
Strukturdiskussion

9 Struktur des Wild-Typ Proteinkomplexes

9.1 Hauptkettenverlauf und Tertiärstruktur

Die Polypeptidkette des Proteins ϵ ist zu einem einfachen Drei-Helix-Bündel gefaltet (a-b-c; rot in Abb.9.1.1). Die Faltung des Proteins ζ besitzt als zentrales Kernstück ein offenes, verdrehtes β -Faltblatt, das aus sechs β -Strängen besteht. Abgesehen vom C-terminalen, antiparallelen β -Strang 6 sind die β -Stränge parallel zueinander angeordnet. Werden diese von N- zu C-terminaler Richtung numeriert, so lautet die Abfolge der β -Stränge innerhalb des β -Faltblattes: 2 / 3 / 1 / 4 / 5 / 6 (von links nach rechts in Abb. 9.1.1, oder vom zentralen Bereich zur solvensexponierten Außenseite der Tertiärstruktur in Abb. 9.1.2). Zwischen den β -Strängen 1 und 2, bzw. 3 und 4 ist jeweils eine Helix eingefügt (Helix B beziehungsweise F). Die Helices C-D-E verbinden β -Strang 2 mit 3, die Helices G-H befinden sich zwischen den β -Strängen 4 und 5. Die Helices I-K-L stellen eine C-terminale Subdomäne dar.

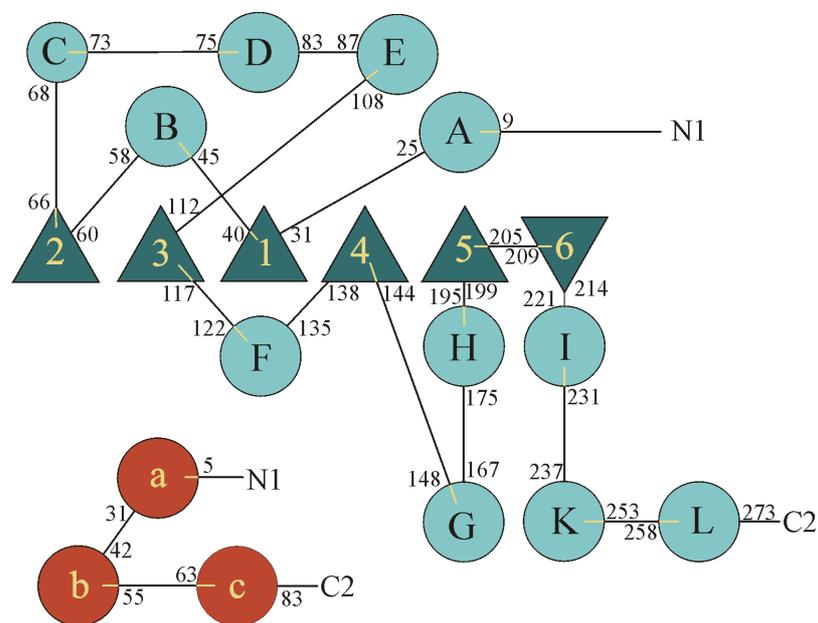


Abb.: 9.1.1 Topographische Darstellung der Proteine ϵ (rot) und ζ (türkis). β -Stränge sind als Dreiecke dargestellt. Dreiecke mit der Spitze nach oben orientiert zeigen in N-terminaler Richtung. α -Helices werden durch Kreise repräsentiert. Die erste und die letzte Aminosäure eines Sekundärstrukturelements sind angegeben. Die Buchstaben A bis L und a bis c geben die Reihenfolge der elf bzw. drei Helices in ζ bzw. ϵ an. Die Zahlen 1 bis 6 nummerieren die β -Stränge des β -Faltblattes in ζ in N- zu C-terminaler Richtung.

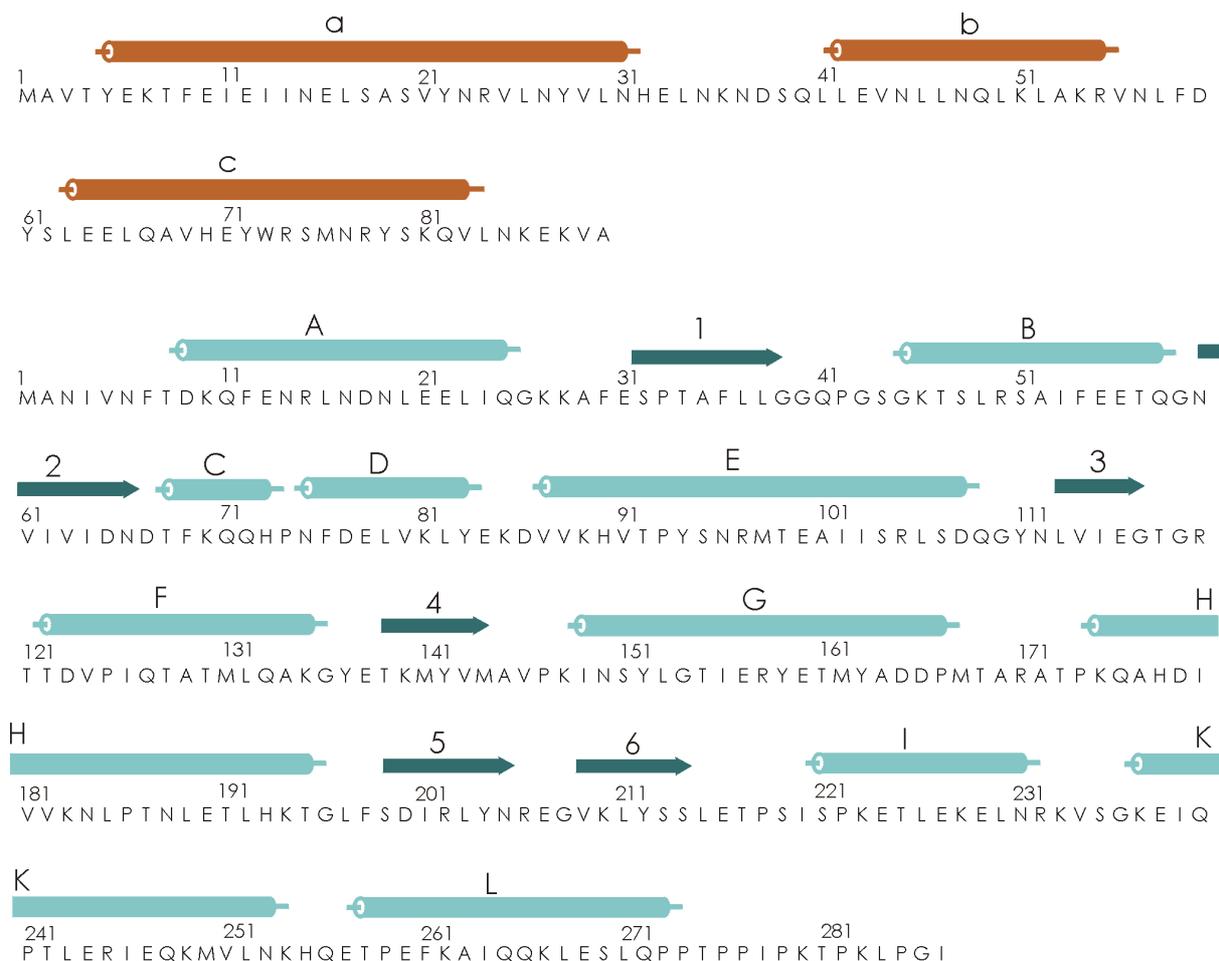


Abb.9.1.2 Aminosäuren-Sequenz der Proteine ϵ (rot) und ζ (türkis). β -Stränge sind als Pfeile dargestellt. α -Helices werden durch Tonnen repräsentiert. Die Buchstaben A bis L und a bis c geben die Reihenfolge der elf bzw. drei Helices in ζ bzw. ϵ an. Die Zahlen 1 bis 6 numerieren die β -Stränge des β -Faltblattes.

Die drei Helices des Proteins ϵ sind in der Form eines verzerrten trigonalen Prismas angeordnet. Die längste Helix a bindet an die Polypeptidkette des Proteins ζ . Helices b und c spannen eine hydrophobe Dimerisierungsfläche von zwei ϵ -Molekülen im $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer auf. Das β -Faltblatt des Proteins ζ ist beidseitig von Helices umgeben. Helices A, B, C und G bilden eine Furche, in die Helix a bindet und so den Kontakt zwischen einer ϵ und einer ζ Polypeptidkette herstellt.

Eine interessante Helix-Schleife-Helix Subdomäne wird von den Helices K und L am C-Terminus von Protein ζ gebildet, die über ein flexibles Segment mit Helix I verbunden ist. Dieses Helix-Schleife-Helix Motiv ist solvensexponiert und über hydrophobe Wechselwirkung der Seitenketten von Helix K an Helix G gebunden. Helices K und L stabilisieren sich gegenseitig über hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren. Helix H weist in der Mitte einen Knick auf. Dieser wird von Pro ζ 186 verursacht, das wegen seiner Einschränkung der Hauptkettenwinkel als Helixbrecher bezeichnet wird.

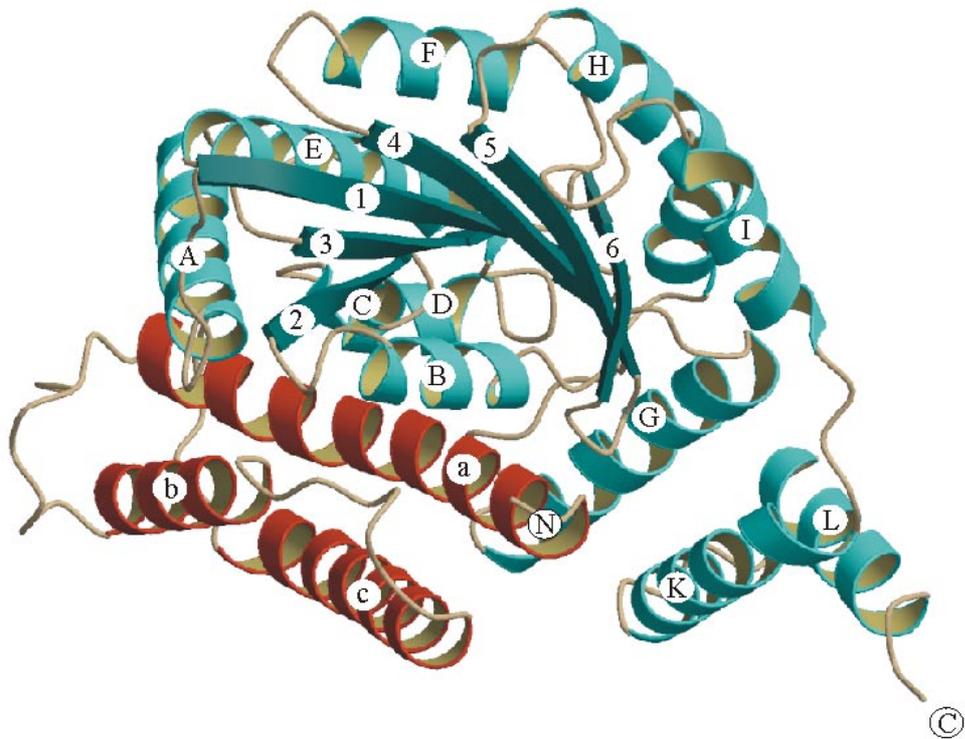


Abb.9.1.3 Abbildung einer $\epsilon_1\zeta_1$ -Unterdomäne des $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers; Die Bezeichnung der Sekundärstrukturen ist wie in Abb. 9.1.1 gewählt. Die Polypeptidkette ϵ ist rot, ζ in türkis koloriert.

9.2 Die Quartärstruktur des $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers

Die Form des in Abb. 9.2.1 abgebildeten Heterotetramers erinnert an eine Hantel. Die maximale Ausdehnung des Komplexes beträgt $41 \times 47 \times 97 \text{ \AA}^3$. Diese ungewöhnliche räumliche Ausdehnung erklärt, weshalb bei Konzentrierungsschritten mit Membranen, deren Ausschlussvolumen größer oder gleich 30 kDa betrug, ϵ und ζ im Durchfluss detektiert werden konnte, obwohl das Molekulargewicht eines Heterotetramers 85.8 kDa beträgt. Nach einer geeigneten Orientierung könnte das Heterotetramer auf Grund seiner länglichen Form trotzdem durch die Membran diffundieren.

In der Dimerisierungsebene zweier ϵ Polypeptidketten ist die zweizählige Symmetrieachse des Moleküls enthalten. In Mod. I und Mod. IV stellt diese eine nicht-kristallographische Symmetrie des Komplexes in der asymmetrischen Einheit dar. In Mod. III verläuft sie entlang

einer kristallographischen Raumgruppensymmetrie. Eine Superposition der $C\alpha$ -Positionen der zwei $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheiten des Proteinrückgrates zeigte, dass die zwei Untereinheiten im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch sind. Die mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate der $C\alpha$ -Positionen beträgt in Mod. I 0.845 Å und 0.667 Å in Mod. IV. Werden Bereiche, die an der Bildung von Molekülkontakten im Kristallgitter beteiligt sind, von der Überlagerung ausgeklammert, so beträgt in Mod. I die mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate für den Rest der $C\alpha$ -Positionen des Proteinrückgrates 0.578 Å.

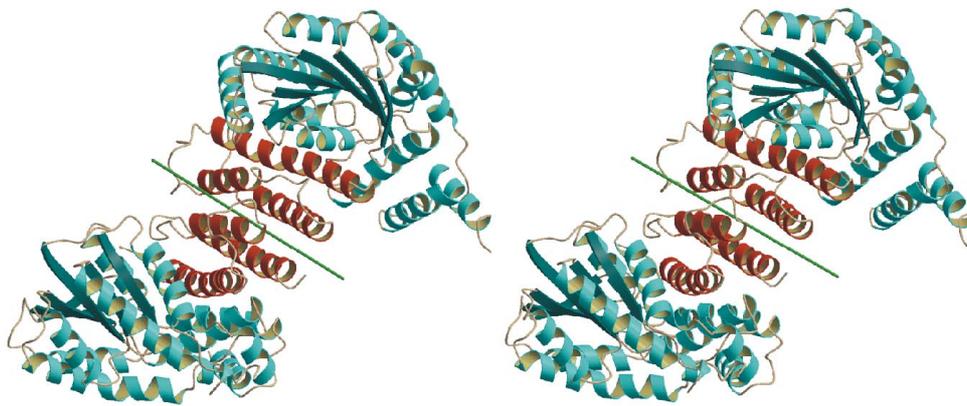


Abb.: 9.2.1 Stereoabbildung der Quartärstruktur des $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramers. ϵ ist rot, ζ ist türkis koloriert; Die Rotationsachse der zweizähligen Molekülsymmetrie ist als Linie eingezeichnet. Die Orientierung der oberen $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit ist gleich zu der in Abb.9.1.2 gewählt.

9.3 Vollständigkeit der Modelle der verschiedenen Modifikationen

9.3.1 Vollständigkeit des Modells der Polypeptidkette von Mod. I

Die Qualität der Elektronendichte ermöglichte, die Polypeptidkette von ϵ von Val ϵ 3 bis Val ϵ 89 und für ϵ' von Ala ϵ' 2 bis Lys ϵ' 86 zu modellieren. In ζ konnte dies von Ala ζ 2 bis Pro ζ 273 und Ala ζ' 2 bis Leu ζ' 271 durchgeführt werden. MALDI-TOF Analysen wie auch die Elektronendichte zeigten, dass das N-terminale Methionin fehlte.

Die C-terminalen Enden erwiesen sich als flexibel. Die in C-terminaler Richtung ansteigenden B-Werte können, da es sich um eine Tieftemperaturmessung handelt, als Unordnungsphänomen interpretiert werden, wenngleich eine Unterscheidung zwischen

Unordnungs- und Schwingungsphänomenen bei Raumtemperaturmessungen schwieriger wäre. In ϵ war keine Restdichte zu finden, die als $\text{Ala}\epsilon 90$ modelliert werden konnte. In ϵ' endete das Peptidrückgrat vier Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende der vorhergesagten Primärsequenz. Ebenso waren die letzten 14 (16) Aminosäuren der Polypeptidketten ζ (ζ') in der Dichte nicht identifizierbar. Diese beiden Prolin-reichen Endstücke nehmen nicht an Kristallkontakten teil und besitzen keine geordnete Sekundärstruktur. Deshalb ist anzunehmen, dass dieser Teil flexibel ist und damit ungeordnet in der Kristallpackung vorliegt.

Im weiteren Textverlauf erfolgt die Unterscheidung beider $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheiten in Form der Bezeichnung als $\epsilon_1\zeta_1$ - beziehungsweise $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit. In der Koordinatendatei können die vier Polypeptidketten mit Hilfe der in Tab.9.3.1.1 gegebenen $\text{C}\alpha$ -Atompositionen der N-terminalen bzw. C-terminalen Reste unterschieden werden.

Polypeptidkette	Terminus	Aminosäure	Position des $\text{C}\alpha$ -Atoms		
			x [Å]	y [Å]	z [Å]
ϵ	N	Val $\epsilon 3$	2.515	44.919	8.111
ϵ	C	Val $\epsilon 89$	13.774	9.473	31.026
ϵ'	N	Ala $\epsilon' 2$	-5.140	14.225	56.096
ϵ'	C	Lyse'86	-0.748	49.111	28.170
ζ	N	Ala $\zeta 2$	22.721	3.863	23.490
ζ	C	Pro $\zeta 273$	24.759	65.329	12.845
ζ'	N	Ala $\zeta' 2$	-23.031	56.807	45.441
ζ'	C	Leu $\zeta' 271$	14.252	30.555	73.860

Tab.9.3.1.1 $\text{C}\alpha$ -Positionen der N- und C-terminalen Reste der vier Polypeptidketten in Mod. I

9.3.2 Vollständigkeit des Modells der Polypeptidketten von Mod. IV

Polypeptidkette	Terminus	Aminosäure	Position des $\text{C}\alpha$ -Atoms		
			x [Å]	y [Å]	z [Å]
ϵ	N	Val $\epsilon 3$	23.724	57.513	63.339
ϵ	C	Lyse86	-4.121	84.903	55.978
ϵ'	N	Ala $\epsilon' 2$	3.151	98.997	34.621
ϵ'	C	Lyse'86	29.425	82.947	57.988
ζ	N	Ala $\zeta 2$	-20.816	72.208	55.567
ζ	C	Gln $\zeta 272$	25.071	70.039	90.583
ζ'	N	Ala $\zeta' 2$	48.758	85.368	44.583
ζ'	C	Pro $\zeta' 273$	-0.980	121.300	53.9601

Tab.9.3.2.1 $\text{C}\alpha$ -Positionen der N- und C-Termini der vier Polypeptidketten in Mod. IV

In Tab.9.3.2.1 erfolgt die Zuweisung der Polypeptidketten mit Hilfe der $\text{C}\alpha$ -Atompositionen der terminalen Reste der Koordinatendatei (wie in Kapitel 9.3.1). Zusätzlich werden in der

Spalte Aminosäure die terminalen Reste der Polypeptidketten angeben, so wie die Interpretation der Elektronendichte es ermöglichte.

9.4.2 Kristallpackung

9.4.1 Kristallpackung der Mod. I

In Mod. I bildet ein $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer mit sechs symmetrieverwandten Molekülen Wasserstoffbrückenbindungen aus und füllt 50 % des Volumens der asymmetrischen Einheit. Vier benachbarte Moleküle binden stark aneinander. Eine Kontaktfläche zu einem benachbarten Molekül liegt etwa parallel zur zweizähligen, nichtkristallographischen Symmetrie des Komplexes. In dieser Fläche bilden Atome des Schleifenbereichs zwischen Helices a und b und das C-terminale Ende der Polypeptidkette ϵ mit dem Nachbarmolekül Wasserstoffbrückenbindungen aus. Entsprechend der Molekülsymmetrie können auch von Atomen des N-terminalen Bereichs von ϵ' und der Schleife zwischen Helices b und c Bindungen ausgebildet werden. Zusätzlich kontaktiert der Schleifenbereich zwischen dem antiparallelen β -Strang 6 und Helix I mit diesem Molekül.

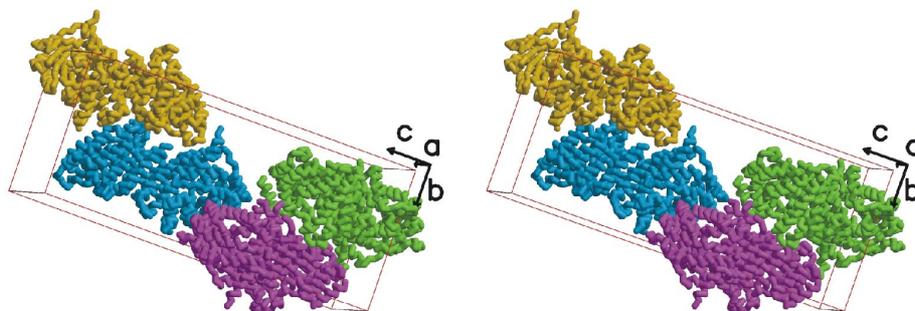


Abb.9.4.1.1 Stereoabbildung der Kristallpackung von Mod. I; symmetrieäquivalente Moleküle sind in verschiedenen Farben koloriert;

Zur ζ -Polypeptidkette eines zweiten benachbarten Molekül bindet die ζ Polypeptidkette im Bereich der Schleife von Helix A zu β -Strang 1, das C-terminale Ende von Helix E und der Beginn der Schleife von Helix F zu β -Strang 4.

Ein weiteres benachbartes Molekül kontaktiert mit Helix E, der Schleife zwischen β -Strang 3 und Helix F, deren N-terminalen Windungen und Helix H. Auch hier bilden zwei ζ Polypeptidketten Wasserstoffbrückenbindungen aus.

Die vierte Kontaktfläche zu einem Nachbarmolekül wird von der Polypeptidkette ζ' bereitgestellt. So binden Atome der Schleife zwischen Helices D und E und des N-terminalen Anfangs von Helix H an Schleifenbereiche des Nachbarmoleküls. Zusätzlich stellt Helix H von ζ einen Kontakt her.

Zu zwei in der kristallographischen Richtung **a** translationsäquivalenten Molekülen der angrenzenden Einheitszellen werden nur von der Schleife zwischen Helices K und L in ζ und vom N-terminalen Bereich von Helix A in ζ' Kontakte mit jeweils einer Wasserstoffbrückenbindung hergestellt.

AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]
<u>-x,y-1/2,-z+1/2^c</u>				
Asn ϵ 31	O	Gln ζ' 176	OE1	2.75
Glu ϵ 33	OE2	Lys ζ' 175	N	3.06
		Gln ζ' 176	N	2.86
		Gln ζ' 176	OE1	2.86
		Lys ζ' 175	N	2.85
Asn ϵ 35	ND2	Glu ζ' 257	O	3.17
Asn ϵ 85	OD1	Asp ζ' 86	OD2	3.28
Vale ϵ 89	O	Gln ζ' 176	NE2	3.20
Lyse'7	NZ	Glu ζ' 84	OE2	3.06
Leue' ϵ 63	N	Glu ζ' 84	OE2	2.98
Ser ζ' 219	N	Glu ζ' 247	OE1	2.83
	OG	Glu ζ' 247	OE2	2.59
<u>x-1/2,-y+1/2,-z^c</u>				
Ala ζ' 29	N	Asp ζ' 123	OD2	2.76
Ser ζ' 32	OG	Asn ζ' 96	ND2	2.78
Ser ζ' 107	O	Arg ζ' 120	NH2	2.81
Asp ζ' 108	O	Asn ζ' 184	ND2	2.93
		Arg ζ' 120	NE	2.82
Lys ζ' 135	O	Arg ζ' 120	NH1	2.95
		Arg ζ' 120	NH2	2.84
<u>x+1,y,z^c</u>				
Glu ζ' 257	OE2	Lys ζ' 10	NZ	2.80
<u>x-1,y,z^c</u>				
Lys ζ' 10	O	Glu ζ' 257	OE2	2.80

AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]
<u>x+1/2,-y+1/2,-z^c</u>				
Asn ζ' 96	ND2	Ser ζ' 32	OG	2.78
Arg ζ' 120	NE	Asp ζ' 108	O	2.82
Arg ζ' 120	NH1	Lys ζ' 135	O	2.95
		Ser ζ' 107	O	2.81
		Lys ζ' 135	O	2.84
Asp ζ' 123	OD2	Ala ζ' 29	N	2.76
Asn ζ' 184	ND2	Asp ζ' 108	O	2.93
<u>-x,y+1/2,-z+1/2^c</u>				
Glu ζ' 247	OE2	Ser ζ' 219	OG	2.59
	OE1	Ser ζ' 219	N	2.83
Glu ζ' 84	OE2	Lyse'7	NZ	3.06
		Leue' ϵ 63	N	2.98
Asp ζ' 86	OD2	Asn ϵ 85	OD1	3.28
Lys ζ' 175	N	Glu ϵ 33	OE2	3.06
		Glu ϵ 33	OE1	2.85
Gln ζ' 176	N	Glu ϵ 33	OE2	2.86
		Asn ϵ 31	O	2.75
		Glu ϵ 33	OE2	2.86
Gln ζ' 176	NE2	Vale ϵ 89	O	3.20
		Asn ϵ 35	ND2	3.17

Tab.9.4.1.2 Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen
AS^a: AminosäureAS^a
^bD: Abstand (engl. *distance*)
^c: abbildender Symmetrieeoperator (mit Translationsvektor)

Auffälligerweise besitzt die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit mehr Molekülkontakte als die $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit. So war bei der Interpretation einer Elektronendichte, die mit anfänglichen Selenomethionin-Phaseninformationen bei einer Auflösung von 3.10 Å berechnet wurde, die Qualität der beiden Untereinheiten unterschiedlich. Wenngleich die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit bis auf wenige

Bereiche durchgängige Elektronendichte des Proteinrückgrates aufwies, konnte die $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit nur mit Hilfe der nichtkristallographischen Symmetrie vollständig gebaut werden. Diese Probleme lösten sich nach der Phasenerweiterung mit Hilfe des nativen Datensatzes.

9.4.2 Kristallpackung der Mod. III

Als das Phasenproblem der Mod. III gelöst war und die erste Elektronendichte nach einer Starre-Körper-Verfeinerung berechnet wurde, zeigte sich, dass aufgrund der begrenzten Auflösung von 3.3 Å die Interpretation der Elektronendichte bezüglich der Position der Seitenketten nur teilweise möglich war. Nur das Proteinrückgrat konnte eindeutig identifiziert werden. Da mit Mod. I schon die Struktur des $\epsilon_2\zeta_2$ -Komplexes gelöst war und Mod. III keine neue Komplexform darstellte, wurde von einer weiteren Verfeinerung abgesehen.

In Mod. III liegt die zweizählige Molekülsymmetrie parallel zur kristallographischen Raumgruppensymmetrie. Deshalb liegt eine $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit in der asymmetrischen Einheit vor und füllt 46% des Volumens. In Mod. III sind ausschließlich Polypeptidketten von ζ am Aufbau von Molekülkontakten beteiligt.

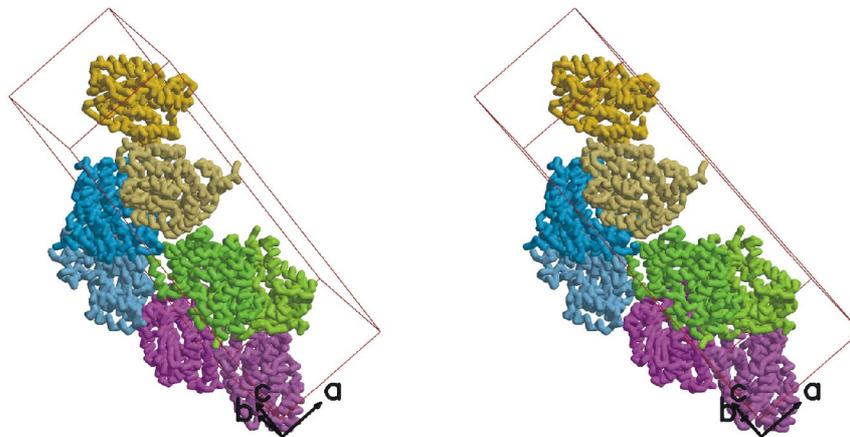


Abb.9.4.2.1 Stereoabbildung der Kristallpackung von Mod III; Symmetrieäquivalente Moleküle, die ein $\epsilon_2\zeta_2$ -Heterotetramer bilden, sind in ähnlichen Farben koloriert; Symmetrieverwandte der vier Heterotetramere einer Elementarzelle sind in unterschiedlichen Farben dargestellt.

9.4.3 Kristallpackung der Mod. IV

Im Unterschied zu Mod. I, in der die einzelnen Heterotetramere kompakt aneinander geordnet sind, liegt in Mod. IV ein weitmaschiges Gerüst mit großen Lösungsmittelkanälen vor. Nur kleine Bereiche von ζ sind an Molekülkontakten beteiligt. In Abb.9.4.3.1 sind vier

aneinandergrenzende Moleküle dargestellt. Diese stehen annähernd senkrecht zueinander und sind über wenige intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft. Der Anteil an mit Protein gefülltem Volumen ist mit 39 % deutlich niedriger als in den anderen Modifikationen.

Von den vier in Abb.9.4.3.1 abgebildeten symmetrieäquivalenten Komplexmolekülen bilden nur zwei intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus. So kontaktieren Helix E und der Beginn von Helix F mit einem, sowie die Schleife zwischen β -Strang 6 und Helix I und Helix I selbst zu einem anderen Molekül. Zu zwei weiteren Molekülen werden einerseits vom Schleifenbereich zwischen Helices I und K, andererseits von der Schleife von Helix A zu β -Strang 1 Molekülkontakte gebildet.

Die leichte Spaltbarkeit der Kristalle und die Probleme bei der Suche nach Cryo-Bedingungen können mit dieser lockeren Struktur von Mod. IV erklärt werden. Diese Kristalle wurden mit K_2PtCl_4 inkubiert. Ein Platinatom befindet sich im Kontaktbereich der $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit zu einem Nachbarmolekül.

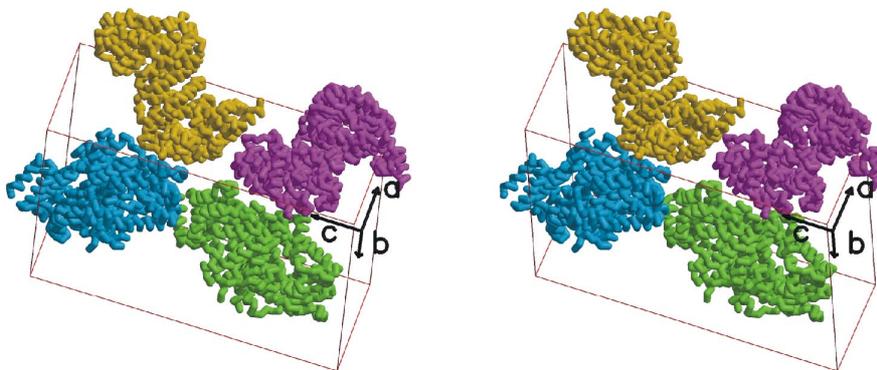


Abb.9.4.3.1 Stereoabbildung der Kristallpackung von Mod IV; symmetrieäquivalente Moleküle sind in verschiedenen Farben koloriert;

AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]
<hr/>				
-x,y-1/2,-z+1/2 ^c				
Glu ζ 100	OE1	Lys ζ 228	NZ	3.03
Asp ζ 123	OD2	Thr ζ 217	O	3.16
Asp ζ 123	OD2	Ser ζ 219	N	2.72
<hr/>				
-x,y+3/2,z+1/2 ^c				
Lys ζ 233	NZ	Ser ζ 32	OG	3.13
<hr/>				
-x+1/2,-y+1,z-1/2 ^c				
Ser ζ 32	OG	Lys ζ 233	NZ	3.13

AS ^a	Atom	AS ^a	Atom	D ^b [Å]
<hr/>				
-x,y+1/2,-z+1/2 ^c				
Thr ζ 217	O	Asp ζ 123	OD2	3.16
Ser ζ 219	N	Asp ζ 123	OD2	2.72
Lys ζ 228	NZ	Glu ζ 100	OE1	3.03

Tab.9.4.3.2 Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen

AS^a: AminosäureAS^a

^bD: Abstand (engl. *distance*)

^c: abbildender Symmetrieeoperator (mit Translationsvektor)

9.5 Vergleich der verschiedenen Modifikationen

Überlagert man die C α -Positionen des Proteinrückgrats der verschiedenen Modifikationen, so sind nur geringe Unterschiede zu beobachten. An der Dimerisierungsfläche der ϵ und ϵ' Polypeptidketten kommt es zu leichten Unterschieden, die durch den Einfluss der unterschiedlichen Molekülkontakte der Modifikationen hervorgerufen werden. In Tab.9.5.1 sind verschiedene Permutationen der Anpassungsmöglichkeiten von Mod. IV an Mod. I angegeben.

Trotz der geringen Differenzen der mittleren Abweichungen der kleinsten Fehlerquadrate der C α -Positionen ist zu erkennen, dass Untereinheit $\epsilon_1\zeta_1$ von Mod. IV besser an $\epsilon_1\zeta_1$ als an $\epsilon'_1\zeta'_1$ von Mod. I angepasst werden kann. Auch für die zweite Untereinheit in Mod. IV kann dies beobachtet werden. Eine überkreuzte Superposition des Heterotetramers führt zu höheren rmsd-Werten.

Werden die Untereinheiten einzeln überlagert, so sind die mittleren Abweichungen der kleinsten Fehlerquadrate der C α -Positionen von $\epsilon'_1\zeta'_1$ niedriger als die von $\epsilon_1\zeta_1$. In Mod. I bildet die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit mehr Molekülkontakte als $\epsilon'_1\zeta'_1$. In Mod. IV, die viel weniger intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, ist die mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate der C α -Positionen nach einer Überlagerung beider Untereinheiten niedriger als bei Mod. I (0.667 Å beziehungsweise 0.845 Å). Deshalb können die Unterschiede der einzelnen Untereinheiten als Packungseffekte erklärt werden. Ebenso kann angenommen werden, dass die Konformation der $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit in Mod. I eher dem in Lösung vorliegenden Proteinkomplex entspricht als die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit, da in beiden Modifikationen die Konformation der $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit weniger als die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit durch Packungseffekte beeinflusst wird.

Festgehaltene Untereinheiten der Mod. I	$\epsilon_1\zeta_1$	$\epsilon'_1\zeta'_1$	rmsd ^a [Å]
Angepasste Untereinheiten der Mod. IV	$\epsilon_1\zeta_1$	$\epsilon'_1\zeta'_1$	1.048
	$\epsilon'_1\zeta'_1$	$\epsilon_1\zeta_1$	1.116
	$\epsilon_1\zeta_1$	frei	0.940
	$\epsilon'_1\zeta'_1$	frei	1.069
	frei	$\epsilon'_1\zeta'_1$	0.757
	frei	$\epsilon_1\zeta_1$	0.809

Tab.: 9.5.1 Ergebnisse der Anpassung der C α -Positionen des Proteinrückgrates von Mod. IV an Mod. I; Permutation der unterschiedlichen Überlagerungsmöglichkeiten. Zur visuellen Unterstützung wurde die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit gelb, die $\epsilon'_1\zeta'_1$ -Untereinheit rot hinterlegt. ^a rmsd: mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate (englisch: *root mean square difference*); "frei" bedeutet von der Überlagerung ausgeklammert;

Da Mod. III nach dem Lösen des Phasenproblems mit der $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit von Mod. I als Startmodell nur einer Starre-Körper-Verfeinerung unterzogen wurde, konnte eine Überlagerung mit anderen Modifikationen keine Aussage bieten. Eine Überlagerung eines entsprechend der Raumgruppensymmetrie erzeugten Heterotetramers von Mod. III, würde dagegen die Abweichung von der perfekten Zweizähligkeit der Molekülsymmetrie in den anderen Modifikationen widerspiegeln.

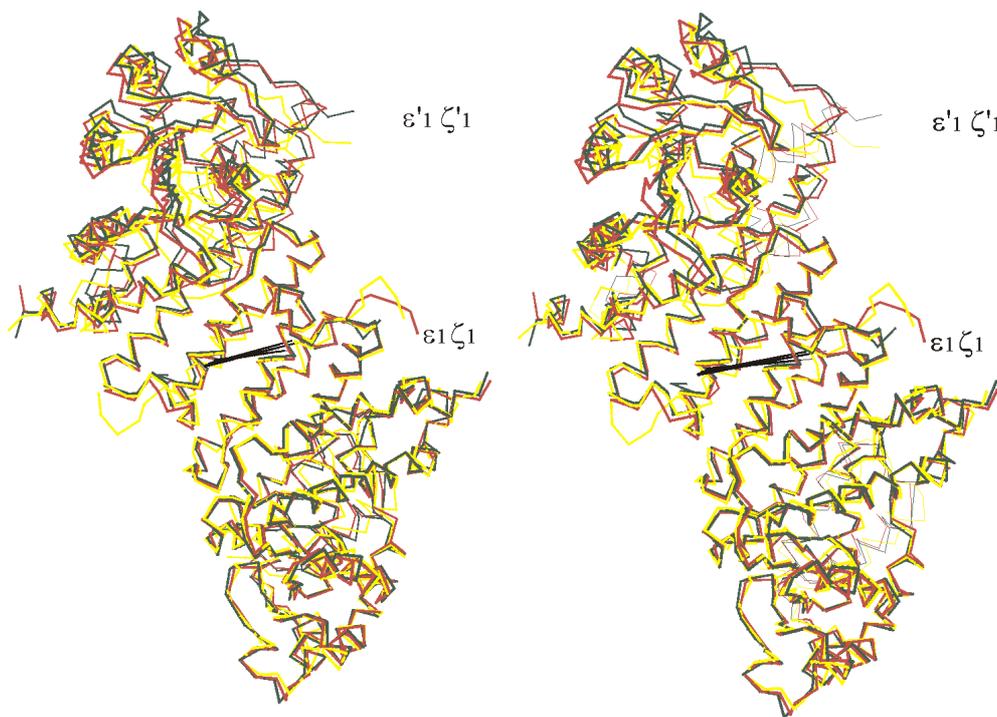


Abb.9.5.2 Superposition des Proteinerückgrates der verschiedenen Modifikationen; Mod. I ist rot, Mod. III gelb und Mod. IV grün koloriert. Symmetrieachsen des Moleküls sind schwarz eingefärbt. Untereinheit $\epsilon_1\zeta_1$ wurde mit den kleinsten Fehlerquadraten überlagert, dadurch kommt es bei $\epsilon'_1\zeta'_1$ zu maximalen Abweichungen; In Mod. III fällt die Molekülsymmetrie mit einer kristallographischen Symmetrie zusammen.

Abb.9.5.2 zeigt eine Überlagerung der Heterotetramere (In Mod. I und Mod. IV wurde die $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit überlagert, $\epsilon'_1\zeta'_1$ wurden von dieser ausgeschlossen.) und die Lagen und Richtungen der zweizähligen Molekülsymmetrieachsen. Letztere fallen eng zusammen und führen deshalb nur zu geringen Unterschieden des Heterotetramers in den verschiedenen Modifikationen.

Wird im weiteren Verlauf auf Unterschiede der Untereinheiten eingegangen, so wird die zu diskutierende Untereinheit immer explizit mitangegeben. Ansonsten werden beide Untereinheiten als identisch angenommen.

9.6 Temperaturfaktorverteilung der Mod. I

Die hohe Auflösung des nativen Datensatzes ($d_{\min.} = 1.95 \text{ \AA}$) ermöglichte eine Verfeinerung der atomaren isotropen Temperaturfaktoren. Wenngleich die C-terminalen Bereiche der Polypeptidketten vergleichsmäßig hohe B-Faktoren zeigen, so weisen im Großteil alle vier Hauptkettenverläufe geringe Temperaturfaktoren (ca. 12 \AA^2) auf (siehe Abb. 9.6.1). Ein Vergleich der dimeren Untereinheiten ergab ähnliche Werte, deshalb wurde in Abb. 9.6.1 nur die $\varepsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit dargestellt.

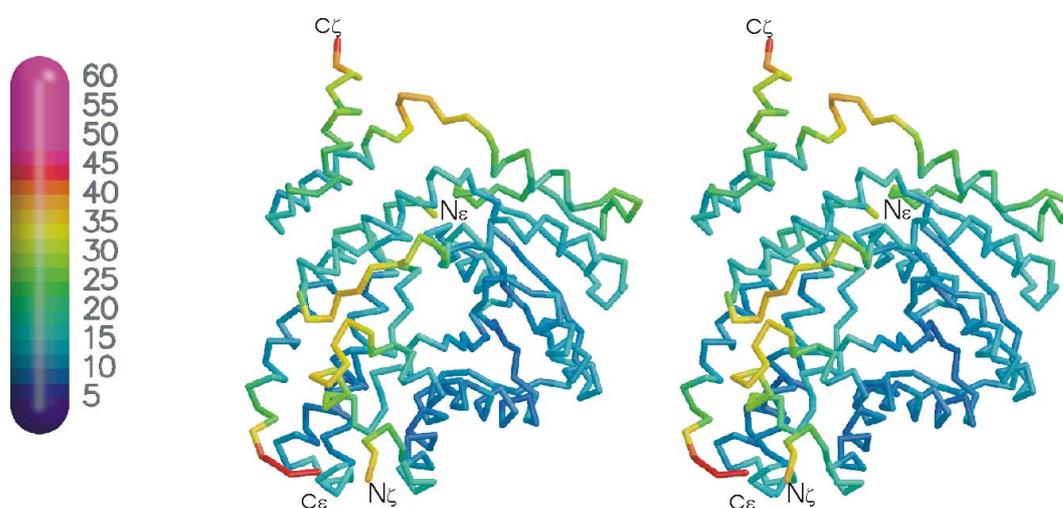


Abb.9.6.1 Illustration des Hauptkettenverlaufs einer $\varepsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit; Dieser ist übereinstimmend mit den Temperaturfaktoren der Hauptkettenatome koloriert. Die Einfärbung entspricht der seitlich angegebenen Skala.

Der C-terminale Bereich des Peptidrückgrats von ε ist nicht an der Dimerisierung beteiligt und bindet nicht an ζ . Dies kann als Grund für die hohe Temperaturfaktorverteilung dieses Bereichs angesehen werden. Die Interpretation der Elektronendichte erwies sich in diesem Bereich als schwierig. Unordnungsphänomene führten zu verschmierten, schwer interpretierbaren Elektronendichten der Seitenketten und Teilen des Rückgrats.

Im Verlauf der Temperaturfaktoren entlang des Proteinrückgrats ζ kann man drei flexible Bereiche erkennen. Auch hier ist der C-terminale Bereich sehr flexibel und konnte aufgrund fehlender Elektronendichte nicht bis zum Ende der vorhergesagten Primärsequenz gebaut werden. Innerhalb der Peptidkette weist die Schleife zwischen Helices I und K Temperaturfaktoren bis zu 35 \AA^2 auf. Bereits der in N-terminaler Richtung davorliegende β -

Strang 6 und die Schleifenverbindung zu Helix I besitzen im Vergleich zu den anderen Sekundärstrukturelementen erhöhte Werte. Der zweite flexible Bereich ist die Schleife zwischen Helices G und H, und der dritte Teil ist die dazu benachbarte Schleife zwischen Helices D und E.

9.7 Die P-Schleife

Schon der Aminosäuresequenz-Vergleich mit dem Programm PROSITE (Bairoch *et al.*, 1997) zeigte, dass ζ ein für ATP/GTP-bindende Proteine typisches Sequenzmotiv enthält. Dieses besteht aus einer starren Schleife zwischen einem N-terminal vorgelagerten β -Strang und einer C-terminal anschließenden α -Helix und wird als Walker A-Motiv (Walker *et al.*, 1982, Yin *et al.*, 1986) bezeichnet. Es besteht aus zwei Glycinresten mit zwischengeschalteten Aminosäuren und dem Motiv GKT/S in C-terminaler Richtung. Die Konsensussequenz ist in Abb. 9.7.1 angeführt.

Konsensussequenz		G	X	X	G	X	G	K	T					
		G	X	X	G	X	G	K	S					
ζ	37	L	L	G	G	Q	P	G	S	G	K	T	S	48
Adenylatkinase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> (P27142)		V	L	E	G	L	P	G	A	G	K	G	T	
Shikimat-Kinase aus <i>Erwinia chrysanthemi</i> (P10880)		F	M	V	G	A	R	G	C	G	K	T	T	
Thymidinkinase aus <i>E. coli</i> (BAB34899)		V	I	E	G	L	E	G	A	G	K	T	A	
Guanylatkinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NP010742)		V	I	S	G	P	S	G	T	G	K	S	T	
Nitrogenase-Eisenprotein aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> (P00460)		A	F	Y	G	K	G	G	I	G	K	S	T	
Chloramphenicol-Phosphotransferase aus <i>Streptomyces venezuelae</i> (U09991)		I	L	N	G	G	S	S	A	G	K	S	G	
RecA aus <i>E. coli</i> (BAB36979)		E	I	Y	G	P	E	S	S	G	K	T	T	
Elongationsfaktor Tu aus <i>Xylella fastidiosa</i> (AAF85437)		G	T	I	G	H	V	D	H	G	K	T	T	
Elongationsfaktor G aus <i>E. coli</i> (P02996)		G	I	S	A	H	I	D	A	G	K	T	T	

Abb.9.7.1 Sequenzanpassung verschiedener ATP-bindender Proteine mit Walker A-Sequenzmotiv; Sie ließe sich aufgrund der vielen bekannten Sequenzen erweitern. Ausgewählt wurden einige bekannte repräsentative Proteine. Homologe Reste des Walker A-Sequenzmotivs sind gelb, konservierte Reste ocker und der katalytisch wichtige, konservierte Lysinrest ist rot koloriert.

Dieses Motiv ist in Mononukleotid-bindenden Proteinen, wie zum Beispiel Nukleotid-Nukleosidkinasen, G-Proteinen, Nitrogenase-Eisenprotein ähnlichen Proteinen und RecA ähnlichen Proteinen zu finden (Murzin *et al.*, 1995). In der Polypeptidkette ζ beginnt dieses Motiv mit Gly ζ 39 und erstreckt sich bis Thr ζ 47.

Obwohl nur das konservierte Sequenzmotiv GXXXXGKT/S als Walker A-Motiv (Walker *et al.*, 1982) bezeichnet wird, zeigt eine Sequenzanpassung, daß dieses Motiv auf

Aminogruppe des N ϵ -Atoms von Lys ζ 46 einen weiteren Donor einer Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe von Gly ζ 40 dar. Die Konformation des Proteinrückgrats und der Seitenketten erlaubt nur drei Sauerstoffatome des Sulfattetraeders zu koordinieren. Das vierte Sauerstoffatom bildet Bindungen zu zwei Wassermolekülen aus. Ein drittes Wassermolekül dient neben der NH-Gruppe von Gly ζ 43 als Donor einer zweiten Wasserstoffbrückenbindung zu einem Sauerstoffatom des Tetraeders.

Wenngleich die Temperaturfaktorverteilung des Proteinrückgrates von ζ und ζ' in dieser Region der P-Schleifen gleich ist, so weisen diese für die beiden gebundenen Sulfattetraeder unterschiedliche Werte auf. Für S ζ 602, das Sulfat-Schwefelatom in $\epsilon_1\zeta_1$, beträgt der B-Faktor 46.6 Å², für S ζ' 603 in $\epsilon'_1\zeta'_1$ ist dieser Wert 26.9 Å². Für die Sauerstoffatome der beiden Sulfattetraeder kann das gleiche Verhalten festgestellt werden.

9.9 Die T-A-R-A-T Schleife

In der Diskussion des Verlaufs der Temperaturfaktoren der Hauptkettenatome wurden bereits die hohen B-Werte in der Schleifenregion zwischen Helices G und H erwähnt. Eingeleitet wird diese Schleife von Pro ζ 167 und endet mit Pro ζ 174. Schon das Met ζ 168 weist erhöhte Temperaturfaktoren auf. Dessen S δ ist in einer *omit* Elektronendichte schlecht definiert. Die in Abb.9.9.1 dargestellte Elektronendichte wurde bei 3.5σ konturiert und die Phaseninformation von Asp ζ 166 bis Lys ζ 175 wurde von der Berechnung ausgeschlossen. Verfolgt man das Proteinrückgrat über Thr ζ 169 und Ala ζ 170 bis Arg ζ 171, so weisen die Atome in diesem Bereich die höchsten Temperaturfaktoren auf. Die Elektronendichte der C α -Position von Arg ζ 171 ist schwach definiert, die der Seitenkette kann nur für NH1 der Guanidiniumgruppe zugeordnet werden.

Ausschließlich für dieses Stickstoffatom der Guanidiniumgruppe können mögliche Wasserstoffbrückenbindungen angegeben werden. Ein mögliches Akzeptoratom stellt das Sauerstoffatom der Carbonylgruppe von Thr ζ 169 des Proteinrückgrates (Donor-Akzeptor-Abstand = 3.02 Å) dar, das zweite mögliche Akzeptoratom könnte das Sauerstoffatom der Seitenkette von Gln ζ 71 sein. Der große Donor-Akzeptorabstand von 3.68 Å deutet jedoch auf eine schwache Bindung hin. Wenngleich im weiteren Verlauf der Polypeptidkette die Temperaturfaktoren von Ala ζ 172, Thr ζ 173 und Pro ζ 174 kleiner werden und damit die Elektronendichte besser definiert ist, engt sich die Elektronendichte an der C-N Bindung von Ala ζ 172 zu Thr ζ 173 erneut deutlich ein. Mit Lys ζ 175 geht die Sekundärstruktur der

Polypeptidkette in Helix H über, deren Verteilung der Temperaturfaktoren wieder vergleichbar zu den restlichen Sekundärstrukturelementen des Proteinkomplexes ist.

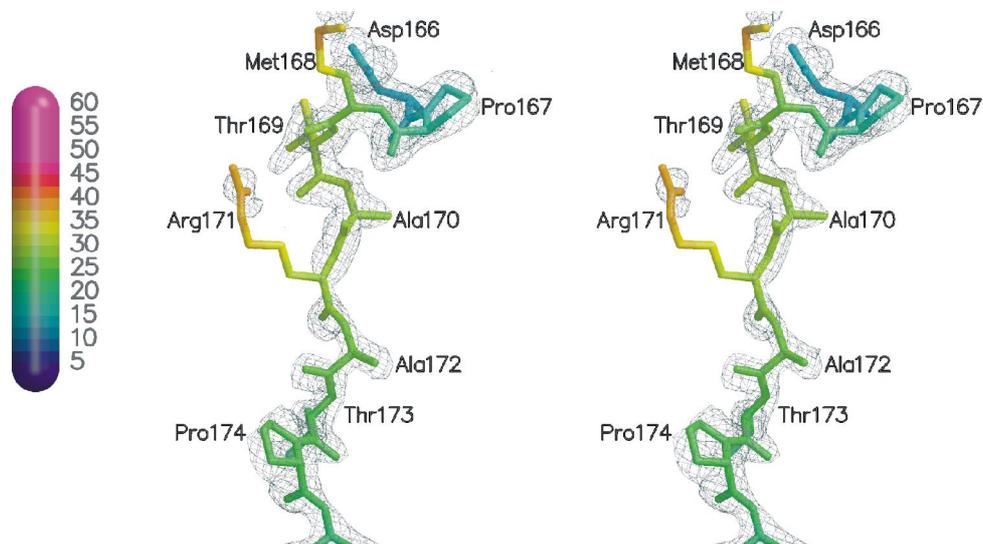


Abb.9.9.1 Abbildung der Schleife von Asp ζ 166 bis Pro ζ 174; Die Kolorierung der Stabdarstellung der Seitenketten und des Proteinrückgrats erfolgte übereinstimmend mit deren Temperaturfaktoren. Die Einfärbung entspricht der seitlich angegebenen Skala. Die Elektronendichte wurde mit 3.5σ konturiert. Die Berechnung erfolgte als Fo-Fc-omit-Elektronendichte, Die Phaseninformationen der dargestellten Reste wurden von der Berechnung ausgeschlossen.

9.10 Vergleich der Tertiärstruktur von ζ mit verwandten Strukturen

Eine Superposition der Tertiärstruktur der Polypeptidkette ζ zu bereits bekannten Tertiärstrukturen anderer Proteine wurde mit dem Programm DALI Vers. 2.0 (Holm und Sander, 1993) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen in der Protein-Datenbank (PDB) ist in Tab.9.10.2 angeführt. Der Z-Faktor stellt einen Gütefaktor der strukturellen Ähnlichkeit zweier Proteinstrukturen, rmsd deren mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate dar.

Es zeigte sich, dass ζ enge strukturelle Verwandtschaft zu Nukleosid-Monophosphat-(NMP)-Kinasen, wie z.B. Adenylatkinase (AK) aus *Bacillus stearothermophilus* (Berry und Phillips, 1998), Thymidylatkinase (TK) aus *E. coli* (Lavie *et al.*, 1998) oder Guanylatkinase (GK) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stehle und Schulz, 1992) aufweist. Abb. 9.10.1 zeigt eine Superposition des Proteinrückgrates von ζ und NMP-Kinasen.

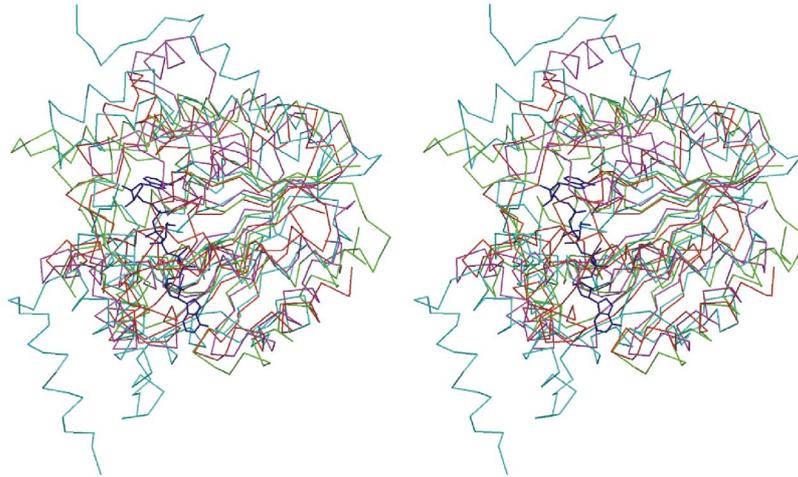
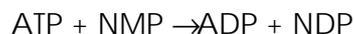


Abb.9.10.1 Stereoabbildung einer Superposition von ζ mit NMP-Kinasen; ζ türkis; Adenylatkinase aus *Bacillus stearothermophilus* im Komplex mit Diadenosinpentaphosphat (Berry und Phillips, 1998) (rot); Thymidylatkinase aus *Escherichia coli* (Lavie *et al.*, 1998) (grün); Guanylatkinase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Stehle und Schulz, 1992) (magenta);

Mit dem Überbegriff NMP-Kinasen werden Phosphotransferasen zusammengefasst, die folgende Reaktion katalysieren:



(N steht für die verschiedenen Basen der Nukleotide). Analog zur Faltung von ζ besitzen alle bisher strukturell bekannten NMP-Kinasen ein offenes, verdrehtes, paralleles β -Faltblatt der β -Strangabfolge 2 / 3 / 1 / 4 / 5 . Dieses enthält bei ζ einen sechsten antiparallelen Strang.

Ebenso beinhalten die Sequenzen dieser Enzyme, wie auch ζ , ein Walker A-Motiv zur Bindung des β -Phosphates von ATP-Molekülen. In NMP-Kinasen wird deren γ -Phosphat auf das zweite Substrat (NMP) übertragen. Dieses Sequenzmotiv liegt in allen NMP-Kinasen zwischen dem N-terminalen ersten β -Strang und der nachfolgenden Helix. Im Unterschied dazu besitzt ζ vor dem β -Strang 1 noch die Helix A. Diese bildet Kontakte zum C-terminalen Bereich von Helix a im ϵ -Protein aus und ist somit an der Bindung von ζ an ϵ beteiligt. In der Superposition der Strukturen ist diese Helix außerhalb des aktiven Zentrums der NMP-Kinasen positioniert.

Strukturell betrachtet sind diese Proteine faszinierende Enzyme, deren Flexibilität eine Vielzahl an Konformationen bei der Bindung und dem Loslassen der Substrate erlaubt (Dreusike *et al.*, 1988, Diederichs und Schulz, 1991, Müller und Schulz 1992, Berry *et al.*,

1994, Müller-Dieckmann und Schulz, 1994, Abele und Schulz 1995, Schlauderer *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 1996, Elamrani *et al.*, 1996 Lavie *et al.*, 1998 und Berry und Phillips 1998).

	PDB-Eintrag	Z-Faktor	r.m.s.d. [Å]	Sequenzidentität
Adenylatkinase	1zin	9.2	3.2	15 %
Chloramphenicol-Phosphotransferase	1qhs	8.9	3.4	8 %
Thymidylatkinase	5tmp	7.3	3.6	14 %
Adenylatkinase biologische Einheit	1nks	7.0	3.9	9 %
Guanylatkinase	1gky	7.0	3.7	13 %
Thymidylatkinase biologische Einheit	3tmk	6.8	3.6	10 %
Thymidinkinase biologische Einheit	1qhi	5.8	3.1	10 %
Sulfotransferase	1aqu	5.7	3.9	4 %
Dethiobiotinsynthase biologische Einheit	1byi	5.6	3.6	13 %
Shikimatkinase biologische Einheit	1shk	5.4	3.6	13 %
Adenosin-5'-Phosphosulfate kinase (APS-Kinase)	1d6j	5.4	3.5	11 %

Tab.9.10.2 Ergebnisse der Superposition der dreidimensionalen Struktur von ζ mit strukturell beschriebenen Proteinen (Holm und Sander, 1993)

Als zweites ζ ähnliches Protein wurde die Chloramphenicol-Phosphotransferase (CmP) aus *Streptomyces venezuelae* (Izard und Ellis, 2000) identifiziert. CMP überträgt das γ -Phosphat von ATP an die (C-3)-Hydroxylgruppe des Antibiotikums Chloramphenicol. Das entstehende 3-Phosphoryl-Chloramphenicol ist als Antibiotikum biologisch vollständig inaktiv. Wie ζ zeigt dieses Enzym strukturelle Verwandtschaft zur Adenylatkinase.

Die Chloramphenicol-Phosphotransferase besitzt 43 % Sequenzhomologie aber nur 16 % Sequenzidentität zur Shikimatkinase aus *Erwinia chrysanthemi* (Krell *et al.*, 1998). In Tab.9.10.2 erscheint auch dieses Enzym mit einer zu ζ ähnlichen Struktur und 13 % Sequenzidentität. Die Shikimatkinase ist das fünfte Enzym des Shikimisäurezykluses und phosphoryliert die 3-Hydroxylgruppe der Shikimisäure unter ATP-Verbrauch als Co-Substrat.

Um einen besseren Vergleich der aktiven Zentren zu ermöglichen, wurden diese mittels des Programmes Isqkab (CCP4, 1994) überlagert. Für eine Superposition mit der Adenylatkinase (AK) (Berry und Phillips, 1998) wurden die $C\alpha$ -Positionen im Bereich von Leu5 bis Met39 in AK zu Leu ζ 38 bis Gln ζ 72 in ζ , Gly80 bis Gly85 (AK) zu Asp ζ 112 bis Gly ζ 117 (ζ) und Asp118 bis Arg127 (AK) zu Thr ζ 149 bis Arg ζ 158 (ζ) einander angenähert. Die mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate des Proteinrückgrats für die ausgewählten Bereiche betrug 3.0 Å. Ebenso wurden diese Bereiche mit Leu8 bis Ala42, Arg88 bis Asp93 und Val124 bis Gly134 von CmP überlagert. Im letztgenannten Bereich wurde Tyr ζ 159 in den zu

überlagernden Bereich miteingeschlossen. Hier war die mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate 2.2 Å.

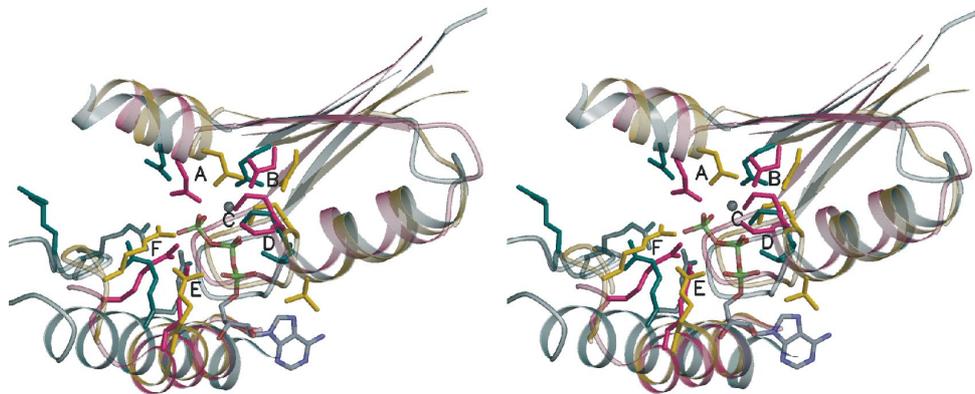


Abb.9.10.3 Superposition von ζ in türkis mit den aktiven Zentren der Adenylatkinase (Berry und Phillips, 1998) (gelb) und der Chloramphenicol-Phosphotransferase (Izard und Ellis, 2000) (rot) (A) Asp ζ 67, Asp33 (AK), Asp37 (CmP); (B) Glu ζ 116, Asp84 (AK), Asp92 (CmP); (C) Lys ζ 46, Lys13 (AK), Lys16 (CmP); (D) Thr ζ 47, Thr15 (AK), Ser17 (CmP); (E) Arg ζ 158, Arg127 (AK), Arg133 (CmP); (F) Arg ζ 171, Arg160 (AK), Arg136 (CmP); Für Arg ζ 158 wurden zwei mögliche Konformationen dargestellt: aus dem aktiven Zentrum, nach links weisend zeigt die Konformation in Mod. I; Nach rechts zeigend, die mögliche, modellierte Konformation in der geschlossenen Form; Ebenso zeigt Arg ζ 171 aus dem aktiven Zentrum in Mod. I und wurde in dieses weisend modelliert. Damit soll eine mögliche geschlossene Konformation dargestellt werden. Das abgebildete ATP-Molekül und das gebundene Metallion stammten aus der Komplexstruktur mit CmP (Izard und Ellis, 2000).

Obwohl das Proteinrückgrat der Polypeptidketten voneinander abweicht, sind Seitenketten zu finden, die in allen drei Enzymen an vergleichbaren Stellen liegen. In Abb.9.10.3 sind fünf gemeinsame Elemente besonders hervorgehoben. Diese sollen im folgenden einzeln genauer besprochen werden.-

9.10.1 *Asp ζ 67 und Glu ζ 116 (A und B)*

Sowohl in AK (Asp33), in CmP (Asp37) als auch in ζ (Asp ζ 67) befindet sich diese Seitenkette an ähnlicher Position. Während sie in AK über ein Wassermolekül (300) an der Koordination des gebundenen Metallions beteiligt ist (Berry und Phillips, 1998), wird Asp37 in CmP eine katalytisch wichtige Funktion zugewiesen. Als einzige Seitenkette bildet diese eine Wasserstoffbrückenbindung zur (C-3)-Hydroxylgruppe des Chloramphenicols aus und erleichtert somit die Deprotonierung der (C-3)-Hydroxylgruppe (Izard und Ellis, 2000). Die zweite, nun aber nicht identische, sondern ähnliche, Aminosäure stellt Glu ζ 116 in ζ dar. Sowohl in AK (Asp84) als auch in CmP (Asp92) bedindet sich an dieser Stelle ein

Aspartatrest. In AK bindet an Asp84 ein Wassermolekül, das an der Metallkoordination beteiligt ist. In CmP koordiniert Asp92 direkt das Metallion. Zusätzlich zu Glu ζ 116 findet man in ca. 5 Å Entfernung Asp ζ 65. In einer Superposition mit der Shikimatkinase (SK) aus *Erwinia chrysanthemi* (Krell et al., 1998) liegt diese Seitenkette an vergleichbarer Position wie Asp32 in SK. Ebenso liegen Asp34 in SK und Asp ζ 67 in vergleichbarer Lage. In SK sind beide Seitenketten Metallliganden.

Nicht nur in allen Proteinkinasen (Cox *et al.*, 1994; Goldsmith und Cobb, 1994; Bossemeyer *et al.*, 1995), sondern auch in bakteriellen Phosphotransferasen, die für bakterielle Resistenzen verantwortlich sind, werden diese letzteren zwei Aspartatreste gefunden. Dies führte zu der Annahme, dass sie eine generelle Rolle bei der ATP-Bindung und Phosphorylierung von Substraten spielen (Brenner, 1987).

9.10.2 Lys ζ 46 (C)

Lys ζ 46 liegt nicht nur an gleicher Position wie Lys13 in AK und Lys16 in CmP, sondern der Verlauf des ganzen Walker A-Motivs ist nahezu identisch. Die Schleife in CmP, die auch im substratfreien Enzym ein Sulfat bindet (Izard und Ellis, 2000), und jene von AK liegen nach der Superposition an der selben Stelle.

In AK sind die Peptid-NH Gruppen des Proteinrückgrats von Gly10, Gly12, Lys13 und Gly14 sowie die Aminogruppe der Seitenkette von Lys13 über Wasserstoffbrückenbindungen an der Koordination des β -Phosphates des Inhibitors Diadenosin-Pentaphosphat beteiligt. Bei CmP erfolgt dies durch die Peptid-NH Gruppen des Proteinrückgrates von Ser13, Gly15, Gly18, der Hydroxylgruppe der Seitenkette von Ser13 und der Aminogruppe von Lys16. Das gebundene Sulfat in der CmP-Struktur ist analog zum Sulfat im ζ -Protein koordiniert.

9.10.3 Thr ζ 47 (D)

Diese Seitenkette, in AK Thr15 und in CmP Ser17, bindet in AK über eine Wasserstoffbrückenbindung an das α -Phosphat des Inhibitors Diadenosin-Pentaphosphat. In CmP bildet diese Seitenkette zum β -Phosphat des ATP-Moleküls eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Ebenso erfolgt die Bindung eines Wassermoleküls, das an der Metallkoordination beteiligt ist. Bei der substratfreien Struktur von CmP ist die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Ser17 nicht an der Bindung des Sulfats beteiligt. Dieses gilt auch für Thr ζ 47 in der Tertiärstruktur ζ .

9.10.4 Arg ζ 158 (E)

In der Struktur von ζ weist die Guanidiniumgruppe von Arg ζ 158 aus dem aktiven Zentrum. Die NH₁-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Proteinrückgrats von Arg ζ 171 mit einem Donor-Akzeptor-Abstand von 3.26 Å. NH₂ und N ϵ bilden zwei starke Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden Sauerstoffatomen der Carboxylatgruppe von Glu ϵ 16 (Donor-Akzeptor-Abstand: 2.82 Å bzw. 2.81 Å).

In Abb.9.10.3 ist eine zweite, modellierte Konformation von Arg ζ 158 abgebildet. Würde Glu ϵ 16 entfernt, so könnte diese Konformation eingenommen werden. Die Position der Guanidiniumgruppe würde dann mit der Position der Guanidiniumgruppe von Arg127 in AK zusammenfallen. Diese Seitenkette ist in AK an der Bindung des γ -Phosphats des Inhibormoleküls beteiligt. In CmP ist der vergleichbare Rest Arg137. Dessen Guanidiniumgruppe bindet an das γ Phosphat von ATP.

9.10.5 Arg ζ 171 (E)

Wie Arg ζ 158 weist die Guanidiniumgruppe von Arg ζ 171 aus dem aktiven Zentrum. Schon im Kapitel "Das T-A-R-A-T Motiv" wurde die flexible Natur dieser Seitenkette und der ganzen Schleife, in der sich diese Aminosäure befindet, diskutiert. Nimmt man an, dass sich die Konformation von Arg ζ 158 bei einer Substratbindung ändert, so könnte die Guanidiniumgruppe von Arg ζ 171 an dessen Position treten. Voraussetzung dafür wäre eine Rotation des Schleifenbereichs.

Die entsprechende Aminosäure wäre Arg160 in AK und Arg137 in CmP. Izard und Ellis (2000) beschreiben in den verschiedenen ermittelten Strukturen eine Rotation des Bereichs um Arg137 in CmP. In einer Superposition der substratfreien und der substratgebundenen Struktur weisen die C α -Positionen dieses Restes unterschiedliche Positionen auf, die 3.7 Å voneinander entfernt sind. Um an das γ -Phosphat von ATP zu binden, bewegt sich die Guanidiniumgruppe um mehr als 9 Å von ihrer ursprünglichen Position weg.

In Abb.9.10.5.1 ist eine Darstellung der ATP-Bindungstasche dargestellt, die Schleife um Arg ζ 171 ist im Stabmodell hervorgehoben. Es soll gezeigt werden, dass im Falle einer Rotation in die Bindungstasche keine sterische Hinderung durch umgebenden Aminosäuren

vorliegen würde. In der Abbildung würde dies einer Rotation um eine vertikale Achse hinter die Zeichenebene entsprechen.

Diese Rotation würde dazu führen, dass die Seitenkette von Arg ζ 171 in das aktive Zentrum schwenkt. Damit würde die Guanidiniumgruppe an vergleichbarer Stelle von Arg160 in AK und Arg136 in CmP liegen. In beiden Strukturen sind diese an der Koordination des γ -Phosphats beteiligt.

Zusätzlich erkennt man in Abb.9.10.5.1, dass Seitenketten von ϵ in die Bindungstasche ragen und diese verschließen.

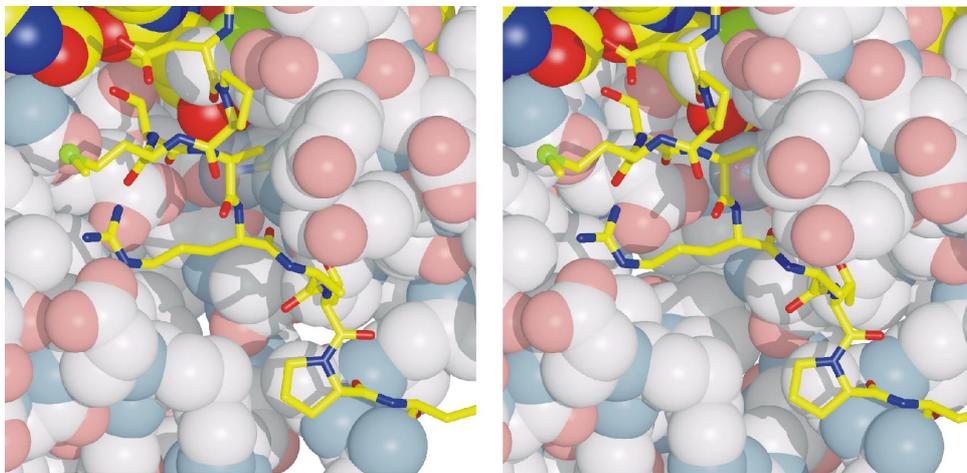


Abb.9.10.5.1 Stababbildung der Schleife von Asp ζ 166 bis Pro ζ 174 und Kalottendarstellung der Oberfläche des vermutlichen aktiven Zentrums; Wasseratome wurden nicht dargestellt. Die Oberfläche ζ ist in Pastellfarben (rot: Sauerstoffatome, blau: Stickstoffatome, grau: Kohlenstoffatome), der Oberflächenanteil ϵ in leuchtenden Farben (rot: Sauerstoff, blau: Stickstoffatome, gelb: Kohlenstoffatome) dargestellt. Die Farbkodierung des Schleifenbereichs erfolgte analog zur Färbung von ϵ . Wassermoleküle, die die Kluft ausfüllen, sind nicht gezeichnet.

9.11 Die inhibierte ATP-Bindungstasche

Durch Strukturhomologien wurde in Abb.9.10.3 gezeigt, an welcher Position der Tertiärstruktur ζ die Bindung des ATP-Cosubstrates zu erwarten ist. Versuche, den $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplex gemeinsam mit unspaltbaren ATP-Analoga (z.B. ATP γ S, ADPcP) oder mit ADP zu kristallisieren, führten zu keinem Erfolg. Es zeigt sich, dass Protein, das nach dem hier beschriebenen Protokoll aufgereinigt wurde, keine ATPase-Aktivität aufweist (Camacho, pers. Mitt.).

Betrachtet man den in Abb.9.11.1 dargestellten Ausschnitt der Quartärstruktur des $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes genauer und nimmt eine mögliche ATP-Bindung vergleichbar zu AK oder CmP an, so fällt folgendes auf:

Helix a von ϵ liegt schräg über dem "großen Anionenloch" (Dreusike und Schulz, 1986) und füllt es mit mehreren Seitenketten. Die Lage des Adenins von ATP sollte in dem Bereich liegen, wo sich die voluminösen Seitenketten von Tyr ϵ 5 und Phe ϵ 9 befinden. Der Abstand der beiden aromatischen Gruppen ist jedoch zu gering, um eine Sandwich-artige π -Wechselwirkung zu der planaren Adeningruppe zu erwarten. Ebenso ragt die Carboxylatgruppe von Glu ϵ 12 in die ATP-Bindungstasche. Diese wäre nur ca. 2 Å von einem Sauerstoffatom des α -Phosphates gelegen und würde mit ihrer negativen Ladung ein repulsives Potential zur ATP-Bindung darstellen.

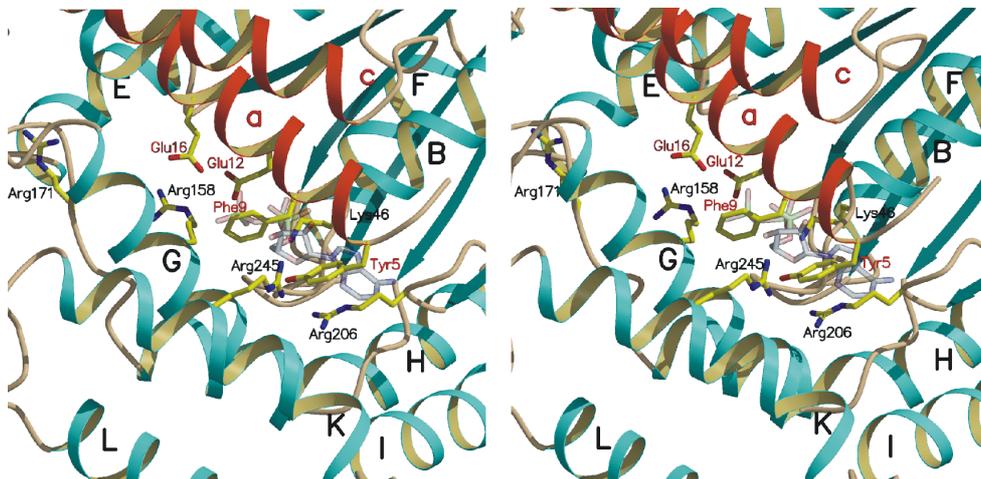


Abb.9.11.1 Sterische Hinderung der ATP-Bindung durch Helix a und ihrer Seitenketten. Die Sekundärstrukturmerkmale und Beschriftung von ϵ ist rot koloriert, die Sekundärstrukturmerkmale von ζ sind türkis gefärbt und schwarz beschriftet. Die Position des ATP-Moleküls ist nach der Überlagerung mit CmP (Izard und Ellis, 2000) modelliert.

Die zweite negativ geladene Seitenkette von Helix a ist Glu ϵ 16. Diese ist zum γ -Phosphat von ATP mehr als 4 Å entfernt und besitzt deshalb keine stark repulsiven Wechselwirkungen. Mit einer starken Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert es Arg ζ 158 in einer Konformation, in der die Seitenkette vom modellierten γ -Phosphat eines ATP-Moleküls wegweist und nicht daran binden könnte.

In Abb.9.11.1 sind zusätzlich Arg ζ 245 und Arg ζ 206 abgebildet. Beide Guanidiniumgruppen könnten Wasserstoffbrückenbindungen zum Adenin des ATP ausbilden. Arg ζ 206 ist in der Schleife zwischen den β -Strängen 5 und 6 lokalisiert. Dieser Bereich besitzt höhere

Temperaturfaktoren als der zentrale Bereich von ζ . Die Guanidiniumgruppe von Arg ζ 206 bildet Wasserstoffbrückenbindungen von der NH₂-Gruppe zur Carbonylgruppe von Gly ζ 43 (Donor-Akzeptor-Abstand: 3.21 Å) und zur Carbonylgruppe der Proteinrückgrats von Asn ζ 150. Die NH₁-Gruppe von Arg ζ 206 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül aus.

N ϵ von Arg ζ 206 bilden in den beiden Untereinheiten unterschiedliche Bindungen aus. In $\epsilon_1\zeta_1$ bindet es zu einem Wassermolekül im Abstand von 2.41 Å, das wiederum eine Wasserstoffbrückenbindung zu Ser ζ 44 ausbildet (Donor-Akzeptor-Abstand: 2.61 Å). In $\epsilon'_1\zeta'_1$ fehlt dieses Wassermolekül und N ϵ von Arg ζ '206 bindet in einem Donor-Akzeptor-Abstand von 3.06 Å direkt an die Carbonylgruppe von Ser ζ '44.

Die Temperaturfaktoren des Proteinrückgrats von Arg ζ 245, das in der C-terminal zweitletzten Helix K liegt, weichen von der allgemeinen Verteilung der B-Werte nicht merklich ab. Auf eine Flexibilität der ganzen Untereinheit an sich deuten jedoch die isolierte Lage des Helix K - Schleife - Helix L Motivs und die hohen Temperaturfaktoren der vorgelagerten Schleife. Die N ϵ - und NH₂-Gruppe der Guanidiniumgruppe von Arg ζ 245 bilden starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu ζ 157 aus (2.86 Å beziehungsweise 2.63 Å).

9.12 Die Substratbindungstasche

Bisher wurde die ATP-Bindungstasche diskutiert, die mit Hilfe der Strukturhomologie zu AK und CmP begründet werden konnte. In der Struktur ζ kann an vergleichbarer Stelle der AMP-Bindungstasche von AK und der Chloramphenicol-Bindungstasche von CmP eine Kluft beobachtet werden, die von den C-terminalen Bereichen der Helix E und dem Anfang von Helix F aufgespannt wird. In Abb. 9.12.1.b sind diese im Vordergrund liegend dargestellt. Die Kluft ist ca. 14 Å tief und ca. 7 Å breit. Es können jedoch keine vergleichbaren Seitenketten gefunden werden, die auf ähnliche Substrateigenschaften zwischen ζ , AK und CmP schließen ließen. Im Unterschied zu CmP, in der diese Tasche hydrophobe Eigenschaften besitzt, ist diese in ζ hydrophil und mit geladenen Seitengruppen ausgekleidet.

Die Carboxylatgruppe von Glu ζ 100 (in Abb.9.12.1a: **(A)**) führt zur negativen Ladung am Grund dieser Kluft. Die Guanidiniumgruppe von Arg ζ 120 (in Abb.9.12.1a: **(B)**) stellt die positive Ladung der rechten Wandung zur Verfügung. An der linken Wandung zeichnen die Aminogruppen von Lys ζ 70 (in Abb.9.12.1a: **(C)**) und Lys ζ 89 (in Abb.9.12.1a: **(D)**) für die

positive Ladung verantwortlich. In Abb.9.12.1.a ist Lys ζ 89 als blauer Vorsprung vorne links oben dargestellt, Lys ζ 89 führt zur positiven Ladung in der Wandung.

Die ATP-Bindungstasche ist als Höhle im hinteren Bereich der Kluft zu erkennen. Diese verläuft in Abb. 9.12.1 nach rechts in den zentralen Bereich des Proteins. Auffällig ist die starke negative Ladung. Eine Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen eines ATP-Moleküls erscheint unwahrscheinlich. In Abb. 9.12.1.b erkennt man, wie Helix a von ϵ sich quer über die Bindungstasche legt. Deren Seitenketten führen zu diesem negativen Potential.

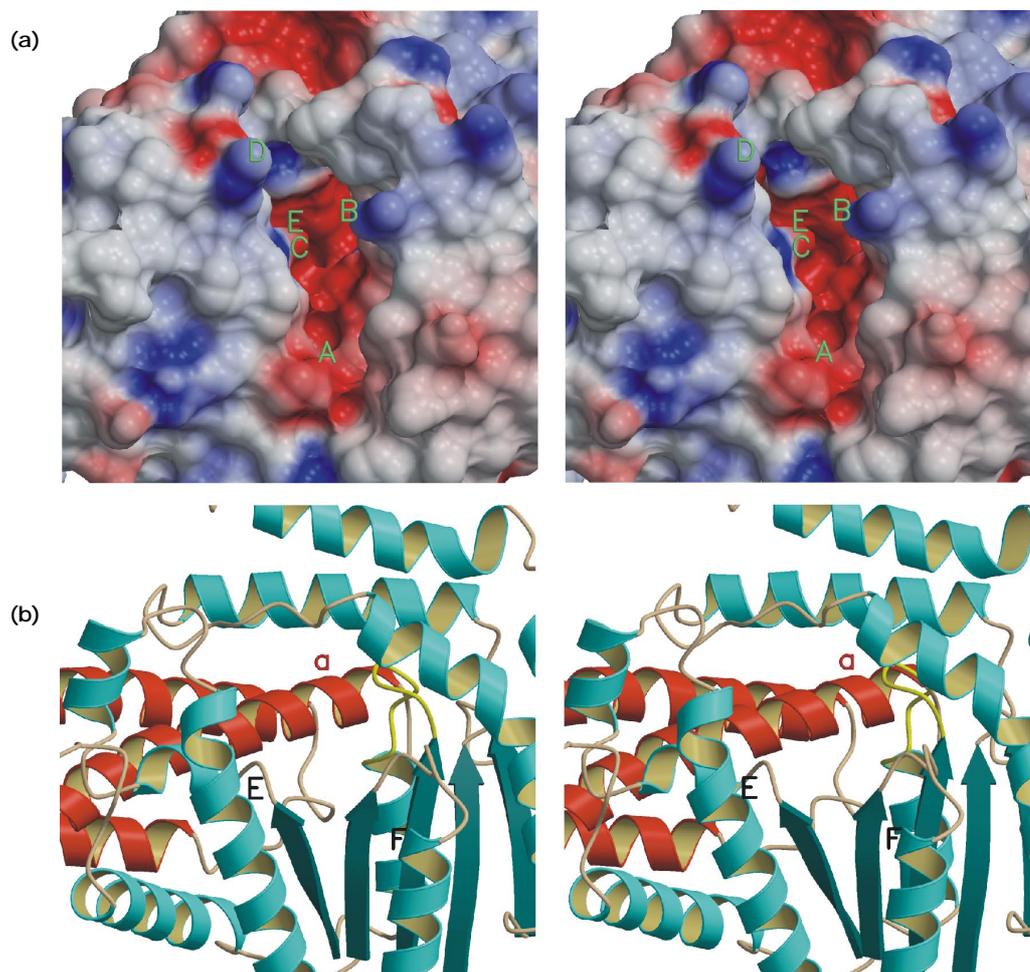


Abb.9.12.1 (a) Abbildung der Moleküloberfläche von ζ im Bereich der vermeintlichen Substratbindungstasche; Die Oberfläche ζ wurde mit dem Programm msms (Sanner *et al.*, 1996) erstellt. Die Einfärbung erfolgte entsprechend des mit dem Programm Delphi (Gilson *et al.*, 1987) errechneten Oberflächenpotentials. Rotfärbungen bedeuten negatives Potential; maximaler Wert: -10 kT/e ; blau bedeutet positives Potential; maximaler Wert: 10 kT/e ; (A) Glu ζ 100, (B) Arg ζ 120, (C) Lys ζ 70, (D) Lys ζ 89, (E) Asp ζ 67, (b) Tertiärstruktur von ζ im Bereich der Substratbindungstasche, die P-Schleife gelb gefärbt. Die Polypeptidkette ϵ ist rot, die ζ ist blau dargestellt.

Am Übergang der ATP-Bindungstasche zur Substratbindungstasche ist an der linken Wandung das negative Potential der Carboxylatgruppe von Asp ζ 67 (in Abb.9.12.1a: **(E)**) zu sehen, die neben Lys ζ 89 liegt. In AK und CmP erfolgt in diesem Bereich die Phosphorylierung des Substrats.

Wenngleich das Substrat für ζ nicht spezifiziert werden kann, so ist eine Aussage über seine Gestalt und Ladungsverteilung möglich. Es sollte dünn, aber großflächig ausgedehnt sein, um in diese Tasche binden zu können und dabei bis an die Phosphorylierungsstelle zu gelangen. Es sollte geladen sein, und die Ladungen sollten an beiden Seiten stark unterschiedlich sein. Die positive Ladungsseite des Substrats würde an den Grund der Kluft binden, die negativ geladenen Seitenflächen und die Oberseite würde von der Wandung und dem positiv geladenen oberen Bereich der Bindungstasche gebunden.

9.13 Der C-terminale Helix-Schleife-Helix Bereich

Dieser Bereich deutet wegen seiner solvensexponierten Lage und der vom restlichen Bereich losgelösten Lage auf ein *Helix-Turn-Helix* Motiv (HTH) oder ein *Helix-Loop-Helix* Motiv (HLH) hin. Beide Motive sind typisch für DNA-bindende Proteine. Im HTH Motiv ist die dreidimensionale Struktur streng konserviert. Die erste Helix wird von den Resten 1-7, die Schleife von 8-11 und die zweite Helix von den Resten 12-20 gebildet. Letztere ist das DNA-erkennende Sekundärstrukturmerkmal. Der konservierte Rest 9 muss immer ein Glycin oder Lysin sein, in den Helices sind Prolinreste unwahrscheinlich (Branden und Tooze, 1991). In der Tertiärstruktur ζ würden Helix K, die anschließende Schleife und Helix L dieses Motiv darstellen. Eine Interpretation dieses Bereichs als HTH Motiv ist aber unwahrscheinlich, da die Aminosäure-Sequenz und Länge des Schleifenbereichs sich stark von diesem unterscheiden. Im Schleifenbereich ist kein Glycinrest in der Aminosäuresequenz vorhanden. Besonders die voluminösen Seitenketten von Lys ζ 254 und His ζ 255 der Schleife machen eine Flexibilität in diesem Bereich unmöglich. Zusätzlich ist Pro ζ 259 der erste Rest von Helix L. Auch die Temperaturfaktorverteilung, die im Schleifenbereich niedriger als in Helix L ist, widerspricht einer Interpretationsmöglichkeit als HTH-Motiv.

Im Gegensatz zu HTH-Motiven zeigen HLH-Motive keine signifikanten Sequenzmerkmale, sodass diese nicht für eine Zuweisung zu diesem Motiv verwendet werden können. Oft ist in HLH-Motiven der Schleifenbereich an einer Ca²⁺-Bindung beteiligt (Yap, K.L. *et al.*, 1999), doch wurde bei Kristallisationsversuchen des $\epsilon_2\zeta_2$ -Proteinkomplexes bei Zugabe von 5 mM

CaCl₂ kein Ca²⁺ gebunden. DNA-Gelretardierungsversuche mit einem ε,ζ(Val234Stop) Proteinkomplex zeigten, dass dieser mutierte Proteinkomplex in anderer Weise an DNA bindet als der Wild-Typ ε₂ζ₂-Proteinkomplex (Francuski, pers. Mitt.). Da diesem Protein der C-terminale Helix-Schleife-Helix Bereich fehlt, kann dies als Indiz für ein DNA-bindendes Sekundärstrukturmerkmal von Helix K und L interpretiert werden.

9.14 Das Oberflächenpotential

In Abb.9.14.1 ist die Moleküloberfläche des ε₂ζ₂-Komplexes entsprechend dem mit dem Programm Delphi (Gilson *et al.*, 1987) errechneten Potential eingefärbt. Die Orientierung in Abb.9.14.1.a ist gleich zu jener in Abb.9.2.1 gewählt. In Abb.9.14.1.b wurde das Molekül an der vertikalen Achse um 180° gedreht.

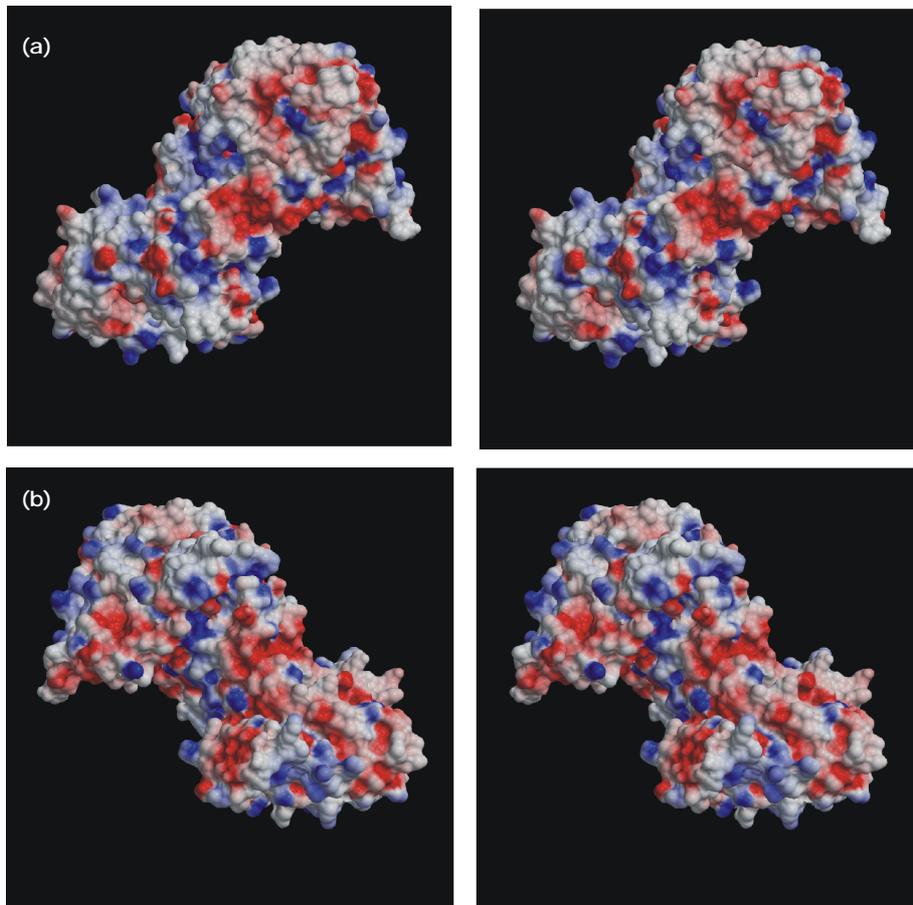


Abb.: 9.14.1 (a) Abbildung der Moleküloberfläche des ε₂ζ₂-Heterotetramers entsprechend der Orientierung in Abb.9.2.1 **(b)** Drehung um 180°; Die Oberfläche wurde mit dem Programm msms (Sanner *et al.*, 1996) erstellt. Die Einfärbung erfolgte entsprechend des mit dem Programm Delphi (Gilson *et al.*, 1987) errechneten Oberflächenpotentials. Rotfärbungen bedeuten negatives Potential; maximaler Wert: -10 kT/e ; blau bedeutet positives Potential; maximaler Wert: 10 kT/e;

Über die Oberfläche hinweg sind negativ und positiv geladene Bereiche gleichmäßig verteilt. Bereiche, die an einer DNA-Bindung beteiligt sind, müssten positiv geladen sein (blau koloriert). Bis auf die Einbuchtung, die im Komplex von zwei aneinandergrenzenden ϵ -Polypeptidketten gebildet wird, ist kein positiv geladener Bereich mit größerer Ausdehnung auf der Moleküloberfläche zu finden. Der C-terminale Helix-Schleife-Helix Bereich zeigt ebenso keine augenfälligen Eigenschaften, die mit Hilfe des Oberflächenpotentials als eine mögliche DNA-Bindungsstelle interpretiert werden könnten. Den größten negativ geladenen Bereich stellt von ϵ blockierte vermutliche ATP-Bindungstasche dar.

10 Die ζ (K46A) Mutante

Um die korrekte Faltung und eine mit dem Wild-Typ Protein vergleichbare Tertiärstruktur des Lys ζ 46 zu Ala ζ 46 punktmultierten Proteinkomplexes zu beweisen, wurde auch die Struktur $\epsilon_2\zeta$ (K46A)₂ bestimmt. Wie erwartet, unterschied sich die Struktur kaum von der des Wild-Typ Proteins. Eine Überlagerung der C α -Atompositionen beider Strukturen ergab eine mittlere Abweichung der kleinsten Fehlerquadrate von 0.32 Å, und 0.52 Å für die Überlagerung von allen Proteinatomen.

Nachdem die Seitenkettenatome des Restes Lys ζ 46 durch die Mutation zu Ala ζ 46 entfernt wurden, war vorauszusehen, dass durch die fehlende positive Ladung der Aminogruppe von Lys ζ 46 eine verringerte Affinität des Proteins zu Sulfationen resultieren würde. Deshalb wurde angenommen, dass diese nicht mehr aus der Aufreinigung mitgeschleppt werden könnten. Interessanterweise fand sich jedoch in der Untereinheit $\epsilon'_1\zeta'_1$ noch Elektronendichte, die einem Sulfat-Ion zuzuordnen war. In der Untereinheit $\epsilon_1\zeta_1$ war an dessen Stelle ein Wassermolekül.

Das gebundene Sulfat-Ion ist von der P-Schleife in Richtung der ATP-Bindungstasche auswärts weisend positioniert. Das zentrale Schwefelatom ist 1.74 Å von der entsprechenden Position im Wild-Typ Protein entfernt. Der Sulfat-Tetraeder in der $\epsilon_1\zeta_1$ -Untereinheit des Wild-Typ Proteins und der im mutierten Protein sind zueinander spiegelsymmetrisch angeordnet. Diese Spiegelebene würde in der Struktur des Wild-Typ Proteins mit der von der P-Schleife wegweisenden Tetraederkante schneiden. Das Peptid-NH von Gly ζ '43 mit einem Donor-Akzeptor-Abstand von 2.79 Å ist das einzige Proteinatom, das noch eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu einem Sauerstoffatom des Sulfations ausbilden kann. Für ein weiteres Sauerstoffatom können zwei Wasserstoffbrückenbindungen