

6. Zusammenfassung

6.1. Kristallstrukturanalyse ortsspezifisch mutierter Kälteschockproteine

Kristallstrukturen von ortsgerecht mutierten Kälteschockproteinen aus *Bacillus caldolyticus* wurden gelöst, um die strukturellen Determinanten der Thermostabilität auf atomarer Ebene zu klären. Die fünf Mutanten stellen den Übergang vom thermophilen Protein zu seinem mesophilen Homologen dar. In ihnen sind Aminosäuren an den Positionen variiert, die für den Unterschied in der Thermostabilität verantwortlich sind. Dabei galt das Augenmerk besonders den beiden Resten Arg3 und Leu66. Beide Residuen tragen im wesentlichen für den Unterschied von $15,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei der Freien Energie der Entfaltung bei. Die restlichen zehn Unterschiede haben nur ganz geringen Einfluß auf die Stabilität. Beide Proteine haben die prinzipiell gleiche Struktur und unterscheiden sich nur in Details. Die kleinen und kompakten Proteine enthalten keine Cysteine, *cis*-Proline und keine fest gebundene Cofaktoren.

Wie aus den Strukturen von *Bc*-Csp und *Bs*-CspB bekannt ist, liegen die beiden Reste Arg3 und Leu66 in der Struktur dicht beieinander. Daher wurden auch potentiell wechselwirkende benachbarte Reste in Strukturanalysen einbezogen. Die Kristallstrukturen von beiden Mutanten, *Bc*-Csp R3E und *Bc*-Csp L66E konnten mit nahezu atomarer Auflösung bestimmt ($1,4 \text{ \AA}$ und $1,27 \text{ \AA}$) und zu R-Werten R/R_{free} von $13,9\%/20,2\%$ und $15,8\%/18,9\%$ verfeinert werden. Beide Strukturen haben die gleiche globale Faltung, zeigen aber zwischen den beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit unterschiedliche Wasserstoff- und Salzbrückenmuster. Mit der Einbeziehung des benachbarten Glu46 sowie durch die Tripelmutanten *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E und *Bc*-Csp V64T/L66E/67A konnte die Verteilung der Oberflächenladung um die Positionen 3 und 66 untersucht werden. Die Mutanten *Bc*-Csp E46A, *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E und *Bc*-Csp V64T/L66E/67A wurden kristallisiert, ihre Struktur bis $1,8 \text{ \AA}$, $1,32 \text{ \AA}$ bzw. $1,8 \text{ \AA}$ gelöst und zu R-Werten R/R_{free} von $18,5\%/23,4\%$, $13,9\%/18,1\%$ und $19,3\%/24,6\%$ verfeinert.

Eine systematische Analyse aller Mutanten zeigt, daß alle Strukturen sich sehr ähnlich sind aber in jeder Mutante unterschiedliche Muster an Wasserstoffbrücken und elektrostatischen sowie hydrophoben Wechselwirkungen an den Positionen 3 und 66 sowie seiner Nachbarn gefunden werden. Die Destabilisierung der Proteinmutanten scheint mit dem Auftreten eines ausgeprägten sauren Bereiches auf der Proteinoberfläche um die mutierten Reste korreliert zu sein. Aus dem thermodynamischen Analysen lassen sich keine attraktiven elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den mutierten Resten ableiten. Dies läßt sich anhand der Kristallstrukturen gut nachvollziehen. Es läßt sich vielmehr schlußfolgern, daß die Kälteschockproteine durch die Entfernung von repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen stabilisiert werden.

6.2. Kristallographische Untersuchungen an KorB

KorB ist ein Repressorprotein aus *E. coli* und kontrolliert die Expression von RP4-Genen. Hierzu bindet es an eine pseudosymmetrische 13 bp lange Operatorsequenz (O_B) die zwölfmal im 60 kb Plasmid präsent ist. Die Bindung des dimeren KorB an DNA wird von anderen Proteinen beeinflusst.

Durch *in situ* Proteolyse im Kritisationsstropfen ist das C-terminale Fragment von KorB (Reste 296 - 356) freigesetzt worden und das Fragment kristallisierte in dem selbigen. Analysen der Domänenstruktur und DNA-Bindungsstudien von KorB und KorB-N zeigen, daß das N-terminale Fragment die DNA-Bindungsstelle enthält. Durch limitierte Proteolyse konnte ein Domäne aus dem N-terminalen Fragment identifiziert werden, die die DNA bindende Region enthält. Das Fragment liegt in der zentralen Region von KorB

Ein solches Fragment konnte in Gegenwart von einem 17 bp langen DNA-Fragment, daß die Operatorsequenz enthält, kristallisiert und gezeigt werden, daß die Kristalle Protein und DNA enthalten. Röntgenbeugungsdaten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,7 Å konnten gesammelt werden.

Die Kristallstruktur von KorB-C, der C-terminalen Domäne des Repressorproteins KorB, konnte in zwei Kristallformen mit einer maximalen Auflösung von 1,7 Å gelöst werden. Die C-terminale Domäne enthält die Reste 297 bis 356. KorB-C faltet in ein fünfsträngiges antiparalleles β -Faltblatt. Die Stränge 1 bis 4 bilden ein up and down Faltblatt. Der fünfte Strang schließt das Faltblatt auf der offenen Seite von β_1 . Zwischen β_4 und β_5 wird eine kurze 3_{10} -Helix beobachtet. Ein Strukturvergleich zeigte überraschenderweise, daß diese Faltung der "Src homology 3 domain" (SH3-Domäne) ähnlich ist. SH3-Domänen sind aus eukaryotischen Signaltransduktionswegen bekannt und binden an prolinreiche Motive.

Von der Anordnung der Moleküle in der Kristallstruktur wurde gefolgert, daß zwei Moleküle ein funktionell relevantes Dimeres bilden. Eine detaillierte Analyse der Kontaktfläche und begleitende Quervernetzungs-Studien deuten darauf hin, daß KorB-C eine Dimerisierungsdomäne bildet. Die Kontaktfläche wird von hydrophoben Resten dominiert und ist groß genug, die dimere Form des intakten KorB in Lösung zu stabilisieren. Somit wird eine Bindung an die palindromische Operatorsequenz unterstützt.

Die Kristallstruktur von KorB-C ist ein weiteres Beispiel für eine SH3-ähnliche Struktur prokaryotischen Ursprungs. Die hier beobachtete Protein-Protein-Wechselwirkung erweitert den Rahmen an Bindungsmotiven für SH3- und SH3-ähnliche Domänen. Die SH3-SH3 Domänen-Wechselwirkung ist klar mit einer biologischen Funktion verbunden und ist in dieser Form und Anordnung das erstmal so beschrieben worden.