
Zusammenfassung

Durch vergleichende Sequenzanalysen entdeckten Peer Bork (EMBL, Heidelberg) und Mitarbeiter einen neuartigen, "BRCT" genannten Domäentyp, der im C-terminalen Sequenzbereich von BRCA1 und anderen Proteinen, die an der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, vorkommt. Ein Funktionsverlust der BRCT-Region von BRCA1, die aus zwei aufeinanderfolgenden BRCT-Domänen besteht, geht einher mit einem erhöhten Risiko für Brust- und Eierstockkrebs. Zellbiologische und biochemische Studien zeigten, dass die beiden BRCT-Domänen von BRCA1 transkriptionsaktivierend wirken und mit hoher Affinität an phosphorylierte Peptidmotive binden, wie sie in Zielproteinen nach der Aktivierung von DNA-Reparaturprozessen zu finden sind. Da Mutationen in den BRCT-Domänen häufig mit einer erhöhten genomischen Instabilität und der Entwicklung von Krebs korreliert sind, geht man davon aus, dass eine wichtige Schlüsselfunktion von BRCT-Proteinen in der Assemblierung von Proteinkomplexen in Reaktion auf DNA-Schädigungen und der anschließenden Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollmechanismen besteht.

Um die molekularen Grundlagen für die beobachteten zellulären Funktionen besser zu verstehen, wurde in einem ersten Projekt dieser Arbeit die BRCT-Region von humanem BRCA1 strukturell charakterisiert. Dazu wurde zunächst die Existenz der beiden BRCT-Domänen durch proteolytische Spaltungsanalysen der BRCT-Region verifiziert. Die Experimente zeigten, dass das stabilste Spaltungsfragment die BRCT-Doppeldomäne war. Letztere erwies sich als äußerst robust gegenüber proteolytischer Degradation, ohne weiter in die einzelnen BRCT-Domänen (BRCT-n und BRCT-c) abgebaut zu werden. Die isolierte zweite BRCT-Domäne (BRCT-c) war jedoch ebenso stabil, wenn für die rekombinante Expression das GroEL/GroES Chaperon-System verwendet wurde. Dies war der erste deutliche Hinweis, dass sich einzelne BRCT-Domänen auch ohne weitere intramolekulare BRCT-Interaktionspartner richtig falten können. Die Co-Expression mit GroEL/GroES erhöhte deutlich den Anteil an löslichen BRCT-Konstrukten, wobei die Proteinfaltung *in vitro* nach dem Zellaufschluss durch die Zugabe von ATP, sowie Mg^{2+} -, K^+ - und Cl^- - Ionen begünstigt wurde. Diese Komponenten sind *in vivo* die natürlichen Co-Faktoren des GroEL/GroES Chaperon-Systems. Ultrazentrifugation und Gelpermeations-Chromatographie zeigten überdies, dass BRCT-c hauptsächlich als Monomer in Lösung vorliegt.

NMR-Spektroskopie wurde zunächst dazu benutzt, geeignete BRCT-Konstrukte für die Strukturuntersuchungen zu finden, erwies sich dann jedoch als die Methode der Wahl, um die dreidimensionale Struktur von BRCT-c zu ermitteln. Dies stellt gleichzeitig die erste (veröffentlichte) Struktur einer isolierten BRCT-Domäne aus einer BRCT-Tandemanordnung dar. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur der BRCT-Doppeldomäne zeigte, dass sich die Helices $\alpha 1$ and $\alpha 3$ in BRCT-c leicht gegeneinander verschieben, wenn die erste der beiden BRCT-Domänen (BRCT-n) fehlt. Diese strukturellen Differenzen und eine genaue Analyse früherer Mutagenese-Untersuchungen lassen vermuten, dass BRCT-n die transkriptionsaktivierende Funktion von BRCT-c beeinflusst. Dies könnte bedeuten, dass es eine durch direkte Interaktion an der Kontaktstelle vermittelte allosterische Wechselwirkung zwischen den beiden BRCT-Domänen gibt. Durch dieses "Finetuning" könnten schließlich Struktur und Funktion präzise moduliert werden.

In einem zweiten Projekt dieser Doktorarbeit wurde die katalytisch inaktive Variante einer bakteriellen 1,3-1,4- β -Glucanase, H(A16-M)^{E105Q/E109Q}, für Kristallisationsexperimente mit einem natürlichen Hexasaccharid-Substrat eingesetzt. 1,3-1,4- β -Glucanasen sind hochspezifische Enzyme, die β -1,4 glycosidische Bindungen in 3-O-substituierten Glucopyranosyl-Einheiten innerhalb von Polysaccharidketten spalten. Die Kristalle streuten in Röntgenbeugungsexperimenten mit Synchrotron-Strahlung bis zu einer Auflösung von mehr als 1.6 Å. Die Kristallstruktur wurde mit der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst. In der Asymmetrischen Einheit fanden sich vier Enzym-Saccharid-Komplexe, die zweifelsfrei ein Tetrasaccharid (Glc β 4Glc β 4Glc β 3Glc) in der Substrat-Bindungsstelle zeigten. Der Zucker-Ligand war über die Glucosyl-Bindungsstellen –IV bis –I gebunden und zeigte eindeutig eine β -1,3 glycosidische Verknüpfung zwischen den Glucose-Einheiten in den Bindungsstellen –II and –I. Die Bindungsstellen +I/II waren von geordneten Wassermolekülen besetzt, was darauf hindeutete, dass das zur Kristallisation eingesetzte Hexasaccharid-Substrat (katalytisch) gespalten worden war. Dies ist vermutlich auf eine partielle Deamidierung von Gln105 und/oder Gln109 zu den entsprechenden katalytisch aktiven Glutamaten, wie sie im Wildtyp-Enzym vorliegen, zurückzuführen. Die Kristallstruktur stellt daher den nicht-kovalenten Enzym-Produkt-Komplex (E·P-Komplex) dar. Die hohe Auflösung der Struktur erlaubte die eindeutige Bestimmung von Konfiguration, Konformation und Art der glycosidischen Bindung innerhalb der Zuckerkette. Ein Vergleich mit dem Modell des Enzym-Substrat-Komplexes (E·S- bzw. Michaelis-Komplex) zeigte, dass der Tetrasaccharid-Ligand eine starke, bislang nicht beschriebene hydrophobe Interaktion mit Phe92 in der Bindungsstelle –I eingeht. Diese Kristallstruktur ergab, zusammen mit den Strukturanalysen des Apo-Enzyms H(A16-M) und eines kovalenten Enzym-Inhibitor- (E·I-) Komplexes, sowie früheren Kinetik-

und Mutagenese-Daten, neue Einblicke in die strukturellen Voraussetzungen für die substratspezifische Bindung und katalytische Spaltung, ermöglichte aber auch Rückschlüsse über die molekularen Grundlagen der Freisetzung des Reaktionsproduktes.

Zusammengefasst wurden in dieser strukturbioologischen Studie sowohl NMR-Spektroskopie als auch Röntgenkristallographie erfolgreich für die strukturelle Charakterisierung von zwei verschiedenen Proteinen angewandt:

- (i) die isolierte zweite BRCT-Domäne (BRCT-c) des humanen Tumorsuppressor-Proteins BRCA1, und
- (ii) der nicht-kovalente E·P-Komplex zwischen der bakteriellen 1,3-1,4- β -Glucanase H(A16-M)^{E105Q/E109Q} und Glc β 4Glc β 4Glc β 3Glc, einem natürlichen Tetrasaccharid-Liganden.

Diese Dissertation wurde an der Freien Universität Berlin eingereicht.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt wurde weder bei einer anderen Hochschule noch an einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, im Oktober 2006

Olaf J. Gaiser