

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

5.1. Kristallisation von KorB

Es wurde versucht, das im SDS-PAGE saubere KorB unter verschiedenen Bedingungen sowohl in nativer Form wie auch im Komplex mit DNA zu kristallisieren. Dabei wurden synthetisch hergestellte DNA-Fragmente mit einer Länge von 13 und 15 Basenpaaren verwendet. Auffällig war die außergewöhnlich gute Löslichkeit des Proteins bis weit über 100 mg/ml [Förster Ch.& Aÿ J., persönliche Mitteilung]

In einem Kristallisationsansatz konnte nach ca. 6 Monaten ein Kristall (Abb. 14, Tab. 6 [Förster Ch.& Aÿ J., persönliche Mitteilung]) entdeckt werden. Dieser wurde in einer Kapillare montiert und bei Raumtemperatur vermessen. Ein vollständiger Datensatz bis 2,7 Å konnte gesammelt werden.

Kristallisationsbedingungen	2,0 M Ammoniumsulfat 0,1 M Natriumphosphat 0,1 M Tris HCl, pH 7,6 0,01 M Magnesiumchlorid 18°C, 6 Monate Proteinkonzentration 100 mg/ml
Raumgruppe	P6 _{1/5}
Volumen der Einheitszelle	a = b = 51,8 Å c = 88,3 Å
Auflösung	205187 Å ³ 2,7 Å
unabhängige Reflexe	3726
Vollständigkeit	100 %
R _{sym}	7,2 %
Moleküle pro asymmetrische Einheit	1
Matthews-Koeffizient V _M	0,88 Å ³ Da ⁻¹

Tab. 6) Kristallisation und Röntgenbeugung von KorB

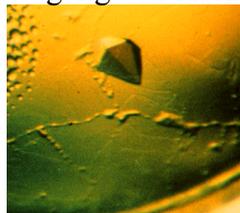


Abb. 14) Kristall von KorB, erhalten nach ca. 6 Monaten

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Die Auswertung der Daten zeigt, daß in diesem Kristall nicht das vollständige KorB vorhanden sein kann. Als Indikator kann der V_M -Wert [Matthews 1968] herangezogen werden. Deshalb wurde der Kristall aufgelöst, das Protein einem Massenspektrum unterworfen und N-terminal ansequenziert. Das Ergebnis [Otto A., Müller E., Urlaub H. & Wittman Liebold B., persönliche Mitteilung] zeigt, daß das Protein abgebaut wurde und nur ein C-terminales Fragment mit einer Länge von überwiegend 62 Resten kristallisierte. Fragmente, die um ein bis zwei Reste länger waren, konnten ferner identifiziert werden. Die Spaltstellen liegen nach den Resten 294, 295 bzw. 296.

1	MTAAQAK'TTK	KNTAAAAQEA	AGAAQPSGLG	LDSIGDLSSL	LDAPAASQGG	SGPIELDLDL
61	IDEDPHQPRT	ADNPGFSPES	IAEIGATIKE	RGVKSPISVR	ENQEQPGRYI	INHGARRYRG
121	SKWAGKKSIP	AFIDNDYNEA	DQVIENLQRN	ELTPREIADF	IGRELAKGKK	KGDIAKEIGK
181	SPAFITQHVT	LLDLPEKIAD	AFNTGRVRDV	TVVNELVTAF	KKRPEEVEAW	LDDDTQEITR
240	GTVKLLREFL	DEKGRDPNTV	DAFNGQTDAE	RDAEAGDGQD	GEDGDQDGKD	AKEKGAKEPD
300	PKLKKAIVQ	VEHDERPARL	ILNRRPPAEG	YAWLKYEDDG	QEFEANLADV	KLVALIEG

Abb. 2) Sequenz von KorB, durch Pfeile sind die Spaltstellen gekennzeichnet

Daraus lassen sich folgende korrigierte V_M -Werte ableiten

Mathews-Koeffizient V_M bei	
1 Molekül pro asymmetrischer Einheit	4,81 Å ³ Da ⁻¹
2 Moleküle pro asymmetrischer Einheit	2.41 Å ³ Da ⁻¹

Tab. 2) Korrigierte V_M -Werte

Damit läßt sich mit hoher Sicherheit sagen, daß zwei Fragmente in der asymmetrischen Einheit sind.

Auf der Basis der obigen Ergebnisse wurden neue *E. coli*-Stämme hergestellt [Ziegelin G. & Lanka E., persönliche Mitteilung], die folgende Fragmente überproduzieren (Fragmentnummer, Rest von bis):

- | | | |
|----|---------|-----------------------|
| 1. | 295-358 | SCS1(PMS51-2) KorB-C |
| 2. | 297-358 | SCS1(PMS51-3) KorB-C |
| 3. | 1-294 | SCS1(PMS51-4) KorB-N |
| 4. | 1-296 | SCS1(PMS51-5) KorB-N. |

5.2. Das N-terminale Fragment KorB-N

Für die Experimente wurde das Fragment mit den Resten 1 bis 294 verwendet. Dieses besitzt ein molekulares Gewicht von und einen für 280 nm berechneten Extinktionskoeffizient von cm^{-1} [Gill & v. Hippel, 1989]. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 4,7 [Bjellqvist et al., 1993, 1994; Wilkins et al., 1998]. Die Daten wurden auf Grundlage der Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Es wurde vermutet, daß das Fragment die DNA-bindende Domäne enthält.

Präparation von KorB-N

Die Präparation von KorB-N erfolgte in Anlehnung an das Protokoll für das intakte Protein [Balzer et al. 1992]. Die die Proteindomäne rekombinant überproduzierenden Zellen pMS 51-4 wurden in einer 200 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 10 l Medium (8 * 1,25 l) angeimpft. Bei einer OD von 0,5 bei 600 nm, die nach ca. 4 h erreicht wird, wurde die Expression des Proteins mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte nach ca. 4 Stunden durch Abzentrifugieren (15000 g, 4°C, 15 min). Die im Spermidinmix resuspendierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die durchschnittliche Ausbeute an Zellen betrug rund 6 bis 7 g/l.

Der Zellaufschluß erfolgte im Eisbad mit Lysepuffer (Endkonzentration von Lysozym bei der Lyse ~ 1 mg/ml). Die Probe wurde 1 h inkubiert und dann bei 45000 g 1½ h abzentrifugiert.

Die Proteinreinigung fand unter nichtdenaturierenden Bedingungen statt. Der klare und frisch gefilterte Überstand (Porengröße 0,45 μm) wurde auf einer mit Puffer A equilibrierten DEAE-Sephacel Säule (Pharmacia) geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 5 CV (Column volumes - Säulenvolumen) auf 50 % Puffer B. Die nach SDS-PAGE ausgewählten und vereinigten Fraktionen wurden gegen Puffer A dialysiert und in einer Amicon Ultrafiltrationseinheit konzentriert. Vor dem Beladen der Heparin-Säule (Pharmacia Heparin Hi-Trap HP) wurde die Lösung erneut filtriert. Die Säule war ebenfalls mit Puffer A equilibriert worden, und die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten (linearer Anstieg auf 20 % B mit 1 CV, 2 CV konstant bei 20 %). Bei 20 % Puffer B erfolgte die Elution des Proteins. Die ebenfalls über SDS-PAGE ausgewählten Fraktionen wurden wie oben behandelt und auf eine hydrophobe Interaktionen nutzende Chromatographie (Hiload Phenylsepharose HP, Pharmacia) an. Die Proteinlösung wurde dazu auf ca. 1,2 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf die mit 1,0 M Ammoniumsulfat und 20 mM Tris pH 7,6 equilibrierte Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten nach Puffer A eluiert. KorB-N wurde schon bei ca. 1 M Ammoniumsulfat nicht mehr von der Säule gebunden und befand sich im Säulendurchlauf. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen gesammelt, filtriert (Porengröße 0,2 μm), eingengt und über

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

eine Gelfiltration (Superdex G200, Pharmacia) und gereinigt. Die Ausbeute betrug rund 5 mg KorB-N pro Liter Kultur. Alle Arbeiten wurden bei 4°C an einer FPLC-Anlage (Pharmacia) durchgeführt.

Die Reinigung konnte nicht zur vollen Zufriedenheit durchgeführt werden. Über die einzelnen Reinigungsschritte war ein stetiger leichter proteolytischer Abbau des Proteins zu erkennen. Durch Zusatz der Proteasehemmer EDTA, PMSF und oder Pefabloc konnte dieser Abbau eingedämmt, aber nicht vollständig über den für die Kristallisation erforderlichen Zeitraum gestoppt werden (siehe Nullwertbanden im Abb. 18).

DNA-Duplex-Präparation

Zur Herstellung des Doppelstranges wurden die synthetisch hergestellten und HPLC-gereinigten Oligonukleotide in Puffer A gelöst und in molarem Verhältnis 1:1 gemischt. In einem Wasserbad wurde das Gemisch auf ca. 70°C erwärmt und langsam abgekühlt (Thermogefäß). Sinnvoll ist es, den Doppelstrang nochmals über einen starken Anionenaustauscher (MonoQ, Pharmacia) von Einzelsträngen zu trennen. Anschließend wurde der Duplex entsalzt und konzentriert. Auf eine zusätzliche Reinigung des Doppelstranges wurde verzichtet, da der Protein-DNA-Komplex abschließend präparativ gereinigt wurde.

Komplexierung von KorB-N und DNA

Wie oben schon erwähnt, konnte gezeigt werden, daß KorB-N spezifisch an DNA bindet. Dieser Nachweis gelang mit geschnittener Plasmid-DNA, also mit DNA-Fragmenten, die viel länger als üblich für die Komplexkristallisation sind. Empirisch mußten daher Fragmente gefunden werden, die spezifisch binden, aber für die Kristallisation geeignet sind, d.h. um die 20 Basenpaare lang sind. Günstig für die Kristallisation ist es, ein DNA-Fragment zu konstruieren, das eine unendliche Helix durch den Kristall bilden kann und somit stabilisierenden Einfluß auf den Kristall hat. Durch die Verwendung von komplementären überhängenden Enden könnte solch eine Helix zusätzlich stabilisiert werden. Weiter wurde vermutet, daß das Protein durch die Komplexbildung hinsichtlich Flexibilität und Degradation stabilisiert werden kann.

Ausgehend von einer Operatorsequenz [Balzer et al., 1992] wurde ein 22 bp langer Duplex hergestellt, für den mittels Gelretardierung gezeigt werden konnte, daß er spezifisch an das N-terminale Fragment bindet (Abb. 17). Ausgehend davon wurden 21 verschiedene Konstrukte im Bereich von 15 bis 24 Basenpaare hergestellt, deren Bindung an KorB-N mittels Gelretardation überprüft wurde. Lediglich für einen 15 bplangen Duplex war keine und für den 16 bp langen Duplex nur eine schwache Bindung nachweisbar. Spezifischen Bindung an KorB-N soll hier exemplarisch an dem 22 bp Duplex gezeigt werden.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

```

5' ACC TTT TAG CCG CTA AAA TCT A 3'
3' TGG AAA ATC GGC GAT TTT AGA T 5'
    
```

Abb. 16) DNA-Sequenz des 22 bp Duplex, rot Erkennungssequenz

Der Komplex aus KorB-N und DNA wurde für die Kristallisation wie folgt präpariert: In molarem Verhältnis von 1:1 wurden Protein- und DNA-Lösung gemischt. Anschließend wurde die überschüssige DNA mittels Gelchromatographie abgetrennt. Dabei zeigte sich, daß das schon in der Gelretardierung erkennbare Verhältnis von zwei Proteinmolekülen zu einem DNA-Duplex bestätigt werden kann. Der so von überschüssiger DNA durch Gelfiltration (Superdex G200, Pharmacia) gesäuberte Komplex wurde konzentriert und in Kristallisationsversuchen eingesetzt.

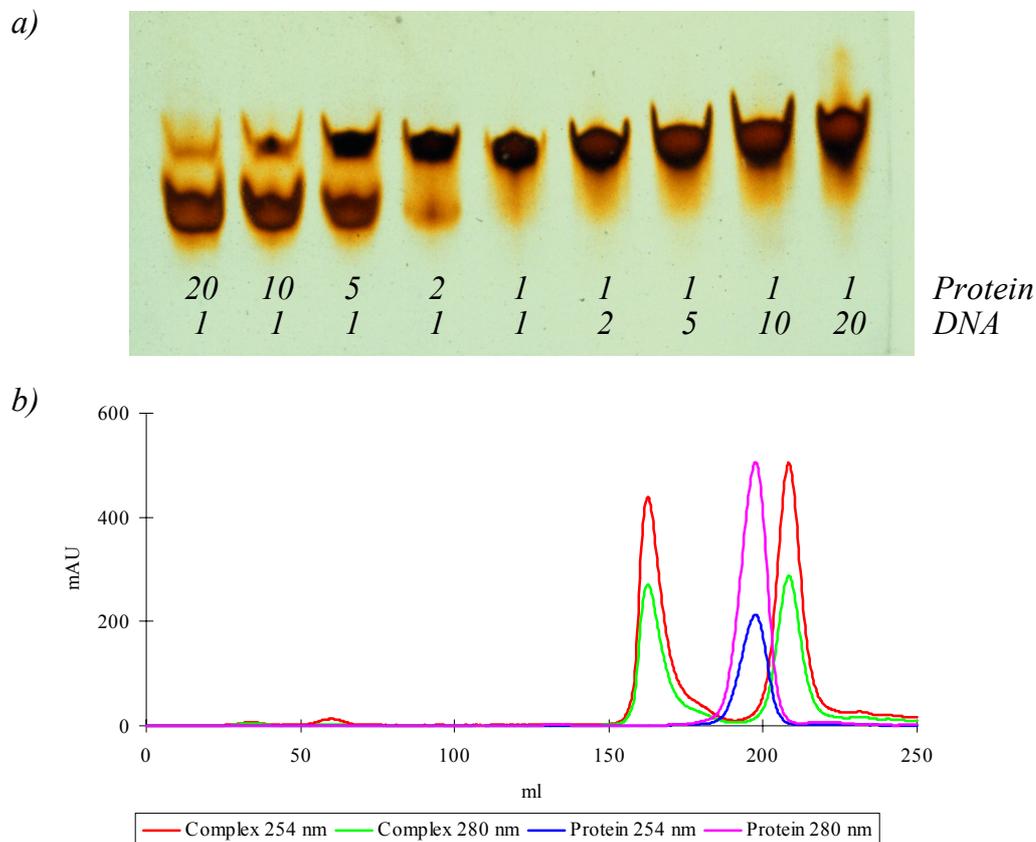


Abb. 17) Komplexbildung von KorB-N und 22bp DNA-Fragment. a) Gelretardierung bei einer konstanten Konzentration von 10 μ M KorB-N, angegeben sind die molaren Verhältnisse. Freie DNA konnte nicht detektiert werden. b) Gelfiltration (Superdex G200, Pharmacia) von KorB-N (blau und magenta) und Gemisch aus KorB-N und 22-bp DNA-Fragment im molaren 1:1 Verhältnis (grün und rot).

Aus der Abbildung 17 ist klar eine Komplexbildung zu erkennen. Als Ergebnis läßt sich festhalten, daß sich ein Komplex mit dem molaren Verhältnis von Protein zu DNA von 2:1

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

bildet. So sind bei einem Verhältnis von 2:1 im Retardierungsgel fast kein freies und ab 1:1 kein freies Protein zu erkennen. Es ist festzuhalten, daß der Komplex langsamer als das freie Protein läuft. Aus dem Chromatogramm läßt sich ebenfalls wiederum ein 2:1-Verhältnis abschätzen.

Mit allen Konstrukten wurden Cokristallisationsversuche nach dem "Sparse Matrix"-Verfahren (Screen I und II) sowie zusätzlich mit dem Natrix-Screen [Scott et al., 1995], einem Kristallisationsscreen, der besonders für DNA, RNA und Protein-DNA-Komplexe entwickelt wurde, im hängenden Tropfen bei 4 und 20°C durchgeführt.

Unter einigen Bedingungen konnten kleine Kristalle beobachtet werden, die sich nicht weiter optimieren ließen. Ein etwa ca. 40 * 40 * 20 µm großer Kristall aus Bedingung 39 Screen II (3,4 M 1,6-Hexandiol, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,2 M Magnesiumchlorid) streute am Synchrotron nur bis etwa 8 Å (BW7B, EMBL/DESY, Hamburg). Es wurde nicht nachgewiesen, ob der Kristall Protein und DNA enthält. Es war eine Bedingung, die ein DNA-Fragment von 22 bp enthielt. Kleine nicht weiter zu analysierende Kristalle konnten auch mit einem 17 bp DNA enthaltenden Kristallisationsansatz erzielt werden.

Als Ursache für diese Schwierigkeiten wurde eine nicht homogene Proteinpräparation angenommen. Zu Grund liegt vermutlich ein nicht völlig zum Stillstand gekommener proteolytischer Abbau des Proteins. Das hat zur Folge, daß unterschiedlich lange Proteinfragmente im Ansatz sind, die den Kristallisationsprozeß stören. Weiter kann man annehmen, daß das N-terminale Fragment aus mehr als einer Domäne besteht. Bei einer Größe von fast 300 Resten sind zwei (oder auch mehr) Domänen gut vorstellbar, die durch ein flexiblen Linker miteinander verbunden sind, so daß die Domänen möglicherweise keine eindeutig fixierte Stellung zu einander einnehmen. Es ist auch denkbar, daß der stabilisierende Einfluß der C-terminalen Domäne auf den Komplex fehlt.

Identifizierung der DNA-bindenden Domäne

Ein Versuch zur Identifizierung der DNA-bindenden Domäne wurde mit Hilfe der limitierten Proteolyse unternommen. Dabei wurde mit den folgenden Proteasen ein klares Ergebnis erzielt:

Subtilisin (spaltet nach basischen Resten)

Endoprotease V8 (spaltet auf der C-terminalen Seite von Glu)

Elastase (spaltet vorzugsweise nach neutralen Resten).

Die Versuche wurden mit und ohne DNA durchgeführt. Dabei wurde das 17 bp lange DNA-Fragment verwendet. In einem zweiten Schritt wurde ein Doppelverdau durchgeführt d.h. erst wurde die Probe mit Elastase inkubiert und dann eine der beiden anderen Proteasen hinzugesetzt und weiter verdaut.

Zum Verdau wurde der Komplex hergestellt, in dem Protein und DNA 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Der Verdau wurde dann ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Aus

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

einem Reaktionsmix wurden nach definierten Zeiten gleichgroße Probenvolumina (5 oder 10 µl) abgenommen mit Auftragepuffer für SDS-PAGE versetzt und 3 min bei ca. 100°C vollständig denaturiert.

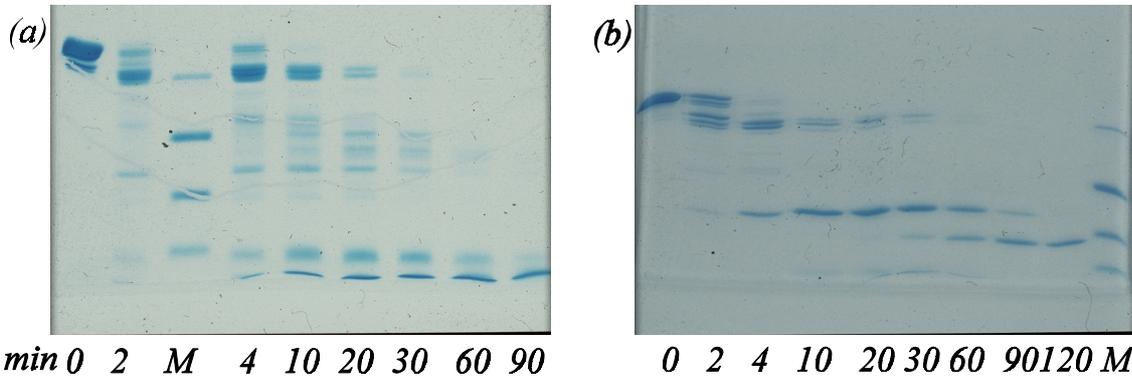


Abb. 18) Verdau mit Elastase von (a) KorB-N und (b) KorB-N in Gegenwart von 17 bp DNA-Fragment

In Gegenwart von DNA konnte ein anderes Verdauverhalten beobachtet werden. Schließlich lassen sich eindeutig kleinere stabile Fragmente identifizieren.

Die Proteinfragmente aus dem Verdau in Gegenwart von DNA wurden mit Massenspektrometrie analysiert sowie N-terminal ansequenziert [Otto A., Müller E. & Wittmann-Liebold B. persönliche Mitteilung]. Alle drei Proteasen ließen ein Fragment übrig (ca. Rest 150 bis 260), das das vermutete Helix-Turn-Helix-Motiv (Rest 172-193 [Balzer et al. 1992]) enthielt.

Protease	möglicher Startpunkt Massenseptrometrie* > N- terminal ansequenziert	möglicher Endpunkt Massenspektrometrie* > Proteaseschnittstelle
Subtilisin	150 > 148	253 > 253, 255,
EndoproteaseV8	156(150) > 146	253 > 254, 260, 262, 263
Elastase	132 > 132	253 > 270, 274

Tab. 8) Fragmentidentifikation mit Massenspektrometrie und N-terminalem Sequenzieren
*Analyse erfolgte durch Fragmentanalyse nach Verdau der Proteinbande mit Trypsin. Dadurch sind der Anfang und das Ende nicht sicher zu bestimmen, nicht alle Fragment sind zu identifizieren. Die so erhaltenen Termini stehen im Widerspruch zu den Spaltstellen der verwendeten Proteasen.(Trypsin spaltet zum Beispiel nach basischen Resten)

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

```
1  MTAAQAKTTK  KNTAAAAQEA  AGAAQPSGLG  LDSIGDLSSL  LDAPAASQGG  SGPIELDLDL
61  IDEDPHQPRT  ADNPGFSPES  IAEIGATIKE  RGVKSPISVR  ENQEQPGRYI  INHGARRYRG
121 SKWAGKKSIP  AFIDNDYNEA  DQVIENLQRN  ELTPREIADF  IGRELAKGKK  KGDIAKEIGK
181 SPAFITQHVT  LLDLPEKIAD  AFNTGRVRDV  TVVNELVTAF  KKRPEEVEAW  LDDDTQEITR
240 GTVKLLREFL  DEKGRDPNTV  DAFNGQTDAE  RDAEAGDGQD  GEDGDQDGKD  AKEK
```

Abb. 19) Sequenz von KorB-N, blau N-Terminus, rot C-Terminus nach Massenspektrometrie und N-terminaler Sequenzieren, fett proteasestabiles Fragment. Weitere mögliche Spaltstellen sind im Fragment enthalten.

Präparation der Fragmente

Auf Grundlage der Ergebnisse wurden folgende überproduzierende *E. coli* Stämme in der AG Lanka hergestellt (Fragment, Rest von bis)

Fragment KorB-5, (148-253)

Fragment KorB-6, (156-253)

Fragment KorB-7, (148- 262)

Fragment KorB-8, (132-262)

Fragment KorB-9, (132-292)

Die *E. coli* Kultivierung und Zellaufschluß erfolgte wie bei KorB-N. Nach der DEAE- und Heparinsäule war das Protein schon weitestgehend sauber, so daß sich nur noch eine Gelfiltration anschloß. Alle Arbeiten wurden bei 4°C an einer FPLC-Anlage (Pharmacia) durchgeführt. Ein Zusatz von Proteasehemmern war nicht notwendig.

Für alle Fragmente konnte keine spezifische DNA-Bindung mittels Gelretardierung nachgewiesen werden.

Kristallisation

Trotz nicht nachgewiesener Bindung wurden mit dem Fragment 7 und dem 17bp langen DNA-Fragment Versuche zur Kristallisation eines möglichen Komplexes durchgeführt. Dazu wurden im molaren Verhältnis von 2 zu 1 Protein und DNA gemischt und anschließend konzentriert. Eine abschließende präparative Reinigung des Komplexes, wie bei KorB-N, war aufgrund der fehlenden spezifischen Bindung nicht möglich.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

5' CTT TTA GCC GCT AAA AT 3'
3' GAA AAT CGG CGA TTT TA 5'

Abb. 20) DNA-Sequenz des 17bp DNA-Fragment, fett Erkennungssequenz

Es konnten unter verschiedenen Bedingungen Kristalle erhalten werden. Ausgehend von Bedingung 13 Screen I (28% PEG 400, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5 und 0,2 M Natriumcitrat) konnten Kristalle bezüglich Größe und optischer Qualität optimiert werden. Die abschließenden Bedingungen enthielten PEG 400 in einem Bereich von 26 bis 30 % sowie Tris-HCl pH 7,6 und 0,2 M Calciumchlorid. Die Konzentration lag dabei in einem Bereich von ca. 1,2 μ M Komplex das entspricht ungefähr 20 mg/ml. Um zu überprüfen ob die Kristalle Protein und DNA enthalten, wurden Kristalle in Reservoirolösung mehrfach gewaschen. Anschließend wurden sie in Puffer A aufgelöst und mit SDS-PAGE auf Protein und mit einem UV-Spektrum auf DNA hin analysiert. Im SDS-PAGE war ein Bande zu erkennen, die dem Proteinfragment entsprach, und das UV-Spektrum zeigte eindeutig das Vorhandensein von DNA an.

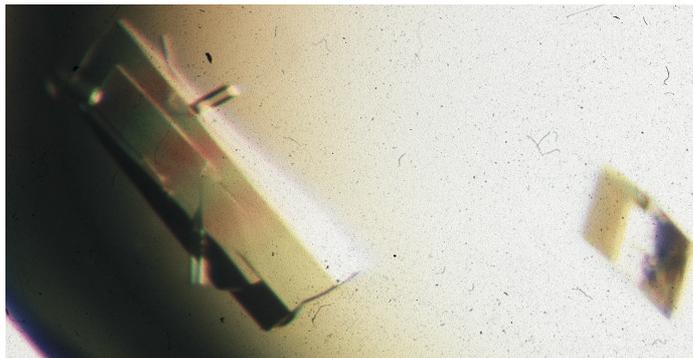


Abb. 21) Kristalle von Fragment 7 (Reste 148-262 von KorB) in Gegenwart des 17 bp DNA-Fragments.

Beugungsexperiment

Für das Beugungsexperiment konnten die Kristalle direkt aus dem Kristallisationstropfen eingefroren werden. An dem Synchrotronmeßplatz BW7B des EMBL/DESY in Hamburg konnten Beugungsdaten gesammelt werden mit einer maximalen Auflösung von 1,7 Å. Das Auflösungsverhalten war stark anisotrop, so daß die Daten maximal bis 1,9 Å ausgewertet wurden (Tab. 9).

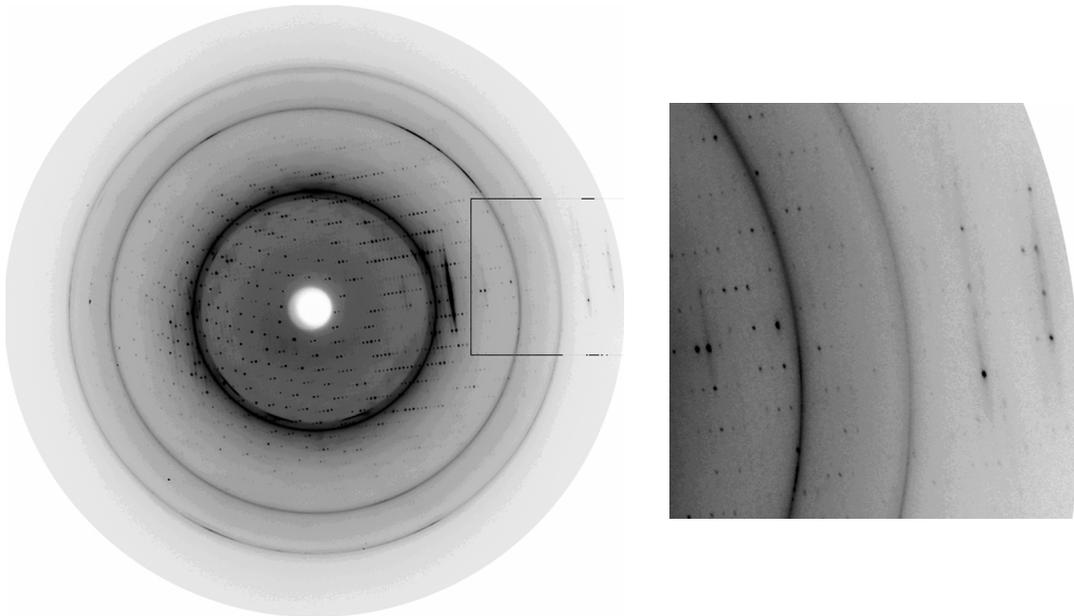


Abb. 22) Diffraktionsbild mit vergrößerten Ausschnitt auf der rechten Seite vom Komplexkristall an der BW7B. Äußere Reflexe in der vergrößerten Darstellung entsprechen einer Auflösung von 1,7 Å. Deutlich zu erkennen ist das anisotrope Streuverhalten.

nativ		Brom 2	Brom 5		
			inflection	peak	remote
λ [Å]	0,8420	0,8420	0,9171	0,9167	0,85361
Auflösung [Å]	50 - 1,9	30 - 2,8	50 - 2,8		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁				
Zellachsen	a = 44,88 b = 76,31 c = 110,90	a = 44,70 b = 76,31 c = 110,87	a = 45,08 b = 76,68 c = 110,97		
unabhängige Reflexe	28276	9275	10038	9973	9883
Vollständigkeit	93,2	95,1	98,4	98,1	91,3
Redundanz	4,6	3,7	2,9	3,0	2,5
I/ σ I	16,2	19,1	13,2	13,2	15,3
R _{sym} [%]	7,2	6,1	5,3	4,7	5,1

Tab. 9) Statistik der Röntgenbeugung

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Aus der Größe der Zelle läßt sich ableiten., daß sich in der asymmetrischen Einheit zwei Proteinmoleküle und ein DNA-Fragment befinden. Wahrscheinlich kann die DNA eine fortlaufende Helix, in Richtung der c-Achse, durch den Kristall bilden. Bei der berechtigten Annahme, daß die DNA in B-Konformation ist, ergibt sich für 17 bp eine Höhe von 57,8 Å. Die DNA-Konformation kann durch die Bindung an das Protein gestört werden und es kann zu einer Krümmung der DNA kommen. Das läßt wahrscheinlich werden, daß zwei DNA-Fragmente im Kristall entlang der c-Achse übereinander gestapelt sind.

Lösung des Phasenproblems

Um das Phasenproblem zu lösen, wurde die DNA mit Brom markiert (5-Bromocytosin) und unter den gleichen Bedingungen kristallisiert. Die Strategie war es, erst zu überprüfen, welche Positionen sich mit Brom ersetzen lassen, da die Positionen möglicherweise in die Wechselwirkungen mit dem Protein einbezogen sind und die Komplexbildung stören.

Nur die Einzelsubstitutionen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Die Doppelsubstitution schlug fehl. Für die Derivate mit Brom an Positionen 2 und 5 (siehe Abb. 37) konnten Kristalle erhalten und Datensätze aufgenommen werden. Von Derivat 2 konnte ein vollständiger Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,5 Å an dem Meßplatz X11 und für das Derivat 5 ein vollständiger MAD-Datensatz bis 2,8 Å an dem Meßplatz X31 des EMBL/DESY in Hamburg gesammelt werden. Die optimalen Wellenlängen für das MAD-Experiment wurden mittels Fluoreszenzmessung am Kristall unmittelbar vor der Messung bestimmt.

5' C ⁴ TT TTA GC ^{1,3} C ⁵ GC ^{2,3} T AAA AT 3'
3' G AA AAT CG G CG A TTT TA 5'

Abb. 23) DNA-Sequenz des 17-bp, fett Erkennungssequenz, ⁿ Bromderivat

Die aufgenommenen Datensätze von den einzeln mit Brom substituierte DNA enthaltenden Kristallen liefern kein auswertbares Signal im Sinne einer isomorphen Differenz zum nativen Datensatz oder einer anomale Differenz. Als mögliche Ursache kann angenommen werden, daß das geringe anomale wie auch isomorphe Signal sich nicht aus dem Rauschen hervorhebt, da es nicht ausreichend ist im Bezug auf die Größe des untersuchten Objekts (ca. 230 Aminosäuren und 17 bp).

Da die DNA-Sequenz stark symmetrisch ist, nur die Enden und die Mittelposition gehorchen nicht einer Rotationssymmetrie, kann angenommen werden, daß die Richtung der DNA für die Kristallpackung keine Rolle spielt und die Kristallkontakte im wesentlichen durch das Protein realisiert werden. So kann es zur alternativen Anordnung der DNA kommen, die auf den nativen

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Kristall wenig Einfluß hat, aber im Derivat das Signal der Anomalie und Isomorphie zusätzlich schwächt.

Für weitere Experiment sollte das Symmetrieproblem in der DNA durch symmetrische Substitution von Brom in der DNA beseitigt werden. Wahrscheinlich müßten mindestens vier Positionen mit Brom besetzt werden, um ein ausreichendes Signal zu erhalten.

5.3. Die C-terminale Domäne KorB-C

Für alle Experimente wurde das Fragment mit den Resten 297 bis 358 verwendet. Dieses besitzt ein molekulares Gewicht von 7099 und einen für 280 nm berechneten Extinktionskoeffizient von $1,162 \text{ cm}^{-1}$ [Gill & v. Hippel, 1989]. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 4,86 [Bjellqvist et al., 1993, 1994; Wilkins et al., 1998]. Die Daten wurden auf Grundlage der Aminosäurezusammensetzung bestimmt.

Strukturvorhersage für das C-terminale Fragment

Die Umstände, die zum Kristallwachstum führten, lassen die Schlußfolgerung zu, daß es sich um eine kompakte stabile proteasenresistente Domäne handelt. Es wurde nunmehr nach einer Proteinstruktur mit ähnlicher Sequenz gesucht, um daraus eine mögliche Funktion abzuleiten, und sie als Modell für molekularen Ersatz zu nutzen. Auf der Basis von Sequenzvergleichen wurde mit FASTA [Pearson, 1990] eine Domäne von Annexin V aus dem Huhn [Bewley et al., 1993] mit einer Sequenzidentität von 40% (Abb. 24) gefunden. Diese Domäne hat eine helikale Struktur (Abb. 25).

295	GAKEPD	PDKLKKAI VQ	VEHDERPARL	ILNRRPPAEG	YAWLKYEDDG
			::	:	::
90	RPARPARI	FD AHALKHAI	KG AGTNEKVL	TE ILASRTPAEV	-QNIK-QVYM
				:	:
341	QEFEANLADV	KLVALIEG			
				:	:
129	QEYEANLEDK	ITGETSGHFQ			

Abb. 24) Sequenzalignement von KorB-C und Annexin V; | identischer Rest; : ähnlicher Rest

Bei diesem Grad der Sequenzübereinstimmung wird eine ähnliche Struktur erwartet. Zusätzliche Sekundärstrukturvorhersagen stützten die Vermutung einer helikal geprägten Domäne. Desweiteren diente das Fragment als Vorgabe für den CASP2 (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction 1996) [<http://predictioncenter.llnl.gov/>] Wettbewerb. Hier sollten vorhergesagte Strukturen mit noch nicht veröffentlichten experimentellen Strukturen verglichen und die Qualität der Vorhersagen getestet werden (Abb. 25).

Von der später gereinigten Domäne wurde ein CD-Spektrum aufgenommen, um Informationen über den Faltungszustand zu erhalten und eine Sekundärstrukturvorhersage zu treffen. Das Ergebnis des CD-Spektrums steht mit den theoretischen Vorhersagen im Widerspruch. Die aus dem CD-Spektrum abgeleitete Struktur [Gast K., Zirwer D., & Damaschun G., persönliche

Mitteilung] wird im wesentlichen von β -Faltblattstrukturen geprägt.

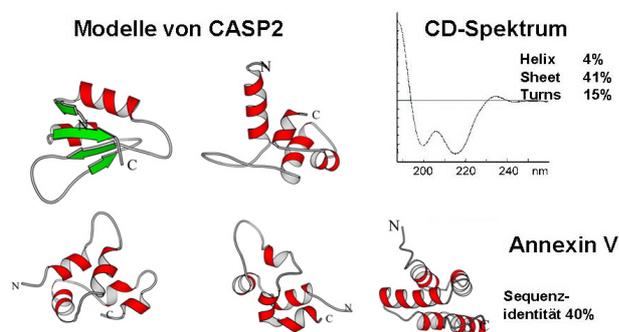


Abb. 25) Sekundärstrukturvorhersage, Strukturmodelle von CASP2, CD-Spektrum und Domäne aus Annexin V.

Präparation von KorB-C

Die Präparation von KorB-C gleicht anfänglich der des N-terminalen Fragments. Kultivierung der *E. coli* und Zellaufschluß erfolgte analog. Die ersten zwei Säulenschritte waren ebenfalls identisch. An die DEAE-Sephacel-Säule und die Reinigung mit Heparin, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten (linearer Anstieg auf 20 % B mit 1 CV, 2 CV konstant bei 20 %). Die Elution des Proteins erfolgte bei 20 % Puffer B. Die wiederum nach SDS-PAGE gesammelten Fraktionen wurden gefiltert (0,2 μ m) und auf eine Mono-Q-Säule (Pharmacia Mono Q HR 5/5) geladen. Hier wurde ebenfalls ein Stufengradient gefahren, in dem innerhalb von 5 CV auf 25 % Puffer B gegangen wurde. Daran schloß sich ein 5 CV umfassender konstanter Teil der Elution des Fragmentes an. Im letzten Schritt wurde eine Gelfiltration (Pharmacia G75-Sephadex 16/60) eingesetzt, die der Entfernung letzter Verunreinigungen diene. Anschließend wurde das Protein gegen Puffer A dialysiert und konzentriert. Nach jedem Säulenschritt wurde der Fortschritt der Reinigung mit SDS-PAGE überprüft. Alle Arbeiten wurden bei 4°C an einer FPLC-Anlage (Pharmacia) durchgeführt.

Die Reinigung von KorB-C verlief problemlos und bis zur apparenten Homogenität auf Coomassie-Blue gefärbter SDS-PAGE. Aus einem Liter Kulturvolumen konnten 4 bis 5 mg Protein höchster Reinheit gewonnen werden.

Kristallisation von KorB-C

Das gereinigte Protein wurde auf ca. 35 mg/ml konzentriert und dem Kristallisationsscreen I und II [Jancarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994] unterworfen. Dabei konnten insgesamt 20 Bedingungen gefunden werden, in denen kristalline Niederschläge sowie kleine, teilweise verwachsene und schon für Röntgenbeugungsexperimente taugliche Kristalle auftraten.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Folgende Bedingungen wurden weiter verfolgt:

Screenbedingung	Zusammensetzung
(a) Screen I / 10	30 % PEG 4000 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 0,2 M Ammoniumacetat
(b) Screen I / 37	8 % PEG 4000 0,1 M Natriumacetat pH 4,6
(c) Screen I / 48	2,0 M Ammoniumphosphat 0,1 M Tris HCl 8,5

Tab. 10) Initialbedingungen der Kristallisation von KorB-C

Der Bedingung (a) wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt. In dem Tropfen waren mehrere sehr unterschiedliche Kristalle gewachsen (Abb. 26).

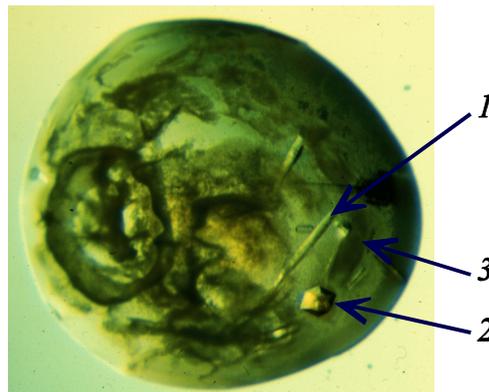


Abb. 26) Screen I / 10 mit mehreren Kristallformen im Tropfen

Kristall 1 zeigte die selben hexagonalen Zellparameter, wie der ursprünglich erhaltene Kristall, obwohl seine Morphologie dies augenscheinlich nicht vermuten ließ. Von diesem Kristall konnte ein vollständiger Datensatz (Tab.12) mit einer Auflösung von 2.15 Å gesammelt werden. Eine weitere Steigerung der Auflösung konnte nicht erreicht werden. Der zweite Kristall hatte eine tetragonale Morphologie. Er streute nur bis 4 Å und zeigte bei einer ersten Auswertung ein tetragonales Bravaisgitter. Diese Kristalle konnten nicht optimiert werden. Der dritte Kristall streute ebenfalls nur schwach, konnte aber im weiteren Verlauf der Experimente optimiert und als orthorhombisch beschrieben werden.

Die Bedingung (b) führte zu kleinen verwachsenen Kristallen. Sie ist zu Bedingung (a) ähnlich und legte eine Optimierung nahe, die in der Kombination von beiden besteht. So wurde intensiv die Fällungsmittelkonzentration im Bereich von 6 % bis 42 % variiert. Durch den Austausch von Ammoniumacetat gegen Natriumchlorid konnte das Auftreten von unterschiedlichen

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Kristallformen unterdrückt und die bei Bedingung 1 erwähnte dritte Kristallform selektiert werden. Die Natriumchloridkonzentration war maßgebend für die Anzahl der entstehenden Kristallisationskeime. Ein Problem bestand im schnellen Wachstum der Kristalle. Schon nach etwa 15 min waren erste Kristalle zu beobachten, die aber zu klein blieben. Durch Senkung der Fällungsmittelkonzentration konnte das Problem nicht behoben werden. Erst die Einstellung der Anfangskonzentration von PEG 4000 auf 1,5 % und 100 mM NaCl im Kristallisationstropfen führte dazu, daß sich nur ein oder zwei Keime bildeten, und die Kristalle beim Equilibrieren gegen 30 % PEG oder mehr zu einer Größe von mehr als 1 mm * 1 mm und einer Dicke von ca. 0,75 mm wuchsen (Abb. 27a). Auf diese Weise erhaltene Kristalle konnten direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und streuten bis 1,7 Å Auflösung (X31 EMBL/DESY Hamburg). Die Strukturanalyse basierte auf Kristallen mit einer Größe von ca. 0,5 * 0,3 * 0,3 mm, da diese sich besser einfrieren ließen. Große Kristalle zeigten eine hohe Mosaizität.

Die auf Bedingung (c) basierenden Kristalle (Abb. 27b) konnten nur bis zu einer maximalen Auflösung von 2,45 Å optimiert werden. Eine weitere Verfolgung dieser Bedingung wurde nicht durchgeführt, da sich beim Einfrieren größere Schwierigkeiten ergaben, und die Kristalle während der Messung in einer Röntgenkapillare bei Raumtemperatur nicht stabil blieben. Ein vollständiger Datensatz (99 %) mit einem R_{sym} von 10,8 % konnte gesammelt werden. Dabei waren deutliche Anzeichen für einen Verlust an Beugungsqualität durch Strahlenschäden über den gesamten Datensatz zu erkennen.

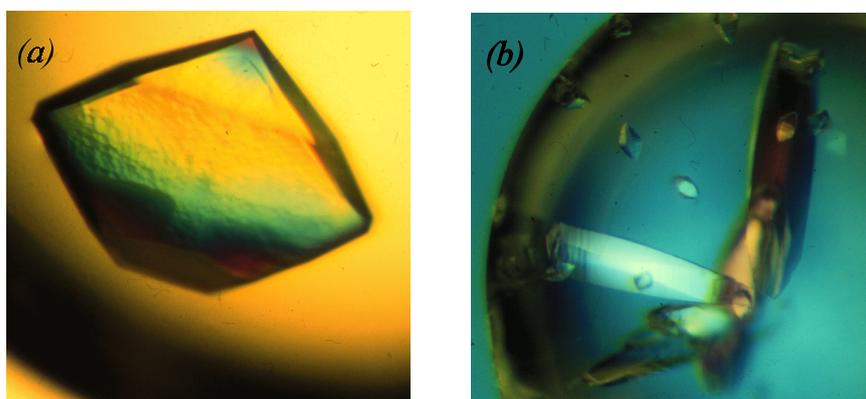


Abb. 27) Kristalle von KorB-C (a) orthorhombisch primitive Form, (b) orthorhombisch zentrierte Form

Die finalen Kristallisationsbedingungen sind im folgenden zusammengefaßt. Die Statistik der Beugungsdaten ist in Tabelle 12 dargestellt.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

orthorhombische Form	36 % PEG 4000 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 0,2 M Natriumchlorid 20 mg/ml Protein im Tropfen 1,5 % PEG 4000 2 Tage, 20°C
hexagonale Form	30 % PEG 4000 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 0,2 M Ammoniumacetat 34 mg/ml Protein 2 Wochen, 20°C
orthorhombisch zentrierte Form	2.0 M Ammoniumphosphat 0,1 mM Tris HCl pH 8.5 15 mg/ml Protein 2 Wochen, 20°C

Tab. 11) Optimierte Kristallisationsbedingungen für KorB-C

Die initiale Auswertung aller Diffraktionsdaten von KorB-C (Zell- und Laborparameter) erfolgte mit dem HKL-Programmpaket [Otwinowski & Minor, 1997]. Die Skalierung und Zusammenführung der Daten wurde mit Scala aus der CCP4-Suite [CCP4, 1994] durchgeführt.

Strukturlösung

Da kein geeignetes Model für einen molekularen Ersatz verfügbar war, konnte die Struktur nur über Schweratomderivate gelöst werden. Der Ersatz von Methionin durch Selenomethionin war nicht möglich, da KorB-C kein Methionin enthält. Die primitiv orthorhombische Form diente als Basis für die Suche nach Schweratomderivaten, da eine ausreichend große Anzahl dieser Kristalle gezüchtet werden konnte. Bei einem Blick auf die Sequenz fällt ein Histidin als wahrscheinlichster Anlagerungspunkt für ein Schweratom auf.

Die beiden Derivate wurden durch Zugabe einer gesättigten Platintetrachlorid- bzw. cis-Platin-(II)-Diamminchloridlösung gewonnen. Es wurden 0,2 µl frisch aufgeschüttelter gesättigter Lösung zum Kristallisationstropfen zugegeben. Nach etwa einem Tag färbten sich die Kristalle leicht gelb bis orange - die Farbe der Platinsalze. Danach blieben die Kristalle für ca. 2 bis 3 Wochen in der Lösung stabil, d.h. länger als die nativen Kristalle, die nur etwa 3 Tage nach Wachstumsende noch stabil waren. Dann begannen sie deutlich auszufransen. Allerdings zeigten sich die derivatisierten Kristalle sehr empfindlich gegenüber Änderungen des Kristallisationspuffers. So konnten diese nicht in einen Stabilisierungspuffer umgesetzt und eingefroren werden. Ein direktes Schockgefrieren wie bei den nativen Kristallen war nicht

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

	Nativ		Derivat		
	orthorhombic	hexagonal	PtCl ₄	PtCl ₄	cis-Platin(II) diamminchlorid
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6 ₅	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Wellenlänge [Å]	1,0721	1,5418	1,0721	1,5418	1,5418
Einheitszelle [Å]	a = 42,13 b = 82,15 c = 87,86	a = 51,68 c = 87,42	a = 43,05 b = 81,39 c = 87,58	a = 42,05 b = 81,29 c = 87,65	a = 43,04 b = 81,79 c = 88,01
Auflösung [Å]	22 - 1,77	22 - 2,15	40 - 2,55	36 - 2,50	36 - 2,75
unabhängige Reflexe	3,216	7,157	9,812	10,897	8,515
Vollständigkeit [%]	98,9 / 95,7	99,0 / 87,9	94,9 / 87,9	98,3 / 89,9	98,7 / 86,5
Redundanz	3,4 / 3,3	3,4 / 2,5	4,0 / 3,9	3,8 / 3,5	2,7 / 2,3
I/σ(I)	19,5 / 3,8	8,5 / 3,9	4,0 / 1,7	9,9 / 2,8	9,7 / 2,0
 nach Wilson	195	25,2	42,6	45,6	43,7
R(sym) [%]	4,4 / 20,3	7,1 / 19,5	10,9	5,7	10,6
R(iso) [%]			46,2	456	207
Anzahl der Atomlagen			4	4	4
Phasing power acen / cen			1,76 / 1,22	2,04 / 1,46	1,20 / 0,98
R(Cullis) acen / cen /anom			0,69 / 0,73 / 0,83	0,64 / 0,68 / 0,87	0,83 / 0,77 / 0,98
fom			0, 5160		

Tab. 12) Statistik der Beugungsdaten und der Phasierung

möglich. Durch Zusammenskalierung der Datensätze der nativen und derivatisierten Kristalle mit FhScale [CCP4, 1994] wurde die mittlere isomorphe Differenz bestimmt, ausgedrückt durch R_{iso} (Tab. 12). Insgesamt wurden mehr als 20 verschieden getränkte Kristalle vermessen. Die Daten wurden ebenfalls wie die nativen Daten mit Denzo und Scala evaluiert. Die Derivatkristalle wurden zusätzlich anomal ausgewertet, d.h. die Friedelpaare wurden nicht zusammengeführt. Um eine möglichst große anomale Differenz zu erreichen, wurde ein Datensatz an der L_{III} -Kante von Platin am Synchrotron (X31, EMBL/DESY Hamburg) gemessen. Die exakte Wellenlänge wurde anhand einer Fluoreszenzmessung am Kristall bestimmt.

Mit Hilfe des Programms HEAVY aus dem SOLVE-Paket [Terwilliger & Berendzen, 1999] konnten vier Schweratompositionen bestimmt werden. Sie sind in den Derivaten an gleicher Position, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer relativen Besetzung und ihrer anomalen Beiträge. Mit dem Programm MLPHARE aus dem CCP4-Paket wurden diese Positionen verfeinert sowie die relativen Besetzungsdichten und B -Faktoren bestimmt.

Modellbau und Strukturverfeinerung

Mit den vier Schweratomlagen konnte eine erste Elektronendichte mit experimentellen Phasen berechnet werden. Diese konnten durch Dichtemodifikation (Solvenznivellierung) mit dem Programm DM aus der CCP4-Suite verbessert werden. Eine erste Elektronendichtekarte wurde im Bereich um die vier Schweratomlagen inspiziert.

Bei der Annahme, daß vier Moleküle in der asymmetrischen Einheit sind, sollten vier sehr ähnliche von einander abgrenzbare Bereiche gefunden werden und mögliche Masken und Operatoren für die nichtkristallographische Symmetrie (NCS) erstellt werden können. Eine wichtige Orientierungshilfe waren dabei die Lagen der vier Platinatome. Zuerst konnten nur zwei solcher Bereiche entdeckt und ein entsprechender Operator bestimmt werden. Sie spiegeln die im weiteren beschriebenen Dimere wider. Durch die Bestimmung des NCS-Operators konnte durch NCS-Mittlung die Qualität der Dichte so verbessert werden, daß der Verlauf von Sekundärstrukturelementen, β -Strängen und Schleifen deutlich zu erkennen war. So wurde für die ersten klar erkennbaren Abschnitte ein Modell aus Alanin gebaut. Durch Ausnutzen des NCS-Operators konnte der entsprechende Bereich auch in der zweiten Hälfte der asymmetrischen Einheit wechselseitig eingebaut werden. Nach dieser Positionierung wurden die Umrisse der einzelnen Moleküle klar, und es konnte die Lage der vier Moleküle abgegrenzt werden. Die daraus berechneten NCS-Operatoren führten dann zu einer nochmaligen Steigerung der Qualität der Dichte durch NCS-Mittlung in DM. Die NCS-Masken und -Operatoren wurden mit MAMA und AVE aus dem RAVE-Paket [Kleywegt, 1996; Kleywegt & Jones, 1996, 1997, 1999] verfeinert.

In der unmittelbaren Umgebung der Position des Platins konnte Dichte beobachtet werden, die

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

sich ganz eindeutig als Histidin (313) identifizieren ließ. Damit war auch die Arbeitshypothese bestätigt, daß sich das Schwermetall wahrscheinlich am Histidin anlagern würde. Mit der Identifizierung von Tryptophan (333) konnte der Verlauf des Proteinrückgrats eindeutig bestimmt werden und das Modell zunächst aus Alaninen weiter gebaut bzw. Fragmente zu einer Kette zusammengefaßt werden, die 50 Reste enthielt. Weitere klar erkennbare Reste wurden ebenfalls schon eingebaut. Diese waren das schon erwähnte His313 und Trp333 sowie Pro317, Pro326, Pro327, Gly330, Tyr331, Tyr336 und Phe343.

	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6 ₅
Daten und Modell		
Auflösungsbereich [Å]	22 - 1,7	24 - 2,2
Anzahl Reflexe	32,160	7,157
R(work) / R(free) [%]	19,28 / 22,80	15,17 / 22,70
Reste mit mult. Konformationen	11	6
Proteinatome	1833	908
Wassermoleküle	250	120
Mittlere <i>B</i>-Werte [Å²]		
Hauptkettenatome A / B / C / D alle	22,96 / 24,09 / 21,91 / 25,36 23,60	35,61 / 34,94 35,27
Seitenkettenatome A / B / C / D alle	27,81 / 27,80 / 28,83 / 30,75 28,75	42,73 / 40,99 41,88
Proteinatome A / B / C / D alle	25,46 / 25,98 / 25,36 / 28,02 26,22	39,28 / 37,97 38,63
Wassermoleküle	35,32	44,33
Alle Atome	27,31	39,26
RMSD-Werte		
Bindungslängen [Å]	0,011	0,013
Bindungswinkel [°]	2,098	2,528

Tab. 13) Statistik der Verfeinerung

In den ersten Verfeinerungszyklen wurde das Programm X-PLOR 3.8 [Brünger et al., 1992a] verwendet. Die vorläufig als Alanin beschriebenen Reste wurden Schritt für Schritt gegen die korrekten Reste ausgetauscht. Damit einhergehend konnte auch die Auflösung gesteigert werden und die Stärke des NCS-Operators gesenkt sowie die Wichtung der experimentellen Daten gegenüber den stereochemischen Parametern erhöht werden. Es zeigten sich aber auch schon Bereiche (Reste 301 bis 307, 356 bis 358), die durch den NCS-Operator nicht beschrieben

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

werden konnten, sowie ein völliges Fehlen interpretierbarer Dichte für die ersten Reste im N-terminalen Bereich. Die weitere Verfeinerung bis zur Konvergenz erfolgte mit REFMAC [Murshudov et al., 1997] unter Verwendung isotroper *B*-Faktoren. Schritt für Schritt wurde nun Wasser in das Strukturmodell eingebaut. Bei der finalen Verfeinerung, die mit einem R/R_{free} von 19,28%/22,80% endete, konnte schließlich ganz auf die Nutzung der NCS verzichtet werden. Alternative Konformationen wurden für einige Reste beobachtet. Diese Reste wurden mit alternativen Seitenkettenkonformationen gebaut, und ihre Besetzungsdichte wurde anhand der *B*-Faktoren abgeschätzt (*B*-Faktoren in etwa gleich, Summe der Besetzungsdichte eins).

Die hexagonale Struktur wurde auf der Basis der orthorhombischen Struktur mit molekularem Ersatz gelöst. Verwendet wurde dazu das Programm AMoRe [Navazza et al., 1994]. Dabei wurde ein Dimeres aus der orthorhombischen Struktur als Modell genutzt und auf den Bereich der Reste 308 bis 356 zurückgeschnitten. Die Lösung der Rotationsfunktion führte zu zwei eindeutig abgesetzten Lösungen, die sich durch die zweizählige NCS im Dimer erklären lassen und gleichwertig sind. Bei der Lösung der Translationsfunktion konnte die Raumgruppe eindeutig mit $P6_5$ bestimmt werden. Verfeinert wurde die Struktur in ähnlicher Form wie die orthorhombische Struktur. Nach der initialen Verfeinerung mit X-PLOR erfolgte die weitere Verfeinerung bis zur Konvergenz mit REFMAC. Bei der finalen Verfeinerung konnte auch hier ganz auf die Nutzung der NCS verzichtet werden, wobei mit alternativen Resten in gleicher Weise umgegangen wurde. Die Verfeinerung endete mit R/R_{free} von 15,17% und 22,70%.

Rotationsfunktion (10 Å - 3 Å)

	α	β	γ	σ
1.	50,89	91,10	12,41	5,81
2.	56,69	89,09	192,55	5,65
3.	14,47	102,87	34,72	2,83

Translationsfunktion (10 Å - 4 Å)

	x	y	z	corr.*	R_{fac}
1.	0,50	0,55	0,00	47,7	45,1
2.	0,83	0,22	0,00	29,8	50,4

Rigid body - Verfeinerung (10 Å - 3 Å)

corr.*	R_{fac}
0,604	40,6

* Korrelationskoeffizient

Tab. 14) Statistik des molekularen Ersatzes

Die beiden Strukturen wurden hinsichtlich stereochemischen Kriterien mit den Programmen PROCHECK [Laskowski et al., 1993] und WHATCHECK [Hoofst et al., 1996] analysiert. Alle

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Strukturen zeigten für diese Auflösungen erwartungsgemäße Werte. Alle Reste liegen im erlaubten Bereich des Ramachandran-Diagramms.

Struktur von KorB-C

Die Faltung der C-terminalen Domäne von KorB wird von einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt geprägt (Abb. 28). Dabei bilden die Stränge 1 bis 4 ein antiparalleles Up-and-down-Faltblatt. Die Stränge sind durch Schleifen unterschiedlicher Länge miteinander verbunden. Die Krümmung der Stränge und die ausgeprägte linkshändige Verdrillung des Faltblatts ermöglichen einen antiparallelen Kontakt des Stranges β_5 mit der offenen Seite des Stranges β_1 . Strang β_1 und β_2 sind durch die Schleife L1 miteinander verknüpft, der sich als β -Haarnadelschleife (β -Turn, His313 bis Arg316) beschreiben läßt. Zwischen β_2 und β_3 befindet sich die 10 Residuen lange Schleife L2 mit zwei β -Haarnadeln (Ile321 bis Arg324 und Ala328 bis Tur331). Die kurze Schleife L3 wird durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken stabilisiert. Daraus resultieren Kontakte zwischen Tyr336 O mit Gly340 N, Asp338 O δ 1 mit Asp339N und Asp339 O δ 2 mit Gln341 N. Die Schleife L4 ist mit 4 Resten wiederum kurz. Drei der vier Reste (Leu347 bis Asp349) besitzen die Struktur einer 3_{10} -Helix.

Das Molekül von KorB-C wird sechsmal in unabhängigen kristallographischen Kopien beobachtet, viermal in der orthorhombischen und zweimal in der hexagonalen Kristallform. Alle sechs Kopien besitzen die gleiche oben beschriebene Faltung. Die RMSD-Werte für die Ca -Positionen betragen im Mittel 0,49 Å und für alle Atome 1,01 Å für fünf der sechs Kopien.

RMSD [Å] Ca \ alle Atome ¹		P6 ₅		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁			
		A	B	A	B	C	D
P6 ₅	A	-	0,79	1,436	0,975	1,125	0,971
	B	0,301	-	1,532	1,172	1,108	1,015
P2 ₁ 2 ₁ 2	A	1,188	1,21	-	1,488	1,623	1,437
	B	0,555	0,642	1,226	-	1,011	0,911
	C	0,547	0,66	1,308	0,411	-	0,994
	D	0,536	0,562	1,26	0,365	0,326	-
Mittel ²		0,49 ± 0,12			1.01 ± 0,12		

¹Reste 306 bis 356, ²Ohne Molekül A von P2₁2₁2,

Tab. 15) RMSD-Abweichungen bei der gegenseitigen Überlagerung aller Moleküle

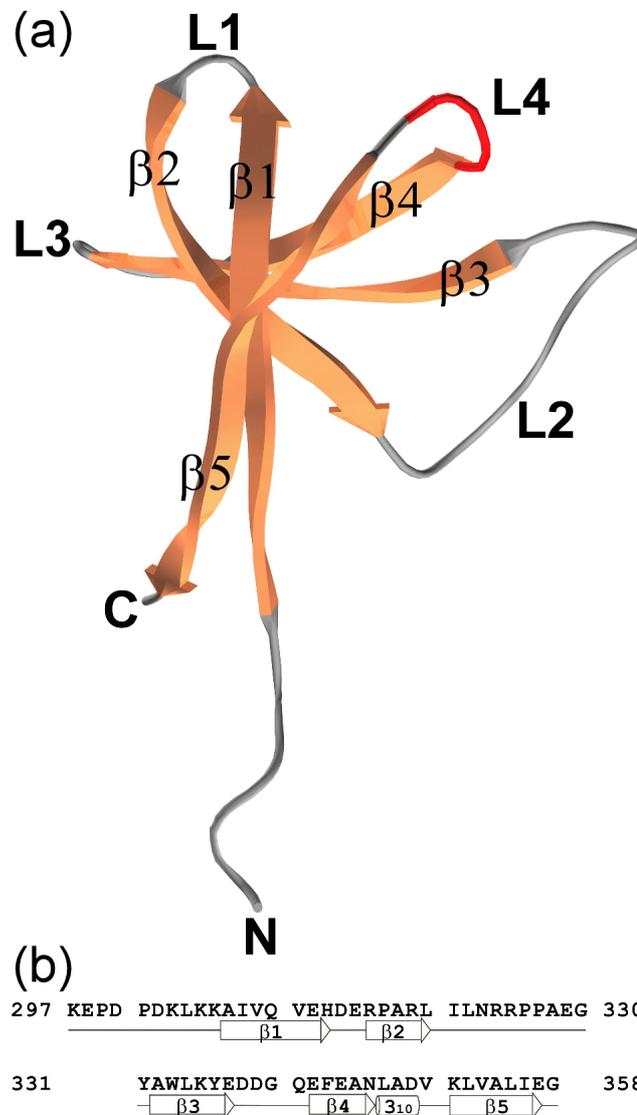


Abb. 28) Sequenz und Kristallstruktur von KorB-C, (a) Molekül D aus der orthorhombischen Struktur β -Stränge und Schleifen sind gekennzeichnet durch β_n und L_n . Die in L_4 enthaltene 3_{10} -Helix ist rot dargestellt. (b) Sequenz und Sekundärstruktur von KorB-C, bestimmt mit PROCHECK [Laskowski et al., 1993]

Orthorhombische Struktur

Die durch MIRAS gelöste Struktur enthält 4 Kopien der C-terminalen Domäne in der asymmetrischen Einheit. Das finale Modell enthält insgesamt 2053 Atome. 1803 Atome beschreiben dabei die vier Ketten von KorB-C und 250 Atome das Lösungsmittel. Von den 62 erwarteten Resten (297 bis 358) für jedes Molekül werden in keinen Fall alle durch das Modell beschrieben. Als besonders flexibel erweist sich der N-terminale Bereich der C-terminalen Domäne. So läßt sich Molekül A erst ab Rest 305 in der Elektronendichte beschreiben. Molekül

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

B und C beginnen je bei Rest 302 während bei Molekül D schon ab Rest 300 deutlich zu interpretierende Elektronendichte vorhanden ist. Der weitere Verlauf bis zu Beginn des ersten β -Stranges bei Rest 307 ist durch hohe atomare Auslenkungsfaktoren gekennzeichnet, und es sind einige Seitenketten nicht in der Dichte identifizierbar. Das sind im Molekül A die Reste Lys305 und Lys306, im Molekül B Asp302, Lys303 und Lys306, im Molekül C Asp302, Lys303 und Lys305 sowie im Molekül D die Reste Pro300 und Lys303, Lys305 und Lys306. Zusätzlich ist im Molekül D die Seitenkette von Glu315 nicht in der Elektronendichte zu identifizieren. Mit Beginn des ersten β -Stranges liegen die atomaren Auslenkungsfaktoren um den Durchschnittswert. Lediglich in den Regionen von Schleifen und C-Terminus findet man erhöhte Werte. Alle Reste liegen in erlaubten oder favorisierten Bereichen des Ramachandran-Diagramms.

Die Lagebeziehungen der vier Kopien von KorB-C lassen sich durch nichtkristallographische Symmetrien beschreiben. So findet man eine zweizählige Drehachse, die die Moleküle A/C und B/D ineinander überführt und die Struktur aus zwei kompakten Einheiten aufgebaut erscheinen läßt, würde man die Moleküle A und C sowie B und D als eins betrachten. Eine zweite Drehachse steht nahezu parallel zur vorherigen jeweils zwischen den Molekülen A und C sowie B und D (siehe Abb. 29). Diese Symmetrie stellt keine 222 Symmetrie dar. Man könnte aber auch die NCS in folgender Art und Weise beschreiben: Zwischen den Molekülen A und C sowie B und D wird je eine zweizählige Drehachse gefunden. Die Überführung von einem Dimer zum nächsten ist dann als eine Translation zu beschreiben. Hier handelt sich es nicht um eine zweizählige Schraubenachse, da die Verschiebung senkrecht zur Drehachse stattfindet.

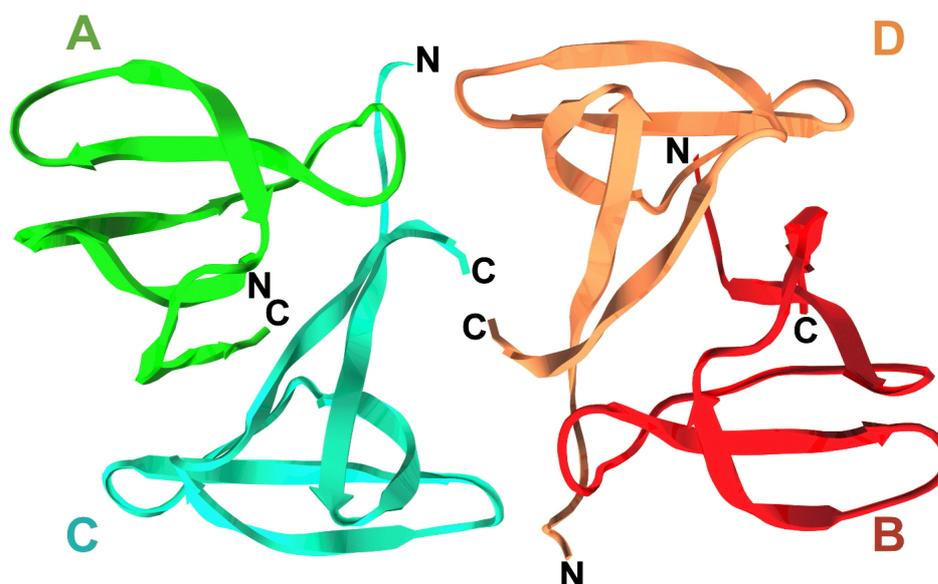


Abb. 30) Asymmetrische Einheit der orthorhombischen Struktur, die Dimere A/C und B/D sind durch eine zweizählige Drehachse im Zentrum, zwischen den C-Termini von Molekül C und D, verknüpft. Das Dimere selbst wird ebenfalls durch eine zweizählige Drehachse erzeugt. Die Drehachsen sind nahezu parallel und stehen senkrecht zur Projektionsebene.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Die Überlagerung der Moleküle zeigt, daß mit Ausnahme des Moleküls A, diese sehr ähnlich zueinander sind (Tab. 15). Die letzten C-terminalen Reste nehmen im Molekül A eine andere Konformation an. Es ist nicht eindeutig klar, warum dieser Bereich diese Abweichung zeigt. Die C-terminalen Reste sind nicht unmittelbar in Kristallkontakte eingebunden. Möglich wäre eine starke Beeinflussung durch den flexiblen N-terminalen Bereich. Dies läßt sich im Vergleich zu den anderen Molekülen vermuten, bei denen N- und C-terminaler Bereich eng benachbart sind. Im Molekül A ist der N-terminale Bereich am schlechtesten definiert und beginnt erst bei Rest 305.

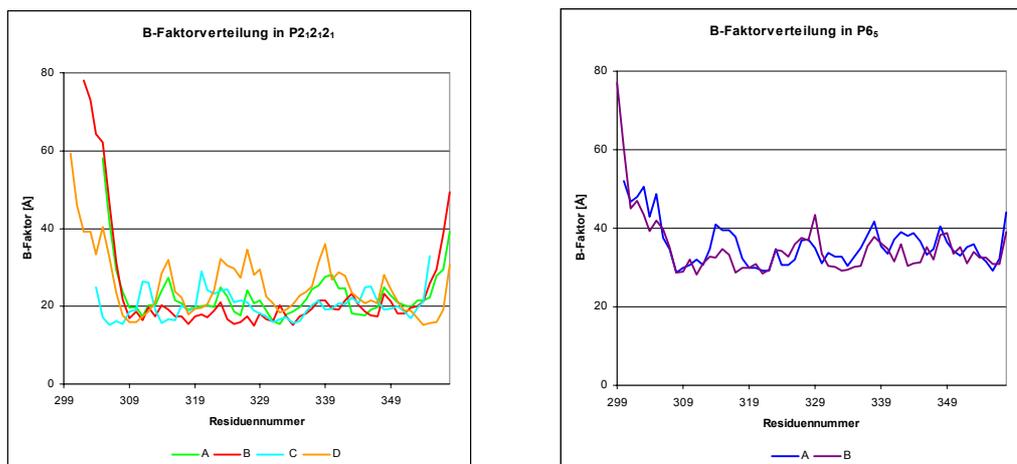


Abb. 30) *B*-Faktorverlauf in der orthorhombischen und hexagonalen Struktur, dargestellt sind die mittleren isotropen *B*-Faktoren der Hauptkettenatome

Hexagonale Struktur

Die durch molekularen Ersatz gelöste Struktur enthält zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Insgesamt enthält das finale Modell 1088 Atome. 968 Atome beschreiben das Protein und 120 das Lösungsmittel. Die beiden Moleküle haben die selbe Anordnung wie die beiden Moleküle A/C bzw. B/D in der orthorhombischen Struktur mit einer zweizähligen nichtkristallographischen Drehachse. In vieler Hinsicht haben sie auch ähnlichen Eigenschaften. So ist auch hier der N- und C-terminale Bereich sehr flexibel, was durch die hohen *B*-Faktoren ausgedrückt wird. Im N-terminalen Bereich können wiederum einige Reste nicht in der Elektronendichte beschrieben werden. So beginnt Molekül A bei Asp300 und Molekül B bei Pro299. Für die Reste in Molekül A Lys305 und in Molekül B Pro299, Lys305 und 306 sind keine Seitenketten in der Dichte zu finden. Alle beschriebene Reste liegen im Ramachandran-Diagramm in erlaubten bzw. favorisierten Regionen.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

	orthorhombische Struktur	hexagonale Struktur
hochfavorisierte Region	182	94
favorisierte Region	15	8
erlaubte Region	1	0
nicht erlaubte Region	0	0
Reste außer Glycin und Prolin	198	102
Endreste (ohne Gly)	4	2
Glycine	12	6
Proline	13	8
Total	227	119

Tab. 16) Statistik des Ramachandran-Diagramms

Dimerenstruktur von KorB-C

Die Anordnung der sechs Kopien in den zwei Kristallstrukturen folgt einem gemeinsamen Muster. Es wird ein Dimeres gebildet, welches wesentlich durch Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen $\beta 5$ -Strängen stabilisiert wird.

Um die intermolekularen Wechselwirkungen zu studieren, wurde die Interaktionsfläche mit dem Protein-Protein Interactions Server [<http://www.biochem.ucl.ac.uk.bsm.pp>] nach einem Ansatz von Jones & Thornton [1995, 1996] analysiert. Die Kontaktfläche für jedes Molekül beträgt rund 990 \AA^2 . Das sind 23,1 % der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die Kontaktfläche hat dabei eine Länge von ca. 31 \AA und eine Breite von 25 \AA . In dieser Fläche werden 63,35 % von nichtpolaren Atomen besetzt. Die Tatsache, daß nahezu 1000 \AA^2 jeder Untereinheit, ein Viertel der gesamten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche, und die Interfacefläche zu Zweidrittel hydrophob sind, läßt den Schluß zu, daß es sich um ein funktionell relevantes Dimeres handelt. Drei Abschnitte des Fragments sind in die Dimerenbildung eingebunden. Der größte Anteil der Kontaktfläche wird von Residuen des Stranges $\beta 5$ gebildet. Das sind Leu352, Leu355 und Glu357. Beide Leucine und Leu347, das zur 3_{10} Helix im Loop L4 gehört, haben ihre Seitenkette in das Interface hinein gerichtet. Die nichtkristallographische zweizählige Symmetrie führt dazu, daß die Leucine miteinander verzahnt wirken. Diese Anordnung erinnert an eine Art Reißverschluß (Zipper). Diese ist perfekt über alle Kopien konserviert (Abb. 32) und paßt sich exakt in die Elektronendichte ein (Abb. 31). Die reißverschlußartige Anordnung ist fundamental unterschiedlich von dem bekannten "leucine zipper" Motiv. Dieses wird von zwei Helices gebildet, während hier die Mehrzahl der Leucine auf β -Faltblättern angeordnet ist.

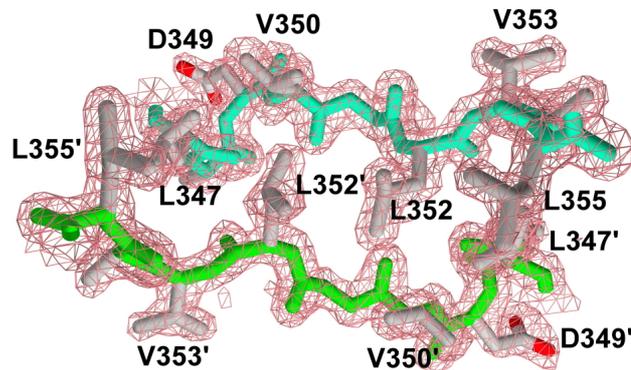


Abb. 31) $2F_o - F_c$ Differenzelektronendichte konturiert bei $1,5 \sigma$ im Bereich des Interfaces des Dimers A/C. Alle Seitenketten passen sich perfekt in die Elektronendichte ein.

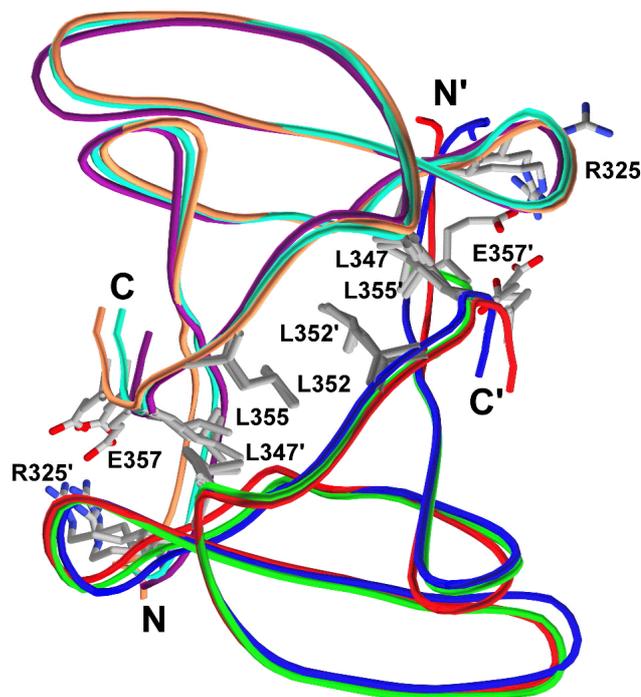


Abb. 32) Dimerkontaktfläche von KorB-C. Überlagert sind die drei kristallographisch unabhängigen Dimere (Orthorhombische Struktur: Molekül A grün, B rot, C türkis, D orange; hexagonale Struktur: Molekül A blau und B violett). Das Dimer wird durch eine Salzbrücke zwischen Arg 325 und Glu357 sowie durch die Reißverschlußartige Anordnung von Leu347, Leu352 und Leu 355 stabilisiert.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Weiter wird das Dimere durch polare Interaktionen stabilisiert. Das sind vier Wasserstoffbrücken und eine konservierte Salzbrücke zwischen Arg325 und Glu357. Aufgrund der abweichenden Konformation der C-terminalen Reste wird diese Salzbrücke im Dimer AC der orthorhombischen Struktur nur einmal ausgebildet. Dadurch ist Glu357 nicht in einer Position, um mit Arg325 direkt in Kontakt zu treten (Abb. 32, grüne Kette).

Dimer/ Molekül		Kontaktfläche [Å]	Anteil an Gesamt- oberfläche [%]	Länge [Å]	Breite [Å]	Nichtpolare Atome in der Kontaktfläche [%]
orth. A	A	895,74	22,55	26,9	25,86	63,7
	C	884,95	20,67	32,93	24,41	71,1
orth. B	B	1013,88	24,11	29,15	22,32	66,7
	D	995,19	22,93	33,84	25,45	62,8
hex	A	1078,72	24,26	33,14	25,19	58
	B	1093,77	24,07	32,22	24,55	57,8
Mittel		993,71 ±88,40	23,10 ±1,40	31,36 ±2,73	24,63 ±1,27	63,35 ±5,12

Tab. 17) Geometrie der Dimeren-Kontaktfläche nach Auswertung mit dem Protein-Protein-Interaction Server [Jones & Thornton, 1995, 1996]

Strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen

Mit dem Dali-Server [Holm & Sander, 1993] wurden strukturelle Ähnlichkeiten von KorB-C zu anderen Proteinen untersucht. Die Faltung von KorB-C ist der Struktur der Src-Homologie-3-(SH3-) Domäne überraschenderweise ähnlich. SH3-Domänen sind im wesentlichen von Proteinen aus eukaryotischen Signaltransduktionswegen bekannt und binden an prolinreiche Motive. Gelegentlich kommen SH3-ähnliche Faltungen auch in Proteinen von Prokaryoten vor [Baumann et al., 1994; Falzone et al., 1994; Safro & Mosyak 1995; Whisstock & Lesk, 1999]. Bei Verwendung der Kette D der orthorhombischen Struktur liefert der DALI-Server die in der folgenden Tabelle (Tab. 18) zusammengefaßten Strukturen mit der höchsten Übereinstimmung.

Das typische Merkmal der Struktur von SH3 Domänen ist ein antiparalleles Up-and-down-Faltblatt. Dieses ist in einigen Fällen in zwei Faltblätter aufgesplittet, einem drei- und einem zweisträngigen Faltblatt, die rechtwinklig zueinander angeordnet sind. Oft wird zwischen den Strängen 4 und 5 eine kurze 3_{10} -Helix von 3 Resten Länge beobachtet [Kuriyan & Cowburn, 1993, Cohen et al., 1995]. Diese Merkmale sind perfekt in den Kristallstrukturen von KorB-C konserviert.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

PDB Code	Z ¹	RMSD ²	Anzahl verglichener Reste	Anzahl Reste in Struktur	Identität [%]	Anzahl Fragmente
KorB-C	14	0	57	57	100	1
1lck ³	4,8	2,4	44	164	14	3
1vie ⁴	4,5	1,8	44	60	7	5
1ihv ⁵	4,4	2	42	52	17	4
1cka ⁶	4,4	1,8	41	56	15	4

¹Z-Score, $Z < 2,0$ bedeutet ähnliche Struktur, ²RMSD-Wert für die C α Positionen, ³1lck Tyrosinkinase mutante [Eck et al., 1994], ⁴1vie Dihydrofolatreduktase [Narayana et al., 1995], ⁵1ihv HIV-1 Integrase [Lodi et al., 1995], ⁶1cka N-terminale SH3-Domäne des Proto-Oncogen-Produkts C-crk [Wu et al., 1995].

Tab. 18) Statistik des Strukturvergleich mit dem Dali-Server,

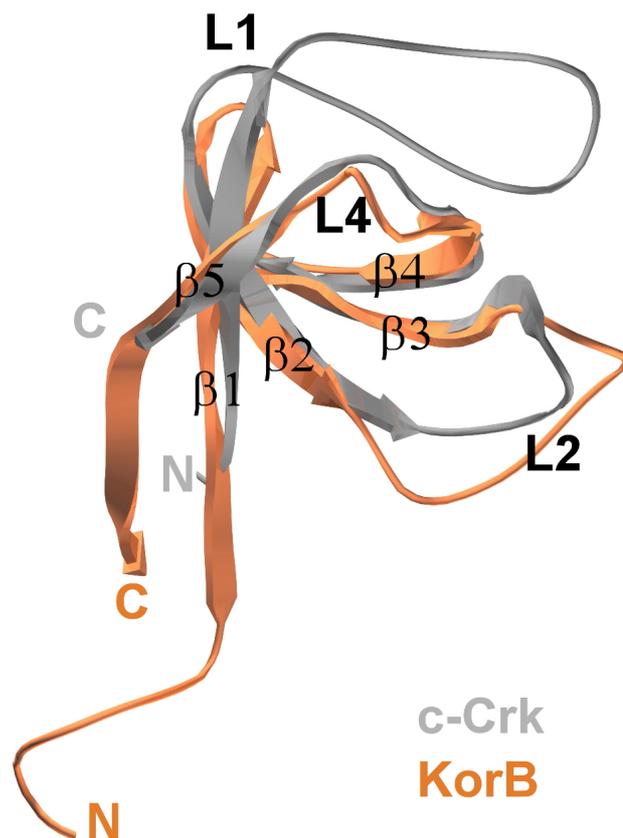


Abb. 33) Überlagerung von KorB-C (Molekül D aus P2₁2₁2₁) und 1cka (c-Crk); Beachte besonders die verkürzte Schleife L1 von KorB-C relativ zu c-Crk

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Im Vergleich zur SH3 Domäne von C-crK ist in KorB-C die Schleife zwischen Strang eins und zwei verkürzt. Diese Schleife ist in C-crK für die Bindung an prolinreiche Motive anderer Proteine [Musacchio et al., 1994] verantwortlich. Sie ist mit dieser Funktion verknüpft und somit für KorB nicht notwendig. Die Situation ist im C- und N-terminalen Bereich umgekehrt. In KorB ist der letzte Strang $\beta 5$ elongiert. Dieser Strang ist im wesentlichen an der Ausbildung der Dimerenkontaktfläche beteiligt. Strang $\beta 5$ geht mit Strang $\beta 1$, der hier ebenfalls elongiert ist, ein Faltblatt ein. Weiterhin wird hier die Verbindung zu den vorherigen KorB-Domänen hergestellt. Dieser Teil ist in der isolierten KorB-C Domäne äußerst flexibel.

Funktion von KorB-C

DNA-Bindungsstudien zeigen (Abb. 17), daß die C-terminale Domäne von KorB nicht direkt in die DNA-Bindung involviert ist. Die DNA-Bindungsstelle ist im Bereich der N-terminalen Domäne lokalisiert.

Eine ähnliche Funktion wie für eukaryotische SH3-Domänen an einem analogen Signaltransduktionsweg beteiligt zu sein, kann ausgeschlossen werden. Auch ist eine enzymatische Aktivität von KorB nicht bekannt.

Aus den beschriebenen Ergebnissen für die Dimerenbildung und DNA-Bindung kann geschlossen werden, daß die C-terminale Domäne für die Bildung eines homodimeren in KorB verantwortlich ist. So stabilisiert KorB-C die dimere Form von KorB, um hochspezifisch an DNA zu binden.

5.4. Diskussion

Das von dem RP4-Plasmid kodierte Protein KorB ist ein Repressor, der die Expression von RP4-Genen negativ kontrolliert. Dies erfolgt durch die Bindung an die pseudosymmetrische 13bp Operatorsequenz (O_B), die zwölfmal in dem Plasmid vorhanden ist. Die DNA-bindende Domäne konnte durch limitierten proteolytischen Verdau eingegrenzt werden und die C-terminale Domäne durch *in situ* Proteolyse im Kristallisationstropfen freigesetzt werden.

Das bakterielle Repressorprotein KorB gliedert sich in mehrere Domänen. Die räumliche Anordnung der Domänen scheint dabei sehr mobil zu sein, und die Domänen sind über flexible Linker miteinander verbunden. Von KorB ist bekannt, daß es als Dimeres in Lösung vorliegt [Balzer et al., 1992]. Die Dimerenbildung, wie sie ausführlich mit dem Einfluß auf die DNA-Bindung hier diskutiert werden soll, erfolgt über die C-terminale Domäne. Die DNA-bindende Domäne liegt im Bereich der 300 N-terminalen Reste. Ein theoretisch vorhergesagtes Helix-Turn-Helix-Motiv liegt im Bereich der Reste 172-193 [Balzer et al., 1992]. Eine durchgeführte Domänenanalyse mit limitiertem proteolytischem Verdau scheint dies zu bestätigen. Die so erhaltenen Fragmente binden aber nicht mehr spezifisch an DNA. Gereinigtes Protein dieser Domäne führte aber in Gegenwart von entsprechenden DNA-Fragmenten zur Kristallen, die Protein und DNA enthalten und Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,7 Å liefern. Eine Strukturbestimmung war aufgrund der fehlenden Phaseninformation nicht möglich. Neuere Analysen mit weiteren N- und C-terminalen Deletionsmutanten [Ziegelin G. & Lanka E., persönliche Mitteilung] zeigen, daß mit Fragmenten, die deutlich früher am N-Terminus beginnen und mit den beschriebenen Fragmenten von KorB überlappen, eine spezifische Bindung erreicht werden kann. Eine einhergehende Analyse, um ein spezifisch bindendes Fragment zu bekommen, sollte weiteren kristallographischen Analysen vorausgehen.

Die Kristallstruktur der C-terminalen Domäne, die die 62 C-terminalen Reste enthält, konnte in zwei Kristallformen bestimmt werden. Die globuläre Domäne ist aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt aufgebaut. Die Topologie und die dreidimensionale Struktur von KorB-C ist den Strukturen der SH3-Domänen ähnlich. Diese kommen oft in Proteinen vor, die in Signaltransduktion eukaryotischer Zellen involviert sind. Die sechs kristallographisch unabhängigen Kopien von KorB-C wurden in zwei Kristallformen beobachtet und bilden drei Homodimere mit zweizähliger Rotationssymmetrie. Die Untereinheiten sind im Dimeren über eine ausgedehnte, überwiegend hydrophobe Kontaktfläche miteinander verknüpft.

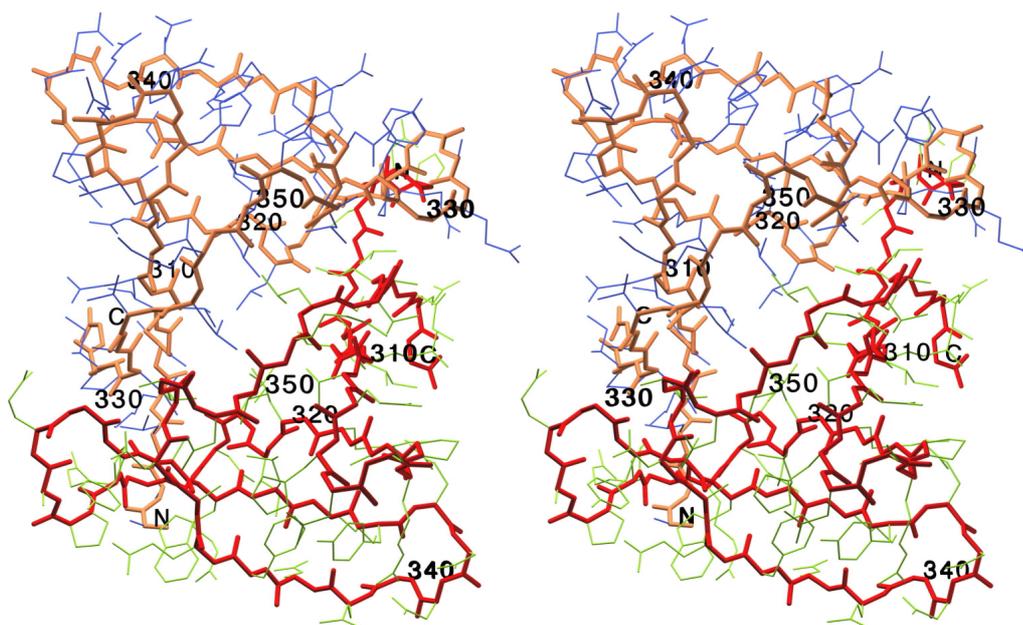


Abb. 34) Stereographische Darstellung des KorB-C Dimeren.

Zur Überprüfung, ob die Dimerenbildung durch die Kristallisation induziert wurde, erfolgten in der Arbeitsgruppe von E. Lanka Quervernetzungs-Studien. Die Analyse der Quervernetzungs-Produkte mit SDS-PAGE (Abb. 35) zeigt, daß mit zunehmender Reagenzkonzentration die dimere Form von KorB-C zunimmt. Bereits bei 0,25 mM Glutardialdehyd ist die Hälfte des Proteins des Reaktionsmix in dimerem Zustand. Bei 1 mM ist KorB-C fast vollständig in dimerer Form. Selbst bei dieser hohen Konzentration von Glutardialdehyd gibt es keine signifikanten Anzeichen von höheren Oligomeren. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den früheren Quervernetzungs-Studien [Balzer et al., 1992] des intakten KorB Proteins, die eine Dimerisierung von KorB und keine höheren Oligomere bei ähnlichen Konzentrationen von Protein und Glutardialdehyd zeigen.

Die Bildung eines Dimeren in Lösung, wie sie bei den Quervernetzungs-Studien gezeigt wurde, ist in guter Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen von KorB-C, wo ein Dimeres mit zweizähliger Rotationssymmetrie gefunden wird. Lediglich der N-Terminus von KorB-C ragt aus dem Dimer heraus und zeigt große Beweglichkeit und Fehlordnung über alle Kopien der Domäne hinweg. Es scheint somit möglich, daß die 296 fehlenden N-terminalen Reste des intakten KorB hinzugefügt werden können, ohne die Dimerenbildung von KorB-C zu stören. Das bedeutet, daß das in der Kristallstruktur von KorB-C gefundene Dimere in der selben Art und Weise im intakten KorB Protein gebildet werden und auch im DNA-Komplex vorhanden sein kann.

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

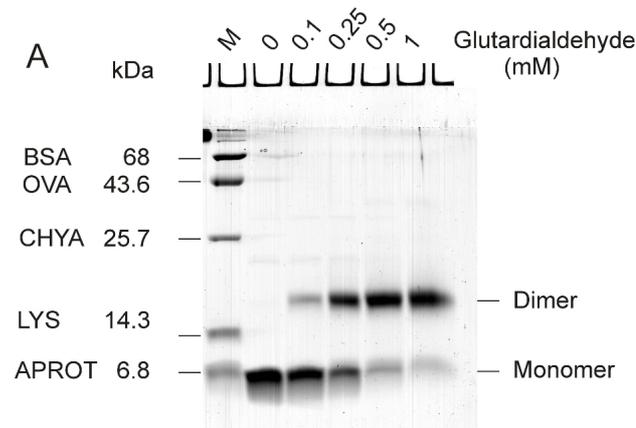


Abb. 35) Quervernetzungs-Studie von KorB-C mit Glutardialdehyd im Bereich von 0 bis 1 mM. Monomer und Dimerbanden sind gekennzeichnet. Molekulargewichtsmarker BSA - Bovines Serumalbumin, OVA - Ovalbumin, CHYA - Chymotrypsinogen, LYS - Lysozym, APROT - Aprotinin [Ziegelin G. & Lanka E., persönliche Mitteilung].

Mittels Gelretardierung [Ziegelin G. & Lanka E., persönliche Mitteilung] wurde das DNA-Bindungsverhalten von KorB-C, KorB-N und intaktem KorB getestet. Auch bei der höchsten Konzentration von 45 pmol Protein im Probenvolumen konnte keine Bindung von KorB-C zu einem die Operatorsequenz O_B enthaltenden DNA-Fragment nachgewiesen werden. Für KorB und KorB-N konnte bei sehr viel geringeren Konzentrationen eine spezifische Bindung an O_B gezeigt werden. Allerdings ist die Affinität verändert. Während für KorB eine komplette Bindung bei 3 pM gezeigt wird, ist bei einer vergleichbaren Konzentration von 2,5 pM KorB-N keine Bindung beobachtet worden. Erst bei höheren Konzentrationen ist die Bindung sichtbar. KorB-C allein kann nicht spezifisch an DNA binden. Aber das Vorhandensein der C-terminalen

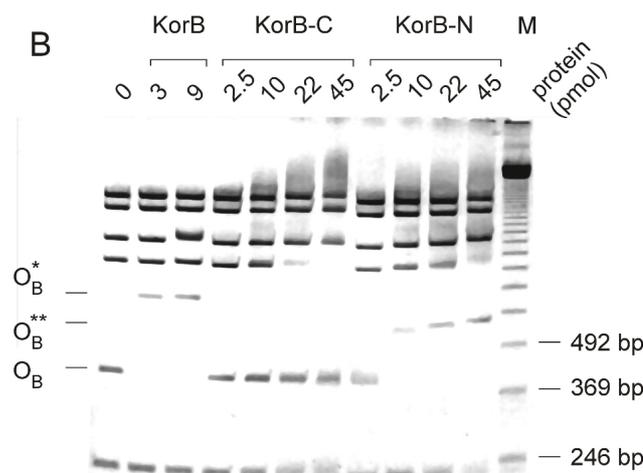


Abb. 36) Komplexbildung von KorB sowie N- und C-terminalen Fragment mit O_B -DNA, O_B^* O_B -DNA-KorB-Komplex, O_B^{**} O_B -DNA-KorB-N-Komplex [Ziegelin G. & Lanka E., persönliche Mitteilung]

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Domäne scheint die DNA-Bindungsaffinität von KorB zu steigern, wie aus dem Vergleich von KorB und KorB-N abgeleitet werden kann.

In Verbindung mit den verfügbaren biochemischen Daten kann KorB-C als die Dimerisierungsdomäne von KorB beschrieben werden. Die ausgedehnte Kontaktfläche ist groß genug, um die dimere Form des intakten KorB zu stabilisieren. Frühere Quervernetzungsstudien zeigen, daß das intakte KorB ein Homodimeres in Lösung bildet [Balzer et al., 1992]. Die Bildung eines Tetrameren in Lösung wurde ebenfalls beschrieben [Williams et al., 1993]. Es gibt aber keine Anhaltspunkte dafür, daß KorB-C ebenfalls ein Tetrameres in Lösung formt, was durch die Kristallstruktur von KorB-C unterstützt wird. In der Kristallstruktur gibt es zwischen den Dimeren keine festen Bindungen und Interaktionsmotive. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß im intakten KorB Bereiche vorhanden sind, die eine weitere Oligomerisierung unterstützen könnten. Bei einem unlängst veröffentlichten Experiment [Jagura-Burdzy et al., 1999a] wurden C-terminale Deletionsmutanten untersucht. Ein Abspalten von 17 C-terminalen Resten, KorB $\Delta 17$, führt zu einer Reduzierung der Oligomerisierung von KorB *in vitro*, und damit ist eine Verringerung der Spezifität der Bindung zu DNA-Fragmenten, die die O_B-Sequenz enthalten, verbunden. Die KorB-Deletionsmutanten verlieren die Fähigkeit, die Operatoren der Klasse II zu unterdrücken, aber nicht die der Klasse I Operatoren. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von KorB-C und KorB-N gut überein. Für KorB-N kann prinzipiell eine spezifische DNA-Bindung gezeigt werden. Die Affinität ist aber im Vergleich zum intakten KorB deutlich reduziert. Das zeigt, daß die Dimerenbildung nicht allein für die Bindung an DNA verantwortlich ist, aber daß die Funktion von KorB als Repressor zu wirken mit der Bildung von Multimeren verbunden ist. Basierend auf der Kristallstruktur kann vorgeschlagen werden, daß die Mutante KorB $\Delta 7$ ähnliche Eigenschaften wie die Mutante KorB $\Delta 17$ hat, denn in ihr würden Leu353 und Leu355 sowie Glu357 fehlen, die einen Großteil der Kontaktfläche ausmachen. Mit einer Mutante KorB $\Delta 2$ könnte im Prinzip der stabilisierende Beitrag der Salzbrücke Arg325-Glu357 bestimmt werden. Weitere Indizien für eine funktionell relevante Dimerisierung über die C-terminale Domäne kommen von Studien [Lobocka & Yarmolinsky, 1996] am KorB-Homologen ParB. Die Deletion eines C-terminalen Teils sowie Mutationen von einigen C-terminalen Resten, einbezogen einige Leucine, verhindern bei diesem Protein die Dimerenbildung und die Bindung an *parS*-Bindungsstellen auf dem Plasmid P1.

Es ist davon auszugehen, daß eine dimere Struktur von KorB, im wesentlichen unterstützt durch die C-terminale Domäne, die hochspezifische Bindung an eine pseudosymmetrische DNA-Sequenz ermöglicht. KorB-C hat keine nachweisbare Affinität zu DNA (Abb. 37), so daß es unwahrscheinlich ist, daß die C-terminale Domäne im intakten KorB an DNA bindet. Das steht auch im Einklang mit dem Auffinden eines Sequenzmotivs [Balzer et al., 1992] im N-terminalen Fragment, das einem Helix-Turn-Helix-Motiv ähnlich ist, wie es von vielen

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

bakteriellen Repressorproteinen bekannt ist. Die funktionelle Rolle der C-terminalen Domäne des intakten KorB bei der Genregulation scheint in der Fähigkeit zur Dimerbildung zu liegen. Diese ist in der Tat für die hochspezifische Bindung von KorB an die Operator-DNA wichtig. Andere Funktionen von KorB-C sind denkbar, wie zum Beispiel die Interaktion mit anderen RP4-codierten Proteinen wie KorA [Kostelidou et al., 1999], TrbA [Kostelidou et al., 1999, Zatyka et al., 2001] oder IncC [Kostelidou & Thomas, 2000; Jagura-Burdzy et al., 1999a; Rosche et al., 2000], welche mit KorB bei der Genrepression im RP4 zusammenwirken.

Das KorB-C Monomere faltet sich in ein fünfsträngiges antiparalleles β -Faltblatt mit einer ungefähren rechtwinkligen Anordnung der gepaarten Stränge $\beta 3$ und $\beta 4$ über die drei Stränge $\beta 2$, $\beta 1$ und $\beta 5$. Diese Art der Faltung ist radikal unterschiedlich zu der OB-Faltung einer ebenfalls fünfsträngigen β -barrel Domäne mit "Greek-key"-Topologie und ähnlicher Größe, wie sie in den im vorherigen Abschnitt diskutierten bakteriellen Kälteschockproteinen vorkommt.

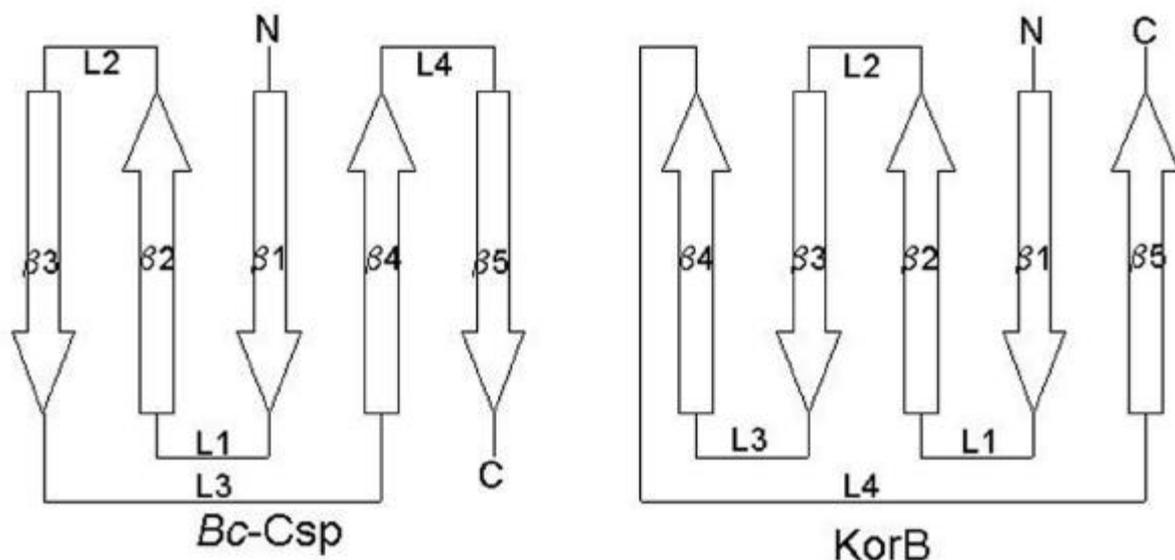


Abb. 37) Schematische Darstellung der Topologie von *Bc-Csp* und *KorB-C*

Die Faltung von *KorB-C* ähnelt statt dessen stark der SH3-Domänen-Faltung, wie sie in der Tyrosinkinase [Yu et al., 1992], dem α -Spectrin [Musacchio et al., 1994], c-Crk [Wu et al., 1995] und vielen anderen Proteinen beobachtet wird. Der β -Faltblattkern dieser Proteine stimmt erstaunlich gut mit dem von *KorB-C* überein. Die strukturelle Ähnlichkeit erstreckt sich sogar auf ein kurzes 3_{10} -helikales Segment in der Schleife L4, wie es charakteristisch für eukaryotische SH3-Domänen [Kuriyan & Cowburn, 1993; Cohen et al., 1995] ist. Während die Schleifen L2, L3 und L4 in den klassischen SH3-Domänen, gewöhnlich als n-Src Schleife, Distalschleife und 3_{10} -Schleife bezeichnet, sehr ähnlich den korrespondierenden Schleifen in den eukaryotischen SH3-Domänen sind, ist die RT-Schleife zu einem β -Turn, der die ganze Schleife L1 in *KorB-C* darstellt, verkürzt worden. Eine weitere Differenz bezüglich der SH3-

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

Domänen sind die verlängerten Stränge $\beta 1$ und $\beta 5$ (Abb.33). Trotz der deutlichen Differenzen ist es jedoch gerechtfertigt, die Faltung von KorB-C als SH3-ähnlich zu bezeichnen. Eine Sequenzähnlichkeit hingegen ist selbst mit der Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von KorB-C und SH3-Domänen schwer zu finden.

KorB-C	295	GAKEPD	PDKLKK	AIVQ	VEH	-----	-----D				
c-Crk	134			AEY	VRAL	FDfNGN	DEEDLPFKK-				
KorB-C	325	ERPARL	IILNR	RPPAEGY	AWL	KYEDDGQ	EFE	ANLADV	KLVA	LIEG	
c-Crk	164	GDILR	IRD	--	-KPEEQ	WWNA	EDS	-EGK	RG	IPVPY	VEKY

Abb. 38) Sequenzvergleich von KorB-C und c-Crk nach Dali [Holm & Sander, 1993]
| identischer Rest

Somit scheinen die Strukturen mit SH3- und SH3-ähnlicher Faltung aus einem stabilen β -Faltblattkern, der aus fünf β -Strängen und oft einer kurzen 3_{10} -Helix besteht, aufgebaut zu sein. Die offensichtliche Variabilität dieses Faltungsmotivs ermöglicht die Anpassung an verschiedene Funktionen, wobei zunächst unklar bleibt, ob die Domänen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben oder sich unabhängig voneinander entwickelt haben.

KorB-C ist nicht die einzige Domäne aus einem prokaryotischen Protein, die eine SH3-ähnliche Faltung haben. Es war schon früher berichtet [Wilson, et al., 1992] worden, daß die C-terminale Domäne des *E. coli* Biotinholoenzymsynthetase/Biotinrepressors strukturell den SH3-Domänen ähnelt. Andere SH3-ähnliche Faltungen sind in der Dihydrofolatreduktase [Narayana et al., 1995], dem photosystem I accessory protein aus *Synechococcus* sp. [Falzone et al., 1994] und *Nostoc* sp. [Mayer et al., 1999], der *Thermus thermophilus* Phenylalanin-tRNA-Synthetase [Safro & Mosyak, 1995], dem *Corynebacterium diphtheriae* Toxin Repressor DtxR [Pohl et al., 1999], der *E. coli* Exonuklease I [Breyer & Matthews, 2000] und dem "minor coat" Protein g3p des fd-Phagen [Holliger & Riechmann, 1997] gefunden worden. Das DNA-bindende Protein Sso7d von *Sulfolobus solfataricus* [Baumann et al., 1994] ist ein Beispiel für eine SH3-ähnliche Faltung in einem archaealen Protein. Schließlich sei noch die HIV1-Integrase [Lodi et al., 1995] erwähnt, die eine DNA-bindende Domäne mit SH3-ähnlicher Faltung enthält, und nicht zu den bakteriellen Proteinen gehört.

Eukaryotische SH3-Domänen sind vornehmlich in die Unterstützung der Protein-Protein-Wechselwirkungen eingebunden und an biologischen Prozessen wie Signaltransduktion oder Membrancytoskelettinteraktionen beteiligt. Die am häufigsten vorkommende Art der Proteinbindung ist die Assoziation von SH3-Domänen mit einer prolinreichen Region, welche in der Regel eine Polyprolin-Typ-II-helikale Konformation hat. Diese Wechselwirkung ist mit

5. Kristallographische Untersuchungen an KorB

der RT-Schleife der SH3-Domäne verknüpft. In KorB-C ist eine ähnliche Art der Bindung zu prolinreichen Motiven ausgeschlossen, da die dafür verantwortliche RT-Schleife zu einer β -Biegung verkürzt ist. Eine Anzahl von anderen Funktionen wurden für die SH3-ähnlichen Domänen beschrieben, die mit ihrem Ursprung variieren. Diese beinhalten DNA-Bindung für das archeale Sso7d-Protein [Baumann et al., 1994] und die N-terminale Domäne der HIV1 Integrase [Lodi et al., 1995], welche abhängig ist von einer Dimerenbildung und Ionenbindung, wie sie bei der SH3-ähnlichen Domäne von DtxR [Pohl, et al., 1999] beobachtet wird. Bei einigen Beispielen konnte bis jetzt keine klare Funktion für die SH3-ähnlichen Domänen beschrieben werden [Safro & Mosyak et al., 1995, Wilson et al., 1992].

Es wurde gezeigt, daß die C-terminale Domäne des KorB-C die Dimerisierung des transkriptionellen Repressors KorB durch eine symmetrische Wechselwirkung der SH3-ähnlichen Domänen unterstützt. Die Bildung von Homodimeren ist für SH3-ähnliche Domänen schon früher beschrieben worden. So bildet die Domäne der HIV1-Integrase ein Homodimeres. Für das "epidermal growth factor receptor pathway substrate 8" (Eps8) werden ineinander verschränkte Dimere in Koexistenz mit Monomeren beschrieben [Kishan et al., 1997, Kishan et al., 2001]. Weiterhin werden heterodimere Wechselwirkungen zwischen SH3-Domänen beschrieben, so für die SH3-Domänen des "mammalian growth factor receptor-binding protein" Grb2 [Maignan et al., 2001] und den Grb2-Vav-Komplex [Nishida et al., 2001]. Alle diese SH3-SH3-Interaktionen sind verschieden von der hier für KorB-C beschriebenen Homodimerenbildung. Diese wird durch eine symmetrische Wechselwirkung von im wesentlichen im C-terminalen Abschnitt befindlichen hydrophoben Resten geformt. Die Kristallstruktur von KorB-C erweitert das Spektrum von Protein-Protein-Wechselwirkungen von SH3- und SH3-ähnlichen Domänen. Mit der Unterstützung der Dimerisierung von KorB und der dadurch hochspezifischen Bindung des bakteriellen Repressors an DNA kann der hier beschriebenen neuen Wechselwirkung zwischen SH3-Domänen eine klare biologische Funktion zugeschrieben werden.

Offensichtlich besteht KorB aus mehreren Domänen die auf den ersten Blick funktionell unabhängig sind. Die genauere Analyse der Daten liefert aber, daß die C-terminale Domäne ohne direkt an DNA zu binden den Komplex aus DNA und KorB stabilisiert. Weiter scheint interessant, die Fragestellung zu untersuchen, inwieweit Bindungspartner von KorB, KorA und IncC die scheinbar flexible Domänenstruktur von KorB stabilisieren. Ein ternärer Komplex aus KorB, IncC und DNA würde einen tieferen Einblick in die spezifische Bindung an DNA geben, zumal von IncC bekannt ist, daß es die Affinität von KorB zu DNA steigern kann. Weiter interessant erscheint ein Komplex aus KorA mit DNA und KorB mit DNA, der stark kooperativ ist, und regulatorisch wirken könnte. Die Ursachen der flexiblen Domänenstrukturen könnten vielleicht aus diesen Zusammenhang erklärt werden.