

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

4.1. Ergebnisse

Kristallisation der *Bc*-Csp und *Bs*-CspB Mutanten

Für die Kristallisationsexperimente wurden die ortsgerichtet mutierten Kälteschockproteine von der Arbeitsgruppe F.X. Schmidt, Universität Bayreuth zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um 4 Mutanten basierend auf dem Kälteschockprotein *Bc*-Csp aus *Bacillus caldolyticus* Typ (den zwei Einzelmutanten *Bc*-Csp E46A, *Bc*-Csp L66E, und den zwei Tripelmutanten *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E und *Bc*-Csp V64T/L66E/67A)¹ sowie vier Mutanten auf dem Kälteschockprotein *Bs*-CspB aus *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB E3R, *Bs*-CspB E3L, *Bs*-CspB A46E, *Bs*-CspB E66L). Die Proteinmutanten lagen in gereinigter Form lyophilisiert vor. Alle Mutanten wurden in 10 mM Na-Hepes Puffer pH 7,0 gelöst sowie gegen diesen Puffer dialysiert und anschließend konzentriert in einen Bereich von 10 bis 15 mg/ml. Die Reinheit wurde mit SDS-PAGE überprüft.

Zum Auffinden geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden alle Mutanten einem Screening

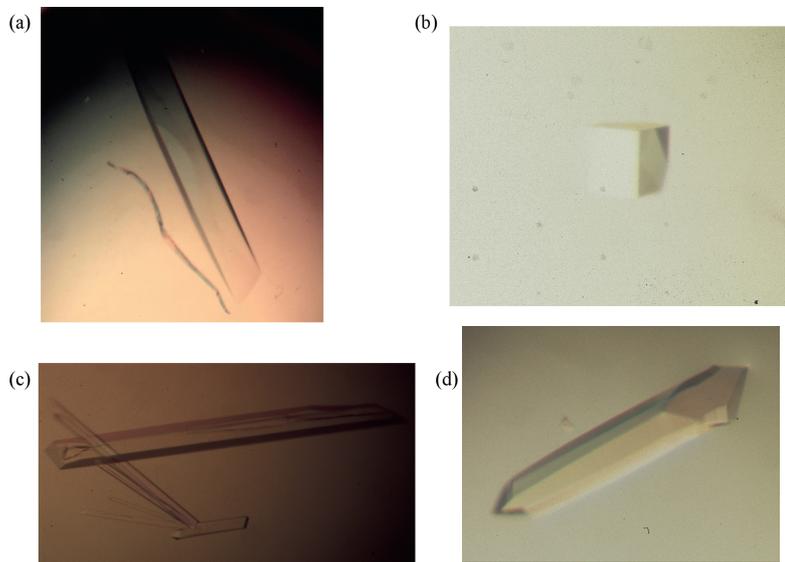


Abb. 7) Kristalle unter optimierten Bedingungen (Tab.1) von (a) *Bc*-Csp E46A, (b) *Bc*-Csp L66E, (c) *Bc*-Csp V64/L66E/67A, (d) *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E

¹In die Gesamtstudie gehört die Mutante *Bc*-Csp R3E, deren Strukturlösung von U. Müller im Rahmen seiner Promotion durchgeführt wurde [Müller U. 1999]

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

(Screen I + II) [Jancarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994] unterworfen. Für alle Mutanten konnten Startbedingungen für weitere Optimierungsversuche gefunden werden. Die *Bc*-Csp-Mutanten konnten durch geringe Veränderungen der Fällungsmittelkonzentration, des pH-Wertes und der Temperatur optimiert werden. Die finalen Bedingungen sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Für alle *Bs*-CspB-Mutanten konnten die Kristallisationsbedingungen nicht ausreichend optimiert werden. Ziel waren Kristalle mit einer Auflösung von besser als 2,5 Å. Eine solche Auflösung wurde als notwendig erachtet, um das Strukturmodell mit genügender Sicherheit im Detail beschreiben zu können. Gleichzeitig wird ab Auflösungen in diesem Bereich die Modellierung von Wasser sowie das Verfeinern mit individuellen isotropen B-Faktoren möglich. Aus den Optimierungszyklen konnten nur optisch gut wirkende Kristalle gewonnen werden, die hinsichtlich der Beugungseigenschaften für diese Vorhaben nicht ausreichend waren.

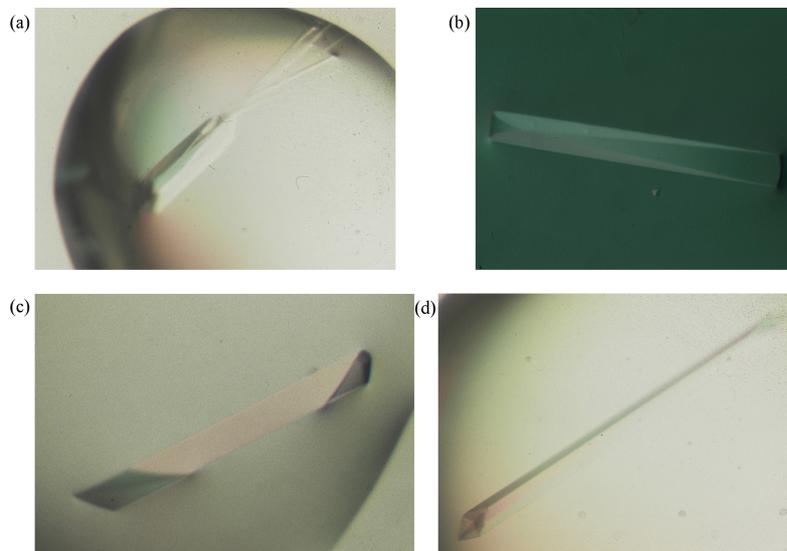


Abb. 8) Kristalle aus den Optimierungszyklen von (a) *Bs*-CspB E3R (b) *Bs*-CspB E3L (c) *Bs*-CspB A46E (d) *Bs*-CspB E66L

Für die Mutanten *Bs*-CspB E3R und *Bs*-CspB E3L wurde von zwei Anfangsbedingungen ausgegangen, die je 30 % PEG 4000, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 und entweder 0,2 M Magnesiumchlorid oder Natriumacetat enthielten. Hier wurden in umfangreichen Versuchen die Konzentrationen von PEG im Bereich von 12 bis 36 % variiert. Parallel dazu wurde der Einfluß des Puffers in einem pH-Wert Bereich von 5,6 bis 8,5 in Abständen von 0,5 Einheiten untersucht. Auch durch Zusätze von jeweils bis zu 10 % Glycerin, 100 mM Harnstoff, 100 mM Guanidin-HCl, 10 % MPD und 10 % Dioxan ergaben keine Kristalle mit hinlänglicher Beugungsqualität. Ähnlich die Situation bei den Mutanten *Bs*-CspB A46E und *Bs*-CspB E66L. Bei der Mutante *Bs*-CspB A46E wurde ebenfalls von zwei Bedingungen ausgegangen. Erstens

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

mit 30 % PEG 4000, 0,1 M Tris HCl pH 8,5 und 0,2 M Natriumacetat und zweitens 20 % PEG 8000, 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 und 0,2 M Magnesiumacetat. Hier wurden ebenfalls die Konzentrationen von PEG, der pH-Wert Bereich sowie die Zusätze variiert. Zusätzlich erfolgte die Erprobung von Ammonium- und Lithiumsulfat als Fällungsmittel. *Bs*-CspB E66L startete mit Bedingungen, die PEG 4000 oder 8000 enthielten. Hier wurden ebenfalls die Konzentrationen der Polyethylenglykole und die pH-Werte im breiten Bereich umfangreich getestet. Als Salze wurden Magnesiumacetat und -chlorid sowie Natriumacetat verwendet. Hier wurde zusätzlich eine Bedingung mit MPD als Fällungsmittel getestet. Die Versuche wurden bei 4 und 20°C durchgeführt. Dabei zeigte sich generell eine optisch bessere Qualität bei 20°C. Deshalb wurden die Versuche mit den Zusätzen nur bei 20°C durchgeführt.

Alle Kristallisationsversuche fanden unter Dampfdiffusion in Form des hängenden Tropfen statt.

Datensammlung und Auswertung

Um die Stabilität der Kristalle über den Verlauf der Messung zu erhöhen bzw. hochaufgelöste Strukturen möglich zu machen, wurden alle Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung der Kristalle erfolgte bei einer Temperatur von 100 K. Das Einfrieren stellte bei den Kristallen der *Bc*-Csp Mutanten kein besonderes Problem dar, da sie sich direkt aus dem Kristallisationstropfen einfrieren ließen. Aufgrund der Kristallisationspufferzusammensetzung mußten die Kristalle der *Bs*-CspB-Mutanten in der Regel zum Einfrieren umgesetzt werden. Optisch am stabilsten blieben Kristalle, die in einen Puffer umgesetzt wurden, dessen Fällungsmittelkonzentration etwas über der Kristallisationsbedingung lag mit zusätzlich 20 % Glycerin als Kryoprotektant.

Die Kristalle wurden zunächst auf einer Drehanodenanlage mit Cu α -Strahlung (1,5418 Å) vermessen. Für die Mutante *Bc*-Csp L66E und für die Tripelmutante *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E konnten zusätzlich hochaufgelöste Datensätze an der Strahlführung BW7B des EMBL/DESY in Hamburg gemessen werden. In allen Fällen diente ein Imagingplatesystem von Mar Research (Hamburg) als Detektor. Ausgewertet und skaliert wurden die Daten mit dem HKL-Programmpaket [Otwinowski & Minor, 1997]. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Um einen möglichst vollständigen Datensatz zu erhalten, mußten am Synchrotron für die hochaufgelösten Kristalle von *Bc*-Csp L66E vier und für *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E drei Datensätze in unterschiedlichen Auflösungsbereichen gesammelt und zu je einem Datensatz zusammengeführt werden. Die Variation des Auflösungsbereiches erfolgte durch unterschiedlichen Abstand des Kristalls vom Detektor und unterschiedlicher Belichtungszeit. Mit Ausnahme des *Bc*-Csp L66E gehören die Kristalle zur Raumgruppe $I4_1$ und sind isomorph

4. Strukturanalyse ortsgenau mutierter Kälteschockproteine

	Bc-Csp				
	R3E ¹	E46A	L66E	R3E/E46A/L66	V64T/L66E/67A
Kristallisationsbedingung	30% PEG 6000 100 mM Na- Citrat pH 5,6 200 mM (NH) ₂ SO ₄	62% MPD 100 mM Na- Hepes pH 7,5	56 % MPD 100 mM Na- cacodylat pH 6,5	54% MPD 100 mM Na- cacodylat pH 6,5	20% PEG 8000 100 mM Na- cacodylat pH 6,5 200 mM NaCl
Temperatur [°C]	4	4	20	4	20
Wachstumszeit	3 Wochen	4 Wochen	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen
Kristallgröße [µm]	600 × 150 × 150	500 × 200 ×	400 × 400 × 400	600 × 300 × 300	400 × 300 × 100
Raumgruppe	I4 ₁	I4 ₁	P3 ₁ 2 ₁	I4 ₁	I4 ₁
Einheitszelle [Å]	a = 77,12 c = 48,26	a = 77,44 c = 46,77	a = 51,58 c = 101,15	a = 76,86 c = 48,02	a = 76,42 c = 47,46
Auflösung [Å]	15 - 1,40	28 - 1,80	20 - 1,27	20 - 1,32	28 - 1,80
Vollständigkeit [%] alle / äußere Schale	96,0 / 92,6	94,7 / 68,3	97,5 / 94,7	99,4 / 97,7	75,9 / 39,6
Redundanz	5,4	3,1 / 1,7	3,5 / 2,5	2,7 / 2,0	2,1 / 1,2
I/σ(I) alle / äußere Schale	24,5 / 2,6	17,9 / 1,1	41,4 / 1,0	34,0 / 1,0	19,1 / 1,2
B Faktor nach Wilson	17,3	23,7	15,7	15,7	21,6
R(sym) ² [%] alle / äußere Schale	4,4 / 32,9	3,5 / 29,7	2,4 / 18,5	3,8 / 43,4	5,1 / 33,9

¹[Müller U., 1999], ²Glg. 7

Tab. 1) Kristallisation und Datensammlung

sowohl zueinander als auch zum Wildtyp *Bc*-Csp. Dagegen führte die Auswertung der Mutante *Bc*-Csp L66E zu einem hexagonalen primitiven Bravaisgitter und der Raumgruppe $P3_121$. In beiden Kristallformen sind zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit.

Lösung des kristallographischen Phasenproblems

Für die Lösung der Strukturen diente die Wildtypstruktur des *Bc*-Csp [PDB-Code 1C9O; Mueller et al 2000] als Modell. Dafür wurden die Wasser und andere Heteroatome sowie alternative Konformationen der Seitenketten entfernt und die Konformation mit der höchsten Besetzung belassen. Zusätzlich wurden die mutierten Aminosäuren in dem Programm O [Jones et al., 1991] gegen die entsprechenden in der Mutante ausgetauscht und in einer Standardkonformation positioniert.

Bei drei der vier Mutantenstrukturen konnte die Isomorphie zum Wildtyp direkt zur Strukturlösung ausgenutzt werden. Die Verfeinerung der drei isomorphen Strukturen begann mit einer Verfeinerung nach dem Prinzip des starren Körpers (rigid-body-refinement) im Programm AMoRe [CCP4, 1994; Navazza, 1994]. Dabei wurden die beiden Moleküle jeweils als einzelne starre Körper behandelt.

Die Struktur der Mutante *Bc*-Csp L66E wurde mittels molekularen Ersatzes gelöst. Dabei wurde das Programm EPMR [Kissinger et al., 1999] verwendet. Mit Hilfe des Matthews-Koeffizienten V_M war abgeschätzt worden, daß die asymmetrische Einheit aus zwei Molekülen besteht (V_M für ein Molekül $5,27 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, für zwei Moleküle $2,63 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ und für drei Moleküle $1,76 \text{ \AA}^3/\text{Da}$). Da eine prinzipiell ähnliche Struktur erwartet wurde, diente auch hier das Dimer der *Bc*-Csp-Struktur als Modell. Damit konnte die Struktur aber nicht gelöst werden. In einem zweiten Versuch wurde nur ein Molekül verwendet (Molekül A von *Bc*-Csp) und dann nach der Lage des zweiten Moleküls in der Einheitszelle gesucht. Dabei wurden erst die Rotations- und Translationsparameter für ein Molekül bestimmt und dann diese Werte für das zweite Molekül gesucht. Das führte zu einem initialen R-Wert von 42,4% und einem Korrelationskoeffizienten von 62,1 % in einem Auflösungsbereich von 15 bis 4 Å. Eine erste Durchsicht der Elektronendichte zeigt, daß sich hier eine andere Dimerengeometrie in der asymmetrischen Einheit ausgebildet hat.

Verfeinerung und Qualität der Modelle

Die Strukturen von *Bc*-Csp L66E und *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E wurden mit SHELXL [Sheldrick & Schneider 1997] und REFMAC [Murshudov et al., 1997] verfeinert. Der Erfolg der Verfeinerung wurde einerseits optisch durch regelmäßige Inspektion der Elektronendichte verfolgt sowie im wesentlichen durch den Verlauf von R/R(free) beurteilt. Die bei der

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

Auflösung zu erwartende Möglichkeit alternativer Konformationen wurde anhand der Elektronendichte im Modell überprüft. Das Verhältnis der Besetzungsdichte alternativer Konformationen wurde mit SHELXL berechnet. Zur weiteren Anpassung der Modelle an die gemessenen Beugungsdaten wurden Wassermoleküle eingeführt. Das Daten/Parameterverhältnis ließ eine anisotrope Verfeinerung der atomaren Auslenkungsparameter (ADP, auch *B*-Faktoren) zu. Der finale Verfeinerungsschritt wurde mit REFMAC unter Einbeziehung der von SHELXL berechneten Besetzungsdichten für die alternativen Konformationen durchgeführt. Die nichtkristallographische Symmetrie fand keine Beachtung.

Die Verfeinerung von *Bc*-Csp L66E endete mit einem R/R(free) von 15,8 % / 18,9 % in einem Auflösungsbereich von 8 bis 1,27 Å und für *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E von 13,9 % / 18,1 % in dem gemessenen Auflösungsbereich von 20 bis 1,32 Å.

Die beiden Strukturen *Bc*-Csp E46A und *Bc*-Csp V64T/L66E/67A wurden mit REFMAC [Murshudov et al., 1997] verfeinert. Die Auflösung der Strukturen war ausreichend, um auf die nichtkristallographische Symmetrie bei der Verfeinerung verzichten zu können. Die *B*-Faktoren wurden isotrop verfeinert. Nach Einführung von Wassermolekülen und alternativen Konformationen konnten die Strukturen auf finale R/R(free)-Werte von 18,5 % und 23,4 % bzw 19,3 % und 24,6 % verfeinert werden. Auftretende alternative Konformationen wurden entsprechend im Modell ergänzt. Die Besetzungsdichte wurde anhand der *B*-Faktoren abgeschätzt.

	<i>Bc</i> -Csp			
	E46A	L66E	R3E/E46A/L66E	V64T/L66E/67A
hochfavorisierte Region	101	102	103	103
favorisierte Region	5	4	3	5
zusätzlich erlaubte Region	0	0	0	0
nicht erlaubte Region	0	0	0	0
Nicht Glycin- und Prolinreste	106	106	106	108
Endreste (ohne Gly)	4	4	4	4
Glycine	20	20	20	20
Proline	2	2	2	2
Total	132	132	132	134

Tab. 2) Statistik des Ramachandran-Diagramms

4. Strukturanalyse ortsgerechtet mutierter Kälteschockproteine

	<i>Bc-Csp</i>				
	R3E ¹	E46A	L66E	R3E/E46A/L66E	V64T/L66E/67A
Auflösungsbereich [Å]	15-1,4	28-1,8	8-1,27	20-1,32	28-1,80
Anzahl an Reflexen	26.847	12.265	40.672	32.610	9.838
<i>R</i> (work) / <i>R</i> (free) [%]	13,9 / 20,5	18,5 / 23,4	15,8 / 18,9	13,9 / 18,1	19,3 / 24,6
Reste mit mult. Konformation	11	6	24	13	8
Proteinatome	1083	1049	1147	1097	1066
Wassermoleküle / halb besetzt	253 / 63	126 / -	182 / 8	271 / 18	120 / 1
Metallionen	1 Na ⁺	-	1 Na ⁺	1 Na ⁺	-
Mittlere <i>B</i> -Werte [Å ²]					
Hauptkettenatome A / B / A+B	16,4 / 22,1 / 19,2	22,2 / 28,5 / 25,4	21,5 / 23,9 / 22,7	14,2 / 18,1 / 16,2	24,0 / 29,6 / 25,8
Seitenkettenatome A / B / A+B	22,1 / 26,8 / 24,4	28,1 / 33,5 / 30,7	27,1 / 29,4 / 28,3	19,2 / 23,0 / 21,0	30,8 / 36,8 / 33,7
alle Proteinatome A / B / A+B	19,4 / 24,5 / 21,9	25,2 / 30,9 / 28,0	24,5 / 26,9 / 25,7	16,9 / 20,6 / 18,7	27,4 / 33,2 / 30,3
alle anderen Atome	34,1	36,0	43,3	34,2	33,7
alle Atome	24,2	29,0	28,1	22,0	30,6
RMSD Bindungslängen [Å]	0,007	0,011	0,018	0,015	0,011
RMSD Bindungswinkel [°]	0,023 ²	2,5	2,7	2,5	2,7
Koordinatenfehler ³ [Å]	0,032 ⁴	0,04	0,05	0,16	0,18

¹[Müller, 1999], ²ausgedrückt als 1-3 Distanz [Å], ³Diffraction-component precision index, DPI [Cruickshank, 1999], ⁴ estimated standard deviation, esd [Sheldrick & Schneider, 1997]

Tab. 3) Statistik der Strukturverfeinerung

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

Die verfeinerten Modelle wurden hinsichtlich stereochemischer Kriterien mit den Programmen PROCHECK [Laskowski et al., 1993] und WHATCHECK [Hoof et al., 1996] analysiert. Alle Strukturen zeigten Werte in einem Bereich, wie sie für Strukturen mit diesen Auflösungen erwartet werden (Tab. 3). Alle Reste liegen im Ramachandran-Diagramm in erlaubten oder favorisierten Bereichen (Tab. 2).

Bc-Csp E46A

Die Struktur konnte im Bereich von 20 bis 1,8 Å verfeinert werden. Insgesamt wurden 126 Wasser in die Elektronendichte modelliert. Das Proteinerückgrat konnte vollständig beschrieben werden. Als problematisch ist der N-terminale Bereich des Moleküls B sowie im weiteren der Schleifenbereich der Reste 21 bis 23 anzusehen. Sie zeichnen sich durch hohe *B*-Faktoren aus. Desweiteren konnte die Seitenkette des Rests 21 an Hand der Elektronendichte nicht beschrieben werden. Für die Seitenkettenatome war keine interpretierbare Dichte vorhanden. Die RMSD zwischen den beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit beträgt für die α -Positionen 0,41 Å.

Bc-Csp L66E

Für diese Mutante wurden Daten im Bereich von 28 bis 1,28 Å gesammelt. Im Verlauf der Auswertung zeigte sich, daß aber nur Daten von 8 bis 1,28 Å verwendet werden konnten. Eine mögliche Ursache könnte in der relativ langen Exposition des Kristalls mit intensiver Synchrotronstrahlung (ca. 16 h) und den dadurch hervorgerufenen Strahlenschäden liegen. Der bemerkenswerteste Unterschied ist, daß diese Mutante in einer anderen Raumgruppe kristallisiert und eine andere Anordnung der Moleküle zueinander in der asymmetrischen Einheit zeigt (Abb. 9).

In das Modell wurden 1147 Proteinatome, 182 vollbesetzte und 8 halbbesetzte Wasser eingebaut. Zusätzlich konnte ein Natriumion in der Struktur im Molekül A identifiziert werden. Es tritt an der gleichen Position auf wie in *Bc-Csp*.

Die RMSD zwischen den beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit beträgt für die α -Positionen 0,30 Å. Die größte Abweichung besteht in den C-terminalen Glu66. Dieser Rest ist im Molekül A im Vergleich zu Molekül B als auch zu allen anderen Strukturen gedreht.

Bc-Csp E3R/E46A/L66E

Diese Mutante konnte im vollen Auflösungsbereich von 28 bis 1,32 Å verfeinert werden. Die Mutante zeigt, daß die Kristallisierbarkeit, Auflösung und Thermostabilität eines Proteins in den untersuchten Systemen nicht miteinander verknüpft sind. Diese Mutante ist weniger stabil, als *Bs-CspB* und die davon abgeleiteten Mutanten, die nicht zufriedenstellend kristallisiert werden konnten.

Das Modell enthält 1097 Proteinatome, 271 vollbesetzte und 18 halbbesetzte Wasser. Auch hier

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

konnte ein Natriumion in der Elektronendichte beschrieben werden. Es ist auch im Molekül A an der selben Position wie in *Bc*-Csp lokalisiert. Die beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit unterscheiden sich um eine RMSD von 0,35 Å.

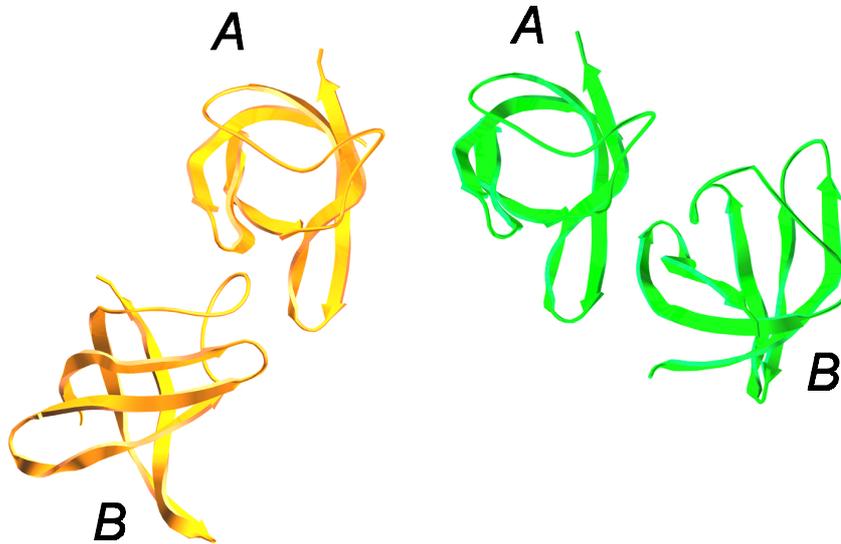


Abb. 9) Anordnung der Dimeren in der asymmetrischen Einheit von *Bc*-Csp in gelb und *Bc*-Csp L66E in grün, bei gleicher Orientierung von Molekül A.

***Bc*-Csp V64T/L66E/67A**

Diese Struktur konnte ebenfalls in dem Bereich von 28 bis 1.8 Å verfeinert werden. Insgesamt leidet die Qualität der Dichte an der mangelnden Vollständigkeit der Beugungsdaten, besonders in den äußeren Auflösungsbereichen.

Das verfeinerte Modell besteht aus 1066 Proteinatomen und 121 Wassern. Ein Wasser ist auf einer Zellachse lokalisiert. Die beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit unterscheiden sich um eine RMSD von 0,45 Å.

Die eindeutige Beschreibung von Natriumionen in den Strukturen ist auf die hochaufgelösten Strukturen beschränkt. Auch scheint sie mit der höheren Genauigkeit, mit der die einzelnen Moleküle bestimmt worden sind, angezeigt durch die geringeren *B*-Faktoren, zu korrelieren. So konnte in den hochaufgelösten Strukturen der Mutanten in den Molekülen B kein Natriumion identifiziert werden, wie es in der Struktur von *Bc*-Csp der Fall ist. Der Unterschied zwischen der Elektronendichte eines Natriumions und eines Wassermoleküls, beide repräsentieren 10 Elektronen, ist marginal und im wesentlichen nur anhand der Koordinationssphäre zu erkennen.

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

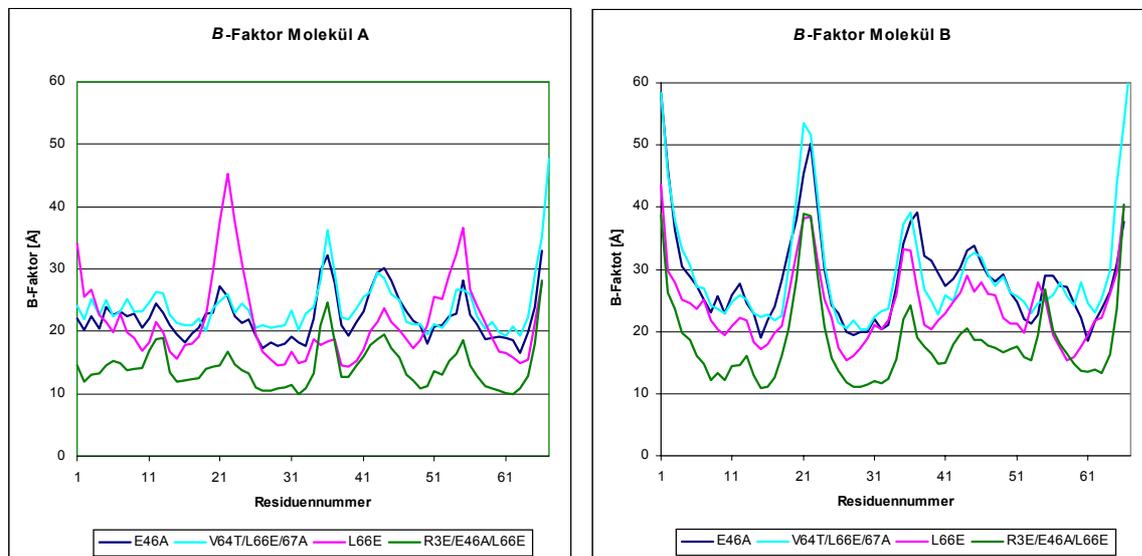


Abb. 10) *B*-Faktor-Verteilung in den *Bc*-Csp Mutanten. Dargestellt sind die mittleren isotropen *B*-Faktoren der Hauptkettenatome. Auffällig ist die Abweichung von *Bc*-Csp L66E um Rest 21 im Molekül A, die sich auf Kristallpackungseffekte in den unterschiedlichen Raumgruppen zurückführen läßt.

4.2. Diskussion

Die Ursachen der erhöhten Thermostabilität von Proteinen aus (hyper)thermophilen Organismen ist schon lange Gegenstand der Forschung. Ausgehend von den Arbeiten über Thermolysin, Ferredoxine und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase [Matthews et al., 1974; Perutz & Raidt, 1975; Argos et al., 1979] sind heute viele Daten (hyper)thermophiler Proteine und ihrer mesophilen Homologen bekannt. Dabei scheinen die Proteine/Organismen unterschiedliche Strategien zu verfolgen, um ihre Thermostabilität zu erhöhen. So nutzen sie Mechanismen wie Optimierung der Sekundärstruktur, Deletion und Verkürzung von Schleifen, Vermeidung flexibler Termini oder Änderungen in Untereinheiten- oder Domänengrenzflächen wie auch Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung [Auerbach et al., 1997, 1998; Korndörfer et al., 1995; Hennig et al., 1995, Kumar et al., 2000a; 1997; Yip et al., 1995; Macedo-Ribeiro et al., 1996; Pfeil et al., 1997; Russell et al., 1997]. Eine postulierte Erhöhung der Packungsdichte konnte nicht im allgemeinen verifiziert werden [Karshikoff & Ladenstein, 1998]. Viele thermostabile Proteine haben eine erhöhte Anzahl von geladenen Seitenketten auf der Oberfläche, und es wird diskutiert, inwieweit das Ionennetzwerk auf der Proteinoberfläche zur Thermostabilität beiträgt und welchen Einfluß eine erhöhte Anzahl an Wasserstoff- und Salzbrücken haben könnte [Auerbach et al., 1998; Elcock, 1998; Korndörfer et al., 1995; Haney

4. Strukturanalyse ortsgerechtet mutierter Kälteschockproteine

et al., 1999; Hennig et al., 1997; Karshikoff & Ladenstein, 1998; Kumar et al., 2000a; Jaenicke & Böhm, 1998; Xiao & Honig, 1999; Yip et al., 1995, 1998]. Dem Einfluß von Oberflächenladungen, deren Verteilung, Einbindung in Salzbrücken und dem Ionennetzwerk scheint eine zentrale Rolle zuzukommen. Dies wird in vergleichenden Studien diskutiert [Elcock, 1998; Grimsley et al., 1999; Kumar et al, 2000b; Kumar & Nussinov, 1999, 2000b; Jaenicke & Böhm, 1998; Spassov et al., 1994, 1995, 1997; Xiao & Honig 1999]. Ein allgemeingültiger Trend läßt sich nicht ausmachen, und es scheint, daß die Stabilisierung individuell an jedem Beispiel diskutiert werden muß.

Alle beobachteten Moleküle in den einzelnen Mutanten haben die gleiche prinzipielle Struktur wie *Bc*-Csp [Mueller et al., 2000]. Die Sekundärstruktur ist über alle fünf Mutanten hinweg nahezu perfekt erhalten geblieben. Wie auch in *Bs*-CspB und *Bc*-Csp ist die Polypeptidkette zu einem fünf-strängigen β -Faß (β -barrel) gefaltet, was charakteristisch für den OB-Faltungstyp (oligonucleotide/oligosaccharide bindings fold) [Murzin et al., 1993]. Die fünf β -Stränge β 1 bis β 5 werden durch vier Schleifen (Loops) L1 bis L4 verbunden (siehe Abb.1). Das in den Kristallstrukturen auftretende Dimere scheint nicht von biologischer Relevanz zu sein. So sind die durch eine nichtkristallographische zweizählige Drehachse verbundenen Moleküle in mehr Kontakte miteinander involviert als die, die durch die kristallographische Symmetrie miteinander verbunden sind. Die Kontaktflächen sind im wesentlichen durch geladene Reste besetzt. In den unterschiedliche Raumgruppen und auch in den beiden *Bc*-Csp und *Bs*-CspB Typen [Mueller et al., 2000; Schindelin et al., 1994] findet man unterschiedliche Dimerengeometrien. In Lösung konnte ebenfalls gezeigt werden, daß es offenbar keine dimere Form von *Bc*-Csp gibt [Perl et al. 1998].

Auffällig in der Struktur ist, daß die in der Sequenz weit auseinanderliegenden mutierten Reste Arg3, Ala46, Leu66 und der C-Terminus in der Struktur räumlich nahe beieinander liegen und auf die β -Stränge β 1, β 4 und β 5 verteilt sind (Abb. 1). Wichtig für diese Studien ist, daß der durch Mutationen veränderte Teil des Proteins nicht in direkte Kristallkontakte eingebunden ist. Ein systematischer Vergleich der Strukturen zeigt, daß die globale Struktur durch die Mutationen nicht beeinflusst wird. Die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) zwischen den $C\alpha$ Atomen nach einer Überlagerung beträgt weniger als 0,2 Å für die Moleküle A und ist unter 0,25 Å für Moleküle B in den $I4_1$ -Strukturen. Dies reflektiert die höhere Genauigkeit der Koordinaten in Molekül A, ausgedrückt durch die kleineren B -Faktoren. Dies ist aber nicht signifikant in Bezug auf den Koordinatenfehler der Strukturen (siehe Tab. 2). Bemerkenswert ist, daß die Überlagerung der beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit zu einer größeren Abweichung führt (siehe Tab. 4 Spalte "selbst") als die mittleren Abweichungen zwischen dem Molekül A bzw. B zu dem korrespondierenden Molekül A bzw. B in einer der Mutantenstrukturen. Die Struktur von *Bc*-Csp L66E stimmt mit dem generellen Trend überein, zeigt aber im Detail Differenzen, die von der unterschiedlichen Packung in

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

P3,21 herrühren.

RMSD [\AA] $C\alpha$ / alle Atome	selbst [\AA]	gegen <i>Bc</i> -Csp [\AA]		
		A/A	B/B	AB/AB
<i>Bc</i> -Csp	0,406 / 0,858	-	-	-
<i>Bc</i> -Csp R3E	0,363 / 0,758	0,093 / 0,418	0,234 / 0,591	0,216 / 0,517
<i>Bc</i> -Csp E46A	0,413 / 0,716	0,081 / 0,301	0,130 / 0,383	0,127 / 0,356
<i>Bc</i> -Csp L66E	0,303 / 0,719	0,371 / 0,789	0,443 / 0,949	-*
<i>Bc</i> -Csp R3E/E46A/L66E	0,353 / 0,816	0,105 / 0,477	0,243 / 0,577	0,241 / 0,547
<i>Bc</i> -Csp V64T/L66E/67A	0,446 / 0,805	0,174 / 0,490	0,239 / 0,623	0,290 / 0,616

Tab. 4) RMS-Abweichungen der Überlagerung der beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit (Spalte selbst) und der Moleküle A bzw. B aus *Bc*-Csp gegen das entsprechende in den Mutanten. *Aufgrund der unterschiedlichen Packung in der asymmetrischen Einheit keine sinnvolle Überlagerung möglich.

Diese zeigt aber auch, daß die Abweichungen, die von einer unterschiedlichen Packung herrühren, größer sind, als die, die durch die Mutation in der Region von 3 und 66 in die Struktur eingebracht worden sind. So scheinen die Moleküle A und B Beispiele für ein Familie von energetisch ähnlichen Subzuständen zu sein, die durch ihre möglichen Gitterkontakte selektiert werden. Es ist unklar, wieviel solcher Zustände beobachtet werden können. Sie erleichtern aber die Interpretation von strukturellen und thermodynamischen Konsequenzen durch die Mutationen in der Hinsicht, daß nur lokale Effekte berücksichtigt werden müssen. Im einzelnen sollen hier alle strukturell charakterisierten Mutanten, einschließlich von *Bc*-Csp R3E, diskutiert werden.

***Bc*-Csp R3E**

Die Position 3 ist von zentralem Interesse, da sie für den größten Unterschied in der Thermostabilität zwischen den beiden Proteinen *Bc*-Csp und *Bs*-CspB verantwortlich ist. In *Bc*-Csp ist der Rest an Position 3 durch ein positiv geladenes Arginin besetzt, während in *Bs*-CspB die Position mit einem negativ geladenen Glutamat besetzt ist. Der Austausch in *Bc*-Csp von Arg3 zu Glu3 reduziert den T_M -Wert von 76,9°C auf 59,1°C und die Freie Energie der Entfaltung ΔG_D um 11,5 kJ·mol⁻¹ (gemessen in 0,1 M Natriumcacodylat pH 7,0 bei 70 °C) [Perl et al., 2000]. Somit ist dieser Austausch für rund 70% der Differenz in der Stabilität von 15,8 kJ·mol⁻¹ (gemessen unter den selben Bedingungen) verantwortlich.

4. Strukturanalyse ortsgerechtet mutierter Kälteschockproteine

Die Kristallstruktur ist im Globalen identisch geblieben verglichen mit *Bc-Csp* [Mueller et al., 2000]. Die Unterschiede in der Thermostabilität müssen ihre Ursachen in lokalen Veränderungen um die Position 3 haben. In der Abb. 12 ist eine auf den mutierten Bereich fokussierte Darstellung von beiden Molekülen zu sehen.

In den Molekülen A und B von *Bc-Csp* unterscheiden sich die Seitenkettenkonformationen von Glu46 und im besonderen von Arg3 deutlich voneinander. So ist im Molekül B eine Anordnung vorhanden, die Arg3 erlaubt, eine Wasserstoffbrücke oder eine Salzbrücke zur Carboxylatgruppe von Glu46 einzugehen. Diese Carboxylatgruppe wiederum steht selber über den zweiten Sauerstoff durch eine Wasserstoff- oder Salzbrücke in Kontakt zu Lys5. In Molekül A ist die Situation völlig anders. Die geladenen Gruppen sind zu weit entfernt um eine Salz- oder Wasserstoffbrücke (angenommener Grenzwert für den Donor-Akzeptor-Abstand 3,5 Å) zu bilden. Der Abstand von Arg3 Nε zu Glu46 Oε2 beträgt 4,6 Å. Zwischen Arg3 Nη1 und Glu46 Oε2 wird ein gut definiertes, verbrückendes Wassermolekül mit einen B-Faktor von 28,4 Å² gefunden. In beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit der *Bc-Csp* Struktur werden einige van der Waals-Kontakte mit C-C Abständen von $\geq 3,5$ Å gefunden.

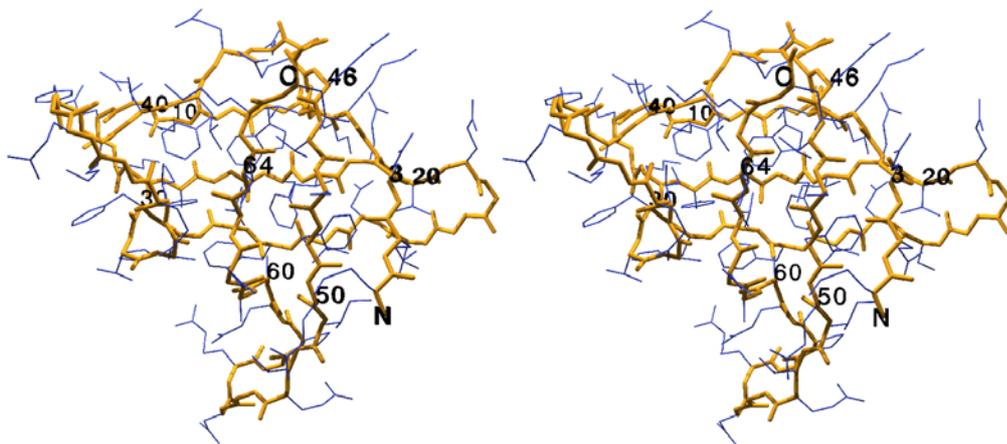


Abb. 1) Stereographische Darstellung von *Bc-Csp* R3E

In der Struktur des *Bc-Csp* R3E ist im Molekül A die Carboxylatgruppe von Glu3 zum Lösungsmittel hin orientiert und gut solvatisiert. Sie scheint nicht in polare intramolekulare Wechselwirkungen einbezogen zu sein. Die Konformation von Glu3 und Leu66 ist sehr ähnlich in beiden Molekülen. Wie auch in *Bc-Csp* findet man van der Waals Wechselwirkungen zwischen Leu66 und dem Rest auf Position 3. Da Glutamat kürzer als Arginin ist, wird nur ein Kontakt zwischen Glu3 Cδ und Leu66 Cδ1 beobachtet. Somit ist die Interaktion abgeschwächt. In Molekül B haben die Reste 3 und 46 alternative Konformationen. In der Abb. 12 sind nur die Hauptkonformationen mit einer Besetzung von 80 bzw. 85 % dargestellt.

Aus den thermodynamischen Analysen weiterer Mutanten läßt sich weitestgehend die Herkunft

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

der Stabilisierung und ihrer Beträge klären. Durch die Mutation von Arg3→Glu ändert sich das Stabilitätsverhalten bezüglich der Salzabhängigkeit von *Bc*-Csp-typisch zu *Bs*-CspB-typisch, wie auch bei der entsprechenden reziproken Mutation. Die starke Stabilisierung durch Arg3 hat drei Quellen. So kann sie auf die günstigen Wechselwirkungen der positiv geladenen Guanidiniumgruppe von Arg3, auf die Eliminierung der ungünstigen Kontakte von Glu3 und auf hydrophobe Wechselwirkungen durch den aliphatischen Anteil von Arg3 zurückgeführt werden. Die Coulomb'sche Abstoßung von Glu3 und Glu46, wie sie auch in den thermodynamischen Studien gefunden wird, reflektiert die Vergrößerung des Abstandes zwischen Glu3 und Glu46.

In der Tat läßt die Mutation von Arg3→Lys die Thermostabilität und das salzabhängige Verhalten weitestgehend unverändert. Das zeigt eindeutig, daß eine Ladungsänderung für die starke Stabilisierung der Csp's verantwortlich ist.

Durch die Mutation von Arg3→Leu wird ungefähr $4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ an Stabilität verloren. Das reflektiert den wahrscheinlich vorteilhaften elektrostatischen Beitrag der positiven Ladung von Arg3.

Die Abnahme an van der Waals-Kontakten mag auch den Verlust von $4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ von nicht polarer Stabilisierung erklären [Perl 2001], der mit der Arg3→Glu Mutation verbundenen ist. Dies läßt sich aus der Mutation Arg3→Ala erklären. Sie ist ungefähr $8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ weniger stabil als *Bc*-Csp und ungefähr $4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ weniger stabil als die Mutante *Bc*-Csp R3L.

***Bc*-Csp E46A**

Diese Mutation läßt die Thermostabilität weitestgehend unverändert. Dies zeigt, daß die starke Coulomb'sche Destabilisierung durch die Mutation Arg3→Glu nicht ursächlich mit dem Verlust einer möglichen Salzbrücke verbunden ist. Solch eine Salzbrücke sollte natürlich auch bei einer Glu46→Ala-Mutation zerstört werden. Diese Mutation müßte ebenfalls stark destabilisierend wirken.

Die Kristallstruktur von *Bc*-Csp E46A zeigt in beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit weitestgehend ähnliche Seitenkettenkonformationen für die Residuen an den Positionen 3, 46 und 66. Lediglich die Seitenkettenanordnung der Reste Arg3 und Lys5, die im allgemeinen flexibel sind, variiert leicht zwischen den beiden Molekülen. *Bc*-Csp E46A ist bemerkenswert ähnlich zu den beiden Molekülen A und B in *Bc*-Csp (siehe Tab. 4). Lediglich das angesprochene Arg3 nimmt eine andere Konformation in Molekül B ein. In *Bc*-Csp E46A ist es zum Lösungsmittel hin orientiert und zeigt erhöhte B-Werte von 31 bis 38 \AA^2 bzw. 68 bis 73 \AA^2 in Molekül A und B verglichen zum *Bc*-Csp.

Die Kombination von Arg3→Glu und Glu46→Ala zeigt eine moderate Stabilisierung im Bezug auf die Einzelmutante Arg3→Glu, wie auch die Stabilisierung durch steigende NaCl-

4. Strukturanalyse ortsgerechteter mutierter Kälteschockproteine

Konzentrationen geringer wird. Das zeigt, daß eine abstoßende Kraft vorhanden ist, wenn beide Positionen 3 und 46 mit Glutamat besetzt sind. Im Gegensatz dazu gibt es keinen Hinweis auf eine attraktive Anziehung zwischen Arg3 und Glu46 in *Bc*-Csp.

***Bc*-Csp L66E**

Die Leu66→Glu-Mutation destabilisiert um $5,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Dieser Effekt ist im Unterschied zur Arg3→Glu-Mutation salzunabhängig [Perl et al., 2000]. Das zeigt, daß die Destabilisierung nicht durch die Einführung einer repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung, sondern durch einen Verlust an Hydrophobizität hervorgerufen wird. In *Bc*-Csp L66E ist Arg3 eingebunden in ein Netz von umfangreichen und flexiblen Wasserstoffbrücken oder elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Carboxylatgruppen von Glu46, Glu66 und dem C-Terminus (Abb. 12). In dieser Mutante sind alle drei interessierenden Positionen mit geladenen Resten besetzt. Auch hier zeigen die Seitenketten von Arg3, Glu46 und Glu66 als auch die C-terminale Carboxylatgruppe unterschiedliche Orientierungen und Wechselwirkungen in Molekül A und B. Zusätzlich unterscheidet sich die Proteinrückgratkonformation in beiden Moleküle von *Bc*-Csp L66E.

Im Molekül A formt die Guanidiniumgruppe von Arg3 elektrostatische Kontakte mit einer perfekten Geometrie zu Glu46 O ϵ 1 von N η 2 aus und dem C-terminalen Carboxylatsauerstoff von N η 1 und N η 2 aus. Die Wechselwirkung mit der C-terminalen Carboxylatgruppe ist durch eine Veränderung der Rückgratkonformation im Bereich des C-Terminus möglich geworden. Als Konsequenz ist der Abstand der C β -Atome der Residuen 46 und 66 auf $6,8 \text{ \AA}$ gestiegen, während er in den anderen Strukturen in der Nähe von 4 \AA liegt. Die Carboxylatgruppe von Glu66 ist zur Hydroxylgruppe des Ser48 hin orientiert. Sie wird durch eine Wasserstoffbrücke kontaktiert.

Das Molekül B ist in der Rückgratkonformation im C-terminalen Bereich dem Molekül B von *Bc*-Csp als auch in der Seitenkettenkonformation von Arg3 sehr ähnlich. In ein multiples Netz an Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen ist Arg3 gemeinsam mit Glu46 und Glu66 eingebunden. Bemerkenswert ist der Kontakt von Glu46 O δ 1 und Glu66 O δ 1 im Abstand von $2,5 \text{ \AA}$. Dieser Abstand indiziert eine starke Wasserstoffbrücke der Art O ...O. Das erfordert die Protonierung einer der beiden Carboxylgruppen bei einem pH-Wert von 6,5, dem pH-Wert der Kristallisationsbedingung. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden mit dem Programm MEAD [Demchuk et al., 2000] mikroskopische pK_a-Werte berechnet. Grundlage war ein vereinfachtes Strukturmodell, das nur die Hauptkonformere von alternativen Seitenketten enthielt. Zur Berechnung der pK_a-Werte mit MEAD ist es notwendig Wasserstoffe in das Modell einzufügen. Dies erfolgte mit einer entsprechenden Bibliothek aus X-Plor 3.8 [Brünger et al., 1992a] in Standardgeometrie für Winkel und Abstände der Wasserstoffe. Ladungen und Radien der Atome wurden Delphi [Nicholls et al., 1991] entnommen. Als Ergebnis wurden für Glu46 und Glu66 im Molekül A pK_a-Werte von 5,0 bzw 3,5 berechnet. Für Molekül B lauten

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

diese 5,4 und 7,2. Das legt in der Tat nahe, daß eine Wasserstoffbrücke in Molekül B zwischen Glu46 und Glu66 gebildet wird, wobei Glu66 O δ 1 protoniert ist und als Donor fungiert, während Glu46 O δ 1deprotoniert ist und als Akzeptor wirkt.

Es sollte angemerkt werden, daß in beiden Molekülen A und B die Seitenkette von Glu46 in zwei alternativen Konformationen gefunden wird. Es sind aber nur die Hauptkonformere in Abb. 12 dargestellt und im weiteren diskutiert worden. Somit bleibt unklar, welche der komplexen Wechselwirkungen zwischen Arg3, Glu46, Glu66 und der C-terminalen Carboxylgruppe zur Proteinstabilität beitragen. In den thermodynamischen Studien [Perl & Schmid, 2001] war es nicht möglich, einen ionischen Beitrag der Leu66→Glu-Mutation oder eine Coulomb'sche Abstoßung zwischen den beiden Glutamaten an den Positionen 46 und 66 zu identifizieren.

Bc-Csp R3E/E46A/L66E

Diese Tripelmutante stellt eine Kombination aus den drei Einzelmutationen Arg3→Glu, Glu46→Ala und Leu66→Glu dar und widerspiegelt an diesen Positionen das mesophile *Bs-CspB*. Die drei Mutationen führen zu einer starken Destabilisierung von $\Delta\Delta G_D = 17,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Somit ist die Tripelmutante in etwa so stabil, wie *Bs-CspB*.

Bei einem paarweisen Vergleich der Moleküle A und B der Tripelmutante und *Bc-Csp* wird eine nahezu identische Konformation bis zu den C β -Atomen der Seitenketten gefunden. Die Moleküle A und B unterscheiden sich deutlich in der weiteren Anordnung der Glutamatseitenketten. Besonders der Torsionswinkel χ_2 von Glu66 ist aufgrund des Kontaktes mit der Hydroxylgruppe von Ser48 in Molekül A verdreht. Im Molekül B wird die Carboxylgruppe von Glu3 in einem O ... O-Abstand von 2,7 Å bzw 3,2 Å beobachtet. Die Berechnung von mikroskopischen pK_a-Werten mit MEAD von 4,7 bzw 6,7 für Glu3 und Glu66 (Molekül A 4,4 und 5,1) suggeriert, daß durch eine partielle Protonierung von Glu66 O δ 2 bei dem Kristallisations-pH-Wert von 6,5 eine Wasserstoffbrücke unterstützt wird. Offensichtlich sind die beiden Carboxylatgruppen in einer energetisch ungünstigen Geometrie, was partiell in der Verschiebung der pK_a-Werte für Glu66 zum Ausdruck kommt. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung einer ungewöhnlichen Flexibilität für Glu3 und Glu66 belegt. Dieses wird durch die erhöhten B-Faktoren von 43 bis 47 Å² für Glu33 und 55 bis 58 Å² für Glu66 angezeigt. Die ungünstige Anordnung der beiden Carboxylgruppen mag die experimentell beobachtete Abstoßungsenergie von 4 kJ·mol⁻¹ für Glu3 und Glu66 erklären [Perl & Schmid, 2001].

Bc-Csp V64T/L66E/67A

In *Bc-Csp* ist das C-terminale Alanin im Vergleich zu *Bs-CspB* deletiert. Das führt zu einer Veränderung der Lage der C-terminalen Carboxylatgruppe in Bezug auf den Bereich 3-46-66. Die Mutation Val64→Thr und Leu66→Glu sowie die Anfügung von Ala67 überführt den C-

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

terminalen Bereich zur Sequenz von *Bs*-CspB. Das mutierte Protein zeigt ein reduzierte Stabilität von $\Delta\Delta G_D = -6,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ relativ zu *Bc*-Csp und hat eine Schmelztemperatur von $66,6^\circ\text{C}$. Dieser Verlust an Stabilität ist im wesentlichen auf die Leu66→Glu Mutation zurückzuführen, die einen Beitrag von $-5,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ leistet.

Die Verschiebung der C-terminalen Carboxylatgruppe durch die Einführung von Ala67, führt zu keiner sichtbaren Veränderung der Struktur. Wie in *Bc*-Csp ist sie nicht in intramolekulare Wechselwirkungen einbezogen. Die Mutation von Val64→Thr hat keinen Effekt auf die Struktur. Verglichen mit der Struktur von *Bc*-Csp L66E werden einige Unterschiede beobachtet. Durch die Verschiebung des C-Terminus in der Tripelmutante ist die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arg3 und der C-terminalen Carboxylatgruppe nicht möglich. Alternativ interagiert Arg3 in der Tripelmutante mit der Seitenkette von Glu66, welches wie in *Bc*-Csp L66E in Kontakt zur Hydroxylgruppe von Ser48 steht. In der hier nicht gezeigten alternativen Konformation von Arg3, ist Arg3 gedreht und interagiert mit der Carboxylatgruppe von Glu46. Im Molekül B von *Bc*-Csp V64T/L66E/67A ist die Wasserstoffbrücke zwischen Ser48 und Glu66 verloren gegangen. Dafür wird aber eine tendenziell stärkere elektrostatische Wechselwirkung zwischen Arg3 und Glu66 beobachtet. Das wird durch kürzere N ... O-Abstände sowie dem Fehlen einer alternativen Konformation von Arg3 nahe gelegt. Trotz der augenscheinlich stabilen Salzbrücke haben die Reste Arg3 und Glu66 eine hohe Flexibilität. Diese wird durch ihre hohen *B*-Faktoren von ungefähr je 70 \AA^2 ausgedrückt.

Die Destabilisierung der Tripelmutante scheint ähnliche Ursprünge zu haben wie die Destabilisierung durch die Mutation von Leu66→Glu. Aus der thermodynamischen Analyse [Perl & Schmid, 2001] könnte gefolgert werden, daß die Lücke von $1,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ zwischen der Tripel- und Einzelmutante durch die Mutation von Val64→Thr bedingt ist ($1,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, Tab. 4). Die Gründe für die Destabilisierung durch die Mutation von Val64→Thr sind aber nicht aus der Struktur zu entnehmen. Die Kälteschockproteine des mesophilen *B. subtilis* und des thermophilen *B. caldolyticus* unterscheiden sich nur wenig in Sequenz [Willimsky et al., 1992; Perl et al., 1998] und Struktur [Schindelin et al., 1993; Mueller et al., 2000]. Trotzdem differieren sie stark in ihrer Thermostabilität. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden [Perl et al., 2000], daß zwei der zwölf unterschiedlichen Reste für den Unterschied von $\Delta\Delta G_D = 15,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ verantwortlich sind. Das sind Arg3 und Leu66 in *Bc*-Csp, welche in *Bs*-CspB durch Glu3 und Glu66 ersetzt sind. Die anderen zehn Unterschiede, einbezogen Glu46→Ala, Val64→Thr und die C-terminale Verlängerung A67 in *Bs*-CspB haben nur geringe Einfluß auf die Thermostabilität [Perl et al., 2000].

Um die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Thermostabilität zu klären, wurden die Kristallstrukturen zweier Einzelmutanten auf der Basis von *Bc*-Csp gelöst. Diese an den Positionen 3 und 66 sind in *Bc*-Csp mit Arginin bzw. Leucin und in *Bs*-CspB jeweils mit Glutamat besetzt. Da diese geladenen Reste in Coulomb'sche Wechselwirkungen mit Glu46 und der C-terminalen Carboxylatgruppe eingebunden sein können, wurden ebenfalls die

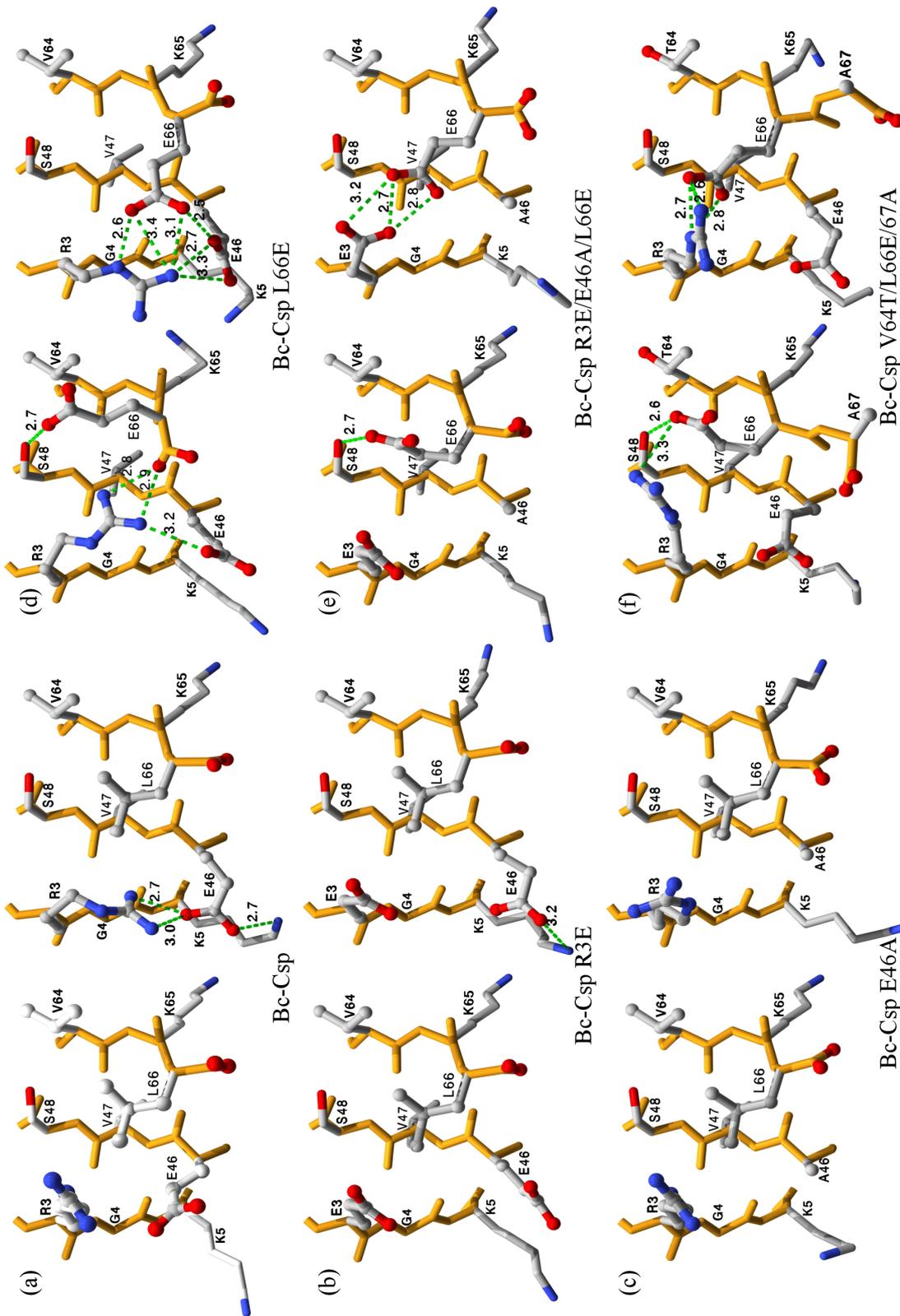


Abb. 12) Detaillierte Ansicht der mutierten Bereiche in den Kristallstrukturen von *Bc-Csp* und der Mutanten. Wasserstoff- und/oder Salzbrücken sind durch grün gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die dazugehörigen Abstände sind in Å angegeben. Es sind nur die jeweiligen Hauptkonformere abgebildet.

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

Kristallstrukturen der Mutanten *Bc*-Csp E46A, *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E sowie *Bc*-Csp V64T/L66E/67A bestimmt. Nunmehr sollen die Ergebnisse in Bezug auf die thermodynamischen Daten vieler weiterer Mutanten beider Kälteschockproteine diskutiert werden.

Die Reste 3 und 66 sind im gefalteten Protein eng benachbart. Zusammen mit Glu46 bilden sie in *Bc*-Csp einen geladenen Bereich auf der Proteinoberfläche. Im ungefalteten Zustand sollten Arg3 und Leu66 weit auseinanderliegen, da sie an unterschiedlichen Enden der Polypeptidkette liegen. Die Mutation zu Glutamat an den Positionen 3 und 66 übt wahrscheinlich durch Effekte auf die gefaltete Form von *Bs*-CspB als auch durch Änderung der Wechselwirkungen im denaturierten Protein [Pace et al., 2000] ihre destabilisierende Wirkung aus. Aus diesem Grunde sind die Kristallstrukturen der Mutanten wichtig für das Verständnis der Korrelation zwischen Struktur und Stabilität.

Die Kristallstrukturen der fünf *Bc*-Csp Mutanten wurden mit Auflösungen im Bereich von 1,27 und 1,8 Å gelöst und sind im Detail mit der Struktur von *Bc*-Csp mit einer Auflösung von 1.17 Å [Mueller et al., 2000] zu vergleichen. Die globale Struktur aller Mutanten ist der von *Bc*-Csp sehr ähnlich (Tab. 4). Abweichungen zwischen den einzelnen Strukturen beschränken sich auf Oberflächenschleifen und kommen am meisten in der Schleife L2, der die β -Stränge β_2 und β_3 verbindet, und in der Schleife L4, der β -Stränge β_4 und β_5 verbindet, also in Regionen, die nicht die Reste 3,46 und 66 enthalten. Es zeigt sich, daß nach einer Überlagerung die $C\alpha$ und $C\beta$ Positionen in den fünf Mutanten nahezu perfekt übereinstimmen mit Ausnahme des Moleküls A in *Bc*-Csp L66E. Hier ist das Rückgrat im C-terminalen Bereich umgelagert, um eine Salzbrückenbildung von der C-terminalen Carboxylatgruppe zur Guanidiumgruppe des Arg3 zu ermöglichen. Alle anderen Mutationen lassen die globale Struktur unverändert. Alle beobachteten strukturellen Veränderungen beziehen sich auf Rotationen der betreffenden Seitenketten und ihrer Nachbarn ab dem $C\beta$ Atom. Dies erklärt auch, warum die Effekte auf die Proteininstabilität additiv sind. Es unterstützt weiterhin die Gültigkeit der Tripelmutantenzyklen [Perl & Schmid, 2001], die auf der Annahme basieren, daß die Aminosäureaustausche keine Effekte langer Reichweite auf die Proteinstruktur haben.

In der Kristallstruktur von *Bc*-Csp [Mueller et al., 2000] und allen fünf Mutanten werden zwei unabhängige Moleküle in der asymmetrischen Einheit gefunden. Aufgrund der hohen Auflösung konnten die beiden Moleküle ohne Verwendung der nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) verfeinert werden [Kleywegt & Jones 1995]. Das Vorhandensein von zwei unabhängigen Molekülen scheint auf den ersten Blick ein Problem zu sein, da es die Interpretation erschwert und auf Widersprüche zu führen scheint. Doch auf der anderen Seite kann es als ein Glücksfall betrachtet werden, da es vor zu schnellen Interpretationen bewahrt. An dieser Stelle sei auf die Unterschiede zwischen den Molekülen A und B in den jeweiligen Strukturen hingewiesen. Ausgehend von *Bc*-Csp wird ein starker destabilisierender Effekt der Mutation Glu46→Ala vorhergesagt, da das Glu46 in einem starken Coulomb'schen oder

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

	T_M (°C)	$\Delta H(T_M)$ (kJ*mol ⁻¹)	ΔG (70 °C) (kJ*mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ (70 °C) (kJ*mol ⁻¹)	ΔG in 2 M NaCl (70 °C) (kJ*mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G$ in 2 M NaCl (70 °C) (kJ*mol ⁻¹)
<i>Bc</i> -Csp	76,9 ± 0,1	245 ± 5	4,5	-	9,2	-
<i>Bs</i> -CspB	53,6 ± 0,1	193 ± 2	-11,3	15,8	0,8	8,4
<i>Bc</i> -Csp Q2L	80,9 ± 0,1	242 ± 3	6,8	-2,3	10,4	-1,2
<i>Bc</i> -Csp R3E	59,1 ± 0,1	191 ± 2	-7,0	11,5	5,0	4,2
<i>Bc</i> -Csp R3E/E21A	60,0 ± 0,1	206 ± 2	-6,8	11,3	4,6	4,6
<i>Bc</i> -Csp R3E/E46A	64,6 ± 0,1	221 ± 2	-3,7	8,2	6,9	2,3
<i>Bc</i> -Csp R3E/L66E	44,6 ± 0,1	154 ± 1	-16,2	20,7	-0,8	10,0
<i>Bc</i> -Csp R3E/E46A/L66E	50,3 ± 0,1	169 ± 2	-12,6	17,1	-0,3	9,5
<i>Bc</i> -Csp R3L	70,9 ± 0,1	233 ± 3	0,6	3,9	8,3	0,9
<i>Bc</i> -Csp R3L/E46A	72,0 ± 0,1	221 ± 2	1,2	3,3	8,0	1,2
<i>Bc</i> -Csp R3L/L66E	56,4 ± 0,1	175 ± 2	-8,3	12,8	0,9	8,3
<i>Bc</i> -Csp R3L/E46A/L66E	59,0 ± 0,1	192 ± 2	-7,1	11,6		
<i>Bc</i> -Csp R3K	76,1 ± 0,1	224 ± 3	3,7	0,8	8,6	0,6
<i>Bc</i> -Csp N11S	79,2 ± 0,1	246 ± 3	5,9	-1,4	10,1	-0,9
<i>Bc</i> -Csp Y15F	76,7 ± 0,1	237 ± 2	4,3	0,2	9,5	-0,3
<i>Bc</i> -Csp E21A	75,0 ± 0,1	242 ± 3	3,3	1,2	8,0	1,2
<i>Bc</i> -Csp G23Q	74,7 ± 0,1	249 ± 7	3,3	1,2	7,9	1,3
<i>Bc</i> -Csp S24D	77,8 ± 0,1	258 ± 5	5,4	-0,9	10,0	-0,8
<i>Bc</i> -Csp T31S	77,8 ± 0,1	250 ± 5	5,2	-0,7	10,0	-0,8
<i>Bc</i> -Csp E46A	75,4 ± 0,1	241 ± 3	3,6	0,9	8,7	0,5
<i>Bc</i> -Csp Q53E	76,1 ± 0,1	246 ± 5	4,1	0,4	9,2	0,0
<i>Bc</i> -Csp G23Q/S24D	75,9 ± 0,1	249 ± 6	4,0	0,5	8,8	0,4
<i>Bc</i> -Csp E46A/L66E	68,0 ± 0,1	217 ± 3	-1,3	5,8	3,4	5,8
<i>Bc</i> -Csp E46A/67A	75,0 ± 0,1	238 ± 2	3,3	1,2	8,3	0,9
<i>Bc</i> -Csp V64T	75,1 ± 0,1	244 ± 6	3,4	1,1	8,4	0,8
<i>Bc</i> -Csp L66E	68,9 ± 0,1	210 ± 3	-0,7	5,2	3,9	5,3
<i>Bc</i> -Csp D66L	65,3 ± 0,1	172 ± 2	-2,5	7,0	1,4	7,8
<i>Bc</i> -Csp 67A	76,9 ± 0,1	247 ± 6	4,6	-0,1	8,9	0,3
<i>Bc</i> -Csp V64T/L66E/67A	66,6 ± 0,2	189 ± 5	-2,0	6,5	3,1	6,1
<i>Bs</i> -CspB E3R	69,6 ± 0,1	219 ± 2	-0,2	-11,1	4,0	-3,2
<i>Bs</i> -CspB E3L	62,7 ± 0,1	200 ± 2	-4,6	-6,7	2,5	-1,7
<i>Bs</i> -CspB A46E	48,6 ± 0,1	166 ± 1	-13,8	2,5	0,9	-0,1
<i>Bs</i> -CspB E66L	66,6 ± 0,1	237 ± 2	-2,5	-8,8	7,6	-6,8
<i>Bs</i> -CspB E3R/E66L	74,6 ± 0,1	229 ± 3	2,9	-14,2	8,0	-7,2
<i>Bs</i> -CspB E3R/T64V/E66L	76,8 ± 0,1	230 ± 3	4,2	-15,5	8,8	-8,0

Tab. 5) Thermodynamische Daten aus den Stabilitätsstudien von Perl & Schmid [2001]

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

wasserstoffbindenden Kontakt zu Arg3 und Lys5 steht. In der Tat hat die Mutation mit einem $\Delta\Delta G_D$ von $-0.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ praktisch keinen Effekt auf die Stabilität [Perl et al., 2000]. Das mag ein Blick auf das Molekül A verständlich machen, bei dem Glu46 kaum mit den benachbarten basischen Seitenketten interagiert.

Der Vergleich von allen Strukturen in der Abb. 12 demonstriert, daß die Differenzen in den Seitenkettenkonformationen für beide Moleküle A und B in der asymmetrischen Einheit der selben Mutante und zwischen den unterschiedlichen Mutanten überraschend groß sein können. Weiter werden in einigen Strukturen alternative Konformationen für die Positionen 3, 46 und 66 als auch für die benachbarten Seitenketten gefunden, oder sie haben erhöhte B-Faktoren, die auf eine hohe Flexibilität hindeuten. Das spiegelt den Fakt wider, daß Arg3, Glu46 und Leu66 von *Bc*-Csp bzw. die korrespondierenden Reste in *Bs*-CspB auf der Oberfläche des Proteins exponiert sind. Es deutet sich weiterhin an, daß die Wasserstoffbrücken oder die ionischen Kontakte, die man in den verschiedenen Formen der Csp's beobachtet, so schwach sind, daß sie nicht den Verlust an Entropie ausgleichen können, der während der Immobilisierung der Seitenketten auftritt. Es ist möglich, daß Kristallkontakte und das Schockgefrieren der Kristalle dazu geführt haben, daß eine begrenzte Anzahl verschiedener Subzustände der Struktur beobachtet werden können. Dabei ist es unklar, ob weitere solcher Subzustände (strukturelle Polymorphie) in Lösung bei Raumtemperatur beobachtet werden könnten. Die Beobachtung der strukturellen Heterogenität und Flexibilität auf der Oberfläche von *Bc*-Csp und dessen Mutante stimmen perfekt mit den thermodynamischen Analysen, bei denen es keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines Ionenpaares gibt [Perl & Schmid, 2001], überein. Wenn auch einige Hinweise für das Vorhandensein eines Ionenpaares anhand der gemessenen Abstände in den Strukturen gefunden werden, so scheinen diese nur einen isolierten Zustand eines Ensembles an Subzuständen zu repräsentieren.

Von den thermodynamischen Untersuchungen und Strukturanalysen ist klar, daß die Differenz der Thermostabilität eine starke elektrostatische Komponente hat [Mueller et al., 2000], welche nicht durch eine paarweise Coulomb'sche Wechselwirkung der Schlüsselresiduen bewirkt wird, wie die Mutageneseexperimente zeigen [Perl et al., 2000]. Besonders deutlich wird dies an der Mutation von Arg3→Glu, wo eine Abstoßung zwischen Glu3 und Glu46 beobachtet wird, aber es kein Indiz dafür gibt, daß zwischen Arg3 und Glu46 in *Bc*-Csp eine attraktive Wechselwirkung existiert. Zur Visualisierung der elektrostatischen Eigenschaften auf der Oberfläche von *Bc*-Csp und der Mutanten, wurde die Verteilung der Oberflächenladung mit DELPHI [Nicholls et al., 1991] berechnet und mit GRASP dargestellt (Abb.13). In der graphischen Darstellung scheint es, daß die thermodynamische Stabilität der Kälteschockproteine mit einer optimierten Balance der Oberflächenladungen wie in *Bc*-Csp und *Bc*-Csp E46A korreliert ist. In *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E und in *Bc*-Csp R3E, den beiden am wenigsten stabilen Varianten, erscheint auf der Oberfläche eine dominierende Ansammlung an negativer Ladung in der Umgebung von Rest 3. In *Bc*-Csp L66E und *Bc*-Csp V64T/L66E/67A,

4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine

den beiden Varianten mit mittlerer Stabilität, ist auch ein negativer Bereich sichtbar. Er ist aber nicht so stark ausgeprägt. Die thermodynamischen Studien von Perl & Schmid [2001] zeigen, daß die Coulomb'sche Abstoßung der Glutamate an den Positionen 3 und 66 (wie in *Bc*-Csp R3E/E46A/L66E) oder an 3 und 46 (wie in *Bc*-Csp L66E) die Strukturen um etwa je 4 kJ·mol⁻¹ destabilisiert. Die strukturellen Untersuchungen erklären diese Resultate und unterstützen weiter die Schlußfolgerung, daß die Stabilität der Kälteschockproteine mehr durch elektrostatische Abstoßung als durch anziehende paarweise Coulomb'sche Interaktionen (Ionenpaare) bestimmt wird. Ungünstige elektrostatische Kontakte führen zu einem Verlust an struktureller Ordnung und scheinen die pK_a-Werte der jeweiligen Glutamate zu verschieben, wie es durch MEAD [Bashford & Karplus, 1990; Demchuk et al., 2000] für einige Strukturen gezeigt werden konnte.

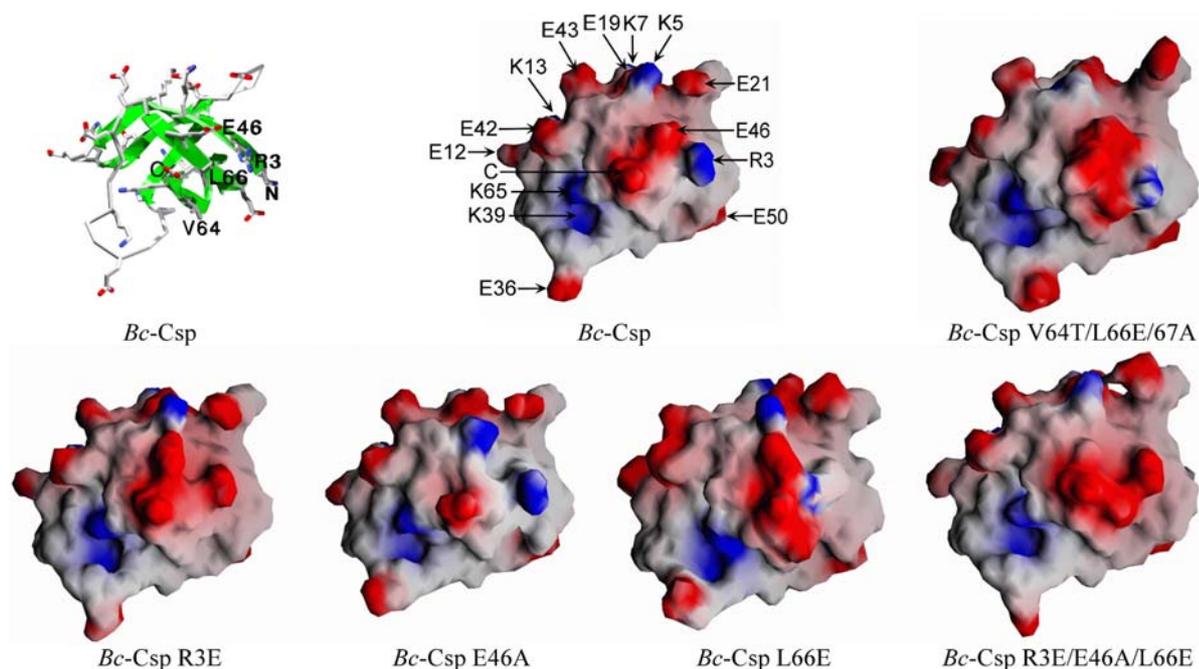


Abb. 2) Verteilung der Oberflächenladung in *Bc*-Csp und Mutanten. Dargestellt ist das Molekül A in der selben Orientierung, wie in der schematischen Darstellung oben links. Die Oberflächenladungen wurden mit DELPHI [Nicholls et al., 1991] berechnet, bei der Verwendung der Hauptkonformere. Asp, Glu, Arg und Lys sowie die terminale Amino- und Carboxyfunktion wurden als voll geladen angesetzt bei einer Ionenstärke von 145 mM. Die Oberfläche wurde mit GRASP [Nicholls et al., 1991] berechnet, bei Verwendung eines Probenradius von 1,4 Å. Die elektrostatischen Potentialkarten dienen zur Einfärbung der Oberfläche. In rot Potentiale mit -10 kT/e oder weniger, 0 kT/e farblos und +10 kT/e oder mehr in blau.

Es kann gesagt werden, daß mobile geladene Residuen stark stabilisierend wirken können, weil

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

sie sich einfacher optimal anordnen können. Das scheint besonders für geladene Residuen mit langen Seitenketten zu gelten und ist der Schlüssel für das Verständnis der stark stabilisierenden Wirkung von Arg3 in *Bc-Csp*.

Diese Arbeit zeigt abermals die Schwierigkeiten für Studien mit dem Ziel, Thermostabilitäten nur auf der Basis von dreidimensionalen Proteinstrukturen zu erklären. Lokale Konformationen und Wechselwirkungen können irreführend sein, wenn sie nur einmal oder nur in einem Molekül beobachtet werden. Interatomare Distanzen in einem Molekül sind nicht wirkliche Indikatoren für energetisch relevante Wechselwirkungen. Es ist von großer Wichtigkeit, alle Indikatoren für strukturelle Fluktuationen wie unterschiedliche konformationelle Zustände in unabhängigen Kopien eines Proteinmoleküls, alternative Seitenketten und Flexibilitäten, wie sie durch die B-Faktoren ausgedrückt werden, einzubeziehen.