

4. Zusammenfassung

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

Die Haupterkennungssignale für die spezifische Erkennung der tRNA^{Ala} aus *E. coli* durch die AlaRS sind im Akzeptorstamm dieses Moleküls lokalisiert. Ein über alle Lebensformen konserviertes G3•U70-Basenpaar stellt hierbei das Haupterkennungselement dar. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Strukturanalyse des heptameren Akzeptorstamms ALA^{wt} und der inaktiven C70-Mutante, ALA^{C70}, sollte Hinweise über die strukturelle Basis dieser Erkennungsmechanismen von der Seite der RNA geben. Daneben sollte diese Studie einen Einblick in das strukturelle Verhalten und die Auswirkungen eines G•U "wobble"-Basenpaars innerhalb eines Watson-Crick -gepaarten Doppelstrangs geben.

Alle untersuchten heptameren RNA-Helices konnten bei hoher bis atomarer Auflösung beschrieben werden. Weiterhin findet in allen Kristallen eine Fehlordnung über die pseudo-zweizählige Achse der Duplexmoleküle statt. Die Verfeinerung der Strukturen fand unter der Annahme eines pseudo-merohedralen Zwillings in der triklinen Raumgruppe P1 statt. ALA^{wt} und ALA^{C70} gehören zum A-RNA Konformationstyp. Die globale Struktur von ALA^{wt} wird durch das G3•U70-Basenpaar nicht verändert. Es findet lediglich eine lokale Modulation des helikalen Twists im Bereich von G3•U70 statt. Die C3'-endo Zuckerwellung aller Ribosen, mit Ausnahme der C2'-exo Konformation von G1 des Moleküls ALA^{wt}-A, und die Konformation des Polyphosphatrückgrats von ALA^{wt} und ALA^{C70} entsprechen den Standardgeometrien von A-RNA. Damit konnten die Ergebnisse der im Vorfeld an einem vergleichbaren RNA-Molekül durchgeführten NMR-Studien (Limmer *et al.*, 1996; Ramos & Varani, 1997) nicht bestätigt werden. Der Vergleich aller untersuchten Eigenschaften zwischen ALA^{wt} und ALA^{C70} führte zu keinen Hinweis auf eine globale Strukturänderung der Doppelhelix durch die Insertion des G3•U70-Basenpaars. Die Beschreibung der Struktur des G3•U70-Basenpaars bei atomarer Auflösung beweist seine Stabilisierung durch die Wechselwirkung mit Wassermolekülen, die in der kleinen und großen Furche sowie entlang des Polyphosphatrückgrats lokalisiert sind. Die "wobble"-Konformation, wie auch die Solvensstruktur des G3•U70-Basenpaars stellen die Hauptunterscheidungsmerkmale im Vergleich mit dem G3-C70-Basenpaar dar. Somit besitzt der tRNA^{Ala}-Akzeptorstamm mit G3•U70 ein einzigartiges Erkennungssignal, welches durch die mögliche direkte Interaktion der AlaRS für die spezifische Erkennung benutzt wird. Das hochkonservierte Wassermolekül, welches eine kleine Kavität zwischen G3 und U70 in der kleinen Furche besetzt, kann als integraler Bestandteil von G•U-Basenpaaren angesehen werden. Damit erweitert es mögliche Erkennungseigenschaften des Akzeptorstammbereichs bei der Erkennung der

AlaRS. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen die Hypothese der direkten Erkennung der tRNA^{Ala} durch die AlaRS (siehe **Abschnitt 1.1.3**). Die weiterführende Beantwortung der Frage nach den Wechselwirkungseigenschaften der AlaRS mit der tRNA^{Ala} wird aber erst nach zusätzlichen strukturanalytischen Untersuchungen wie der Kristallstrukturanalyse des tRNA-Synthetasen-Komplexes möglich sein.

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

Das chimären Oktamer HIV^{Chi} dient als Modell für die Beschreibung der 3'-DNA-RNA-5' Verknüpfung, welches bei der Initiation der Minus-Strang-Synthese der HIV-Replikation gebildet wird. HIV^{Chi} kristallisiert mit zwei identischen Oktamerduplexen in der asymmetrischen Einheit. Beide Moleküle liegen in der A-Konformation vor. Dies beinhaltet eine C3'-endo Zuckerwellung für alle 32 Ribosen bzw. Desoxyribosen. Der Vergleich der tetrameren RNA-RNA- sowie RNA-DNA-Duplexhälften, sowie die Analyse des Übergangsbereichs ergab keine signifikanten Unterschiede, die durch die Basenpaarung von RNA mit DNA-Nukleotiden erklärt werden könnte. Die Überlagerung der beiden unabhängig voneinander verfeinerten Kopien zeigt eine hohe Flexibilität der Duplexmoleküle auf. Grund dafür sind unterschiedliche Umgebungen für die Moleküle innerhalb des Kristallgitters. Die Überlagerung beider Oktamerduplexe mit modellierter kanonischer A-RNA bestätigt die globale A-Konformation der untersuchten Helix. Die sequenzabhängige Analyse der Helixparameter ergab eine geringe Korrelation beim Vergleich der beiden Kopien. Lediglich der helikale Twist (Ω), der "Slide"-Wert (Dy) sowie die Steighöhe (Dz) sind mit der Basenpaarabfolge korreliert. Die Analyse ergab weiterhin ein globales Minimum für diese drei Werte, die den Basenpaarschritt c2-G15/a3-T14 beschreiben. Dieser Pyrimidin-Purin-Schritt führt durch seine speziellen Stapel­eigenschaften zu einer Flexibilisierung dieses Bereichs. Ein Resultat davon ist eine erweiterte Phosphatrückgrat-Konformation des 5'c2pa3-3' Schritts bei HIV^{Chi}-B. Entgegen der (-)gauche/trans/(+)gauche Konformation für $\alpha/\beta/\gamma$, die bei allen anderen Nukleotidschritten auftritt, entspricht dieser Schritt einer trans/trans/trans Konformationen. Obwohl diese strukturelle Abweichung nicht zwingend für die Ausbildung der Struktur des speziellen c2-G15/a3-T14 Schrittes ist, läßt dieser flexible Bereich die erweiterte Rückgratkonformation zu. Über die Möglichkeit einer Signalwirkung dieser strukturellen Variation bei der Erkennung des genomischen RNA-Strangs durch die der Reversen Transkriptase assoziierte RNase-H Funktion von HIV, darf spekuliert werden. Trotzdem grenzen die identifizierten Spaltstellen genau an den beschriebenen c2-G15/a3-T14-Basenpaarschritt. Das ebenfalls vorhandene chemische Signal,

welches durch den Übergang des tRNA^{Lys,3}-Primer RNA-Strang in den neu synthetisierten DNA-Strang durch das Wegfallen der stark solvensexponierten 2'OH Gruppe der Ribose permanent vorhanden ist, könnte hierbei jedoch von größerer Bedeutung sein.

Der Vergleich des kristallographischen Strukturmodells von HIV^{Chi} mit dem zeitgleich generierten NMR-Strukturmodell, war wegen der Unzugänglichkeit der Strukturdaten im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich (Szyperski *et al.*, 1999).

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

Die Kristallstrukturen von *Bc*-Csp und seiner R3E-Mutante konnten bei atomarer Auflösung mit einer großen Genauigkeit bestimmt werden. Beide Proteine kristallisieren isomorph in der tetragonalen Raumgruppe I4₁ mit zwei Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit. Diese bilden Homodimere aus, deren Struktur sich von der Dimerstruktur von CspB unterscheidet. Die dreidimensionale Struktur des *Bc*-Csp Monomers entspricht nahezu der von CspB. Es konnten lediglich geringfügige Abweichungen des Hauptkettenverlaufs innerhalb flexibler Schleifenbereiche identifiziert werden. Diese Abweichungen konnten teilweise bezüglich einer erhöhten Stabilität der Polypeptidkette durch zusätzliche Wechselwirkungen bei *Bc*-Csp interpretiert werden. Die spezifische Bindung eines Na⁺-Kations im Bereich von Schleife 2 stabilisiert die β -Faltblattstruktur zwischen Strang β 2- β 3. Von besonderem Interesse ist die Analyse des Bereichs der E3R- und A46E-Mutationen beim Übergang vom mesophilen zum thermophilen Protein. *Bc*-Csp ist in der Lage, eine stabilisierende Salzbrücke zwischen R3 und E46 unter zusätzlicher Stabilisierung durch den Rest K5 auszubilden. Diese Salzbrücke ist solvensexponiert. Die Ausbildung dieser Salzbrücke scheint aber nicht unbedingt zwingend für den nativen Zustand des Proteins zu sein, da sie nur bei einem Molekül in der asymmetrischen Einheit vorhanden ist. Obwohl die Punktmutation R3E bei *Bc*-Csp einen signifikanten Verlust an Thermostabilität von etwa 6 kJ/mol bewirkt (Perl, 1997), ist beim Vergleich der Kristallstrukturen lediglich ein Einfluß auf die Konformation weniger Seitenketten im Mutationsbereich erkennbar. Der Verlust der solvensexponierten R3-E46 Salzbrücke kann den Verlust an Thermostabilität alleine nicht erklären. Die kürzlich an einer *Bc*-Csp E46A-Mutanten durchgeführten thermischen Entfaltungsexperimente zeigen eine sehr geringe thermische Destabilisierung im Vergleich mit *Bc*-Csp^{R3E} (Perl, 1999). Um die stabilisierenden Eigenschaften des thermophilen Proteins verstehen zu können, sind alle Einflüsse, die aus der Veränderung der Primärstruktur beim Übergang von CspB nach *Bc*-Csp resultieren, einzubeziehen. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen beider Proteine stellt

dabei eine der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Möglichkeiten dar. Obwohl lediglich 12 Aminosäuren die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine bestimmen, ist es nicht möglich, diese Austausche und Deletionen vollständig in Bezug auf die Fragestellung zu verstehen. Vielmehr sind weitere biophysikalische Experimente mit Einzelmutanten von *Bc-Csp* geplant, die in Verbindung mit deren strukturanalytischen Untersuchungen die Datenbasis für das Verständnis der Stabilität und Faltung dieser Proteine erweitern.

5. Summary

5.1. Crystal Structure of ALA^{wt} and ALA^{C70}

The acceptor stem of tRNA^{Ala} from *E. coli* contains the main identity element for specific aminoacylation by its cognate alanyl-tRNA-Synthetase (AlaRS). It is known, that the presence of the G3•U70 wobble base pair, which is fully conserved within all kingdoms of life, is essential for this process. The major goal of this work was the structure analysis of the heptameric microhelix ALA^{wt} as well as of the inactive mutant ALA^{C70}, in order to gain insight into the structural basis of recognition. Additionally, this work was aimed to provide information about the behavior of a single G•U wobble base pair within a Watson-Crick double helix.

All heptameric RNA fragments diffracted between 1.16 Å and 1.4 Å resolution. Interestingly within all crystals, the RNA molecules are disordered around their pseudo-twofold axis, which is perpendicular to the helical axis of the duplex molecules. Crystallographic refinement of the RNA's was carried out assuming pseudo merohedral twinning in space group P1. ALA^{wt} and ALA^{C70} adopt normal A-Form geometry throughout. The G3•U70 base pair causes a slight modulation of the helical Twist. All ribose sugar pucker are in the preferred C3'-endo conformation, except for the C2'-exo conformation of G1 of molecule ALA^{wt}-A. All phosphate backbone torsion angles adopt undisturbed geometry throughout the molecules. These results might be in contradiction to the recently performed NMR structure analysis of related molecules (Limmer *et al.*, 1996; Ramos & Varani, 1997).

The comparison of ALA^{wt} and ALA^{C70} shows no global changes of the helical structure by the insertion in the G3•U70 base pair. It was found, that distinct water molecules are specifically bound to the G•U base pair in order to stabilize this special arrangement. Thus the main differences between the wildtype and the C70 mutant structure are located within the mutation itself. Our analysis proposes that the G3•U70 is the unique recognition signal, which might be sufficient for direct recognition by AlaRS. One highly conserved water molecule, which fills a cavity between G3 and U70 at the minor groove site of the helix, is an integral part of the G•U wobble base pair. A more detailed view of that system could only be provided by the structure determination of the entire AlaRS-tRNA^{Ala} complex.

5.2. Crystal Structure of a 3'-DNA-RNA-5' Hybrid from HIV-1

During initiation of minus-strand synthesis by HIV-1 reverse transcriptase a 3'-DNA-RNA-5' junction is formed involving the 3'-end of tRNA^{Lys,3}. The HIV-RT-associated RNase H cleaves the RNA template strand specifically, opposite the newly synthesized DNA strand. The crystal structure at 1.9 Å resolution of an eight-base pair hybrid duplex representing the junction has been performed to identify global or local structural perturbations which may be recognized by HIV-RT RNase H. In the crystal HIV^{Chi} is present as two independent copies in the asymmetric unit. Both junction octamers adopt A-type conformation throughout their entire length. This is clearly apparent from the C3'-endo sugar pucker present in all 32 nucleotides and from the average helical parameters. There are no systematic differences in helix geometry between the four base pairs per molecule of pure RNA duplex and the four base pairs of RNA-DNA hybrid duplex. The least-squares superposition of the two independent molecules shows deviations which are due to the different crystal environment of both molecules. A least-squares superposition of the junction octamer with modelled canonical A-form RNA confirms the global A-type conformation of the duplexes within the crystal. The sequence-dependent analysis of the helical parameters shows only a slight correlation between both duplexes. It has been found, that only the helical Twist (Ω), Slide (Dy) and Rise (Dz) are moderately correlated with the sequence. Interestingly these three helical parameter show local minima at the *cpa*•*TpG* base pair step, which is the second from the end, for both molecules. In molecule two, this stacking pattern is accompanied by an unusual, extended $\alpha/\beta/\gamma$ all-trans backbone conformation of nucleotide a3. The fact that the backbone is extended only on one side and only in one of the two *cpa*•*TpG* steps appears to indicate that the cross-strand base pair stacking lowers the energy barrier between two alternative backbone conformations without necessarily driving the structure all the way to the all-trans form. This structural feature may only be a conformational soft spot for the discussion of its possible recognition capability for RNase H. It may be of functional significance, that the structural perturbation at the *cpa*•*TpG* step in the hybrid is flanked by the main cleavage site of HIV-RT RNase H. On the other hand, the chemical signal coming from the exchange of the ribose sugar from the tRNA^{Lys,3} primer to the deoxyribose sugar of the DNA, lacking the solvent exposed 2'OH group, might be of major importance for that recognition. The comparison of our model with the NMR-work of the identical molecule, which has been performed in parallel (Szyperski *et al.*, 1999) was not possible due to the unavailability of the coordinates but will be carried out in the near future.

5.3. Crystal Structure of *Bc*-Csp and the *Bc*-Csp^{R3E} mutant

The crystal structure of the cold-shock protein *Bc*-Csp and its R3E-mutant was refined close to atomic resolution. Both proteins crystallize isomorphously in the tetragonal space group $I4_1$ with two molecules present in the asymmetric unit. These dimers are different from the CspB dimer. The three dimensional structures of *Bc*-Csp monomer in comparison with CspB are highly identical. There are only some slight variations of main chain geometry within flexible loop regions. These differences are further discussed in terms of an increased thermostability of the *Bc*-Csp protein. A Na^+ -cation is bound within loop 2 for three out of four observed protein molecules. This cation binding might provide additional stabilization of the β -sheet structure $\beta 2$ - $\beta 3$. One region of special interest is the site of the R3E and E46A mutation converting two residues of the sequence of the mesophilic CspB to the thermophilic *Bc*-Csp protein sequence. *Bc*-Csp has the ability of forming a salt bridge between R3 and E46 and involving interactions with the side chain of residue K5. This salt bridge is solvent accessible. Since this salt bridge occurs only in one of the two molecules of *Bc*-Csp present in the asymmetric unit of the crystal, it appears not to be necessary for the formation of the native state of the protein. However the *Bc*-Csp^{R3E} mutant is 6 kJ/mol less stable than wildtype *Bc*-Csp. Comparing both structures shows only minor differences in side chain conformations within this region. The loss of the solvent exposed R3-E46 salt bridge in the *Bc*-Csp^{R3E} mutant can not explain the significant destabilization of the protein. Additionally the recently performed thermal denaturation experiments of a *Bc*-Csp E46A mutant protein (Perl, 1999), reveal only a minor destabilization when compared to wildtype *Bc*-Csp. In order to understand the structural basis of the increased thermostability of thermophilic *Bc*-Csp, when compared to CspB all relevant changes resulting from the 12 differences in the sequence of *Bc*-Csp and CspB have to be recognized. Currently only the crystal structures of both wildtype cold shock proteins and of the *Bc*-Csp^{R3E} mutant are known. Because of the complexity of multiple substitutions further biophysical experiments of single mutants of *Bc*-Csp together with structural investigations are planned to enlarge our understanding of folding and stability within these proteins.

