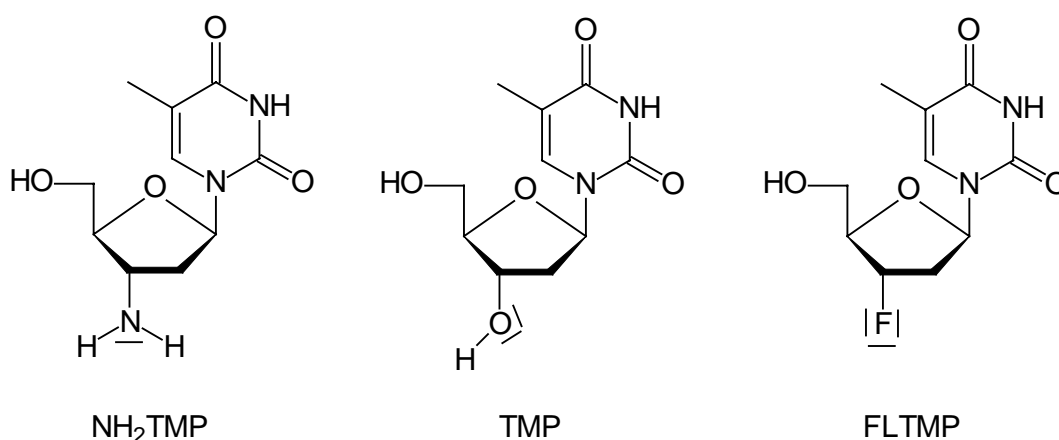


Kontakt zu irgendeinem Rest der TMPK (nächste Abstand ist 3.4 Å zu der Rückgrat-Carbonylgruppe von Phe42), so daß eine Substitution durch einen ähnlich großen oder etwas größeren Rest, wie ein Brom- oder Jodatome, die Phosphorylierungsaktivität durch TMPK nicht beeinflussen sollte. Diese Hypothese ist konsistent mit der Beobachtung, daß solche Substanzen durch zelluläre Kinasen effektiv zum Triphosphat phosphoryliert werden und aufgrund ihrer Toxizität für den Gebrauch als antivirale Medikamente ungeeignet sind. Die Substitution der Methylengruppe durch einen größeren Rest (z. B. Bromvinyl, wie in dem anti-HSV Nukleosid BVDU, E-5-(2-bromvinyl)-2'-desoxyuridin, (Jeffries und De Clercq, 1995)) sollte im Gegensatz dazu eine Phosphorylierung durch menschliche TMPK verhindern. Dieses steht im Einklang mit dem hohen therapeutischen Index von BVDU gegenüber verschiedenen Herpes-Viren, da BVDU im Gegensatz zu der menschlichen TMPK ein Substrat der HSV-TK, die auch TMPK-Aktivität hat, ist und daher hauptsächlich in HSV-infizierten Zellen phosphoryliert wird.

Auch sind mögliche Modifikationen an der Ribose begrenzt, da die Positionierung von Phe105 in TMPK (diskriminiert gegenüber Ribonukleotiden) das Einführen von Substituenten an der 2'-Position verhindert. Die 3'-Position der Ribose scheint die beste Position zu sein, um Modifikation einzufügen. Zwar zeigen die Studien dieser Arbeit, daß alle hier untersuchten Modifikationen der TMP-Ribose zwar die katalytische Aktivität der TMPK negativ beeinflussen, daß aber beispielsweise die Substitution der 3'-Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe die Aktivität nur geringfügig herabsetzt, so daß  $\text{NH}_2\text{TMP}$  ein ausreichend gutes Substrat der menschlichen TMPK ist, damit es intrazellulär effizient phosphoryliert wird. Auch kann das Fehlen der 3'-OH-Gruppe durch Beeinflussung der Zuckerpackung in d4TMP partiell kompensiert werden, so daß sich d4TMP nicht in mit d4T inkubierten Zellen anreichert. Mit Blick auf die Inhibition der RT sind Modifikationen an der 3'-Position des Nukleosidderivates besonders wirksam (zeigt sich auch darin, daß die meisten anti-HIV Medikamente an dieser Position modifiziert sind), da durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe die Kettenverlängerung eines wachsenden DNA-Stranges irreversibel gestoppt wird, sobald ein solches NMP einmal in einen wachsenden DNA-Strang eingebaut ist. Dazu kommt, daß die RT im Gegensatz zu den zellulären DNA-Polymerasen mit Blick auf den 3'-Substituenten des NTPs geringere Substratspezifität aufweist. Größere Substituenten, wie die Azidogruppe an der 3'-Position werden von der RT toleriert, von den zellulären Polymerasen dahingegen nicht, was den hohen therapeutischen Index von AZTTP erklärt. Demnach ist AZT im Prinzip ein optimales Medikament, dessen Wirkung lediglich durch die schlechte Phosphorylierung durch TMPK begrenzt wird.

### 3.5.1 Einfluß des 3'-Substituenten des NMPs auf die P-loop Konformation der menschlichen TMPK, die auch mit der Aktivität korreliert

Aus den Struktur-Aktivitätsuntersuchungen der in dieser Arbeit untersuchten NMPs an TMPK wird deutlich, daß die Aktivität der menschlichen TMPK mit der beobachteten P-loop Konformation in Abhängigkeit der verschiedenen Substrate korreliert. Die Substrate, die die P-loop partiell-geschlossene oder P-loop geschlossene Konformation der TMPK begünstigen (TMP, NH<sub>2</sub>TMP und d4TMP), werden besser phosphoryliert als die Substrate, die die P-loop offene Konformation begünstigen (FLTMP, ddTMP und AZTMP). Dabei kommen sterische Gründe stärker zum Tragen als elektronische, so daß von den hier untersuchten Derivaten AZTMP das schlechteste Substrat der menschlichen TMPK ist. Vergleicht man die Strukturen der menschlichen TMPK mit den Substrate NH<sub>2</sub>TMP, TMP und FLTMP auf der Monophosphatbindungsstelle und AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle wird deutlich, daß die P-loop Konformation mit der Anzahl der Wasserstoffatome oder umgekehrt mit der Anzahl der nicht-bindenden Elektronenpaare des 3'-Substituenten korreliert (Abb. 3.47).



#### P-loop Konformation und $k_{\text{cat}}$ -Werte

geschlossen  
0.14 s<sup>-1</sup>

partiell-geschlossen  
0.36 s<sup>-1</sup>

offen  
0.03 s<sup>-1</sup>

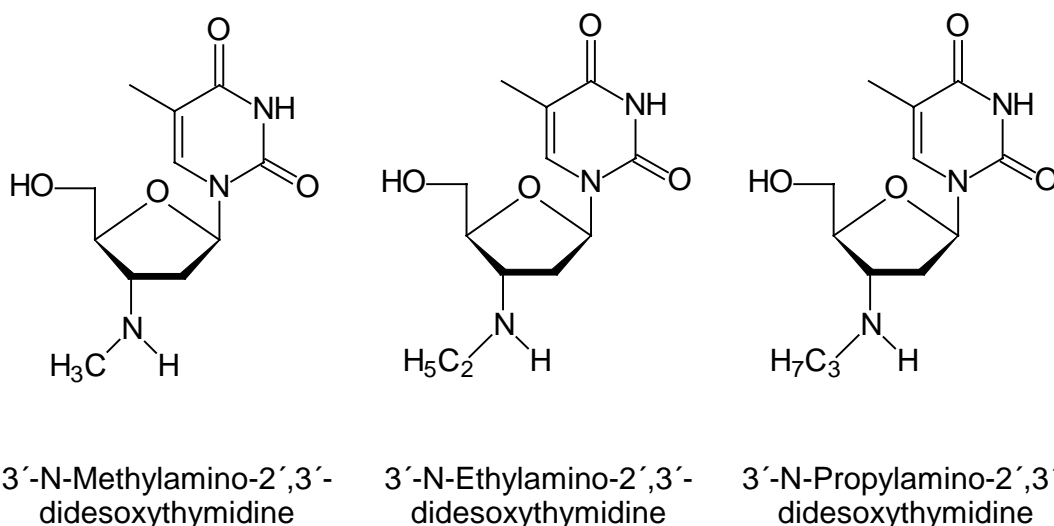
**Abb. 3.47:** Korrelation des P-loops Zustandes der menschlichen TMPK im substratgebundenen Zustand (NMP-AppNHp) mit der Zahl der nicht-bindenden Elektronenpaare bzw. des Protonierungsgrades des 3'-Substituenten verschiedener NMPs.

Im nicht protonierten Zustand trägt das Stickstoffatom der Aminogruppe in  $\text{NH}_2\text{TMP}$  zwei Wasserstoffatome und es hat ein nicht-bindendes Elektronenpaar (für die Annahme, daß bei dem für die Kristallisation verwendeten pH-Wert von 8.0 die Aminogruppe protoniert ist, sind es drei Wasserstoffatome und kein nicht-bindendes Elektronenpaar) und der P-loop wird in der voll geschlossenen Konformation beobachtet ( $\text{NH}_2\text{TMP}$ -AppNHp-Struktur). Das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe in TMP hat ein Wasserstoffatom und zwei nicht-bindende Elektronenpaare und der P-loop wird in der partiell-geschlossenen Konformation beobachtet (TMP-AppNHp-Struktur). Im Gegensatz zu den beiden erst genannten Nukleotiden hat das Fluoratom in FLTMP kein Wasserstoffatom, aber drei nicht-bindende Elektronenpaare und der P-loop liegt in der offenen Konformation vor (FLTMP-AppNHp-Struktur). Da TMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  beides gute Substrate der menschlichen TMPK sind und mit beiden Substraten die P-loop (partiell)-geschlossenen Konformationen die bevorzugten Konformationen sind, in denen eine Wechselwirkung zu der Asp15 Carboxylatgruppe möglich ist und auch beobachtet wird, scheint die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen Asp15 und dem 3'-Substituenten für die katalytische Aktivität der menschlichen TMPK sehr wichtig zu sein. Drei nicht-bindende Elektronenpaare beim Fluoratom in FLTMP scheinen dahingegen aus elektronischen Gründen eine Wechselwirkung mit der Asp15 Seitenkette zu verhindern bzw. vorzubeugen, indem die P-loop offene Konformation begünstigt ist, was sich in der verminderten katalytischen Aktivität dieses Derivates widerspiegelt.

### 3.5.2 N-alkylierte $\text{NH}_2\text{TMP}$ -Derivate als potentielle Kandidaten für einen Einsatz in der HIV-Therapie

Nicht nur für die menschliche TMPK (siehe oben) sondern auch für die NDPK scheint es wichtig zu sein, daß der 3'-Substituent des Phosphorylakzeptors als Protonendonator für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung steht. Für NDPK konnte gezeigt werden, daß die 3'-Hydroxylgruppe von TDP als Wasserstoffatomdonor für eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem  $\beta$ -Phosphat von TDP benötigt wird, um die Positionierung des  $\beta$ -Phosphates von TDP zu stabilisieren. Diskutiert wird auch eine direkte Beteiligung der 3'-OH-Gruppe an der Katalyse (Bourdais et al., 1996). Anhand dieser Überlegungen und der Beobachtung, daß  $\text{NH}_2\text{TMP}$  ein gutes Substrat der TMPK ist, sollten 3'-N-Alkylderivate des  $\text{NH}_2\text{TMP}$ s wie 3'-N-Methylamino-3'-desoxythymidin, 3'-N-Ethylamino-3'-desoxythymidin, oder 3'-N-Propylamino-3'-desoxythymidin ( $\text{NH}(\text{CH}_3)\text{TMP}$ ,  $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{TMP}$  oder  $\text{NH}(\text{C}_3\text{H}_7)\text{TMP}$ ) (Abb. 3.48), bei denen ein

Wasserstoffatom der Aminogruppe für die genannten Wechselwirkungen unbeeinflusst bleibt, mögliche Kandidaten mit akzeptablen oder sogar optimierten Phosphorylierungseigenschaften von TMPK und auch NDPK sein.



**Abb. 3.48:** Strukturformeln der vorgeschlagenen N-alkylierten  $\text{NH}_2\text{TMP}$ -Derivate als potentielle Kandidaten für einen Einsatz in der HIV-Therapie.

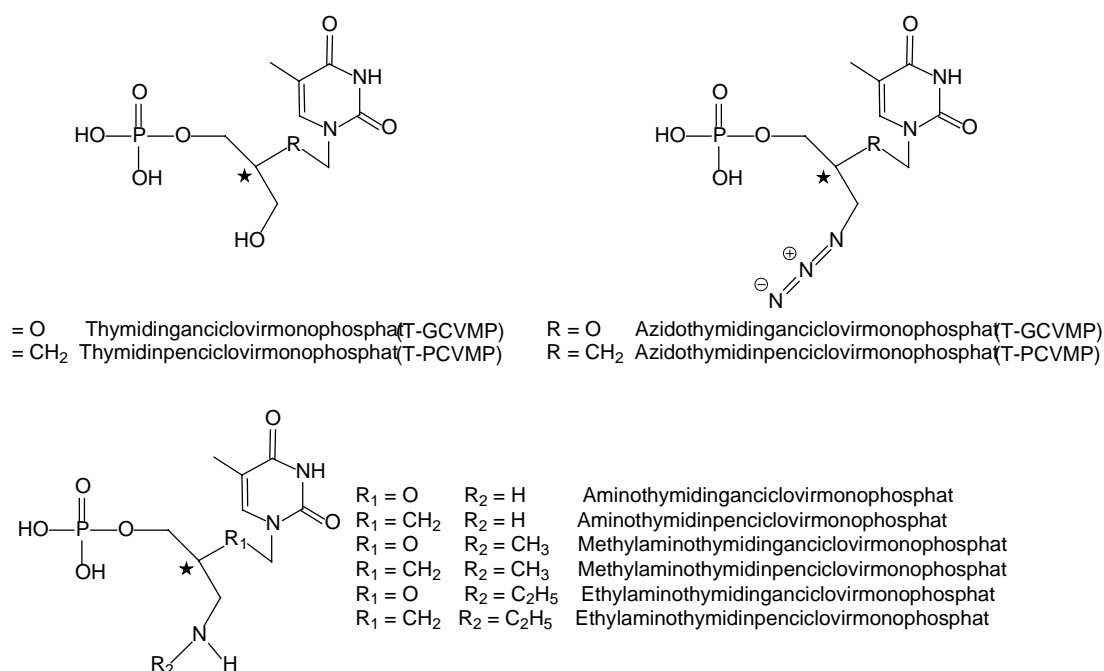
Im Gegensatz zu  $\text{NH}_2\text{TMP}$  sollte der größere Substituent an der 3'-Position in diesen Derivaten, ähnlich wie für AZT, die Selektivität gegenüber der RT erhöhen, so daß toxische Effekte auf nicht infizierte Zellen minimiert werden. Ein größerer Alkylrest (Ethyl, oder Propyl) sollte stärker gegenüber die zellulären Polymerasen diskriminieren als ein kleinerer (Methyl), wobei die Inhibitoreigenschaften gegenüber der RT nicht merklich beeinflußt werden sollten. Für  $\text{NH}(\text{CH}_3)\text{TTP}$  und  $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{TTP}$  konnte im Gegensatz zu  $\text{NH}_2\text{TTP}$  tatsächlich eine selektive Inhibition der RT beobachtet werden, wobei die Selektivität von  $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{TTP}$  ähnlich gut ist, wie die von AZTTP (Jasko et al., 1995). Für diese beiden Substanzen konnte jedoch *in vivo* (in MT4 Zellen) keine Inhibition der HIV-1 Reproduktion nachgewiesen werden, was vermutlich auf eine unzureichende Aktivierung durch eines der beteiligten Enzyme zurückgeführt werden kann (Jasko et al., 1995). Wenn der erste Schritt der Aktivierung, katalysiert durch TK, der limitierende Schritt in der Aktivierung ist, sollte das von Meier et al. (1997, 1998) entwickelte Pronukleotidkonzept helfen, diese Stufe der Aktivierung zu umgehen. Sollte entgegen der Erwartungen (die Alkylaminogruppe sollte im Gegensatz zu der starren Azidogruppe in AZTMP in der Lage sein, eine solche Position einzunehmen, daß die P-loop geschlossene Konformation durch den Alkylrest sterisch nicht behindert wird und daß das Proton der Aminogruppe

dem Asp15 zugerichtet ist und für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung steht) der zweite durch TMPK katalysierte Schritt die Aktivierung dieser Derivate limitieren, besteht immer noch die Möglichkeit, daß die Mutanten der menschlichen TMPK mit verbesserten AZTMP-Substrateigenschaften (siehe folgendes Kapitel), die ja auch die größere Azidogruppe tolerieren, auch diese Derivate als Substrate akzeptieren. Für diesen Fall wäre man auch bei diesen Derivaten auf genetische Pharmakomodulation angewiesen. Die letzte Stufe der Aktivierung, katalysiert durch NDPK, sollte nicht limitierend sein, da das Wasserstoffatom der Aminogruppe die geforderte Wechselwirkung zu einem Sauerstoffatom des  $\beta$ -Phosphates eingehen kann. Auch für den Fall, daß die N-alkylierten  $\text{NH}_2\text{TDP}$  Derivate keine sehr guten Substrate der NDPK sind, sollte die Phosphorylierungsgeschwindigkeit dennoch ausreichend schnell sein, da NDPK eine sehr schnelle Kinase ist. Da diese Derivate sehr selektive Substrate der RT sind, sollte die Aktivierung der einzelnen Stufen für diese Substrate in nachfolgenden Arbeiten detailliert untersucht und gegebenenfalls, wie oben beschrieben, verbessert werden.

### 3.5.3 Azyklische Thymidinderivate

Die auf sterische Gründe zurückzuführende verminderte Aktivität der menschlichen TMPK mit dem Substrat AZTMP gibt Anlaß zu einem Versuch neue Thymidinnukleoside zu entwerfen. Um die Flexibilität der durch die Packung der Ribose vorgegebenen Konformation der „starr“ Azidogruppe in AZTMP zu erhöhen, werden, in Anlehnung an die azyklischen anti-Herpes Nukleosidanaloga Ganciclovir (GCV) und Penciclovir (PCV), azyklische Thymidinanaloga, in denen die 2'-Methylengruppe fehlt, vorgeschlagen (Abb. 3.49). Die azyklische Natur solcher Derivate sollte es erlauben, daß sich auch ein größerer 3'-Substituent im Vergleich zu der OH-Gruppe (zur Übersichtlichkeit wird die Nukleotidnomenklatur verwendet) leichter der Proteinkonformation anpassen kann, so daß diese durch den 3'-Substituenten nicht mehr beeinflußt werden sollte. Denkbar sind einerseits AZT-Derivate wie AZT-GCV, bei dem lediglich die 2'-Methylengruppe der Ribose fehlt, oder AZT-PCV, bei dem zusätzlich das O4'-Atom der Ribose gegen eine Methylengruppe ausgetauscht ist. Um den Einfluß der Azidogruppe auf die Aktivität der TMPK in diesen azyklischen Derivaten zu bestimmen, sollten auch die analogen Derivate des Thymidins mit der 3'-OH-Gruppe (T-GCV und TPCV) hergestellt und untersucht werden. Darüber hinaus sind auch azyklische Derivate denkbar bei denen sich an der 3'-Position eine Aminogruppe oder eine N-

Alkylaminogruppe befindet, ähnlich wie für die im vorangehenden Kapitel vorgestellten  $\text{NH}_2\text{TMP}$ -Derivate.



**Abb. 3.49:** Strukturformeln der vorgeschlagenen azyklischen TMP, AZTMP, und  $\text{NH}_2\text{TMP}$ -Derivate. Die Konformation des mit dem Sternchen gekennzeichneten C-Atoms muß für die Monophosphate in der S-Konformation vorliegen, damit sich die Atome der azyklischen Ribose in einer ähnlichen Position, wie in den zyklischen Nukleotiden, anordnen können.

Dr. C. Meier hat die Monophosphate der azyklischen Derivate T-GCV, T-PCV, AZT-GCV und AZT-PCV als Razemate synthetisiert und für die Charakterisierung der Eigenschaften gegenüber der menschlichen TMPK zur Verfügung gestellt. Alle vier Derivate zeigen *in vitro* (nach dem gekoppelten Enzymtest, der auch für die anderen in dieser Arbeit untersuchten Nukleotide angewendet wurde) keine meßbare TMPK-Aktivität (persönliche Mitteilung von Dr. J. Reinstein und T. Veit). Eine vorläufige kristallographische Analyse (die Kristallisationsbedingungen sowie die Datenauswertung dieser Komplexe erfolgte in Analogie zu den zuvor beschriebenen Komplexen, wird hier allerdings nicht detailliert aufgeführt, da die abschließende Verfeinerung dieser Modelle nicht mehr im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde) der Monophosphatderivate T-GCVMP, T-PCVMP und AZT-PCVMP im Komplex mit der menschlichen TMPK und ADP bzw. AppNHp zeigt, daß in allen Komplexen tatsächlich die voll geschlossene P-loop Konformation der menschlichen TMPK vorliegt, auch in Anwesenheit der Azidogruppe. Aus der vorläufigen Analyse wird deutlich, daß vermutlich

nur die S-Enantiomere der Monophosphate an die TMPK gebunden sind. Für eine endgültige Aussage müssen die Strukturen jedoch vollständig verfeinert werden. Zurückzuführen ist die geschlossene P-loop Konformation auf die Flexibilität des 3'-Substituenten, aufgrund einer möglichen Rotation von C3' um die Bindung C3'-C4' als Resultat der azyklischen Struktur dieser Derivate. Die Flexibilität dieses Restes kommt in den Strukturen dadurch zum Ausdruck, daß für die funktionelle Gruppe an der 3'-Position keine oder nur sehr schwache Elektronendichte sichtbar ist. Die azyklische Struktur der Ribose dieser Derivate hat allerdings auch zur Folge, daß neben dem 3'-Substituenten auch die Phosphorylgruppe durch mögliche Rotation um die Bindung zwischen C4' und O4' bzw. die analoge Bindung in den PCV-Derivaten, in denen das O-Atom gegen eine Methylengruppe ausgetauscht ist, beweglicher ist (relativ schlechte Elektronendichte für die Phosphorylgruppe), so daß sie der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von AppNHp viel stärker ausweicht und in einer stark verschobenen Konformation beobachtet wird. Als Resultat dieser unterschiedlichen Positionierung der Phosphorylgruppe der azyklischen NMPs liegt auch die Seitenkette des Arg97 in der rotierten Konformation vor, ähnlich wie es in der TDP-ADP-Struktur beobachtet wird. In dieser Konformation ist die Phosphorylgruppe in einer sehr ungünstigen Position für einen nukleophilen Angriff auf die zu Übertragende Phosphorylgruppe des Triphosphates und gleichzeitig kann Arg97 weder als Klammer agieren, um beide Substrate zueinander zu bringen, noch kann es in dieser Position mit dem  $\gamma$ -Phosphat von AppNHp interagieren, um den Übergangszustand (negative Ladungen abschirmen) zu stabilisieren. Die verfeinerten Strukturen dieser azyklischen Nucleosidderivate sind erforderlich, um diese Derivate weiter zu entwickeln. z. B. kann durch gezieltes Einfügen von Doppelbindungen in die azyklische Seitenkette der PCV-Derivate versucht werden, die Positionierung der Phosphorylgruppe ähnlich zu beeinflussen, wie es für d4TMP der Fall ist (siehe Kapitel 3.4.4), ohne jedoch die Flexibilität des 3'-Substituenten einzuschränken.

### 3.6 Rationales Design von Mutanten der menschlichen TMPK mit umgekehrter AZTMP- und TMP-Substratspezifität für den Einsatz in der genetischen Pharmakomodulation

Aus dem vorangehenden Kapitel wird deutlich, daß prinzipiell das rationale Design neuer Nukleosidderivate für einen möglichen Einsatz in der HIV-Therapie unter der Berücksichtigung der Strukturen aller an der Aktivierung beteiligten Stufen als auch des Zielenzym RT denkbar und möglich ist, sich aber als sehr schwierig erweist. Auch für den Fall, daß sich tatsächlich potente Derivate mit einer sehr guten intrazellulären Aktivierung entwickeln lassen, ist es möglich, daß sich diese Substanzen *in vivo* als toxisch erweisen und sich demnach nicht für einen Einsatz in der HIV-Therapie eignen. Daher stellt der Versuch, die Wirkung bekannter Medikamente, deren Effizienz durch eine unzureichende intrazelluläre Aktivierung begrenzt ist, durch Optimierung der Metabolisierung zu verbessern, eine sinnvolle und, wie in der Einleitung erläutert, vielversprechende Alternative zu der Entwicklung neuer Substanzen dar. AZT zeichnet sich durch eine besonders hohe Selektivität gegenüber der RT aus. Auftretende toxische Nebenwirkungen bei Patienten, die mit AZT behandelt werden, sind hauptsächlich auf die unzureichende Metabolisierung und das damit verbundene Auftreten von partiell aktivierten Intermediaten (insbesondere AZTMP) begrenzt. Wie in der Einleitung erläutert und von Guettari et al. (1997) am Beispiel der HSV-TK gezeigt, ist es möglich, durch genetische Pharmakomodulation die intrazelluläre AZT-Aktivierung zu verbessern und dadurch die Wirksamkeit von AZT zu erhöhen. Da AZTMP kein gutes Substrat der HSV-TK ist und HSV-TK nicht selektiv AZT bzw. AZTMP phosphoryliert, ist der erzielte Effekt auf die zu erreichende AZTTP-Konzentration nur gering. Sie reicht jedoch aus, um die Virusreplikation in mit HIV-infizierten Zellen, die das HSV-TK Gen tragen und die HSV-TK exprimieren, mit relativ geringen AZT-Konzentrationen zu unterdrücken. Durch die Wahl einer geeigneteren TMPK, die effektiv und selektiv AZTMP phosphoryliert, sollte der erzielte Effekt bei noch geringeren AZT-Konzentrationen deutlich verbessert werden. Darüber hinaus sollte durch Gebrauch von Mutanten der menschlichen TMPK mit möglichst wenigen Veränderungen eine Immunantwort auf das Fremdgen oder Genprodukt minimiert werden. Daher werden in diesem Kapitel, die auf die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die menschliche und *E. coli* TMPK zusammen mit dem bekannten Wissen über die Hefe und *E. coli* TMPK aus vorangehenden Studien entworfenen Mutanten der menschlichen TMPK vorgestellt und auf ihre *in vitro* AZTMP-Phosphorylierungseigenschaften untersucht. Um geeignete Kandidaten für einen Einsatz



in Form der gentherapeutischen Pharmakomodulation für eine optimierte AZT Aktivierung darzustellen, sollten diese Mutanten im Idealfall spezifisch und selektiv AZTMP phosphorylieren.

### 3.6.1 Initiale Mutationsstudien

Die ersten Ideen für das Design von Mutanten der Hefe und menschlichen TMPK wuchsen aus den Strukturen der Hefe TMPK im Komplex mit TMP und AZTMP. Um der beobachteten P-loop Verschiebung um 0.5 Å in der Struktur der Hefe TMPK im Komplex mit AZTMP im Vergleich zu der TMP-Struktur aufgrund der größeren Azidogruppe in AZTMP vorzubeugen, wurde das Asp14 (in Hefe TMPK) bzw. Asp15 (in menschlicher TMPK) zu kleineren Aminosäuren mutiert (Die Mutationsstudien wurden von Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiers durchgeführt). Auch wurden viele andere Mutationen dieser Aminosäure auf die AZTMP-Aktivität getestet (für Hefe TMPK D14X mit X = Ala, Ile, Asn, Ser, Cys, His und Glu; für menschliche TMPK D15X mit X = Ala, Asn und Glu) (Brundiers et al., 1999). Jedoch führt jede Mutation des P-loop Aspartats, sowohl für die Hefe als auch der menschlichen TMPK, zu einem inaktiven Enzym sowohl in Bezug auf das natürliche Substrat TMP als auch AZTMP (Brundiers et al., 1999). Die kristallographische Analyse der menschlichen TMPK erklärt zumindest teilweise dieses Verhalten für die menschliche TMPK, obwohl die Rolle des Asp15 noch immer nicht vollständig verstanden ist. Es scheint, daß Asp15 eine sehr wichtige Rolle spielt, um die P-loop partiell-geschlossene und geschlossene Konformationen zu stabilisieren, die als die katalytisch aktiven Konformationen interpretiert werden. Um in dieser Funktion Wasserstoffbrücken sowohl zum Arg97 als auch zum Gln157 ausbilden zu können, müssen beide Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe von Asp15 als Protonenakzeptor fungieren, was bei den meisten getesteten Mutationen nicht möglich ist. In der Asp15Glu-Mutation ist vermutlich die Seitenkette des Glutamats zu lang, so daß hier sterische Hinderungen eine entscheidende Rolle spielen könnten.

### 3.6.2 Die F105Y-Mutante – eine Mutante mit umgekehrter AZTMP und TMP Substratspezifität

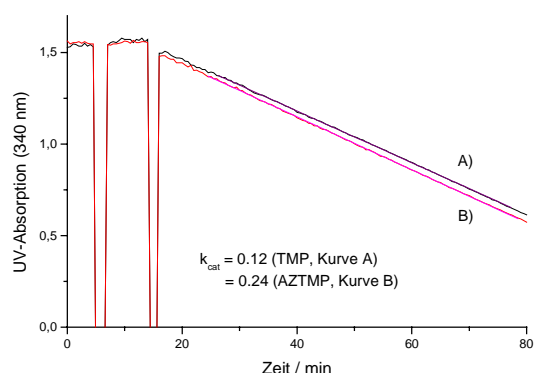
Die in dieser Arbeit vorgestellten strukturellen Ergebnissen der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP führten zu der Hypothese, daß für AZTMP, im Gegensatz zu dem natürlichen Substrat TMP, vermutlich eine Konformationsänderung vor der

Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt. In allen ternären Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP wird die offene P-loop Konformation beobachtet. Das bedeutet, daß Mutationen der menschlichen TMPK, die die P-loop partiell-geschlossene oder P-loop geschlossene Konformation begünstigen, sich positiv auf die AZTMP-Umsatzgeschwindigkeit der menschlichen TMPK auswirken sollten. Im Gegensatz dazu sollte die TMP-Umsatzgeschwindigkeit von einer solchen Mutation nicht merklich beeinflusst werden.

Ein Sequenzvergleich der sich im aktiven Zentrum befindenden Aminosäuren der Hefe, *E. coli* und menschlichen TMPK zeigt, daß in Hefe und *E. coli* TMPK die Diskriminierung gegenüber Ribonukleotiden durch die Positionierung der Seitenkette eines Tyrosins (Tyr102 in Hefe und Tyr108 in *E. coli*) erfolgt. Im Gegensatz dazu ist in menschlicher TMPK dieser Rest ein Phenylalanin (Phe105). In Hefe TMPK macht die Hydroxylgruppe des Tyr102 eine Wechselwirkung zu der Seitenkette des Asp14 aus dem P-loop und zu Arg94, der homologen Aminosäure zu Arg97 in menschlicher TMPK. Diese Beobachtung führte zu der Idee, das Phe105 in menschlicher TMPK zu einem Tyrosin zu mutieren, da in keiner bisher gelösten Struktur der Hefe oder *E.coli* TMPK der P-loop in einer offenen Konformation beobachtet wurde. Da diese Mutante auch kristallographisch untersucht werden sollte, wurde auch bei diesem Konstrukt das Arg200 zu Alanin mutiert.

Der molekularbiologische Teil der Herstellung der F105Y-R200A-Doppelmutante (zur Vereinfachung wird diese Doppelmutante im folgenden als F105Y-Mutante bezeichnet) wurde von Dr. A. Lavie in Zusammenarbeit mit Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiers in Göttingen durchgeführt und die transformierte Zelllinie zur Verfügung gestellt. Die Überexpression und Aufreinigung der F105Y-Mutante erfolgte nach den in Kapitel 3.2.1 für die R200A-Mutante vorgestellten Methoden. Ähnlich wie für die R200A-Mutante lieferte diese Prozedur ca. 450 mg Protein mit einer Reinheit von über 95 %. Wie eine HPLC-Analyse zeigte, ist die F105Y-Mutante, ähnlich wie die R200A-Mutante, nicht vollständig nukleotidfrei. Es sind noch ca. 35 % TMP und 25 % ADP gebunden.

Die Bestimmung der  $k_{cat}$ -Werte für die Umsatzgeschwindigkeit von TMP und AZTMP durch die F105Y-Mutante erfolgte mit dem schon vorgestellten gekoppelten Enzymtest. Für die Messungen wurden 160 nM Protein und 277  $\mu$ M TMP bzw. 350  $\mu$ M AZTMP verwendet. In Abb. 3.50 sind exemplarisch Kurven für die Reaktionen von TMP (Kurve A) und AZTMP (Kurve B) mit der F105Y-Mutante dargestellt.



**Abb. 3.50:**  $k_{cat}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von TMP (A) und AZTMP (B) durch die F105Y-Mutante der menschliche TMPK. (siehe auch experimenteller Teil Kapitel 5.1.6; die verwendeten Konzentrationen sind im Text genannt). Zu beobachten sind lineare UV-Absorptionsabnahmen aufgrund der durch die TMPK-Reaktion initiierten Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  für A) TMP und B) AZTMP. Aus der Steigung der Geraden kann man nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel den  $k_{cat}$ -Wert berechnen.

Eine lineare Regression mit dem Programm Origin lieferte die im Graphen dargestellten Geraden mit deren Steigung die  $k_{cat}$ -Werte berechnet wurden (Formel siehe Kapitel 5.1.6). Da pro TMP-Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente NADH oxidiert wurden (siehe Kapitel 3.2.2), mußte dieser Faktor bei der Auswertung der TMP-Experimente berücksichtigt werden. In Tab. 3.11 sind die erhaltenen  $k_{cat}$ -Werte für die TMP- und AZTMP-Umsatzgeschwindigkeiten der F105Y-Mutante im Vergleich zu menschlicher Wildtyp TMPK dargestellt.

**Tab. 3.11:** Vergleich der  $k_{cat}$ -Werte der TMP- und AZTMP-Phosphorylierung durch Wildtyp TMPK und der F105Y-Mutante

	Wildtyp TMPK	F105Y-Mutante
	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$	$k_{cat} / \text{s}^{-1}$
TMP	0.36	0.12
AZTMP	0.01	0.24

Die gemessenen  $k_{cat}$ -Werte zeigen, daß die F105Y-Mutation im Vergleich zu Wildtyp TMPK zwar zu einer verminderten Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat TMP (1/3 Aktivität im Vergleich zu Wildtyp TMPK) führt, die AZTMP Aktivität jedoch um den Faktor 24 verbessert wird. Da AZTTP und TTP ähnlich gute Substrate der RT sind,

bestimmt das Verhältnis der Konzentrationen der beiden Triphosphate zueinander die Einbauwahrscheinlichkeit von AZTMP in einen wachsenden DNA-Strang und damit die Wirkung auf die Inhibition der DNA-Replikation. Aus diesem Grund ist die Tatsache, daß die AZTMP-Aktivität der F105Y-Mutante 2fach höher ist als die TMP-Aktivität von besonderem Interesse und zeichnet diese Mutante als vielversprechenden Kandidaten für einen Einsatz in der genetischen Pharmakomodulation aus. Bemerkenswert ist, daß bei dieser Mutante eine einzige Punktmutation ausreicht, um die Substratspezifität umzukehren. Auch dieser Fakt macht die F105Y-Mutante zu einem vielversprechenden Kandidaten, da eine Mutante mit möglichst wenig Veränderungen (eine einzelne Punktmutation in diesem Fall) eine Immunreaktion auf das Genprodukt minimieren sollte.

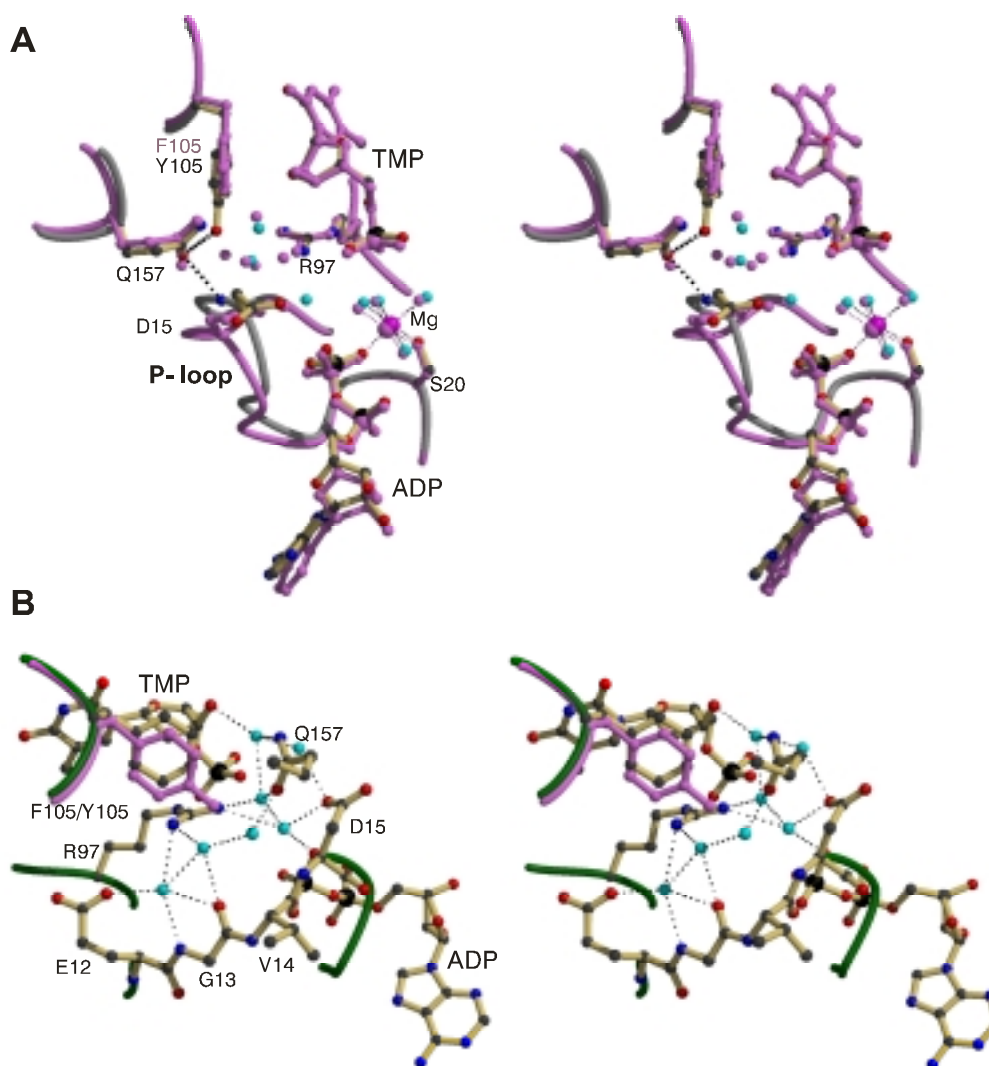
Um zu verstehen, wie diese Punktmutation die verbesserte AZTMP-Aktivität bewerkstelligt, wurden die F105Y-Mutante im Komplex mit TMP und ADP, TMP und AppNHp, AZTMP und ADP sowie AZTMP und AppNHp kristallisiert und die Strukturen von Dr. A. Lavie gelöst und verfeinert. Der bemerkenswerteste Effekt der F105Y-Mutation auf die Strukturen der menschlichen TMPK ist, daß in allen vier Strukturen die P-loop partiell-geschlossene Konformation vorliegt, unabhängig davon, welche Substrate gebunden sind. Dieses ist im Gegensatz zu Wildtyp TMPK, bei der in Gegenwart von ADP auf der Phosphoryldonorbindungsstelle und auch in dem Komplex mit AZTMP und AppNHp die P-loop offene Konformation vorliegt. Das bedeutet, daß die Proteinkonformation der F105Y-Mutante sowohl im Komplex mit TMP als auch mit AZTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP oder AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle sehr ähnlich zu der ist, die mit Wildtyp TMPK nur im Komplex mit TMP und AppNHp beobachtet wird. Es ist diese Proteinkonformation, die als aktiver Zustand interpretiert wurde. Bei der menschlichen Wildtyp TMPK verbleibt im Gegensatz dazu auch in Gegenwart von AppNHp der P-loop in der offenen Konformation, wenn TMP durch AZTMP ersetzt wird.

Erreicht wird dieses zum einen durch die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation und zum anderen durch die Destabilisation der P-loop offenen Konformation aufgrund der Anwesenheit der Hydroxylgruppe von Tyr105. Die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation erfolgt scheinbar durch die Wechselwirkung der Tyr105-Hydroxylgruppe mit Gln157 (3.1 Å) (Abb. 3.51A), da dieses die einzige Wechselwirkung der Tyr105-Seitenkette zur TMPK ist, die in allen vier Komplexen beobachtet wird. Gln157 ist aufgrund der Wechselwirkungen sowohl zu der Seitenkette als auch dem Rückgratstickstoffatom von Asp15 wichtig für die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation. Das bedeutet, aufgrund

der Wechselwirkung zwischen Tyr105 und Gln157 wird die Seitenkette von Gln157 in einer Position stabilisiert, in der es mit Asp15 interagieren kann. Im Gegensatz zu den Erwartungen aufgrund der Beobachtungen in den Strukturen der Hefe TMPK wird jedoch keine direkte Wechselwirkung zwischen Asp15 und Tyr105 beobachtet.

Da die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen Konformation nur indirekt ist, wird eine größere Bedeutung für die beobachtete geschlossene P-loop Konformation der Destabilisation der P-loop offenen Konformation zugesprochen. Die P-loop offene Konformation scheint durch sieben Wassermoleküle, die ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen dem P-loop und dem Monophosphat bilden, stabilisiert zu sein (siehe Kapitel 3.2.8). Eine Überlagerung der F105Y-Strukturen mit der TMPK-TMP-ADP-Struktur zeigt, daß die Hydroxylgruppe des Tyr105 in einem 2.0 Å Abstand zu einem dieser Wassermoleküle wäre (Abb. 3.51B). Das bedeutet, daß dieses Wassermolekül vermutlich durch die Hydroxylgruppe des Tyr105 verdrängt oder verschoben wird. Dadurch wird das gesamte Wasserstoffbrückennetzwerk zerstört oder zumindest geschwächt und gleichzeitig die Stabilität der P-loop offenen Konformation negativ beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, daß im Gegensatz zu TMP, für AZTMP eine Konformationsänderung vor der Reaktion der limitierende Faktor der Gesamtreaktion der menschlichen TMPK ist. Die F105Y-Mutation scheint diesen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zumindest teilweise zu beschleunigen, da im Gegensatz zu Wildtyp TMPK auch in Gegenwart von AZTMP die als aktiv interpretierte P-loop partiell-geschlossene Konformation beobachtet wird. Auf die TMP-Aktivität wirkt sich die mit dieser Mutation verbundene P-loop Fixierung in der partiell-geschlossenen Konformation dahingegen negativ aus (3fach langsamer als Wildtyp TMPK). Das verstärkt die Hypothese, daß für TMP nicht eine Konformationsänderung vor der Reaktion, sondern ein anderer Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, der durch die F105Y-Mutation noch stärker reduziert wird. Denkbar ist beispielsweise, daß in der F105Y-Mutante der Übergang von der P-loop partiell-geschlossenen in die P-loop geschlossene Konformation (wird in der Wildtyp TMPK-TDP-ADP-Produktstruktur beobachtet) nicht mehr so gut funktioniert und die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bremst oder das andererseits die Produkte nicht mehr so leicht freigesetzt werden können, da die Beweglichkeit des P-loop eingeschränkt ist.



**Abb. 3.51:** Mögliche Gründe für die Stabilisation der P-loop partiell-geschlossenen bzw. Destabilisation der P-loop offenen Konformation und die damit verbundene verbesserte AZTMP-Aktivität der F105Y-Mutante der menschlichen TMPK (Stereobilder). A) Überlagerung der Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP (pink) mit der analogen Struktur der F105Y-Mutante (bunt). Dargestellt als Schleife sind der P-loop und als *ball and stick* Präsentation die Substrate TMP und ADP und die Seitenketten der Aminosäuren Asp15, Ser20, Arg97, Phe/Tyr105 und Gln157. Deutlich zu sehen ist die P-loop partiell-geschlossene Konformation in der F105Y-Mutante, die durch die Wasserstoffbrückenbindungen (dargestellt als dicke gestrichelte Linien) zwischen dem Tyr105 und Gln157 bzw. Gln157 und dem P-loop Asp15 (Amidstickstoff) stabilisiert zu sein scheint. Bei der Wildtyp TMPK wird im Gegensatz dazu die P-loop offene Konformation beobachtet. B) Wassermoleküle stabilisieren die P-loop offene Konformation durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk (dargestellt als gestrichelte Linien) zwischen dem P-loop und TMP (*ball and stick* Präsentation) in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP und ADP. Überlagert ist das Tyr105 aus der analogen Struktur der F105Y-Mutante. Deutlich zu sehen ist, dass die Hydroxylgruppe des Tyr105 dieses

Wasserstoffbrückennetzwerk zerstört oder abschwächt, da es mindestens ein Wassermolekül, das an dem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt ist, aus sterischen Gründen verdrängt.

### 3.6.3 Die *E. coli*-LID in der menschlichen TMPK - eine Mutante mit höherer Aktivität und gleichzeitig umgekehrter AZTMP- und TMP-Substratspezifität

Aus den Studien an Hefe und *E. coli* TMPK entstand die Idee, die Hefe und die menschliche TMPK so zu verändern, daß sie die *E. coli* TMPK nachahmen. Hefe TMPK gehört zu Typ I TMPKs bei denen zusätzlich zu dem hochkonserviertem Lysin ein weiterer basischer Rest (Arg15) aus dem P-loop stammt, der eine Wechselwirkung zu der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP macht. Die Bindung von AZTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle bewirkt eine Verschiebung des P-loops um 0.5 Å und bewirkt damit, daß dieses Arginin für die Katalyse vermutlich nicht mehr optimal positioniert ist (Lavie et al., 1997a, 1997b, 1998a). Die Vermutung, daß für die Hefe TMPK dieses Arginin ein katalytischer Rest ist, ist konsistent mit der Beobachtung, daß die Mutation von Arg15 zu Gly die Aktivität der Hefe TMPK um den Faktor 200 reduziert (Brundiars et al., 1999). In *E. coli* TMPK (gehört zu Typ II TMPKs) ist der entsprechende Rest im P-loop, ähnlich wie für AMPK und UMPK, ein Glycin. Anstelle des Arginins aus dem P-loop entspringt in *E. coli* TMPK ein Arginin (Arg153) der LID-Region, das ähnlich, wie Arg15 in Hefe TMPK, mit der mittleren Phosphorylgruppe von Tp5A interagiert. Die Bindung von AZTMP beeinflußt die Positionierung des Arg153 in *E. coli* TMPK im Gegensatz zu dem P-loop Arg15 in Hefe TMPK nicht (siehe Kapitel 3.1.5). Diese Beobachtungen führten zu der Überlegung, das P-loop Arginin in Hefe und menschlicher TMPK durch ein Arginin in der LID-Region zu ersetzen, so daß dieses Arginin nicht mehr von einer P-loop Bewegung bei der Bindung von AZTMP beeinflußt werden sollte.

Die initialen Mutationsstudien (alle im folgenden aufgeführten Mutationsstudien an der Hefe und menschlichen TMPK wurden, wenn nicht anders erwähnt von Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiars durchgeführt) wurden an Hefe TMPK als Modell für die menschliche TMPK durchgeführt, bevor die Strukturen der menschlichen TMPK gelöst waren. Um eine sterische Kollision der Seitenketten des in der LID-Region der Hefe TMPK eingefügten Arginins mit dem Arg15 in dem P-loop zu vermeiden, wurde das Arg15 zu Gly mutiert und systematisch die Aminosäuren 142-146 der LID-Region zu Arginin mutiert (Brundiars et al., 1999). Jedoch zeigt keine dieser Doppelmutanten Aktivität gegenüber AZTMP und, wenn überhaupt, sehr geringe Aktivität gegenüber TMP (Brundiars et al., 1999).

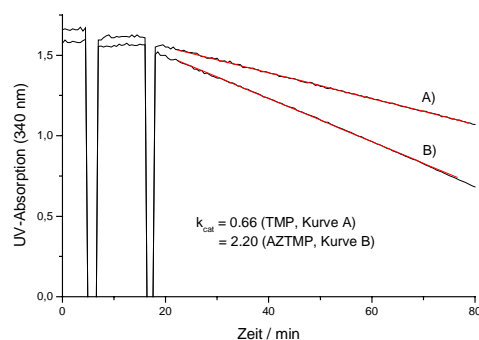
Zurückzuführen ist dieses vermutlich darauf, daß katalytische Aminosäuren exakt positioniert sein müssen, damit sie ihre katalytische Funktion ausüben können. Dieses ist scheinbar durch die genannten Punktmutationen nicht gelungen. Daraufhin wurde die gesamte LID-Region der Hefe TMPK (Aminosäuren 131 – 149) durch die der *E. coli* TMPK (Aminosäuren 138 – 157) ausgetauscht und gleichzeitig das Arg15 aus dem P-loop wiederum zu Glycin mutiert. Im Vergleich zu Wildtyp Hefe TMPK zeigt diese Mutante zwar nur 25 % der TMP-Aktivität, jedoch eine 400 %ige Steigerung der AZTMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Reduktion der Aktivität aufgrund des Fehlens des P-loop Arginins in Hefe TMPK zumindest teilweise durch das Einfügen eines Arginins in die LID-Region wiedergewonnen werden kann und daß das Verhältnis zwischen  $k_{\text{cat}}$  von TMP zu AZTMP auf diese Weise verbessert werden kann (16fach für diese Mutante).

Da für einen gentherapeutischen Einsatz der Gebrauch einer Mutante der menschlichen TMPK signifikante Vorteile bietet, und die Experimente mit Hefe TMPK insofern vielversprechend waren, daß gezeigt ist, daß es prinzipiell möglich ist, die AZTMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit auf diesem Wege zu verbessern, wurden die Studien auf die menschliche TMPK erweitert. Die menschliche TMPK gehört ebenso wie Hefe TMPK zu Typ I TMPKs, mit einem Arginin (Arg16) in dem P-loop. Im Gegensatz zu Hefe TMPK macht bei der menschlicher TMPK dieses Arginin in keiner der hier vorgestellten Strukturen eine Wechselwirkung zu den Phosphatgruppen der Substrate. In vielen Strukturen ist die Elektronendichte der Seitenkette jedoch sehr schlecht, was auf Flexibilität der Seitenkette schließen läßt, wie es für katalytische Reste erwartet wird. Aber auch hat die Mutation von Arg16 zu Gly in menschlicher TMPK, im Gegensatz zu der analogen Arg15Gly-Mutation in Hefe TMPK (200fache Reduzierung der Aktivität), kaum einen Einfluß auf die katalytische Aktivität der menschlichen TMPK (Brundiers et al., 1999). Dieses kann bedeuten, daß in menschlicher TMPK dieses Arginin tatsächlich nicht an der Katalyse beteiligt ist. Eine mögliche alternative Interpretation ist, daß bei menschlicher TMPK nicht der chemische Schritt (die Übertragung der Phosphorylgruppe) geschwindigkeitsbestimmend ist, sondern zum Beispiel eine Konformationsänderung nach der Reaktion oder die Produktfreisetzung, wie es aus den in Kapitel 3.2 aufgeführten Ergebnissen (TDP-ADP-Struktur) gefolgert werden kann. Das hätte zur Folge, daß die Mutation eines katalytischen Resten zwar die Geschwindigkeit des chemischen Schrittes verlangsamt, dieses aber die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion, die in dem verwendeten gekoppelten Enzymtest gemessen wird, nicht beeinflusst.



Aus der Überlagerung der menschlichen und der *E. coli* TMPK wurde ein Konstrukt entwickelt, bei dem die Aminosäuren 136 – 148 aus der LID-Region der menschlichen TMPK durch die Aminosäuren 142 – 156 aus der LID-Region der *E. coli* TMPK ersetzt sind. Wird gleichzeitig das Arg16 nicht zum Gly mutiert, reduziert sich die katalytische Aktivität sowohl für TMP als auch für AZTMP (Brundiars et al., 1999). Im Gegensatz dazu liefert die Kombination der LID-Mutation zusammen mit der Arg16Gly-Mutation in menschlicher TMPK (wird im folgenden als LID-Mutante bezeichnet) ein Enzym mit einer höheren Aktivität als die menschliche Wildtyp TMPK, sowohl in Bezug auf die TMP als auch die ATZMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit. Darüber hinaus phosphoryliert diese Mutante AZTMP effizienter als TMP.

Der molekularbiologische Teil der oben aufgeführten LID-Mutante wurde von Dr. A. Lavie in Zusammenarbeit mit Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiars durchgeführt. Auch wurde die LID-Mutante der menschlichen TMPK von Dr. A. Lavie in ausreichenden Mengen überexprimiert, aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Die Aktivität wurde mit dem schon bekannten gekoppelten Enzymtest UV-spektroskopisch bestimmt. Für die Messung wurden 16 nM Protein und 277  $\mu$ M TMP bzw. 350  $\mu$ M AZTMP verwendet. In Abb. 3.52 sind exemplarisch Kurven für die Reaktionen von TMP (Kurve A) und AZTMP (Kurve B) mit der LID-Mutante dargestellt. Eine lineare Regression mit dem Programm Origin lieferte die im Graphen dargestellten Geraden, mit deren Steigung die apparenten  $k_{\text{cat}}$ -Werte berechnet wurden (verwendete Formel siehe Kapitel 5.1.6). Da auch bei dieser Mutante pro TMP-Reaktionsäquivalent zwei Äquivalente NADH oxidiert wurden, mußte dieser Faktor bei der Auswertung der TMP-Experimente berücksichtigt werden. In Tab. 3.12 sind die erhaltenen  $k_{\text{cat}}$ -Werte für die TMP- und AZTMP-Umsatzgeschwindigkeiten der LID-Mutante im Vergleich zu Wildtyp TMPK und der F105Y-Mutante dargestellt.



**Abb. 3.52:**  $k_{\text{cat}}$ -Wert Bestimmung der Phosphorylierung von TMP (A) und AZTMP (B) durch die LID-Mutante der menschliche TMPK mittels eines gekoppelten, UV-spektroskopischen Enzymtests mit den Hilfsenzymen LDH und PK unter *steady-state* Bedingungen (siehe auch experimenteller Teil Kapitel 5.1.6; die verwendeten Konzentrationen sind im Text genannt). Zu beobachten sind lineare UV-Absorptionsabnahmen aufgrund der durch die TMPK-Reaktion initiierte Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  für A) TMP und B) AZTMP. Aus der Steigung der Geraden kann man nach der im experimentellen Teil aufgeführten Formel den  $k_{\text{cat}}$ -Wert berechnen.

**Tab. 3.12:** Vergleich der  $k_{\text{cat}}$ -Werte der TMP- und AZTMP-Phosphorylierung durch Wildtyp TMPK, der F105Y-Mutante und der LID-Mutante

	Wildtyp TMPK	F105Y-Mutante	LID-Mutante
$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ für TMP	0.36	0.12	0.66
$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ für AZTMP	0.01	0.24	2.20
Verhältnis von $k_{\text{cat}}$ für TMP / $k_{\text{cat}}$ für AZTMP	36	0.5	0.3
Verhältnis von $k_{\text{cat}}$ Mutante / $k_{\text{cat}}$ Wildtyp für AZTMP	1	24	30

LID-Mutante bedeutet folgende Mutationen: R16G und die Aminosäuren  $^{136}\text{QLADAAKRGAFGH}^{148}$  der menschlichen TMPK werden gegen die Aminosäuren  $^{142}\text{TPEVGLKRARARGEL}^{156}$  der *E. coli* TMPK ausgetauscht

Aus der Tab. 3.12 wird deutlich, daß die LID-Mutante nicht nur AZTMP 220fach schneller phosphoryliert als Wildtyp TMPK, sondern auch noch AZTMP 3.3fach schneller phosphoryliert als TMP. Darüber hinaus hat die LID-Mutante eine höhere Aktivität als Wildtyp TMPK. Es ist nicht nur die Mutante mit der höchsten AZTMP-Aktivität, sondern auch die Mutante mit der höchsten Selektivität gegenüber AZTMP im Vergleich zu TMP. Damit hat diese Mutante fast ideale Eigenschaften für einen erfolgreichen gentherapeutischen Einsatz in Form von genetischer Pharmakomodulation zur

Verbesserung der AZT Aktivierung. Versuche, die LID-Mutante zu kristallisieren, blieben bisher erfolglos. Dieses liegt vermutlich daran, daß die eingefügte LID-Region zwei Aminosäuren länger ist, als die der menschlichen Wildtyp TMPK. Modelliert man die eingefügte Mutation in die menschliche TMPK, wird deutlich, daß die längere LID-Sequenz nicht in diese Kristallpackung paßt, so daß man durch Variation der Kristallisationsbedingungen nach einer anderen Kristallpackung suchen muß. Dieses ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelungen. Aus diesem Grund kann man nur über die Gründe der guten AZTMP-Substrateigenschaften und der hohen Spezifität dieser Mutante spekulieren. Denkbar ist einerseits, daß die Mutation der LID-Region in menschlicher TMPK bewirkt, daß die P-loop geschlossenen Konformationen (partiell-geschlossen oder geschlossen), ähnlich wie bei der F105Y-Mutante, die bevorzugten Proteinkonformationen sind. Wenn es sich bestätigt, daß für AZTMP eine Konformationsänderung vor dem chemischen Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist, würde dieses erklären, warum die Mutation sich besonders drastisch auf die AZTMP-Phosphorylierung auswirkt. Andererseits ist es denkbar, daß das Arginin in der LID-Region mit den Phosphaten der Substrate interagiert und den Übergang von der P-loop offenen in die P-loop geschlossene Konformationen überflüssig macht, indem es die Funktionen des Arg16 (nicht nur die der Seitenkette, sondern auch die des Rückgratstickstoffatoms zu dem abgehenden Sauerstoff in ATP) übernimmt. Um den wahren Grund zu entschlüsseln, ist eine kristallographische Analyse erforderlich. Damit sollte es auch möglich sein, noch selektivere und bessere Mutanten zu designen, die im Idealfall nur AZTMP und nicht TMP phosphorylieren.

#### **3.6.4 Die UMPK-LID in der menschlichen TMPK - ein alternativer Vorschlag zur Verbesserung der AZTMP-Phosphorylierungsgeschwindigkeit aufgrund eines weiteren Arginins**

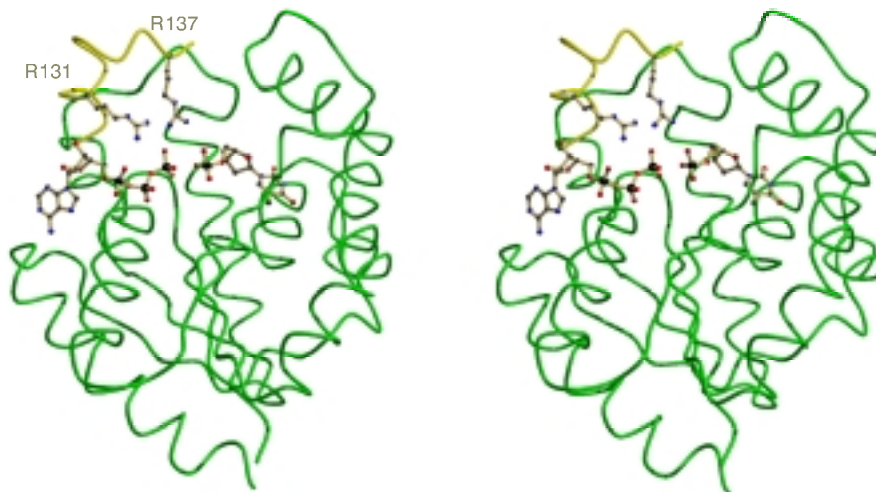
Die Studien der *E. coli*-LID-Mutante der menschlichen TMPK zeigen, daß diese Strategie sehr vielversprechend ist, um die AZTMP-Aktivität und die AZTMP-Substratspezifität drastisch zu steigern. Auch wenn die Gründe für diese Beobachtungen noch nicht verstanden sind, kann man über eine weitere Optimierung sowohl in Bezug auf die AZTMP-Aktivität als auch die AZTMP-Spezifität nachdenken. In *E. coli* TMPK wird nur ein Arginin (Arg153) aus der LID-Region beobachtet, daß ins aktive Zentrum gerichtet ist und mit den Phosphatgruppen der Substrate Wechselwirkungen macht. Unabhängig davon, ob die LID-Mutante eine geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderung

beschleunigt oder gleichzeitig auch den chemischen Schritt beschleunigt, kann man überlegen, daß das Einfügen weiterer basischer Reste in die LID-Region diesen Effekt verstärken könnte. Darüber hinaus könnten weitere Arginine im aktiven Zentrum auch die Positionierungen der Phosphatgruppen positiv beeinflussen, so daß beispielsweise die Phosphatgruppe des Monophosphates in einer Position fixiert wird, oder die Produkte keine Konformationsänderung mehr vollziehen, sondern direkt freigesetzt werden. Sowohl für die UMPK als auch für die AMPK wird im substratgebundenen Zustand keine Konformationsänderung der Hauptkettenatome in Abhängigkeit der gebundenen Substrate beobachtet. Darüber hinaus sind beides viel schnellere Kinasen als alle bisher untersuchten TMPKs und beide Kinasen haben drei Arginine (Arg131, Arg137 und Arg148 für UMPK) in der LID-Region, die mit den Phosphatgruppen der Substrate Wechselwirkungen eingehen und damit nicht nur negative Ladungen vor und während der Reaktion, sondern auch die Positionierung der Substrate zueinander stabilisieren.

Aufgrund dieser Überlegungen werden hier zwei mögliche Konstrukte abgeleitet und vorgeschlagen, in denen Teile der UMPK-LID (mit zwei Argininen) in die menschliche TMPK modelliert sind. Eine Überlagerung der UMPK mit der menschlichen TMPK (Tp5A-Struktur, P-loop geschlossene Konformation) zeigt, daß der Austausch der gesamten UMPK-LID mit allen drei Argininen nicht funktionieren sollte, da daß Arg148 aus der UMPK-LID mit dem Asp15 aus dem P-loop der menschlichen TMPK sterisch kollidieren würde. Der Austausch von kürzeren Sequenzen der UMPK-LID, in denen das Arg148 nicht vorhanden ist, scheinen geeigneter zu sein, da die beiden anderen Arginine (Arg131 und Arg137) mit keiner Aminosäure der menschlichen TMPK interferieren sollten (Abb. 3.52).

Bei der Auswahl der Schnittstellen bietet sich auf der einen Seite das Arg143 in menschlicher TMPK (Arg127 in UMPK) an, daß in beiden NMPKs eine hydrophobe *stacking* Wechselwirkung zu der Base des Phosphoryldonors macht und in beiden NMPKs ähnlich positioniert ist. Auf der anderen Seite gestaltet sich die Auswahl einer geeigneten Aminosäure, die in beiden NMPKs eine ähnliche Funktion und Position hat, schwieriger, so daß hier zwei verschiedene Varianten vorgeschlagen werden. Die eine mit einer kürzeren Sequenz, die andere mit einer längeren, in der aufgrund einer zusätzlichen Schleife dem Konstrukt mehr Freiheiten für eine optimale Anpassung gegeben werden. Im ersten Konstrukt werden die Aminosäuren <sup>143</sup>RGAFGE<sup>148</sup> der menschlichen TMPK gegen die Aminosäuren <sup>127</sup>RLLKRGETSGRV<sup>138</sup> der UMPK ausgetauscht. Im zweiten, längeren Konstrukt werden die Aminosäuren <sup>143</sup>RGAFGEERTE<sup>152</sup> der menschlichen TMPK gegen die Aminosäuren

<sup>127</sup>RLLKRGETSGRVDDNEETI<sup>145</sup> der UMPK ausgetauscht. In Analogie zu der *E. coli*-LID-Mutante sollte auch bei diesen Konstrukten, daß Arg16 des P-loops zu Gly mutiert werden, um Interferenz mit dem Arg131 zu vermeiden.



**Abb. 3.53:** Modellierter UMPK-LID (gelb) (aus der Struktur der UMPK im Komplex mit UMP, ADP und  $\text{AlF}_3$ ) in die Struktur der menschlichen TMPK (grün) im Komplex mit Tp5A (gezeigt sind TMP und ATP als *ball and stick* Präsentation). Die Überlagerung der beiden Strukturen wurde so durchgeführt, daß die zentralen  $\beta$ -Faltblätter beider Strukturen optimal überlagern. Deutlich zu sehen sind die Arginine 131 und 137 aus der UMPK-LID, die in das aktive Zentrum der menschlichen TMPK gerichtet sind.

### 3.6.5 Pharmakomodulation zur Verbesserung der zellulären AZTMP-Aktivierung mit den Mutanten (F105Y und *E. coli*-LID) der menschlichen TMPK

Die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen verschiedener NMPs an TMPKs von drei verschiedenen Quellen (Hefe, *E. coli* und Mensch) führten zu dem Design von Mutanten der menschlichen TMPK (F105Y und *E. coli*-LID) mit optimierten *in vitro* AZTMP-Phosphorylierungseigenschaften. Diese Mutanten sind potentielle Kandidaten für einen gentherapeutischen Einsatz in der HIV-Therapie, und werden zur Zeit auf ihren *in vivo* Effekt auf die HIV-Replikation nach der in der Einleitung vorgestellten Methode, der genetischen Pharmakomodulation, für eine optimierte AZT-Metabolisierung getestet. Für erste *in vivo* Experimente wurden die Mutanten der menschlichen TMPK von Dr. R. Brundiars in einen pCI-Vektor kloniert, der diese Mutanten exprimiert (Brundiars et al., 1999a). Von Dr. B. Wöhrli in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. D. Klatzmann (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) wurden diese Vektoren in menschliche Zellen (Zelllinie P4CCR5) transfiziert, die transformierten Zellkulturen mit tritiummarkiertem Thymidin bzw.

AZT inkubiert und die Konzentrationen der Thymidin bzw. AZT-Metaboliten mittels HPLC verfolgt (Tab. 3.13).

**Tab. 3.13:** Konzentrationen der AZT-Metaboliten in mit (Mutanten) der menschlichen TMPK transfizierten P4CCR6-Zellen (Daten sind mündliche Mitteilungen von Dr. B. Wöhrl und Dr. D. Klatzmann)

	Kontrolle mit nicht transformierten Zellen	Kontrolle mit Wildtyp TMPK	F105Y- Mutante	<i>E. coli</i> -LID- Mutante
	%	%	%	%
AZT	3.4	0.6	0.5	0.6
AZTMP	92.6	61.3	36	34.9
AZTDP	1.9	16.9	29.6	28.2
AZTTP	2.1	21.1	33.2	36.3

Die in Tab. 3.13 zusammengefaßten Daten der ersten *in vivo* Experimente zeigen eindrucksvoll, daß die erreichbare AZTTP-Konzentration in den transfizierten Zellen deutlich höher ist, als in den nicht transformierten Zelllinien (von 2.1 % in nicht transformierten Zellen bis auf 36 % in mit der *E. coli*-LID-Mutante transformierten Zellen). Die AZTMP-Konzentration, die in den nicht transfizierten Zellen 92.6 % des eingesetzten AZT ausmacht, reduziert sich in den mit den Mutanten transfizierten Zelllinien dahingegen auf ca. 35 %. Im Vergleich mit früheren Studien, in denen analoge Experimente mit der HSV-TK durchgeführt wurden (siehe Einleitung oder Klatzmann et al., 1997) sind diese Ergebnisse äußerst vielversprechend, da dort der erzielte Effekt auf die erreichbare AZTTP-Konzentration erheblich schlechter war. Auffällig ist jedoch, daß sich auch in der Zelllinie, die mit der Wildtyp TMPK transformiert ist, die AZTMP-Konzentration reduzieren läßt. Dieses läßt sich dadurch erklären, daß vermutlich allein die Anwesenheit von mehr TMPK in der Zelle ausreicht, um die AZT-Metabolisierung geringfügig zu verbessern.

Diese ersten vielversprechenden *in vivo* Experimente in Bezug auf die optimierte AZT-Metabolisierung geben Anlaß, den Effekt auf die Unterdrückung der HIV-Replikation in HIV-infizierten Zellen, die dauerhaft mit diesen Mutanten transformiert sind und diese Mutanten exprimieren, zu untersuchen. Frau Dr. B. Wöhrl gelang es, menschliche Zelllinien herzustellen, die dauerhaft die Mutanten der TMPK exprimieren. Diese stabilen Zelllinien wurden mit HIV-1 infiziert und werden zur Zeit in einem Langzeitversuch in Zusammenarbeit mit Dr. D. Klatzmann, in Anlehnung an die Experimente mit der die HSV-TK exprimierenden Zelllinie, mit AZT inkubiert, um den Effekt auf die HIV-Replikationsunterdrückung zu untersuchen.

#### 4 Zusammenfassung

Aufbauend auf vorangehende Studien an Hefe TMPK als Modell für die menschliche TMPK und erste Studien an *E. coli* TMPK - eine TMPK, die im Gegensatz zu Hefe und menschlicher TMPK effizient AZTMP phosphoryliert - wurden im ersten Teil dieser Arbeit die Gründe der guten Substrateigenschaften von AZTMP gegenüber der *E. coli* TMPK analysiert. Dazu wurde der Binukleotidinhibitor AZTp5A synthetisiert, die Affinität zur *E. coli* TMPK bestimmt und die Röntgenkristallstruktur der *E. coli* TMPK im Komplex mit AZTp5A gelöst. Ein Vergleich dieser Struktur mit der bekannten *E. coli* TMPK-Tp5A-Struktur offenbarte, daß im Gegensatz zu der Hefe TMPK die Substitution von TMP gegen AZTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle der *E. coli* TMPK keine komplexe P-loop Verschiebung induziert, so daß im Fall der *E. coli* TMPK die Positionierung der Substrate zueinander nicht negativ beeinflusst wird. Die notwendigen strukturellen Anpassungen begrenzen sich auf eine leichte Rotation der Desoxyribose von AZTMP und dreier Carboxylsäureseitenketten, darunter Glu12 aus dem P-loop, die in der Nähe der 3'-Position des Phosphorylakzeptors positioniert sind. Darüber hinaus stammt in *E. coli* TMPK das vermutlich katalytische Arg153, das ähnlich wie Arg15 aus dem P-loop in Hefe TMPK, mit den Sauerstoffatomen der mittleren Phosphorylgruppe von Tp5A interagiert, aus der LID-Region und wird in seiner Position durch die Azidogruppe in AZTMP nicht beeinflusst.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Studien auf das menschliche Enzym erweitert und vertieft. Dazu wurde zunächst die menschliche TMPK in ausreichenden Mengen überexprimiert, aufgereinigt und die Aktivität mit den natürlichen Substraten TMP und ATP bestimmt. Die Aktivität der menschlichen TMPK ( $0.36 \text{ s}^{-1}$ ) ist, trotz der hohen Sequenzhomologie beider TMPKs, um den Faktor 100 geringer, als die der Hefe TMPK. Um die Funktionsweise der menschlichen TMPK auf molekularer Ebene möglichst detailliert zu verstehen, wurden darüber hinaus Röntgenkristallstrukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit verschiedenen Nukleotidkombinationen (TMP und ADP; TMP und AppNHp als substratgebundener Komplex; TMP-ADP und  $\text{AlF}_3$  als Mimik des Übergangszustandes; TDP und ADP als produktgebundener Komplex; Tp5A als ein Biproduktinhibitor-Komplex), die verschiedene Zustände entlang der Reaktionskoordinate repräsentieren, gelöst. Ein Vergleich dieser Strukturen zeigt, daß die menschliche TMPK im Gegensatz zu anderen NMPKs weitere Konformationsänderungen innerhalb der nukleotidgebundenen und global geschlossenen Proteinkonformation vollzieht. Zu den Bereichen, die in Abhängigkeit der gebundenen Substrate Konformationsänderungen vollziehen, zählen der P-loop,

die LID-Region und die Adenin-bindende Region. Gemeinsam mit diesen Regionen verschiebt sich auch der Phosphoryldonor mit dem gebundenen Magnesiumion in Abhängigkeit der gebundenen Nukleotide. Innerhalb der global geschlossenen Konformation wird zwischen einer P-loop offenen Konformation, wenn TMP und ADP gebunden sind, einer P-loop partiell-geschlossenen Konformation, wenn TMP und AppNHp oder TMP-ADP und  $\text{AlF}_3$  gebunden sind und einer P-loop geschlossenen Konformation, wenn TDP und ADP oder Tp5A gebunden sind, unterschieden. Die P-loop (partiell)-geschlossenen Konformationen werden als aktive Zustände interpretiert. Die Bewegung des P-loops als Reaktion auf den Austausch eines Di- gegen ein Triphosphat ist für die menschliche TMPK einzigartig und wurde bisher bei keiner anderen NMPK oder keinem anderen Protein, daß das P-loop-Motiv beinhaltet, beobachtet. Auch wird die TMP-Phosphorylgruppe in verschiedenen Konformationen in Abhängigkeit der gebundenen Nukleotide beobachtet. Nur in der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit TMP-ADP und  $\text{AlF}_3$ , die als Mimik des Übergangszustandes interpretiert werden kann, sind sowohl das Enzym als auch die Nukleotide in einer Konformation, wie man es für einen  $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen Phosphoryltransfermechanismus erwarten würde.

Diese detaillierte strukturelle Analyse des katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK führte zu der Hypothese, daß das minimale Reaktionsschema eines Random Bi-Bi-Mechanismus, der für die menschliche TMPK vermutet wird, um mindestens zwei Schritte erweitert werden muß. Erstens ist eine Konformationsänderung der TMP-Phosphorylgruppe zu der aktiven TMP-ADP- $\text{AlF}_3$  gebundenen TMP-Konformation vor der Reaktion erforderlich und zweitens wird eine Konformationsänderung nach der Reaktion, die Rotation der Seitenkette des hochkonservierten Arg97 zusammen mit den Phosphaten des TDP zu der stabilen Produktkonformation gefordert. Ordnet man die Strukturen entsprechenden Zuständen auf der Reaktionskoordinate zu und vergleicht diese, offenbaren sie die notwendigen Konformationsänderungen der TMPK und der Nukleotide, die vermutlich während der Reaktion vollzogen werden und man erhält ein einzigartiges Bild einer Phosphoryltransferreaktion. Diese Vielzahl von Konformationsänderungen, die durch eine komplizierte Anordnung und Umpositionierung von Wassermolekülen bewerkstelligt wird, läßt vermuten, daß *in vivo* nicht nur die Expression der menschlichen TMPK durch den Zellzyklus, sondern auch die Aktivität durch einen weiteren Faktor reguliert ist. Dieses würde im Einklang damit stehen, daß die intrinsische Aktivität der menschlichen TMPK im Vergleich zu der von anderen NMPKs sehr gering ist.



Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Substrateigenschaften der AZT-Metaboliten AZTMP und NH<sub>2</sub>TMP gegenüber der menschlichen TMPK untersucht. AZTMP wird unter *steady-state* Bedingungen 36fach langsamer phosphoryliert als TMP, NH<sub>2</sub>TMP dahingegen nur 2.5fach langsamer. Die Strukturen der menschlichen TMPK im Komplex mit AZTMP-ADP, AZTMP-AppNHp bzw. AZTp5A zeigen, daß die Azidogruppe in AZTMP scheinbar die TMPK daran hindert, die aktiven P-loop (partiell)-geschlossenen Konformationen einzunehmen, da das Asp15 aus dem P-loop (eine vermutlich katalytische Aminosäure) mit der Azidogruppe sterisch kollidieren würde, wenn es in der substratgebundenen Konformation die gleiche Position einnehmen würde, wie in der analogen Struktur mit dem natürlichen Substrat TMP. Diese strukturellen Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß für AZTMP, im Gegensatz zu TMP, eine Konformationsänderung vor der Reaktion, der Übergang von der P-loop offenen zu der P-loop partiell-geschlossenen Konformation, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt und dieses AZTMP zu einem schlechten Substrat der menschlichen TMPK macht. In der Struktur der menschlichen TMPK im Komplex mit NH<sub>2</sub>TMP und AppNHp wird dahingegen die aktive P-loop geschlossene Konformation beobachtet, so daß für dieses Substrat die Reaktion ohne notwendige Konformationsänderung vor der Reaktion ablaufen kann. Diese Ergebnisse sind konsistent mit bekannten *in vivo* Experimenten, die zeigen, daß sich AZTMP in Zellen, die mit AZT inkubiert werden, anreichert, NH<sub>2</sub>TMP dahingegen nicht.

Um möglichst viele Informationen über den Einfluß des 3'-Substituenten des Phosphorylakzeptors auf die Aktivität der menschlichen TMPK zu erhalten, wurden im vierten Teil dieser Arbeit die Studien auf die partiell aktivierten anti-AIDS Medikamente d4TMP, FLTMP und das Analogon ddTMP erweitert. Es wurde gezeigt, daß sich die Aktivitäten dieser drei NMPs im Vergleich zu TMP und AZTMP in der Reihenfolge AZTMP < FLTMP = ddTMP < d4TMP < TMP jeweils um den Faktor drei unterscheiden. Auch diese Ergebnisse sind konsistent mit bekannten *in vivo* Experimenten, die zeigen, daß d4TMP sich nicht in mit d4T inkubierten Zellen anreichert, FLTMP dahingegen schon.

Ein Vergleich der zuvor beschriebenen Strukturen mit denen der menschlichen TMPK im Komplex mit FLTMP, d4TMP und ddTMP auf der Phosphorylakzeptorbindungsstelle und ADP oder AppNHp auf der Phosphoryldonorbindungsstelle zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Aktivität der verschiedenen NMPs und der P-loop Konformation im substratgebundenen Zustand. Die NMPs (TMP, NH<sub>2</sub>TMP und d4TMP), die im substratgebundenen Zustand

die P-loop (partiell)-geschlossene Konformation stabilisieren, werden effizienter phosphoryliert als die NMPs (AZTMP, FLTMP und ddTMP), die die P-loop offene Konformation begünstigen. Desweiteren wurde deutlich, daß scheinbar ein Wasserstoffatom an dem 3'-Substituenten erforderlich ist, um die P-loop (partiell)-geschlossenen Konformationen zu stabilisieren. Der Aktivitätsverlust aufgrund des Fehlens der 3'-OH-Gruppe in ddTMP und d4TMP kann durch Zwänge auf die Zuckerpackung (Doppelbindung zwischen den Atomen C2' und C3' in d4TMP) und der damit verbundenen Beeinflussung der Positionierung der d4TMP Phosphorylgruppe teilweise kompensiert werden.

Basierend auf die in dieser Arbeit durchgeführten Struktur-Aktivitätsuntersuchungen verschiedener NMPs an menschlicher TMPK, zusammen mit den bekannten Strukturen der HIV-RT und der NDPK, wurden im fünften Kapitel dieser Arbeit neue Substrate entworfen, die in nachfolgenden Studien auf ihre Eigenschaften untersucht werden sollten. Es wurden N-Alkylderivate des NH<sub>2</sub>TMPs sowie, in Anlehnung an die anti-Herpes Medikamente Ganciclovir und Penciclovir, azyklische Thymidinderivate, in denen die 2'-Methylengruppe fehlt, vorgeschlagen. In diesen Derivaten sollte ein größerer Substituent an der 3'-Position in der Lage sein, sich so zu positionieren, daß es keine sterischen Hinderungen zwischen diesem Rest und dem P-loop Aspartat in den P-loop (partiell)-geschlossenen Konformationen geben sollte. Gleichzeitig sollte der größere 3'-Substituent für die Selektivität gegenüber der HIV-RT sorgen. In den N-Alkylderivaten des NH<sub>2</sub>TMPs sollte das verbleibende Wasserstoffatom der N-Alkylaminogruppe in der Lage sein, mit dem P-loop Aspartat zu interagieren.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden, basierend auf die durchgeführten Struktur-Aktivitätsuntersuchungen der TMPKs aus Hefe, *E. coli* und Mensch, Mutanten des menschlichen Enzyms entwickelt, die effizient und selektiv AZTMP phosphorylieren und geeignete Kandidaten für einen gentherapeutischen Einsatz für eine optimierte AZT-Aktivierung in der HIV-Therapie darstellen. Die Punktmutation F105Y führt zwar zu einem Enzym mit geringerer Aktivität als Wildtyp TMPK, jedoch zu einem Enzym, das AZTMP 24fach schneller phosphoryliert als Wildtyp TMPK und das AZTMP 2fach schneller phosphoryliert als TMP. Insbesondere die umgekehrte Substratspezifität macht diese Mutante zu einem attraktiven Kandidaten für einen gentherapeutischen Einsatz in der HIV-Therapie, da AZTTP und TTP ähnlich gute Substrate der HIV-RT sind und demnach die relativen Konzentrationen der beiden Nukleotide zueinander die Einbauwahrscheinlichkeit von AZTMP in einen wachsenden viralen DNA-Strang bestimmen. Die F105Y-Mutante bewirkt, daß unabhängig von den gebundenen

Nukleotiden die P-loop partiell-geschlossene Konformation begünstigt ist, so daß der vermutlich geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Konformationsänderung vor der Reaktion) für das Substrat AZTMP beschleunigt oder umgangen wird.

Bei einer zweiten Mutante der menschlichen TMPK wurde die LID-Region der menschlichen TMPK durch die LID-Region der *E. coli* TMPK ausgetauscht, so daß die menschliche TMPK die Eigenschaften der *E. coli* TMPK nachahmt, bei der ein vermutlich katalytisches Arginin aus der LID-Region stammt, das von einer P-loop Bewegung unbeeinflusst bleibt. Diese LID-Mutante hat nicht nur höhere Aktivität als die Wildtyp TMPK, sondern auch eine höhere Selektivität gegenüber AZTMP als die F105Y-Mutante. Damit hat diese Mutante fast ideale *in vitro* Eigenschaften für einen erfolgreichen Einsatz in der gentherapeutischen Pharmakomodulation von AZT in der HIV-Therapie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben nicht nur zu einem detaillierten Verständnis des katalytischen Mechanismus der menschlichen TMPK auf molekularer Ebene geführt, sondern darüber hinaus wesentlich zu dem gezielten und rationalem Proteindesign für eine optimierte AZT Aktivierung beigetragen.

## **5 Experimenteller Teil – Material, Methoden und chemische Synthese**

### **5.1 Biochemische, proteinchemische und biophysikalische Methoden**

#### **5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, die bei der Bindung eines Proteins an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 auftritt. Je nach Proteinkonzentration (0.1-1 mg/ml) wurden 1-10 µl Proteinlösung mit Bradford-Reagenz auf 1000 µl aufgefüllt, nach 5 bis 10 min die Absorption bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Rinderserumalbumin (BSA)-Eichreihe als Standard berechnet.

#### **5.1.2 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die analytische, elektrophoretische Trennung von Proteinen nach apparentem Molekulargewicht nach Laemmli (1970) wurde in Minigelkammern der Firma BioRad (Mini-PROTEAN II Cell) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine in einem SDS-haltigem Auftragspuffer hitzedenaturiert. Dabei lagern sich entlang des denaturierten Proteins negativ geladene SDS-Moleküle an. Da die Zahl der sich anlagernden SDS-Moleküle der Größe der Proteine (also dem Molekulargewicht) proportional ist, trennen sich die Proteine bei dem Durchwandern eines Polyacrylamidgels im elektrischen Feld nach ihrer Größe auf und man kann anhand von Molekulargewichtsstandards ihr Molekulargewicht abschätzen. Als Molekulargewichtsstandard diente eine Mischung aus Phosphorylase b (97.4 kD), Rinderserumalbumin (66.2 kD), Ovalbumin (45 kD), Carboanhydrase (31 kD), Trypsininhibitor (21.5 kD) und Lysozym (14.4 kD) (BioRad).

	Trenngellösung für 2 Gele mit 12 % Acrylamid	Sammelgellösung für 2 Gele mit 4 % Acrylamid
Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid (30 %, 29/1)	6 ml	0.75 ml
H <sub>2</sub> O	5.25 ml	3 ml
Trenngelpuffer	3.75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1.25 ml
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10 % w/v)	45 µl	25 µl
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin	5 µl	5 µl

Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8  
0.4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8  
0.4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3  
250 mM Glycin  
0.1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Färbelösung: 25 % (v/v) Isopropanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
0.1 % (w/v) Coomassie-Blau

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure  
5 % (v/v) Ethanol

Auftragspuffer (4fach): 200 mM Tris-HCl, pH 6.8  
400 mM 1,4-Dithioerythritol (DTE)  
8 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)  
0.4 % (w/v) Bromphenolblau  
40 % Glycerin

Für die Herstellung der Gele wurde die Trenngellösung in eine Gelkammer zwischen zwei Glasplatten (Abstand 1 mm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min) wurde das Isopropanol vollständig entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet, ein Kamm als Taschenformer zum Auftragen der Proteinlösungen in die Sammelgellösung eingebracht und anschließend das Sammelgel polymerisiert (ca. 30 min). Die zu untersuchende Proteinlösung (ca. 2-20 µg) wurde mit Auftragspuffer versetzt und ca. 10 min im Heizblock auf 95 °C erhitzt

und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (40 mA) mit dem Elektrophoresepuffer (ca. 60 min). Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Gele 30 min mit Färbelösung versetzt und anschließend der nicht an die Proteine gebundene Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt (ca. 30 min). Anhand der blau gefärbten Proteinbanden konnten neben dem Molekulargewicht auch die Reinheit der Proteinprobe abschätzen werden.

### **5.1.3 Überexpression der menschlichen TMPK (R200A-Mutante und R200A-F105Y-Doppelmutante) als GST-Fusionsprotein in *E. coli*-Zellkulturen**

Für die Überexpression der menschlichen TMPK-R200A- bzw. TMPK-R200A-F105Y-Mutanten wurden *E. coli*-BL21 (DE3)-Zellen, die mit einem die TMPK als GST-Fusionsprotein kodierenden rekombinanten Plasmidvektor (pGexRB) transformiert sind, verwendet (Brundiers et al., 1999). Die transformierten Zelllinien wurden von Dr. A. Lavie in Kollaboration mit Dr. M. Konrad und Dr. R. Brundiers hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Die menschliche TMPK wurde als Glutathion-S-Transferase- (GST)-Fusionsprotein überexprimiert. Dadurch konnte die Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an einer Glutathion-Sepharose (GSH)-Säule durchgeführt werden. Anschließend wurde das Fusionsprotein GST durch Thrombin abgeschnitten, so daß die TMPK am N-Terminus um drei Aminosäuren (Gly-Ser-His) verlängert isoliert werden konnte.

2 ml LB-Medium (Luria Bertani; 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro Liter H<sub>2</sub>O) mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 10 µl einer 25 %igen Glycerol Stammlösung der transformierten *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Übernachtskultur 1:50 mit LB-Ampicillin (100 µg/ml)-Medium verdünnt, weitere 3 h bei 37 °C inkubiert und ein weiteres mal 1:50 mit LB-Ampicillin (100 µg/ml)-Medium auf insgesamt 5 l verdünnt (5 l Kultur). Bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0.6-0.9 nach weiteren 2 h wurde die Überexpression der TMPK durch Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Endkonzentration) gestartet und über Nacht bei 30 °C durchgeführt (vor und nach der Induktion wurde eine Probe von ca. 300 µl der Zellkultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert, mit SDS-Auftragspuffer 10 min bei 95 °C inkubiert und durch SDS-PAGE die Überexpression kontrolliert und analysiert).

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 5000 U/min und 4 °C) pelletiert (Sorvall RC-3B plus-Zentrifuge, Rotor H6000A), in Lyse-Puffer aufgenommen, aufgeschlossen und das überexprimierte Protein isoliert und aufgereinigt.

#### **5.1.4 Zellaufschluß und Reinigung der GST-Fusionsproteine (R200A- bzw. R200A-F105Y-Mutanten der menschlichen TMPK)**

Das abzentrifugierte Zellpellet wurde in 90 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 200 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) suspendiert und unter Eiskühlung an einem Microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA, USA) bei einem Druck von 600 kPa aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (40000 U/min, 4 °C, 1 h) abgetrennt und der Überstand auf eine mit GST-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibrierte GSH-Säule (30 ml Volumen, Flußrate 1.5 ml/min) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit ca. 200 ml Hochsalzpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) eluiert und anschließend die GSH-Säule wieder mit ca. 150 ml GST-Puffer äquilibriert (Flußrate 2 ml/min). Um die Mutanten der menschlichen TMPK von der GSH-Säule zu eluieren, wurde die TMPK über Nacht mit 100 U Thrombin von dem an die GSH-Säule gebundenen Fusionspartner Glutathion-S-Transferase geschnitten. Dazu wurde der Ausgang der Säule mit dem Eingang für den Puffer an der Pumpe kurzgeschlossen und nachdem das Thrombin zugegeben war, im Kreislauf mit einem Fluß von 1 ml/min gepumpt. Um die Protease Thrombin zu entfernen, wurde die TMPK anschließend mit GST-Puffer über eine nachgeschaltete Benzamidinsepharose 6B (Pharmacia) Säule eluiert. TMPK-haltige Fraktionen wurden durch SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und in einem Vivaspin über einer Membran mit 5 kD Ausschlußgrenze (4000 U/min, 4 °C, ca. 20 min) auf ca. 12 ml aufkonzentriert. Nach einer abschließenden Gelfiltration (Größenausschlußchromatographie, S-200-Säule, 4mal 3 ml, Flußrate 2 ml/min) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> eluierten die TMPK-Mutanten nach einer Retentionszeit entsprechend eines Dimeren mit einer Reinheit von über 95 % (nachgewiesen durch SDS-PAGE). Die die TMPK enthaltenden Fraktionen der einzelnen S-200 Läufe wurden vereinigt und im Vivaspin über einer Membran mit 5 kD Ausschlußgrenze (4000 U/min, 4 °C) auf eine Konzentration von ca. 28 mg/ml konzentriert. Aus einer 5 l Zellkultur wurden ca. 350 - 450 mg aufgereinigtes Protein

erhalten. HPLC-Analysen der aufgereinigten Mutanten zeigten, daß die Proteine nicht vollständig nukleotidfrei vorliegen und ca. 35 % TMP und 25 % ADP gebunden sind. Auch eine zusätzliche Ammoniumsulfatfällung vor der Gelfiltration lieferte kein nukleotidfreies Protein. Die aufkonzentrierten Proteinlösungen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 5.1.5 Fluoreszenzspektroskopie zur Affinitätsbestimmung der Komplexe aus TMPK und den Binukleotidinhibitoren Tp5A-mant, Tp5A und AZTp5A

Alle fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden mit einem AB2 Fluoreszenzspektrometer (SLM-Aminco) bei 25 °C in einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA und 100 mM KCl durchgeführt. Als Meßsignal diente in allen Experimenten die Fluoreszenzänderung der N-Methylantraniloyl (mant)-Gruppe des an der 2',3'-Position der Ribose von Adenosin fluoreszenzmarkierten Binukleotids Tp5A-mant (hergestellt und zur Verfügung gestellt von Andrea Beste) bei der Bindung an TMPK (Fluoreszenzzunahme um ca. 100 %) bzw. bei der Verdrängung aus einem Komplex mit TMPK (Fluoreszenzabnahme). Die Anregung der mant-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 360 nm (Spaltbreite 2 nm), die Messung der Emission der mant-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 440 nm (Spaltbreite 8 nm).

#### Gleichgewichtstitrationen

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) eines Komplexes aus TMPK (*E. coli* und Mensch) und Tp5A-mant wurden direkte Fluoreszenztitrationen durchgeführt. Hierfür wurden 100 nM Tp5A-mant vorgelegt und die Konzentration der TMPK solange stufenweise erhöht (Konzentrationsbereich 0.01-2.6 µM), bis keine Fluoreszenzänderung mehr zu beobachten war (also Sättigung erreicht ist). Nach jeder Konzentrationserhöhung wurde die Fluoreszenzänderung gemessen. Die  $K_d$ -Werte wurden durch Anpassen der Lösung einer quadratischen Gleichung, die die Komplexkonzentration in einem bimolekularen Gleichgewicht unter der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie beschreibt, an die gemessenen Daten berechnet.

Die quadratische Gleichung leitet sich aus der Reaktionsgleichung eines reversiblen Gleichgewichtes aus Enzym (E) und Ligand (Fluorophor) (L) folgendermaßen ab:





Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante leitet sich aus dem Massenwirkungsgesetz ab und ist wie folgt definiert:

$$(1) \quad K_d = \frac{[E_{GG}][L_{GG}]}{[EL_{GG}]}$$

Die Gleichgewichtskonzentrationen  $[E_{GG}]$ ,  $[L_{GG}]$  und  $[EL_{GG}]$  sind mit den Anfangskonzentrationen  $[E_0]$  und  $[L_0]$  über das Massenerhaltungsgesetz folgendermaßen verknüpft:

$$(2) \quad [E_{GG}] = [E_0] - [EL_{GG}] \text{ und } [L_{GG}] = [L_0] - [EL_{GG}]$$

Durch einsetzen der Gleichungen (2) in Gleichung (1) und anschließend ausmultiplizieren und umstellen erhält man folgende quadratische Gleichung,

$$(3) \quad 0 = [EL_{GG}]^2 - [EL_{GG}](K_d + [L_0] + [E_0]) + ([L_0] + [E_0])$$

deren thermodynamisch sinnvolle Lösung folgende ist:

$$(4) \quad [EL_{GG}] = \frac{(K_d + [L_0] + [E_0]) - \sqrt{(K_d + [L_0] + [E_0])^2 - 4[L_0][E_0]}}{2}$$

Die partielle Zunahme der Fluoreszenzemission ( $F - F_{\min}$ ) des Fluorophors pro Titrationsschritt ist gleich dem Bindungsgrad ( $[EL_{GG}]/[L_0]$ ) multipliziert mit der maximalen Fluoreszenzzunahme ( $F_{\max} - F_{\min}$ ), die man bei Sättigung erhält. Daraus ergibt sich die Gesamtfluoreszenz ( $F$ ) aus der Summe der Anfangsfluoreszenz ( $F_{\min}$ ) und der partiellen Fluoreszenzzunahme des Titrationsschrittes:

$$(5) \quad F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \cdot \frac{[EL_{GG}]}{[L_0]}$$

Durch einsetzen von Gleichung (4) in Gleichung (5) ergibt sich:

$$(6) \quad F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \frac{(K_d + [L_0] + [E_0]) - \sqrt{(K_d + [L_0] + [E_0])^2 - 4[L_0][E_0]}}{2[L_0]}$$

Die gemessenen Titrationskurven spiegeln  $F$  als Funktion von  $[E_0]$  wieder. Ein Kurvenangleich an die experimentellen Daten unter Verwendung von Gleichung (6) liefert den  $K_d$ -Wert des untersuchten Gleichgewichtes.

Verdrängungstitrationen

Die Bestimmung der  $K_d$ -Werte von TMPK (*E. coli* und mensch) und der nicht fluoreszenzmarkierten Binukleotidinhibitoren Tp5A bzw. AZTp5A erfolgte durch Verdrängungstitration von Tp5A-mant aus einem Komplex mit TMPK. Voraussetzung hierfür ist, daß beide Substrate (Tp5A-mant und Tp5A bzw. AZTp5A) an der gleichen Bindungsstelle der TMPK binden und die  $K_d$ -Werte in der gleichen Größenordnung liegen, damit eine kompetitive Verdrängung möglich ist. Zur Durchführung wurden 50 nM Tp5A-mant und 150 nM *E. coli* TMPK bzw. 100 nM Tp5A-mant und 100 nM menschliche TMPK vorgelegt und die Konzentration von Tp5A bzw. AZTp5A stufenweise solange erhöht, bis keine Fluoreszenzabnahme durch Freisetzen von gebundenem Tp5A-mant mehr zu beobachten war. Da die entsprechende Dissoziationskonstante des Komplexes von TMPK und Tp5A-mant (ermittelt in einem unabhängigen Experiment, siehe oben) und die für die Verdrängungstitration verwendeten Konzentrationen von Tp5A-mant und TMPK bekannt sind, konnte mit dem Programm SCIENTIST in einem iterativen Verfahren nach folgendem Gleichungssystem eine berechnete Kurve an die Meßdaten angepaßt werden und so die  $K_d$ -Werte der Komplexe von TMPK und Tp5A bzw. AZTp5A berechnet werden.

**Modell:**

//Comp. Titration

IndVars: C

DepVars: A, B, AB, AC, Cf, F

Params: K1, K2, ATOT, BTOT, Yb, Yab

 $AB = A \cdot B / K1$  $AC = A \cdot Cf / K2$  $ATOT = A + AB + AC$  $BTOT = B + AB$  $C = Cf + AC$  $0 < A < ATOT$  $0 < B < BTOT$  $0 < Cf < C$  $F = B \cdot Yb + AB \cdot Yab$ **Definitionen:**

A: TMPK

B: Tp5A-mant

C: Tp5A bzw. AZTp5A

Cf: freie Konzentration an C

TOT: Gesamtkonzentration

F: Fluoreszenz

K1:  $K_d$  des Komplexes ABK2:  $K_d$  des Komplexes AC

Yb: F von freiem B

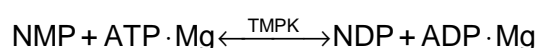
Yab: F des AB-Komplexes

Für die Berechnung von K2, Yb und Yab wurden die unabhängig bestimmten Größen K1, A (TMPK Konzentration) und C (Tp5A-mant Konzentration) konstant gehalten.

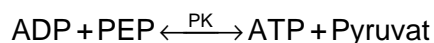
### 5.1.6 Gekoppelter, UV-spektroskopischer Enzymtest zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{cat}}$ ) verschiedener Substrate an menschlicher TMPK

Die UV-spektroskopische Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{cat}}$  verschiedener Substrate an isolierter TMPK unter *steady-state* Bedingungen erfolgte in Anlehnung an einen von Berghäuser (1975) beschriebenen gekoppelten Enzymtest, der von Reinstein et al. (1988) für die Anwendung auf Adenylatkinase optimiert wurde. Unter Zuhilfenahme von Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), Phosphoenolpyruvat (PEP) und der beiden Hilfsenzyme Lactatdehydrogenase (LDH) und Pyruvatkinase (PK) können mit diesem komplexen Assay die Michaelis-Menten-Parameter  $K_M$  und  $V_{\text{max}}$  (Michaelis-Menten-konstante und maximale Umsatzgeschwindigkeit) der von der TMPK katalysierten Reaktion erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit diente er zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{cat}}$ -Werte) verschiedener Substrate zu TMPK. Da die Geschwindigkeitskonstanten mit diesem Assay nur indirekt bestimmt werden und man die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion betrachtet, erhält man keine Information über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (z. B. chemische Reaktion, Konformationsänderung vor, während oder nach der Reaktion oder Produktfreisetzung) der Reaktion anhand dieser Messungen. Die Grundlagen dieses Assays lassen sich folgendermaßen beschreiben:

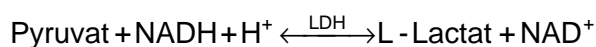
Die TMPK katalysiert die reversible Übertragung der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von  $\text{ATP} \cdot \text{Mg}$  auf NMP (TMP oder ein anderes Thymidinmonophosphatanalogon):



Das durch die Hinreaktion gebildete ADP wird in Gegenwart von PEP durch Pyruvatkinase unter Bildung von Pyruvat zum Triphosphat phosphoryliert:



Die Carbonylgruppe des in dieser Reaktion gebildeten Pyruvats wird in Gegenwart von NADH in einer weiteren, durch Laktatdehydrogenase katalysierten, stereoselektiven Hydridübertragungsreaktion reduziert und führt zum L-Lactat:



Als indirektes Meßsignal der Thymidylatkinasereaktion dient die Abnahme der UV-Absorption von NADH bei der Oxidation zu NAD<sup>+</sup> bei einer Wellenlänge von 340 nm, wie in der letzten Reaktionsgleichung dargestellt. Die Grundvoraussetzung für diesen gekoppelten Assay ist, daß die beiden Reaktionen, die durch die Hilfsenzyme PK und LDH katalysiert werden, um Größenordnungen schneller sind, als die zu bestimmende Thymidylatkinasereaktion.

Alle Messungen wurden in 1 ml Reaktionslösung bei 25 °C an einem UV-Spektrophotometer der Firma Beckmann (DU 640 Spektrophotometer) durchgeführt. Die Messungen wurden mit folgenden Puffer-, Enzym- und Substratkonzentrationen durchgeführt, unter denen *steady-state* Bedingungen erfüllt sind.

Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	100 mM KCl
	0.25 mM Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NADH)
	0.5 mM Phosphoenolpyruvat (PEP)
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
Phosphoryldonor:	1 mM Adenosintriphosphat-Magnesium (ATP*Mg)
Hilfsenzyme:	11 Units Lactatdehydrogenase (LDH)
	10 Units Pyruvatkinase (PK)
(Eine Unit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.)	
TMPK:	99 nM für WT oder TMPK-R200A, 160 nM für TMPK-R200A-F105Y oder 16 nM für TMPK-R200A-LID
Phosphorylakzeptor:	277 µM TMP, 350 µM AZTMP, 181 µM d4TMP, 209 µM FLTMP, 250 µM ddTMP oder 201 µM NH <sub>2</sub> TMP

Zur Durchführung einer Messung wurde der Puffer vorgelegt und nacheinander ATP, die Hilfsenzyme, die TMPK und zum Starten der Reaktion das zu untersuchende NMP zugegeben. Vor jeder Zugabe wurde gewartet, bis eine konstante UV-Absorption beobachtet wurde. Dadurch wurde gewährleistet, daß die nach dem Starten der Reaktion beobachtete Fluoreszenzabnahme nur durch Abreaktion des zugegebenem NMPs stammt. TMP und ADP aus der nicht vollständig nukleotidfreien TMPK sollten vorher abreagieren und die Messung nicht stören. Gleichzeitig ist gezeigt, daß die beiden Hilfsenzyme nicht mit einer ATPase verunreinigt sind, die ebenfalls ATP zu ADP abbauen würden und so die Messung verfälschen würden.

Für die Auswertung der Experimente muß bekannt sein, ob das in der Thymidylatkinasereaktion gebildeten NDP (Thymidindiphosphatanalogon) ebenfalls wie ADP von der Pyrovatkinase unter Verbrauch eines weiteren Äquivalentes Phosphoenolpyruvat oder durch eine Verunreinigung der Hilfsenzyme (z. B. Nukleosiddiphosphatkinase) unter Verbrauch eines weiteren Äquivalentes ATP zu den entsprechenden Triphosphaten phosphoryliert werden. Wenn eines der beiden Fälle für ein NDP zutrifft, werden nicht 1 Äquivalent NADH sondern 2 Äquivalente NADH pro TMPK-Reaktionsäquivalent zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, so daß man dieses Faktor gegebenenfalls in der Auswertung berücksichtigen muß.

Dazu wurde der gleiche Assay mit  $1 \mu\text{M}$  TMPK und ca.  $50 \mu\text{M}$  des entsprechenden NMPs wiederholt. Da die UV-Absorptionsabnahme von 1 OD einem Umsatz von  $160 \mu\text{M}$  NADH entsprechen, kann man aus diesem Experiment quantitativ feststellen, ob ein oder zwei Äquivalente NADH pro TMPK-Reaktionsäquivalent umgesetzt werden. Gleichzeitig kann man mit diesem Test die NMP-Konzentration des für die Messung verwendeten TMP-Analogons überprüfen.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  erhält man nach folgender Gleichung:

$$k_{\text{cat}} = \frac{\Delta\text{Absorption}_{340} \cdot \text{Reaktionsvolumen}}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot D \cdot [\text{TMPK}]} [\text{s}^{-1}]$$

Dabei ist  $\Delta\text{Absorption}_{340}/\Delta t$  die Steigung der beobachtete UV-Absorptionsabnahme am Anfang der Reaktion (im linearen Bereich) mit der Einheit OD/min,  $D$  ist die Schichtdicke der Lösung (1 cm),  $[\text{TMPK}]$  die für die Reaktion verwendete TMPK-Konzentration und  $\varepsilon$  der molare Absorptionskoeffizient von NADH bei 340 nm ( $6.2 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) entsprechend eines NADH Umsatzes von  $160 \mu\text{M}/\text{OD}$ . Das Reaktionsvolumen entspricht  $1 \text{ cm}^3$ .

### 5.1.7 Proteinkristallographie

Alle für die Kristallographie verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert. Verwendete Kristallisationsbedingungen und –strategien, die Röntgenquellen und Detektoren für die Datensammlung, die Verfeinerungsstrategien, sowie alle verwendeten Programme sind in den entsprechenden Kapiteln im Teil Ergebnisse und Diskussion aufgeführt.

## 5.2 Allgemein chemische und analytische Methoden und chemische Synthese

### 5.2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad puriss. p.a bzw. p.a und wurden, sofern nicht im Text bei den entsprechenden Substanzen explizit aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Baker, Camtro Scientific, Sigma, Fluka, Serva, Gerbu, Merck, Aldrich, Pharmacia, Boehringer, Riedel-de Häen, ICN Biomedical und MoBiTec. Die Enzyme alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase aus Schweinemuskel, Pyrovatkinase aus Kaninchenmuskel und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz wurden von Boehringer Mannheim und BSA von MBI Fermentas bezogen.

Die Nukleotide  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und  $\text{ddTMP}$  wurden als Triphosphate von den Firmen USB bzw. Boehringer Mannheim bezogen und durch enzymatischen Abbau durch Inkubation mit 5 U Phosphodiesterase für 3 h bzw. 12 h bei Raumtemperatur hergestellt. Der Abbau zu den entsprechenden Monophosphaten wurde mittels HPLC kontrolliert. Die Abtrennung der Phosphodiesterase nach erfolgtem Abbau erfolgte durch Filtration in einem Vivaspin mit einer Membran von 5 kD Ausschlußgrenze.

### 5.2.2 Anionenaustauschchromatographie

Zur Anionenaustauschchromatographie wurde das High-Load-System LKB GP-10 der Fa. Pharmacia mit Pumpe P-50, UV-M-2-Detektor, Konduktivitätsmonitor, Rec-102-Schreiber und Fraktionssammler SuperFrac verwendet.

### 5.2.3 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Im synthetischen Teil dieser Arbeit wurde die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*reversed Phase* HPLC) mit dem Beckmann System Gold durchgeführt. Die HPLC-Anlage besteht aus dem programmierbaren Lösungsmittelmodul 125 (Pumpensystem), einem Photodiode-Array-Detektor Modul 168 (UV-Detektor) und einem Shimadzu RF-535 Fluoreszenzdetektor. Als Interface für den Fluoreszenzdetektor dient das Analog Interface Modul 406. Die für die Reinigung oder Reaktionskontrolle verwendeten Säulentypen sind im Text aufgeführt. Die HPLC-Pufferlösungen wurden vor Gebrauch filtriert und 20 min im Ultraschallbad entgast. Die

auf die Säule aufgetragene Probe wurden im verwendeten HPLC-Startpuffer aufgenommen und vor der Auftragung auf die Säule mikrofiltriert.

Für isokratische, analytische HPLC-Läufe wurde das Beckmann System Gold 166 verwendet (Integrator: C-R6A Chromatopac, Shimadzu; Solvent Delivery module 110B, Beckmann; C 18-Ultrasphere Säule, Beckmann). Der HPLC-Puffer für isokratische Läufe war: 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, 100 mM Kpi (Dikaliumhydrogen-, Kaliumdihydrogencarbonat pH = 7.0), 0.2 mM Natriumazid.

#### 5.2.4 Nukleotidkonzentrationsbestimmungen

Die Nukleotidkonzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte von Nukleotidlösungen in Tris-HCl-Puffer (50 mM; pH 7.0) in einer Quarzküvette mit einem UV-Visible-Spektrophotometer Cary 3E. Die Konzentrationen der Lösungen wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz errechnet:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = c \cdot \varepsilon \cdot d$$

Dabei stehen  $I_0$  und  $I$  für die Intensität des eingestrahnten bzw. austretenden Lichtes,  $c$  ist die Konzentration des Nukleotids in mM,  $d$  die Schichtdicke der Küvette in cm (1 cm für die verwendeten Küvetten) und  $\varepsilon$  bezeichnet den molaren Extinktionskoeffizienten der Substanz in  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Der Extinktionskoeffizient für Thymidinderivate (TMP, d4TMP, FTMP, 3'NH<sub>2</sub>TMP, ddTMP und AZTMP) beträgt  $9.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 267 nm, für Adenosinderivate (ADP, ATP, Ap4 und AppNHp)  $15.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 259 nm und für die Binukleotidinhibitoren Tp5A und AZTp5A  $22.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 262.2 nm.

#### 5.2.5 Lyophilisation

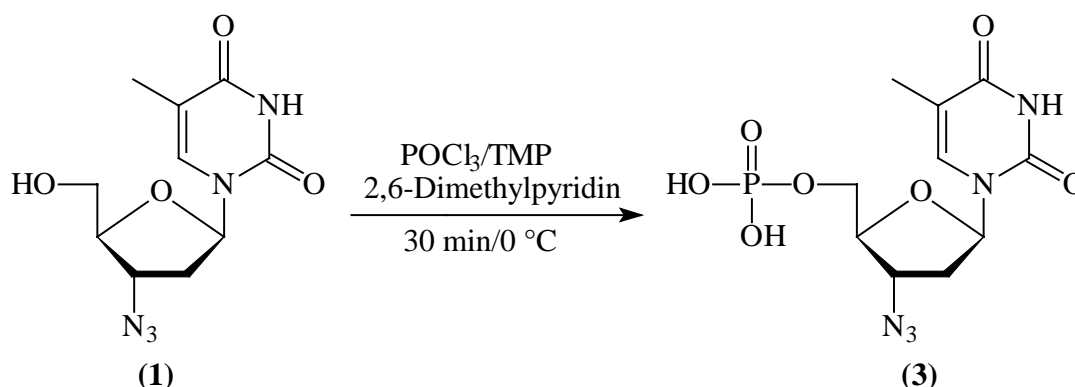
Für die Lyophilisation kleiner Volumina (< 2 ml) wurde die Speed Vac Plus SC 110 A der Firma Savant verwendet. Größere Volumina (> 2 ml) wurden mit dem Uni Trap Modell 10-100 der Firma VirTis bei  $10^{-3}$  mbar, -80 °C (Temperatur der Kühlfalle) eingeeengt.

### 5.2.6 Massenspektrometrie

Massenspektren zur Identifizierung von Nucleotiden oder Nucleotidanaloga wurden an einem Elektrospray Ionisations LCQ Massenspektrometer (ESI-MS, Finnigan, San José, CA, USA) mit Nano-Elektrospray Ionenquelle im negativen Ionenbereich von Dr. H. Prinz aufgenommen. Verdampfen des Lösungsmittels (H<sub>2</sub>O) erfolgte aus einer goldbeschichteten Quarzkapillare mit 1 µm Durchmesser an der Spitze. Das Molekulargewicht M des gemessenen Nucleotids errechnet sich aus dem Spektrum aus dem Produkt des Masse-Ladungsverhältnisses des Ions m/z und der Ladungszahl z abzüglich der Zahl der Ladungen z des entsprechenden Ions nach folgender Formel:

$$M = z \cdot \frac{m}{z} - z$$

### 5.2.7 Synthese von Azidothymidinmonophosphat



267.3 mg (1.0 mmol) Azidothymidin wurden bei Raumtemperatur unter Argon als Schutzgas in 1.5 ml wasserfreiem Trimethylphosphat gelöst und anschließend auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 348.3 µl (3.0 mmol) 2,6-Dimethylpyridin und 186.4 µl (2.0 mmol) Phosphoroxidtrichlorid wurde 30 min bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe von 30 ml 20 mM Triethylammoniumacetat-Lösung (pH 7.5) wurde anschließend die Reaktion gestoppt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *Reversed Phase* HPLC kontrolliert:



## HPLC-Bedingungen:

Säule:	ODS-Hypersil <i>Reversed Phase</i> C-18, 5 µm, 120 Å, 250×4.6 mm	
Flußrate:	1.5 ml/min	
Detektion:	254 nm	
Laufmittel:	Puffer A: Tetrabutylammoniumbromid (0.01 M), Dikaliumhydrogen-, Kaliumdihydrogenphosphat (0.1 M, pH = 6.5) Puffer B: Acetonitril (50 %), Puffer A (50 %)	
Gradient:	15 % Puffer B isokratisch für 1 min 15 % - 100 % Puffer B innerhalb 14 min 100 % Puffer B für 5 min	
Retentionszeiten:	Azidothymidin:	6.6 min
	2,6-Dimethylpyridin:	11.28 min
	Azidothymidinmonophosphat:	6.4 min
	höhere Phosphate:	9.21 min

Nach weiteren 30 min bei 0 °C wurde die Reaktionslösung im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M Natronlauge auf 7.5 eingestellt und anschließend die wäßrige Lösung mit 2mal 30 ml Diethylether extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung des Produktes wurde die wäßrige Phase durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt.

## Bedingungen:

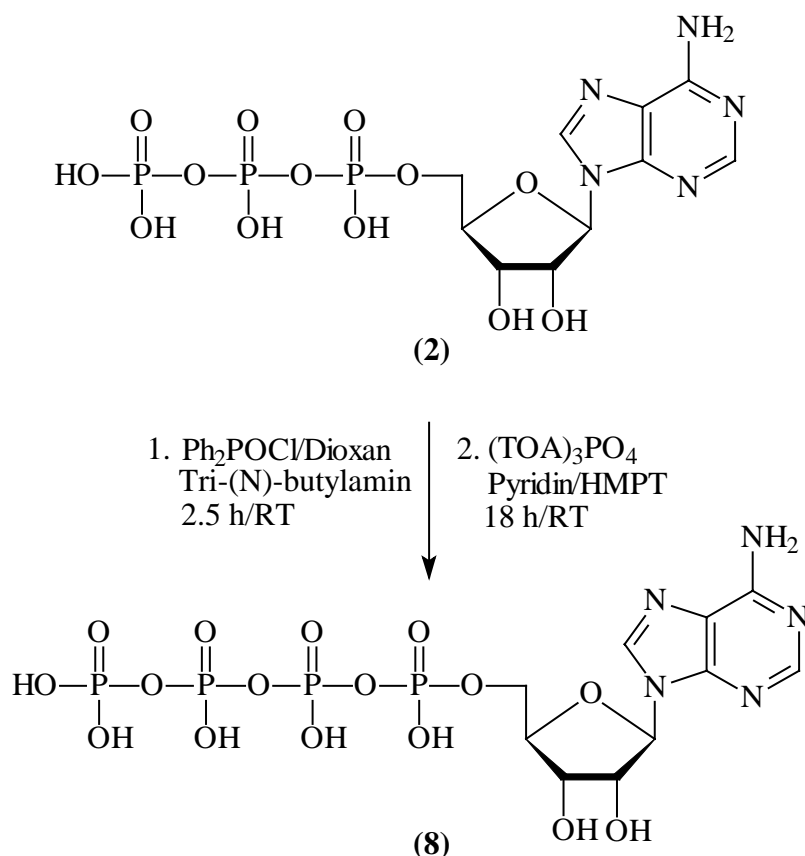
Säule:	Q-Sepharose <i>Fast-Flow</i> , 100x15 mm	
Flußrate:	3 ml/min	
Detektion:	254 nm	
Laufmittel:	Puffer A: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (5 mM, pH 7.5) Puffer B: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1 M, pH 7.5)	
Gradient:	0 % Puffer B isokratisch für 200 ml 0 % - 30 % Puffer B innerhalb 700 ml	
Elution	Azidothymidinmonophosphat:	zwischen 5 % und 15 % Puffer B

Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer konzentriert und 5mal mit je 5 ml Wasser lyophilisiert. Der

Rückstand wurde in 4 ml Wasser aufgenommen, schockgefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Nukleotidkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 267 nm. Die Konzentration wurde man nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet (Extinktionskoeffizient:  $9.7\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ausb.: 203.5 mg (59 %); MS: m/z: 346 ( $\text{M}-\text{H}^+$ ) $^-$ .

Neben dem Nachweis durch Elektrospray-Massenspektrometrie wurde das synthetisierte Azidothymidinmonophosphat durch enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase zum Azidothymidin nachgewiesen. Die Dephosphorylierung wurde durch analytische HPLC analog der Reaktionskontrolle durchgeführt.

### 3.2.8 Synthese von Adenosintetraphosphat



2.21 g (4 mmol) des Dinatriumsalzes von Adenosintriphosphat wurden in 20 ml Wasser gelöst und durch Kationenaustauschchromatographie an dem stark sauren Kationenaustauscher Merck I (Pyridinium-Form, erhalten durch Lagerung der  $\text{H}^+$ -Form in 50% wässrigem Pyridin) in das Pyridiniumsalz überführt. Das Adenosintriphosphat

wurde mit 50% wässrigem Methanol eluiert. Anschließend wurde das Eluat in einem Rotationsverdampfer vollständig konzentriert. Der Rückstand wurde in 5.24 ml (12 mmol) Tri-(N)-oktylamin und 30 ml Methanol aufgenommen, ca. 20 min bis zur vollständigen Auflösung des Rückstandes gerührt, vollständig konzentriert und durch Koevaporation mit wasserfreiem Dimethylformamid (3mal mit je 5 ml) getrocknet (Ölpumpe).

Das wasserfreie Triphosphat wurde in 10 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, mit 1.8 ml (8.7 mmol) Diphenylphosphorochloridat und 1.9 ml (8 mmol) Tri-(N)-butylamin versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das aktivierte Adenosintriphosphat unter Rühren und Eiskühlung mit 70 ml wasserfreiem Diethylether ausgefällt. Nach weiteren 30 min bei 0 °C wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand in 5 ml Dioxan aufgenommen und durch erneutes konzentrieren im Rotationsverdampfer getrocknet.

Zu dem Rückstand wurde eine Lösung aus 10 mmol Orthophosphat als Tri-(N)-oktylammonium-Salz (erhalten durch lösen von 0.98 g (10 mmol) Orthophosphorsäure und 4.37 ml (10 mmol) Tri-(N)-oktylamin in 10 ml Methanol und anschließendem azeotropischen Trocknen mit 3mal 5 ml wasserfreiem Pyridin), 5 ml Pyridin und 1 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid gegeben. Das Pyridin wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und die Reaktionslösung 18 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte durch analytische HPLC (Bedingungen wie unter AZTMP).

Retentionszeiten: Adenosintriphosphat: 7.5 min

Adenosintetraphosphat: 8.4 min

Anschließend wurde die Reaktionslösung im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert, der Rückstand in 40 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M KOH auf 8.0 eingestellt und die Lösung mit 2mal 40 ml Diethylether extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung des Produktes wurde die wässrige Phase durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt.

Bedingungen:

Säule: Q-Sepharose *Fast-Flow*, 100x15 mm

Flußrate: 3 ml/min

Detektion: 254 nm

Laufmittel: Puffer A: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (50 mM, pH 7.5)

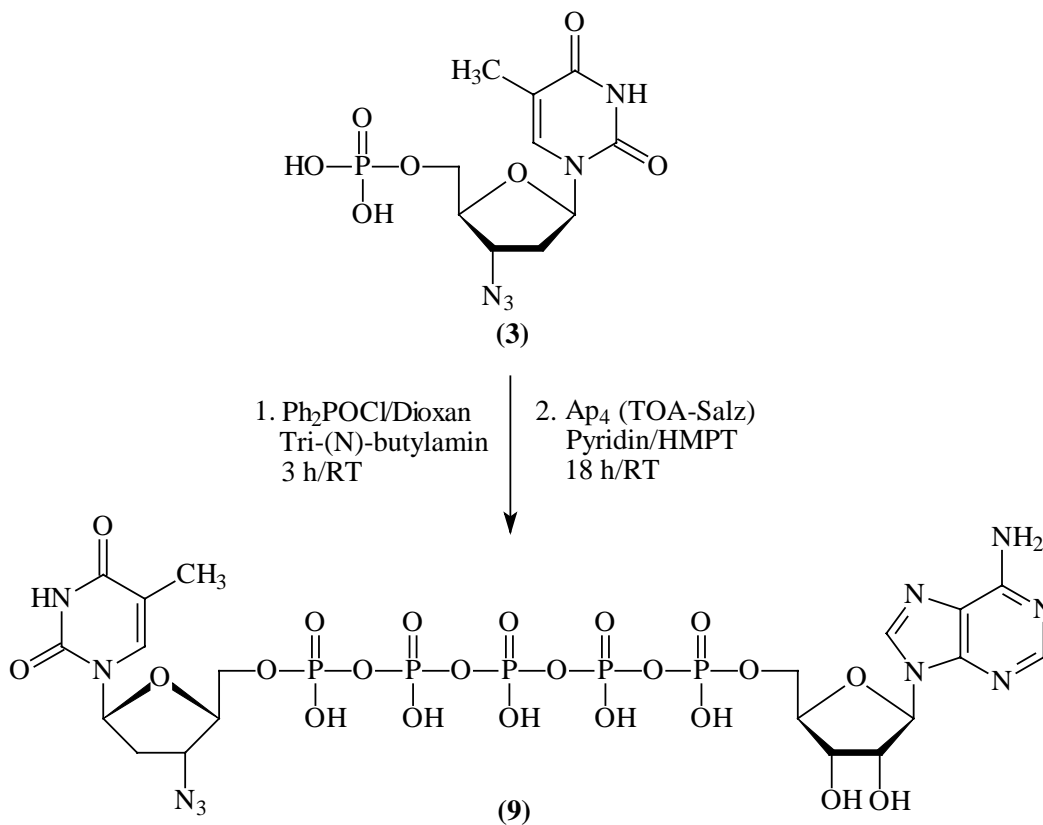
Puffer B: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1 M, pH 7.5)

Gradient: 0 % Puffer B isokratisch für 200 ml  
 0 % - 50 % Puffer B innerhalb 1400 ml  
 Elution Adenosintetraphosphat: zwischen 25 % und 40 % Puffer B

Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer konzentriert und 5mal mit je 5 ml Wasser lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen, schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Nukleotidkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 259 nm. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet (Extinktionskoeffizient: 15.4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Ausb.: 384 mg (16 %); MS: m/z: 586.4 (M-H<sup>+</sup>)<sup>-</sup>.

Neben dem Nachweis durch Elektrospray-Massenspektrometrie wurde das synthetisierte Adenosintetraphosphat durch enzymatischen Abbau mit alkalischer Phosphatase zum Adenosin nachgewiesen. Die Dephosphorylierung wurde durch analytische HPLC analog der Reaktionskontrolle kontrolliert.

### 5.2.9 Synthese von P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphat



204 mg (0.59 mmol) Azidothymidinmonophosphat wurden in 5 ml Wasser gelöst und durch Kationenaustauschchromatographie an dem stark sauren Kationenaustauscher Merck I (Pyrodimium-Form, erhalten durch Lagerung der H<sup>+</sup>-Form in 50% wässrigem Pyridin) in das Pyrodimiumsals überführt. Das Azidothymidinmonophosphat wurde mit 50% wässrigem Methanol eluiert und anschließend das Eluat in einem Rotationsverdampfer vollständig konzentriert. Der Rückstand wurde in 257 µl (0.57 mmol) Tri-(N)-oktylamin und 10 ml Methanol aufgenommen, ca. 20 min bis zur vollständigen Auflösung des Rückstandes gerührt, vollständig konzentriert und durch Koevaporation mit wasserfreiem Dimethylformamid (3mal mit je 5 ml) getrocknet (Ölpumpe).

Das wasserfreie Monophosphat wurde in 7 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, mit 249 µl (1.2 mmol) Diphenylphosphorochloridat und 286 µl (1.2 mmol) Tri-(N)-butylamin versetzt und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das aktivierte Azidothymidinmonophosphat unter Rühren und Eiskühlung mit 70 ml wasserfreiem Diethylether ausgefällt. Nach weiteren 30 min bei 0 °C wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand in 3 ml Dioxan aufgenommen und im Vakuum restliches Diethylether entfernt.

Zu dieser Lösung wurde eine Lösung aus 240 mg (0.4 mmol) Adenosintetraphosphat als Tri-(N)-oktylammonium-Salz (erhalten durch Kationenaustauschchromatographie des synthetisierten Adenosintetraphosphates an dem stark sauren Kationenaustauscher Merck I; die Elution erfolgt mit 50% wässrigem Methanol in einen Kolben mit vier Äquivalenten Tri-(N)-oktylamin (714 µl (1.6 mmol))); nach vollständiger Konzentration des Eluates wird der Rückstand durch Koevaporation mit wasserfreiem Pyridin (3mal 5 ml) getrocknet, 5 ml Pyridin und 1 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid gegeben. Das Pyridin wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und die Reaktionslösung 18 h bei RT gerührt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 30 ml Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung (50 mM) zugegeben und anschließend vollständig im Rotationsverdampfer konzentriert. Der Rückstand wurde in 25 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M NaOH auf 7.5 eingestellt und die Lösung mit 2mal 30 ml Diethylether extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung des Produktes wurde die wässrige Phase durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt.

## Bedingungen:

Säule: Q-Sepharose *Fast-Flow*, 100x15 mm  
Flußrate: 3 ml/min  
Detektion: 254 nm  
Laufmittel: Puffer A: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (50 mM, pH 7.5)  
Puffer B: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1 M, pH 7.5)  
Gradient: 0 % - 20 % Puffer B innerhalb 200 ml  
20 % - 70 % Puffer B innerhalb 1300 ml

Elution des P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphates:  
zwischen 40 % und 60 % Puffer B

Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert, in 0.5 ml Wasser aufgenommen und durch präparative HPLC weiter aufgereinigt.

## HPLC-Bedingungen:

Säule: YMC-Pack ODS *Reversed Phase* C-18, 5 µm, 120 Å, 250x20 mm  
Flußrate: 10 ml/min  
Detektion: 254 nm  
Laufmittel: Puffer A: Triethylammoniumacetat (100 mM), pH 7.0  
Puffer B: Acetonitril (70 %), Puffer A (30 %)  
Gradient: 0 % - 22 % Puffer B innerhalb 36 min

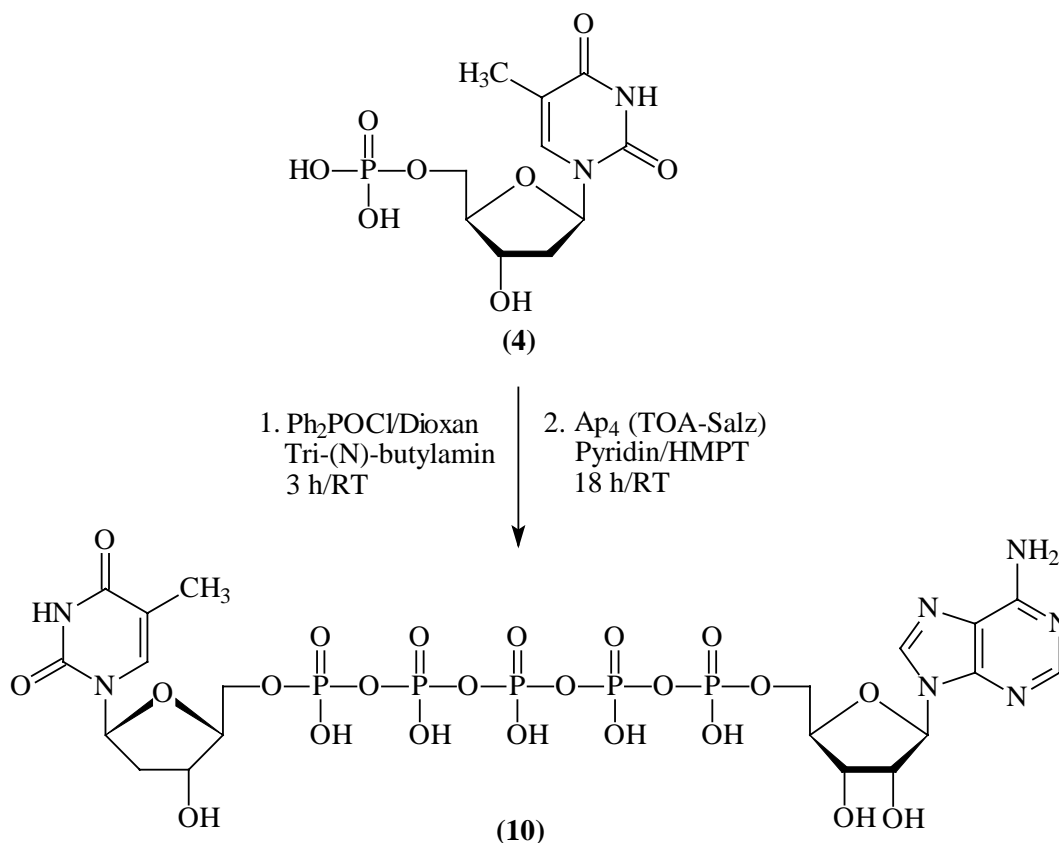
Retentionszeit: P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphat:  
29.8 min

Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert und 5mal mit je 5 ml Wasser lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M NaOH auf 7.5 eingestellt, die Lösung schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 262.6 nm. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet (Extinktionskoeffizient: 22.3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Ausb.: 6.4 mg (2 %), MS: m/z: 914.9 (M-H<sup>+</sup>).

Neben dem Nachweis durch Elektrospray-Massenspektrometrie wurde das synthetisierte P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Azidothymidyl)-pentaphosphat durch

enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase zu den korrespondierenden Monophosphaten nachgewiesen. Der Abbau wurde durch analytische HPLC kontrolliert.

### 5.2.10 Synthese von P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Thymidyl)-pentaphosphat



322.21 mg (1 mmol) des Natriumsalzes von Thymidinmonophosphat wurden in 5 ml Wasser gelöst und durch Kationenaustauschchromatographie an dem stark sauren Kationenaustauscher Merck I (Pyrodinium-Form, erhalten durch Lagerung der H<sup>+</sup>-Form in 50% wässrigem Pyridin) in das Pyrodiniumsalz überführt. Das Thymidinmonophosphat wurde mit 50% wässrigem Methanol eluiert und anschließend das Eluat in einem Rotationsverdampfer vollständig konzentriert. Der Rückstand wurde in 436.6 µl (1 mmol) Tri-(N)-oktylamin und 10 ml Methanol aufgenommen, ca. 20 min bis zur vollständigen Auflösung des Rückstandes gerührt, vollständig konzentriert und durch Koevaporation mit wasserfreiem Dimethylformamid (3mal mit je 5 ml) getrocknet (Ölpumpe).

Das wasserfreie Monophosphat wurde in 7 ml wasserfreiem Dioxan gelöst, mit 415  $\mu$ l (2 mmol) Diphenylphosphorochloridat und 430  $\mu$ l (1.8 mmol) Tri-(N)-butylamin versetzt und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das aktivierte Thymidinmonophosphat unter Rühren und Eiskühlung mit 70 ml wasserfreiem Diethylether ausgefällt. Nach weiteren 30 min bei 0 °C wurde der Überstand abdekantiert, der Rückstand in 3 ml Dioxan aufgenommen und im Vakuum restliches Diethylether entfernt.

Zu dieser Lösung wurde eine Lösung aus 170 mg (0.29 mmol) Adenosintetraphosphat als Tri-(N)-oktylammonium-Salz (erhalten durch Kationenaustauschchromatographie des synthetisierten Adenosintetraphosphates an dem stark sauren Kationenaustauscher Merck I; die Elution erfolgt mit 50% wäßrigem Methanol in einen Kolben mit vier Äquivalenten Tri-(N)-oktylamin (507  $\mu$ l (1.16 mmol)); nach vollständiger Konzentration des Eluates wird der Rückstand durch Koevaporation mit wasserfreiem Pyridin (3mal 5 ml) getrocknet), 5 ml Pyridin und 1 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid gegeben. Das Pyridin wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und die Reaktionslösung 18 h bei RT gerührt.

Um die Reaktion zu stoppen, wurden 30 ml Triethylammoniumhydrogencarbonatlösung (50 mM) zugegeben und anschließend vollständig im Rotationsverdampfer konzentriert. Der Rückstand wurde in 35 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M NaOH auf 7.5 eingestellt und die Lösung mit 2mal 50 ml Diethylether extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung des Produktes wurde die wäßrige Phase durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt.

Bedingungen:

Säule: Q-Sepharose *Fast-Flow*, 100x15 mm

Flußrate: 3 ml/min

Detektion: 254 nm

Laufmittel: Puffer A: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (50 mM, pH 7.5)

Puffer B: Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (1 M, pH 7.5)

Gradient: 0 % - 20 % Puffer B innerhalb 200 ml

20 % - 70 % Puffer B innerhalb 1300 ml

Elution des P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-Thymidyl)-pentaphosphates:

zwischen 43 % und 56 % Puffer B



Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert, in 0.5 ml Wasser aufgenommen und durch präparative HPLC weiter aufgereinigt, da das Produkt laut analytischer HPLC nur 80 % rein war.

HPLC-Bedingungen:

Säule: YMC-Pack ODS *Reversed Phase* C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 120 Å, 250×20 mm

Flußrate: 10 ml/min

Detektion: 254 nm

Laufmittel: Puffer A: Triethylammoniumacetat (100 mM), pH 7.0

Puffer B: Acetonitril (70 %), Puffer A (30 %)

Gradient: 0 % - 18 % Puffer B innerhalb 36 min

Retentionszeit:  $\text{P}^1\text{-(5'-Adenosyl)-P}^5\text{-(5'-Thymidyl)-pentaphosphat}$ : 29.8 min

Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer vollständig konzentriert und 5mal mit je 5 ml Wasser lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen, der pH mit 1 M NaOH auf 7.5 eingestellt, die Lösung schockgefroren und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 262.6 nm. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet (Extinktionskoeffizient:  $22.3\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ausb.: 53.9 mg (21 %, bezogen auf eingesetztes Adenosintetraphosphat); MS:  $m/z$ : 890.4 ( $\text{M-H}^+$ ).

Neben dem Nachweis durch Elektrospray-Massenspektrometrie wurde das synthetisierte  $\text{P}^1\text{-(5'-Adenosyl)-P}^5\text{-(5'-Thymidyl)-pentaphosphat}$  durch enzymatischen Abbau mit Phosphodiesterase zu den korrespondierenden Monophosphaten nachgewiesen. Der Abbau wurde durch analytische HPLC kontrolliert.

## 6 Anhang

### 6.1 Ein- und Dreibuchstabencode von L-Aminosäuren

**Tab. 6.1:** Ein- und Dreibuchstabencode von L-Aminosäuren

Alanin	A	Ala	Leucin	L	Leu
Arginin	R	Arg	Lysin	K	Lys
Asparagin	N	Asn	Methionin	M	Met
Aspartat	D	Asp	Phenylalanin	F	Phe
Cystein	C	Cys	Prolin	P	Pro
Glutamin	Q	Gln	Serin	S	Ser
Glutamat	E	Glu	Threonin	T	Thr
Glycin	G	Gly	Tryptophan	W	Trp
Histidin	H	His	Tyrosin	Y	Tyr
Isoleucin	I	Ile	Valin	V	Val

## 6.2 Tabellarische Zusammenfassung der $k_{\text{cat}}$ -Werte der Monophosphate TMP, AZTMP, FLTMP, d4TMP, ddTMP und $\text{NH}_2\text{TMP}$ an menschlicher TMPK und die P-loop Konformationen der in dieser Arbeit untersuchten Komplexe der menschlichen TMPK

**Tab. 6.2:** Zusammenfassung der  $k_{\text{cat}}$ -Werte der Monophosphate TMP, AZTMP, FLTMP, d4TMP, ddTMP und  $\text{NH}_2\text{TMP}$  und die P-loop Konformationen der in dieser Arbeit untersuchten Komplexe der menschlichen TMPK

Komplex der menschlichen TMPK	Besetzung des Zustandes	P-loop Konformation	NMP	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
TMP-ADP	1	offen		
TMP-AppNHp	2/3	partiell-geschlossen		
TMP-ADP-AIF <sub>3</sub>	1	partiell-geschlossen	TMP	0.36
TDP-ADP	2/3	geschlossen		
TP5A	1	geschlossen		
AZTMP-ADP	1	offen		
AZTMP-AppNHp	2/3	offen	AZTMP	0.01
AZTP5A	1/2	offen		
	1/2	partiell-geschlossen		
$\text{NH}_2\text{TMP}$ -AppNHp	1	geschlossen	$\text{NH}_2\text{TMP}$	0.14
FLTMP-ADP	1	offen		
FLTMP-AppNHp	2/3	offen	FLTMP	0.03
d4TMP-ADP	1/2	offen		
	1/2	partiell-geschlossen	d4TMP	0.09
d4TMP-AppNHp	1	partiell-geschlossen		
ddTMP-ADP	1	offen		
ddTMP-AppNHp	1/2	offen	ddTMP	0.03
	1/2	partiell-geschlossen		

### 6.3 Tabellarische Zusammenfassung der Aminosäuren, die in den Modellen der Strukturen der menschlichen TMPK in zwei Konformationen, als Alanin oder nicht modelliert sind.

**Tab. 6.3:** Zusammenfassung der Aminosäuren, die in den Modellen der Strukturen der menschlichen TMPK in zwei Konformationen, als Alanin oder nicht modelliert sind

Komplex der TMPK	Aminosäuren, die		
	nicht modelliert sind	als Ala modelliert sind	in 2 Konformationen modelliert sind
<b>TMP-ADP</b>	M1, A2, A3	R200, K205	S23
<b>TMP-AppNHp</b>	M1, A2	Q136, K142, H148, R200, K205	G13, V14, D15, R16, S23, A136, L137, A138, D139, A140, A141
<b>TMP-ADP-AIF<sub>3</sub></b>	M1, A2, A3	R4, R41, E101, Q136, K142, E152, R162, R200, K205	S23
<b>TDP-ADP</b>	M1, A2, A3, A145, F146, G147, H148	K142, E149, R200, E204, K205	R16, S23, E48, R97
<b>Tp5A</b>	M1, A2, A3	K142, H148, R200	S23
<b>AZTMP-ADP</b>	M1, A2, A3	H148, R200, K205	S23
<b>AZTMP-AppNHp</b>	M1, A2, A3	K142, H148, R200	S23
<b>AZTp5A</b>	M1, A2, A3	K142, R200, K205	G13, V14, D15, R16, S23, L135, Q136, L137, A138, D139, A140, A141, K142, T201, A202, T203, E204
<b>NH<sub>2</sub>TMP- AppNHp</b>	M1, A2, A3	K142, H148, R200, K205	S23, D197
<b>FLTMP-ADP</b>	M1, A2	H148, R200, K205	S23
<b>FLTMP-AppNHp</b>	M1, A2, A3	E110, H148, R200, K205	S23
<b>d4TMP-ADP</b>	M1, A2, A3	E110, H148, R200, K205	G13, V14, D15, R16, S23, S67, L135, Q136, L137, A138, D139, A140, A141, K142, R143, A200, T201, A202, T203, E204
<b>d4TMP-AppNHp</b>	M1, A2, A3, G144, A145, F146, G147, H148	E110, L137, R200, K205	S23, S67
<b>ddTMP-ADP</b>	M1, A2, A3	K142, H148, R200, K205	S23
<b>ddTMP-AppNHp</b>	M1, A2, A3	K142, R200	G13, V14, D15, R16, T201, A202, T203, E204

## 7 Literaturverzeichnis

Abele, U. und Schulz, G. E. (1995) High resolution structures of adenylyate kinase from yeast ligated with inhibitor Ap5A, showing the pathway of phosphoryl transfer. *Protein Science* **4**, 1262-1271.

Akhtar, S. und Rossi, J. J. (1996) Anti-HIV therapy with antisense oligonucleotides and ribosymes: realistic approaches or expensive myths? *J. Antimicrob. Chemother.* **32**, 159-165.

Arts, E. J. und Wainberg, M. A. (1996) Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Anitmicrob. Agents Chemother.* **40**, 527-540.

Balter, M. (1998) On World AIDS Day, a shadow looms over southern Afrika. *Science* **282**, 1790-1791.

Balzarini, J., Pauwels, R., Baba, M., Herdewijn, P., De Clercq, E., Broder, S. und Johns, D. G. (1988) The in vitro and in vivo anti-retrovirus activity, and intracellular metabolism of 3'-azido-2',3'-dideoxycytidine are highly dependent on the cell species. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2065-2068.

Balzarini, J., Herdewijn, P. und De Clercq, E. (1989) Differential pattern of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **264**, 6127-6133.

Balzarini, J., Degreve, B. und De Clercq, E. (1997) Improving AZT efficacy. *Nat. Med.* **4**, 132.

Balzarini, J., Neasens, L., Aquaro, S., Knispel, T., Perno, C.-F., De Clercq, E. und Meier, C. (1999) Intracellular Metabolism of cycloaligenyl 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine monophosphate, a prodrug of 3'-azido-2'-3'-dideoxythymidine (zidovudine). *Mol. Pharm.* **56**, 1354-1361.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

Bartlett, J. G. und Moore, R. D. (1998) Improving HIV Therapy. *Scientific American*, July, 64-69; Bartlett, J. G. und Moore, R. D. (1998) Anti-HIV-Therapien. *Spektrum der Wissenschaft*, September, 36-40.

Bebenek, K., Abbotts, J., Wilson, S. H. und Kunkel, T. A. (1993) Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding and termination probability to mutational hot spots. *J. Biol. Chem.* **268**, 10324-10334.

Berghäuser, J. (1975) A reactive arginine in adenylyate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **379**, 370-376.

- Berry, M. B., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M. und Phillips, G. N. Jr. (1994) The closed conformation of a highly flexible protein: The structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **19**, 183-198.
- Bourdais, J., Biondi, R., Sarfati, S., Guerreiro, C., Lascu, I., Janin, J. und Veron, M. (1996) Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides. Role of nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 7887-7890.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bridges, E. G., Faraj, A. und Sommadossi, J. P. (1993) Inhibition of mammalian DNA polymerase-associated 3' to 5' exonuclease activity by 5'-monophosphates of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 3'-amino-3'-deoxythymidine. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1571-1576.
- Brünger, A.T. (1992) The Free R Value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures *Nature* **355**, 472-474.
- Brünger, A. T. (1993) X-PLOR: a system for X-ray crystallography and NMR. *Yale University Press*, New Haven, CT.
- Brundiers, R., Lavie, A., Veit, T., Reinstein, J., Schlichting, I., Ostermann, N., Goody, R. S. und Konrad, M. (1999) Modifying human thymidylate kinase to potentiate azidothymidine activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 35289-35292.
- Caruso, M. und Klatzmann, D. (1994) Genetically controlled pharmacomodulation for HIV gene therapy. *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie/Life Sci.* **317**, 1027-1030.
- Champness, J. N., Bennett, M. S., Wien, F., Visse, R., Summers, W. C., Herdewijn, P., De Clercq, E., Ostrowski, T., Jarvest, R. L. und Sanderson, M. R. (1998) Exploring the active site of Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase by x-ray crystallography of complexes with aciclovir and other ligands. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **32**, 350-361.
- Cheng, Y. C. und Prusoff, W. H. (1973) Mous ascites sarcoma 180 thymidylate kinase. General properties, kinetic analysis and inhibition studies. *Biochemistry* **12**, 2612-2619.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. und Sodroski, J. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.
- Clay, T. M., Custer, M. C., Spiess, P. J. und Nishimura, M. I. (1999) Potential use of T cell receptor genes to modify hematopoietic stem cells for the gene therapy of cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **5**, 3-15.
- Coffin, J. M. (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* **340**, 571-574..

Collaborative Computational Project, Nummer 4 (1994) The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* **50**, 760-763.

Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, A. D., Jesson, S., Lu, X., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P. A. J., Smith, R. H., Kroeger Koepke, M., Michejda, C. J., Hughes, S. H. und Arnold, E. (1995) Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor  $\alpha$ -APA R95845 at 2.8 Å resolution. *Structure* **3**, 365-379.

Endres, M. J., Clapham, P. R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J. D., McKnight, A., Thomas, J. F., Stoebenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P. J., Wells, T. N., Power, C. A., Sutterwala, S. S., Doms, R. W., Landau, N. R. und Hoxie, J. A. (1996) CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusion/CXCR4. *Cell* **87**, 745-756.

Farnet, C. M. und Bushman, F. D. (1996) HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *AIDS* **10** Suppl. A, 3-11.

Feldhaus, P., Fröhlich, T., Goody, R. S., Isakov, M. und Schirmer, R. H. (1975) Synthetic inhibitors of adenylate kinase in the assays for ATPases and phosphokinases. *Eur. J. Biochem.* **57**, 197-204.

Frensch, G. S. und Wilson, K. S. (1978) *Acta Cryst.* **A34**, 517.

Furman, P. A., Fyfe, J. A., St. Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., Nusinoff Lehrmann, S., Bolognesi, D. P., Broder, S., Mitsuya, H. und Barry, D. W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8333-8337.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. und Markham, P. D. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.

Gait, M. J. und Karn, J. (1995) Progress in anti-HIV structure-based drug design. *Trends Biotechnol.* **13**, 430-438.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. und Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England J. of Med.* **305**(24), 1425-1431.

Guettari, N., Loubiere, L., Brisson, E. und Klatzmann, D. (1997) Use of Herpes Simplex Virus thymidine kinase to improve the antiviral activity of Zidovudine. *Virology* **235**, 398-405.

Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Gonzalez, C., Mc Mohan, D., Richman, D. D., Valentine, F. T., Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E. A. und Chodakewitz, J. A. (1997) Treatment with Indinavir, Zidovudine and Lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *New England J. of Med.* **337**, 734-739.

- Hall, E. T., Yan, J. P., Melancon, P. und Kutscha, R. D. (1994) 3'-Azido-3'-deoxythymidine potently inhibits protein glycosylation. A novel mechanism for AZT cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **269**, 14355-14358.
- Hammer, S. M., Squires, K. E., Hughes, M. D., Grimes, J. M., Demeter, L. M., Curriers, J. S., Eron, J. J., Feinberg, J. E., Baltour, H. H., Deyton, L. R., Chodakewitz, J. A. und Fischl, M. A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *New England J. of Med.* **337**, 725-733.
- Harrington, J. A., Reardon, J. E. und Spector, T. (1993) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) monophosphate: An inhibitor of exonucleolytic repair of AZT-terminated DNA. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **37**, 918-920.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. und Sheriff, S. (1985) Direct phase determination determination based on anomalous Scattering. *Methods in Enzym.* Academic Press, London, 1. Auflage, 115, Kap. 4, 41-55.
- Hendrickson, W. A. (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51-58.
- Herdewijn, P., Balzarini, J., De Clercq, E., Pauwels, R., Baba, M., Broder, S. und Vanderhaeghe, H. (1987) 3'-Substituted 2',3'-dideoxynucleotide analogues as potential anti-HIV (HTLV-III/LAV) agents. *J. Med. Chem.* **30**, 1270-1278.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L. und Harrison, S. C. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: Implications for drug resistance. *Science* **282**, 1669-1675.
- Jasko, M. V., Fedorov, I. I., Atrazhev, A. M., Mozzherin, D. Y., Novicov, N. A., Bochkarev, A. V., Gurskaya, G. V. und Krayevsky, A. A. (1995) Synthesis, molecular and crystal structure of 3'-N-alkylamino-3'-deoxythymidines and some biochemical properties of their phosphorous esters. *Nucleosides & Nucleotides* **14**, 23-37.
- Jeffries, D. J. und De Clercq, E. (1995) Antiviral chemotherapy. *John Wiley & Sons* Chichester - New Yourg - Brisbane - Toronto - Singapore.
- Jones, T. A., Zhou, J.-Y., Cowan, S. W. und Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building proteins in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta. Cryst. A* **47**, 110-119.
- Kabsch, W. (1993) *J. Appl. Cryst.* **24**, 795-800.
- Kingsman, S. M. und Kingsman, A. J. (1996) The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur. J. Biochem.* **240**, 491-507.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. und Steitz, T. A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783-1790.



- Kong, X.-B., Zhu, Q.-Y., Vidal, P. M., Watanabe, K. A., Polsky, B., Armstrong, D., Ostrander, M., Lang, S. A., Muchmore, E. und Chou, T.-C. (1992) Comparison of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **36**, 808-818.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langen, P., Kowolik, G., Etzold, G., Venner, H. und Reinert, H. (1972) The phosphorylation of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine and its incorporation into DNA in a cell free system from tumor cells. *Acta. Biol. Med. Ger.* **29**, 483-494.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993) PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of proteins. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Lavie, A., Schlichting, I., Vetter, I. R., Konrad, M., Reinstein, J. und Goody R. S. (1997a) The bottleneck in AZT activation. *Nature Medicine* **3**, 922-924.
- Lavie, A., Vetter, I. R., Konrad, M., Goody, R. S., Reinstein, J. und Schlichting, I. (1997b) Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 601-604.
- Lavie, A., Konrad, M., Brundiers, R., Goody, R. S., Schlichting, I. und Reinstein, J. (1998a) Crystal structure of yeast thymidylate kinase complexed with the bisubstrate inhibitor P<sup>1</sup>-(5'-adenosyl)-P<sup>5</sup>-(5'-thymidyl) pentaphosphate (Tp5A) at 2.0 Å resolution: Implications for catalysis and AZT activation. *Biochemistry* **37**, 3677-3686.
- Lavie, A., Ostermann, N., Brundiers, R., Goody, R. S., Reinstein, J., Konrad, M. und Schlichting, I. (1998b) Structural basis for efficient phosphorylation of 3'-azidothymidine monophosphate by *Escherichia coli* thymidylate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14045-14050.
- Lehmann, M. E., Scholz, C., Rosenthal, H. A. und Langen, P. (1988) Phosphorylation, anti-HIV activity and cytotoxicity of 3'-fluorothymidine. *Biochem. Biophys. Research Com.* **153**, 825-831.
- Levy, J. A., Hoffmann, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. und Oshiro, L. S. (1984) Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals. *J. Infect. Dis.* **152**, 734-738.
- Li, Y., Zhang, Y. und Yan, H. (1996) Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 28038-28044.
- Mann, J. M. und Tarantola, D. J. M. (1998) HIV 1998: The Global Picture. *Scientific American*, July, 62-63; Mann, J. M. und Tarantola, D. J. M. (1998) AIDS - die globale Bilanz. *Spektrum der Wissenschaft*, September, 34-35.

- Meier, C., Lorey, M., De Clercq, E. und Balzarini, J. (1997a) Cyclic saligenyl phosphotriesters of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T) – a new pro-nucleotide approach. *Bioorg. & Medic. Chem. Letters* **7**, 99-104.
- Meier, C., Lorey, M., De Clercq, E. und Balzarini, J. (1997b) Cyclo-saligenyl-2'-3'-dideoxy-2'-3'-didehydrothymidinemonophosphate (cyclosal-d4TMP) – a new pro-nucleotide approach. *Nucleosides & Nucleotides* **16**, 1303-1306.
- Meier, C., De Clercq, E. und Balzarini, J. (1997c) Cyclo-saligenyl-3'-azido-2'-3'-dideoxythymidinemonophosphate (cyclosal-AZTMP) - a new pro-nucleotide approach. *Nucleosides & Nucleotides* **16**, 793-796.
- Meier, C., Lorey, M., De Clercq, E. und Balzarini, J. (1998) Cyclosal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine monophosphate (cyclosal-d4TMP) – synthesis and antiviral evaluation of a new d4TMP delivery system. *J. Med. Chem.* **41**, 1417-1427.
- Mildvan, A. S. (1997) Mechanisms of signaling and related enzymes. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **29**, 401-416.
- Modrow, S. und Falke, D. (1997) Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Montaner, J. (1998) Standards of medical therapy for HIV-lessons from the 12th world AIDS conference.
- Müller, C. W. und Schulz, G. E. (1992) Structure of the complex between adenylate kinase from Escherichia coli and the inhibitor Ap5A refined at 1.9 Å resolution – a model for a catalytic transition state. *J. Mol. Biol.* **224**, 159-177.
- Neuhard, D. J. und Nygaard, P. (1987) Biosynthesis and conversation of nukleotides. *Cellular and molecular biology* 445-447.
- Nicholls, A., Sharp, K. und Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **11**, 281-296.
- Pan, X.-Z., Qui, Z.-D., Baron, P. A., Gold, J. W. M., Polsky, B. und Chou, T. C. (1992) Three-drug synergistic inhibition of HIV-1 replication in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxythymidine, recombinant soluble CD4 and recombinant interferon-alpha. *AIDS Research & Human Retroviruses* **8**, 589-595.
- Pauling, L. (1960) The nature of the chemical bond. 3<sup>rd</sup> ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 255-260.
- Qian, M., Bui, T., Ho, R. J. Y. und Unadkat, J. D. (1994) Metabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) in human placental Trophoblasts and Hofbauer cells. *Biochem. Pharmac.* **48**, 383-389.
- Ramachandran, G. N. und Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. In Prot. Chem.* **23**, 283-483.

- Reinstein, J., Brune, M. und Wittinghofer, A. (1988) Mutations in the Nucleotide Binding Loop of Adenylate Kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **27**, 4712-4720.
- Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D. und Stammers, D. (1995) High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 293-302.
- Ren, J., Esnouf, R. M., Hopkins, A. L., Stuart, D. I. und Stammers, D. K. (1999) Crystallographic analysis of the binding modes of thiazoloisoindolinone non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase and comparison with modeling studies. *J. Med. Chem.* **42**, 3845-3851.
- Rhoads, D. G. und Lowenstein, J. M. (1968) Initial velocity and equilibrium kinetics of myokinase. *J. Biol. Chem.* **243**, 3963-3972.
- Rittinger, K., Divita, G. und Goody, R. S. (1995) Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8986-8988.
- Rübsamen-Weigmann, H. (1995) Neue Konzepte zur Behandlung von AIDS und der HIV-Infektion. *Spektrum der Wissenschaft*, Dossier Seuchen.
- Rossmann, M. G. (1972) The molecular replacement method. Gordon and Breach, New York – London – Paris.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. und Wittinghofer, A. (1990) The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- Scheffzek, K., Kliche, W., Wiesmüller, L. und Reinstein, J. (1996) Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P<sup>1</sup>-(5'-adenosyl) P<sup>5</sup>-(5'-uridyl) pentaphosphate (Up5A) and Mg<sup>2+</sup> at 2.2 Å: Implications for water-mediated specificity. *Biochemistry* **35**, 9716-9727.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. und Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338.
- Scheidig, A. J., Burmester, C. und Goody, R. S. (1999) The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Struct. Fold. Des* **7**, 1311-1324.
- Schinazi, R. F., Boudinot, F. D., Doshi, K. J. und McClure, H. M. (1990) Pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents & Chemother.* **34**, 1214-1219.
- Schlichting, I. und Reinstein, J. (1997) Structure of active conformations of UMP kinase from *Dictyostelium discoideum* suggest phosphoryl transfer is associative. *Biochemistry* **36**, 9290-9296.
- Schlichting, I. und Reinstein, J. (1999) pH influences fluoride coordination number of the AIF<sub>x</sub> phosphoryl transfer transition state analog. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 721-723.

Sheng, X. R., Li, X. und Pan, X. M. (1999) An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 22238-22242.

Smerdon, S. J., Jäger, J., Wang, J., Kohlstaedt, L. A., Chirino, A. J., Friedman, J. M., Rice, P. A. und Steitz, T. A. (1994) Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3911-3915.

Smith, C. A. und Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404-5417.

Singer, A. und Shearer, G. M. (1986) AIDS therapy by blocking CD4+ cells. *Nature* **320**, 113.

Spektrum der Wissenschaft (1998) Februar S. 38.

Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. und Johnson, K. A. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **267**, 988-993.

Su, J. Y. und Scafani, R. A. (1991) Molecular cloning and expression of the human deoxythymidylate kinase gene in yeast. *Nucleic. Acids. Res.* **19**, 823-827.

Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R. G., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P. A. J. und Arnold, E. (1994) Location of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* **243**, 369-387.

Törnevik, Y., Ullman, B., Balzarini, J., Wahren, B. und Eriksson, S. (1995) Cytotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine correlates with 3'-azidothymidine-5'-monophosphate (AZTMP) levels, whereas anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity correlates with 3'-azidothymidine 5'-triphosphate (AZTTP) levels in cultured CEM T-lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 829-837.

Tourneux, L., Bucurenci, N., Lascu, I., Sakamoto, H., Briand, G. und Gilles, A. I. (1998) Substitution of an alanine residue for glycine 146 in TMP kinase from escherichia coli is responsible for bacterial hypersensitivity to bromodeoxyuridine. *J. of Bact.* **180**, 4291-4293.

Turner, B. G. und Summers, M. F. (1999) Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**, 1-32.

Vonrhein, C., Schlauderer, G. J. und Schulz, G. (1995) Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. *Structure* **3**, 483-490.

Watenpaugh, K. D. (1985) Overview of phasing by isomorphous replacement. *Methods in Enzym.* Academic Press, London, 1. Auflage, **115**, Kap. 1, 3-15.

Wild, K., Bohner, T., Folkers, G. und Schulz, G. E. (1997) The structure of thymidine kinase from Herpes simplex virus type 1 in complex with substrates and a substrate analogue. *Proteine Sci.* **6**, 2097-2106.

Wittinghofer, A. (1997) Signaling mechanistics: Aluminum fluoride for the molecule of the year. *Current Biol.* **7**, 682-685.

Xu, Y., Sellam, O., Moréra, S., Sarfita, S., Biondi, R., Veron, M. und Janin, J. (1997) X-ray analysis of azido-thymidine diphosphate binding to nucleoside diphosphate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7162-7165.

Yan, J. P., Ilsley, D. D., Frohlick, C., Steet, R., Hall, E. T., Kuchta, R. D. und Melancon, P. (1995) 3'-Azidothymidine (Zidovudine) inhibits glycosylation and dramatically alters glycosphingolipid synthesis in whole cells at clinically relevant concentrations. *J. Biol. Chem.* **270**, 22836-22841.

Zimmermann, T. P., Mohany, W. B. und Prus, K. L. (1987) 3'-Azido-3'-deoxythymidine. An unusual nucleoside analogue that permeates the membrane of human erythrocytes and lymphocytes by nonfacilitated diffusion. *J. Biol. Chem.* **262**, 5748-5754.

Ich danke...

- ... Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung, für die interessante Aufgabenstellung, für seine Unterstützung bei der Anfertigung und für die Begutachtung meiner Arbeit.
- ... Herrn Prof. Dr. W. Kreiser für die Begutachtung meiner Arbeit und für die Kooperation und Unterstützung von Seiten der Universität Dortmund.
- ... Herrn Dr. Arnon Lavie als meinen direkten Betreuer für die hervorragende Zusammenarbeit, seine Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit und die vielen Diskussionen auch über das Fachliche hinaus.
- ... Frau Dr. Ilme Schlichting insbesondere für die Unterstützung in Sachen Kristallographie (Kristallisation, Datensammlung und Datenauswertung) und viele Diskussionen.
- ... Herrn Dr. Manfred Konrad und Herrn Dr. Ralf Brundiars für die sehr gute Kooperation und das Klonieren und Bereitstellen der Proteine.
- ... Herrn Dr. Jochen Reinstein und Herrn Dipl. Chem. Thomas Veit für die Zusammenarbeit im Bereich der Kinetiken.
- ... Herrn Georg Holtermann für die hervorragende technische Unterstützung im Bereich X-ray Equipment und Frau Sonja Hönig für die vielseitige Hilfe im Labor.
- ... Frau Dr. Ingrid Vetter insbesondere für die Hilfe rund um alle Software-Angelegenheiten.
- ... Herrn Dr. Michael Weyand, Herrn Dr. Arnon Lavie, Frau Dr. Birgitta Wöhr, Herrn Dipl. Chem. Karsten Goedecke und Herrn Dr. Christian Herrmann für das Korrekturlesen meiner Arbeit.
- ... der gesamten X-ray Gruppe, allen Mitarbeitern der Abteilung 3 und den Mitarbeitern der zentralen Einrichtungen, die mich unterstützt und zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.
- ... von ganzem Herzen meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für den Rückhalt und die Unterstützung während der gesamten Studienzzeit.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Silke ... einfach für alles. Es gibt nichts wertvolleres, als jemanden zu haben, auf den man so zählen kann.

## **Tabellarischer Lebenslauf**

**Name:** Nils Ostermann  
**Geburtsort:** Münster  
**Geburtsdatum:** 26.08.1970  
**Nationalität:** deutsch

### **Schulbildung**

1977 - 1981 Besuch der Grundschule in Drensteinfurt-Walstedde  
1981 - 1990 Besuch des St. Michael Gymnasiums in Ahlen/Westf.  
Mai 1990 Abitur

### **Bundeswehr**

Juli 1990 - Juni 1992 Soldat im Panzergrenadierbataillon 192, Ahlen/Westf.

### **Studium**

Okt. 1992 - März 1997 Studium der Chemie an der Universität Dortmund  
Okt. 1994 Diplom-Vorprüfung  
Juli 1996 Diplom-Hauptprüfung  
August 1996 – März 1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund  
Synthese neuer fluoreszenzmarkierter Guanosin-nukleotide und Untersuchung der Wechselwirkung mit kleinen GTP-bindenden Proteinen (Betreuer Prof. Dr. R. S. Goody, Prof. Dr. R. P. Kreher)  
März 1997 Abschluß des Chemiestudiums als Diplomchemiker

### **Promotion**

April 1997 - März 2000 Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, Abteilung physikalische Biochemie von Prof. Dr. R. S. Goody