

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Kristallstrukturanalyse von ALA^{wt} und ALA^{C70}

3.1.1. Kristallisation und Diffraktionsexperiment

Die Kristallisation der gereinigten und hybridisierten RNA-Heptamere ergab bei der Verwendung des "Nucleic-Acid-Mini-Screen" (Berger *et al.*, 1996) innerhalb mehrerer Pufferbedingungen Kristalle unterschiedlicher Morphologie und Größe. Bei 294 K Umgebungstemperatur bildeten sich in einem Zeitraum von einem Tag bis zwei Wochen Kristalle mit einer maximalen Kantenlänge von etwa 300 µm. Das Wachstum verlief aber immer anisotrop, so daß die kleinste Kantenlänge der Kristalle die zur Strukturlösung benutzt wurden, etwa nur 50 µm betrug. Im Falle von ALA^{wt} und ALA^{I-U6} konnten durch die Verringerung der Konzentration der doppelsträngigen RNA von anfänglich 1 mM auf 0.5 mM das Kristallwachstum verlangsamt werden. Die Verlangsamung hatte positive Auswirkungen auf die Größe der Kristalle. ALA^{C70} kristallisierte im Vergleich zu den anderen Heptameren langsamer, und nur wenige Kristalle waren für die Durchführung des Diffraktionsexperiments geeignet.

1.5 µl der RNA-Lösung wurden mit 1.0 µl Kristallisationslösung auf einem silikonisiertem Deckgläschen vermischt und gegen eine 35%ige wäßrige MPD-Lösung äquilibriert. Kristallisationsversuche bei 277 K führten in jedem Fall zur Bildung von sehr vielen, kleinen Kristallen, die nicht für das Diffraktionsexperiment geeignet waren. In **Tab. 3.1** sind die Kristallisationsbedingungen der RNA-Heptamere zusammengefaßt.

Tab. 3.1 Optimale Kristallisationsbedingungen der RNA-Heptamere

	Ala ^{wt} , Ala ^{I-U6}	Ala ^{C70}
Zusammensetzung des Tropfen	40 mM Natriumkakodylat pH 6.0 12 mM Spermin x 4HCl 80 mM Strontiumchlorid 40 mM Lithiumchlorid 10% v/v MPD	40 mM Natriumkakodylat pH 6.0 12 mM Spermin x 4HCl 100 mM Kaliumchlorid 10% v/v MPD
Wachstumsdauer	4 Tage	10 Tage
Kristallgröße	250x80x50 µm	300x50x50 µm

Alle Kristalle wuchsen in Gegenwart von großen Mengen grobkörnigen Präzipitats. Grund dafür kann die verstärkte Bildung von Guanin-Tetraplex Strukturen (Phillips *et al.*, 1997) aus jeweils vier purinreichen Einzelsträngen rGGGGCUA sein. Die Bildung dieser sehr stabilen Tetraplexe, die erst bei Temperaturen größer als 358 K schmelzen, konnte mittels mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Limmer, 1997).

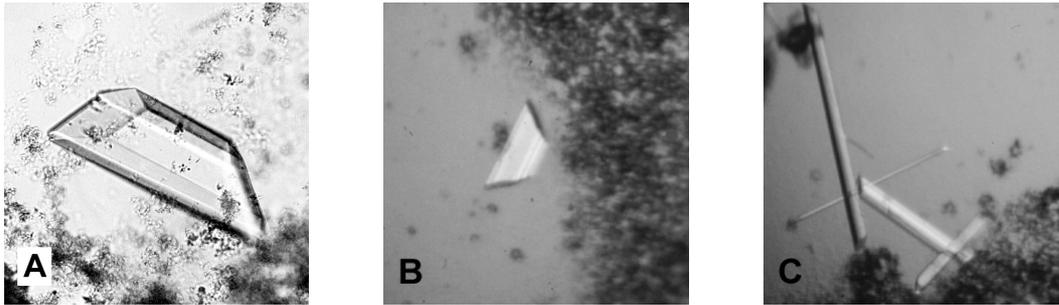


Abb. 3.1 Kristalle der tRNA^{Ala}-Akzeptorstämme A) ALA^{wt}, B) ALA^{L-U6} und C) ALA^{C70}

Die Kristalle wurden zur Messung der Beugungsdaten im Tropfen innerhalb der Linbro-Schalen zu den Elektronensynchrotrons DESY nach Hamburg und ESRF nach Grenoble transportiert. Nach der direkten Montage der Kristalle im Stickstoffstrom wurde das Diffraktionsexperiment durchgeführt. Die Temperatur betrug in allen Fällen 100 K. In der nachfolgenden **Tab. 3.2** sind die Ergebnisse der Diffraktionsexperimente für alle relevanten Datensätze zusammengestellt. Die Indizierung der Reflexe in Raumgruppe C2 konnte bei allen gemessenen Datensätzen zweifelsfrei durchgeführt werden. Der Grund für die großen R_{sym} -Werte der Reflexe in den hochaufgelösten Auflösungsschalen liegt in der schwachen Signalstärke der Meßwerte im Vergleich zum Hintergrundrauschen begründet. Die Verwendung dieser "schwachen" Reflexe bei der Verfeinerung wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (Dauter, 1997; Otwinowski, 1999). In dieser Arbeit wurden schwache Reflexe bis zu einem mittleren Signal-Rausch-Verhältnis $I/\sigma(I) \geq 1.5$ einbezogen. Alle hochaufgelösten Datensätze sind aus jeweils zwei Teildatensätzen zusammengesetzt. Da die Intensität der Reflexe bei höherer Auflösung stark abfällt, wurde jeweils ein Teildatensatz mit einer sehr langen, von der Strahlungsquelle abhängigen Belichtungszeit, bei Oszillationswinkeln $\Delta\Phi$ von 3° und doppelter Abtastung von $\Delta\Phi$ pro Einzelbild aufgenommen. Der Nachteil dieses Experiments liegt in der auf Grund des begrenzten dynamischen Bereichs des Image-Plate-Flächendetektors, großen Anzahl an überbelichteten Reflexen niedriger Auflösung.

Tab. 3.2 Diffraktionsexperimente an tRNA^{Ala}-Akzeptorstämmen

	ALA ^{wt}	ALA ^{C70}	ALA ^{I-U6-1}	ALA ^{I-U6-2}
Strahlenquelle	DESY-X11	DESY-BW7A	ESRF-BM14	ESRF-BM14
Wellenlänge (Å)	0.907	1.021	1.569	0.905
Auflösungsb.¹ (Å)	15-1.16	15-1.4	15-2.19	15-1.23
Kristallgröße (µ)	200x100x50	130x80x50	150x100x50	200x100x50
Mosaizität (°)	0.6	1.2	0.8	0.7
Auswertung in Raumgruppe C2				
Zellachsen (Å)	32.9 / 47.5 / 26.2	37.3 / 38.6 / 30.5	32.9 / 47.9 / 26.3	33.1 / 47.7 / 26.4
Zellwinkel (°)	90 / 101.9 / 90	90 / 110.6 / 90	90 / 101.6 / 90	90 / 101.6 / 90
Reflexanzahl²	13258	7824	1925	11212
Vollständigkeit³	96.7 / 93.3	98.5 / 95.8	93.0 / 72.7	96.0 / 78.1
Redundanz	5.0	3.18	3.3	2.5
< I/σ(I) >^{3,4}	14.2 / 1.5	15.86 / 1.73	10.5 / 7.8	11.82 / 1.8
R_{sym}^{3,5} (%)	6.9 / 56.4	7.8 / 46.6	4.4 / 7.4	6.8 / 33.0
V/bp⁶ (Å³)	1438	1468	1450	1458
<I²>/<I>²⁷	2.21	2.66	-	1.98
 E²-1 ⁸	0.687	0.758	-	0.678
Auswertung in Raumgruppe P1				
Zellachsen (Å)	26.2 / 28.9 / 28.9	26.7 / 26.7 / 30.5		26.4 / 29.0 / 29.0
Zellwinkel (°)	110.5 / 96.9 / 96.9	104.3 / 104.3 / 91.7		110.4 / 96.6 / 96.6
Reflexanzahl	23758	13834		18837
Vollständigkeit³	88.4 / 75.7	89.5 / 80.7		82.2 / 31.1
Redundanz	2.7	1.6		3.4
< I/σ(I) >^{3,4}	12.6 / 1.5	11.4 / 2.3		13.4 / 2.1
R_{sym}^{3,5} (%)	9.9 / 54.0	5.7 / 28.8		5.0 / 30.8
Moleküle / a. s. u⁹	Zwei Duplexe			

- 1: minimaler - maximaler Auflösungsbereich der gemessenen Reflexe
- 2: Anzahl der unabhängigen Reflexe des reduzierten Datensatzes (siehe **Abschnitt 2.4.3**)
- 3: Vollständigkeit des Datensatzes innerhalb der angegebenen Auflösungsbereiche: 15-1.16 Å / 1.17-1.16 Å für ALA^{wt}, 15-1.4 Å / 1.5-1.4 Å für ALA^{C70}, 15-2.19 Å / 2.25-2.19 Å für ALA^{I-U6-1}, 15-1.23 Å / 1.24-1.23 Å für ALA^{I-U6-2}
- 4: I : Intensität des Reflexes, σ : Standardabweichung der Intensität des Reflexes
- 5: ([Glg. 2.5])
- 6: Volumen pro Basenpaar unter der Annahme von einem RNA-Duplex pro asymmetrischer Einheit (siehe **Abschnitt 2.6**)
- 7: <I²>/<I>² Test zur Identifizierung von Zwillingskristallen (siehe **Abschnitt 2.7**)
- 8: |E²-1|-Test zur Identifizierung von Zwillingskristallen (siehe **Abschnitt 2.7**)
- 9: RNA-Moleküle pro asymmetrischer Einheit

Da diese Reflexe nicht ausgewertet werden konnten, wurde ein zweites Teilexperiment desselben Kristalls mit einem größeren Kristall-Detektor Abstand, wie auch einer viel geringeren Belichtungszeit, die im Sekundenbereich lag, durchgeführt. Beide Teildatensätze wurden einzeln ausgewertet und anschließend zusammen skaliert und kombiniert. Der bei den Datensammlungen gemessene Winkelbereich von $100\text{-}130^\circ$ entsprach den nach der Autoindizierung im C-zentrierten, monoklinen Bravaisgitter notwendigen Bereich zur vollständigen Messung des Datensatzes. Im Weiteren mußte der Kristall mit Hilfe des Goniometerkopfs justiert werden, um eine Rotation um die monokline Achse des Kristalls zu vermeiden. Für die Aufzeichnung eines vollständigen Datensatzes würde diese Orientierung die Abtastung eines Winkelbereichs von 180° erforderlich machen. Die Positionierung der Kristallachsen zur Detektorfläche kann direkt von den Parametern "crystal rotx roty rotz", die während der Autoindizierung bestimmt werden, abgelesen werden (siehe **Abschnitt 2.4.3**). Bei der Durchführung wie der Auswertung der Diffraktionsexperimente konnten keine Hinweise auf eine, wie später identifizierte, Fehlordnung der Kristalle gefunden werden. Weder die Kristallmorphologie, noch die Daten der Indizierung in der monoklinen Zelle deuteten auf einen Verlust der Symmetrie im gesamten Auflösungsbereich hin. Die erst nach erfolgter Strukturlösung durchgeführte Auswertung der Intensitätsstatistik der azentrischen Reflexe ist widersprüchlich. So deutet die $|E^2-1|$ -Statistik von ALA^{wt} und ALA^{I-U6} mit Werten von 0.668 und 0.678 auf eine mögliche Fehlordnung der Strukturen hin (**Tab. 3.2**), die $\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$ -Statistik hingegen nicht. Auch bei hoher Auflösung waren die Reflexmuster unauffällig und zeigten keine Doppelreflexe oder ähnliche Artefakte, die auf eine Störung des Einkristalls hätten schließen lassen können (**Abb. 3.2**).

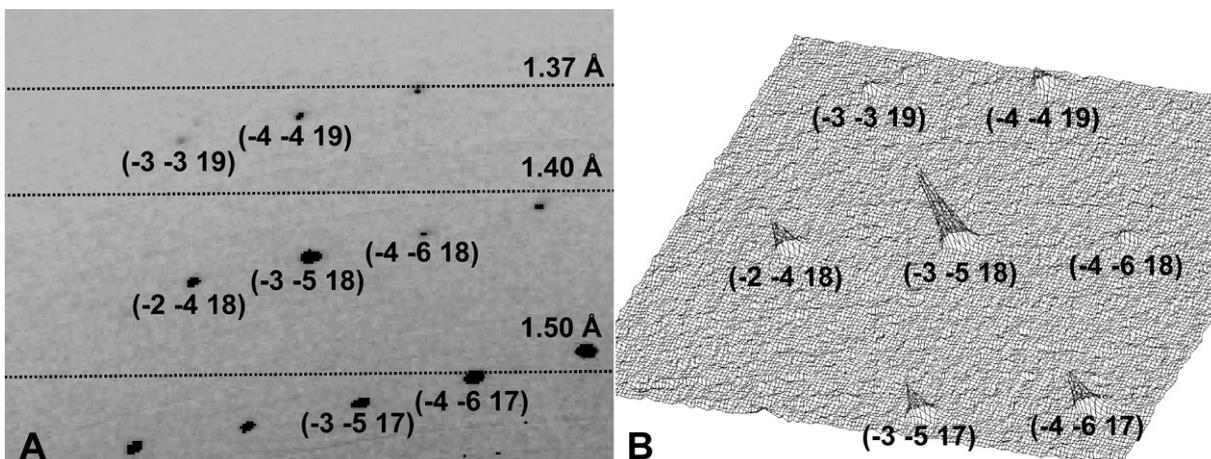


Abb. 3.2 Ausschnitt aus dem Diffraktionsbild von ALA^{I-U6} -2 A) zweidimensionale und B) dreidimensionale Darstellung der Reflexprofile des ALA^{I-U6} -2 Datensatzes bei hoher Auflösung mit den Millerschen Indizes der monoklinen Indizierung

Die im weiteren Verlauf der Strukturlösung angewandte Methode der Verfeinerung der RNA-Heptameren als pseudo-merohedrale Zwillinge verlangte die Reindizierung der für die Verfeinerung benutzten Datensätze in der triklinen Raumgruppe. Diese Auswertung in Raumgruppe P1 führte zu einer systematischen Verringerung der Vollständigkeit aller Datensätze, die nicht durch nochmalige Synchrotron-Experimente kompensiert werden konnten.

Die Datensammlung des anomalen Datensatzes ALA^{I-U6}-1 (**Tab. 3.2**) wurde nach anderen Gesichtspunkten durchgeführt. Das Ziel dieses Experiments war die Sammlung eines möglichst vollständigen, anomalen Datensatzes. Das bedeutet die separate Messung aller Friedel-Reflexe, deren systematischer Intensitätsunterschied durch das anomale Signal beschrieben wird. Bei diesem Experiment ist die Minimierung des experimentellen Fehlers von essentieller Bedeutung, da die Größe des anomalen Signals im Bereich dieses statistischen Fehlers der Intensitätsmessung liegt. Diese zusätzlichen Anforderungen wurden durch die sorgfältige Auswahl eines Kristalls mit sehr guten Beugungseigenschaften wie auch der besonderen Strahlqualität des ESRF-Messplatzes BM-14 erfüllt. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 1.569 Å ein vollständiger Teildatensatz, bei der Drehung des Kristalls um 90° mit einem Φ -Inkrement von 3° und einen Kristall-Detektor Abstand von 160 mm, gemessen. Der zweite Teildatensatz wurde analog, aber 180° um die Φ -Achse gedreht, aufgenommen. Beide Teildatensätze wurden skaliert, und die anomale Differenz jedes Reflexes wurde ermittelt. Obwohl die Energie der Röntgenstrahlung bei diesem Experiment signifikant höher als die Energie der Absorptionskante des Schweratoms (2.38 Å LII-Kante von Iod) ist, ist die Messung des anomalen Signals (Conner *et al.*, 1982) möglich.

3.1.2. Die Strukturlösung und Verfeinerung von ALA^{wt} und ALA^{C70} in C2

3.1.2.1. Molekularer Ersatz

ALA^{wt}:

Obwohl die Methode des Molekularen Ersatzes eine adäquate Methode der Strukturlösung doppelhelikaler Nukleinsäurefragmente darstellt, führten im Fall von ALA^{wt} alle durchgeführten Versuche nicht zum Erfolg. Als Suchmodell wurde eine RNA in der kanonischen A-Form (Saenger, 1984) mit einer identischen Sequenz gewählt. Zur Berechnung der Kreuzrotations- und Translationsfunktion wurden die Programme AMORE (CCP4, 1994), XPLOR (Brünger, 1990), und ULTIMA (Rabinovich & Shakked, 1984) benutzt. Durch den kontrastarmen Lösungsraum der Rotations- wie auch der Translationssuche, war keine Strukturlösung möglich. Bei der Analyse von

potentiellen Lösungen stellte sich eine Präferenz der Orientierung der Duplexmoleküle entlang der Flächendiagonale der a, c-Fläche heraus, die eine quasi-kontinuierliche Doppelhelix im Kristall aufbauen. Bei der Analyse der Kristallpackung zeigte sich, daß symmetrieverwandte Doppelhelices in jedem Fall zu stereochemischen Problemen im Bereich der intermolekularen Basenpaar-Wechselwirkungen führten, die nicht beseitigt werden konnten (**Abb. 3.3**). Als beste Lösungen wurden hierbei Strukturen mit einem minimalen R-Wert, einem maximalen Korrelationskoeffizienten und einer chemisch sinnvollen Packung innerhalb des Kristallgitters selektiert.

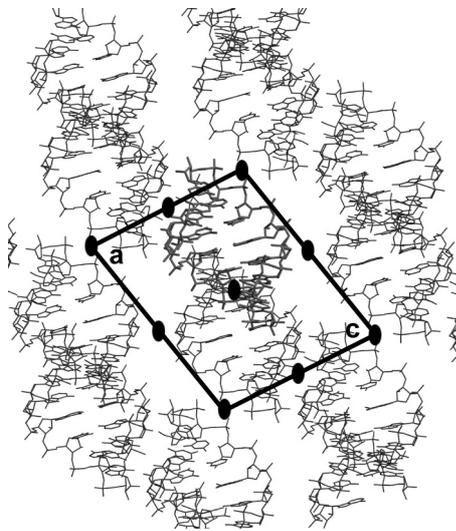


Abb. 3.3 Stereochemisch falsche Lösung für ALA^{wt} unter Verwendung der Methode des Molekularen Ersatzes nach erfolgter "Starrer Körper" Verfeinerung, Auflösungsbereich 8-3.0 Å, R=49.5% , C=0.449

ALA^{C70}:

Im Gegensatz zum ALA^{wt}-Kristall war in diesem Fall die Strukturlösung mittels Molekularem Ersatz in der monoklinen Raumgruppe unter Verwendung des Programms AMORE (CCP4, 1994) möglich. Als Suchmodell wurde eine kanonische A-Form RNA der entsprechenden Sequenz verwendet (Heinemann, 1995). Die Einzelschritte der Strukturlösung sind in **Tab. 3.3** zusammengefaßt.

Tab. 3.3 Statistik der Strukturlösung von ALA^{C70} durch Molekularen Ersatz

Kreuzrotationsfunktion	
Auflösungsbereich (Å)	8-2.8
$\alpha / \beta / \gamma^1$ (°)	57.20 / 68.80 / 221.20
Rang innerhalb der Rotationsfunktion	6
Peakgröße	49.6
Standardabweichung	8.98
Translationsfunktion	
Auflösungsbereich (Å)	10-5.0
$T_x / T_y / T_z^2$	0.1667 / 0.0000 / 0.3571
R^3 (%) / C^4	49.0 / 0.30
"Starrer Körper"-Verfeinerung	
Auflösungsbereich (Å)	8-3.0
R^3 (%) / C^4	44.7 / 0.626
α, β, γ^1 (°) T_x, T_y, T_z^2	56.63 / 65.17 / 225.80 / 0.179 / 0.000 / 0.382

- 1: Eulerwinkel der Kreuzrotationslösung
- 2: Translationsvektor der Translationslösung
- 3: R-Wert [Glg. 2.16]
- 4: Korrelationskoeffizient [Glg. 2.17]

Abb. 3.4 stellt das Ergebnis der Strukturlösung nach der Verfeinerung der primären Lösung als "starrer Körper" dar. Eine Doppelhelix bildet die asymmetrische Einheit. Über zweizählige Drehachsen wird innerhalb des Kristalls eine pseudo-kontinuierliche Helix aufgebaut. Die a, c-Flächendiagonale ist mit 34.91 Å um 2.64 Å länger als die der ALA^{wt}-Zelle. Diese Differenz scheint für die unterschiedlichen Packungseigenschaften der beiden RNA-Heptameren verantwortlich zu sein.

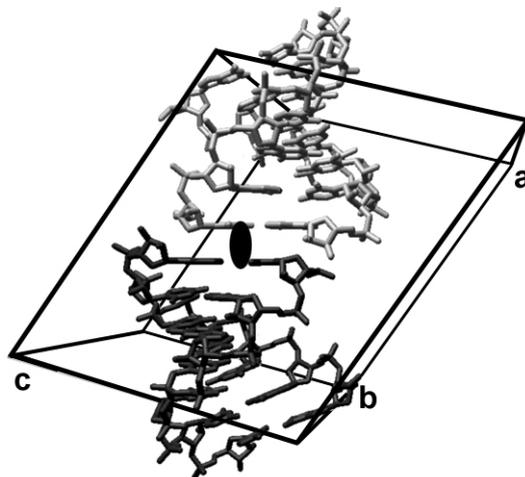


Abb. 3.4 Als "starrer Körper" verfeinerte Lösung des Molekularen Ersatzes der ALA^{C70}-Helix. Der schwarz dargestellte RNA-Duplex bildet die asymmetrische Einheit in der monoklinen Zelle

3.1.2.2. Strukturanalyse von ALA^{wt} unter Verwendung der SIRAS-Methode

Bei Nucleinsäuren ist die Verwendung von Schweratomen zur Ermittlung experimenteller Phasen bestimmten Einschränkungen unterworfen. Obwohl in Einzelfällen die nachträgliche Einlagerung von Kationen aus Schweratom-Salzen in das Kristallgitter bzw. die Kokristallisation dieser mit der Nucleinsäure beschrieben wurde, ist die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung dieser Kationen an doppelhelikale Strukturen gering (Cate *et al.*, 1996; Correll *et al.*, 1997). Eine Alternative stellt die Verwendung derivatisierter Nucleotide, die chemisch gebundene Schweratome enthalten, dar. Sie werden bei der chemischen Synthese der oligomeren Nucleinsäuren in das Oligonucleotid eingefügt. Hierbei kommen ausschließlich mit Brom und Iod an Position 5 derivatisierte Cytidin- und Uridin-Nucleotide zum Einsatz. Die Verwendung eines 5-Iod-Uridin-Derivats bei der Strukturlösung bot sich aufgrund der größeren Elektronendichte von Iod (Ordnungszahl 53), im Gegensatz zu Brom (Ordnungszahl 35), und der besseren Verfügbarkeit der Nucleotidsynthese für die Synthese an (**Abb. 3.5**).

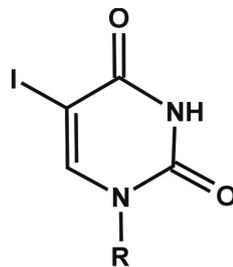


Abb. 3.5 Schweratom-Derivat 5-Iod-Uridin (R = Ribose)

Analyse der Pattersonfunktion:

Zur Ermittlung der Iod-Positionen wurde die isomorphe und die anomale Differenz-Pattersonfunktion des nativen ALA^{wt} und des ALA^{I-U6}-1 Datensatzes ausgewertet. Die Skalierung der Daten ergab ein signifikantes isomorphes Signal wie auch eine schwache anomale Differenz (**Abb. 3.6**). Obwohl ein Anstieg von $\langle |Diso| \rangle$ ab 5 Å hin zu höherer Auflösung auf Isomorphieprobleme hindeutet, wurde ein Auflösungsbereich von 10-3.0 Å für die weitere Strukturlösung ausgewählt.

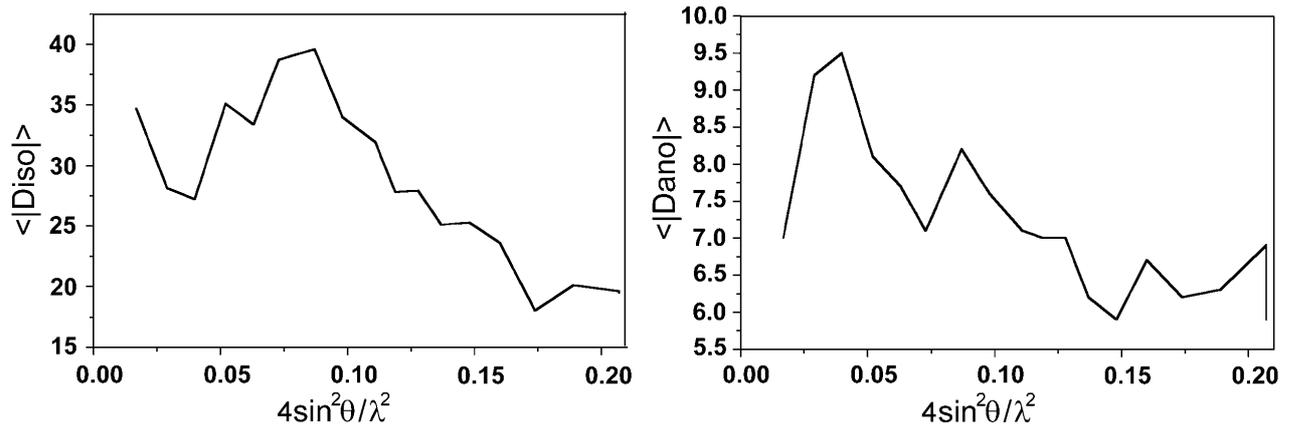


Abb. 3.6 Auflösungsabhängigkeit der isomorphen und anomalen Differenzen im Bereich von 8–3 Å

In der monoklinen Raumgruppe C2 befindet sich eine zweizählige Drehachse entlang der b-Achse. Daraus ergeben sich die zwei äquivalenten Positionen x, y, z und $-x, y, -z$. Die daraus resultierende HARKER-Ebene ist $u, 0, w$. Die Auswertung der isomorphen und anomalen Pattersonfunktion lieferte konsistente Lösungen für zwei Iod-Positionen. Durch Anwendung des entsprechenden Kreuzpattersonpeaks wurden anschließend die Atomkoordinaten der Iod-Atome bestimmt (Tab. 3.4, Abb. 3.7).

Tab. 3.4 Iod-Koordinaten nach Analyse der Pattersonfunktionen

	Iod-1	Iod-2
Isomorphe Differenzpattersonfunktion		
HARKER-Peak	0.3843 / 0.0000 / 0.3181	0.3579 / 0.0000 / 0.4615
Kreuz-Peak, Peakhöhe	0.12810 / 0.32565 / 0.11214 ; 5.1 σ	
Fraktionelle Koordinaten	-0.1922 / 0.0000 / -0.1591	-0.3203 / -0.3256 / -0.2712
Anomale Differenzpattersonfunktion		
HARKER-Peak	0.3940 / 0.0000 / 0.3245	0.3636 / 0.0000 / 0.4735
Kreuz-Peak, Peakhöhe	0.1162 / 0.3216 / 0.1018 ; 4.8 σ	
Fraktionelle Koordinaten	-0.1970 / 0.0000 / -0.1623	-0.3132 / -0.3216 / -0.2641

Der experimentelle Befund des Vorhandenseins zweier Schweratom-Lagen in der asymmetrischen Einheit bildete einerseits die Voraussetzung zur Strukturlösung in der polaren Raumgruppe C2, andererseits konnte er zu diesem Zeitpunkt der Auswertung nicht interpretiert werden (siehe Abschnitt 2.5).

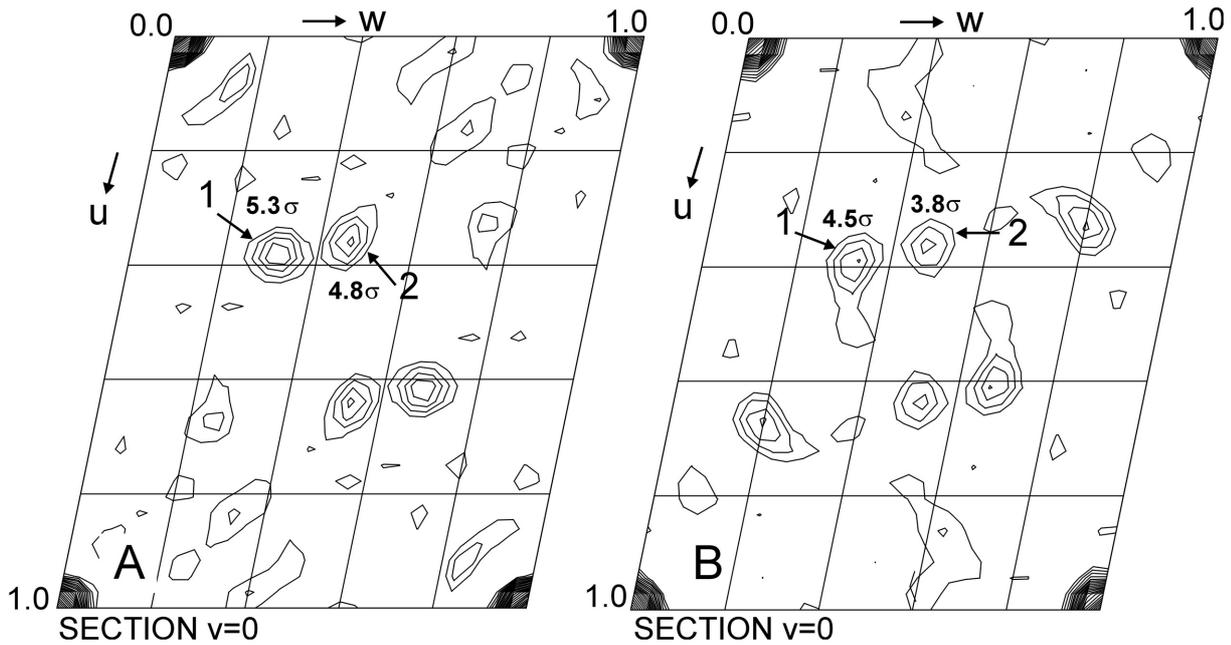


Abb. 3.7 HARKER-Ebene u_0w der A) isomorphen- und B) anomalen Differenzpattersonfunktion im Auflösungsbereich von 10-3.0 Å, Konturierungsstart 1σ , Konturierungsschritt 1σ

Phasenverfeinerung :

Die Phasenverfeinerung erfolgte in mehreren Schritten unter Einbeziehung der isomorphen- wie auch der anomalen Differenz im Auflösungsbereich von 10-3.0 Å. An Stelle eines Iod-Atoms wurde ein artifizielles Atom "ANO" verwendet, welches ein Einelektronensystem darstellt und Vorteile bei der Behandlung von Besetzungswahrscheinlichkeiten wie auch der B-Faktoren im Prozeß der Phasenverfeinerung bietet (CCP4, 1994). Anschließend wurde die Phasenverbesserung durch Dichtemodifikationsrechnungen durchgeführt. Es wurde ein Solvensanteil von 45% vorgegeben, der niedrig angesetzt wurde um nicht Elektronendichte der RNA zu nivellieren. Fünf iterative Modifikationszyklen führten zu einer signifikanten Verbesserung der experimentellen Elektronendichte ($m=0.736$). Die Daten der Phasenverfeinerung wie der Dichtemodifikation sind in **Tab. 3.5** dargestellt.

Tab. 3.5 Statistiken der Phasenverfeinerung mit MLPHARE und der Phasenverbesserung mit DM

	Iod-1	Iod-2
MLPHARE-Phasenverfeinerung		
Fraktionelle Koordinaten¹	-0.191 / 0.000 / -0.159	-0.320 / -0.320 / -0.270
Isomorphe Besetzung	12.6	13.3
Anomale Besetzung	1.07	0.996
B-Faktor (Å²)	3.4	6.6
Auflösungsbereich (Å)	10-3.0	
R_{cullis}² (%)	57	
PP³	2.3	
FOM⁴	0.538	
DM-Dichtemodifikation		
FOM⁴	0.736	
R_{free}⁵	43.2	

- 1: verfeinerte fraktionelle Koordinaten
- 2: Cullis R-Wert [Glg. 2.11]
- 3: Phasierungspotential [Glg. 2.10]
- 4: Figure of merit [Glg. 2.12]
- 5: R_{free} der Dichtemodifikation [Glg. 2.20], 5% der Reflexe wurden als Testdatensatz ausgewählt

Modellbau:

Auf der Grundlage der experimentell ermittelten Phaseninformation war es möglich, die Strukturlösung in der monoklinen Raumgruppe durchzuführen. Dazu wurde eine auf zwei Elementarzellen erweiterte Elektronendichtekarte in einem Auflösungsbereich von 8-3 Å berechnet, die bei einer Konturierung von 1-2 σ an der Graphikworkstation mit dem Programm "O" (Jones *et al.*, 1991) ausgewertet wurde. Markante Anhaltspunkte der Dichtekarte bildeten leiterartige Dichteabschnitte die den stapelnden Basenpaaren zugeordnet wurden (**Abb. 3.8-A**). Damit war auch eine prinzipielle Positionierung der helikalen Strukturen möglich. Die Positionierung eines heptameren Duplexes innerhalb der durch zweizählige Drehachsen begrenzten asymmetrischen Einheit konnte jedoch aufgrund folgender Beobachtungen nicht durchgeführt werden. Im mittleren Bereich der asymmetrischen Einheit war ein deutlicher Versatz zweier Helixstrukturen identifizierbar. Dieser Versatz war weder durch eine Umorientierung des helikalen Modells noch durch eine chemisch sinnvolle Konformationsänderung innerhalb der helikalen Struktur erklärbar. Elektronendichtebereiche, die Basenpaaren zugeordnet wurden, verliefen in derselben Ebene wie zwei die asymmetrische Einheit begrenzenden zweizähligen Drehachsen. Oftmals werden selbstkomplementäre Duplexstrukturen über zweizählige Drehachsen, die zwischen den beiden

zentralen Basenpaaren und senkrecht zur helikalen Achse des Duplexes liegen, im Kristallgitter aufgebaut (Heinemann *et al.*, 1987; Hunter *et al.*, 1989; Portmann *et al.*, 1995). Die Voraussetzung dafür ist eine entsprechende Sequenz und eine geradzahlige Basenpaaranzahl, da im ungeradzahigen Fall die zweizählige Drehachse durch das zentrale Basenpaar laufen müßte. Die Sequenz des tRNA^{Ala}-Akzeptorstamms ist aber nicht selbstkomplementär und die Basenpaaranzahl ist ungeradzahlig (**Abb. 1.1**). Die daraus gefolgerte Annahme einer Duplexbildung durch die Kombination zweier gleicher Einzelstränge, die diese zweizählige Symmetrie erfüllt, wurde aufgrund energetisch destabilisierender Wechselwirkungen (A•A, G•G, A•G) verworfen. Experimentell wurde diese Annahme durch eine gelelektrophoretische Analyse der Zusammensetzung mehrerer aufgelöster RNA-Kristalle unter denaturierenden Bedingungen ebenfalls widerlegt, da beide im elektrischen Feld unterschiedlich mobilen Einzelstränge zweifelsfrei identifizierbar waren und im äquimolarem Verhältnis vorlagen. Durch die Zuordnung der durch die Pattersonmethoden bestimmten Positionen der Iod-Atome, die chemisch an U6 fixiert sind, konnte das endgültige Strukturmodell etabliert werden. Hierbei wird die asymmetrische Einheit durch zwei um die begrenzenden zweizähligen Drehachsen fehlgeordnete Duplexmoleküle aufgebaut. Beide bilden mit einem jeweils 50%igen Anteil den Inhalt der asymmetrischen Einheit. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der anfänglich durchgeführten Packungsabschätzung, welche einen effektiven Platz für einen heptameren Duplex zuließ (**Tab. 3.2**). Durch die Fehlordnung um das zentrale G4-C69-Basenpaar werden die in Bezug auf diese Achse gegenüberliegende Basenpaare aufeinander abgebildet (**Abb. 3.8**).

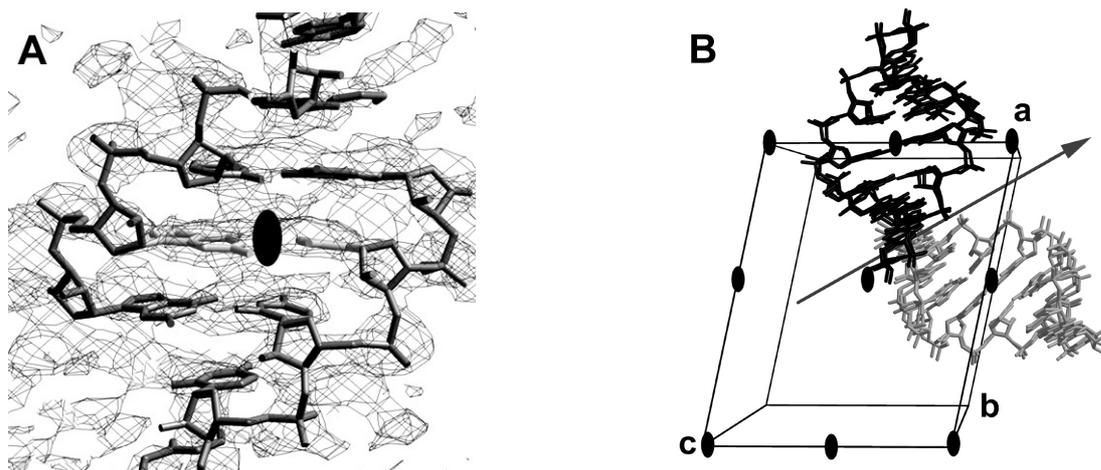


Abb. 3.8 Strukturlösung von ALA^{wt} A) Experimentelle Elektronendichte konturiert bei 1.5σ mit Teilen des eingebauten Strukturmodells. Das zentrale G4-C69-Basenpaar liegt in der Ebene einer zweizähligen Drehachse (symmetrieverwandte Atome sind nicht dargestellt). B) Aufbau der asymmetrischen Einheit in der monoklinen Raumgruppe. Sie wird über die zwei fehlgeordneten Heptamer-Duplexe gebildet. Der Pfeil kennzeichnet eine zweizählige, nichtkristallographische Symmetrieachse. Die superpositionierten Duplexmoleküle wurden gemeinsam eingezeichnet.

3.1.2.3. Verfeinerung von ALA^{wt} und ALA^{C70} in der monoklinen Raumgruppe C2

ALA^{wt}:

Die Strukturverfeinerung des fehlgeordneten Modells erfolgte mit SHELXL-97. Zur Durchführung der Verfeinerung wurden die aufgrund der kristallographischen Symmetrie auftretenden symmetrieverwandten Kontakte durch die PART -1 Option ausgeschaltet. Die Besetzungszahl aller Atome der RNA-Helix wurden auf 0.5 zurückgesetzt. Die Verfeinerung erfolgte in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, unter Einbeziehung aller gemessenen Daten, bis zur Auflösungsgrenze. In der $+(F_o-F_c)$ -Differenzelektronendichte konnte ein dominierender, sphärischer 16 σ -Peak der auf der zentralen, durch den Mittelpunkt der a, c-Fläche verlaufenden, zweizähligen Drehachse lag, als ein Sr^{2+} -Kation identifiziert werden (**Tab. 3.1**). Nach der Identifikation von 85 Wasserpositionen und unter Verwendung von 559 Testreflexen, konvergierte die Verfeinerung bei einem R/R_{free} von 22.1%/27.6%. Die sich anschließende Verfeinerung dieses Strukturmodells unter Verwendung anisotroper B-Faktoren, führte ohne zusätzliche Wasserpositionen zu einem R/R_{free} von 14.68%/24.01% (**Abb. 3.9**).

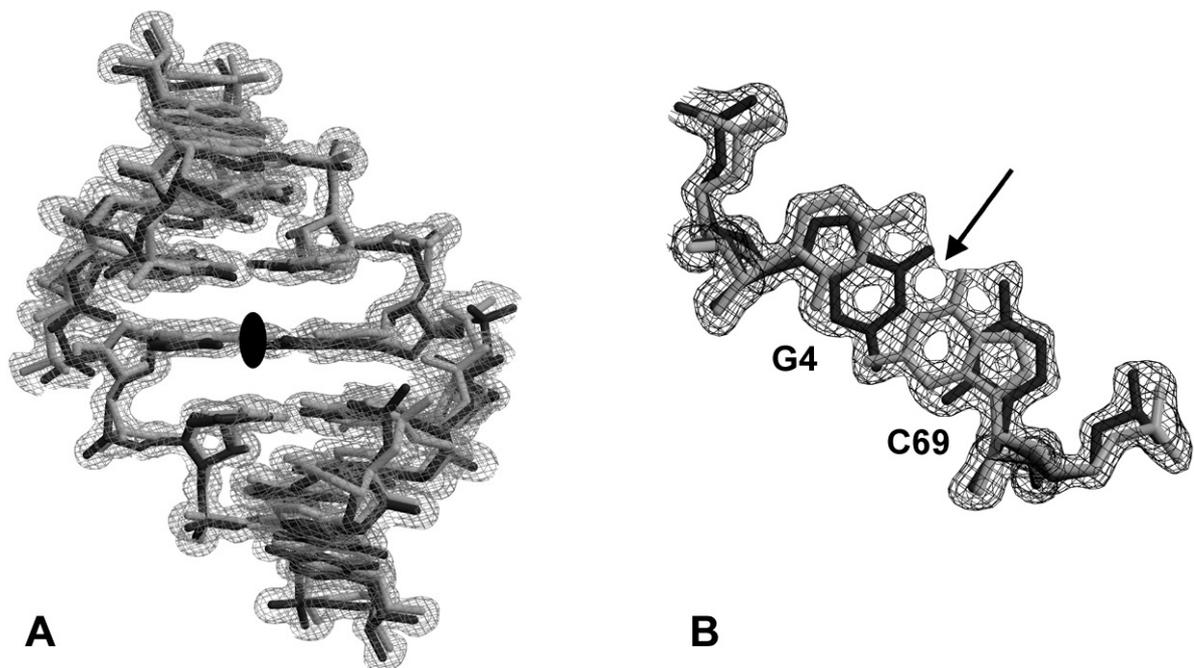


Abb. 3.9 Verfeinerte Strukturmodelle mit $(2mF_o-DF_c)$ -Elektronendichten bei 1.5 σ konturiert, A) Fehlordnung des heptameren Duplexes um die zweizählige Drehachse, B) Das zentrale G4-C69-Basenpaar liegt in der Ebene der zweizähligen Drehachse

ALA^{C70} :

Die Verfeinerung der ALA^{C70}-Mutante wurde ausschließlich mit SHELXL-97 durchgeführt. Während 11 aufeinanderfolgender Verfeinerungszyklen unter Verwendung isotroper B-Faktoren und Daten zwischen 15-1.4 Å konnten 74 Wasserpositionen bestimmt werden. Der R/R_{free} konvergierte zu Werten von 22.8%/31.5%. Die sich anschließende Verfeinerung der zusätzlichen anisotropen B-Faktoren führte zu einer sprunghaften Verbesserung der R/R_{free} Werte auf 22.5%/28.15%. Am Ende der Verfeinerung betrug R/R_{free} 19.1%/25.0%, ohne daß eine weitere Erweiterung des Wassermodells stattfand. Bei der Analyse der verfeinerten Struktur wurden ausgedehnte Bereiche hochkonturierter $+(mF_o-DFc)$ -Differenzdichte, vorwiegend in der Nähe der Basenpaarebenen, gefunden. Dieser Befund deutete auf eine ebenfalls vorliegende Fehlordnung dieses Kristalls um die, in diesem Fall, nichtkristallographische pseudo-zweizählige Drehachse des Duplexes hin (**Abb. 3.10**). Eine Superpositionierung der Struktur mit der angenommenen Struktur des fehlgeordneten Duplex erklärte vollständig die aufgefundene Differenzdichte. Nach dem Erkennen dieser Fehlordnung wurde diese aber nicht wie in den vorangegangenen Verfeinerungen in der monoklinen Raumgruppe modelliert. Die Verfeinerung von ALA^{C70} wurde als pseudo-merohedrales Zwilling in der triklinen Raumgruppe ausgeführt (siehe **Abschnitt 3.1.3**).

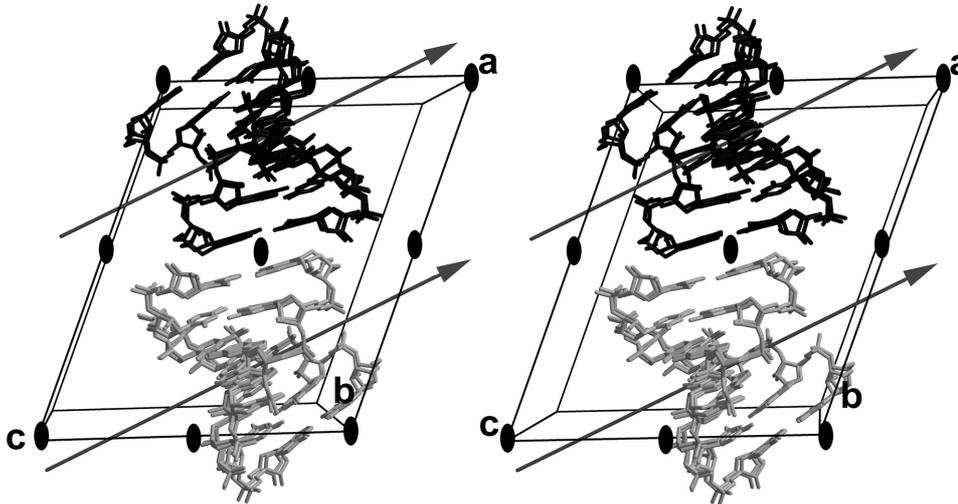


Abb. 3.10 Fehlordnung von ALA^{C70} in der monoklinen Zelle. Die Pfeile kennzeichnen die nichtkristallographischen, zweizähligen Drehachsen die die Fehlordnung realisieren. Die grau gefärbten Duplexmoleküle entsprechen dem Inhalt der asymmetrischen Einheit.

3.1.3. Alternative Strukturlösung und Verfeinerung der tRNA^{Ala}-Mikrohelix in P1

Eine praktische Alternative der Verfeinerung aller heptameren RNA-Duplexstrukturen stellt die Beschreibung als pseudo-merohedrales Zwilling dar. Im Verlauf der Auswertung aller Meßdaten war die Durchführung dieser speziellen Verfeinerung für alle Fehlordnungsstrukturen möglich. Der Hauptunterschied zu der Fehlordnungsverfeinerung in der monoklinen Raumgruppe beruht auf der nach Aufstellung des Zwillingsgesetzes möglichen Dekonvolution der beobachteten Überlagerungen der Duplexmoleküle. Während die Verfeinerung in der monoklinen Raumgruppe eine perfekte Fehlordnung mit einer Besetzung von 0.5 für alle RNA-Atome, die um die zweizählige Drehachse fehlgeordnet sind erzwungen, ist die zusätzliche Verfeinerung der Zwillingsfraktion α [Glg. 2.18] bei der Zwillingsverfeinerung in der triklinen Raumgruppe möglich.

3.1.3.1. Positionierung der RNA-Duplexe in P1 durch den Molekularen Ersatz

Die Voraussetzung für die Verfeinerung aller Kristallstrukturen ist die erneute Lösung des Phasenproblems in der triklinen Raumgruppe. Aufgrund der Nichtisomorphie des ALA^{C70} zum ALA^{wt} und ALA^{I-U6} mußten zwei unabhängige Berechnungen durchgeführt werden. Eine Eigenschaft der triklinen Zelle ist die Verdopplung des Volumens der asymmetrischen Einheit in Bezug auf die monokline Elementarzelle. Als Suchmodell dienten deshalb in beiden Fällen zwei aufeinander stapelnde Duplexe, die dem verfeinerten, aber nicht fehlgeordneten Strukturmodell der C2-Verfeinerung entsprachen. Obwohl dieses Suchmodell durch seine vergrößerte Abweichung von einer globulären Form die Orientierung in der asymmetrischen Einheit negativ beeinflussen kann, war eine problemlose Strukturlösung der beiden RNA-Helices möglich (Tab. 3.6). Im Falle der triklinen Strukturlösung mit den zwei Duplexmolekülen entfiel die Translationssuche, da aufgrund der Symmetrie der triklinen Zelle die asymmetrische Einheit die gesamte Elementarzelle bildet und damit die Positionierung des Suchmodells durch die Kreuzrotationsfunktion durchgeführt wird. Die direkte Verfeinerung der Rotationslösung mit der "starren-Körper" Verfeinerung, lieferte zweifelsfrei die entsprechende Lösung.

Tab. 3.6 Molekularer Ersatz in Raumgruppe P1 für ALA^{wt} und ALA^{C70}

	ALA ^{wt}	ALA ^{C70}
Kreuzrotationsfunktion		
Auflösungsbereich (Å)	8-2.5	
$\alpha / \beta / \gamma^1$ (°)	300.01/36.45/312.13	46.80/106.07/0.80
Rang innerhalb der Rotationsfunktion	1	1
Peakgröße	73.2	69.0
Standardabweichung	8.11	7.36
"Starrer Körper"-Verfeinerung		
Auflösungsbereich (Å)	8-4.0	
R² (%) / C³	35.8 / 0.674	25.8 / 0.850
α, β, γ^1 (°)	295.40/33.98/310.95	46.39/106.35/0.24

- 1: Eulerwinkel der Kreuzrotationslösung
- 2: R-Wert [Glg. 2.16]
- 3: Korrelationskoeffizient [Glg. 2.17]

3.1.3.2. Zwillingsverfeinerung von ALA^{wt}, ALA^{C70} und ALA^{I-U6}

SHELXL bietet neben der Verfeinerung anisotroper B-Faktoren auch die Möglichkeit der Zwillingsverfeinerung analytisch gelöster Zwillinge an. Nach der Aufstellung der Zwillingsgesetze (Herbst-Irmer & Sheldrick, 1998) wurde die Verfeinerung aller RNA-Strukturen in einer vergleichbaren Art und Weise durchgeführt. Als Startmodell für die Verfeinerung der RNA-Helices diente das Strukturmodell der monoklinen Verfeinerung, welches durch den Molekularen Ersatz in der triklinen Zelle positioniert wurde (siehe **Abschnitt 3.1.3.1**). Die Definition der speziellen C5-I5 Bindung des 5-Iod-Uridins wurde durch Auswertung einer hochaufgelösten Struktur (NDB-Eintrag: DRBB19) zur Festlegung von "restraints" für die Bindungslänge wie auch Bindungswinkel und der zusätzlichen Planarität des Iod-Atoms in Bezug auf die Nukleobase Uracil durchgeführt.

Die anfängliche Verfeinerung im Bereich von 15-2.0 Å führte zu einer schnellen Konvergenz der Strukturmodelle. Anschließend wurde das Wassermodell durch eine sukzessive und automatische Suche durch das Programm SHELXWAT etabliert. In allen Fällen führte der Beginn der anisotropen B-Faktorverfeinerung zur Verringerung des R_{free}-Wertes, der als Maß für die Signifikanz dieses Ansatzes diente. Die Verfeinerung der Zwillingsfraktion α (BASF-Verfeinerung) führte zu Werten von 0.44 bis 0.51. Diese Abweichung von der exakten Halbbesetzung der Fehlordnungsbereiche hatte aber keinen auffälligen Einfluß auf die anfängliche Indizierung in der Raumgruppe C2. Zum Ende der Verfeinerungen wurden zusätzliche Metallionenbindungsstellen identifiziert und die Feinabstimmung der Standardabweichungen für die einzelnen "restraints"

durchgeführt. Der letzte Verfeinerungszyklus wurde in jedem Fall unter Verwendung aller Meßdaten durchgeführt. Die Ergebnisse der Verfeinerungen sind in **Tab. 3.7** zusammengefaßt.

Tab. 3.7 Ergebnisse der Zwillingsverfeinerung von ALA^{wt}, ALA^{I-U6} und ALA^{C70}

	ALA ^{wt}	ALA ^{I-U6}	ALA ^{C70}
Auflösungsbereich (Å)	15-1.16	15-1.23	15-1.4
Zwillingsgesetz	-100 00-1 0-10		0-10 -100 00-1
10 Zyklen Koordinaten + isotrope B-Faktor Verfeinerung, Auflösungsbereich 15-2.0 Å			
R¹/R_{free}² (%)	21.1 / 26.4	28.4 / 30.7	25.8 / 33.3
10 Zyklen automatische Wassersuche (SHELXWAT) + 10 Zyklen Koordinaten + isotrope B-Faktor Verfeinerung , gesamter Auflösungsbereich			
Anzahl der Wasser	95	69	143
R¹/R_{free}² (%)	18.8 / 25.1	20.1 / 22.9	20.4 / 27.5
10 Zyklen Koordinaten + anisotrope B-Faktoren Verfeinerung			
ΔR³/ΔR_{free}⁴ (%)	4.1 / 2.1	3.4/2.5	4.0/2.9
Konvergenz der Verfeinerung			
R¹/R_{free}² (%)	12.3 / 18.0	12.7/19.3	15.8 / 21.8
Verfeinerung gegen alle Daten⁵			
R¹/R_{4σ}⁶ (%)	12.4 / 11.7	12.9/12.24	16.1 / 13.8
BASF⁷	0.51	0.44	0.48
RNA-Atome	586	588	586
Anzahl Wasser	149	155	134
Andere Atome	1Sr ²⁺ , 1Na ⁺	1Sr ²⁺ , 1Na ⁺	2 Na ⁺
rmsd 1-2 Abstände⁸ (Å)	0.007	0.029	0.028
rmsd 1-3 Abstände⁹ (Å)	0.019	0.018	0.010
rmsd Basenebene¹⁰ (Å)	0.032	0.032	0.020
atom. Koord. fehler¹¹ (Å)	0.041	0.033	0.053

- 1: R-Wert [Glg. 2.16]
- 2: R_{free} [Glg. 2.20], 5% der Reflexe wurden als Testdatensatz gewählt
- 3: Änderung des R-Werts zu Beginn der anisotropen Verfeinerung
- 4: Änderung des R_{free}-Werts zu Beginn der anisotropen Verfeinerung
- 5: Verfeinerung gegen Test- und Arbeitsdatensatz
- 6: R-Wert für Reflexe mit I_{obs}, F_{obs} > 4σ
- 7: Zwillingsfraktion α [Glg. 2.18]
- 8: mittlere Abweichung der Bindungslänge von Standardwerten
- 9: mittlere Abweichung der Bindungswinkelabstände von Standardwerten
- 10: mittlere Abweichung der Basenplanarität von Standardwerten
- 11: mittlerer Koordinatenfehler der Struktur

Die Strukturverfeinerung nach der "full matrix"-Methode lieferte den mittleren Koordinatenfehler jedes Atoms. Im Gegensatz zur Ermittlung der Abweichung des Strukturmodells von der Standardgeometriebibliothek bietet die Ermittlung der Standardabweichung der Koordinaten

einzelner Atome die Möglichkeit der quantitativen Einschätzung der experimentell bedingten Ungenauigkeiten. Der Koordinatenfehler hängt in erster Linie von der erreichten Auflösung des Diffraktionsexperiments ab. Zum Anderen besteht ein Zusammenhang mit der Art des Atoms und des Bindungszustands. Je größer die integrale Elektronendichte des Atoms ist -größer atomarer Streufaktor- um so genauer kann seine Position ermittelt werden. Die Größe des Koordinatenfehlers steigt in der Reihe der Atomsorten, $P < O < N < C < OH_2$ (als Wasser koordinierter Sauerstoff) (**Abb. 3.11**).

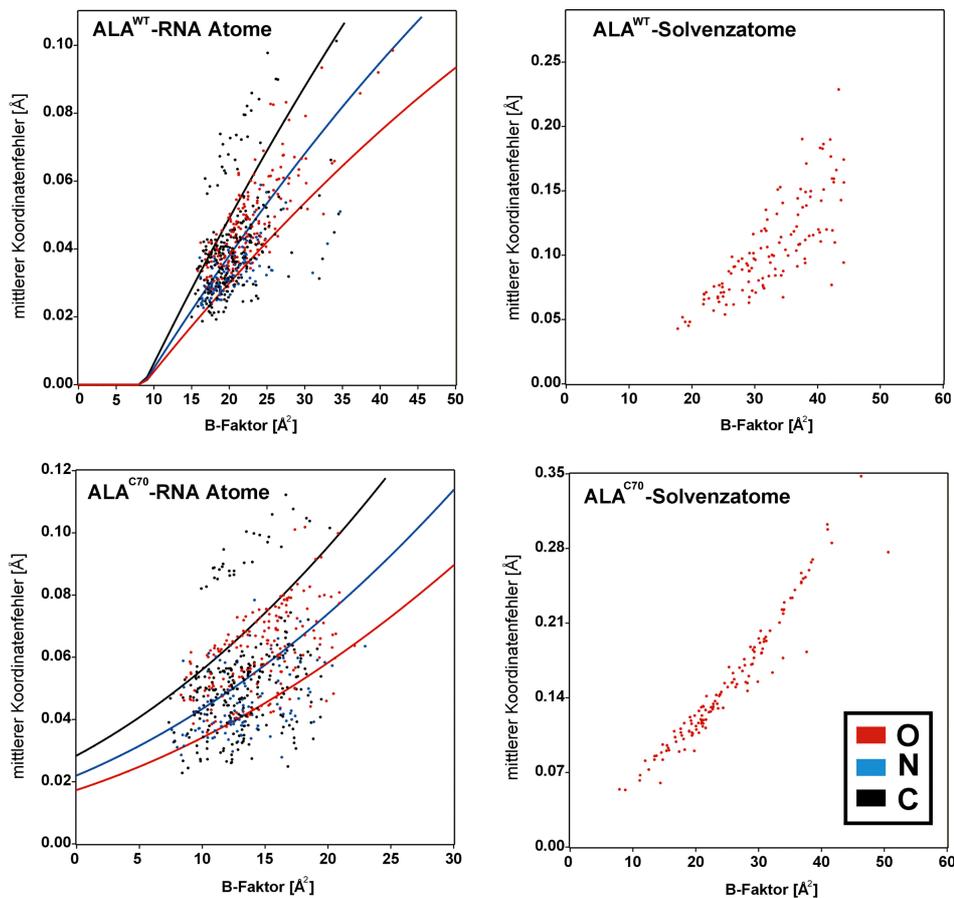


Abb. 3.11 Experimentell ermittelter mittlerer atomarer Koordinatenfehler von ALA^{wt} und ALA^{C70} (Phosphoratome wurden nicht dargestellt). Quadratische Kurven entsprechen der Abschätzung der radialen atomaren Standardabweichung des Koordinatenfehlers (Cruickshank, 1996). Die Diagramme wurden von SHELXPRO (Sheldrick & Schneider, 1997) generiert.

Durch die Verfeinerung der anisotropen Temperaturfaktoren ist eine bessere Anpassung des Strukturmodells an die experimentellen Daten möglich (siehe **Abschnitt 2.9**). **Abb. 3.12** verdeutlicht die durch diese Verfeinerung erzielte Qualität des Strukturmodells. Eine Eigenschaft hochauflöster Kristallstrukturen ist die Unterscheidbarkeit der Atomtypen innerhalb der Elektronendichte nach der Elektronendichteverteilung. Diese Eigenschaft ist exemplarisch für das

Nukleotid U6 von ALA^{wt}-A (siehe **Abschnitt 3.1.4**) in **Abb. 3.12-B** dargestellt worden. Die auf 2.0 σ konturierte (2mFo-DFc)-Elektronendichte umhüllt alle Atome, die 4.0 σ -Dichte jedoch nicht mehr C, die 4.5 σ -Dichte nicht mehr vollständig N und die 7.0- σ Dichte umhüllt lediglich das schwerste Atom P.

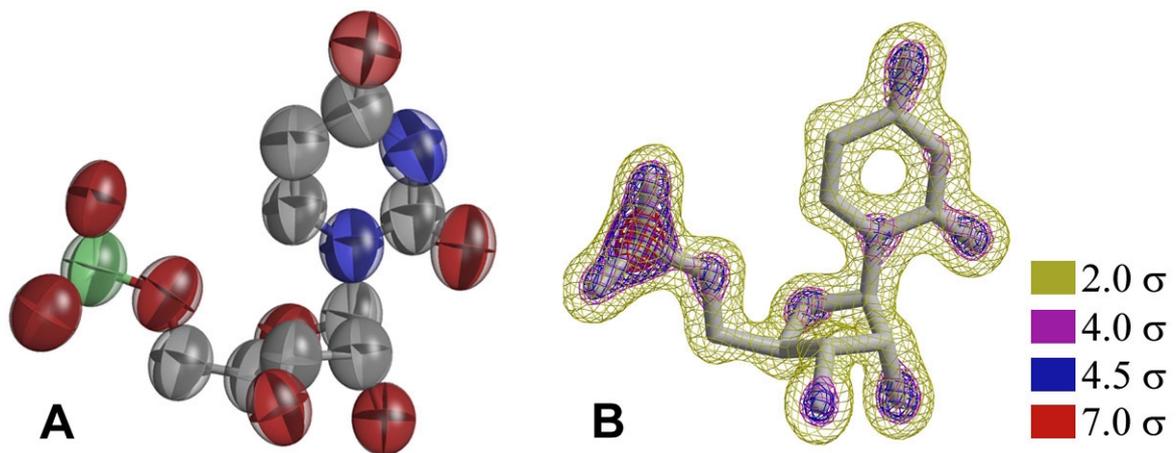


Abb. 3.12 Qualität des verfeinerten Strukturmodells am Beispiel von U6-ALA^{wt}-A. A) Anisotropieellipsoide bei 50% Aufenthaltswahrscheinlichkeit, B) (2mFo-DFc)-Elektronendichte bei unterschiedlicher Konturierung

Die in **Abb. 3.12-A** visualisierten Anisotropieellipsoide des Nukleotids U6, deren Volumina für eine 50-prozentige Aufenthaltswahrscheinlichkeit des entsprechenden Atoms innerhalb des Ellipsoids berechnet wurden, verdeutlichen den Zuwachs an Strukturinformation bei der anisotropen B-Faktorverfeinerung. Da die verfeinerten Strukturmodelle der Zwillingsverfeinerung mit SHELXL durch einen niedrigeren R/R_{free} besser an die experimentellen Daten angepaßt werden konnten und eine bessere Interpretation nach der Dekonvolution der fehlgeordneten Strukturmodelle möglich war, wurden diese für die weitere Auswertung benutzt.

3.1.4. Die Organisation der RNA-Duplexe im Kristallgitter

In jedem untersuchten Fall bauen zwei RNA-Doppelhelices die triklinen Zelle auf. Im weiteren Verlauf der Auswertung werden die beiden Duplexmoleküle mit A und B bezeichnet. Die beiden Moleküle stapeln in einer 3', 5'-Anordnung aufeinander. Dadurch bildet sich eine quasi unendliche Doppelhelix aus, die den Kristall durchläuft (**Abb. 3.13-A**). Diese speziellen Stapelungsbedingungen bedingen auch die Ausbildung eines negativen intermolekularen Twistwinkels von -17.2° (ALA^{wt}) und -16.4° (ALA^{C70}). Daraus resultiert eine Aufweitung der durch die Stapelung zweier

Heptamerduplexe gebildeten großen Furche. Jede den Kristall durchlaufende Doppelhelix wird durch sechs Nachbarhelices, die unterschiedliche Kontakte ausbilden, stabilisiert. Im Falle von ALA^{wt} und ALA^{I-U6} erfolgt eine zusätzliche Stabilisierung durch den Gitterkontakt eines Sr²⁺-Kations mit jeweils zwei O3'-terminalen Ribosen (**Abb. 3.13-B**). Diese zusätzliche, ionische Packungsstabilisierung kann ein Grund für die atomare Auflösung der Diffraktionsdaten sein. Im Falle von ALA^{C70} wird eine ähnliche Kationenstabilisierung nicht beobachtet. Daraus ergibt sich eine im Detail unterschiedliche Kristallpackung.

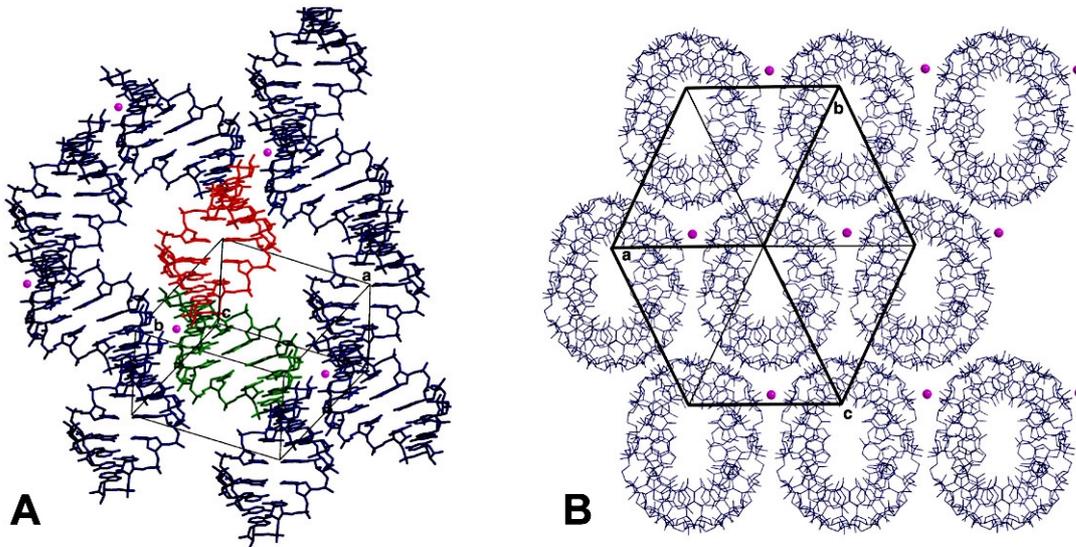


Abb. 3.13 Kristallpackung von ALA^{wt} A) Duplexmoleküle bilden eine quasi-unendliche Doppelhelix im Kristall aus. Die rot und grün gefärbten Duplexe, füllen die triklinische Zelle. B) Eine um 90° gedrehte Darstellung der Packungsstabilisierung durch Sr²⁺-Kationen.

3.1.5. Die Auswertung der globalen Helixparameter

Da das Hauptaugenmerk innerhalb dieser Arbeit auf der Auswertung der Unterschiede der ALA^{wt}- zur ALA^{C70}-Helix liegt, wurde der analoge Vergleich zum isomorphen ALA^{I-U6} nicht konsequent für alle Auswertungen durchgeführt. Der Vergleich der Strukturen des ALA^{wt} zur hochaufgelösten NMR-Struktur der tRNA^{Ala}-Mikrohelix (Ramos & Varani, 1997) bietet die Möglichkeit, Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Strukturbestimmungsmethoden im Hinblick auf die biologische Fragestellung zu diskutieren. Die untersuchte tRNA^{Ala}-Mikrohelix besitzt im Gegensatz zum nativen tRNA^{Ala}-Akzeptorstamm ein G7-C67-Basenpaar mit einer sich anschließenden UUCG-Tetraschleife. Das einzelsträngige -ACCA-3' Ende, ist ebenfalls Bestandteil des Modells. Zum direkten Vergleich wurde aus dem Ensemble von 27 Strukturen, die in der Proteindatenbank unter dem PDB-Eintrag: 1IKD deponiert sind, die zentrale Struktur mit der kleinsten mittleren

"rms"-Abweichung von 1.96 Å von allen anderen Modellen benutzt (LSQMAN, (Kleywegt, 1996). Die "rms" ("root-mean-square")-Abweichung wird als Quadratwurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abstände äquivalenter Atome berechnet.

Alle untersuchten RNA-Heptamere liegen als A-Form RNA vor. Dieser Befund kann durch die Auswertung bestimmter Helixparameter wie helikaler Twist (Ω), Steighöhe pro Basenpaarschritt (Dz), Neigung (η) und X-Verschiebung (dx) im Vergleich zu kanonischer Kalbsthymus A-DNA gezeigt werden (**Tab. 3.8**) Die Definition und Bestimmung der Helixparameter folgt Lavery & Sklenar (1989). Kalbsthymus-DNA liegt ebenfalls in der A-Form vor und wurde mittels Faserdiffraktionsexperimenten strukturell charakterisiert (Chandrasekaran & Arnott, 1989). Die helikale Wiederholungseinheit pro vollständiger Windung umfaßt Werte zwischen 10.91 Basenpaare für ALA^{wt}-A und 11.38 Basenpaare bei ALA^{I-U6}-B. Die mittlere Weite der kleinen Furche entspricht mit Werten zwischen 9.74 Å für ALA^{wt}-A und 10.14 Å für ALA^{wt}-B der Furchengeometrie von ALA^{C70} (9.88 Å (A), 9.81 Å (B)) und der kanonischen A-Form-DNA (11.0 Å). Die Analyse der großen Furche der einzelnen Heptamere ist aufgrund der geringen Basenpaar-Anzahl nicht möglich.

Tab. 3.8 Globale helikale Parameter, die den A-Form Konformationstyp bestimmen

	Twist Ω (°)	Steighöhe Dz (Å)	Neigung η (°)	X-Verschiebung dx (Å)	Slide Dy (Å)
ALA ^{wt} -A	32.99 / 5.75	2.83 / 0.20	8.96 / 1.01	-3.95 / 0.20	-0.19 / 0.45
ALA ^{wt} -B	31.74 / 2.94	2.88 / 0.24	7.63 / 1.36	-3.92 / 0.29	-0.12 / 0.31
ALA ^{I-U6} -A	32.93 / 4.37	2.83 / 0.17	10.87 / 1.70	-4.31 / 0.16	-0.14 / 0.35
ALA ^{I-U6} -B	31.61 / 4.01	2.83 / 0.24	9.63 / 0.83	-4.39 / 0.19	-0.13 / 0.42
ALA ^{C70} -A	32.29 / 2.35	2.91 / 0.11	6.60 / 0.71	-3.86 / 0.23	-0.14 / 0.21
ALA ^{C70} -B	32.59 / 1.33	2.81 / 0.24	10.58 / 0.87	-4.23 / 0.22	-0.10 / 0.26
NMR-Modell	31.97 / 4.45	2.84 / 0.43	16.43 / 5.13	-3.77 / 0.34	0.28 / 0.36
Faser-Modell ¹	32.70	2.55	22.66	-5.14	0.00

Die Parameter wurden mit CURVES 5.0 (Lavery & Sklenar, 1989) durch die globale Auswertung bei Verwendung einer gekrümmten helikalen Achse ermittelt. Es werden die mittleren Größen und ihre Standardabweichungen dargestellt.

1: kanonische A-DNA, Werte wurden experimentell durch Faserdiffraktion von Kalbsthymus DNA ermittelt (Chandrasekaran & Arnott, 1989)

Der Vergleich der mittleren Helixparameter zeigt zusätzlich die generelle Übereinstimmung des kristallographischen Modells mit dem NMR-Modell. Der für das NMR-Modell mit 16.43° erhöhte Wert der Neigung weicht signifikant in Richtung der kanonischen A-Form DNA ab. Dieser Wert besitzt aber mit 5.13° eine für Kristallstrukturen vergleichbar hohe Standardabweichung. Zusätzlich

beschreiben die Autoren der NMR-Studie, bei Auswertung des gesamten Strukturensambles, eine signifikante Abweichung der X-Verschiebung auf Werte um 3 Å (Ramos & Varani, 1997). Die X-Verschiebung beschreibt die Abweichung des geometrischen Schwerpunkts der Basenpaare von der helikalen Achse und beträgt innerhalb der Standard-A-Form-Geometrie 4 Å. Ein Grund dafür kann das Vorhandensein von nur wenigen experimentellen Informationen in Form von Kern-Overhauser Signalen (NOE) sein, die für die Bestimmung der Neigung der Basenpaare zur Helixachse notwendig sind (Ramos & Varani, 1997). Das beschriebene Verhalten des NMR-Modells konnte im Rahmen dieser Arbeit beim Vergleich mit dem kristallographischen Strukturmodell nicht bestätigt werden. Die erhöhten Standardabweichungen des helikalen Twist innerhalb von ALA^{wt} und ALA^{I-U6} und des NMR-Modells deuten auf eine verstärkte Modulation dieses Helixparameters im Vergleich zu ALA^{C70} hin. Das gleiche gilt auch für die Variationsfähigkeit des Slide-Werts, der bezüglich der Variabilität dasselbe Verhalten wie der Twist aufweist.

3.1.6. Der Vergleich der verfeinerten Strukturmodelle durch Superpositionierung

Die Superpositionierung äquivalenter Atome der verfeinerten Duplexe stellt eine weitere Möglichkeit des Vergleichs der Strukturen auf atomarer Ebene dar. Der dabei ebenfalls durchgeführte Vergleich der Moleküle A und B, derselben asymmetrischen Einheiten erlaubt Aussagen über die Flexibilität identischer Moleküle in Bezug auf einen unterschiedlichen Kristallpackungskontext. Die iterative Superpositionierung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde mit dem Programm LSQKAB (CCP4, 1994) unter Verwendung aller äquivalenter Atome durchgeführt. In Tab.3.9 sind die mittleren Abweichungen der Atomkoordinaten nach erfolgter Konvergenz des Anpassungsprozesses aller verglichenen Helices zusammengefaßt.

Tab. 3.9 Rms-Abweichungen äquivalenter Atome superpositionierter Moleküle

rmsd (Å)	ALA ^{wt} -A	ALA ^{wt} -B	ALA ^{I-U6} -A	ALA ^{I-U6} -B	ALA ^{C70} -A	ALA ^{C70} -B	NMR-Modell
ALA ^{wt} -A		0.883	0.181	0.944	0.629	0.653	1.298
ALA ^{wt} -B			0.798	0.232	0.817	0.695	1.342
ALA ^{I-U6} -A				0.875	0.589	0.583	1.271
ALA ^{I-U6} -B					0.880	0.775	1.366
ALA ^{C70} -A						0.458	1.395
ALA ^{C70} -B							1.349

Trotz der Zugehörigkeit aller Heptamere zum A-Konformationstyp und der daraus resultierenden allgemeinen Übereinstimmung aller verglichenen Strukturen sind durch diese Untersuchung interessante Aussagen möglich. So unterscheiden sich die Moleküle A und B, die derselben asymmetrischen Einheit zugeordnet werden, relativ stark voneinander. Die rmsd-Werte betragen bei ALA^{wt} (0.883 Å) und ALA^{I-U6} (0.875 Å) und sind damit größer als bei ALA^{C70} (0.458 Å). Ein Grund dafür ist die Sr²⁺-Wechselwirkung, die nur bei ALA^{wt}-A und ALA^{I-U6}-A bei der Wechselwirkung mit A7 und C72 über einen Kristallkontakt stattfindet. Damit ist die Doppelhelix A stärker fixiert als das vergleichbare Molekül B. Die größten dabei beobachteten Abweichungen treten beim Vergleich der Koordinaten von G68 bis U66 auf. Die auftretenden Unterschiede gleichartiger Moleküle sind ein Hinweis auf die hohe Flexibilität dieser kompakten Strukturen.

Die kleinsten Abweichungen treten, wie erwartet, bei der Überlagerung der ALA^{wt} und ALA^{I-U6} Duplexe (A-A 0.181 Å, B-B 0.232 Å) auf (**Abb. 3.14-A**). Dieses Ergebnis spiegelt die Isomorphie der Kristalle wieder, die ja eine Voraussetzung der Strukturlösung durch die SIRAS-Methode darstellt (siehe **Abschnitt 3.1.2.2**). Der rmsd-Wert der Überlagerung des iodierten U6 mit dem unmodifizierten U6 von den Molekülen A ist mit 0.336 Å fast doppelt so groß wie die mittlere Abweichung der Gesamtstruktur. Der Einfluß der Schweratom-Substitution auf die Gesamtstruktur des Duplexes ist aber vernachlässigbar klein. Die Superpositionierung der ALA^{wt}-Heptamere zu den beiden ALA^{C70}-Heptameren weist kleinere (0.629 Å A-A) bis etwa gleich große rmsd-Werte (0.817 B-A), verglichen mit den packungsbedingten Abweichungen beim Vergleich identischer Heptamere, auf (**Abb. 3.14-B+C**). Die größten Unterschiede treten im Bereich von G3-U/C70 aufgrund der sich durch die C70-Mutation veränderten Basenpaarung auf. Auf der Basis dieser Analyse kann man also lediglich die Beeinflussung der lokalen Struktur im Bereich der Mutation feststellen. Die Beeinflussung der globalen Helixstruktur ist durch die Insertion des G3•U70-Basenpaars in den Watson-Crick Basenparkontext nicht feststellbar. Dieses Ergebnis unterstützt damit die Hypothese der direkten Erkennung der AlaRS (Hou & Schimmel, 1988), durch

lokalisierte, strukturelle Signale des "wobble"-Basenpaars (Mueller *et al.*, 1999). Der Vergleich aller Kristallstrukturen mit dem tRNA^{Ala}-MikroheliX NMR-Modell führt zu rmsd-Werten von 1.271 Å-1.395 Å (Abb. 3.14-D). Es liegt eine generelle Übereinstimmung der Helixgeometrien (A-Form Doppelhelix) vor. Die Größe der Abweichungen der überlagerten Strukturmodelle liegt im selben Bereich wie die Abweichung der Strukturen innerhalb des NMR-Strukturensembles. Die strukturellen Hauptunterschiede begründen sich hauptsächlich durch die unterschiedlichen experimentellen Randbedingungen wie Datenbasis, Methode der Anpassung der Daten an das Strukturmodell wie auch in den verwendeten "constraints" bei der NMR-Strukturlösung.

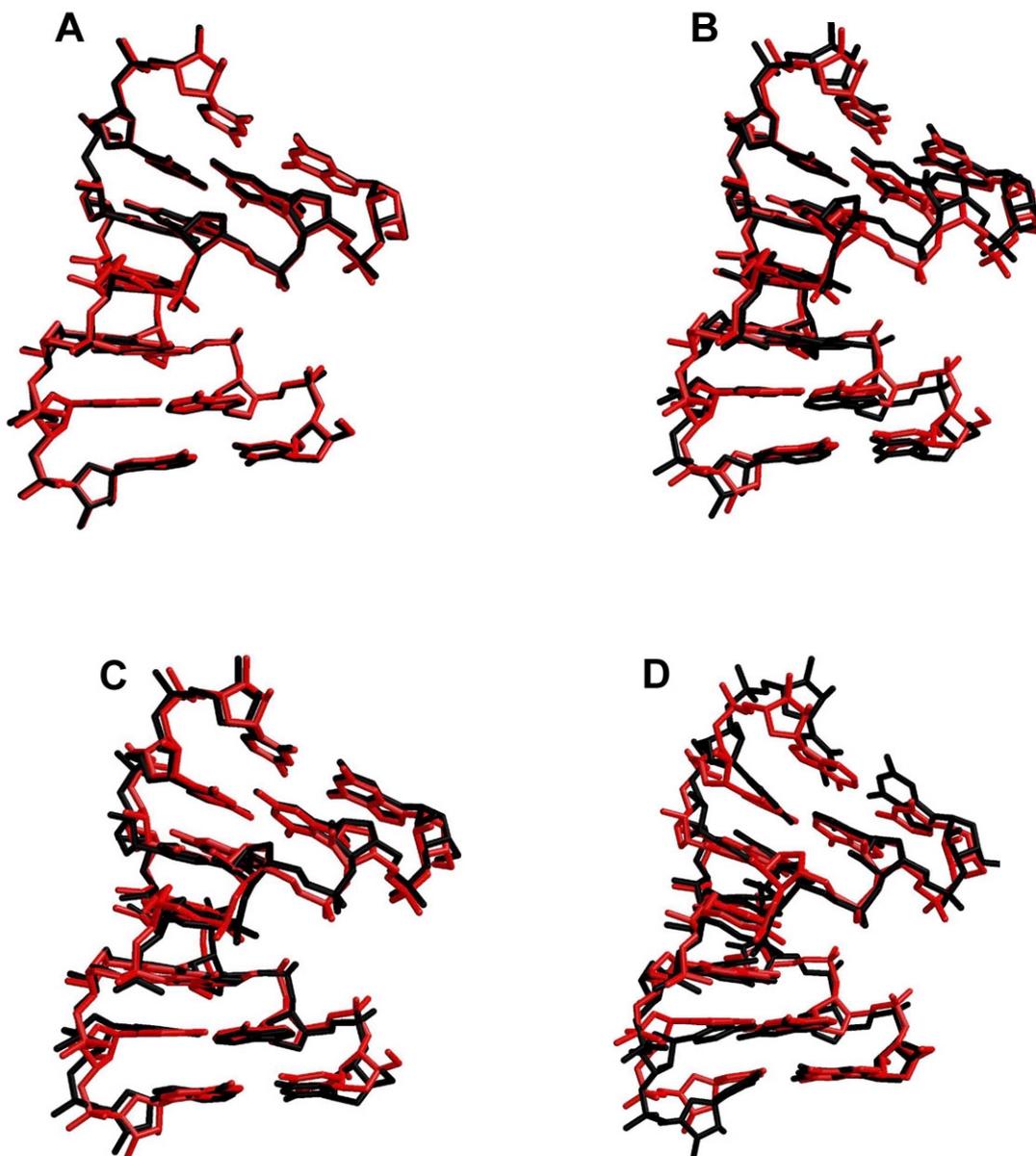


Abb. 3.14 Die Superpositionierungen verschiedener Heptamerstrukturen. A) ALA^{wt}-A mit ALA^{I-U6}-A, B) ALA^{wt}-A mit ALA^{wt}-B, C) ALA^{wt}-A mit ALA^{C70}-A, D) ALA^{wt}-A mit tRNA^{Ala}-MikroheliX (rot ALA^{wt}-A)

3.1.7. Vergleich der sequenzabhängigen helikalen Parameter

Im Gegensatz zum Faserdiffraktionsexperiment von doppelhelikalen Nukleinsäuren (Chandrasekaran & Arnott, 1989) bietet die Kristallstrukturanalyse die Möglichkeit der Bestimmung von helikalen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Sequenz des Oligonukleotids. Von besonderem Interesse ist hierbei die Untersuchung der möglichen Beeinflussung der A-Konformation durch die Insertion des G3•U70 "wobble"-Basenpaars. Dazu wurden alle relevanten helikalen Parameter der ALA^{wt} und ALA^{C70} Strukturen verglichen (Definitionen siehe Lavery & Sklenar (1989)). Durch das Vorhandensein von jeweils zwei unabhängig verfeinerten Kopien in der asymmetrischen Einheit ist es möglich, die Signifikanz der Sequenzabhängigkeit bei der Änderung helikaler Parameter zu bestimmen. Dazu wurden Korrelationskoeffizienten für den sequenzabhängigen Verlauf der helikalen Parameter identischer Moleküle berechnet. Konvergiert dieser Wert gegen 1.0, dann kann der Verlauf eines Parameters mit der sich gleichmäßig ändernden Sequenz in Bezug gebracht werden. Eine signifikante Abweichung des Koeffizienten von 1.0 bedeutet aber eine sequenzunabhängige Variation dieses Werts oder zum Beispiel eine Überlagerung dieser Eigenschaft durch Kristallpackungseigenschaften.

Das G3•U70-Basenpaar beeinflusst die Form der Doppelhelix nur sehr wenig. Die meisten helikalen Parameter variieren im Bereich der Werte typischer A-Form (Saenger, 1984). Es konnte lediglich eine Modulation des helikalen Twist und des Slide-Werts festgestellt werden. Konkret findet bei ALA^{wt} eine Unterwindung der Helix am Basenpaarschritt G2C71/G3U70 mit Werten von 23.5° (A) und 26.9° (B), im Vergleich zum Twist-Winkel der Kalbsthymus A-DNA von 32.7° (**Tab. 3.8**), statt. Diese Störung der A-Form Geometrie wird im nachfolgenden Schritt G3U70/G4C69 durch eine Überwindung der Helix mit Werten von 41.5° (A) und 35.8° (B) relaxiert. Der Slide-Wert ist mit dem helikalen Twist korreliert und zeigt daher denselben Verlauf. Der Vergleich mit ALA^{C70} bestätigt, daß diese Modulation des helikalen Twists (**Abb. 3.15**) durch G3•U70 induziert ist. Diese Eigenschaft des G•U "wobble"-Basenpaars kann durch die Versetzung der U70-Base in Richtung der großen Furche bei der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zu G3 verstanden werden. Die sich damit verringernde Überlappung aufeinander stapelnder Basen wird durch die Twist-Modulation ausgeglichen (**Abb. 3.15-A+B**). Diese Eigenschaft wurde im Rahmen von hochaufgelösten kristallographischen Studien an A-RNA und A-DNA Oligonukleotiden mit G•U- bzw. G•T-Basenpaaren beobachtet (Kneale *et al.*, 1985; Rabinovich *et al.*, 1988; Biswas *et al.*, 1997). Der helikale Twist des NMR-Modells der tRNA^{Ala}-Mikrohelix zeigt mit 25.7° und 39.3° ein

ähnliches Verhalten, obwohl dieses Ergebnis der Auswertung einer Einzelstruktur bei der Analyse der Gesamtheit nicht relevant ist (Ramos & Varani, 1997).

Die beschriebene Änderung des helikalen Twists stellt eine lokale Variation der A-Form dar. Es ist aber nicht sehr wahrscheinlich, daß dieses sehr schwache Signal, welches durch die erhöhte Flexibilität in Lösung weiter gedämpft werden könnte, für die spezifischen AlaRS Erkennung ausschlaggebend ist. Globale Änderungen der Helixgeometrie werden durch das "wobble"-Basenpaar also nicht induziert.

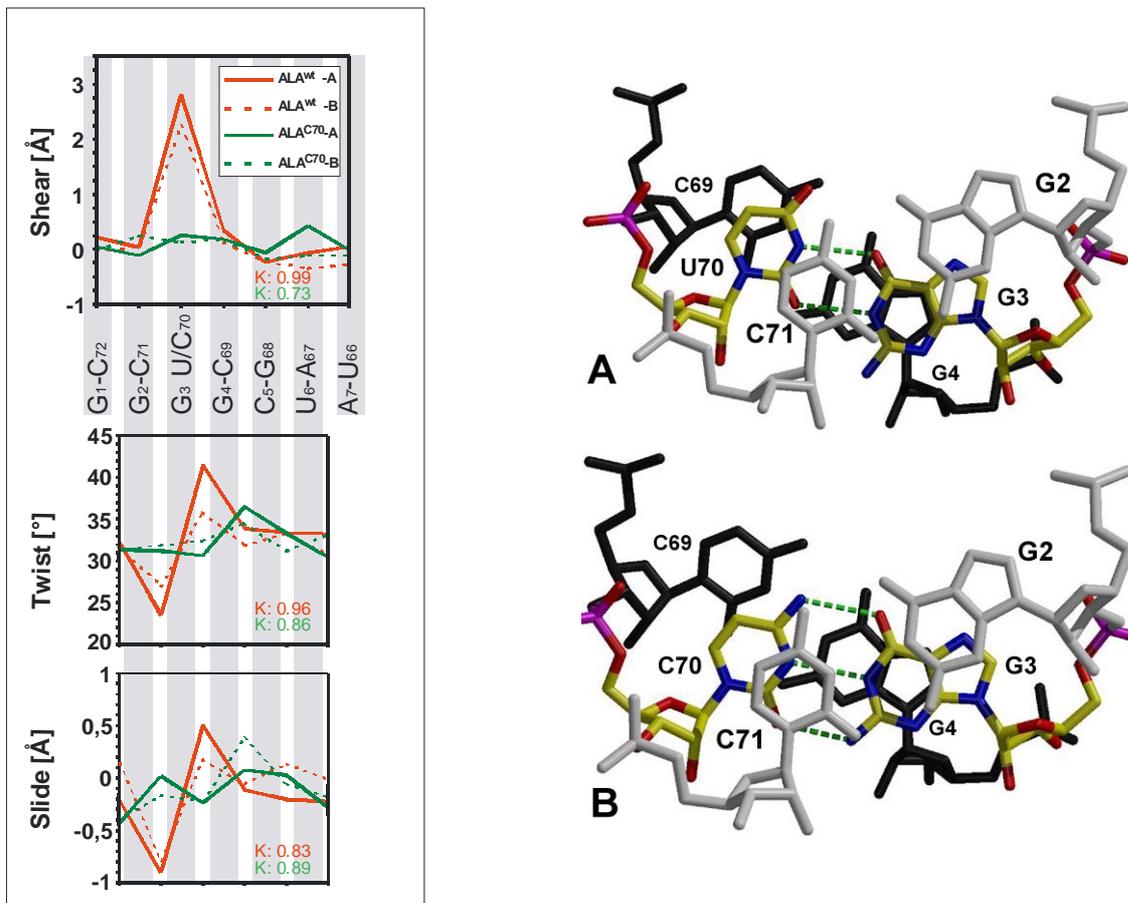


Abb. 3.15 Auswirkungen der Insertion des G•U-Basenpaares Links: Einfluß des G3•U70-Basenpaares auf die Helixgeometrie (K : Korrelationskoeffizient) Rechts: Basenpaarstapelung von G2-C71 - G4-C69 bei A) ALA^{wt}, B) ALA^{C70}

3.1.8. Zuckerwellung und Torsionswinkel des Phosphatrückgrats

Bei der Auswertung der Konformationen des Phosphatrückgrats und der Zuckerwellung der Ribosen wurde das Hauptaugenmerk auf auffällige Abweichungen von der A-Form und den Vergleich von ALA^{wt} zu ALA^{C70} gelegt. Die Torsionswinkel sind wie allgemein üblich (Saenger,

1984) definiert. Alle untersuchten Torsionswinkel des Phosphatrückgrats liegen im Bereich der kanonischen A-Form. Weder die Auswertung der in **Tab. 3.10** dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen noch die sequenzabhängigen Größen zeigen eine vom G3•U70-Basenpaar ausgehende Abweichung von der Standard-A-Form. Die unterschiedlich großen Standardabweichungen der Torsionswinkel resultieren aus auflösungsbedingten Unterschieden bei der Verfeinerung dieser Größen. Sie sind bei ALA^{C70} größer als bei der höher aufgelösten ALA^{wt}-Struktur. Bemerkenswert ist aber die Tatsache, daß bei allen mit SHELXL-97 durchgeführten Verfeinerungen die spezielle Möglichkeit der Definition von "similarity restraints" ohne eine explizite Vorgabe von A-Form Zielwerten für die Torsionswinkel verwandt wurde. Hierbei werden vergleichbare Torsionswinkel des Polyphosphats in relativ weiten Fehlergrenzen miteinander korreliert. Die Anwendung dieser weichen "restraints" führt zu einer besseren Konvergenz der Verfeinerung der Strukturen. Die Torsionswinkel α , ζ liegen im (-)gauche-Bereich, β/ϵ und χ liegen im (+)trans/(-)trans-Bereich, γ und δ befinden sich im (+)gauche-Konformationsbereich. Im Rahmen der Beschreibung des tRNA^{Ala}-MikroheliX NMR-Modells wurde eine signifikante Besetzung der Konformere des Phosphatrückgrats von G3 für $\alpha/\beta/\gamma$ von trans/trans/trans (all-trans) beschrieben. Dadurch verschiebt sich das G3-Phosphoratom um 0.8 Å von der Idealgeometrie. Die Autoren interpretieren diese Eigenschaft als mögliches Erkennungssignal der AlaRS (Ramos & Varani, 1997). Obwohl die all-trans Konformation energetisch möglich ist und gelegentlich beobachtet wird (Heinemann *et al.*, 1987; Shakked, 1991; Wahl & Sundaralingam, 1997; Mueller *et al.*, 1998), ist sie innerhalb von ALA^{wt} keine notwendige Bedingung zur Stabilisierung des G3•U70-Basenpaars. Die Unterschiede der bei der NMR-Studie betrachteten tRNA^{Ala}-MikroheliX zum kristallinen ALA^{wt}, erklären ebenfalls nicht die Notwendigkeit der Besetzung der all-trans Konformation im Bereich von G3•U70.

Tab. 3.10 Torsionswinkel und Standardabweichungen des RNA-Rückgrats und der Ribosen von ALA^{wt} und ALA^{C70}

	α (°)	β (°)	γ (°)	δ (°)	ϵ (°)	ζ (°)	χ (°)	P (°)
ALA ^{wt} -A	-68.3 3.8	174.4 7.4	54.2 4.6	78.7 3.4	-152.7 6.1	-68.3 6.2	-162.7 5.2	11.2 5.1
ALA ^{wt} -B	-70.3 8.5	174.7 5.13	55.4 7.3	76.7 4.0	-154.2 4.0	-66.8 6.6	-162.1 5.1	11.4 4.9
ALA ^{C70} -A	-65.5 14.9	173.2 9.6	56.9 11.3	80.5 7.0	-150.1 10.3	-74.8 9.8	-164.4 7.7	19.4 12.1
ALA ^{C70} -B	-66.8 16.3	173.3 9.3	56.9 13.9	81.0 7.1	-150.3 11.9	-75.2 9.5	-165.4 7.9	15.0 10.2
Faser-Modell ¹	-52	175	42	79	-148	-75	-157	7.5

Die Parameter wurden mit CURVES 5.0 (Lavery & Sklenar, 1989) ermittelt. Es werden die mittleren Größen und ihre Standardabweichungen dargestellt.

1: kanonisches A-DNA Modell (Chandrasekaran & Arnott, 1989)

Der N-glykosidische Torsionswinkel χ zeigt eine sequenzunabhängige Verteilung mit Werten von -162.1° bis -165.4° , die einer anti-Konformation entsprechen. Im Einklang steht damit die C3'-endo-Konformation aller Ribosen mit mittleren Pseudorotationsphasen P von 11.2° bis 19.4° . Eine Abweichung von der anti-Konformation würde auch eine C2'-endo Zuckwellung bedingen, da der sonst entstehende Kontakt der Basenatome mit den Riboseatomen O4' und C5' zu einer stereochemisch ungünstigen Wechselwirkung führen würde (Saenger, 1984). Die einzige Ausnahme bilden die G1-Ribose von ALA^{wt}-A und ALA^{C70}-B, die sich im C2'-exo Bereich mit $P = -1.9^\circ$ und -4.1° befinden. Diese konformationelle Abweichung von der bevorzugten C3'-endo Geometrie ist aber nur geringfügig. Grund hierfür kann die erhöhte Flexibilität der terminalen Ribosen sein. Die N-glykosidische Bindungen von G1 von ALA^{wt}-A und ALA^{C70}-B sind davon unbeeinflusst in der anti-Konformation ($\chi = -172.2^\circ$ und -179.1°). Alle Ribosen des NMR-Modells entsprechen ebenfalls dem C3'-endo-Konformationstyp. Innerhalb einer vorangegangenen NMR-Studie einer ALA^{wt}-Mikrohelix mit -ACCA-3' Ende wurde eine Änderung der U70 Zuckerwellung nach C2'-endo beschrieben (Limmer *et al.*, 1996).

Zusammenfassend läßt sich weder eine spezifische Veränderung der ALA^{wt}-Struktur vom Standard-A-Konformationstyp noch von der Struktur des ALA^{C70} feststellen. Das G3•U70-Basenpaar kann damit also ohne Beeinflussung des Polyphosphatrückgrats und damit der globalen Helixgeometrie in die Doppelhelix mit Watson-Crick-Basenpaarung eingepaßt werden.

3.1.9. Die Struktur des G3•U70 und des G3-C70-Basenpaars

Die Untersuchung der Unterschiede zwischen ALA^{wt} und ALA^{C70} unter Betrachtung der Gesamtstruktur der RNA-Duplexe hat zu keiner ausreichenden Beantwortung der Frage nach der spezifischen Erkennung des ALA^{wt} durch die AlaRS geführt. Daraus folgert eine mögliche Fixierung des Erkennungssignals im Mutationsbereich, welches die Hypothese der direkten Erkennung des G3•U70-Basenpaars unterstützten würde (siehe **Abschnitt 1.1.3**). Als Teil dieser Arbeit konnten vier voneinander unabhängige G•U- und zwei G-C-Basenpaare innerhalb derselben helikalen Umgebung untersucht werden. Alle G•U-Basenpaare zeigen die bekannte "wobble"-Konformation. Der Hauptunterschied zum Watson-Crick G-C-Basenpaar liegt in der Versetzung der Uracil-Base in Richtung der großen Furche (Saenger, 1984) mit einer Versetzung "shear" von 2.8 Å für ALA^{wt}-A und 2.2 Å für ALA^{wt}-B in Bezug auf den Purinring von G3. Diese Versetzung wird energetisch durch die Ausbildung von zwei direkten Uracil-Guanin Wasserstoffbrückenbindungen zwischen (G)O6—N3(U) und (G)N1—O2(U) stabilisiert. Daraus folgt die Exposition der freien, exozyklischen (G)N2-Aminogruppe in der kleinen Furche mit dem Potential zur Ausbildung von zwei zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen. (G)N2 bindet ein Wassermolekül, welches eine durch die "wobble" Konformation geschaffene Kavität innerhalb der kleinen Furche besetzt und weitere Wechselwirkungen zu (U)O2 und (U)O2' eingeht. Durch die starke Fixierung dieses Wassers nimmt der dazugehörige isotrope B-Faktor ungewöhnlich niedrige Werte von 18.7 Å² bzw. 21.9 Å² an, die mit Werten kovalent gebundener Atome vergleichbar sind. Tatsächlich findet diese Wechselwirkung bei allen G•U-Basenpaaren, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, statt (**Abb. 3.16**). Zusätzlich wurde diese Wasserkoordination in verschiedenen hochaufgelösten Kristallstrukturen von Doppelhelices mit G•U-Basenpaaren beobachtet (Sussman *et al.*, 1978; Westhof, 1987; Holbrook *et al.*, 1991; Cruse *et al.*, 1994; Biswas *et al.*, 1997). Aufgrund des universellen Auftretens dieses speziellen Wassermoleküls muß es als integraler Bestandteil des G•U-Basenpaars betrachtet werden.

Die zweite mögliche Wechselwirkung der in die kleine Furche ragenden (G)N2-Aminogruppe findet in beiden Fällen zu einem O2' Atom eines symmetrieverwandten RNA-Moleküls statt. Die durch die "wobble"-Basenpaarung lösungsmittel-exponierte exozyklische Aminogruppe von G3 wird im Kristall durch Wasserstoffbrückenbindungen vollständig abgesättigt. Diese Beobachtung verdeutlicht das extrem hohe Wechselwirkungspotential der entsprechenden solvens-exponierten Aminogruppe. Daraus kann auf eine mögliche spezifische Wechselwirkung dieser Aminogruppe mit Proteinseitenketten bei der Erkennung durch die AlaRS geschlossen werden. Ribas de Pouplana *et al.* (1998) untersuchten die monomere Form der AlaRS aus *E. coli* durch Mutation

hochkonservierter Aminosäuren. Die Einzelmutation von N285A und R314A führten immer zum Verlust der Bindung der AlaRS an die vollständige tRNA^{Ala}. Für die Wechselwirkung mit (G)N3 und der G(N2)-Aminogruppe käme daher R314 in Frage, dessen Position innerhalb eines α -helikalen, oberflächenexponierten Bereichs angenommen wird. Die Wechselwirkung der G•U-abhängigen Solvensstruktur beim Erkennungsprozess durch die AlaRS kann ebenfalls angenommen werden. Die Störung der auf das hochkonservierte Wassermolekül, welches die Kavität der "wobble"-Konformation in der kleinen Furche ausfüllt, aufbauende Solvationsnetzwerkes in der kleinen Furche, führt ebenfalls zum Verlust der AlaRS-Aktivität. Darauf konnte im Rahmen einer *in vitro*-Studie durch den Vergleich der Aktivität einer Wildtyp-Minihelix zu einer G4•U70 Punktmutante geschlossen werden (Henderson *et al.*, 1998).

Im Bereich der besser zugänglichen großen Furche binden im Falle von ALA^{wt}-A und -B zwei Wassermoleküle an das G3•U70-Basenpaar. Diese binden an (U)O4, (G)O6 und (G)N7 und interagieren ebenfalls untereinander. Somit wird der Verlust an direkten Basenpaarwechselwirkungen durch die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich der kleinen und großen Furche kompensiert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Annahme einer helikalen Destabilisierung durch das G3•U70-Basenpaar, welche die Flexibilität des Akzeptorstamms erhöhen und damit als ein mögliches Erkennungssignal bei der AlaRS-Erkennung dienen kann, nicht unmittelbar bestätigt werden. MD-Simulationen ordnen die Stabilität von hydratisierten G•U-Basenpaaren analog der Stabilität von A-U und etwas geringer als G-C-Basenpaare ein (Auffinger & Westhof, 1998).

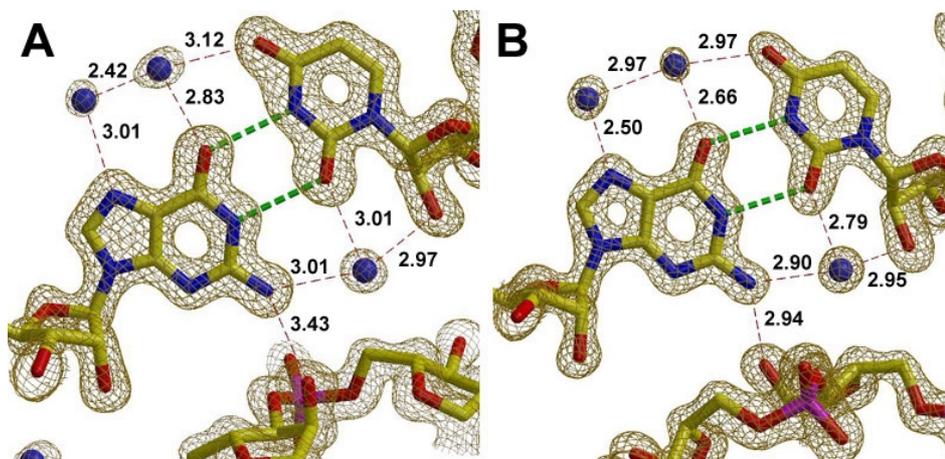


Abb. 3.16 Die Struktur des G3•U70-Basenpaars von ALA^{wt} mit spezifischer Wasserkoordination. (2mFo-DFc)-Elektronendichte bei 1.2 σ konturiert. A) ALA^{wt}-A, B) ALA^{wt}-B

Die Struktur des G3-C70-Basenpaar entspricht dem normalen Watson-Crick-Basenpaarungsmuster mit drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen (G)O6—(C)N4, (G)N1—(C)N3 und (G)N2—(C)O2. Durch Einbeziehung der exozyklischen Aminogruppe (G)N2 in die Basenpaarung wird ihre Solvenszugänglichkeit verringert. Es bildet sich eine mit 3.04 Å lockere Wasserstoffbrückenbindung zu einem Netzwerk von koordinierten Wassermolekülen in der kleinen Furche aus. Dieses Netzwerk besteht bei ALA^{C70}-A aus drei Wassermolekülen und wechselwirkt mit (G)O2', (G)N3, (G)N2, (C)O2, (C)O2' und jeweils miteinander. Es findet aber keine Stabilisierung der G3-C70-Basenpaars über einen intermolekularen Kontakt zu anderen RNA-Molekülen statt. Bei ALA^{C70}-B ist im Bereich von G3-C70 keine Population von wechselwirkenden Wassermolekülen festzustellen. Im Bereich der großen Furche findet ebenfalls eine für ALA^{C70}-A und -B unterschiedliche Besetzung der freien Wechselwirkungsstellen (C)N4, (G)O6 und (G)N7 mit Wassermolekülen statt. Zusammenfassend verfügt das G3-C70-Basenpaar durch seine intrinsische Stabilisierung über ein eine kleinere Anzahl konservierter Wassermoleküle. Die im Vergleich zum G3•U70-Basenpaar verlorengegangene Exposition funktioneller Gruppen innerhalb solvens- und proteinzugänglicher Bereiche der kleinen Furche, kann ein Grund des Verlustes der AlaRS-Aktivität dar.

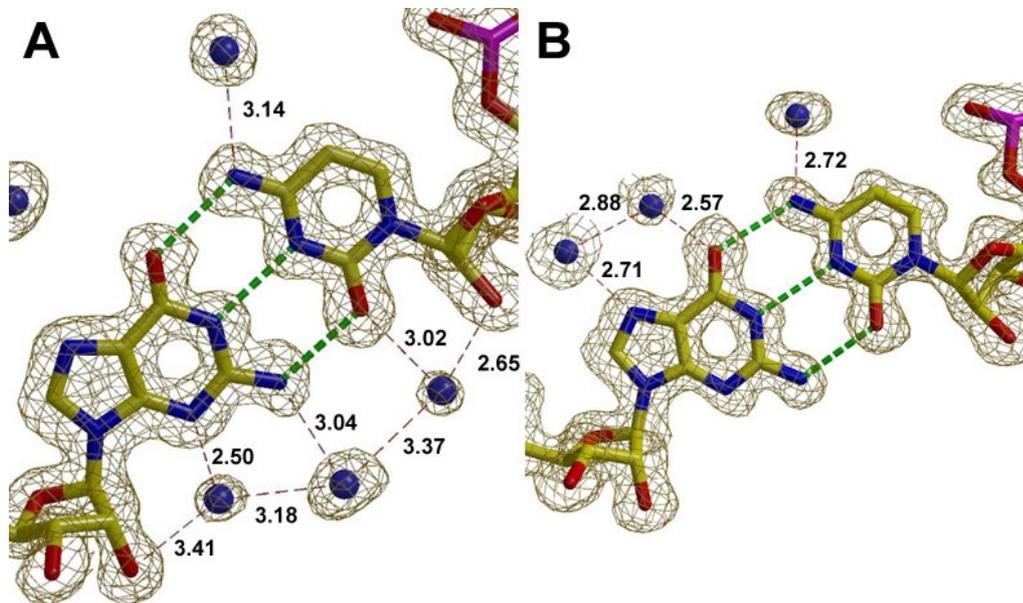


Abb. 3.17 Die Struktur des G3-C70-Basenpaar von ALA^{C70} mit spezifischer Wasserkoordination. (2mFo-DFc)-Elektronendichte bei 1.5 σ konturiert. A) ALA^{C70}-A, B) ALA^{C70}-B

3.1.10. Solvens- und Kationenstruktur bei atomarer Auflösung

Die bei der Strukturanalyse des tRNA^{Ala}-Akzeptorstamms erzielte atomare Auflösung stellt eine ausgezeichnete Möglichkeit zur detaillierten Analyse der Hydratisierungseigenschaften und Kationenbindung an RNA dar. Die elektrostatisch hochgeladenen Nukleinsäuremoleküle werden durch Wasserinteraktionen, sowie die Wechselwirkung mit hydratisierten Kationen stabilisiert, und somit wird die Bildung von Doppelhelices ermöglicht. Im Vergleich zur DNA besitzt RNA durch die zusätzliche C2'-OH Gruppe der Ribose mehr Möglichkeiten der Wechselwirkung mit Wassermolekülen. Innerhalb der asymmetrischen Einheit von ALA^{wt} konnten 155 Wasserpositionen ermittelt werden. 7 Wassermoleküle besitzen eine 50% Besetzungswahrscheinlichkeit. Der mittlere isotrope B-Faktor beträgt 34.4 Å² und variiert mit Werten zwischen 12.0 und 56.3 Å². Bei der Beschreibung der Struktur von ALA^{C70} wurden 132 Wasserpositionen ermittelt ($\langle \text{Biso} \rangle = 24.7 \text{ \AA}^2$, Min.-, Max.-B. 8.2 und 49.6 Å²). Auf die Beschreibung der vergleichbaren Solvensstruktur von ALA^{I-U6} wird im Weiteren wegen der Redundanz zu ALA^{wt} verzichtet. Wassermoleküle ordnen sich bevorzugt im Bereich des Phosphatrückgrats an. Die dort möglichen Wechselwirkungen mit O_xP, 2'OH, O3', O5' und O4' führen zu einer Abschirmung der Phosphatanionen und über verbrückende Wechselwirkungen zu stabilisierenden Kristallkontakten mit Nachbarmolekülen. Innerhalb von ALA^{wt}/ALA^{C70} konnten 89/71 Moleküle diesem Bereich zugeordnet werden. Die auf der Grundlage einer durchgeführten Kontaktanalyse (Programm CONTACT (CCP4, 1994)) ermittelte Zuordnung, entspricht dem Wechselwirkungspartner mit geringsten Abstand. Durch Kristallkontakte besteht aber die praktische Möglichkeit der Zugehörigkeit eines Lösungsmittelmoleküls zu unterschiedlichen Bereichen von symmetrieverwandten RNA-Molekülen. Neben der stärksten Besetzung des Phosphatrückgrats, koordiniert Wasser ebenfalls an Atome der schmalen und tiefen großen Furche von ALA^{wt}/ALA^{C70} mit 25/12 und an Atome der weiten und seichten kleinen Furche von ALA^{wt}/ALA^{C70} mit 7/12. In **Abb. 3.18** ist die prozentuale Besetzungshäufigkeit spezifischer Wasserkoordinationen innerhalb der Furchen der A-Form RNA für alle Basenpaare von ALA^{wt}/ALA^{C70} dargestellt. Die schematisch dargestellten, sequenzabhängigen Bindungsbereiche basieren auf einer Analyse hochauflösender RNA Kristallstrukturen (Auffinger & Westhof, 1998).

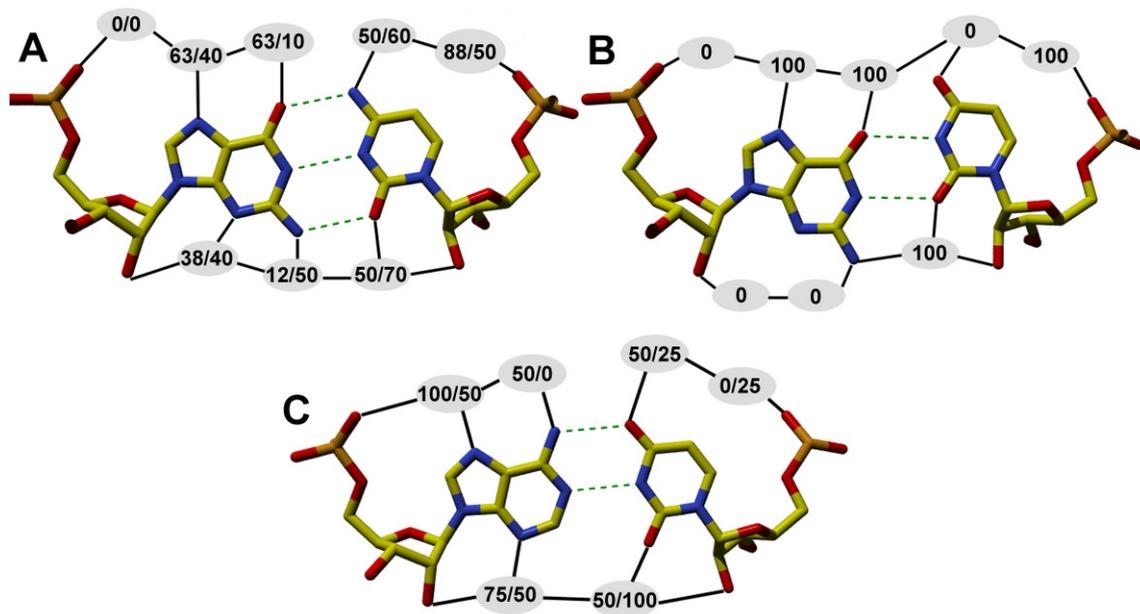


Abb. 3.18 Besetzung spezifischer Koordinationsstellen in der kleinen und großen Furche. Auswertung aller ALA^{wt}/ALA^{C70}-Basenpaare und Darstellung der prozentualen Besetzung für A) G-C, B) G•U (kommt innerhalb von ALA^{C70} nicht vor), C) A-U

Bedingt durch die Planarität der Basenpaare, liegen die dargestellten Hauptkoordinationsstellen ebenfalls innerhalb dieser Ebene. Die große Furche bietet mehr mögliche Koordinationsstellen als die kleine Furche. Die Häufigkeit der Besetzung der Stellen ist in beiden Furchen gleich groß. Grund hierfür ist die hohe Auflösung der Datensätze bei einer Strukturanalyse bei 100K, die ein "Ausfrieren" energetisch vergleichbarer Anordnungen bewirken kann. Die Stärke der Wasserbindung, die in erster Näherung mit der prozentualen Besetzung dieser Stellen korreliert werden kann, hängt von mehreren Faktoren ab. Das G-C-Basenpaar wird gegenüber dem A-U-Basenpaar durch eine zusätzliche Watson-Crick-Basenpaarwechselwirkung stärker stabilisiert. Trotz dieser Tatsache erfolgt die Wasserbesetzung von A-U vollständiger als bei G-C. Ein Grund kann die unterschiedliche Anzahl der Einzelbeobachtungen der beiden Basenpaare sein. Der Vergleich von A-U mit G•U zeigt eine höhere Konservierung der Wasserkoordination des "wobble"-Basenpaars in der kleinen Furche, durch die zusätzliche Wechselwirkung der (G)N2-Aminogruppe. Innerhalb der großen Furche ist ein ähnliches Verhalten durch das im Falle von G•U freie U(O4) Atom zu finden. Die Notwendigkeit der Wasserkoordination bei G•U zur Stabilisierung der Struktur wird durch die hohe Konservierung der Besetzung untermauert.

Im Falle von ALA^{wt} und ALA^{I-U6} wird das Kristallgitter durch eine noch nicht beobachtete Komplexierung eines Sr²⁺-Kations an die O3'-terminalen Bereiche A7 und C72 von Molekül A über

Symmetriekontakte stabilisiert. Die Wechselwirkung, findet unter Einbeziehung der cis-diolischen Ribosefunktionen statt (**Abb. 3.19**).

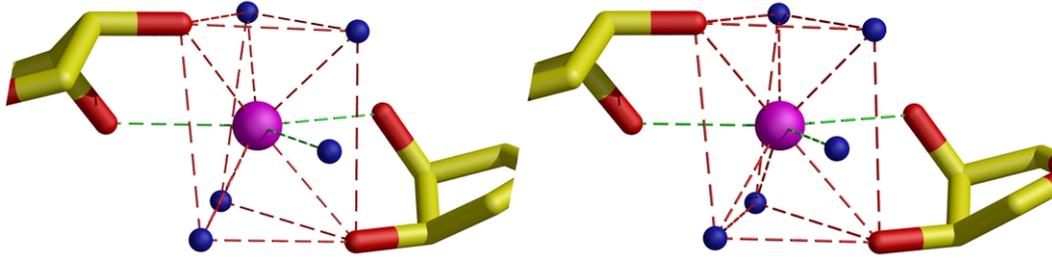


Abb. 3.19 Stabilisierung des Kristallgitters von ALA^{wt} durch Sr²⁺ bei der intermolekularen Wechselwirkung an O3'-terminalen Bereichen der Moleküle A

Eine vergleichbare Wechselwirkung wird durch Os(VI) bei der Bindung von OsO₃(Pyridin)₂ an eine cis-diolische Ribosefunktion der tRNA^{Phe} aus Hefe beschrieben (Jack *et al.*, 1977). Im Falle der Sr²⁺-Bindung koordinieren 9 Sauerstoffatome, wobei 4 durch die beiden Hydroxylgruppen und 5 weitere Atome durch Wassermoleküle bereitgestellt werden, an das Kation. Sie bilden ein leicht verzerrtes, trigonales Prisma (rot gestrichelte Linien in **Abb. 3.19**) mit der zusätzlichen Besetzung von drei Koordinationsstellen oberhalb seiner Rechteckflächen (grün gestrichelte Linien in **Abb. 3.19**). Alle Metall-Sauerstoff-Abstände befinden sich im Bereich von 2.5 bis 2.7 Å. Die lockerste Bindung wird durch das Wassermolekül, welches über der einen Rechteckfläche lokalisiert ist, realisiert. Der dazugehörige isotrope B-Faktor beträgt 47 Å² und ist damit etwas doppelt so groß wie die B-Faktoren der anderen, das Sr²⁺-Kation koordinierenden Wassermoleküle. Diese starke intermolekulare Stabilisierung der RNA-Heptamere kann ein Grund für die außergewöhnlich guten Diffraktionseigenschaften der ALA^{wt}- wie auch der ALA^{I-U6}-Doppelhelix sein. Zum Anderen befindet sich das Sr²⁺-Kation innerhalb der monoklinen Auswertung auf einer speziellen Lage, auf der zentralen zweifachen Rotationsachse, die senkrecht zur a, c-Ebene der monoklinen Elementarzelle verläuft. Vielleicht trägt dieser Ankerpunkt damit zur Verstärkung der Fehlordnungstendenz dieser Helices bei. Bisher ist keine biologische Bedeutung der Sr²⁺-Wechselwirkung mit RNA bekannt. Es wurde aber im Rahmen der Beschreibung der Faltung und RNA-Spaltung des Ribozyms, welches aus dem Gruppe I-Intron von *Tetrahymena* abgeleitet wurde, eine Abhängigkeit dieser Reaktionen von millimolar konzentrierten Sr²⁺-Zusätzen beschrieben (Celander & Cech, 1991; Chowrira *et al.*, 1993; Streicher *et al.*, 1996).

Bei der Beschreibung der Solvensstruktur der RNA wurden weiterhin innerhalb aller Strukturen einige Na⁺-Kationen lokalisiert (**Tab. 3.7**). Die Beschreibung erfolgte auf Grundlage des Auftretens

sehr kleiner isotroper B-Faktoren bei der anfänglichen Verfeinerung dieser Atome als Wassersauerstoff von 5 bis 9 Å² und verbleibender +(mFo-DFc)-Differenzdichte. Ein Grund für diese Beobachtung kann die Auflösungsabhängigkeit der atomaren Streufaktorkurven sein. Trotz der isoelektronischen Struktur von Na⁺ und O⁻² in Wasser ist führt die Unterschiedlichkeit ihrer atomaren Streufaktorkurven bei atomarer Auflösung zu einer +(mFo-DFc)-Differenzdichte. Zusätzlich wurden interatomare Abstände von 2.3 Å zu anderen Sauerstoffatomen gefunden, die für O-O Kontakte zu klein sind. Die Lokalisation dieser Kationen befindet sich innerhalb des zentralen Bereichs der großen Furche, etwa im Bereich von G4-C67. Es findet keine direkte Bindung an die Basen der RNA statt.

3.2. Kristallstrukturanalyse eines 3'-DNA-RNA-5'-Hybrids aus HIV-I

3.2.1. Kristallisation und Diffraktionsexperiment

Die Kristallisation von HIV^{Chi} erfolgte unter Verwendung des hybridisierten und gereinigten chimären Duplexes r(gcaguggc)•r(gcca)d(CTGC). Innerhalb dieses Abschnittes werden die RNA-Nukleotide klein, die DNA-Nukleotide groß geschrieben. Dazu wurden die unter Verwendung des "Nucleic-Acid-Mini-Screen" (Berger *et al.*, 1996) erhaltenen Kristallisationsbedingungen optimiert. Die Kristallisation wurde bei 293 K unter Verwendung der Methode des hängenden Tropfen durchgeführt (siehe **Abschnitt 2.2**). 1.5 µl einer 0.5 mM HIV^{Chi}-Lösung wurden mit 1.5 µl einer Lösung bestehend aus 40 mM Natriumkacodylat pH 7.0, 12 mM Spermintetrachlorid, 20 mM Kaliumchlorid und einer 10%igen wäßrigen MPD-Lösung vermischt. Diese Lösung wurde gegen ein Reservoir bestehend aus 0.5 ml einer 35%igen wäßrigen MPD-Lösung äquilibriert. Pro Tropfen bildeten sich nach etwa einer Woche 2-3 Kristalle, die im weiteren Verlauf innerhalb von zwei Wochen zur maximalen Größe von 500x100x50 µm wuchsen (**Abb. 3.20**).

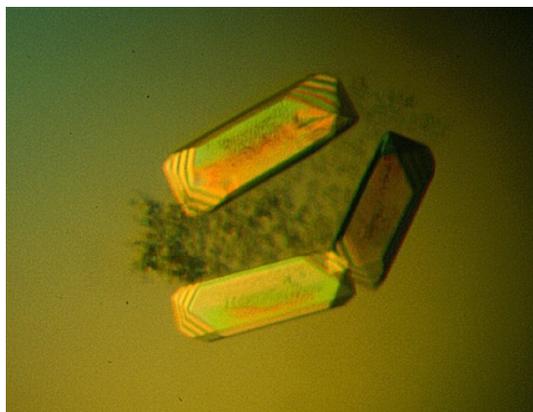


Abb. 3.20 Kristalle der HIV^{Chi}-Doppelhelix r(gcaguggc)•r(gcca)d(CTGC)

Nach dem Erreichen der maximalen Größe, setzte schnell ein Alterungsprozess der Kristalle ein, der durch Rißbildungen im Bereich der Kristalloberfläche wahrnehmbar war und negative Auswirkungen auf die Diffraktionsqualität der Kristalle hatte. Deshalb wurden die frischen Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die spätere Datensammlung am Synchrotron im Stickstoffstank gelagert. Die Datensammlung erfolgte am Deutschen-Elektronensynchrotron DESY, EMBL Meßplatz BW7A/X31. Dazu wurde am Meßplatz BW7A ein Diffraktionsexperiment über

einen Bereich von $\Phi=94^\circ$ mit einer Oszillationsbreite $\Delta\Phi=1^\circ$ und einem Kristall-Detektor Abstand von 140 mm durchgeführt. Bedingt durch die lange, dosisabhängige Belichtungszeit von etwa 5 Minuten ("double bunch mode" des DORIS-Ringes), waren etwa 20% der starken Reflexe niedriger Auflösung überladen, für die der Detektor kein zuverlässiges Intensitätssignal liefern konnte. Aus Zeitgründen wurde die Datensammlung am Meßplatz X31 unter Verwendung eines zweiten Kristalls mit $\Phi=44^\circ$ und $\Delta\Phi=2^\circ$ und einer vergleichbar geringeren Röntgendosis komplettiert. Die Statistik der vereinigten Reflexe der Teildatensammlungen ist in **Tab. 3.11** dargestellt.

Tab. 3.11 Statistik der vereinigten Daten des Diffraktionsexperiments

	HIV ^{Chi}
Strahlenquelle	DESY-BW7A / X11
Wellenlänge (Å)	1.000 / 1.072
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellachsen (Å)	42.74 / 44.15 / 51.93
Auflösungsbereich¹(Å)	15-1.94
Temperatur (K)	100
Kristallgröße (µm)	500x100x50
Mosaizität (°)	0.9 / 0.8
Reflexanzahl²	7566
Vollständigkeit³ (%)	99.2 / 93.1
Redundanz	3.7
< I/σ(I) >^{3,4}	7.4 / 2.2
R_{sym}^{3,5} (%)	7.5 / 41.6
V/bp⁶ (Å³)	1531
Moleküle / a. s. u⁷	2 Duplexe

- 1: minimale und maximale Auflösungsgrenze der gemessenen Reflexe
- 2: Anzahl der unabhängigen Reflexe des reduzierten Datensatzes (siehe **Abschnitt 2.4.3**)
- 3: Vollständigkeit des Datensatzes innerhalb der Auflösungsbereiche: 15 Å-1.94 Å / 1.96 Å-1.94 Å
- 4: I : Intensität des Reflexes, σ : Standardabweichung der Intensität des Reflexes
- 5: ([Glg. 2.5])
- 6: Volumen pro Basenpaar unter der Annahme von einem RNA-Duplex pro asymmetrischer Einheit (siehe **Abschnitt 2.6**)
- 7: RNA-Moleküle pro asymmetrischer Einheit

Die hohe Mosaizität von 0.9° bzw. 0.8° beider verwendeter Kristalle wirkte sich ungünstig auf das Verhältnis von vollständigen zu unvollständig gemessenen Reflexprofilen pro Einzelbild mit $\Delta\Phi=1^\circ$ aus. Diese experimentell bedingte Einschränkung kann zu Problemen bei der automatischen Profilanpassung innerhalb der Reflexintegrationsroutinen führen. Der Grund für die hohe

Mosaizität der Kristalle lag jedoch nicht an unzureichenden Kryobedingungen bzw. an einem fehlerhaften Schockgefrieren der Kristalle, wie Testmessungen bei Raumtemperatur bestätigten. Die Autoindizierung und Datenauswertung erfolgte mit DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). Die Richtigkeit der indizierten orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$, speziell das Vorhandensein der drei senkrecht zueinander angeordneten 2_1 -Schraubenachsen, wurde durch die systematischen Auslöschungen aller Reflexe mit ungeraden h , k , l entlang der a^* , b^* , c^* -Achsen des reziproken Gitters bestätigt.

3.2.2. Strukturlösung von HIV^{Chi} mittels Molekularen Ersatzes

Die Strukturlösung erfolgte nach der Methode des molekularen Ersatzes mit AMORE (CCP4, 1994). Als Suchmodell wurde ein kanonisches A-RNA-Oktameres, das auf Grundlage der entsprechenden Sequenz (**Abb. 1.1-B**) mit dem Programm HELIX (Heinemann, 1995) generiert wurde, verwandt. Die Rotations- wie auch die Translationssuche mit jeweils einem Duplexmolekül ließ keine eindeutige Bestimmung der richtigen Teillösung anhand der verfügbaren Qualitätsparameter wie dem Signal-Rauschverhältnis, dem Funktionswert der Kreuzrotationsfunktion oder auch dem R-Wert (**[Glg. 2.16]**) und Korrelationskoeffizienten (**[Glg. 2.17]**) der Translationsfunktion zu. Die nach der Verfeinerung als "starrer Körper" beste Teillösung wurde für die Suche nach der Position des zweiten Moleküls in der asymmetrischen Einheit fixiert. Danach erfolgte die Translationssuche unter Verwendung der fünf höchsten Rotationslösungen. Bei der Verwendung von Reflexen im Auflösungsbereich von $10\text{-}4 \text{ \AA}$ konnte mit der Rotationslösung auf Rang 5 das beste Ergebnis der kombinierten Translationssuche erreicht werden. Dieses Ergebnis wurde bei der "starrten Körper"-Verfeinerung der 10 besten kombinierten Translationslösungen bestätigt (**Tab. 3.12**). Die beste Lösung bildete das Startmodell für die Verfeinerung der Atompositionen und der isotropen B-Faktoren.

Tab. 3.12 Statistik der Strukturlösung von HIV^{Chi} durch Molekularen Ersatz

Kreuzrotationsfunktion		
Auflösungsbereich (Å)	8-3.0	
$\alpha / \beta / \gamma^1$ (°)	50.40 / 116.24 / 208.00	172.24 / 116.80 / 152.32
Rang der Rotationslösung	2	5
Peakgröße	40.2	35.3
Standardabweichung	10.45	
Translationsfunktion nmol=1 ⁵		
Auflösungsbereich (Å)	10-4.0	
T _x / T _y / T _z ²	0.4697 / 0.3745 / 0.3517	0.3833 / 0.0172 / 0.2253
R ³ (%) / C ⁴	54.6 / 0.222	57.6 / 0.196
"Starrer Körper"-Verfeinerung nmol=1 ⁵		
Auflösungsbereich (Å)	8-4.0	
R ³ (%) / C ⁴	53.4 / 0.273	56.1 / 0.208
α, β, γ^1 (°)	53.09 / 116.48 / 206.39	170.63 / 115.60 / 149.80
T _x , T _y , T _z ²	0.4714 / 0.3709 / 0.3556	0.3866 / 0.0102 / 0.2258
Translationsfunktion nmol=2 ⁶ , Lösung 1 Fix		
Auflösungsbereich (Å)	10-4.0	
α, β, γ^1	53.10 / 116.48 / 206.38	172.24 / 116.80 / 152.32
T _x / T _y / T _z ²	0.4714 / 0.3709 / 0.3556	0.4111 / 0.3919 / 0.6850
R ³ (%) / C ⁴	53.4 / 0.273	51.0 / 0.379
"Starrer Körper"-Verfeinerung nmol=2 ⁶ , Lösung 1 Fix		
Auflösungsbereich (Å)	8-4.0	
R ³ (%) / C ⁴	48.9 / 0.410	
Lösung 1: α, β, γ^1 (°)T _x , T _y , T _z ²	53.97 / 119.47 / 208.50 / 0.4723 / 0.3669 / 0.3507	
Lösung 2: α, β, γ^1 (°)T _x , T _y , T _z ²	174.62 / 115.13 / 151.67 / 0.4122 / 0.3889 / 0.6831	

- 1: Eulerwinkel der Kreuzrotationslösung
- 2: Translationsvektor der Translationslösung
- 3: R-Wert [Glg. 2.16]
- 4: Korrelationskoeffizient [Glg. 2.17]
- 5: Translationssuche und "starrer-Körper"-Verfeinerung mit einer Kopie des Suchmodells in der asym. Einheit
- 6: Translationssuche und "starrer-Körper"-Verfeinerung mit zwei Kopien des Suchmodells in der asym. Einheit

3.2.3. Strukturverfeinerung von HIV^{Chi} mit XPLOR-3.8

Die Verfeinerung des Strukturmodells von HIV^{Chi} wurde mit dem Programm XPLOR (Brünger, 1992A) durchgeführt. 5% der Reflexe wurden als Testdatensatz ausgewählt. Das durch die Strukturlösung erhaltene Modell, bestehend aus zwei oktameren Duplexen, wurde durch Deletion der entsprechenden O2'-OH Gruppen in den Kontext des Hybridduplexes HIV^{Chi} gebracht. Die anfängliche "starre Körper"-Verfeinerung und Positionsverfeinerung unter Anwendung von nichtkristallographischen Symmetriebeziehungen ("NCS-restraints"), die eine Ähnlichkeit der

Oktamerstrukturen annimmt, führte im Auflösungsbereich von 15-2.5 Å zu einen R/R_{free} von 36.8% / 43.4%. Die Kontrolle des Strukturmodells am Graphikbildschirm zeigte neben der allgemeinen, richtigen Anpassung der Lage der Oktamere, eine um 180° falsche Orientierung des HIV^{Chi}-A Moleküls um die zentrale pseudo-zweizählige Drehachse. Bei der anschließenden Kontrolle der Verfeinerung mittels Graphikprogrammen, waren +(Fo-Fc)-Dichtebereiche in der Nähe von C2' der Desoxyribosen C13-C16 und -(Fo-Fc)-Dichtebereiche in unmittelbarer Umgebung von O2'-Atomen des Bereichs von u5-c8 zu finden. Dieser Befund stellte einen eindeutigen Indikator für die beschriebene, falsche Orientierung eines Oktamerduplexes dar. Eine weitere interessante Beobachtung war das Fehlen einer ähnlich klaren Differenzdichteverteilung im Bereich der falsch, positionierten Basenatome, die für das Vertauschen von C13 mit u5 und T14 mit g6 erwartet wurde. Daraus läßt sich folgern, daß bei einer mittleren Auflösung von etwa 2.5 Å die beschriebene, falsche Positionierung von DNA- und RNA- Duplexen aufgrund der internen pseudo-zweizähligen Symmetrie sehr schwer analysierbar ist, wenn nicht andere "Störungen" eine stärkere Verletzung der Symmetrie dieser Moleküle bewirken.

Die manuelle Repositionierung und eine weitere Verfeinerung der Atompositionen und individueller isotroper B-Faktoren führte zur Konvergenz der Verfeinerung zu R/R_{free} von 30.7%/34.9% unter Verwendung aller Daten bis zur maximalen Auflösung von 1.94 Å. Bei der Analyse der +(Fo-Fc)-Differenzdichtekarte konnten hochkonturierte Dichtebereiche, die den Positionen von Sauerstoffatomen aus Wassermolekülen zugeordnet wurden, identifiziert werden. Die Modellerweiterung führte in Verbindung mit zyklischen Verfeinerungen der Position und isotroper B-Faktoren aller Atome zur finalen Konvergenz der Verfeinerung mit R/R_{free} von 21.6%/29.8% (**Abb. 3.21**) Im Verlauf der zyklischen Modellverbesserung wurde eine Solvenskorrektur für die Anpassung des Streubeitrags der diffusen Lösungsmittelstreuung durchgeführt (siehe **Abschnitt 2.8**). Hierbei wurde ein B-Faktor von 300 Å² und K3-Wert von 2.13 ermittelt [**Glg. 2.26**]. Zusätzlich wurde nach der Einbeziehung aller Daten bis zur maximalen Auflösung das "NCS-Modell" entfernt. Die tatsächliche Abweichung der Strukturen aufgrund von Kristallpackungseinflüssen konnte somit besser angepaßt werden. Die Statistik der Verfeinerung wurde in **Tab. 3.13** zusammengefaßt

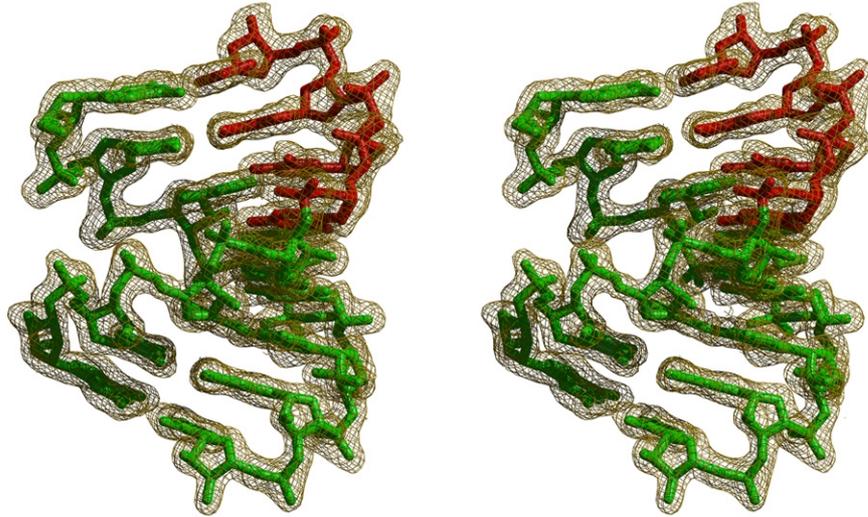


Abb. 3.21 Darstellung des verfeinerten Strukturmodells von HIV^{Chi} mit (2Fo-Fc)-Elektronendichte, bei 0.9 σ konturiert. Die grün eingefärbte Teilstruktur entspricht dem RNA-Teil, der DNA-Teil ist in rot dargestellt.

Tab. 3.13 Statistik der Verfeinerung von HIV^{Chi}

R/R_{free} (%)	21.6/29.8
Anzahl der RNA/DNA Atome	666
Anzahl der Wassersauerstoffatome	86
rmsd Bindungslängen¹ (Å)	0.012
rmsd Bindungswinkel² (Å)	1.69
mittlerer B-Faktor der Wassersauerstoffatome (Å²)	33.58
mittlerer B-Faktor der Hauptkette³ A/B⁴ (Å²)	25.4/19.7
mittlerer B-Faktor der Basenatome A/B⁴ (Å²)	17.5/16.3

- 1: rms-Abweichung der Bindungslängen des verfeinerten Strukturmodell von der Standardbibliothek
- 2: rms-Abweichung der Bindungswinkel des verfeinerten Strukturmodell von der Standardbibliothek
- 3: alle Atome des Polyphosphatrückgrats sowie der Ribose/Desoxyribose
- 4: Moleküle A und B der asymmetrischen Einheit

3.2.4. Organisation der HIV^{Chi} Oktamere im Kristall

HIV^{Chi} wird im orthorhombischen Kristallgitter durch direkte intermolekulare Kontakte der Oktamerduplexe wie auch durch wasservermittelte Kristallkontakte stabilisiert. **Abb. 3.22** zeigt den Aufbau des Kristallgitters. Eine 2₁-Schraubenachse verläuft parallel zur c-Achse. Dadurch werden eine Vielzahl von Packungswechselwirkungen realisiert.

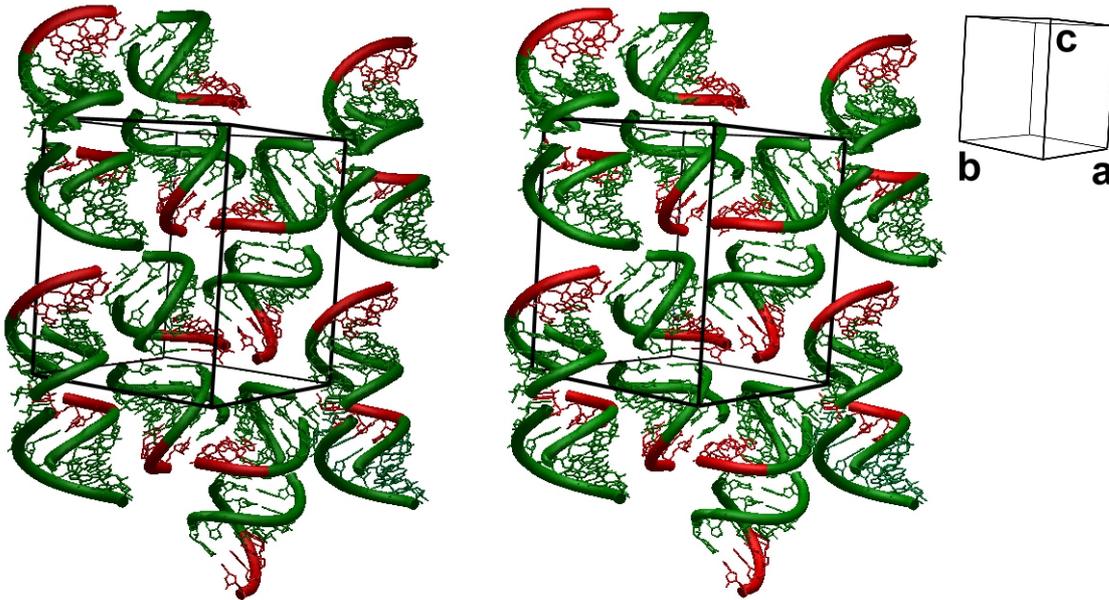


Abb. 3.22 Packungseigenschaften von HIV^{Chi} in der orthorhombischen Elementarzelle. Ausschnitt einer Schicht, die entlang der Flächendiagonale der a, b-Ebene verläuft.

Die asymmetrische Einheit wird durch zwei aufeinanderstapelnde Oktamerduplexe gebildet. Diese Kopf-Schwanz Stapelung wird durch eine perfekte Überlappung der Purinbasen g9 und g8 unter vollständiger Beseitigung von Stapelwechselwirkungen der komplementären Basen c8 und C16. Die Anordnung des intermolekularen 16-Basenpaar-Duplexes führt zur Ausbildung einer sehr weiten und tiefen großen Furche mit einem negativen helikalen Twist von -19.4° im Bereich der zentralen Oktamerstapelung. Die perfekte zweizählige Rotationsymmetrie wird durch die Kopf-Schwanz Stapelung gestört. In **Abb. 3.23** wurden zusätzlich zwei intermolekulare Wechselwirkungen mit symmetrieverwandten Molekülen dargestellt. Dabei packt der g1-C16-terminale Bereich von HIV^{Chi}-A mit der kleinen Furche gegen den Phosphatrückgratbereich g9/c10 des symmetrieverwandten HIV^{Chi}-B. Eine weitere Wechselwirkung erfolgt zwischen dem Phosphatrückgrat von C15/T14 von HIV^{Chi}-B und den Riboseatomen von g6 des HIV^{Chi}-A-Moleküls.

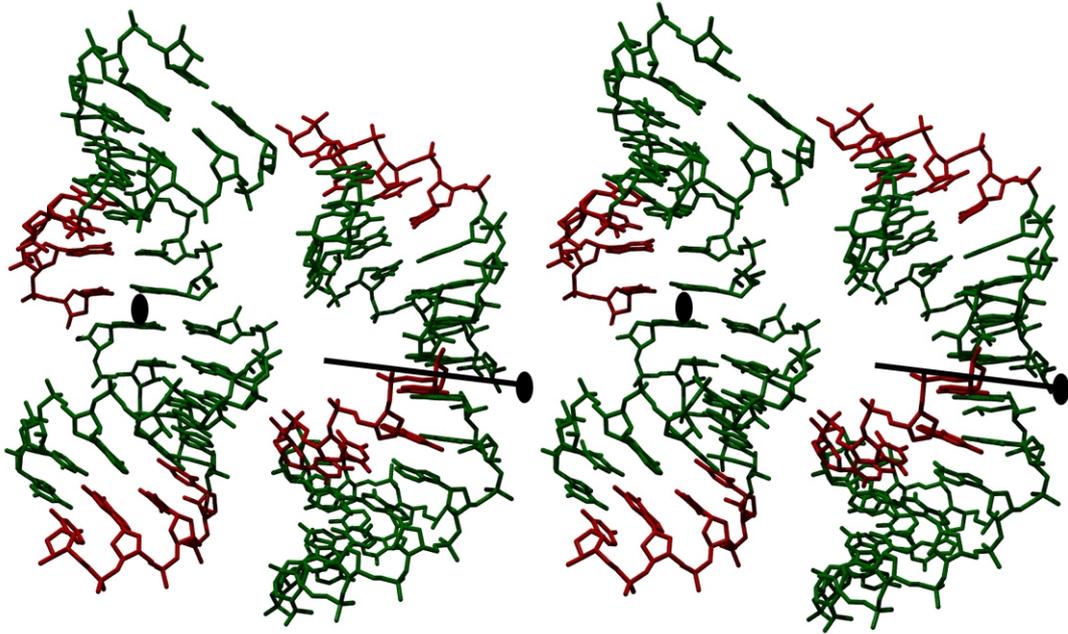


Abb. 3.23 Die asymmetrische Einheit von HIV^{Chi} wird durch zwei aufeinanderstapelnde Oktamerduplexe gebildet. Zusätzlich wurde die Packungswechselwirkung mit symmetrieverwandten Helices dargestellt. Die perfekte zweifache Rotationsymmetrie wird durch die Kopf-Schwanz Stapelung gestört.

In **Abb. 3.24** ist eine zusätzliche interessante Stabilisierung des Kristallgitters von HIV^{Chi} dargestellt. Das Basenpaar g1-C16 von HIV^{Chi}-A stapelt genau in die kleine Furche im Bereich G15/C16 des symmetrieverwandten HIV^{Chi}-B. Dabei werden direkte Kontakte der g1-Basenatome mit Riboseatomen von G15 beobachtet.

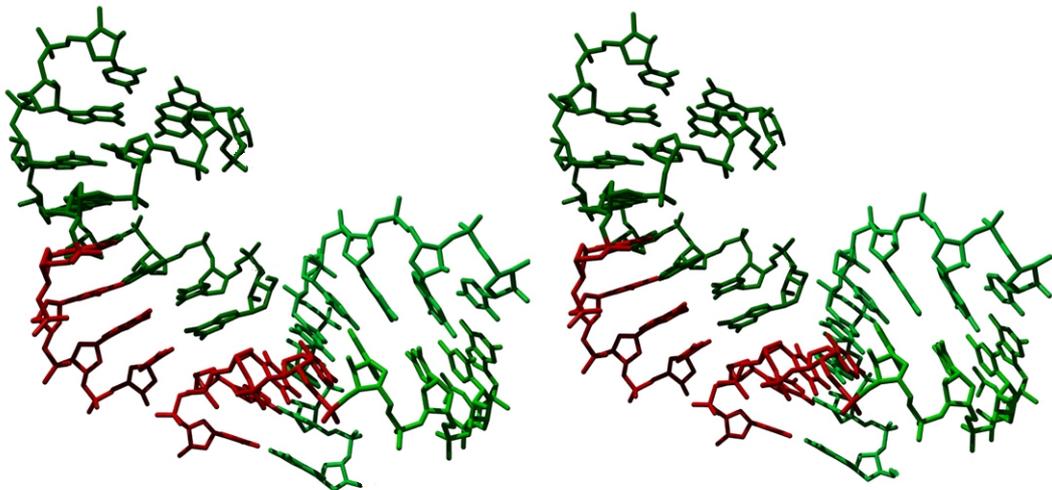


Abb. 3.24 Stapelung des g1-C16-Basenpaares in die kleine Furche eines Nachbarmoleküls

3.2.5. Solvensstruktur von HIV^{Chi}

Innerhalb der Kristallstruktur konnten bei einer maximalen Auflösung von 1.94 Å, 84 vollständig besetzte Wasserpositionen, die zur ersten Hydratationssphäre der chimären Duplexe gehören, identifiziert werden (**Tab. 3.13**). 51 Wassersauerstoffatome sind am Polyphosphatrückgrat koordiniert. Dort finden intensive Wechselwirkungen mit H-Brückendonoren wie den 2'OH Gruppen der Ribosen statt. 14 der 24 Ribose-2'OH-Gruppen werden durch Wasser und teilweise zusätzlichen intermolekularen Wechselwirkungen zu anderen H-Akzeptoren stabilisiert. drei weitere Ribose-2'OH Gruppen sind ausschließlich in intermolekulare Nukleinsäurekontakte involviert. Damit sind die RNA-Nukleotide stärker solvatisiert als die DNA-Nukleotide. An 25 der 28 Phosphatgruppen koordinieren Wassersauerstoffatome. Weitere Wasser koordinieren im Phosphatrückgratbereich an O3', O5' und O4' 26 Wassersauerstoffatome solvatisieren Nukleinsäureatome innerhalb der großen Furche und sieben Moleküle wechselwirken innerhalb der kleinen Furche. Die unterschiedliche Verteilung der Wasserkoordinationen ist abhängig von der Anzahl der H-Donoren und H-Akzeptoren wie auch von der Furchengeometrie die die allgemeine Zugänglichkeit der Solvensmoleküle bestimmt und von der Kristallpackung.

3.2.6. Auswertung der globalen Oktamerstruktur

Um die Frage nach den strukturellen Signalen, die die hohe Spezifität der RNase-H bestimmen, zu beantworten, wurden die Helixparameter von HIV^{Chi} ermittelt und mit denen von kanonischer A-DNA (Chandrasekaran & Arnott, 1989) verglichen. Hypothetisch kommen für diese Signale eine von der A-Form abweichende Helixkonformation in Frage (Fedoroff *et al.*, 1997), deren Lokalisation entweder am 3'-DNA-RNA-5' Übergang oder innerhalb der tetrameren RNA-DNA Teilstruktur zu finden sein sollte. Dazu wurden die Duplexstrukturen der beiden unabhängig voneinander verfeinerten Oktamerkopien in der asymmetrischen Einheit aber auch die tetrameren RNA-RNA und RNA-DNA Teilstücke, sowie die Helixparameter des 3'-DNA-RNA-5' Übergangs verglichen. Beide Oktamerduplexe der asymmetrischen Einheit des HIV^{Chi} liegen in der A-Konformation vor (**Abb. 3.21**). Alle 32 Pentosen zeigen eine C3'-endo Zuckerwellung. Die große x-Verschiebung (dx) der Basen zur helikalen Achse erzeugt die typische tiefe, große Furche. Weiterhin ist die deutliche Basenneigung (η) zur helikalen Achse, sowie die spezielle Steighöhe pro Basenpaarschritt (Dz) und der helikale Twist (Ω) indikativ für die A-Konformation (**Tab. 3.14**).

Der mittlere helikale Twist (ω) von 33.52° (HIV^{Chi}-A) bzw. 32.80° (HIV^{Chi}-B) entspricht einer helikalen Wiederholung von 10.7 und 11.0.

Tab. 3.14 Globale helikale Parameter von HIV^{Chi} im Vergleich mit kanonischer A-DNA

	X-Verschiebung dx (Å)	Neigung η (°)	Twist Ω (°)	Steighöhe Dz (Å)	Slide Dy (Å)
HIV^{Chi}-A	-4.25 / 0.27	10.67 / 2.74	33.52 / 1.92	2.77 / 0.37	-0.08 / 0.34
HIV^{Chi}-B	-4.66 / 0.22	15.63 / 4.38	32.80 / 2.81	2.65 / 0.28	-0.15 / 0.33
RNA-RNA	-4.61 / 0.22	11.26 / 2.68	32.83 / 1.33	2.68 / 0.25	-0.21 / 0.33
RNA-DNA	-4.28 / 0.33	15.04 / 5.03	32.29 / 3.47	2.73 / 0.34	-0.12 / 0.34
3'-DNA-RNA-5'	-	-	33.75 / 0.80	2.62 / 0.16	0.20 / 0.04
Faser-Modell¹	-5.14	22.66	32.70	2.55	0.00

Die Parameter wurden mit CURVES 5.0 (Lavery & Sklenar, 1989) unter Verwendung einer gekrümmten, globalen Helixachse ermittelt. Es werden die mittleren Größen und ihre Standardabweichungen dargestellt.

1: kanonische A-DNA, Werte wurden experimentell durch Faserdiffraktion von Kalbsthymus DNA ermittelt (Chandrasekaran & Arnott, 1989)

Die Hauptunterschiede zwischen HIV^{Chi}-A und -B liegen in einem kleineren mittleren Betrag für dx (-4.25 \AA (A), -4.66 \AA (B)) und in einer kleineren mittleren Neigung (η) für A (10.67° (A), 15.63° (B)). Bei der Überlagerung aller Atome beider Oktamere nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurde eine rms-Abweichung von 1.01 \AA errechnet. Dabei treten die größten Abweichungen innerhalb terminaler Bereiche der Duplexe auf, die besonders stark in unterschiedliche Packungskontakte involviert sind. Diese signifikanten strukturellen Unterschiede verdeutlichen die hohe Flexibilität der Moleküle, welche beim Aufbau des Kristallgitters ausgenutzt wird. Die ebenfalls durchgeführte Überlagerung von HIV^{Chi} mit einer modellierten und energieminierten A-Form RNA (Zacharias, 1998) zeigt rmsd-Abweichungen von 0.95 \AA für HIV^{Chi}-A bzw. 0.84 \AA für HIV^{Chi}-B. Diese Abweichungen sind geringer als die packungsinduzierten Variationen der Oktamere A und B. Dieser Vergleich verdeutlicht nochmals die allgemeine Übereinstimmung der globalen Helixstruktur von HIV^{Chi} mit dem A-Helixstyp.

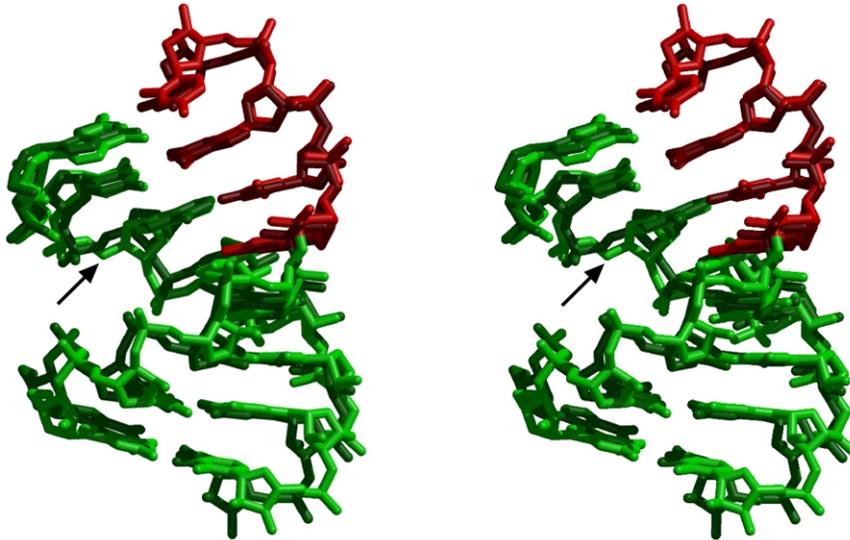


Abb. 3.25 Überlagerung von HIV^{Chi}-A mit -B. Der Pfeil kennzeichnet die Position des modulierten Phosphatrückgrats bei HIV^{Chi}-B.

Der Vergleich der mittleren, helikalen Parameter der tetrameren RNA-RNA-Teilstruktur zum RNA-DNA-Teilstück zeigt keine systematischen Abweichungen, die größer wären als die packungsbedingten Unterschiede der beiden verglichenen Oktamere. Somit weicht auch das DNA-RNA Teilstück nicht von der A-Form ab. Die helikalen Parameter für den 3'-DNA-RNA-5' Übergangsbereich zeigen auch hier keine signifikanten Abweichungen von der A-Konformation. Die Analyse der Torsionswinkel des Phosphatrückgrats bestätigt die A-Konformation für beide Oktamerduplexe. Eine signifikante Abweichung ist innerhalb des Phosphatrückgrats von α_3 feststellbar (**Abb. 3.25**, Pfeil). Bei HIV^{Chi}-B sind die $\alpha/\beta/\gamma$ Torsionswinkel im trans/trans/(-)trans-Bereich, HIV^{Chi}-A hat an dieser Stelle die Standard-A-Form Torsionswinkel von (-)gauche/trans/(+)gauche. Grund für diese modulierte Konformation bei HIV^{Chi}-B sind ebenfalls Packungswechselwirkungen (siehe **Abschnitt 3.2.4**). Der Vergleich der Torsionswinkel des Phosphatrückgrats der RNA-Nukleotide zu den DNA-Nukleotiden fällt unauffällig aus. Alle Winkel schwanken für RNA/DNA unabhängig um die Torsionswinkel der Standard-A-Form. Die mittlere Pseudorotationsphase beträgt für den DNA-Teil 21.6° bzw. 20.5° und liegt systematisch leicht über den Werten des RNA-Teils (17.3° bzw. 16.2°). Unabhängig davon liegen die Desoxyribosen wie die Ribosen im Bereich der C3'-endo Zuckerwellung (**Tab. 3.15**).

Tab. 3.15 Torsionswinkel und Standardabweichungen des RNA- und DNA-Rückgrats und Pseudorotationsphasen der Ribosen/Desoxyribosen von HIV^{Chi}

	α (°)	β (°)	γ (°)	δ (°)	ϵ (°)	ζ (°)	χ (°)	P (°)
	HIV^{Chi}-A							
RNA	-68.8 6.2	175.4 5.7	57.2 3.2	81.0 5.7	-150.6 5.8	-74.3 3.6	-164.7 6.6	17.3 2.7
DNA	-71.8 9.5	176.1 5.9	59.3 2.3	86.8 3.8	-157.2 11.6	-73.9 5.9	-155.2 3.8	21.6 4.6
	HIV^{Chi}-B							
RNA	-60.4 ¹ 4.6	176.9 7.7	51.9 ¹ 6.1	82.9 3.3	-150.4 3.0	-74.9 3.6	-162.7 7.7	16.2 4.6
DNA	-69.4 4.9	175.3 6.9	50.6 3.0	81.4 1.8	-154.6 9.5	-71.4 6.1	-153.0 2.2	20.5 3.2
Faser-Modell²	-52	175	42	79	-148	-75	-157	7.5

Die Parameter wurden mit CURVES 5.0 (Lavery & Sklenar, 1989) ermittelt. Es werden die mittleren Größen und ihre Standardabweichungen dargestellt.

- 1: α (a3)= 139.17° und γ (a3)=-176.92° wurden nicht mit einbezogen, da die Werte im trans-Bereich liegen
- 2: kanonisches A-DNA-Modell (Chandrasekaran & Arnott, 1989)

3.2.7. Vergleich der sequenzabhängigen helikalen Parameter

Das Vorhandensein von zwei unabhängig voneinander verfeinerten Kopien von HIV^{Chi} bietet die Möglichkeit einer Korrelation der helikalen Struktur zur Basenpaarabfolge. Obwohl der Gang der meisten Helixparameter nur sehr wenig mit der Sequenz korreliert bzw. diese Abhängigkeit durch unterschiedliche Kristallumgebungen beeinflusst wird, bilden der helikale Twist (ω), die Steighöhe (Dz) und der "Slide"-Wert (Dy) eine Ausnahme. Die etwa vergleichbare Korrelation des Twists mit dem Slide-Wert von 0.76 bzw. 0.78 verdeutlicht den engen Zusammenhang der beiden helikalen Parameter. Die Steighöhe ist mit $K=0.48$ schlechter an die Basenabfolge korreliert (**Abb. 3.26**).

Das bestimmende Signal bei der Analyse der dargestellten Werte stellen Minima an dem Basenpaarschritt c2-G15/a3-T14 dar. Dabei weicht HIV^{Chi}-B mit einem Twistwinkel (ω) von 28.2°, einem "Slide"-Wert (Dy) von -0.65 Å und einer minimalen Steighöhe (Dz) von 2.08 Å stärker von Werten der normalen A-Konformation ab als HIV^{Chi}-A (vergleiche dazu **Tab. 3.14**).

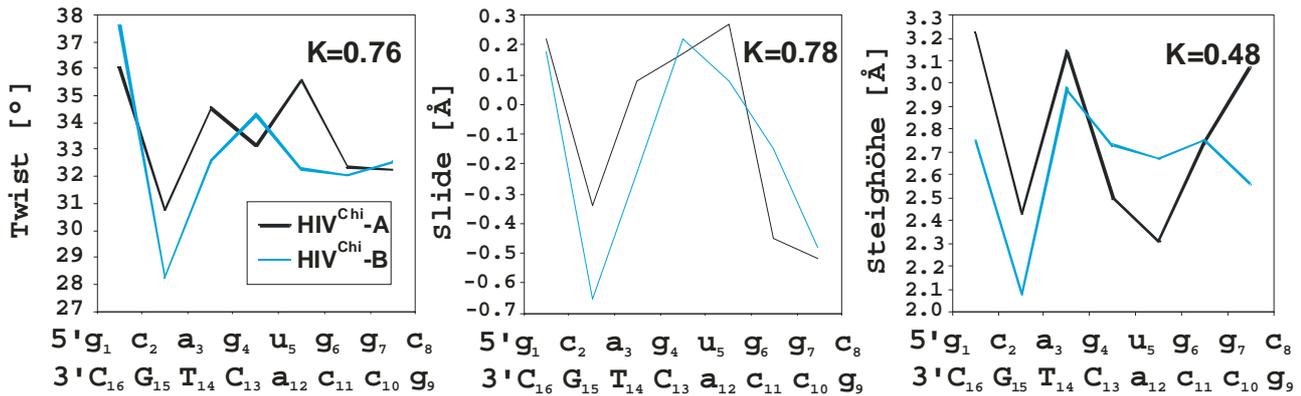


Abb. 3.26 Vergleich helikaler Parameter von HIV^{Chi}-A und HIV^{Chi}-B. Die Parameter wurden mit CURVES 5.0 (Lavery & Sklenar, 1989) in Bezug auf eine gekrümmte globale Helixachse ermittelt.

Interessanterweise wurde im selben Sequenzbereich bei HIV^{Chi}-B beim Schritt 5'-c₂pa₃-3' das modulierte Phosphatrückgrat mit all-trans Torsionswinkel für $\alpha/\beta/\gamma$ festgestellt (siehe **Abschnitt 3.2.5**). Im folgenden Abschnitt wird dieser durch seine besondere Konformation hervorgehobene Bereich des Oktamerduplexes weiter charakterisiert.

3.2.8. Analyse des c₂-G₁₅/a₃-T₁₄-Bereichs von HIV^{Chi}

Obwohl die globale Struktur von HIV^{Chi} in großer Übereinstimmung zu kanonischer A-DNA steht, konnte durch die sequenzspezifische Analyse der Helices ein Bereich mit einem davon abweichenden Verhalten identifiziert werden. Die spezielle Geometrie des c₂-G₁₅/a₃-T₁₄-Schrittes, die bei beiden Oktamerduplexes sehr ähnlich ist, ist exemplarisch für HIV^{Chi}-B in **Abb. 3.27** dargestellt. Hierbei führt die Interstrang-Purinbasenüberlappung der DNA-Base G₁₅ und der RNA-Base a₃ zur nahezu vollständigen Entstapelung bei den Pyrimidin-Purin-Wechselwirkungen innerhalb eines Stranges. Im Falle von HIV^{Chi}-B wird diese Geometrie zusätzlich durch das modulierte Phosphatrückgrat, das in einer all-trans Konformation vorliegt, stabilisiert. Diese speziellen Stapel Eigenschaften, die in einem Fall mit einer veränderten Phosphatrückgratgeometrie verbunden sind, wurden ebenfalls bei der Auswertung von Pyrimidin-Purin-Schritten innerhalb von A-Form Helices beobachtet (Heinemann *et al.*, 1987; Shakked, 1991; Wahl & Sundaralingam, 1997).

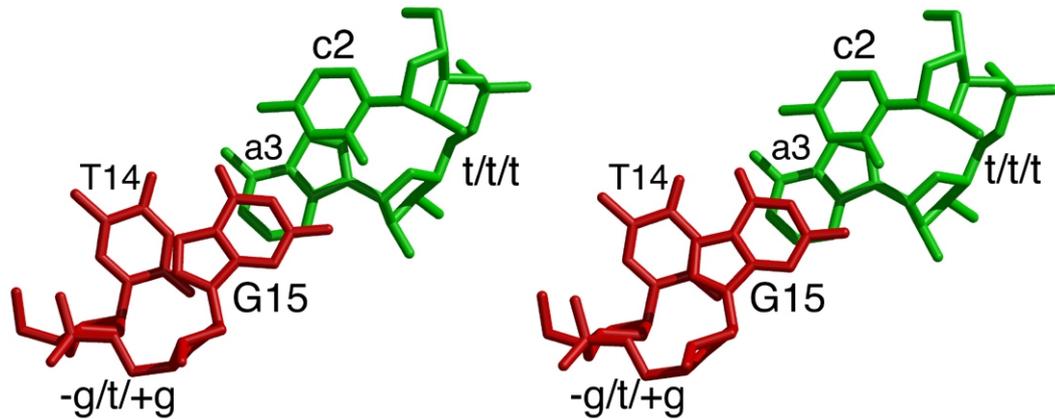


Abb. 3.27 Die Basenpaarstapelung des c2-G15/a3-T14-Schritts

Das Auftreten eines modulierten Phosphatrückgrats für den Schritt 5'-c2pa3-3' bei HIV^{Chi}-B wird durch die Kristallpackung stabilisiert. Der intermolekulare Kontakt von (c11)O2' zu (a3)O4' mit einem Abstand von 2.93 Å stabilisiert die von der Standardkonformation abweichende Phosphatrückgratgeometrie. Die in **Abb. 3.28** dargestellte superpositionierte Struktur des Phosphatrückgrats von HIV^{Chi}-A (schwarz gefärbte Teilstruktur), zeigt die destabilisierenden stereochemischen Kontakte, die bei der Ausbildung der (-)gauche/trans/(+)gauche-Konformation im Kristall auftreten würden. Diese Konformation, die für die Ausbildung der beschriebenen Basenpaarstapelung zwar nicht zwingend ist, kann als Ausdruck des erweiterten Konformationsraums aufgrund der Flexibilität der c2-G15/a3-T14-Stapelung interpretiert werden.

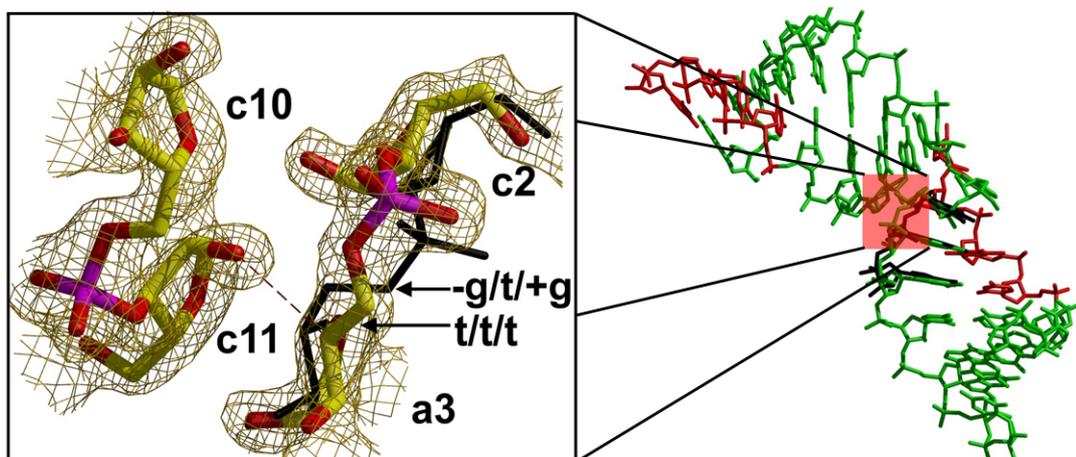


Abb. 3.28 Das all-trans Phosphatrückgrat im Bereich von 5'-c2pa3-3' bei HIV^{Chi}-B wird durch einen Kristallkontakt stabilisiert. Die Superpositionierung des Phosphatrückgrats von HIV^{Chi}-A ist in Schwarz dargestellt.

Eine weitere Folge der speziellen Duplexgeometrie dieses Bereichs ist eine Variation der Intrastrang-Phosphatabstände. Wie in **Abb. 3.29** dargestellt, führt die Interstrang-Purin-Purin Stapelung zur Beeinflussung der Abstände benachbarter Phosphatgruppen im Bereich von 5'-c2pa3-3' des RNA-Strangs. Dabei tritt für HIV^{Chi}-A ein maximaler Abstand beim Schritt 5'-a3pg4p-3' von 6.43 Å auf. Dieses Verhalten wird durch das Auftreten des all-trans Phosphatrückgrats bei HIV^{Chi}-B nochmals auf einen Wert von 6.85 Å verstärkt. Der Gang der Phosphatabstände des RNA Strangs beider Oktamerduplexes ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $K=0.82$ stark korreliert. Die Korrelation dieser Funktion fällt für den chimären DNA-RNA Strang mit $K=0.34$ geringer aus. Auf der Basis der Interpretation diese Auswertung scheint ein mögliches strukturelles Signal im Bereich des RNA-Strangs zwischen 5'c2pg4p-3' lokalisiert zu sein.

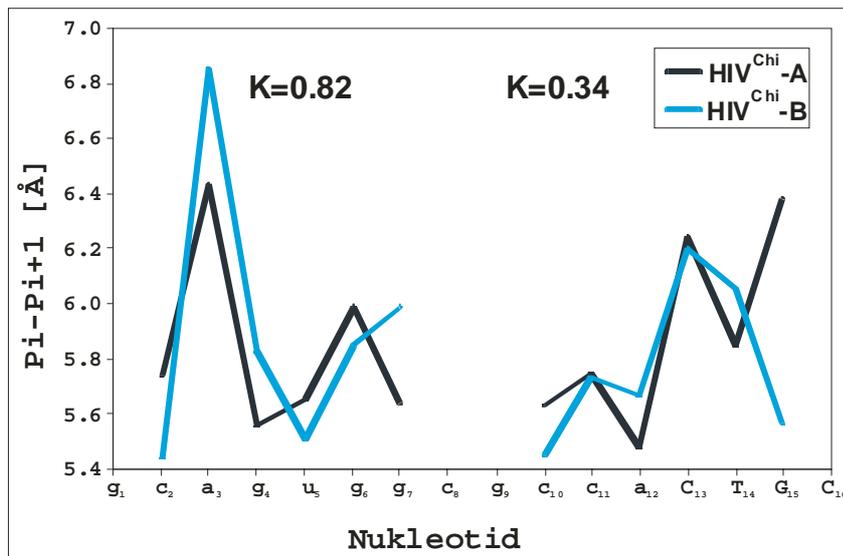


Abb. 3.29 Intrastrang-Phosphatabstände von HIV^{Chi}

Die Auswirkungen der Flexibilität des c2-G15/a3-T14 Schritts sind für den chimären DNA-RNA-Einzelstrang in Hinblick auf die erweiterte Phosphatrückgratgeometrie geringer als beim komplementären RNA-Strang. Obwohl über die biologische Implikation der Struktur des c2-G15/a3-T14-Schritts nur spekuliert werden kann, sind alle von der A-Form abweichende strukturelle Eigenschaften in diesem Bereich konzentriert. **Abb. 3.30** verdeutlicht die Position der Haupt- und Nebenschnittstellen, die bei der Degradation der genomischen RNA während der Minusstrang-Synthese benutzt werden (Götte *et al.*, 1995). Bemerkenswerterweise begrenzen die erste, vom 5'-Terminus gezählte, Nebenschnittstelle und die Hauptschnittstelle (großer Pfeil) den

flexiblen c2-G15/a3-T14-Basenpaarschritt. Die zweite Nebenschnittstelle ist exakt im Übergangsbereich des Hybrids lokalisiert. Dieser enthält wiederum einen Pyrimidin-Purin-Schritt (g4-C13/u5-a12).

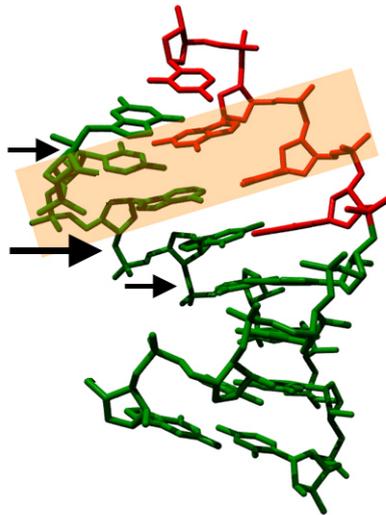


Abb. 3.30 Positionen der Haupt- und Nebenschnittstellen der RT-assoziierten RNase-H Funktion am verfeinerten Strukturmodell von HIV^{Chi}-B (mit markiertem c2-G15/a3-T14 Schritt).

Sollten diese Pyrimidin-Purin-Schritte aufgrund ihrer Neigung zur Intrastrang-Entstapelung, die durch eine Interstrang-Purinüberlappung wieder kompensiert werden kann, ein strukturelles Signal enthalten, so ist dieses als relativ schwach einzuschätzen. Im Vergleich dazu ist der Wechsel zwischen dem Ribose-Zucker zum Desoxyribosезucker und der damit verbundene Verlust der 2'OH-Gruppe als potentiellen Wasserstoffbrückendonator im Übergangsbereich des Hybridoktamers ein sehr starkes, strukturelles Signal bei der RNase-H katalysierten enzymatischen Degradation des genomischen RNA-Strangs.

3.3. Kristallstrukturanalyse von *Bc-Csp* und der *Bc-Csp*^{R3E}-Mutante

3.3.1. Kristallisations- und Diffraktionsexperimente

Die durchgeführten Kristallisationsexperimente ergaben für beide Proteine unter den in **Tab. 3.16** dargestellten Bedingungen exzellent diffraktierende Kristalle (siehe **Abschnitt 2.3**). Die Optimierung der Kristallisation erfolgte bei *Bc-Csp* hauptsächlich über Variationen der MPD-Konzentration. Dabei konnte bei einer erhöhten MPD Konzentration eine schnelle Kristallisation im Bereich von 1-3 Tagen unter Bildung vieler kleiner Kristalle beobachtet werden. Durch die Verringerung der Fällungsmittelkonzentration war eine gezielte Verlangsamung der Kristallwachstumsgeschwindigkeit, wie auch eine Verringerung der Kristallkeimbildung möglich. Nach Anwendung der optimierten Bedingungen, bildeten sich pro Tropfen 1-2 Kristalle aus (**Abb. 3.31-A**). Die Zugabe von verschiedenen mono- und divalenten Kationen unterschiedlicher Konzentrationen führte zu keiner Verbesserung der Kristallisationsbedingungen.

Tab. 3.16 Kristallisationsbedingungen für *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

	<i>Bc-Csp</i>	<i>Bc-Csp</i> ^{R3E}
Zusammensetzung des Tropfens	100 mM Hepes ¹ pH 7.5 65% MPD	100 mM Natriumzitat pH 5.6 200 mM Ammoniumsulfat 30% PEG 6000 ²
Temperatur (K)	293	277
Wachstumsdauer	2 Wochen	3 Wochen
Kristallgröße (µm)	1000x100x80	600x150x150

1: [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure

2: Polyethylenglykol, Polymerisationsgrad 6000

Die Kristallisation von *Bc-Csp*^{R3E} war unter Raumtemperaturbedingungen nicht möglich. Diese Eigenschaft kann mit der verringerten Thermostabilität dieser Mutante erklärt werden, welche die Homogenität der Probe durch einen erhöhten Anteil an entfalteten Proteinmolekülen verschlechtert (**Tab. 1.3**). Bei 277 K bildeten sich unter Verwendung der Wildtypbedingungen viele kleine Kristalle mit Kantenlängen von 50x30x30 µm. Aufgrund ihrer geringen Größe waren sie nur im beschränkten Maße für die Datensammlung geeignet. Zusätzlich konnten unter völlig anderen Bedingungen Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie im Vergleich zu *Bc-Csp* erhalten werden.

Während die Tropfenzusammensetzung von *Bc*-Csp mit 65% MPD ein problemloses Schockgefrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff erlaubte, war das bei *Bc*-Csp^{R3E} nicht möglich. Um trotzdem Kryobedingungen zu erhalten, wurde die Mutterlauge des zur Endgröße gewachsenen Kristalls gegen Paraffinöl ausgetauscht (Riboldi-Tunicliffe & Hilgenfeld, 1999). Dazu wurde der Kristall unter Zuhilfenahme einer 0.1-0.2 mm großen Schlinge aus dem Tropfen entnommen und in einen etwa 10 µl großen Tropfen Öl überführt. Die an den Kristallflächen verbliebene Mutterlauge wurde mit Filterpapierstäbchen vollständig entfernt. Durch die küvettenartige Form des Kristalls war dieser Schritt sehr aufwendig (**Abb. 3.31-B**). Nach diesem Austausch konnte der Kristall ebenfalls in flüssigen Stickstoff schockgefroren werden.

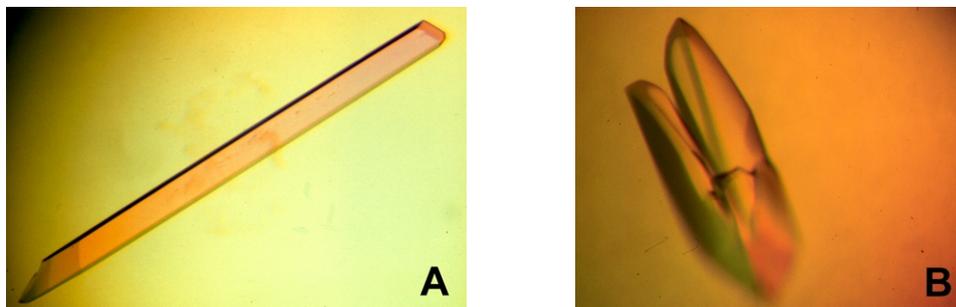


Abb. 3.31 Kristalle von A) *Bc*-Csp und B) *Bc*-Csp^{R3E}, die für das Diffraktionsexperiment benutzt wurden.

Das Diffraktionsexperiment wurde für beide Proteine am Meßplatz BW7A des DESY, Hamburg bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt. Die Messung eines hochaufgelösten Datensatzes von *Bc*-Csp erfolgte mit einer durchschnittlichen Belichtungszeit von etwa 5 Minuten, in Abhängigkeit des Photonenstroms der Synchrotronstrahlenquelle, die im "double-bunch"-Modus arbeitete. Der Kristall-Detektorabstand betrug 135 mm, und es wurde eine Detektorfläche von 300 mm Durchmesser benutzt. In Verlauf des Diffraktionsexperiments wurde ein Φ -Winkelbereich von 62° in 1°-Schritten gemessen. Im Anschluß wurde ein zweiter Datensatz mit einer verringerten Belichtungszeit von 30 sec. pro Einzelbild über einen Φ -Winkelbereich von 40° in 1°-Schritten zur Komplettierung des Diffraktionsexperiments aufgenommen. Hierbei wurde die reduzierte Detektorfläche von 180 mm Durchmesser benutzt, um die bei der hochaufgelösten Datensammlung überladenen Reflexe neu zu messen. Analog dazu wurde der *Bc*-Csp^{R3E}-Kristall gemessen. Bei einem Kristall-Detektorabstand von 160 mm wurde ein hochaufgelöster Datensatz über einen Φ -Winkelbereich von 60° in 1.5°-Schritten mit einer mittleren Belichtungszeit von ebenfalls 5 Minuten aufgenommen. Der mit 30 sec. Belichtungszeit kürzer belichtete zweite Datensatz erstreckte sich über einen Φ -Winkelbereich von 60° in 2°-Schritten. Beide Proteine kristallisierten

isomorph und konnten in der tetragonalen Raumgruppe $I4_1$ indiziert werden. Durch die 4_1 -Schraubenachse ist nur jeder Reflex $l=4n$ entlang der c^* -Achse vorhanden. In dieser hochsymmetrischen Raumgruppe kristallisieren Proteinmoleküle relativ selten. Mit Stand 05.02.1999 befanden sich nur 14 Proteinstrukturen in Raumgruppe $I4_1$ in der PDB (Abola *et al.*, 1997). In **Tab. 3.17** ist eine Zusammenfassung der vereinigten Teildatensätze von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} dargestellt worden.

Tab. 3.17 Statistik der vereinigten Daten der Diffraktionsexperimente

	<i>Bc</i> -Csp	<i>Bc</i> -Csp ^{R3E}
Strahlenquelle	DESY-BW7A	
Wellenlänge (Å)	0.9493	
Temperatur (K)	100	
Raumgruppe	$I4_1$	
Zellachsen (Å)	76.99 / 76.99 / 47.07	77.13 / 77.13 / 48.20
Auflösungsb.¹ (Å)	15-1.17	15-1.40
Kristallgröße (μ)	1000x100x80	600x150x150
Mosaizität (°)	0.2	0.62
Reflexanzahl²	45179	26847
Vollständigkeit³ (%)	96.2 / 38.8	96.0 / 92.6
Redundanz	4.8	5.4
$\langle I/\sigma(I) \rangle^{3,4}$	33.4 / 2.1	24.5 / 2.6
$R_{\text{sym}}^{3,5}$ (%)	4.1 / 30.1	4.4 / 32.9
V_M-Wert⁶ (Å³/Da)	2.05	2.12
Mol. pro a. u.⁷	2 monomere Moleküle	

- 1: Auflösungsbereich des Datensatzes
- 2: Anzahl der unabhängigen Reflexe des reduzierten Datensatzes (siehe **Abschnitt 2.4.3**)
- 3: Vollständigkeit des Datensatzes innerhalb der angegebenen Auflösungsbereiche: 15-1.17Å / 1.18-1.17Å für *Bc*-Csp, 15-1.4Å / 1.41-1.40Å für *Bc*-Csp^{R3E}
- 4: I : Intensität des Reflexes, σ : Standardabweichung der Intensität des Reflexes
- 5: (**Glg. 2.5**)
- 6: Matthews V_M -Wert zur Packungsabschätzung, entspricht bei *Bc*-Csp/ *Bc*-Csp^{R3E} einem Wasseranteil von 40.0% /41.9% im Kristall (siehe **Abschnitt 2.6**)
- 7: Protein-Moleküle pro asymmetrischer Einheit

Bei der Vereinigung von Teildatensätzen in Raumgruppe $I4_1$ mußte eine alternative Indizierungsmöglichkeit eines Reflexes (hkl) bzw. (kh-l) in Bezug auf die Blickrichtung entlang der tetragonalen Symmetrieachse, die entlang der c -Achse verläuft, als eine Besonderheit beachtet werden. Beide Indizierungen sind möglich, die Vermischung beider ist aber wegen der Nichtäquivalenz der indizierten Reflexe nicht erlaubt. Deshalb mußte im gegebenen Fall eine

Reindizierung eines Teildatensatzes zur Anpassung an den anderen Teildatensatz in SCALEPACK (Otwinski & Minor, 1997) unter Verwendung der Matrix [Glg. 3.1] durchgeführt werden.

$$\begin{pmatrix} h' \\ k' \\ l' \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k \\ h \\ -l \end{pmatrix} \quad [\text{Glg. 3.1}]$$

3.3.2. Strukturanalyse in der tetragonalen Raumgruppe $I4_1$ von Bc -Csp

Die Strukturlösung von Bc -Csp erfolgte unter Verwendung der Methode des Molekularen Ersatzes mit dem Programm AMORE (CCP4, 1994). Als Suchmodell wurde das Strukturmodell von CspB (PDB-Eintrag: 1Csp) verwendet, das bis zu einer maximalen Auflösung von 2.45 Å verfeinert wurde (Schindelin *et al.*, 1993).

Die von der Sequenz von Bc -Csp abweichenden Aminosäuren L2, E3, S11, F15, Q23, D24, S31, A46, E53, T64 und E66, wurden mit Hilfe des Programms "O" (Jones *et al.*, 1991) zu Alanin mutiert (außer A46) bzw. der Rest A67 wurde gelöscht. Die Kreuzrotationsfunktion wurde entsprechend der Dimension des Suchmodells von etwa 30x30x30 Å in einer rechtwinkligen P1-Zelle mit etwas größeren Abmessungen durchgeführt. Dabei wurden intramolekulare Pattersonvektoren bis 12 Å einbezogen (siehe **Abschnitt 2.6**). Durch das Vorhandensein von zwei monomeren Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit ist der Kontrast der Einzellösungen, die ja lediglich 50% der asymmetrischen Einheit bilden, in der Kreuzrotations- und der Translationsfunktion sehr gering (**Tab. 3.18**). Da deshalb keine zweifelsfreie Bestimmung der richtigen Lösungen möglich war, wurden zu Beginn der Strukturlösung die 10 besten Rotationslösungen für die Rechnung der Translationsfunktionen benutzt. Dazu war eine Suche entlang der z-Achse wegen der Unbestimmtheit dieser in Raumgruppe $I4_1$ nicht nötig. Die beste, mittels "starrer Körper"-Verfeinerung verbesserte Translationslösung wurde für die Positionierung des zweiten Moleküls fixiert. Die auf Basis der Erweiterung des Suchmodells mit den restlichen neun Rotationslösungen durchgeführte Translationssuche führte zur eindeutigen Positionierung des zweiten Moleküls (**Tab. 3.18**). Nach einer anschließenden "starrten Körper"-Verfeinerung konvergierte die Gesamtlösung im Auflösungsbereich von 8-3 Å zu einem R-Wert von 42.2% mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.572. Im Gegensatz zur Verfeinerung der Einzellösung konnten jetzt auch die Koordinaten entlang der z-Achse verfeinert werden. Grund dafür ist der

Translationsanteil in z-Richtung des zweiten Moleküls in Bezug auf das erste Molekül innerhalb der asymmetrischen Einheit der tetragonalen Zelle. Durch die Isomorphie der *Bc*-Csp^{R3E}-Kristalle zu *Bc*-Csp war eine explizite Strukturlösung für die Mutante nicht erforderlich.

Tab. 3.18 Statistik der Strukturlösung von *Bc*-Csp durch molekularen Ersatz

Kreuzrotationsfunktion		
Auflösungsbereich (Å)	8-3	
$\alpha / \beta / \gamma^1$ (°)	79.83/82.83/117.49	17.70/106.03/235.08
Rang der Rotationslösung	1	6
Peakgröße	20.8	13.2
Standardabweichung	3.91	
Translationsfunktion, nmol=1 ⁵		
Auflösungsbereich (Å)	8-4	
$T_x / T_y / T_z^2$	0.8482/0.5804/0.0000	0.0179/0.7143/0.0000
R^3 (%) / C^4	53.1/0.158	53.3/0.142
"Starrer Körper"-Verfeinerung, nmol=1 ⁵		
Auflösungsbereich (Å)	8-3	
R^3 (%) / C^4	49.3/0.388	51.8/0.317
α, β, γ^1 (°)	80.50/86.43/116.86	19.10/106.42/235.97
T_x, T_y, T_z^2	0.8518/0.5879/0.0000	0.0152/0.7105/0.0000
Translationsfunktion, nmol=2 ⁶ , Lösung 1 Fix		
Auflösungsbereich (Å)	8-4	
α, β, γ^1	80.50/86.43/116.86	19.10/106.42/235.97
$T_x / T_y / T_z^2$	0.8518/0.5879/0.0000	0.5584/0.2514/0.9268
R^3 (%) / C^4	49.3/0.388	44.3/0.444
"Starrer Körper"-Verfeinerung, nmol=2 ⁶ , Lösung 1 Fix		
Auflösungsbereich (Å)	8-3	
R^3 (%) / C^4	42.2/0.572	
Lösung 1: α, β, γ^1 (°) T_x, T_y, T_z^2	80.46/88.12/117.79	0.8496/0.5882/-0.0013
Lösung 2: α, β, γ^1 (°) T_x, T_y, T_z^2	17.87/107.45/235.45	0.5567/0.2539/0.9237

- 1: Eulerwinkel der Kreuzrotationslösung
- 2: Translationsvektor der Translationslösung
- 3: R-Wert [Glg. 2.16]
- 4: Korrelationskoeffizient [Glg. 2.17]
- 5: Translationsuche und "starrer-Körper"-Verfeinerung mit einer Kopie des Suchmodells in der asym. Einheit
- 6: Translationsuche und "starrer-Körper"-Verfeinerung mit zwei Kopien des Suchmodells in der asym. Einheit

3.3.3. Strukturverfeinerung von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} mit SHELXL

Die Strukturverfeinerung mit SHELXL (Sheldrick & Schneider, 1997) wurde nacheinander für *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} gegen die integrierten Reflexintensitäten I_{obs} durchgeführt (**Tab. 3.19**). Die "starre Körper"-Verfeinerung und anschließende weitere Positions- und B-Faktorverfeinerung des *Bc*-CspB-Strukturmodells führte im Auflösungsbereich von 15-1.5 Å zu einem R/R_{free} von 27.8% / 33.1%. Innerhalb dieser Verfeinerungszyklen war eine Anpassung der Sequenz des Strukturmodells entsprechend der Primärstruktur von *Bc*-Csp ohne Schwierigkeiten möglich. Während der gesamten Verfeinerung wurden keine "NCS-restraints" verwandt. Die anfängliche automatische Wassersuche durch das Zusatzprogramm SHELXWAT führte im Auflösungsbereich von 15-1.3 Å zur Bestimmung von 146 Wassersauerstoffpositionen. Bei der Erweiterung der Daten bis zur Auflösungsgrenze von 1.17 Å konvergierte die Verfeinerung bei R/R_{free} von 21.8% / 25.1%. Die sich anschließende Verwendung von anisotropen B-Faktoren für alle Atome bei der Verfeinerung führte zu einer weiteren Verbesserung des Strukturmodells auf R/R_{free} 17.0% / 21.8%. Dabei wurden die SIMU/DELU-"restraints" mit Werten von 0.08/0.02 Å² sehr stark fixiert (siehe **Abschnitt 2.9**). Die zyklische Verbesserung des Strukturmodells durch Inspektion der (2mFo-DFc)-wie auch der (mFo-DFc)-Dichten wurde bis zur Konvergenz der Verfeinerung durchgeführt. Die hauptsächliche Verbesserung war durch die Definition von weiteren vollständig sowie halb besetzten Wassersauerstoffpositionen und zwei Na⁺-Kationenpositionen wie auch das Auffinden von drei 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (TRIS)-Molekülen möglich. Als Startmodell für TRIS wurden die Koordinaten des Liganden aus der 1.70 Å-Kristallstruktur einer Glykoamylase (PDB-Eintrag: 1ayx) verwendet. Eine weitere Verbesserung stellte die Definition von 16 Aminosäuren mit alternativen Seitenketten-Konformationen für die beiden Proteinmoleküle (14.3% aller Seitenketten) der asymmetrischen Einheit dar. Deren Verfeinerung erfolgte unter Anpassung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der zwei bis drei alternativen Konformere pro Aminosäure ("group occupancy refinement"), wobei die Summe der Teilbesetzungswahrscheinlichkeiten 1.0 ergab. Es wurden überall dort alternative Konformationen verfeinert, wenn Seitenkettenrotamere +(mFo-DFc)-Differenzdichtebereiche hoher Konturierung in der Nähe der Hauptkonformation erklärten, die wegen der Form der Dichte oder aufgrund von Abstandsbeschränkungen nicht durch Wassersauerstoffpositionen erklärt werden konnten. Zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen der neuen Seitenkettenkonformationen mit Proteinatomen bestätigten die Definition der alternativen Möglichkeiten. Für das N-terminale M1 von *Bc*-Csp-A konnten drei alternative Konformationen definiert werden. Diese Konformere waren besonders gut durch einen großen +(mFo-DFc)-Peak aufgrund der Fehlordnung des S δ feststellbar. Weitere Besonderheiten dieser Verfeinerung stellten

die Einbeziehung von Standardwasserstoffpositionen bestimmter Aminosäuren dar, die rotationssymmetrisch um σ -Schweratom-Bindungen delokalisiert waren ("riding hydrogen model"). Diese Modellerweiterung führte ohne Einführung zusätzlicher Parameter -die Position der delokalisierten Protonen ist an die Position des Zentralatoms geknüpft- zu einer Verbesserung von R/R_{free} um 0.80% / 0.95%. Bedingt durch die atomare Auflösung der Daten war eine signifikante Abschwächung der einschränkenden Planarität der Peptidbindung (Torsionswinkel $\omega=180^\circ$) zum Ende der Verfeinerung durch eine signifikante Lockerung der Planaritätseinschränkung durch $\sigma(\text{FLAT})=0.5 \text{ \AA}^3$, möglich. Der letzte Verfeinerungszyklus erfolgte unter Einbeziehung aller Meßdaten. Dabei konvergierte die Verfeinerung zu $R=12.5\%$ für alle 45179 Reflexe und $R=11.5\%$ für 38047 Reflexe mit $I>4\sigma(I)$. R_{free} betrug vor der Einbeziehung der 2307 Testreflexe in die Verfeinerung 17.9%. Die Analyse der vollständigen Blockmatrix von jeweils 20 Aminosäuren mit zwei überlappenden Aminosäuren pro Zyklus erlaubte die Bestimmung der atomaren Koordinatenfehler für jedes Atom der Struktur.

Die Verfeinerung von $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E}}$ wurde auf Basis des verfeinerten Strukturmodells des Wildtyp-Proteins nach Einführung der R3E-Mutation durchgeführt. Trotz einer geringeren Auflösung war eine stark eingeschränkte anisotrope B-Faktorverfeinerung möglich (DELU/SIMU 0.01/0.04). Zu Beginn dieser Verfeinerung verringerten sich R/R_{free} um 2.7% / 1.6%. Die im weiteren Verlauf der Verfeinerung durchgeführte Festlegung von 63 halbbesetzten und 189 vollständig besetzten Wassersauerstoffatomen, eines Na^+ -Kations sowie von 13 alternativen Seitenkettenkonformationen (11.6% aller Seitenketten) beider Proteinmoleküle, führte nach Einbeziehung des Testdatensatzes zu $R=14.2\%$ für alle 26842 Reflexe und $R=13.4\%$ für 23349 Reflexe mit $I>4\sigma(I)$. R_{free} betrug vor der Einbeziehung der 1306 Testreflexe in die Verfeinerung 20.5%.

Tab. 3.19 Statistik der Strukturverfeinerung von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

	<i>Bc-Csp</i>	<i>Bc-Csp</i> ^{R3E}
Auflösungsbereich (Å)	15-1.17	15-1.4
Reflexanzahl	45179	26847
Daten/Parameter¹	3.57	2.21
R²/R_{free}³ (%)	12.4/17.9	13.9/20.5
R^{2,4}/R_{4σ}^{5,4} (%)	12.5/11.5	14.2/13.4
Anzahl der fehlgeordneten Seitenketten A/B⁶	8 / 6	7 / 4
Anzahl der Proteinatome	1117	1083
Anzahl der Solvensmoleküle mit Besetzungszahl 1.0/0.5	238 / 33	189 / 63
Anzahl der Kationen	2 Na ⁺	1 Na ⁺
Anzahl sonstiger Liganden	3 TRIS	-
Stereochemie		
rmsd⁷ 1-2 Abstände (Å)	0.016	0.007
rmsd⁷ 1-3 Abstände (Å)	0.035	0.023
rmsd⁷ chirale Volumina (Å³)	0.070	0.060
rmsd⁷ Planarität (Å³)	0.355	0.333
rmsd⁷ DELU/SIMU⁸ (Å²)	0.022/0.047	0.004/0.035
mittlerer Koordinatenfehler⁹ der Proteinatome A/B⁶ (Å)	0.020/0.026	0.028/0.035
mittlerer Koordinatenfehler⁹ der anderen Atome (Å)	0.073	0.089
isotroper B-Faktor		
mittl. B-Faktor der Hauptkettenatome A/B⁶ (Å²)	11.9/16.6	16.4/22.1
mittl. B-Faktor der Seitenkettenatome A/B⁶ (Å²)	15.3/18.8	20.9/25.9
mittl. B-Faktor der anderen Atome (Å²)	33.7	34.1

- 1: Verhältnis der Meßdaten zu den Verfeinerungsparametern
- 2: R-Wert [Glg. 2.16] am Ende der Verfeinerung gegen den Arbeitsdatensatz
- 3: R_{free} [Glg. 2.20], 5% der Reflexe wurden als Testdatensatz gewählt
- 4: R-Wert [Glg. 2.16] am Ende der Verfeinerung gegen alle Daten
- 5: R-Wert [Glg. 2.16] am Ende der Verfeinerung gegen Daten mit I > 4σ(I)
- 6: Proteinmoleküle A und B der asymmetrischen Einheit
- 7: mittlere Abweichung von Standardwerten
- 8: Anisotropieeinschränkungen (siehe Abschnitt 2.9)
- 9: mittlerer Koordinatenfehler aus der Auswertung der vollständigen Blockmatrix

3.3.4. Die Qualität der verfeinerten Strukturmodelle von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

Die verfeinerten Strukturmodelle wurden nach stereochemischen Gesichtspunkten durch die Auswertung mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hoofst *et al.*, 1996) evaluiert. Wie in Abb. 3.32 dargestellt, befinden sich bei *Bc-Csp* 97.2% der Aminosäuren innerhalb der hochfavorisierten Regionen des Ramachandran-Diagramms. Die Aminosäuren N62 (*Bc-Csp*-A), F38 und K39 (*Bc-Csp*-B) kommen in den erlaubten l- und b-Bereichen des Diagramms vor. Im

Fälle von $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E}}$ liegen 98.1% der Aminosäuren in den hochfavorisierten Bereichen, N62 ($Bc\text{-Csp-A}$) und K39 ($Bc\text{-Csp-B}$) liegen in den erlaubten l- und b-Bereichen.

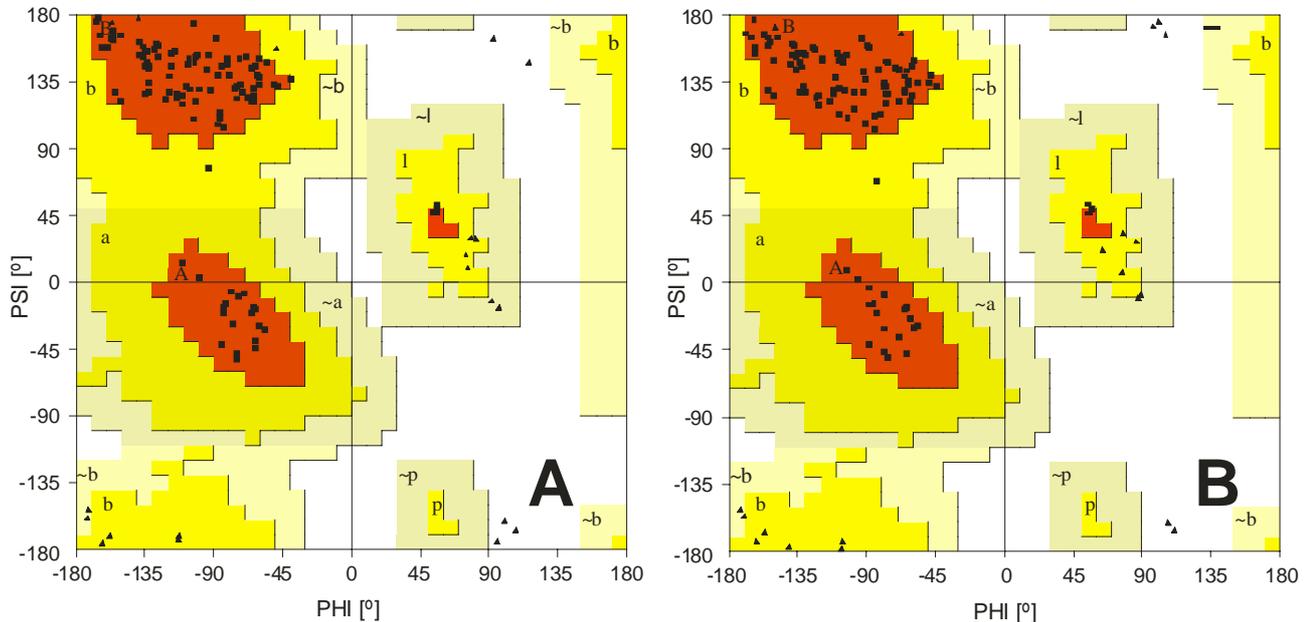


Abb. 3.32 Ramachandran-Diagramm für die dimeren Moleküle A) $Bc\text{-Csp-A/B}$ und B) $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E-A/B}}$. Die als Dreiecke gekennzeichneten Aminosäuren entsprechen Glycin. Die Diagramme wurden mit PROCHECK generiert (Laskowski *et al.*, 1993).

Die bei der Verfeinerung verwendeten stereochemischen Einschränkungen führten zu einer guten Übereinstimmung der verfeinerten Strukturmodelle mit den Standardgeometrien von Proteinen (Engh & Huber, 1991). So beträgt die mittlere Abweichung der 1,2-Bindungslängen 0.016 \AA für $Bc\text{-Csp}$ und 0.007 \AA für $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E}}$ (Tab. 3.19). Die im Vergleich zu $Bc\text{-Csp}$ mehr als zweimal so genaue Übereinstimmung des $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E}}$ -Modells mit den Standardgeometrien resultiert durch die stärker gewichteten stereochemischen Einschränkungen bei der Verfeinerung aufgrund der geringeren Auflösung der Diffraktionsdaten. Die auflösungsbedingte, höhere Qualität des $Bc\text{-Csp}$ Strukturmodells läßt sich anhand der Analyse der vollständigen Blockmatrix des letzten Verfeinerungszyklus zeigen. So beträgt der mittlere Koordinatenfehler für die Proteinatome von $Bc\text{-Csp-A/B}$ $0.020/0.026 \text{ \AA}$, der von $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E-A/B}}$ beträgt $0.028/0.035 \text{ \AA}$. Der sequenzabhängige mittlere Koordinatenfehler der Hauptkettenatome wurde in Abb. 3.33 dargestellt. Maxima treten vorwiegend in den sekundärstrukturlosen Schleifenbereichen V20-G23, A32-T40 sowie an den N- und C-terminalen Bereichen der Polypeptidketten auf. Innerhalb von β -Strängen, die in antiparallelen β -Faltblättern organisiert sind, ist der mittlere Koordinatenfehler erwartungsgemäß geringer. Interessanterweise sind $Bc\text{-Csp-B}$ sowie $Bc\text{-Csp}^{\text{R3E-B}}$ trotz eines prinzipiell gleichen

Verlaufs des Koordinatenfehlers schlechter definiert als die Moleküle A beider Strukturmodelle. Weiterhin ist auf der Basis dieser Auswertung kein signifikanter Unterschied im Vergleich des Wildtyps mit der Mutante festzustellen. Durch die bessere Auflösung der *Bc*-CspB-Struktur ist eine leichte Skalierung der Koordinatenfehler zu kleineren Werten feststellbar.

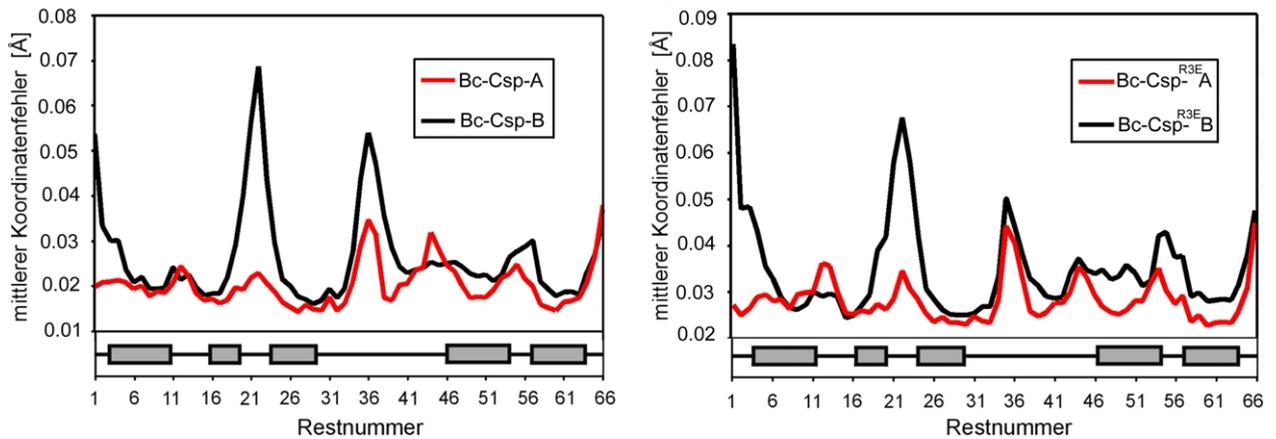


Abb. 3.33 Mittlerer Koordinatenfehler der Hauptkettenatome (N-C α -C) jedes Rests von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E}. Die grau unterlegten Kästen entsprechen β -Strängen.

Der Verlauf der mittleren, isotropen B-Faktoren der Hauptkettenatome beider Strukturmodelle ist eng mit dem Verhalten der Koordinatenfehler geknüpft. Dabei ist der mittlere B-Faktor innerhalb der β -Stränge deutlich kleiner als in den Schleifenbereichen (**Abb. 3.34**).

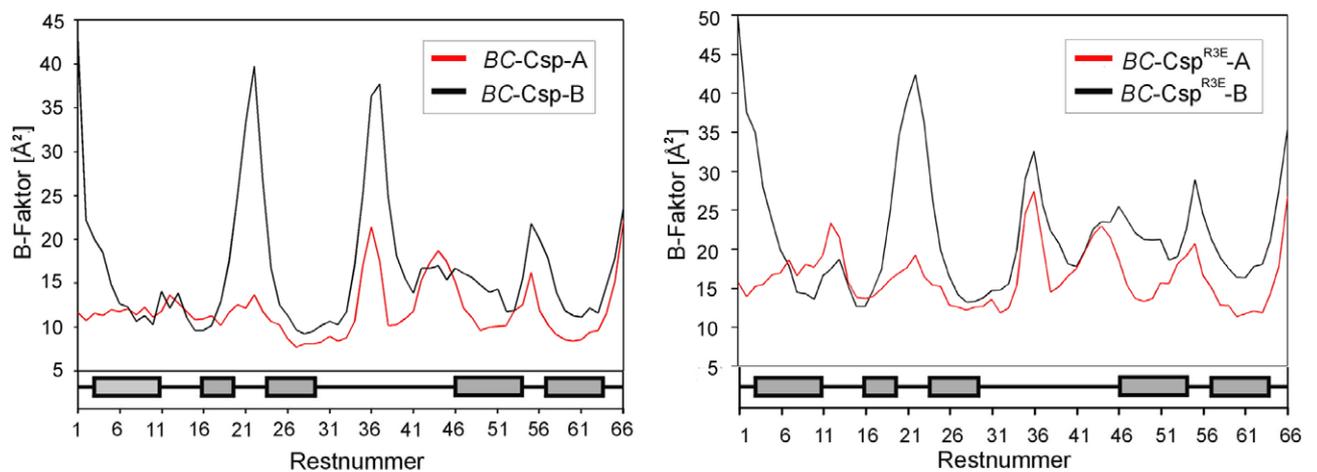


Abb. 3.34 Mittlerer isotroper B-Faktor der Hauptkettenatome (N-C α -C) jedes Rests von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E}. Die grau unterlegten Kästen entsprechen β -Strängen.

Kristallpackungskontakte haben ebenfalls einen großen Einfluß auf die Größe der atomaren Beweglichkeit im Gitter. Anhand dieser Daten läßt sich eine stärkere Fixierung der Moleküle A beider isomorph, kristallisierender Proteine diskutieren.

Die mittlere Anisotropie der Hauptkettenatome ist ein Maß für die Form der Anisotropieellipsoide (**Abb. 3.35**). Dieser Wert berechnet sich aus dem Verhältnis des größten Eigenwerts zum kleinsten Eigenwert der U-Matrix [**Glg. 2.27**]. Die Eigenwerte entsprechen den Halbradien der Ellipsoide. So bedeutet eine mittlere Anisotropie von 2.0 eine im Verhältnis zur kleinen Achse doppelt so große lange Halbachse. Bei Werten über 4.0 ist die Wahrscheinlichkeit einer alternativen Hauptkettenkonformation groß. Anhand der ausgewerteten Elektronendichtekarten war jedoch eine solche Modellbeschreibung nicht möglich.

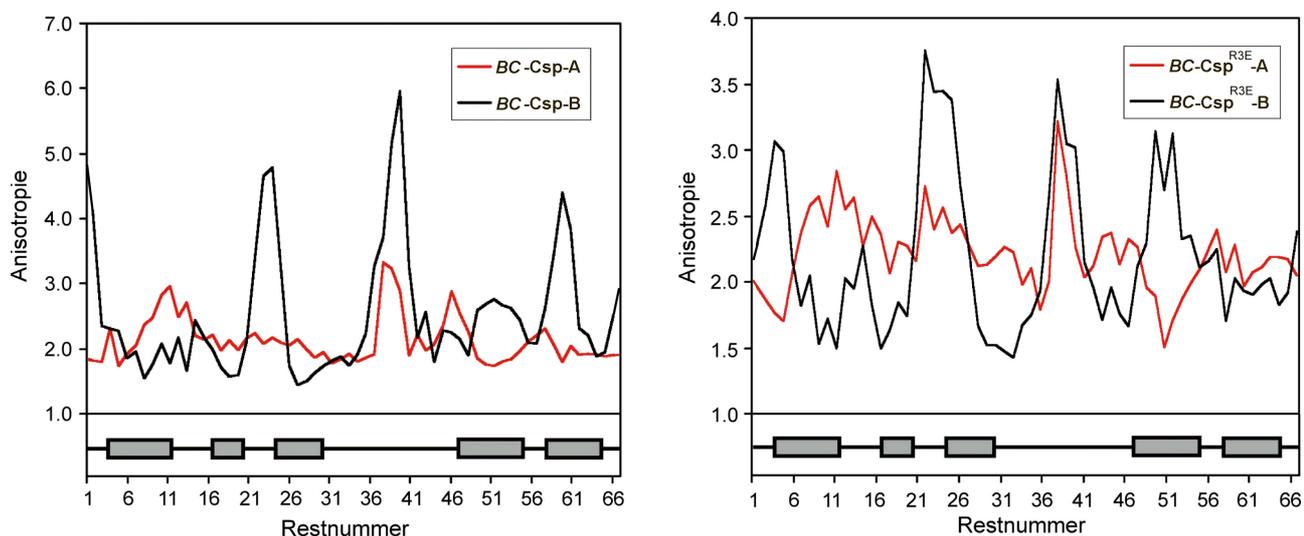


Abb. 3.35 Mittlere Anisotropie der Hauptkettenatome (N-C α -C) jedes Rests von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}. Die grau unterlegten Kästen entsprechen β -Strängen.

Die Standardabweichung des Verlaufs des Omega-Winkels, der die Planarität der Peptidbindung beschreibt, beträgt beim dimeren *Bc-Csp* 5.6° und beim dimeren *Bc-Csp*^{R3E} 5.0°. Durch die erzielte atomare Auflösung konnten mit einer großen Genauigkeit die Atompositionen bestimmt werden. Diese Genauigkeit ist die Grundlage zur sicheren Bestimmung von zusammengesetzten Größen wie Diederwinkel und anderen Größen. Die größten Abweichungen von der Planarität der Peptidbindung treten bei *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E} bei den Aminosäuren G37-B (154.9°, 167.4°) und V47-A (161.0°, 159.2°) und V47-B (161.8°, 161.0°) auf (**Abb. 3.36**). Beide G37- sowie V47-Reste sind im Bereich der größten, mehr als 15 Aminosäuren umfassenden Schleife, lokalisiert. Nach **Abb. 3.33** - **Abb. 3.35** zählt dieser Schleifenbereich zu dem Bereich mit dem größten experimentellen Fehler (größte B-Faktoren, große Koordinatenfehler, große Anisotropie) innerhalb

der Polypeptidkette. Alle anderen Omega-Winkel schwanken bei *Bc*-Csp-A/B um Mittelwerte von $179^\circ/178^\circ$ und bei *Bc*-Csp^{R3E}-A/B um Mittelwerte von $179^\circ/179^\circ$ mit einer Standardabweichung von $4.7^\circ/4.5^\circ$ für *Bc*-Csp / *Bc*-Csp^{R3E}. Trotz des delokalisierten π -Systems der Peptidbindung, ist eine Verletzung der Planarität dieser Diederbindung in engen Grenzen mit Abweichung der maximalen Orbitalüberlappung durch eine möglich (MacArthur & Thornton, 1996).

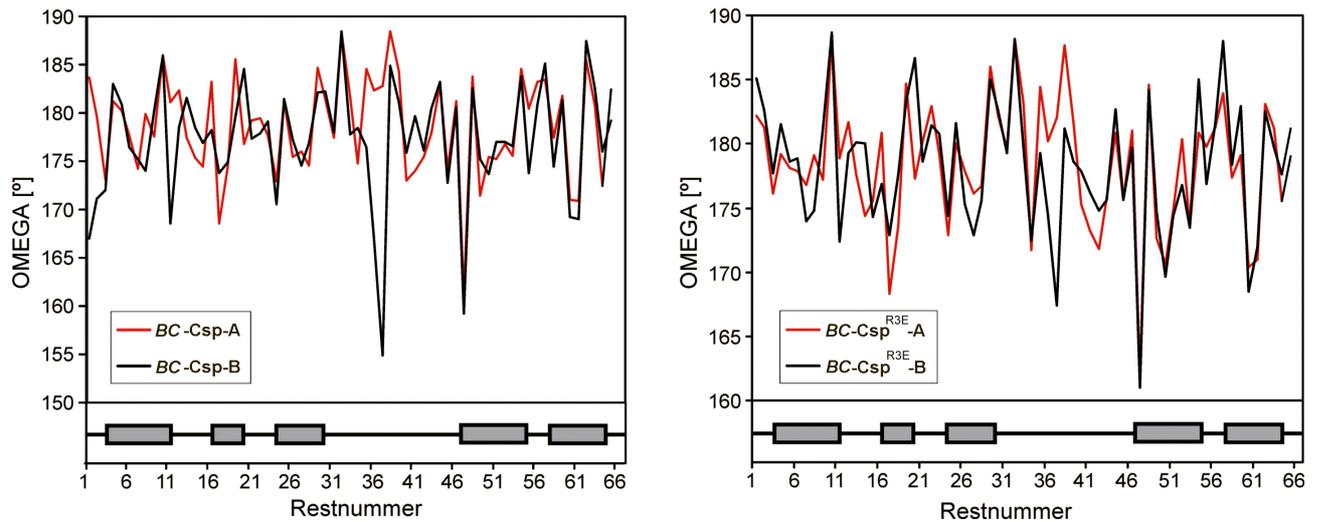


Abb. 3.36 Abweichung von der Planarität der Peptidbindung jedes Rests von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E}. Die grau unterlegten Kästen entsprechen β -Strängen.

Die hohe Qualität der verfeinerten Strukturmodelle beruht auf der Modellierung von anisotropen B-Faktoren. Dadurch ist eine extrem genaue Beschreibung der Strukturfaktorgleichung möglich (siehe **Abschnitt 2.9**). Die verfeinerten Anisotropieellipsoide tragen zusätzlich Informationen über die richtungsabhängige Beweglichkeit der Atome. In **Abb. 3.37** sind die Anisotropieellipsoide bei einer 50 prozentigen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der $C\alpha$ -Atome im Volumen des Körpers für *Bc*-Csp-A dargestellt. Hierbei ist relative leicht die größere anisotrope Beweglichkeit der $C\alpha$ -Atome in den Schleifenbereichen erkennbar. Da alle verfeinerten Atome über diese zusätzliche Strukturinformation verfügen, ist eine detaillierte Beschreibung der Dynamik dieser Proteinstrukturen möglich.

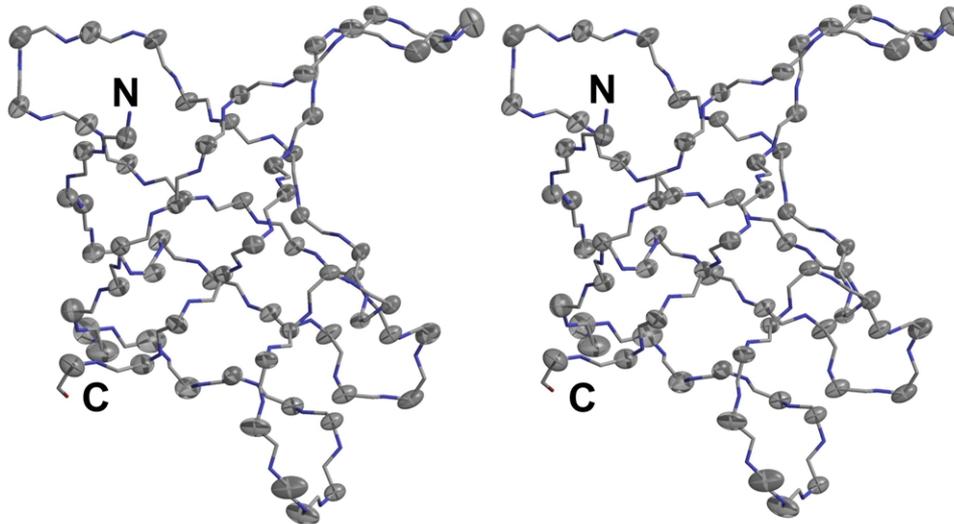


Abb. 3.37 Anisotropieellipsoide (P=50%) der $\text{C}\alpha$ -Atome der Polypeptidkette von *Bc-Csp-A*

3.3.5. Die Struktur von *Bc-Csp* und *Bc-Csp*^{R3E}

Die Sekundärstruktur wurde mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson & Thornton, 1996) analysiert. Die Tertiärstruktur von *Bc-Csp* besteht aus der Anordnung von fünf β -Strängen sowie vier Schleifenbereichen zu einer β -Faß Struktur. Dabei bilden die β -Stränge 1-3 und 4-5 zwei antiparallele β -Faltblätter aus, welche das globuläre Protein in zwei Subdomänen über die große, 16 Aminosäuren umfassende Schleife S3 teilt (Abb. 3.38). Diese Subdomänen sind wiederum um etwa 90° gegeneinander versetzt und bilden damit ein "L". Der Verlauf der β -Stränge 1-4 entspricht dem bekannten "Greek-Key"-Motiv. In Abb. 3.39 ist die Faßstruktur nach Drehung um 90° dargestellt. Die 16 Reste umfassende Schleife S3 überspannt hierbei eine Seite des Fasses, wobei die andere Seite nicht weiter stabilisiert ist. N- und C-Terminus liegen etwa 15 \AA voneinander entfernt auf derselben Seite der globulären Struktur und werden durch den Strang β_4 voneinander getrennt. Innerhalb der Faßstruktur bilden die solvensunzugänglichen, hydrophoben Seitenketten wie V6, F9, I18, V26, V28, I33, L41, V47, F49, I51 und V63 den hydrophoben Kern des Proteins. Im Gegensatz dazu sind die aromatischen Aminosäuren W8, Y15, F17, F27, F30 und F38 sowie die basischen Reste K7, K13, H29 und R56, die für die biologischen Eigenschaften der Kälteschockproteine bedeutend sind, solvensexponiert (Schindelin *et al.*, 1993). Sie bilden innerhalb der Stränge β_1 - β_3 das RNP1- und RNP2-RNA-Bindungsmotiv, welches auch bei CspB, CspA und anderen Proteinen mit ähnlichen nukleinsäurebindenden Eigenschaften gefunden wurde (Schindelin *et al.*, 1993; Schindelin *et al.*, 1994).

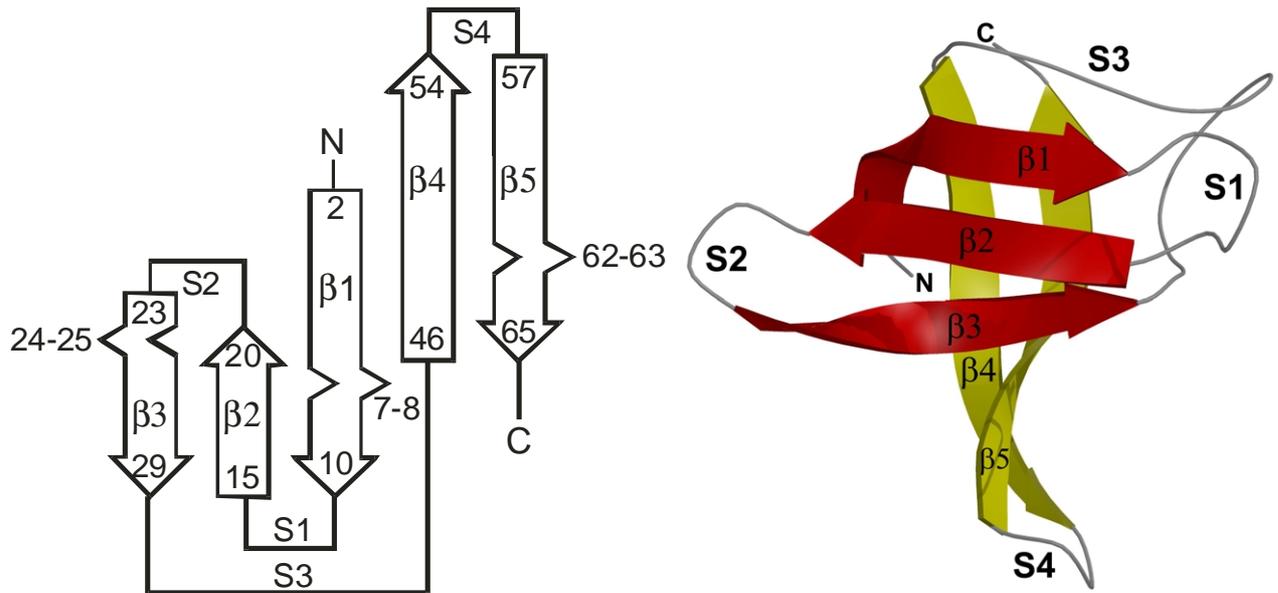


Abb. 3.38 2D- und 3D-Sekundärstrukturdiagramm von *Bc-Csp*

Die antiparallelen β -Faltblätter die durch die β -Stränge $\beta 1$ -2, $\beta 2$ -3 und $\beta 4$ -5 aufgebaut werden, weisen sogenannte β -Ausbuchtungen, " β -Bulges", der Aminosäuren K7-W8, S24-D25 und N62-V63 auf. Innerhalb der Schleifensegmente befinden sich mehrere Haarnadelschleifen " β -Turns". Dazu gehören die Bereiche N11-G14 (Typ-I), V20-G23 (Typ-II), E42-Q45 (Typ-II) und G54-G57 (Typ-I).

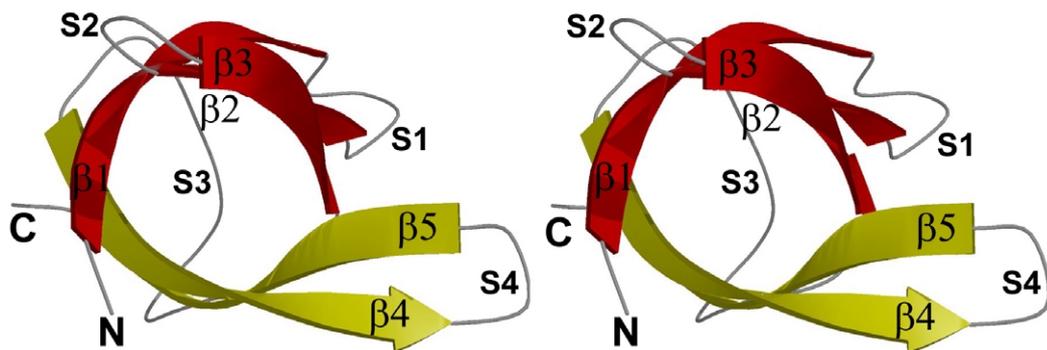


Abb. 3.39 Darstellung der β -Faßstruktur von *Bc-Csp*

Die Analyse von *Bc-Csp*^{R3E} zeigt eine identische Sekundär- und Tertiärstruktur zum Wildtypprotein. Die R3E-Mutation hat somit keinen meßbaren Einfluß auf diese Eigenschaften. Weiterhin sind auch die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Kälteschockproteine aus *B. subtilis* und *B. caldolyticus* nahezu identisch. Geringfügige Unterschiede treten im Rahmen dieser Analyse

durch eine Erweiterung der β -Faltblattstruktur zwischen den Strängen $\beta 2$ und $\beta 3$ im Bereich von S2 aufgrund der höheren Flexibilität von G23 (*B. caldolyticus*) zu Q23 (*B. subtilis*) auf. Der Schleifenbereich S4 unterscheidet sich im Falle des thermophilen Proteins durch die zusätzliche Stabilisierung auf Grundlage von zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen G54 und G57 gegenüber CspB aus dem mesophilen *B. subtilis*. Grund dafür kann die unterschiedliche Struktur der Dimeren-Kontaktfläche sein, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird.

CspB bildet über eine zweizählige kristallographische Drehachse eine Homodimerstruktur aus. Diese wird durch ein antiparalleles Faltblatt zwischen $\beta 4$ und $\beta 4'$ realisiert. Im Falle von *Bc*-Csp konnte eine ähnliche aber nicht identische Quartärstruktur gefunden werden (**Abb. 3.40**).

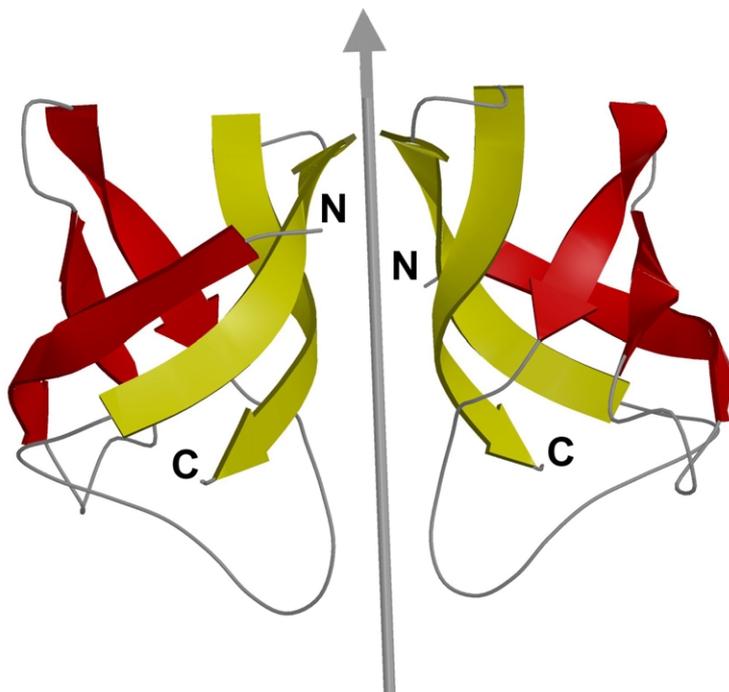


Abb. 3.40 Homodimerstruktur von *Bc*-Csp. Der Pfeil kennzeichnet die zweizählige, nichtkristallographische Symmetrieachse.

Im Unterschied zu CspB wird die Dimerenbindung über eine nichtkristallographische zweizählige Symmetrieachse realisiert, während dort die Dimerisierung über eine zweizählige kristallographische Drehachse erfolgt. Dabei wird das intermolekulare, antiparallele Faltblatt lediglich durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Q53-A und Q53-B stabilisiert. Im Falle von CspB sind sechs Wasserstoffbrückenbindungen, die ausschließlich das antiparallele β -Faltblatt stabilisieren, vorhanden (Schindelin *et al.*, 1993).

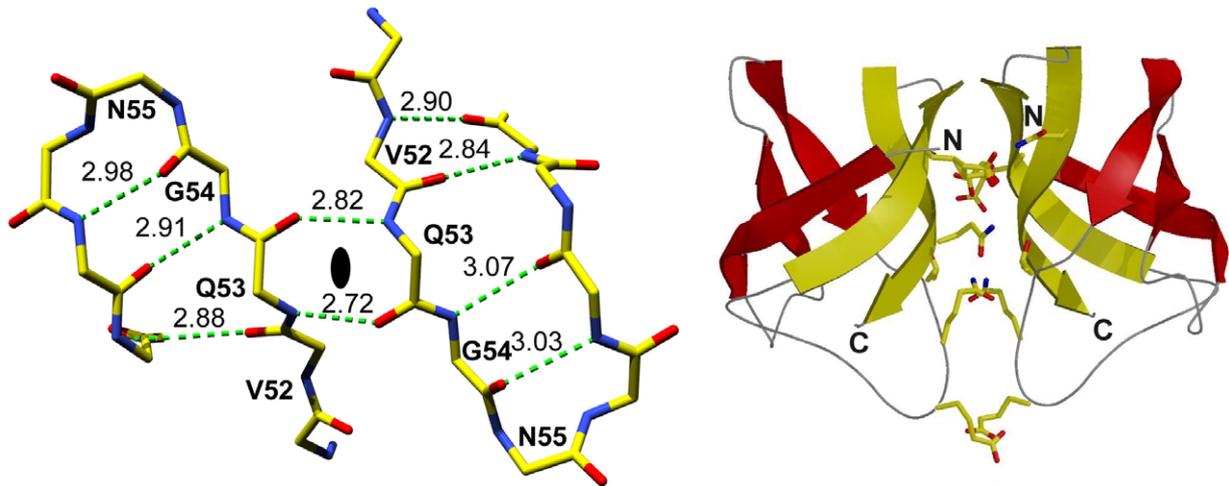


Abb. 3.41 Intermolekulares antiparalleles Faltblatt bei der Dimerwechselwirkung von *Bc-Csp*, sowie ein Überblick über die Seitenkettenwechselwirkung bei der Dimerstabilisierung (Darstellung der Hauptkonformationen).

Zusätzlich wird die Dimerstruktur durch sechs weitere, direkte intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen (**Tab. 3.20**) und eine große Anzahl von wasservermittelten Kontakten stabilisiert. Daran sind von CspB abweichende Aminosäuren bei der Ausbildung der Dimerwechselwirkung beteiligt. Der Austausch von S31 nach T31 und von E53 nach Q53, sowie die Tatsache, daß in beiden Fällen Hauptkettenwechselwirkungen für die Stabilisierung verantwortlich sind, vermag die unterschiedliche Geometrie der Dimerisierung der Csp-Proteine aber nicht vollständig zu erklären.

Tab. 3.20 Intermolekulare Wechselwirkungen in *Bc-Csp*-Dimeren

Bc-Csp-A	Bc-Csp-B	Entfernung [Å]
T31-O	Q34-NE2	3.08
Q34-NE2	T31-O	3.05
E36-OE1A	E36-OE2A	3.14
G37-N	E36-OE2A	3.16
K39-NZ	E36-OE2B	2.66
	E36-OE2C	2.83
Q53-O	Q53-N	2.72
Q53-N	Q53-O	2.82
Q59-NE2	E50-OE2A	2.98

Das Dimeren-Kontaktfläche hat in Falle von *Bc-Csp* eine Größe von 959 \AA^2 pro Monomer, im Falle von CspB beträgt die Wechselwirkungsoberfläche 824 \AA^2 . Diese wurde durch die Differenz der solvenszugängigen Dimer- zur Monomeroberfläche errechnet (CCP4, 1994). Auf der Grundlage der

strukturellen Daten, einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung und einer um 135 \AA^2 größeren Wechselwirkungsfläche, kann die Dimerwechselwirkung von *Bc*-Csp als leicht stabiler eingeschätzt werden. Die unterschiedliche Dimerisierung der Csp-Proteine scheint aber kein Kristallpackungsartefakt zu sein. Dafür sprechen die Dimerenbildung von CspB in zwei unterschiedlichen Kristallformen und Gelretardationsexperimente unter nativen Bedingungen bei CspB (Schindelin *et al.*, 1993). Mikrokolorimetrische- und chromatographische Untersuchungen der Anionenabhängigkeit der Dimerisierung von CspB zeigen eine Verhinderung dieser durch Zugabe von 50 mM Natriumphosphat pH 7.5 (Makhatadze & Marahiel, 1994). Die Autoren erklären diesen Effekt mit einer möglichen Phosphatbindung an Strang β_4 bzw. einer direkten Phosphatwechselwirkung mit N55 und R56. Sollte die vermutete Wechselwirkung stattfinden, müßte die Dimerisierung von *Bc*-Csp analog zu CspB bei der Zugabe von Phosphat unterdrückt werden können. Über eine mögliche biologische Funktion der dimeren Proteine liegen zur Zeit noch keine Informationen vor. Die Tatsache der unterschiedlichen Dimerisierungen von CspB im Vergleich mit CspB und die nicht beobachtete Dimerisierung von CspA aus *E. coli*, deuten aber auf eine geringere biologische Relevanz der Dimerisierungseigenschaften hin.

3.3.6. Der Vergleich der Csp-Strukturen

Als Basis für die Diskussion der Gemeinsamkeiten und strukturellen Unterschiede der betrachteten Csp-Proteine wurden Superpositionierungen aller möglichen Kombinationen von Monomeren durchgeführt (Tab. 3.21). Beim Vergleich aller identischen Atome wurden jeweils die Hauptrotamerkonformationen (Rotamere mit höchster Besetzungszahl) der Seitenketten benutzt.

Tab. 3.21 Superpositionierung der Kälteschockproteine

rmsd (Å)	C α / alle Atome ¹	<i>Bacillus caldolyticus</i>			<i>B. subtilis</i>
		<i>Bc</i> -Csp-B	<i>Bc</i> -Csp ^{R3E} -A	<i>Bc</i> -Csp ^{R3E} -B	CspB
	Bc-Csp-A	0.567/1.017	0.104/0.481	0.476/0.950	0.877/1.241
	Bc-Csp-B		0.581/1.008	0.324/0.727	0.796/1.309
	Bc-Csp^{R3E}-A			0.490/1.001	0.862/1.147
	Bc-Csp^{R3E}-B				0.935/1.360

1: beim Vergleich von Proteinen unterschiedlicher Sequenz wurden ebenfalls alle identischen Atome in unterschiedlichen Aminosäuren verglichen

Wie schon aus den rmsd-Werten der numerischen Auswertung ersichtlich (**Tab. 3.21**), unterscheiden sich die beiden Kopien der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit von *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} sowohl bei der Überlagerung der C α -Atome als auch unter Einbeziehung aller Atome, aufgrund von unterschiedlichen Kristallkontakten. Der Vergleich, der in den isomorphen Elementarzellen identisch gepackten Monomere, zwischen *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} (A-A, B-B), zeigt eine weitgehende Übereinstimmung im Hauptkettenbereich mit 0.104/0.324 Å (A-A, B-B), zeigt eine weitgehende Übereinstimmung im Hauptkettenbereich mit 0.104/0.324 Å wie auch bei der Überlagerung aller identischer Atome mit 0.481/0.727 Å.

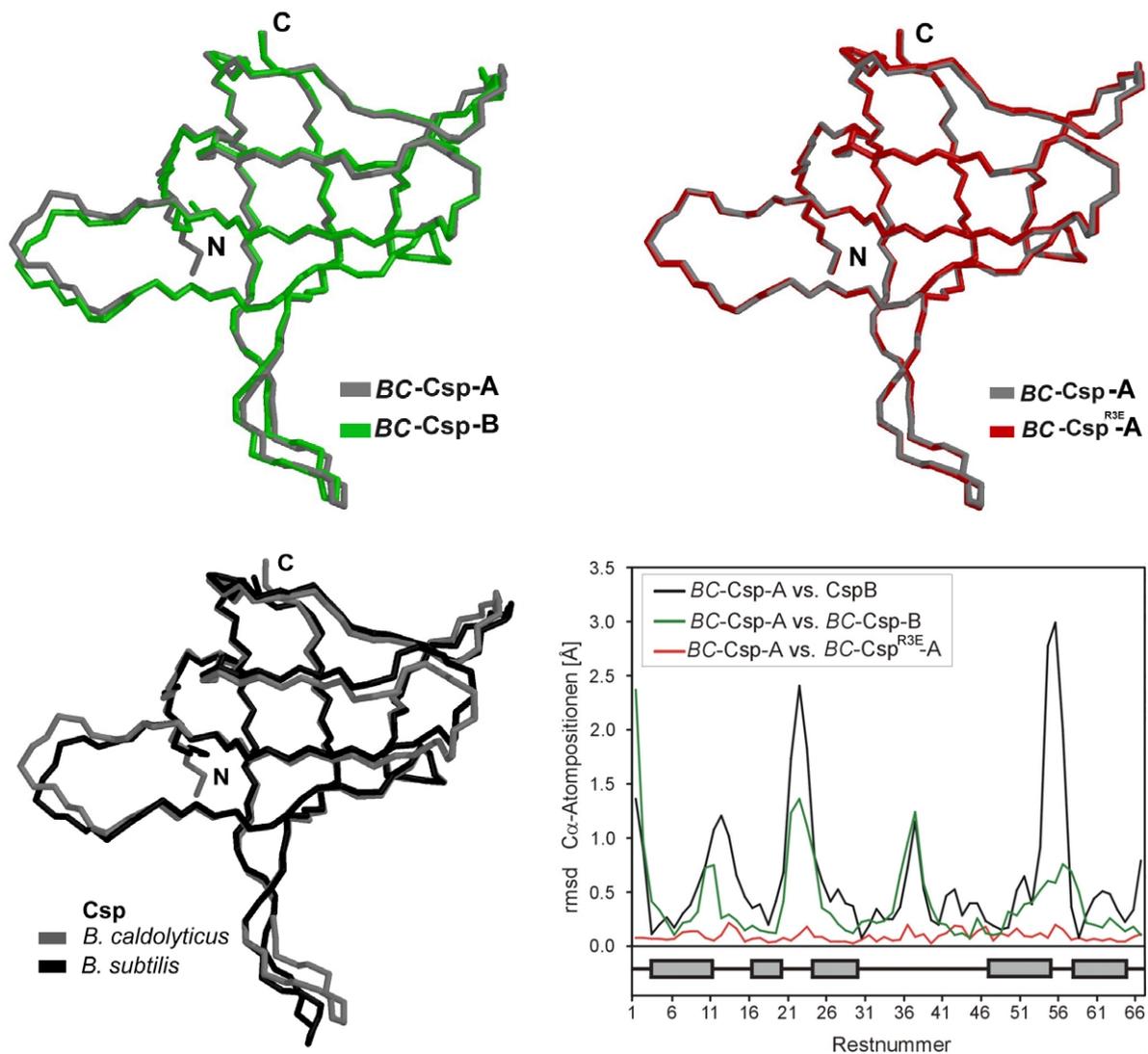


Abb. 3.42 C α -Überlagerung von *Bc*-Csp-A mit *Bc*-Csp-B, *Bc*-Csp^{R3E}-A und *Bc*-Csp-A sowie *Bc*-Csp-A mit CspB

Wie aus **Abb. 3.42** hervorgeht, befinden sich die Bereiche mit den größten Abweichungen der Hauptkette innerhalb der flexiblen Schleifen S1-S4. Da die sequenzabhängigen Maxima dieser Abhängigkeit bei der Überlagerung vom Molekül *Bc*-Csp-B mit *Bc*-Csp-A (**Abb. 3.42**, grüne

Kurve) identisch mit der Superpositionierung von *Bc*-Csp-A mit CspB (Abb. 3.42, schwarze Kurve) sind, können die größten Unterschiede der Strukturen durch die unterschiedlichen Packungskontakte flexibler Schleifenbereich erklärt werden (siehe Abschnitt 3.3.9). So zeigt der Vergleich des Hauptkettenverlaufs im Bereich zwischen Rest 19 und 26 innerhalb von Schleife S2 signifikante Unterschiede zwischen den Kälteschockproteinen *Bc*-Csp und CspB (Abb. 3.43) aber auch zwischen *Bc*-Csp-A und *Bc*-Csp-B (Abb. 3.42).

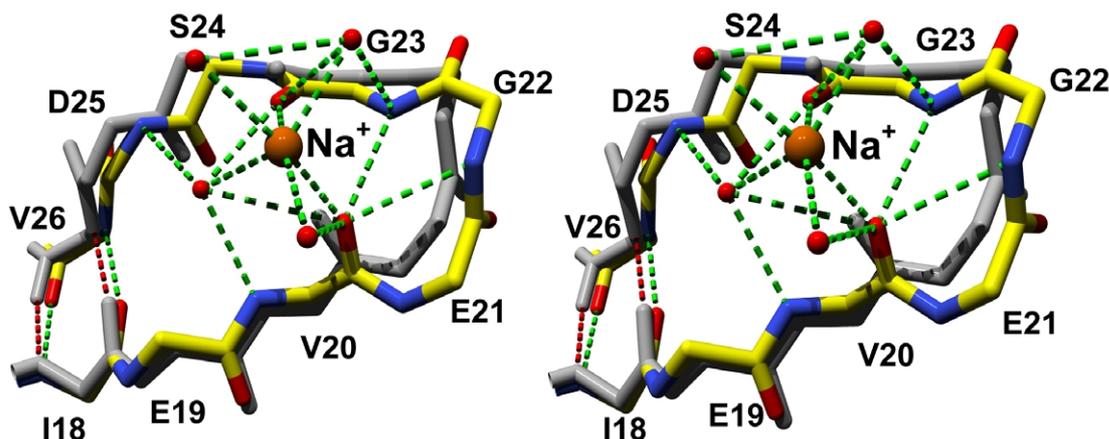


Abb. 3.43 Stabilisierung des Schleifenbereichs S2 von *Bc*-Csp-A. Hauptkettenatome von *Bc*-Csp-A farbig und CspB in grau, nach Überlagerung der C α -Positionen des Schleifenbereich S2. Ein solvatisiertes Na⁺-Kation (orange) stabilisiert den Schleifenbereich.

Der in Abb. 3.43 grau gefärbte Verlauf der Hauptkette von CspB weicht im besonderen Maße zwischen den Resten V20 und D25 von der Struktur von *Bc*-Csp-A ab. Grund dafür kann der Austausch Q23G sein. Die Abfolge von zwei Glycinresten G22-G23 innerhalb von *Bc*-Csp, führt zu einer höheren Flexibilität der Hauptkette. Die zusätzliche Bindung von Na⁺, die bei allen *Bc*-Csp Varianten, außer *Bc*-Csp^{R3E}-B, beobachtet werden konnte, stabilisiert den Schleifenbereich (siehe Abschnitt 3.3.8). Die Möglichkeit der Na⁺-Bindung bei *Bc*-Csp kann nicht vollständig ausgeschlossen werden (unterschiedliche Auflösungen der verglichenen Strukturen). Innerhalb des CspB-Proteins steht jedoch die Carbonylgruppe von Q23 nicht für die Kationenbindung zur Verfügung. Die in Abb. 3.43 grün dargestellten, zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen von *Bc*-Csp-A (Darstellungsgrenze >3.3 Å), sind eine Folge der veränderten Geometrie von Schleife S2. Lediglich zwischen I18 und V26 konnten bei CspB zwei Wasserstoffbrückenbindungen (rot) identifiziert werden.

Eine weitere signifikante Abweichung zwischen *Bc*-Csp und CspB ist der Schleifenbereich S4, der sich von Rest G54 bis G57 erstreckt. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich eine einzige variierte Aminosäure (E53Q). Bei beiden Proteinen bildet der Bereich um Q53 die Dimerisierungs-

kontaktstelle für die Ausbildung des antiparallelen, intermolekularen β -Faltblatts $\beta 4$ - $\beta 4'$. Ob die E53Q Mutation für die unterschiedlichen Dimerwechselwirkungen der gesamten Struktur verantwortlich ist oder die unterschiedliche Dimerisierung die veränderte Konformation der Hauptkette in Schleife S4 bedingt, kann nur spekuliert werden. Ausgehend von stereochemischen Betrachtungen sollten beide Dimerstrukturen für jedes Protein möglich sein.

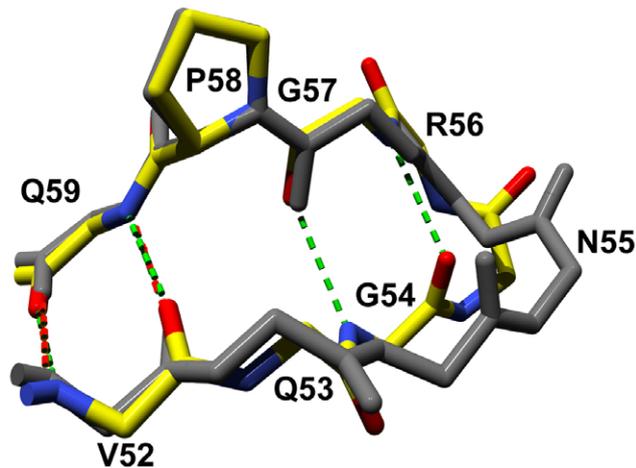


Abb. 3.44 Hauptkettenatome und Seitenkette des P58 von *Bc-Csp-A* farbig und CspB grau gefärbt, nach Überlagerung der C α -Positionen des Schleifenbereich S4.

Die Überlagerung von *Bc-Csp-A* mit *Bc-Csp*^{R3E}-A zeigt eine vom R3E-Austausch unbeeinflusste Hauptkettenkonformation (**Abb. 3.42**). Die strukturellen Auswirkungen der R3E-Mutation des *Bc-Csp* sind sehr gering und lediglich auf die Seitenkettenkonformationen in der Umgebung des Mutationbereichs konzentriert. Die auf der Grundlage des Strukturmodells von CspB (Schindelin *et al.*, 1993) und durch die Variation von E3 auf R3 und A46 auf E46 beim Übergang vom mesophilen zum thermophilen Protein vorgeschlagene Ausbildung einer solvens exponierten Salzbrücke, konnte nur teilweise bestätigt werden. Der Vergleich der beiden *Bc-CspB*-Moleküle hinsichtlich der Ausbildung der R3-E46-Salzbrücke, zeigt ein differenziertes Bild. In **Abb. 3.45-A** ist die Situation für das Molekül A dargestellt. Zusätzlich zu *Bc-Csp-A* (grünes Modell) ist die superpositionierte *Bc-Csp*^{R3E}-A Struktur dieses Bereichs dargestellt. Im Falle von *Bc-Csp-A* findet lediglich eine Interstrangstabilisierung durch schwache Wechselwirkung der fehlgeordneten K5B Seitenkette zu E46 (N ζ -K5B zu O ϵ 2-E46 = 3.9 Å) statt. Die potentielle Salzbrücke zwischen N η 1/2 von R3 zu O ϵ 1/2 von E46 ist 4.8 Å lang und damit praktisch nicht vorhanden. R3 ist in keinen Kristallpackungskontakt involviert. Die superpositionierte *Bc-Csp*^{R3E}-A Struktur zeigt bei einer identischen Konformation von E3 im Vergleich zu R3 eine veränderte Konformation der Reste K5 und E46 unter Erhalt der Hauptkettenkonformation.

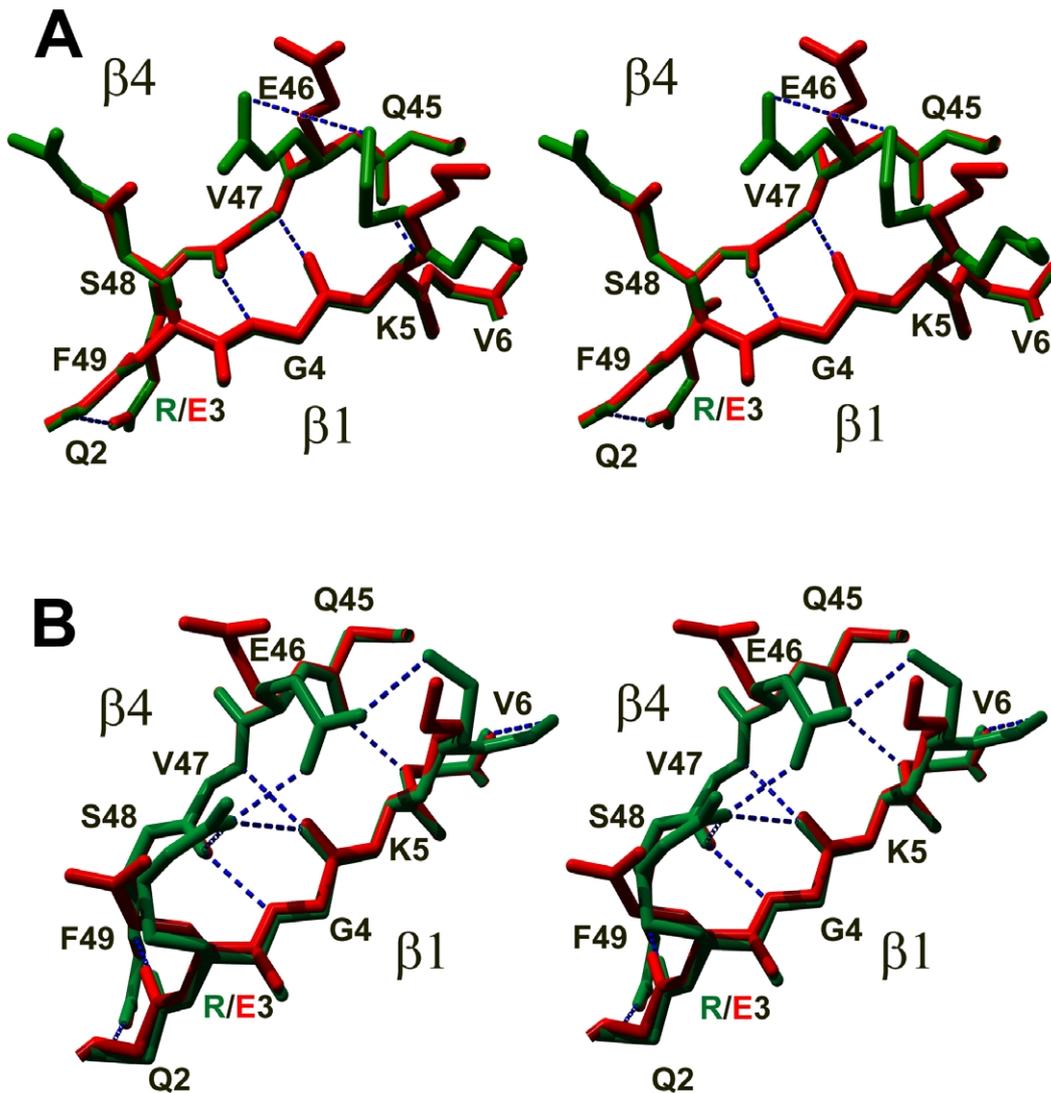


Abb. 3.45 R3E-Mutationsbereich des *Bc*-Csp. A) Überlagerung von *Bc*-Csp-A mit *Bc*-Csp^{R3E}-A, B) Überlagerung von *Bc*-Csp-B mit *Bc*-Csp^{R3E}-B. In grün ist der Wildtyp, in rot der superpositionierte Kettenverlauf von *Bc*-Csp^{R3E} dargestellt worden. Die Seitenkette K5 von *Bc*-Csp ist fehlgeordnet.

Interessanterweise konnte bei der Auswertung des Bereichs von *Bc*-Csp-B ein anderes Bild aufgezeigt werden. In **Abb. 3.45-B** ist eine analoge Überlagerung der Moleküle B wie für Moleküle A (**Abb. 3.45-A**) dargestellt worden. In diesem Falle findet die vorhergesagte Ausbildung der R3-E46 Salzbrücke (N η 1/2-R3 zu O ϵ 1-E46 = 2.75 Å) statt. Zusätzlich ist eine weitere Stabilisierung zwischen der Seitenkette des fehlgeordneten Rests K5 mit E46 mit einem Abstand von 2.74 Å (N ζ -K5B zu O ϵ 2-E46) vorhanden. Die Ausbildung der R3-E46 bzw. K5-E46 Wechselwirkung bedingt eine veränderte Seitenkettenkonformation für R3, E46 und K5 im Vergleich der Konformation der

Seitenketten bei *Bc*-Csp^{R3E}-B. Der Hauptkettenverlauf bleibt hierbei ebenfalls unbeeinflusst. Fügt man beide Einzelbeobachtungen zu einem Gesamtbild zusammen, läßt sich folgendes schließen. Die Tertiärstruktur des *Bc*-Csp-Proteins wird durch die Ausbildung einer Salzbrücke (R3-E46) und einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke zwischen K5 und E46 stabilisiert. Die R3E-Mutation führt zu einer Zerstörung dieser stabilisierenden Wechselwirkungen. Davon ist auch die K5-E46-Wechselwirkung betroffen. Möglich ist aber auch, daß durch die geringere Auflösung der *Bc*-Csp^{R3E}-Struktur die fehlgeordnete Seitenkette von K5 nicht identifizierbar ist. Die Ausbildung dieser Salzbrücke ist aber für *Bc*-Csp nicht zwingend. Obwohl R3 von *Bc*-Csp-A nicht durch Packungskontakte beeinflußt wird, ist die R3-E46 Salzbrücke praktisch nicht vorhanden. Daraus läßt sich eine geringere Bedeutung der speziellen ionischen Wechselwirkung für die Stabilität des *Bc*-Csp aus dem thermophilen Organismus folgern. Die veränderten elektrostatischen Eigenschaften aufgrund der Zusammensetzung des Kristallisationspuffers (45% MPD, etc., **Tab. 3.16**) wie auch die veränderte mikroskopische Dielektrizitätskonstante können die ionischen Wechselwirkungen abschwächen.

Analog zur R3E-Mutante sind im Falle von CspB die beschriebenen, stabilisierenden Seitenkettenwechselwirkungen nicht vorhanden (E3, A46). Diese strukturellen Unterschiede können damit ein Grund für die verringerte Thermostabilität des CspB-Proteins aus dem mesophilen *B. subtilis*) sein.

3.3.7. Seitenketten mit alternativen Konformationen

Die hochauflösenden Diffraktionsexperimente an *Bc*-Csp und *Bc*-Csp^{R3E} ließen die Beschreibung aller Seitenkettenkonformationen zu. Zusätzlich konnten durch die erweiterte Datenbasis, aber auch wegen der Durchführung eines Kryodiffraktionsexperiments, eine Vielzahl von alternativen Seitenkettenkonformationen verfeinert werden. Durch die Untersuchung des Kristalls bei einer Temperatur von 100 K können diskrete Konformationen "ausgefroren" werden (Walsh *et al.*, 1998). Darunter versteht man die Population einer geringen Anzahl unterschiedlicher, diskreter von Seitengruppenrotamere mit hoher Besetzungsdichte eines Restes im Kristall, die bei einer höheren thermischen Beweglichkeit nicht separat beobachtbar wären. In **Tab. 3.22** sind alle alternativen Seitenkettenkonformationen der *Bc*-CspB-Struktur aufgelistet.

Tab. 3.22 Aminosäuren mit alternativen Seitenkettenkonformationen bei CspB

	Amino- säure	Besetzungszahlen der Konformationen (%)				Amino- säure	Besetzungszahlen der Konformationen (%)		
		A	B	C			A	B	C
Bc-Csp-A		A	B	C	Bc-Csp-B		A	B	C
	M1	46	38	16		K5	42	58	
	K5	41	59			E19	45	55	
	E19	28	72			E21	67	33	
	E36	33	38	29		E36	51	29	20
	Q45	46	54			K39	52	48	
	S48	47	53			E42	44	56	
	E50	66	34			E50	61	39	
	Q53	34	66						
	K65	69	31						

Neben der N-terminalen Aminosäure M1 von *Bc-Csp-A*, bei der eine dreifache Fehlordnung beschrieben wurde, sind alle fehlgeordneten Aminosäuren entweder polar oder zusätzlich geladen. Diese Aminosäuren sind ausschließlich an der Oberfläche des Proteins lokalisiert und stabilisieren die Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken. Dabei können sie energetisch gleichwertige Konformationszustände besetzen, welche durch das Auffinden der alternativen Seitenkettenkonformationen beschrieben werden konnten. In **Abb. 3.46** sind repräsentative, alternative Seitenkettenkonformationen von *Bc-Csp* mit der dazugehörigen (2mFo-DFc)-Elektronendichte dargestellt.

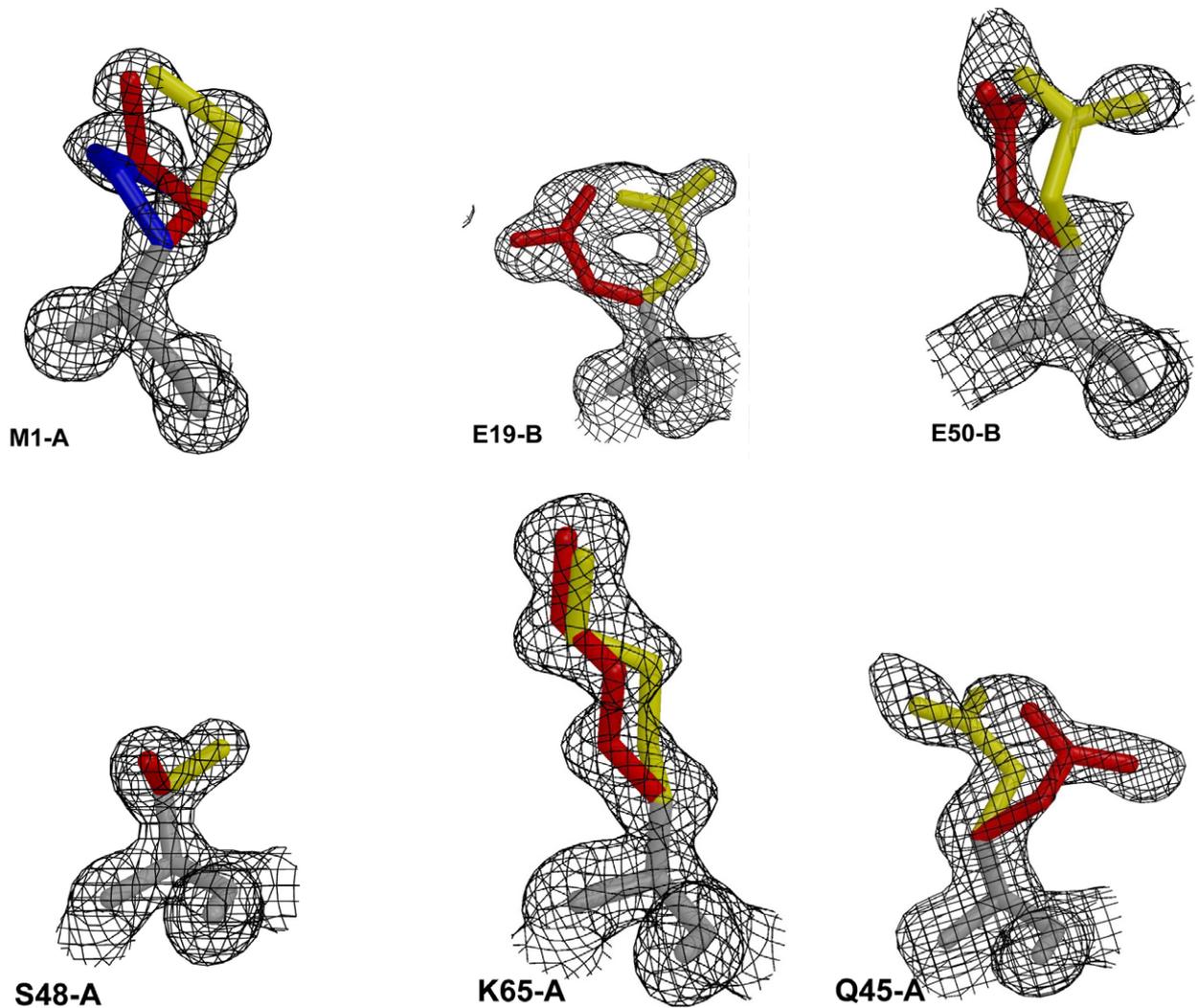


Abb. 3.46 Alternative Seitenkettenkonformationen von *Bc-Csp* mit (2mFo-DFc)-Elektronendichte, bei 1.0σ konturiert. Rote, gelbe und blau gefärbte Konformationen entsprechen einer fallenden Besetzungszahl.

Im Falle der isomorphen 1.4 \AA Struktur von *Bc-Csp*^{R3E} wurden 13 fehlgeordnete Seitenketten verfeinert. Hierbei handelt es sich ebenfalls, bis auf M1 von *Bc-Csp*^{R3E}-A, um polare und geladene Aminosäuren (**Tab. 3.23**).

Tab. 3.23 Aminosäuren mit alternativen Seitenkettenkonformationen bei *Bc-Csp*^{R3E}

	Aminosäure	Besetzungszahlen der Konformationen [%]			Aminosäure	Besetzungszahlen der Konformationen [%]	
		A	B			A	B
<i>Bc-Csp</i> ^{R3E} -A		A	B	<i>Bc-Csp</i> ^{R3E} -B		A	B
	M1	77	23		E3	80	20
	K13	69	31		E21	54	46
	E21	66	34		E36	63	37
	E36	84	16		E46	85	15
	E43	56	44		E53	75	25
	E50	50	50				
	N55	59	41				
	Q59	52	48				

3.3.8. Die Solvens-, Kationen-, und Ligandenstruktur von *Bc-Csp*

Innerhalb des Kristalls von *Bc-Csp* beträgt der abgeschätzte Solvensanteil etwa 40% (Matthews, 1968). Der größte Teil der den Kristall ausfüllenden Solvensmoleküle ist aufgrund seiner statistischen Verteilung im Diffraktionsexperiment nicht beobachtbar. Trotzdem ist es in Abhängigkeit von der Auflösung des kristallographischen Datensatzes möglich, Solvensmoleküle, Kationen und andere Liganden, die durch direkte Kontakte mit dem das Kristallgitter aufbauenden Makromolekül (Protein, Nukleinsäure) fixiert werden, zu lokalisieren. Diese durch eine direkten Bindung zum Proteinmolekül charakterisierten Moleküle gehören zur ersten Hydratationssphäre. Sie sind innerhalb eines Abstandsbereichs von 2.4-3.5 Å um Wasserstoffbrückendonator- oder -akzeptorgruppen des Proteins lokalisiert. Bei der atomaren Auflösung der hier verwendeten Datensätze war zusätzlich die Beschreibung von Solvensmolekülen, die innerhalb der zweiten Hydratationssphäre liegen und keine direkten Wechselwirkungen zum Proteinmolekül besitzen, möglich. Zusätzlich bot sich eine teilweise Halbbesetzung weniger Atome mit sehr großem B-Faktor bei der Verfeinerung an (Tab. 3.19). In Abb. 3.47 ist die abstandsabhängige Verteilung der Wassersauerstoffpositionen der *Bc-Csp*-Struktur dargestellt. Das erste Maximum, im Bereich von 2.7-2.8 Å, entspricht der hauptsächlichen Besetzung der ersten Hydratationssphäre des Proteins. Die geringere Besetzung des Bereichs um 3.7 Å ist der Population der zweiten Hydratationssphäre zuzuordnen. Der atomare Koordinatenfehler der Solvensstruktur ist im Mittel 3-5 mal größer als der von gebundenen Proteinatomen. Wenige, sehr stark gebundene Solvensmoleküle können aber mit einer durchaus vergleichbaren Genauigkeit beschrieben werden.

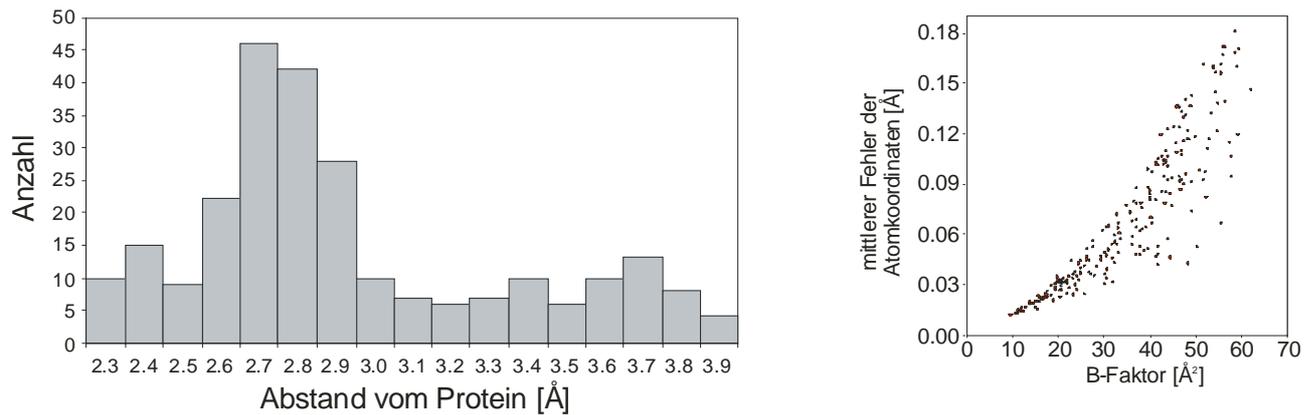


Abb. 3.47 Verteilung der Wassersauerstoffpositionen um das Proteinmolekül von *Bc-Csp* und der mittlere Koordinatenfehler in Abhängigkeit vom B-Faktor.

Neben der Wasserstruktur konnten ebenfalls Kationenpositionen ermittelt werden. Jedes Proteinmolekül bindet ein Na^+ -Kation spezifisch an die Carbonylsauerstoffatome von V20 und G23 innerhalb der Schleife S2. Evidenzen für die Richtigkeit der Beschreibung als Na^+ sind die Verfeinerung als Sauerstoffatom zu B-Faktoren von kleiner 5Å unter Erhalt von $+(m\text{Fo}-\text{DFc})$ -Differenzdichte (größer als 5σ). Ein zusätzlicher Hinweis für die Richtigkeit der Annahme, ist eine ähnliche Na^+ -Bindung in einem vergleichbaren Schleifenbereich von Thrombin (PDB-Einträge: 1hgt, 1thr) (Di Cera *et al.*, 1995). Die Wechselwirkung des Kations mit den negativen Partialladungen der Sauerstoffe stabilisiert den Schleifenbereich S2 aller untersuchten *Bc-Csp*- und *Bc-Csp*^{R3E}-Moleküle (Ausnahme *Bc-Csp*^{R3E}-A) (**Abb. 3.43**). Zusätzlich zur Koordination der zwei Carbonylsauerstoffatome sind vier Wassersauerstoffatome um Na^+ koordiniert so daß ein verzerrtes Oktaeder aufgebaut wird. Mg^{2+} koordiniert zwar auch oktaedrisch, es fand aber keine definierte Zugabe von Mg^{2+} zur Kristallisationlösung statt.

Obwohl im Kristallisationspuffer von *Bc-Csp* kein TRIS-Puffer vorhanden ist, konnten drei TRIS-Moleküle in der asymmetrischen Einheit von *Bc-Csp* gefunden werden. Dieser Puffer wurde bei der Reinigung des Proteins benutzt (Perl, 1997), so daß spezifisch gebundene Puffermoleküle noch beobachtbar sind. In **Abb. 3.48** ist das am besten definierte TRIS-Molekül dargestellt. Es bindet innerhalb einer durch Kristallpackung entstandenen Kavität an die Glutamate E12 und E50 und wird durch zwei Wassersauerstoffatome solvatisiert. Die anderen beiden TRIS-Moleküle binden ebenfalls durch Kristallpackungsinteraktionen an das Protein.

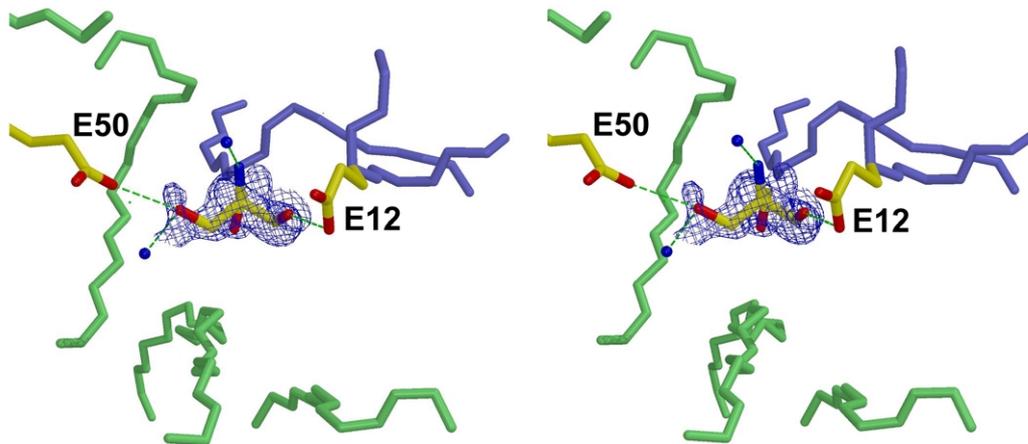


Abb. 3.48 TRIS-Bindung innerhalb der *Bc*-Csp-Struktur. (2mFo-DFc)-Elektronendichte für TRIS ist bei 1.2σ konturiert. Die unterschiedlich gefärbten Hauptkettenverläufe sind symmetrieverwandten Molekülen zuzuordnen.

3.3.9. Die Organisation von *Bc*-Csp im Kristall

Bc-Csp wie auch *Bc*-Csp^{R3E} ist mit einem V_M -Wert von 2.05 bzw. 2.1 relativ dicht innerhalb des Kristallgitters der innenzentrierten tetragonalen Zelle gepackt. Die beiden 4_1 -Schraubenachsen, die senkrecht zur der 1,1-Flächendiagonalen der a, b-Ebene angeordnet sind, zentrieren Molekül B koaxial zum Verlauf der Schraubenachse. Die Anordnung der 4_1 -Schraubenachsen zusammen mit der Innenzentrierung der Elementarzelle bewirkt den Aufbau von zwei 4_3 -Schraubenachsen, die Molekül A koaxial um sich anordnen (**Abb. 3.49**).

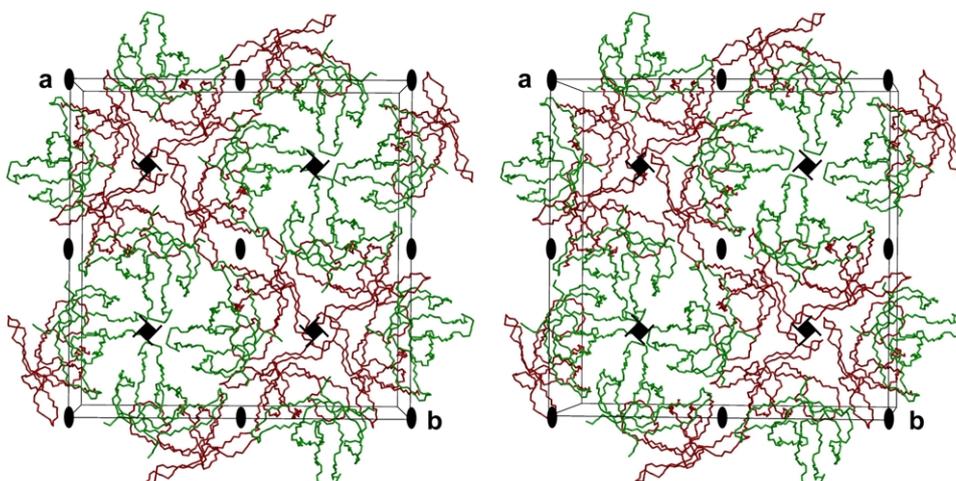


Abb. 3.49 Packung von *Bc*-Csp innerhalb der $I4_1$ Zelle. Rot entspricht dem C α -Kettenverlauf von Molekül A, grün dem C α -Kettenverlauf von Molekül B. Es wurden alle Symmetrieelemente (4_1 , 4_3 -Schraubenachsen) sowie 2-zählige Drehachsen eingezeichnet.

In **Tab. 3.24** sind alle Aminosäuren mit intermolekularen Packungskontakten bis 3.5 Å für *Bc*-Csp aufgeführt. Damit sind sowohl Schleifenbereiche wie auch β -Faltblätter in Kristallkontakte involviert. Die geringere Anzahl von Kontakten bei Molekül B, die auch in **Abb. 3.49** in Bezug auf die lockerere Packung im Vergleich mit Molekül A veranschaulicht wird, resultiert in einem höheren mittleren B-Faktor aller Proteinhaupt- und -seitenkettenatome (**Tab. 3.19**).

Tab. 3.24 Aminosäuren mit intermolekularen Proteinkontakten bei *Bc*-Csp. Hervorgehobene Reste besitzen nur Hauptkettenkontakte.

<i>Bc</i> -Csp-A	<i>Bc</i> -Csp-B	Symmetrioperator
T31 , Q34, E36, G37 , K39, Q53 , Q59	T31 , Q34, E36, Q53 , E50	X, Y, Z
E36	N11, E36, F38 , E42	-Y, 0.5+X, 0.25+Z
	W8, S24, D25, N55, R56	0.5+Y, -X, 0.75+Z
V6 , K7, Y15, E19, S24, E43, R56,		0.5-Y, X, 0.75+Z
N11, E36, K39 , E42,	R3, E21	Y, 0.5-X, 0.25+Z

3.3.10. Mögliche strukturelle Determinanten der erhöhten Thermostabilität von *Bc*-Csp

Im Rahmen dieser Studie wurde die Struktur von *Bc*-Csp und der R3E-Mutante dieses Proteins analysiert. Der Vergleich beider Strukturen, wie auch die Einbeziehung der Strukturdaten von CspB sollten erste Hinweise zur Beantwortung der Frage nach den strukturellen Determinanten der Thermostabilität von *Bc*-Csp geben.

Die Wildtypstruktur bestätigt die nah Sequenzvergleich vermutete Ausbildung einer Salzbrücke zwischen R3 und E46 (**Abb. 3.45**). Durch die R3E-Mutation wird diese Möglichkeit der Stabilisierung der Polypeptidkette zerstört. Dabei bleibt die globale Struktur von *Bc*-Csp^{R3E} von der Mutation unbeeinflusst. Der weitere Einfluß der R3-E46-Salzbrücke auf die Proteinstabilität bei der Faltung von *Bc*-Csp, kann durch Bestimmung der Struktur des gefalteten Proteins natürlich nicht ermittelt werden. Es ist klar, das die erhöhte Thermostabilität von *Bc*-Csp nicht Resultat einer einzigen Punktmutation ist.

Der Vergleich der Kristallstruktur von *Bc*-Csp mit der Struktur von CspB kann ebenfalls zum Verständnis derjenigen strukturellen Einflüsse beitragen, welche die Stabilität des thermophilen Proteins erhöhen. Im nachfolgenden Abschnitt wird versucht, alle Aminosäureaustausche beim Übergang von CspB nach *Bc*-Csp bezüglich der Stabilisierung oder Destabilisierung des Proteins zu diskutieren. Alle 11 mutierten Aminosäuren sind oberflächenexponiert. Der Austausch L2Q in der Nähe des N-Terminus wechselt einen hydrophoben Rest gegen eine polare Gruppe. Obwohl

solvensexponierte polare Gruppen den gefalteten Zustand mehr als hydrophobe Gruppen stabilisieren sollten, ist die *Bc-Csp*^{Q2L}-Mutante um etwa 1 kJ/mol stabiler als der *Bc-Csp*-Wildtyp (Perl, 1999). Der E3R- und A46E-Übergang führen zur Ausbildung einer stabilisierenden Salzbrücke mit einem zusätzlichen Effekt des Austauschs eines hydrophoben Rests gegen einen geladenen Rest. Der S11N-Austausch bewirkt eine stärkere Interaktion dieses Restes zur Seitenkette von T40 ($N11N2\delta-O\gamma T40 = 2.61\text{\AA}$), im Vergleich mit der alternativen Stabilisierung durch S11O γ . Der F15Y-Austausch sollte zur Absenkung hydrophober Wechselwirkungen an der Proteinoberfläche unter Erhalt derselben solvensexponierten Konformation der aromatischen Seitenkette führen, obwohl die Einführung einer einzelnen OH-Gruppe einen kaum meßbaren Effekt bei der Stabilisierung des Proteins hat (Perl, 1999). Der Wechsel Q23G führt zur Erhöhung der Flexibilität der Hauptkette durch das Vorhandensein von zwei konsekutiven Glycinresten. Dadurch ist die Möglichkeit zur Ausbildung stabilisierender Sekundärstrukturen unter der Einbeziehung einer spezifischen Na⁺-Kationenbindung im Bereich von Schleife S2 gegeben (**Abb. 3.43**). Einen ähnlichen Einfluß kann der sich anschließende D24S-Austausch durch die Verkürzung der Seitenkette, unter Erhalt der Polarität haben. Der Übergang von S31T führt zur Einführung einer zusätzlichen solvensexponierten Methylgruppe. Durch diese zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung sollte das gefaltete Protein destabilisiert werden. Der E53Q-Austausch befindet sich interessanterweise an der Stelle der modifizierten Dimerwechselwirkung. Eine Stabilisierung der Monomerstruktur kann aber aufgrund der Konformation nicht vorhergesagt werden und wurde auch nicht experimentell durch die Messung der Stabilität einer *Bc-Csp*^{Q53E}-Mutante gefunden (Perl, 1999). Die C-terminale Modifikation T64V, E66L und Deletion von 67A kann lediglich durch das Wegfallen des C-terminalen Alanin und die damit stattfindende Kompaktierung der globulären Struktur des Protein verstanden werden. Die derzeitig zur Verfügung stehende Datenbasis erlaubt lediglich eine Diskussion möglicher Stabilisierungseffekte. Für den eigentlichen Beweis sind aber weitere strukturanalytische Arbeiten wie auch biophysikalische Untersuchungen erforderlich.

3.4. Besonderheiten der Kristallstrukturanalyse biologischer Makromoleküle bei atomarer Auflösung

Die meisten der innerhalb dieser Arbeit beschriebenen Kristallstrukturen erreichen das Kriterium der atomaren Auflösung. Durch die konsequente Ausnutzung der Synchrotronstrahlung in Verbindung mit kryokristallographischen Versuchsanordnungen konnte dieses gestellte Ziel erreicht werden. Die auf Grundlage dieser Datenbasis durchgeführten Strukturverfeinerungen, erzielten durch die Modellierung anisotroper Temperaturfaktoren verfeinerte Strukturmodelle mit einer großen Genauigkeit. Durch die Auswertungen der hochaufgelösten Strukturmodelle war es bei der tRNA^{Ala}-Mikrohelix möglich, neben der Nukleinsäurestruktur die Struktur der Hydrathülle sowie spezielle Kationenbindungen an den Nukleinsäurehelices im fehlgeordneten Kristall zu beschreiben. Weiterhin gelang es auf der Grundlage der atomaren Daten ein detaillierte Strukturmodell des Bc-Csp-Proteins zu erzeugen. Dieses Strukturmodell beschreibt alle Haupt- und Seitenkettenkonformationen des Proteins mit teilweise alternativen Besetzungen, sowie die Solvens-, Kationen- und Ligandenstruktur des Proteins im Kristall. In jedem Fall war die hohe Auflösung der Strukturmodelle für die Beantwortung der speziellen Fragestellungen eine notwendige Voraussetzung.

