

## 4 Röntgenstrukturanalysen

### 4.1 *Übersicht über die bestimmten Röntgenstrukturen*

Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt fünf Kristallstrukturen gelöst werden. Hiervon werden die drei Strukturen, die mit den disulfidverbrückten Proteinen erhalten wurden, in den folgenden Abschnitten besprochen. Die Abbildung 11 zeigt den Ansatz für die Einführung der Disulfidbrücken. Hierbei dienten die am meisten geöffnete (1hp1) und die am meisten geschlossene (1hpu C) Struktur des Wildtyp-Proteins als Modell. In der Abbildung sind diese Strukturen sowohl N- als auch C-terminal überlagert und die theoretischen Positionen der Disulfidbrücken sind eingezeichnet. Ziel war es, durch experimentelle Einführung von Disulfidbrücken diese Konformationen, die im Folgenden auch Zielstrukturen genannt werden, zu fixieren.

Zwei weitere Strukturen, eine Kokristallisation mit Ap3A und eine Mutation des aktiven Zentrums (His-117→Ala), wurden noch nicht vollständig verfeinert und werden in dieser Arbeit nicht näher besprochen. Diese beiden Strukturen bieten jedoch interessante Möglichkeiten zur Weiterarbeit. Die Struktur mit Ap3A ist insofern interessant, als dass sie unter den gleichen Bedingungen gewonnen wurde wie die Kristallstruktur 1ho5, jedoch andere Zellparameter aufweist, da das große Substrat eine Konformationsänderung der C-terminalen Domäne verursacht. Die Struktur mit der Mutation im aktiven Zentrum ist eine intermediäre Konformation mit einem sehr hohen Anteil an Schließbewegung. Hier ist es sehr interessant herauszufinden, ob diese ungewöhnliche Konformation von der Punktmutation im aktiven Zentrum hervorgerufen wird oder ein tatsächliches Energieminimum darstellt, das auch das Wildtyp-Protein einnehmen kann.

In Tabelle 5 sind alle bisher bestimmten Röntgenstrukturen der 5'-NT hinsichtlich der Rotation der C-terminalen Domäne, ihrer Raumgruppe und ihrer Zellparameter zusammengefasst.

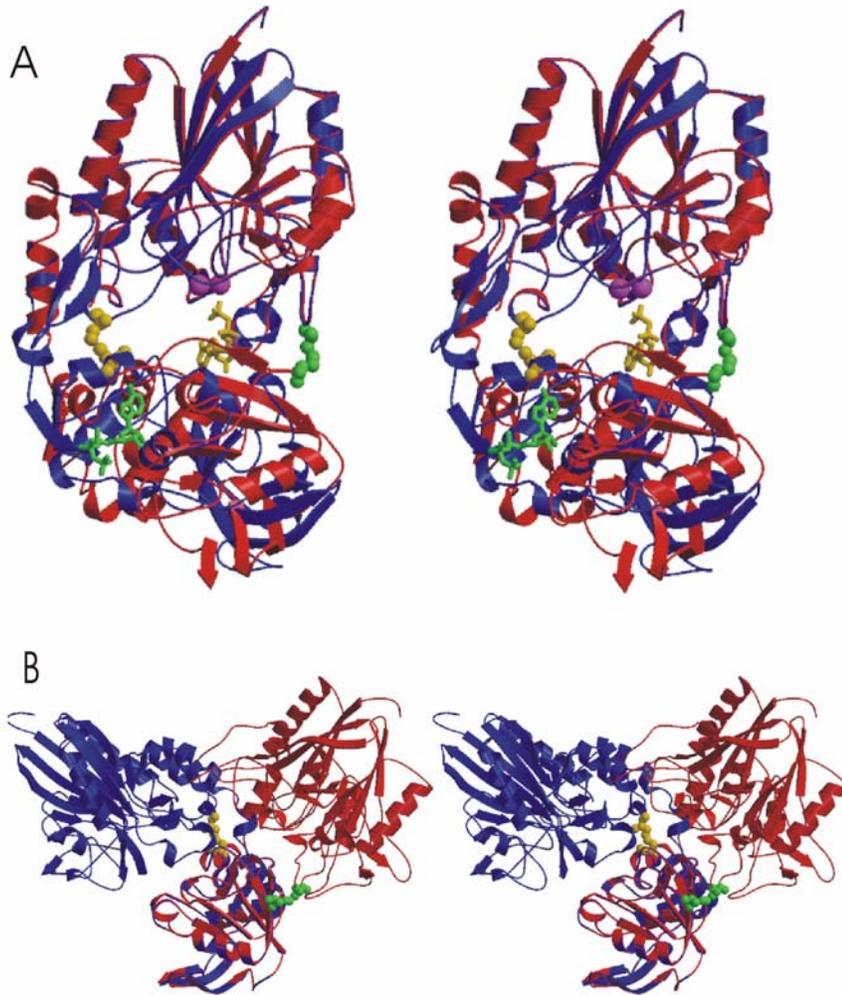


Abbildung 11. Einführung der Disulfidquervernetzung (stereo). Die am meisten geschlossene Konformation des Wildtyp-Proteins (1hp1 Kette C) diente als Modell für die Domänenverbrückung in der geschlossenen Form (blau) und die am meisten offene Konformation des Wildtyp-Proteins (1hp1) diente als Modell für die Domänenquervernetzung in der offenen Form (rot). Die beiden Moleküle sind einmal N-terminal (A) und einmal C-terminal überlagert (B). Die Cysteine sind modelliert, die Brücke für die offene Konformation ist als Kalottenmodell in grün dargestellt und für die geschlossene Konformation in gelb. Zur Orientierung sind in Abbildung A noch ein Substrat, das in der offenen Konformation gebunden ist (ebenfalls grün) und ein Inhibitor, der in der geschlossenen Konformation gebunden ist (ebenfalls gelb) sowie die Metallionen im aktiven Zentrum eingezeichnet.

Tabelle 5. Übersicht über die bestimmten Röntgenstrukturen der 5'-NT.

Kristallform	Bemerkung	Domänenrotation*	Raumgruppe	Zellkonstanten in Å	PDB-ID
I	-	96,7°	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	a=83,6; c=181,6	1ush
I-ATP	ATP	96,7°	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2		1hp1
II	-	a:91,2°, b:90,3°	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	a=93,2; b=116,3; c=132,8	2ush
III	Adenosin	a:2,8°, b:3,9°	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	a=69,9; b=75,7; c=221,7;	1ho5
IV	AMPCP	a:7,0°, b:8,4°, c:0°, d:5,4°	P1	a=89,6 b=90.1 c=96,4 α=110,7°, β=106,4°, γ=107,7°	1hpu
SP-I	disulfidverbrückt offen, S228C, P513C	96,0°	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	a=83,13; c=180,66	1oe1
SP-II	disulfidverbrückt offen, S228C, P513C	a: 91,2; b:87,7	P2 <sub>1</sub>	a=80,49; b=93,70 c=82,90; α=90; β=97,71	1od1
PL	disulfidverbrückt geschlossen, P90C, L424C	a:43,2; b:44,3	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	a=97,68, c=312,05	1oi8
5'-NT- Ap3A	Ap3A, ohne Me <sup>2+</sup> , Struktur noch nicht fertig verfeinert	a:7,2; b:9,2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	a=63,36, b=94,19; c=226,16	-
HA	H117A, Struktur noch nicht fertig verfeinert	a:29,3; b:36,4	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	a=230,87; b=102,60; c=52,38	-

\* Struktur 1hpu Kette C wurde = 0° gesetzt

Ein wichtiger Teil der Analyse stützt sich auf die Berechnung der Rotationsachsen zwischen einem gegebenen Konformerpaar. Wie in dem Methoden-Abschnitt beschrieben wurde hierfür das Programm DYNDOM verwendet. In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse aller Berechnungen, die in den einzelnen Abbildungen der kommenden Abschnitte wiedergegeben sind zusammengefasst und mit weiterreichenden Angaben über die Krümmungsreste, der Translationskomponente und dem Schließanteil versehen. Auch sind in dieser Tabelle die Daten der hier nicht weiter besprochenen Strukturen HA und Ap3A mit aufgelistet.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Konformeranalyse nach DYNDOM.

Rotationspaar	Rotationswinkel (°)	Translation (Å)	Schließanteil (%)	Krümmungsreste
SP-II B - SP-I	11,5	0,3	99,4	360-361
SP-II B - 1hp1	12,2	0,4	99,8	360-361
SP-II B - SP-II A	7,1	0,2	86,3	360-361
1hpu C - 1hp1	96,7	-0,2	65,8	354-363
1hpu C - SP-I	96	-0,4	65,5	354-363
SP-II A - 1hpu C	91,2	-0,6	63,5	354-363
SP-II A - SP-I	5,1	0	85,7	361-362
SP-II A - 1hp1	6,0	0,1	85,6	360-361
1hpu C - PL A	43,2	0,4	37,9	354-363
SP-I - PL A	55,5	-1,2	78,6	355-363
PL B - 1hpu C	44,3	0,2	34,7	354-364
PL B - SP-I	54,1	-1	74,3	356-363
SP-II B - 1hpu C	87,7	-1,1	59,8	354-361
PL A - SP-I	55,5	-1,2	74,9	355-363
SP-II B - 1hpu C	87,7	-1,1	57,9	354-361
Ap3A A - 1hpu C	7,2	-0,1	53,1	355-362
Ap3A A - 1hp1	89,8	0,3	68,5	354-360
Ap3A B - 1hpu C	9,2	0,0	54,9	354-361
Ap3A B - 1hp1	88,0	0,3	67,6	354-361
HA A - 1hpu C	29,3	1,1	95,3	354-359
HA A - 1hp1	74,4	-0,2	52,4	356-366
HA B - 1hpuC	36,4	1,3	94,6	351-361
HA B - 1hp1	69,7	0,3	50,0	353-364

## **4.2 Strukturen des disulfidverbrückten Enzyms 5'-NT-SP**

Die Doppelmutante S228C, P513C konnte in zwei unterschiedlichen Kristallformen gewonnen werden: Eine tetragonale Kristallform mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit und eine monokline Kristallform mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Da sich die Strukturen beider Kristallformen deutlich voneinander unterscheiden, werden sie separat voneinander besprochen.

### **4.2.1 Die tetragonale Kristallform: SP-I**

Die tetragonalen Kristalle der Doppelmutante S228C, P513C wurden an der Heimanode vermessen. Versuche, einen Datensatz an der an der Messstation ID14 am ESRF in Grenoble zu sammeln waren erfolglos, da der Kristall schon nach wenigen Bildern nicht mehr streute, wobei insgesamt drei verschiedene Kristalle getestet wurden. Hier lag die Vermutung nahe, dass Strahlenschäden zum Verlust des Streuvermögens geführt haben. Es ist bekannt, dass sich an Disulfidbindungen als erstes Strahlenschäden bemerkbar machen (Ravelli und McSweeney, 2000). Hinzu kommt, dass in der SP-Mutante die eingeführte Disulfidbrücke stark wasserexponiert liegt, so dass Radikale hier schnell angreifen können (Weik et al., 2000).

An der Heimanode ließ sich ein Datensatz bis 2.3 Å Auflösung sammeln. Die Statistik der Datensammlung ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7. Kristallographische Datensammlung der Kristallform SP-I. Angaben in Klammern beziehen sich jeweils auf die Daten in der höchsten Auflösungsschale (2,41-2,33 Å).

Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	1,54179
Oszillationswinkel	0,3°
Rotationswinkel	111,9°
Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
	a=83,13
Zellkonstanten (Å)	b=83,13
	c=180,66
Mosaizität	0,49
Moleküle/AU	1
Auflösungsbereich (Å)	20-2,3
Unabhängige Reflexe	193519
Vollständigkeit (%)	99,7 (100)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>a</sup>	6,6 (16,5)
Redundanz	6,96 (6,84)
I/σ (I)	28,4 (11,8)

#### 4.2.1.1 Molekularer Ersatz

Das Phasenproblem konnte über die Methode des Molekularen Ersatzes gelöst werden. Die Indizierung und Skalierung der gemessenen Reflexe ergab ein tetragonales Kristallsystem mit der Laue-Klasse 4/mmm. Eine systematische Auslöschung entlang h00 ließ die Möglichkeiten P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2, P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2 und P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2 offen. Berechnung des Matthews-Koeffizienten V<sub>m</sub> ergab unter der Annahme, dass sich genau ein Molekül in der Einheitszelle befindet den Wert 2,6, woraus sich ein realistischer Solvensgehalt von 54,3 % errechnet (Molekulargewicht 59,2 kDa).

Als Suchmodell für den molekularen Ersatz wurde die Struktur 1hp1, die auch als Modell für die Einführung der Disulfidbrücke diente, verwendet. Der molekulare Ersatz wurde mit Hilfe des Programms MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) durchgeführt. Die Rotationsuche ergab eine erhabene Lösung mit 11,05 über  $\sigma_{\text{rms}}$ , was dem 2,5-fachen Wert der nächstfolgenden Lösung entsprach. Die Translationssuche wurde in allen noch in Frage kommenden Raumgruppen durchgeführt, wobei die Raumgruppe P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 mit 115,2 über  $\sigma_{\text{rms}}$ , einem kristallographischen R-Wert von 34% und einer Korrelation von 69% sich als die korrekte Lösung herausstellte.

#### 4.2.1.2 Kristallographische Verfeinerung und Modellbau

Das mittels MOLREP bestimmte Strukturmodell konnte durch eine Starre-Körper-Verfeinerung mit dem Programm Refmac (Murshudov et al., 1997) weiter verbessert werden. Zusammen mit einem ersten Verfeinerungszyklus (Minimierung und Temperaturfaktor-Verfeinerung) unter Beachtung der geometrischen Randbedingungen wurde eine weitere Verbesserung des R-Wertes auf 25,64/28,66 ( $R/R_{\text{free}}$ ) erzielt. Die (Fo-Fc) Differenz- und (2Fo-Fc)-Elektronendichtekarten wurden mit den Phasen des mittels MOLREP bestimmten Strukturmodells berechnet und in das Programm O eingelesen. Die Reste Ser 228 und Pro 513 wurden manuell in O zu Cysteinen ausgetauscht.

Zwischen diesen beiden Cysteinen war noch deutlich Dichte zu erkennen, die die beiden Reste miteinander verband. Auch zeigte sich, dass noch Restdichte im Schlaufenbereich 321-332 vorhanden war, der in der Struktur 1ush fehlte. Außerdem war noch starke Dichte im aktiven Zentrum zu sehen, die nicht mit dem Vorhandensein von Wassermolekülen erklärt werden konnte. Die stark ausgeprägte Koordinationssphäre ließ darauf schließen, dass hier ein Metallion gebunden hat. Da keine Metallionen dem Kristallisationsansatz zugesetzt worden waren, wurde vermutet, dass es sich hierbei um ein  $\text{Ni}^{2+}$  Ion handelt, das noch von der Aufreinigung über die Metall-Chelat-Säule stammt. Später konnte gezeigt werden, dass das Metallion  $\text{Zn}^{2+}$  ist, das noch aus dem Medium aufgenommen stammen musste (vgl. Abschnitt 3.1.3).

Im Folgenden wurde alternierend mit dem Programmpaket CNS (Brunger et al., 1998) das Modell verfeinert und manuell gebaut. Bei der Verfeinerung wurde nach dem im Abschnitt 2.4 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Am Ende der Verfeinerung lagen die R-Werte bei 18,6 bzw. 23,8 %. Neben den Proteinatomen wurden 389 Wassermoleküle und 1  $\text{Zn}^{2+}$  Ion verfeinert. Im Vergleich zu der bekannten Struktur 1hp1 konnte noch der Rest Gln-550 gebaut werden, der Glutamat-Rest 551 und die Histidin-Reste 552-557 wurden hingegen nicht gefunden. Vom fehlenden Schlaufenbereich 321-332 konnten die Reste 322, 323, 330, 331 gebaut werden, hierzu wurde neben dem gewöhnlichen Verfeinerungsprotokoll auch die Methode des simulierten Aufheizens und Abkühlens dieses Bereiches mit dem Programm CNS verwendet. Der Rest der Schlaufe war auch in dieser Struktur ungeordnet. Das Ergebnis der Verfeinerung ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Es wurden insgesamt 4439 Atome mit jeweils vier (x, y, z, B) Freiheitsgraden verfeinert, anschließend wurde noch eine TLS-Verfeinerung durchgeführt (vgl. hierzu Abschnitt 4.4.2)

In der Kristallstruktur liegen bis auf drei Ausnahmen (Gln-161, His-252, His-289) alle  $\phi/\psi$ -Winkelpaare in den energetisch bevorzugten oder erlaubten Regionen des Ramachandran Diagramms. Dies entspricht dem Ergebnis der 1hp1 Struktur, nur dass Gln-161 ein wenig ungünstigere Torsionswinkel eingenommen hat und so von einer erlaubten in die unerlaubte Region gerutscht ist.

Tabelle 8. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes SP-I. Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 5% der Reflexe verwendet. Daten nach TLS-Verfeinerung. Das Ramachandran-Diagramm wurde mit dem Programm ProCheck erstellt (Laskowski et al. 1993).

Auflösungsbereich (Å)	20,0-2,3
R-Faktor	16,8
freier R-Wert	22,0
Proteinatome	4048
Wassermoleküle	389
Standardabweichung (RMSD)	
Bindungslänge (Å)	0,024
Bindungswinkel (°)	1,74
Durchschnittlicher B-Wert (Å <sup>2</sup> )	32,0
Hauptketten	30,4
Seitenketten	32,5
Zn <sup>2+</sup>	44,8
Wasser	39,4
Ramachandran Diagramm (% aller Aminosäurereste)	
In bevorzugten Regionen	89,6
In erlaubten Regionen	9,3
In großzügig erlaubten Regionen	0,5
In unerlaubten Regionen	0,7

#### 4.2.1.3 Strukturbeschreibung

##### *Disulfidbrücke*

Bereits während der Bakterienanzucht der Überexpressionskonstrukte ließ sich nach Zugabe von DTT erhöhte Aktivität der 5'-NT feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die Cysteine spontan *in vivo* oxidieren. Beim gereinigten Protein ließ sich die oxidierte Form von der reduzierten Form durch den Ellmans Test überprüfen (s. Abschnitt 3.1.3), wobei gezeigt werden konnte, dass sämtliche Cysteine oxidiert vorlagen. Auch in der ersten Elektronendichtekarte, die noch mit dem nativen Suchmodell errechnet wurde, ließ sich Restedichte zwischen den Aminosäureseitenketten Ser-228 und Pro-513, die zu Cystein mutiert worden sind, erkennen, so dass die Disulfidbrücke problemlos in die Dichte eingepasst werden konnte (Abbildung 12).

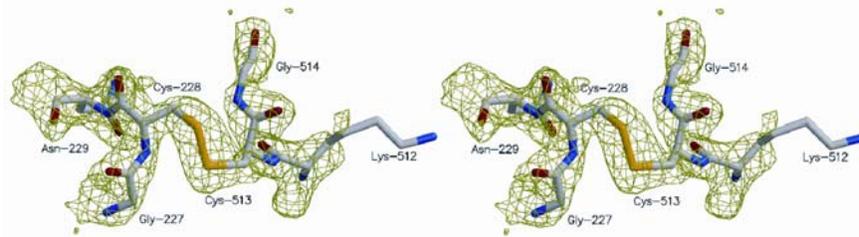


Abbildung 12. Stereoabbildung der Disulfidbrücke in der Struktur SP-I. 2Fo-Fc Elektronendichtekarte um die Disulfidbindung. Die Berechnung der Elektronendichte erfolgte unter Auslassung aller gezeigten Reste.

Die Elektronendichte zeigt keinerlei Strahlenschäden, wie sie häufig – auch bei Tieftemperaturmessungen – bei Disulfidbrücken beobachtet wird (Ravelli und McSweeney, 2000). Auch deutet die Dichte nicht auf eine Mischform zwischen oxidierten und reduzierten Cysteinen hin, wie sie etwa Ivens et al. gefunden haben (Ivens et al., 2002). Die Disulfidbrücke nimmt eine rechtshändige Konformation ein, wie es von dem Programm SSBond (Hazes und Dijkstra) vorausgesagt wurde. Die tatsächliche Geometrie der Disulfidbrücke ist sogar etwas günstiger als die berechnete, was vor allem bei einem Vergleich der  $\chi_3$ -Torsionswinkel deutlich wird, der in der Mutante mit  $108,2^\circ$  näher dem idealen Wert von  $90^\circ$  entspricht (Thornton, 1981) als in der Vorhersage ( $127,6^\circ$ ). Im Abschnitt 4.5 wird die Geometrie der eingebauten Disulfidbrücken ausführlich diskutiert.

### *Enzymkonformation*

Bereits die Datensammlung und die Strukturlösung zeigen, dass die dreidimensionale Struktur des SP-I sehr ähnlich zu der des Wildtyp-Proteins in der offenen Form (1hp1) sein muss. Anders wäre die identische Kristallform nicht zu erklären. Daraus lässt sich auch ableiten, dass die Stellung der C-terminalen Domäne bezüglich der N-terminalen Domäne zwischen der SP-I Struktur und der Zielstruktur nahezu identisch sein müssen. Dies zeigt auch eine Berechnung der Rotationwinkel. In Abbildung 13 ist ein Vergleich der Struktur SP-I mit den am weitesten geöffneten (1hp1, Zielstruktur) und geschlossenen (1hpu, Kette C) nativen Strukturen dargestellt.

Der Rotationswinkel zwischen der Struktur 1hp1 und der Struktur SP-I beträgt nur  $0,9^\circ$ . Auch der Unterschied zwischen den offenen Strukturen (1hp1 und SP-I) und der geschlossenen Struktur (1hpu Kette C) zeigt, dass nur ein geringer Unterschied zwischen der offenen Konformation des Wildtyp-Proteins ( $96,7^\circ$ ) und der der fixierten Mutante ( $96,0^\circ$ ) besteht. Die Rotationsachsen zwischen der Drehung der beiden offenen Konformationen und der geschlossenen Konformation liegen exakt übereinander (Abbildung 13 A), so dass hier von einer identischen Bewegung ausgegangen werden muss.

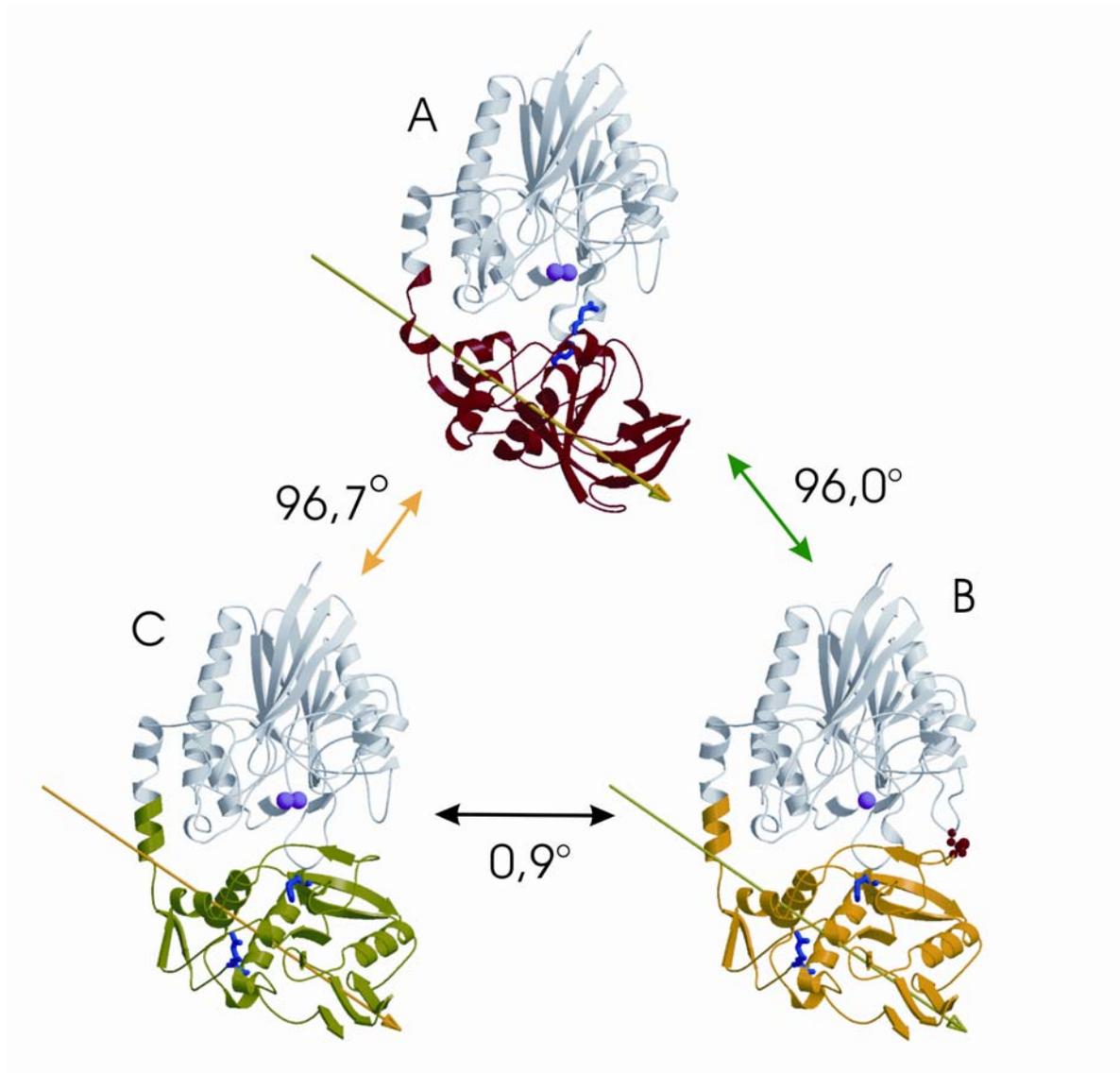


Abbildung 13. Rotationswinkel zwischen SP-I (B) und den nativen Strukturen 1hp1 (C) und 1hpu C (A). Die N-terminalen Domänen sind jeweils in grau dargestellt. Der Übergang zu den farblich markierten C-terminalen Domänen ist jeweils bei Rest 355. Die Metallionen, des aktiven Zentrums sind in magenta gezeichnet. Die Rotationsachsen für die Übergänge zwischen der geschlossenen und den beiden offenen Konformationen sind als Pfeile dargestellt: Zwischen 1hpu C und 1hp1 in gelb und zwischen 1hpu C und SP-I in grün. Um der Rotationsbewegung folgen zu können, sind die Reste Arg-375 und Phe-498 der Substratbindungsstelle in blau für alle drei Strukturen eingezeichnet. Die Rotationswinkel zwischen den jeweiligen Molekülen sind auf den entsprechenden Pfeilen markiert. Die eingebaute Disulfidbindung ist in rot eingezeichnet.

### Temperaturfaktoren

Disulfidbrücken werden sehr häufig eingebaut, um Konformationen im Protein zu stabilisieren (Fontana, 1991). Es wurde daher vermutet, dass die Cystinquervernetzung zu einer veränderten Beweglichkeit im Protein führt, die sich kristallographisch häufig durch die Temperaturfaktoren ( $B$ -Faktoren) bemerkbar macht, da diese über die Beziehung

$$(Formel 8) \quad B = 8\pi^2 \cdot \langle u^2 \rangle$$

mit der mittleren quadratischen Atombewegung  $u^2$  verbunden ist. Da die Strukturen 1hp1 und SP-I isomorph sind lassen sich die  $B$ -Werte miteinander vergleichen, womit überprüft werden kann, ob die Disulfidbrücke eine konformations-stabilisierende Wirkung zeigt (Abbildung 14).

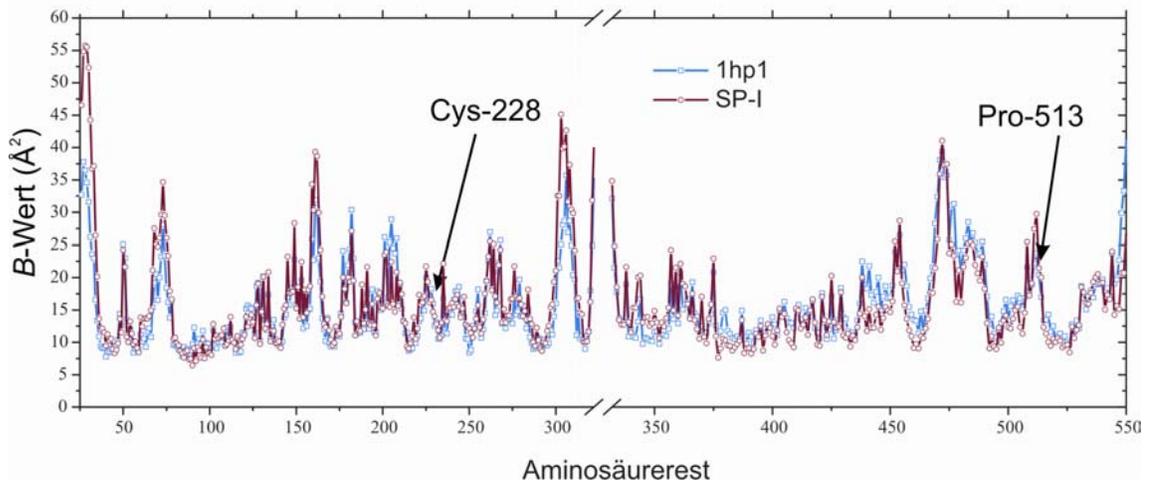


Abbildung 14. Vergleich der Temperaturfaktoren von 1hp1 und SP-I. Die  $B$ -Werte sind gemittelt pro Aminosäurerest und aufgetragen gegen die Restnummer. Der ungeordnete Schlaufenbereich (321-332) wurde ausgelassen. Die Werte für die Struktur SP-I wurden auf die Werte der Struktur 1hp1 skaliert. Die Stellen der Punktmutationen Ser-228→Cys und Pro-513→Cys sind durch Pfeile markiert.

Um den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen gerecht zu werden, wurden für den Vergleich die Temperaturfaktoren der SP-I Struktur auf die der 1hp1 Struktur skaliert. Durch die Skalierung ist zwar die Analyse einer denkbaren aber unwahrscheinlichen globalen Absenkung aller  $B$ -Werte der Proteinatome nicht mehr möglich, jedoch sollte eine lokale Veränderung erkennbar sein. Die  $B$ -Werte der beiden Strukturen lassen sich exakt überlagern. Die Beweglichkeit *im Kristall* ist durch die Disulfidbrücke also nicht eingeschränkt. Dies ist besonders interessant in den Regionen der mutierten Reste. Sowohl der Rest 228 als auch der Rest 513 befinden sich in beiden Strukturen auf der absteigenden

Seite einer lokalen Spitzenformation. Dies zeigt, dass die Einführung der Disulfidbindung auch in ihrer näheren Umgebung keine strukturellen Abweichungen verursacht hat. Auf der anderen Seite sind die *B*-Werte der Hauptkettenatome um die Cysteine 228 und 513 leicht erhöht gegenüber den entsprechenden Aminosäuren der Vergleichsstruktur. Eine eindeutige Erklärung kann hierfür nicht gegeben werden. Die Reste für die Punktmutationen mussten verständlicherweise an der Domänen-Grenzfläche liegen, so dass die eingeführten Mutationen das Wasserstoffbrücken-Muster an dieser Stelle aufgebrochen haben. Da die Disulfidbrücke in SP-I sehr flexibel ist (vgl. Abschnitt 4.4), ist es möglich, dass die Ausbildung des Cystins keinen adäquaten Ersatz für die verlorene Stabilität bietet. Die hier beobachtete Erhöhung bei den eingeführten Cysteinen ist jedoch relativ gering im Vergleich zu der Erhöhung die in vielen anderen Strukturen mit eingebauten Disulfidbrücken gefunden wurde (Jacobson et al., 1992; Pjura et al., 1990; van den Akker et al., 1997). Auch für die Erhöhung der *B*-Werte in diesen Strukturen wurde keine befriedigende Erklärung gefunden. Vergleiche jedoch Abschnitt 4.4 für eine weiterführende Diskussion von eingebauten Disulfidbrücken in Proteinen.

#### Rmsd-Werte

Die Strukturlösung, die Rotationsanalyse wie auch die Auswertung der Temperaturfaktoren zeigen, dass die Struktur SP-I die Konformation der Zielstruktur einnimmt. Durch eine Überlagerung der Atomkoordinaten beider Strukturen können kleinere Abweichungen im Hauptkettenverlauf sichtbar gemacht werden, indem die mittlere quadratische Abweichung gegen den Aminosäurerest aufgetragen wird (Abbildung 15).

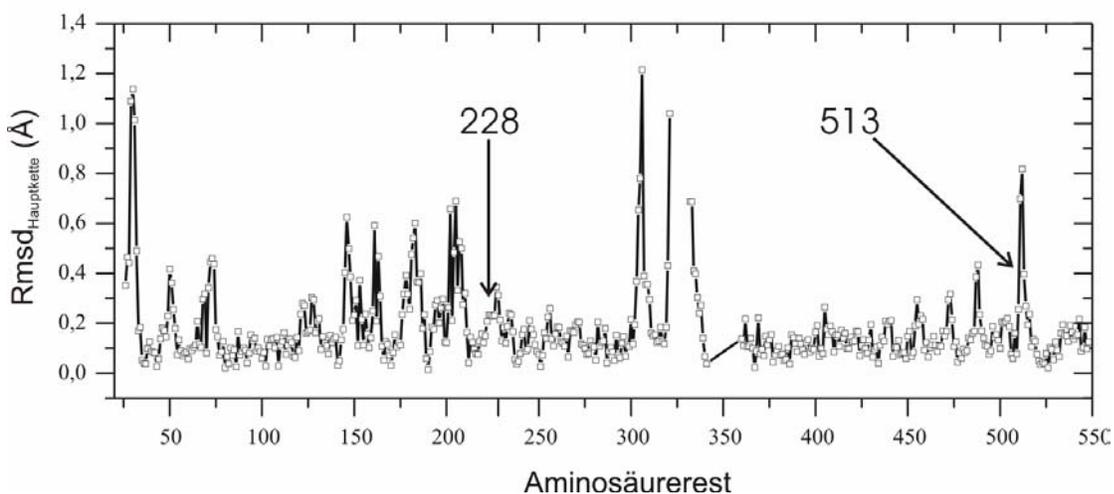


Abbildung 15. Rmsd-Werte der Überlagerung der Strukturen SP-I auf 1hp1. Aufgetragen ist der mittlere Rmsd-Wert für die Hauptkettenatome. Die Überlagerung wurde getrennt für die N-terminale Domäne (Reste 26-340) und die C-terminale Domäne (Reste 360-550) durchgeführt. Die Punktmutationen Ser-228 → Cys und Pro-513 → Cys sind durch Pfeile markiert.

Die absoluten Rmsd-Werte sind mit einem Durchschnittswert von 0,20 Å für die N-terminale Domäne und 0,14 Å für die C-terminale Domäne sehr gering. Die Maxima liegen erwartungsgemäß sehr ähnlich wie bei der Verteilung der *B*-Werte. Die eingeführten Cysteine 228 und 513 liegen mit Werten von 0,31 bzw. 0,40 Å zwar über dem Durchschnitt, jedoch sind die Abweichungen sehr gering verglichen mit denen, die in anderen Strukturuntersuchungen von disulfidverbrückten Proteinen gefunden worden sind. Bemerkenswert sind die hohen Rmsd-Werte in der Nachbarschaft des Cys-513, wo die Reste 512 und 511 Werte von 0,7 und 0,8 Å haben. Dies ist wahrscheinlich noch auf den veränderten Hauptkettenverlauf durch die Mutation des Pro-513 des Wildtyp-Proteins zurückzuführen. Das Protein gleicht diese lokale Störung aber schnell wieder aus und die Reste 510 und 514 liegen nur noch wenig über den Durchschnittswerten. Auch die Rmsd-Werte für die Reste des aktiven Zentrums, die alle deutlich unter dem Durchschnittswert liegen, sprechen dafür, dass die strukturelle Integrität des Enzyms durch die eingeführten Cysteine nicht angetastet ist (siehe hierzu auch nächsten Abschnitt).

Die beiden Maxima, die mit über 1 Å Abweichung auffallen, sind die Reste 29-30 und 303-308. Beide Stellen bilden Kontakte zum gleichen symmetrieverwandten Molekül aus. Wie in Tabelle 9 (Abschnitt 4.2.1.4) gezeigt wird, unterscheiden sich diese Kontakte leicht, so dass die Abweichungen wahrscheinlich auf kleine Unterschiede in der Kontaktstelle zurückzuführen sind.

#### *Metall-Koordinierung*

Von Interesse ist die Anwesenheit eines Metallions im aktiven Zentrum. Da keine Metallionen bei der Kristallisation zugefügt wurden, bestätigt die Anwesenheit des einen Metallions die Hypothese einer hochaffinen Bindungsstelle und einer zweiten, weniger affinen Bindestelle für die Metallionen (McMillen et al., 2003). Dies kann auch in den Wildtyp-Strukturen gesehen werden, wo die Dichte für das Metallion 2 bei geringen Konzentrationen des Metalls im Kristallisationsansatz sehr viel stärker ist als für das Metallion 1 (Knöfel und Sträter, 2001b). Hier wurde während der Enzymreinigung und der Kristallisation kein Metallion zugefügt, so dass davon auszugehen ist, dass das Zink-Ion noch aus dem Medium stammt. Der relativ hohe *B*-Wert von 44,8 des Metallions (gegenüber einem Durchschnittswert der Hauptketten von 30,4) deutet jedoch auf eine unvollständige Besetzung hin, da nicht gesondert nach Besetzung verfeinert wurde. Dies kommt überein mit den Ergebnissen der Atomabsorptionsspektroskopie (vgl. Abschnitt 3.1.3), aus der sich ein molares Verhältnis von Metallionen zu Protein von 0,7 errechnet.

In Abbildung 16 ist die Metallkoordination des  $Zn^{2+}$ -Ions in der Struktur SP-I gezeigt. Die Koordinationsgeometrie ist trigonal bipyramidal und damit identisch zu der in der Struktur 1hp1 (dunkel-gold überlagert in Abbildung 16). An Stelle des einen Bikarbonations sind hier jedoch die Wasser W-44 und W-81 getreten, die Stelle des zweiten Zinkatoms ist hier durch eine Wassermolekül besetzt (W-4). Der Abstand von W-81 beträgt 3,2 Å und gehört

damit nicht direkt zur Koordinationssphäre des Metallions 2. Tabelle 9 vergleicht die Abstände und Winkel zum Metallion2 zwischen der Struktur SP-I und der Struktur 1hp1.

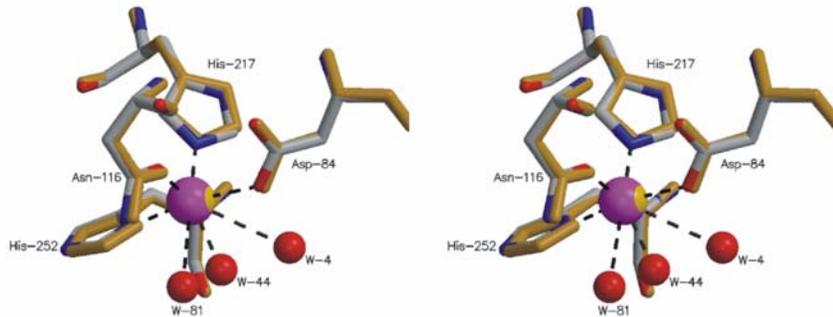


Abbildung 16. Stereoabbildung der  $Zn^{2+}$ -Koordination in der Struktur SP-I. Alle metallkoordinierenden Aminosäuren und Wassermoleküle der Struktur SP-I sind gezeigt. Stickstoff-Atome sind in blau, Sauerstoff-Atome in rot, alle anderen in grau dargestellt. Das Zink-Atom ist in magenta abgebildet. Die metallkoordinierenden Reste der Struktur 1hp1 sind überlagert (Überlagerung basierend auf den Resten 26-340) und in dunkel-gelb gezeichnet. Das Zink-Atom aus der 1hp1-Struktur ist in gelb gezeichnet. Das Zink2-Atom aus der Struktur 1hp1 sowie das Bikarbonat-Ion sind nicht gezeigt.

Die Ähnlichkeit der Metallkoordination zwischen der Struktur SP-I und deren Zielstruktur 1hp1 zeigt deutlich, dass durch die Einführung der Disulfidbrücke die Integrität des Proteins und insbesondere das aktive Zentrum nicht gelitten haben. Daraus kann geschlossen werden, dass das S228C, P513C disulfidverbrückte Enzym ein gutes Modell für die offene Konformation des Wildtyps darstellt.

Tabelle 9. Koordinationsgeometrie des  $Zn_2$  Atoms in der Struktur SP-I. Angaben in Klammern beziehen sich auf die Struktur 1hp1.

Koordinationsabstände (Å) zu $Zn_2$		Koordinationswinkel (°)	
Asp-84O $\delta$ 2	2,34 (2,21)	D84-Zn2-H252	166,7 (164,9) *
Asn-116O $\delta$ 1	2,21 (2,01)	H217-Zn2-N116	90,4 (94,2) **
His-217N $\epsilon$ 2	1,96 (2,09)	H217-Zn2-W-44 (O1)	140 (136,1) **
His-252N $\delta$ 1	2,29 (2,21)	N116-Zn2-W-44 (O1)	125,7 (129,5) **
W-44 (CO $_3$ -O1)	2,31 (2,39)	D84-Zn2-H217	85,4 (86,7) ***
W-81 (CO $_3$ -O2)	3,16	D84-Zn2-N116	91,3 (96,9) ***
W-4	3,37	D84-Zn2-W	79,3 (83,7) ***

ideale trigonal bipyramidale Winkel \* 180°, \*\* 120°, \*\*\* 90°

## 4.2.1.4 Kristallkontakte

Nicht nur die Raumgruppe  $P4_12_12$  ist mit der der Strukturen 1hp1 und 1ush identisch, auch die Zellparameter mit  $a=b=83,132 \text{ \AA}$  und  $c=180,664 \text{ \AA}$  sind praktisch mit denen der Struktur 1ush ( $a=b=83,6$ ,  $c=181,6$ ) identisch, so dass hier davon ausgegangen werden kann, die gleiche Kristallform unter anderen Kristallisationsbedingungen gefunden zu haben. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der Kristallkontakte der beiden Strukturen. Alle Kontaktflächen der Moleküle in der Einheitszelle sind identisch. Lediglich einige Seitenketten sind anders positioniert, so dass etwas andere Kontakte ausgebildet werden. Dies ist besonders deutlich bei dem mutierten Rest 513, der nur in der SP-I Form einen polaren Kontakt zum Nachbarmolekül ausbildet. Die Orientierung der symmetrieverwandten Moleküle ist aber identisch (nicht gezeigt).

Tabelle 9 stellt die Kristallkontakte der beiden Kristalle gegenüber. Die Anzahl der Kontakte ist in dem SP-I Kristall mit 240 deutlich höher als in dem isomorphen Kristall 1hp1 mit lediglich 155 Kontakten. Hierbei sind 15 Kontaktreste nur in SP-I nicht aber in 1hp1 an Kontakten beteiligt, während umgekehrt nur 5 Kontaktreste exklusiv in der Struktur 1hp1 vorkommen. Vergleichbare Unterschiede sind nicht zu sehen zwischen den isomorphen Kristallen 1hp1 und 1ush, so dass sie nicht auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zurückgeführt werden kann, sondern genuine Unterschiede zwischen den beiden Strukturen darstellen.

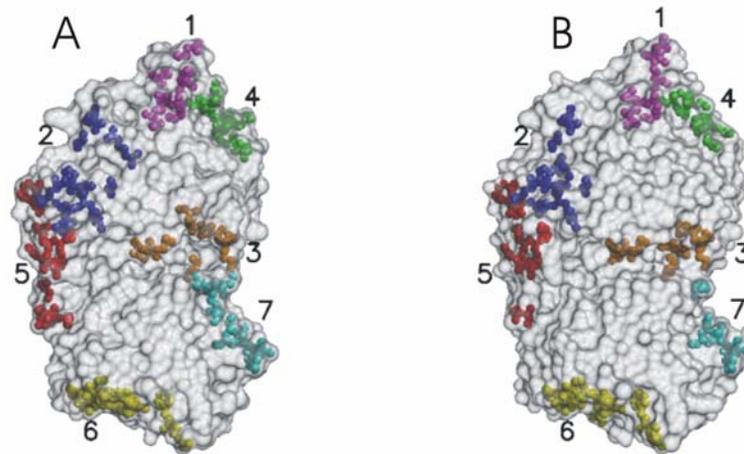


Abbildung 17. Vergleich der Kontaktflächen zwischen den Kristallstrukturen SP-I (A) und 1hp1 (B). Eine Kontaktfläche ist hier als die Summe aller Atomkontakte zwischen dem gezeigten Molekül und einem symmetrieverwandten Molekül definiert. Jede Kontaktfläche hat eine eigene Farbe und ist durchnummeriert jeweils nach der erst niedrigsten Aminosäure der Kontaktfläche (vgl. Tabelle 9).

Die unterschiedlichen Kontakte sind wahrscheinlich nötig, um die Kristallpackung an den leichten Rotationsunterschied zwischen den beiden C-terminalen Domänen anzupassen. Die etwas kleineren Zellkonstanten, die für den SP-I Kristall beobachtet wurden, könnten durch die dichtere Packung aufgrund der zahlreicheren Kristallkontakte verursacht sein. Es stellt sich die Frage, ob auch das Wildtyp-Protein unter den Malonat-Bedingungen kristallisiert, was praktische Vorteile mit sich brächte, da die Kristalle unter den ursprünglichen Bedingungen (60% gesättigter  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ -Lösung, 0,1 M NaCitrat pH 6,6 und 0,3 M CsCl) innerhalb von 3-6 Monaten kristallisierten, während die Malonat-Kristalle hier innerhalb einer Woche kristallisiert sind. Das disulfidverbrückte Enzym ist jedoch andersherum nicht unter den Wildtyp-Bedingungen kristallisierbar, so dass auch der Umkehrschluss nicht sicher scheint, da das Gleichgewicht zwischen den Konformationen wesentlich von den Kristallisationsbedingungen abhängt.

Tabelle 10. Vergleich der polaren Kristallkontakte unter 3,8 Å zwischen SP-I und 1ush. Reste, die zu der gleichen Kontaktfläche gehören, sind farblich einheitlich markiert.

SP-I			1HP1		
Kontaktfläche <sup>1</sup>	Kontaktreste <sup>2</sup>	Anzahl <sup>3</sup>	Kontaktfläche	Kontaktreste	Anzahl
1 Symmetrie- molekül 7 1 -1 0	Asp-29, <b>Thr-31</b> , Glu-301, Arg- 303, Lys-308, Val-310	38	1 Symmetrie- molekül 7 0 0 0	Asp-29, Glu-301, Arg-303, Lys- 308, Val-310	22
2 Symmetrie- molekül 4 0 0 -1	Gly-65, Glu-69, Gly-272, <b>Arg- 297, Val-333</b> , Leu-334, Tyr- 335, Thr-336, Pro-337, Glu-338	29	2 Symmetrie- molekül 4 -1 0 -1	<b>Leu-62</b> , Gly-65, Glu-69, Gly-272, Leu-334, Tyr- 335, Thr-336, Pro-337, Glu-338	24
3 Symmetrie- molekül 3 0 -1 0	Leu-123, Thr- 124, Gln-144, Lys-145, Ser- 146, <b>Leu-151</b> , Thr-185	29	3 Symmetrie- molekül 3 0 0 0	Leu-123, Thr- 124, Gln-144, Lys-145, Ser- 146, Thr-185, <b>Ile- 187</b>	23
4 Symmetrie- molekül 5 1 -1 0	Gln-204, Gln- 205, <b>Thr-206</b> , Lys-208, <b>Pro- 241</b> , Ala-242, <b>Gly-243</b> , Glu-306	33	4 Symmetrie- molekül 5 0 -1 0	Gln-204, Gln- 205, Lys-208, Ala-242, Glu-306	14
5 Symmetrie- molekül 5 0 -1 0	Gln-343, Ser- 347, <b>Ser-350</b> , Pro-351, Phe- 352, Asn-354, Lys-355, <b>Ala- 358</b> , Glu-361, <b>Lys-421</b>	39	5 Symmetrie- molekül 5 -1 -1 0	Gln-343, <b>Ile-346</b> , Ser-347, Pro- 351, Phe-352, Asn-354, Lys- 355, Glu-361	29
6 Symmetrie- molekül 5 0 0 0	Asn-368, Gly- 369, Arg-370, Glu-372, Asp- 376, Lys-377, <b>Phe-380</b> , Val- 381, Val-538, Glu-542, Trp-549, Gln-550	39	6 Symmetrie- molekül 5 -1 0 0	Asn-368, Gly- 369, Arg-370, Glu-372, Asp- 376, Lys-377, Val-381, Val-538, <b>Ser-539</b> , Glu- 542, Trp-549, Gln-550	29
7 Symmetrie- molekül 5 1 0 0	<b>Asp-437</b> , Thr- 439, Glu-442, Pro-487, Ala-488, Lys-489, <b>Asn- 511, Lys-512</b> , <b>Cys-513</b>	33	7 Symmetrie- molekül 5 0 0 0	Thr-439, Glu-442, Pro-487, Ala-488, Lys-489, <b>Pro-513</b>	14
Summe Kontakte SP-I: 240, 62 Reste beteiligt davon 38 N-terminal und 24 C-terminal					
Summe Kontakte 1hp1: 155, 52 Reste beteiligt davon 19 N-terminal und 33 C-terminal					

<sup>1</sup> Die Kontaktfläche ist definiert als die Summe aller Kontakte zu *einem* Symmetrieäquivalent

<sup>2</sup> Alle Reste mit mindestens einem interatomaren Kontakt mit weniger als 3,8 Å, fettgedruckt wenn der Rest keinen Kontakt in der Vergleichsstruktur ausbildet

<sup>3</sup> Summe aller interatomaren Kontakte, die von den Kontaktresten gebildet werden.

#### 4.2.2 Die monokline Kristallform: SP-II

Ebenso wie bei der Struktur SP-I mussten auch die Daten für die monokline Kristallform des S228C, P513C 5'-NT-Enzyms an der Heimanode gemessen werden, um Strahlenschäden zu vermeiden. Es konnte ein Datensatz bis 2,1 Å gesammelt werden. Die Tabelle 11 stellt die wichtigsten Ergebnisse der Datensammlung zusammen.

Tabelle 11. Datensammlung Kristall SP-II.

Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	1,54179
Oszillationswinkel	0,5°
Rotationswinkel	188°
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Zellkonstanten	a=80,49 Å b=93,70 Å c=82,90 Å; β=97,71°
Mosaizität	0,74°
Moleküle/AU	2
Auflösungsbereich (Å)	20-2,1 (2,17-2,10)
Unabhängige Reflexe	194970
Vollständigkeit (%)	98,4 (90,8)
R <sub>sym</sub> (%) <sup>a</sup>	5,5 (32,0)
Redundanz	2,8 (2,5)
I/σ (I)	11,3 (2,1)

##### 4.2.2.1 Molekularer Ersatz

Die Struktur konnte über die Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Die Indizierung der Reflexe ergab ein monoklines Kristallgitter, aufgrund des Fehlens der 0k0-Reflexe ließ sich jedoch nicht entscheiden, ob es die Raumgruppe P2<sub>1</sub> oder P2 war. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ergab für 2 Moleküle in der asymmetrischen Einheit den Wert 2,6, was einen realistischen Solvensgehalt von 52,6 % entspricht.

Als Suchmodell wurde die Zielstruktur (1hp1) der Doppelmutante gewählt. Weder mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994; Navaza und Saludjian, 1997) noch mit dem Programm

MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) konnte mit dem gesamten Suchmodell eine erhabene Lösung gefunden werden. Erst als die Domänen geteilt wurden (Reste 26-355 für die N-terminale Domäne und 356-549 für die C-terminale Domäne), wurden in der Rotationslösung (Auflösungsbereich 15 - 3,5 Å) mit nur der N-terminalen Domäne als Suchmodell zwei Positionen gefunden die sich mit einer Korrelation von 27,8 und 26,2 und kristallographischen R-Werten von 51,9 und 52,5 deutlich vom Hintergrund abhoben. Eine Translationssuche in der Raumgruppe  $P2_1$  mit diesen Lösungen und eine Starre-Körper-Anpassung ergab dann für diese Lösung einen R-Wert von 37,8 % und einen Korrelationskoeffizienten von 60,9. Über den molekularen Ersatz konnte nur eine C-terminale Domäne gefunden werden (deren Lösung sich nicht deutlich vom Hintergrund abhob und sich erst im Nachhinein als die wahre Lösung erwies), die zweite C-terminale Domäne wurde dann analog der ersten Domäne über die Transformationsoperatoren der beiden N-terminalen Domänen eingebaut.

Die unerwarteten Schwierigkeiten bei der Strukturlösung ließen bereits zweierlei vermuten: Die Struktur SP-II unterscheidet sich grundlegend, vermutlich durch eine Rotation der C-terminalen Domäne, von dem Suchmodell (d. h. der Zielstruktur). Die beiden Moleküle der asymmetrischen Einheit unterscheiden sich voneinander, vermutlich ebenfalls durch eine unterschiedliche Rotation der C-terminalen Domäne.

#### 4.2.2.2 Kristallographische Verfeinerung und Modellbau

Das gesamte Modell wurde dann über eine Starre-Körper-Anpassung mit dem Programm Refmac verfeinert (Murshudov et al., 1997). Hierbei war es entscheidend, dass der Auflösungsbereich sehr eng gewählt wurde (20 – max. 4,5 Å), um nicht in falsch-positiven Minima zu landen und dass die Domänen als unabhängige starre Körper verfeinert wurden. In vier Starre-Körper-Verfeinerungszyklen wurde sukzessiv die volle Auflösung (20 – 2,1 Å) erreicht, die einen R-Wert von 28,0 % und einen freien R-Wert von 33,1 % ergab. Für die Berechnung des freien R-Werts wurden 5 % der Reflexe genommen.

Mit den Phasen dieses Modells wurde eine Fo-Fc-Differenz- und eine 2Fo-Fc-Differenz-Elektronendichtekarte berechnet und in das Programm O eingelesen (Jones et al., 1991). Das Modell war hinreichend gut, um in beiden Ketten die Mutationen Ser-228 → Cys und Pro-513 → Cys zu erkennen und manuell einbauen zu können. Auch war noch deutlich Restdichte zwischen den beiden Cysteinen zu erkennen, so dass eine Disulfidbrücke gebaut wurde. Des Weiteren war noch Restdichte im Schlaufenbereich 321-332 zu sehen, der in dem Suchmodell nicht modelliert werden konnte. Interessant war, dass auch hier wie in der Struktur SP-I im aktiven Zentrum ein Metallion gebunden haben musste, jedoch nur in der Kette A nicht aber in der Kette B, wo an analoger Stelle die Dichte sehr viel schwächer war und sich nicht von den angrenzenden Wassermolekülen unterschied und folglich auch als Wasser interpretiert wurde.

Im Folgenden wurde alternierend mit dem Programmpaket CNS (Brunger et al., 1998) das Modell verfeinert und manuell gebaut. Bei der Verfeinerung wurde nach dem im Abschnitt 2.4 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Das Modell konnte so auf einen R-Wert von 19,74 und einen freien R-Wert von 23,05 verbessert werden. Am Ende der Verfeinerung wurden neben den Proteinatomen 748 Wassermoleküle und 1  $Zn^{2+}$ -Ion gebaut. Wie auch in der Struktur SP-I liegt das C-terminale Ende mit den 6 Histidin-Resten ungeordnet vor. In der Kette A wurde noch der Rest Glu-551 gebaut, in der Kette B konnte das Modell nur bis Rest Ser-548 erstellt werden. Die C-terminale Domäne der Kette B erwies sich als überaus schwierig zu bauen, da hier große Bereiche keine klar definierte Dichte aufwiesen. Durch spätere Verfeinerungszyklen konnte die Dichte zwar etwas verbessert werden, sie war aber insgesamt viel schlechter als die der C-terminalen Domäne der Kette A, was sich auch in den relativ hohen Temperaturfaktoren mit einem Durchschnittswert von 63,6  $\text{\AA}^2$  widerspiegelt (vgl. auch Abschnitt „Temperaturfaktoren“).

Der fehlende Schlaufenbereich 321-332 konnte in beiden Molekülen vollständig gebaut werden. Hierzu wurde neben den üblichen Verfeinerungsverfahren auch die Methode des simulierten Aufheizens und Abkühlens (ebenfalls aus dem CNS Programmpaket) der fehlenden Reste verwendet. Die bessere Ordnung der Reste in dieser Struktur ist darauf zurückzuführen, dass in beiden Monomeren Reste der Schlaufe Kontakte zu Nachbarmolekülen ausbilden (Tabelle 13).

Das Ergebnis der Verfeinerung ist in Tabelle 12 zusammengefasst. Es wurden insgesamt 8923 Atome mit jeweils vier (x, y, z, B) Freiheitsgraden verfeinert. Anschließend wurde noch mit dem Programm Refmac eine TLS-Verfeinerung durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.4.2), die einen endgültigen R-Wert von 16,6 und einen freien R-Wert von 21,5 ergab. Die Differenz zu den R-Werten des CNS-Modells erklärt sich nicht nur durch die TLS-Verfeinerung sondern auch durch die Berechnung der nicht-aziden Wasserstoffatome, die Refmac verwendet, CNS jedoch nicht. Wie auch in der Struktur SP-I zeigt das Ramachandran-Diagramm keine Auffälligkeiten gegenüber der Struktur 1hp1. In der Kette B liegen nur die Histidin-Reste 289 und 252 des aktiven Zentrums in unerlaubten Regionen, in der Kette A liegt neben den Histidin-Resten auch der Rest Gln-161 in der unerlaubten Region. Alle Reste in den unerlaubten Regionen sind in der Dichte sehr gut definiert. Die Histidin-Reste liegen in allen 5'-NT Strukturen im unerlaubten Bereich, Gln-161 ist entweder unerlaubt oder großzügig erlaubt.

Tabelle 12. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes SP-II. Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 5% der Reflexe verwendet. Das Ramachandran-Diagramm wurde mit dem Programm Procheck erstellt (Laskowski et al., 1993).

Auflösungsbereich (Å)	20,0-2,1
R-Faktor (%)	16,6
freier R-Wert (%)	21,5
Proteinatome	8174
Wassermoleküle	746
Standardabweichung (RMSD)	
Bindungslänge (Å)	0,029
Bindungswinkel (°)	2,17
Durchschnittlicher B-Wert (Å <sup>2</sup> )	42.0 (B=44.4) (A=36.8)
Hauptketten	39,2
Seitenketten und Wasser	44,5
Zn <sup>2+</sup>	66,8
Ramachandran Diagramm (% aller Aminosäurereste)	
In bevorzugten Regionen	87,9 (B) 88,4 (A)
In erlaubten Regionen	10,5 (B) 10,2(A)
In großzügig erlaubten Regionen	1,1 (B) 0,4 (A)
In unerlaubten Regionen	0,4 (B) 0,9 (A)

#### 4.2.2.3 Strukturbeschreibung

##### *Disulfidbrücke*

Wie in der Struktur SP-I war auch hier die Dichte um die mutierten Aminosäurereste klar definiert und von Strahlenschäden unangetastet (Abbildung 18). Die Disulfidbrücken in den beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander (vgl. Tabelle 19). In Abbildung 18 ist nur die Disulfidbrücke der Kette A gezeigt. Der markanteste Unterschied zur Struktur SP-I ist der Wechsel von einer rechts-händigen zu einer linkshändigen Disulfid-Geometrie. Dies deutet darauf hin, dass auch in Lösung eine große Beweglichkeit der Disulfidbrücke möglich ist.

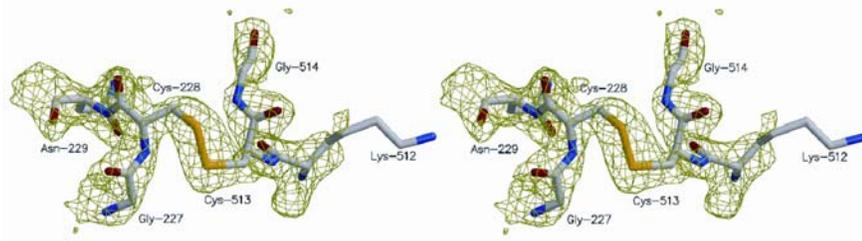


Abbildung 18. Stereoabbildung der Disulfidbrücke in der Struktur SP-II. 2Fo-Fc Elektronendichtekarte um die Disulfidbindung. Alle gezeigten Reste wurden für die Berechnung der Elektronendichte ausgelassen.

Die Geometrie des Dicysteins weicht erheblich von der Vorhersage ab. Die nach dem Programm SSBOND (Hazes und Dijkstra, 1988) berechnete Disulfidbindung wäre rechts­händig gewesen mit einem  $\chi_3$ -Torsionswinkel von  $127,6^\circ$  während die hier gefundenen  $\chi_3$ -Torsionswinkel  $-96,2^\circ$  (A) und  $-94,7^\circ$  (B) betragen. Damit weichen auch die  $\chi_2$ -Winkel erheblich von den vorhergesagten Werten ab ( $66,3^\circ$ ,  $-83,5^\circ$  für 1hp1 gegenüber  $178,6^\circ$  und  $74,5^\circ$  für die Kette A und  $174,3^\circ$ ,  $78,2^\circ$  für die Kette B). Siehe Abschnitt 4.5 für eine detaillierte Diskussion der Disulfidgeometrie.

### *Enzymkonformation*

Sowohl die Tatsache, dass bei dem molekularen Ersatz nicht mit dem gesamten Suchmodell eine Lösung gefunden werden konnte, wie auch die von der Zielstruktur erheblich abweichende Geometrie der Disulfidbindung lässt darauf schließen, dass die Struktur SP-II im Gegensatz zur Struktur SP-I erheblich von der gewünschten Konformation (1hp1) abweicht. Überlagert man die N-terminalen Domänen, lassen sich die unterschiedlichen Konformationen anhand der Position der C-terminalen Domänen beschreiben (Abbildung 19).

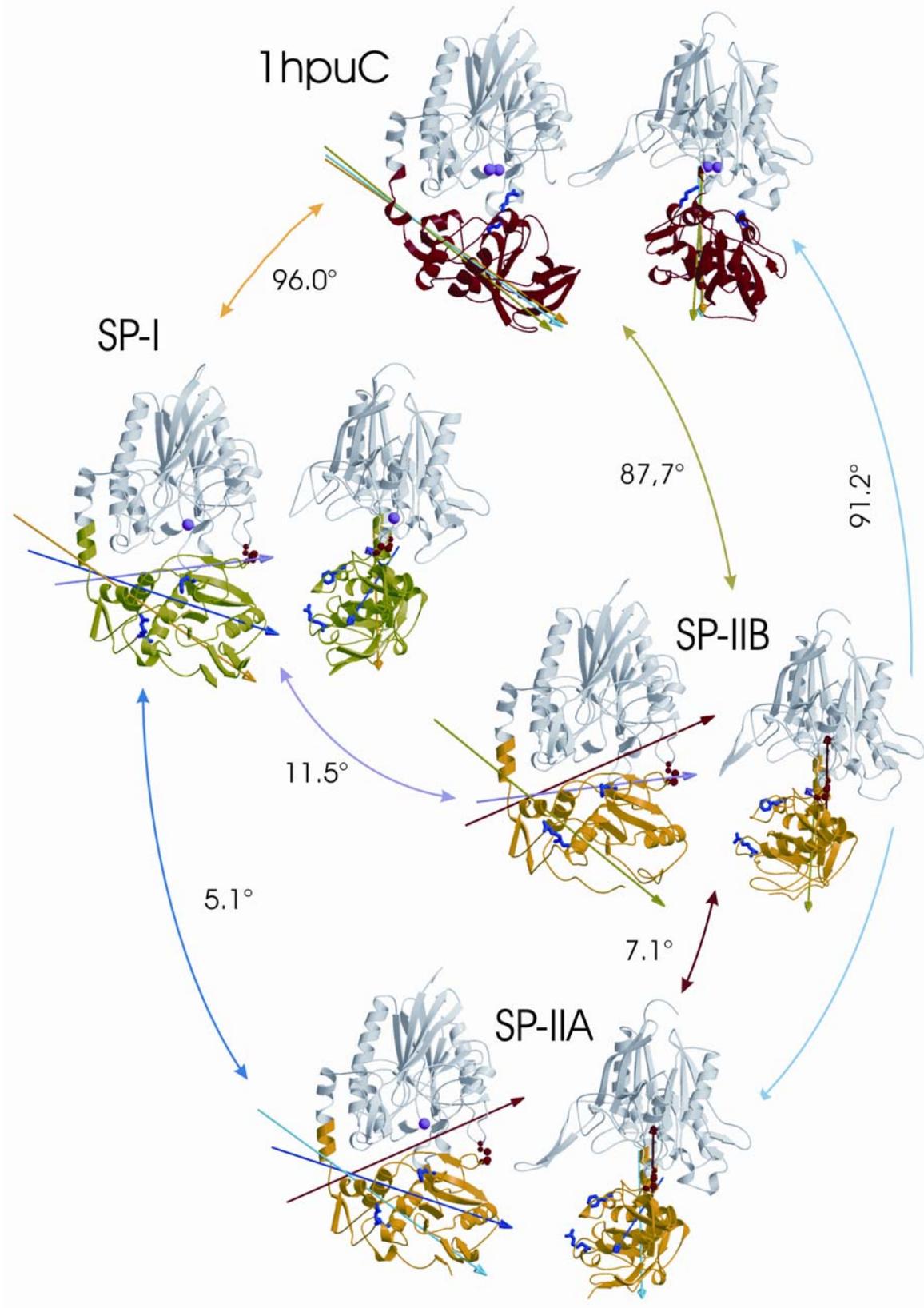


Abbildung 19. Vergleich der Rotation der C-terminalen Domäne zwischen den Kristallstrukturen SP-I und SP-II und 1hpu C (am meisten geschlossene Wildtyp-Konformation). Für den Vergleich wurden alle Moleküle N-terminal überlagert. Die N-terminale Domänen sind in grau gezeichnet. Die C-terminalen Domänen sind farblich dargestellt. Die vorhandenen Metallionen im aktiven Zentrum sind als Kalottenmodell dargestellt. Um die Rotationsbewegung zu verfolgen sind die Reste der Substratbindungsstelle Arg-375 und Phe-498 blau eingezeichnet. Die Rotationsbewegung zwischen 2 Strukturen ist jeweils auf den Pfeilen eingetragen. Die Rotationsachsen zwischen den Konformationen sind farblich entsprechend den Pfeilen kodiert. Jedes Molekül ist auch um 90° gedreht dargestellt, so dass die Lage der Rotationsachsen dreidimensional eingeschätzt werden kann.

Auffällig sind die stark unterschiedlichen Konformationen der Ketten A und B in der Struktur SP-II. Die C-terminalen Domänen weisen eine Interdomänen-Rotation von 7,1° auf. Das Molekül SP-II B ist damit gegenüber der offenen Konformation SP-I um 11,5° gedreht bzw. um 12,2° gegenüber der Zielstruktur 1hp1. Interessant ist, dass die Rotationsachse zwischen den Molekülen SP-I und SP-II B genau von der domänen-verbindenden Helix entlang der Domänengrenzfläche genau durch die Disulfidbrücke geht und damit nicht, wie bei der Rotation zwischen den offenen und geschlossenen Konformeren, durch das Massenzentrum der C-terminalen Domäne. Die Rotationsachse, die die Domänenbewegung zwischen den beiden Monomeren der Struktur SP-II beschreibt, verläuft sehr ähnlich entlang der Domänengrenzfläche, schneidet jedoch die N-terminale Domäne knapp oberhalb der eingeführten Disulfidbrücke. Das Verschieben der Rotationsachsen hin zur Disulfidbrücke ermöglicht eine maximale Bewegung der Domäne bei minimaler geometrischer Verzerrung der Disulfidbrücke. Diese Bewegung ist jedoch nicht untypisch für Rotationsbewegungen der 5'-NT und ist somit wahrscheinlich nicht auf den Einbau der Disulfidbrücke zurückzuführen. Die Rotationsachse des Konformerpaars der offenen Strukturen 1hp1 und 2ush Kette A entspricht exakt der Rotationsachse, die hier für das Paar SP-II A und SP-II B gefunden wurde. Auch eine Rotationsachse, die entlang der Domänengrenzfläche die Helix mit der Disulfidbrücke (bzw. der entsprechenden Position) verbindet, wurde bereits für das Konformerpaar 1ho5 A – 1ho5 B beschrieben (Knöfel und Sträter, 2001a).

Der Vergleich der Rotation zwischen den beiden Proteinkonformeren der SP-II Struktur und der am meisten geschlossenen Konformation (1hpu C) zeigt, dass die Rotationsachsen mit den Rotationsachsen für die Konformerpaare 1hpu C – 1hp1 sowie 1hpuC-SP-I übereinstimmen.

Die Übereinstimmung der Lage der Rotationsachsen zwischen einem Konformer in der offenen Form und einem Konformer in der geschlossenen Form ist nicht überraschend, da sich die offenen Konformere um max.  $11,5^\circ$  und die geschlossenen Konformere um max.  $8,4^\circ$  bzgl. des Interdomänen-Rotationswinkels unterscheiden. Bemerkenswert ist, dass auch die Rotationsachsen, die Konformationsänderungen innerhalb der offenen und innerhalb der geschlossenen Konformation entsprechen, eine Gemeinsamkeit haben: Diese Achsen liegen sämtlich in der in Abschnitt 1.5.3 beschriebenen Ebene, die die Massenzentren der Domänen und die Gelenkregion umfasst. Dies zeigt, dass die Domänenbeweglichkeit der 5'-NT nicht einer freien Bewegung der Domänen entspricht, sondern dass die Art der Rotationsmobilität durch die Proteinstruktur vorgegeben ist.

### *Temperaturfaktoren*

Bei der Strukturlösung der SP-II Kristallform musste die zweite C-terminale Domäne über Transformationsoperatoren analog der gefundenen ersten C-terminalen Domäne eingesetzt werden, da über den molekularen Ersatz keine eindeutige Lösung gefunden wurde. Dies deutete bereits darauf hin, dass die Unordnung in der C-terminalen Domäne des Monomers B sehr viel größer ist als beim Monomer A. Dieses Ergebnis lässt sich über einen Vergleich der Temperaturfaktoren quantifizieren (Abbildung 20).

Der durchschnittliche *B*-Wert der Kette A liegt bei  $35,3 \text{ \AA}^2$ , der der Kette B bei  $43,2 \text{ \AA}^2$ . In beiden Ketten ist die C-terminale Domäne von besonders hohen *B*-Werten betroffen. In der Kette A liegt der durchschnittliche *B*-Wert für die N-terminale Domäne bei  $26,7 \text{ \AA}^2$ , für die C-terminale Domäne hingegen bei  $49,8 \text{ \AA}^2$ . In der Kette B ist der durchschnittliche *B*-Wert der C-terminalen Domäne mit  $63,6 \text{ \AA}^2$  sogar doppelt so hoch wie in der N-terminalen Domäne mit  $31,2 \text{ \AA}^2$ .

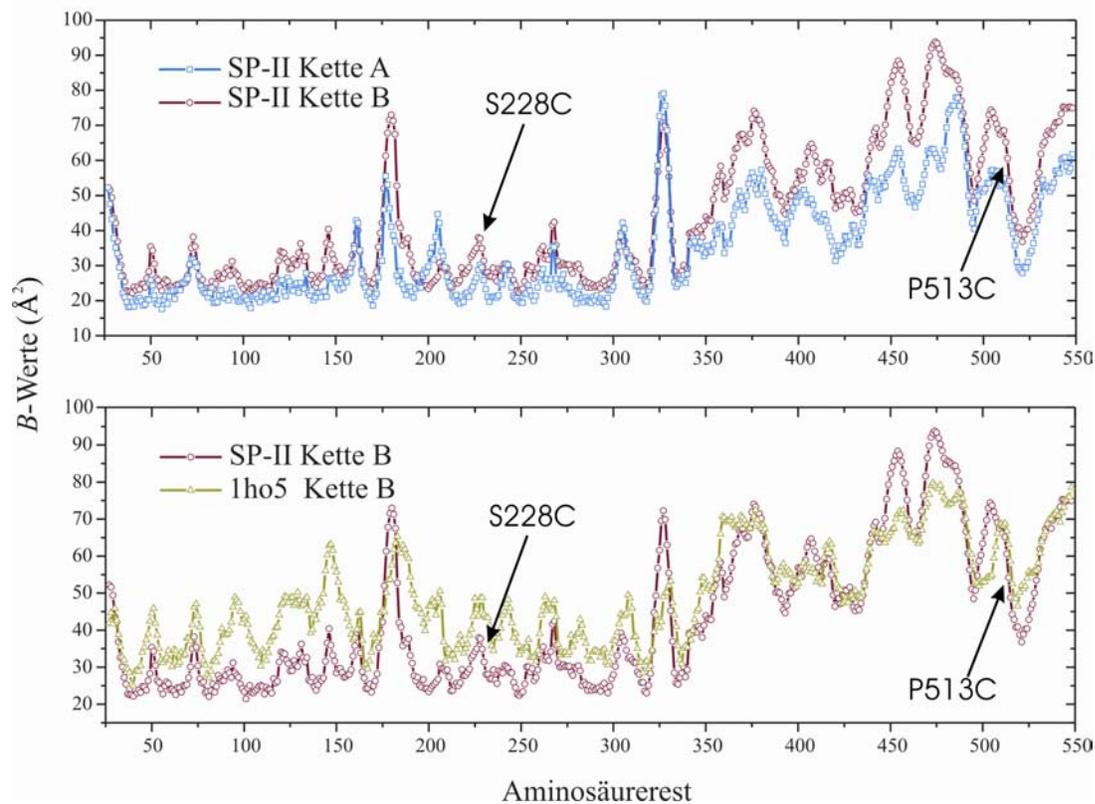


Abbildung 20. Vergleich der Temperaturfaktoren der Hauptkettenatome zwischen den Protein A und B der Struktur SP-II (oben) und zwischen dem Protein B SP-II und dem Protein B 1ho5.

In der Abbildung 20 ist deutlich zu sehen, dass der Anstieg der Temperaturfaktoren bei der domänenverbindenden Helix (Reste 344-361) geschieht und die Erhöhung gleichmäßig über die gesamte Länge der Domäne beibehalten wird. Dies zeigt, dass auch rigide Sekundärstrukturelemente von den hohen  $B$ -Werten betroffen sind und die Unordnung der C-terminalen Domäne auf eine konzertierte Bewegung der Domäne zurückzuführen ist. Da die Daten bei 100 K gemessen wurden sind die  $B$ -Werte auf statische Unordnung zurückzuführen und deuten darauf hin, dass im Kristall verschiedene Konformationen des Proteins vorliegen. Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die 5'-NT Struktur 1ho5 B beschrieben und wurde mit den sehr wenigen Kristall-Kontakten, die die C-terminalen Domänen ausbilden, erklärt (Knöfel und Sträter, 2001a). Interessant ist, dass der Verlauf der  $B$ -Werte dieser Struktur sehr ähnlich zu dem Verlauf der  $B$ -Werte der Struktur SP-II B ist (Abbildung 20 B), obwohl sich beide Strukturen hinsichtlich ihrer Konformation wie auch hinsichtlich ihrer Kristallpackung deutlich voneinander unterscheiden. Der Verlauf der  $B$ -Faktoren ist in der Struktur SP-II B nur noch ausgeprägter bezüglich der Differenz der durchschnittlichen Werte für die N- und C-terminalen Domänen. Die N-terminale Domäne hat durchschnittlich niedrigere  $B$ -Werte als in die der Struktur 1ho5 B, die C-

terminale Domäne hat hingegen durchschnittlich höhere  $B$ -Werte als die Struktur 1ho5 B. Wie im Abschnitt 4.2.2.4 gezeigt werden kann, ist auch in der Struktur SP-II B der große Unterschied der  $B$ -Werte zwischen den Domänen auf die Bewegungsfreiheit der C-terminalen Domänen im Kristall zurückzuführen.

Der parallele Verlauf der  $B$ -Faktoren der Strukturen SP-II B und 1ho5 B in Abbildung 20 zeigt zweierlei: Zum einen bewirkt auch hier wie bei der Struktur SP-I der Einbau der Disulfidbrücke offensichtlich keine Einschränkung der Bewegung im Kristall. Zum anderen beweist der Vergleich, dass die Kristallpackung nur einen unerheblichen Einfluss auf die Verteilung der  $B$ -Werte hat und ganz sicher nicht die Konformation der Moleküle bestimmt.

In Abschnitt 4.4.2 wird mit Hilfe der TLS-Verfeinerung gezeigt, dass die beobachtete Bewegung im Kristall übereinstimmt mit der Bewegung der 5'-NT, wie sie aus dem Vergleich zweier Strukturen abgeleitet werden kann.

Die  $B$ -Werte der eingeführten Cystein Reste sind unauffällig und liegen mit  $30,2 \text{ \AA}^2$  (S228C) und  $49,0 \text{ \AA}^2$  (P513C) für die Kette A bzw.  $37,7 \text{ \AA}^2$  und  $60,6 \text{ \AA}^2$  für die Kette B im Durchschnittsbereich aller  $B$ -Werte der entsprechenden Domäne. Auch hier ist der Vergleich mit der Struktur 1ho5 B sehr aufschlussreich, da er zeigt, dass das lokale Maximum bei Rest 228 auch in einer Vergleichsstruktur ohne eingeführtes Cystein vorliegt. Ähnliches gilt für den Bereich um die Reste 513. Der Verlauf der  $B$ -Werte stimmt auch hier zwischen den Strukturen mit den mutierten Proteinen und dem Wildtyp-Protein überein. Insgesamt ergibt sich also für die Disulfidbrücke Ser-228  $\rightarrow$  Cys, Pro-513  $\rightarrow$  Cys, dass sie sehr wenig Einfluss auf die Bewegung des Moleküls im Kristall hat und dass sie zu keinen eindeutigen Abweichungen gegenüber der Wildtyp-Struktur führt.

Weitere Auffälligkeiten im Verlauf der  $B$ -Werte sind die Maxima rund um die Reste 225 und 180. Der 180-iger Schlaufenbereich ist als sehr beweglich bekannt und dreht sich um beinahe  $180^\circ$  zwischen den offenen und den geschlossenen Wildtyp-Konformationen, der 225-iger Schlaufenbereich war in der Struktur 1hp1 noch komplett fehlgeordnet und konnte hier auch nur zum Teil gebaut werden. Die hohen  $B$ -Werte reflektieren diese Unordnung auch noch in der Struktur SP-II.

#### *Rmsd-Werte*

Eine separate Überlagerung der N- und C-terminalen Reste von SP-II auf 1hp1 ergibt eine durchschnittliche mittlere quadratische Abweichung von  $0,34 \text{ \AA}$  (N-terminale Domäne) und  $0,38 \text{ \AA}$  (C-terminale Domäne) für die Kette A bzw.  $0,39 \text{ \AA}$  und  $0,47 \text{ \AA}$  für die Kette B. Die durchschnittlich höheren Werte der C-terminalen Domäne gehen einher mit den ebenfalls durchschnittlich höheren Temperaturfaktoren der C-terminalen Domäne. Die Rmsd-Werte sind im Vergleich mit 1hp1 für die Ketten A und B in Abbildung 21 gezeigt. Zwischen den Ketten gibt es keine großen Unterschiede mit Ausnahme des Bereichs der Reste 450-480. Dies ist genau der Bereich, der auch auffällig erhöhte Temperaturfaktoren der Kette B gegenüber der Kette A aufweist. Dieser Bereich ist in der Struktur SP-II B besonders schlecht geordnet.

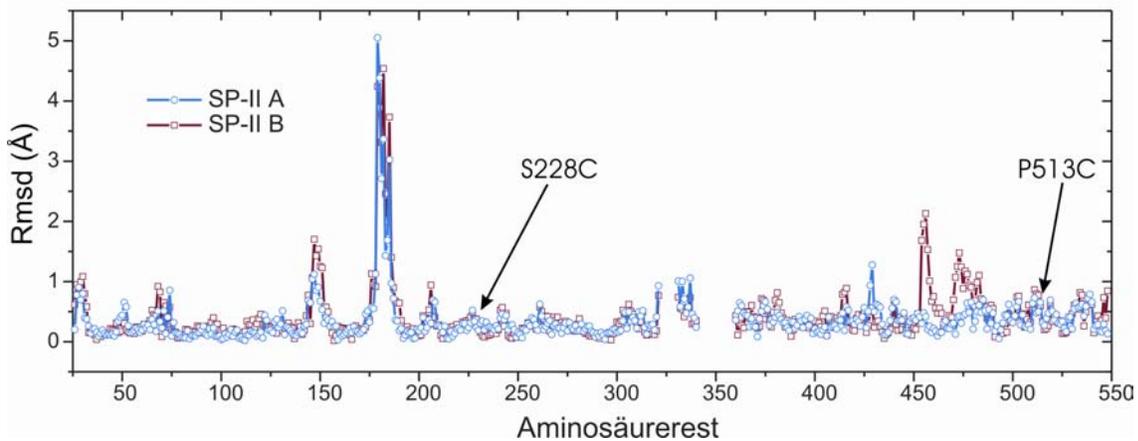


Abbildung 21. Rmsd-Abweichungen der Struktur SP-II gegenüber der Struktur 1hp1 basierend auf getrennten Überlagerungen für N- (26-340) und C-terminale (360-550) Domänen. Der Bruch bei Aminosäurerest 321 resultiert aus dem fehlenden Schlaufenbereich 321-332 in der Struktur 1hp1.

Wie auch beim Vergleich der Temperaturfaktoren sind hier die Bereiche um die Disulfidbrücken unauffällig. Das Cystein 228 liegt mit einer Abweichung von 0,34 (Kette A) bzw. 0,38 (Kette B) bei den Durchschnittswerten. Die Werte für Cystein 513 liegen in beiden Fällen deutlich über dem Durchschnitt mit 0,50 (Kette A) und 0,77 (Kette B), was auf den veränderten Hauptkettenverlauf des Cysteins gegenüber dem ursprünglichen Prolin zurückzuführen ist. Die Abweichungen der Cysteinreste und um das Dicystein herum sind vernachlässigbar klein und mit großer Wahrscheinlichkeit von der Reorganisation der Wasserstoffbrücken an der Kontaktstelle der beiden Domänen hervorgerufen. Dieser Befund ist im Einklang mit den Ergebnissen der SP-I-Strukturanalyse (s. Abschnitt 4.2.1.3) und zeigt, dass die Disulfidbrücke ohne strukturelle Verzerrungen eingebaut werden konnte. Es ist gut möglich, dass die Domänenrotation bei der Einpassung der Disulfidbrücke hilfreich ist, da es sehr häufig bei künstlich eingeführten Disulfidbrücken zu starken lokalen strukturellen Abweichungen kommt (Almog et al., 1998; Jacobson et al., 1992; Wakarchuk et al., 1994).

Bemerkenswert sind die hohen Abweichungen im 180-iger Schlaufenbereich, die in der Kette A bis zu 5 Å reichen. Dieser Schlaufenbereich hatte bislang in allen offenen Strukturen des Wildtyp-Proteins eine andere Konformation. Die hier beobachtete Umlagerung wird durch Kristallkontakte hervorgerufen (vgl. Tabelle 13), die aufgrund der hohen Beweglichkeit des Bereichs möglich sind.

### *Metall-Koordinierung*

Neben der unterschiedlichen Konformation ist einer der interessantesten Unterschiede zwischen der SP-II A und der SP-II B Struktur die unterschiedliche Besetzung des aktiven Zentrums mit einem Metallion. Obgleich dem Kristallisationsansatz keine Metallionen zugesetzt wurden, konnte in der Dichte des Monomers A eindeutig ein Metallion in der Restdichte lokalisiert werden, wohingegen im Monomer B diese Position mit einem Wassermolekül besetzt ist. Wie auch in der Struktur SP-I ist im Molekül A lediglich die Metallbindestelle 2 nicht jedoch die Bindestelle 1 besetzt. Es konnte leider nicht geklärt werden, worauf die unterschiedliche Besetzung der Bindestelle 2 in den zwei Molekülen der asymmetrischen Einheit der Struktur SP-II zurückzuführen ist.

Wie auch in der Struktur SP-I kann das stark gebundene Metallion, das aufgrund der atomabsorptionsspektroskopischen Daten als Zinkatom verfeinert wurde, als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die strukturelle Integrität des Proteins durch den Einbau der Disulfidbrücke nicht gelitten hat. In Abbildung 22 sind die Liganden des Metallions 2 der Strukturen 1hp1 und SP-II A überlagert. Wie auch in der Struktur 1hp1 weist das Zinkion eine trigonal bipyramidale Koordinationsgeometrie auf. An Stelle des Bikarbonations sind hier jedoch die Wassermoleküle W-113 und W-247. Wahrscheinlich aufgrund der fehlenden elektrostatischen Abstoßung durch das zweite Metallion ist das Zinkatom etwas in Richtung der Position des zweiten Metallions gerutscht (hier besetzt von einem Wassermolekül, in der Abbildung nicht zu sehen), so dass die beiden Metallionen im Gegensatz zu den Liganden Asp-84, Asn-116 und His-252 nicht perfekt überlagern. Diese Positionsänderung des Zink-Ions führt auch zu einer leichten Drehung des Rests His-217. Es muss jedoch bedacht werden, dass in der Struktur SP-II A die insgesamt hohen *B*-Werte und insbesondere der hohe *B*-Wert des Metallions von 66,8 Å<sup>2</sup> (vgl. Tabelle 11) die Positionsbestimmung wesentlich ungenauer macht. Wie auch in der Struktur SP-I ist auch hier der hohe *B*-Wert des Zink-Ions wahrscheinlich Ausdruck einer unvollständigen Besetzung, weil nicht separat für die Besetzung einzelner Atome verfeinert wurde. Die maximale rechnerische Besetzung aufgrund der Ergebnisse der Atomabsorptionsspektroskopie beträgt 0,7 (vgl. Abschnitt 3.1.3). Durch die leichte Verschiebung des Metallions kommt es auch zu relativ großen Abständen zwischen dem Metallion und den Liganden (W-247 2,39 Å, Asp-84 2,45 Å, Asn-116 2,44 Å, His-217 2,40 Å, W-113 2,86 Å, His-252 2,40 Å), so dass hier auch die Koordinationsgeometrie gegenüber der Zielstruktur 1hp1 leicht verzerrt ist. Dennoch deutet die Aufnahme des Metallions auf ein intaktes aktives Zentrum hin, da die Abweichungen eher auf den schlechteren Datensatz aufgrund der hohen Beweglichkeit des Moleküls zurückzuführen sind, als auf den Einbau der Disulfidbrücke. Diese Schlussfolgerung wird durch die Struktur SP-I und die kinetischen Daten gestützt.

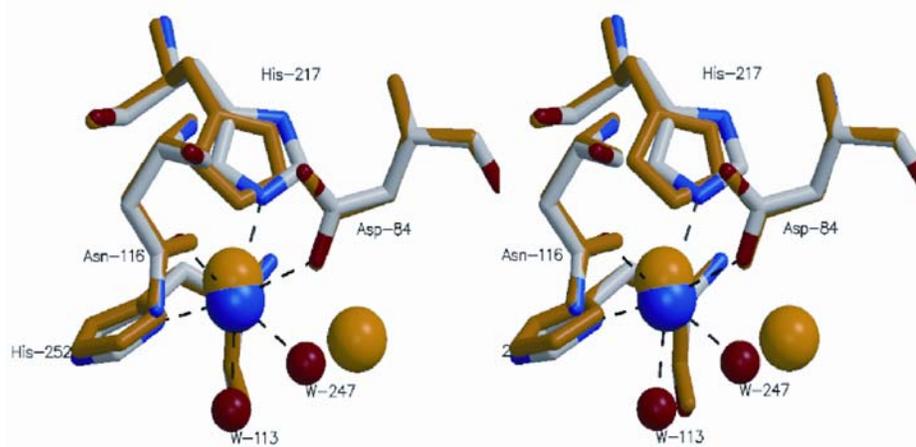


Abbildung 22. Stereoabbildung der Metallkoordinierung in der Struktur SP-II A. Alle metallkoordinierenden Aminosäuren und Wassermoleküle der Struktur SP-I sind gezeigt. Stickstoff-Atome sind in blau, Sauerstoff-Atome in rot, alle anderen in grau dargestellt. Das Zink-Atom ist in ebenfalls in blau abgebildet. Die metallkoordinierenden Reste und das Zinkatom der Struktur 1hp1 sind überlagert (Überlagerung basierend auf den Resten 26-340) und in gelb gezeichnet.

#### 4.2.2.4 Kristallkontakte

Die unterschiedlich guten Lösungen für die erste und zweite C-terminale Domäne beim molekularen Ersatz, die qualitativ sehr unterschiedliche Dichte, die beim Modellbau beobachtet wurde, die Rotationswinkel der C-terminalen Domänen sowie auch die Metallbindung in der Kette A, nicht aber in der Kette B, deuten alle darauf hin, dass beide Moleküle der asymmetrischen Einheit stark unterschiedlich sind. Ein Vergleich der Kristallkontakte zeigt, dass dies auch für die Umgebung der beiden Proteine gilt (Tabelle 13).

Während das Monomer A mit acht benachbarten Molekülen insgesamt 257 Kristallkontakte ausbildet (Kontakte  $< 3,8 \text{ \AA}$ ), ist das Monomer B von nur sechs Molekülen umgeben, mit denen es nur 163 Kontakte formt. Die unterschiedliche Umgebung der beiden Ketten ist auch in Abbildung 23 dargestellt, in der die kontaktformenden Reste der symmetrieverwandten Moleküle als Kalottenmodell dargestellt sind. Während das Monomer A kompakt von Kontaktresten umgeben ist, ist das Monomer B nur von wenigen Seiten von benachbarten Molekülen begrenzt.

Interessant sind vor allem die Unterschiede in den C-terminalen Domänen, weil hier die größten Unterschiede bezüglich der Qualität der Dichte beobachtet wurden. In der Kette A sind insgesamt 18 Reste an Kontakten zu zwei benachbarten Molekülen beteiligt, während in der Kette B lediglich 10 Reste an Kontakten zu zwei benachbarten Molekülen beteiligt sind (Tabelle 13). Ausschlaggebend für die höhere Ordnung der C-terminalen Domäne der Kette A dürfte aber sein, dass sie erstens mit stabileren Sekundärstrukturelementen Kontakte ausbildet und nicht mit stark beweglichen Schlaufenbereichen wie im Monomer B, und zweitens die Kontaktreste der benachbarten Moleküle zum Molekül B einen durchschnittlich höheren *B*-Wert haben als die Kontaktreste zum Molekül A (Abbildung 23). Ein dritter Grund für die unterschiedliche Ordnung der beiden C-terminalen Domänen könnte sein, dass Reste der domänenverbindenden Helix der Kette A (Ser-350, Gln-353, Asn-354, Lys-357) Kontakte zu Nachbarmolekülen ausbilden, die die Helix möglicherweise stabilisieren und damit die Beweglichkeit der Domäne einschränken. Vergleichbare Kontakte lassen sich in der Kette B nicht finden. Die geringe Packungsdichte in der C-terminalen Domäne der Kette B führt zu einer hohen statischen Unordnung im Kristall. In Abschnitt 4.4 wird mit Hilfe einer TLS Verfeinerung gezeigt, dass diese Unordnung anisotrop ist und die Richtung der Bewegung im Kristall mit der Richtung der Bewegung in Lösung übereinstimmt.

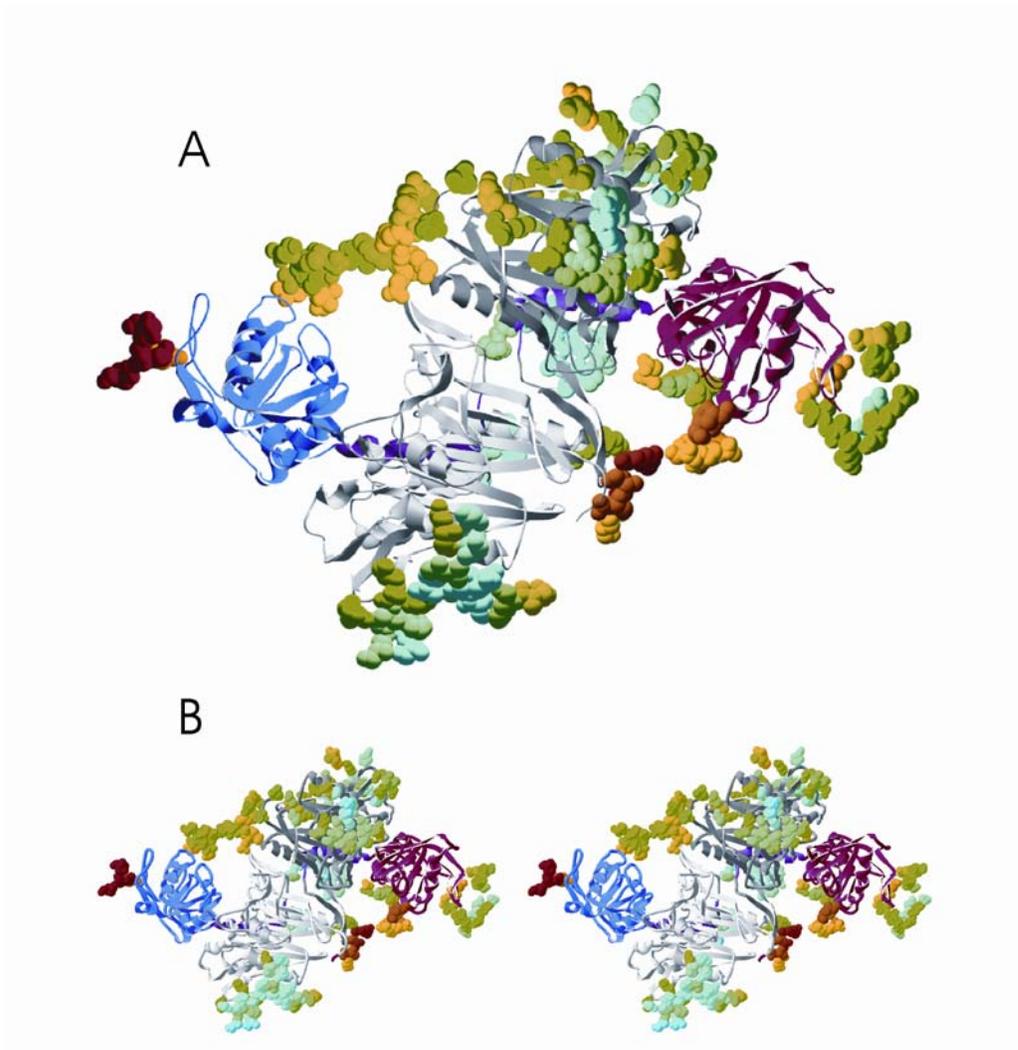


Abbildung 23. Kristallkontakte der Struktur SP-II. Die Monomere A und B sind als Bändermodelle gezeigt. Die N-terminalen Domänen in grau (dunkelgrau Kette A, hellgrau Kette B), die C-terminale Domänen sind rot (A) und blau (B) gezeichnet, die domänenverbrückende Helix ist lila. Alle Kontaktreste der symmetrieverwandten Moleküle sind als Kalottenmodelle (nur Hauptkettenatome) dargestellt und nach ihren Temperaturfaktoren auf einer Farbskala von blau (niedrige *B*-Faktoren) nach rot (hohe *B*-Faktoren) eingefärbt. Abbildung B wie A jedoch in stereo.

Tabelle 13. Kristallkontakte der Struktur SP-II. Kontakte unter 3,8 Å zu symmetrieverwandten Molekülen oder zum benachbarten Molekül in der AU. In der Spalte „Symmetriemolekül“ steht A für Kette A, B für die Kette B, n ist die N-terminale Domäne, c die C-terminale Domäne. Die Nummer des Symmetrieoperators ist gefolgt von dem Translationsvektor jeweils als Vielfaches von a, b, c.

Symmetriemolekül	Kontaktreste	Anzahl
Kontakte der A-Kette		
1. Ac 1 1 0 0	Glu-27, Lys-30, Lys-33, Glu-73, Asp-162	13
2. Ac 2 4 0 0	Gln-28, Asp-29, Gln-279, Gln-280, Asn-281, Arg-303, Asn-304, Glu-306	29
3. An 2 4 -1 0	Trp-47, Arg-48, Glu-50, Ser-330, Ser-347, Ser-350, Gln-353, Asn-354, Lys-357, Asp-411, Glu-414, Lys-421, Lys-425	53
4. Bn	Lys-68, Glu-69, Ala-71, Glu-73, Val-270, Pro-274, Asn-311, Lys-321, Glu-331, Leu-334, Glu-338	18
5. Bn 1 0 0 1	Glu-98, Arg-102, Pro-122, Leu-123, Thr-124, Arg-127, Gln-128, Lys-131, Trp-132, Lys-134, Gln-144, Glu-149, Leu-151, Glu-182, Tyr-183	51
6. Bn 2 4 0 0	Lys-145, Glu-188, Phe-189, Arg-190,	26
7. An 2 4 0 0	Gln-205, Asn-223, Arg-238, Ala-239, Pro-241, Ala-242	24
8. Bc 1 -1 0 0	Glu-326, Arg-375, Asp-376, Arg-379, Val-381, Met-453, Asp-456, Gly-458, Lys-471, Asn-476, Asp-477, Asp-504, Gly-545, Gln-550	43
Summe Kontakte A-Kette: 257, 75 beteiligten Resten, 57 N-terminal und 18 C-terminal		
Kontakte der B-Kette		
1. Bc 1 -1 0 0	Glu-27, Asp-29, Lys-30, Asp-162	15
2. An	Lys-68, Glu-69, Ala-72, Glu-73, Pro-274, Asn-311, Lys-321, Trp-325, Glu-331, Leu-334, Tyr-335, Glu-338	26
3. An 1 0 0 -1	Tyr-143, Lys-145, Ser-146, Thr-147, Gly-148, Glu-149, Trp-155, Glu-188, Arg-190, Lys-197, Leu-198, Gln-201, Glu-202, Gln-205, Thr-206, Lys-208	51
4. Ac 1 1 0 0	(Lys-321), Thr-324, Glu-326, Gly-328, Arg-375, Asp-376, Arg-379, Lys-454, Asp-456,	27
5. An 2 4 -1 0	Gln-343, Gln-344, Ser-347,	26
6. Bn 1 1 0 0	Lys-474, Asn-476, Asp-477, Lys-544, Gly-545	18
Summe Kontakte B-Kette: 163, 48 beteiligten Resten, 38 N-terminal und 10 C-terminal		

### 4.3 Struktur des disulfidverbrückten Enzyms PL

Ein interessantes Problem bei der Strukturlösung war die häufig beobachtete perfekte meridionale Verzwilligung des Kristalls. Insgesamt wurden sieben Kristalle getestet und auf Verzwilligung überprüft. Erst mit dem Austausch des Kristallisationsreagenz von Ammoniumsulfat zu Lithiumsulfat wurde ein Einkristall erhalten, der dann auch komplett vermessen wurde. Als verlässlichster Parameter für die Verzwilligung erwiesen sich die kumulativen Intensitäten der Reflexe. Die zentrischen und azentrischen Momente hingegen, die auch ein diagnostisches Kriterium für Verzwilligung sind, ergaben nicht in allen Fällen Werte, die auf Verzwilligung hindeuteten. Da nur ein in Gegenwart von Lithiumsulfat gezüchteter Kristall vermessen wurde, kann nicht festgestellt werden, ob aufgrund der veränderten Kristallisationsbedingungen oder nur zufällig der Kristall als Einkristall gewachsen ist.

Der Datensatz konnte an der Synchrotronstrahlenquelle BW7B am EMBL in Hamburg (DESY) gemessen werden. Anders als bei den Kristallformen der offen verbrückten Mutante kam es hier nicht zu auffälligen Strahlenschäden während der Datensammlung. Das kann entweder daran gelegen haben, dass die Strahlenquelle in Hamburg nicht so intensitätsstark ist wie das Strahlrohr ID 14 am ESRF in Grenoble oder daran, dass die eingeführte Disulfidbrücke stärker im Proteininneren verborgen ist und dadurch nicht so wasserexponiert liegt wie die Disulfidbrücke der offen verbrückten Mutante. Tabelle 14 fasst die wichtigsten Ergebnisse der Datensammlung zusammen.

Tabelle 14. Datensammlung Kristall PL. Die Werte in Klammern beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

Temperatur (K)	100
Wellenlänge (Å)	0,8453
Oszillationswinkel	0,5°
Rotationswinkel	57,5°
Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Zellkonstanten (Å)	a=97,68, b=97,68, c=312,05
Moleküle/AU	2
Mosaizität	0,9°
Auflösungsbereich (Å)	30-2,1 (2,18-2,10)
Unabhängige Reflexe	89316
Vollständigkeit (%)	95,1 (95,6)
R <sub>sym</sub> (%)	6,9 (26,7)
Redundanz	3,2 (3,3)
I/σ (I)	17,2 (4,7)

### 4.3.1 Molekularer Ersatz

Der Datensatz konnte über die Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Die Indizierung und Skalierung der gemessenen Reflexe ergab ein tetragonales Kristallsystem mit der Laue-Klasse 4/mmm. Die Abwesenheit von gemessenen Reflexen entlang der  $h00$  Linie ließ die Möglichkeiten  $P4_21_2$ ,  $P4_12_12$ ,  $P4_22_12$  und  $P4_32_12$  offen. Berechnung des Matthews-Koeffizienten  $V_m$  ergab unter der Annahme, dass sich zwei Moleküle in der Einheitszelle befinden einen Wert von 3,3, woraus sich ein Solvensgehalt von 62,7 % errechnet, bei 3 Molekülen in der asymmetrischen Einheit beträgt bei einem angenommenen Molekulargewicht von 59,2 der Solvenzgehalt 44,1 %. Es wurde zuerst unter der Annahme nur zweier Moleküle in der AU gerechnet, was sich später auch als wahr herausgestellt hat.

Als Suchmodell für den molekularen Ersatz wurde die Kette C der Struktur 1hpu, die auch als Modell (Zielstruktur) für die Einführung der Disulfidbrücke diente, verwendet. Der molekulare Ersatz wurde mit Hilfe des Programms AMORE (Navaza, 1994; Navaza und Saludjian, 1997) durchgeführt. Wie auch bei der Strukturlösung der Kristallform SP-II stellte sich hier schnell heraus, dass Rechnungen mit dem kompletten Suchmodell zu keinen sinnvollen Lösungen führten. Die Rotationssuche mit nur einer N-terminalen Domäne (Reste 26-355) ergab eine erhabene Lösung mit einem R-Wert von 57,9% und einer Korrelation von 17,4. Die Translationssuche wurde nun systematisch mit allen in Frage kommenden Raumgruppen durchgeführt, wobei lediglich für die Raumgruppe  $P4_12_12$  eine Verbesserung des R-Werts (56,1%) und der Korrelation (17,6) beobachtet wurde.  $P4_12_12$  stellte sich dann auch als die wahre Raumgruppe heraus. Unter Vorgabe der gefundenen Lösung für die N-terminale Domäne wurde noch eine C-terminale Domäne gefunden. Nach einer ersten Starre-Körper-Anpassung mit dem Programm AMORE wurden für das gesamte erste Molekül ein R-Wert von 50,6 und eine Korrelation von 36,3 erhalten. Unter Vorgabe dieses Modells konnte auch die zweite N-terminale Domäne gefunden werden, die das Ergebnis auf 49,6% (R-Wert) und 47,7 (Korrelation) verbesserte. Interessanterweise konnte keine Lösung für die zweite C-terminale Domäne gefunden werden. Erst mit dem Programm BEAST (Read, 2001) wurde die richtige Position der zweiten C-terminalen Domäne gefunden. Das gesamte Modell konnte mit dem Programm ArpWarp (Perrakis et al., 1999) noch wesentlich verbessert werden, so dass vor der Verfeinerung und vor dem Einbau von Wassermolekülen ein Modell mit einem R-Wert von 25,6% und ein freier R-Wert von 25,8% erhalten wurde. In diesem Modell sind allerdings die programmtypischen „Dummy“-Atome in die Restdichte eingebaut.

### 4.3.2 Kristallographische Verfeinerung und Modellbau

Mit den Phasen des mittels AMORE und ArpWarp bestimmten Strukturmodells wurde eine Elektronendichtekarte berechnet und in das Programm O eingelesen (Jones et al., 1991). Die Dichte war gut interpretierbar, so dass die Punktmutationen Pro-90 → Cys und Leu-424 → Cys problemlos eingebaut werden konnten. Auch war zwischen den eingeführten Cysteinresten noch Restdichte zu erkennen, die auf eine Dicysteinbildung schließen ließ. Ebenso konnten die Mangan-Ionen, die dem Kristallisationsansatz zugesetzt waren, in dem bekannten Ligandenumfeld lokalisiert werden.

Im Folgenden wurde alternierend mit dem Programmpaket CNS (Brunger et al., 1998) das Modell verfeinert und manuell mit dem Programm O gebaut. Bei der Verfeinerung wurde nach dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Am Ende der Verfeinerung lagen die R-Werte bei 19,16 bzw. 23,17 % (vor TLS-Verfeinerung). Ähnlich wie in der Struktur 1hp1 (Knöfel und Sträter, 1999) konnte hier Restdichte zwischen den beiden Metallionen nur mit einem Einbau von Bikarbonat-Ionen in den beiden Proteinen in der AU erklärt werden. Des Weiteren wurden auch noch zwei Sulfat-Moleküle identifiziert, die jedoch auch bereits zuvor beschrieben wurden. Neben den Proteinatomen wurden 921 Wassermoleküle, vier Mangan, zwei Sulfat und zwei Bikarbonat-Moleküle gebaut. Wie auch in den Strukturen des offen verbrückten Enzyms lag hier der C-Terminus der Peptidkette ungeordnet vor, so dass die zusätzlichen Reste Glu-551 und die Histidin-Reste 552-557 nicht gebaut werden konnten. Es wurden insgesamt 9134 Atome mit jeweils vier (x, y, z, B) Freiheitsgraden verfeinert, anschließend wurde noch eine TLS-Verfeinerung durchgeführt (vgl. hierzu Abschnitt 4.4).

Die in Tabelle 15 zusammengefassten Daten der Verfeinerungsstatistik beinhalten auch die TLS-Verfeinerungszyklen. Im Ramachandran-Diagramm besetzen die Reste His-252 (an der Metallkoordinierung beteiligt), His-289 sowie Thr-87 unerlaubte Positionen. Die Histidin-Reste sind in allen 5'-NT – Strukturen in der unerlaubten Region gefunden worden, der Threonin-Rest hat gegenüber den anderen Strukturen ein leicht ungünstigeres Phi/Psi-Winkelpaar eingenommen und ist so von einer großzügig erlaubten in eine unerlaubte Region gekommen. Die Dichten aller dieser Reste in den unerlaubten oder großzügig erlaubten Regionen sind sehr gut definiert.

Tabelle 15. Verfeinerungsstatistik des Datensatzes PL. Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 5% der Reflexe verwendet. Das Ramachandran-Diagramm wurde mit dem Programm Pro-Check erstellt (Laskowski et al., 1993).

Auflösungsbereich (Å)	20,0 – 2,1
R-Wert	15,6
freier R-Wert	20,5
Proteinatome	8194
Wassermoleküle	921
Standardabweichung (RMSD)	
Bindungslänge (Å)	0,022
Bindungswinkel (°)	1,74
Durchschnittlicher B-Wert (Å <sup>2</sup> )	26,1
Hauptketten	23,5
Seitenketten	26,5
Wasser	36,6
Metallionen (1; 2)	31,1 ; 21,9
Bikarbonation	34,7
Ramachandran Diagramm (% aller Aminosäurereste)	
In bevorzugten Regionen	89.6 (B)
In erlaubten Regionen	90.4 (A)
In großzügig erlaubten Regionen	9.6 (B)
In unerlaubten Regionen	8.4 (A)
In großartig erlaubten Regionen	0.2 (B)
In unzulässigen Regionen	0.4 (A)
In unzulässigen Regionen	0.7 (B)
In unzulässigen Regionen	0.7 (A)

### 4.3.3 Strukturbeschreibung

#### *Disulfidbrücke*

Die Disulfidbrücke weist am C $\beta$ -Atom des Rests Pro-90 erste Anzeichen von Strahlenschäden auf (Abbildung 24). Hierbei kommt es durch Radikalangriff zu einem Aufbrechen der Disulfidbrücke, wie es von Ravelli und Weik beschrieben wurde (Ravelli und McSweeney, 2000; Weik et al., 2000). Diese Erklärung ist wahrscheinlicher als ein Vorliegen einer partiell geöffneten Disulfidbrücke, da der Ellmans Test keine reduziert vorliegenden Cysteine in Lösung nachwies (s. Abschnitt 3.1.3).

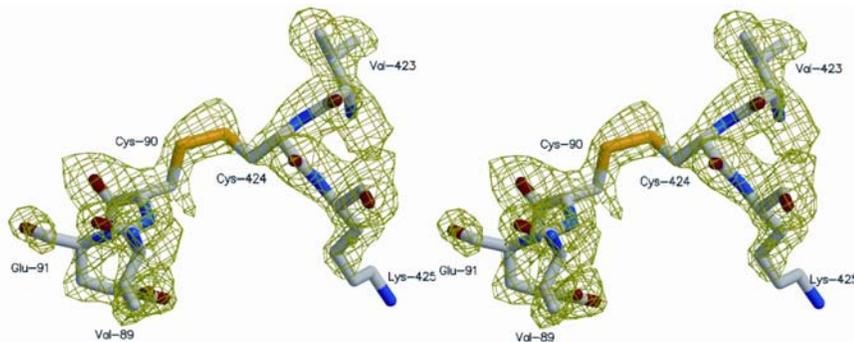


Abbildung 24. Stereoabbildung der eingeführten Disulfidbrücke Pro-90  $\rightarrow$  Cys, Leu-424  $\rightarrow$  Cys der Kette A. Gezeigt ist eine 2Fo-Fc Elektronendichtekarte um die Disulfidbindung für deren Berechnung die gezeigten Reste ausgelassen wurden.

Die Geometrie der Disulfidbindung unterscheidet sich zwischen den beiden Monomeren in der asymmetrischen Einheit nur geringfügig (Kette A  $-103,6^\circ$ ,  $169,2^\circ$ ,  $-78,1^\circ$ ,  $-126,0^\circ$ ,  $-60,3^\circ$  und Kette B  $-91,9^\circ$ ,  $177,5^\circ$ ,  $-94,0^\circ$ ,  $-120,6^\circ$ ,  $-62,1^\circ$  jeweils von  $\chi_1$  nach  $\chi'_1$ ). Mit einem  $\chi_3$ -Winkel von  $-94,0^\circ$  nimmt die Kette B eine energetisch etwas günstigere Konformation ein als die A-Kette mit  $\chi_3$  von  $-78,1^\circ$  (vgl. Tabelle 19, Abschnitt 4.5). Diese beiden linkshändigen Konformationen weichen jedoch erheblich von der energetisch günstigsten Konformation der Vorhersage ab, die rechtshändig ist und beinahe optimale Torsionswinkel einnimmt ( $-44,3^\circ$ ,  $-136,5^\circ$ ,  $90,9^\circ$ ,  $95,8^\circ$ ,  $42,7^\circ$  von  $\chi_1$  nach  $\chi'_1$ ). Auch die beiden anderen als möglich berechneten Disulfidgeometrien werden weit verfehlt mit jeweils über  $50^\circ$  Abweichungen bei den  $\chi_2$  und über  $100^\circ$  Abweichungen bei den  $\chi'_2$  Winkeln. Zusammen mit der Schwierigkeit bei der Strukturlösung, bei der für den Molekularen Ersatz mit den

Domänen getrennt gesucht werden musste, deutet das bereits darauf hin, dass die C-terminale Domäne der PL - Struktur einen anderen Drehwinkel eingenommen hat als in der Zielstruktur (1hpu C).

### *Enzymkonformation*

Die Analyse der Bewegung der C-terminalen Domäne relativ zur N-terminalen Domäne ergibt einen Rotationsunterschied von lediglich  $1,5^\circ$  zwischen den beiden Monomeren der asymmetrischen Einheit. Es gibt jedoch überraschend große Abweichungen zur Zielstruktur. In Abbildung 25 sind die Strukturen des Monomers A der PL-Struktur und der Zielstruktur (1hpu C) sowie die Struktur SP-I mit den Rotationsachsen abgebildet. Die C-terminale Domäne der PL-Struktur (gelb) hat sich gegenüber der am meisten geschlossenen Konformation (rot) um  $43,2^\circ$  gedreht. Die Rotationsachse liegt zwar in derselben Ebene wie die Rotationsachse zwischen den Strukturen 1hpu C und SP-I, hat sich jedoch etwas geneigt, so dass sie parallel zur Disulfidbrücke ausgerichtet liegt. Damit liegt die Disulfidbrücke auch sehr dicht an der Rotationsachse, wodurch eine nur geringe Konformationsänderung der Disulfidbrücke eine große Konformationsänderung des Enzyms erlaubt. Es ist zu vermuten, dass diese theoretische Bewegungsfreiheit des Enzyms auch tatsächlich genutzt wird und das Enzym auch in der geschlossenen Form, die es eigentlich einnehmen sollte, existieren kann. Beleg hierfür ist die hohe katalytische Aktivität, die das Enzym aufweist (vgl. Kapitel 54.5) und die theoretische Voraussage, dass die Disulfidbrücke auch in der geschlossenen Konformation eine energetisch günstige Konformation einnimmt. (Vgl. auch Abschnitt 4.4.1 für eine Diskussion über die mögliche Bewegungsfreiheit der PL-Mutante in Lösung.)

Die Rotationsdifferenz zur offenen Konformation (in Abbildung 25 repräsentiert durch die Struktur SP-I) beträgt  $55,5^\circ$  um eine Achse, die praktisch identisch mit der Rotationsachse der vollen Bewegung ist (1hpu C und SP-I). Hiermit handelt es sich bei der PL-Struktur um eine tatsächliche intermediäre Konformation, die im Gegensatz zu allen anderen zwölf beschriebenen 5'-NT Strukturen (inklusive der SP-Strukturen) weder der offenen noch der geschlossenen Konformation zugeordnet werden kann.

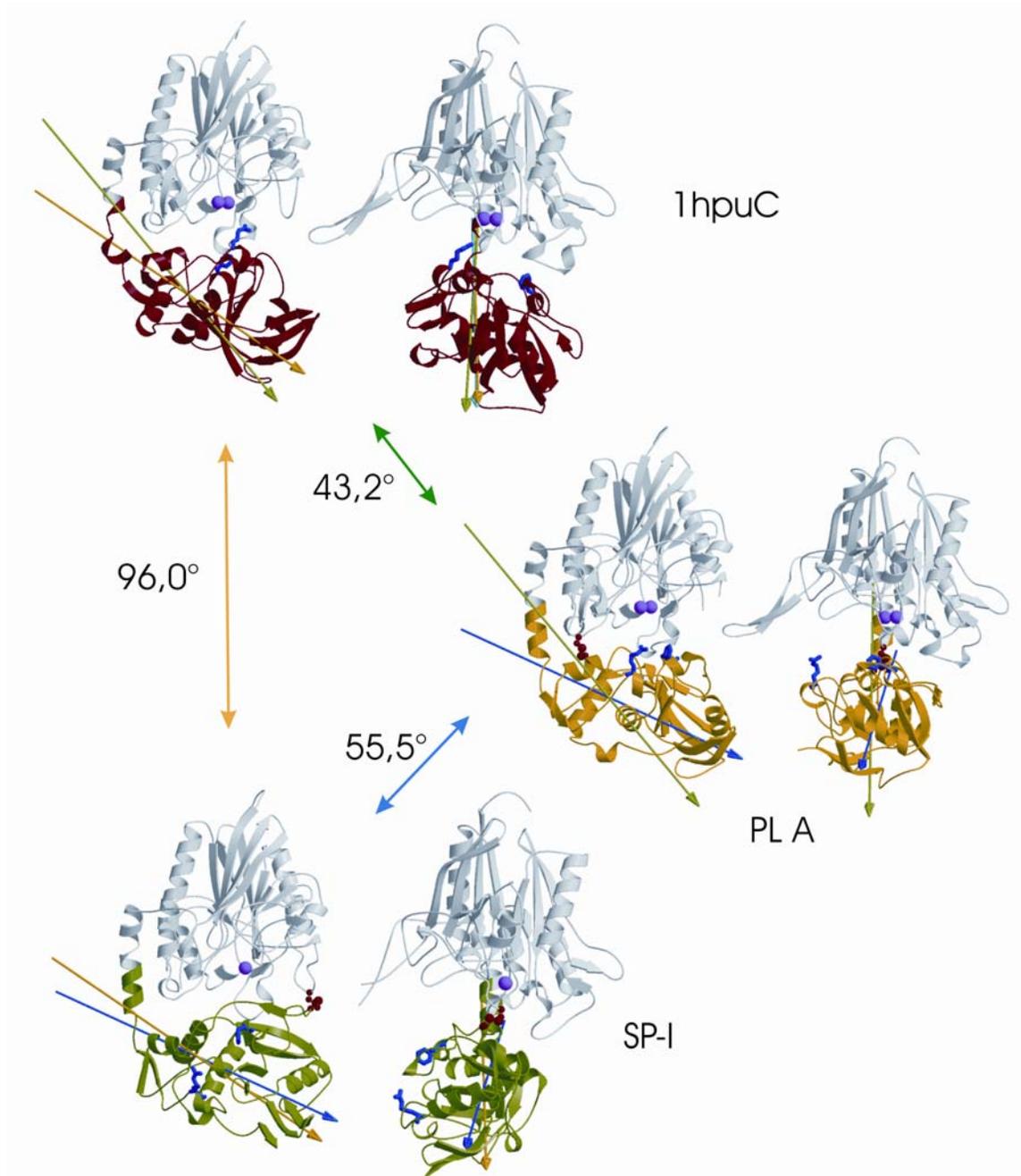


Abbildung 25. Rotationswinkel zwischen der Struktur PL Kette A und der geschlossenen Referenzstruktur 1hpu Kette C sowie der offen verbrückten Mutante SP-I. Der Vergleich der Strukturen basiert auf einer Überlagerung der N-terminalen Domänen. Um die Rotationsbewegung der farblich markierten C-terminalen Domänen gegenüber der unbewegten N-terminalen Domäne zu verfolgen, sind die Reste der Substratbindungsstelle Arg-375 und Phe-498 blau eingezeichnet. Die Rotationsachsen sind farblich den Molekül verbindenden Pfeilen zugeordnet. Die Rotationsbewegung um diese Achse ist auf den Pfeilen zwischen zwei Konformationen eingetragen.

Die Frage, ob es sich hierbei um eine natürliche Konformation handelt, die auch das Wildtyp-Protein eingehen kann, kann auf Basis der vorhandenen Daten nicht entschieden werden. Dafür spricht, dass die Rotationsachsen der intermediäre Konformation mit der der großen Rotationsbewegung übereinstimmen und dass drei neue Interdomänen-Kontakte ausgebildet werden (zwischen Ile-178, Gly-179 und Asn-180 auf der N-terminalen Domäne und Asn-497, Asn-517 und Gly-519 auf der C-terminalen Domäne), die die Konformation stabilisieren sollten, weil nur ein Kontakt gegenüber der geschlossenen Konformation (Gly-88 mit Lys-425) verloren gegangen ist. Auch wurde bei einer anderen Mutante (His-117 → Ala) eine zweite intermediäre Konformation gefunden (die Struktur wurde aufgrund der schlechten Auflösung und unvollständigen Datensammlung jedoch nicht weiter verfeinert). Auf der anderen Seite kristallisiert der Wildtyp nicht unter den Bedingungen der PL-Kristallform und eine Berechnung der  $C\alpha$ -Abstände der beiden Cysteine zeigt, dass eine weitere Rotation, um die angegebene Achse aufgrund der Disulfid-Geometrie nicht möglich wäre, was darauf hinweist, dass die gefundene Konformation nicht ausschließlich durch die eingeführte Disulfidbrücke gebildet wird (vgl. Abbildung 29, Abschnitt 4.4.1). Auch ist es unwahrscheinlich, dass sich die Rotationsachse zwischen den Molekülen PL A und 1hpu C parallel zur Disulfidbrücke ausrichtet, selbst wenn diese Abweichung nahe bei der Rotationsachse der großen Rotationsbewegung liegt. Es ist daher am wahrscheinlichsten, dass die beobachtete intermediäre Konformation zwar auf der Rotationstrajektorie des Wildtyp-Enzyms liegt, jedoch in Lösung kein Energieminimum wie die geschlossene und die offene Konformation darstellt.

Alle Bewegungen zwischen zwei Nukleotidase-Konformeren, die in dieser Arbeit beschrieben wurden oder bereits vorher beobachtet wurden (Knöfel und Sträter, 2001a), entsprechen einer Gleitbewegung, wobei sich die Reste der Domänengrenzfläche entlang der Grenzfläche bewegen. Diese Bewegung unterscheidet sich deutlich von der klassischen Schließbewegung, bei der sich die Reste der Grenzfläche senkrecht zu ihr bewegen. Diese Vorzugsrichtung ist nicht nur bei dem Übergang zwischen offener und geschlossener Form sowie bei den Domänenbewegungen von  $5-10^\circ$  sondern auch bei kleinen Bewegungen von  $1-2^\circ$  anzutreffen

### *Temperaturfaktoren*

Der Mittelwert der Temperaturfaktoren liegt bei  $22,3 \text{ \AA}^2$  (Kette A) und  $24,1 \text{ \AA}^2$  (Kette B). Anders als in den Strukturen SP-II und 1ho5 verteilen sich hier die *B*-Werte gleichmäßig über das gesamte Molekül mit vergleichbaren Mittelwerten für die einzelnen Domänen. Interessant ist hier erneut, dass die eingeführten Cystein-Reste nicht vom Mittelwert abweichen (Cys-90 =  $22,3 \text{ \AA}^2$  für Molekül A und  $20,2 \text{ \AA}^2$  für Molekül B, Cys-424 =  $21,0 \text{ \AA}^2$  und  $20,9 \text{ \AA}^2$ ), sehr wohl aber lokale Maxima in ihrer Umgebung darstellen (s. Abbildung 26). Dieselben Reste in der Vergleichsstruktur (1hpu C) haben zwar höhere *B*-Werte, stellen aber keine lokalen Maxima dar (nicht gezeigt), so dass dieser Effekt wahrscheinlich auf die Einführung der Disulfidbrücke zurückzuführen ist. Das deutet auf eine gewisse

Beweglichkeit des Dicysteins hin, wobei zu berücksichtigen ist, dass der Effekt lokal begrenzt ist und die Temperaturfaktoren nur wenig erhöht sind. Ebenso sind die *B*-Werte der Seitenketten der zwei Cysteine sehr wahrscheinlich durch die partielle Reduktion und Öffnung der Brücke erhöht. Die Elektronendichte (Abbildung 24) zeigt bereits Merkmale für eine alternative Konformation. Ohne diese Strahlenschäden wäre der *B*-Wert der Cysteine möglicherweise so groß wie der der benachbarten Reste.

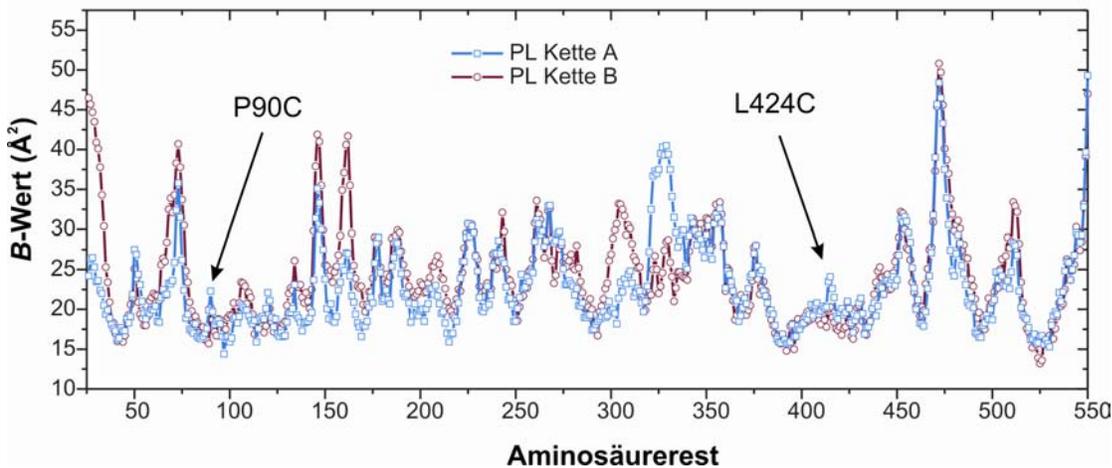


Abbildung 26. Temperaturfaktoren der beiden Monomere der PL-Struktur. Aufgetragen sind die gemittelten *B*-Werte pro Aminosäurerest gegen die Restennummer. Die Reste der Punktmutationen Pro-90 → Cys und Leu-424 → Cys sind mit Pfeilen markiert

Auffällig ist, dass der häufig ungeordnete und sehr flexible Bereich 321-332 nur in der Kette A, nicht aber in der Kette B höhere *B*-Werte als die Umgebung aufweist, wohingegen der Bereich 300-310 in der Kette A gegenüber der Kette B erhöht ist. Interessanterweise findet genau zwischen diesen beiden Bereichen ein reziproker Kristallkontakt zwischen der Kette A und der Kette B statt. Es ist allerdings nicht deutlich, warum nur der eine Kontakt (B 300-310 zu A 321-332) nicht aber der reziproke Kontakt (A 300-310 zu B 321-332) eine erhöhte Unordnung aufweist.

Die anderen Bereiche mit erhöhten Temperaturfaktoren um die Reste 65, 145 und 475 sind in allen 5'-NT Strukturen von überdurchschnittlicher Unordnung betroffen und scheinen innerhalb der „Starren-Körper“ N- und C-terminale Domäne stärker flexible Unterbereiche auszubilden, die dem Enzym inhärent sind. Der häufig flexible 180-iger Schlaufenbereich ist in beiden Molekülen der AU unauffällig, was wahrscheinlich auf die Kristallkontakte, die die Schlaufe macht (vgl. Tabelle 17), zurückzuführen ist.

### Rmsd-Werte

In Abbildung 27 sind die mittleren quadratischen Abweichungen der beiden Moleküle der PL-Struktur gegen die Zielstruktur (1hpu C) pro Aminosäurerest aufgetragen. Wie auch für die Strukturen der SP-Mutante sind die Strukturen mit nur sehr kleinen Abweichungen gut zu überlagern, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Cystein-Doppelmutation die strukturelle Integrität des Proteins nicht beeinträchtigt hat.

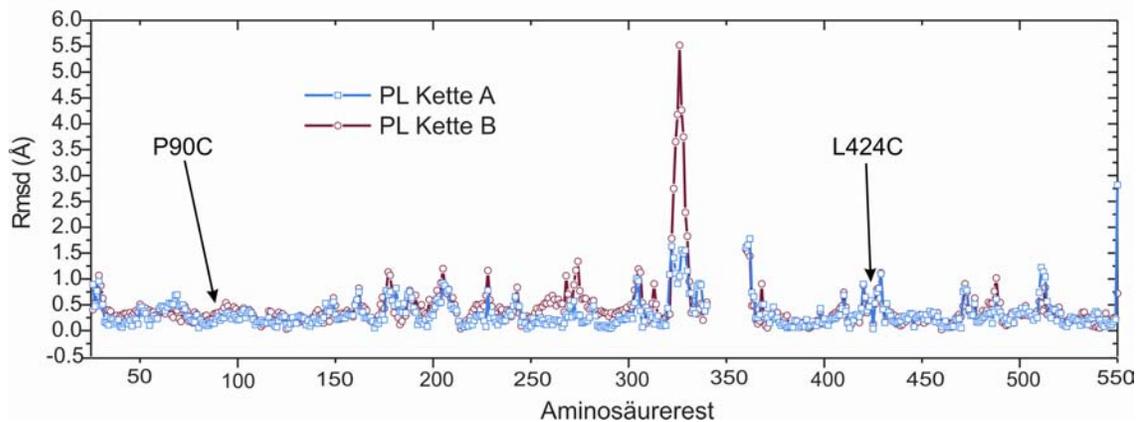


Abbildung 27. Rmsd der Struktur PL basierend auf separaten Überlagerungen der N- und C-terminalen Domänen mit der Zielstruktur 1hpu Kette C.

Die stärkste Abweichung gegenüber der Zielstruktur findet sich im Schlaufenbereich 321-332, der vor allem in der Kette B um bis zu 5,5 Å von der 1hpu C Struktur abweicht. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, bildet dieser Bereich eine intensive Kontaktfläche zu einem symmetrieverwandten Nachbarmolekül aus (vgl. Tabelle 17). Diese Bindungen stabilisieren den Schlaufenbereich in einer von der Zielstruktur abweichenden Konformation. Die hier gefundene Diskrepanz zwischen den beiden Ketten korrespondiert mit den unterschiedlichen Temperaturfaktoren für die beiden Ketten in diesem Bereich.

Interessant ist, dass hier die Mutation des Pro-90 zu Cys-90 keine erhöhten Abweichungen im Hauptkettenverlauf zur Folge hat, wohl aber der Bereich um das Cys-424, der in beiden Ketten kleinere Schwankungen aufweist. Diese Schwankungen sind auf die Reorganisation der Wasserstoffbrücken zwischen der N- und C-terminalen Domäne zurückzuführen, die in erster Linie eine Folge der gegenüber der Zielstruktur unterschiedlichen Rotationsstellung der Domänen ist. Wie für die SP-Strukturen gilt auch hier, dass die Abweichungen im Vergleich zu anderen experimentellen Strukturen mit eingeführten Disulfidbrücken sehr klein sind und geschlussfolgert werden kann, dass durch den Einbau der Cysteine nur die Konformation der Domänen beeinträchtigt ist, die Proteinstruktur als solche aber nicht beeinflusst wurde.

### *Metall-Koordinierung*

Wie auch bei den SP-Strukturen eignet sich auch hier ein Vergleich des aktiven Zentrums mit dem der Zielstruktur, um die Struktur des Proteins auf schwerwiegende Verzerrungen durch den Einbau der Cysteinreste zu überprüfen. Im Kristallisationsansatz wurde anders als bei den SP-Strukturen  $Mn^{2+}$  in hoher Konzentration verwendet, so dass beide Metallbindestellen von Metallionen besetzt sind und die Metallkoordinierung hier direkt vergleichbar ist mit der Struktur 1hpu (in der ebenfalls  $Mn^{2+}$  zugegeben wurde). Eine Überlagerung des PL A Moleküls (PL B ist dazu analog, Daten nicht gezeigt) mit der Zielstruktur 1hpu C zeigt, dass in dem mutierten Protein dieselbe oktaedrische Koordinationsgeometrie vorliegt wie im Wildtyp-Protein (Abbildung 28). Tabelle 16 vergleicht die Abstände und Winkel der Metallliganden in den beiden Strukturen miteinander.

Alle koordinierenden Reste überlagern exakt, wenngleich die Metallionen leicht verschoben sind. Ein interessanter Unterschied zwischen den Strukturen ist das Bikarbonat, das hier im aktiven Zentrum gefunden wurde, nicht aber in der Struktur 1hpu C, wo diese Position von zwei Wassermolekülen und einem Phosphatmolekül (terminale Phosphatgruppe des Inhibitors AMPCP) besetzt ist. Das Sauerstoffatom O1 des Bikarbonat-Ions überbrückt dabei beide Metallionen bidentat, das Sauerstoffatom O2 bindet monodentat an Mn1 und O3 koordiniert das zweite Metallion. Nicht verwunderlich, dass sich hier auch die größten Unterschiede beim Vergleich dieser Gruppen mit dem Bikarbonat-Ion ergeben: So weicht der Abstand der Bindung des O3-Atoms des Bikarbonat-Ions um 0,3 Å von der analogen Bindung mit der Phosphatgruppe ab und der größte Winkelunterschied mit 20° ist der zwischen der Gruppe CO3 O1 – Mn2 – CO3 O3 und der analogen Gruppe im Molekül 1hpu C mit 20°.

Tabelle 16. Vergleich der Metallkoordinierung der Strukturen PL A und 1hp. In Klammern jeweils die Werte der Struktur 1hp.

Koordinationsabstände (Å)						
Mn1	Asp-41O $\delta$ 2	His-43N $\epsilon$ 2	Asp-84O $\delta$ 2	Gln-254O $\epsilon$ 1	CO3 O1 (W1)	CO3 O2 (W2)
	2,15 (2,11)	2,26 (2,25)	2,28 (2,35)	2,27 (2,25)	2,22 (2,15)	2,76 (2,46)
Mn2	Asp-84O $\delta$ 2	Asn-116O $\delta$ 1	His-217N $\epsilon$ 2	His-252N $\delta$ 1	CO3 O1 (W1)	CO3 O3 (P $\beta$ O $_4$ <sup>3-</sup> -O1)
	2,43 (2,31)	2,18 (2,18)	2,12 (2,26)	2,19 (2,28)	2,08 (2,26)	2,34 (2,23)
Koordinationswinkel (°)						
D84-Mn1-Q254	175,4 (169,5)		H217-Mn2-N116		90,0 (83,8)	
D41-Mn1-H43	101,0 (110,6)		H217-Mn2-CO3 O1 (W1)		96,0 (111,6)	
H43-Mn1-CO3 O1 (W1)	157,3 (154,7)		N116-Mn2-CO3 O3 (O1)		87,9 (86,1)	
D84-Mn1-D41	87,6 (93,1)		CO3 O1 (W1)-Mn2-CO3 O3 (O1)		65,2 (78,7)	
D84-Mn1-H43	95,4 (93,8)		CO3 O3 (O1)-Mn2-H217		177,6 (169,1)	
D84-Mn1-CO3 O1	80,8 (81,6)		CO3 O3 (O1)-Mn2-H252		94,7 (92,0)	
H43-Mn1-Q254	87,5 (87,8)		CO3 O1 (W1)-Mn2-N116		153,0 (164,6)	
CO3 O3 (W1)-Mn1-Q254	95,2 (92,2)		CO3 O1 (W1)-Mn2-H252		96,0 (88,4)	
D41-Mn1-Q254	95,2 (95,6)		N116-Mn2-H252		88,4 (94,6)	
D41-Mn1-CO3 O3 (W1)	101,1 (94,5)		H217-Mn2-H252		86,4 (85,1)	

Ein Bikarbonation wurde auch schon früher in einer Wildtyp-Struktur (1hp1) gefunden. Da es offensichtlich leicht an das aktive Zentrum bindet und dortige Wassermoleküle verdrängt, wurden kinetische Tests mit Bikarbonat durchgeführt, um eventuellen Einflüssen nachzugehen. Die kinetische Aktivität des Wildtyp-Enzyms ist aber durch Bikarbonat nicht zu beeinflussen (Daten nicht gezeigt), so dass davon auszugehen ist, dass unter physiologischen Bedingungen Wassermoleküle die Metallionen koordinieren. Dafür spricht auch, dass die Winkel, die das Sauerstoffatom O3 des Bikarbonat-Ions bildet zum Teil erheblich von den optimalen oktaedrischen Winkeln von 90° bzw. 180° abweichen (vgl. Tabelle 16).

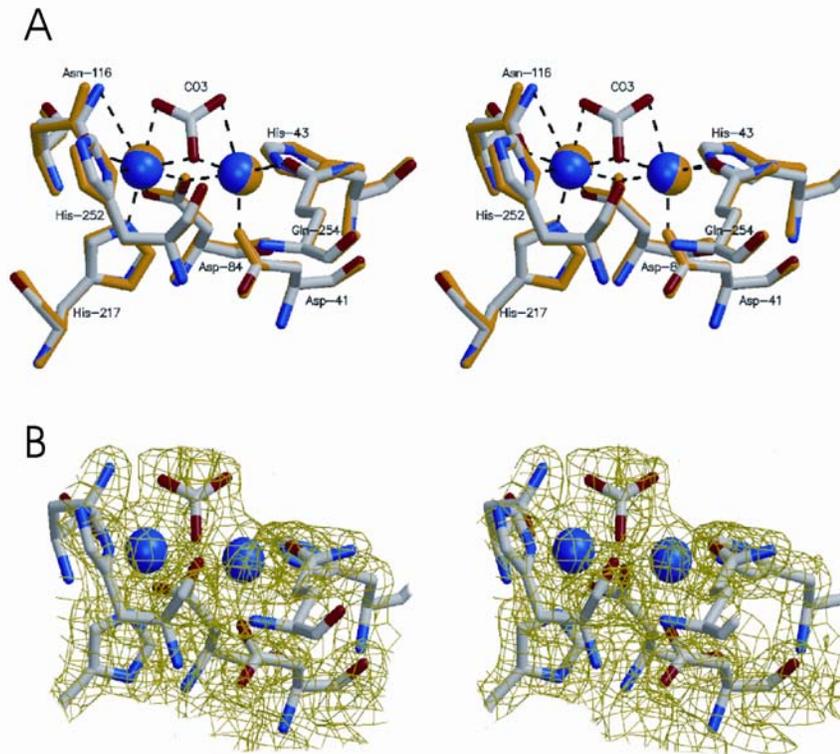


Abbildung 28. Vergleich der Metallkoordination zwischen der Struktur PL Kette A und deren Zielstruktur 1hpu Kette C. Die Moleküle wurden N-terminal überlagert. A. Die Vergleichsstruktur 1hpu C ist in gold gezeichnet, die Stickstoffatome der PL-Struktur sind blau, die Sauerstoffatome rot und die Kohlenstoffatome in grau gezeichnet. B. Ansicht wie in A, jedoch ohne Überlagerung und mit Elektronendichte, konturiert bei  $\sigma$  1,5.

#### 4.3.4 Kristallkontakte

Anders als bei der Struktur SP-II weisen in der Struktur PL weder die beiden Moleküle in der AU noch die beiden Domänen eines Moleküls bezüglich der Rotation, der *B*-Faktoren-Verteilung oder der mittleren quadratischen Abweichungen in einer Überlagerung auf die geschlossene Konformation 1hpu Kette C voneinander ab. Dieses völlig unterschiedliche Verhalten im Kristall kann wesentlich auf die Kristallpackung zurückgeführt werden. Tabelle 17 listet die Kontakte der asymmetrischen Einheit zu symmetrieverwandten Molekülen oder zu der Nachbarkette analog zu den Strukturbesprechungen SP-I und SP-II auf. Im Gegensatz zu der Struktur SP-II sind bei der Struktur PL die beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit ähnlich gepackt. In beiden Ketten gibt es zwei große Kontaktflächen zu benachbarten Symmetriemolekülen (Anzahl Kontakte Kette A 106, 64; Kette B

106, 92) und jeweils 5 kleine Kontaktflächen zwischen 7 und 28 Kontakten. Beide Moleküle haben eine ähnlich große Anzahl an Kontakten mit 283 Kontakten der Kette A und 292 Kontakten der Kette B. Auffällig ist auch, dass in dieser Struktur Kontaktflächen bestehen, die die beiden Domänen überbrücken, was zusätzliche Stabilität bringen sollte und zu einer gleichmäßigeren *B*-Werte Verteilung führt. Auch sind die Kontakte zwischen der N- und der C-terminalen Domäne gleichmäßig unter Berücksichtigung der jeweiligen Domänengröße verteilt.

Interessant ist, dass auch die domänenverbindende Helix an den Kristallkontakten beteiligt ist. Die Konformation dieser Helix konnte als ein diagnostisches Kriterium für die Proteinkonformation identifiziert werden (Knöfel und Sträter, 2001a), wobei eine offene Helix (Knick bei den Resten 365 und 366, vgl. Abbildung 25 A) einherging mit einer geschlossenen Konformation und eine durchgehende Helix mit einer offenen Konformation assoziiert war. Es wäre interessant zu sehen, in welcher Konformation die Helix bei einer intermediären Proteinkonformation ist. Durch die Kristallkontakte, die die Helix in der PL-Struktur ausbildet ist diese Analyse jedoch schwierig, weil in der geschlossenen Struktur 1hpu C die Helix ebenfalls durchgängig ist. Insgesamt stützen aber folgende Befunde die Annahme, dass die intermediäre Struktur PL eher zu den offenen Strukturen gezählt werden muss: Die Helix ist durchgehend, die Anwesenheit eines Bikarbonation wurde bislang auch nur in offenen Konformationen beobachtet und die PL Struktur ist so weit geöffnet, wie es durch die Verbrückung maximal möglich erscheint, wenn die  $C\alpha$ - $C\alpha$  Abstände der beiden Cysteine gegen den Drehwinkel der Domänen betrachtet werden (vgl. Abbildung 29).

Tabelle 17. Kristallkontakte in der Struktur PL.

Symmetriemolekül	Kontaktreste	Anzahl
Kontakte der A-Kette		
1. Bc 1 1 -1 0	Tyr-26, Gln-204, Gln-205, Asn-304	10
2. Bn 7 0 0 0	Thr-31, Glu-69, Gly-272, Thr-273, Pro-274, Glu-301, Arg-303, Glu-306, Lys-308, Met-309, Asn-311, Val-323, Thr-324, Trp-325, Glu-326, Asp-327, Lys-329, Leu-334	106
3. Bn/c,h 5 0 -1 0	Asp-96, Thr-124, Arg-127, Gln-128, Lys-131, Glu-182, Thr-185, Asp-186, Lys-355, Gln-359, Asp-395, Arg-396, Thr-397, Gly-398, Tyr-420, Tyr-435, Arg-492	69
4. Ac 5 1 -1 0	Tyr-143, Gly-148, Arg-150, Arg-190, Glu-195, Leu-198, Glu-202, Gln-205, Thr-206, Glu-207	25
5. Ac/n 7 0 0 0	Glu-326, Glu-414, Ala-415, Gly-416	20
6. Bn	Asn-368, Asp-417, Ser-534, Pro-535	7
7. An 5 1 0 0	Asp-437, Thr-439, Asp-486, Pro-487, Ala-488, Thr-490, Arg-492, Phe-520, Glu-524, Lys-527, Gln-531, Lys-532	26
Summe Kontakte A-Kette: 283; 69 beteiligte Reste, davon 42 N- und 27 C-terminal		
Kontakte der B-Kette		
1. Ac	Tyr-26, Gln-204, Gln-205, Ala-242	12
2. An/c 5 0 0 0	Asp-96, Thr-124, Arg-127, Gln-128, Lys-131, Gln-144, Glu-182, Thr-185, Asp-186, Lys-355, Gln-359, Asp-395, Arg-396, Thr-397, Tyr-420, Tyr-435, Arg-492, Phe-520, Glu-524, Lys-527, Gln-531, Lys-532	92
3. Bc 5 0 -1 0	Tyr-143, Gly-148, Glu-149, Arg-150, Arg-190, Glu-195, Leu-198, Glu-202, Gln-205	28
4. An 7 0 0 0	Gln-266, Val-270, Pro-274, Glu-301, Arg-303, Asn-304, Glu-306, Lys-308, Val-310, Lys-321, Thr-324, Trp-325, Glu-326, Glu-326, Asp-327, Glu-331, Val-333, Tyr-335, Pro-337	106
5. Bc 7 -1 1 0	Glu-326, Asp-327, Gly-369, Arg-370, Glu-414	19
6. An 1 -1 1 0	Ala-415, Gly-416, Asp-417, Ser-543, Pro-535	10
7. Bn 5 0 0 0	Asp-437, Thr-439, Lys-441, Asp-486, Pro-487, Ala-488, Thr-490, Gly-514,	28
Summe Kontakte B-Kette: 292, 68 beteiligte Reste, davon 40 N- und 28 C-terminal		

Die PL-Struktur ist von allen bislang beschriebenen 5'-NT Strukturen diejenige, mit der höchsten Anzahl an Kristallkontakten. Dies macht sich insbesondere in der C-terminalen Domäne bemerkbar, bei der mit Abstand am meisten Reste (27 bzw. 28) gegenüber den

anderen Strukturen an Kristallkontakten beteiligt sind (Tabelle 18). Daraus resultieren sehr niedrige B-Werte (nur in der Struktur 1hp1 bzw. 1ush sind die durchschnittlichen B-Werte niedriger) auch gegenüber den höher aufgelösten Strukturen. Die Struktur PL A ist des Weiteren die einzige Struktur bei der die durchschnittlichen B-Werte der C-terminalen Domäne ebenso hoch sind wie die der N-terminalen Domäne, bei allen anderen Strukturen sind die Werte in der C-terminalen Domäne durchgehend höher.

Tabelle 18 fasst die Kristallkontakte und durchschnittlichen B-Faktoren der 5'-NT Strukturen zusammen. Die Ergebnisse schwächen das Argument, dass die gefundene intermediäre Konformation auch ein energetisch günstiger Zustand in Lösung ist etwas ab, da die Konformation hier durch auffällig intensive Kristallkontakte gestützt wird.

Tabelle 18. Vergleich der Kristallkontaktanzahl in allen 5'-NT – Strukturen. In Klammern jeweils die Anzahl der beteiligten Reste.

Struktur	Kontakte insgesamt	N-terminale Domäne	C-terminale Domäne	∅ B-Faktor (N-dom; C-dom)
PL Kette A	283 (69)	(42)	(27)	22,8 (22,8; 22,8)
PL Kette B	292 (68)	(40)	(28)	24,1 (24,7; 23,2)
SP-I	240 (62)	(38)	(24)	30,0 (30,6; 29,1)
1hp1	155 (52)	(33)	(19)	14,5 (13,7; 15,8)
SP-II Kette A	257 (75)	(57)	(18)	35,3 (26,7; 49,8)
SP-II Kette B	163 (48)	(38)	(10)	43,2 (31,2; 63,6)
2ush Kette A	112 (35)	(21)	(14)	38,6 (35,3; 44,9)
2ush Kette B	108 (31)	(17)	(14)	40,6 (37,7; 45,7)
1ho5 Kette A	269 (50)	(39)	(11)	41,1 (27,0; 64,9)
1ho5 Kette B	219 (39)	(29)	(10)	49,3 (40,9; 63,2)
1hpu Kette A	76 (25)	(13)	(12)	35,2 (33,4; 38,2)
1hpu Kette B	191 (41)	(28)	(13)	31,9 (30,6; 34,3)
1hpu Kette C	204 (49)	(37)	(12)	32,2 (29,1; 37,5)
1hpu Kette D	174 (43)	(33)	(10)	31,7 (31,0; 32,9)

## 4.4 Domänenquervernetzung und Domänen-Flexibilität

### 4.4.1 Theoretische Flexibilität

Die intermediäre Konformation der PL-Mutante sowie deren hohe enzymatische Aktivität war unerwartet und kann nicht ohne weiteres erklärt werden. Die Strukturanalyse der SP-Mutante hat bereits ergeben, dass trotz Einbau einer Disulfidbrücke und daraus resultierender Domänen-quervernetzung es noch eine erhebliche Domänenflexibilität gibt, die sich in Rotationsunterschieden bis zu  $11,5^\circ$  zwischen der SP-I Kristallstruktur und dem Monomer B der SP-II Struktur widerspiegelt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die PL-Mutante eine ähnliche Flexibilität hat auch wenn sich das kristallographisch aufgrund der dichten Packung (vgl. Abschnitt 4.3.4) nicht bemerkbar macht. Da die Cys-90, Cys-424 Disulfidbindung in dem PL-Enzym auf der strukturellen Basis der am meisten geschlossenen Konformation konzipiert wurde, ist es naheliegend anzunehmen, dass das Enzym auch tatsächlich in dieser Konformation existieren kann. Um abschätzen zu können, ob auch die Konformationen, die auf der Trajektorie zwischen dieser am meisten geschlossenen Konformation und der experimentell gefundenen intermediären Konformation theoretisch möglich sind, ohne dass die Disulfidbindung aufgebrochen werden muss, wurden die  $C\alpha$ - $C\alpha$  Abstände theoretischer Zwischenkonformationen berechnet (Abbildung 29).

Der Abstand der  $C\alpha$ -Atome der beiden Cysteine ist ein anerkannt entscheidender (und intuitiv einleuchtender) Parameter zur Bildung von Disulfidbrücke (Petersen et al., 1999; Srinivasan et al., 1990; Thornton, 1981). Schwieriger ist es, realistische Zwischenkonformationen zu berechnen. Hier wurden intermediäre Konformationen gewählt, die von dem Molmorph-Server berechnet wurden (Echols et al., 2003; Gerstein, 1998). Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, da die Analyse der Domänenbewegung der 5'-NT mit dem Morphserver übereinkommt mit den hier verwendeten Berechnungen des Programms DynDom. Der Morph-Server berechnet nach Nutzervorgaben intermediäre Konformationen zwischen zwei vorgegebenen Strukturen (hier: 1hpu C und 1hp1), wobei jede intermediäre Konformation energetisch optimiert ist. In Abbildung 29 sind nun die  $C\alpha$ - $C\alpha$  Abstände dieser der für den Einbau der Disulfidbrücke ausgewählten Aminosäurereste (Ser-228 und Pro-513 für die offene Konformation, Pro-90, Leu-424 für die geschlossene Konformation) gegen den Rotationswinkel aufgetragen. Zum Vergleich sind auch die experimentell gefundenen Abstände sowohl der Wildtyp- 5'-NT Strukturen wie auch der disulfidverbrückten Strukturen aufgetragen.

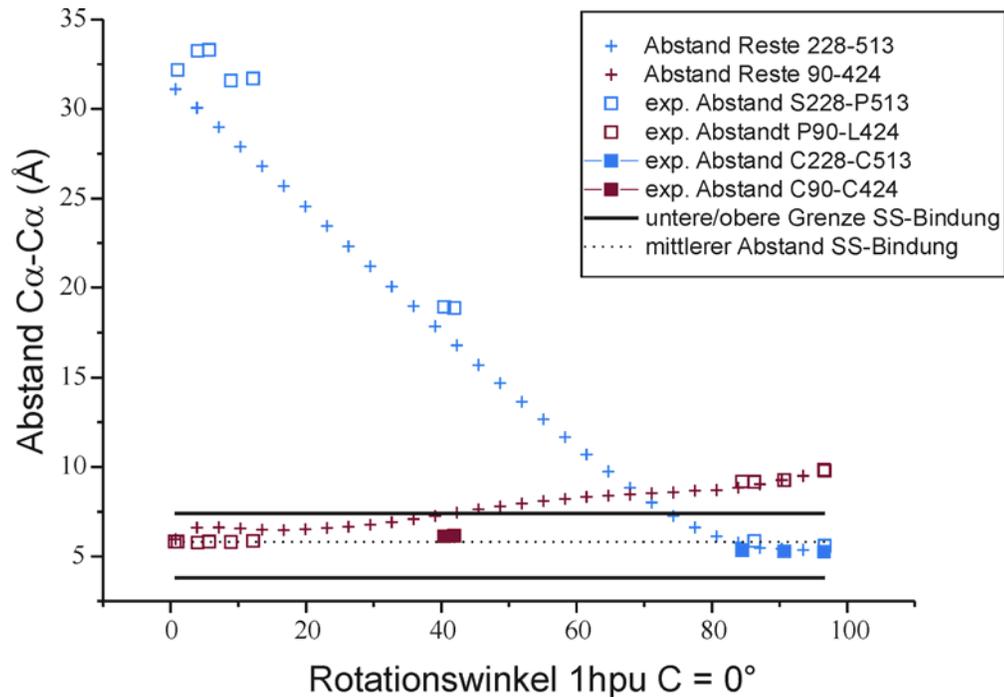


Abbildung 29. Berechnung des theoretischen  $C\alpha$ -Abstands der Cystein-Punktmutationen nach einem Morph-Modell. Die theoretischen Abstände sind als Kreuze dargestellt. Die experimentellen Abstände der Wildtyp-Strukturen (1hp1, 2ush, 1ho5, 1hpv) sind als offene Quadrate in das Diagramm eingetragen, die Abstände der disulfidverbrückten Enzymvarianten als geschlossene Quadrate. Rot sind die Abstände der Reste 90, 424 und blau die Abstände der Reste 228, 513.

Dieser Vergleich zeigt, dass die experimentellen Werte sehr gut mit den theoretischen Vorhersagen übereinstimmen. Aus der Grafik wird deutlich, dass sich die experimentelle PL Konformation die am weitest möglichen geöffnete Konformation mit Disulfidbindung einnimmt. Der gesamte Rotationsbereich bis zur geschlossenen Konformation liegt innerhalb des erlaubten  $C\alpha-C\alpha$  Abstands und kann theoretisch eingenommen werden. Die hohe kinetische Aktivität des PL-Enzyms beweist, dass dies auch geschieht. Auf der anderen Seite ist die SP-Mutante sehr viel stärker eingeschränkt in ihrer Rotationsfreiheit. Der experimentell beobachtete Bereich der Flexibilität kommt überein mit dem optimalen theoretischen Bereich, wenngleich eine weitere Drehung um bis zu  $22^\circ$  möglich erscheint, eine vollständige Schließbewegung ist mit intakter Disulfidbrücke jedoch unmöglich. Die unterschiedlichen Rotationsfreiheiten der beiden Protein-Mutanten sind auf die jeweilige Lage der Disulfidbrücke zurückzuführen. In dem PL-Enzym liegt die Disulfidbrücke parallel zur Rotationsachse und in geringem Abstand zur Achse, so dass eine große Rotationsbewegung mit nur geringer geometrischer Verzerrung des Dicysteins bewirkt werden

kann. In dem SP-Enzym hingegen liegt die Disulfidbrücke weit entfernt von einer senkrecht zu ihr stehenden Rotationsachse, so dass bereits kleine Rotationsbewegungen zu großen Veränderungen der Disulfid-Geometrie führen.

Diese Berechnungen erklären nicht nur die unerwartet hohe enzymatische Aktivität der PL-Mutante, sondern zeigen auch, dass erwünschte Bewegungsbeschränkungen nicht immer über eine Disulfidverbrückung realisiert werden können, da diese mögliche Bewegungsfreiheiten ausnutzen.

#### 4.4.2 TLS-Analyse

Die Analyse der Rotationsbewegung zeigte, dass auch die disulfidverbrückten Proteine in Lösung eine hohe Beweglichkeit haben. Dennoch zeigen die kinetischen Messungen, dass die Beweglichkeit gegenüber dem Wildtyp-Protein deutlich eingeschränkt ist. Der Vergleich der Temperaturfaktoren zwischen Wildtyp-Strukturen und den SP-Strukturen hat gezeigt, dass die Einführung der Disulfidbrücke die Beweglichkeit im Kristall nicht einschränkt (vgl. Abschnitt 4.2.1.3 und 4.2.2.3). Es ist dennoch aufschlussreich, die Bewegung im Kristall zu analysieren, um so Voraussagen über mögliche Bewegungen machen zu können. In dieser Hinsicht ist besonders das Molekül B der Struktur SP-II interessant, weil hier die C-terminale Domäne nur von wenigen Kristallkontakten in ihrer Bewegung beschränkt ist (s. Abschnitt 4.2.2.4). Eine hohe Beweglichkeit der C-terminalen Domäne ist hier durch die durchschnittlich sehr hohen Temperaturfaktoren anzunehmen.

Die Bewegung der Atome im Kristall  $U$  setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Formel 9 
$$U = U_{Kristall} + U_{TLS} + U_{innerhalb} + U_{Atom}$$

wobei  $U_{Kristall}$  einen allgemeinen anisotropen Skalierungsfaktor entlang der Kristall-Achsen darstellt,  $U_{TLS}$  die Bewegung von definierten „starrten Körpern“ ist,  $U_{innerhalb}$  weitere kollektive intramolekulare Bewegungen (z.B. Librationen bestimmter Torsionswinkel) beinhaltet und  $U_{Atom}$  Anisotropie einzelner Atome beschreibt, die nur bei sehr hoher Auflösung kristallographisch zu berechnen ist.

Für die Beschreibung einer Domänenrotation eignet sich die TLS-Analyse in besonderer Weise, weil hier die Domänen als starre Körper betrachtet werden können und so direkte Hinweise auf unterschiedliche Bewegungen der Domänen erhalten werden. Ein weiterer Vorteil der TLS-Analyse ist, dass hier keine hohe Auflösung nötig ist, so dass alle Strukturen miteinander verglichen werden können.

Dafür wurde mit allen drei Kristallstrukturen (SP-I, SP-II, PL) eine TLS-Verfeinerung mit dem Programm Refmac (Murshudov et al., 1997) durchgeführt und mit dem Programm TLSANL (Howlin et al., 1993) analysiert. Die Verfeinerung erbrachte Translations-, Librations- und Schrauben-Tensoren, die die Bewegung der Domänen (Reste 26-340 und 360-549) im Kristall beschreiben. Von besonderem Interesse ist hier der Librations-Tensor, der eine Rotationsbewegung um drei senkrecht zueinander stehende Achsen beschreibt.

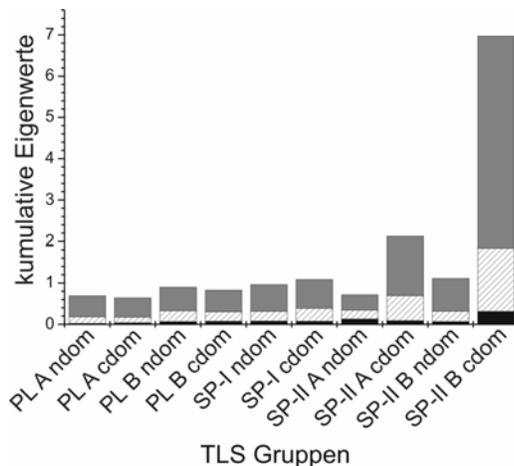


Abbildung 30. Kumulative Eigenwerte aus der TLS Verfeinerung. Die Eigenwerte sind für jede Domäne kumulativ dargestellt, wobei der kleinste Wert in schwarz und der größte Wert in grau und der jeweils mittlere Wert schraffiert abgebildet wurde.

In Abbildung 30 sind die Eigenwerte der Librations-Tensoren der N- und C-terminalen Domäne jedes Moleküls der asymmetrischen Einheit der 3 Strukturen wiedergegeben. Hierbei wurden die Eigenwerte jeder Achse kumulativ zusammengefasst. Es fällt auf, dass die Librations-Tensoren der N- und C-terminalen Domäne aller Moleküle der Strukturen PL und SP-I hinsichtlich der relativen Größe ihrer Eigenvektoren sehr ähnlich sind. Es konnte jedoch lediglich für die Kette A der PL-Struktur eine Übereinstimmung der Richtung der Tensoren der N- und der C-terminalen Domänen (maximale Abweichung 23°) festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass hier die Tensoren eine Starre-Körper-Bewegung des gesamten Moleküls beschreiben mit nur schwachem Beitrag der einzelnen Domänen. Bei den Molekülen PL B und SP-I nehmen die Librations-Eigenvektoren der beiden Domänen um mehr als 50° unterschiedliche Richtungen ein, so dass hier von unabhängigen Bewegungen der einzelnen Domänen ausgegangen werden kann. Generell ist die Librationskomponente bei diesen drei Molekülen jedoch sehr klein.

Im Gegensatz dazu ist die Librationsbewegung der C-terminalen Domäne des Moleküls B besonders groß und zudem stark anisotrop, d. h. es herrscht vorwiegend eine Rotations-

beweglichkeit um eine Achse vor. Wie im Abschnitt 4.2.2 ausführlich dargelegt, ist dies auf die wenigen Kristallkontakte dieser Domäne zurückzuführen, von denen die meisten zu einer anderen ebenfalls beweglichen C-terminalen Domäne führen.

Die TLS-Analyse ist also in der Lage, die unterschiedlichen Bewegungsfreiheiten der Domänen im Kristall aufzudecken. Es stellt sich die Frage, inwieweit die beobachtete Anisotropie auch die tatsächliche Bewegung der Domänen in Lösung widerspiegelt.

Wenn die  $C\alpha$ -Atome des Moleküls als Ellipsoide gezeichnet werden, die sowohl die Temperaturfaktoren durch ihre Farbe als auch die aus den TLS-Tensoren des starren Körpers berechnete Beweglichkeit des einzelnen Atoms wiedergeben, wird deutlich, dass die C-terminale Domäne eine viel stärkere Beweglichkeit aufweist als die N-terminale Domäne (Abbildung 31 A). Die Temperaturfaktoren der C-terminalen Domäne haben einen Durchschnittswert von  $63,6 \text{ \AA}^2$  und die der N-terminalen Domäne lediglich von  $31,2 \text{ \AA}^2$ . Da auch die gewöhnlich sehr starren Sekundärstrukturelemente in der C-terminalen Domäne hohe *B*-Werten aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass die statische Unordnung, die im Kristall beobachtet wird, auch eine tatsächliche Bewegung des Proteins reflektiert. Dies kann überprüft werden, indem die Rotationsachsen zwischen den Molekülen mit der Richtung des Librations-Tensors verglichen werden (Abbildung 31 B und C). Die Achse, die der Hauptlibrationskomponente entspricht ( $5,13^\circ$ ) läuft durch die domänenverbindende Helix entlang der Domänen-Grenzfläche und schneidet schließlich einen Punkt, der sehr dicht an der Disulfidbrücke liegt. Diese Achse verläuft demnach sehr ähnlich der Rotationsachse, die den Übergang zwischen den Molekülen SP-II A und SP-II B und entspricht exakt der Rotationsachse zwischen den Molekülen SP-II B und SP-I. Darüber hinaus liegt diese Achse ebenso wie die Achse, die der zweitgrößten Librationskomponente entspricht, genau in der Ebene aller anderen Zwischendomänen-Rotationsachsen (vgl. Abschnitt 1.5.3).

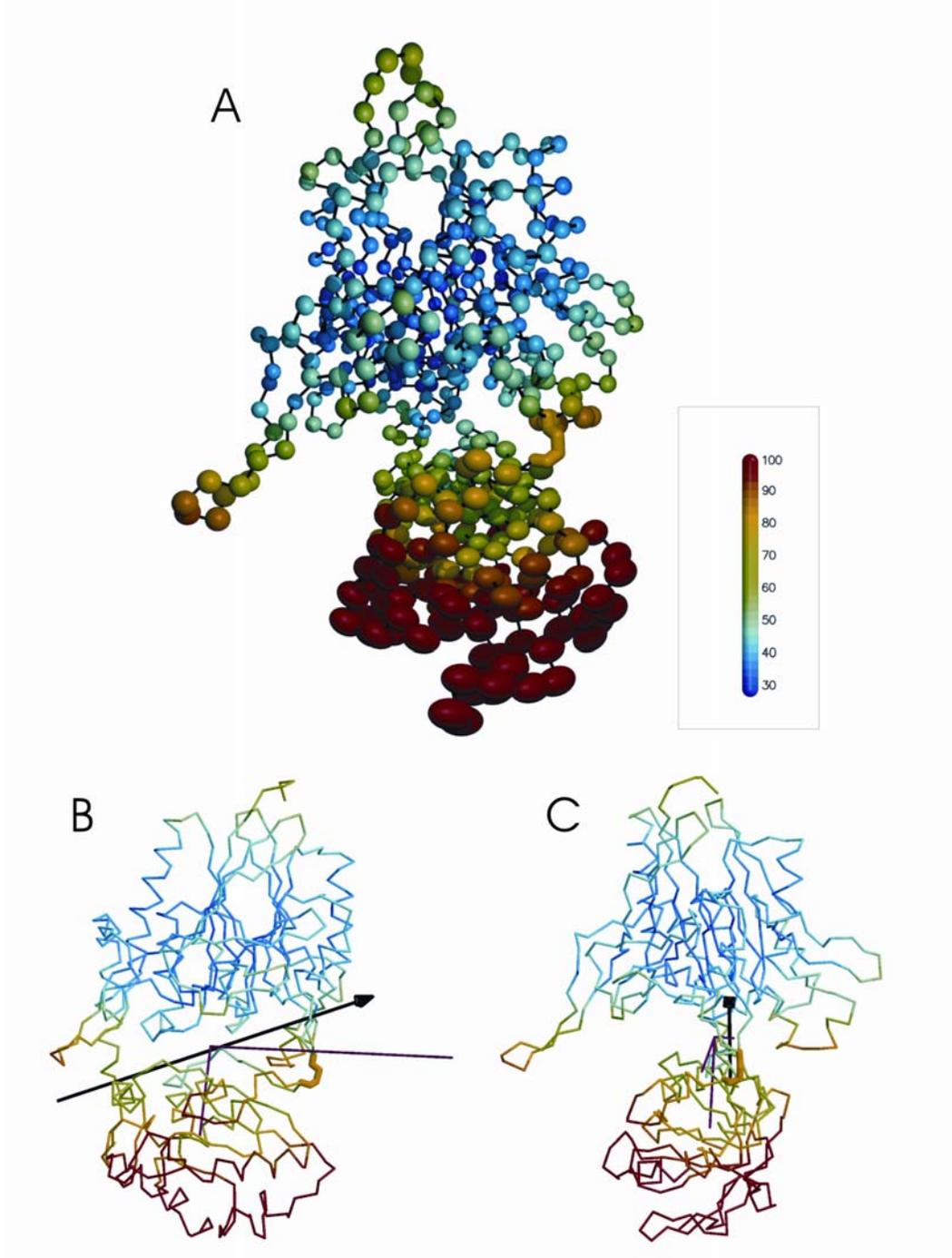


Abbildung 31. Ellipsen-Darstellung der Librations-Komponente in der SP-II TLS- Verfeinerung (A). Vergleich der Librationsachsen mit der Rotationsachse zwischen den Molekülen SP-II A und B. (B). Abbildung C entspricht der Abbildung B um 90° gedreht. Die Proteinreste sind nach ihren Temperaturfaktoren eingefärbt, wobei die Farbskalierung im Farbbalken dekodiert ist.

Die TLS-Analyse erweist sich also als ein sehr geeignetes Instrument, um anhand einer anisotropen statischen Unordnung im Kristall Aussagen über tatsächliche und biologisch relevante Bewegungen in Lösung zu treffen. Eine ähnlich gute Übereinstimmung zwischen Tensoren aus einer TLS-Verfeinerung und der berechneten Bewegungsachse zweier experimenteller Strukturen wurde zuvor auch für die Alkoholdehydrogenase beobachtet (Winn et al., 2003).

#### 4.5 Geometrie der Disulfidbrücken

Die Positionen zur genetischen Modifizierung, um die beiden Domänen mit einem Disulfid zu verbrücken, wurden mit dem Programm SSBOND bestimmt (Hazes und Dijkstra, 1988). Hierbei dienten die 5'-NT-Strukturen der am weitesten geöffneten Wildtyp-Konformation (1hp1) und der am meisten geschlossenen Wildtyp-Konformation (1hpu Kette C) als Eingabe-Modell für die Berechnung. SSBOND berechnet für das „protein engineering“ geeignete Cystin-Brücken auf Basis des Abstands der beiden C $\beta$ -Atome der zu Cystein mutierten Aminosäurereste und des Energiegehalts der möglichen Disulfid-Konformation.

Tabelle 19. Parameter der Disulfidbrücken. Siehe Abbildung 32 für die Definitionen der Disulfidparameter. Der Energiegehalt wurde nach (Hazes und Dijkstra, 1988) berechnet. Torsionswinkel sind in Grad angegeben, Abstände in Å.

		$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi'_2$	$\chi'_1$	C $\alpha$ - C $\alpha$	C $\beta$ - C $\beta$	Energie (kcal/mol)
1hpu C	1.	-44,3	-136,5	90,9	95,8	42,7	5,83	3,95	3.10
	2.	-147,2	120,4	-109,6	157,3	41,9	5,83	3,95	5.49
	3.	-145,0	65,9	112,3	-155,7	156,7	5,83	3,95	5.55
PL A		-103,6	169,2	-78,1	-126,0	-60,3	6,11	3,60	11,69
PL B		-91,9	177,5	-94,0	-120,6	-62,1	6,16	3,59	8,91
1hp1		-73,35	66,3	127,6	-83,5	-146,1	5,60	4,39	5,47
SP-I		-65,3	65,4	108,2	-80,4	-149,8	5,27	4,24	4,69
SP-II A		-67,4	178,6	-96,2	74,5	-158,1	5,29	4,22	9,77
SP-II B		-70,4	174,3	-94,7	78,2	-166,4	5,35	4,13	4,04

Im Folgenden wird zusammenhängend das Ergebnis aller drei experimentell gefundenen Disulfidbrücken in Hinsicht auf deren Flexibilität und deren Zielkonformationen diskutiert. Die Parameter, die die Geometrie der eingeführten Disulfidbrücken beschreiben, zusammen mit den berechneten geometrischen Parametern der Zielstrukturen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Für die Disulfidbrücke zwischen den Aminosäureresten Cys-90 und Cys-424, die das Enzym in der geschlossenen Konformation fixieren sollte, wurden drei energetisch günstige Disulfid-Konformationen von SSBOND berechnet (Tabelle 19). Wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben nehmen jedoch die beiden Disulfid-Konformere in der PL-Struktur zwar einander ähnliche jedoch von der Vorhersage deutlich abweichende unkanonische Konformationen ein. Die ungünstige Konformation spiegelt sich auch in einem höheren Energiegehalt der beiden PL- Monomere gegenüber den berechneten Konformationen wider.

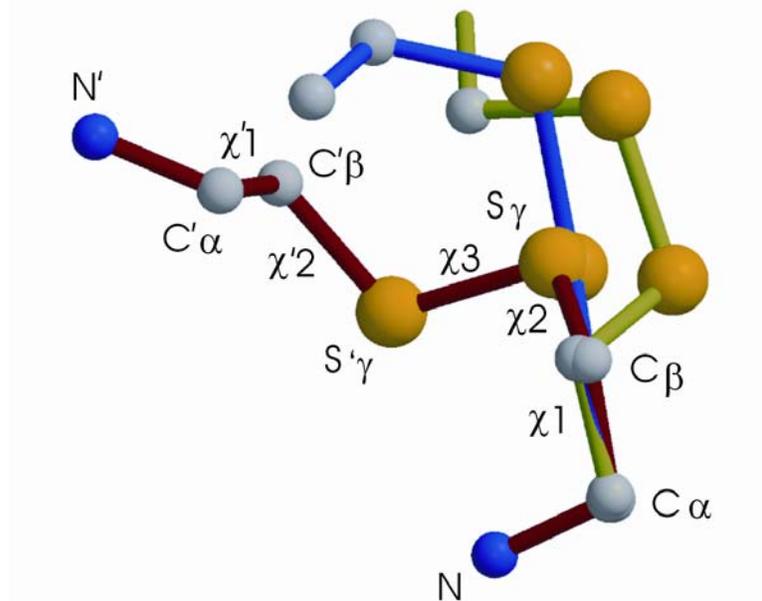


Abbildung 32. Geometrie der Disulfidbrücken. Dargestellt ist eine Strukturüberlagerung basierend auf den Hauptkettenatomen und dem C $\beta$  Atomen der N-terminalen Domäne. Grün: PL Kette A. Blau: SP-II Kette A. Rot: SP-I. Kohlenstoffatome sind grau gezeichnet, Stickstoffatom in blau und die Schwefelatome gelb. Für die bessere Übersichtlichkeit sind die Parameter nur für die Struktur SP-I angegeben. Die Beschriftungen für die C-terminale Domäne sind dabei mit einem Strich versehen.

Wie im Abschnitt 4.2.1.3 dargelegt wurde, sind die Strukturen SP-I und 1hp1 isomorph, so dass auch die Identität zwischen der berechneten und der tatsächlichen Cystin-Geometrie nicht überrascht. Die beiden Disulfidbrücken der Monomere A und B der Struktur SP-II

hingegen sind zwar untereinander ähnlich, unterscheiden sich jedoch deutlich von der gewünschten Geometrie. Ebenso wie die Domänen-Konformere des SP-Enzyms miteinander in Gleichgewicht stehen, ist auch davon auszugehen, dass die verschiedenen Disulfidbrücken in Lösung leicht ineinander übergehen können. Der augenfälligste Unterschied zwischen den beiden Strukturen ist der Wechsel von einer rechtshändigen (SP-I) in eine linkshändige (SP-II) Konformation (Abbildung 32). Eine ähnliche Flexibilität in Lösung ist auch von der Disulfidbrücke der PL-Struktur zu erwarten, da auch hier die Domänen noch sehr beweglich sind (vgl. Abschnitt 4.4).

Insgesamt wurden also in den 3 Strukturen 3 unterschiedlich Disulfidgeometrien beobachtet (Abbildung 32). Basierend auf den  $C\alpha-C\alpha$  und den  $C\beta-C\beta$  interatomaren Abständen, sowie der Torsionswinkel  $\chi_3$ ,  $\chi_1$  und  $\chi'_1$  kann die Disulfidbindung der PL-Struktur als eine linkshändige Spirale nach der Richardson-Klassifizierung beschrieben werden (Richardson, 1981; Srinivasan et al., 1990), obwohl die trans Position in  $\chi_2$  sehr ungewöhnlich ist (Petersen et al., 1999). Ebenso sind die  $\chi_2$  Torsionswinkel in der linkshändigen SP-II Disulfidbindung und der  $\chi'_1$  Torsionswinkel in der rechtshändigen SP-I Disulfid-Konformation ungewöhnlich und führen zu einer energetisch ungünstigen Verzerrung der Disulfid-Geometrie (Petersen et al., 1999).

Es konnte schon früher gezeigt werden, dass auch atypische Disulfidbrücken in Proteine eingebaut werden können und dort auch zu einer erheblichen Stabilisierung des Proteins führen können (Katz und Kossiakoff, 1986). Tatsächlich sind auch in vielen anderen genetisch modifizierten Proteinen eingeführte Disulfidbrücken mit ungewöhnlicher Bindungs-Geometrie gefunden worden, ohne dass die strukturelle Integrität und Stabilität des Proteins geschädigt worden wäre (Clarke et al., 1995; Villafranca et al., 1987).

Es ist dennoch interessant, dass die Geometrie von Disulfidbrücken in Wildtyp-Proteinen einheitlicher und energetisch optimierter ist, als in artifiziellen Disulfidbrücken. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass in den evolutionär optimierten Strukturen sich für das Cystin eine optimale Stabilität in Hinsicht auf die Reduktion zu freien Cysteinen herausgebildet hat.

Die hier diskutierten Resultate belegen experimentell eine erstaunliche Flexibilität der Disulfid-Geometrie. Theoretische Berechnungen anhand von Diethyldisulfid zeigen, dass der interatomare  $C\alpha-C\alpha$  Abstand einer Disulfidbrücke bei gleichem Energiegehalt sehr viel stärker variieren kann als der anderer vergleichbarer kovalenter Quervernetzungen wie p-Xylol und n-Hexan (Gorbitz, 1994). Das kann analog auch für die anderen geometrischen Parameter einer Disulfidbrücke gesagt werden. Im Falle der 5'-NT scheinen also die relativ geringen Energiebarrieren einer verzerrten Disulfidgeometrie überkompensiert zu werden von einer energetisch günstigeren Domänen-Konformation.

In dieser Hinsicht ist es interessant zu bemerken, dass in anderen Strukturen mit artifiziellen Disulfidbrücken die beteiligten Cysteine durch sehr hohe  $B$ -Werte auffallen, so wurden z. B. bei dem Einbau einer Disulfidbrücke in Lysozym  $B$ -Werte von 60 und 40 Å<sup>2</sup> in der oxidierten Form gegenüber 30 und 17 Å<sup>2</sup> im Wildtyp Protein bei sonst gleichen Durch-

schnittswerten gefunden (Jacobson et al., 1992). An dieser Stelle sei die Hypothese erlaubt, dass die geringen Energiebarrieren verschiedener Disulfid-Geometrien besonders in atypischen Disulfid-Konformationen zu statischer Unordnung führen, die sich in der Erhöhung der Temperaturfaktoren ausdrückt.