

4 Ergebnisse zu SapC und SapD

4.1 Kristallisation von SapC

Zur Kristallisation von SapC wurden Reihenversuche mit Hilfe kommerziell erhältlicher Zusammenstellungen von Kristallisationslösungen unternommen, um anfängliche Kristallisationsbedingungen zu finden. Nach ca. drei Monaten erschienen hierbei in Ansatz 8 des „Hampton Screen I“ (Hampton Research) dünne, lange Nadeln. Da diese Bedingung 30% Isopropanol als Fällungsmittel verwendet, wurde zur Optimierung und Beschleunigung des Kristallwachstums ein Gitter-Reihentest verwendet, in dem die Konzentration des Fällungsmittels Isopropanol gegen den pH-Wert variiert. Hierbei erschienen innerhalb einer Woche Nadeln bei Verwendung von 70% Isopropanol als Fällungsmittel und pH-Werten zwischen 4,5 (Acetatpuffer) und 5,6 (Citratpuffer). Die nach einer längeren Optimierungsphase erhaltenen Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 10 angegeben. Dabei wurde SapC aus verschiedenen Reinigungen verwendet.

Tabelle 10: Bedingungen zur optimalen Kristallisation von SapC. Details zur verwendeten Proteinlösung finden sich in Abschnitt 2.1.2.2. Die Kristallisation erfolgte bei 18°C.

Additiv	8-12% (v/v) Ethylenglykol
Präzipitant	60-70% (v/v) Isopropanol
Puffer	100mM Natriumcitrat-Puffer, pH 4,2-4,8
Tropfenaufbau	2µl Reservoir + 2µl Protein bis 1µl Reservoir + 2,5µl Protein

Unter den optimierten Kristallisationsbedingungen wurden in $\frac{3}{4}$ aller Ansätze Kristalle erhalten, in ungefähr jedem fünfzigsten Ansatz wuchs ein Kristall bis zu einer Länge von 750µm bei einer Dicke von ca. 50-100µm. In den meisten Fällen, insbesondere bei Verwendung von Ethylenglykol in der Reservoirlösung, wuchsen die Kristalle innerhalb von nur 12-36Std. aus einer öligen Proteinphase, die auch Präzipitat und mikrokristallines Material umschloss (Abbildung 44) .

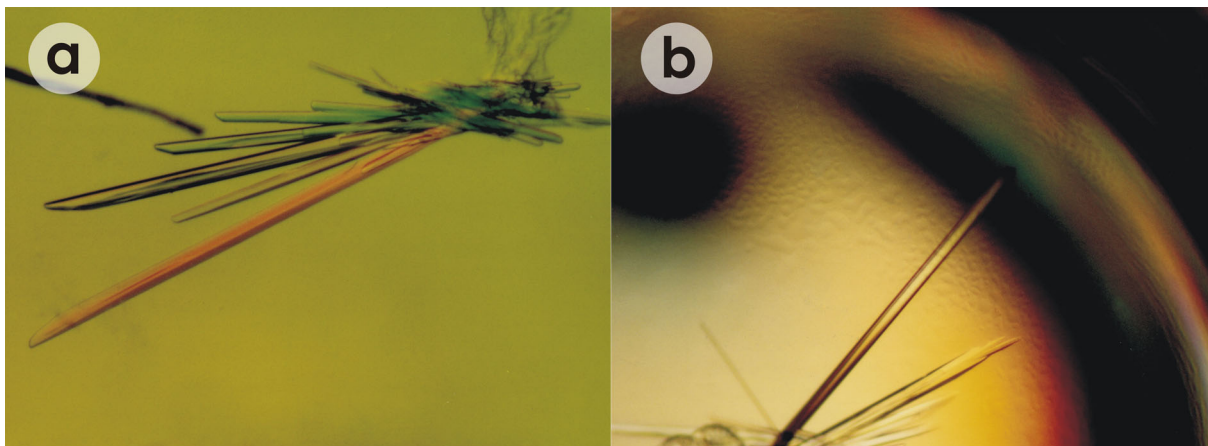


Abbildung 44: Mikroskopische Ansicht von SapC-Kristallen. Die Kristalle wurden unter den im Text angegebenen Kristallisationsbedingungen erhalten, einzelne Nadeln erreichen bis zu 750µm Länge.

Die Datensammlung erfolgte an dem Strahlrohr ID29 (ESRF, Grenoble) unter Verwendung eines CCD-Flächendetektors des Typs Quantum 4 (ADSC, Area Detector Systems Corporation, Poway, CA, USA). Die Datenreduktion wurde mit Programmen des HKL-Pakets (Otwinowski und Minor, 1997) durchgeführt. Das Bravais-Gitter der Kristalle ist primitiv hexagonal, was angesichts der Stäbchen mit hexagonalem Querschnitt nicht überrascht. Beim Übergang zur Prozessierung in P622 von P6 wurde keinerlei Verschlechterung der Anpassung beobachtet. Die Zuweisung von systematischen Auslöschungen in den (0,0,l) Reflexen gelang nicht eindeutig. So wurden in verschiedenen Datensätzen einmal eine (0,0,6n) Reflexbedingung (Raumgruppe $P6_{1/5}22$) und ein anderes mal eine (0,0,2n) Reflexbedingung (Raumgruppe $P6_322$) beobachtet. Es ist unklar, ob die betreffenden Kristalle verschiedene Raumgruppen besaßen oder ob die Unterschiede auf Messfehler zurückzuführen sind. Eine eindeutige Zuordnung der Raumgruppe ist damit, insbesondere im Fall der enantiomorphen Raumgruppen $P6_{1/5}22$, erst im Laufe einer Strukturlösung sicher möglich. Die Zellparameter und die Datensammlungsstatistik für zwei typische hochredundante Datensätze werden in Tabelle 11 zusammengefasst.

Zur Strukturbestimmung von SapC war die Ermittlung experimenteller Phasen vorgesehen. Diese sollte durch die SAD-Methode unter Verwendung des anomalen Signals des natürlich im Protein vorkommenden Schwefels erfolgen, da Kristalle hoher Symmetrie (P622) verfügbar waren, die bis zu einer Auflösung von besser als 3Å Diffraction zeigten. Die Auswertung der Datensammlungs-Statistik zeigte aber, dass aufgrund der relativ schlechten R-Werte auch in den inneren Schalen und der steten Balance zwischen Strahlenschäden, hoher Auflösung und hoher Redundanz eine nur unzureichende Datenqualität für die SAD-Phasierung erhalten wurde. Dies wird insbesondere an den hohen R-Werten und dem niedrigen S_{norm}/S_{ano} (Tabelle 11) deutlich. Die Qualität der hochredundanten Daten ließ sich weder durch das mehrfache Translatieren des Kristalls während der Datensammlung als Schutz gegen Strahlenschäden noch durch das Vereinigen von Datensätzen mehrerer Kristalle verbessern.

Tabelle 11: Datensammlungsstatistik der SapC-Kristalle. Die Prozessierung erfolgte mit den Programmpaketen „XDS“ oder „HKL“.

	(psc1a), hochredundant, Nicht-SAD, anomal prozessiert		(s42), hochredundant, Schwefel-SAD anomal prozessiert		(s93) Nicht-anomal prozessiert
	HKL	XDS	HKL	XDS	HKL
Quelle	ESRF, ID29		ESRF, ID29		ESRF, ID29
Wellenlänge (Å)	0,9393		1,8786		0,8713
Raumgruppe	P622		P622		P622
Zellkonstanten (Å)	a=53,6 c=116,7		a=53,6 c=117,1		a=53,7 c=117,0
Auflösung (Å)	30,0 -3,0		30,0-3,0		30,0-2,45
Höchste Schale (Å)	3,11-3,00	3,16-2,99	3,11-3,00	3,15-2,98	2,54-2,45
Mosaizität (°)	0,989	0,354	1,401	0,402	0,579
Gemessene Reflexe	76947		83253		26693
Unabhg. Reflexe	2293		2284		4057
Mittlere Redundanz	33,5		36,5		6,6
Vollständigkeit (%)	100 (100)	98,3 (94,1)	100 (100)	97,6 (86,8)	99,5 (99,7)
$I/\sigma(I)$ ¹	41,4 (6,1)	42,0 (9,3)	47,4 (7,4)	30,3 (6,7)	15,2 (4,2)
	8,1 (1,0)		8,7 (0,9)		7,0 (1,7)
R_{sym} ²	8,6 (77,8)	6,2(42,2)	8,6 (74,5)	7,1 (54,3)	10,7 (43,7)
R_{pim} ³	1,5 (15,3)		1,5 (12,0)		4,7 (17,6)
$R_{\text{mrgd-F}}$ ⁴		2,5 (14,1)		3,5 (15,9)	
$S_{\text{norm}}/S_{\text{ano}}$ ⁵		1,00		1,02	

¹ Obere Reihe: Werte aus Scalepack, Untere Reihe: Korrigierte Fehlerwerte des Programms „RMERGE“

² $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

³ R_{pim} = Präzisionsanzeiger R-Wert, nach Weiss (2001)

⁴ $R_{\text{mrgd-F}}$ = Qualitätsanzeiger R-Wert nach Diederichs und Karplus (1997).

⁵ S_{norm} bzw. S_{ano} = mittleres $\sigma(I)$ für azentrische Reflexe bei gemeinsamer bzw. getrennter Behandlung der Reflexe eines Friedel-Paares, $S_{\text{norm}}/S_{\text{ano}} > 1$ zeigt die Anwesenheit eines anomalen Signals an

Trotz des eher schwachen anomalen Signals in den gemessenen Daten wurde versucht, die Struktur durch Anwendung der SAD-Methode zu lösen. Hierzu wurde unter anderem eine experimentelle Absorptionskorrektur sowie die Extrapolation der Strahlenbelastung auf null angewendet, um die Datenqualität zu optimieren. Zur Ermittlung der Schwefel-Koordinaten wurden direkte Methoden, implementiert in den Programmen „SHELXD“, SHAKE'N'BAKE“ und „RANTAN“ (auch in Form der automatisierten Verwendung innerhalb des Programms „AUTO-SHARP“) angewendet. Keine der erhaltenen Lösungen war eindeutig und es gelang nicht, auf der Basis einer dieser Lösungen zu einer interpretierbaren Elektronendichte zu gelangen.

4.2 Kristallisation und Derivatisierung von SapD

Die anfängliche Suche nach Kristallisationsbedingungen für SapD wurde in 96-Loch-Platten nach der Methode des sitzenden Tropfens durchgeführt. Hierzu wurden neben den Reihentests „Screen I und II“ auch die Tests „Index-Screen“, „PEG-Ion-Screen“, „PEG-LiCl-Screen“ (Hampton Research) und weitere verwendet. Unter verschiedenen Bedingungen mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel wurden kleine hochverwachsene Kristallbälle aus winzigen Nadeln erhalten. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde daher ein erweiterter Gitterreihentest durchgeführt, der die verwendete Konzentration des Präzipitanten Ammoniumsulfat gegen den pH-Wert optimierte. Die hierbei erhaltenen Kristallisationsbedingungen wurden durch systematische Variation weiterentwickelt, bevor schließlich versucht wurde, im hängenden Tropfen durch Zusatz einer Auswahl von Additiven das Kristallwachstum zu verbessern. Die optimierten Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12: Bedingungen zur optimalen Kristallisation von SapD. Details zur verwendeten Proteinlösung finden sich in Abschnitt 2.1.2.2. Die Kristallisation erfolgt bei 18°C.

Additiv	0,1M Phenol oder 30% (v/v) Dimethylsulfoxid oder 1M Glycin
Präzipitant	2,1 - 2,3M Ammoniumsulfat
Puffer	100mM Natriumcacodylat, pH 6,0 oder 100mM BisTris, pH 5,9
Tropfenaufbau	2µl Reservoir + 2µl Protein, bei Verwendung eines Additivs: bis 2,5µl Protein + 2µl Reservoir + 0,5µl Additivlösung

Dünne, meist verwachsene Plättchen erschienen nach ca. zehn Tagen und wuchsen in den Tropfen für ca. zwei Wochen weiter bis zu einer Größe von maximal $200 \times 80 \times 15 \mu\text{m}^3$ (Abbildung 45). Die erhaltenen Plättchen waren sehr anfällig gegen mechanische Beanspruchung und bildeten zum Teil schon beim Bewegen in der Mutterlauge Risse aus.

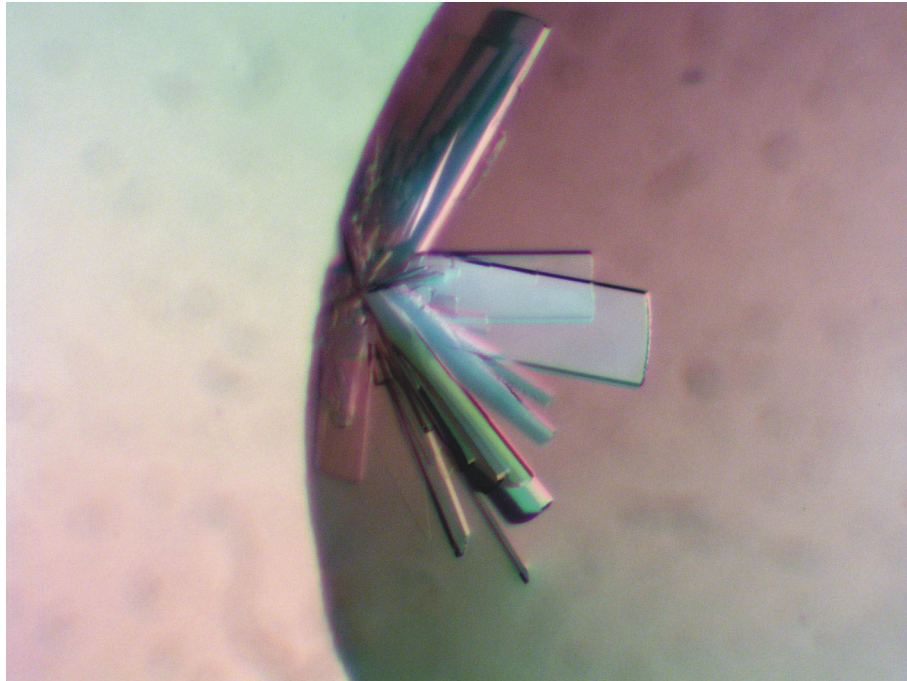


Abbildung 45: Mikroskopische Ansicht von SapD-Kristallen. Kristallisationsbedingungen sind im Text gegeben, die größten gezeigten Kristalle besitzen eine Größe von $200 \times 80 \times 15 \mu\text{m}^3$.

Der erste Datensatz wurde für ein ca. $15 \mu\text{m}$ dickes Plättchen auf dem hauseigenen Drehanodengenerator gesammelt, dabei wurde Diffraction bis zu $2,1 \text{Å}$ Auflösung beobachtet. In dem vermessenen Kristall war unter dem Mikroskop ein leichter Riss sichtbar, der während der Bewegung des Kristalls im Tieftemperatur-Puffer entstanden war. Dementsprechend wurden auch im Beugungsbild zwei Gitter beobachtet, die nur sehr wenig Überlappung zeigten und von denen das eine deutlich schwächere Reflexe als das andere zeigte. Da es selbst bei Verwendung von Synchrotronstrahlung nicht gelang, erneut einen Datensatz mit derart hoher Auflösung zu vermessen, wurden die Daten dennoch zur Strukturbestimmung verwendet. Eine automatische Indizierung der Daten mit dem Programm „DENZO“ (Otwinowski und Minor, 1997) gelang nicht. Auch mit den Programmen „XDS“ (Diederichs und Karplus, 1997) oder „MOSFLM“ (CCP4, 1994) war es selbst bei Verwendung von auf bis zu 100 Bildern gefundenen Reflexen im gesamten vermessenen Rotationsbereich nicht möglich, eine Indizierung durchzuführen. Daher wurden schließlich durch den optischen Vergleich vieler aufeinander folgender Beugungsbilder von Hand einzelne Reflexe und Reflexgruppen identifiziert, die zu einem einheitlichen Gitter gehörten. Die so identifizierten Reflexe eines Gitters wurden dann manuell dem Programm „DENZO“ zur Autoindizierung vorgegeben. Mit dieser Auswahl an Reflexen gelang die Autoindizierung und ergab die Raumgruppe P1 mit Zellkonstanten von $a=40,1 \text{Å}$, $b=41,0 \text{Å}$, $c=65,9 \text{Å}$, $\alpha=89,98^\circ$, $\beta=80,80^\circ$, $\gamma=71,37^\circ$ (Tabelle 13). Die Korrektheit dieser Raumgruppe wurde durch später aufgenommene Datensätze von unter identischen Bedingungen gewachsenen Kristallen mit niedrigerer maximaler Auflösung bestätigt. Aus der Berechnung des Matthews-Koeffizienten wurde auf die Anwesenheit von vermutlich vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit bei einem Lösungsmittelgehalt von ca. 57,1%

und einem Matthews-Koeffizienten von $2,9\text{\AA}^3/\text{Da}$ geschlossen. Eine Bestimmung der Struktur mittels molekularem Ersatz war mit diesem Datensatz nicht möglich, vermutlich da die Kombination aus Abweichungen zwischen korrekter Struktur und Suchmodell und das Vorliegen von insgesamt vier Molekülen in der asymmetrischen Einheit in unbekannter Orientierung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis extrem verschlechterten. Eine Strukturbestimmung mit der SAD-Methode kam wegen der stark unterschiedlichen Ausdehnung und damit Absorption der Kristalle in den verschiedenen Raumrichtungen und der damit verbundenen Messfehler in Kombination mit der niedrigen Symmetrie und der zu erwartenden Strahlenschäden nicht in Frage. Daher wurde versucht, die erhaltenen Kristalle mit Schweratomen zu derivatisieren. Problematisch hierbei ist die Anwendung hoher Konzentrationen von Ammoniumsulfat als Fällungsmittel bei pH-Werten über 5,5, da hier neben NH_4^+ -Ionen auch freies, nukleophiles NH_3 in Lösung vorliegt, wodurch der Einsatz weicher bis mittlerer Metallionen als Liganden zur Bindung an Histidin, Methionin und Disulfidbrücken fast unmöglich gemacht wird. Daher wurden die nativen Kristalle mit verschiedenen harten kationischen Schwermetallionen inkubiert. Daneben wurden Kristalle auch mit Triiodid inkubiert, um entweder (Tri)Iodid-Ionen zu binden oder aber Tyrosin-Reste kovalent zu iodieren. Kristalle, die nach ca. 10 Min. Inkubation mit Schwermetallen schockgefroren wurden, zeigten trotz der Verwendung von Synchrotronstrahlung schlechtere Diffraktion als der native am Drehanodengenerator gemessene Kristall, waren aber auf der Basis der Zellparameter isomorph zu diesem. Für keinen der Datensätze konnte eine erfolgreiche Schwermetallderivatisierung gezeigt werden, was nach Ermittlung der Struktur anhand von Differenzelektronendichten bestätigt wurde, so dass hier auf eine Diskussion dieser Datensätze verzichtet wird.

Ein Kristall, der erst nach 24-stündiger Inkubation mit Triiodid schockgefroren wurde, zeigte Diffraktion bis $2,5\text{\AA}$ Auflösung. Überraschenderweise ergab die Indizierung der Beugungsbilder dieses Kristall eine andere Raumgruppe als für das native SapD. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe $C222_1$ mit Zellkonstanten von $a=40,7\text{\AA}$, $b=75,6\text{\AA}$, $c=67,1\text{\AA}$ ($\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$) (Tabelle 13). Diese Zelle besitzt eine höhere Symmetrie und geht vor allem durch eine Änderung zweier Winkel aus der zuvor beobachteten triklinen Zelle hervor, wie eine monokline Aufstellung der orthorhombischen Zelle mit Zellkonstanten von $a=40,1\text{\AA}$, $b=42,2\text{\AA}$, $c=66,2\text{\AA}$, $\alpha=89,6^\circ$, $\beta=90,0^\circ$, $\gamma=61,9^\circ$ (nicht angepasst, direkt aus der Autoindizierung mit „XDS“ erhaltene Werte) zeigt, in der die Winkel β und γ um 10° größer bzw. kleiner sind als in der ursprünglich erhaltenen Raumgruppe.

Tabelle 13: Datensammlungsstatistik von SapD- und Iodo-SapD-Kristallen. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

Programm	nativ (triklin)	iodiert (orthorhombisch)
	HKL	HKL
Quelle	Drehanodengenerator	Bessyll, BL-I
Wellenlänge (Å)	1,54179	1,12714
Raumgruppe	P1	C222 ₁
Zellkonstanten	a=40,1Å, b=41,0Å, c=65,9Å $\alpha=89,98^\circ$, $\beta=80,80^\circ$, $\gamma=71,37^\circ$	a=40,7Å, b=75,6Å, c=67,1Å $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$
Auflösung (Å)	30,0-2,10	20,0-2,5
Höchste Schale (Å)	2,18-2,10	2,59-2,50
Mosaizität (°)	1,55	1,93
Gemessene Reflexe	43556	20167
Unabhg. Reflexe	21627	3659
Mittlere Redundanz	2,0	5,5
Vollständigkeit (%)	94,5 (91,7)	98,7 (97,7)
$I/\sigma(I)$ ¹	12,7 (3,3)	13,5 (3,1)
	9,2 (2,4)	6,1 (1,1)
R_{sym} ²	5,0 (18,3)	10,4 (49,1)
R_{pim} ³	4,6 (16,8)	4,9 (25,6)

¹ Obere Reihe: Werte aus Scalepack, Untere Reihe: Korrigierte Fehlerwerte des Programms „RMERGE“

² $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

³ R_{pim} =Präzisionsanzeigender R-Wert, nach Weiss (2001)

Durch die höhere Symmetrie in den iodierten Kristallen änderte sich auch die Zahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf lediglich eins, mit einem Matthews-Koeffizienten von $2,9\text{Å}^3/\text{Da}$ und einem Lösungsmittelgehalt von 56,9%. Die Analyse des Datensatzes zeigte ein signifikantes anomales Signal bis ca. 5Å Auflösung an. Trotzdem gelang es in ersten Versuchen nicht, die Lagen der Schweratome zu ermitteln und eine Phasenbestimmung auf der Basis dieses anomalen Signals durchzuführen.

4.3 Strukturaufklärung von SapD

Auf Grund der veränderten Raumgruppe im iodierten Kristall und der Anwesenheit von nur einem Molekül pro asymmetrischer Einheit konnte für diese Kristallform eine Strukturlösung durch molekularen Ersatz erfolgen. Dabei wurde zunächst mit dem Programm „AMORE“ ein Poly-Ser-Modell für eine Domäne von SapD (s. Abschnitt 4.6) platziert, bevor die zweite durch Überlagern mit ganzen Suchmodellen und Starre-Körper-Verfeinerungen eingepasst wurde. Das Modell wurde schließlich mit den Programmen „REFMAC“ (Murshudov et al., 1997) und

„ARP/wARP“ (Perrakis et al., 2001) verfeinert, bevor Seitenketten mit „GUISIDE“ hinzugefügt wurden und das Modell nochmals verfeinert wurde. Dieses Modell wurde dann für eine Dyaden-Suche in der triklinen Raumgruppe mit dem Programm „MOLREP“ eingesetzt, bei der nach Dimeren mit zweizähliger Rotationsachse gesucht wurde. Die erhaltenen Lösungen für alle vier Monomere wurden anschließend erneut mit „REFMAC“ und „GUISIDE“ verfeinert. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Schritte der Strukturlösung, die wesentlichen verwendeten Parameter und die Güte der erhaltenen Modelle in jedem Schritt.

Zur Verfeinerung der Strukturen von Iodo-SapD in der orthorhombischen und SapD in der triklinen Raumgruppe wurde das Programm „REFMAC“ verwendet. Die topologische Beschreibung der gebundenen Heterogruppen, Sulfat, Glycerin und 4-Iodo-Tyrosin, wurde aus der Monomerbibliothek von „REFMAC“ übernommen. Zur Suche nach Wassermolekülen wurde das Programm „ARP_WATERS“ eingesetzt. Die Besetzung des Iod-Atoms im Iodo-Tyrosin und die Besetzung der gebundenen Heterogruppen Glycerin und Sulfat wurde während der Verfeinerung optimiert.

Das Modell für Iodo-SapD in der orthorhombischen Raumgruppe C222₁ bei 2,5Å Auflösung umfasst die Reste 2-79 aus der Aminosäuresequenz von SapD, N- und C-Termini sind ungeordnet, der Rest Tyr54 ist in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe iodiert. Aufgrund der relativ niedrigen Auflösung von nur 2,5Å, der hohen B-Werte ($B_{\text{Wilson}}=65,7\text{Å}^2$) und einer relativ dichten Packung hydrophiler Bereiche konnten ungewöhnlicherweise nur fünf Wassermoleküle sicher lokalisiert werden. Außer dem zum Iodo-Tyrosin modifizierten Tyr54 wurden keine weiteren Heterogruppen lokalisiert. Da die Iodierung nicht vollständig erfolgte, wurde die Besetzung des Iod in Iodo-Tyr54 unter Anpassung der B-Werte des Iods und der benachbarten Atome auf einen Wert von 0,5 angepaßt. Eine volle Besetzung ist anhand dieser Werte auszuschließen, was angesichts des Einflusses auf die Kristallpackung verwundert. Das Modell ist bis auf R-Werte von $R/R_{\text{frei}}= 22,5\%/24,0\%$ verfeinert, im Ramachandran-Diagramm liegen 94,1% der Reste in den bevorzugten und 5,9% in den weiteren erlaubten Regionen, die Statistik der Verfeinerung ist in Tabelle 15 angegeben.

Das Strukturmodell für SapD in der triklinen Raumgruppe P1 umfasst vier NCS-verwandte Proteinketten, A (Reste 2-80), B (Reste 1-80), C (Reste 3-80) und D (Reste 1-79), in denen unterschiedlich viele Aminosäuren am N-Terminus und am C-Terminus ungeordnet sind. Das native Protein umfasst 82 Aminosäuren, die hier verwendeten Konstrukte enthalten darüber hinaus noch ein C-terminales (His)₆-Anhängsel. Neben den vier Proteinketten sind in dem Modell drei Sulfatreste vorhanden, von denen zwei schwächer gebundene mit einer Besetzung von 0,75 modelliert wurden, um eine Anpassung der B-Werte an die der koordinierenden Atome zu erreichen.

Tabelle 14: Schritte der Strukturlösung von SapD durch molekularen Ersatz.

	Schritt	Programm	Parameter	Güte
	Kristallform		Orthorhombisch	
	Suchmodell	Morphserver, Modeller	Poly-Ser-Modell für Reste 23-63	
1.	Rotationssuche	Amore	12-4,5Å Auflösung	drittbeste Lösung R=60,0 CC=32,7
2.	Translationssuche	Amore	12-4,5Å Auflösung	beste Lösung R=54,4 CC=48,5
3.	Starre-Körper- Verfeinerung	Amore	12-4,5Å Auflösung	beste Lösung R=48,4 CC=67,7
4.	Überlagern mit Poly-Ser-Modellen	LSQKAB	Strukturen des Morph-Servers	geschlossene Konformation optimal
5.	Starre-Körper- Verfeinerung	Refmac	35-3,25Å Auflösung, eine Gruppe/Helix	R/R _{frei} =50,2/50,3 CC=56
6.	Verfeinerung (400 Zyklen)	Refmac	35-2,5Å, Matrix- gewicht: 0,03	R/R _{frei} =36,1/40,3
7.	Modelloptimierung (50 Zyklen)	Arp/wArp	ohne Kreuz- validierung	R=28,1
8.	Seitenkettenbau in Arp/wArp Dichte	GuiSide	Rotamerwahl und Verfeinerung	
9.	Verfeinerung (40Zyklen)	Refmac	35-2,5Å, Matrix- gewicht: 0,03	R/R _{frei} =31,8/33,6
	Kristallform		triklin	
	Suchmodell		Modell aus Schritt 9.	
10.	Molekularer Ersatz	Molrep	Dyaden-Suche, 20- 3Å Auflösung	1.Lsg.: R=52 CC=40 2.Lsg.: R=42 CC=61
11.	Starre Körper- und Verfeinerung	Refmac	65-2,1Å, Matrix- gewicht: 0,03	R/R _{frei} =31,7/36,7
12.	Modelloptimierung (50 Zyklen)	Arp/wArp	mit Kreuz- validierung	R/R _{frei} =23,6/32,6
13.	Seitenketten- optimierung	Guise	Rotamerwahl und Verfeinerung	
14.	Verfeinerung (40Zyklen)	Refmac	65-2,1Å, Matrix- gewicht: 0,03	R/R _{frei} =28,9/33,0
	Rechenzeit 1-14:	ca. 3Std.		

Tabelle 15: Verfeinerungsstatistik der SapD- und Iodo-SapD-Modelle.

	Iodo-SapD (sd12)	SapD (sapd)
Auflösung (Å)	35-2,5	30-2,10
R/R _{frei} (%)	22,5/24,0	19,9/26,5
Rmsd. Bindungen (Å)	0,033	0,017
Rmsd. Winkel (°)	2,72	1,69
DPI (Å) ¹	0,25	0,21
Monomere/A.E.	1	4
Anzahl der Proteinreste/ Atome	78/608	316/2531
Anzahl der Wassermoleküle	5	300
Heterogruppen	(Iodo-Tyr)	2 Glycerin, 3 Sulfat
Lösungsmittelgehalt (%)	57,9	51,2
B _{Wilson} (Å ²)	65,7	29,9
⟨B _{Protein} ⟩ (Å ²)	57±7	45±10
⟨B _{Lösungsmittel} ⟩ (Å ²)	57±9	53±9

¹ DPI, Diffraktionsdaten-Präzisions-Indikator = $\sqrt{(N_{\text{atome}}/N_{\text{obs}})(C-1/3)d_{\text{min}} R_{\text{frei}}}$, wobei
 N_{atome} , N_{obs} = Zahl der Atome, unabhängige Reflexe; C=fractionelle Vollständigkeit,
 d_{min} = höchste Auflösung

Eine analoge Vorgehensweise wurde zuvor bei der ultra-hochaufgelösten Struktur des homologen Proteins Granulysin angewandt (Anderson et al., 2003), in der Sulfate mit einer Besetzung von nur 0,5 verfeinert wurden. Desweiteren konnten zwei gebundene Glycerinmoleküle und 300 Wassermoleküle lokalisiert werden. Die Auflösung liegt mit 2,1Å deutlich höher als für Iodo-SapD und auch der Wilson-B-Wert des verwendeten Datensatzes ist mit 30Å² deutlich niedriger als der des Iodo-SapD-Datensatzes; der durchschnittliche B-Wert aller Proteinreste liegt bei 45Å². Das Strukturmodell wurde bis auf R-Werte von R/R_{frei}= 20,0%/26,6% verfeinert. Im Ramachandran-Diagramm liegen 94,1% aller Reste in den bevorzugten, 5,9% in den weiteren erlaubten Gebieten. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

4.4 Die Faltung von SapD

Iodo-SapD und alle vier Monomere in der SapD-Kristallstruktur besitzen eine identische Faltung. SapD ist ein Bündel aus vier α -Helices, A (Reste 4-18, orange in Abbildung 46), B (Reste 25-38, grün), C (Reste 43-62, blau) und D (Reste 68-76, rot). Drei Disulfidbrücken verknüpfen diese Helices zu zwei kovalent verbundenen Paaren: Die terminalen α -Helices A und D werden durch die Disulfidbrücken 1 (Cys5-Cys78) und 2 (Cys8-Cys72) verbunden, Disulfidbrücke 3 (Cys36-Cys47) verbindet die zentralen α -Helices B und C. Helix B ist unterteilt in B'

(hellgrün, Reste 25-33) und B'' (dunkelgrün, Reste 33-38). Dabei ist B'' im Gegensatz zu B' keine typische α -Helix, sondern eine 3_{10} -Helix. In einer solchen Helix bilden drei Reste eine volle Windung und zehn Atome in der Kette trennen die durch eine Wasserstoffbrücke verbundenen Carbonylsauerstoff-Atome eines Restes n von den Peptid-Stickstoff-Atomen der Reste n+3; in dieser Nomenklatur wird eine Standard- α -Helix als $3_{6_{13}}$ -Helix bezeichnet. Helix C ist durch einen Knick zwischen Tyr54 und Glu55 unterteilt in C' (grünblau, Reste 43-54) und C'' (blau, Reste 55-62), das Zusammenfassen beider Teile unter der gemeinsamen Bezeichnung Helix C beruht auf der Homologie zu SapB (Abschnitt 4.6). N- und C-Terminus liegen nah benachbart, die eingefügte C-terminale (His)₆-Gruppierung ist im Kristall vollkommen fehlgeordnet und hat keinen Einfluß auf die restliche Proteinstruktur (Abbildung 46).

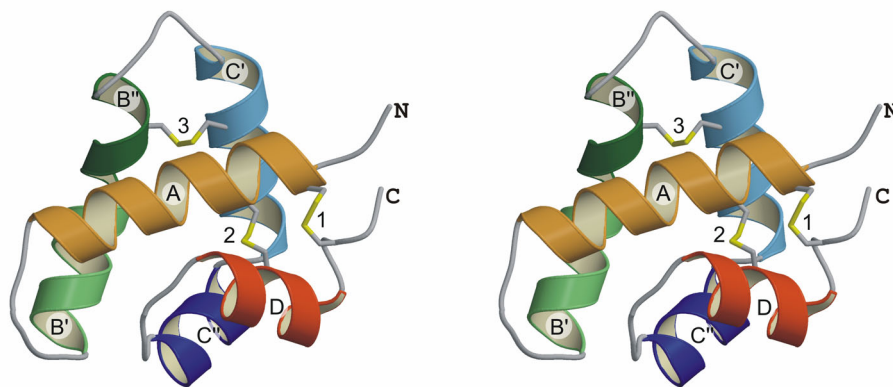


Abbildung 46: Bänderdiagramm der Faltung von SapD (stereo). Gezeigt ist Monomer A aus der Kristallstruktur von SapD (Raumgruppe P1). N- und C-Termini sowie die Lage der drei Disulfidbrücken 1 (Cys5-Cys78), 2 (Cys8-Cys72) und 3 (Cys36-Cys47) sind angegeben. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist farblich gekennzeichnet: Helix A (Reste 4-18) ist orange, Helix B (Reste 25-38) ist grün, Helix C (Reste 43-62) blau und Helix D (Reste 68-76) rot gefärbt. Helix B ist unterteilt in B' (hellgrün, Reste 25-33) und B'' (dunkelgrün, Reste 33-38), da B'' keine typische α -Helix, sondern eine 3_{10} -Helix ist. Helix C ist durch einen Knick zwischen Tyr54 und Glu55 unterteilt in C' (hellblau, Reste 43-54) und C'' (dunkelblau, Reste 55-62).

Die vier Helices in SapD bilden ein verzerrtes 4-Helix-Bündel, in dem die Helices in den über Disulfidbrücken verknüpften Helixpaaren A-D und B-C nicht parallel verlaufen. Die Helices werden, neben den Disulfidbrücken, durch ein intensives Netzwerk hydrophober Interaktionen zusammengehalten. Insgesamt 35 der 59 Reste in den Helices sind in Kontakt mit Resten in anderen Helices (Abbildung 47), darunter alle Reste von Position 4-14 in Helix A. Besonders intensive Kontakte bilden Tyr14 (Helix A) mit Phe38 (Helix B'') (markiert mit 1 in Abbildung 47) und Phe50 (Helix C') mit Phe4 und Cys8 (beide Helix A) (markiert mit 2 in Abbildung 47). Neben den hydrophoben Kontakten existieren auch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Helices, deren auffälligste zwischen den beiden Glutamat-Resten 33 und 55, die an den Übergangsstellen zwischen den Helices B'/B'' bzw. C'/C'' liegen, gebildet wird. Der

mittlere Abstand der beteiligten Carboxylat-Sauerstoffe in den vier Ketten beträgt nur 2,5Å (markiert mit 3 in Abbildung 47). Dies legt nahe, dass zumindest eines der beteiligten Glutamate, die an der Oberfläche liegen, trotz des bei der Kristallisation verwendeten pH-Werts von 5,9 protoniert ist und eine Wasserstoffbrücke mit dem zweiten Glutamat ausbildet, da beide Reste sonst eher abstoßenden Wechselwirkungen ausgesetzt wären. Die beiden beteiligten Glutamate tragen durch ihre Interaktion vermutlich zu den an den Übergangsstellen der Helices B'/B'' bzw. C'/C'' auftretenden Verzerrungen der helikalen Geometrie bei.

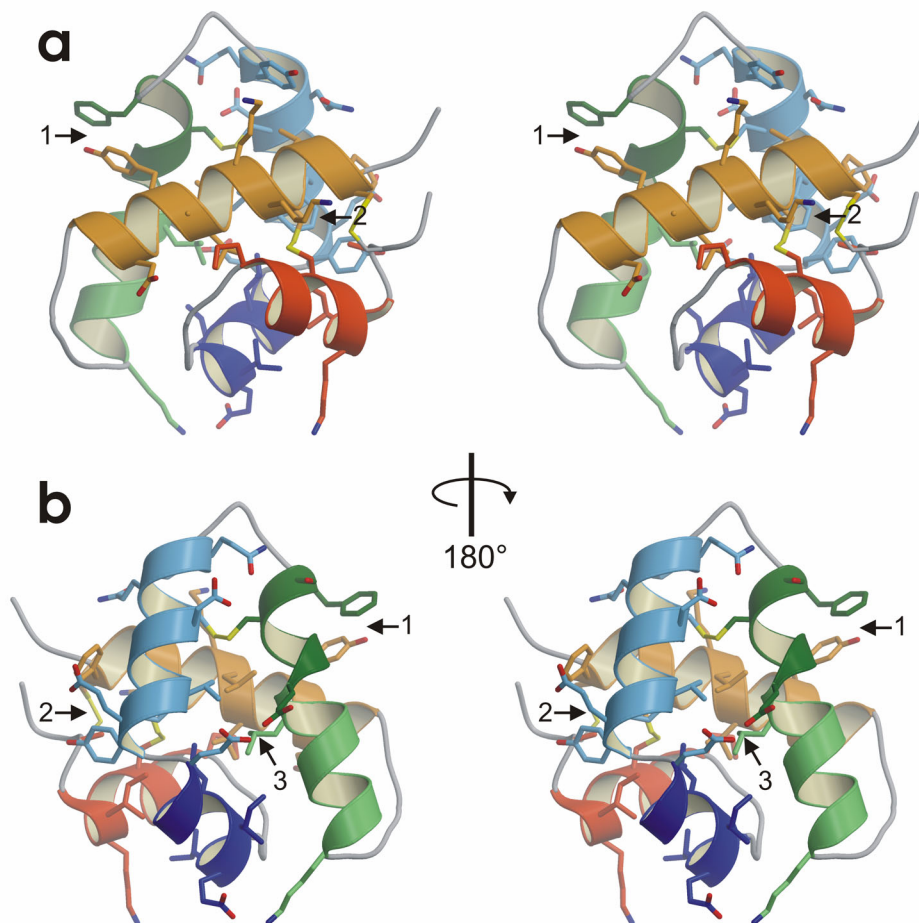


Abbildung 47: Intramolekulare Wechselwirkungen in SapD (stereo). Die Färbung entspricht Abbildung 46, ebenso die Perspektive in (a), (b) ist um 180° um eine vertikale Achse rotiert. Aminosäure-Reste, die interhelikale Interaktionen bilden, sind mit C-Atomen in der Farbe der jeweiligen Helix gezeigt.

Das kristallisierte SapD ist sowohl nach der beobachteten Elektronendichte als auch nach Massenspektrometrie (Daten nicht gezeigt) nicht glykosyliert, obwohl eine unter den Sap-Proteinen konservierte N-Glykosylierungsstelle (Asn22) für die Expression in *Pichia pastoris* nicht entfernt wurde. Aus humanem Gewebe gereinigte Sap-Proteine sind hingegen an dieser Position glykosyliert (Ito et al., 1993; Yamashita et al., 1990). Allerdings besitzen auch unglykosylierte, in *E.coli* exprimierte Sap-Proteine biologische Aktivität (Qi et al., 1994). Ein

gewisser Einfluß der Glykosylierung auf die Interaktion zwischen Sap-Proteinen und Membranen kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.5 Vergleich der Strukturen von SapD und Iodo-SapD

Die Faltung aller vier Monomere in der SapD-Struktur ist sehr ähnlich und auch Iodo-SapD, das ja erst im Kristall iodiert wurde, besitzt dieselbe Faltung, wie eine Überlagerung der $C\alpha$ -Kettenverläufe der Moleküle zeigt (Abbildung 48). Von Gly3 bis Cys78 ist die Rückgratstruktur aller Ketten wohlgeordnet und zeigt kaum Unterschiede; die Rmsd-Werte für die Überlagerung der $C\alpha$ -Atome dieser Reste mit den entsprechenden Atomen der Kette A des SapD sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Obwohl Iodo-SapD in einer anderen Kristallform vorliegt, sind die positionellen Rmsd-Werte zwischen Iodo-SapD und der A-Kette von SapD nicht größer als zwischen den SapD-Ketten.

Tabelle 16: Unterschiede in Struktur und B-Wert zwischen Iodo-SapD und SapD-Ketten. Mittlere Rmsd-Werte für Position und B-Wert für Überlagerungen nur der $C\alpha$ - oder aller Atome der einzelnen Ketten mit den entsprechenden Atomen der Kette A von SapD. Die Rmsd-Werte für den B-Faktor für Iodo-SapD sind eingeklammert, da eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Kristallen hier nicht besteht.

	Rmsd (Position) [Å]		Rmsd (B-Werte) [Å ²]	
	$C\alpha$	Alle	$C\alpha$	Alle
SapD Kette B	0,4	1,0	3,6	4,6
SapD Kette C	0,2	0,8	10,7	10,7
SapD Kette D	0,3	1,0	10,3	10,5
Iodo-SapD	0,3	1,1	(16,8)	(17,2)

Lediglich die Termini der einzelnen Ketten sind weniger geordnet oder liegen in mehreren Konformationen vor, so dass stärkere Abweichungen im Rückgratverlauf für Gly2-Gly3 und Pro79-Ser80 beobachtet werden. Die Ketten C und D besitzen deutlich größere Abweichungen der B-Werte von denen der Kette A als Kette B. Der Grund hierfür liegt in deutlich erhöhten B-Werten der Ketten C ($B_{\text{protein}}=50\text{Å}^2$) und D ($B_{\text{protein}}=50\text{Å}^2$) im Vergleich zu A ($B_{\text{protein}}=40\text{Å}^2$) und B ($B_{\text{protein}}=41\text{Å}^2$) (Abbildung 49). Die B-Werte von Iodo-SapD sind nicht direkt mit denen für die Ketten des SapD vergleichbar, da sie in verschiedenen Kristallen und Kristallformen bestimmt wurden. Die orthorhombische Iodo-SapD-Kristallstruktur zeigt deutlich höhere atomare B-Werte (Tabelle 15). Es bleibt bemerkenswert, dass der Iodo-SapD-Kristall nach der Umwandlung der Raumgruppe durch das Iodieren überhaupt noch derart gute Diffraction zeigt. Tatsächlich hat die Verteilung der durchschnittlichen B-Werte pro Rest noch eine Ähnlichkeit mit der der SapD-Ketten in der triklinen Kristallform, mit höheren B-Werten für die Schleifenregionen um die Aminosäuren 20 und 65 (Abbildung 49).

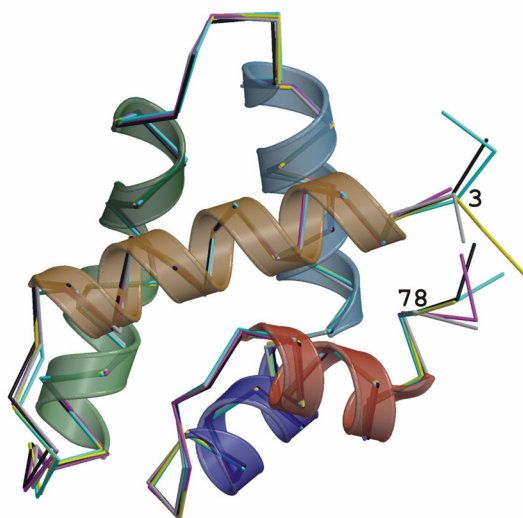


Abbildung 48: Überlagerung aller SapD-Monomere und des Iodo-SapD. Für die Überlagerung wurden nur die $C\alpha$ -Atom-Positionen der Reste 3-78 (angezeigt) verwendet. Die $C\alpha$ -Kettenverläufe für die Monomere A, B, C und D des SapD sind in schwarz, türkis, rosa und gelb gezeigt, die des Iodo-SapD in grau. Zur besseren Übersicht sind die α -Helices als Bändermodell zusätzlich entsprechend Abbildung 46 transparent dargestellt, auch die Perspektive entspricht dieser Abbildung.

Die vorhandenen leichten Abweichungen zwischen den Hauptkettenverläufen der SapD-Ketten und des Iodo-SapD lassen sich an Hand einer graphischen Darstellung der Rmsd-Werte der Atompositionen für Haupt- und Seitenketten (Abbildung 49) analysieren.

Auffällige Unterschiede zwischen den Hauptkettenverläufen des Iodo-SapD und des SapD finden sich vor allem in zwei Regionen um Tyr54/Glu55 und Glu60/Ile61. Tyr 54 ist das in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe am $C^{\epsilon 1}$ -Atom iodierter Tyrosin (Restename IYR). Das Iodatom liegt innerhalb der Ebene des Phenylringes mit einem Bindungsabstand von $2,1\text{\AA}$ zu $C^{\epsilon 1}$. Es bildet, vermutlich unter Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen, einen Kontakt zu Phe4 mit einem Abstand von nur $2,8\text{\AA}$ zum Atom $C^{\delta 2}$ des Phe4, wodurch die Lage der Tyr-Seitenkette leicht verändert wird (Abbildung 49, mittleres Diagramm). Diese Störung wird über Kontakte zu Val57 weiter auf Glu60 übertragen (Abbildung 50).

Die zweite Region mit Abweichungen im Hauptkettenverlauf befindet sich in der Umgebung von Arg17, das in den Ketten A, B und C des SapD an der Bindung von Sulfat-Ionen beteiligt ist. Die Bindung dieser Sulfat-Ionen erfolgt in einem Falle (SO_4 B100) durch Reste zweier NCS-verwandter Ketten und zweimal (SO_4 A100, C100) nur durch eine Kette, was die unterschiedlichen Hauptkettenverläufe erklärt. Details der Sulfatbindung werden im Abschnitt 4.7 besprochen.

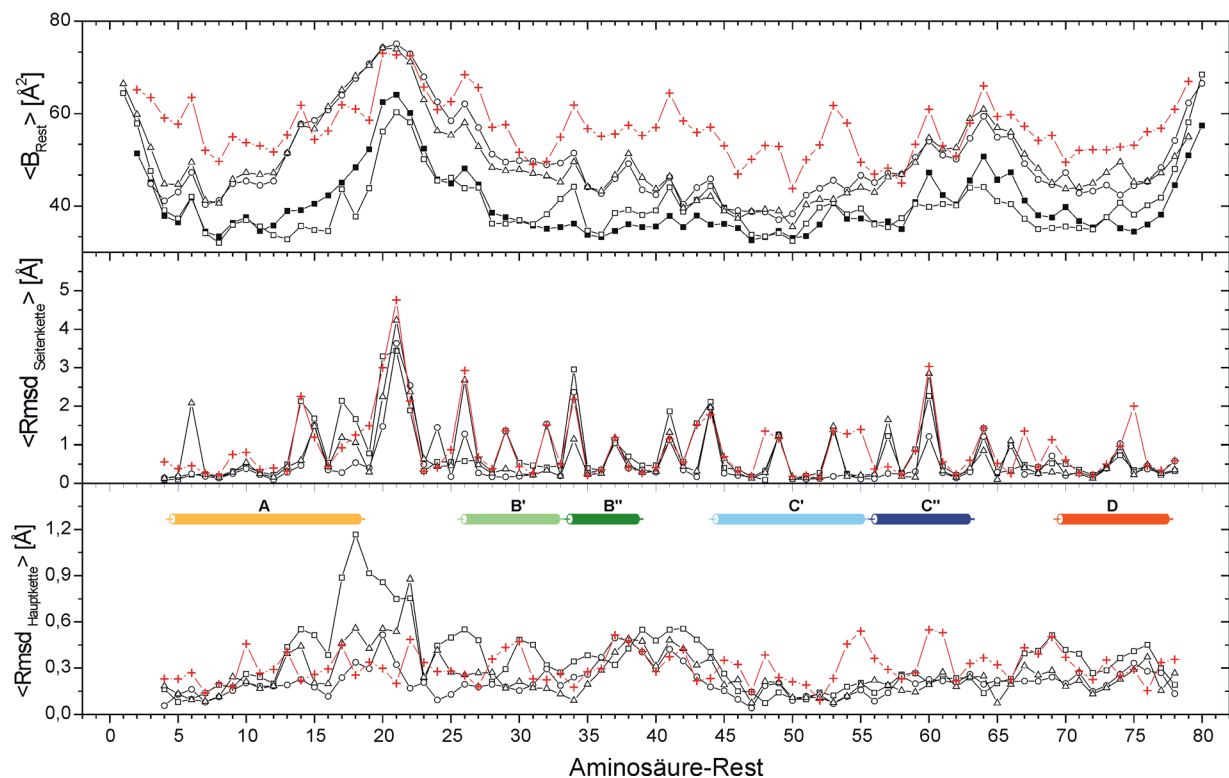


Abbildung 49: Rmsd-Werte der Überlagerung einzelner Ketten und B-Werte für SapD. Aufgetragen ist der mittlere Rmsd-Wert pro Aminosäure für die Hauptkettenatome (unten) bzw. die Seitenkettenatome (Mitte) für die Überlagerung aller Atome von Rest 3-78 der jeweiligen Ketten mit Kette A der SapD-Kristallstruktur und der mittlere B-Wert pro Aminosäure (oben) für alle Ketten. Im untersten Diagramm ist die Sekundärstruktur von SapD in gleicher Farbkodierung wie in Abbildung 46 angegeben. Die verwendeten Symbole sind: Kette A: Quadrat, Kette B: Quadrat (offen), Kette C: Kreis, Kette D: Dreieck, Iodo-SapD: rotes Kreuz.

Die Kristallpackung weist erwartungsgemäß eine große Ähnlichkeit zwischen der triklinen und der orthorhombischen Kristallform auf. In beiden bildet jede einzelne Proteinkette im wesentlichen Kontakte zu vier anderen Proteinketten, die sich mit abnehmender Interaktionsstärke in drei Typen, I, II und III, klassifizieren lassen. In der orthorhombischen Kristallform des Iodo-SapD bildet das einzige Proteinmolekül in der asymmetrischen Einheit einen Typ-I-Kontakt mit einem durch die Operation $[-x, y, -z + 1/2]$, $[+a, 0, 0]$ erzeugten Symmetrieverwandten, und je einen Typ-II-Kontakt zu zwei durch die Raumgruppen-Symmetrieoperationen und Translationen von $[x + 1/2, -y + 1/2, -z]$, $[-a, 0, +c]$ bzw. $[x + 1/2, -y + 1/2, -z]$, $[0, 0, +c]$ erzeugten Verwandten, der Typ-III-Kontakt wird zu einem durch $[x, -y, -z]$, $[0, 0, +c]$ erzeugten ausgebildet. In der triklinen Kristallform des nicht-iodierten SapD entstehen die Kontakte dagegen zwischen den NCS-verwandten Molekülen. Hierbei bilden die Moleküle A/B und C/D, die sich untereinander auch in den B-Werten stärker ähneln, zwei Gruppen: A bildet einen Typ-I-Kontakt mit einer D-Kette, translatiert um $[-a, 0, c]$, zwei Typ-II-Kontakte mit zwei B-Ketten, translatiert um $[-a, 0, 0]$ bzw. $[-a, b, 0]$ und einen Typ-III-Kontakt mit der B-Kette der gleichen asymmetrischen Einheit; B

bildet in gleicher Weise einen Typ-I-Kontakt mit C aus der gleichen asymmetrischen Einheit, zwei Typ-II-Kontakte mit zwei D-Ketten (gleiche asymmetrische Einheit bzw. [0,-b,0]) und einen Typ-III-Kontakt mit einer weiteren D-Kette [-a,0,0].

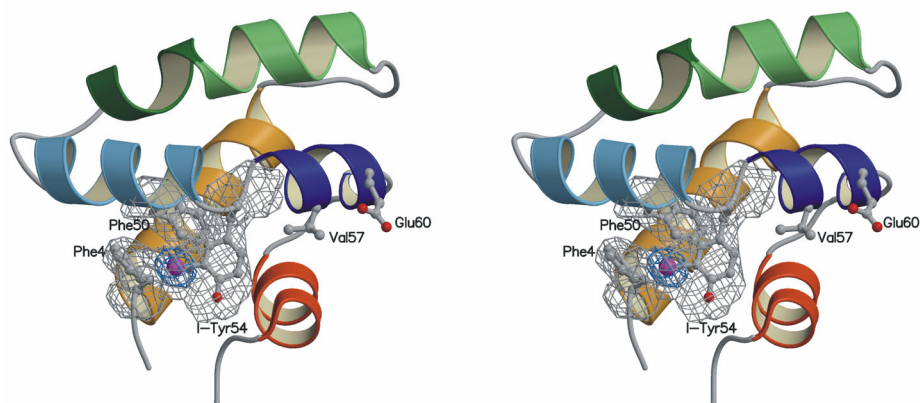


Abbildung 50: Elektronendichte um Iodo-Tyr54 in Iodo-SapD. Neben dem Bändermodell in gleicher Färbung wie Abbildung 46 sind die in Abwesenheit des Iodatoms berechneten Elektronendichten gezeigt (2Fo-Fc konturiert bei 1σ , grau und Fo-Fc konturiert bei 5σ , blau).

Die an den einzelnen Kontakt-Typen beteiligten Aminosäuren sind in Tabelle 17 zusammengefasst. In den Typ-I-Kontakten existieren durchschnittlich 34 interatomare Kontakte, an denen 8-12 Reste je Partner beteiligt sind. Die Kontakte besitzen gemischt hydrophoben und hydrophilen Charakter, es werden 5-10 Wasserstoffbrücken in bevorzugter Geometrie gebildet. In den Typ-II-Kontakten gibt es nur 10-14 interatomare Kontakte, daran sind nur 4-6 Aminosäuren je Partner beteiligt. Die wesentlichen Interaktionen sind eine Wasserstoffbrücke zwischen den Seitenketten von Glu33(Monomer A) und Lys74(Monomer B) sowie hydrophobe Kontakte zwischen Glu55(A) und Phe70(B), insgesamt werden zwei bis vier Wasserstoffbrücken gebildet. Im Gegensatz zu den ersten beiden unterscheidet sich der Kontakt-Typ III zwischen Iodo-SapD und SapD: In Iodo-SapD interagieren die Paare Arg17(A)/Asn18(B) und umgekehrt unter Ausbildung von vier Wasserstoffbrücken miteinander (Kontakt IIIa), während in den triklinen SapD-Kristallen Arg17 und Asn18 einer Kette mit Lys34, Asp41 und Ser37 der zweiten Kette interagieren. Dies steht in Zusammenhang mit der Sulfatbindung an Arg17 in den beteiligten Ketten, die im Abschnitt 4.7 ausführlicher betrachtet wird.

Im Gegensatz zum dimeren SapB liegt SapD, genau wie SapC und SapA, unter einer Reihe von Bedingungen, die dem physiologischen Milieu ähneln, als Monomer vor. Dennoch gibt es Hinweise aus ersten Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie, dass zumindest SapC in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht steht, das durch pH-Wert und Osmolarität beeinflusst wird (pers. Mitteilung, Michaela Wendeler).

Tabelle 17: Kontaktflächen in SapD-Kristallen.

	Beteiligte Reste ¹	Gebildet zwischen	Interatomare Kontakte ²	Wasserstoffbrückenbindungen ³
Typ I	(1,2), <u>3,4</u> ,	Iodo-SapD	38	10
	41, <u>42</u> ,(43,44)	SapD B-C	39	6
	45, <u>46</u> ,(48), <u>49</u> (52,53)	SapD A-D	26	5
Typ II	26,29, <u>33</u> , <u>55</u> ,	Iodo-SapD	11	5
	(59), <u>70</u> , <u>73</u> , <u>74</u> ,	SapD A-B	14	4
	(78)	SapD C-D	14	3
Typ IIIa	14, <u>17</u> , <u>18</u> ,38	Iodo-SapD	8	3
Typ IIIb	<u>17</u> , <u>18</u> , <u>34</u> , <u>37</u> ,	SapD C-D	6	3
	<u>38</u> , <u>39</u> ,41,44	SapD A-B	16	3

¹ eingeklammert: nicht an allen Kontakten dieses Typs beteiligt, unterstrichen: starke Interaktion

² Mit einem interatomaren Abstand von weniger als 3,66Å

³ Bevorzugte Wasserstoffbrücken gemäß dem Programm „CONTACT“

Aus diesem Grunde soll hier die Kontaktfläche I, die nach der Zahl der interatomaren Kontakte und der Wasserstoffbindungen eindeutig die stärkste ist, etwas ausführlicher analysiert werden. Die Änderung der dem Lösungsmittel Wasser zugänglichen Oberfläche pro Monomer beträgt im Kontakt SapD (Monomer B)-SapD (Monomer C), dem Typ-I-Kontakt mit der größten Zahl interatomarer Interaktionen, 526\AA^2 , das sind 11% der Oberfläche eines Monomers. Im Vergleich dazu beträgt die verborgene Oberfläche pro Monomer im SapB-Dimer ca. 1260\AA^2 oder 22% der Monomer-Oberfläche. Dennoch ist die Kontaktfläche zwischen B- und C-Kette sehr kompakt und besteht aus einer durchgehenden Fläche (s. Abbildung 51(a)). Zu den wichtigsten Interaktionen gehören vier Wasserstoffbrücken, die kürzer als $3,0\text{\AA}$ sind. Zwei davon werden jeweils zwischen dem Peptid-N von Lys45 und dem Peptid-O von Pro42 gebildet, die anderen beiden entstehen zwischen $N^{\delta 2}$ von Gln46 und $O^{\delta 1}$ von Gln49. Insgesamt gesehen ist dieser Kontakt angesichts der geringen Größe der Moleküle, der hohen Zahl interatomarer Kontakte und der gebildeten Wasserstoffbrücken erstaunlich intensiv. Es wäre daher durchaus zu vermuten, dass ein solcher Kontakt auch zu einer Bildung von Dimeren in Lösungen mit hoher Proteinkonzentration führen könnte.

Interessanterweise bildet das homologe Oberflächen-assoziierte Protein B (SP-B) ein durch eine Disulfidbrücke verknüpftes Dimer aus, für das bisher nur Strukturvorhersagen existieren. Es ist jedoch bekannt, dass die Disulfidbrücke zwischen beiden Monomeren durch eine Verknüpfung der Cys-Reste 48/48' der beiden Untereinheiten entsteht, entsprechend Gln49 in

SapD (s. Abbildung 52). Das sehr wenig begründete und wenig zuverlässige Homologiemodell (Zaltash et al., 2000) geht desweiteren davon aus, dass die Interaktion der Aminosäuren Glu51 (1.Monomer, entsprechend Ala52 im SapD) und Arg52 (2. Monomer, entsprechend Glu53) wesentlich zur Stabilisierung des Dimers beiträgt. Eine weitere Interaktionsstelle ausser dieser die Disulfidbrücke umgebenden wird nicht vermutet. Bemerkenswerterweise ist damit die Interaktionsstelle zwischen den beiden kovalent verbundenen SP-B-Monomeren sicher dieselbe, die auch in dem Kristallkontakt I des SapD vorliegt. Da das Modell für das dimer SP-B ohne jede Basis für die Orientierung der Monomere zueinander nur aufgrund einer unzureichenden Energieminierung postuliert wird, bietet der Kontakt der Ketten B und C vermutlich auch ein besseres Gerüst zur Modellierung der Struktur des medizinisch hochrelevanten SP-B.

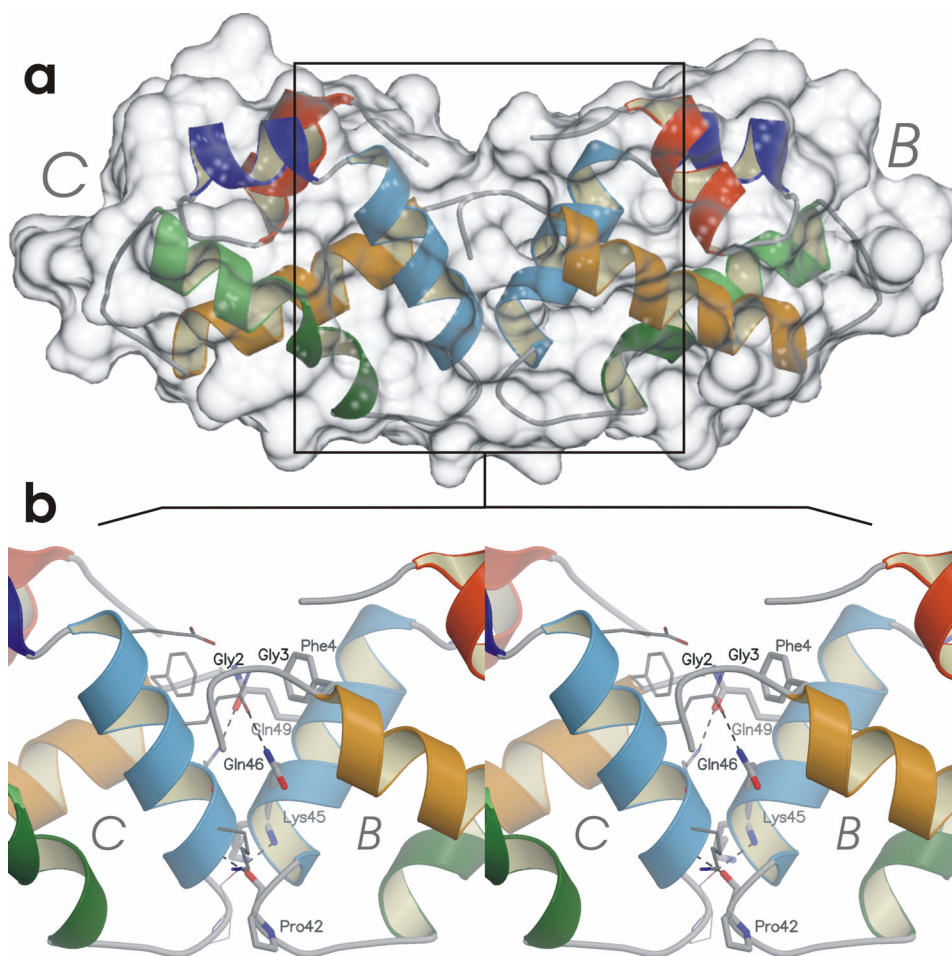


Abbildung 51: Kontaktfläche zwischen den Molekülen B und C im SapD-Kristall. (a) Bändermodell umgeben von transparenter Oberfläche. (b) Ausgewählte Aminosäuren in Linien- (Molekül C) und Stabdarstellung (Molekül B) (stereo), der gezeigte Ausschnitt ist in (a) angezeigt, die an direkten Kontakten beteiligten Aminosäuren sind in Kette B beschriftet. Die Moleküle B und C sind in (a) und (b) mit grauen Großbuchstaben beschriftet.

4.6 Strukturvergleich von SapD mit homologen Proteinen

Sap- und Sap-ähnliche Proteine gehören zu einer großen, aber sehr divergenten Familie von Proteinen und Proteindomänen, die durch eine konservierte Sekundärstruktur, die Abfolge von vier α -Helices und zumeist die konservierte Lage der drei Disulfidbrücken gekennzeichnet ist. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine funktionelle Gemeinsamkeit, nämlich die Interaktion mit Lipiden, zumeist mit Lipid-Membranen. Die Details der Interaktion und die physiologischen Aufgaben der Proteine unterscheiden sich aber deutlich. Die Sap-Proteine selbst arbeiten in Lysosomen bei pH-Werten um 4,7 als Coaktivator-Proteine im Sphingolipid-Metabolismus. NK-Lysin, ein basisches Polypeptid mit Vorkommen in „Natürlichen Killerzellen“ und T-Lymphocyten, lysiert Membranen verschiedener Tumorzelllinien, nicht aber die roten Blutkörperchen und besitzt antibakterielle Aktivität. Ähnliche Aufgaben hat auch das gleichfalls basische Granulysin, das ebenso von T-Lymphocyten gebildet wird und eine Reihe verschiedener Bakterien, Pilze und Tumorzelllinien lysiert. Das Oberflächen-assoziierte Protein B (SP-B) aus der Säugerylunge ist dagegen Bestandteil einer komplexen Mischung aus Lipiden und Proteinen und essentiell für eine normale respiratorische Aktivität der Lunge. SP-B ist, wie in Abschnitt 4.5 besprochen, ein Disulfid-verbrücktes Dimer. Die Amöbaporen-Proteine A, B und C werden von der Amöbe *Entamoeba histolytica* ausgeschüttet, um Poren in der Membran der Wirtszelle zu bilden.

Eine Sequenzanpassung der erwähnten Proteine ist in Abbildung 52 gezeigt. Zu der ca. 500 bekannte Mitglieder umfassenden Familie der Sap-ähnlichen Proteine gehören darüber hinaus Domänen aus pflanzlichen Aspartat-Proteasen und der Acyloxyacyl-Hydrolase des Menschen, die J3-Kristalline und eine Reihe weiterer wenig charakterisierter Proteine, darunter bemerkenswerterweise auch ein menschliches Protein mit einer vorhergesagten Transmembranhelix. Innerhalb dieser Familie ist die Lage der Disulfid-verbrückten Cysteine (orange in Abbildung 52) nahezu vollständig konserviert, ebenso die Anordnung hydrophober Reste, die für die Interaktionen zwischen den amphipathischen Helices verantwortlich sind (grün in Abbildung 52). Diese Reste weisen allerdings auch schon eine hohe Rate konservativer Austausche auf. Darüber hinaus ist die Sequenzkonservierung in der Familie der Saposin-ähnlichen Proteine sehr gering, typischerweise um oder unter 30%.

Bereits die humanen Proteine SapA, -B und -C zeigen eine genauso geringe Sequenzidentität zu SapD wie alle anderen Proteine der Familie auch. Drei ausnahmsweise identische Reste zu SapD (Asn22, Thr24, Val54) sind in Abbildung 52 blau gefärbt. Lediglich SapD aus verschiedenen Säugern zeigt eine hohe Sequenzidentität und auch eine Konservierung der Ladungsverteilung, z.B. der positiv geladenen Reste (mit + markiert in Abbildung 52) mit humanem SapD. Damit ist allein der große, nicht durch Zufall zu erklärende Sequenzunterschied ein eindeutiges Kennzeichen für unterschiedliche Aufgaben und Funktionsweisen der verschiedenen Sap- und Sap-ähnlichen Proteine. Von mehreren Sap-ähnlichen Proteinen sind dreidimensionale Strukturen bekannt, dies sind NK-Lysin (NMR, pdb:1NKL), Granulysin (Röntgenstruktur, pdb:1L9L) und das dimere SapB (Röntgenstruktur, pdb:1N69). Darüberhinaus liegen strukturelle Daten für zwei weitere Verwandte vor: Erstens die Struktur einer Sap-ähnlichen Domäne als Teil der Aspartat-Proteinase Phytapsin (Röntgenstruktur, pdb:1QDM),

in der die Reihenfolge der Helixpaare AB und CD in der Sequenz bei ähnlicher Struktur umgekehrt ist und zweitens die des Bacteriocins (NMR, pdb:1e68), eines porenbildenden zyklischen Proteins aus *Enterococcus faecalis*, das keinerlei Sequenzhomologie zu SapD und auch keine Disulfidbrücken besitzt, aber in der dreidimensionalen Struktur Ähnlichkeiten zum NK-Lysin aufweist. Auf einen Vergleich der SapD-Struktur mit den beiden letztgenannten Strukturen wird wegen deren strukturellen Besonderheiten verzichtet.

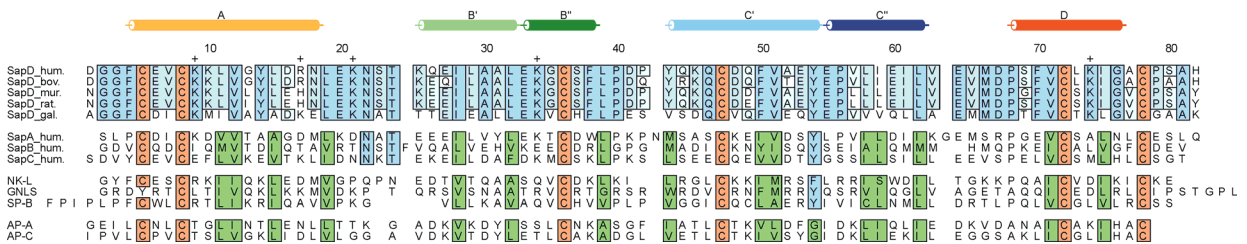


Abbildung 52: Sequenzanpassung von humanem SapD und Homologen. Im ersten Block sind Sequenzen von SapD aus Mensch (hum), Rind (bov), Maus (mur) und Huhn (gal), im zweiten die der humanen Proteine SapA, -B und -C, im dritten die der Homologen NK-Lysin (NK-L, aus Schwein), Granulysin (GNLS, aus Mensch) und Oberflächen-assoziiertes Protein B (SP-B, aus Schwein), im vierten die der Amöbaporen-Proteine A und C aus *Entamoeba histolytica* gezeigt. Die an Disulfidbrücken beteiligten Cysteine sind orange hinterlegt, die Reste im ersten Block sind nach Identität in drei Abstufungen blau gefärbt, ebenso drei innerhalb der Sap-Proteine identische Reste (Asn22, Thr24, Tyr54). In grün sind hydrophobe Reste hinterlegt, die an den Interhelix-Interaktionen beteiligt sind. Oberhalb der Sequenzen ist die Sekundärstruktur des SapD angezeigt, (+)-Zeichen geben die Position konservierter positiv geladener Reste innerhalb der SapD-Proteine (erster Block) an. Die Nummerierung richtet sich nach der Sequenz von menschlichem SapD.

Die Kristallstruktur des dimeren SapB (Ahn et al., 2003) unterscheidet sich ganz deutlich von der des SapD (Abbildung 53). In SapD liegt ein geschlossenes 4-Helix-Bündel vor, in dem die durch Disulfidbrücken verbundenen Helixpaare jeweils intensive Kontakte miteinander eingehen und so eine dem Lösungsmittel nicht zugängliche Interhelix-Kontaktfläche und einen hydrophoben Kern bilden. SapB hingegen bildet ein hufeisenförmiges Dimer, in dem die einzelnen Monomere „geöffnet“ sind, d.h. die disulfidverbrückten Helixpaare wechselwirken weniger stark. Im Gegensatz zu dem in *E.coli* exprimierten Granulysin, dem aus Schweine-darm gereinigten NK-Lysin und dem in *P.pastoris* exprimierten SapD wird das in *E.coli* exprimierte SapB mit einer endogenen heterogenen Population ans Protein gebundener Lipide isoliert und gereinigt. Neben der Stabilisierung der offenen Konformation des SapB durch die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Dimers muss daher auch der Einfluss der Lipide beim Aufbrechen der hydrophoben Kontakte zwischen den Helices berücksichtigt werden. In der Kristallstruktur des SapB wurden zwei verschiedene Dimere beschrieben, ein asymmetrisches, mit in verschiedenen Orientierungen gebundenen Lipiden (AB-Dimer, Abbildung 53(b)) und ein symmetrisches (CC'-Dimer), in dem keine gebundenen Lipide identifiziert werden konnte (Ahn et al., 2003). Es wird spekuliert, daß diese beiden Zustände den

physiologisch relevanten Zuständen mit gebundenem und ohne gebundenes Lipid entsprechen. Dieses wäre ein dramatischer Unterschied zu SapD, dessen hier kristallisierte lipidfreie Form eindeutig durch ein geschlossenes 4-Helix-Bündel mit hydrophobem Kern charakterisiert ist. Hypothesen zur Lipid-Interaktion des SapD werden im Abschnitt 4.7 diskutiert.

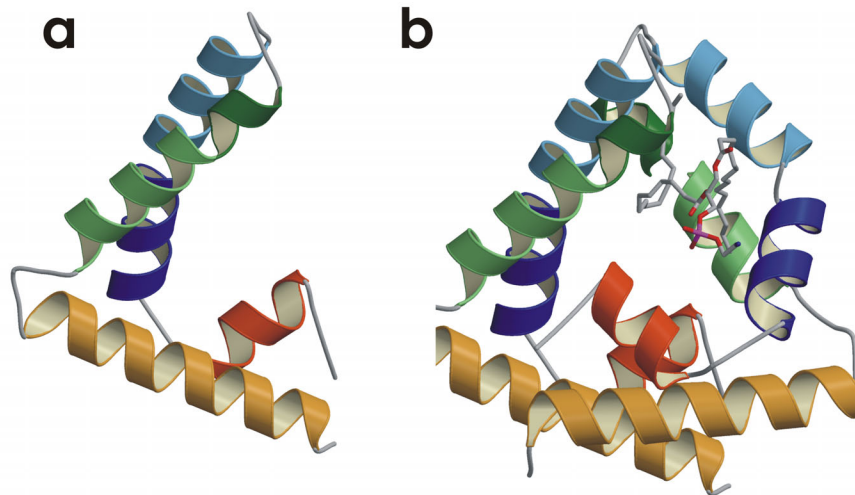


Abbildung 53: Bändermodell der Struktur des SapB. (a) Monomer A, (b) Dimer AB aus der SapB-Kristallstruktur. Im AB-Dimer ist die innere Höhle durch Lipide ausgefüllt, von denen nur eins modelliert wurde (gezeigt als Stabmodell). Homologe Bereiche der Struktur sind entsprechend Abbildung 46 in den auch für SapD verwendeten Farbtönen gezeigt. Die verwendeten Koordinaten entstammen aus (pdb: 1N69, A,B) (Ahn et al., 2003).

Vergleicht man die hier erhaltene, vollständig geschlossene Konformation von SapD mit der Struktur des SapB, so stellt sich heraus, dass die Strukturen durch eine Transformation ineinander überführbar sind, die im wesentlichen als Scharnier-Drehbewegung starrer Körper beschreibbar ist (Abbildung 54, Abbildung 55). Der Übergang zwischen zwei SapD-Modellen, eines auf der Basis des Monomer A aus der SapB-Kristallstruktur erzeugt (offene Konformation, „0“ in Abbildung 54), das andere in der beobachteten geschlossenen Konformation („11“ in Abbildung 54) wurde mit Hilfe des „MORPHSERVER“ simuliert. Die Analyse der offenen und geschlossenen Konformationen mit dem Programm „DYNDOM“ identifiziert die Hauptscharnier-Regionen am N-Terminus von Helix B bei Gln26 und zwischen Helix C' und C" bei Glu55. Die erste, terminale Domäne besteht also aus den Aminosäuren 3-26 und 56-78, die zweite, zentrale Domäne aus den Resten 27-55. Die Bewegung der Domäne 2 erfolgt nach „DYNDOM“ durch eine 68,9° Rotation um die in Abbildung 55 gezeigte Schraubenachse, entlang derer eine Translation von 3.9Å auftritt. Die biologische Relevanz dieses Übergangs ist nicht klar, obwohl die Lipidbindung von SapD eindeutig mit einer Öffnung der Helixpaare und einer Exposition der hydrophoben inneren Oberfläche zum Lipid hin einhergehen muss.

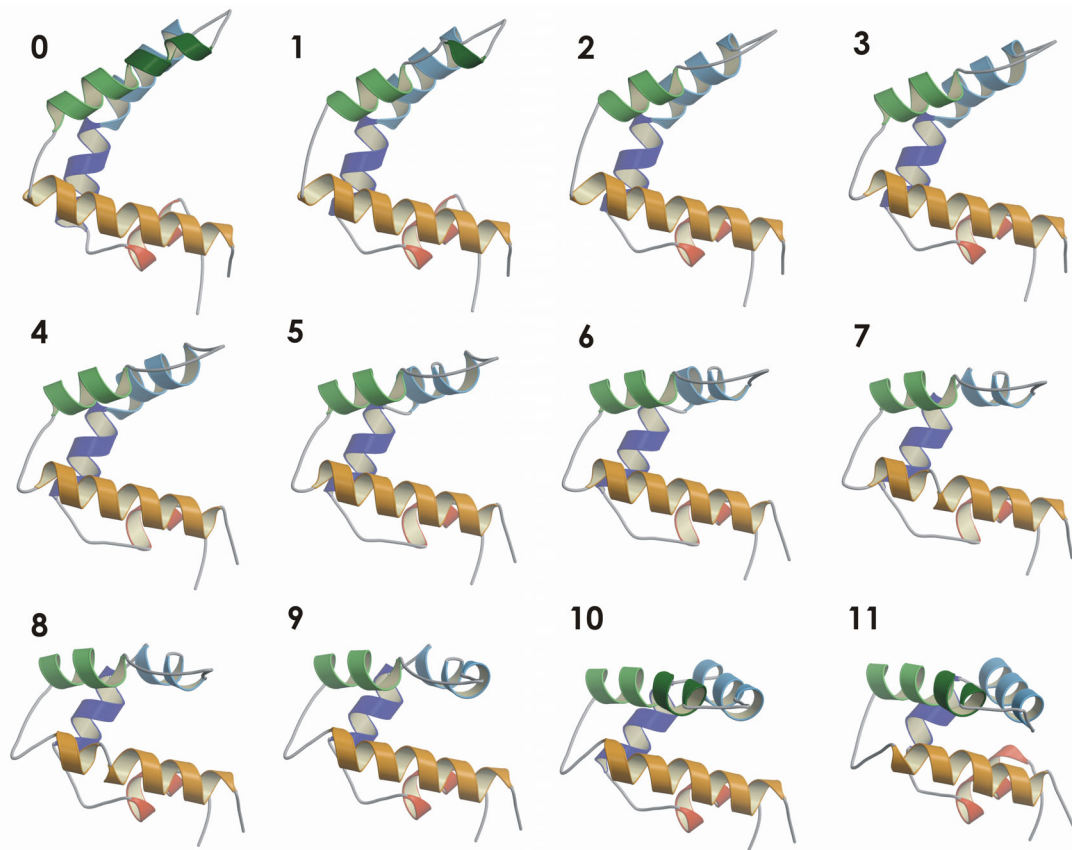


Abbildung 54: Hypothetische Strukturumwandlung von SapD. Modellierung der Transformation von SapD aus einer SapB-ähnlichen offenen in die geschlossene Konformation. Ein Homologie-Modell für SapD erstellt anhand des Monomers A aus der SapB-Kristallstruktur (0) wird mit 10 energieminierten Zwischenzuständen (1-10) in eine geschlossene SapD-Konformation (11) transformiert. Die Färbung entspricht Abbildung 46. Die Berechnung der Zwischenstufen erfolgte mit dem „MORPHSERVER“.

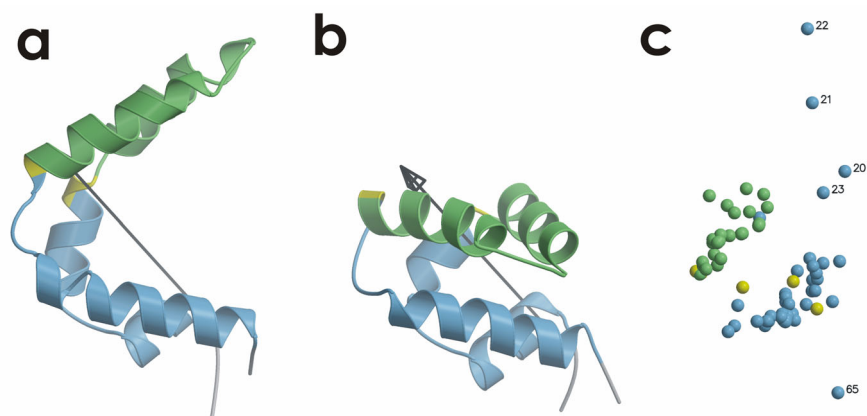


Abbildung 55: Domänenanalyse der offenen und geschlossenen Konformation von SapD. (a) Hypothetische offene Konformation von SapD modelliert auf Basis von Monomer A der SapB-Kristallstruktur. (b) SapD in der beobachteten geschlossenen Konformation. Die terminale Domäne ist blau, die Krümmungsreste gelb und die zentrale Domäne grün gefärbt. Die dynamischen Domänen wurden durch einen Strukturvergleich beider Konformere bestimmt. Die $68,9^\circ$ Rotationsachse ist grau dargestellt. (c) Darstellung der den Übergang zwischen (a) und (b) beschreibenden Rotationsvektoren von Segmenten aus jeweils fünf Hauptkettenresten in identischer Färbung zu (a) und (b); Ausreißer sind beschriftet.

Die hier gezeigte Bewegung kann daher durchaus als Teilbewegung der physiologisch bedeutsamen Öffnung dienen oder zumindest einen Ansatzpunkt für die Untersuchung der tatsächlich ablaufenden Bewegung geben.

Im Gegensatz zu den überraschend starken Unterschieden zu SapB zeigt die Faltung des SapD (schwarz in Abbildung 56) große Ähnlichkeiten zu denen von Granulysin (dort gelb) und NK-Lysin (dort blau), die ebenfalls eine geschlossene Konformation einnehmen. Innerhalb der konservierten α -Helices sind besonders geringe Abweichungen im Rückgratverlauf auszumachen, die größten Unterschiede existieren in den Schlaufenregionen zwischen den Helices B und C bzw. zwischen den Helices C und D. Die strukturelle Anpassung mit dem Programm „TOP“ ergibt 80% Übereinstimmung zwischen der A-Kette des SapD und Granulysin, da 64 aus insgesamt 80 Resten gleiche Positionen zeigen. Dabei werden nur 13 identische Reste (20% Identität) gefunden, dennoch liegt der Rmsd-Wert für die $C\alpha$ -Atome der positionsgleichen Reste bei nur 1,4Å. Im Falle von NK-Lysin werden 72 positionsgleiche Reste, entsprechend 90% aller Reste, mit 14 identischen Resten (Identität 19%) und einem Rmsd-Wert für die $C\alpha$ -Atome dieser Reste von 1,5Å gefunden.

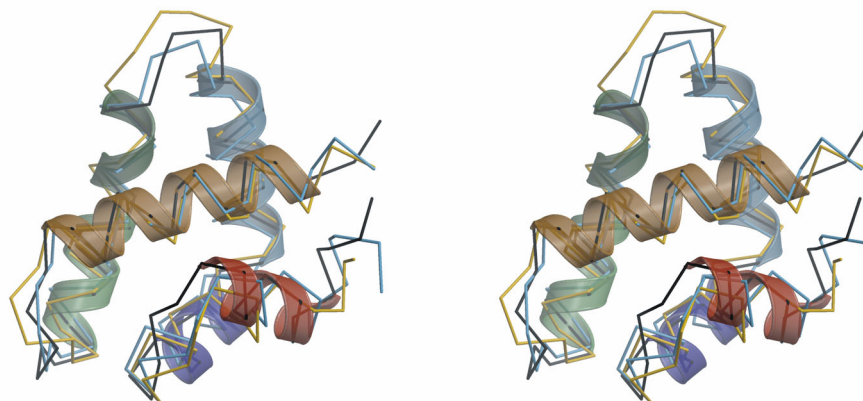


Abbildung 56: Rückgrat-Strukturen von SapD, Granulysin und NK-Lysin (stereo). Neben dem transparentem Bändermodell der SapD Helices (in gleicher Färbung und Orientierung wie Abbildung 46) sind die $C\alpha$ -Kettenverläufe von SapD (schwarz), Granulysin (gelb) und NK-Lysin (blau) gezeigt.

Diese hohe strukturelle Ähnlichkeit ist angesichts der relativ niedrigen Sequenzidentität von ca. 20% und der hohen Zahl der nicht-konservativen Austausch bemerkenswert und nur durch die strikte Konservierung der Disulfidbrücken und den einfachen Aufbau des Vier-Helix-Bündels zu erklären. Auch die Osmolarität der Lösung scheint keinen Einfluss auf die Struktur zu haben, denn die Kristallisation erfolgte in 2,3M (SapD) bzw. 3,2M (Granulysin) Ammoniumsulfat (Anderson et al., 2003), während die Aufnahme der NMR-Daten von NK-Lysin in H_2O bzw. D_2O erfolgte (Liepinsh et al., 1997).

4.7 Ladungsverteilung und Lipid-Interaktion Sap-ähnlicher Proteine

Bisher ist außer der Struktur des SapB (Ahn et al., 2003) keine offene oder Lipid-gebundene Struktur eines Sap-ähnlichen Proteins bekannt. Da die Lipidbindung in SapB von der Dimerisierung abhängig ist (Abbildung 53), während viele Sap-ähnliche Proteine unter physiologischen Bedingungen als Monomer vorliegen, bietet der Mechanismus der Lipidbindung durch SapB keine Basis für ein allgemeingültiges Modell der Protein-Lipid-Interaktion in dieser Familie. Darüberhinaus lassen sich viele beobachtete Interaktionen von Sap-ähnlichen Proteinen mit intakten Membranen oder Vesikeln kaum durch den in der SapB-Kristallstruktur beobachteten Modus der Lipidbindung erklären, hierzu gehören unter anderem:

- die porenbildende Aktivität der Amöbaporen-Proteine (Leippe et al., 1991)
- die Restrukturierung von Phospholipid-Membranen (You et al., 2001)
- die Co-Migration und Bindung von SapD und Liposomen (Tatti et al., 1999).

Im SapB-Dimer erlaubt die beobachtete Abgeschlossenheit der Lipide in der Proteinhülle keine großflächigen Interaktionen mit Lipidmembranen. Die Struktur des einzelnen Monomers aus der SapB-Struktur hingegen würde dies ermöglichen, gleiches gilt allerdings auch für eine Reihe weiterer denkbarer geöffneter Konformationen.

Ein entscheidender Schritt der Interaktion der Sap-ähnlichen Proteine mit Membranen ist die erste gerichtete Anbindung der Proteine an die Membranen und die darauf folgende Öffnung der Disulfid-verbrückten Sap-Helixpaare zur Interaktion mit den hydrophoberen Lipidbereichen. Dabei muss eine gewisse Erkennung der polaren Lipid-Kopfgruppen und dadurch eine Ausrichtung des Proteins erfolgen, die eine produktive Bindung zulässt. Für SapD wurde gezeigt, dass diese erste Interaktion bevorzugt mit Membranen auftritt, die anionische Phospholipide enthalten (Ciaffoni et al., 2003), eine gleiche Präferenz besitzen auch andere Sap-ähnliche Proteine.

Als Hinweis auf mögliche initiale Interaktionsstellen werden daher Aminosäurereste diskutiert, die in der Kristallstruktur des Granulysins an der Bindung von Sulfationen, die als Analoge der Phosphate in den Lipidkopfgruppen angesehen werden, beteiligt sind. In dieser Kristallstruktur wurden vier Sulfationen (Reste 81-84) beobachtet, die z.T. nur halbe Besetzung aufweisen, obwohl die Kristallisation in 3,2M Ammoniumsulfat erfolgte und die Bindung aller Sulfationen durch Reste von wenigstens zwei symmetrieverwandten Proteinketten erfolgte (Anderson et al., 2003). Die Hauptbindungsstellen der Sulfationen im Granulysin werden von Argininen gebildet, darunter insbesondere Arg42 (2 Kontakte zu SO₄ 81, 2 Kontakte zu SO₄ 84), Arg 46 (2 Kontakte zu SO₄ 84) und Arg51 (1 Kontakt zu SO₄ 81, 2 Kontakte zu SO₄ 82). In Abbildung 57 sind die Positionen aller positiv geladenen Reste in SapD (a), Granulysin (b) und NK-Lysin (c) auf Bändermodellen der Strukturen in rot eingezeichnet. Die in Granulysin für die Sulfatbindung hauptsächlich verantwortlichen Reste 42, 46 und 51 liegen allesamt auf Helix C, weisen in dieselbe Richtung und sind von weiteren positiv geladenen Resten umgeben. Diese Anordnung positiv geladener Reste ist im NK-Lysin, das genau wie Granulysin ein basisches, von T-Lymphocyten gebildetes Protein zum Abtöten von Fremdzellen ist, vollständig konserviert.

Vergleicht man nun jedoch SapD, ein saures Protein, das erst im lysosomalen Milieu bei sauren pH-Werten aktiv ist, mit Granulysin, so ist eindeutig die konservierte Abfolge basischer Reste auf der Helix C nicht vorhanden.

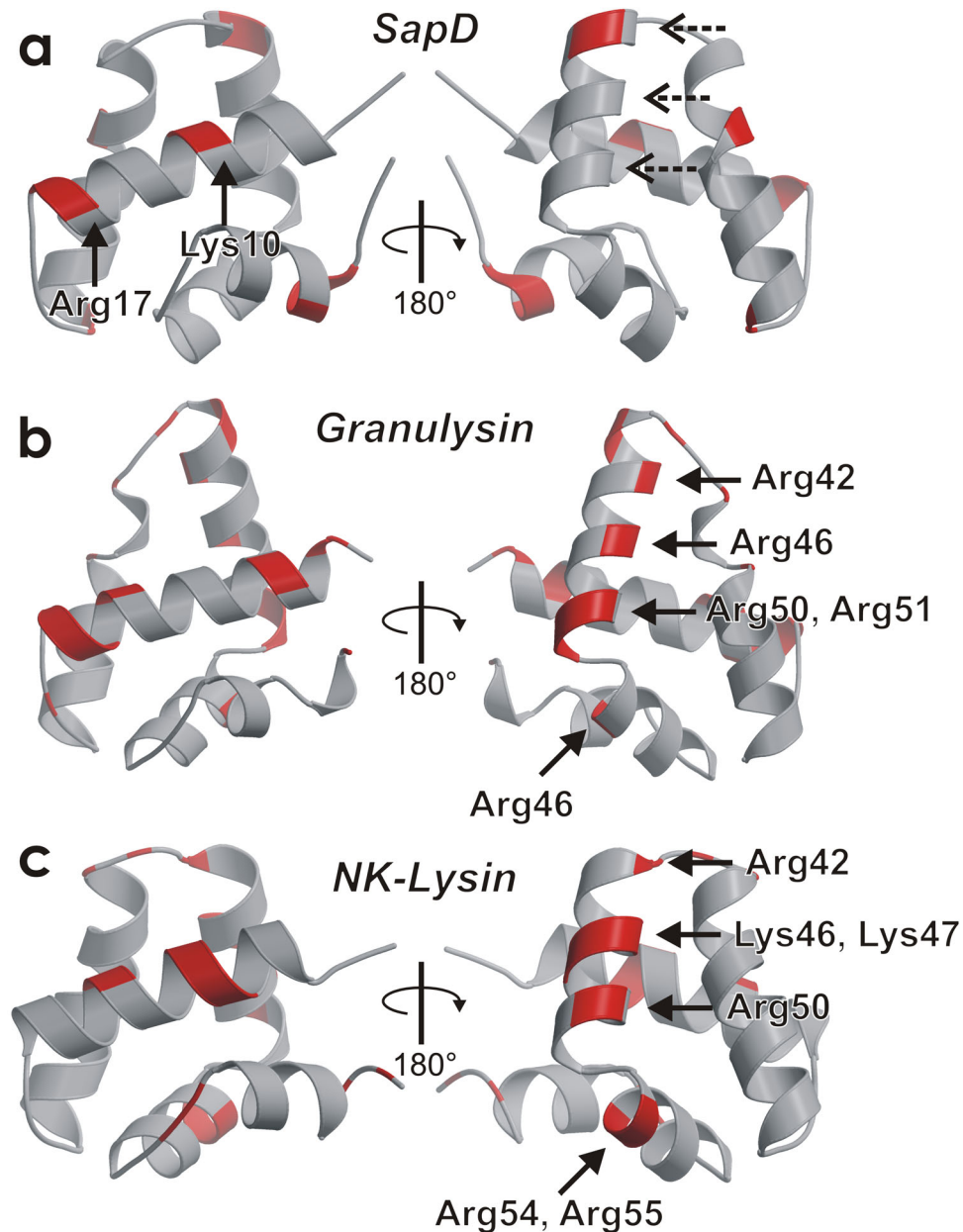


Abbildung 57: Positionen positiv geladener Reste in SapD und Homologen. Die Positionen positiv geladener Reste in SapD (a), Granulysin (b) und NK-Lysin (c) sind rot in den grauen Bändermodellen hervorgehoben. Die rechte Abbildung ist gegenüber der linken um jeweils 180° um eine vertikale Achse rotiert. Pfeile zeigen die Positionen positiv geladener Reste an, die vermutlich an der Bindung der Phospholipid-Kopfgruppen beteiligt sind, gestrichelte Pfeile zeigen das Fehlen positiv geladener Reste.

Damit macht auch die Struktur und nicht nur die unterschiedlichen biochemischen Wirkungen einen anderen Mechanismus der initialen Interaktion von SapD mit Membranen nötig, als für Granulysin diskutiert wurde.

Dementsprechend sind in der Kristallstruktur von SapD die Sulfationen auch von anderen Resten gebunden und liegen in einer anderen Region als die Sulfationen in der Granulysin-Struktur. Die Koordination erfolgt für zwei Sulfationen (A100, C100) durch nur ein Molekül, diese Positionen sind auch nur mit einer Besetzung von 75% modelliert, das dritte Sulfation B100 wird durch Reste zweier NCS-verwandter Moleküle koordiniert (Abbildung 58, Tabelle 18).

Tabelle 18: Kontakte zu gebundenen Sulfationen in der SapD-Kristallstruktur.

Sulfation	Atom	Kontakt zu	Atom	Distanz [Å]
SO ₄ A100	O1	Wat S21	O	3,35
		Wat S292	O	2,60
	O2	Lys A10	N ^ζ	3,45
	O4	Arg A17	N ^{η1}	3,14
		Wat S43	O	2,64
SO ₄ B100	O1	Wat S44	O	2,72
		Arg 17B	N ^{η1}	3,40
	O2	Arg 17B	N ^{η2}	3,20
		Arg 17A	N ^{η2}	3,08
		Arg 17A	N ^ε	2,99
O4	Asn 18A	N ^{δ2}	2,99	
SO ₄ C100	O2	Lys 10C	N ^ζ	3,29
		Wat S286	O	2,95
		Wat S260	O	3,31
		Wat S255	O	3,44
	O3	Arg 17C	N ^{η1}	3,26
		Wat S258	O	2,76
		Wat S260	O	2,82

Aufgeführt sind alle Kontakte kürzer als 3,5Å zwischen Sulfationen und anderen Resten

In der Umgebung von Molekül D wurde kein Sulfation identifiziert, dies kann aber auch in den hohen B-Werten dieses Moleküls (vgl. Tabelle 16) begründet sein; so wurden in der Umgebung von Molekül D auch unterdurchschnittlich wenig Wassermoleküle lokalisiert. Unabhängig von der Beteiligung von einem oder zwei Proteinmolekülen an der Sulfatbindung sind immer Lys10 und Arg17 wesentlich an der Bindung beteiligt (Abbildung 58, vgl. auch Abbildung 57).

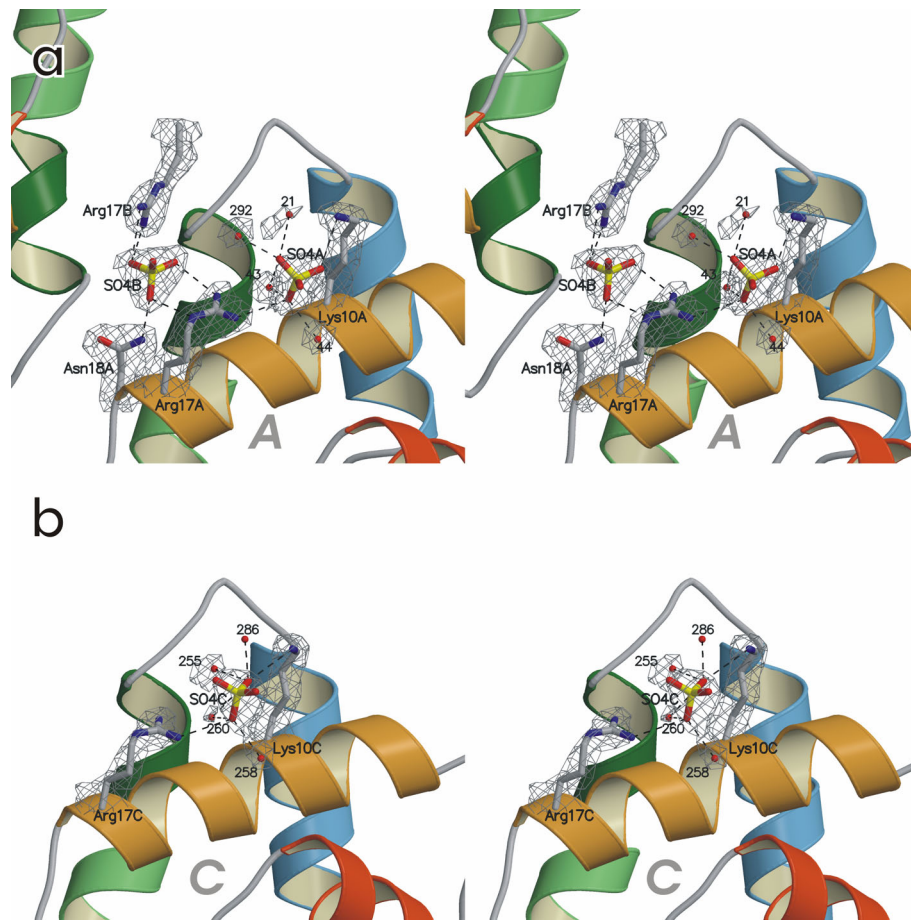


Abbildung 58: Sulfatbindung durch SapD im Kristall (stereo). Bindestelle von SO4A100 und SO4B100 zwischen den Monomeren A und B (a) und von SO4C100 an Monomer C (b). Den Reste-Bezeichnungen ist ein Kennbuchstabe für das jeweilige Monomer angefügt, die Monomere sind in grau benannt und in den gleichen Farben wie in Abbildung 46 gezeigt. Um die Sulfate und die an ihrer Bindung beteiligten Seitenketten und Wassermoleküle ist die 2Fo-Fc Elektronendichte konturiert bei 1σ gezeigt. Die Wassermoleküle sind mit Nummern beschriftet, die Elektronendichte um H₂O286 ist erst bei niedrigeren Konturierungsstufen erkennbar.

Damit ist eine alternative Bindestelle für das Phosphat-analoge Sulfat im Vergleich zu Granulysin und NK-Lysin gefunden, die Vermutungen über die initiale Interaktion von SapD mit Phospholipid-Membranen erlaubt.

Da die kurzen α -Helices nicht geeignet sind, eine Membran voll zu durchspannen, muss für die Amöbaporen-Proteine ein besonderer Mechanismus, womöglich unter vollständiger Streckung der Proteine zu linear angeordneten Helixpaaren oder höheren Aggregaten, diskutiert werden. Eine ähnliche Konformationsumwandlung wird auch für die strukturell gut charakterisierte Apolipoprotein III-Familie beobachtet. Apolipoprotein III (apoLp-III) ist ein Protein aus der Insekten-Hämolymphe, dem Äquivalent zum Blut höherer Organismen, mit einem ungefähren Molekulargewicht von 18-20kDa, das reversibel an die Oberflächen von Lipoproteinen binden kann und in den Insekten für die Stabilisierung von Protein-Lipid-Komplexen in der

Hämolymphe verantwortlich ist. Im Lipid-freien Zustand ist ApoLp-III zu einem globulären 4-Helix-Bündel mit einer kleinen helikalen Erweiterung gefaltet, in dem zwischen den Helices intensive hydrophobe Kontakte gebildet werden, wie die Röntgenstrukturanalyse des ApoLpIII aus der afrikanischen Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* ergab (Breiter et al., 1991). Auf der Basis dieser Röntgenstruktur und weiterer Überlegungen, die hier nicht im Detail dargestellt werden können, wurde ein Modell für die Konformationsumwandlung des ApoLpIII vorgeschlagen, das auf einer scharnierartigen Öffnungsbewegung zweier Helixpaare beruht. Dieses Modell ist in Abbildung 60 mit einer reproduzierten Abbildung aus der Originalarbeit gezeigt, da die ihm zugrunde liegenden Koordinaten nicht zugänglich sind. Obwohl die einzelnen Helices in den ApoLpIII-Proteinen deutlich länger sind als die Helices in den Sap-ähnlichen Proteinen, ist beiden Familien die Organisation des 4-Helix-Bündels gemeinsam, das im Falle des ApoLpIII aus den Helixpaaren 2/5 und 3/4 aufgebaut ist. Das vorgeschlagene Modell für die Öffnungsbewegung des ApoLpIII wäre in analoger Weise auf die Sap-ähnlichen Proteine übertragbar, da die einzelnen starren Körper bei dieser Bewegung zu den in den Sap-ähnlichen Proteinen durch Disulfidbrücken verbundenen Helixpaaren analog sind. Es muß der Vollständigkeit halber erwähnt werden, dass neben dem hier beschriebenen noch ein zweites Modell der Öffnungsbewegung in ApoLpIII existiert, das aber nicht mit der Anordnung der Disulfidbrücken in den Sap-ähnlichen Proteinen kompatibel ist (Soulages und Arrese, 2000).

Die große Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur und in der Anordnung der Sekundärstrukturelemente zwischen Sap-Proteinen und ApoLpIII läßt sich anhand von CD-Spektren ausgezeichnet demonstrieren (Abbildung 59).

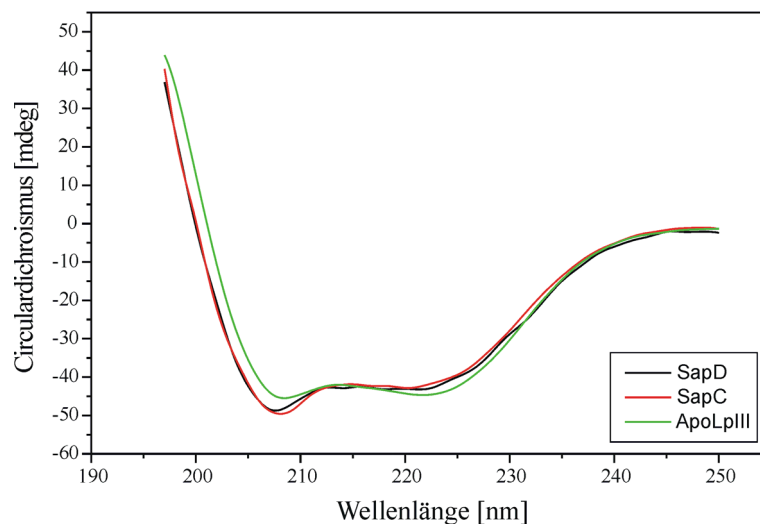


Abbildung 59: Vergleich der CD-Spektren von ApoLpIII mit Sap-Proteinen. In grün das CD-Spektrum von ApoLpIII aus *Galleria mellonella*, in schwarz bzw. rot die CD-Spektren von humanen, rekombinant in *Pichia pastoris* exprimiertem SapD bzw. SapC.

Eine weitere auffällige Ähnlichkeit zwischen ApoLpIII und SapD zeigt sich in der Bildung charakteristischer Scheibchenstapel bei der Interaktion der Proteine mit Lipiden und Lipidvesikeln (Abbildung 61). Für ApoLpIII wurden Stapel mit einem Durchmesser von 18-20nm und einer Dicke der in der Elektronenmikroskopie dichten Schichten von geschätzt 3,5nm beobachtet, entsprechend 35Å oder der durchschnittlichen Länge der α -Helices des ApoLpIII (Niere et al., 2001). Ganz ähnliche Scheibchenstapel mit einem Durchmesser von 16-25nm bilden sich bei der Interaktion von SapD mit Lipidvesikeln bei einem molaren Lipid-Protein-Verhältnis von 12,5:1, bei geringeren Proteinanteilen zeigt sich lediglich eine Verkleinerung der ursprünglich kugelförmigen Vesikel (Ciaffoni et al., 2001).

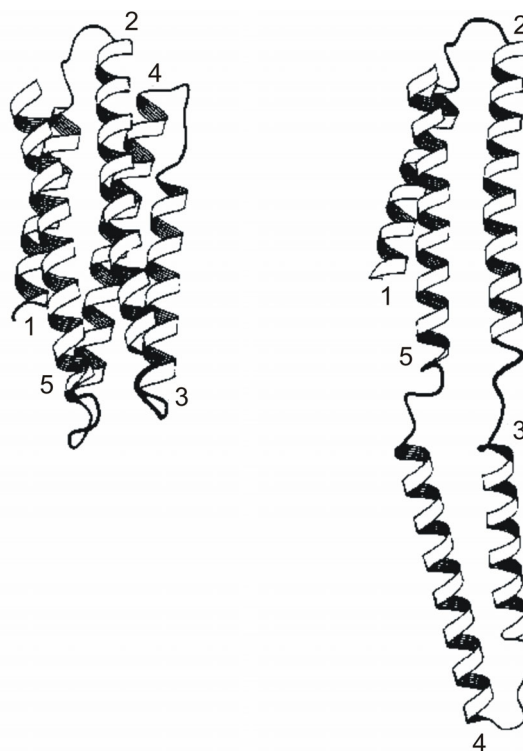


Abbildung 60: Kristallstruktur und hypothetische offene Konformation des ApoLpIII. Links: Kristallstruktur des ApoLpIII, die Helices sind vom N- zum C-Terminus durchnummeriert. Rechts eine hypothetische, geöffnete Konformation. Abbildung reproduziert aus Breiter et al. (1991).

Hoch aufgelöste Strukturen von helikalen Apolipoproteinen in einem natürlichen Komplex mit Lipiden existieren bisher nicht, lediglich für das Apolipoprotein A-II wurde auf der Basis einer Kristallstruktur in Gegenwart von *n*-Octyl- β -D-glucosid ein Modell für die Lipidbindung vorgeschlagen, in dem mehrere Proteinmoleküle rundliche Lipidvesikel wie eine Hülle umgeben (Kumar et al., 2002). Wegen der abweichenden Beobachtungen von Protein-Lipid-Komplexen in der Form von Scheibchenstapeln und einer vollkommen anderen Organisation der Helices in diesem Protein als in Sap-Proteinen ist dieses Modell jedoch in keiner Weise auf die Sap-ähnlichen Proteine übertragbar.

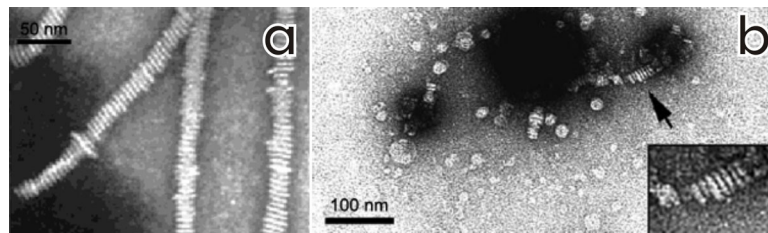


Abbildung 61: Bildung von Scheibchenstapeln bei der Interaktion von SapD mit Lipiden. (a) ApoLpIII im Komplex mit Dimyristoyl-Phosphatidylcholin, reproduziert aus Niere et al. (2001). (b) SapD im Komplex mit Vesikeln (Phosphatidylcholin, Cholesterin, Phosphatidylserin, 55:25:20), der Einschub zeigt eine dreifache Vergrößerung, reproduziert aus Ciaffoni et al. (2001). Beides Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Negativkontrast durch Phosphorwolframat.

4.8 Ansätze zu weiteren Arbeiten zum Mechanismus Sap-ähnlicher Proteine

Von größtem Interesse ist der Mechanismus der Protein-Lipid-Interaktion und die offene oder Lipid-gebundene Konformation der Sap-ähnlichen Proteine. Zur Untersuchung des Mechanismus der initialen Kontaktaufnahme zwischen den bevorzugten anionischen Phospholipiden und den Sap-ähnlichen Proteinen werden auf der Basis der Erkenntnisse über die Sulfatbindung in der Kristallstruktur Punktmutanten des SapD hergestellt. Dazu werden Arg17, Lys10 und alle anderen Lys-Reste des Proteins gegen saure oder polare ungeladene Reste mutiert, erste Mutanten werden bereits in *Pichia pastoris* exprimiert. Eine geplante Analyse der Lipidbindung dieser Mutanten wird in der Lage sein, die Bedeutung der an der Sulfatbindung beteiligten Reste für die physiologisch relevante Phospholipidinteraktion zu demonstrieren. Darüber hinaus werden mit SapD auch Kristallisationsexperimente in Gegenwart des wasserlöslichen C₁₂-Ceramide, das sich nur durch die kürzeren Kohlenstoffketten von den natürlichen Substraten unterscheidet, und in Gegenwart von n-Octyl-β-D-glucosid durchgeführt. Bei der Kristallisation von SapC wurden bereits langgestreckte Kristalle mit dreieckigem Querschnitt in Gegenwart von 0,6% (w/v) n-Octyl-β-D-glucosid, also knapp oberhalb der nominellen kritischen Micellenkonzentration, erhalten. Für SapC und SapD können aufgrund identischer CD-Spektren (Abbildung 59) im lipidfreien Zustand und in Abwesenheit organischer Lösungsmittel nahezu identische Strukturen erwartet werden. Die bereits erhaltenen und vermessenen Kristalle des SapC (s. Abschnitt 4.1) wurden jedoch in Gegenwart erhöhter Isopropanol-Konzentrationen erhalten. Es konnte mittlerweile über eine Titration von SapC mit Isopropanol gezeigt werden, dass in einem Bereich von ca. 10-65% (v/v) Isopropanol mit steigender Isopropanol-Konzentration der Helixgehalt in SapC ansteigt. Ein solcher Anstieg wäre durch eine Öffnung des Proteins, die mit einer Streckung der Helices zu einer Konformation ähnlich zu der des SapB oder sogar einer vollständig gestreckten Helixanordnung, wie für das ApoLpIII vorgeschlagen, erklärbar. Erst in mehr als 80% (v/v) Isopropanol denaturiert SapC (persönliche Mitteilung, M. Rossokha). Die Struktur des mit Isopropanol als Präzipitant kristallisierten SapC könnte damit als Modell für die Lipid-gebundene offene Konformation der Sap-ähnlichen Proteine dienen. Die Struktur konnte bisher vermutlich mangels eines geeigneten Suchmodells und ob der hohen Wilson B-Werte der Daten nicht durch molekularen Ersatz gelöst

werden. Auch eine Reihe von Schweratom-Derivatisierungsversuchen schlug fehl, meist aufgrund einer Beschädigung der Kristalle während der Inkubation oder wegen der Unlöslichkeit vieler Schwermetalle in der verwendeten Präzipitantenlösung. Um die Struktur dennoch lösen zu können, wurde SapC als Selenomethionin-markiertes Protein in *Pichia pastoris* exprimiert. Mittels MALDI-Massenspektrometrie konnte eine Substitutionsrate von größer 50% für alle Methionine nachgewiesen werden. Das eingebaute Selenomethionin wurde während der Expression oder Reinigung nicht oxidiert (persönliche Mitteilung, M. Rossokha).

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Untersuchung der Öffnungsbewegung der Sap-ähnlichen Proteine bei Lipidbindung bietet SapA. Als einziges humanes Sap enthält es einen Trp-Rest (Trp37, Position 38 in Abbildung 52); dieser ist am C-Terminus der Helix B lokalisiert. Bei einer postulierten Öffnungsbewegung muss sich der Abstand dieses Restes zum N-Terminus des Proteins verändern, da die Helixpaare A/D und B/C durch Disulfidbrücken fixiert sind und eine Öffnung daher nur durch eine relative Bewegung dieser Paare zueinander zustande kommen kann. Da Techniken existieren, gezielt nur den N-Terminus eines Proteins mit einer Fluoreszenzmarkierung zu koppeln, ließe sich durch die Messung des Förster-Energie-Transfers zwischen Trp37 in SapA und einem einzuführenden Fluoreszenzmarker die Öffnung des Proteins in Gegenwart verschiedener Lipide bestimmen. Da der N-Terminus zwar in der Kristallstruktur frei ist, aber in der Nähe des C-Terminus liegt, müssen mögliche Wechselwirkungen zwischen einer fluoreszierenden Gruppe am N-Terminus und dem C-Terminus berücksichtigt werden. Um möglichst wenig Abweichungen vom natürlichen Verhalten in Kauf nehmen zu müssen, wird SapA daher nun auch ohne C-terminalen 6-His-Anker exprimiert.

Neben der Frage nach der Lipid-gebundenen, physiologisch aktiven Konformation der Sap-ähnlichen Proteine bleibt auch ihre physiologische Rolle noch unklar. Die bis jetzt charakterisierten Proteine besitzen als funktionelle Gemeinsamkeit lediglich die Funktion der Lipidbindung, werden zum Teil in allen Geweben exprimiert und üben Funktionen im Grundmetabolismus aus, wie die Sap-Proteine selber, oder sie haben spezialisierte Aufgaben wie das Oberflächen-assoziierte Protein SP-B aus der Lunge oder Granulysin und NK-Lysin, die, von T-Zellen gebildet, eine Bedeutung in der Immunabwehr besitzen. Neben diesen funktionell teilweise oder sogar gut charakterisierten Sap-ähnlichen Proteinen existieren aber noch weitere, weitgehend unbeschriebene Sap-ähnliche Proteine, wie die Genomsequenz des Menschen ergibt. Es wird daher versucht, einige davon unter Zuhilfenahme der bei der Expression der Sap-Proteine gewonnenen Erkenntnisse zu exprimieren und sowohl funktionell als auch strukturell zu charakterisieren. Von besonderem Interesse hierbei ist ein Protein, das nach Vorhersagen mit einer einzigen Transmembranhelix in Membranen verankert ist, eine Signalsequenz für das endoplasmatische Retikulum besitzt und dessen mRNA in einer Reihe verschiedener menschlicher Gewebe, unter anderem dem Hirn, nachgewiesen wurde (Genbank gi:11291554). Dieses 18kDa große Protein wäre damit das einzige bekannte Membran-verankerte Sap-ähnliche Protein. Ein Konstrukt, dem lediglich die vorhergesagte Transmembran-Helix fehlt und das einen C-terminalen 6-His-Anker enthält, konnte bereits mit hohen Ausbeuten exprimiert und durch Metallchelat- und Gelpermeations-Chromatographie als monodisperses und monomeres Protein gereinigt werden.