

## 6 Analyse der Domänenrotation

Die Domänenbewegung spielt eine wichtige Rolle in der Funktionsausübung vieler Proteine. In Enzymen beispielsweise ist die Substratbindung und Freilassung der Produkte oft mit einer großen Domänenbewegung verbunden (Janin & Wodak, 1983; Bennett & Huber, 1984; Schulz, 1991; Gerstein *et al.*, 1994; Hayward, 1999). Weiterhin spielen diese kollektiven Bewegungen von Proteinfragmenten eine Rolle bei regulatorischen und allosterischen Prozessen, beim Transport von Stoffwechselprodukten, bei der Bildung von großen Proteinkomplexen, bei kontraktiven und motorischen Funktionen sowie sehr wahrscheinlich auch bei der Proteinfaltung. Domänenbewegungen werden für gewöhnlich mit Hilfe der Röntgenkristallographie beobachtet, wenn das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Substrates (oder Inhibitors), unterschiedliche Kristallisationspuffer oder Änderungen in der Kristallpackung verschiedene Proteinkonformationen bedingen. Gerstein und Mitarbeiter (1994) untersuchten eine Vielzahl solcher Konformere, deren Strukturen mit Hilfe der Kristallographie bestimmt wurden. Dabei fanden sie zwei grundlegende Bewegungstypen, die gelenkartige und scherartige Domänenbewegung, mit deren Hilfe Domänenbewegungen beschrieben werden können. Die beiden Bewegungstypen werden anhand der Veränderung der Struktur der Interdomänenregion und nicht auf der Basis der tatsächlichen relativen Bewegung der beiden Domänen zueinander charakterisiert. Während bei Scherbewegungen die Domänen relativ zueinander entlang des Domäneninterfaces translatiert werden, rotieren bei der Gelenkbewegung die Domänen relativ zueinander um einen oder mehrere Gelenkbereiche, in denen nur einige wenige Hauptkettentorsionswinkel große Änderungen erfahren.

Es sind mehrere Algorithmen (Nichols *et al.*, 1995; Hayward *et al.*, 1997; Wriggers & Schulten, 1997; Hinsen, 1998; Bahar *et al.*, 1999; Verbitsky, 1999) im Laufe der Zeit entwickelt worden, um Domänenbewegungen zu erkennen und zu analysieren. Dabei werden entweder zwei strukturell bereits bekannte Proteinkonformationen analysiert oder an einer Proteinkonformation werden Normalmoden- oder molekulardynamische Berechnungen durchgeführt, um auf mögliche kollektive Bewegungen zu schließen. Der in dieser Arbeit im Programm DYNDOM (Hayward & Berendsen, 1998; Hayward, 1999) benutzte Algorithmus basiert auf dem Vergleich zweier Strukturen, für die die dynamischen Domänen, die Interdomänenschraubenachse und die Gelenkbereiche berechnet werden.

## 6.1 Beschreibung der Domänenrotation

Die 5'-NT konnte im Rahmen dieser Arbeit in neun unterschiedlichen Konformationen beobachtet werden, die vier verschiedenen Kristallformen entstammen. Die Kristallformen I und II enthalten die drei offenen Konformationen (I, IIa und IIb) und die beiden anderen Kristallformen III und IV enthalten sechs geschlossene Konformationen (IIIa, IIIb, IVa, IVb, IVc und IVd). Zusätzlich wurde ein Substratkomplex der Kristallform I erhalten, dessen Konformer als I\_ATP bezeichnet wird. Werden Strukturen der offenen und geschlossenen Konformationen überlagert, so ergeben sich sehr große Unterschiede in den Standardabweichungen, die dagegen kleiner sind, wenn nur geschlossene oder nur offene Konformationen untereinander überlagert werden (Tabelle 21). Interessanter Weise zeigen aber die Standardabweichungen der N- und C-terminalen Domänen der einzelnen Konformere untereinander nicht sehr große Unterschiede, auch wenn einzelne Domänen offener und geschlossener Konformere überlagert werden (Tabelle 21). Dieses Verhalten zeigt deutlich, daß die Domänen als nahezu starre Körper angesehen werden können und die hohen Standardabweichungen aus der Veränderung der Orientierung der N- und C-terminalen Domäne relativ zueinander resultieren. Die relativ hohen Standardabweichungen im helikalen Bereich der Domänen-verbindenden Helix  $\alpha 8$  deuten auch hier auf Veränderungen in ihrer Konformation hin, zumal es sich um nicht sehr viele Reste handelt.

Tabelle 21: Standardabweichungen (Å) der 5'-NT-Konformere. Für die Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome wurde das Programm LSQKAB (CCP4, 1994) benutzt. Die einzelnen Konformere wurden in die N-terminale, Domänen-verbindende Helix und in die C-terminale Domäne zerlegt oder es wurden alle gemeinsamen Reste überlagert. Für die Berechnung der rms-Abweichungen wurden die  $C_{\alpha}$ -Atome folgender Reste aus der entsprechenden Domäne überlagert: (i) N-terminale Domäne: Reste 26-177, 183-321, 332-342; (ii) Helix  $\alpha 8$ : Reste 343-361; (iii) C-terminale Domäne: Reste 362-469, 479-549; (iv) Gesamtes Protein: alle Reste von (i) bis (iii).

<b>N-term</b>	<b>I</b>	<b>I_ATP</b>	<b>IIa</b>	<b>IIb</b>	<b>IIIa</b>	<b>IIIb</b>	<b>IVa</b>	<b>IVb</b>	<b>IVc</b>
<b>I_ATP</b>	0.112								
<b>IIa</b>	0.433	0.459							
<b>IIb</b>	0.360	0.386	0.350						
<b>IIIa</b>	0.477	0.476	0.446	0.467					
<b>IIIb</b>	0.457	0.460	0.446	0.444	0.305				
<b>IVa</b>	0.375	0.373	0.374	0.340	0.299	0.302			
<b>IVb</b>	0.395	0.390	0.363	0.381	0.359	0.330	0.209		
<b>IVc</b>	0.394	0.397	0.389	0.369	0.303	0.293	0.186	0.214	
<b>IVd</b>	0.390	0.389	0.388	0.387	0.274	0.289	0.188	0.195	0.176

<b>Helix</b>	<b>I</b>	<b>I_ATP</b>	<b>Ila</b>	<b>Ilb</b>	<b>IIla</b>	<b>IIlb</b>	<b>IVa</b>	<b>IVb</b>	<b>IVc</b>
<b>I_ATP</b>	0.059								
<b>Ila</b>	0.217	0.184							
<b>Ilb</b>	0.254	0.233	0.174						
<b>IIla</b>	1.879	1.880	1.908	1.871					
<b>IIlb</b>	1.940	1.942	1.975	1.945	0.265				
<b>IVa</b>	1.836	1.839	1.862	1.831	0.252	0.314			
<b>IVb</b>	1.726	1.725	1.747	1.715	0.358	0.390	0.271		
<b>IVc</b>	1.900	1.900	1.915	1.869	0.304	0.430	0.360	0.422	
<b>IVd</b>	1.015	1.003	1.026	0.953	1.416	1.457	1.417	1.247	1.388

<b>C-term</b>	<b>I</b>	<b>I_ATP</b>	<b>Ila</b>	<b>Ilb</b>	<b>IIla</b>	<b>IIlb</b>	<b>IVa</b>	<b>IVb</b>	<b>IVc</b>
<b>I_ATP</b>	0.114								
<b>Ila</b>	0.330	0.334							
<b>Ilb</b>	0.325	0.326	0.266						
<b>IIla</b>	0.436	0.420	0.478	0.489					
<b>IIlb</b>	0.401	0.383	0.446	0.432	0.411				
<b>IVa</b>	0.328	0.310	0.384	0.375	0.412	0.310			
<b>IVb</b>	0.307	0.295	0.351	0.350	0.397	0.323	0.205		
<b>IVc</b>	0.340	0.315	0.401	0.394	0.387	0.319	0.251	0.263	
<b>IVd</b>	0.343	0.325	0.375	0.378	0.397	0.309	0.240	0.206	0.216

<b>ALLE</b>	<b>I</b>	<b>I_ATP</b>	<b>Ila</b>	<b>Ilb</b>	<b>IIla</b>	<b>IIlb</b>	<b>IVa</b>	<b>IVb</b>	<b>IVc</b>
<b>I_ATP</b>	0.146								
<b>Ila</b>	1.112	1.199							
<b>Ilb</b>	1.073	1.157	0.392						
<b>IIla</b>	9.901	9.898	9.859	9.737					
<b>IIlb</b>	9.791	9.786	9.774	9.645	0.588				
<b>IVa</b>	9.491	9.488	9.453	9.329	0.741	0.638			
<b>IVb</b>	9.459	9.455	9.440	9.317	0.929	0.746	0.334		
<b>IVc</b>	10.018	10.014	9.997	9.872	0.449	0.529	0.825	0.962	
<b>IVd</b>	9.733	9.727	9.724	9.598	0.746	0.509	0.588	0.595	0.662

### 6.1.1 Konformationsvergleich der 5'-NT-Strukturen

Für die Domänenrotationsanalyse wurden die neun Konformere paarweise mit dem Programm DYNDOM verglichen. Hierbei wurden dynamische Domänen bestimmt, die sich als quasi-starre Körper bewegen. Die dahinter stehende Idee ist, daß sich dynamische Domänen aufgrund ihrer unterschiedlichen rotatorischen Eigenschaften identifizieren lassen. Ebenfalls berechnet wird eine Schraubenachse, um die eine Domäne relativ zur anderen rotiert und translatiert wird. Diese Achse wird als „effektive“ Gelenkachse bezeichnet, wenn sie an einem  $C_{\alpha}$ -Atom innerhalb eines Abstandes von 3 Å vorbeiläuft, das von einem Rest stammt, der sich in der Krümmungsregion des Konformers befindet. Der Krümmungsbereich ist der Bereich, der die beiden dynamischen Domänen verbindet und enthält die Reste, die durch Konformationsänderungen die Domänenrotation erlauben. Diejenigen Krümmungsreste, deren  $C_{\alpha}$ -Atome sich in einem Abstand zur Schraubenachse von kleiner oder gleich 3 Å befinden, werden als Gelenkreste bezeichnet.

Mit Hilfe dieses Algorithmus wird die 5'-NT in zwei dynamische Domänen mit den Resten 26 bis 351 und 365 bis 550 geteilt, die sehr gut mit den strukturellen Domänen mit den Resten 26 bis 343 für die N-terminale und 361 bis 550 für die C-terminale Domäne korrespondieren (Abbildung 38). Nur in zwei Fällen war es nicht möglich, eine Domänenrotationsanalyse durchzuführen (Paare IIa/IIb und IIIb/IVd), da ihre Konformationsunterschiede zu gering sind. Der größte Unterschied besteht mit einem Interdomänenrotationswinkel von  $96.1^{\circ}$  (Tabelle 22) zwischen den Konformeren I und IVc. Die Cluster der berechneten Rotationsvektoren, die den beiden beweglichen Domänen entsprechen sind in Abbildung 38 in grün und blau dargestellt. Ebenfalls dargestellt sind die Rotationsachse (rot) und die Aminosäurereste, die sich im Krümmungsbereich befinden (orange). Die Translationskomponente der Schraubenachsenoperation für die Beschreibung der Domänenrotation des Konformerpaars I und IVc beträgt 0.26 Å. Beim Vergleich aller Konformerpaare untereinander variiert dieser Wert zwischen nahe 0.0 und 0.7 Å und ist somit sehr klein. Daher kann die hier beobachtete Bewegung als reine Rotation angesehen werden. Als Gelenkreste wurden die Reste 355 und 357 bis 361 bestimmt, da die Rotationsachse in einem Abstand innerhalb von 3 Å an deren  $C_{\alpha}$ -Atomen vorbeiläuft. Eine Liste mit den Ergebnissen für alle Konformerpaare ist in Tabelle 22 gegeben. Der Bereich der Krümmungsreste geht von Rest 352 bis Rest 364, während die Reste 354 bis 364 mögliche Gelenkreste sein können.

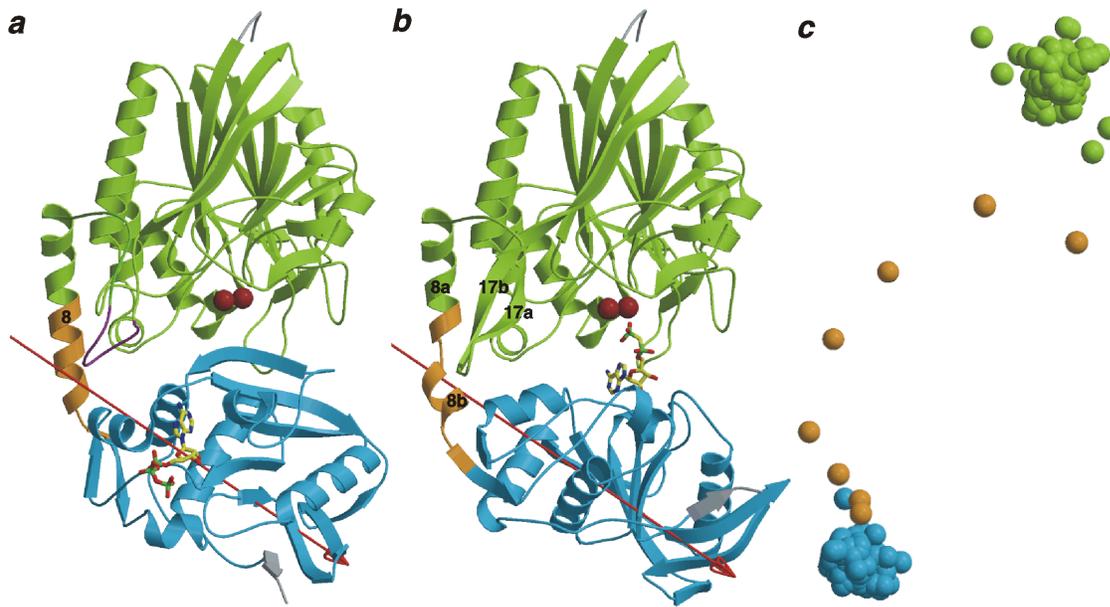


Abbildung 38: Gelenkartige Domänenrotation. **a** und **b**, Tertiärstruktur der offenen (Konformer I) und geschlossenen (Konformer IVc) Struktur der 5'-NT. Die dynamischen Domänen wurden mit Hilfe des Strukturvergleiches beider Konformere bestimmt. Die N-terminale Domäne ist grün, die Krümmungsreste orange und die C-terminale Domäne ist blau gefärbt. Die sich in beiden Strukturen unterscheidenden Sekundärstrukturelemente sind gekennzeichnet. Die 96° Rotationsachse ist rot dargestellt. **c**, Darstellung der Rotationsvektoren der Segmente bestehend aus jeweils fünf Hauptkettenresten. Diese beschreiben den Übergang zwischen den beiden Strukturen, die in (a) und (b) dargestellt sind. Die Farbgebung ist die gleiche wie in (a) und (b).

Auf der Basis des Vergleichs der neun Konformere untereinander können die einzelnen Strukturen in Bezug auf das am weitesten geöffnete Konformer I (Abbildung 39) klassifiziert werden. Die Klassifizierung besteht aus den drei offenen Konformeren I, IIa und IIb, die sich mit einem maximalen Rotationswinkel von 10.4° unterscheiden und aus den geschlossenen Konformationen, die sich maximal um einen Rotationswinkel von 8.4° unterscheiden. Für den 82°-Bereich zwischen den beiden Konformeren IIb und IVd konnte bis jetzt keine Konformation gefunden werden.

Anzumerken ist, daß die Kristallformen mit mehr als einem Molekül in der asymmetrischen Einheit stets Konformere der gleichen offenen oder geschlossenen Konformation enthalten. Diese Beobachtung ist nicht bloß ein Ergebnis von identischen intermolekularen Wechselwirkungen innerhalb des Kristalls, da die Wechselwirkungen der unabhängigen Moleküle innerhalb des Kristalls in jeder der Kristallformen II bis IV zumindest teilweise voneinander verschieden sind. Beispielsweise besitzen die beiden Moleküle in den Kristallformen II und III gemeinsame Wechselwirkungen untereinander aufgrund der nicht-kristallo-

graphischen zwei-zähligen Achse, während sie sich in den Wechselwirkungen mit kristallographisch verwandten Molekülen unterscheiden.

Tabelle 22: Analyse der Domänenrotation mit DYNDOM.

Paar	Rotationswinkel (°)	Translation (Å)	Schließbewegungsanteil (%)	Krümmungsreste	Gelenkreste
I / IIa	10.4	-0.12	84.2	361 - 364	361
I / IIb	10.1	+0.08	93.6	359 - 361	360, 361
I / IVb	87.8	-0.28	68.4	355 - 364	357 - 361
I / IVa	89.5	-0.23	70.1	354 - 363	357 - 361
I / IVd	91.0	-0.06	66.2	354 - 363	357 - 361
I / IIIb	92.7	+0.38	66.8	353 - 363	354, 355, 357 - 361
I / IIIa	95.7	-0.18	70.2	353 - 363	354, 357 - 361
I / IVc	96.1	-0.21	67.3	355 - 363	355, 357 - 361
IIa / IIb	~	~	~	~	~
IIa / IVb	82.9	-0.21	60.8	352 - 361	354 - 361
IIa / IVa	84.4	-0.18	62.3	352 - 362	354 - 361
IIa / IVd	86.1	+0.03	58.2	352 - 363	354 - 361
IIa / IIIb	87.9	+0.41	59.1	352 - 362	354 - 361
IIa / IIIa	90.6	-0.19	63.2	352 - 362	354 - 361
IIa / IVc	91.2	-0.20	60.0	353 - 363	354 - 361
IIb / IVb	81.9	-0.63	62.0	352 - 364	354, 355, 357 - 361
IIb / IVa	83.4	-0.58	63.4	352 - 364	354, 355, 357 - 361
IIb / IVd	85.1	-0.38	55.3	352 - 364	354 - 361
IIb / IIIb	86.8	+0.02	60.1	352 - 363	354 - 361
IIb / IIIa	89.6	-0.57	64.3	352 - 363	354 - 361
IIb / IVc	90.3	-0.62	61.8	352 - 363	354 - 361
IVb / IVa	2.1	+0.19	99.0	356 - 361	356, 357
IVb / IVd	3.7	+0.03	67.0	363 - 364	~
IVb / IIIb	5.6	+0.27	83.9	353 - 354	~
IVb / IIIa	8.1	+0.13	88.4	352 - 356	352 - 355
IVb / IVc	8.4	-0.15	68.2	361 - 362	~
IVa / IVd	3.1	+0.09	38.7	363 - 364	364
IVa / IIIb	4.5	+0.26	65.8	352 - 356	~
IVa / IIIa	6.3	+0.03	77.5	352 - 357	352 - 355
IVa / IVc	7.0	-0.14	50.8	361 - 363	~
IVd / IIIb	~	~	~	~	~
IVd / IIIa	5.8	+0.45	97.7	355 - 356	~
IVd / IVc	5.4	+0.04	77.3	355 - 356	~
IIIb / IIIa	4.6	-0.01	98.3	360 - 361	~
IIIb / IVc	3.9	-0.25	61.5	361 - 362	~
IIIa / IVc	2.8	+0.07	40.1	361 - 362	~

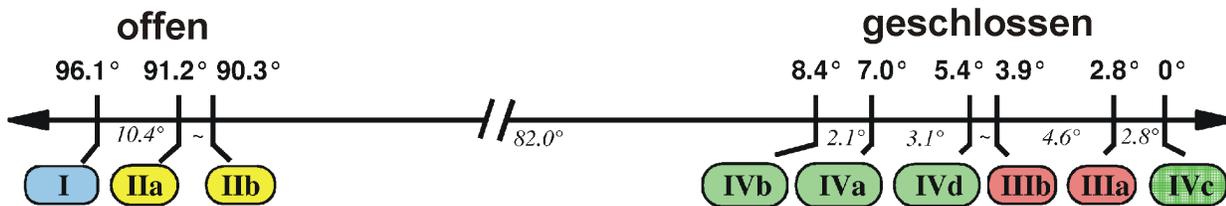


Abbildung 39: Klassifizierung der neun Konformere in Bezug auf den Rotationswinkel relativ zum Konformer IVc.

### 6.1.2 Konformationsänderungen im Krümmungsbereich

Proteingelenke sind spezielle Bereiche der Hauptkette eines Proteins in dem Sinn, daß sie für gewöhnlich dem Lösungsmittel exponiert sind und nur wenige Einschränkungen ihrer Beweglichkeit durch Packungskontakte besitzen. Dies erlaubt ihnen, große Konformationsänderungen zu durchlaufen (Gerstein *et al.*, 1995; Hayward, 1999). In der 5'-NT sind die Krümmungsreste die Reste 352 bis 364, innerhalb derer der Rotationsübergang der zwei verbundenen starren Domänen auftritt (Abbildung 40). Die Rotationsachse verläuft nahe dem Zentrum dieser Region, dicht neben den Resten 357 bis 360 der Domänen-verknüpfenden Helix  $\alpha 8$ . Demnach handelt es sich bei diesen Resten um den mechanischen Gelenkbereich. In der offenen Enzymkonformation befinden sich diese Reste im C-terminalen Ende der Domänen-verbindenden  $\alpha$ -Helix (Reste 343 bis 361). Diese Helix wird durch ein für  $\alpha$ -Helices typisches fast perfektes System gestützt, in dem Rest  $i$  mit Rest  $i+4$  Wasserstoffbrücken ausbildet. In der geschlossenen Konformation der 5'-NT ist dieses Wasserstoffbrückenmuster in der Region der Reste 355 und 356 zerstört, die die beiden Helices  $\alpha 8a$  und  $\alpha 8b$  verbinden. Diese beiden Reste sind also die Region, in der die größten Veränderungen der Torsionswinkel auftreten (Abbildung 41).

Die beiden Reste Lys-355 und Gly-356 besitzen in der offenen Konformation typische  $\alpha$ -helikale Hauptketten-Torsionswinkel, während sich diese Werte in Bereichen von  $\beta$ -Strängen und  $3_{10}$ -Helices befinden, wenn man die geschlossene Konformation betrachtet (Abbildung 41). Also sind Lys-355 und Gly-356 die hauptverantwortlichen Reste für die Domänenrotation im Gelenkbereich, während die anderen Torsionswinkel der Krümmungsreste sich nur sehr wenig verändern. Die Gelenkreste besitzen Kontakte zu Resten der Schleife mit Rest 90, zu Glu-91 oder Glu-95, sind aber sonst frei von Packungswechselwirkungen. Die „Ausreißer“ im Ramachandran-Diagramm Gly-357, Ala-358 und Gln-359 von Konformer IVb (7 im Ramachandran-Diagramm) sind auf die schlecht definierte Elektronendichte dieses Bereichs in der Helix  $\alpha 8$  zurückzuführen.

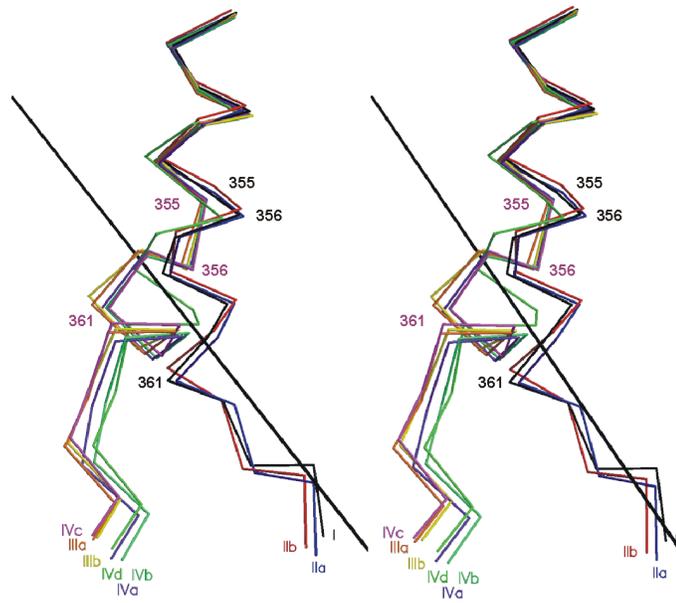


Abbildung 40: Überlagerung der Krümmungsregion in Helix  $\alpha 8$ . Stereodarstellung der Krümmungsregion der neun Konformere mit den „Gelenkresten“ Lys-355 und Gly-356. Die Überlagerung basiert auf den  $C_{\alpha}$ -Atomen der N-terminalen Domäne. Die  $96^{\circ}$  Interdomänen-Rotationsachse ist in schwarz dargestellt.

Konformer IVd stellt eine Ausnahme zu den eben beschriebenen Unterschieden zwischen den offenen und geschlossenen Konformationen dar. Seine Helix  $\alpha 8$  besitzt die gleiche Struktur wie die der offenen Konformationen, obwohl Konformer IVd eine geschlossene Konformation besitzt. Diese Beobachtung ist auf Kristallpackungskräfte innerhalb der Kristallform IV zurückzuführen, denn die Reste 344, 346, 350, 354, 358, 361 und 362 der Helix in Konformer IVd bilden sieben Kristallkontakte mit anderen symmetrieverwandten Molekülen (Abbildung 42). Derartige Kontakte sind für die anderen drei Konformere der Kristallform IV nicht zu beobachten. IVa bildet mit Rest 350 und 354 zwei, IVb bildet keine Kontakte mit  $\alpha 8$ -Resten und IVc bildet mit Rest 343 und 347 zwei Kristallkontakte zu symmetrieverwandten Molekülen.



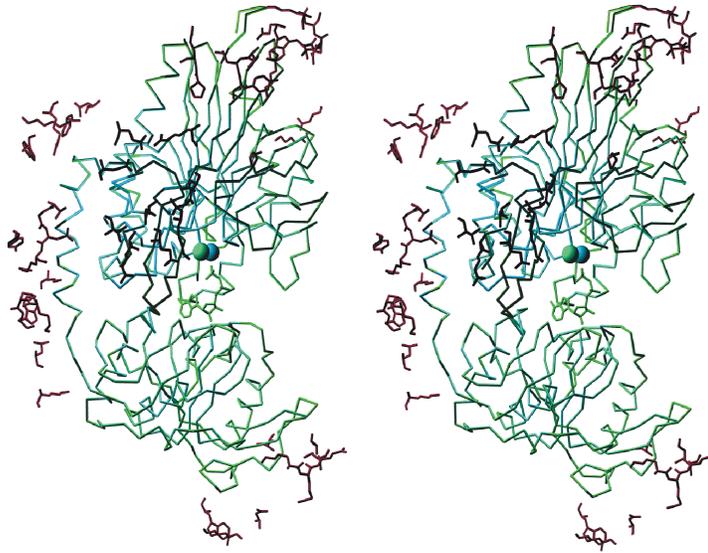


Abbildung 42: Kristallkontakte des Konformers IVc. Stereodarstellung des Hauptkettenverlaufes des Monomers IVc. Seine Farbgebung entspricht den B-Faktoren der  $C_{\alpha}$ -Atome und geht von blau (niedrige B-Faktoren) nach grün (mittlere B-Faktoren). Seitenkettenreste symmetrieäquivalenter Reste, die Kristallkontakte mit Monomer IVc ausbilden sind in weinrot dargestellt.

### 6.1.3 Interface-Region

Auf den ersten Blick unterscheidet sich die molekulare Oberfläche der offenen (Abbildung 17) kaum von der der geschlossenen Konformation (Abbildung 27). In der offenen Konformation ist die Substratbindungstasche Lösungsmittel-exponiert und die Interface-Reste sind in hydrophoben Bereichen verborgen. Betrachtet man dagegen die Situation in der geschlossenen Konformation, so ist die Lage genau umgekehrt: Die Reste, die sich vorher noch in der Interface-Region dem Lösungsmittel entzogen hatten, sind nun Solvent-exponiert und die Bindungstasche ist im inneren Proteinkernbereich verborgen.

Abbildung 43 zeigt die Interface-Region der offenen Konformation (a) mit 7 polaren Kontakten zwischen der N- und C-terminalen Domäne sowie die geschlossene Konformation (b) mit 3 polaren Kontakten im Grenzflächen-Bereich. Interessant ist auch eine Berechnung der Oberflächenänderung beim Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation. Denn mit einer klassischen Domänenschließbewegung (engl. „*domain closure*“) sollte eigentlich eine Abnahme der Solvent-exponierten Bereiche mit der Domänenschließung einhergehen. Dies ist allerdings nicht der Fall, wie eine Berechnung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) ergibt. So beträgt die der offenen Konformation I 1080 Å<sup>2</sup> und die der geschlossenen Konformation IVc 1056 Å<sup>2</sup>. Dagegen besitzen die beiden offenen

Konformere IIa und IIb erstaunlicher Weise mit 980 und 940 Å<sup>2</sup> sogar kleinere Interdomänen-grenzflächen.

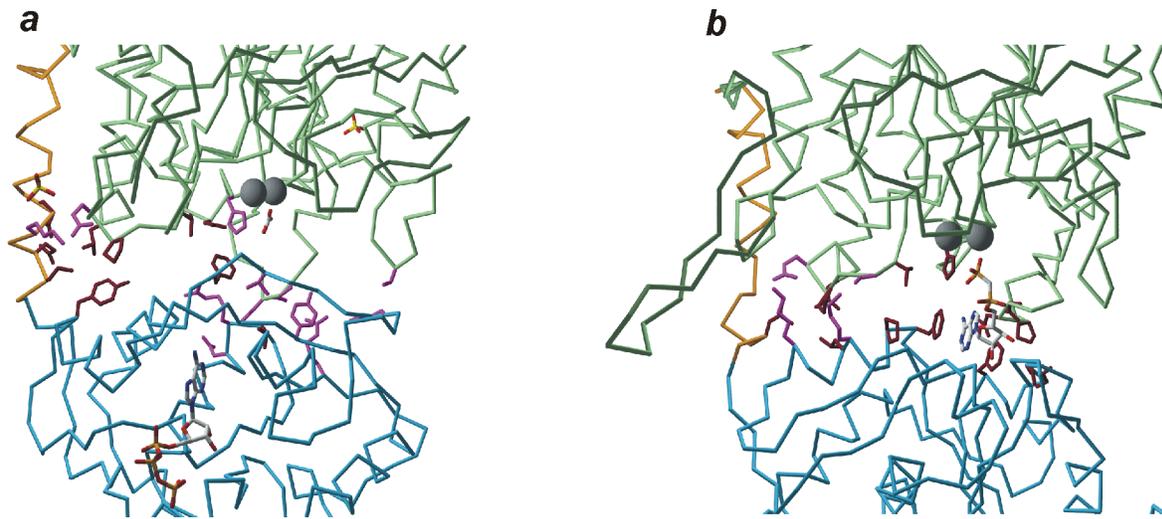


Abbildung 43: Intramolekulare Kontakte in der Interface-Region. **a** und **b**, dargestellt sind die Hauptkettenverläufe von Monomer I in Komplex mit ATP und von Monomer IVc. Die N-terminale Domäne ist grün, die Helix  $\alpha 8$  ist orange und die C-terminale Domäne ist blau gefärbt. Polare Wechselwirkungen ausbildende Reste sind violett und die der hydrophoben Wechselwirkungen sind weinrot dargestellt.

## 6.2 Domänenflexibilität im Kristallgitter

Die meisten Strukturen von Makromolekülen werden nach wie vor mittels Röntgenstrukturanalyse an Einkristallen gewonnen. Bei diesen Strukturen handelt es sich um statische Strukturen, also um „Schnappschüsse“ einer bestimmten Konformation, wie beispielsweise hier es sich um neun unterschiedliche statische Konformationen der 5'-NT handelt. Die Kristallstrukturanalyse schließt aber auch dynamische Daten in Form der kristallographischen Temperaturfaktoren (B-Faktoren) mit ein. Diese sind über die Beziehung  $B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle$  mit der mittleren quadratischen Atombewegung  $u$  verbunden. Moleküle in unterschiedlichen Packungsumgebungen können ähnliche Temperaturfaktoren-Verteilungen besitzen (Artymiuk *et al.*, 1997), was impliziert, daß die Beweglichkeit, so wie sie von der B-Faktorenverteilung beschrieben wird, in Relation zur Bewegung in Lösung steht. Ebenso wurde eine Korrelation der Temperaturfaktoren mit der Beweglichkeit aus Normal-Moden-Berechnungen und Molekulardynamik-Simulationen ermittelt. Auf der anderen Seite werden in der Regel keine großen konzertierten Bewegungen, wie Domänenrotationen, im Kristall beobachtbar sein, da Bewegungseinschränkungen durch die Wechselwirkungen mit den anderen Molekülen des Kristallgitters vorhanden sind bzw. das Kristallgitter zerstört werden würde.

Tabelle 23: Kontakte im Kristallgitter der Kristallform III. Angegeben sind jeweils wechselwirkende Atome der Reste aus den Monomeren IIIa (A) und IIIb (B) und der Symmetrieoperator, durch den das wechselwirkende Monomer erzeugt wird. Der Operator 1 steht für die Operation  $(-x+1/2, -y, z+1/2)$ , Operator 2 für  $(-x, y+1/2, -z+1/2)$  und Operator 3 für  $(x+1/2, -y+1/2, -z)$ . Wenn kein Operator angegeben ist, so ist die Operation  $(x, y, z)$  gemeint, sie steht für Wechselwirkungen der beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit.

N-terminale Domäne (Reste 26 – 342)									
Atom i				Abstand (Å)	Atom k				Sym. Op.
Thr	31	A	OG1	2.83	Glu	331	B	OE1	1
				3.18	Glu	331	B	OE2	1
Glu	73	A	OE2	3.81	Glu	338	B	N	1
Arg	303	A	NH1	2.93	Asp	327	B	OD1	1
				3.01	Asp	327	B	OD2	1
Arg	303	A	NH2	3.76	Asp	327	B	OD1	1
				2.70	Asp	327	B	OD2	1
Glu	306	A	OE1	3.74	Glu	326	B	N	1
Glu	306	A	OE2	2.46	Glu	326	B	N	1
Lys	308	A	NZ	2.66	Thr	324	B	O	1
Val	310	A	O	3.20	Lys	321	B	NZ	1
Lys	321	A	NZ	3.06	Val	310	B	O	1
Thr	324	A	O	2.30	Lys	308	B	NZ	1
Trp	325	A	NE1	3.71	Thr	31	B	OG1	1
Glu	326	A	N	3.59	Glu	306	B	OE2	1
				3.29	Glu	306	B	OE1	1
Asp	327	A	OD1	2.86	Arg	303	B	NH1	1
Asp	327	A	OD2	3.45	Arg	303	B	NH1	1
				3.61	Arg	303	B	NH2	1
Glu	331	A	OE1	3.89	Thr	31	B	OG1	1
Glu	331	A	OE2	2.84	Thr	31	B	OG1	1
Lys	30	B	NZ	3.04	Glu	262	B	OE1	3
				3.88	Glu	262	B	OE2	3
Gln	161	B	NE2	3.73	Glu	262	B	OE1	3
				3.19	Glu	262	B	OE2	3
Asp	194	B	OD2	3.93	Lys	357	A	NZ	2
Gln	201	B	OE1	3.19	Gln	343	A	O	2
				3.74	Gln	343	A	N	2
				2.98	Ser	347	A	OG	2
Gln	201	B	NE2	3.31	Gln	343	A	OE1	2
				2.74	Gln	343	A	O	2
				2.90	Ser	347	A	OG	2

Verbindende Helix $\alpha 8$ (Reste 343 – 361)									
Gln	343	A	O	3.31	Gln	201	B	NE2	2
Gln	344	A	N	3.74	Gln	201	B	OE1	2
Ser	347	A	OG	2.98	Gln	201	B	OE1	2
				2.90	Gln	201	B	NE2	2
Lys	357	A	NZ	3.93	Asp	194	B	OD2	2

C-terminale Domäne (Reste 362 – 550)									
Tyr	435	A	OH	2.53	Thr	518	B	O	
				3.95	Gly	519	B	N	
				3.96	Phe	520	B	N	
				3.93	Gly	519	B	O	
Thr	518	A	O	2.49	Tyr	435	B	OH	
Gly	519	A	N	3.88	Tyr	435	B	OH	
Lys	532	A	NZ	3.35	Lys	532	B	NZ	
Lys	441	B	NZ	3.97	Pro	535	B	O	2
				2.86	Asp	537	B	OD2	2

In der Kristallform III ist die Beweglichkeit der C-terminalen Domäne nur durch einige wenige intermolekulare Kontakte eingeschränkt (Abbildung 44, Tabelle 23). Insgesamt sind es 6 polare Wechselwirkungen, die zwischen den beiden C-terminalen Domänen der Monomere IIIa und IIIb auftreten, die über eine nicht-kristallographische zwei-zählige Achse in Beziehung stehen. Des Weiteren bildet die C-terminale Domäne des Monomers IIIb 2 polare Kontakte mit symmetrieäquivalenten Molekülen aus. Dem gegenüber stehen 33 polare Kontakte zwischen den N-terminalen Domänen der Konformere IIIa und IIIb mit symmetrieäquivalenten Molekülen und 5 polare Kontakte der beiden Domänen-verbrückenden Helices. Diese Bedingungen äußern sich wie schon weiter oben erwähnt in erhöhten kristallographischen Temperaturfaktoren und in den Elektronendichtekarten der C-terminalen Domänen. Der Temperaturfaktorenverlauf für Monomer IIIa und IIIb ist in Abbildung 45 dargestellt. Die Elektronendichtekarten der C-terminalen Domänen sind nur schwach und schlecht definiert für eine Vielzahl von Regionen in diesen Domänen. Dies deutet auf eine Beweglichkeit der C-terminalen Domänen hin. Die B-Faktoren der C-terminalen Domänen (mittlerer B-Faktor  $60 \text{ \AA}^2$ ) sind entscheidend größer als die der N-terminalen Domänen ( $30 \text{ \AA}^2$ ), in denen für Proteinstrukturen normal zu erwartende Temperaturfaktoren auftreten. Da nicht nur Schlaufenbereiche, die oft ungeordnete Bereiche

enthalten, sondern auch starre Sekundärstrukturelemente schlecht definiert sind, läßt dies auf eine Rotation der gesamten Domäne innerhalb des Kristalls schließen.

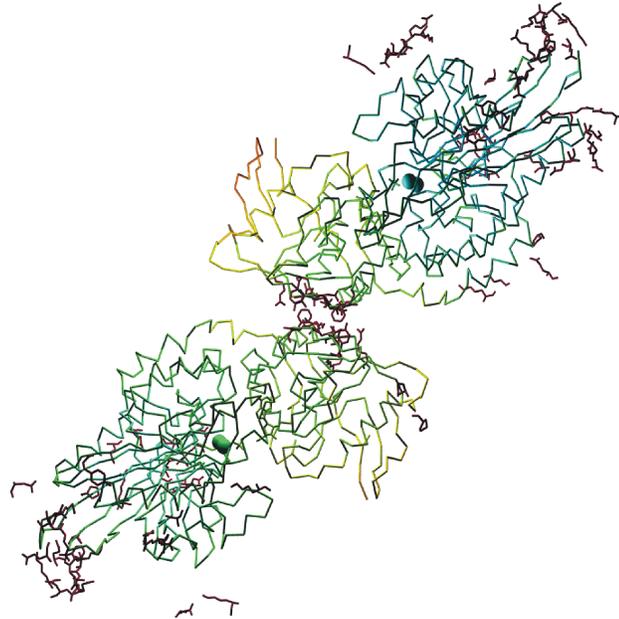


Abbildung 44: Flexibilität im Kristallgitter der Kristallform III. Hauptkettenverlauf der beiden Monomere IIIa (oben) und IIIb (unten). Die Farbgebung entspricht den Werten der B-Faktoren der  $C_{\alpha}$ -Atome. Sie geht von blau (niedrige Werte) über grün (mittlere Werte) und gelb nach rot (hohe B-Faktoren). Seitenreste symmetrieäquivalenter Monomere, die mit den hier gezeigten Molekülen Kristallkontakte ausbilden, sind weinrot gefärbt. Auch sind die Kontakte zwischen den beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit dargestellt.

Eine Analyse der Temperaturfaktorverteilung der Hauptkettenatome in der C-terminalen Domäne läßt auf die Richtung, in der die Bewegung stattfindet, schließen (Abbildung 46). Da alle neun Konformere Interdomänen-Schraubenachsen mit sehr kleinem Translationsanteil besitzen, kann angenommen werden, daß auch die hier beobachtete Bewegung der C-terminalen Domäne als einfache Rotation um eine Achse beschrieben werden kann. Hierbei sollten nun Reste, die nahe der Rotationsachse liegen, nur kleine Bewegungen ausführen, also kleine B-Faktoren besitzen und andersherum, Reste, die weit entfernt von der Achse liegen, sollten große Bewegungen beschreiben und hohe B-Faktoren besitzen. Allerdings wird diese Analyse durch eine interne thermische Flexibilität der Domänen mit einer höheren Beweglichkeit im Außenbereich (beispielsweise Lösungsmittel-exponierte Schlaufenbereiche) des Proteins und einer geringeren Beweglichkeit im Inneren des Proteins beeinflusst. Also bekommt man am Ende eine Überlagerung dieser inneren Flexibilität mit der durch die Domänenrotation ausgelösten Flexibilität. Trotzdem kann die B-Faktorverteilung qualitativ zur Beschreibung der Rotation der C-terminalen Domäne herangezogen werden. Sie entspricht etwa der Drehung um

die 2.8°-Rotationsachse, die in Abbildung 46 in cyan dargestellt ist. Interessanterweise entspricht diese Achse der Rotationsachse zwischen Konformer IIIa und dem ihm ähnlichsten Konformer IVc. Weiterhin ist in Abbildung 46 die Rotationsachse eingetragen (in blau), die der größten Rotation von 96.1° entspricht. Diese Achse ist jedoch nicht dazu geeignet, die beobachtete kristallographische Temperaturfaktorverteilung zu erklären.

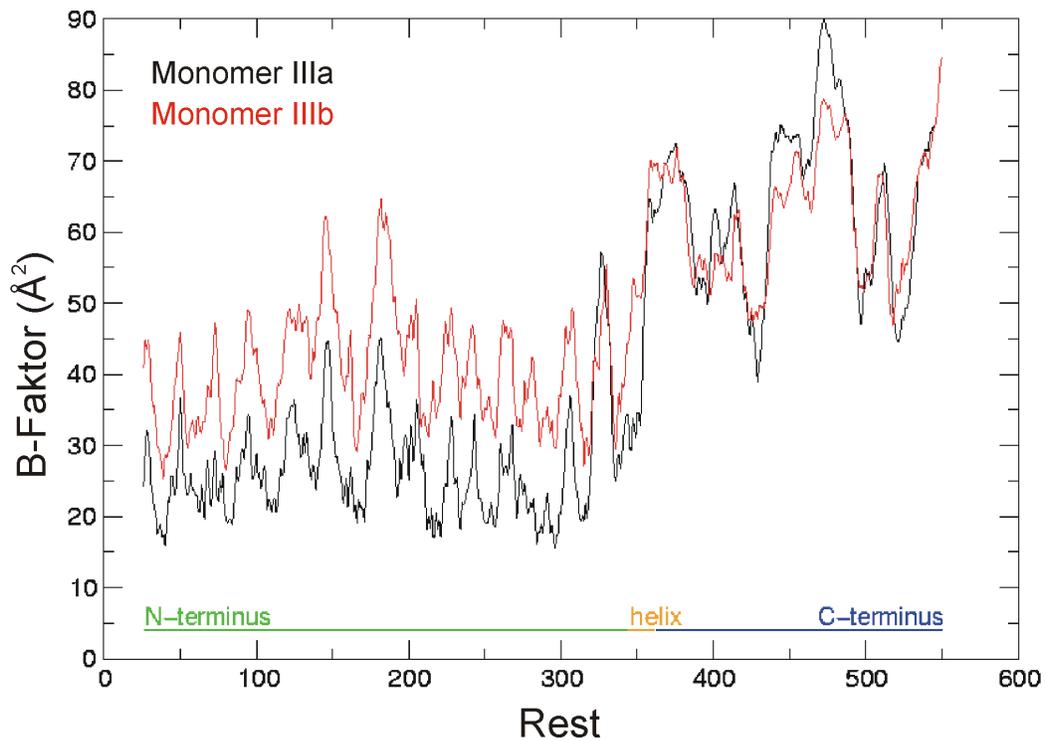


Abbildung 45: Verlauf der Temperaturfaktoren für Kristallstruktur III. Dargestellt sind die B-Faktoren der beiden Monomere IIIa (schwarz) und IIIb (rot) von der N-terminalen über die verbindende Helix  $\alpha 8$  zur C-terminalen Domäne.

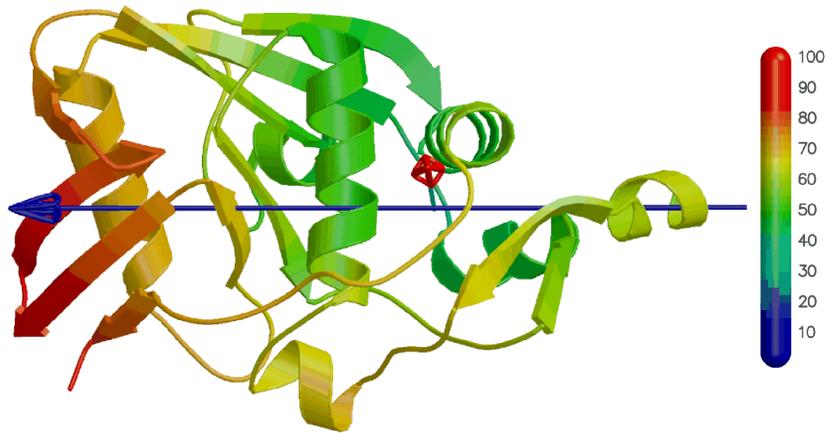


Abbildung 46: Domänenflexibilität der C-terminalen Domäne. Tertiärstruktur der C-terminalen Domäne von Konformer IIIa. Die Sekundärstrukturelemente sind entsprechend ihrer B-Faktoren (der  $C_{\alpha}$ -Atome) eingefärbt. Eine Skala gibt die Werte der B-Faktoren in  $\text{\AA}^2$  für die Färbung an. Die  $2.8^\circ$ -Rotationsachse des Paares IIIa/IVc steht senkrecht zur Papierebene und ist im Zentrum der Abbildung in rot eingezeichnet. Die  $96^\circ$ -Rotationsachse ist in blau dargestellt.

## 6.3 Diskussion

### 6.3.1 Beschreibung der Domänenrotation

Grundsätzlich existieren zwei Typen von Bewegungen, mit Hilfe derer Domänenrotationen, die über einen Gelenkbereich ausgeführt werden, beschrieben werden können (Abbildung 47). Bei dem ersten Typ (Abbildung 47a) handelt es sich um eine reine Domänenschließbewegung. Dabei befindet sich die Rotationsachse senkrecht zu einer Geraden, die beide Domänenzentren verbindet. Dagegen ist die Rotationsachse im zweiten Typ (Abbildung 47b) parallel zur der die Domänenzentren verbindenden Geraden. Dieser Bewegungstyp wird als Dreh- oder Twistbewegung bezeichnet. Betrachtet man den Winkel zwischen der Rotationsachse des Konformerpaars I/IVc mit dem größten Rotationswinkel  $96.1^\circ$  und der die beiden Domänenzentren verbindenden Gerade, so erhält man einen Winkel von  $125^\circ$ . Dies entspricht einem prozentualen Anteil einer Domänenschließbewegung von 67 % (vgl. Tabelle 22). Der prozentuale Anteil an Domänenschließbewegung wird definiert als Quadratwurzel der Komponente der Interdomänen-Schraubenachse in der Ebene, die sich senkrecht zur Verbindungsachse zwischen den Domänenzentren befindet (Hayward & Berendsen, 1998). Ein Vergleich von 12 Proteinen (Hayward, 1999), die Gelenkdomänenrotationen mit Rotationswinkeln von mindestens  $10^\circ$  aufweisen, deren Translationskomponenten höchstens 3  $\text{\AA}$  betragen und aus zwei Domänen bestehen, ergibt einen Domänenschließbewegungsanteil von mindestens 80 % mit einem Mittelwert von 93 %. Somit besitzt die Rotationsbewegung der 5'-NT einen ungewöhnlich hohen Anteil an einer Twistbewegung. Ein weiterer sehr bemerkenswerter Punkt

der Domänenbewegung der 5'-NT ist, daß das Zentrum der C-terminalen Domäne sich kaum bewegt und dennoch eine so große (96.1°) Rotation durchläuft. Dies ist möglich, da die Rotationsachse in einem Abstand von nur 3 Å am Massenschwerpunkt der C-terminalen Domäne entlangläuft. Der Vergleich mit den 12 oben genannten Proteinen zeigt die Einmaligkeit dieser Beobachtung. Unter diesen Proteinen besitzt das *bushy stunt* Virusmantelprotein aus der Tomate mit 8.4 Å die kürzeste Distanz zwischen der Rotationsachse und dem sich ihr am nächsten befindlichen Massenschwerpunkt einer der beiden Domänen. Für alle anderen Proteine ist dieser Wert größer als 10 Å und besitzt einen Mittelwert von 12.6 Å.

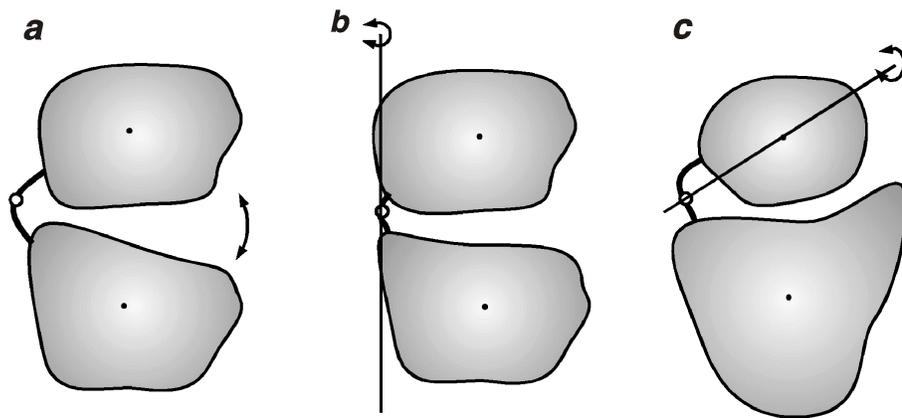


Abbildung 47: Typen der gelenkartigen Domänenrotation. **a**, Klassische Domänen-Schließbewegung. **b**, Reine Drehbewegung (Twistbewegung). **c**, Kugelgelenkartige Domänenrotation, so wie sie in der 5'-NT beobachtet wird (eine Domäne rotiert um ihren eigenen Massenschwerpunkt; die C-terminale ist die obere und die N-terminale ist die untere Domäne). Mit Ausnahme von (a), wo die Ansicht entlang der Rotationsachse ist, sind die Rotationsachsen als Linien eingezeichnet.

Während die kleinere C-terminale Domäne der 5'-NT eine eher kompakte und kugelartige Struktur aufweist, besitzt der N-terminale Bereich der Interface-Region nicht die Form eines Kugelsegmentes. In einer Näherung kann dieser Bereich aber als komplementär zur Form der C-terminalen Domäne angesehen werden. Somit erinnert die Domänenbewegung und deren Topologie der eines Kugelgelenks (Abbildung 47c). Hierbei ist die Kugel (C-terminale Domäne) mit dem Sockel (N-terminale Domäne) über eine Interdomänenhelix, in der sich die Gelenkregion befindet verknüpft, was in einem mechanischen oder anatomischen Kugelgelenk nicht der Fall ist. Damit ist eine große Rotation der C-terminalen Domäne nur dann möglich, wenn die Rotationsachse durch den Gelenkbereich der Helix und durch das Domänenzentrum (der C-terminalen Domäne) verläuft. Anderenfalls müßte sich die Helix in Bezug auf die N-terminale Domäne umorientieren, da die Reste am C-terminalen Ende dieser Domänenverbindenden Helix mit der Domänenrotation große Bewegungen ausführen würden.

Die klassische gelenkartige Domänenrotation schließt ein Öffnen und Schließen der Substrat- oder Ligandbindungstasche ein. Dabei verläuft die Hauptkomponente der Bewegung des Domäneninterfaces (in dem sich die Bindungstasche befindet) senkrecht zum Interface (Abbildung 47a) (Gerstein *et al.*, 1994; Hayward, 1999). Dies ist ganz deutlich nicht so im Fall der 5'-NT. Hier bewegt sich der Ligand mit der Rotationsbewegung der C-terminalen Domäne entlang des Domäneninterfaces in das aktive Zentrum. Somit besitzt diese Bewegung typische Charakteristika einer Scherbewegung in Bezug auf das Domäneninterface, obwohl es sich bei der Bewegung eindeutig um eine Rotation und nicht um eine Translation handelt. Trotz des deutlichen Unterschiedes der hier gezeigten Domänenbewegung der 5'-NT von einer klassischen Domänenschließbewegung wird die aktive Konformation, in der sich der Ligand nahe dem aktiven Zentrum befindet, als geschlossene und die inaktive als offene Konformation bezeichnet.

Wie oben beschrieben, kristallisiert die 5'-NT in vier unterschiedlichen Kristallformen, die insgesamt drei offene Konformere I, IIa und IIb sowie sechs geschlossene Konformere IIIa, IIIb sowie IVa bis IVd beinhalten. Konformer I bildet hierbei das am meisten geöffnete und Konformer IVc das am weitesten geschlossene Konformer. Auffällig ist, daß nur zwei Cluster von Konformeren auftreten, entweder geöffnete Strukturen oder geschlossene. Für den 82°-Bereich zwischen den offenen und geschlossenen Konformeren IIb und IVb wurden bisher keine Strukturen gefunden. Die beobachteten offenen und geschlossenen Konformationen stellen also wahrscheinlich örtliche Energieminima dar, während ein Übergang zwischen den beiden Zuständen zu hohe Energien erfordert, um im Kristall beobachtet zu werden. Eine Untersuchung von 25 Kristallformen des T4 Lysozyms (Zhang *et al.*, 1995) ergab ebenfalls Rotationswinkel, die in zwei Cluster eingeteilt werden konnten (-10° bis 10° und 25° bis 40°). Allerdings ist hier sowohl die Variabilität innerhalb der Zustände größer (20° in der offenen und 15° in der geschlossenen Konformation), und der Bereich zwischen den Clustern kleiner (15°). Weiterhin wurden auch drei Lysozym-Strukturen bei 12°, 19° und 21° bestimmt. Interessant ist auch, daß jeweils nur eine Konformation (also nur offen oder nur geschlossen) in den Kristallformen II bis IV auftritt. Eine plausible Erklärung dafür ist, daß die Kristallisationsbedingungen eine von den beiden Konformationen energetisch stabilisieren, so daß eine Konformation als Hauptbestandteil in der Lösung vorliegt und diese Konformation ausschließlich im Kristallverbund vorkommt. Zumindest für die Kristallform III konnte die Unabhängigkeit der Konformationsbildung von der An- oder Abwesenheit des Liganden in der Kristallisationslösung gezeigt werden, da ebenfalls eine Kristallstruktur ohne Ligand in der gleichen Kristallform bestimmt werden konnte. Kristallform IV dagegen konnte bisher nur in Gegenwart von  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP kristallisiert

werden. Mit Hilfe von Untersuchungen des Enzyms in Lösung, wie beispielsweise der Einfluß des pH-Wertes oder der Salzkonzentration, kann möglicherweise in späteren Experimenten gezeigt werden auf welche Art und Weise das Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen beeinflußt werden kann.

### 6.3.2 Vergleich der Rotationsachsen

Die Klassifizierung der Konformere wie in Abbildung 39 stellt eine hilfreiche Einordnung aller neun Konformere dar. Sie vernachlässigt aber die Tatsache, daß die Rotationsachsen nicht kollinear zueinander verlaufen. Tatsächlich weisen die Achsenorientierungen beträchtliche Unterschiede auf (Abbildung 48). Dieses Ergebnis ist allerdings nicht überraschend und ist ebenso bei der Untersuchung anderer Proteine beobachtet worden, beispielsweise bei T4 Lysozym (Zhang *et al.*, 1995). Es spiegelt die Tatsache wider, daß aufgrund der Bewegungseinschränkungen am Domäneninterface und der Torsionswinkel der Gelenkregion eine Domänenrotation von  $96^\circ$  nicht als kontinuierliche Rotation um nur eine Achse erfolgen kann, sondern daß sich die Bewegung aus vielen kleinen Rotationen um verschiedene Achsen zusammensetzt. Auf der anderen Seite muß auf den Zusammenhang zwischen ähnlichen Konformeren, die nur kleine Unterschiede im Rotationswinkel aufweisen, und dem Einfluß von Kristallpackungskräften auf diese Konformere hingewiesen werden. Denn Kristallpackungskräfte könnten einzelne Konformere aus ihrem Energieminimum verdrängen, und die beobachtete Konformation liegt somit nicht mehr auf dem Energiepfad von der offenen zur geschlossenen Konformation in Lösung. Normalerweise sind Kristallkräfte aber begrenzt und die in Kristallgittern beobachteten Konformere sollten auch in Lösung über thermische Bewegungen, zugänglich sein. Damit sind die Konformere, so wie sie in Kristallen gefunden werden, wohl Teil der Energielandschaft, die den Pfad von der offenen zur geschlossenen Konformation bestimmt.

Obwohl die Rotationsachsen der neun Konformere nicht kollinear zueinander verlaufen, liegen sie dennoch fast alle in einer Ebene (Abbildung 48). In einer groben Näherung enthält diese Ebene die Domänen-verbrückende Helix  $\alpha 8$  einschließlich der Gelenkreste und beide Domänenschwerpunkte. Allen Achsen ist gemeinsam, daß sie die Interfacekontakte mit der Rotation aufrecht erhalten. Es konnte keine Bewegung beobachtet werden, in der eine typische Domänenschließbewegung (Abbildung 47a) auftritt. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, daß sich die Größe des Domäneninterfaces kaum verändert.

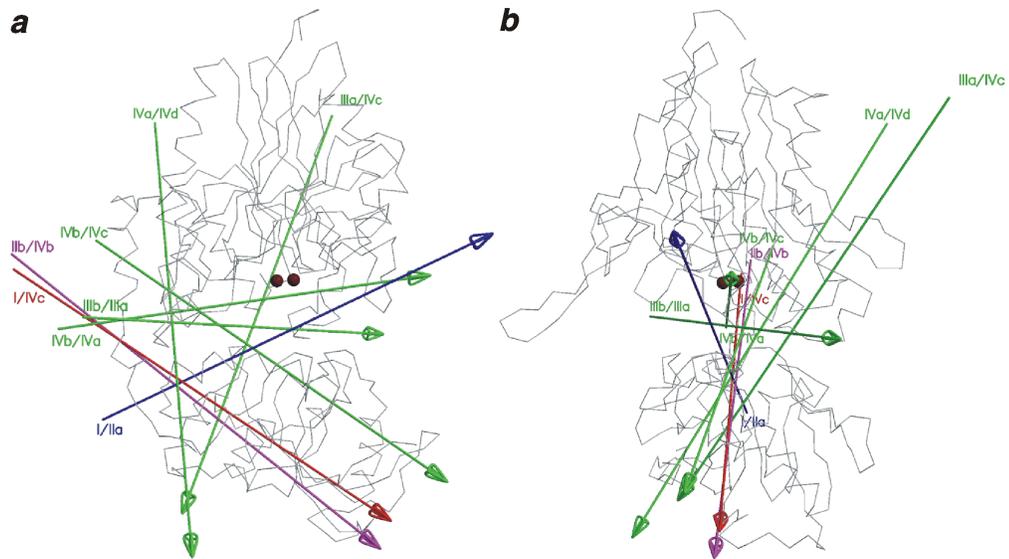


Abbildung 48: Rotationsachsen zwischen den beiden Domänen. **a** und **b**, Zwei zueinander senkrechte Darstellungen ausgewählter Rotationsachsen. Die Achsen sind mit dem zugehörigen Konformenpaar markiert. Zusätzlich ist die 96° Rotationsachse in rot gezeichnet.

### 6.3.3 Vergleich der Gelenkregion mit andern 5'-NTs

Die Proteinsequenzen von mindestens 15 5'-NTs sind bisher veröffentlicht worden. In Tabelle 24 werden sie in der Gelenkbereichsregion verglichen, die für die 5'-NT aus *E. coli* mit DYNDOM bestimmt wurde. Die Analyse der Domänenrotation ergab als mögliche Reste im Krümmungsbereich der Helix  $\alpha 8$  die Reste 352 bis 364 innerhalb aller neun Konformationen in vier unterschiedliche Kristallformen. Innerhalb dieser Sequenzen existieren offensichtlich drei Cluster. Der erste enthält bakterielle Sequenzen von *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Yersinia enterocolitica*, die alle im Krümmungsbereich sehr homolog zueinander sind. Mit Ausnahme der Sequenz von *Vibrio parahaemolyticus* sind die Reste Lys-355 und Gly-356 der *E. coli* Sequenz, die die größten Änderungen der Torsionswinkel aufweisen, konserviert. Der zweite Cluster wird von der menschlichen und den tierischen Sequenzen des Rindes, der Ratte, der Maus und des Zitterrochens gebildet. Diese Sequenzen unterscheiden sich stark von den bakteriellen sind aber untereinander mit Ausnahme der Sequenz des Zitterrochens stark homolog. Der dritte Cluster setzt sich aus sechs 5'-NT-Sequenzen des *Haemophilus influenza*, *Treponema pallidum*, *Archaeoglobus fulgidus*, der Viehzecke und der Sandfliege zusammen. Darin sind keine Gemeinsamkeiten festzustellen, weder innerhalb dieses Clusters noch zu den anderen beiden Clustern. Daher lassen sich keine seriösen Aussagen über einen möglichen gelenkartigen Domänenrotationsmechanismus und der daran beteiligten Reste machen.

Tabelle 24: Sequenzvergleich verschiedener 5'-NTs im Krümmungsbereich der Helix  $\alpha 8$ .

Species	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i>	S	P	F	Q	N	K	G	K	A	Q	L	E	V	K	I	G	E
<i>Salmonella</i>	T	P	F	Q	N	K	G	K	A	Q	L	E	V	K	I	G	S
<i>Vibrio</i>	R	P	F	Q	E	K	G	Q	S	Q	L	N	V	K	I	A	E
<i>Yersinia</i>	T	P	F	E	Q	Q	G	K	A	Q	L	D	V	K	V	G	S
Mensch	N	K	W	R	I	K	L	D	N	Y	S	T	Q	E	L	G	K
Rind	N	K	W	R	V	K	L	D	N	Y	S	T	Q	E	L	G	K
Ratte	N	Q	W	R	I	K	L	D	N	Y	S	T	Q	E	L	G	R
Maus	N	Q	W	R	I	K	L	D	N	Y	S	T	Q	E	L	G	R
Zitterrochen	N	K	W	K	E	S	L	A	N	F	G	K	E	V	I	G	R
<i>Haemophilus</i>	S	K	Y	K	S	E	K	D	R	L	A	Q	E	I	V	G	V
<i>Treponema</i>	E	E	F	K	K	E	K	E	A	L	G	A	Q	A	I	G	V
<i>Archaeoglobus</i>	Q	N	Y	V	E	K	L	N	A	F	V	K	E	R	S	G	F
<i>Mehanobacterium</i>	L	R	I	T	E	T	D	S	D	H	L	E	T	V	V	G	S
Viehzecke	D	R	Y	R	D	R	V	A	Q	S	Q	A	S	V	V	A	E
Sandfliege	E	K	Y	R	E	R	V	E	N	Y	G	N	R	V	I	G	V

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), das auf sekundärstruktur-unabhängigen „gap penalties“ beruht, durchgeführt. Ebenso wurde eine Sekundärstrukturvorhersage für alle 15 Sequenzen durchgeführt. Dabei wurde die GOR IV Methode (Garnier *et al.*, 1996) und das Programm PREDICTPROTEIN (Burkhart & Sander, 1993; 1994) zur Sekundärstrukturvorhersage des Krümmungsbereichs benutzt. Beide Methoden ergaben mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einen sehr hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil für den Krümmungsbereich (bezogen auf die Reste 352 bis 364 für die *E. coli* 5'-NT), somit bildet dieser Bereich also mit großer Wahrscheinlichkeit in allen untersuchten Organismen ebenfalls eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus.

### 6.3.4 Domänenflexibilität und Kristallpackung

Eine wichtige Frage in der Kristallographie ist die Frage nach der Größe des Einflusses, den das Kristallgitter auf die Konformation der Strukturen und deren Beweglichkeit besitzt. Oder mit den Worten von Dickerson und seinen Mitarbeitern (1994) gefragt: Wie groß ist die „thyrranny of the lattice“? Ein Vergleich von Strukturen, die aus nicht-isomorphen Lysozymkristallen stammten, mit Strukturen, die in voneinander unabhängigen unterschiedlichen Kristallumgebungen vorkamen (Zhang *et al.*, 1995), zeigte vergleichbare Unterschiede. Sie schlossen daraus, daß das

Kristallgitter die Struktur beeinflusst und fanden Verzerrungen innerhalb der untersuchten Lysozymstrukturen von 0.2 bis 0.5 Å im Proteinrückrad, wobei  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge in gleicher Weise beeinflusst wurden. Da intermolekulare Wechselwirkungen in Proteinkristallen aber relativ schwach sind, können diese Verzerrungen als niederenergetische Übergänge angesehen werden, so wie sie als thermische Bewegungen in Proteinmolekülen vorkommen.

Im Monomer IVd der 5'-NT im Komplex mit  $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP ist die Helix um Unterschied zu den drei anderen Konformeren der Kristallform IV im Bereich der Krümmungsregion nicht in zwei Helices  $\alpha 8a$  und  $\alpha 8b$  aufgespalten. Als Ursache hierfür sind Unterschiede in der Kristallpackung zu sehen, also der Wechselwirkungen der einzelnen Monomere mit symmetrieverwandten Nachbarproteinen. Wogegen die Helix von Molekül IVd sieben Kristallkontakte innerhalb des helikalen Bereichs ausbildet, bilden die helikalen Bereiche der anderen Monomere nur zwei bzw. gar keine Kristallkontakte aus. Diese Kontakte reichen offenbar aus, um die Helix des Konformers IVd in die beobachtete Konformation zu „zwingen“.

Während Proteinmodelle aus der Kristallstrukturbestimmung eine statische Struktur darstellen, so spiegeln doch die im Datensatz enthaltenen Temperaturfaktoren eine gewisse „Verschmiertheit“ der Elektronendichte wider (Frauenfelder *et al.*, 1979). Weil die kristallographischen Temperaturfaktoren (B-Faktoren) von der Unordnung im Kristallgitter beeinflusst werden, kann man generell annehmen, daß B-Faktoren Informationen über die interne Flexibilität einer Struktur im Kristallverbund beinhalten. Wie schon weiter oben erwähnt, wird ein Zusammenhang zwischen den B-Faktoren in Kristallstrukturen und der Beweglichkeit von Molekülen in Lösung angenommen. Allerdings kann die Beweglichkeit des Proteinrückgrats so stark durch Kristallkontakte eingeschränkt sein, daß die B-Faktoren keine Aussage mehr über die Beweglichkeit des untersuchten Proteinmoleküls in Lösung zulassen (Zhang *et al.*, 1995). Dicht gepackte Kristalle tendieren dazu, den Röntgenstrahl zu hoher Auflösung zu beugen und ergeben sehr genaue Strukturen und kleine B-Faktoren. In demselben Maße geht aber auch die Information über das dynamische Verhalten in Lösung der zu hoher Auflösung streuenden Struktur verloren, da die starken Kristallkontakte die innere Beweglichkeit der Struktur zu stark einschränken.

In Abbildung 45 ist der Temperaturfaktorverlauf für die Kristallstruktur III in Komplex mit Adenosin und Phosphat gezeigt. In beiden Konformeren IIIa und IIIb besitzen die C-terminalen Domänen relativ hohe B-Faktoren (vgl. Kapitel 6.2). Mit Mittelwerten um  $60 \text{ \AA}^2$  und einem maximalen B-Faktor von  $91 \text{ \AA}^2$  handelt es sich um relativ hohe Werte für eine Struktur mit einer

maximalen Auflösung von 2.1 Å. Dies deutet auf eine hohe Beweglichkeit der C-terminalen Domänen und wenige Kristallkontakte, die die innere Dynamik der Domänen einschränken. Die Kristallkontaktanalyse zeigt 6 polare Wechselwirkungen zwischen den beiden C-terminalen Domänen, die über eine zwei-zählige nicht-kristallographische Achse in Beziehung stehen, 2 polare Wechselwirkungen der C-terminalen Domäne des Monomers IIIb mit symmetrieverwandten Molekülen, 5 polare Kontakte gehen von der Domänen-verbrückenden Helix des Konformers IIIa aus und 33 polare Wechselwirkungen mit symmetrieverwandten Molekülen bilden dagegen die N-terminalen Domänen. Damit ist die hohe Beweglichkeit der C-terminalen Domäne erklärt. Die Bewegung der C-terminalen Domäne kann als eine Rotation um eine Achse beschrieben werden, die der räumlichen Orientierung der 2.8°-Rotationsachse des Konformerpaars IIIa/IVc entspricht. Diese Achse beschreibt eine Drehung in guter Übereinstimmung mit der Temperaturfaktorverteilung in der C-terminalen Domäne (Abbildung 46). Die kleineren B-Faktoren vor allem in Strang  $\beta$ 27 sind auf die oben erwähnten Kristallkontakte zurückzuführen, die zwischen den beiden Monomeren IIIa und IIIb ausgebildet werden.

Für die HIV-1 Reverse Transcriptase haben Bahar und Kollegen (1999) eine starke Korrelation zwischen den kristallographischen B-Faktoren und denen beobachtet, die mit Hilfe des „Gaussian Network Model“ (GNM) berechnet wurden. Die GNM-Methode basiert auf einer Analyse der lokalen Packungsdichte und der Kontakttopologie (von symmetrieäquivalenten Molekülen) innerhalb einer bekannten Struktur. Arnold & Ornstein (1994) führten intensive molekular dynamische Simulationen an T4 Lysozym mit verschiedenen Lösungsmittelmodellen durch und fanden dabei eine gute Korrelation für die aus der Simulation berechneten B-Faktoren mit den kristallographischen (0.74 für die Rückgratotope und 0.72 für die gesamten Aminosäuren).

Am Ende kann also angemerkt werden, daß das Kristallgitter sicherlich einen Einfluß auf die Konformation der Proteinstruktur besitzt, der um so größer ist, je stärker die Kristallkontakte innerhalb des Kristallverbundes die Beweglichkeit einschränken. Dafür ist aber die Elektronendichte sehr gut interpretierbar und die B-Faktoren werden klein, womit keine genauen Aussagen über die Dynamik des Moleküls in Lösung mehr erlaubt sind. Im Gegensatz dazu erlauben hohe B-Faktoren das Verhalten des Moleküls in Lösung zu beschreiben, wie im Fall der C-terminalen Domänen der Monomere IIIa und IIIb. Dies ist allerdings mit einer schlechten Elektronendichte verbunden, wodurch keine genauen Aussagen über die Konformationen von vielen Proteinseitenresten mehr möglich sind.