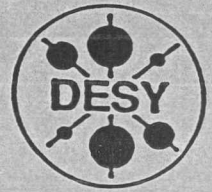


A
DEUTSCHES ELEKTRONEN-SYNCHROTRON

DESY-THESIS-1998-011,
Mai 1998

hat ausgelesen



Röntgenkristallographische Untersuchungen an
Enolpyruvyltransferase und Kinesin



von

S. Sack



ISSN 1435-8085

NOTKESTRASSE 85 - 22603 HAMBURG

DESY behält sich alle Rechte für den Fall der Schutzrechtserteilung und für die wirtschaftliche Verwertung der in diesem Bericht enthaltenen Informationen vor.

DESY reserves all rights for commercial use of information included in this report, especially in case of filing application for or grant of patents.

To be sure that your reports and preprints are promptly included in the
HEP literature database
send them to (if possible by air mail):

DESY
Zentralbibliothek
Notkestraße 85
22603 Hamburg
Germany

DESY
Bibliothek
Platanenallee 6
15738 Zeuthen
Germany

Röntgenkristallographische Untersuchungen an Enolpyruvyltransferase und Kinesin

X-Ray Structure Determination of Enolpyruvyltransferase and Kinesin

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Physik der
Universität Hamburg

vorgelegt von
Stefan Sack ✓

aus
Hamburg

Hamburg
1998

Röntgenkristallographische Untersuchungen an
Enolpyruvattransferease und Kinesin

X-Ray Structure Determination of Enolpyruvattransferease and Kinesin

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Physik der
Universität Hamburg

vorgelegt von
Stefan Sack
aus
Hamburg

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. E. Mandelkow
Prof. Dr. R.L. Johnson

Gutachter der Disputation: Prof. Dr. E. Mandelkow
Prof. Dr. G. Materlik

Datum der Disputation: 20. Februar 1998

Dekan des Fachbereichs Physik und
Vorsitzender des Promotionsausschusses: Prof. Dr. B. Kramer

Für Scharik und Mark

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	1
1.2 Motorprotein Kinesin	3
1.2.1 Mikrotubuli	3
1.2.2 Funktion des Kinesins	4
1.2.3 Struktur des Kinesins und Kinesinfamilie	5
1.3 Enolpyruvyltransferase	6
1.3.1 Funktion der EPT	7
1.3.2 Pharmakologische Bedeutung	7
1.3.3 Vergleich mit EPSP-Synthase	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Proteine	9
2.1.1 Aufbau und Primärstruktur	9
2.1.2 Sekundärstruktur	9
2.1.3 Tertiär- und Quartärstruktur	10
2.2 Röntgenkristallographische Bestimmung der Struktur von Proteinen	10
2.3 Aufbau eines Proteinkristallographieexperiments	11
2.3.1 Röntgengenerator	11
2.3.2 Detektor	12
2.3.3 Einfrieren von Proteinkristallen	13
2.4 Synchrotronstrahlführungen	13
2.4.1 BW6 (DESY/Max-Planck-Ges.)	14

2.4.2	BW7b (DESY/EMBL)	14
2.4.3	X11 (DESY/EMBL)	14
2.4.4	X31 (DESY/EMBL)	14
2.4.5	W32 (LURE, Orsay)	15
2.4.6	BM14 (ESRF/EMBL Grenoble)	15
2.5	Methoden der Phasenbestimmung	15
2.5.1	isomorpher Ersatz	16
2.5.2	Ausnutzung anomaler Streueffekte	19
2.5.3	MAD - Multiple wavelength Anomalous Dispersion	19
2.5.4	Molekularer Ersatz	19
2.6	Methoden zur Phasenverbesserung mit Dichtemodifikationen	21
2.6.1	Lösungsmittelglättung - <i>Solvent Flattening</i>	21
2.6.2	Nicht-kristallographische Symmetrie (NCS)	22
2.7	Verfeinerung der Proteinstruktur	22
2.7.1	Methode der kleinsten Quadrate	23
2.7.2	Simuliertes Annealing	23
2.8	Kristallographische Computer-Programme	23
2.8.1	Programme für die kristallographische Analyse	24
2.8.2	Programm zum (Um)Bau der Modelle: O	25
2.8.3	Programme zur Struktur-Verfeinerung	26
2.8.4	Programme zur Qualitätsüberprüfung der Struktur	27
2.8.5	Programme zur Darstellung der Proteinstruktur	27
3	Strukturbestimmung des Motorproteins Kinesin	29
3.1	Ergebnisse	29
3.1.1	Strukturbestimmung des dimeren Kinesins	29
3.1.2	Strukturbestimmung des Kinesin-Monomers	37
3.1.3	Verfeinerung und Umbau des Monomer-Modells	39
3.1.4	Beschreibung der Struktur des Kinesin-Monomers	49
3.2	Diskussion	60
3.2.1	Vergleich von Kinesin Motoren	60

3.2.2	Ähnlichkeit von Kinesin mit anderen Proteinen	65
4	Strukturaufklärung der Enolpyruvyltransferase	79
4.1	Ergebnisse	79
4.1.1	Kristallographische Analyse der Enolpyruvyltransferase	79
4.1.2	Phasenbestimmung	84
4.1.3	Fourierdifferenzdichtekarten	87
4.1.4	Verfeinerung der Struktur der Enolpyruvyltransferase	89
4.1.5	Struktur der Enolpyruvyltransferase	91
4.2	Diskussion	102
4.2.1	Vergleich mit EPT-Substrat-Inhibitor-Komplex	102
4.2.2	Vergleich mit EPSP-Synthase	106
Ausblick		109
	Enolpyruvyltransferase	109
	Kinesin	109
Danksagungen		111
Literaturverzeichnis		113
Index		123

Abbildungsverzeichnis

1.1	PDB Wachstum von 1973-1997	2
1.2	Mikrotubulus mit Motorproteinen	4
1.3	Kinesin Familie	5
1.4	Kinesin Domänenstruktur	6
1.5	Funktion der Enolpyruvyltransferase	7
2.1	Aufbau eines Proteinkristallographieexperimentes	11
2.2	Phasenbeziehungen zwischen Struktur Faktoren	16
2.3	Harkerkonstruktion zur Bestimmung der Phasen	18
3.1	Erste Elektronendichtekarte des Kinesin-Dimer nach SIRAS	31
3.2	Kinesin: Stereobild der Differenz-Fourier Elektronendichtekarte (Quecksilber)	32
3.3	Kinesin: Differenz-Fourier Elektronendichtekarte (Selen)	33
3.4	Elektronendichtenkarten des Kinesin-Dimer vor und nach <i>Solvent Flattening</i>	35
3.5	Elektronendichten vor und nach NCS	36
3.6	Drehkristallaufnahme von monomerem Kinesin	37
3.7	Elektronendichte des Kinesin-Monomers nach molekularem Ersatz	38
3.8	Kinesin Monomer Verfeinerung: erster Simulated Annealing Lauf	40
3.9	Kinesin Monomer: alle Simulated Annealing Läufe	41
3.10	Schema eines Verfeinerungs-Umbau-Zyklusses	42
3.11	Elektronendichte im Bereich des Restes 31	43
3.12	Elektronendichte im Bereich des Restes 293	44
3.13	Kinesin Monomer REFMAC-Verfeinerung	46
3.14	Ramachandran-Plot des Kinesin-Monomers	47
3.15	Cartoonplot des Kinesin Strukturmodells	49

3.16	Topologie-Plot des Kinesin	50
3.17	Wasserstoffbrückenbindungsschema des Kinesins	52
3.18	Nukleotidbindungsstelle des Kinesins	53
3.19	Elektronendichtekarte der Nukleotidbindungsstelle des Kinesin	54
3.20	Elektrostatistisches Potential an der Oberfläche des Kinesins	55
3.21	Richtungsbestimmende Reste des Kinesin	56
3.22	Überlagerung der Kopfdomänen von Kinesinen	57
3.23	Doppelkonformation Ser205–Arg191	58
3.24	Verbindungen zwischen Switch I und Switch II	59
3.25	Vergleich Kinesin und <i>ncd</i>	61
3.26	Kinesin-Dimer	64
3.27	G-Protein Topologie	67
3.28	p21 ^{H-ras} -GTP Strukturmodell	67
3.29	G-Protein-Zyklus nach Kjeldgaard et al. (1996)	67
3.30	Struktur von p21 ^{H-ras}	69
	(a) GTP-Zustand, geschlossene Konformation	69
	(b) GDP-Zustand, offene Konformation	69
3.31	Struktur von EF-Tu	70
	(a) EF-Tu-GTP, geschlossene Konformation	70
	(b) EF-Tu-GDP, offene Konformation	70
3.32	Struktur des Myosin	71
	(a) ADP·VO ₄ (1vom)	71
	(b) Nukleotid frei (2mys)	71
3.33	Positionen der konservierten Glycine in P-Loop und Switch II	73
3.34	Topologien der β -Faltblätter von Nukleotidbindenden Proteinen	75
3.35	Überlagerung von Nukleotidbindenden Proteinen	76
4.1	Drehkristallaufnahme von EPT	80
4.2	Selbstrotation von EPT, $\kappa = 180^\circ$	81
4.3	Harker-Ebene $y = 0$ der Patterson-Funktion des EPT mit K ₂ Pt(CN) ₄	83
4.4	Harker-Ebene $y = 0$ der Patterson-Funktion des EPT mit KAu(CN) ₂	84

4.5	Bindungsstelle des Pt- und Au-Ions an Asp51	87
4.6	Bindungsstelle des Pt-Ions im Loop 112-121	87
4.7	Xenon-Bindungsstelle zwischen IIa und IIc	88
4.8	Xenon-Bindungsstelle in der Nähe von Trp95	88
4.9	EPT Verfeinerung: Simulating Annealing Läufe	90
4.10	Stereobilder von EPT: C ^α -trace und Cartoonplot	91
4.11	Topologie der Enolpyruvyltransferase	92
4.12	Faltung der Unterheiten der Enolpyruvyltransferase	93
4.13	Wasserstoffbrückenbindungsschema der EPT	95
4.14	Überlagerung der Primärsequenzen der Faltungseinheiten	96
4.15	Verbindung der Faltungseinheiten (Blick entlang Domänenachse)	97
4.16	Scharnier-Region der EPT	99
	(a) Oberflächen-Potential	99
	(b) Detail-Ansicht	99
4.17	Kontaktstelle der nichtkristallographisch äquivalenten EPT-Monomere	100
4.18	Ramachandran-Plot der EPT	101
4.19	Vergleich von EPT ohne und mit Substrat	103
4.20	Oberflächen-Potential der EPT	104
4.21	Alignment der EPT- und EPSP-Synthase	107
4.22	Struktur der EPSP-Synthase	108
	(a) gesamtes Molekül	108
	(b) Faltungseinheiten	108

Tabellenverzeichnis

2.1	Proteinkristallographische Synchrotronmeßplätze	15
3.1	Phasing Power und <i>figures of merit</i>	34
3.2	Temperaturfaktoren Kinesin	48
3.3	Richtungsbestimmende Reste von Motorproteinen	57
3.4	Sequenzen von Nukleotidbindungs- und Schalter-Regionen	65
3.5	P-Loops von G-Proteinen und Myosin	68
3.6	Offene und geschlossene Konformationen von G-Proteinen	72
3.7	Proteine mit P-Loops	74
3.8	Überlagerung des zentralen β -Faltblattes	77
4.1	Datenqualität und Phasierungsstatistik von EPT	85
4.2	Schema der Faltungseinheiten der EPT	94
4.3	LX ₃ G(A) Verbindungen zwischen den EPT-Faltungseinheiten	98
4.4	AEGT Verbindungen zwischen den EPT-Faltungseinheiten	98
4.5	Temperaturfaktoren Enolpyruvyltransferase	102

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ADP	Adenosin-Triphosphat
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
EMBL	Europäisches Molekularbiologie Laboratorium
EPT	Enolpyruvyltransferase
ESRF	Europäische Synchrotronstrahlquelle
FOM	Figure of merit
GDP	Guanosin-Triphosphat
MAD	Multiple wavelength Anomalous Dispersion
MIR	Multiple isomorphous Replacement
MIRAS	Multiple isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion
MPG	Max-Planck-Gesellschaft
PDB	Protein Data Bank
SIRAS	Single isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion
Symbol	Bezeichnung
$\alpha(hkl), \alpha_{hkl}$	Phase des Strukturfaktors
$\Delta P(u, v, w)$	Differenz-Patterson-Funktion
$\Delta f', \Delta f''$	anomale Streubeiträge
ϵ	lack-of-closure
κ, ω, ϕ	Rotationswinkel
λ	Wellenlänge
ϕ -Achse, $\Delta\phi$	Rotationsachse, Drehwinkel
$\rho(x, y, z)$	Elektronendichte
σ	Standardabweichung
$\sigma_{I(hkl)}$	Standardabweichung der Intensitätsmessung
σ_A	SigmaA-Wert (Qualität des Modells)
ω, ϕ, χ	Rotationswinkel
$a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$	Einheitszellparameter
$F(hkl), F_{hkl}$	Strukturfaktor
$ F(hkl) , F_{hkl} $	Betrag des Strukturfaktors
F_o, F_c	gemessener und berechneter Strukturfaktor
$F_{PH}(hkl)$	Strukturfaktor des Schweratomderivats
$F_P(hkl)$	Strukturfaktor des Proteins ohne Schweratom
$F_H(hkl)$	Beitrag des Schweratoms zu $F_{PH}(hkl)$
h, k, l	Millersche Indices
$I(hkl), I_{hkl}$	Intensität des Reflexes (hkl)
I_{max}, V_{max}	maximaler Strom und maximale Spannung
k	Skalierungsfaktor
m	figure of merit
M_r	Molekulargewicht
$P(\alpha)$	Wahrscheinlichkeit für die Phase α
$P(u, v, w), P(\vec{u})$	Patterson-Funktion
R	kristallographisches Residual
R_{free}	freier R -Wert
R_{sym}	Abweichung der symmetrieäquiv. Intensitäten
T	Temperatur
V	Volumen
V_M	Matthews-Parameter
V_p	Volumenanteil des Proteins
V_s	Volumenanteil des Lösungsmittels

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur der Proteine Kinesin und Enolpyruvyltransferase mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Dazu wurden verschiedene Methoden (isomorpher und molekularer Ersatz, Verwendung anomaler Signale) zur Bestimmung der Phasen eingesetzt.

Das Motorprotein Kinesin, das chemische Energie in Form von ATP in gerichtete Bewegung auf dem Mikrotubulus umwandeln kann, konnte in dimerem und monomerem Zustand aufgeklärt werden. Für das dimere Protein wurden im Rahmen dieser Arbeit die Phasen unter Verwendung von Schweratomersatz und dem Einsatz anomaler Signale bestimmt. Die zu höherer Auflösung streuenden Kristalle des monomeren Kinesin konnten mit Molekularem Ersatz eines vorläufigen Dimermodells phasiert werden. Vergleiche zwischen G-Proteinen und Myosin mit dem monomeren Kinesin zeigten Gemeinsamkeiten und Unterschiede, die zu Vorhersagen oder Einschränkungen für die Bewegung des Kinesin führten.

Das zweite Protein, dessen Struktur aufgeklärt wurde, ist das Enzym Enolpyruvyltransferase. Dieses ist für die bakterielle Zellwandsynthese essentiell und stellt deshalb ein Ziel für Antibiotika dar. Die Struktur zeichnet sich durch eine sechsfache Wiederholung eines aus einem viersträngigen β -Faltblatt und zwei α -Helices aufgebauten Motivs aus. Je drei dieser Faltungseinheiten sind zu einer Domäne zusammengefaßt. Diese beiden Domänen I und II sind durch einen scharnierartigen Übergang verbunden. Das Protein erhält dadurch eine hantelförmige Struktur. Ein Vergleich mit der kürzlich veröffentlichten Struktur von Enolpyruvyltransferase mit gebundenem Substrat (Skarzynski et al. 1996) zeigt die Wirkungsweise des Enzyms: das Scharnier bewegt sich und das Protein „klappt“ zu, wodurch das Substrat in sein Inneres wandert.

Summary

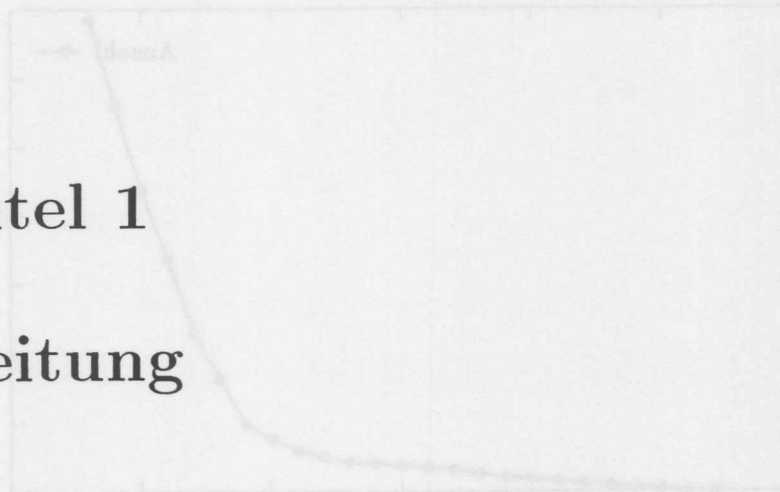
The three-dimensional structures of the proteins kinesin and enolpyruvyltransferase have been determined using X-ray crystallography. Several methodical approaches have been used (isomorphous and molecular replacement, anomalous diffraction) to determine the phase angles.

The motor protein kinesin transfers chemical energy (ATP) into directed movement on a microtubulus. Its structure was solved in the monomeric and dimeric state. The phase angles for the dimeric protein were determined by using isomorphous replacement and anomalous scattering (MIRAS). The crystals of the monomeric form diffracted to higher resolution and could be phased by molecular replacement methods using a preliminary model of the dimer as a search model. Comparisons between G-proteins and myosin with the monomeric kinesin showed similarities and differences leading to predictions or restrictions for the motility mechanism of kinesin.

The second protein investigated was the enzyme enolpyruvyltransferase. This enzyme is essential for the synthesis of the bacterial cell wall. It is therefore a target for antibiotic drugs. The structure shows a six-fold repeat of a folding unit composed of a four stranded β -sheet and two α -helices. Three folding units form a domain. The two domains I and II are connected via a hinge-like transition region. The overall shape of the protein resembles a dump-bell. A comparison with the recently published structure of enolpyruvyltransferase with bound substrate (Skarzynski et al. 1996) shows the function of the enzyme: the hinge moves and the protein 'closes' burying the substrate in its interior.

Kapitel 1

Einleitung



1.1 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Die Idee, Proteine auf atomarer Ebene zu untersuchen, ist relativ alt. Sie reicht zurück ins Jahr 1936, als Max Perutz und John Kendrew die Vision hatten, biologische Moleküle und ihre Funktion im atomaren Detail zu untersuchen. Sie wählten sich als Untersuchungsobjekte Myoglobin und Hämoglobin, die sie kristallisierten und mit Röntgenstrahlung bestrahlten. Es dauerte dann allerdings fast 20 Jahre, bevor diese Studien die endgültige atomare Struktur lieferten (Perutz 1956, Kendrew et al. 1958). Dafür erhielten Perutz und Kendrew im Jahre 1962 gemeinsam den Nobelpreis für Chemie.

Mittlerweile ist die Röntgenkristallographie aus der Untersuchung von biologischen Molekülen nicht mehr wegzudenken. Insbesondere in den 90er Jahren sind tausende von neuen und teilweise sehr großen Strukturen gelöst worden. Diese sind in der ProteinDataBank in Brookhaven/New York (Bernstein et al. 1977) zusammengefaßt. Dieses allgemein für die Forschung zugängliche Archiv umfaßt heute (3.12.97) 6731 veröffentlichte Strukturen. Täglich kommen etwa fünf neue hinzu. Die Anzahl der Protein Strukturen, die in der ProteinDataBank veröffentlicht sind, steigt seit Ende der 80er Jahre steil an. Von ihrer Gründung im Jahre 1973 bis 1986 wurde zwischen 2 und 50 Strukturen pro Jahr veröffentlicht. Dieser Wert ist in den Jahren 1988 bis 1997 stetig angestiegen. Im Jahr 1997 wurden insgesamt 1640 neue Protein Strukturen veröffentlicht (s. Abb. 1.1).

Die weitaus meisten dieser Strukturen (etwa 82%) wurden mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse gewonnen. Dazu kommen noch 16%, die mit NMR in Lösung erarbeitet wurden. Vernachlässigbar ist dagegen die Anzahl der aus theoretischen Arbeiten in der PDB deponierten Strukturen ($\approx 2.5\%$) oder die aus Neutronen-Experimenten gewonnenen Strukturen (33 von 6664).

Der große Anstieg der Anzahl der bekannten Proteinstrukturen durch Anwendung der Proteinkristallographie ist auf verschiedene sich parallel entwickelnde Zweige der experimentellen Techniken der Molekularbiologie sowie der Möglichkeiten der Datensammlung und der Datenauswertung zurückzuführen.

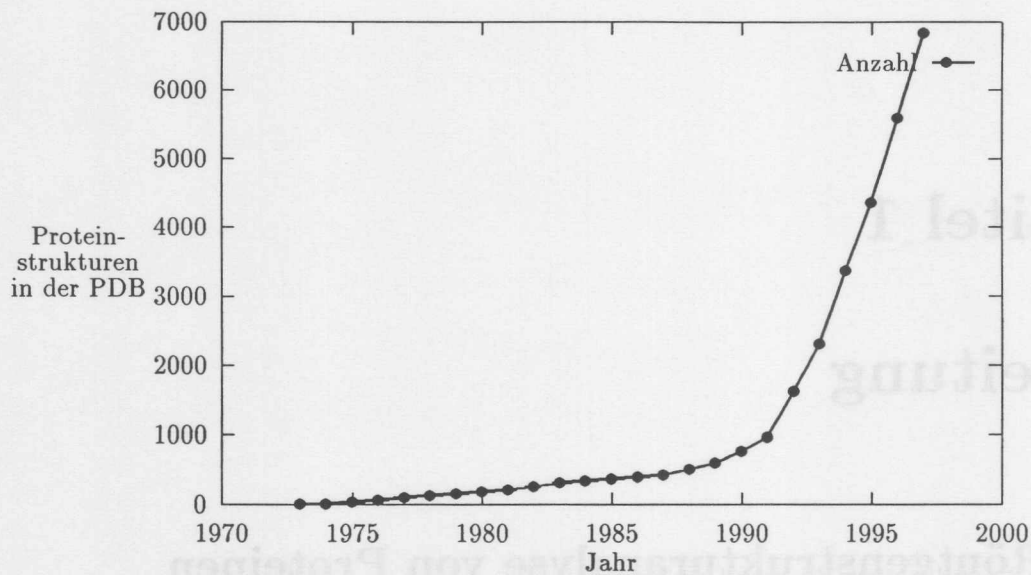


Abbildung 1.1: Anzahl der Strukturen in der ProteinDataBank von 1973-1997

Dazu zählen insbesondere:

1. experimentelle Techniken

- (a) Sequenzierungs-, Klonierungstechniken
- (b) Modifizieren von Aminosäuren und Einbringen von anomalen Streuern (z.B. Selenmethionin)
- (c) Einfriertechniken für Kristalle, so daß der Strahlenschaden an den Kristallen reduziert werden kann

2. Datensammlung

- (a) bessere Strahlungsquellen (Synchrotronstrahlungsquellen der zweiten und dritten Generation)
 - i. intensivere und besser fokussierte Strahlung (für kleine Kristalle)
 - ii. Möglichkeit verschiedene Wellenlängen einzusetzen (anomale Dispersion, MAD)
- (b) Verfügbarkeit von leistungsfähigen Flächendetektoren
 - i. Imageplates
 - ii. CCD-Kameras

3. Datenauswertung

- (a) leistungsfähigere Rechner (neue 3D-Graphics-Rechner und bessere Rechenleistung für aufwendige Verfeinerungsprotokolle)
- (b) Entwicklung und Verbesserung von Software für (fast) alle Bereiche der Datenverarbeitung von Proteinkristallographiedatensammlung über Datenreduktion bis zur Verfeinerung der Struktur

Alle diese Fortschritte führen dazu, daß in der heutigen Zeit die Lösung einer Proteinstruktur in erheblich kürzerer Zeit zu verwirklichen ist, als dies noch vor einem Jahrzehnt der Fall war. Außerdem können auch wesentlich größere Strukturen ganzer Proteinkomplexe kristallisiert und mit Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Der derzeit größte Proteinkomplex, der mit Röntgenkristallographie gelöst werden konnte, ist das Proteasom (Loewe et al. 1995). Dies ist ein Zusammenschluß von 14 Proteinen, der dafür sorgt, daß Proteine oder Proteinfragmente in der Zelle abgebaut werden. Insgesamt sind für dieses Modell die Positionen von 56419 Atomen zu einer Auflösung von 3.4 Å bestimmt worden. Die Daten zur Lösung dieser Struktur wurden am Synchrotronstrahlungsexperiment BW6 der Max-Planck-Gesellschaft am DESY aufgenommen.

Ein weiteres sehr ehrgeiziges Projekt, das die Nutzung der Synchrotronstrahlung und modernste Methoden wie Kryokristallographie und Nutzung anomaler Streuer erfordert, ist die Untersuchung von Proteinen des Ribosoms. Das Ribosom ist ein Zellpartikel, der Proteine aus Aminosäuren aufbaut. Er selbst besteht aus etwa 50 Proteinen und Ribonukleinsäuren und hat eine Masse von etwa 2 Millionen Dalton. Die Untersuchung dieser Struktur wird von den Gruppen um Prof. Ada Yonath in Hamburg und Rehovot/Israel durchgeführt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteinen handelt es sich zum einen um das Motorprotein Kinesin, das für die Transportprozesse in der Zelle eine herausragende Bedeutung hat, und zum anderen um ein Protein, das für den Aufbau der bakteriellen Zellwand zuständig ist, die Enolpyruvyltransferase. Diese beiden Proteine sollen in den folgenden Abschnitten kurz in ihrer Funktion beschrieben werden.

1.2 Motorprotein Kinesin

Das Motorprotein Kinesin ist eine ATPase, die chemische Energie in gerichtete mechanische Bewegung umsetzt. Dabei bewegt sich das Kinesin entlang von Mikrotubuli ähnlich wie Züge auf Gleisen. Diese Mikrotubuli sind röhrenartige Strukturen, die sich in allen höheren Zellen finden und neben Aktinfilamenten und intermediären Filamenten einen Teil des sogenannten Zellskeletts ausmachen. Sie übernehmen in der Zelle vielfältige Aufgaben. So stabilisieren sie etwa Zellfortsätze wie die langen Fortsätze der Nervenzellen (Axone) oder sie bilden den für die Zellteilung erforderlichen Spindelapparat aus. Der Mikrotubulus selbst ist aus einem heterodimeren Protein aufgebaut, dem Tubulin. Ein Tubulin-Dimer besteht aus zwei Untereinheiten, dem α - und dem β -Tubulin (orange und hellblaue Kugeln in Abb. 1.2). Diese lagern sich zu sogenannten Protofilamenten zusammen, von denen mehrere parallel angeordnet einen Hohlzylinder, den Mikrotubulus, bilden.

1.2.1 Mikrotubuli

Stabilisiert werden die Mikrotubuli durch Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP) (Mandelkow und Mandelkow 1995). Diese MAPs wirken quasi wie Schwellen an den Gleisen und sorgen für den Erhalt der Mikrotubulusstruktur. Diese ist jedoch nicht starr sondern dynamisch. Auf Polymerisationsphasen, die eine Verlängerung - ein Wachstum des Mikrotubulus - bedeuten, folgen Zerfallphasen, in denen der Mikrotubulus rasch schrumpft. Mit diesen dynamischen

Prozessen, der sogenannten dynamischen Instabilität, kann in der Zelle z.B. die Trennung der Chromosomen während der Teilung gesteuert werden.

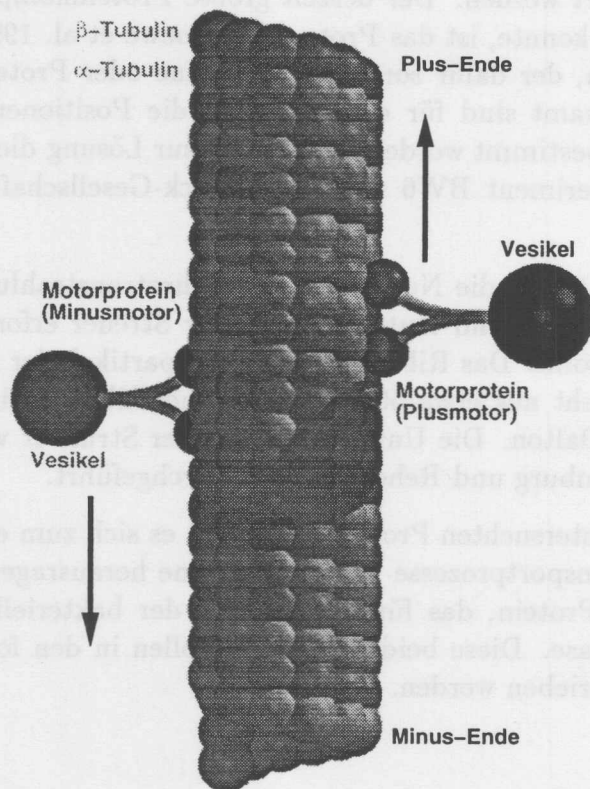


Abbildung 1.2: Mikrotubulus mit Motorproteinen und Vesikeln. Die Bewegungsrichtung der Motorproteine ist mit Pfeilen angedeutet.

gen. So bewegt sich das Protein *ncd* zum Minusende der Mikrotubuli und das Protein Kinesin zum Plusende der Mikrotubuli (Abb. 1.2).

1.2.2 Funktion des Kinesins

Kinesine sind praktisch in allen Arten von höheren Zellen und allen bisher untersuchten Vielzellern bei verschiedenen Entwicklungsstufen zu finden. Die Aufgaben der Proteine der Kinesin-Familie in der Zelle sind vielfältig. So sind Kinesine u.a. an folgenden Prozessen beteiligt:

1. Transport von Vesikeln und Organellen (z.B. in Axonen),
2. Verschieben und Orientieren des Spindelapparates während der Zellteilung.

Die erste Aufgabe ist insbesondere in neuronalen Zellen wichtig. Diese haben lange Fortsätze (Axone) von bis zu 1 m Länge, so daß Transportprozesse nicht mehr mittels Diffusion ablaufen

Das Motorprotein Kinesin bindet ebenfalls auf dem Mikrotubulus und gleitet an ihm entlang. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde es auch vor etwas mehr als 10 Jahren durch Video-Mikroskopie von Brady (1985) und Vale et al. (1985) entdeckt. Sie entdeckten gerichtete Transportvorgänge entlang der Mikrotubuli und konnten diese mit einem *Motorprotein*, dem Kinesin, in Verbindung bringen. Das Kinesin zieht somit Partikel (Organellen, Vesikel) gleichsam wie eine Lokomotive auf den Mikrotubulusgleisen hinter sich her (Abb. 1.2).

Seit 1985 ist eine Vielzahl von verschiedenen Motorproteinen, die zur Kinesinfamilie gehören, entdeckt worden. Alle diese Proteine wandern entlang von Mikrotubuli, indem sie sich unter Spaltung von ATP zu ADP gerichtet fortbewegen. Die Richtung dieser Bewegung ist dabei für jede Proteingruppe gleich. Es gibt jedoch je nach Art der Aufgaben der Motorproteine in der Zelle verschiedene Proteine, die sich am Mikrotubulus in unterschiedliche Richtungen bewegen.

ziert sein. Es werden auch monomere Kinesine, oder Kinesine mit einer Motordomäne in der Mitte des Moleküls gefunden. Die Familie der Kinesine erhält durch die Entdeckung neuer Proteine ständig „Zuwachs“.

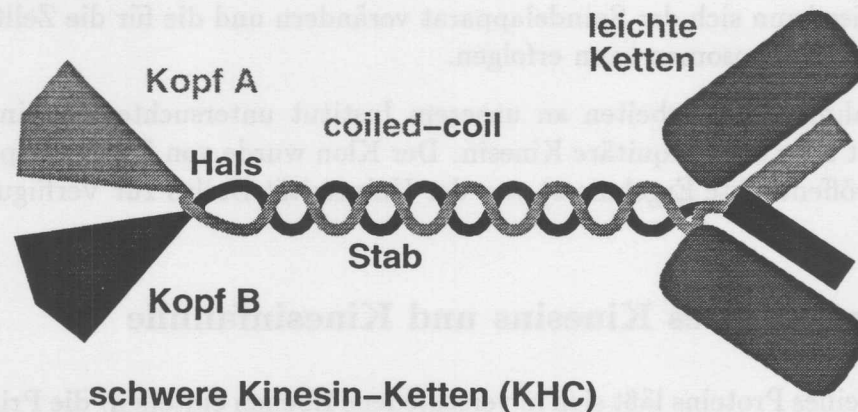


Abbildung 1.4: Kinesin Domänenstruktur

Über die detaillierte räumliche Struktur des Kinesinmoleküls war zu Beginn der kristallographischen Arbeiten in unserem Labor (1994) nur wenig bekannt. Es waren sogenannten Dekorierungsexperimente durchgeführt worden (Song und Mandelkow 1993), bei denen Mikrotubuli mit Kinesin-Molekülen *gesättigt* wurden. Auf diese Weise war es erstmals möglich, unter dem Elektronenmikroskop die Ausrichtung der Tubulin-Moleküle im Mikrotubulus zu untersuchen, was eine offene Frage über die Anordnung der Tubulin-Dimere im Mikrotubulusgitter klärte (A- oder B-Gitter-Anordnung). Mit solchen Dekorierungsexperimenten war es auch möglich durch 2- und 3-dimensionalen Bildrekonstruktion von elektronenmikroskopischen Aufnahmen niedrig auflösende Bilder von Kinesin und Tubulin zu erzeugen. Die Struktur der Kinesine auf atomarer Ebene blieb jedoch zunächst unzugänglich.

Mit der atomaren Struktur fehlte aber die wichtigste Voraussetzung, um ein Verständnis über die Funktion von molekularen Motoren zu erhalten. Deshalb wurden Anstrengungen in verschiedenen Gruppen unternommen, atomare Modelle von Kinesin oder kinesinähnlichen Molekülen zu bestimmen. Mittlerweile sind einige Strukturen von Kinesinen (Kull et al. 1996, Sablin et al. 1996, Gulick et al. 1998) veröffentlicht worden, zu zweien davon (Kozielski et al. 1997b, Sack et al. 1997) wurden im Rahmen dieser Arbeit Beiträge geleistet.

1.3 Enolpyruvyltransferase

Das zweite Protein, das in dieser Arbeit untersucht wurde, war das Protein Enolpyruvyltransferase (EPT). Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der bakteriellen Zellwand. Diese ist im Gegensatz zur Zellwand tierischer Zellen sehr stabil. Ansonsten würde sich das Bakterium in seiner normalen Umgebung auflösen, es würde lysieren.

Die Zellwand besteht aus einem Makromolekül, das *Peptidoglykan* genannt wird. Dieses besteht aus Polysaccharidketten, die durch kurze Peptide quervernetzt sind. Durch die außerordentlich starke Vernetzung kann das Peptidoglykan als ein einziges, großes Makromolekül aufgefaßt werden.

Ohne hier auf die einzelnen Schritte der Peptidoglykan-Synthese näher einzugehen, soll an dieser Stelle kurz die Funktion der Enolpyruvyltransferase beschrieben werden.

1.3.1 Funktion der EPT

Das Enzym Enolpyruvyltransferase vermittelt den ersten Schritt in der Peptidoglykan-Synthese. Es sorgt dafür, daß auf einen aktivierten Zucker, Uridinphosphat-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), ein Phosphoenolpyruvat übertragen wird. Nach Abspaltung von anorganischem Phosphat, P_i , entsteht daraus Uridindiphosphat-N-acetylmuraminsäure (UDP-MNAc). Die Reaktion ist in Abb. 1.5 schematisch dargestellt.

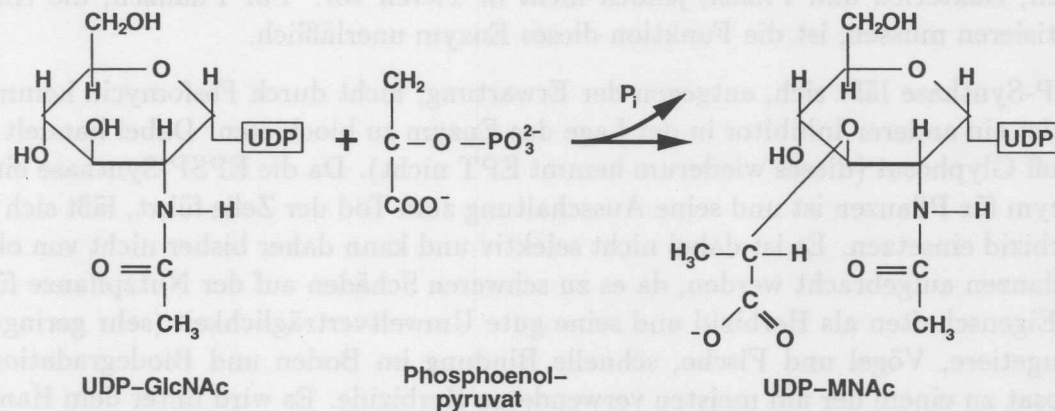


Abbildung 1.5: Funktionsweise der Enolpyruvyltransferase nach Stryer (1987)

Erst nach diesem Schritt kann ein Peptid an die UDP-MNAc angehängt werden, was der eigentliche Beginn der Peptidoglykan-Synthese ist. Anschließend wird diese Zucker-Peptid-Einheit auf einen Trägerstoff (Carrierlipid) übertragen. An den MNAc-Teil dieser Zucker-Peptid-Carrierlipid-Einheit wird dann ein weiterer aktivierter Zucker (UDP-GlcNAc) angehängt. Nun ist die Grundstruktureinheit der Zellwand fertig. Sie kann an das eine Ende einer wachsenden Polysaccharid-Kette angefügt werden.

1.3.2 Pharmakologische Bedeutung

Die Tatsache, daß die Enolpyruvyltransferase für die Erzeugung der UDP-MNAc-Moleküle unerlässlich ist, macht sie zu einem Ziel für Antibiotika. Ein Medikament, dessen Wirkung auf EPT seit langem bekannt ist, ist das Fosfomycin. Dieser Stoff, der ein Analog des Phosphoenolpyruvats ist, bindet kovalent am Cys115 und verhindert damit die Anlagerung des Phosphoenolpyruvats (Cassidy und Kahan 1973).

Diese Behinderung der EPT-Funktion führt dazu, daß das Bakterium nicht mehr in der Lage ist, einen korrekten Aufbau der Zellwand vorzunehmen. Bei der nächsten Zellteilung stirbt es daher, worauf letztlich die Wirkungsweise dieses Antibiotikums beruht. Mit der Kenntnis der Struktur der EPT ist es daher möglich, die Wirkung von Fosfomycin auf EPT im atomaren Modell zu verstehen. Möglich ist auch eine Verbesserung der antibiotischen Wirkung, indem die Bindungsstelle studiert und alternative Liganden auf dem Reißbrett entworfen und später im Chemielabor erzeugt werden. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur dieses Enzyms war daher nicht nur aus biologischer, sondern auch aus pharmakologischer Sicht von sehr großem Interesse.

1.3.3 Vergleich mit EPSP-Synthase

Das einzige andere bekannte Protein, das eine komplette Phosphoenolpyruvateinheit übertragen kann, ist die EPSP-Synthase (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat Synthase). Diese vermittelt den vorletzten Schritt im sogenannten Shikimat-Zyklus. Dieser ist erforderlich für die Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Das Enzym kommt in Pflanzen, Bakterien und Pilzen, jedoch nicht in Tieren vor. Für Pflanzen, die Aminosäuren synthetisieren müssen, ist die Funktion dieses Enzym unerlässlich.

EPSP-Synthase läßt sich, entgegen der Erwartung, nicht durch Fosfomycin hemmen. Stattdessen ist ein anderer Inhibitor in der Lage das Enzym zu blockieren. Dabei handelt es sich um den Stoff Glyphosat (dieses wiederum hemmt EPT nicht). Da die EPSP-Synthase ein essentielles Enzym für Pflanzen ist und seine Ausschaltung zum Tod der Zelle führt, läßt sich Glyphosat als Herbizid einsetzen. Es ist dabei nicht selektiv und kann daher bisher nicht von oben auf die Nutzpflanzen aufgebracht werden, da es zu schweren Schäden auf der Nutzpflanze führt. Seine guten Eigenschaften als Herbizid und seine gute Umweltverträglichkeit (sehr geringe Toxizität für Säugetiere, Vögel und Fische, schnelle Bindung im Boden und Biodegradation) machen Glyphosat zu einem der am meisten verwendeten Herbizide. Es wird unter dem Handelsnamen Roundup ReadyTM von der Firma Monsanto, St. Louis/USA, vertrieben.

Aufgrund seiner Empfindlichkeit gegen Glyphosat ist die EPSP-Synthase für die landwirtschaftliche Forschung von sehr großem Interesse. Eine Mutation (G96A in *E.coli*-Zählweise), macht das Protein gegen das Herbizid Glyphosat unempfindlich. Diese Mutation kann gentechnisch in die EPSP-Synthase eingeführt werden, um z.B. Kulturen von Sojabohnen, die mittels Genmanipulation Glyphosat-Resistenz zeigen, nur mit diesem einen Herbizid zu behandeln. Auf diese Weise kann man den Einsatz von Herbiziden und damit die Kosten erheblich reduzieren (Padgett et al. 1996). Seit Anfang 1997 werden auf diese Weise manipulierte Sojabohnen auch nach Europa exportiert, was etwa in Deutschland zu einer intensiven öffentlichen Diskussion um genveränderte Nahrungsmittel geführt hat.

Die Struktur des Proteins wurde bereits von Stallings et al. (1991) röntgenkristallographisch gelöst (PDB-Code: 1eps). Dies war ein industrielles Projekt (Monsanto), da man sich durch die Aufklärung der Struktur Einsichten in die Wirkungsweise des Glyphosats erhoffte. Allerdings ist es bisher nicht gelungen (oder es wurde nicht publiziert), das Enzym in Gegenwart des Inhibitors Glyphosat zu kristallisieren. Damit bleibt die Frage nach der Funktionsweise des Enzyms und der Wirkungsweise des Inhibitors zumindest teilweise spekulativ. Das Interesse an der Strukturaufklärung der EPT ist daher indirekt auch über die Hoffnung auf Einsichten in die EPSP-Synthase-Funktionsweise begründet, solange keine direkten Daten von EPSP-Synthase-Strukturen vorliegen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Proteine

Untersuchungsgegenstände der vorliegenden Arbeit waren biologische Makromoleküle, speziell Proteine. Die Bedeutung der beiden untersuchten Proteine Kinesin und Enolpyruvyltransferase wurde in Kapitel 1 bereits erläutert. Es sollen hier einige allgemeine Bemerkungen über den Aufbau und die Struktur der Proteine gemacht werden.

2.1.1 Aufbau und Primärstruktur

Proteine werden von der Zelle durch Ribosomen synthetisiert. Dort wird der aus vier verschiedenen Basen bestehende genetische Code der Nukleinsäuren übersetzt. Jeweils drei Basenpaaren, einem Triplet, wird eine Aminosäure zugeordnet. Bei der Übersetzung des genetischen Codes wird dann Stück für Stück eine Kette von Aminosäuren aufgebaut. Die Aminosäuren sind über Peptidbindungen miteinander verbunden, weshalb man in diesem Zusammenhang auch von einem *Polypeptid* spricht.

Die Abfolge der Aminosäuren läßt eine eindeutige Bestimmung des Proteins zu. Man nennt die Aminosäuresequenz daher auch die *Primärstruktur* des Proteins. Diese Primärstruktur sagt allerdings nichts über die Funktion des Proteins aus, oder wie Branden und Tooze (1991) in ihrer Einleitung ausführen: *"by themselves these sequences tell little more about the biology of the system than a New York telephone directory tells about the function and marvels of that city"*.

2.1.2 Sekundärstruktur

Die Aminosäurekette ist allerdings im Protein nicht beliebig orientiert, sondern es lassen sich verschiedene Strukturmerkmale ausmachen. Diese *Sekundärstruktur* genannten Elemente sind über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierte spezielle Anordnungen von Aminosäurenabschnitten im Protein. Durch Drehung der Peptidbindung und damit verbundener sterischer Hinderung der Seitenketten werden solche Sekundärstrukturelemente oft vom größten Teil

der Aminosäuren eines Proteins angenommen. Es bilden sich sogenannte α -Helizes und β -Faltblätter. α -Helizes sind Spiralen von Aminosäureabschnitten, die mit einer Periode von 3.6 Aminosäuren pro Umlauf teilweise sehr lang werden können. β -Faltblätter sind demgegenüber nicht spiralisiert. Im Gegenteil, sie sind langausgestreckte Aminosäureabschnitte, an denen sich parallel oder antiparallel ebensolche ausgestreckten Aminosäureabschnitte anlagern. Die Sekundärstrukturelemente werden im Protein von Schlaufen oder Loops genannten Bereichen verbunden, so daß diese in unterschiedlichsten Orientierungen angeordnet sein können.

2.1.3 Tertiär- und Quartärstruktur

Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente zu größeren Einheiten, sogenannten Domänen, wird als die *Tertiärstruktur* des Proteins bezeichnet. Erst auf diesem Niveau läßt sich die Funktionsweise eines biologischen Makromoleküls verstehen. Weder die Primär- noch die Sekundärstruktur ermöglichen Aussagen über Bindungsregionen oder Strukturänderungen, die bei biologischen Prozessen ablaufen.

Die Vorhersage der Tertiär- oder der Quartärstruktur (hiermit werden Zusammenlagerungen von Domänen bezeichnet) ist aus der Aminosäuresequenz bislang nicht möglich, da über die bei der Proteinfaltung herrschenden Mechanismen noch zu wenig bekannt sind. Deshalb ist für das Verständnis der Funktionsweise der Proteine auf atomarer Ebene die experimentelle Bestimmung der Tertiär- und Quartärstruktur unerläßlich. Dazu stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die nuklearmagnetische Resonanz von gelösten Proteinen und die röntgenkristallographische Untersuchung von Proteinen.

2.2 Röntgenkristallographische Bestimmung der Struktur von Proteinen

Das Ziel jedes Röntgenbeugungsexperiments an Proteinkristallen ist die Aufklärung der Struktur des Proteins. Diese läßt sich beschreiben mit der Elektronendichte ρ , in die dann die einzelnen Atome des Proteinmoleküls plaziert werden. Es besteht ein einfacher durch eine Fouriertransformation gegebener Zusammenhang zwischen den Struktur Faktoren F_{hkl} und der Elektronendichte ρ :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (2.1)$$

Dabei sind die Struktur Faktoren F_{hkl} komplex und werden üblicherweise gemäß Gl. 2.2 in Amplitude ($|F_{hkl}|$) und Phase (α_{hkl}) zerlegt.

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \cdot e^{i\alpha_{hkl}} \quad (2.2)$$

Mit (hkl) werden hier die Millerschen Indices bezeichnet, die die reflektierende Gitterebenschar kennzeichnen. Der direkten Messung ist jedoch nur die Intensität I der Röntgenstrahlung

für jeden Reflex (hkl) zugänglich. Für diese gilt¹

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2. \quad (2.3)$$

Die Zuordnung der korrekten Indizes (hkl) und die möglichst genaue Bestimmung der Intensitäten I_{hkl} der Beugungsreflexe stellt dabei eine hauptsächlich meßtechnische Aufgabe dar. Demgegenüber müssen für die Bestimmung der Phasen, die nicht direkt über das Röntgenbeugungsexperiment gemessen werden können, verschiedene Verfahren herangezogen werden, die in Abschn. 2.5 vorgestellt werden. Zunächst soll allerdings der Aufbau eines typischen Proteinkristallographieexperiments beschrieben werden.

2.3 Aufbau eines Proteinkristallographieexperiments

2.3.1 Röntgengenerator

Der schematische Aufbau eines Proteinkristallographieexperiments ist in Abb. 2.1 gezeigt. In der linken Bildhälfte ist die typische Anordnung an einem Röntgengenerator dargestellt.

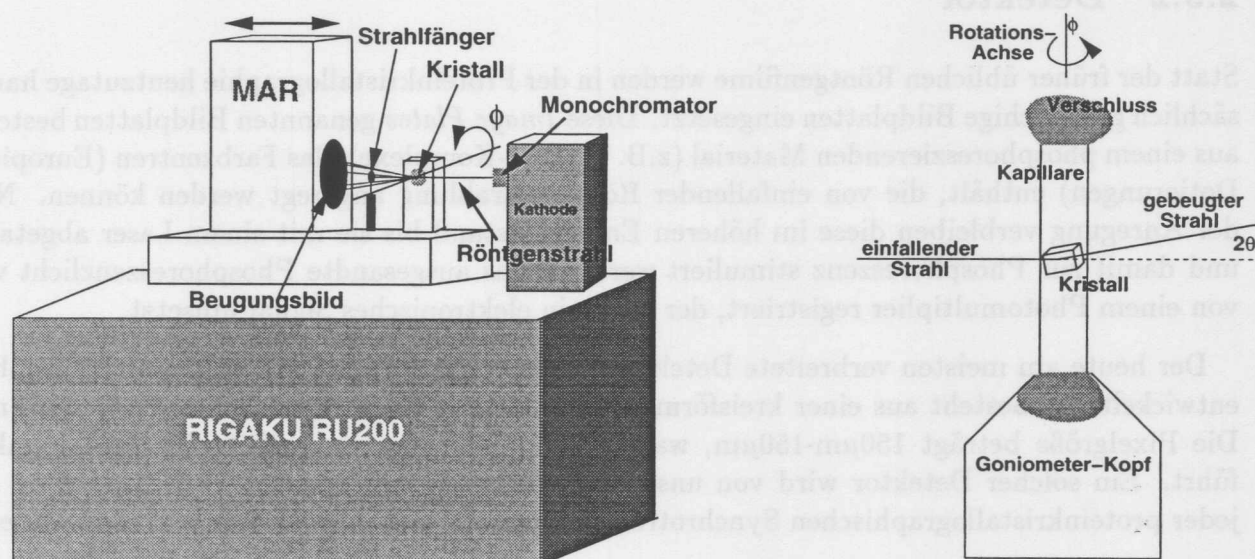


Abbildung 2.1: Aufbau eines Proteinkristallographieexperiments

Bei den Arbeitsgruppen der Max-Planck-Gesellschaft am DESY steht für die Experimente ein Drehanodengenerator RU200 der Firma Rigaku zur Verfügung. Dieser ist mit einer Kupfer-Anode ausgestattet, die von einem durch eine regelbare Kathode ($I_{max} = 50 \text{ mA}$, $V_{max} = 100 \text{ kV}$) beschleunigten Elektronenstrahl beschossen wird. Die austretende Röntgenstrahlung wird von einem Graphit-Monochromator (Fa. Huber) unter einem Glanzwinkel von $\theta = 13.1^\circ$

¹Hier sind einige Korrekturfaktoren zu beachten (Polarisationskorrektur P und Lorentzkorrektur L), auf deren Bedeutung hier aber nicht eingegangen werden soll. Nach korrekter Skalierung der Daten gilt Gl. 2.3.

abgelenkt. Dadurch wird die Strahlung monochromatisiert und es kann mit Strahlung der Kupfer K_α -Linie ($\lambda = 1.514 \text{ \AA}$) experimentiert werden. Für besondere Anforderungen an die Strahlung ist bei einigen Experimenten noch der Einsatz von fokussierenden Spiegeln möglich.

Nach dem Passieren eines Blendensystems des Detektors, mit dem die Strahlweite bestimmt wird (typischer Wert: $0.3 \text{ mm} \cdot 0.3 \text{ mm}$), trifft der Strahl den Kristall, an dem er gebeugt wird. Während der unabgelenkte Primärstrahl mit einem Strahlfänger oder Beamstop aufgehalten wird, erreichen die vom Kristall gebeugten Anteile einen Bildplattenscanner (MAR-Research), in dessen Innern sie eine Bildplatte mit Röntgenphotonen anregen. Dieser Scanner ist in seiner Entfernung zum Kristall verfahrbar, um verschiedene Auflösungsbereiche einstellen zu können. Während der Messung wird der Kristall um die ϕ -Achse gedreht, so daß eine sogenannte Drehkristall- oder Oszillationsaufnahmen entsteht.

Die Befestigung des Kristalls auf einem Goniometerkopf ist im rechten Teil von Abb. 2.1 skizzenhaft dargestellt. Der Kristall ist in einer Quarz-Kapillare von 0.2 mm bis 2.0 mm Durchmesser montiert, die an beiden Enden mit Wachs verschlossen ist. Dies ist erforderlich, um das Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Mit dem Goniometer-Kopf, der mit Mikrometerschrauben in verschiedenen Richtungen justierbar ist, kann dann der Kristall exakt auf die mit dem Detektor verbundene ϕ -Drehachse justiert werden.

2.3.2 Detektor

Statt der früher üblichen Röntgenfilme werden in der Proteinkristallographie heutzutage hauptsächlich großflächige Bildplatten eingesetzt. Diese *Image Plates* genannten Bildplatten bestehen aus einem phosphoreszierenden Material (z.B. BaF:Br-Komplexe), das Farbzentren (Europium-Dotierungen) enthält, die von einfallender Röntgenstrahlung angeregt werden können. Nach der Anregung verbleiben diese im höheren Energiezustand bis sie mit einem Laser abgetastet und damit zur Phosphoreszenz stimuliert werden. Das ausgesandte Phosphoreszenzlicht wird von einem Photomultiplier registriert, der es in ein elektronisches Signal umsetzt.

Der heute am meisten verbreitete Detektor wurde von der Firma MAR-Research, Hamburg entwickelt. Er besteht aus einer kreisförmigen Bildplatte mit einem Durchmesser von 300 mm . Die Pixelgröße beträgt $150 \mu\text{m} \cdot 150 \mu\text{m}$, was zu einer Rasterung von $2000 \cdot 2000$ Bildpunkten führt. Ein solcher Detektor wird von uns für die Messungen eingesetzt und ist auch an fast jeder proteinkristallographischen Synchrotronmeßplätzen (s. Abschn. 2.4 Tab. 2.1) zu finden.

Die Steuerung der Messung (Einstellung von Kristall-Detektor-Abstand, Drehwinkel $\Delta\phi$, Drehbeginn ϕ_0 und Belichtungsdauer) erfolgt über einen Rechner der Firma Silicon Graphics (INDY) auf dem die Steuerungssoftware des Detektors (Firma Mar-Research, Hamburg) installiert ist. Vom Rechner aus wird auch das Auslesen des Detektors gesteuert. Mit diesem System ist eine nahezu automatische Messung von Datensätzen möglich.

Andere Detektorarten, die in der Proteinkristallographie eingesetzt werden, sind Proportionalzählrohre und in neuerer Zeit CCDs. Diese sind allerdings derzeit fast nur an Synchrotronmeßplätzen zu finden, da die benötigten großflächigen CCDs extrem schwierig herzustellen und damit sehr teuer sind. Mit den CCDs kann ein großer Nachteil der Image Plate-Detektoren ausgeglichen werden: ihre lange Auslesezeit von etwa $2:30$ Minuten pro Bild. Diese macht insbesondere an Synchrotronmeßplätzen den Hauptanteil der Meßzeit aus. Die eigentliche Belichtung dauert dort in der Regel nur einige Sekunden. Allerdings konnte die Auslesegeschwin-

digkeit für die neue Generation der MAR-Detektoren erheblich gesteigert werden (45 sec), so daß dieser Vorteil sich mittlerweile relativiert hat. Kaum zum Einsatz kommen noch die „alten Methoden“: Röntgenfilm und Diffraktometer. Das letztere wird gelegentlich für hochpräzise Messungen von einigen wenigen Reflexen benutzt.

2.3.3 Einfrieren von Proteinkristallen

Die meisten Proteinkristalle sind empfindlich gegen Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (Hope 1990). Der Effekt des Strahlenschadens, macht sich durch eine abnehmende Auflösung bemerkbar (Hope et al. 1989). Man muß daher die Stabilität der Kristalle im Röntgenstrahl erhöhen, wenn man komplette Datensätze zu höherer Auflösung aufnehmen will. Dies läßt sich durch das Einfrieren der Kristalle vor dem Bestrahlen und das Messen im eingefrorenen Zustand erreichen.

Das gängigste Verfahren ist das Einfrieren von Protein-Kristallen in einem Strom von verdampfendem Stickstoff. Dieser hat eine Temperatur von bis zu -196°C , wobei sich aus technischen Gründen (Verstopfung der Düse) Temperaturen von -180°C bis -150°C als günstig erwiesen haben. Da Proteinkristalle einen hohen Anteil von Wasser aufweisen (etwa 50-70%), muß der Kristall mit einer Frostschutzlösung getränkt werden, damit er beim Einfrieren nicht springt. Diese Frostschutzlösungen führen allerdings in den meisten Fällen bereits vor dem Einfrieren zu einer Zerstörung der Kristalle, weshalb hier eine *trial-and-error* Methode zum Einsatz kommt, bis das optimale Frostschutzmittel und die günstigste Konzentration gefunden sind.

Die Proteinkristalle werden nur für wenige Sekunden in ein Reservoir mit Frostschutzlösung getaucht und anschließend mit einer winzigen Schlaufe aus Zahnseide unter dem Mikroskop herausgefischt. Schlaufe und Kristall werden auf der ϕ -Rotationsachse des Beugungsexperiments so schnell wie möglich in einen Strom von verdampfendem Stickstoff gebracht. Die in der Schlaufe befindliche Flüssigkeit und damit der Kristall erstarren momentan. Der Kristall ist dann in einen freistehenden Film eingebettet (Teng 1990), der von einem laminaren Strom aus verdampfendem Stickstoff umgeben ist.

Die oben beschriebene Möglichkeit des Einfrierens ist auch an der RIGAKU-Drehanode gegeben (in Abb. 2.1 nicht gezeigt), so daß routinemäßig mit eingefrorenen Kristallen gearbeitet werden kann. An Synchrotronmeßplätzen ist das Einfrieren von Kristallen ohnehin in den letzten Jahren zum Standard geworden.

2.4 Synchrotronstrahlführungen

Für die Datensammlung zu höherer Auflösung wurden neben den Messungen am Drehanodengenerator zusätzlich verschiedene Synchrotronstrahlführungen am Speicherring DORIS (DESY, Hamburg) und an der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle (ESRF, Grenoble/Frankreich) genutzt. Diese sollen in den folgenden Abschnitten kurz charakterisiert werden.

2.4.1 BW6 (DESY/Max-Planck-Ges.)

Der Synchrotronmeßplatz BW6 (Buth et al. 1996) ist eine am DORIS-Bypass installierte Wiggler-Beamline, die für proteinkristallographische und Oberflächenuntersuchungen zur Verfügung steht. Durch ihren Aufbau mit einem $\text{Si}_{(111)}$ -Doppelmonochromator ist sie in einem Wellenlängenbereich von 0.6-2.3 Å durchstimmbar, was insbesondere das Arbeiten mit der MAD-Methode (s. Abschn. 2.5.3) ermöglicht. Die Beamline ist derzeit ausgerüstet mit einem 345 mm MAR-Detektor und einer Oxford-Cryosystems Kühlanlage. An dieser Strahlführung wurden die für die Bestimmung der Kinesin-Monomerstruktur erforderlichen Experimente durchgeführt.

2.4.2 BW7b (DESY/EMBL)

Die BW7b (van Silfhout und Hermes 1995) ist eine weitere intensive Wigglerbeamline am Ende des DORIS-Bypasses. Sie hat einen dreieckigen Monochromator und gebogene Spiegel zur Fokussierung. Damit hat dieser Meßplatz allerdings im Vergleich zur BW6 den Nachteil, daß sich die Wellenlänge nicht verstellen läßt. Diese ist fest und beträgt 0.83 Å. Damit lassen sich keine optimierten anomalen Effekte für die Phasenbestimmung nutzen.

2.4.3 X11 (DESY/EMBL)

Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Strahlführungen BW6 und BW7 ist die X11 (Hendrix et al. 1979) an einem Beugungsmagneten am Speicherring DORIS installiert. Dies bedeutet, daß diese Strahlführung eine deutlich geringere Intensität aufweist als die Wiggler-Strahlführungen. Eine weitere Einschränkung im Vergleich zur BW6 ist die nicht regelbare Wellenlänge. Diese beträgt $\lambda = 0.91\text{Å}$, so daß wie bei der BW7b Experimente mit anomaler Beugung nur in diesem Wellenlängenbereich und MAD-Experimente gar nicht möglich sind.

An dieser Beamline, die vom EMBL betrieben wird, wurden nur einzelne Testaufnahmen von Kinesin- und Enolpyruvyltransferase-Kristallen durchgeführt.

2.4.4 X31 (DESY/EMBL)

Auch die Meßstation X31 (Pettifer und Hermes 1985) befindet sich an einem Beugungsmagneten des Speicherrings DORIS. Allerdings ist dieser Meßplatz mit einer durchstimmbaren Wellenlänge (0.7 - 1.8 Å) geeignet um anomale Signale aufzunehmen. MAD-Experimente sind an der X31 ebenfalls bereits durchgeführt worden. Da die Intensität des von dem Beugungsmagneten erzeugten Strahls allerdings nicht sehr hoch ist, dauern solche Experimente an der X31 sehr lange, mit den damit verbundenen Risiken (z.B. Vereisen des Kristalls im Kühlstrom).

An diesem Meßplatz wurden die für die Enolpyruvyltransferase-Strukturaufklärung erforderlichen Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Wellenlänge auf die Absorptionskanten der anomalen Streuer Gold und Platin abgestimmt (s. Abschn. 4.1.2).

2.4.5 W32 (LURE, Orsay)

An der Beamline W32 (Fourme et al. 1992) des DCI Speicherrings am LURE/Orsay bei Paris wurde ein Experiment mit Hilfe von Xenon-Gas durchgeführt, das unter Druck in den Proteinkristall eindiffundiert wurde (s. Abschn. 4.1.2.2). Dazu war an dieser Wiggler-Beamline neben der üblichen Ausstattung (MAR-Detektor 300 mm und Oxford Cryosystem) zusätzlich eine Xenon-Druckvorrichtung installiert. Mit dieser konnte Xenon-Gas mit einem Druck von 12 bar in den Kristall, der in einer Kapillare montiert war, eingepresst werden.

2.4.6 BM14 (ESRF/EMBL Grenoble)

Die Beamline BM14 (für *bending magnet 14*) wird an der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle (ESRF, Grenoble/Frankreich) vom EMBL betrieben. Es handelt sich dabei um eine insbesondere für MAD-Experimente optimierte Strahlführung. Durch den von Beginn an speziell für die Synchrotronstrahlungsnutzung optimierten Verhältnisse an der ESRF ist es möglich mit der Ablenkung an einem Beugungsmagneten vergleichbare Ergebnisse zu erzielen wie am DORIS-Ring mit einer Wiggler-Beamline. Daher wurden die Experimente für die Strukturbestimmung des Kinesin-Dimers an der BM14 am ESRF durchgeführt.

Zusammengefaßt sind die Parameter der hier in aller Kürze beschriebenen Synchrotronmeßplätze in Tab. 2.1.

Beamline	BW6	BW7b	X11	X31	W32	BM14
Betreiber	DESY/MPG	DESY/EMBL			LURE	ESRF
Wellenlänge λ	0.6-2.3Å	0.83Å	0.91Å	0.7-1.8Å	0.9-1.5Å	0.6-2.0Å
Magnettyp	Wiggler	Wiggler	Ablenkmagn.	Ablenkmagn.	Wiggler	Wiggler
Optik	Doppelm.	Dreiecksm.	Dreiecksm.	Doppelm.	Doppelm.	Doppelm.
Detektor	MAR345 (CAD)	MAR345	MAR300	MAR180	MAR300	MAR300 (CAD)
Einfriersystem	Oxford-Cryosystem					
bearbeitete Projekte	Kinesin- Monomer	Test- messungen		EPT	EPT (Xenon)	Kinesin Dimer

Tabelle 2.1: Proteinkristallographische Synchrotronmeßplätze

2.5 Methoden der Phasenbestimmung

Wie bereits in Abschn. 2.2 erwähnt, ist die Bestimmung der Phasen α_{hkl} der Strukturformfaktoren F_{hkl} die Hauptschwierigkeit bei der röntgenkristallographischen Strukturlösung von biologischen Makromolekülen. Zur Bestimmung der Phasen für die einzelnen gemessenen Reflexe (hkl) können verschiedene Methoden verwendet werden. Dies sind

1. die **Methode des multiplen isomorphen Ersatzes** (MIR = Multiple Isomorphous Replacement), in der Kristalle mit mehreren Schweratomen modifiziert werden und aus

den auftretenden Differenzen auf die Phasen geschlossen werden kann,

2. die Verwendung eines Kristalls mit anomalen Streuern für die **Methode der anomalen Beugung mit mehreren Wellenlängen** (MAD = Multiple Wavelength Anomalous Dispersion)
3. als Kombination der Ausnutzung von anomalen und isomorphen Informationen werden noch **SIRAS** (=Single Isomorphous Replacment with Anomalous Scattering) oder **MI-RAS** (=Multiple Isomorphous Replacment with Anomalous Scattering) benutzt,
4. der **Molekulare Ersatz** (MR = Molecular Replacement), wo ein Suchmodell aus Ausgangspunkt für die Phasierung der Daten verwendet werden kann,
5. **ab initio Methoden**, die allerdings bisher noch theoretische Schwierigkeiten bereiten und deshalb kaum Eingang in die Proteinkristallographie gefunden haben.

2.5.1 isomorpher Ersatz

Der isomorphe Ersatz ist nach wie vor diejenige Methode, mit der die meisten Proteinstrukturen gelöst werden. Eine von Green et al. (1954) und Perutz (1956) entwickelte Methode ist das Einbringen von Schweratomen, die die Strukturfaktoren des Proteins $F_P(hkl)$ modifizieren, in dem ein zusätzlicher Beitrag von den schweren Streuern $F_H(hkl)$ vektoriell addiert wird.

$$F_{PH}(hkl) = F_P(hkl) + F_H(hkl) \quad (2.4)$$

Dabei sind zunächst die Winkel der einzelnen Strukturfaktoren unbekannt. In der komplexen Ebene ergibt sich das in Abb. 2.2 dargestellte Bild (nach Drenth (1994)). Dabei sind links die Beziehungen im Fall idealer Bestimmung der komplexen Strukturfaktoren F_{PH} und F_H dargestellt und rechts die mit Fehlern behaftete (realitätsnahe) Konstruktion. Dort schließt sich das Dreieck bestehend aus den Strukturfaktoren F_P , F_H und F_{PH} nicht vollständig. Es fehlt der Betrag ϵ . Man nennt diese Diskrepanz zwischen berechnetem und gemessenem Dreieck deshalb auch *lack of closure*. Damit ist eine Abschätzung der Güte der Phasenbestimmung aufgrund der vorläufigen Proteinphasen durch ϵ möglich.

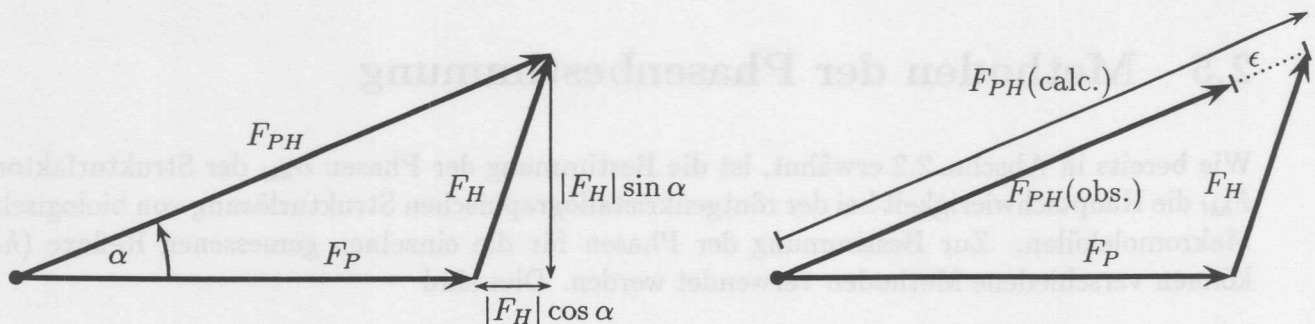


Abbildung 2.2: Phasenbeziehungen zwischen Strukturfaktoren

2.5.1.1 Patterson-Methode

Um die Positionen von Schweratomen im Kristall zu finden, steht das Verfahren nach Patterson (1934) zur Verfügung. Patterson stellte eine Fourier-Summe auf, in der nur noch die Amplitude des Strukturfaktors F_{hkl} , $|F_{hkl}|$ auftritt: die Patterson-Funktion (Gl. 2.5).

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cdot e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad (2.5)$$

Während die übliche Elektronendichteverteilung $\rho(x, y, z)$ (s. Gl. 2.1) die Verteilung der Elektronen im realen Raum angibt, beschreibt die Patterson-Funktion die Verteilung von *Differenzvektoren zwischen Atomen*. Dies wird aus einer anderen Formulierung der Patterson-Funktion

$$P(\vec{u}) = \int_{\vec{r}} (\rho(\vec{r}) \cdot \rho(\vec{r} + \vec{u})) d\vec{v} \quad (2.6)$$

deutlich. Der Term unter dem Integral verschwindet nur für solche Vektoren \vec{u} nicht, für die am Anfang und Ende von \vec{u} Atome und damit auch Elektronendichte, ρ , vorhanden ist. Damit ist allerdings noch nichts über die Position innerhalb der Einheitszelle bekannt.

Nimmt man nun statt der Amplituden die Differenz $(\Delta F)^2 = (|F_P| - |F_{PH}|)^2$ der Amplituden von nativem (F_P) und Schweratom-Datensatz (F_{PH}) und setzt diese als Koeffizienten ein, so erhält man der Differenz-Patterson-Funktion:

$$\Delta P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \Delta F_{hkl}^2 \cdot e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad (2.7)$$

Aus dieser lassen sich dann die Positionen bestimmen. Wenn es nur einige wenige Schweratome gibt, so lassen sich die Differenz-Vektoren zwischen ihnen als Peaks in der $\Delta P(u, v, w)$ leicht lokalisieren. Sind es aber viele Schweratome, so wird auch die Anzahl der Differenz-Vektoren \vec{u}_i zwischen ihnen schnell groß. Bei N Schweratomen erhält man bereits $N \cdot (N - 1)$ Differenzvektoren, die von Null verschieden sind, sowie N zusätzliche Vektoren, die alle im Nullpunkt zusammenfallen.

Die Interpretation der Peaks einer Differenz-Patterson-Map kann deshalb schwierig sein. Dies gilt insbesondere, da die Daten meist verrauscht sind. Ein Hilfsmittel zur Interpretation stellen die Harker-Ebenen oder Harker-Linien (Harker 1936) dar. Symmetrieäquivalente Atome innerhalb einer Einheitszelle haben ihre Differenz-Vektoren jeweils in speziellen Bereichen, die von den Symmetrieeoperatoren des Kristalls festgelegt werden. Dieses können, je nach Art der Symmetrie, Ebenen oder Linien sein. So weisen etwa Kristalle mit x -Schraubenachsen eine Harkerebene bei $x = 0.5$ auf. Auf diesen Ebenen sind dann die Differenz-Vektoren zwischen symmetrieäquivalenten Schweratomen zu finden. Damit lassen sich die zwei Positionsparameter bestimmen, die senkrecht zur Symmetrieachse liegen, also bei einer x -Schraubenachse etwa die y - und z -Koordinate. Je größer die Anzahl der Symmetrieeoperatoren ist, umso mehr Harker-Ebenen existieren, was in der Regel eine Bestimmung aller drei Koordinaten der Schweratome ermöglicht.

Es lassen sich also mit dem Pattersonverfahren ohne Kenntnis der Phasen, die bei den röntgenkristallographischen Vorgehen zunächst unbekannt sind, geringe Teile der Struktur (die

Schweratome) bereits lokalisieren. Diese können dann genutzt werden, um die Phasierung zu beginnen.

2.5.1.2 Phasenberechnung

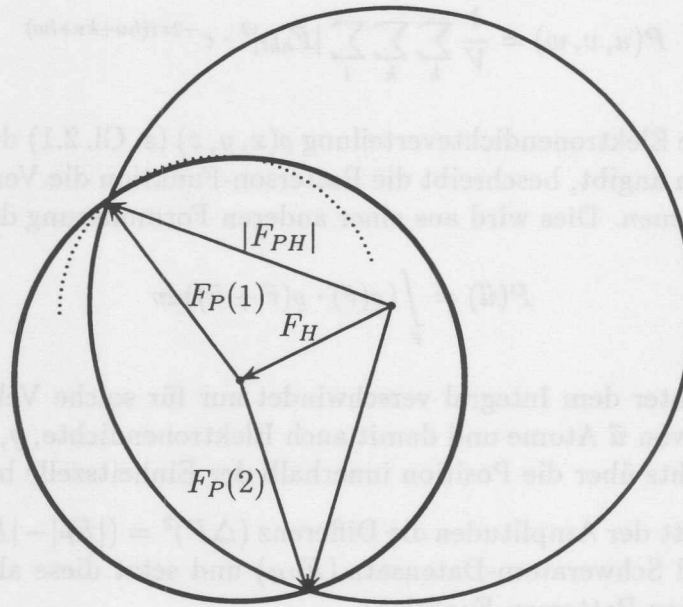


Abbildung 2.3: Harkerkonstruktion zur Bestimmung der Phasen

Mit der Harker-Konstruktion (Harker (1956), s. Abb. 2.3) lassen sich die Phasen berechnen. Dazu benötigt man jedoch mindestens zwei Derivate. Mit dem ersten Derivat (durchgezogene Kreise und Pfeile in Abb. 2.3) ergeben sich zwei Lösungen, von denen eine falsch ist. Erst die Hinzunahme eines zweiten Derivats (gestrichelte Linie in Abb. 2.3, die entsprechenden F'_H , $F'_P(1)$ und $F'_P(2)$ wurden zugunsten einer deutlicheren Darstellung nicht eingezeichnet) ermöglicht die Entscheidung für die richtige Lösung. Allerdings sind die drei Kreise keine unendlich dünnen Linien. Vielmehr sind alle diese Größen fehlerbehaftet, so daß man diese jeweils als eine Gaußverteilte Funktion darstellen muß. Deshalb erhält man eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Phasen $P(\alpha)$. $P(\alpha)$ zeigt eine umso schärfere Verteilung, je kleiner ϵ ist.

Ist

$$F_{best} = \frac{\sum P(\alpha)F(\alpha)}{\sum P(\alpha)}, \quad (2.8)$$

die mit der Wahrscheinlichkeit $P(\alpha)$ bestimmte beste Abschätzung für den komplexen Strukturfaktor, dann erhält man mit dem Ausdruck

$$m = \frac{|F_{hkl}(best)|}{|F_{hkl}|} \quad (2.9)$$

eine Abschätzung für die Qualität der Phase α_{hkl} . Man nennt m die *figure of merit*. Eine mit den Koeffizienten F_{best} berechnete Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ liefert damit bezogen auf die Phasenfehler die beste Elektronendichtekarte.

2.5.2 Ausnutzung anomaler Streueffekte

Sind anomale Effekte der Beugung vorhanden, so lassen sich diese ebenfalls heranziehen, um Phaseninformationen zu erhalten. Anomale Beugungseffekte entstehen, falls Wellenlängen verwendet werden, die in der Nähe der Absorptionskanten der streuenden Atome liegen. Für die Bijvoet- oder Friedel-Paare (hkl) und $(\bar{h}\bar{k}\bar{l})$ gilt dann nicht mehr die Beziehung $|F(hkl)| = |F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$.

Damit ist es möglich, statt eines zweiten Derivats die Bijvoet-Partner zu benutzen, um die richtige Phase zu bestimmen. In Analogie zu Abb. 2.3 ist dann das erste Derivat durch $|F(hkl)|$ und das zweite durch $|F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$ zu ersetzen. Diese Methode wird als SIRAS bezeichnet und erlaubt eine Phasenbestimmung mit nur einem Derivat.

Da anomale Effekte stark wellenlängenabhängig sind, können solche Experimente nur an Synchrotronstrahlungsquellen durchgeführt werden. Die Methode, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird, erfordert darüber hinaus noch die gezielte Einstellung verschiedener Wellenlängen.

2.5.3 MAD - Multiple wavelength Anomalous Dispersion

Eine besonders geeignete Methode mit Synchrotronstrahlung Proteinstrukturen zu bestimmen ist in der Ausnutzung der anomalen Beugung bei verschiedenen Wellenlängen, dem MAD-Verfahren, zu sehen. Hierbei werden von einem einzigen Proteinkristall bei verschiedenen Wellenlängen Datensätze gemessen. Diese wurde erstmals von der Gruppe um Wayne Hendrickson (Columbia Univ., NY) verwendet (Hendrickson et al. 1988, Murthy et al. 1988).

Durch die anomale Beugung ergeben sich Differenzen zwischen $|F(hkl)|$ und $|F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$ einerseits und zwischen $|F(\lambda_i)|$ und $|F(\lambda_j)|$ andererseits. Dabei ist $|F(\lambda_i)|$ die gemittelte Summe aus $|F(hkl)|$ und $|F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|$ bei der Wellenlänge λ_i . Beide Effekte lassen sich dadurch maximieren, daß mindestens drei Datensätze aufgenommen werden: 1. Ein quasi nativer, mit einer Wellenlänge λ_1 , die nicht in der Nähe der Absorptionskante des anomalen Streuers liegt, 2. ein Datensatz zur Maximierung von $\Delta f'$ und 3. ein Datensatz zur Maximierung von $\Delta f''$.

Der Nachteil dieser Methode ist, daß die anomalen Differenzen sehr klein sind. Das führt zu erheblich höheren Anforderungen an die Meßgenauigkeit, die nicht immer gewährleistet werden kann, da viele Kristalle trotz vorherigen Einfrierens nach längerer Bestrahlungsdauer einen Strahlenschaden zeigen. Da jedoch mindestens drei vollständige Datensätze gemessen werden müssen, kann diese Methode nicht bei allen Projekten angewandt werden. Mit der zunehmenden Anzahl der Synchrotronmeßplätze für Proteinkristallographie ist allerdings in den letzten Jahren die Anzahl der mit MAD bestimmten Strukturen erheblich angestiegen, und die Methode entwickelt sich ebenso zu einem Standardverfahren wie Multipler Isomorpher und Molekularer Ersatz.

2.5.4 Molekularer Ersatz

Eine gänzlich andere Möglichkeit die Phasen zu bestimmen, ist die Verwendung eines Suchmodells. Oftmals sind Proteine anderen bereits bestimmten Strukturen ähnlich. Ein Maß für

die mögliche Ähnlichkeit ist ihre Aminosäuresequenz. Ein hohes Maß an Homologie in der Primärstruktur geht in der Regel einher mit einer großen Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Struktur. Dies kann man sich zu nutzen machen, indem man ein geeignetes Suchmodell im Kristall plaziert und daraus resultierende Phasen berechnet. Da die Anzahl der Proteinstrukturen in der PDB schnell wächst, steigt die Chance ein solches Protein zu finden von Tag zu Tag. Bei einem guten Suchmodell entfällt die Notwendigkeit Schweratome zu suchen genauso wie die Last gute MAD-Daten zu produzieren. Ein einzelner nativer Datensatz reicht dann bereits für die Bestimmung der Struktur. Allerdings gilt dies nur für sehr ähnliche Strukturen. Ist das Suchmodell nicht ähnlich genug, so kommen u.U. keine guten Phasen zustande und man wird dann doch auf eine der anderen Methoden zurückkommen müssen.

Die Berechnung der Transformationen die das Suchmodell in geeigneter Weise in der Zelle plazieren erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die *Rotationsfunktion* bestimmt, die die Drehung des Suchmodells in Relation zu dem Protein im Kristall beschreibt. Im zweiten Schritt wird mit der *Translationsfunktion* die absolute Position des Suchmodells im Kristall bestimmt. Bei der Rotationssuche wird die bereits oben beschriebene Pattersonfunktion (Gl. 2.5) genutzt. Die Pattersonfunktion des Suchmodells wird berechnet und mit der gemessenen Pattersonfunktion des Kristalls verglichen. Da beide Funktionen nur aus Differenzvektoren zwischen Dichtemaxima bestehen, wird hier keine absolute Position verglichen. Stattdessen lassen sich die Pattersonfunktionen durch Drehungen ineinander überführen. Ist dies gelungen, so ist die Rotationsfunktion gefunden und man kann zum nächsten Schritt der Translationsuche übergehen.²

Die Bestimmung der Translationsfunktion erfolgt nun indem das bereits in die richtige Orientierung gedrehte Suchmodell in einer trial-and-error Methode den realen Raum auf einem Gitter abtastet. An jedem Gitterpunkt werden die Strukturfaktoren des Suchmodells berechnet und mit den gemessenen verglichen. Die Qualität des Überlapps läßt sich mit einem *R*-Faktor $R = \frac{\sum_{hkl} ||F_o| - k|F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|}$ oder einem Korrelationsfaktor *c* ausdrücken. Die auf diese Weise gewonnene beste Lösung kann dann zur Berechnung einer ersten Elektronendichtekarte verwendet werden, in der das Modell möglicherweise bereits gebaut werden kann.

Eine auf Molekularem Ersatz beruhende Dichtekarte ist allerdings nicht ganz ohne Risiko. Da die aus einem Suchmodell berechneten Phasen die Dichtekarte dominieren, kann es sehr leicht zu falschen Interpretationen kommen, die im späteren Verlauf des Modellbaus nur sehr schwer wieder zu eliminieren sind. Der sogenannte Model-bias kann damit u.U. den Bau des korrekten Modells verhindern. Mit einer (selbst-)kritischen und vorsichtigen Bauweise und geeigneten Verfeinerungsprozeduren (Verwendung von *R_{free}* und simulated annealing Protokollen) kann man dem aber entgegenwirken.

²Statt die Pattersonfunktion eines Suchmodells zu überlagern, kann man die Pattersonfunktion des nativen Kristalls auch mit sich selbst vergleichen. Dies bezeichnet man als eine Selbstrotation. Die so gefundenen Lösungen deuten auf verschiedene über nicht-kristallographische Symmetrien verknüpfte Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit hin (s. Abschn. 4.1.1.4).

2.6 Methoden zur Phasenverbesserung mit Dichtemodifikationen

Die in Abschn. 2.5 beschriebenen Verfahren führen - Daten von entsprechender Qualität vorausgesetzt - zu ersten Dichtekarten. Diese sind allerdings nicht immer interpretierbar, da sie teilweise stark verrauscht sind. Oft läßt sich durch Dichtemodifikationen aus diesen ersten Phasenabschätzungen eine klare Elektronendichtekarte erhalten, in der ohne weiteres ein Modell gebaut werden kann. Die beiden Verfahren, die breite Anwendung gefunden haben und auch in dieser Arbeit genutzt wurden, sind das *Solvent Flattening* und die Ausnutzung der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS).

2.6.1 Lösungsmittelglättung – *Solvent Flattening*

Da in einem Proteinkristall stets ein hoher Anteil von Lösungsmittel enthalten ist, versucht man die Streubeiträge des Lösungsmittels rechnerisch zu eliminieren. Das hierfür eingesetzte Verfahren wird als *Solvent Flattening* (=Lösungsmittelglättung) bezeichnet und führt in einer großen Zahl von Fällen zu deutlich verbesserten Elektronendichtekarten (Wang 1985). Auch im Falle der Phasenbestimmung des Kinesin-Dimers führte die Glättung der Lösungsmittelhülle zu einer deutlich verbesserten Elektronendichtekarte.

Der Anteil des Lösungsmittels am Gesamtvolumen des Kristalls, läßt sich mit den von Matthews (1968) angegebenen Formeln

$$V_M = \frac{V}{M_r \cdot Z} \quad (2.10)$$

und

$$V_p = 1.66 \cdot \frac{v}{V_M} \quad (2.11)$$

abschätzen.

Dabei sind V_M der Matthewsparameter, V das Volumen einer Einheitszelle, M_r das Molekulargewicht eines Proteinmoleküls, Z die Anzahl der Proteinmoleküle in der Einheitszelle, V_p der Volumenanteil des Proteins im Kristall und $v = 0.74 \text{ cm}^3/\text{g}$ ein empirischer Parameter. Typische Werte für V_M sind laut Matthews (1968): 1.66 bis $4.0 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Dies entspricht einem Volumanteil für das Protein von $V_p = 0.30 - 0.75$.

Mit Hilfe der so gewonnenen Abschätzung lassen sich dann die Anteile in der Dichtekarte identifizieren, die zusammenhängende Bereiche mit niedrigem ρ aufweisen. In diesen wird die Dichte auf einen konstanten niedrigen Wert ρ_{SF} gesetzt. Anschließend wird aus dieser im *realen Raum* geglätteten Dichte durch Fourier-Transformation ein neuer Satz Phasen α_{SF} berechnet. Diese werden mit den ursprünglichen Phasen α_{init} kombiniert, indem eine Wahrscheinlichkeitsabschätzung $P_{neu}(\alpha) = P_{init}(\alpha) \cdot P_{SF}(\alpha)$ durchgeführt wird. Mit dieser werden neue Phasen α_{neu} ermittelt und es wird eine Dichte ρ_{neu} berechnet, die wiederum im realen Raum geglättet wird. Dieser Zyklus wird einige Male durchlaufen und führt in der Regel zu einer deutlich verbesserten Elektronendichtekarte.

Eine kürzlich entwickelte Methode (Abrahams et al. 1994, Abrahams und Leslie 1996) verwendet statt eines konstanten Werts ρ_{SF} außerhalb der Proteinregion den Wert $\rho_{flip} = -\rho_{calc}$.

Damit wird der *zufällige* Wert³ invertiert und man erreicht damit eine erheblich schnellere Konvergenz der Iteration. Dieses Verfahren wird aufgrund des „Umklappens“ der Dichte des Lösungsmittels daher *Solvent Flipping* genannt.

2.6.2 Nicht-kristallographische Symmetrie (NCS)

Sind mehrere identische Moleküle in der asymmetrischen Einheit vorhanden, so lassen sich deren Dichten mitteln. Das Verfahren hierzu ähnelt in Teilen dem des *Solvent Flattening*. Ausgehend von den Anfangsphasen wird zunächst eine Elektronendichtekarte gerechnet, in der die verschiedenen Untereinheiten identifiziert werden müssen. Es wird eine Maske für jede Untereinheit gewählt. Diese Masken werden dann mit Hilfe der ermittelten nicht-kristallographischen Symmetrieeoperatoren überlagert. Jetzt läßt sich die Dichte ρ über die NCS äquivalenten Maskenbereiche mitteln. Wie beim *Solvent Flattening* wird diese modifizierte Dichte ρ_{NCS} benutzt, um mit Fourier Transformation modifizierte Phasen α_{NCS} zu berechnen. Diese werden über ihre Wahrscheinlichkeiten gewichtet aufsummiert und anschließend kann eine neue modifizierte Dichte berechnet werden. Dieser Vorgang wird über mehrere Iterationszyklen wiederholt.

Unter Ausnutzung der NCS lassen sich häufig schlechte Dichtekarten erheblich verbessern. Dieses Verfahren wurde auch bei der Strukturbestimmung des Kinesin-Dimers eingesetzt und verbesserte die Dichte an einigen Stellen erheblich (s. Abb. 3.5). Die Grenzen dieses Verfahrens liegen notwendigerweise dort, wo die nicht-kristallographische Symmetrie gebrochen wird. In Bereichen, in denen sich die einzelnen Untereinheiten stark unterscheiden, führt eine Mittelung zu schlechteren Dichtekarten. Auch dieser Effekt ließ sich beim Kinesin-Dimer beobachten, wenn man die zu mittelnden Bereiche zu weit ausdehnte.

2.7 Verfeinerung der Proteinstruktur

Die Verfeinerung der Proteinstrukturen beruht auf der Anpassung des Modells an die gemessenen Daten. Dabei wird der kristallographische *R*-Faktor als ein Maß für die Qualität der Verfeinerung herangezogen.

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_o(hkl)| - k|F_c(hkl)||}{\sum_{hkl} |F_o(hkl)|} \quad (2.12)$$

Allerdings wäre es nicht möglich, eine Proteinstruktur zu verfeinern, wenn nicht zusätzliche Bedingungen die Freiheit einschränken. Dies liegt daran, daß nur wenig mehr Meßwerte als zu verfeinernde Parameter vorliegen. Die Einschränkungen in der Verfeinerung lassen sich aber auch als zusätzliche Meßwerte interpretieren, so daß es entweder zu einer Erhöhung der Anzahl der Meßwerte (*restraints*) oder zu einer Reduzierung der Parameter (*constraints*) kommt. In beiden Fällen verbessert sich das Verhältnis von Parametern zu gemessenen Größen.

Bei den zusätzlich eingebrachten Informationen handelt es sich um Bindungslängen und Winkel von sehr gut verfeinerten Strukturen kleiner Moleküle. Diese werden herangezogen, um Vergleichsmodelle zu den Proteinstrukturen zu erhalten. Sogenannte *Dictionaries* sind in jedem

³Zufällig ist der Wert in einem gewissen Sinne, da die Lösungsmittelhülle etwa $\rho = 0$ aufweisen sollte, was auch der Ausgangspunkt des normalen *Solvent Flattening* ist.

Proteinstrukturverfeinerungsprogramme enthalten und beruhen zumeist auf der Zusammenstellung von Engh und Huber (1991).⁴

2.7.1 Methode der kleinsten Quadrate

Eine Verfeinerungsmethode ist die Methode der kleinsten Quadrate. Sie minimiert die Funktion

$$Q = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_o(hkl)| - k|F_c(hkl)|)^2. \quad (2.13)$$

Der Wichtungsfaktor wird dabei in Abhängigkeit von der Meßgenauigkeit der einzelnen Reflexe gesetzt $w(hkl) = \frac{1}{\sigma^2(hkl)}$. Das Minimum der Funktion wird bestimmt, in dem die Parameter u_j ($j = 1, 2, \dots, n$) der einzelnen Protein-Atome variiert werden, bis die Differentiale $\frac{\partial Q}{\partial u_j} = 0$ für alle j verschwinden.

Das least-squares-Verfahren zeigt gute Ergebnisse, falls die Struktur im großen und ganzen richtig bestimmt ist. Falls allerdings einige Atome zu weit von ihren richtigen Positionen entfernt sind, kann u.U. die Verfeinerung aufgrund ihres kleinen Konvergenzradius diese nicht an den richtigen Platz befördern.

2.7.2 Simuliertes Annealing

Da dies erkannt wurde haben Kirkpatrick et al. (1983) und Brünger et al. (1990) eine andere Methode entwickelt, die in diesem Fall zum Einsatz kommt. Bei diesem *Simulated Annealing* genannten Verfahren wird die Struktur *rechnerisch aufgeheizt*, d.h. es werden thermische Bewegungen der Atome bei hohen Temperaturen (einige tausend Kelvin) simuliert. Auf die Aufheizphase folgt eine schnelle Abkühlung (alle 25 fs um 25 K). Mit diesem Verfahren kann die Struktur aus einem lokalen Minimum gehoben werden und die richtige Konformation annehmen. So können auch grobere Fehler beim Bau des Modells später noch korrigiert werden.

2.8 Kristallographische Computer-Programme

Für die weitaus meisten Fragestellungen der Proteinkristallographie gibt es mittlerweile leistungsfähige Programme, die die einzelnen Schritte der Strukturbestimmung erleichtern. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Programme werden in diesem Abschnitt stichwortartig beschrieben.

⁴Allerdings zeigte sich bei einigen hochauflösenden Proteinstrukturen, daß die Winkel und Bindungslängen, die für große Proteine beobachtet werden nicht exakt identisch mit den Winkeln und Bindungslängen kleiner Peptide aus Engh und Huber (1991) sind. Daher wird derzeit von einigen Wissenschaftlern (V. Lamzin u.a.) versucht, ein neues Verfeinerungsdictionary nur auf Basis von hochauflösten Proteinstrukturen zu entwickeln.

2.8.1 Programme für die kristallographische Analyse

2.8.1.1 DENZO/SCALEPACK

Mit dem Programm DENZO (Otwinowski und Minor 1997) lassen sich die Rohdaten von Diffraktionsaufnahmen zu Millerschen Indizes (h, k, l), sowie den dazugehörigen Intensitäten I_{hkl} und ihren Fehlern ($\sigma_{I(hkl)}$) integrieren. Dazu ist es möglich, mit dem Programm interaktiv die Einheitszelle des Kristalls zu bestimmen. Dies geschieht über das automatische Aufsuchen von Beugungsmaxima auf der gescannten Bildplatte. Zwischen diesen werden Differenzvektoren gebildet, deren Clusterung untersucht wird. Das Programm gibt dann eine Bewertung der Bravais-Gitter mit den möglichen Zellkonstanten aus.

Normalerweise reicht zu diesem Zweck eine kleine Anzahl von Oszillationsaufnahmen (häufig genügt eine einzige Aufnahme). Die Parameter der so gefundenen Einheitszelle werden dann verfeinert und die daraus berechneten Positionen aufgesucht. Mit einem Iterationsverfahren wird der Hintergrund subtrahiert und die Intensität integriert. Dabei werden die Lorentz- und die Polarisationskorrektur L und P bereits berücksichtigt. Die Ergebnisse für jede einzelne Oszillationsaufnahme dieser Integration liegen dann in Form eines ASCII-Files $h, k, l, I(hkl), \sigma_{I(hkl)}$ vor, jeweils mit dem Vermerk, ob der Reflex auf dem entsprechenden Bild vollständig oder nur teilweise gemessen wurde.

Das von denselben Autoren geschriebene Programm SCALEPACK addiert zunächst die auf aufeinanderfolgenden Oszillationsaufnahmen nur jeweils teilweise gemessenen Reflexen zu vollen Reflexen auf. Anschließend werden die symmetrieäquivalenten Reflexe aufeinander skaliert. Weiterhin ist es möglich eine Nachverfeinerung der Einheitszellparameter aufgrund des gesamten Datensatzes vornehmen zu lassen. Schließlich gibt das Programm eine skalierte Liste aller $h, k, l, I(hkl), \sigma_{I(hkl)}$ aus. Dazu werden als Qualitätsparameter der R -Wert für symmetrieäquivalente Reflexe

$$R_{sym}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (2.14)$$

und das Signal-Rauschverhältnis

$$\frac{I(hkl)}{\sigma_{I(hkl)}} \quad (2.15)$$

jeweils in Abhängigkeit von der Auflösung angegeben.

2.8.1.2 Phases-Programmsuite

Die PHASES-Programmsuite (Furey und Swaminathan 1997) ermöglicht das Bestimmen der Phasenwinkel α_{hkl} der Strukturaktoren F_{hkl} . Dabei ist es sowohl möglich, die Phasierung nur mit Hilfe von MIR-Daten als auch zusätzlich mit Daten, bei denen anomale Signale gemessen wurden, zu verwenden. Das Programmpaket umfaßt auch Möglichkeiten die Positionen der Schweratome zu verfeinern. Die Teil-Programme CMBISO und CMBANO skalieren zunächst die Derivat-Datensätze auf die nativen Daten. Nun lassen sich entsprechend des in Abschn. 2.5.1.1 beschriebenen Verfahrens Pattersonkarten berechnen, die eine erste Lokalisierung und Positionsabschätzung der Schweratom-Positionen ermöglichen.

Die Schweratompositionen können dann in PHASIT zur Phasierung benutzt werden. Dabei werden gleichzeitig die eingegebenen Startwerte für die Schweratome in ihrer Position und Besetzung verfeinert. Die so gewonnenen Phasen können zur Berechnung von Elektronendichtekarten verwendet werden, die an einem 3D-Graphik-Computer den Bau eines Protein-Modells ermöglichen.

Weitere Möglichkeiten der PHASES-Programmsuite sind die Einbeziehung der nicht-kristallographische Symmetrien (NCS) und die Durchführung einer Lösungsmittelglättung, wie es in Abschn. 2.6 beschrieben wurde.

Eine Benutzung als Molecular Replacement Programm ist nicht vorgesehen. Dafür besser geeignet ist AMoRe.

2.8.1.3 AMoRe

Mit diesem Programm (Navaza 1994) ist die Phasenbestimmung über die Methode des molekularen Ersatzes möglich. AMoRe (Automated Molecular Replacement Programm) führt die Suche nach Rotations- und Translationsfunktionen durch und listet die Ergebnisse mit den entsprechenden Korrelations- und *R*-Faktoren auf. Mit Programmen aus der CCP4-Suite, X-PLOR oder der PHASES-Suite lassen sich dann die Elektronendichtekarte berechnen und der Modellumbau kann beginnen.

2.8.1.4 CCP4-Suite

Als CCP4-Suite (CCP4 1994) wird eine Sammlung von Programmen bezeichnet, die ausgehend von einem englischen Projekt (Collaborative Computing Project No.4), das an der Universität York entstand, die umfangreichste Sammlung proteinkristallographischer Software darstellt. Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Programmen wurde dieses Paket nicht von einem Autor entwickelt. Es werden Beiträge verschiedener Autoren zusammengefaßt, die dann über ein normiertes Datenformat (mtz-Format) ineinander überführt werden können. Im Rahmen dieses Pakets sind auch die später zu beschreibenden Programme ARP, REFMAC, PROLSQ, eine frühe Version von AMoRe u.v.m. enthalten. Neben den o.g. CCP4 Programmen wurden im Rahmen dieser Arbeit lediglich einige andere für kleinere Berechnungen und Umformatierungen genutzt.

2.8.2 Programm zum (Um)Bau der Modelle: O

Zum Bau und Umbau des Proteinmodells ist es erforderlich mit einem Graphik-Rechner die Elektronendichtekarten möglichst dreidimensional zu betrachten und in dieser 3D-Dichtekarte den Umbau vorzunehmen. Dies wurde mit einer Silicon Graphics Workstation des Typs Indigo2 und dem Programm O (Jones et al. 1991) durchgeführt.

Der Rechner ist dazu mit einem Sender ausgestattet, der eine Stereobrille steuert, die über Polarisationsfilter wechselweise das eine und das andere Auge verschließt. Der Bildschirm stellt mit gleicher Frequenz zwei Bilder zur Verfügung, die im Gehirn bei der Überlagerung einen Stereoeindruck erzeugen. Über Drehknöpfe lassen sich dann die Dichtekarte und das Molekül oder Teile des Moleküls scheinbar dreidimensional bewegen. Eine Reihe von eingebauten Un-

terprogrammen hilft beim Bau durch das Ergänzen von Atomen an den richtigen Positionen, sofern ein Gerüst (ein C α -Rückgrat der Polypeptidkette) bereits gebaut wurde.

Dazu wurden noch einige andere Programme der *Uppsala Software Factory* (Arbeitsgruppe um Prof. Alwyn Jones in Uppsala) eingesetzt (OOPS (Kleywegt und Jones 1996), LSQMAN (Kleywegt 1996), MOLEMAN2 (nicht veröffentlichtes Programm)), die den Bau des Modells vereinfacht haben.

2.8.3 Programme zur Struktur-Verfeinerung

2.8.3.1 X-PLOR

X-PLOR (Brünger 1992b) ist das am meisten verwendete Programm zur Verfeinerung. Mit diesem ist es möglich, Moleküldynamik-Rechnungen durchzuführen, um die Struktur zu verfeinern. Dazu bietet X-PLOR eine eigene Syntax die einer Programmier-Sprache ähnlich ist. Mit ihr lassen sich neben Simulierter Annealing-Verfeinerung in x -, y - und z -Koordinaten auch Torsionswinkel Dynamiken rechnen. Beide Verfahren sind in der Lage einen möglicherweise während des Modellbaus eingefügten sogenannten *model bias* (eine Beeinflussung der Elektronendichte in Richtung des Modells) durch simuliertes Aufheizen wieder zum Verschwinden bringen zu lassen. Dabei ist durch die reduzierte Anzahl der Freiheitsgrade und die bessere Anpassung an das System der Torsionswinkel-Dynamik der Vorzug zu geben.

Neben dem Ausdruck aus Gl. 2.13 lassen sich bei X-PLOR noch weitere Terme minimieren. Dazu zählen Geometrieterme (Bindungslängen und Winkel nach Engh und Huber (1991)), die potentielle Energie E_{pot} aufgrund der Veränderung der Bindungslänge, ein NCS-Term, Torsions-Potentiale und Van der Waals-Wechselwirkungen.

2.8.3.2 REFMAC

Das von Murshudov et al. (1997) entwickelte Programm REFMAC implementiert die Methode der maximum likelihood Verfeinerung.

Zusätzlich nutzt es die von Read (1986) vorgeschlagenen Wichtungen und berechnet die Elektronendichtekarte daher mit $(2m|F_o| - D|F_c|)$ -Koeffizienten. Dabei ist m die in Gl. 2.9 definierte *figure of merit* und D ein Maß für die Genauigkeit der Atompositionen, häufig auch als σ_A bezeichnet. F_o und F_c sind die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoren.

Diese Art der Berechnung hat den Vorteil, daß schlecht definierte Strukturfaktoren (mit einem kleinen m) ebenso mit einem geringen Gewicht in die Dichtekarte eingehen, wie schlecht bestimmte (und daher mit einem hohen σ_A -Wert behaftete) Teile des Modell. Mit dieser Methode läßt sich das Rauschen der Elektronendichtekarte verringern.

2.8.3.3 PROLSQ

Das älteste der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Programme ist die least-square Verfeinerungsroutine von Hendrickson (1985), die in dem Programm PROLSQ eingesetzt wird.

Hierbei handelt es sich um eine Prozedur, die rein nach der Methode der kleinsten Quadrate verfeinert und genau wie X-PLOR und REFMAC einige zusätzliche Terme minimiert.

Allen Verfeinerungen gemeinsam ist die Gefahr, daß die Struktur *überverfeinert* wird. Dies kann leicht passieren, da durch Minimierung des R -Faktors nichts über die Qualität der Struktur ausgesagt, sondern nur eine besonders gute Modellierung der Daten erreicht wird. Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß eine zu diesem Zwecke absichtlich rückwärts gebaute Proteinstruktur zu einem R -Wert von 21.4% verfeinert werden konnte (Kleywegt und Jones 1995). Dies ist ein Wert, der für Proteinstrukturen bei einer solchen Auflösung nicht ungewöhnlich ist. Man sieht an diesem Beispiel, daß ein blindes Vertrauen auf den R -Wert verheerende Folgen haben kann und daß R sogar dann „akzeptabel“ bleibt, wenn die Struktur völlig falsch ist. Um zu verhindern, daß mit einer Verfeinerung von R nur noch die Meßfehler besser angepaßt werden, wurde von Brünger (1992a) die Benutzung des unabhängigen freien R -Werts R_{free} vorgeschlagen (s. Abschn. 3.1.3.1), der diese Gefahr reduziert.

2.8.4 Programme zur Qualitätsüberprüfung der Struktur

Eine andere Möglichkeit, die Qualität der Verfeinerung zu überprüfen besteht darin, sich die Plausibilität der Struktur anzusehen. Während die ausschließliche Betrachtung der R -Faktoren die Qualität des Modells völlig außer acht läßt, kann mit anderen Programmen dieses Modell stereochemisch überprüft werden. Damit ergänzen sich diese beiden Qualitätskontrollen. Eine gut verfeinerte Struktur sollte bei beiden Kriterien ein akzeptables Ergebnis erzielen.

Eine weitere Anwendung der Qualitäts-Checks nur auf Grundlage der Atom-Koordinaten ist darin zu sehen, daß die allermeisten Strukturen dem Benutzer nur als Koordinaten vorliegen (etwa als Datei aus der PDB). Es gibt daher für ihn keine Möglichkeit die Struktur mit Hilfe der Elektronendichtekarte zu überprüfen. Daher muß man sich in einem solchen Fall auf Plausibilitätsbetrachtungen und aus anderen Strukturen erhalten Gütefaktoren beschränken.

Ein umfangreiches Testprogramm der stereochemischen Parameter wird von dem von Laskowski et al. (1993) entwickelten Programm PROCHECK durchgeführt. Es werden die Bindungslängen und Winkel mit den Standardwerten verglichen, dazu Torsionwinkel, Planaritäten von ebenen Gruppen usw. Dieses Programm liefert auch einen sogenannten Ramachandran-Plot (nach Ramakrishnan und Ramachandran (1965)), der kritische Reste unmittelbar zeigt.

2.8.5 Programme zur Darstellung der Proteinstruktur

2.8.5.1 Molscript

Die komplexe Natur einer Struktur von einigen tausend Atomen macht eine Schematisierung notwendig. Eine Darstellung, die von Richardson (1985) eingeführt wurde, hat sich mittlerweile als Standard durchgesetzt. In dieser Darstellungsform werden α -Helizes als Spiralen und β -Stränge als Pfeile dargestellt. Bereiche die keine Sekundärstrukturmerkmale aufweisen sind als Bänder gezeichnet. Das Programm MOLSCRIPT (Kraulis 1991) wurde verwendet, um die entsprechenden Bilder in dieser Arbeit zu erstellen. Bei einigen Graphiken sind zusätzlich zu den Strukturmerkmalen noch besondere Atomgruppen als Kugelstabmodelle eingezeichnet

2.8.5.2 Grasp

Eine andere Darstellungsart, die gelegentlich in der Arbeit verwendet wird, ist die Konturierung der Oberfläche. Diese Abbildungen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls et al. 1991; 1993) erstellt. Während mit den von MOLSCRIPT erstellten Cartoon-Plots eine gute Orientierung der Lage verschiedener Sekundärstrukturelemente in einem Protein möglich ist, läßt sich durch die Darstellung der Oberfläche ein Eindruck von möglichen Bindungsverhältnissen an Substraten oder Hemmstoffen erhalten. Die Oberfläche des Proteins wird dabei berechnet, indem die van der Waals-Radii der Proteinatome so zu einer Fläche verbunden werden, daß diese mit einem *Probe-Lösungsmittelmolekül* wechselwirken kann. Dabei ergeben sich in der Regel größere zusammenhängende Gebiete. In diesen lassen sich dann Bindungstaschen oder Kanäle als Vertiefungen oder durchgehende Löcher erkennen.

Da viele Interaktionen in biologischen Systemen über elektrostatische Wechselwirkungen ablaufen, ist eine besonders informative Darstellung gegeben, wenn die Oberfläche des Proteins mit ihrem elektrostatischen Potential $\Phi(\vec{r})$ dargestellt wird. Dies wird berechnet, indem die Poisson-Boltzmann-Gleichung

$$\nabla \cdot [\epsilon(\vec{r}) \nabla \cdot \Phi(\vec{r})] - \epsilon(\vec{r}) \kappa(\vec{r})^2 \sinh[\Phi(\vec{r})] + \frac{4\pi \rho^f(\vec{r})}{kT} = 0 \quad (2.16)$$

numerisch gelöst wird. Dabei ist Φ das dimensionslose elektrostatische Potential in Einheiten von kT/e mit der Boltzmann-Konstante k , der Temperatur T und der Elementarladung e . ρ^f ist die *fixe* Ladungsverteilung des Proteins in Einheiten von e . ϵ ist die Dielektrizitätskonstante, die typischerweise zwei Werte annimmt. Im Protein hat ϵ einen Wert von 2 bis 4, außerhalb wird dieser 80 gesetzt (ϵ des Wassers). Der Term $\kappa^2 = 1/\lambda^2$ mit der Debyelänge λ ermöglicht die Einbeziehung von Punktladungen in der Lösung. Sind keine beweglichen Ionen vorhanden, so ist $\kappa^2 = 0$.

Ein Übersichtsartikel über Elektrostatik in Biologie ist von (Honig und Nicholls 1995) veröffentlicht worden. Diese Autoren haben auch das Programm DELPHI entwickelt, daß die oben beschriebenen Berechnungen ausführt. Dieses steht in unserem Labor nicht zur Verfügung. Mit GRASP sind allerdings gute qualitative Annäherungen möglich, so daß die erhaltenen Ergebnisse wie z.B. in Abb. 3.20 zwar nicht quantifizierbar sind, aber dennoch Richtwerte für die Potentialverteilung angeben. Die Oberfläche des Proteins wird gemäß der relativen Stärke des Potentials $\Phi(\vec{r})$ eingefärbt. Dabei bedeutet rot ein negatives Potential und blau ein positives.

Kapitel 3

Strukturbestimmung des Motorproteins Kinesin

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Strukturbestimmung des dimeren Kinesins

Die Kristallisation, die Bestimmung der Raumgruppe ($P2_12_12_1$) und der Einheitszelldimensionen des dimeren Kinesinkonstrukts RK379 ($a = 72.2 \text{ \AA}$, $b = 91.9 \text{ \AA}$, $c = 141.7 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) wurden von Frank Kozielski durchgeführt und sind in Kozielski (1997) und Kozielski et al. (1997a) ausführlich beschrieben. Im Rahmen einer Zusammenarbeit auf diesem Gebiet wurden in dieser Arbeit die für die Strukturbestimmung des Kinesin-Dimers unerläßliche Phaseninformation bestimmt und mit Hilfe verschiedener Methoden Elektronendichtekarten erstellt, in denen dann das Kinesin-Dimer Modell gebaut werden konnte (Kozielski 1997, Kozielski et al. 1997b).

Die Phasenbestimmung für die Kristalle des Kinesin-Dimers wurde mit Hilfe der PHASES-Programmsuite (Furey und Swaminathan 1997) durchgeführt. Die geringe Qualität der Daten erforderte dabei den Einsatz verschiedener Methoden, bevor eine akzeptable Elektronendichtekarte berechnet werden konnte, in der der Bau eines Modells möglich war. Im folgenden werden die einzelnen Schritte zur Erstellung einer interpretierbaren Elektronendichtekarte aufgeführt.

3.1.1.1 Suche nach Schweratomderivaten: Quecksilberderivat

Da es keinerlei Hinweise auf ein geeignetes Suchmodell für molekularen Ersatz gab, wurde versucht, Schweratome in die Kinesin-Dimer Kristalle einzubringen, um mit MIR- oder MAD-Methoden zu einer Lösung des Phasenproblems zu gelangen.

Nachdem es gelungen war (Kozielski 1997) ein Schweratom (Quecksilber) in den Kristall eindiffundieren zu lassen und dieser Kristall zu dem nativen Kristall hinreichend isomorph war, mußten die Positionen des Quecksilbers bestimmt werden. Diese wurden mit Hilfe der Patterson-Methode (Patterson 1934) (s. auch Abschn. 2.5.1.1) von Dr. Frank Kozielski und Dr. Alexander Marx gefunden (Kozielski 1997). Allerdings ist bei der für die Strukturbestim-

mung gängigsten Methode, dem isomorphen Ersatz, das Vorhandensein nur eines Derivats und die Kenntnis der Schweratompositionen nicht ausreichend für die Bestimmung der Phasen, da die Zweideutigkeit des Phasenwinkels nicht entschieden werden kann. Es mußten daher noch weitere Derivate (multipler isomorpher Ersatz) gefunden werden, oder die Ambiguität des Phasenwinkels mußte über anomale Streuung aufgelöst werden (s. Abschn. 2.5).

Eine Möglichkeit der Bestimmung der Phasenwinkel unter Ausnutzung nur eines Kristalls bieten Experimente bei verschiedenen Röntgenwellenlängen. Diese MAD (nach Multiple wavelength Anomalous Diffraction) genannte Methode (Hendrickson et al. 1988, Murthy et al. 1988) wurde bereits in Abschn. 2.5.3 kurz besprochen. Dazu ist der Einsatz von Synchrotronstrahlung unerlässlich. Die Datensammlung mit Synchrotronstrahlung hat neben der erheblich besseren Qualität der Strahlung (höhere Intensität und geringe Divergenz) den Vorteil, daß sich die Wellenlänge einstellen läßt und dann in der Nähe der Absorptionskanten der anomalen Streuer gemessen werden kann.

Ein entsprechendes MAD-Experiment wurde mit einem Quecksilber-Kristall an der Synchrotronstrahlführung BM14 am ESRF/Grenoble durchgeführt. Dazu wurden insgesamt drei Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen in der Nähe der L_{III} Absorptionskante des Quecksilber aufgenommen. Allerdings scheiterte die Phasenbestimmung in unserem Fall an der geringen Qualität der Daten. Aufgrund der langen Meßzeit und damit der langen Bestrahlung, der der Kristall für die drei Datensätze ausgesetzt war, nahm dessen Qualität im Laufe der Messung stark ab. Insbesondere wurde die Auflösung geringer, d.h. die Daten wurde bei großen Beugungswinkeln stark verrauscht. Damit war ein genaues Messen nicht mehr möglich. Für den Erfolg der MAD-Methode sind aber diese sehr genaue Messungen erforderlich, da die beobachteten anomalen Effekte im Bereich von nur 1%-3% liegen.

3.1.1.2 Phasenbestimmung mit einfachem isomorphem Ersatz unter Ausnutzung anomaler Signale (SIRAS)

Da die ausschließliche Verwendung nur eines Kristalls, wie im MAD-Experiment nicht zum Erfolg führte, wurde versucht unter Verwendung der nativen Daten einerseits und der anomalen und isomorphen Daten des Quecksilbers andererseits mit der SIRAS-Methode (=Single Isomorphous Replacment with Anomalous Scattering) eine erste Elektronendichtekarte zu erhalten. Nach den Vorarbeiten (Schweratomsuche und Lösung der Patterson-Karten), die noch mit Daten von einer Drehanode des Typs RIGAKU RU-200 in Hamburg durchgeführt worden waren (s. Abschn. 2.3.1), wurden dazu Synchrotron-Daten eines nativen und eines Quecksilberderivat-Kristalls, die an der Strahlführung BM14 ESRF/Grenoble aufgenommen (s. Abschn. 2.4.6) worden waren, benutzt. Auf diese Art und Weise wurden genügend Informationen zur Phasierung gewonnen, so daß eine erste interpretierbare Elektronendichtekarte erhalten werden konnte.

Ein Ausschnitt aus dieser ersten Elektronendichtekarte ist in Abb. 3.1 dargestellt. Es ließen sich bereits einige sekundäre Strukturmerkmale, wie zum Beispiel α -Helices oder das zentrale, ausgedehnte β -Faltblatt erkennen. Die Dichte zu einer durchgehenden Polypeptidkette zu verbinden, war allerdings noch sehr schwierig. Es waren noch viele sogenannte Kettenabbrüche vorhanden (ein Zeichen für eine zu ungenaue Phasenbestimmung) und die Zuordnung der Seitenketten war ebenfalls stellenweise noch unsicher oder unmöglich.

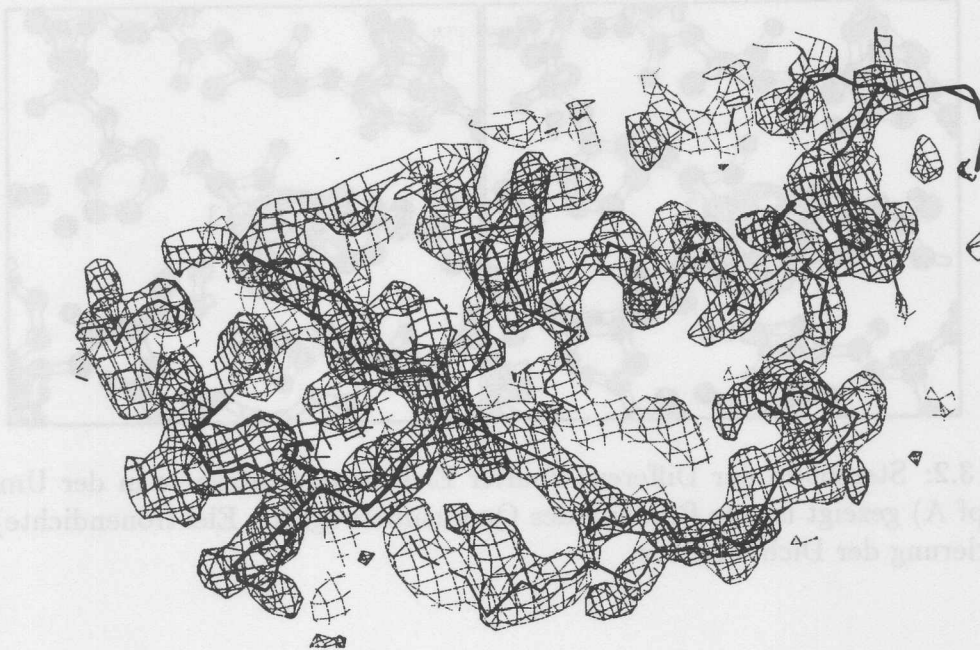


Abbildung 3.1: Erste Elektronendichtekarte des Kinesin-Dimer nach SIRAS. Gezeigt ist der Bereich um Helix α_3 in der Bildmitte und Faltblatt β_{5a}, β_{5b} links.

Mit der Differenz-Fourier-Methode wurde auf Basis der vorhandenen ersten Phasenabschätzung nach weiteren Bindungsstellen für Quecksilber gesucht. Die Differenz-Fourier-Dichtekarte zeigt jedoch nur zwei, dafür allerdings sehr ausgeprägte, Stellen, eine pro Kinesin-Molekül.

Quecksilbersalze binden in Proteinen in der Regel kovalent an Cystein-Resten. Die Bindungsstelle des hier gefundenen Quecksilberderivats liegt in beiden Köpfen zwischen Cys13 und Cys304, so daß das Quecksilber mit diesen Resten wechselwirken kann. Als ein Beispiel für die Bindungsstelle ist in Abb. 3.2 ein Stereoplot¹ der Umgebung der Reste Cys13 und Cys304 des Kopfes A gezeigt. Die gezeigte Dichte ist die zwischen der ursprünglichen MIR-Dichte und dem Quecksilberdatensatz bestimmte Differenz-Fourier-Karte (konturiert bei 10σ)². Man erkennt, daß der Schwerpunkt zum Cys13 verschoben ist, an dem das Atom kovalent gebunden ist. Im Kopf B sieht die Dichte entsprechend aus, allerdings ist dort der Schwerpunkt zwischen Cys13 und Cys304, so daß nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß das Quecksilberatom (auch) am Cys304 bindet.

Die Höhe des Quecksilbersignals war in den beiden Köpfen stark unterschiedlich. Während im Kopf A eine Höhe von 56σ vorlag, betrug der Wert in Kopf B nur 28σ . Dies deutete daraufhin, daß die Besetzung der Stellen nicht gleichmäßig war, und ergab sich auch aus der Verfeinerung der Besetzungen der Stellen. Allerdings war der Peak in Kopf B erheblich verschmierter als in Kopf A, so daß hierdurch bereits ein geringeres Signal entstand.

¹Der Stereo-Eindruck entsteht, wenn man die beiden Bilder entspannt mit den Augen einzeln betrachtet: linkes Auge betrachtet linkes Teilbild, rechtes Auge rechtes Teilbild. Alternativ kann auch eine Stereo-Brille bestehend aus zwei Linsen im richtigen Abstand verwendet werden.

² σ ist hierbei eine Standardabweichung oberhalb des Mittelwertes der Differenzfourier-Karte, bezogen auf die Schwankungen der Dichtewerte

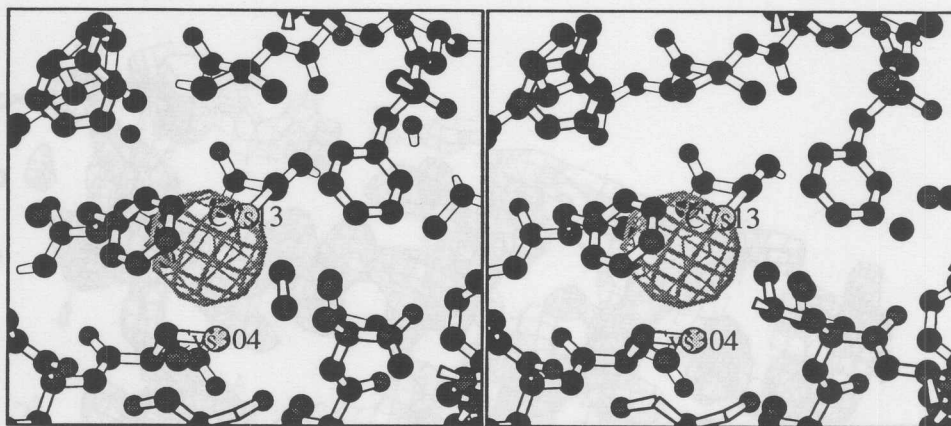


Abbildung 3.2: Stereobild der Differenz-Fourier Elektronendichtekarte in der Umgebung von Cys13 (Kopf A) gezeigt ist die Bindung des Quecksilbers (grüne Elektronendichte) am Cys13. Die Konturierung der Dichte ist 10σ .

Eine Verfeinerung der Besetzungsdichten ergab, daß die Bindungsstelle im Kopf B im Verhältnis zu derjenigen in Kopf A nur zu 60 % besetzt war. Ein Grund hierfür konnte bisher nicht aus der chemischen Umgebung der Bindungsstelle abgeleitet werden. Möglicherweise ist der Diffusionsweg des Quecksilber-Ions im Kristall für den einen Kopf des Dimer ungünstiger als für den anderen.

3.1.1.3 Phasenbestimmung mit mehrfachem isomorphem Ersatz unter Ausnutzung anomaler Signale (MIRAS)

Da die Elektronendichtekarten, die mit der SIRAS-Methode unter Einsatz der Quecksilberderivate erhalten worden waren, noch nicht überall eine eindeutige Zuordnung der Polypeptidkette erlaubten, wurde versucht, weitere Schweratomverbindungen eindiffundieren zu lassen. Als dies aus verschiedenen Gründen nicht gelang wurde ein sogenanntes Selenomethioninderivat des Proteins hergestellt (Dr. Manfred Thormählen). Zu diesem Zweck wurde Kinesin in einem Bakterienstamm exprimiert, der auxotroph für Methionine ist und Selenomethionin aus dem Nährmedium aufnehmen kann. Dadurch ist in dem so gewonnenen Protein der Schwefel der Methionin-Seitenketten gegen Selen ausgetauscht. Dieses Protein kann dann in Kristallform als ein Schweratomderivat verwendet werden, um zusätzliche Phaseninformationen zu erhalten (Hendrickson et al. 1990).

Nachdem die bakterielle Expression des Selen-Methionin-Kinesin gelungen war, konnten entsprechende Daten ebenfalls an der Synchrotronstrahlführung BM14 am ESRF in Grenoble aufgenommen werden. Mit Hilfe der Differenz-Fourier-Methode konnten in diesem Selen-Methionin-Datensatz die Positionen einiger Selen-Atome bestimmt werden. Abb. 3.3 zeigt beispielhaft einen Schnitt durch eine Selen-Differenz-Fourierkarte. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits 3 Selen-Positionen bestimmt und in die Bestimmung der Phasen eingeflossen.

In Abb. 3.3 erkennt man eine Reihe von deutlichen Differenz-Peaks. Die Konturierung erfolgte bei 2σ mit weiteren Abstufungen von 0.5σ . Insgesamt sind hier fünf deutliche Peaks zwischen 3σ und 5σ zu erkennen, die weiteren Selen-Positionen zugeordnet werden konnten.

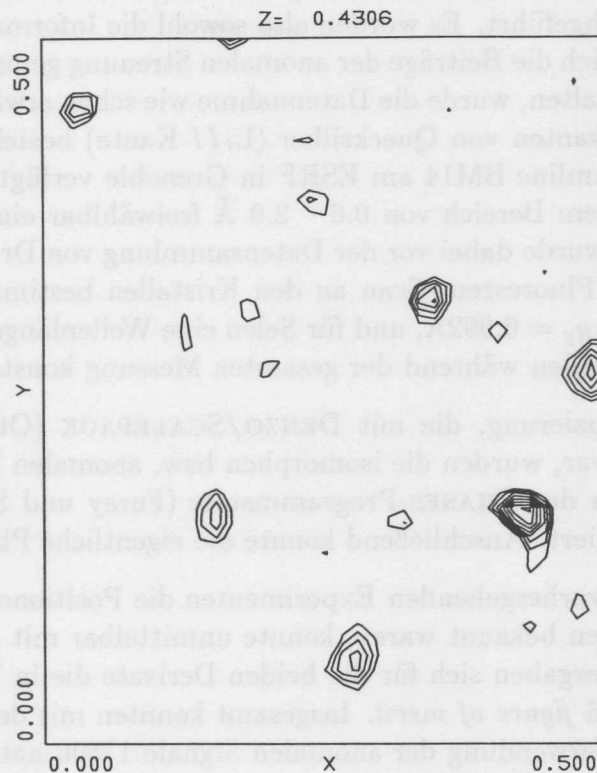


Abbildung 3.3: Schnitt durch die Differenz-Fourier Elektronendichtekarte und Selen-Positionen (x, y -Sektion bei $z = 0.43$)

Die so gefundenen Positionen der Selenatome wurden wiederum zur Phasenbestimmung herangezogen, die Besetzung dieser Positionen wurde verfeinert und anschließend entschieden, ob die gefundene neue Stelle tatsächlich eine Schweratomposition darstellte oder zum Rauschen gezählt werden muß. Auf diese Art und Weise konnten in mehreren Zyklen insgesamt 15 von 16 zu erwartenden Selenpositionen (jedes Kinesin-Molekül enthält 8 Methionin-Seitenketten) bestimmt werden. Lediglich die Seitenkette eines Methioninrestes (Met198 aus Kopf B) zeigte keine Differenz-Elektronendichte. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß diese Seitenkette in einer besonders flexiblen Region liegt.

Obwohl die Positionen der Selenatome bestimmt werden konnten, zeigte die unter Verwendung der im Februar 1996 gemessenen Selendaten erhaltene Dichtekarte keine bessere Qualität als die Quecksilber-SIRAS Dichtekarte. Dies lag daran, daß die Qualität der Selen-Daten aufgrund einer hohen Mosaizität der Kristalle nicht sehr gut war. Deshalb wurde parallel zum Bau des Modells in der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Quecksilber-SIRAS Dichtekarte versucht, bessere Kristalle zu erhalten.

Für die endgültige experimentelle Phasenbestimmung wurden schließlich drei Datensätzen (nativer Datensatz, Quecksilber-Derivat und Selenomethioninderivat) herangezogen, die an der ESRF-Synchrotronstrahlführung BM14 im Juni/Juli 1996 in Grenoble/Frankreich gemessen worden waren. Mit diesen war es möglich, eine gute Phasenbestimmung mit dem Programm PHASES durchzuführen, mit deren Hilfe ein Modellbau ohne weiteres möglich war. Die Phasierung soll im folgenden etwas ausführlicher besprochen werden.

Die Phasierung wurde unter Verwendung der drei oben erwähnten Datensätze nach der MIRAS-Methode durchgeführt. Es wurden also sowohl die Informationen aus dem isomorphen Ersatz als auch zusätzlich die Beiträge der anomalen Streuung genutzt. Um ein möglichst hohes anomales Signal zu erhalten, wurde die Datennahme wie schon erwähnt bei Wellenlängen in der Nähe der Absorptionskanten von Quecksilber (L_{III} -Kante) beziehungsweise Selen (K-Kante) durchgeführt. Die Beamline BM14 am ESRF in Grenoble verfügt dazu über die Möglichkeit, die Wellenlänge in einem Bereich von 0.6 – 2.0 Å freiwählbar einzustellen. Die genaue Lage der Absorptionskante wurde dabei vor der Datensammlung von Dr. Valerie Biou und Dr. Andy Thompson mit einem Fluoreszenz-Scan an den Kristallen bestimmt. Für Quecksilber wurde eine Wellenlänge von $\lambda_{Hg} = 0.992\text{Å}$, und für Selen eine Wellenlänge von $\lambda_{Se} = 0.978\text{Å}$ gewählt. Diese Wellenlängen wurden während der gesamten Messung konstant gehalten.

Nach der Datenreduzierung, die mit DENZO/SCALEPACK (Otwinowski und Minor 1997) durchgeführt worden war, wurden die isomorphen bzw. anomalen Daten mit den Programmen CMBISO/CMBANO aus der PHASES-Programmsuite (Furey und Swaminathan 1997) auf den nativen Datensatz skaliert. Anschließend konnte die eigentliche Phasierung beginnen.

Da bereits aus den vorhergehenden Experimenten die Positionen der Schweratome und deren relative Besetzungen bekannt waren, konnte unmittelbar mit der Phasierung mit PHASIT begonnen werden. Es ergaben sich für die beiden Derivate die in Tab. 3.1 dargestellten Werte für *Phasing Power* und *figure of merit*. Insgesamt konnten mit den Informationen aus beiden Derivaten und unter Verwendung der anomalen Signale 17506 native Reflexe mit einer *Figure of Merit* (FOM) von 0.668 phasiert werden.

Derivat	FOM	Anzahl Refl.	Phasing Power
Quecksilber, isomorph	0.388	17170	
zentrische Reflexe	0.558	1859	1.94
azentrische Reflexe	0.368	15311	
Quecksilber, anomal	0.302	14537	1.93
Selenomethionin, isomorph	0.262	16639	
zentrische Reflexe	0.392	1645	2.08
azentrische Reflexe	0.248	14994	
Selenomethionin, anomal	0.361	13901	2.18
gesamt	0.668	17506	

Tabelle 3.1: Phasing Power und *figure of merit* der Quecksilber- und Selenomethioninderivate

3.1.1.4 Lösungsmittelglättung - *Solvent Flattening*

Bei allen Phasierungsarten (unabhängig davon, ob SIRAS oder MIRAS durchgeführt wurde) wurde im Anschluß an die Phasierung eine Glättung der Lösungsmittelanteile durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Lösungsmittelanteile mittels der von Matthews (1968) angegebenen Formel 2.11 berechnet. Die Bestimmung des Matthewsparameters ergab, wenn man ein Molekulargewicht von $M_r = 84\text{kDa}$ zugrunde legt, für $Z = 1$ einen Wert von $V_M = 2.8\text{Å}^3/\text{Da}$. Es konnte also vermutet werden, daß ein Dimer pro asymmetrischer Einheit im Kristall ent-

halten ist. Die Abschätzung des Lösungsmittelanteils nach Formel 2.11 ergab einen Wert von $V_s = 1 - V_p = 55\%$.

Für die Qualität der Phasen war die Lösungsmittelglättung (Wang 1985) beim Kinesin-Dimer von großer Bedeutung. In die ohne Lösungsmittelglättung uninterpretierbare Elektronendichtekarten konnte teilweise automatisch eine vorläufige Hauptkette gelegt werden. Der Wert der *Figure of Merit* (FOM) für die letzte Phasierung ließ sich nach Lösungsmittelglättung auf 0.883 steigern und eine anschließende Extrapolation der Phasen auf weitere 1897 bis dahin nicht phasierte Reflexe (eine sogenannte *Phase extension*) führte schließlich auf eine FOM von 0.825 für alle 19398 gemessenen nativen Reflexe.

Die optimale Lösungsmittelkonzentration für die Lösungsmittelglättung war allerdings nicht 55%, sondern nur 45%. Diese Diskrepanz kommt dadurch zustande, daß das Kinesinmolekül einen nicht globulären Anteil hat (die Halsregion). Diese Region wird bei einer Lösungsmittelglättung mit hohem Lösungsmittelanteil ebenfalls *geglättet* und verschwindet aus der Dichtekarte.

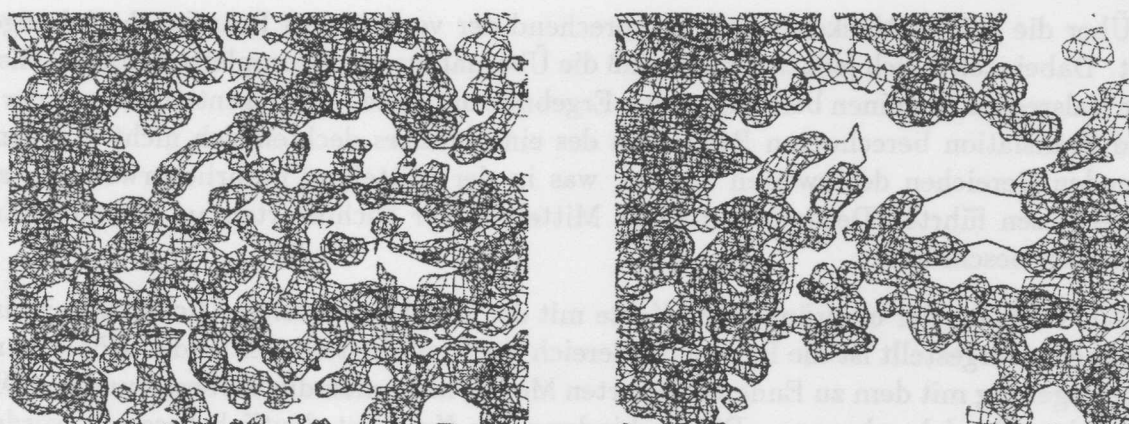


Abbildung 3.4: Vergleich der Elektronendichtekarten des Kinesin-Dimer vor (links) und nach (rechts) *Solvent Flattening* (durchgezogene Linien: Verlauf der Peptidkette des verfeinerten Modells). Gezeigt ist die Kontaktstelle zwischen den beiden Dimer-Köpfen. Im Zentrum der Bilder jeweils links Loop L8b von Kopf A und rechts Loop L10 von Kopf B (vgl. Abb. 3.26)

Man sieht in Abb. 3.4 den Unterschied zwischen den Elektronendichtekarten (links vor, rechts nach *Solvent Flattening*). Im Bereich zwischen den beiden Köpfen des Kinesin-Dimers läßt sich in der geglätteten Dichtekarte der Verlauf der Polypeptid-Kette wesentlich deutlicher erkennen, was den Modellbau erheblich erleichtert hat.

3.1.1.5 Nicht-kristallographische Symmetrie

Da bei der dimeren Form des Kinesin zwei von der Aminosäuresequenz her identische Ketten vorlagen, lag es nahe, nach nicht-kristallographischen Symmetrien zu suchen, um mit diesen weitere Phaseninformationen zu berechnen. Mit Hilfe der zunächst gefundenen Positionen der Quecksilber-Atome, die in den Differenz-Fourier Karten deutlich hervortraten und ersten Selen-Positionen gelang es, diese zu bestimmen. Die Zuordnung von äquivalenten Selen-Stellen in den beiden Köpfen des Dimer war dabei von entscheidender Bedeutung und ermöglichte eine gute

erste Abschätzung der Rotations- und Translationsbeziehungen. Dazu wurden am Graphics-Rechner visuell die entsprechenden korrespondierenden Schweratomstellen in beiden Köpfen identifiziert und mit least-square-Methoden einander überlagert. Mit diesen Informationen konnte eine erste Rotations- und Translationsabschätzung gefunden werden.

Nun wurden zwei Maske gewählt, die erzeugt wurden, indem die großen Dichte-Bereiche, die den beiden Kinesin-Köpfen entsprachen, getrennt ausgewählt wurden. Dazu dienten bereits erkennbare zusammenhängende Peptidstücke als Orientierungshilfen. Die Wahl einer Maske wurde von der relativ guten Abgrenzung der Protein- und Lösungsmittelbereiche erleichtert, die vom *Solvent Flattening* erzeugt worden war. Die Rotations- und Translationsbeziehungen wurden unter Verwendung der Masken und Elektronendichten anschließend mit dem Programm LSQROTGEN aus der PHASES-Suite (Furey und Swaminathan 1997) optimiert.

Die Rotations- und Translationsbeziehungen ergaben sich zu (sphärische Polarwinkel) $\omega = 56.9$, $\phi = -45.3$, $\chi = 115.8$, wobei χ der Rotationswinkel ist und ω sowie ϕ die Richtung der Drehachse bestimmen. Diese verläuft etwa zwischen den beiden *coiled-coil* Helices (s. Abb.3.26 auf Seite 64).

Über die beiden Masken wurde entsprechend der verfeinerten Rotationsbeziehungen gemittelt. Dabei stellte sich jedoch heraus, daß die Übernahme eines kompletten Kopfes einschließlich der Halsregion zu keinen befriedigenden Ergebnissen führte. Im Gegenteil, die aus der Rotation und Translation berechneten Positionen des einen Halses deckten sich nicht mit den entsprechenden Bereichen des zweiten Kopfes, was in der Mittelung natürlicherweise zu schlechten Ergebnissen führte. Deshalb wurde die Mittelung der Dichtekarten auf die globulären Kopfdomänen beschränkt.

Ein Vergleich der ursprünglichen Karte mit der 2-fach gemittelten Dichtekarte ist in Abb.3.5 gegeben. Dargestellt ist die Region im Bereich der Kontaktstelle der beiden Köpfe. Anhand der Überlagerung mit dem zu Ende verfeinerten Modell kann man die Verbesserung der Dichtekarte im linken Bereich erkennen. Die Verbindung der Kette ist deutlich besser geworden und es konnte eine sichere Zuordnung der entsprechenden Bereiche (hier im Bild die Reste 210-225 von Kopf B) erfolgen.

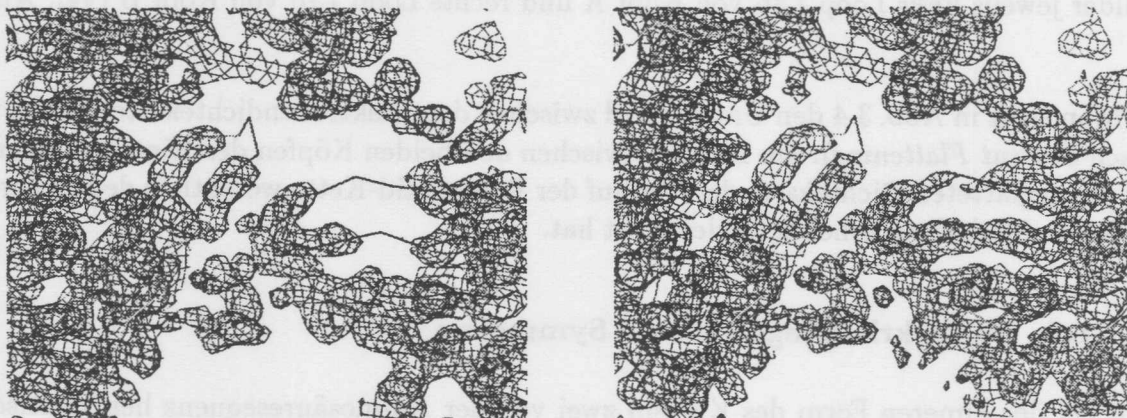


Abbildung 3.5: Vergleich der Elektronendichten des Kinesin-Dimers vor (links) und nach (rechts) 2facher Mittelung mit NCS (durchgezogene Linien: Kettenverlauf des verfeinerten Modells). Gezeigt ist dieselbe Stelle wie in Abb. 3.4

3.1.1.6 Modellbau und Verfeinerung

Der Bau des Kinesindimermodells und die anschließende Verfeinerung des Modells gegen die gemessenen Daten wurde von Frank Kozielski durchgeführt. Daher wird hier nicht weiter darauf eingegangen. Das verfeinerte Dimer-Modell ist in Abb. 3.26 auf Seite 64 in zwei Ansichten zu sehen. Neben der Darstellung in Kozielski (1997) ist dieses Modell auch ausführlich in Kozielski et al. (1997b) beschrieben.

3.1.2 Strukturbestimmung des Kinesin-Monomers

Die Kristallisation des monomeren Kinesin mit Li_2SO_4 als Fällungsmittel wurde von Jens Müller durchgeführt und ist in Kozielski et al. (1997a) beschrieben. Mit den so gewonnenen Kristallen konnte am Synchrotronmeßplatz BW6 der Max-Planck-Gesellschaft am DESY ein kompletter Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.9 \AA aufgenommen werden. In Abb. 3.6 ist ein Beugungsbild aus diesem Datensatz gezeigt.

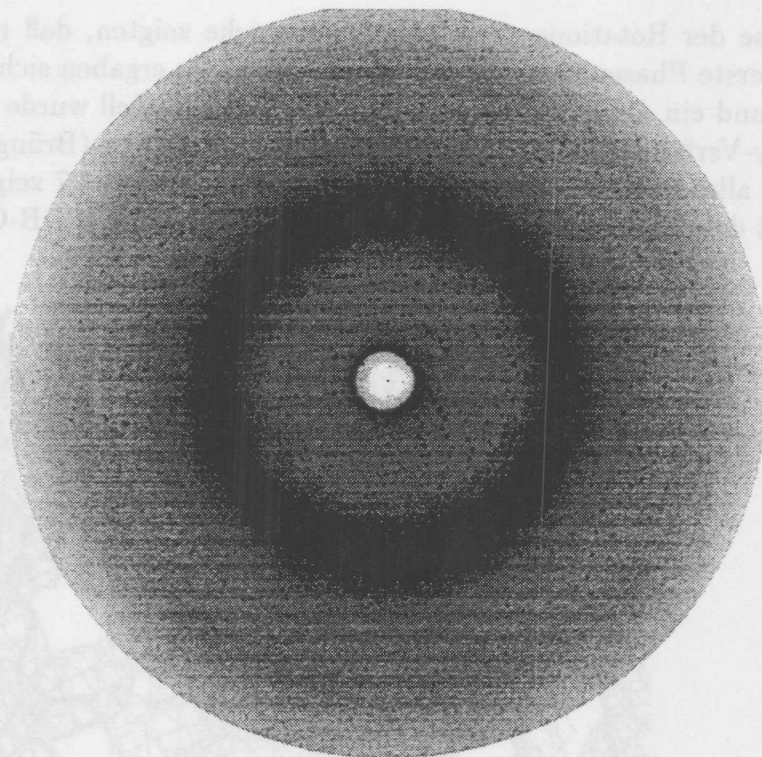


Abbildung 3.6: Drehkristallaufnahme von monomerem Kinesin aufgenommen an der Synchrotronstrahlführung BW6 der Max-Planck-Gesellschaft am DESY, $\lambda = 1.1 \text{ \AA}$, $\Delta\phi = 1^\circ$, Kristall-Detektor-Abstand 140 mm

Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ und hatten die Einheitszelldimensionen

$$\begin{aligned} a &= 71.6\text{\AA} \\ b &= 73.7\text{\AA} \\ c &= 71.4\text{\AA} \\ \alpha = \beta = \gamma &= 90^\circ \end{aligned}$$

Da zum Zeitpunkt der Datennahme des Monomerkristalls bereits ein unvollständiges Modell des Kinesin-Dimers vorlag, wurde versucht, die Phasen mit der Methode des Molekularen Ersatzes zu erhalten.

3.1.2.1 Molekularer Ersatz

Als Suchmodell für das Programm AMoRe (Navaza 1994) wurde eine Hälfte des zu dem Zeitpunkt vorhandenen Kinesin-Dimer Modells verwendet (Kozielski 1997). Dieses Suchmodell bestand aus den Resten: Asp3–Ser236, Gly263–Lys274 und His276–Leu335. Später zeigte sich jedoch, daß einige dieser Reste nicht an der richtigen Stelle waren. Es waren sogenannte *out of register* Fehler (Verschiebungen in der Polypeptidkette) vorhanden, die aber durch die höhere Auflösung der Monomer-Daten korrigiert und später auch auf das Dimer-Modell übertragen werden konnten (s. Abschn. 3.1.3.3).

Die Ergebnisse der Rotations- und Translationssuche zeigten, daß mit diesem Suchmodell eine recht gute erste Phasenabschätzung gelungen war. Es ergaben sich ein Korrelationsfaktor von $c = 50.5\%$ und ein R -Faktor von $R = 41.9\%$. Dieses Modell wurde anschließend einem ersten Rigid-Body-Verfeinerungslauf mit dem Programm X-PLOR (Brünger 1992b) unterworfen. Es ergaben sich allerdings keine weiteren Verbesserungen. Abb. 3.7 zeigt die erste Elektronendichtekarte, mit dem überlagerten zu Ende verfeinerten Modell (PDB-Code: 2kin).

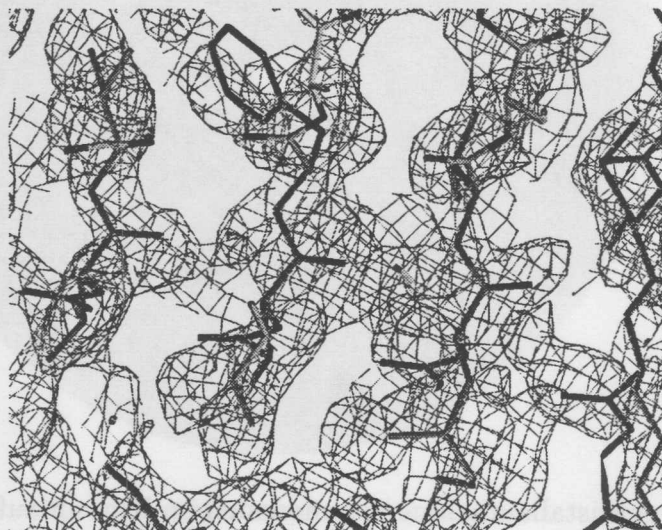


Abbildung 3.7: Elektronendichte des Kinesin-Monomers nach molekularem Ersatz. Dargestellt ist ein Teil des zentralen β -Faltblatts von links nach rechts $\beta 8 \uparrow, \beta 3 \uparrow, \beta 7 \uparrow, \beta 6 \downarrow$.

3.1.3 Verfeinerung und Umbau des Monomer-Modells

Die Verfeinerung der Kinesin-Monomer Struktur wurde unter Benutzung der Programme X-PLOR (Brünger 1992b) und REFMAC (Murshudov et al. 1997) durchgeführt. Diese beiden Programme ergänzen sich, da sie mit unterschiedlichen *Philosophien* an die Verfeinerung herangehen. Mit X-PLOR können sogenannte *Simulated Annealing*-Läufe durchgeführt werden. Dies sind simulierte Aufheizungen der Struktur, die von einem langsamen Abkühlen gefolgt werden. Damit lassen sich größere Fehler in der Struktur beseitigen, da die Energiefunktion u.U. aus einem lokalen Minimum zum globalen Minimum geführt werden kann. REFMAC ist demgegenüber mit seiner auf der Methode der Maximum Likelihood basierenden Optimierung leistungsfähiger, was die *lokale* Verfeinerung des Modells angeht.

3.1.3.1 Kristallographischer R -Wert und freier R -Wert, R_{free}

Der Fortschritt der Verfeinerung wurde mit Hilfe des normalen kristallographischen Residuals R und dem freien R -Wert, R_{free} (Brünger 1992a; 1993), überprüft. Dabei sind R und R_{free} nach Gl. 3.1 bzw. 3.2 definiert.

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_o| - k|F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|} \quad (3.1)$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} ||F_o| - k|F_c||}{\sum_{hkl \subset T} |F_o|} \quad (3.2)$$

Hierbei bedeutet $hkl \subset T$, daß nur über diejenigen Reflexe gemittelt wird, die zu einer nicht dem Refinement unterworfenen Testmenge T gehören.

Es wurde eine Testmenge T mit 10% zufällig ausgewählter Reflexe vor dem ersten Rigid-body-Verfeinerungslauf bestimmt, und während der gesamten Verfeinerung beibehalten. Auf diese Weise konnte R_{free} zu jedem Zeitpunkt R_{free} berechnet werden. Eine Testmenge von nicht verfeinerten Reflexen ist erforderlich, da die Anzahl der zu anzupassenden Parameter nur unwesentlich kleiner ist als die Anzahl der unabhängigen Meßwerte³. Die Gefahr der Modellierung des Rauschens ist damit sehr groß. Dabei kann der kristallographische R -Wert fallen, obwohl die Struktur bereits *überverfeinert* ist. Das gilt allerdings nicht für den freien R -Wert (Brünger 1992a; 1993). Dieser kann damit als unabhängiges Maß dafür genommen werden, ob eine weitere Verfeinerung zu einer Verbesserung der Struktur, oder nur zu einer besseren Modellierung des Rauschens führt.

3.1.3.2 Simulated Annealing-Verfeinerung

Nach der Rigid-Body-Verfeinerung wurde das Modell einem ersten Simulierten-Annealing Lauf (Kirkpatrick et al. 1983) bei einer Temperatur von $T = 4000$ K und einer langsamem Abkühlung auf 300 K unterworfen (Brünger et al. 1990). Gefolgt wurde dies von der üblichen Powell-Minimierung und einer individuellen Temperaturfaktoroptimierung. Die Anfangswerte von

³In dem endgültigen Modell sind 11740 Parameter (x, y, z -Koordinaten und Temperaturfaktoren von 2935 Atomen) gegen 27128 gemessene Reflexe verfeinert worden.

$R_{free}=48.1\%$ und $R=49.2\%$ fielen dabei auf $R_{free}=42.3\%$ bzw. $R=34.0\%$. Der Fortschritt der Verfeinerung des ersten simulated annealing-Laufs ist in Abb 3.8 dargestellt. Die Verläufe der beiden R -Werte haben mit einer Korrelation von 0.825 eine gute Übereinstimmung. Dies kann als ein Kriterium dafür gesehen werden, daß die Verfeinerung zu einem verbesserten Modell führte und nicht nur die Fehler besser modelliert wurden. Verfeinert wurde dabei mit Daten zwischen 8.0 und 1.8 Å. Dabei wurden nur solche Strukturfaktoren verfeinert, deren Amplitude $|F_o|$ hinreichend gut bestimmt war ($|F_o| > 2\sigma_{|F_o|}$; 2σ -Cutoff).

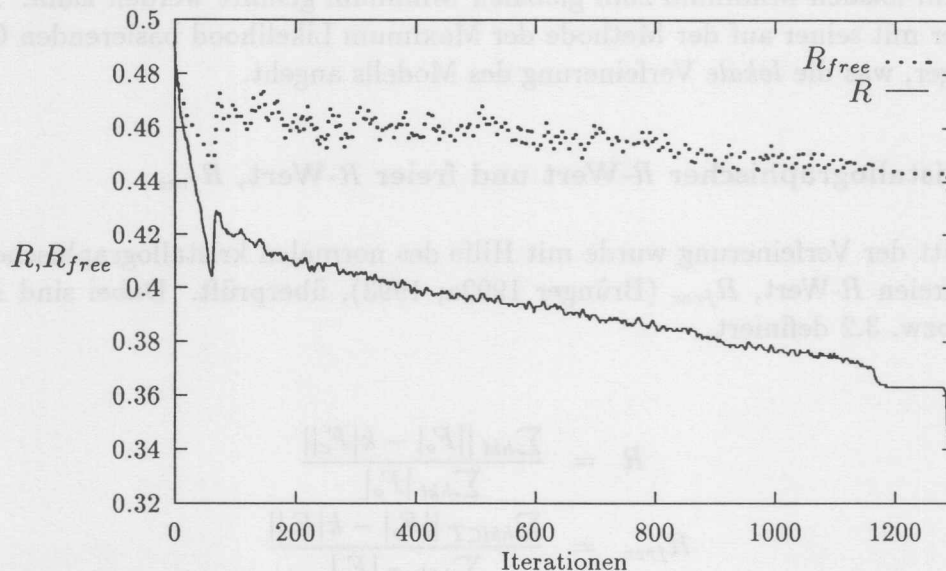


Abbildung 3.8: Kinesin Monomer Verfeinerung: Verlauf der R - und R_{free} -Werte des ersten Simulated Annealing Laufs

Am Verlauf der beiden Kurven in Abb. 3.8 läßt sich das Prinzip eines simulierten Annealing verdeutlichen. Es besteht aus einer Verfeinerung mit der Methode der kleinsten Quadrate (Abfall bis Iteration 60) gefolgt von einem starken Aufheizen der Struktur auf $T_{max} = 4000$ K (steiler Anstieg), die dann langsam (alle 25 fs um 25 K) wieder abgekühlt wird. Schließlich folgen weitere 120 Verfeinerungszyklen mit der Methode der kleinsten Quadrate und schließlich eine Verfeinerung der Temperaturfaktoren der Struktur (Abfall in den letzten 30 Iterationen).

Obwohl bereits am Ende des ersten Verfeinerungslaufs eine deutlich verbesserte Dichtekarte erhalten werden konnte, waren die stereochemischen Parameter beurteilt mit PROCHECK (Laskowski et al. 1993) noch recht schlecht⁴. Etwa 20% der Reste waren dabei außerhalb der idealen Bereiche des Ramachandran-Plots. Die meisten dieser Reste lagen in Loop-Bereichen an der Außenseite des Proteins, die in der Dichte schlecht definiert waren. Einige lagen jedoch in gut definierten Bereichen (z.B. Arg31), was zunächst unverständlich war und erst später geklärt werden konnte (Abschn. 3.1.3.6). Vor der folgenden Verfeinerungsrunde wurde eine komplette Sichtung des Moleküls am Graphics-Rechner durchgeführt. Dabei wurden offensichtliche Fehler mit Hilfe der neu berechneten Elektronendichtekarte bereits korrigiert, wo dies möglich war. Dies waren insbesondere Seitenkettenkonformationen außerhalb der Elektronendichte, die durch eine einfache Drehung in die richtige Position gebracht werden konnten.

⁴Zur Beurteilung der Qualität des endgültigen Modell siehe Abschn. 3.1.3.10 Seite 47ff.

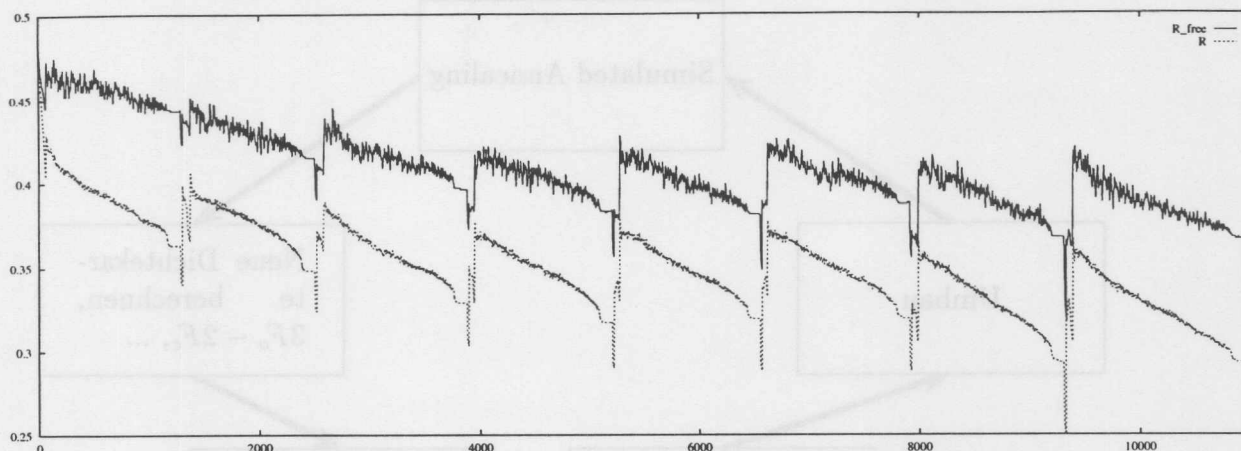


Abbildung 3.9: Kinesin Monomer Verfeinerung: Verlauf der R - und R_{free} -Werte für alle acht Simulated Annealing Läufe

Insgesamt wurden acht Simulated-Annealing-Zyklen mit X-PLOR durchgeführt. An diese schloß sich jeweils ein Umbau unter Sichtung des neuen Modells am Graphics-Rechner an. Es ergab sich für den Verlauf der Verfeinerung die in Abb. 3.9 gezeigten R - und R_{free} -Kurven. Man erkennt, daß R - und R_{free} sich am Ende nicht mehr merklich verbessern. Zu diesem Zeitpunkt wurden gebundene Wasser gesucht und ins Modell eingebaut, sowie mit dem Programm REFMAC weiter verfeinert.

3.1.3.3 Umbau des Modells

Ein typischer Verfeinerungs- und Umbauzyklus läßt sich am besten anhand von Abb. 3.10 beschreiben.

Nach jedem Simulated Annealing-Lauf werden mit den verfeinerten Phasen neue Elektronendichtekarten gerechnet. Dies sind Elektronendichtekarten mit Koeffizienten vom Typ $(3F_o - 2F_c)$, Differenz-Fourierkarten $(F_o - F_c)$ oder „Omit-Maps“, in denen Teile der Modellstruktur weggelassen wurden.

Die neuen Positionen und Orientierungen der Reste und der Hauptkette werden an der Graphics-Station in den Elektronendichtekarten gesichtet. Aus Elektronendichtekarte und Koordinaten lassen sich dann kritische Bereiche bestimmen, die einen zusätzliche Umbau erfordern. Weitere Kriterien liefern stereochemische Parameter, die aufgrund der Atom-Koordinaten berechnet werden können: Torsionswinkel, Bindungslängen, Rotamerkonformationen, Peptid-Bindungsrotationen (*pep-flips*) sowie ungewöhnliche Temperaturfaktoren und hohe *real space* R -Werte, die ebenfalls auf noch nicht optimal angepaßte Elektronendichte hindeuten. Diese rein numerischen Größen lassen sich mit kleinen Hilfsprogrammen berechnen (OOPS, Kleywegt und Jones (1996))⁵. Anschließend werden gezielt diejenigen Reste aufgesucht, die die größten Probleme zeigen und - falls möglich - mit Hilfe des Programms O von Jones et al. (1991) an einem 3D-Graphics Computer (Silicon-Graphics Workstation, Indigo2) umgebaut.

⁵Basis für die Beurteilung sind dabei besonders gut verfeinerte Strukturen hoher Auflösung in der PDB.

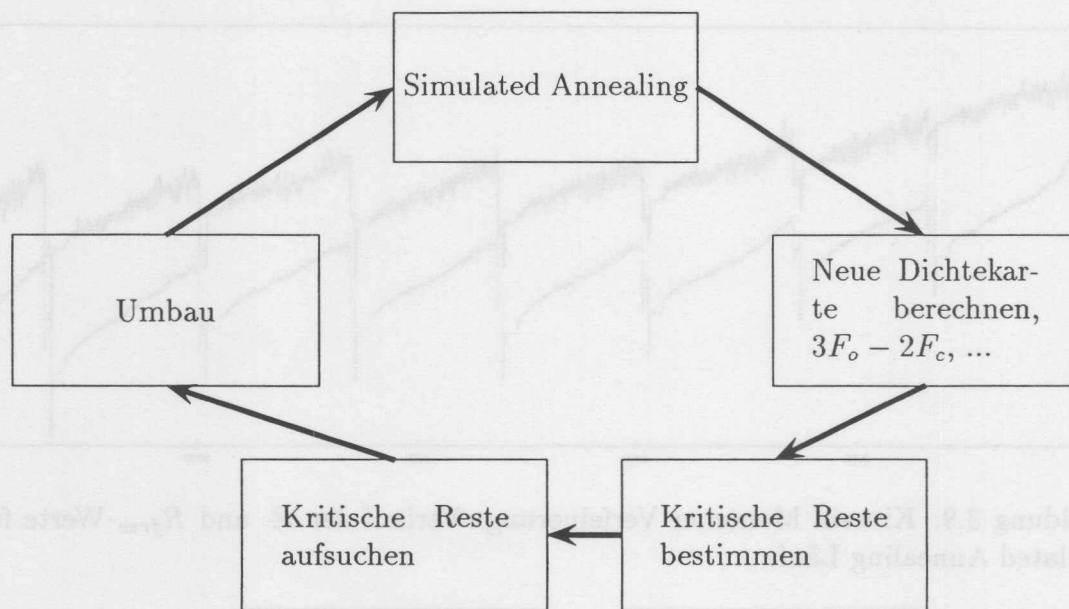


Abbildung 3.10: Schema eines Verfeinerungs-Umbau-Zyklus

Sind die Umbaumöglichkeiten weitgehend erschöpft, wird das umgebaute Modell einem erneuten Verfeinerungszyklus unterworfen.

3.1.3.4 Erste Umbaurunde

Im Durchlauf des manuellen Umbaus nach der ersten Simulierten-Annealing-Verfeinerung wurden eine Reihe von groben Fehlern umgebaut. Dazu zählten deutlich falsch konformierte Seitenketten, denen dann die richtige Rotamer-Konformation gegeben werden konnte, sowie einige Drehungen der Peptid-Bindung. An mehreren Stellen war jedoch ein Bau des Modells bzw. eine Modifizierung von erkennbar falschen Bereichen noch nicht möglich. Dies galt insbesondere für die Schlaufen-Regionen an der dem Lösungsmittel ausgesetzten Außenseite des Proteins.

Zusätzlich wurde damit begonnen, die Positionen von möglichen Wassermolekülen zu vermerken, die dann im späteren Verlauf mit ARP genau bestimmt und in das Modell eingebaut werden konnten (Abschn. 3.1.3.8).

3.1.3.5 Verschiebungen in der Zuordnung der Aminosäuren (*Out-of-register-Fehler*) im Ursprungsmodell

Da das Suchmodell für den molekularen Ersatz nur in einer experimentellen Elektronendichtekarte von 3.0 Å Auflösung gebaut wurde, konnte nicht davon ausgegangen werden, daß es fehlerfrei war. Zu dem Zeitpunkt des molekularen Ersatzes war es auch nicht vollständig. Der größte Fehler des Modells wurde nach einem größeren nicht in der Elektronendichte vorhandenen Stück (Loop L11) sichtbar. Es handelte sich um einen Verschiebungsfehler oder *Out-of-register-Fehler*.

Es zeigte sich, daß die Reste 263-274 des Suchmodells gegenüber ihrer wahren Position um 7 Aminosäuren verschoben waren. Dieser Fehler konnte auftreten, da vor und nach dieser Stelle Bereiche mit schlechter Elektronendichte und keine oder nur geringe Konnektivität vorhanden waren. Mit Hilfe der nach drei Simulated-Annealing Zyklen deutlich verbesserten Elektronendichte war es jedoch möglich, diese Verschiebung zu erkennen und zu korrigieren.

Die Identifikation wurde erschwert durch den Umstand, daß obwohl die Aminosäuresequenz um sieben Reste verschoben war, sich dennoch einige Reste an der richtigen Stelle befanden. Dies läßt sich am Vergleich der verschobenen (oben) mit der richtigen Sequenz (unten) ablesen:

256—267	Asn	Ile	Asn	Lys	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Asn	Gly
263—274	Gly	Asn	Val	Ile	Ser	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Lys
identisch					↑			↑		↑		

Drei der zwölf fraglichen Reste wiesen also die richtigen Seitenketten auf, obwohl die Verschiebung die dazwischenliegenden Aminosäuren an falsche Positionen brachte. Diese waren dann auch in der Elektronendichte gut definiert, während die anderen Reste schlecht definiert waren. Mit Hilfe von Omit-Maps konnte aber schließlich die richtige Lösung gefunden werden, was auch die Möglichkeit eröffnete, die nachfolgende Loop-Region (L12) in das Modell einzubauen.

3.1.3.6 Sequenzierungsfehler Arg31/Pro31

Ein weiterer bemerkenswerter Fehler im Ausgangsmodell war an der Aminosäure-Position 31 zu verzeichnen (Abb. 3.11).

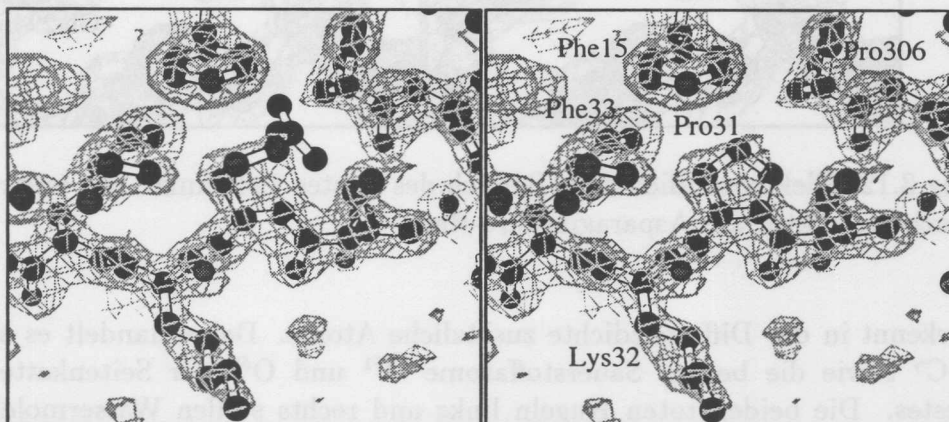


Abbildung 3.11: Elektronendichte im Bereich des Restes 31. links: mit Arginin-, rechts: nach Korrektur auf Prolin-Rest. Die Konturierung der Elektronendichte erfolgte bei 1σ .

Diese befindet sich im Bereich des kleinen Faltblatts β 1a-c. Entsprechend der Sequenzierung des von Dr. A. Sperry und Dr. S.T. Brady geschickten Gens sollte sich an dieser Stelle ein Arginin befinden. Eine Betrachtung der Elektronendichte in diesem Bereich ließ allerdings keine Arginin-Dichte in diesem Bereich erkennen (Abb. 3.11). Zusätzlich sind in der Umgebung dieses

Restes ausschließlich hydrophobe Reste vorhanden: Phe15, Phe29, Ile30, Phe33, Val39, Pro306. Diese bilden eine hydrophobe Tasche, in der der geladene Arginin-Rest keinen Bindungspartner hätte, was letztlich bedeutet, daß es praktisch unmöglich ist, daß es sich bei dieser Seitenkette um Arginin handeln könnte.

Stattdessen erschien es nach der Form der Elektronendichte wahrscheinlich, daß sich an dieser Stelle ein Prolin befindet. Eine Sichtung der von Kozielski (1997) angefertigten Sequenzierungsgele bestätigte diesen Sachverhalt. Das entsprechende Codon lautete statt CGT(Arg) CCT(Pro). Damit konnte auf röntgenkristallographischem Wege ein Sequenzierungsfehler aufgeklärt werden, was für die gute Qualität des Modells spricht.

3.1.3.7 PCR-Mutation Gly293Asp

Eine weitere in der verfeinerten Dichte korrigierte besondere Stelle im Modell befand sich im Übergangsbereich zwischen der Helix $\alpha 5$ und dem β -Strang $\beta 8$. Dort zeigte sich bei der Aminosäure Gly293 eine große Extradichte. In Abb. 3.12 ist die Elektronendichte zu dem damaligen Refinement-Stand in blau (1σ) und die Differenzfourier-Elektronendichte bei einem Konturierungslevel von 2.5σ in rot dargestellt.

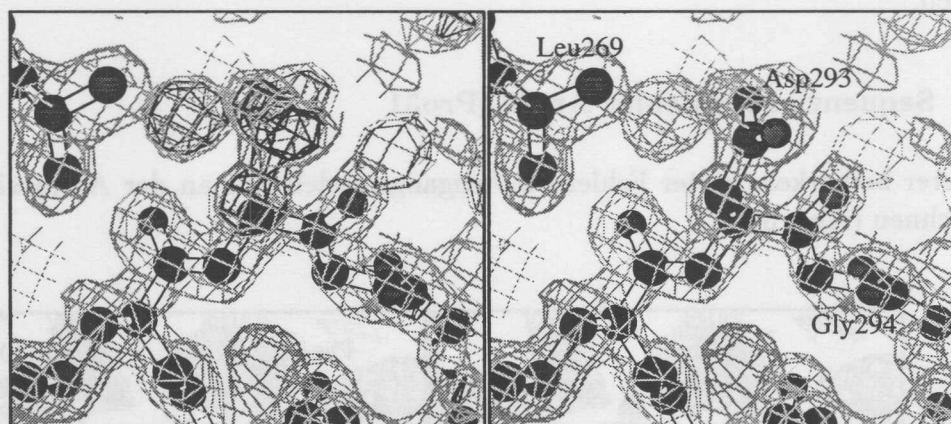


Abbildung 3.12: Elektronendichte im Bereich des Restes 293. links: mit ursprünglich Glycin-, rechts: nach Korrektur auf Asparaginsäure-Rest

Man erkennt in der Differenzdichte zusätzliche Atome. Dabei handelt es sich um die Atome C^{β} , C^{γ} sowie die beiden Sauerstoffatome $O^{\delta 1}$ und $O^{\delta 2}$ der Seitenkette eines Asparaginsäurerestes. Die beiden roten Kugeln links und rechts stellen Wassermoleküle dar, die zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch nicht in die Struktur eingebaut waren.

Diese Abweichung von der ursprünglichen Sequenz beruht offenbar auf einem Fehler in der PolymeraseChainReaction (PCR). Diese wurde genutzt, um das Proteinkonstrukt aus dem Gen zu klonieren. Dabei treten in etwa einem Fall vom tausend fehlerhafte Basenpaarungen in den Nucleinsäuren auf, die dann zu mutierten Aminosäuren führen. In diesem Fall ist die Mutation von GGT nach GAT, was eine Änderung von Glycin nach Asparaginsäure bedeutet. Dies konnte anhand des Sequenzierungsgels von Jens Müller nachträglich verifiziert werden. In der Struktur des Kinesin-Dimers (Kozielski et al. 1997b) tritt diese Mutation nicht auf.

3.1.3.8 Suche nach gebundenen Wassermolekülen

Die Suche nach gebundenen Wassermolekülen wurde mit dem Programm ARP (Automated Refinement Procedure) (Lamzin und Wilson 1993) und durch systematisches Untersuchen der Elektronendichtekarten durchgeführt.

Die in der Elektronendichte gefundene Peaks wurden nur dann als Wasser bestimmt, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

1. Ein deutlich positiver Differenz-Peak (größer als 3σ) ist in der $F_o - F_c$ -Dichtekarte zu erkennen,
2. eine klare *runde* Dichte in der $3F_o - 2F_c$ -Dichtekarte vorhanden und
3. ein gut definierter Bindungspartner für eine Wasserstoffbrückenbindung liegt in der Struktur vor.

Zwei typische Wasser, für die diese Kriterien zutreffen, sind in Abb. 3.12 links dargestellt. Beide Wasser zeigen klare Differenzdichte (rot) und eine kugelförmige Dichte ebenfalls in der $3F_o - 2F_c$ -Dichtekarte. Die Wasserstoffbrückenbindungspartner sind zum einen das Hauptketten-Carbonyl von Asp293 (rechtes Wasser) zum anderen das endständige Carbonyl der Seitenkette Asp293.

Das Programm ARP sucht nach einer ähnlichen Strategie automatisiert nach Wassermolekülen. Es sucht dazu Dichtepikes in der Elektronendichtekarte, die keinem atomaren Streuer zugeordnet sind und bestimmt den Schwerpunkt dieser Peaks. Anschließend wird geprüft, ob es sich bei diesen Dichtebereichen um Wassermoleküle handeln kann. Dies wird durch eine Betrachtung der Entfernung zwischen dem Schwerpunkt des Peaks und möglichen Wasserstoffbrückenbindungspartnern erreicht. Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich typischerweise bei einer Entfernung von 2.2 Å (minimaler Wasser - Wasser-Abstand) bis zu 3.3 Å. Allerdings lassen sich diese Parameter im Programm bei Bedarf anpassen. Anschließend wird ein kurzer Verfeinerungslauf mit PROLSQ oder REFMAC angeschlossen und der Prozeß wird wiederholt. Ergibt sich dann, daß einige Wasserpositionen fraglich sind, können diese auch nachträglich vom Programm wieder herausgenommen werden.

Die auf diese Weise von ARP gefundenen Wasser wurden dann in der Elektronendichtekarte angesehen und auf ihre Plausibilität überprüft. Dabei wurden die o.a. Kriterien verwendet. ARP wurde also hauptsächlich eingesetzt, um ein schnelleres Auffinden der Wasserpositionen zu ermöglichen.

3.1.3.9 Maximum Likelihood Refinement

Nach der Verfeinerung mit X-PLOR und Verwendung von Simulated-Annealing Protokollen (s. Abschn. 3.1.3.2) wurde beim Einsatz von ARP bei der Suche nach Wassern das Programm REFMAC (Murshudov et al. 1997) verwendet. Der Einsatz von REFMAC und der damit verbundenen Maximum Likelihood-Algorithmen zeigte bessere Ergebnisse. Mit REFMAC lassen sich auch besonders einfach mit der mit der *figure of merit* m und D (Maß für die Genauigkeit des Modells) gewichteten $(2m|F_o| - D|F_c|)$ -Koeffizienten Elektronendichtekarte berechnen, die

die Interpretation und den möglichen Umbau des Modells erheblich erleichtern. Der Fortschritt der Verfeinerung wurde wiederum mit R und R_{free} überprüft (s. Abb. 3.13).

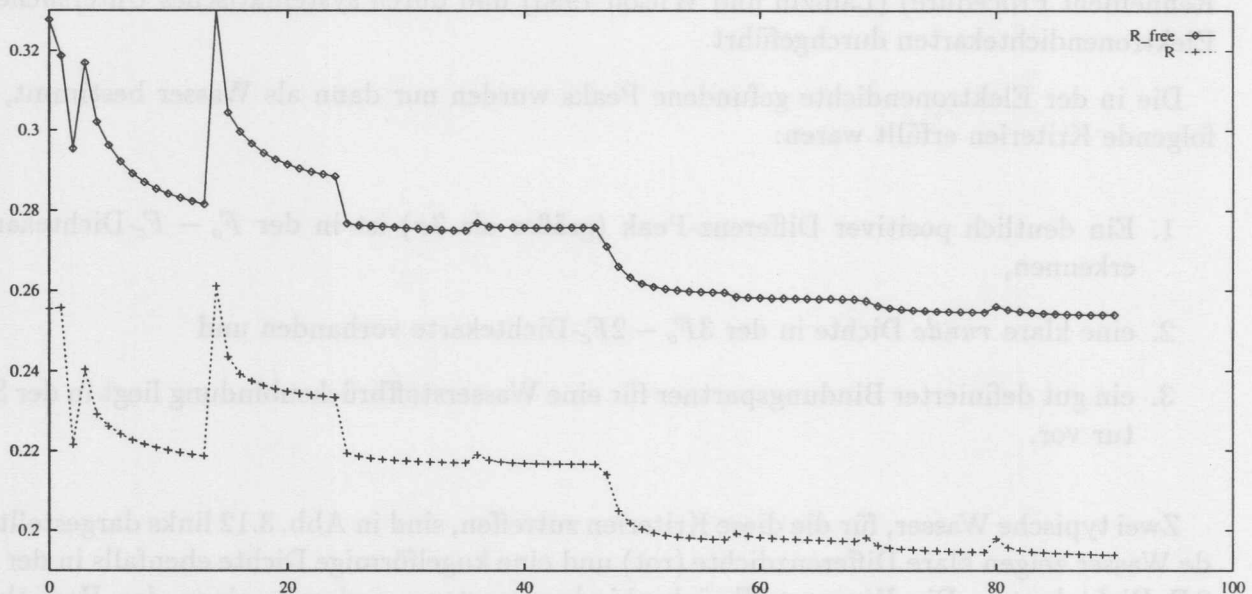


Abbildung 3.13: Kinesin Monomer: Verlauf der R - und R_{free} -Werte für acht REFMAC-Verfeinerungszyklen

Allerdings war es auch mit der Anwendung von REFMAC und dem Einfügen von 2 ADP, 3 Sulfat und 205 Wassermolekülen nicht möglich, alle Teile des Proteins in einem Modell zu vereinigen. Es blieben Bereiche, die nicht einer Dichte zugeordnet werden konnten. Es handelt sich dabei um einen Loop mit einer Länge 12 von Aminosäuren (L11), der nicht gebaut werden konnte. Ansonsten war das Modell bis auf drei C-terminale Reste vollständig. Die Qualität des Modells, das mittlerweile in der Proteindatabank deponiert ist (PDB-Code: 2kin), ist im nächsten Abschnitt anhand wichtiger Kenngrößen dargestellt.

3.1.3.10 Qualität des Modells

Die Qualität des Modells läßt sich an verschiedenen Größen messen. Hier sollen als Indikatoren auf den Ramachandran-Plot und die Temperaturfaktor-Verteilung eingegangen werden.

Der Ramachandran-Plot ist ein Verfahren mit dem die stereochemische Qualität einer Proteinstruktur ermittelt werden kann. Ramakrishnan und Ramachandran (1965) haben mit theoretischen Berechnungen über die sterische Hinderung der Seitenketten verschiedene Bereiche für die Torsionswinkel⁶ ϕ und ψ der Peptidbindung bestimmt, die erlaubten oder verbotenen Bereichen der Proteinkonformationen entsprechen.

Im Fall des Kinesin-Monomers wurde eine Untersuchung der Torsions-Winkel ϕ und ψ mit dem Programm PROCHECK (Laskowski et al. 1993) durchgeführt. Es ergab sich dabei der

⁶ ϕ ist dabei der Torsionswinkel um die Bindung N-C α definiert über die Atome C-N-C α -C, ψ derjenige um die Bindung C α -C definiert über die Atome N-C α -C-N

in Abb. 3.14 dargestellte Ramachandran-Plot. In diesem sind 281 oder 92.4% der Nicht-Glycinreste in den bevorzugten Regionen, 22 oder 7.2% weitere in zusätzlich erlaubten Gebieten und nur ein einziger Rest (Lys274) oder 0.3% in großzügig erlaubten Gebieten. Keiner der im Modell 2kin eingebauten Reste ist in einer stereochemisch verbotenen Region.

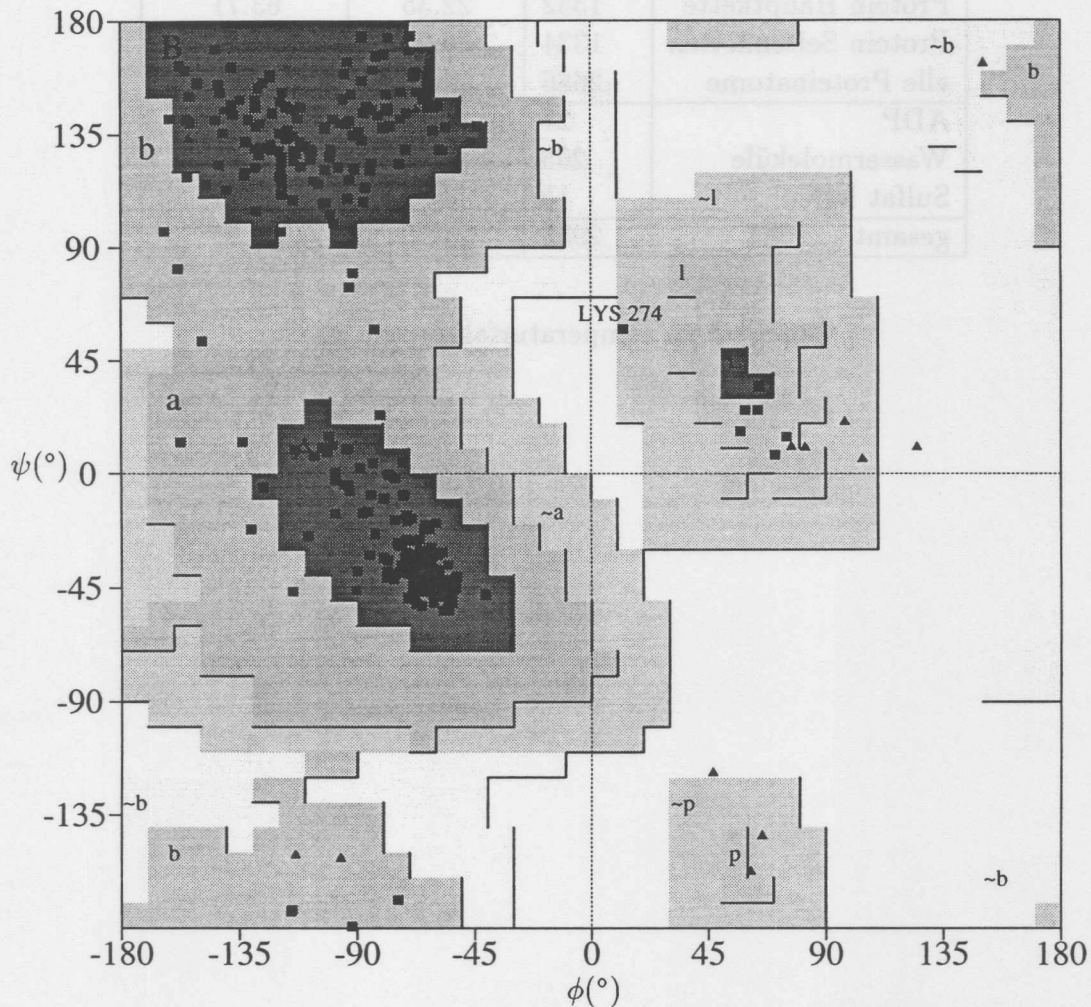


Abbildung 3.14: Ramachandran-Plot des Kinesin-Monomers (PDB-Code: 2kin). Rot dargestellt sind *bevorzugte Regionen*, gelb *erlaubte Bereiche*, und blaßgelb *zusätzlich-erlaubte Bereiche*. Reste im weißen Bereich sind stereochemisch verboten und deuten auf größere Probleme im Modell hin.

In der Region [a] und [~a] sind die Aminosäuren in α -Helices und in Region [b] und [~b] in β -Strängen. [p] und [l] kennzeichnen darüberhinaus erlaubte Schlaufen-Bereiche. Mit einem [] sind Nicht-Prolin-Reste markiert. Glycin-Reste werden durch ein \blacktriangle dargestellt.

Die Temperaturfaktorverteilung des Kinesin-Monomers-Modells ist in Tab. 3.2 dargestellt. Die Temperaturfaktoren sind mit 22 bzw. 23 Å² für eine bei einer Auflösung von 2.0 Å gelöste Struktur im Mittel recht gut. Allerdings gibt es Bereiche mit deutlich höheren B-Faktoren. Dies sind auch die in der Elektronendichte schlecht definierten Bereiche insbesondere Loop L12 (Aminosäuren 273-276), α0 (19-25) und Loop L2 zwischen β1b und β1c (42-46).

Atome in	Anzahl	Temperaturfaktor B (Å ²)	
		Mittelwert	Maximum
Protein Hauptkette	1352	22.35	63.71
Protein Seitenketten	1334	26.27	69.48
alle Proteinatome	2686	24.30	69.48
ADP	27	35.11	47.04
Wassermoleküle	205	31.15	99.05
Sulfat Ionen	15	43.92	53.81
gesamt	2933	24.98	99.05

Tabelle 3.2: Temperaturfaktoren Kinesin

3.1.4 Beschreibung der Struktur des Kinesin-Monomers

3.1.4.1 Übersicht und Topologie

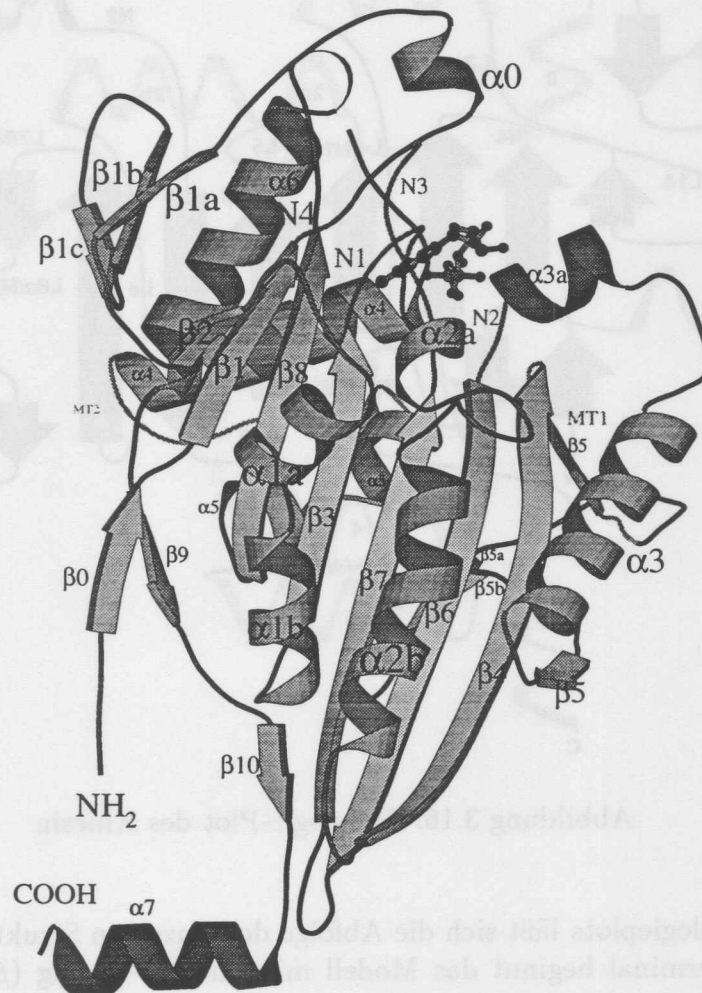


Abbildung 3.15: Cartoonplot des Kinesin Strukturmodells. Erläuterungen siehe Text.

Das Strukturmodell des Kinesin (Abb. 3.15) läßt sich in verschiedene Bereiche einteilen. Es besteht aus einem zentralen β -Faltblatt mit acht β -Strängen, die zum Teil parallel zum Teil antiparallel gepaart sind. Die Abfolge der Stränge ist $\beta 2 \rightarrow \beta 1 \rightarrow \beta 8 \rightarrow \beta 3/\beta 10 \rightarrow \beta 7 \rightarrow \beta 6 \rightarrow \beta 4 \rightarrow \beta 5$. Die Numerierung gibt dabei die Reihenfolge in der Aminosäuresequenz an. Zusätzlich gibt es drei weitere kleinere jeweils antiparallele β -Faltblätter aus zwei bzw. drei β -Strängen an den Seiten des zentralen β -Faltblatts. Dieses wird auf seiner Vorder- und Rückseite jeweils von drei α -Helices flankiert (vorn: $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$, hinten: $\alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$). Unten bildet die „Halshelix“ $\alpha 7$ den Abschluß.

Ein schematischer Topologie-Plot des Kinesin ist in Abb. 3.16 dargestellt. In diesem sind (in Analogie zum Strukturmodell in Abb. 3.15) α -Helices in orange und β -Faltblätter in blau

dargestellt. Zusätzlich sind die durch DNA-Sequenzvergleiche von Yang et al. (1989) und gezielte Alanin-Mutagenese von Woehlke et al. (1997) bestimmten Mikrotubuli-Bindungsregionen grün und die Nukleotid-Bindungsregionen violett gefärbt. Die C-terminale Hals-Helix $\alpha 7$ ist zur besseren Verdeutlichung rot hervorgehoben.

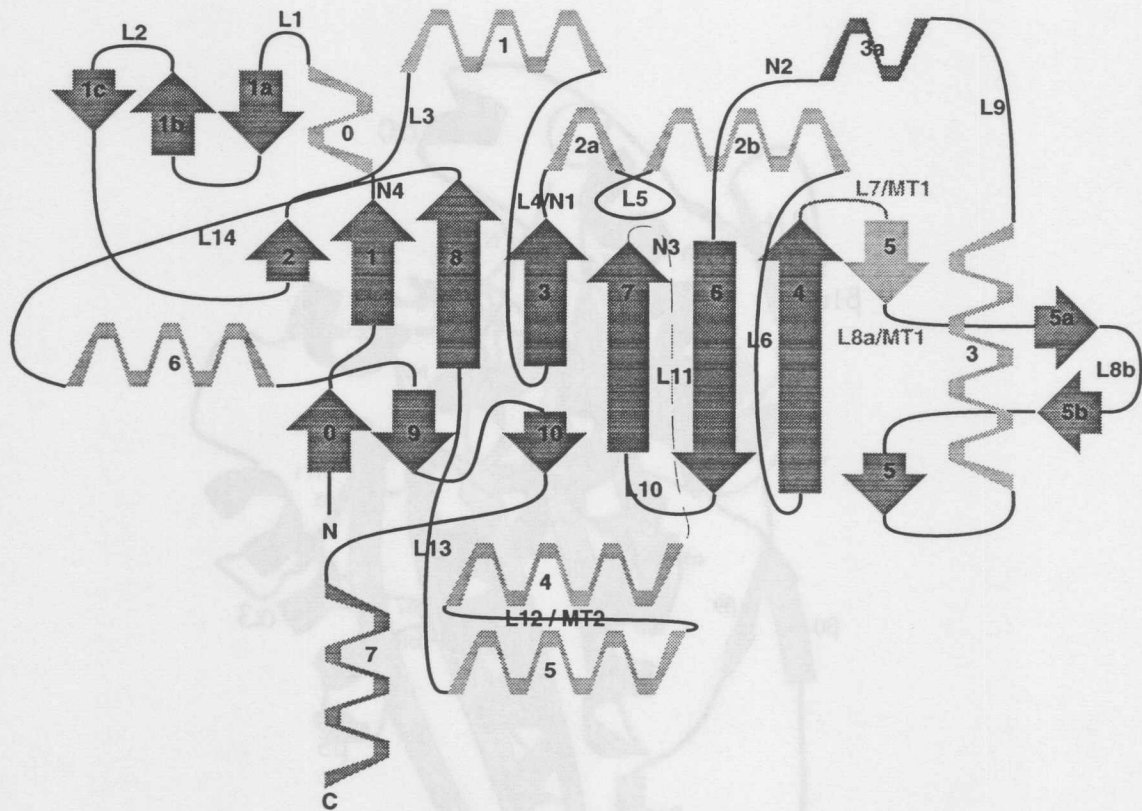


Abbildung 3.16: Topologie-Plot des Kinesin

Anhand des Topologieplots läßt sich die Abfolge der einzelnen Strukturelemente im Kinesin verdeutlichen. N-terminal beginnt das Modell mit einem β -Strang ($\beta 0$)⁷, der zu einem der kleineren β -Faltblätter gehört. Es folgt $\beta 1$ aus dem zentralen β -Faltblatt, an das sich ein Einschub bestehend aus $\alpha 0$ ⁷ und dem β -Faltblatt $\beta 1a-c$ anschließt.

Gefolgt wird dieser Bereich von dem äußersten Strang $\beta 2$ des zentralen β -Faltblatts, an den sich die Helix $\alpha 1$ anschließt, die sich aufteilt in $\alpha 1a$ und $\alpha 1b$ mit einer Knickstelle bei Cys65. Der folgende, mittig im zentralen β -Faltblatt gelegene, Strang $\beta 3$ mündet an seinem Ende in den phosphatbindenden Loop (P-Loop), der von Helix $\alpha 2$ gefolgt wird. Diese hat als Besonderheit einen Loop L5 genannten Einschub von 9 Resten. Es folgen die antiparallel angeordneten $\beta 4$ und der obere Teil von $\beta 5$, bevor das kleine antiparallele β -Faltblatt $\beta 5a-b$ an der hinteren Seite des Moleküls eingeschoben wird. Der zweite Teil von $\beta 5$ und die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 3a$ komplettieren dann den vorderen Teil des Moleküls.

⁷Die Numerierung beginnend mit $\beta 0$ bzw. $\alpha 0$ für die Strukturelemente ist ungewöhnlich und nur deshalb so gewählt worden, um in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Kull et al. (1996) und Sablin et al. (1996) (s. Abschn. 3.2.1) zu bleiben, deren Modelle jeweils erst mit $\beta 1$ begonnen und keine $\alpha 0$ aufwiesen oder bezeichneten.

Die beiden längsten β -Stränge $\beta 6$ (13 Reste) und $\beta 7$ (12 Reste) folgen in antiparalleler Anordnung, bevor ein ungeordneter - und daher im vorliegenden Modell nicht eingebauter - Bereich folgt: Loop L11. An Loop L11 schließt sich der größte Teil der für die Mikrotubuli-Bindung (s. Abschn. 3.1.4.4) verantwortlichen Region an: Helix $\alpha 4$, Loop L12 und Helix $\alpha 5$. β -Strang $\beta 8$ und α -Helix $\alpha 6$ bilden dann das Ende des Kopfes.

Die daran anschließenden Elemente $\beta 9$ und $\beta 10$ fügen sich in ein kleines Faltblatt ($\beta 0$, $\beta 9$ ($\uparrow\downarrow$)) ein oder sind in das zentrale Faltblatt ($\beta 10$) integriert.

Völlig außerhalb der Motordomäne folgt schließlich der Beginn der Halshelix $\alpha 7$ (rot in Abb. 3.15 und 3.15), die für die Dimerisierung der Kinesin-Köpfe verantwortlich ist.

3.1.4.2 Wasserstoffbrückenbindungsschema

In Abb. 3.17 ist das Schema der Wasserstoffbrücken im Kinesin dargestellt (erzeugt mit dem von Hutchinson und Thornton (1996) geschriebenen Programm PROMOTIF). Dabei ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Amino- und der Carbonylgruppe der beteiligten Aminosäuren durch einen Pfeil gekennzeichnet: $\text{NH} \rightarrow \text{O}=\text{C}$. Reste, die in eine β -Faltblattstruktur eingebettet sind erscheinen in Kästen (z.B. 130 H), solche in α -Helices in Ellipsen (z.B. 185 D).

Man erkennt in dieser schematischen Darstellung deutlich die vier β -Faltblätter und sechs α -Helices. Die Zuordnung der α -Helices ist in dieser Abbildung jedoch nicht bezogen auf Vorder- oder Rückseite der Struktur zu verstehen, sondern verläuft rein nach geometrischen Überlegungen des Programms zur Platzoptimierung.

Neben den für die Sekundärstruktur erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen sind einige wenige zusätzliche Verbindungsmerkmale zu erkennen. Die meisten davon sind nicht ideale Verbindungen am Anfang und Ende von α -Helices oder zwischen β -Strängen bzw. Gebiete unmittelbar davor und dahinter. Drei der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen sind jedoch für die Beschreibung der Struktur interessant und sollen hier etwas näher beschrieben werden.

- Die erste Wasserstoffbrücke verläuft zwischen (Gly235 NH \cdots O=C Ser203). Sie verbindet die sogenannten Switch-Bereiche I und II. Auf diese Wasserstoffbrückenbindung und die Switch-Bereiche wird im Abschnitt 3.1.4.7 eingegangen.
- Die zweite Wasserstoffbrücke verbindet Ile30 NH \cdots O=C Pro306 und stellt eine (lose) Verbindung zwischen dem β -Faltblatt $\beta 1a-c$ (von Sablin et al. (1996) „kleiner Lappen“ genannt), und dem zentralen β -Faltblatt am Ende von $\beta 8$ her.
- Eine weitere Verbindung zwischen dem kleinen Lappen und dem zentralen β -Faltblatt stellt die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Val52 NH \cdots O=C Glu36 dar. Diese verbindet den kleinen Strang $\beta 2$ mit dem Übergang von $\beta 1a$ zu $\beta 1b$. Damit kann man den kleinen Lappen quasi als eine *Ausweitung des zentralen β -Faltblatts* interpretieren.

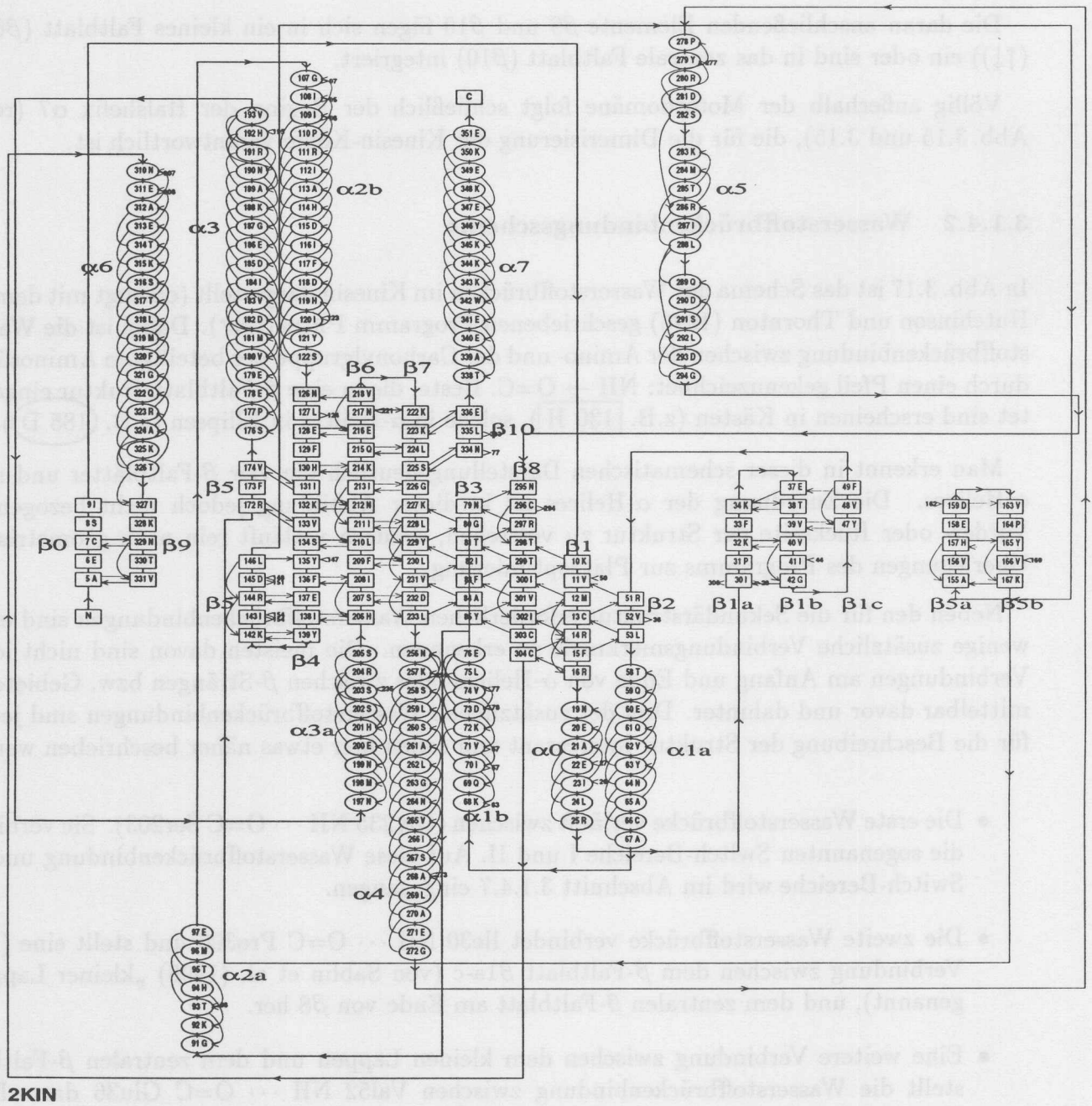


Abbildung 3.17: Wasserstoffbrückenbindungsschema des Kinesins

3.1.4.3 Nukleotidbindungsstelle

In Abb. 3.18 ist die Nukleotidbindungsstelle des Kinesins mit den Interaktionen gezeigt. Erzeugt wurde Abb. 3.18 mit dem Programm LIGPLOT von Wallace et al. (1995). In dieser Graphik sind neben dem gebundenen ADP auch die Wechselwirkungen eingezeichnet, die das ADP-Molekül mit dem Kinesin und den es umgebenden Wassermolekülen eingeht. Als gestrichelte blaue Linien sind Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Abstand der beteiligten Nicht-Wasserstoffatome gezeigt (--- 3.00 ---). In Form eines 90°-Bogens mit aufgesetzten Strahlen sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Atomgruppen dargestellt.

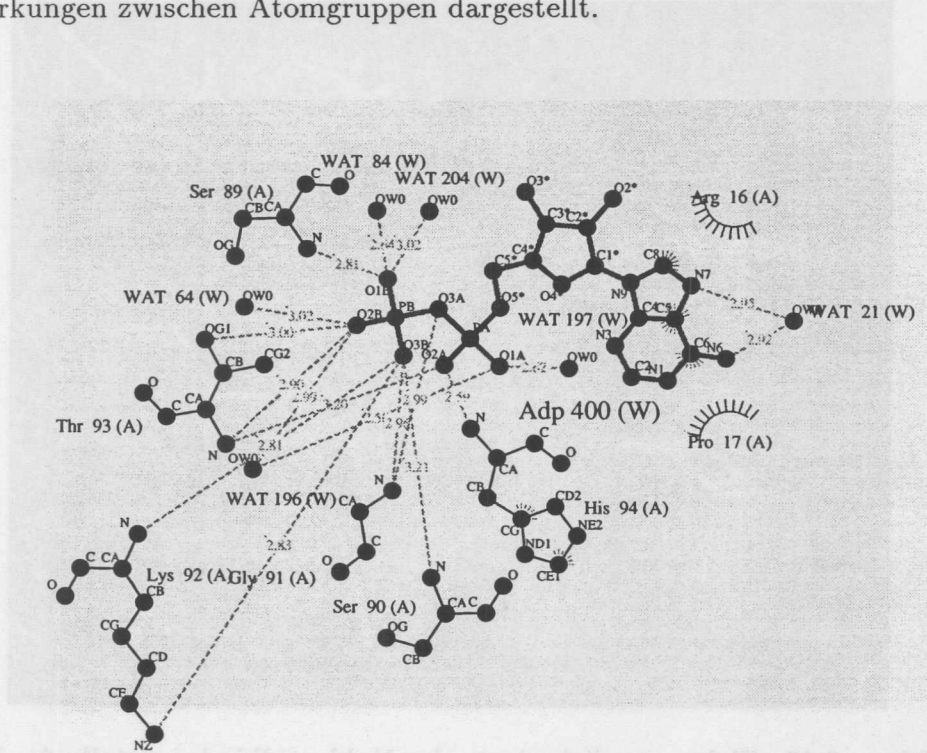


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Nukleotidbindungsstelle des Kinesins mit Wechselwirkungen zwischen ADP, Kinesin und Wassermolekülen (s. Text).

Man erkennt, daß verschiedene Bereiche des Moleküls zur Bindung des Nukleotids beitragen:

1. das β -Phosphat wird durch Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenketten der Reste Thr93 und Lys92 sowie durch Wasserstoffbrücken zu Hauptkettenatomen der Reste Ser89, Ser90, Lys92 und T93 stabilisiert. Dazu kommen noch einige gebundene Wassermoleküle.
2. Das α -Phosphat wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Hauptkettenatomen der Reste Gly91 und His94 gebunden.
3. Die Ribose ist weder an Wasserstoffbrückenbindungen noch an hydrophoben Interaktionen beteiligt, sie ist auch der vom gesamten ADP-Molekül am schlechtesten definierte Teil.

- Die Base wird ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen an ihrem Platz gehalten. Diese gehen aus von den aliphatischen Bereichen der Seitenkette des Arg16 und vom Pro17 auf der einen Seite sowie vom His94 auf der anderen Seite der Bindungstasche.

Die Elektronendichtekarte ($2F_o - F_c$) berechnet mit den Phasen des verfeinerten Modells im Bereich der Nukleotidbindung ist in Abb. 3.19 dargestellt. Man erkennt deutlich die Position des Nukleotids. Ein mehr schematischer Cartoon-Plot ist in Abb. 3.24 auf Seite 59 zu sehen.

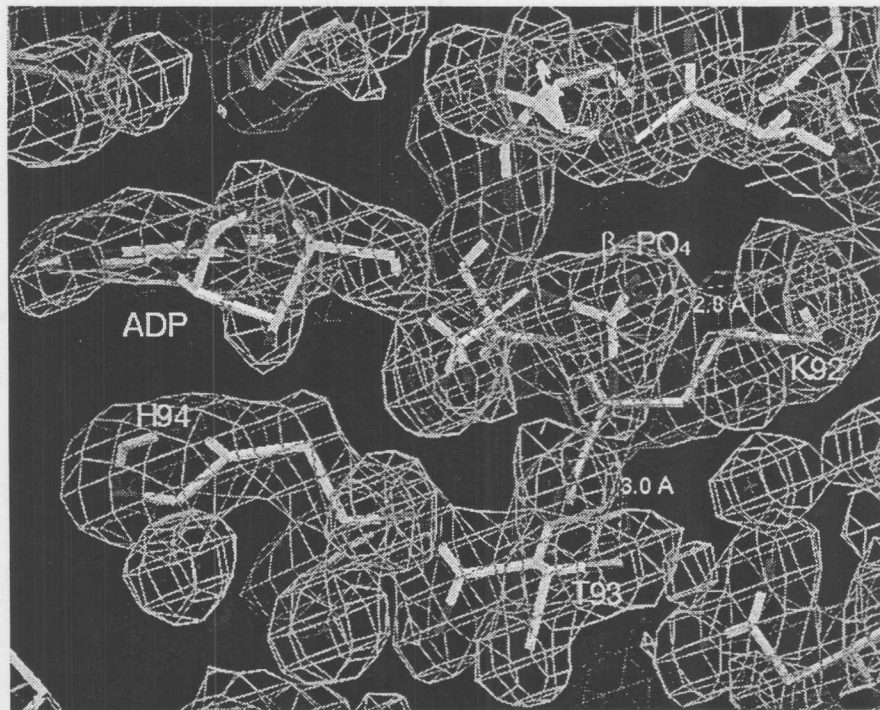


Abbildung 3.19: Elektronendichtekarte der Nukleotidbindungsstelle des Kinesin

Die Nukleotid-Bindungsstelle ist auch in Abb. 3.20 (links) dargestellt. Man erkennt im oberen Teil des Bildes die Bindungstasche des Kinesins in der als Stäbchenmodell das ADP-Molekül eingefügt ist.

3.1.4.4 Ladungsverteilung und Mikrotubuli-Bindungsregion

Die Bindungsstelle von Kinesin auf Mikrotubuli wurde von Yang et al. (1989) mittels DNA-Sequenzvergleich und Bindungsstudien vorhergesagt. Kürzlich konnte von Woehlke et al. (1997) mittels gezielter Alanin-Mutagenese an menschlichem Kinesin diese Vorhersagen bestätigt und damit die Mikrotubuli-Bindungsregion bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß die für die Bindung am Tubulin wichtigen Reste in den Bereichen $\alpha 4$, Loop L12 sowie $\alpha 5$ zu finden sind. Ein besonders wichtiger Rest ist dabei Arg280, der zu Alanin mutiert einen 15mal geringeren Mikrotubuli induzierten ADP-Umsatz zeigt.

Abb. 3.20 zeigt die Oberfläche des Kinesins mit ihrem elektrostatischen Potential⁸. Dabei

⁸Für die Berechnung des elektrostatischen Potentials s. Abschn. 2.8.5.2 auf Seite 28.

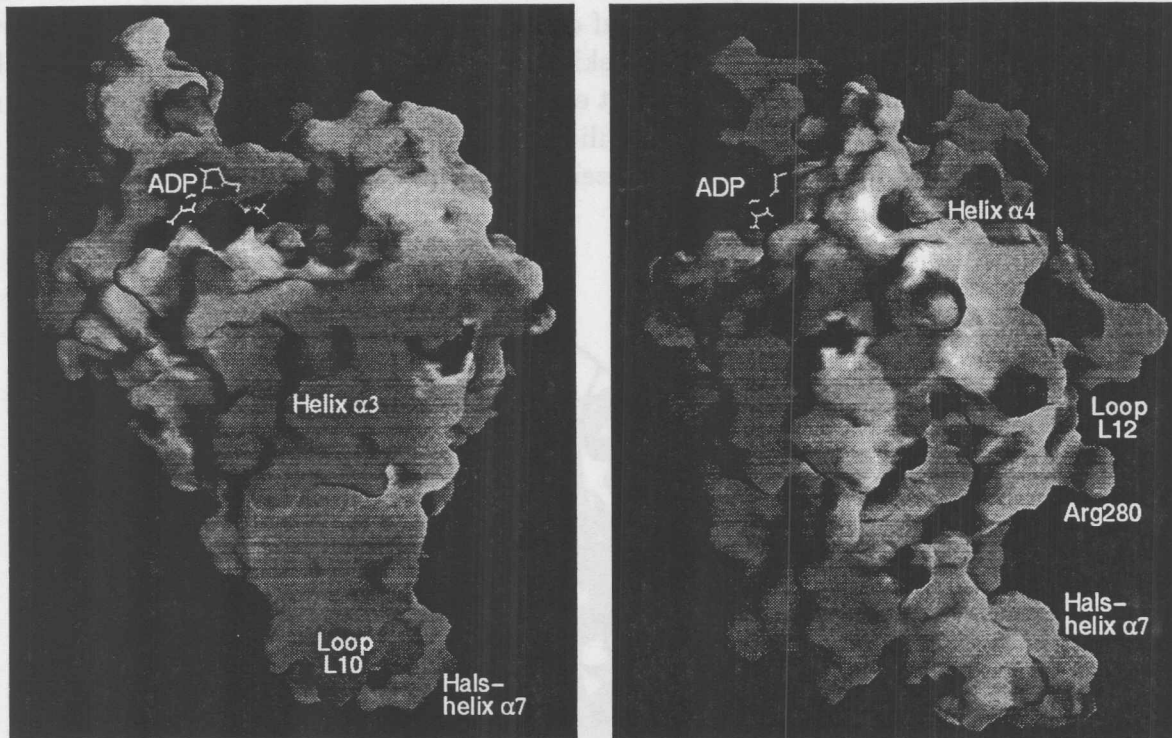


Abbildung 3.20: Elektrostatisches Potential an der Oberfläche des KinesinMoleküls erzeugt mit GRASP (Nicholls et al. 1991; 1993).

bedeutet in diesem rein qualitativen Bild rot ein negatives Potential und blau einen Bereich positiven Potentials. In Abb. 3.20 links ist der Blick entlang des zentralen β -Faltblatts dargestellt. Dieser Bereich ist stark negativ geladen. Da auch die C-terminale Kinesin-Bindungsdomäne des Tubulin negativ geladen ist, kommt dieser Bereich für eine Bindung an Mikrotubuli nicht in Betracht. Anders ist dies bei der in Abb. 3.20 rechts dargestellten etwa 70° um die senkrechte Achse gedrehten Darstellung. Hier erkennt man positiv geladene Bereiche darunter auch das besonders hervorstechende Arg280. Die röntgenstrukturell erhaltenen Aussagen decken sich damit sehr gut mit den auf molekularbiologischem Wege gewonnenen (Woehlke et al. 1997).

Allerdings ist die Beschreibung und Eingrenzung der Mikrotubuli-Bindungsstelle ohne die Kenntnis der Tubulin-Struktur trotz der hier beschriebenen Hinweise noch recht spekulativ. Diese wird in nächster Zeit (Nogales et al. 1998) zur Verfügung stehen. Hat man beide Moleküle zur Hand, kann mit Modellierungen der Oberflächen versucht werden, die Bindungsart zu verstehen. Eine endgültige Klärung der Details wird aber erst mit einer Co-Kristallisation von Tubulin- und Kinesin-Fragmenten möglich sein. Erst dann lassen sich auf molekularer Ebene sichere Aussagen machen. Arbeiten dazu sind in unserem Labor angelaufen.

3.1.4.5 Direktionalitäts-Bereich

Wie von Case et al. (1997), Vale und Fletterick (1997) sowie Henningsen und Schliwa (1997) gezeigt werden konnte, sind bestimmte Reste für die Bewegungsrichtung der Motorproteine von besonderer Bedeutung (s. Tab.3.3). Diese liegen im Übergangsbereich vom Kopf zum C-

bzw. N-terminalen *coiled-coil* Bereich⁹. Damit ist auch nicht verwunderlich, warum Motoren, die sich in unterschiedlichen Richtungen auf dem Mikrotubulus bewegen, eine gleiche Struktur aufweisen. Außer dem hier und in Kozielski et al. (1997a), Kozielski (1997) und Sack et al. (1997) beschriebenen Kinesin aus Ratte gibt es bislang noch keine Motorprotein-Strukturen, die diesen Bereich einschließen. Weder menschliches Kinesin (Kull et al. 1996), noch *ncd* (Sablin et al. 1996) und Kar3 (Gulick et al. 1998) zeigen diesen Bereich.

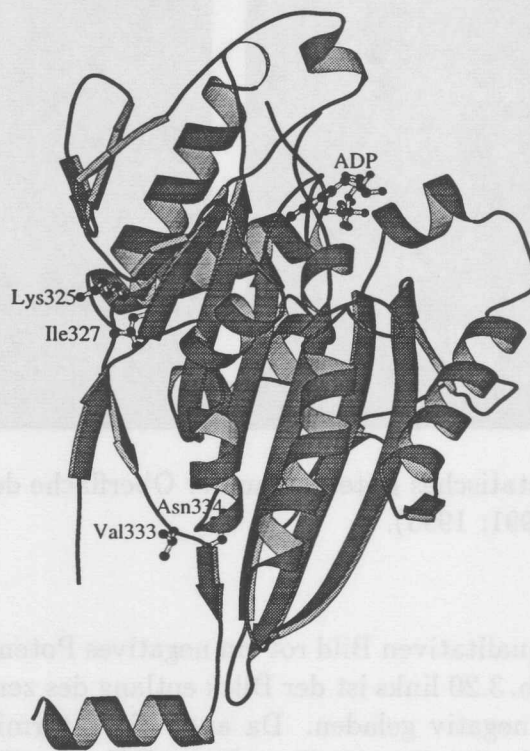


Abbildung 3.21: Lage der konservierten richtungsbestimmenden Reste im Kinesin. Die in Tab. 3.3 rot hervorgehobenen Aminosäuren sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Zusätzlich ist zur besseren Orientierung das Nukleotid ebenfalls eingezeichnet.

In Kürze wird die Struktur des dimeren *ncd* zur Verfügung stehen (Sablin et al. 1998) und damit eine weitere Struktur, die eine *coiled-coil* α -Helix als Dimerisierungsdomäne umfaßt. Damit sind auch die aus den Mutationsexperimenten und Sequenzvergleichen von Case et al. (1997) bestimmten konservierten Reste für Kinesin und *ncd* Sekundärstrukturmerkmalen zuzuordnen (s. Tab. 3.3). In Plusmotoren (C-terminalen Motoren) befindet sich dieser Bereich hinter Helix α_6 , in Minusmotoren (N-terminalen Motoren) vor dem Strang β_1 .

Die Lage der Reste ist dabei sehr interessant (Abb.3.21). Im Falle des Ratten-Kinesins sind die entsprechenden Reste Lys325 (α_6), Ile327 (β_9), Val333 und Asn334 (β_{10}). Die Reste befinden sich am Ende von α_6 (Lys325, Ile327) bzw. am Anfang von β_{10} (Val333, Asn334).

⁹Unter einer *coiled-coil*-Helix versteht man zwei umeinander gewundene α -Helices, die über hydrophobe Wechselwirkungen an den Kontaktstellen stabilisiert werden. *Coiled-coil*-Helices bilden die Stab- oder Dimerisierungsdomäne des Kinesins (s. Abb.1.4).

Plusmotoren			Minusmotoren		
Kinesin	$\beta 1 - \alpha 6$	KtIkntvsVNlelta	<i>ncd</i>	meRKeLHNtvmDLrG	$\beta 1 - \alpha 6$
Eg5	$\beta 1 - \alpha 6$	KnImnkpeVNqkltk	Kar3	tvRRtLHNelqELrG	$\beta 1 - \alpha 6$
KRP85	$\beta 1 - \alpha 6$	KnIkntvcVNedpkd	CHO2A	meRRrLHNqlqELkG	$\beta 1 - \alpha 6$

Tabelle 3.3: Konservierte Reste im richtungsbestimmenden Bereich von Motorproteinen (Case et al. 1997). Bei Plusmotoren folgt der die Richtung bestimmende Teil auf die Kopfdomäne $\beta 1 - \alpha 6$. In Minusmotoren liegt er vor der Kopfdomäne in einem Bereich der beim Kinesin $\beta 0$ entspricht. Die Numerierung der Reste oberhalb von Kinesin bezieht sich auf das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kinesin aus Rattenhirn.

Bemerkenswert ist dabei u.a. der Rest Asn334. Vergleicht man nämlich die Strukturen von monomerem und dimerem Kinesin, so stellt Asn334 diejenige Stelle dar, an der sich die Richtungen der C-terminalen $\alpha 7$ und des davorliegenden Übergangsbereichs zwischen der Kopf- und der Halsregion ändern. Während sich die C α -Positionen der Dimer- und der Monomer-Strukturen zwischen Rest 2 und Rest 334 mit einem r.m.s.-Wert von 0.71 Å überlagern lassen, ändert sich hier die Konformation sehr stark (Abb.3.22)¹⁰.

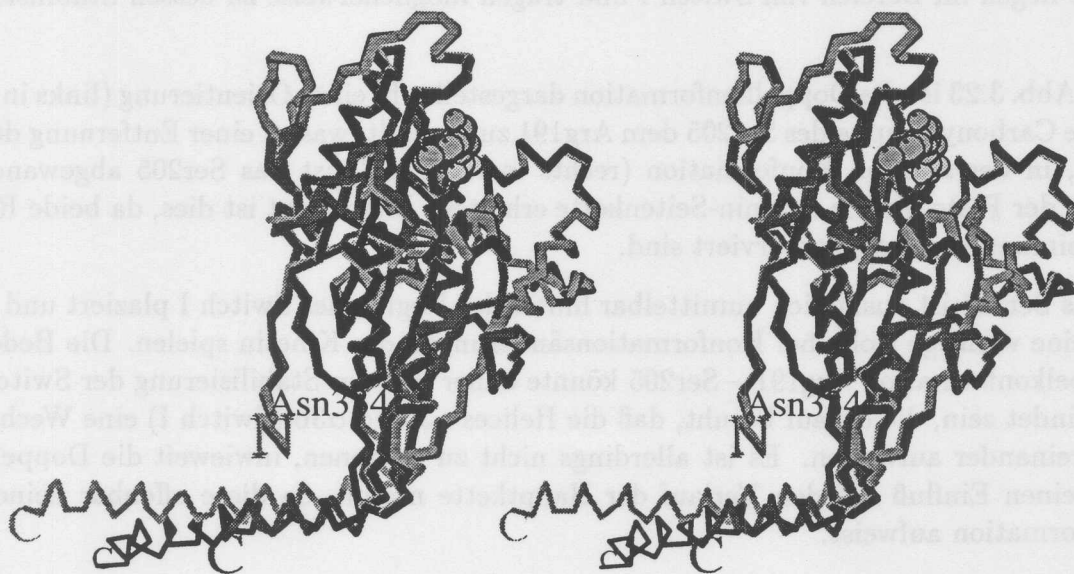


Abbildung 3.22: Stereo-Bild der Überlagerung der Kopfdomänen von monomerem (grün) und dimerem Kinesin (rot und blau).

¹⁰Zur Betrachtung von Stereobildern siehe Fußnote 1 auf Seite 31.

3.1.4.6 Doppelkonformation Ser205 – Arg191

Eine Doppelkonformation tritt in der Struktur des monomeren Kinesins an der Stelle Ser205 – Arg191 auf. Diese ist in der Elektronendichtekarte erscheint dieser Bereich deshalb als eine Region mit zwei Konformationszuständen.

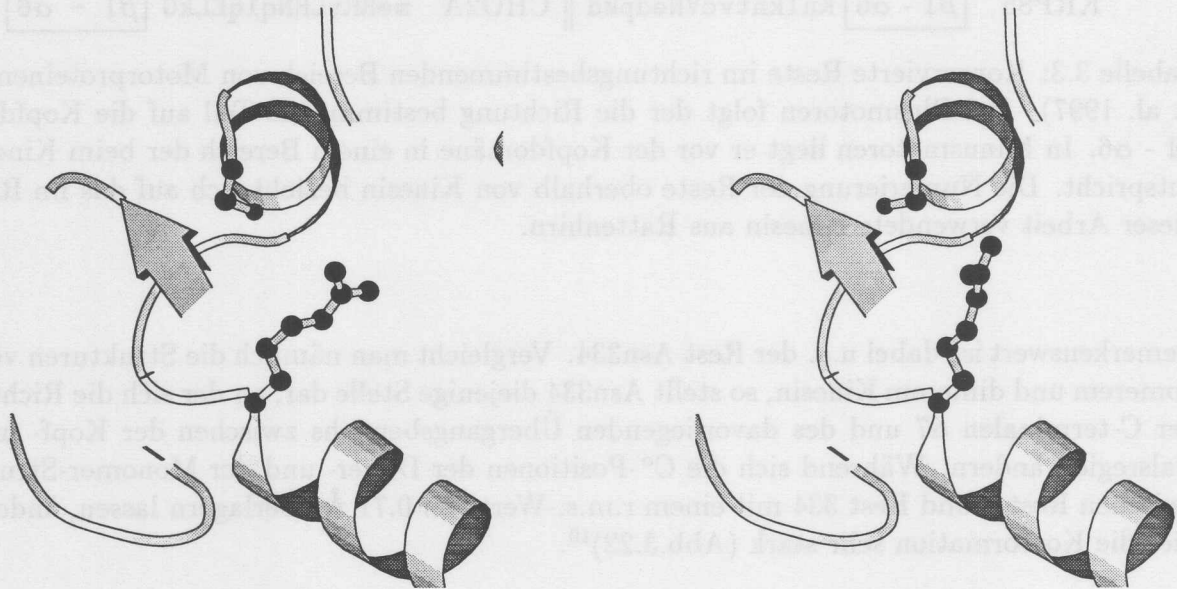


Abbildung 3.23: Doppelkonformation der Aminosäurereste Ser205 und Arg191. Diese beiden Reste liegen im Bereich von Switch I und tragen möglicherweise zu dessen Stabilisierung bei.

In Abb. 3.23 ist die Doppelkonformation dargestellt. In einer Orientierung (links in Abb. 3.23) ist die Carbonylgruppe des Ser205 dem Arg191 zugewandt, was zu einer Entfernung des Arginins führt, in der zweiten Konformation (rechts in Abb. 3.23) ist das Ser205 abgewandt. Damit bleibt der Platz für die Arginin-Seitenkette erhalten. Interessant ist dies, da beide Reste in der Kinesinfamilie streng konserviert sind.

Das Ser205 ist zusätzlich unmittelbar hinter der Region des Switch I plaziert und könnte somit eine wichtige Rolle bei Konformationsänderungen des Kinesin spielen. Die Bedeutung der Doppelkonformation Arg191 – Ser205 könnte daher in einer Stabilisierung der Switch I-Region begründet sein, die darauf beruht, daß die Helices α_3 und α_{3b} (Switch I) eine Wechselwirkung untereinander aufweisen. Es ist allerdings nicht zu erkennen, inwieweit die Doppelkonformation einen Einfluß auf den Verlauf der Hauptkette nimmt, da diese offenbar keine zweifache Konformation aufweist.

3.1.4.7 Verbindung zwischen den Schalterregionen Switch I und Switch II

Eine weitere interessante Stelle befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft. Es ist dies die Salzbrücke zwischen Arg204 und Glu237. Diese ist deshalb u.U. von großer Bedeutung, da sie die beiden Schalterregionen Switch I und Switch II miteinander verbindet. Allerdings ist zur Bewertung dieser Tatsache die Kenntnis anderer Nukleotidzustände unerlässlich, da man nur so mögliche Konformationsänderungen bestimmen kann.

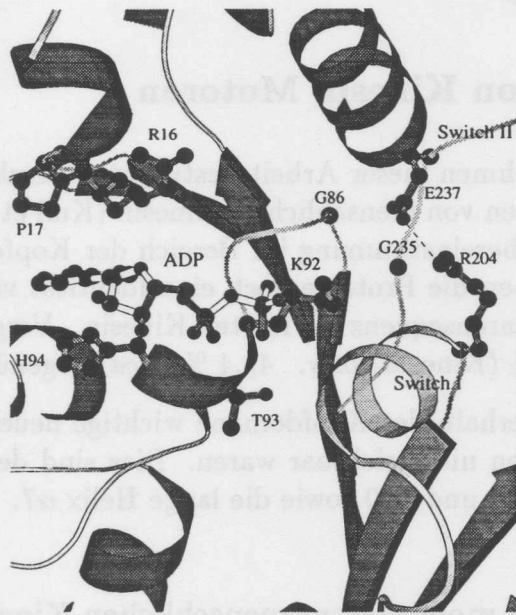


Abbildung 3.24: Verbindungen zwischen Switch I und Switch II im Kinesin. Die Salzbrücke zwischen Glu237 und Arg204 verbindet die beiden Schalterregionen. Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly235 und Ser203 (hier nicht dargestellt s. Abb.3.17).

Eine zusätzliche, jedoch schwächere, Wechselwirkung zwischen Switch I und Switch II bildet die bereits in Abschn. 3.1.4.2 erwähnte Wasserstoffbrücke zwischen (Gly235 NH ... O=C Ser203) (s. Abb. 3.17). Diese ist allerdings möglicherweise für die ungewöhnliche Anordnung von Gly235 im Switch II verantwortlich, die eine geschlossene Konformation hervorruft (s. Abschn. 3.2.2.3). Auf die Besonderheiten der Regionen Switch I und II im Kinesin wird in Zusammenhang mit dem Vergleich des Kinesin mit G-Proteinen und Myosin noch ausführlich eingegangen (s. Abschn. 3.2.2).

3.2 Diskussion

3.2.1 Vergleich von Kinesin Motoren

Ein Vergleich, der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Struktur von Ratten-Kinesin (PDB-Code: 2kin) mit denjenigen von menschlichem Kinesin (Kull et al. 1996) und *ncd* (Sablin et al. 1996) zeigt eine große Übereinstimmung im Bereich der Kopfdomäne ($\beta 1$ - $\alpha 6$). Dies ist nicht weiter überraschend, haben die Proteine doch eine Identität von 87.3 % (Kinesin) bzw. 36.4 % (*ncd*) in der Aminosäuresequenz zu Ratten-Kinesin. Vergleicht man die Homologien, so betragen sie sogar 91.5 % (Kinesin) bzw. 49.4 % (*ncd*) gegenüber 2kin.

Es sind allerdings außerhalb der Kopfdomäne wichtige neue Elemente hinzugekommen, die in den anderen Strukturen nicht sichtbar waren. Dies sind der N-terminale β -Strang $\beta 0$, die C-terminalen β -Stränge $\beta 9$ und $\beta 10$ sowie die lange Helix $\alpha 7$.

3.2.1.1 Vergleich mit monomerem menschlichen Kinesin

Die Struktur von menschlichen Kinesin im monomeren Zustand wurde von Kull et al. (1996) bestimmt. Dazu wurde ein Konstrukt verwendet, das aus den Aminosäuren 1-349 bestand. Die beiden Strukturen¹¹ wurden überlagert. Dabei zeigte sich, daß diese, wenn man die C^α -Positionen von 286 Resten mit der Methode der kleinsten Quadrate überlagert, eine mittlere Abweichung von nur 1.439 Å aufweisen. Diese wird noch geringer, wenn man nur die beiden Bereiche N-terminal von Loop11 vergleicht. Dann sind 225 C^α -Positionen im Mittel nur 1.090 Å voneinander entfernt. Legt man die letzte Überlagerung zugrunde, so erkennt man, daß die Strukturen bis auf die Mikrotubuli-Bindungsstelle völlig übereinstimmen. Auch diese überlagert gut ($\alpha 4$ Reste 258-272: rms 0.217 Å), ist aber gegenüber dem überlagerten Modell um etwa 5 -7.5 Å verschoben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß es sich bei dieser Region tatsächlich um die Mikrotubulus-Bindungsstelle handelt, die vermutlich eine gewisse Flexibilität gegenüber dem Rest des Moleküls besitzen muß.

Am C-Terminus und N-Terminus ist das Modell von Rattenkinesin allerdings erheblich vollständiger. Obwohl beide Strukturen fast genau die gleiche Primärsequenz umfassen (Rattenkinesin: Reste 2-354, menschliches Kinesin: 1-349), fehlen neben dem im Rattenkinesin ebenfalls nicht sichtbaren Loop L11 in menschlichem Kinesin¹² zusätzlich noch C-terminal die Reste 324-349. Dies liegt offenbar an fehlender Ordnung im Kristall.

Am N-Terminus ist ein zusätzlicher β -Strang im Rattenkinesin vorhanden ($\beta 0$)¹³. C-terminale zusätzliche Elemente sind beim Rattenkinesin die β -Stränge $\beta 9$, der mit $\beta 0$ ein zusätzliches antiparalleles Faltblatt bildet und $\beta 10$, das sich in das zentrale Faltblatt eingliedert. Neu ist insbesondere die C-terminale α -Helix $\alpha 7$. Diese ist auch das markanteste neue Element der Rattenkinesinstruktur. Die Strukturen von Kinesin aus Rattenhirn sowie menschliches Kinesin sind in Abb. 3.25 in rot (Ratte) bzw. in grün (Mensch) dargestellt, zusätzlich ist noch *ncd*, auf

¹¹Die Struktur des menschlichen Kinesins ist noch nicht in der PDB deponiert kann aber unter <http://util.ucsf.edu/people/kull/kin.pdb.html> über das Internet abgerufen werden.

¹²Allerdings wird eine mögliche Position von L11 in Kull et al. (1996) angegeben, die sich auch in Abb. 3.25 auf Seite 61 findet.

¹³s. Fußnote 7 auf Seite 50.

das im nächsten Absatz eingangen wird, in blau eingezeichnet. Die beiden Strukturen sind jeweils der des Rattenkinesins überlagert.

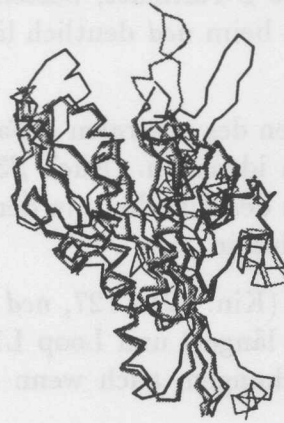


Abbildung 3.25: Vergleich der Struktur von Kinesin (Ratte, Mensch) und *ncd*. Die im Ratten-Kinesin zusätzlich sichtbare Helix $\alpha 7$ befindet sich unten rechts und verläuft in die Bildebene hinein.

Die Abwesenheit dieser Elemente in menschlichem Kinesin wirft allerdings die Frage auf, warum diese Elemente nicht ansatzweise zu erkennen sind, wenn beide Kristalle auf Protein im ADP-Zustand und praktisch dergleichen Länge beruhen. Man kann hier nur mutmaßen, daß unter den verschiedenen Kristallisationsbedingungen diese Bereiche weniger gut geordnet sind. Eine andere Erklärung wäre, daß die beiden Strukturen Artefakte der Kristallkontakte sind. Dies kann man jedoch ausschließen, da auch die Struktur des dimeren Kinesin (Kozielski 1997) die gleichen Merkmale in völlig anderer Packung zeigt.

3.2.1.2 Vergleich mit *ncd* aus *Drosophila melanogaster*

Beim *ncd* befindet sich im Gegensatz zum Kinesin die Motordomäne am C-Terminus. Entsprechend erfolgt die Bindung der beiden Köpfe daher auch nicht über eine C-terminale, sondern über eine N-terminal *coiled-coil* Wechselwirkung. Das von Sablin et al. (1996) benutzte Konstrukt enthielt die Aminosäuren von Arg335 - Lys700. Im Strukturmodell sind aber nur die Aminosäuren von 347 - 667 enthalten. Die 12 N-terminalen sowie die 33 C-terminalen Aminosäuren waren weder in der Original MIR-Dichte-Karte noch in der verfeinerten Karte sichtbar (Sablin et al. 1996).

Bringt man die beiden Strukturen von Ratten-Kinesin und *ncd* mit einer Überlagerung durch die Methode der kleinsten Quadrate (Programm LSQMAN (Kleywegt 1996)) zur Deckung (s. Abb. 3.25, *ncd* blau, Ratten-Kinesin rot), so lassen sich leicht die korrespondierenden Aminosäurereste identifizieren. Bei einer Überlagerung von 228 C^α -Positionen ergab sich eine mittlere Abweichung von 1.64Å. Reduziert man auch hier auf den Bereich vor Loop L11, so sind es für 183 Reste sogar nur 1.20Å.

Die Überlagerung beginnt mit Ile9 Kinesin (entspricht Ile349 *ncd*) im Bereich des β -Faltblattstranges $\beta 1$ und geht bis zu Pro17 (=Pro357 *ncd*). Diese Region ist (s. Abschn. 3.1.4.3)

für die Wechselwirkung mit der Base des Nukleotids zuständig. Das bedeutet, daß auch beim *ncd* wie schon beim menschlichen Kinesin kein Bereich gefunden wird, der $\beta 0$ entsprechicht.

Während sich im Kinesin eine kurze α -Helix ($\alpha 0$) anschließt, folgt im *ncd* nur ein Loop. Das folgende antiparallele kleine β -Faltblatt, bestehend aus $\beta 1a-c$ ist in beiden Strukturen vorhanden. Nur der Loop L2 ist beim *ncd* deutlich länger (10 Aminosäuren zusätzlich) als im Kinesin.

In den nun folgenden Bereichen des zentralen β -Faltblatts ($\beta 2$) sowie der α -Helix ($\alpha 1$) sind die beiden Strukturen praktisch identisch. Auch $\beta 3$ sowie der P-Loop mit dem Beginn der Helix $\alpha 2a$ sind gleich. Die Länge des Einschubs in der Helix $\alpha 2$ ist allerdings beim *ncd* um drei Aminosäuren kürzer als beim Kinesin.

Auch im Bereich von Loop L6 (Kin: 121 - 127, *ncd* eine Aminosäure länger), Loop L8a (Kin: 147 - 151, *ncd* eine Aminosäure länger) und Loop L12 (Kin: 147 - 151, *ncd* eine Aminosäure kürzer) gibt es kleinere Abweichungen, auch wenn sich die Strukturen hier weiterhin stark ähneln.

Eine Helix, die der Helix $\alpha 3a$ im Kinesin (Reste 199-204, Switch I-Region) entspricht, gibt es im *ncd* nicht. Dort ist an dieser Stelle eine Loop-Region ohne helikale Anzeichen.

Der Bereich $\beta 6 - L10 - \beta 7$, ist in beiden Strukturen wieder praktisch gleich. Erst beim Beginn von Switch II (DLAGSE-Motiv) verändert sich die Richtung von $\beta 7$ im *ncd* und im Kinesin. Dies läßt auch Spekulationen offen, daß die beiden Konformationen von Loop L11 im *ncd* und im Kinesin anders sind. Im Kinesin ist der Loop L11 in beiden bekannten Strukturen^{14,15} ungeordnet. Die Extrapolation des noch in der Dichte des Kinesins sichtbaren Beginns (237-239) wie des ebenfalls sichtbaren Endes (252-255) von Loop L11 läßt allerdings eine andere Konformation erwarten als im *ncd*. Leider liegen bisher keine Daten vor, die diese Spekulation belegen oder entkräften könnten.

Die anschließenden Strukturelemente $\alpha 4$, Loop L12 sowie $\alpha 5$ sind wiederum in Kinesin und *ncd* vergleichbar. Allerdings ist dieser Bereich interessanterweise insgesamt wie beim menschlichen Kinesin räumlich verschoben. Die Verschiebung zwischen der hier beschriebenen Struktur und derjenigen aus Kull et al. (1996) beträgt bis zu 7.5Å, zu der *ncd*-Struktur aus Sablin et al. (1996) 6.5Å. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Bereich für die Mikrotubuli-Bindung von Kinesin verantwortlich ist (Woehlke et al. 1997). Deshalb ist eine Beweglichkeit dieser Stelle u.U. von Bedeutung für die Bindung am und Ablösung vom Mikrotubulus. Diese wird über den Nukleotidzustand des Kinesin/*ncd* gesteuert. Eine Änderung des Nukleotidzustandes könnte über das Öffnen oder Schließen des Bereichs um die Schalterregion Switch I und II erfolgen. Diese könnten über Loop L11 auf diese Mikrotubuli-Bindungsregion übertragen werden und somit die Bindung vom Kinesin auf dem Mikrotubulus regulieren. Auf diese Frage wird in Abschn. 3.2.2.6 noch ausführlicher eingegangen.

3.2.1.3 Vergleich der Nukleotidbindungsstelle

Kinesin und *ncd* weisen jeweils eine geschlossene Konformation der Nukleotidbindungsstelle auf (ausführlicher beschrieben in Abschn. 3.2.2.3). Mißt man die entsprechenden Abstände

¹⁴In der Struktur von KAR3 ist Loop11 ebenfalls ungeordnet. (Gulick et al. 1998)

¹⁵Zu Loop11 von menschlichem Kinesin siehe auch Fußnote 12 auf Seite 60

zwischen dem ersten Glycin des P-Loops und dem des DLAGSE-Motivs (Switch II), so erhält man 5.87 Å (2kin), 5.88 Å (Kull-Kinesin), 6.54 Å (*ncd*). Zusätzlich ist in allen drei Strukturen die Wasserstoffbrückenbindung zwischen (Gly235 NH \cdots O=C Ser203) bzw. zwischen den entsprechenden Aminosäurenresten vorhanden

Die Salzbrücken-Bindung zwischen Arg204 und Glu237 ist allerdings nur beim Rattenkinesin zu erkennen. In den beiden anderen monomeren Strukturen ist die Bindung nicht vorhanden. Obwohl die Glutaminsäure an der entsprechenden Stelle des Moleküls jeweils in einer nahezu identischen Orientierung vorliegt, ist das korrespondierende Arginin anders konformiert. Im Gegensatz zu der Spekulation von Kull et al. (1996) ist also auch in der ADP-Struktur des Rattenkinesin eine Salzbrücken-Bindung zwischen Arg204 und Glu237 möglich, und diese tritt damit nicht als charakteristisch nur im ATP- oder im Übergangszustand auf. Die von Kull et al. (1996) beobachtete Paarung Arg203–Glu199 (Numerierung nach Kull et al. (1996)) findet man dagegen in Rattenkinesin nicht.

3.2.1.4 Vergleich mit dimerem Kinesin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch Beiträge zur Aufklärung des dimeren Kinesin geleistet. Dieses ist ausführlich in Kozielski et al. (1997b) und Kozielski (1997) beschrieben. Aufgrund der längeren Sequenz ist dieses Protein-Konstrukt in der Lage, an der C-terminalen Helix $\alpha 7$ zu dimerisieren. Es bildet sich ein sogenannter Leucin-Zipper aus, in dem einander zugewandte hydrophobe Reste eine Stabilisierung die beiden Helices $\alpha 7$ zu einer gewundenen *coiled-coil*-Helix zusammenbinden. Zwei schematische Darstellungen des Kinesin-Dimers sind in Abb. 3.26 dargestellt (aus Kozielski et al. (1997b)). Die beiden Köpfe schließen einen Winkel von 120° ein (s. Abb. 3.26 (rechts)). Dies entspricht der bereits bei der Phasierung gefunden nicht-kristallographischen Symmetrie (Abschn. 3.1.1.5). Die Rotationsachse verläuft dabei nahezu in der Achse der *coiled-coil* Helix (Dreieck in Abb. 3.26 (rechts)). Man erkennt in der Abb. 3.26, daß eine gleichzeitige Bindung auf dem Mikrotubulus in dieser Orientierung nicht denkbar ist. Die Mikrotubulibindungsstellen (grüne Bereiche) sind unterschiedlich ausgerichtet. Es ist damit sehr wahrscheinlich, daß sich die Kristallstruktur des Kinesindimers und die Bindung auf dem Mikrotubulus unterscheiden.

Um sich dieser Frage zu nähern, wurden in unserem Labor in Zusammenarbeit mit A. Hoenger (ETH Zürich) in Eis eingebettete Mikrotubuli, die mit Kinesin periodisch „dekoriert“ wurden, elektronenmikroskopisch untersucht (Hoenger et al. 1998). Das Zusammenführen der kristallographisch und elektronenmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse liefert dabei erste Schritte zum Verständnis der Kinesin-Bindung auf dem Mikrotubulus und legt nahe, daß die in Abb. 3.26 gezeigte dimere Konformation des Kinesins im Kristall nicht den Zustand der Bindung auf dem Mikrotubulus wiedergibt. Dies ist nicht unbedingt überraschend, da durchaus eine Konformationsänderung des Kinesin-Dimers durch den Mikrotubulus erzeugt werden kann (*induced fit*) und der hier kristallisierte Nukleotidzustand (ADP in beiden Köpfen) kein stark gebundener Zustand auf dem Mikrotubulus ist.

Andere kürzlich in unserem Labor erhaltenen Ergebnisse (Thormählen et al. 1998) deuten außerdem daraufhin, daß das dimere Kinesin bei der Bindung auf den Mikrotubuli größere Konformationsänderung vollführt und sich die Köpfe dabei voneinander entfernen. Diese Öffnung könnte möglicherweise über ein „Entspiralisieren“ der *coiled-coil* Helix vermittelt werden. Um die Frage der Konformation des Kinesin auf dem Mikrotubulus weiter zu untersuchen, ist es

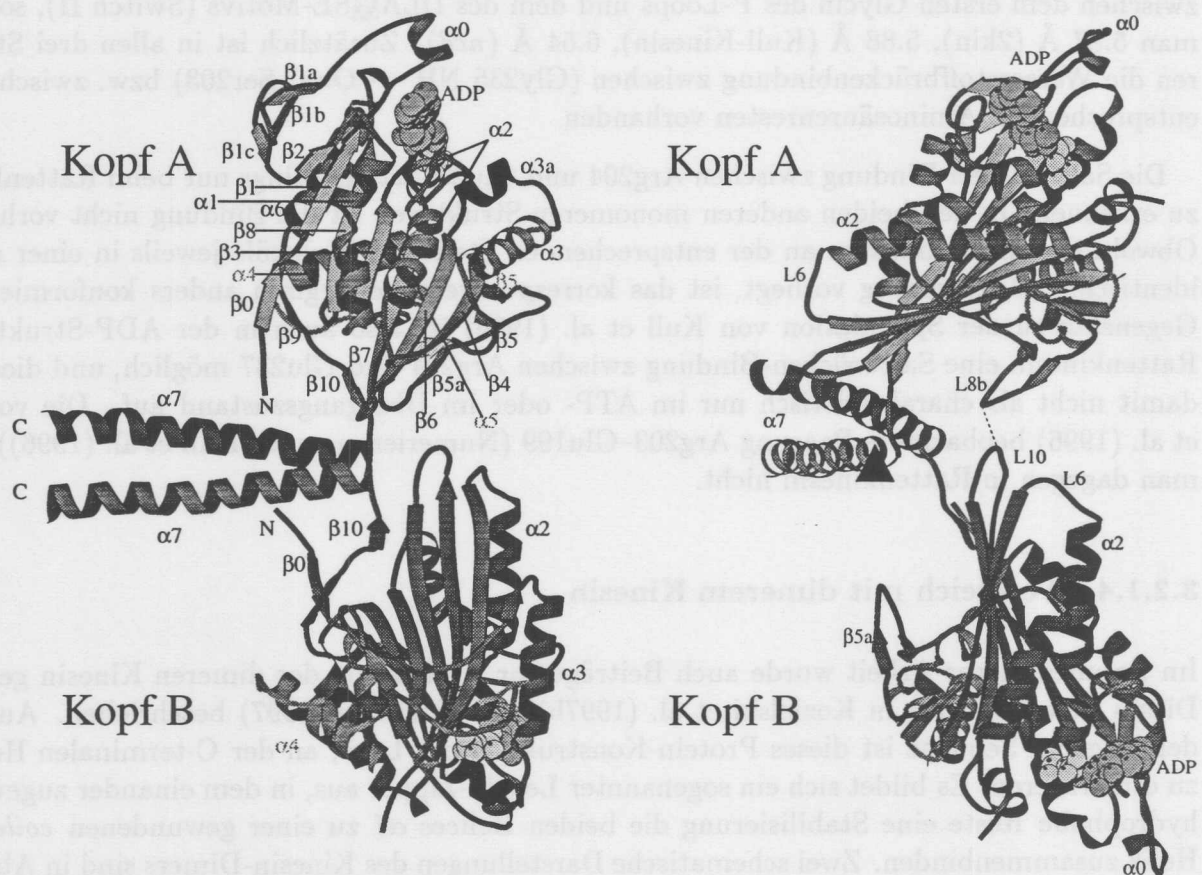


Abbildung 3.26: Zwei Ansichten des Kinesin-Dimers. Der Kopf A ist jeweils in helleren, der Kopf B in dunkleren Farben dargestellt. Links ist Kopf A in einer Aufsicht auf das zentrale β -Faltblatt dargestellt, rechts ist eine seitliche (symmetrische) Ansicht gewählt. Die Nichtkristallographische Symmetrie zwischen den beiden Kopfdomänen entspricht im rechten Bild einer senkrecht zur Papierebene verlaufenden Rotationsachse, die durch ein α dargestellt ist. Man erkennt, daß diese Symmetrie nicht für die *coiled-coil* Helices gilt.

daher erforderlich, weitere strukturelle Arbeiten insbesondere mit verschiedenen Nukleotidzuständen durchzuführen.

3.2.2 Ähnlichkeit von Kinesin mit anderen Proteinen

Die Ähnlichkeit von Kinesin mit anderen nukleotidbindenden Proteinen wurde bereits von Kull et al. (1996) und Sablin et al. (1996) bei der Beschreibung ihrer Kinesin bzw. *ncd*-Strukturen hervorgehoben. Die Ähnlichkeit zwischen Kinesin und *ncd* einerseits sowie G-Proteinen und Myosin andererseits ist dabei besonders auffällig. Die Ähnlichkeit erstreckt sich dabei nicht nur auf die Nukleotidbindungsstelle selbst, sondern auch auf vier zusätzliche in G-Proteinen bereits für die Funktion identifizierten Loop-Bereiche. Deren räumliche Überlagerung ist überraschend gut, so daß man einen ähnlichen funktionellen Mechanismus vermuten kann. Diese Bereiche werden mit N-1 bis N-4 bezeichnet (Tabelle 3.4) und sind im einzelnen

N-1: der Phosphatbindungs-Loop (kurz: P-Loop)¹⁶

N-2: Switch I und

N-3: Switch II (Diese Motive in der Nähe des P-Loops sind am Konformationswechsel der Strukturen vom GDP- in den GTP-Zustand beteiligt.) sowie

N-4: das Motiv NKxD, das die Spezifität für Guanosin-Nukleotide erzeugt.

Protein-Klasse	gebundenes Nukleotid	P-Loop N-1 $\alpha, \beta\text{-PO}_4$	Switch I N-2 $\gamma\text{-PO}_4$	Switch II N-3 $\gamma\text{-PO}_4$	N-4 Base
G-Proteine EF-Tu	GTP	GxxxxGKS/T 18-25	T 62	DxxG 81-84	NKxD 136-139
Myosine	ATP	GESxxxKS/T 179-186	NxxSSR 233-238	DxxGxE 454-459	NP 127-128
Kinesine	ATP	GQTxxxKS/T 86-93	NxxSSR 199-204	DxxGxE 232-237	RxRP 14-17

Tabelle 3.4: Nukleotidbindungs- und Schalter-Regionen in G-Proteinen, Myosinen und Kinesinen

Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß der *Schaltmechanismus* beim Kinesin bei seiner ATP-Bindung ähnlich dem Mechanismus der GTP-Bindung bei G-Proteinen ist. Dies wurde bereits von Kull et al. (1996) und Vale (1996) spekuliert. Die hier als Switch I und Switch II bezeichneten Bereiche führen bei G-Proteinen sowie bei Myosin nach GTP- bzw. ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung aus. Diese überträgt sich auf andere Bereiche des Moleküls und *schaltet* gleichsam das Molekül in seine entsprechende Zustände.

Da in der Kinesinfamilie gerade diese Loop-Bereiche ebenfalls konserviert sind und dazu räumlich mit denen der G-Proteine und Myosin überlagert werden können, kann man davon

¹⁶Dieses Struktur-Motiv wird nach Walker et al. (1982) auch nucleotide-binding fold (nbf) oder Glycin-reicher Loop genannt. Nach seinem Entdecker ist auch der Begriff Walker A-Motiv gebräuchlich. In dieser Arbeit wird ausschließlich der Begriff P-Loop verwendet. Man findet dieses Motiv außer in G-Proteinen auch in einer Reihe anderer nukleotidbindender Proteine.

ausgehen, daß auch die Konformationsänderungen und damit die Bewegung von Kinesin über diese Schalterregionen gesteuert wird.

Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wenden wir uns daher zunächst der Funktionsweise einiger G-Proteine zu.

3.2.2.1 G-Proteine

Als G-Proteine wird eine Klasse von Proteinen bezeichnet, die in der Lage sind GTP zu binden. Diese GTP-bindenden Proteine zeichnen sich durch eine Reihe von strukturellen Übereinstimmungen aus. Auf die Funktionsweisen und die Bedeutung der einzelnen G-Proteine soll hier nicht im Detail eingegangen werden. Ich beschränke mich im folgenden ausschließlich auf ihre räumliche Struktur.

Die bis heute bekannten kristallographisch aufgeklärten Strukturen der G-Proteine (s. Tabelle 3.5) weisen eine starke Ähnlichkeit in ihren nukleotidbindenden Domänen auf. Diese bestehen aus einem zentralen β -Faltblatt, das aus 6 β -Strängen angeordnet ist. Davon verlaufen 5 β -Stränge parallel und einer antiparallel zu den restlichen. Die Topologie ist in Abb. 3.27 dargestellt. In Abb. 3.28 ist zusätzlich ein Cartoon eines G-Proteins (p21^{H-ras}) mit gebundenem GTP (PDB-Code 5p21) (Pai et al. 1989) dargestellt. Die Wahl von p21^{H-ras} beruht darauf, daß dieses Protein nur aus der GTP-bindenden Domäne der G-Proteine besteht. Das zentrale β -Faltblatt ist in Abb. 3.27 und 3.28 blau dargestellt, die auf den P-Loop folgende Helix magenta bzw. gestreift. Die Abfolge der β -Stränge in der Primärsequenz des Proteins ist bei allen G-Proteinen gleich. Der N-terminale β_1 -Strang befindet sich topologisch in der Mitte des β -Faltblattes gefolgt vom P-Loop und der anschließenden α -Helix. Die Stränge β_2 bis β_6 laufen dann von der einen Seite des β -Faltblatts auf die andere Seite des Moleküls. Schematisch ist dies unter dem Faltblatt in Abb. 3.27 mit den Ziffern von 1 bis 6 dargestellt. Allerdings kann die Abfolge durch das Einschieben einer Domäne (etwa bei $G_{i\alpha}$ und $G_{t\alpha}$) unterbrochen sein, oder es sind weitere C-terminale Domänen angehängt (wie bei den Elongationsfaktoren EF-G (Czworkowski et al. 1994) und EF-Tu (Kjeldgaard und Nyborg 1992)). Die nicht nukleotidbindenden Domänen der G-Proteine ähneln sich jedoch in der Regel nicht. Dies spiegelt deren unterschiedliche Funktionen in der Zelle wider, während die bei allen G-Proteinen ähnliche GTP-bindende Domäne auf einen gleichen Energieumwandlungsmechanismus hindeutet.

Allerdings ist die Tatsache, daß Proteine GTP binden können, für sich allein noch kein Grund, eine Übereinstimmung in der Primärstruktur zu finden. So konnte etwa für das Tubulin, das ebenfalls GTP und GDP binden kann, keine Homologie in der Aminosäuresequenz zur Klasse der G-Proteine festgestellt werden. Die Strukturaufklärung des Tubulin wird darüber Auskunft geben, ob - wie vermutet - eine strukturelle Ähnlichkeit der G-Proteine mit Tubulinen besteht oder nicht (Nogales et al. 1998)¹⁷.

¹⁷Obwohl die Tubulinstruktur noch nicht veröffentlicht ist, wurde auf Vorträgen bereits gezeigt, daß Tubulin eine Drei-Domänen-Struktur besitzt, wobei die N-terminale Domäne einem G-Protein sehr ähnlich sieht. Allerdings ist der Nukleotidbindungsmechanismus von dem der G-Proteine deutlich verschieden.

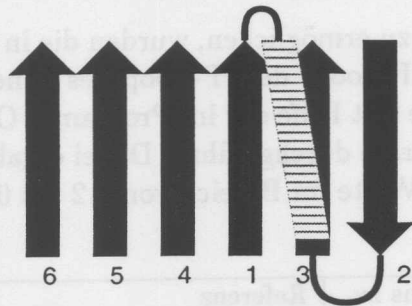


Abbildung 3.27: Topologie der Nucleotidbindenden Domäne der G-Proteine. Zentrales β -Faltblatt, P-Loop und folgende Helix. Die Zahlen unter den β -Strängen geben die Reihenfolge in der Aminosäuresequenz an.

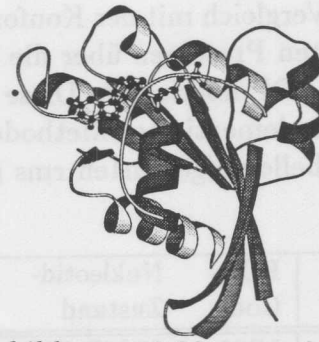


Abbildung 3.28: p21^{H-ras}-GTP Strukturmodell. Das Nucleotid (GTP) ist als Kugelstabmodell eingezeichnet. Der Effektorloop (rechts) ist in rot dargestellt. Das zentrale β -Faltblatt ist blau und die auf den P-Loop folgende α -Helix magenta.

3.2.2.2 Zyklus der G-Proteine und Konformationsänderungen

G-Proteine werden durch die Bindung von GTP aktiviert. Sie durchlaufen einen Zyklus, in dem GTP zu GDP hydrolysiert und das Protein inaktiv wird. Nach Ablösung des GDP kann das G-Protein durch erneute GTP-Bindung reaktiviert werden. Der Ersatz von GDP durch GTP (also die Reaktivierung) ist ein sehr langsamer Prozess, der in der Regel die Anwesenheit eines Guanin-Nukleotid-Exchange-Faktors (GEF) erfordert. Die Anregung der GTPase-Aktivität erfolgt meist über ein GTPase aktivierendes Protein (GAP). In letzter Zeit sind einige Proteine in Anwesenheit von ihrem GAP kristallisiert und röntgenstrukturell aufgeklärt worden (p21^{H-ras} (Scheffzek et al. 1997) und rhoA (Rittinger et al. 1997)).

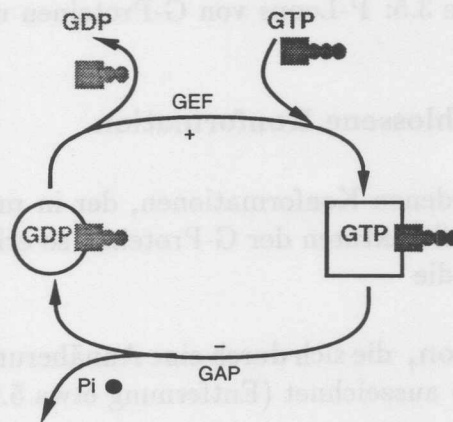


Abbildung 3.29: G-Protein-Zyklus nach Kjeldgaard et al. (1996)

Ein Übersichtsartikel von Kjeldgaard et al. (1996) über das GTP Bindungs-Motiv listet eine Zahl von röntgenkristallographisch gelösten Strukturen von G-Proteinen auf, die bereits in

verschiedenen Nukleotidbindungszuständen kristallisiert und aufgeklärt werden konnten.

Um einen Vergleich mit der Konformation des Kinesin zu ermöglichen, wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Proteinen über die C^α-Positionen ihrer P-Loops dem P-Loop des Kinesin mit gebundenem ADP überlagert. Diese Überlagerung wurde mit Hilfe der im Programm O (Jones et al. 1991) implementierten Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Dabei ergaben sich die in der Tabelle aufgeführten rms (root-mean-square) Werte im Bereich von 0.2 bis 0.6 Å.

Protein- Bezeichnung	PDB- Code	Nukleotid- Zustand	P-Loop Reste	rms zu 2KIN	Referenz
p21 ^{H-ras}	5P21	(GMP-PNP)	GAGGVGKS	0.454 Å	(Pai et al. 1989)
	4Q21	(GDP)	10-17	0.362 Å	(Tong et al. 1991)
EF-Tu (<i>T.a.</i>) (Hilgenf.)	1EFT	(GMP-PNP)	GHVDHGKT	0.421 Å	(Kjeldgaard et al. 1993)
			18-25	0.386 Å	(Berchtold et al. 1993)
EF-Tu (<i>E.c.</i>) (Hilgenf.)	1ETU	(GDP)	GHVDHGKT 18-25	0.677 Å 0.345 Å	(Kjeldgaard und Nyborg 1992)
EF-G	1EFG	(GDP)	AHIDAGKT 19-26	0.421 Å	(Czworkowski et al. 1994)
G _{iα1}	1GDD	(GDP)	GAGESGKS	0.271 Å	(Mixon et al. 1995)
	1GIA	(GTP _γ S)	40-47	0.365 Å	(Coleman et al. 1994)
G _{tα}	1TAG	(GDP)	GAGESGKS	0.169 Å	(Lambright et al. 1994)
	1TND	(GTP _γ S)	36-43	0.395 Å	(Noel et al. 1993)
ARF-1	1HUR	(GDP)	GLDAAGKT 24-31	0.426 Å	(Amor et al. 1994)
Ran	nicht depon.		GDGGTGKT 17-24		(Scheffzek et al. 1995)
Rap1A	1GUA	(GDPNP)	GSGGVGKS 10-17	0.472 Å	(Nassar et al. 1996)
Myosin	1mmd	(BeF _x ·ADP)	GESGAGKT	0.161 Å	(Fisher et al. 1995)
	1vom	(VO ₄ ·ADP)	179-186	0.266 Å	(Smith und Rayment 1996b)

Tabelle 3.5: P-Loops von G-Proteinen und Myosin

3.2.2.3 Offene und geschlossene Konformation

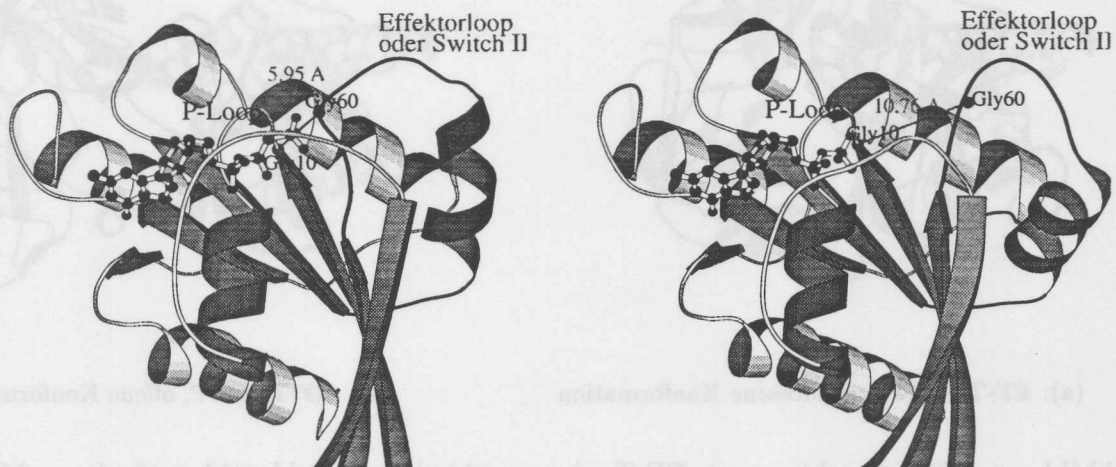
Betrachtet man die verschiedenen Konformationen, der in mehreren Nukleotidzuständen kristallographisch aufgeklärten Strukturen der G-Proteine, so erkennt man, daß diese sich in zwei Kategorien einteilen lassen: die

geschlossene Konformation, die sich durch eine Annäherung der Switch-Regionen zum phosphatbindenden P-Loop auszeichnet (Entfernung etwa 5.9 Å, s. Tab.3.6) und die

offene Konformation, die eine größere Entfernung (bis 10.7 Å) der Switch-Regionen vom P-Loop zeigt.

Charakteristisch dabei ist, daß in den bisher aufgeklärten Strukturen die *geschlossene Konformation* dem *GTP-Zustand* und die *offene Konformation* stets dem *GDP-Zustand* zugeordnet

werden kann. In Abb. 3.30(a) und 3.30(b) sind die Umgebungen der Nukleotidbindungsstelle für den GTP- und den GDP-Zustand von p21^{H-ras} dargestellt.



(a): GTP-Zustand, geschlossene Konformation

(b): GDP-Zustand, offene Konformation

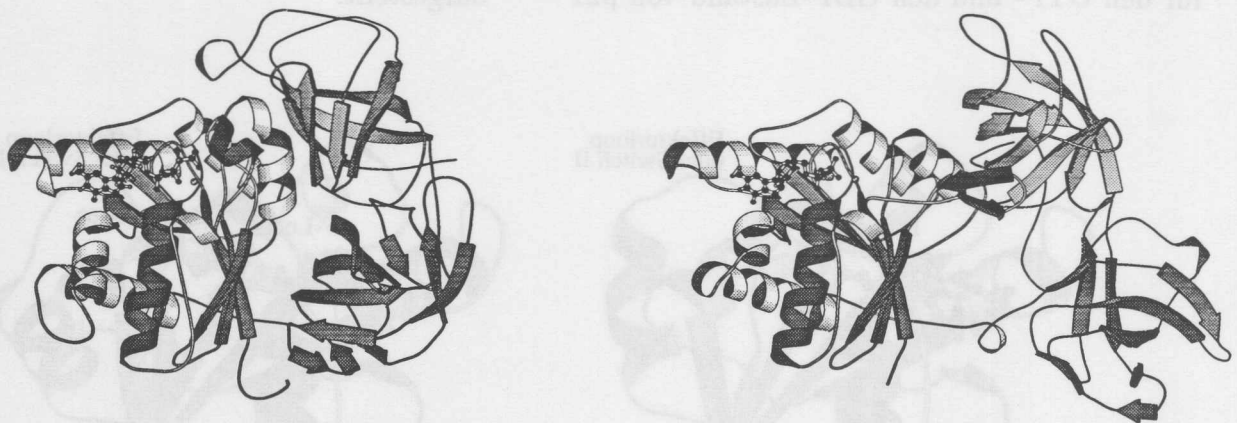
Abbildung 3.30: Struktur von p21^{H-ras} in verschiedenen Nukleotidzuständen. Die Nukleotide sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt. Zusätzlich sind die Positionen der konservierten Glycine Gly10 (P-Loop) und Gly60 (Switch II) hervorgehoben. Der sich nach der GTP-Hydrolyse bewegende Effektorloop (=Switch II) und die Entfernung zwischen Gly10 und Gly60 sind rot eingezeichnet. Diese beträgt im GDP-Zustand (offene Konformation) 5.95 Å und im GTP-Zustand (geschlossene Konformation) 10.76 Å.

Es ist jeweils die Entfernung zwischen den C^α-Positionen von Gly10 (P-Loop) und Gly60 (Switch II) eingezeichnet. Für die geschlossene Konformation (GTP-Zustand) beträgt sie 5.95 Å. Für die offene (GDP-Zustand) dagegen 10.76 Å. In dieser Darstellung läßt sich außerdem die Bewegung des (hier rot eingezeichneten) sogenannten Effektorloops beobachten. Dieser ist im p21^{H-ras} derjenige Bereich des Moleküls, der sich nach GTP-Hydrolyse stark bewegt.

Bevor der Vergleich der offenen und geschlossenen Konformation in Abschn. 3.2.2.6 vertieft und quantifiziert wird, sollen zuvor nach p21^{H-ras} die Konformationsänderungen zweier anderer Nukleotidbindender Proteine dargestellt werden: EF-Tu (Abschn. 3.2.2.4) und Myosin (Abschn. 3.2.2.5).

3.2.2.4 EF-Tu: Bewegung von Domänen

Noch eindrucksvoller als die Effektorloop-Bewegung in p21^{H-ras} ist die Konformationsänderung eines anderen G-Proteins nach GTP-Hydrolyse. Beim Elongationsfaktor EF-Tu bewegen sich zwei Domänen des Moleküls um nahezu 90° gegenüber der Nukleotidbindungsdomäne (Abb. 3.31(a) und (b)). (Die für die Herstellung der Abbildung verwendeten Koordinaten wurden mir freundlicherweise von Prof. Rolf Hilgenfeld, IMB Jena, zur Verfügung gestellt.)



(a): EF-Tu-GTP, geschlossene Konformation

(b): EF-Tu-GDP, offene Konformation

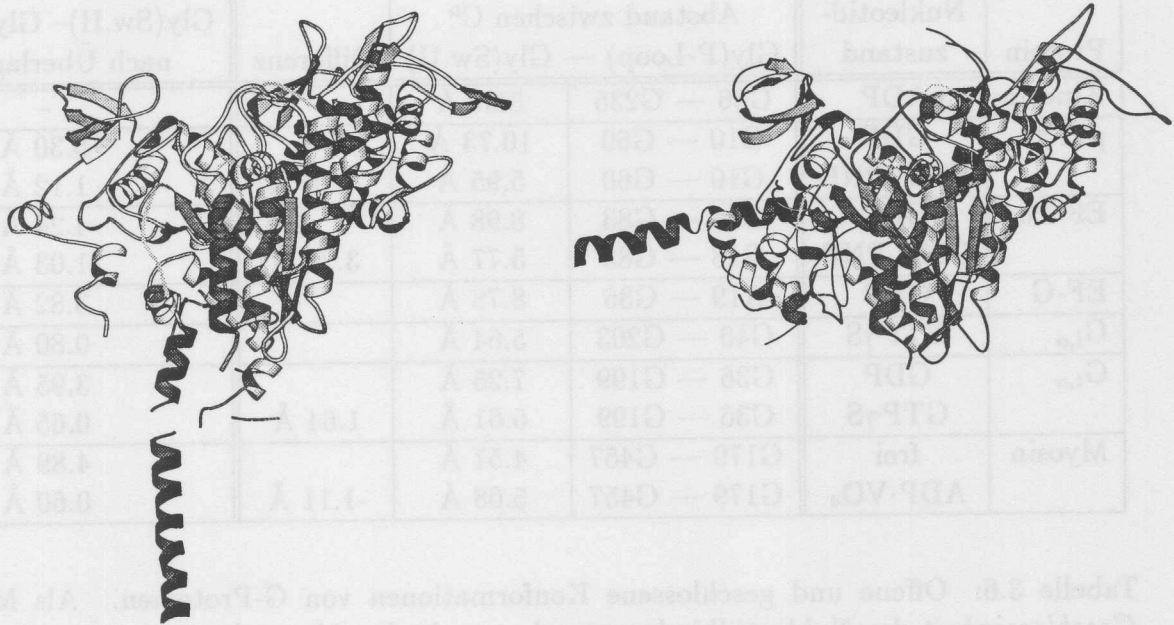
Abbildung 3.31: Struktur von EF-Tu in verschiedenen Nukleotidzuständen. Man erkennt deutlich die Umorientierung der Domänen II (gelb) und III (grün) nach der GTP-Hydrolyse. Die Öffnung der Kontaktstelle zwischen den Domänen wird durch die Bewegung der Switch-Regionen erzwungen. Dabei wandelt sich Switch I (rot) von einer α -Helix in ein β -Faltblatt um und schiebt dabei gleichsam die beiden anderen Domänen zur Seite.

Die das Nukleotid bindende Domäne ist wieder in der üblichen Orientierung (seitlicher Blick auf das zentrale β -Faltblatt) dargestellt. Die beiden zusätzlichen Domänen sind gelb und grün eingefärbt. In rot ist der Bereich dargestellt, der die Konformationsänderung durch die GTP-Hydrolyse auf die beiden C-terminalen Domänen überträgt. Dies ist eine strukturell sehr interessante Stelle, da sich dort eine α -Helix (GTP-Zustand) in ein antiparalleles β -Faltblatt (GDP-Zustand) umwandelt (Abel et al. 1996, Polekhina et al. 1996). Eine solche Umwandlung könnte auch eine mögliche Erklärung für die Art der Kinesinfortbewegung sein, wenn man annimmt, daß sich die *coiled-coil* Helix in ein Faltblatt umwandeln kann.

3.2.2.5 Myosin — Ein Hebelarm wird in Bewegung gesetzt

Ähnlich eindrucksvoll wie bei EF-Tu ist die Konformationsänderung von Myosin, das wie Kinesin ein Motorprotein ist. Myosin wandert allerdings nicht entlang der Mikrotubuli, sondern bindet an Aktinfilamente. Obwohl Myosin kein G-Protein ist (es bindet ATP anstelle von GTP), sind doch Ähnlichkeiten zur Gruppe der G-Proteine festzustellen (s. Tab. 3.4). Wie die G-Proteine nach GTP-Hydrolyse, so führt auch Myosin nach ATP-Hydrolyse eine große Konformationsänderung durch. Die Schalterregionen (Switches I und II) bewegen sich dabei und übertragen ihre Konformationsänderung an einen sogenannten *Hebelarm* (Abb. 3.32 auf der linken Seite des Moleküls).

Die Bewegung, die dieser *Hebelarm* nach der Hydrolyse ausführt, entspricht einer Drehung um etwa 70° , was einer räumliche Bewegung von 35 \AA an der Spitze entspricht. Diese Bewegung wird dafür verantwortlich gemacht, daß sich Myosinmoleküle entlang von Aktinfilamenten

(a): ADP·VO₄ (1vom)

(b): Nukleotid frei (2mys)

Abbildung 3.32: Myosin, verschiedene Nukleotidzustände. Beim Myosin sind verschiedene Nukleotidzustände durch unterschiedliche Konformationen der langen als *Hebelarm* bezeichneten α -Helix gekennzeichnet. Über deren Konformationsänderungen dieser Helix wird die Bewegung am Aktinfilament bewirkt.

fortbewegen können (Holmes 1997). In Analogie dazu wurde bereits spekuliert (Vale 1996, Kull et al. 1996), daß andere Motorprotein wie insbesondere auch das Kinesin eine ähnliche Konformationsänderung durchmachen, um chemische Energie in gerichtete Bewegung umzuwandeln.

3.2.2.6 Vergleich der offenen und geschlossenen Konformationen

Welche Vorhersagen lassen sich aus den Erkenntnissen über die G-Proteine und Myosin für die Konformationsänderungen des Kinesins machen? Um dies zu untersuchen, wurden die Konformationen der einzelnen G-Proteine sowie von Myosin mit Hilfe der charakteristischen Entfernung zwischen der C $^{\alpha}$ -Position des ersten Glycins des P-Loops sowie der C $^{\alpha}$ -Position des konservierten Glycins im Switch II bestimmt. Dabei ergaben sich die in Tab. 3.6 dargestellten Werte. Interessant dabei ist, daß sich die Werte für den Triphosphatzustand in einem sehr engen Bereich von 5.6 Å bis 5.9 Å befinden.

Um den ADP-Zustand des Kinesin mit denjenigen der anderen Moleküle vergleichen zu können, wurde zusätzlich aufgrund der bereits vorher vorgenommen Überlagerungen (Tab. 3.5) die Entfernung der C $^{\alpha}$ -Position der konservierten Glycine im Switch II relativ zu derjenigen von Kinesin bestimmt. Diese Entfernung ist in der letzten Spalte von Tab. 3.6 aufgeführt.

Wie aus Tabelle 3.6 ersichtlich, unterscheiden sich die Abstände zwischen den beiden konser-

Protein	Nukleotid-zustand	Abstand zwischen C ^α		Differenz	Abstand
		Gly(P-Loop) — Gly(Sw.II)			Gly(Sw.II)– Gly235(Kin) nach Überlagerung
Kinesin	ADP	G86 — G235	5.87 Å	–	–
p21 ^{ras}	GDP	G10 — G60	10.73 Å		5.30 Å
	GMP-PNP	G10 — G60	5.95 Å	4.78 Å	1.12 Å
EF-Tu	GDP	G18 — G83	8.98 Å		4.24 Å
	GMP-PNP	G18 — G83	5.77 Å	3.21 Å	1.03 Å
EF-G	GDP	A19 — G86	8.78 Å		3.82 Å
G _{i,α}	GTP _γ S	G40 — G203	5.64 Å		0.80 Å
G _{t,α}	GDP	G36 — G199	7.25 Å		3.95 Å
	GTP _γ S	G36 — G199	5.61 Å	1.64 Å	0.65 Å
Myosin	frei	G179 — G457	4.57 Å		4.89 Å
	ADP·VO ₄	G179 — G457	5.68 Å	-1.11 Å	0.60 Å

Tabelle 3.6: Offene und geschlossene Konformationen von G-Proteinen. Als Maß für die *Geschlossenheit* der Nukleotidbindungstasche wurde der Abstand zwischen den konservierten Glycinen aus dem P-Loop und der Switch II-Region bestimmt. Zusätzlich wurde nach einer Überlagerung auf die Kinesin-Struktur die Abstände der konservierten Switch II-Glycine zum Switch II-Glycin des Kinesin (Gly235) ermittelt. Eine graphische Veranschaulichung ist in Abb.3.33 dargestellt.

vierten Glycinresten im Switch II einerseits und im P-Loop andererseits bei den G-Proteinen in ihrer Länge erheblich. Diese wachsen um bis zu 5 Å. Für Myosin ist dies jedoch nicht der Fall. Der nukleotid-freie (vergleichbar dem ADP-Zustand) und der ADP·VO₄-Zustand (vergleichbar dem ATP-Zustand) unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Im Gegensatz zu den G-Proteinen ist die Entfernung zwischen den Glycinen des P-Loops und von Switch II (G179—G457) im Nukleotid freien Zustand beim Myosin sogar etwas *enger* (1.11 Å) als im ATP-Zustand.

Dieser Sachverhalt läßt sich auch graphisch veranschaulichen. In Abb.3.33 sind dazu die Positionen der C^α-Atome der konservierten Glycine aus dem P-Loop und der Switch-II-Region in zwei um 90° gegeneinander gedrehten Orientierungen dargestellt. Man erkennt, daß die Positionen der Glycin C^α-Atome der Switch-II-Regionen im ATP- oder GTP-Zustand für alle dargestellten Proteine (p21^{H-ras}, G_{tα}, EF-Tu, Myosin) praktisch identisch sind. Es ergeben sich zwischen ihnen (nach der gemeinsamen räumlichen Überlagerung auf den P-Loop von Kinesin) Entfernungen von 0.3 Å bis 1.1 Å. Dies ist im Rahmen der allein aufgrund der Koordinatenfehler zu erwartenden Schwankungen.

Allerdings erkennt man auch, daß sich die Glycin C^α-Positionen der unterschiedlichen Proteine im ADP- oder GDP-Zustand stark unterscheiden. Dort sind die Positionen der Switch II-Glycine zwischen 0.6 Å (EF-Tu – EF-G, die sich kaum unterscheiden) bis hin zu 6 Å oder sogar 9.1 Å (p21^{ras} – Myosin) voneinander entfernt.

Der Grundmechanismus der Steuerung einer Konformationsänderung ist bei all diesen Proteinen ähnlich. Die *Öffnung* der Tasche, erfolgt jedesmal durch die Bewegung des Switches II.

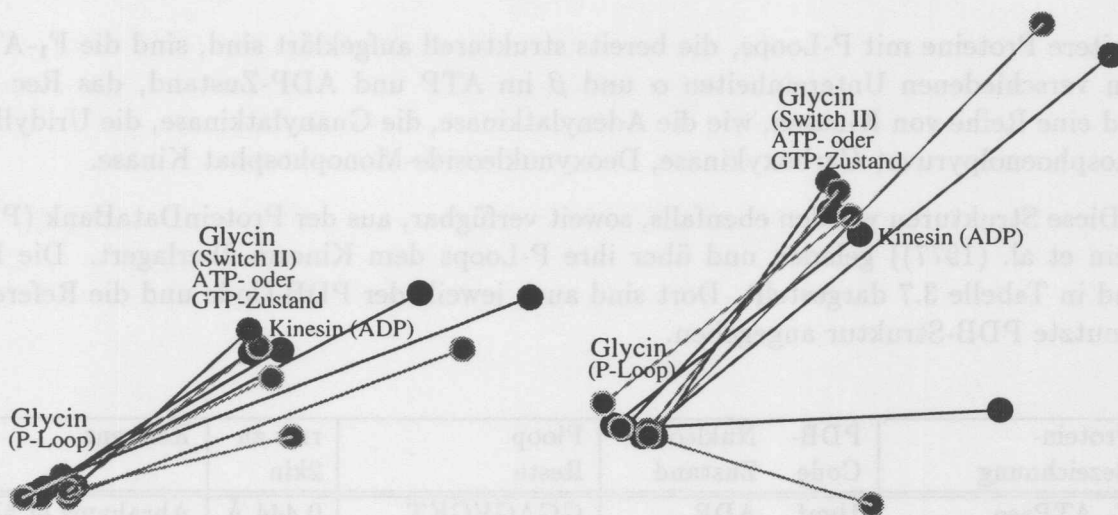


Abbildung 3.33: Positionen der konservierten Glycine in P-Loop und Switch II: p21^{ras}, G_{t,α}, EF-Tu, Myosin und Kinesin. Gezeigt sind zwei um 90° gegeneinander gedrehte Ansichten. Bemerkenswert ist die räumliche Nähe der ATP- bzw. GTP-Zustände zum Kinesin ADP-Zustand. Im ADP- oder GDP-Zustand sind nur bei einigen Proteinen Ähnlichkeiten zu erkennen. Während EF-Tu und p21^{ras} in eine vergleichbare Richtung *öffnen*, verändern sich die Positionen von Myosin und G_{t,α} im ADP- bzw. GDP-Zustand in völlig andere Richtungen. Eine Vorhersage über mögliche Kinesin-Konformationsänderungen ist daher aus dieser Abbildung heraus nicht möglich.

Sie öffnet sich aber in unterschiedliche Richtungen, so daß die verschiedenen Funktionen der Proteine erfüllt werden können.

Wo liegt nun Kinesin in diesem Bild? Die Position des C^α-Atoms des konservierten Switch II Glycins des Kinesin (Gly235) überlagert sehr gut mit den entsprechenden Atomen der GTP- und ATP-Zustände von G-Proteinen und Myosin und damit der geschlossenen Zustände. Dies ist von daher überraschend, als Kinesin im ADP-Zustand und nicht im ATP-Zustand vorliegt.

Man kann zusammenfassend feststellen, daß die geschlossenen Konformationen der Proteine einander sehr ähnlich sind, während sich die offenen je nach Funktion (die beiden einzigen ähnlichen Konformationen EF-G und EF-Tu sind beide Elongationsfaktoren) mehr oder weniger stark unterscheiden. Die interessanteste Erkenntnis ist jedoch, daß das Kinesin, obwohl es im ADP-Zustand vorliegt, in einer *geschlossenen Nukleotidbindungskonformation* auftritt.

Neben den bereits beschriebenen G-Proteinen und dem Myosin gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, die in der Lage sind, Nukleotide zu binden. Diese lassen sich in Proteine unterteilen, die P-Loops aufweisen, und solche, die eine andere Bindung für das Nukleotid vornehmen.

3.2.2.7 Weitere Nukleotidbindende Proteine mit P-Loop

Weitere Proteine mit P-Loops, die bereits strukturell aufgeklärt sind, sind die F_1 -ATPase mit den verschiedenen Untereinheiten α und β im ATP und ADP-Zustand, das Rec A-Protein und eine Reihe von Kinasen, wie die Adenylatkinase, die Guanylatkinase, die Uridylkinase, die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, Deoxynukleoside-Monophosphat Kinase.

Diese Strukturen wurden ebenfalls, soweit verfügbar, aus der ProteinDataBank (PDB, Bernstein et al. (1977)) geladen und über ihre P-Loops dem Kinesin überlagert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Dort sind auch jeweils der PDB-Code und die Referenz für die benutzte PDB-Struktur angegeben.

Protein-Bezeichnung	PDB-Code	Nukleotid-Zustand	Ploop Reste	rms zu 2kin	Referenz
F_1 -ATPase (β -Untereinheit)	1bmf	ADP	GGAGVGKT	0.444 Å	Abrahams et al. (1994)
	1bmf	AMP-PNP	156-163	0.504 Å	
Rec A Protein	1rea	ADP	GPESSGKT	0.309 Å	Story und Steitz (1992) Story et al. (1992)
	2reb	frei	66-73	0.323 Å	
Dethiobiotin Synthetase	1dad	ADP	TDTEVGKT	0.812 Å	Huang et al. (1995) Alexeev et al. (1994)
	1dbs	frei	9-16	0.975 Å	
Nitrogenase Eisen Protein	1nip	ADP	GKGGIGKS	0.999 Å	Georgiadis et al. (1992)
Adenylosuccinat Synthetase	1ade	frei	G tq WGDEGKG	1.604 Å	Silva et al. (1995) Poland et al. (1996)
	1hoo	GMP-PNP	8 11-17	1.489 Å	
Kinasen					
Uridylat kinase	1uky	ADP	GGPGAGKG T	0.231 Å	Mueller-Dieckmann und Schulz (1994)
	1ukz	ADP	23-30 31		
UMP/CMP kinase	1ukd	UP5	GGPGSGKG T		Scheffzek et al. (1996)
Adenylat kinase	2eck	ADP	GAPGAGKG T	0.308 Å	Berry et al. (1994)
	1ank	AMP-PNP	7-14 15	0.254 Å	
Guanylat kinase	1gky	5GP	GPSGTGKS	0.797 Å	Stehle und Schulz (1992)
Deoxynukleos. monoph. kin.	1del	AMP	GVKRSGKDT	0.724 Å	Teplyakov et al. (1996) Teplyakov et al. (1996)
	1dek		8-16		
Carboxykinase	1ayl	ATP	GLSGTGKT	0.224 Å	Tari et al. (1996)
	1oen	frei	248-255	0.819 Å	Matte et al. (1996)
nukleotidbindendes Protein mit fraglichem P-Loop					
3-Phosphoglycerat Kinase	1php	ADP (P-Loop ??)	GAKVKDKI	2.227 Å	Davies et al. (1994)

Tabelle 3.7: Weitere Proteine mit P-Loops. Die hier aufgeführten Proteine wurden ebenfalls mit dem Kinesin Monomermodell überlagert. Dabei ergaben sich Abweichungen von 0.2 Å bis 1.6 Å.

Mit Ausnahme der Adenylosuccinat Synthetase überlagern die Proteine wieder sehr gut mit dem P-Loop des Kinesin. Dies gilt sowohl für die Kinasen als auch für die anderen Proteine. Allerdings läßt sich für keines dieser Proteine ein Schaltermechanismus zeigen. Zum einen

sind nicht von allen Proteinen die Strukturen verschiedener Nukleotidzustände bekannt, zum anderen (bei den Kinasen) ist eine den Schalterregionen (Switch I oder Switch II) entsprechende Stelle gar nicht vorhanden.

3.2.2.8 Nukleotidbindende Proteine ohne P-Loop

Während bei nukleotidbindenden Proteinen mit P-Loops eine Überlagerung der Nukleotidbindungsstelle mit dem P-Loop von Kinesin noch möglich ist, sind die Abweichungen für andere Proteine (Hitzeschock-Proteine, Protein-Kinasen, ...) derart groß, daß keine Ähnlichkeit erkannt werden kann, die eine Überlagerung erlaubt. Auch bei diesen Proteinen erfolgt die Nukleotidbindung in Loop-Regionen. Die Bindungsstellen sehen hier aber teilweise deutlich anders aus, was zusätzlich einen Vergleich und eine daraus resultierende Folgerung auf die Kinesin-Funktionsweise erschwert.

3.2.2.9 P-Loop Proteine haben ein gemeinsames zentrales β -Faltblatt

Vergleicht man allerdings die G-Proteine, Myosin, Kinasen und andere Proteine, die einen P-Loop zeigen, so zeigt sich, daß diese Proteine alle über ein zentrales β -Faltblatt verfügen. Dieses ist jedoch bei den einzelnen Proteinen unterschiedlich. Die verschiedenen Typen sind in Abb. 3.34 aufgeführt.

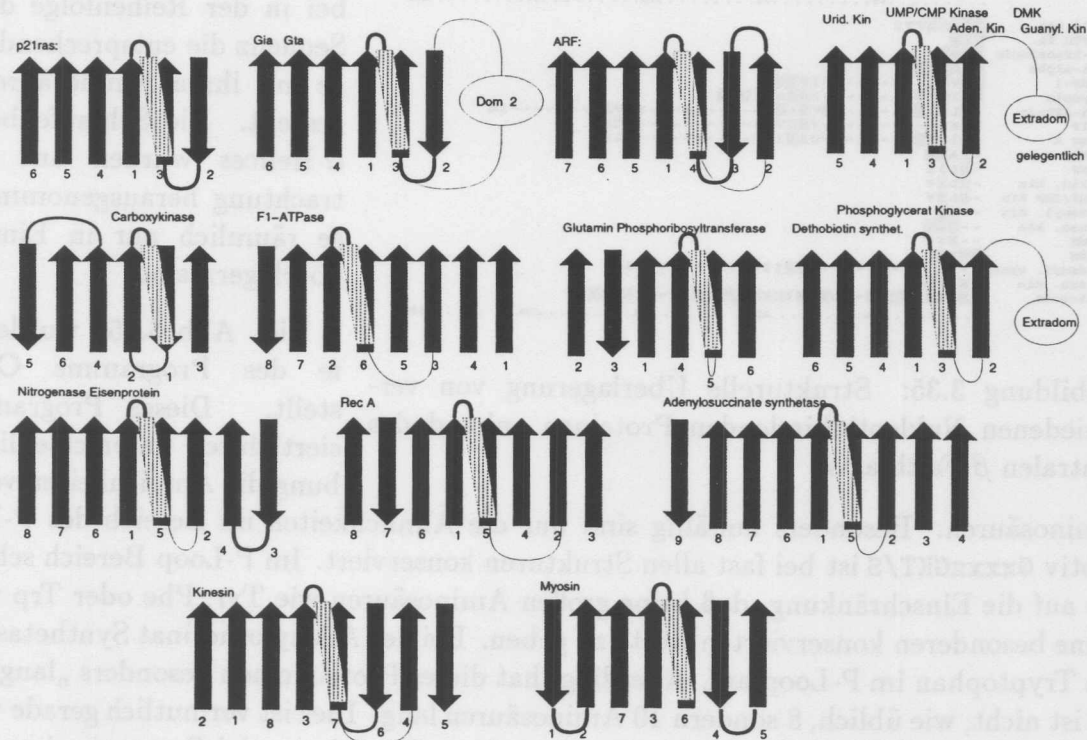


Abbildung 3.34: Topologien der zentralen β -Faltblätter von verschiedenen Nukleotidbindenden Proteinen

Die Größe des β -Faltblatts kann dabei zwischen 5 und 9 β -Strängen variieren. Auch die Länge der einzelnen Stränge ist stark unterschiedlich. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Smith und Rayment (1996a) werden diese zentralen Faltblätter miteinander verglichen. Allerdings sind mittlerweile weitere Strukturen in der PDB-Datenbank verfügbar, so daß zusätzliche Proteine in die Betrachtung mit einbezogen werden können. Abb. 3.34 zeigt nunmehr 13 Typen verschiedener β -Faltblätter statt nur 6 wie in Smith und Rayment (1996a).

p21 ras	-----I I-----MVLV-----GELCVFA-----EEL
EFTu Ta.	-----V I E-----I V V M M-----I L V V-----E V E V
a-transducin	-----S H M-----I V L F L M-----C I I F I A A-----R E V E L
gi-alpha	-----I V E-----S I L L E L M-----A I I F C V A-----K L
ARF-1	-----K X I Q A-----V L L V E A M-----T Q G L I E V V M-----K I
Myosin	-----S K T E-----L V V A V-----N E E E V E C I-----S E L
Fl-ATPase	-----S E-----A T T V-----A T T V-----K I
NIP	-----H E V-----R L G S L I C M-----I I E I V C-----R Q C
rec A	-----S I-----L I S A A G-----V L L I R I E I A V E M-----T V
DBS	-----L L S I-----L A S M V V A-----V I L V V G-----E E E
PHP	-----H I-----S V I-----L V V M E-----E E E
Urid. kin	-----V V R V E-----I L E L-----E L E E-----V V I
UMP/CMP Kin	-----V K I I E-----N E K F V L F E F-----V V V
Adenyl. Kin	-----K E A V E-----V L E E E-----I
guan. kin	-----K V I V-----R E L E I A-----I
DMK	-----L I E-----L V I-----E V I E V V E-----E L I
GPH	-----L I K-----L A E-----V V E-----R V V
Adenyl. synth	-----K M I-----T E I E-----S C L E-----L S I L E-----V E V
Carb. Kin	-----E E V-----S A L V E-----A T X V I E L E-----V A V
Kinesin	-----R V L-----K V M C R E E E-----C R T E I V I C C-----E E E I
10.....20.....30.....40.....50
p21 ras	V V V H A G E V S E K E A L E I L I Q M-----E C L L E I L E E-----E E E
EFTu Ta.	I I G V E E E G K T E L T A A-----H E E E V S-----A E V
a-transducin	L L L S A G S E S K S E I V E K M K I I H Q-----L N E R M E V-----E E E
gi-alpha	L L L G A G S E S K S E I V E K M K I I H Q-----L H F K M F V-----I V
ARF-1	L M V S L S A S K T E L E K L-----I S E E V L E-----V
Myosin	L T S Q S G A S K T E K E V I Q L A S V A G K-----E E I S V L E-----E E
Fl-ATPase	L I F G G A S V S K T V L I M E L I M M V-----S I S E V Q A I-----E E
NIP	A I E K G G I G K S E E T T O L V A A L A M-----V E V E E-----E
rec A	I X G P E S S G K T E L E L V I A A A Q R E-----L L I E I N-----E E
DBS	V E T E T E V K E T V A S C A L L Q A A K A A G-----M V L V-----E E
PHP	E T A I I G G A K V K K I V I Q S L L-----R E V E-----E E
Urid. kin	V L G G E F G A S K G E Q C A K L V E E E-----K E L I E-----E E
UMP/CMP Kin	V L G G E F G S G K G E Q C A H I V R E F G-----L V V-----E E
Adenyl. Kin	I L L G A F G A G K G E D A G E I M M K K G-----L L L-----E E
guan. kin	V I S G E S G K S E L L K L M A S E-----C I L E-----E E
DMK	L I F G G A S V S K T V L I M E L I M M V-----S I S E V Q A I-----E E
GPH	M V S S I V R S G T S R R I V M L R E A-----V E V E I-----E E
Adenyl. synth	V V L G S G G K G K G K I V L L E-----V M E-----E E
Carb. Kin	E G G L S G T G K T E L S T-----V M A S C-----E E
Kinesin	A S G G E S S G K T E H M I I E R I A E I E E E I E-----K L S K L L V E-----E E
60.....70.....80.....90.....100
p21 ras	E E E K G V V I
EFTu Ta.	E E E
a-transducin	E E E E E
gi-alpha	E E E E E
ARF-1	E E V E-----I V E E
Myosin	K E I I I-----I S G A E I G E E
Fl-ATPase	I E L L V-----V E A G V-----A L V E E-----I M
NIP	I M V-----V K C V-----K A G
rec A	-V I V-----C A S I-----L C S
DBS	-A A E
PHP	-L I I
Urid. kin	-L E V
UMP/CMP Kin	-L E V
Adenyl. Kin	-I E
guan. kin	--E Q E
DMK	--K V A
GPH	E E L E
Adenyl. synth	V V E-----E E I I-----L L L
Carb. Kin	-R L I E
Kinesin	I E L I E I K Q E E-----L E E E I K V E E E E I E-----K I R E E E V
110.....120.....130.....140.....150

Abbildung 3.35: Strukturelle Überlagerung von verschiedenen Nukleotidbindenden Proteinen anhand des zentralen β -Faltblatts

Aminosäuren. Besonders auffällig sind nur die Ähnlichkeiten im Bereich des P-Loops. Das Motiv GxxxxGKT/S ist bei fast allen Strukturen konserviert. Im P-Loop Bereich scheint es aber bis auf die Einschränkung, daß keine großen Aminosäuren wie Tyr, Phe oder Trp vorkommen, keine besonderen konservierten Reste zu geben. Bei der Adenylosuccinat Synthetase tritt sogar ein Tryptophan im P-Loop auf. Allerdings hat dieses Protein einen besonders „langen“ P-Loop. Er ist nicht, wie üblich, 8 sondern 10 Aminosäuren lang. Dies ist vermutlich gerade wegen dieses Tryptophanrestes erforderlich. Da dieser im Loop-Bereich zu viel Raum einnimmt, *beult* sich der Loop gleichsam aus, um Platz für die Seitenkette zu schaffen.

Mit Hilfe eines Vergleichs zwischen den korrespondierenden Strukturen in den β -Faltblättern der einzelnen Proteine sollten eventuell auch Rückschlüsse auf die Konservierung wichtiger Aminosäurenreste möglich sein. Zu diesem Zweck wurden die β -Faltblätter der einzelnen Proteinstrukturen ermittelt und die vergleichbaren β -Stränge überlagert und einander entsprechende Aminosäuren identifiziert. Die β -Stränge wiesen teilweise in unterschiedliche Richtungen, dies wurde durch eine Umkehr der Aminosäuresequenz ebenfalls berücksichtigt. Die erhaltene Aminosäurenüberlagerung ist in Abb. 3.35 dargestellt. Es sind dabei in der Reihenfolge der Kinesinsequenz die entsprechenden β -Stränge mit ihren Aminosäureresten dargestellt. Die Schlaufenbereiche und α -Helices wurden aus dieser Betrachtung herausgenommen, da diese räumlich nur in Einzelfällen zu überlagern sind.

Die Abb. 3.35 wurde mit Hilfe des Programms CINEMA erstellt. Dieses Programm visualisiert durch unterschiedliche Farbgebung die Ähnlichkeiten verschiedener

Protein	PDB	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	P-Loop	α -Helix	β_6	β_7	β_8	β_9
Kinesin	2kin		51-53 ↑	10-15 ↑	296-304 ↑	79-85 ↑	86-93	91-121	223-232 ↑	206-217 ↓	127-139 ↑	142-145 ↓
p21 ^{H-ras}	5p21		141-143 ↑	111-116 ↑	77-83 ↑	2-9 ↑	10-17	15-26	49-58 ↑	37-46 ↓		
EF-Tu <i>T.a</i>	left		170-172 ↑	131-136 ↑	103-107 ↑	11-17 ↑	18-25	23-30	76-81 ↑	66-71 ↓		
G _t α	1tag		316-319 ↑	259-265 ↑	216-222 ↑	28-35 ↑	36-43	41-54	190-197 ↑	182-187 ↓		
G _i α	lgia		319-323 ↑	263-269 ↑	220-226 ↑	35-39 ↑	40-47	45-58	194-201 ↑	184-191 ↓		
ARF-1	1hur		153-157 ↑	120-126 ↑	85-93 ↑	19-23 ↑	24-31	29-37	61-67 ↑	53-58 ↓	42-45 ↑	
Myosin	1mmd		116-119 ↓	122-126 ↑	649-656 ↑	173-178 ↑	179-186	184-202	448-454 ↑	240-247 ↓	253-261 ↑	
F ₁ -ATPase	1bmf			354-355 ↓	331-334 ↑	151-155 ↑	157-164	161-173	303-311 ↑	250-256 ↑	181-186 ↑	216-220 ↓
Nitrogenase Eisenprotein	1nip		209-211 ↑	178-185 ↑	146-151 ↑	3-8 ↑	9-16	14-29	121-125 ↑	33-37 ↑	83-87 ↑	77-79 ↓
rec A	1rea		267-268 ↑	257-263 ↓	221-233 ↑	61-65 ↑	66-73	71-86	188-193 ↑	140-144 ↑	90-94 ↑	115-117 ↑
Dethiobiotin Synthetase	1dad		199-203 ↑	169-175 ↑	141-146 ↑	2-8 ↑	8-16	14-30	111-115 ↑	33-36 ↑		
Phosphoglycerat Kinase	1php		367-368 ↑	345-348 ↑	312-316 ↑	189-193 ↑	191-198(?)	197-209	259-261 ↑	214-217 ↑		
Uridylat Kinase	luky			180-184 ↑	124-129 ↑	17-22 ↑	23-31	28-40	99-103 ↑	43-46 ↑		
UMP/CMP Kinase	lukd			169-173 ↑	110-118 ↑	7-12 ↑	13-21	18-31	86-89 ↑	33-36 ↑		
Adenylat Kinase	1ank			192-197 ↑	105-110 ↑	3-7 ↑	7-15	12-25	82-84 ↑	28-29 ↑		
Guanylat Kinase	1gky			164-167 ↑	116-121 ↑	4-7 ↑	8-15	13-25	94-98 ↑	29-31 ↑		
Deoxynukleo. Monop. Kin.	1del			219-222 ↑	191-196 ↑	2-7 ↑	8-16	13-25	170-173 ↑	26-28 ↑		
Phosphoribosyltransfer.	1ghp		303-305 ↑	329-331 ↑	276-278 ↑	340-345 ↑	346-353	351-364	368-373 ↑	412-415 ↑		
Adenylosucc. Synth.	1gin	421-424 ↓	410-414 ↑	326-330 ↑	261-267 ↑	3-8 ↑	8 11-17	15-24	218-221 ↑	29-32 ↑	65-68 ↑	97-99 ↑
Carboxykinase	1oen		371-373 ↓	435-440 ↑	354-361 ↑	243-247 ↑	248-255	253-259	233-237 ↓	264-267 ↑		

Tabelle 3.8: Überlagerung des zentralen β -Faltblattes

Kapitel 4

Strukturaufklärung der Enolpyruvyltransferase

Das Enzym Enolpyruvyltransferase (EPT) aus *E. coli* wurde an der Harvard University im Labor von C. Walsh kloniert und exprimiert (Marquardt et al. 1992, Marquardt 1993). An der ETH Zürich wurde unabhängig davon von Wanke et al. (1992) dasselbe Enzym des Bakteriums *E. cloacae* kloniert, exprimiert und aufgereinigt (Wanke 1993, Wanke et al. 1992). Dieses Enzym bildete die Grundlage für die strukturellen Untersuchungen an der EPT, die eine Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Pflanzenwissenschaften der ETH Zürich und den Max-Planck-Arbeitsgruppen für strukturelle Molekularbiologie waren. Auf Seiten der ETH Zürich in der Arbeitsgruppe Amrhein waren Christoph Wanke und später Florian Krekel beteiligt, in der Arbeitsgruppe Mandelkow in Hamburg Ernst Schönbrunn und Stefan Sack.

4.1 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Zusammenarbeit wurde die Struktur der Enolpyruvyltransferase bis zu einer Auflösung von 2.0 Å aufgeklärt (siehe auch Schönbrunn et al. (1996)). Das Enzym befand sich dabei im nativen Zustand, das heißt es hatte weder das Substrat Phosphoenolpyruvat noch den Hemmstoff Fosfomycin gebunden. Teile dieser Dissertation sind in die Veröffentlichungen Sack et al. (1996) sowie Schönbrunn et al. (1996) eingeflossen.

Mittlerweile ist es einer Arbeitsgruppe von Glaxo Wellcome gelungen, die Struktur von EPT in Anwesenheit von UDP-*N*-acetylglucosamin und Fosfomycin aufzuklären (Skarzynski et al. 1996) (PDB-Code 1uae). Hierauf wird an späterer Stelle in dieser Arbeit noch eingegangen (Abschn. 4.2.1).

4.1.1 Kristallographische Analyse der Enolpyruvyltransferase

4.1.1.1 Kristallisation der Enolpyruvyltransferase

Die Kristallisation wurde mit dem von F. Krekel aus Zürich geschickten Protein von Ernst Schönbrunn in Hamburg durchgeführt. Die Bedingungen der Kristallisation sind in Sack et al.

(1996) ausführlich beschrieben. An dieser Stelle wird deshalb nicht näher darauf eingegangen. Der Kristallisationspuffer bestand aus 0.8 M Na-K-Phosphat Puffer (pH 6.4) und einem Zusatz von 40 mM Cyclohexylammonium-Phosphat. Das Cyclohexylammonium-Phosphat war dabei für die Kristallisation unerlässlich. Der Grund dafür konnte später im Modell erkannt werden (s. Abschn. 4.1.5.7): das Cyclohexylammonium stabilisiert die Kristallpackung.

4.1.1.2 Bestimmung der Einheitszelldimensionen

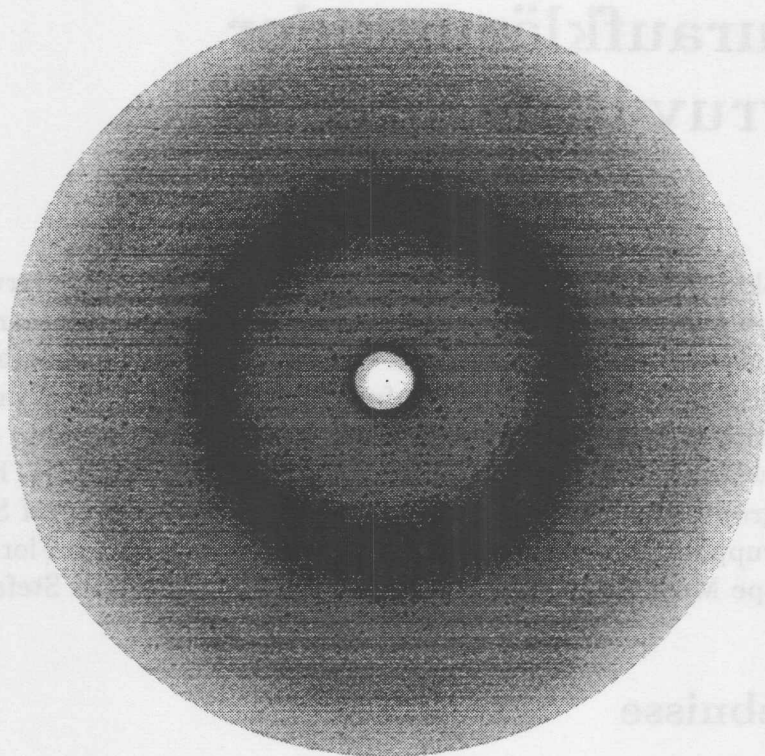


Abbildung 4.1: Drehkristallaufnahme von EPT, $\lambda = 0.99 \text{ \AA}$, $\Delta\phi = 1^\circ$, Kristall-Detektor-Abstand 140 mm

Abbildung 4.1 zeigt eine typische Beugungsaufnahme eines nativen EPT-Kristalls. Das Beugungsbild wurde an der Synchrotronstrahlführung X31 am Speicherring DORIS bei DESY mit einem Detektor der Firma MAR Research, Hamburg, (Radius $r = 90 \text{ mm}$) aufgenommen. Der Abstand zwischen Kristall und Detektor betrug dabei $x = 140 \text{ mm}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 0.99 \text{ \AA}$. Der Rand des Beugungsbildes lag damit bei 1.76 \AA . Die Drehung des Kristalls während dieser Aufnahme war $\Delta\phi = 1^\circ$.

Mit dem Program DENZO (Otwinowski und Minor 1997) wurden die Einheitszelldimensionen und die Raumgruppe bestimmt. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe $C2$ und hatten die Einheitszelldimensionen

$$\begin{aligned} a &= 86.9 \text{ \AA} \\ b &= 155.9 \text{ \AA} \\ c &= 83.8 \text{ \AA} \end{aligned}$$

$$\beta = 91.6^\circ$$

$$\alpha = \gamma = 90^\circ$$

4.1.1.3 Einfrierbedingungen für die Kristalle der Enolpyruvyltransferase

Die Kristalle der Enolpyruvyltransferase sind wie die meisten Proteinkristalle empfindlich gegen Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (s. Abschn. 2.3.3). Von einem EPT-Kristalle müssen unter Umständen Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von insgesamt 180° aufgenommen werden (falls die Orientierung relativ zur ϕ -Drehachse entlang einer ungünstigen Kristallachse verläuft), um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Deshalb ist es erforderlich, die Stabilität der Kristalle im Röntgenstrahl zu erhöhen. Dies läßt sich durch das Einfrieren der Kristalle vor dem Bestrahlen erreichen. Für EPT wurde als optimale Frostschutzlösung ein Gemisch aus dem Kristallisationsfällungsmittel (1.5 M Na-K-Phosphat-Puffer, sowie 40 mM Cyclohexylammonium Phosphat) und 35% Glycerol benutzt. Die Kristalle wurden in einer Schlaufe aus Zahnseide in einem freistehenden Film montiert (s. Teng (1990)) und konnten auf diese Weise nahezu beliebig lange bestrahlt werden, ohne daß die Qualität der Kristalle gelitten hätte.

4.1.1.4 Bestimmung der Selbstrotation

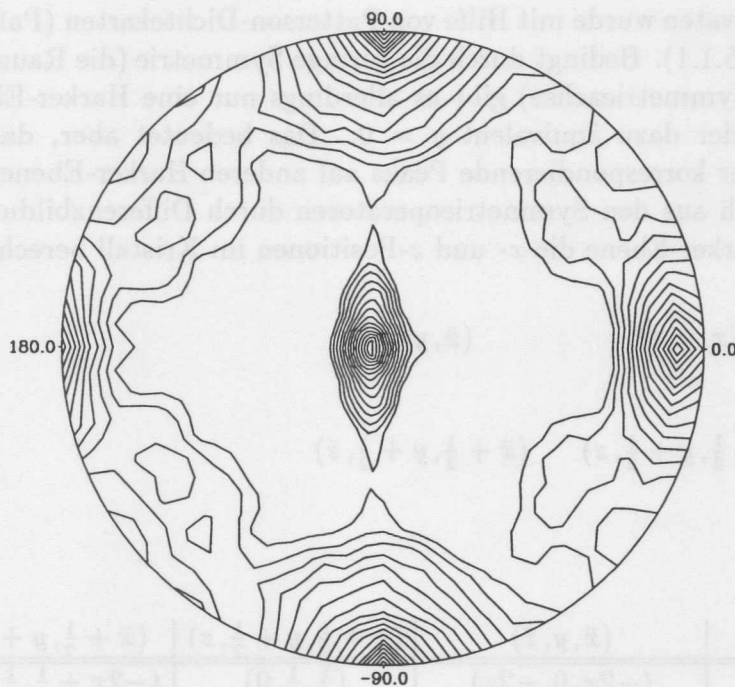


Abbildung 4.2: Polare Darstellung der Selbstrotationsfunktion von EPT. Dargestellt ist die $\kappa = 180^\circ$ -Sektion. Das Maximum liegt rechts bei $\omega = 85.2^\circ$ und $\phi = 0^\circ$.

Um die Anzahl der Moleküle in einer asymmetrischen Einheit zu bestimmen, wurde mit dem Programm POLARRFN (CCP4 1994) die Selbstrotation aufgrund der nativen Röntgendaten berechnet. In Abb. 4.2 ist die polare Darstellung der Ergebnisse der Selbstrotationsuche von EPT dargestellt. Man erkennt am rechten Rand deutlich das Maximum. Die dargestellte Polfigur entspricht dem Winkel $\kappa = 180^\circ$. Die weiteren Eulerwinkel ergeben sich zu $\omega = 85.2^\circ$ und $\phi = 0^\circ$.

Die Sektion $\kappa = 180^\circ$ ist charakteristisch für eine zweifache Symmetrie ($\frac{1}{2} \cdot 360^\circ$). Mit der Bestimmung der Selbstrotation konnte also gezeigt werden, daß zwei EPT-Moleküle in der asymmetrischen Einheit des Kristalls vorlagen. Dies wurde auch später in der Elektronen-

dichtekarte bestätigt und konnte genutzt werden, um das Modell zu bauen und später zu verfeinern.

Ein unabhängiger Test für diese Hypothese ist der Vergleich mit dem sogenannten Matthews-Parameter V_M (Matthews 1968). Dieser ergab bei einem Molekulargewicht von $M_r = 44.776$ Da nach Formel 2.10 einen Wert von $V_M = 3.17 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Dies liegt im Rahmen der von Matthews bestimmten Werte für Proteinkristalle, während der Wert für die Annahme nur eines Moleküls pro asymmetrischer Einheit mit $V_M = 6.34 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ deutlich darüber liegt. Geht man von zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit aus, erhält man einen Lösungsmittelanteil von $V_s = 61\%$ (nach Formel 2.11).

4.1.1.5 Suche nach Schweratomderivaten

Um eine Bestimmung der Phasen mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) durchführen zu können, wurde versucht, geeignete Schweratomderivate herzustellen. Dazu wurden EPT-Kristalle über verschiedene Zeiten in Lösungen von Schweratomsalzen eingelegt (Ernst Schönbrunn). Mit diesem als *Soaking* bezeichneten Verfahren, können Schweratomionen in die Kristalle eindiffundieren. Diese binden dann an spezifischen Stellen im Protein und modifizieren die Streufaktoren F_P . Aus der Veränderung von F_{HP} läßt sich auf die Phase schließen (s. Abschn. 2.5). Auf die Details des Soakings wird hier nicht eingegangen, sondern es sollen nur die Beugungsbilder und Datensätze der so veränderten Kristalle und die Suche nach geeigneten Schweratom-Verbindungen diskutiert werden.

Die Suche nach Schweratomderivaten wurde mit Hilfe von Patterson-Dichtekarten (Patterson 1934) durchgeführt (s. Abschn. 2.5.1.1). Bedingt durch die geringe Symmetrie (die Raumgruppe $C2$ hat nur eine zweizählige Symmetrieachse) gibt es allerdings nur eine Harker-Ebene. Diese befindet sich bei $y = \frac{1}{2}$ oder dazu äquivalent $y = 0$. Das bedeutet aber, daß man auftretende Dichtepikes nicht über korrespondierende Peaks auf anderen Harker-Ebenen verifizieren kann. Dennoch lassen sich aus den Symmetrieeoperatoren durch Differenzbildung aus der Position der Peaks auf der Harker-Ebene die x - und z -Positionen im Kristall berechnen.

$$\begin{array}{cc} (x, y, z) & (\bar{x}, y, \bar{z}) \\ (x + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, z) & (\bar{x} + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, \bar{z}) \end{array}$$

Differenz	(x, y, z)	(\bar{x}, y, \bar{z})	$(x + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, z)$	$(\bar{x} + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, \bar{z})$
(x, y, z)	—	$(-2x, 0, -2z)$	$(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$	$(-2x + \frac{1}{2}, \frac{1}{2}, -2z)$
(\bar{x}, y, \bar{z})	$(2x, 0, 2z)$	—	$(2x + \frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 2z)$	$(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$
$(x + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, z)$	$(-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, 0)$	$(-2x - \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, -2z)$	—	$(-2x, 0, -2z)$
$(\bar{x} + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, \bar{z})$	$(2x - \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, 2z)$	$(-\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, 0)$	$(2x, 0, 2z)$	—

Damit gelten für auf den Harker-Ebenen $y = 0$ bzw. $y = \frac{1}{2}$ gefundene Peaks (u, v, w) die Beziehungen:

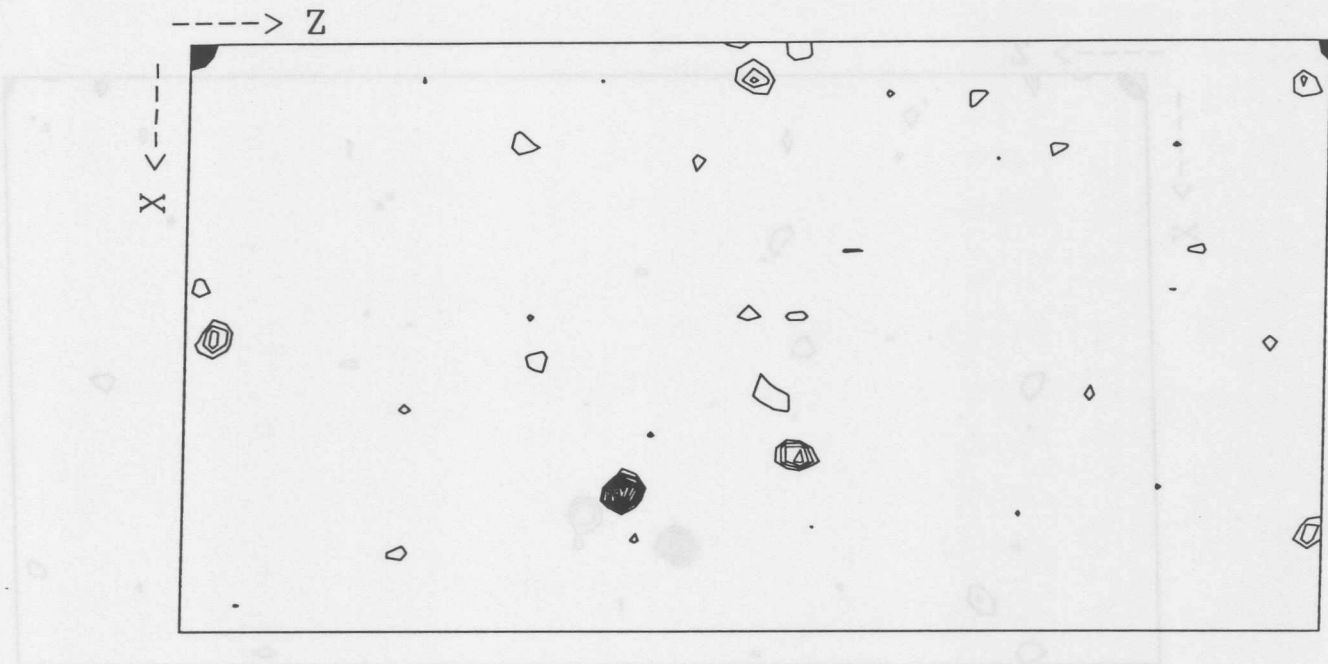


Abbildung 4.3: Harker-Ebene $y = 0$ der Patterson-Funktion des EPT mit $\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$

$$(u, v, w) = \left(-2x + \frac{1}{2}, \frac{1}{2}, -2z\right) \quad (4.1)$$

$$(u, v, w) = (2x, 0, 2z) \quad (4.2)$$

Allerdings gibt es keine Harkerebene in z - oder x -Richtung, was die Bestimmung der y -Koordinate ermöglichen würde. Diese muß später ermittelt werden. Es lassen sich für die y -Positionen zunächst nur die relativen Werte zwischen verschiedenen Peaks bestimmen.

Die Harker-Ebene $y = 0$ für die beiden Derivate $\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$ und $\text{KAu}(\text{CN})_2$ ist in den Abb. 4.3 und 4.4 dargestellt. Dabei läuft die relative x -Koordinate von 0 bis 0.5 und die relative z -Koordinate von 0 bis 1. Die beiden Derivatdatensätze waren an der Synchrotronstrahlführung X31 am Speicherring DORIS/DESY gemessen worden. Der native Datensatz war an der Strahlführung BW7b ebenfalls am Speicherring DORIS aufgenommen worden. Einige Peaks lassen sich direkt in der Pattersonkarte bestimmen, was durch die hohe Besetzung und gute Datenqualität bedingt ist. Mit der in Gln. 4.1 angegebenen Formel $(u, v, w) = (2x, 0, 2z)$ wurden diese Peaks interpretiert und die x - und z -Positionen der Schweratome im Kristall bestimmt. Mit diesen Startwerten, wurden mit dem Programm PHASES (Furey und Swaminathan 1997) erste MIRAS-Phasen berechnet. Mit deren Hilfe konnten weitere Peaks mit ersten Differenz-Fourier Karten gefunden werden.

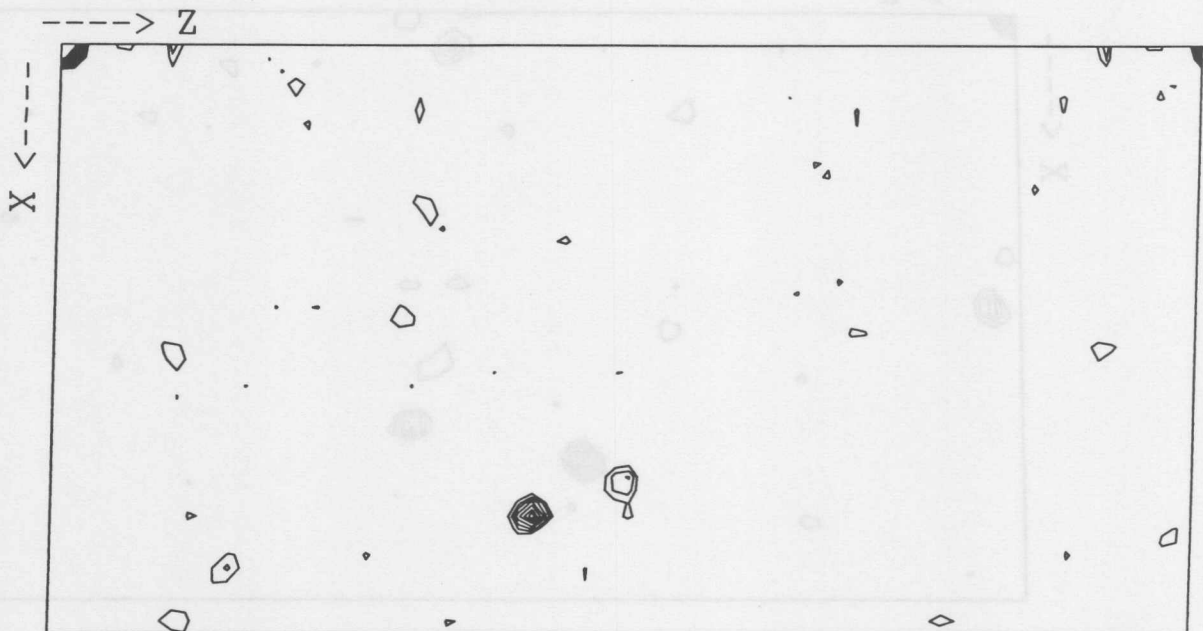


Abbildung 4.4: Harker-Ebene $y = 0$ der Patterson-Funktion des EPT mit $\text{KAu}(\text{CN})_2$

4.1.2 Phasenbestimmung

Nachdem die Schweratompositionen bestimmt worden waren, war es möglich, eine erste Phasenabschätzung durchzuführen.

4.1.2.1 MIRAS

Die Bestimmung der Phasen der Streufaktoren wurde mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes unter zusätzlicher Ausnutzung der vorhandenen anomalen Streusignale der eingebrachten Schwermetallatome Platin und Gold durchgeführt. Während der Messung an der Synchrotronstrahlung X31 am DESY war für die Optimierung der anomalen Signale eine Wellenlänge von $\lambda = 1.0 \text{ \AA}$ gewählt worden, die in der Nähe der L_{III} Absorptionskanten der als Schweratome eingesetzten Metalle Gold und Platin liegt (Au: 1.04 \AA , Pt: 1.07 \AA). Dies ermöglichte die zusätzliche Ausnutzung der anomalen Beugungseffekte in der Nähe dieser Absorptionskanten.

Eine erste Bestimmung der Phasen für die Kristalle der EPT wurde von A. Perrakis (EMBL-Hamburg) mit dem Programm PHASES (Furey und Swaminathan 1997) durchgeführt. Diese wurde dann mit den neuen Schweratom-Parametern sukzessive erweitert und verbessert.

Die Phasierung der nativen Daten läßt sich in drei Abschnitte unterteilen:

Datensatz	nativ	Gold	Platin
Auflösung	25 - 1.8 Å	25 - 2.0 Å	30 - 2.0 Å
Anzahl gemessener Reflexe	744 941	702 087	657 859
Anzahl reduzierter Reflexe	103 189	74 025	74 497
Vollständigkeit	99.8% (98.7%) [†]	97.9% (95.3%) [†]	98.0% (95.8%) [†]
R_{sym}	5.3% (29.0%) [†]	4.5% (27.4%) [†]	3.7% (13.6%) [†]
Anteil mit $\frac{I}{\sigma_I} > 2$	84.5% (60.9%) [†]	85.0% (56.7%) [†]	89.4% (74.8%) [†]
Bijvoet Paare		66 415	68 514
Vollständigkeit der Bijvoet Paare		96.9% (90.5%) [†]	97.0% (92.1%) [†]
$R_{sym,ano}$		3.6% (23.8%) [†]	3.0% (11.6%) [†]
Anteil mit $\frac{I}{\sigma_I} > 2$		81.2% (48.4%) [†]	86.4% (67.2%) [†]
Anz. der Schweratomstellen		5	6
Phasing Power (ano)		1.41 (1.22) [†]	1.99 (1.93) [†]
Phasing Power (iso)		1.66 (1.05) [†]	1.78 (1.12) [†]
Figure of merit		0.671 (0.761) ^{††}	
Anzahl phasierter Reflexe		57 441 (74 618) ^{††}	

[†]Angaben in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale

^{††} vor und (nach) Solvent Flattening und Phasenerweiterung

Tabelle 4.1: Datenqualität und Phasierungsstatistik von EPT

1. Die Bestimmung der Phasen von Reflexen, die in beiden Derivat-Datensätzen und im nativen Datensatz vorkommen (MIR, MIRAS),
2. die Bildung einer Protein-Maske außerhalb derer die Dichte auf Null gesetzt wird (*Solvent flattening*) und
3. die Erweiterung der Phaseninformation durch Extrapolation auf Reflexe, die nur im nativen Datensatz gemessen wurden.

Das Software-Paket PHASES bietet dazu einen kompletten Satz von aufeinander abgestimmten Programmen an. Die Phasen wurden dabei entsprechend des in Abschn.2.8.1.2 beschriebenen und auch für die Phasierung des dimeren Kinesin verwendeten Algorithmus bestimmt.

Anschließend wurde die übliche Lösungsmittelglättung vorgenommen. Dabei wurde ein Lösungsmittelanteil von $V_s = 60\%$ eingesetzt. Dieser Wert ist gleich demjenigen, der in Abschn. 4.1.1.4 berechnet wurde. Er lieferte gute Ergebnisse, was darauf zurückzuführen ist, daß das Molekül eine globuläre Struktur hat, anders als etwa bei Solvent Flattening für das Kinesin-Dimer (Abschn. 3.1.1.4).

Die Datenqualität und abschließende Phasierungsstatistik ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

4.1.2.2 Xenon-Methode

Eine weitere Methode, Schweratome in Proteinkristalle einzubringen ist von Schiltz et al. (1994) entwickelt worden. Dazu werden in einer Kapillare montierte Kristalle in Xenon-Atmosphäre

unter einem Druck von 12 bar in den Röntgenstrahl gebracht. Dadurch diffundieren Xenon-Atome in den Kristall ein und können als Schweratome für das Verfahren des isomorphen Ersatz genutzt werden.

Das Xenon-Verfahren wurde auch für die Lösung der EPT-Struktur als eine Möglichkeit in Betracht gezogen, Schweratomderivate zu erhalten. Dazu wurde an der Wiggler-Strahlführung W32 am LURE-DCI Speicherring in Orsay/Frankreich ein EPT-Datensatz aufgenommen.

Ein Nachteil, der sich als besonders hinderlich für die Datensammlung erwies, war die Tatsache, daß man bei dieser Methode die Kristalle nicht, wie sonst üblich, in einem Strom von verdampfendem Stickstoff einfrieren kann. Wie bereits oben (S.81) ausgeführt, müssen die EPT-Kristalle vor der Bestrahlung mit Röntgenstrahlung eingefroren werden. Dies war bei dieser Methode nicht möglich, da das Xenon durch hohen Druck in der Kapillare per Diffusion in den Kristall gebracht werden muß. Dies macht aber eine gleichzeitige Kühlung mit Stickstoff auf -190°C unmöglich. Es war lediglich möglich, durch einen Strom kühler, trockener Luft eine Temperatur von 4°C während der Messung aufrechtzuerhalten.

Dennoch gelang es, einen kompletten Datensatz bis zu 2.4 \AA Auflösung aufzunehmen. Allerdings waren die Reflexe jenseits von 2.8 \AA sehr schwach, so daß die für die Strukturbestimmung verwendbare effektive Auflösung¹ ebenfalls nur bei etwa 2.8 \AA liegt. Eine Phasierung mit diesen Daten war damit nicht möglich, da die Auflösung im Vergleich zu den Gold- und Platindaten nicht ausreichte, um zusätzliche Phasen-Informationen zu liefern.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Xenon-Atome in den Kristall eindiffundiert waren. Auf die Bindungsstellen wird an späterer Stelle (Abschn. 4.1.3, S.87) noch eingegangen. In Abbn. 4.7 und 4.8 sind zusätzlich Differenz-Fourier-Elektronendichten mit dem endgültigen Modell und einem gebundenen Xenon-Atom dargestellt.

4.1.2.3 Molekularer Ersatz mit EPSP-Synthase

Eine weitere Möglichkeit, die Struktur der EPT zu lösen, bestand darin, das Modell der EPSP-Synthase (Stallings et al. 1991) als ein Suchmodell zu verwenden. Diese Annahme gründete darauf, daß die beiden Proteine (s. Abschn. 1.3.3) sich in ihrer Funktion sehr ähneln und auch eine gewisse Übereinstimmung der Aminosäuresequenz haben. Die Aminosäuresequenz weist eine Identität von 25% und eine Homologie von sogar 47% der beiden Proteine auf (Wanke et al. 1992).

Erschwert wurde dies allerdings dadurch, daß nur die C^{α} -Koordinaten der EPSP-Synthase in der ProteinDataBank deponiert (PDB-Code: leps).

Versuche, die Röntgen-Daten der EPT mit den EPSP-Synthase Modellphasen zu phasieren scheiterten und lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Rückblickend ist dies nicht weiter überraschend, da sich die beiden Moleküle zwar stark ähneln, ihre beiden Domänen aber gegeneinander verschoben sind (s. Abb. 4.22), so daß eine Phasierung mit dem Gesamtmodell nicht zu einem Erfolg führen konnte. Eine Phasierung mit den beiden Teildomänen sollte möglich sein, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die Phasen bereits anderweitig bestimmt worden waren.

¹Als effektive Auflösungsgrenze wird hier die Schale bezeichnet, in der $R_{sym} < 20\%$ ist, und höchstens 20% der Reflexe $\frac{I}{\sigma_I} < 2$ aufweisen

4.1.3 Fourierdifferenzdichtekarten

Berechnet man die Fourier-Differenz-Elektronendichtekarten mit Hilfe der Modellphasen aus der verfeinerten Struktur, so lassen sich die eindiffundierten Schweratome als hervorstechende Differenzpeaks erkennen (Abb. 4.5 und 4.6).

4.1.3.1 Gold- und Platin-Derivate



Abbildung 4.5: Bindungsstelle des Pt-Ions (blau) und des Au-Ions (grün) an Asp51

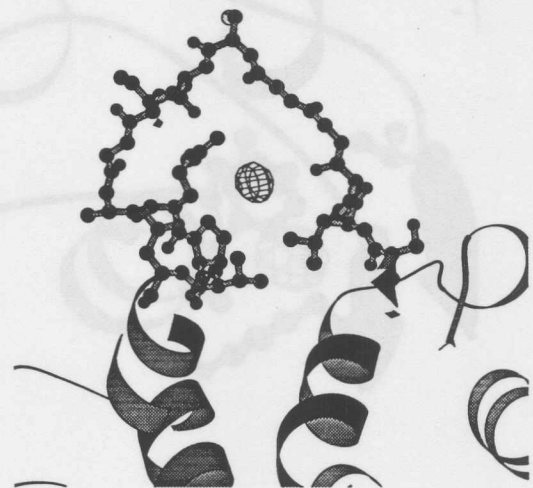


Abbildung 4.6: Bindungsstelle des Pt-Ions im Loop 112-121

Die Bindungsstellen der Schweratome **Gold** und **Platin** sind dabei in zwei Fällen identisch. Die beiden größten Peaks in der Differenzdichte rühren von Platin- bzw. Gold-Ionen her, die jeweils an den Resten Asp51 der beiden Monomere gebunden sind (Abb. 4.5). Diese Stelle befindet sich an der Oberfläche des Proteins und ist deshalb für den Diffusionsprozeß gut zugänglich.

Das Platin-Derivat zeigt dazu noch Peaks im Bereich des Loops 111-122. In der von der Polypeptidkette aufgespannten Schlaufe befindet sich eine Bindungsstelle für Platin-Ionen. Diese liegt in der direkten Verbindungslinie zwischen den beiden den Loop begrenzenden Resten Pro112 und Pro121. In Abb. 4.6 ist die Stelle (Monomer A) mit der Differenz-Fourier-Elektronendichte bei einem Niveau von 6σ in blau eingezeichnet. Man erkennt die Position des Pt-Ions in der vom Loop 111-122 aufgespannten Schlaufe. Im Monomer A ist dieser Stelle als ein einzelner Peak zu erkennen, im Monomer B erscheinen dagegen zwei leicht gegeneinander verschobene Dichtebereiche. Im Monomer B ist dieser Loop schlechter geordnet als in Monomer A. Dies dürfte der Grund dafür sein, daß die Bindungsstelle etwas delokalisiert ist.

Das Gold-Derivat zeigt diese Bindungsstelle nicht. Stattdessen hat es eine zusätzliche Bindungsstelle an der Verbindung zwischen den beiden Monomeren (s. auch Abschn. 4.1.5.7). Dort

bindet es in der Gegend zwischen Glu274(MonB) und Lys248(MonA) und sorgt damit für eine weitere Stabilisierung dieser Region.

4.1.3.2 Xenon-Derivat

Das in LURE gemessene Xenon-Derivat zeigte zwei Bindungsstellen pro EPT-Molekül (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Aus den in Abschn.4.1.2.2 bereits genannten Gründen, wurde es allerdings nicht zur Phasierung herangezogen.

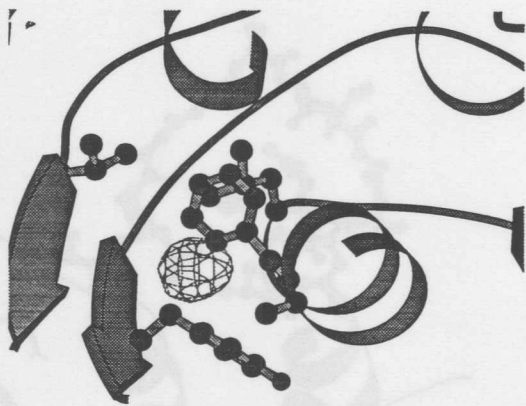


Abbildung 4.7: Xenon-Bindungsstelle zwischen Ila und Iic

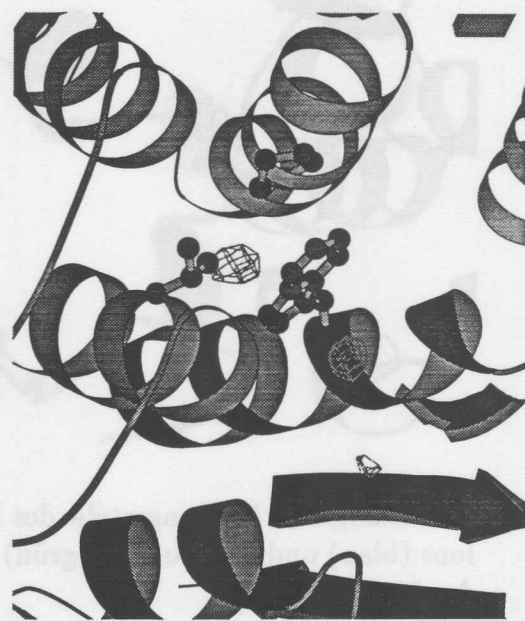


Abbildung 4.8: Xenon-Bindungsstelle in der Nähe von Trp95

Die erste und markantere der beiden befindet sich in einer hydrophoben Tasche, die von den Resten Val39, Phe197, Ala200, Leu201, Val225 und Tyr226 gebildet wird. Sie liegt damit im Bereich der Verbindung zwischen den Faltungseinheiten Ila und Iic (s. Abschn. 4.1.5.4).

Das Xenon-Atom, das als Edelgasatom nur von den Van-der-Waals-Bindungen umgeben werden kann, ist damit an einer Position, die mit den Erwartungen für eine mögliche Bindungsstelle übereinstimmt. Dasselbe gilt für die zweite Position. Diese befindet sich zwischen drei Helices in Domäne II. Dort liegt das Xenon-Atom zwischen den drei α 1-Helices von Ila, Iib und Iic. Auch hier ist die Umgebung wiederum stark hydrophob. Von den drei Helices befindet sich jeweils ein hydrophober Rest in unmittelbarer Nähe des Xe-Atoms (Pro27(Iib), Trp95(Iic), Leu167(Ila)). In der Umgebung dieser Stelle befindet sich im Monomer B noch eine weitere schwach besetzte Stelle. Die beiden Stellen liegen auf den beiden Seiten des Tryptophans Trp95 (Abb. 4.8).

4.1.4 Verfeinerung der Struktur der Enolpyruvyltransferase

4.1.4.1 Modellbau der Enolpyruvyltransferase

Das Modell der Enolpyruvyltransferase wurde im Rahmen der Strukturlösung der EPT von Ernst Schönbrunn gebaut, ausgehend von mit dem Programm GMAP aus der PHASES-Suite erzeugten Skelett von C α -Positionen. Es wird hier auf den Bau des ersten Modells nicht weiter eingegangen. Stattdessen soll das Refinement und letzte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Umbauzyklen der EPT-Struktur beschrieben werden.

Die Verfeinerung der Enolpyruvyltransferase Struktur wurde unter Benutzung der Programme X-PLOR (Brünger 1992b) und PROLSQ (Hendrickson 1985) sowie ARP (Lamzin und Wilson 1993) durchgeführt. X-PLOR und ARP wurden bereits kurz in Abschn. 3.1.3 bzw. in Abschn. 3.1.3.8 beschrieben. PROLSQ ist ein Programm aus der CCP4-Suite (CCP4 1994), mit dem mit einer Verfeinerung der kleinsten Quadrate (*least-square*) gearbeitet wird. Dieses Programm liefert ähnlich wie REFMAC, das zum Zeitpunkt der Strukturaufklärung (Anfang 1996) noch nicht frei verfügbar war, bessere stereochemische Ergebnisse und eine bessere Platzierung der Wasser als X-PLOR.

Der Fortschritt der Verfeinerung wurde dabei mit Hilfe des normalen kristallographischen Residuals R und dem freien R -Wert, R_{free} (Brünger 1992a; 1993), überprüft. Auf die Definition und Bedeutung der beiden Werte wurde oben (S. 39, Gln. 3.1-3.2) schon eingegangen. Es wurden 10% der Reflexe zufällig ausgewählt und während des ganzen Refinements nicht mit verfeinert.

4.1.4.2 Simulated Annealing

Nachdem einer der beiden Monomere in der experimentellen Elektronendichtekarte gebaut worden war, wurde mit der Verfeinerung der Struktur begonnen. Es wurden mit dem Programm X-PLOR Simulated Annealing-Läufe durchgeführt, um eventuell falsch interpretierte Elektronendichte zu korrigieren. Allerdings war die Qualität der Dichtekarte gut genug, um bereits mit den MIRAS-Phasen die meisten Bereiche der Struktur der Dichte zuordnen zu können.

In Abb. 4.9 ist der Verlauf der Verfeinerung mit X-PLOR dargestellt. Der erste Teil der Kurve gibt die Verfeinerung des ersten Modells wieder. Im zweiten Schritt (starker Abfall kurz vor Iteration 500) wurde dieses um das mit Hilfe der nicht-kristallographischen Symmetrie bestimmte zweite Molekül ergänzt. Dieses wurde nicht unabhängig gebaut, sondern aus dem ersten durch Anwendung der NCS-Operatoren erzeugt. Die beiden Moleküle wurden dann in diesem Verfeinerungsschritt unter Berücksichtigung der nichtkristallographischer Symmetrie verfeinert (etwa bis Iteration 1800). Nach Durchsicht der Elektronendichtekarte am 3D-Graphik-Rechner wurde in beiden Molekülen unabhängig voneinander umgebaut. In den nachfolgenden drei Verfeinerungsläufen wurde auf den Einsatz der nichtkristallographischen Symmetrie verzichtet.

Nach jedem Verfeinerungslauf wurde das neue Modell in der Elektronendichte vollständig durchgegangen und kritische Bereiche korrigiert (E. Schönbrunn). Am Ende der Verfeinerung mit X-PLOR waren beide Moleküle vollständig gebaut. Im letzten Lauf wurden 300 gebundene Wassermoleküle in die Struktur integriert, die mit dem Programm ARP und durch Durchsicht der Dichtekarten identifiziert werden konnten.

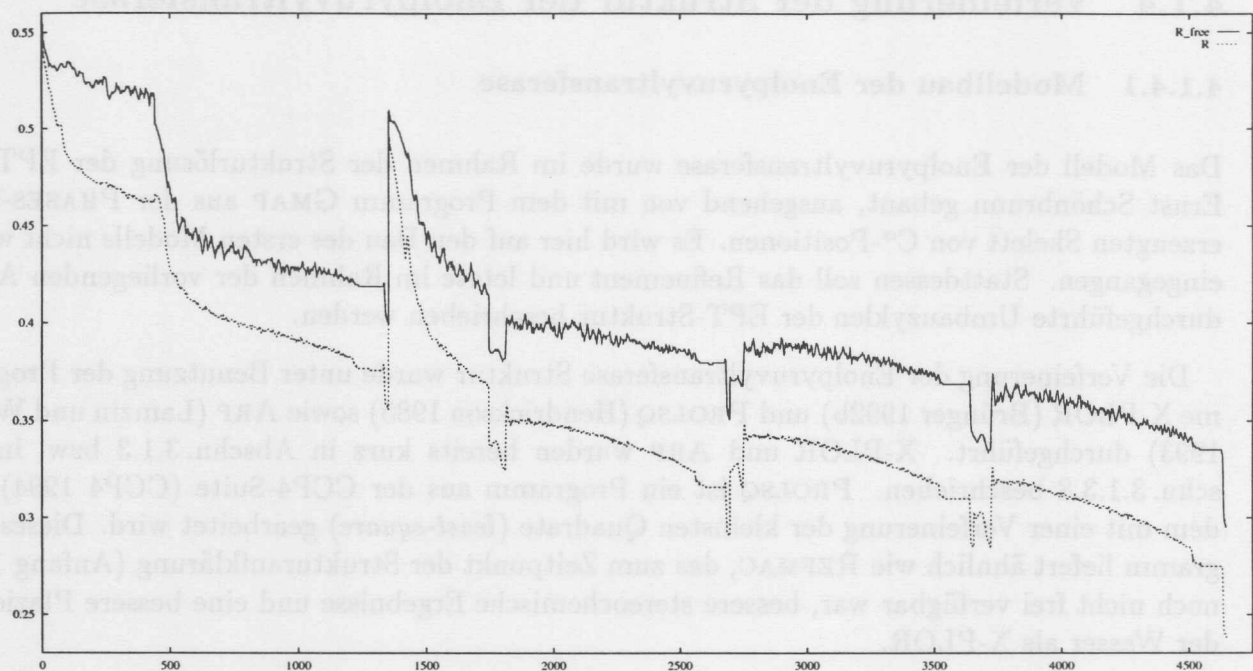


Abbildung 4.9: EPT Verfeinerung: Simulating Annealing Läufe

4.1.4.3 Suche nach gebundenen Wassermolekülen

Die Suche nach gebundenen Wassermolekülen wurde, wie in Abschn. 3.1.3.8 für Kinesin beschrieben, mit dem Programm ARP (Automated Refinement Procedure) (Lamzin und Wilson 1993) durchgeführt. Es wurden auch hier dieselben Kriterien angewendet. Eine weitere Verfeinerung mit Simulierten Annealing-Läufen unter Verwendung des Programms X-PLOR führte allerdings bei vielen Wassermolekülen dazu, daß sie nicht an ihrem aus der Elektronendichte bestimmten Platz blieben, sondern stark verschoben wurden. Das liegt daran, daß bei der simulierten Aufheizung die Wasserstoffbrückenbindungen leicht aufgetrennt werden können und die Wassermoleküle dann durch die simulierte thermische Bewegung ihren Bindungsplatz verlassen. An dieser Stelle wurde die Verfeinerung mit PROLSQ fortgesetzt.

4.1.4.4 Verfeinerung mit der Methode der kleinsten Quadrate

PROLSQ (Hendrickson 1985, CCP4 1994) ist ein Programm, das eine Verfeinerung mit der Methode der kleinsten Quadrate vornimmt. Es wurde zusammen mit ARP eingesetzt, um die Positionen von gebundenen Wassern zu bestimmen und anschließend zu verfeinern. Allerdings ist im Gegensatz zu simuliertem Annealing wie es in X-PLOR implementiert werden kann, der Konvergenzradius der least-squares Verfeinerung erheblich kleiner. Deshalb wurde diese Art der Verfeinerung erst eingesetzt, als das Modell bereits sehr gut verfeinert war. Da PROLSQ und ARP eine bessere Behandlung der gebundenen Wasser ermöglichen, wurden vier letzte Verfeinerungsrunden mit diesen beiden Programmen durchgeführt. Dabei wurden neben Wassern auch das Cyclohexylammonium sowie das am Arg232 gebundene Phosphat eingefügt.

4.1.5 Struktur der Enolpyruvyltransferase

Ein Stereobild der Enolpyruvyltransferase ist in Abb. 4.10 dargestellt. Im oberen Teil ist das sogenannte *Rückgrates* oder *backbone* dargestellt. Dieses verbindet die C^α -Atome des Moleküls. Die unteren Hälfte des Bildes zeigt eine schematische Darstellung der Faltung des Moleküls in Stereo².

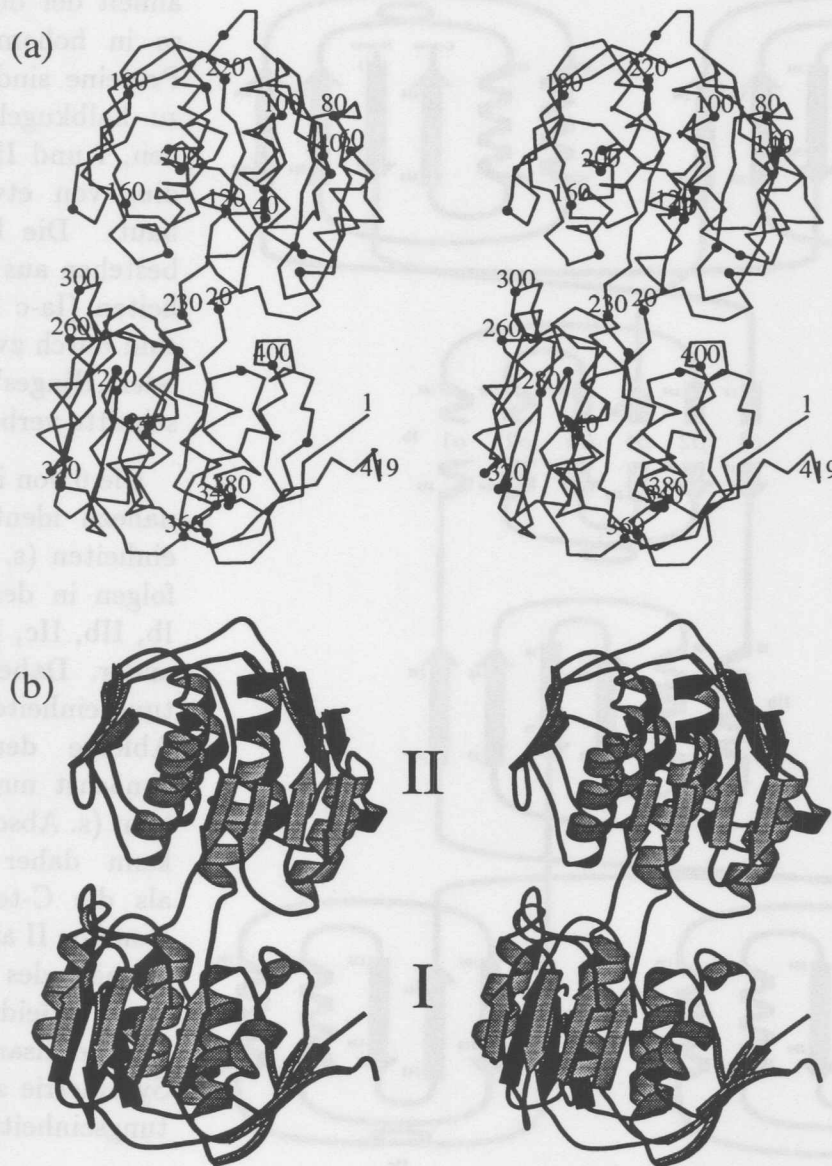


Abbildung 4.10: Stereo Bilder von EPT: (a) Verbindung der C^α -Atome. Jede zehnte Aminosäure ist mit einem Punkt hervorgehoben und jede zwanzigste zusätzliche numeriert. (b) Schematische Darstellung der Faltung des Moleküls.

Die Struktur des Proteins ist bemerkenswert, da die β -Faltblätter auf der Außenseite des Moleküls liegen. Man kann, in Abwandlung einer typischen Proteinstrukturklasse, dieses Protein daher als ein Inside-out- α - β -Barrell bezeichnen.

²Zur Betrachtung von Stereobildern siehe Fußnote 1 auf Seite 31.

4.1.5.1 Topologie der Enolpyruvyltransferase

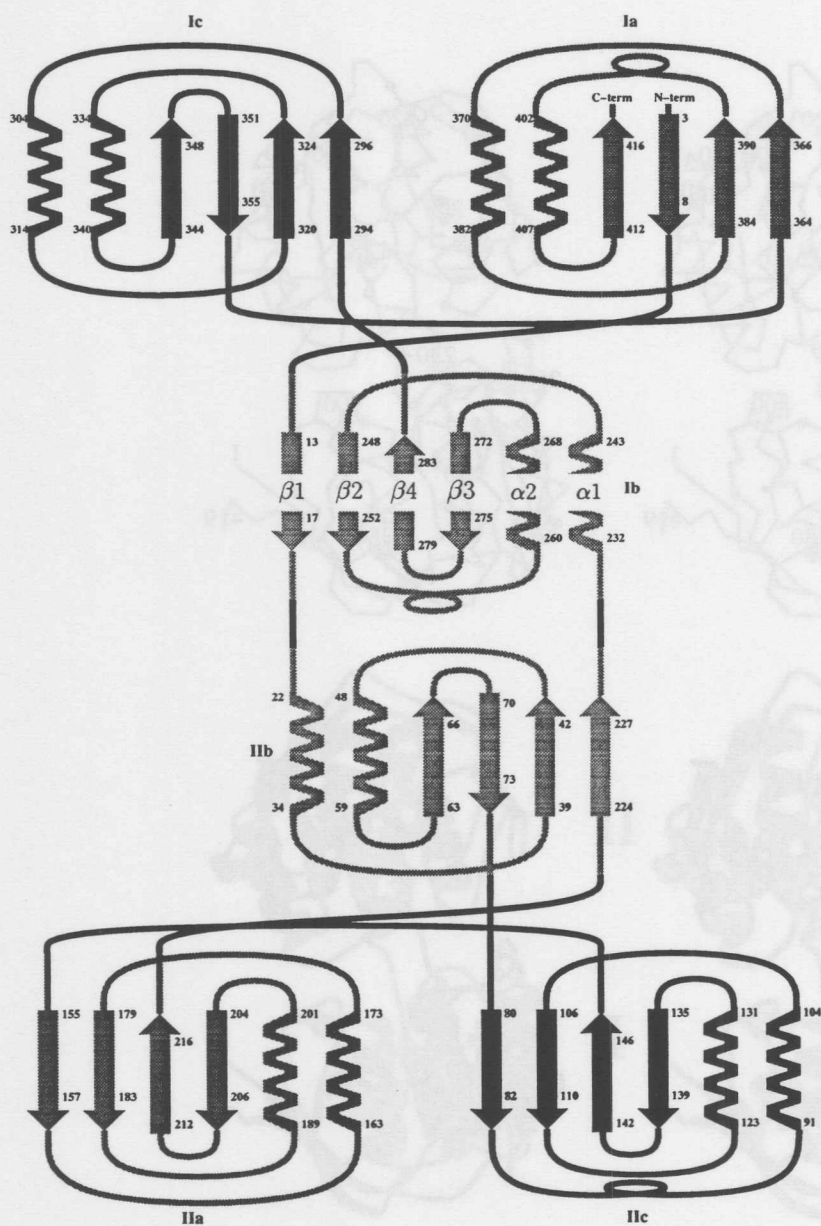


Abbildung 4.11: Topologie der Enolpyruvyltransferase. Das Protein besteht aus zwei Domänen I und II, die aus je drei topologisch gleichen Faltungseinheiten a,b,c aufgebaut sind.

Die Topologie der Enolpyruvyltransferase (Abb.4.11) ähnelt der der EPSP-Synthase in hohem Maße. Beide Proteine sind aus zwei nahezu halbkugelförmigen Domänen, I und II, mit einem Radius von etwa 25 Å aufgebaut. Die beiden Domänen bestehen aus je drei Untereinheiten (Ia-c sowie IIa-c) und sind durch zwei als Scharniere oder „Hinges“ bezeichnete Abschnitte verbunden.

Die 6 von ihrem Aufbau her nahezu identischen Faltungseinheiten (s. Abschn. 4.1.5.2) folgen in der Reihenfolge Ia, Ib, IIb, IIc, IIa, Ib, Ic aufeinander. Dabei werden die Faltungseinheiten Ia und Ib in der Abfolge der Primärsequenz zunächst nur teilweise aufgebaut (s. Abschn. 4.1.5.2). Man kann daher die Domäne I als die C-terminale und die Domäne II als die N-terminale Domäne des Moleküls bezeichnen. Beide Domänen weisen gleichsam eine dreizählige Symmetrie zwischen den Faltungseinheiten auf.

Die einzelnen Faltungseinheiten sind in der Abbildung 4.11 farbkodiert dargestellt: in rot Ia und IIa, in grün Ib und IIb sowie in blau Ic und IIc. Diese Farbkodierung wird auch in den weiteren

Übersichtsabbildungen über die EPT beibehalten. Detailliertere Betrachtungen zum Aufbau der Faltungseinheiten und des Übergangsbereiches werden in den folgenden Abschnitten (Abschn. 4.1.5.2 bzw. Abschn. 4.1.5.6) durchgeführt.

4.1.5.2 Faltungseinheit der EPT

Die beiden Hälften des EPT, Domänen I und II, sind aus je drei nahezu identischen Bausteinen aufgebaut. Jede dieser sechs Faltungseinheiten besteht aus vier β -Strängen, die ein gemischtes β -Faltblatt bilden und zwei α -Helizes. In Abb.4.12 erkennt man die Ähnlichkeit der einzelnen Bausteine. Nur geringe Unterschiede sind in den Loop-Regionen zu erkennen. So wird bei den Faltungseinheiten Ia und Ib der Loop zwischen dem Strang β_2 und α_2 zu einer kurzen Helix verändert. Ansonsten variieren allenfalls die Länge der Sekundärstrukturelemente und der Loops.

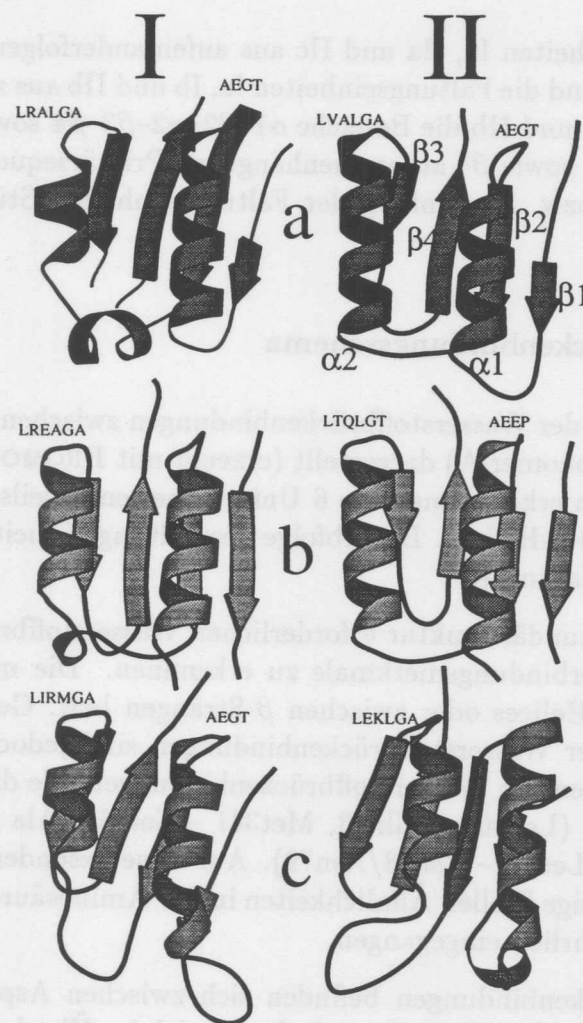


Abbildung 4.12: Faltung der Unterheiten der Enolpyruvyltransferase

Allerdings sind nicht alle diese Faltungseinheiten aus in der Primärsequenz aufeinanderfolgenden Regionen gebildet. Es wird also nicht unbedingt erst eine Faltungseinheit „fertiggestellt“ bevor die nächste begonnen wird, sondern einzelne Bestandteile der Faltungseinheiten können in unterschiedlichen Bereichen der Primärsequenz lokalisiert sein (s. Tab. 4.2).

Faltungseinheit	Abfolge	Reste
Ia	$\beta_4, \beta_1-\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3$	3-8, 363-416
Ib	$\beta_1, \alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4$	12-18, 231-284
Ic	$\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4$	292-356
IIa	$\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4$	154-217
IIb	$\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4, \beta_1$	21-73, 224-228
IIc	$\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4$	80-147

Tabelle 4.2: Schema der Faltungseinheiten der EPT

Während die Faltungseinheiten Ic, IIa und IIc aus aufeinanderfolgenden Teilen der Primärsequenzen aufgebaut sind, sind die Faltungseinheiten Ia, Ib und IIb aus zwei Stücken zusammengesetzt. Dabei bilden bei Ib und IIb die Bereiche $\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3-\beta_4$ sowie β_1 und bei Faltungseinheit Ia $\beta_1-\alpha_1-\beta_2-\alpha_2-\beta_3$ sowie β_4 zusammenhängende Primärsequenzbereiche (s. Tab. 4.2). Es werden also am Ende bzw. am Anfang der Faltungseinheiten Stücke vorher oder später angesetzt.

4.1.5.3 Wasserstoffbrückenbindungsschema

In Abb. 4.13 ist das Schema der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hauptkettenatomen der Enolpyruvyltransferase (Monomer A) dargestellt (erzeugt mit PROMOTIF von Hutchinson und Thornton (1996)). Deutlich erkennt man die 6 Untereinheiten jeweils mit dem viersträngigen β -Faltblatt ($\uparrow\downarrow\uparrow\uparrow$) und zwei α -Helices. Die Abfolge der Faltungseinheiten von links nach rechts ist dabei: Ia, Ib, IIb, IIc, IIa und Ic.

Neben den durch die Sekundärstruktur erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen sind einige wenige zusätzliche Verbindungsmerkmale zu erkennen. Die meisten davon sind nicht ideale Verbindungen in α -Helices oder zwischen β -Strängen bzw. Gebiete unmittelbar davor und dahinter. Einige dieser Wasserstoffbrückenbindungen sind jedoch besonders interessant. Dies sind insbesondere diejenigen Wasserstoffbrückenbindungen, die die einzelnen Untereinheiten miteinander verbinden (Leu409 – Gln13, Met341 – Ser361, Ala 269 – Lys290, Leu201 – Gly222, Leu132 – Lys152, Leu60 – Asn78/Asn79). Auf diese besonderen Bereiche, die auch in der Primärstruktur als einzige Stellen Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweisen, wird im Abschnitt 4.1.5.4 ausführlich eingegangen.

Weitere Wasserstoffbrückenbindungen befinden sich zwischen Asp231 NH ... O=C Ser19 und Ala21 NH ... O=C Leu229. Diese Reste befinden sich im Überkreuzungsbereich zwischen den beiden Domänen I und II, dem Scharnier zwischen beiden Domänen. Die Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren daher die Verbindung zwischen den beiden Domänen. Auf den Scharnier-Bereich wird im Abschnitt 4.1.5.6 ausführlich eingegangen. Dazu kommen noch die Wasserstoffbrücken zwischen: Ile392 – Asp2, Val218 – Thr174, Val357 – Leu315, Thr10 – Cys381. Dies sind allerdings Verbindungen, die nicht idealen Sekundärelemente entsprechen. Sie lassen sich jeweils als Verlängerungen der β -Stränge interpretieren.

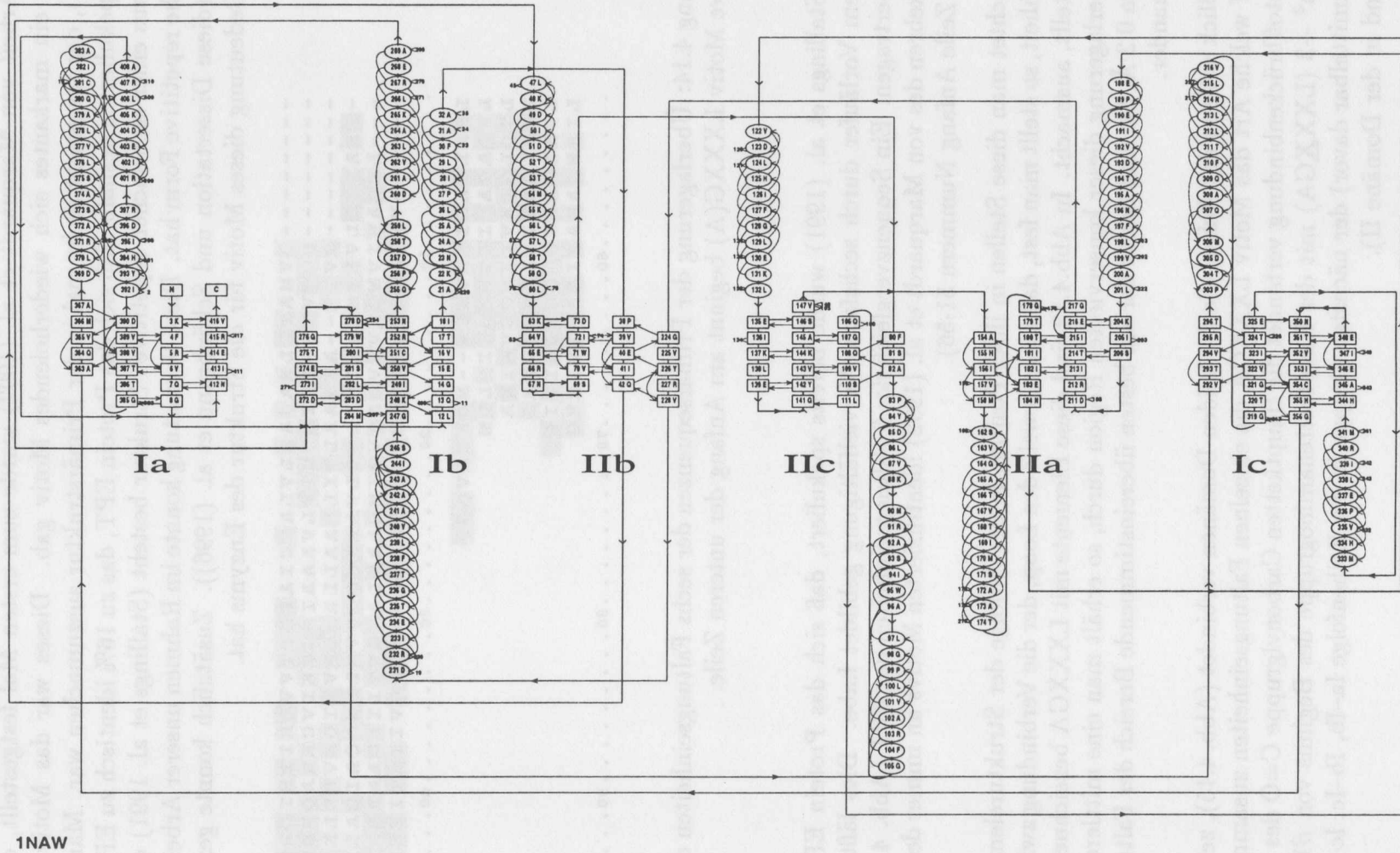


Abbildung 4.13: Wasserstoffbrückenbindungsschema der EPT

4.1.5.4 Das Motiv LXXXG(A)

In der Arbeit von Marquardt et al. (1992) wurde zum ersten Mal festgestellt, daß es in der Sequenz ein markantes sich wiederholendes Motiv gab. Dieses war das Motiv Leu-X-X-X-Gly(Ala), das insgesamt sechs mal in der Primärstruktur auszumachen war. Marquardt et al. (1992) spekulierten deshalb, daß sich das Protein EPT, das zu 16% identisch zu EPSP-Synthase ist, die aus einer sechsfachen repetitiven Struktur besteht (Stallings et al. 1991) ebenfalls eine sechsfache repetitive Form hat. Diese Vermutung konnte im Rahmen unserer Arbeiten bestätigt werden (diese Dissertation und Schönbrunn et al. (1996)). Zusätzlich konnte gezeigt werden, welche Bedeutung dieses Motiv für die Struktur des Enzyms hat.

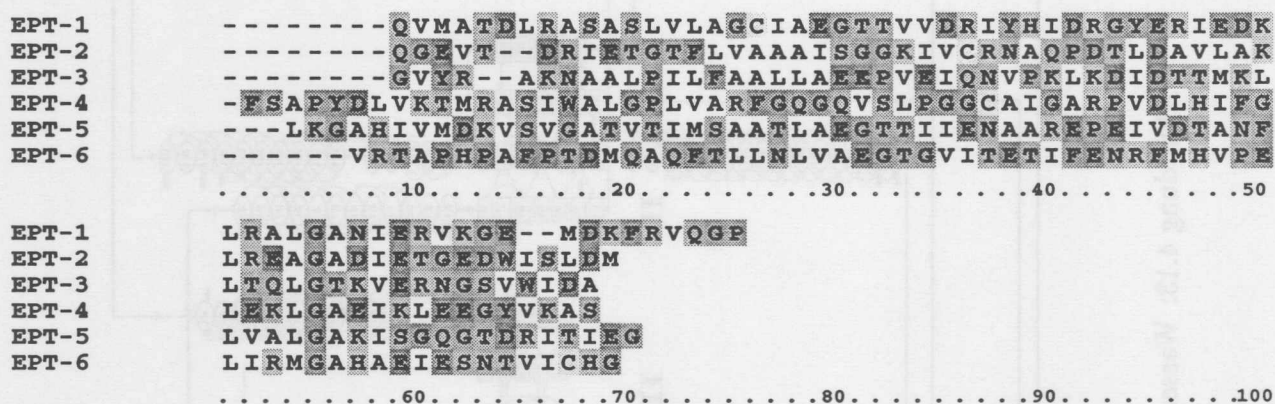


Abbildung 4.14: Überlagerung der Primärsequenzen der sechs Faltungseinheiten der EPT. Das repetitive Motiv LXXXG(A) beginnt am Anfang der unteren Zeile.

Von Stallings et al. (1991) wurde bereits spekuliert, daß sich das Protein EPSP-Synthase aus einem Vorläufer durch sechsfache Vervielfältigung gebildet habe. Dies läßt sich auf die EPT übertragen. Ein Sequenzvergleich der 6 Faltungseinheiten der EPT (Abb. 4.14) zeigt das Wiederkehren des von Marquardt et al. (1992) identifizierten Motivs an immer derselben Stelle (untere Zeile Anfang Nummern 51-56).

Betrachtet man diese Stellen in ihrer Position in der Abfolge der Strukturelemente der Faltungseinheit, so stellt man fest, daß dieses jeweils den Loop, der die Verbindung zwischen α_2 und β_3 darstellt, ausmacht. In Abb.4.12 sind diese Elemente mit LXXXGA bezeichnet. Führt man eine Überlagerung dieser konservierten Region durch, so erhält man eine mittlere Abweichung von etwa 0.2 Å. Sie sind damit der am besten übereinstimmende Bereich der Faltungseinheiten untereinander.

Ein Blick entlang der Achse, die die beiden Domänen verbindet (Abb. 4.15), zeigt sehr deutlich, auf welche Art das Motiv LXXXGA die einzelnen Faltungseinheiten zusammenhält. Eine Wasserstoffbrückenbindung verbindet die Hauptketten Carbonylgruppe C=O des Restes an der Position³ +3 (LXXXGA) mit der Hauptkettenaminogruppe des Beginns von β_1 (oder einem Rest unmittelbar davor) der nächsten Gruppe in der Reihenfolge Ia-Ib, Ib-Ic, Ic-Ia (bzw. entsprechend in der Domäne II).

³Die relative Position bezieht sich dabei auf das konservierte L des Motivs LXXGA, das Position +1 entspricht.

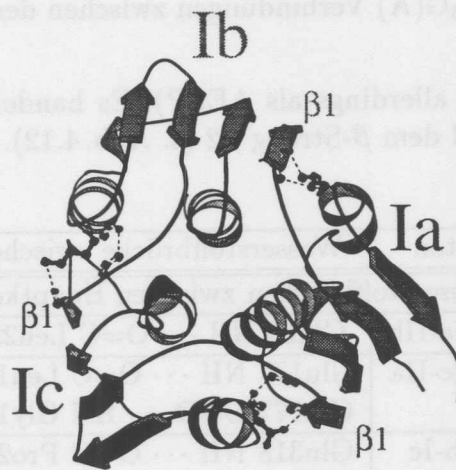
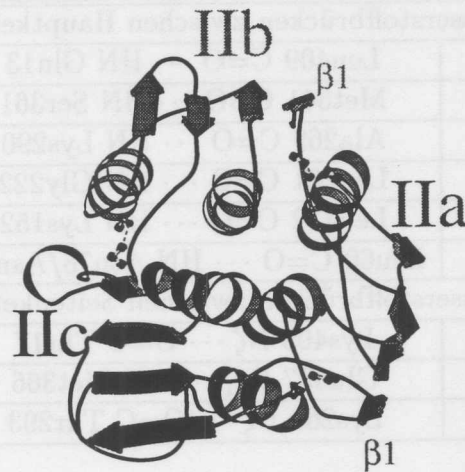


Abbildung 4.15: Verbindung der Faltungseinheiten der Enolpyruvyltransferase. Gezeigt ist der Blick durch die Domänen I (unten) und II (oben) entlang der dreizähligen Symmetrieachse.

Interessanterweise gibt es noch weitere Wasserstoffbrückenbindungen, die die Domäne I zusätzlich verstärken (s. Tab. 4.3). Dabei sind die geladenen Reste der Position -1 (in Helix α_2) an der Bindung beteiligt. Dies sind entweder Lysine, die mit ihrer terminalen Aminogruppe eine Wasserstoffbrücke zu dem Hauptketten-Carbonyl eines Threonin-Rest bilden, bzw. einer Glutaminsäure, die mit der Hauptkettenaminogruppe eines Methionins wechselwirkt (s. Tab. 4.4 untere Hälfte). Die beteiligten Reste befinden sich jeweils am Ende des Stranges β_1 . Dadurch erhält die Domäne I eine zusätzliche Stabilisierung, da die drei Faltungseinheiten stärker miteinander vernetzt sind.

4.1.5.5 Das Motiv AEGT

Ein weiteres Motiv, das ebenfalls mit der Verbindung der Faltungseinheiten innerhalb der Domänen in Zusammenhang steht, ist das Motiv AEGT, das in vier der sechs Faltungs-

Einheiten	Wasserstoffbrücke zwischen	Entfernung
Wasserstoffbrücken zwischen Hauptkettenatomen		
Ia - Ib	Leu409 C=O ... HN Gln13	3.1 Å
Ic - Ia	Met341 C=O ... HN Ser361	2.5 Å
Ib - Ic	Ala269 C=O ... HN Lys290	2.7 Å
IIa - IIb	Leu201 C=O ... HN Gly222	3.2 Å
IIc - IIa	Leu132 C=O ... HN Lys152	2.9 Å
IIb - IIc	Leu60 C=O ... HN Asn78/Asn79	2.8Å/3.0Å
Wasserstoffbrücken zwischen Seitenkettenatomen		
Ia - Ib	Lys405 Nζ ... O=C Thr17	2.7 Å
Ic - Ia	Glu337 Oε ₁ ... HN Met366	2.8 Å
Ib - Ic	Lys265 Nζ ... O=C Thr293	2.9 Å

 Tabelle 4.3: LX₃G(A) Verbindungen zwischen den EPT-Faltungseinheiten

einheiten auftritt (einmal allerdings als AEEP). Es handelt sich dabei jeweils um den Loop zwischen der Helix $\alpha 1$ und dem β -Strang $\beta 2$ (s. Abb. 4.12).

Einheiten	Wasserstoffbrücke zwischen	Entfernung
Wasserstoffbrücken zwischen Hauptkettenatomen		
IIb → IIa-IIb	Glu36 NH ... O=C Leu221	2.9 Å
IIa → IIc-IIa	Glu177 NH ... O=C Leu151	2.8 Å
	Glu177 C=O ... HN Gly153	2.8 Å
Ic → Ib-Ic	Glu318 NH ... O=C Pro289	2.8 Å
	Glu318 C=O ... HN Ala291	3.0 Å
Ia → Ic-Ia	Glu384 NH ... O=C Leu360	2.8 Å
mögliche Wasserstoffbrücken zwischen Seitenkettenatomen		
IIb → IIa-IIb	Glu36 Oε ₁ ... Nε Arg220	2.7 Å
IIa → IIc-IIa	Glu177 Oε ₁ ... Nζ Lys152	3.0 Å
Ic → Ib-Ic	Glu318 Oε ₂ ... Nζ Lys290	3.3 Å
Ia → Ic-Ia	Glu384 Oε ₁ ... Nζ Lys359	benachbart

Tabelle 4.4: AEGT Verbindungen zwischen den EPT-Faltungseinheiten

Die Bindungen, die über diesen Bereich zwischen den Faltungseinheiten vermittelt werden, sind in Tab. 4.4 zusammengefaßt. Durch diese Bindungen wird jeweils der Übergangsbereich zwischen zwei Untereinheiten mit der zweiten Faltungseinheit am Motiv AEGT verbunden. Es ist dabei jeweils die Hauptkette des konservierten Glutaminsäure-Rests mit der Hauptkette des Übergangsbereichs über eine Wasserstoffbrücke verbunden. Zusätzlich ist die negativ geladene Seitenkette der Glutaminsäure jeweils in der Nähe positiv geladener Seitenketten (Arginin oder Lysin), so daß auch dort Wasserstoffbrücken oder ionische Wechselwirkungen auftreten können. Allerdings sind diese Regionen, da sie an der Oberfläche des Moleküls liegen, in der Elektronendichte nicht immer gut geordnet, so daß eine sichere Zuordnung schwierig ist.

4.1.5.6 Die Übergangs- oder Scharnier-Region

In der Scharnier-Region, die den Übergangsbereich zwischen den beiden Domänen bildet und sich wie ein Scharnier öffnet und schließt, gibt es eine Reihe von Wechselwirkungen, die die beiden Domänen stabilisierenden.

Dazu zählen insbesondere die bereits in Abschn. 4.1.5.3 erwähnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden antiparallel verlaufenden Bereichen 17-22 und 227-232. Diese verbinden die Hauptkettenatome von Asp231 NH \cdots O=C Ser19 und Ala21 NH \cdots O=C Leu229 miteinander. Dadurch wird eine Stabilisierung in diesem Bereich erreicht. Allerdings ist diese Stabilisierung nicht sehr starr. Wie in Abschn. 4.2.1 gezeigt wird, ist gerade diese Stelle von großer Bedeutung beim Übergang vom substratfreien zum substratgebundenen Zustand der EPT. Die Bewegung hat ihr Scharnier an den Resten Leu229 und Ala21, die aber weiter über eine Wasserstoffbrückenbindung miteinander verbunden bleiben.

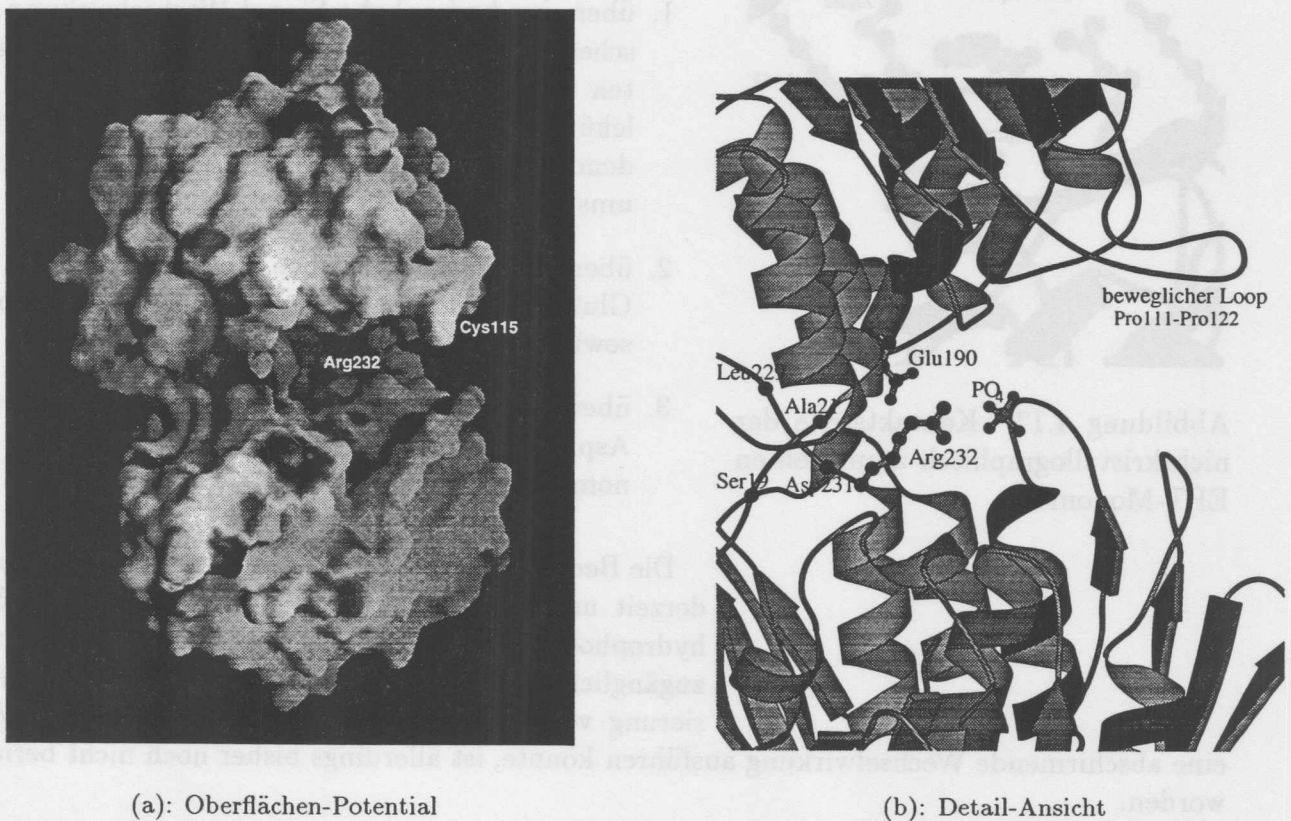


Abbildung 4.16: Scharnier-Region der EPT.

Neben den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptkettenatomen gibt es noch Bindungen zwischen den Resten Arg232 und Glu190. Das Arg232 bindet interessanterweise noch ein Phosphat-Ion (s. Abb. 4.16(b)). Es ist der einzige positiv geladene Rest in einer rein negativ geladenen Umgebung, die gleichsam eine Höhle bildet für die Aufnahme des Substrates bzw. des Inhibitors (s. Abb. 4.16(a)).

4.1.5.7 Die Packung der Monomere im Kristall

Die asymmetrische Einheit des Kristalls wird aufgebaut aus zwei Molekülen des EPT. Diese beiden, Monomer A und B genannten, Einheiten sind über eine nicht-kristallographische Symmetrie miteinander verbunden. Diese beiden Untereinheiten wurden unabhängig voneinander behandelt. Die Überlagerung der C^α-Atome von Monomer A und B liefert eine mittlere Abweichung von 0.670 Å. Dies ist im Rahmen der Genauigkeit des Modells als gleich zu beurteilen. Der Rotationswinkel zwischen den beiden Monomeren beträgt 179.3°. Damit konnte das Ergebnis der Selbstrotation (s. Abschn. 4.1.1.4) bestätigt werden.

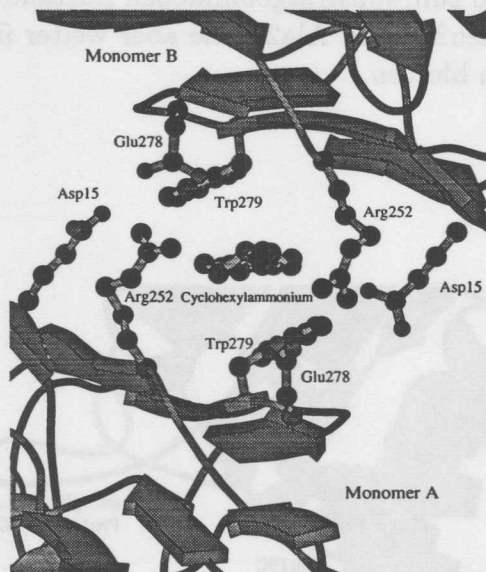


Abbildung 4.17: Kontaktstelle der nichtkristallographisch äquivalenten EPT-Monomere

Die Kontaktstelle zwischen den beiden Monomeren ist schematisch in Abb. 4.17 dargestellt. Man erkennt, daß die beiden Monomere antiparallel angeordnet sind und damit den Rotationswinkel wiedergeben. Die Wechselwirkungen zwischen ihnen werden auf zwei verschiedene Arten gebildet:

1. über eine hydrophobe Stapel-Wechselwirkung zwischen den beiden dem Lösungsmittel ausgesetzten Resten Trp279, die zwischen sich zwei Moleküle des im Kristallisationsfällungsmittel vorhandenen ebenfalls hydrophoben Cyclohexylammoniums enthalten,⁴
2. über Salzbrücken zwischen den Resten Arg252 und Glu278 (jeweils aus unterschiedlichen Monomeren), sowie
3. über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asp15 O^{ε1} ... N^{ε1} Trp279 der jeweils anderen Monomere.

Die Bedeutung des Tryptophanrests Trp279 *in vivo* ist derzeit unklar. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß ein hydrophober Rest auf diese Weise dem Lösungsmittel zugänglich sein sollte. Über eine funktionelle Dimerisierung von EPT *in vivo*, die etwa auf ähnliche Weise eine abschirmende Wechselwirkung ausführen könnte, ist allerdings bisher noch nicht berichtet worden.

4.1.5.8 Cis-Peptide

In der EPT sind die Reste Pro9 und Pro300 in beiden Monomeren als sogenannte Cis-Peptide konformiert. Dies ist eine für die Peptidbindung ungewöhnliche Konformation, die oft mit funktionellen Aufgaben in Verbindung gebracht werden kann. Diese beiden Reste sind aber auch in der Struktur von Skarzynski et al. (1996) als Cis-Peptide konformiert.

⁴Dies erklärt auch, warum Cyclohexylammonium zur Kristallisation unerlässlich war (s. Abschn. 4.1.1.1)

Das Cis-Peptid Pro300 ist dabei genau an der Verbindungsstelle zwischen den beiden Domänen zu finden. Allerdings bleibt es auch beim Übergang zum EPT-Substrat-Komplex in der Cis-Konformation, so daß dieser besondere Zustand bisher nicht funktionell gedeutet werden kann. Dasselbe gilt für das Cis-Peptid Pro9, das sich unmittelbar hinter $\beta 4$ von Faltungseinheit Ia im Übergang zur Faltungseinheit Ib befindet. Auch hierfür konnte bisher keine Erklärung für die besondere Konformation gefunden werden.

4.1.5.9 Qualität des Modells

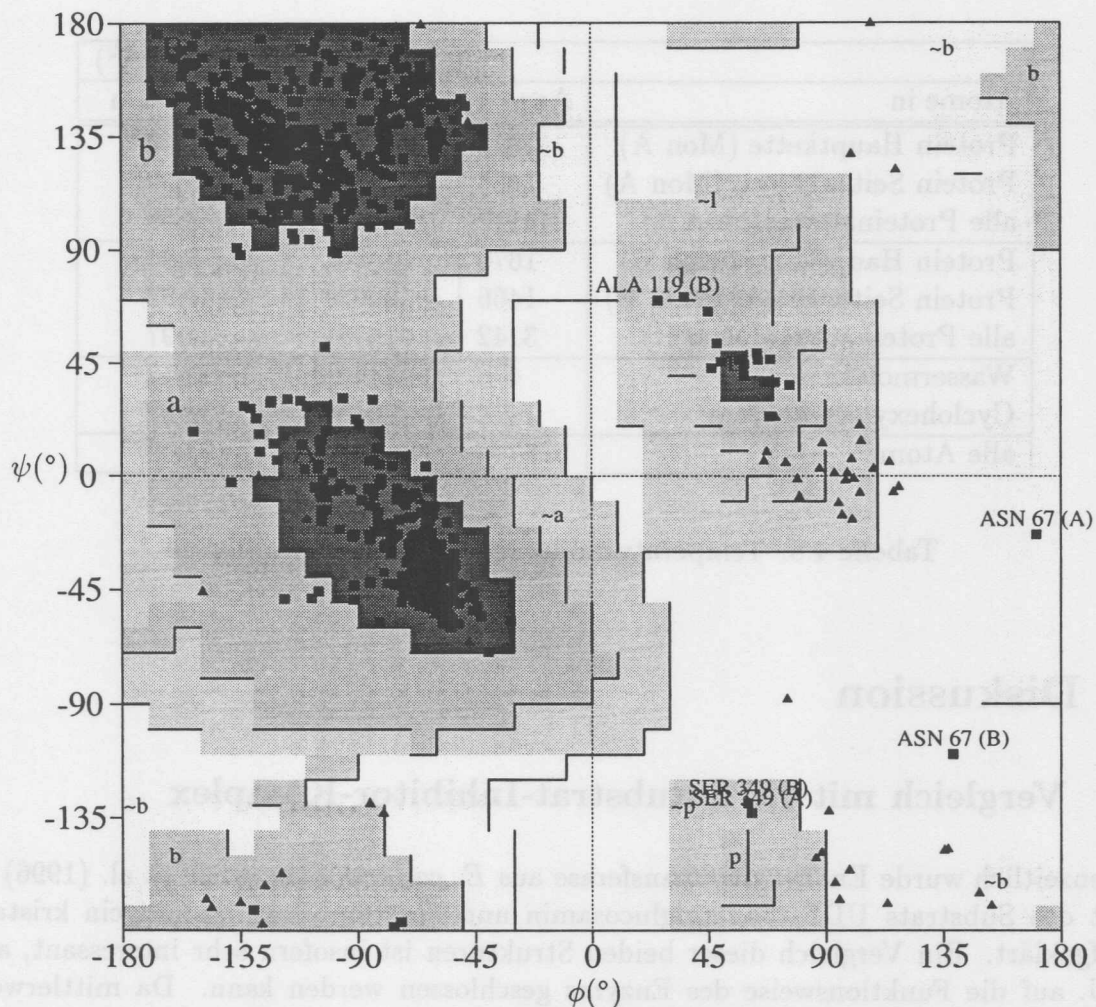


Abbildung 4.18: Ramachandran-Plot der EPT (1naw) Rot sind *bevorzugte Regionen*, gelb *erlaubte Bereiche*, und blaugelb *zusätzlich-erlaubte Bereiche* dargestellt. Reste im weißen Bereich sind stereochemisch verboten und deuten auf größere Probleme im Modell hin.

In der Region **a** und **~a** sind die Aminosäuren in α -Helices und in Region **b** und **~b** in β -Strängen. **p** und **l** kennzeichnen darüberhinaus erlaubte Schlaufen-Bereiche. Mit einem sind Nicht-Prolin-Reste markiert. Glycin-Reste werden durch ein Δ dargestellt.

Die Qualität des verfeinerten EPT-Modells wurde mit den üblichen PROCHECK-Tests (Laskowski et al. 1993) überprüft. Dabei ergab sich dabei der in Abb.4.18 dargestellte Ramachandran-

Plot. In diesem sind 669 oder 92.9% der Nicht-Glycinreste in den bevorzugten Regionen, 46 oder 6.4% weitere in zusätzlich erlaubten Gebieten und nur 4 Reste oder 0.6% (Asn67(A), Ser349(A+B), Ala119(B) in großzügig erlaubten Gebieten. Lediglich der Rest Asn67 im Monomer B befindet sich in einer verbotenen Region.

Die Temperaturfaktoren, die ein weiteres Indiz für die Qualität der EPT-Struktur sind, sind in Tab. 4.5 zusammengefaßt. Dabei zeigt sich, daß die beiden Monomere, obwohl sie bei der Verfeinerung als unabhängige Einheiten betrachtet wurden, nahezu identische Werte aufweisen. Diese sind mit 22 bzw. 23 Å² für eine bei einer Auflösung von 2.0 Å gelöste Struktur recht gut. Man erkennt aber auch, daß teilweise hohe Temperaturfaktoren vorhanden sind, die auf schlecht geordnete Bereiche hinweisen (insbesondere im Loop 111-122, s. Abschn. 4.2.1.2).

Atome in	Anzahl	Temperaturfaktor B (Å ²)	
		Mittelwert	Maximum
Protein Hauptkette (Mon A)	1676	20.46	77.42
Protein Seitenketten (Mon A)	1466	25.88	93.59
alle Proteinatome (Mon A)	3142	22.99	93.59
Protein Hauptkette (Mon B)	1676	19.70	76.84
Protein Seitenketten (Mon B)	1466	25.03	84.97
alle Proteinatome (Mon B)	3142	22.18	84.97
Wassermoleküle	478	29.44	92.12
Cyclohexylammonium	14	34.16	38.92
alle Atome	6776	23.09	93.59

Tabelle 4.5: Temperaturfaktoren Enolpyruvyltransferase

4.2 Diskussion

4.2.1 Vergleich mit EPT-Substrat-Inhibitor-Komplex

Zwischenzeitlich wurde Enolpyruvyltransferase aus *E. coli* von Skarzynski et al. (1996) in Gegenwart des Substrats UDP-*N*-acetylglucosamin und des Inhibitors Fosfomycin kristallisiert und aufgeklärt. Ein Vergleich dieser beiden Strukturen ist insofern sehr interessant, als daraus u.U. auf die Funktionsweise des Enzyms geschlossen werden kann. Da mittlerweile die Daten der Struktur von Skarzynski et al. (1996) über die ProteinDataBank zugänglich sind (PDB-Code: 1uae), ist dieser Vergleich auch durchführbar.

4.2.1.1 Domänen Anordnung

Die Anordnung der beiden Domänen in der Struktur der EPT im substratfreien Zustand und mit gebundenem Substrat läßt sich am besten als *geschlossener* und *geöffneter* Zustand beschreiben. Dies wird aus Abb. 4.19 deutlich. Dort sind die beiden Modelle so angeordnet, daß die Domänen I (unten) jeweils gleich orientiert sind.

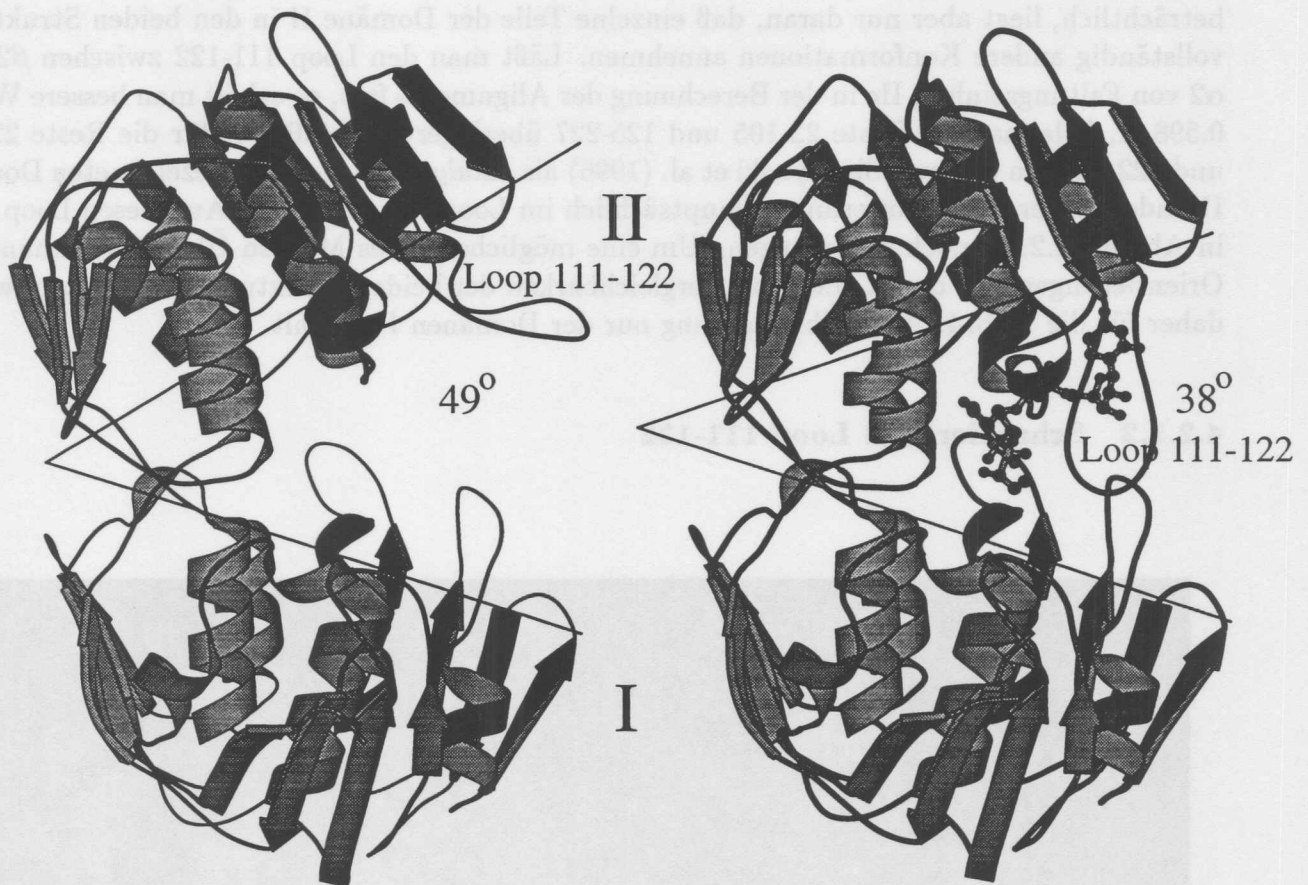


Abbildung 4.19: Vergleich von EPT ohne (links) und mit Substrat (rechts, Skarzynski et al. (1996))

Man kann das EPT-Molekül mit einem sogenannten *Pacman* vergleichen. Im substratfreien Zustand ist der Mund geöffnet, wird das Substrat gebunden, so „beißt“ der Pacman zu. Der Öffnungswinkel ist dabei in der substratfreien Form 49° und in der Form mit Substrat und Inhibitor 38° . Diese rein geometrische Konstruktion liefert bereits eine sehr gute Abschätzung, da die Drehung der Domäne II gegenüber Domäne I um den Bereich der Scharnier-Region (links) stattfindet. Die Bewegung wird ausgeführt an den Resten Leu229 und Ala21, die über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden sind. Der genaue Rotationswinkel der mittels einer Überlagerung nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet wurde, ergibt sich zu 10.8° .

Eine Überlagerung der beiden Strukturen jeweils über die C^α -Atome der Domäne I (Reste 1-18 und 232-419) ergab eine mittlere Abweichung von 0.499 \AA . Dies ist sehr wenig, wenn man berücksichtigt, daß der Positionsfehler der Atome beider Strukturen schon bei etwa $0.3\text{-}0.4 \text{ \AA}$ liegt. Dies Ergebnis zeigt, daß sich die Domänen I der beiden Strukturen im Bereich der Auflösung der beiden Modelle nicht unterscheiden. Die Domäne I ist daher vermutlich nicht mit einer Konformationsänderung an der Funktion des Enzyms beteiligt.

Anders sieht dies bei der Domäne II aus. Dort führt eine „naive“ Überlagerung der beiden vollständigen Domänen II (Reste 22-227) zu einer mittleren Abweichung von 2.330 Å. Dies ist beträchtlich, liegt aber nur daran, daß einzelne Teile der Domäne II in den beiden Strukturen vollständig andere Konformationen annehmen. Läßt man den Loop 111-122 zwischen $\beta 2$ und $\alpha 2$ von Faltungseinheit IIc in der Berechnung des Alignments fort, so erhält man bessere Werte: 0.598 Å, falls man die Reste 22-105 und 125-227 überlagert und 0.607 Å für die Reste 22-108 und 122-227. In der, von Skarzynski et al. (1996) als *katalytische Domäne* bezeichneten Domäne II finden daher Umorientierungen hauptsächlich im Loop 111-122 statt. Auf diesen Loop wird in Abschn. 4.2.1.2 noch eingegangen. Um eine möglichst hohes Maß an Übereinstimmung der Orientierungen und damit eine gute Vergleichbarkeit der beiden Strukturen zu erhalten, wurde daher für die Abb. 4.19 die Überlagerung nur der Domänen I gewählt.

4.2.1.2 Scharnier und Loop 111-122

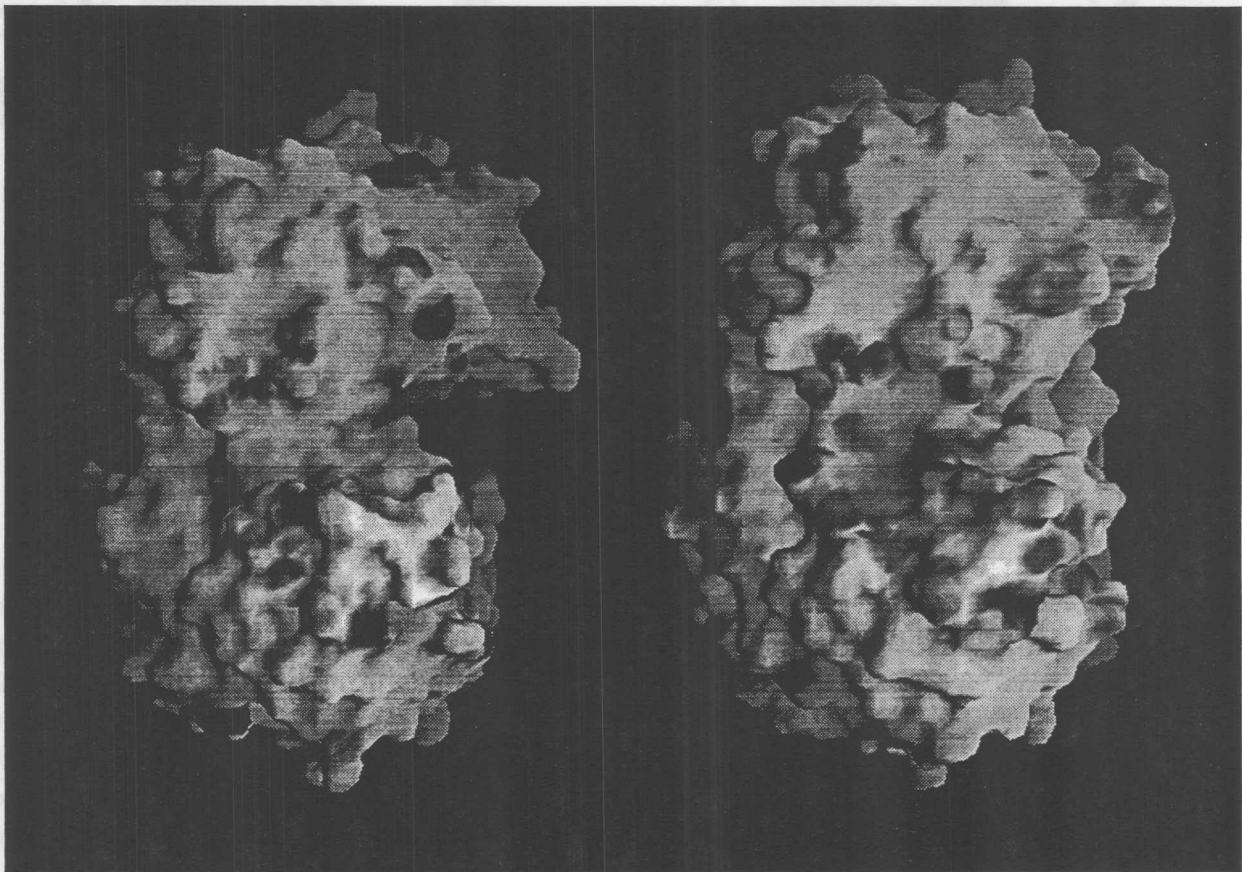


Abbildung 4.20: Oberflächen-Potential von nativer EPT (li.) und EPT-Substrat-Inhibitor-Komplex (re.). Orientierung der Moleküle wie in Abb.4.19.

Man erkennt in Abb. 4.20, die die beiden Oberflächen der Proteine mit ihren Ladungen darstellt (erzeugt mit GRASP (Nicholls et al. 1991)) deutlich den Unterschied zwischen den beiden Zuständen. Während im substratfreien Zustand eine deutliche Öffnung, gleichsam ein Loch,

vorhanden ist, ist dieses im EPT-Substrat-Komplex von einem komplementär (positiv) geladenen Substrat geschlossen worden. Sowohl Substrat als auch Inhibitor sind völlig von Protein umschlossen, so daß sie vom Lösungsmittel abgeschirmt sind.

Wie in Abb. 4.19 deutlich zu erkennen, ist der Loop 111-122 derjenige Teil der Struktur, der bei Bindung des Substrats die größte Bewegung vollführt. Der Loop knickt gleichsam bei den Stellen Pro112 und Pro121 ein, wie dies in unserer Veröffentlichung (Schönbrunn et al. 1996) vorausgesagt worden war. Dadurch wird das katalytische Cys115 in eine günstige Position für eine Bindung des Substrates in der Bindungstasche gebracht. Tatsächlich wird diese Art der Bindung verwirklicht. So bindet Cys115 kovalent am Inhibitor Fosfomycin, während UDP-Glc-NAc eingeschlossen wird zwischen den hydrophoben Oberflächen von Arg120, Pro121 sowie Leu124. Dazu kommen noch Wasserstoffbrückenbindungen zu Ser162, Val163, Gly164 und Arg91. Die Bindungen finden also bei einer genaueren Betrachtung der Substratbindung in der Bindungstasche statt. Dabei sind nur Reste aus der flexibleren Domäne II beteiligt. Arg397, das im Übergangsbereich liegt, bildet dabei eine Ausnahme. Es bindet mit einer Wasserstoffbrückenbindung am Fosfomycin. Eine ausführliche Betrachtung der Bindungen im EPT-Substrat-Komplex ist in Skarzynski et al. (1996) gegeben.

Dieser Loop ist auch unterschiedlich in den beiden Monomeren der substratfreien Form, was darauf hindeutet, daß er sehr flexibel ist (Schönbrunn et al. 1996, S. 1070).

4.2.1.3 Vergleich kritischer Bereiche

Die im Modell der substratfreien EPT kritisch zu beurteilenden Bereiche können nun mit denen des EPT-Substrat-Komplexes verglichen werden, um eventuell Hinweise auf Korrekturmöglichkeiten zu erhalten.

Für die beiden in stereochemisch verbotenen Regionen des Ramachandran-Plot liegenden Aminosäuren-Reste der substratfreien EPT finden sich exakt dieselben Konformationen auch im EPT-Substrat-Komplex. Auch dort sind die Reste Ser349 und Asn67 diejenigen - und auch die einzigen -, die nur in großzügig erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plot zu liegen kommen. Der Rest Ala119 des Monomers B befindet sich im kritischen Loop 111-122. Dieser ist aber an der Substratbindung beteiligt, deshalb ist er in der flexiblen Struktur schlechter definiert, als im EPT-Substrat-Komplex.

Es zeigt sich, daß die beiden Strukturen an diesen kritischen Stellen übereinstimmen. Für Ser349 konnte diese ungewöhnliche Konformation durch die Elektronendichte der nativen EPT eindeutig gerechtfertigt werden. Dies ist für Asn67 nicht in dieser Form möglich, weshalb die unabhängig gelöste Struktur dort eine gute Bestätigung darstellt. Die beiden Reste liegen übrigens jeweils in denselben Positionen in ihren Faltungseinheiten: unmittelbar nach $\beta 3$, wo sich ein scharfer β -turn, eine „Haarnadel“, als Verbindungselement zu $\beta 4$ anschließt. Dieser erzwingt offenbar die besondere Konformation.

Zu den Seitenketten an der Oberfläche des Proteins lassen sich aufgrund der fehlenden Elektronendichte des EPT-Substrat-Inhibitor-Komplexes keine Aussagen machen. Es zeigt sich aber, daß etliche oberflächliche Reste im Substratkomplex eine andere Konformation annehmen als im substratfreien Enzym. Ob dies relevant ist, kann ohne einen Vergleich der Elektronendichte des EPT-Substrat-Komplexes nicht entschieden werden.

Zusammenfassend lassen sich aus den beiden Strukturen von EPT wichtige Informationen für die Entwicklung neuer oder für die Modifizierung von bestehenden Antibiotika erhalten. Dazu kann die Umgebung der Fosfomycin- und Substratbindungsstellen untersucht werden. Es können aber auch neue Strategien entwickelt werden, wie die Blockade des *Scharniers* zwischen Leu229 und Ala21 oder das Binden von Liganden an Loop 111-122, um die Bindung zum Substrat zu verhindern.

4.2.2 Vergleich mit EPSP-Synthase

Weitere Implikationen ergeben sich aus der EPT-Struktur für ein anderes Protein. Es ist die bereits in Abschn. 1.3.3 erwähnte EPSP-Synthase. Dies ist das einzige bisher bekannte Protein, das strukturell der Enolpyruvyltransferase ähnlich ist. Die Besonderheit der sechsfach wiederholten Faltungseinheit und der hantelförmigen Form sind dabei gewahrt. EPSP-Synthase ist ein in Pflanzen und Bakterien vorkommendes Enzym, das im Shikimate-Zyklus den Transfer einer Phosphoenolpyruvat-Einheit vermittelt und damit einen Schritt in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren vermittelt.

4.2.2.1 Alignment von EPSP-Synthase- und EPT-Sequenzen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von EPSP-Synthase und EPT aus verschiedenen Spezies⁵ zeigt, daß nur wenige Reste in allen EPSP-Synthasen und Enolpyruvyltransferasen konserviert sind. Dazu zählen nur die bereits in Abschn. 4.1.5.4 beschriebenen Motive LXXXG(A) und AEGT, sowie einige wenige andere Reste an speziellen Positionen wie etwa im Bereich der Scharnier-Region (s. Schönbrunn et al. (1996)).

In Abb. 4.21 ist eine Abbildung aller verglichenen EPT und EPSP-Synthase Aminosäuresequenzen dargestellt.

4.2.2.2 Vergleich der EPSP-Synthase- und EPT-Strukturen

In Abb. 4.22 ist die Struktur der EPSP-Synthase und ihrer Faltungseinheiten in Analogie zu den Abbn. 4.10 und 4.12 dargestellt. Man erkennt die große Ähnlichkeit zwischen den beiden Modellen. Dies ist nicht selbstverständlich, da die Proteine zwar dieselbe Funktion haben -

⁵Swiss-Prot Codes: MURA.ACICA (*Acinetobacter calcoaceticus*), MURA.BACSU (*Bacillus subtilis*), MURA.ECOLI (*E. coli*), MURA.ENTCL (*Enterobacter cloacae*), MURA.HAEIN (*Haemophilus influenzae*), MURA.HELPHY (*Helicobacter pylori*), MURA.MYCLE (*Mycobacterium leprae*), MURA.MYCTU (*Mycobacterium tuberculosis*), MURA.SYNY3 (*Synechocystis sp.*), AROA.AERSA (*Aeromonas salmonicida*), AROA.ARATH (*Arabidopsis thaliana*), AROA.BACSU (*Bacillus subtilis*), AROA.BORPE (*Bordetella pertussis*), AROA.BRANA (*Brassica napus*), AROA.BUCAP (*Buchnera aphidicola*), AROA.BURPS (*Burkholderia pseudomallai*), AROA.CAMJE (*Campylobacter jejuni*), AROA.ECOLI (*E. coli*), AROA.HAEIN (*Haemophilus influenzae*), AROA.HAESO (*Haemophilus somnus*), AROA.KLEPN (*Klebsiella pneumoniae*), AROA.LACLA (*Lactococcus lactis*), AROA.LYCES (*Lycopersicon esculentum*), AROA.METJA (*Methanococcus jannaschii*), AROA.MYCTU (*Mycobacterium tuberculosis*), AROA.PASHA (*Pasteurella haemolytica*), AROA.PASMU (*Pasteurella multocida*), AROA.PETHY (*Petunia hybrida*), AROA.SALGL (*Salmonella gallinarum*), AROA.SALTI (*Salmonella typhi*), AROA.SALTY (*Salmonella typhimurium*), AROA.STAAU (*Staphylococcus aureus*), ARO.SYNY3 (*Synechocystis sp.*), AROA.YEREN (*Yersinia enterocolitica*), AROA.YERPE (*Yersinia pestis*)

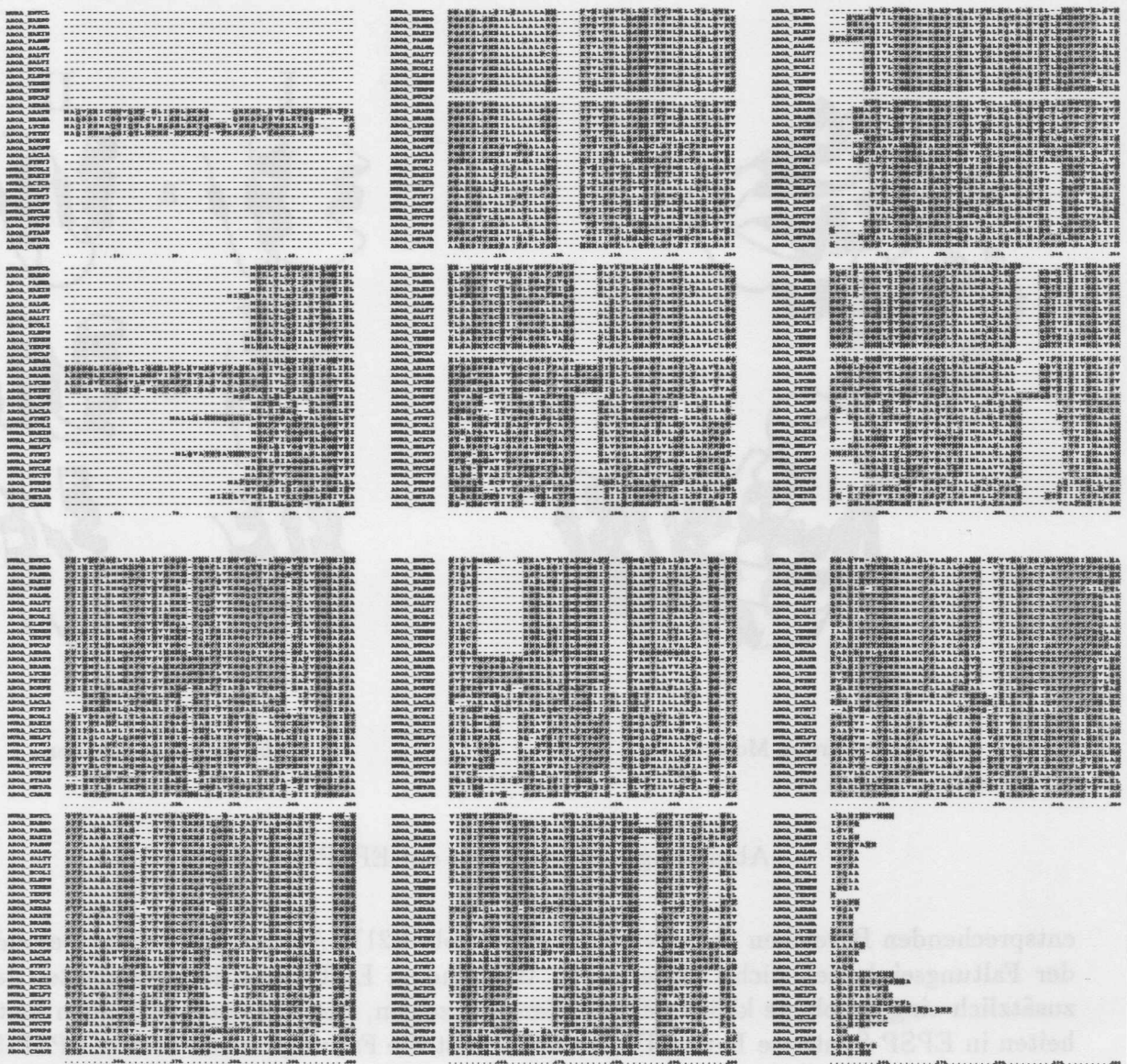


Abbildung 4.21: Alignment der EPT- und EPSP-Synthase

nämlich den Transfer einer Phosphoenolpyruvateinheit auf ein Substrat - dieses aber in völlig verschiedenem Kontext tun. Bei der EPT geschieht dies im Rahmen der Zellwandsynthese von Bakterien, bei der EPSP-Synthase als Vorstufe von aromatischen Aminosäuren in Pflanzen und Bakterien. Offensichtlich wird hier in der Natur ein einmal entwickelter Mechanismus in verschiedenen Spielarten eingesetzt. Allerdings sind Substrate und Inhibitoren der beiden Proteine, wie bereits in Abschn. 1.3.3 beschrieben, nicht austauschbar. Dies läßt sich auf struktureller Ebene verstehen, sind doch die beiden Proteine trotz der großen Ähnlichkeit im Detail unterschiedlich, was den Ersatz des einen Proteins durch das andere unmöglich macht.

Ein Vergleich der beiden Proteine läßt aber dennoch vermuten, daß diese aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entstanden sind, das durch sechsfache Wiederholung die beiden unterschiedlichen Strukturen gebildet hat. So sind neben dem identischen Aufbau der Faltungseinheiten (Abb. 4.22(re.)) auch die dazugehörigen Motive LXXXGA und AEGT in den

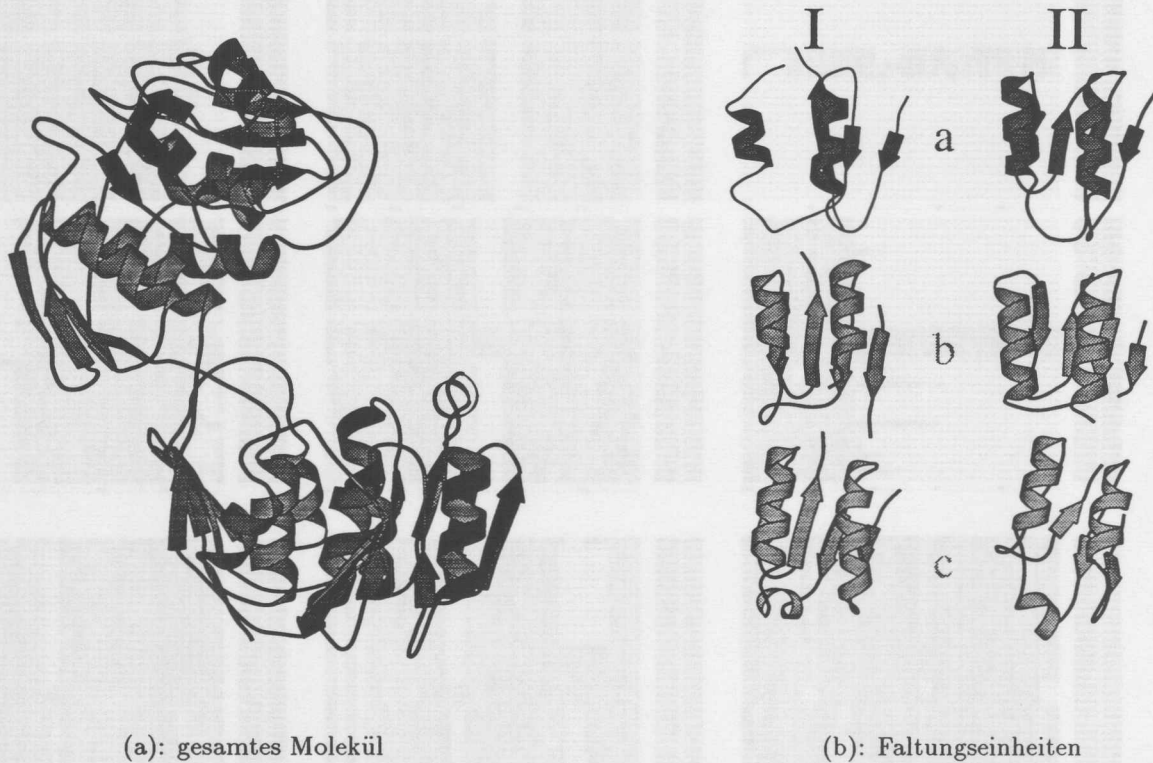


Abbildung 4.22: Struktur der EPSP-Synthase

entsprechenden Bereichen konserviert (s. auch Abb. 4.21). Allerdings sind die Besonderheiten der Faltungseinheiten nicht konserviert. Während in EPT die Faltungseinheiten Ia und Ib zusätzlich eingeschobene kleine helikale Bereiche zeigen, sind die entsprechenden Faltungseinheiten in EPSP-Synthase Ic und IIc. Zusätzlich ist die Faltungseinheit Ia von EPSP-Synthase auch „nicht vollständig“. Es fehlt der C-terminale β -Strang β_3 . Dies ist nicht nur eine Frage des für die Kristallisation verwendeten Konstrukts, sondern scheint in allen EPSP-Synthasen so zu sein, was sich aus der Überlagerung der Proteinsequenzen ergibt (s. Abb. 4.21).

Auch die Orientierung der beiden Domänen zueinander ist mit keiner der beiden EPT-Strukturen vergleichbar, obwohl man erwarten könnte, daß der substratfreie EPT-Zustand der substratfreien EPSP-Synthase entsprechen könnte. Die EPSP-Synthase zeigt aber verglichen mit EPT eine noch weiter geöffnete Bindungstasche (Abb. 4.22(a)).

Auf Wasserstoffbrückenbindungen und ähnliche Details kann hier nicht eingegangen werden, da bisher von EPSP-Synthase nur die C^α -Atome in der PDB deponiert sind (PDB-Code: 1eps), obwohl die Struktur bereits vor sechs Jahren gelöst wurde. Dies verhindert ein detaillierteres Studium. Aber auch die hier präsentierte Struktur läßt bereits Möglichkeiten für das Design oder die Verbesserung von Pflanzenschutzmittel entsprechend dem EPSP-Synthase-Inhibitor Roundup ReadyTM zu.

Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärten Proteinstrukturen haben für verschiedene anschließende Untersuchungen die Grundlage geschaffen.

Enolpyruvyltransferase

Die Bedeutung der EPT-Struktur ist insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer oder für die Modifizierung von bestehenden Antibiotika zu sehen. Mit der Kenntnis der Struktur der Enolpyruvyltransferase im substratfreien (nativen) Zustand und mit gebundenem Inhibitor und Substrat (Skarzynski et al. 1996) sind Möglichkeiten gegeben über die Kenntnis der Bindungstasche das vorhandene Antibiotikum Fosfomycin zu modifizieren. Andererseits ist über die Veränderung der Konformation im Scharnier-Bereich der Weg frei für Studien, in denen diese Bereiche blockiert werden. Es können also vollständig neue Antibiotika entworfen und getestet werden.

Eine weitere Anwendung der hier beschriebenen Struktur ist darin zu sehen, daß auf dem Gebiet der Enolpyruvyltransferase gewonnene Erkenntnisse auf das für die Herbizid-Forschung wichtige Protein EPSP-Synthase übertragen werden können. Dies ist insbesondere von Interesse, da es bisher nicht gelungen ist, EPSP-Synthase in einem anderen als dem nativen Zustand röntgenkristallographisch aufzuklären (Stallings et al. 1991).

Kinesin

Mit der Kinesin-Struktur nähert man sich ein Stück dem Verständnis der Funktion eines molekularen Motors. Kinesine übernehmen Transportaufgaben in der Zelle, ohne die diese nicht lebensfähig wäre. Dabei wird chemische Energie in Form von ATP-Molekülen in gerichtete Bewegung umgesetzt. Ein Verständnis dieser Vorgänge auf molekularem Niveau würde die Tür aufstoßen für die Anwendung von Mikro-Maschinen in der Biotechnologie.

Kinesin kann aber ebenso als ein Modellsystem für an Mikrotubuli bindende Proteine angesehen werden. Ein Verständnis der Bindung vom Kinesin an Tubulin und der Dynamik dieser Bindung kann zu Implikationen führen, die weit über Motorproteine hinausgehen. Es sei hier nur auf die Funktion der Mikrotubuli bei der Zellteilung und die Bedeutung von Mikrotubuli assoziierten Proteinen in der Alzheimer-Krankheit hingewiesen.

Danksagungen

- Für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen sowie die fortwährende Unterstützung jeglicher Art bedanke ich mich bei Prof. Eckhard Mandelkow und Dr. Eva Mandelkow.
- Prof. Robert L. Johnson danke ich für die Durchsicht und Begutachtung der Arbeit.
- Für Unterstützung finanzieller und ideeller Art danke ich der Friedrich-Ebert-Stiftung (Bonn).
- Für die kollegiale Zusammenarbeit geht mein besonderer Dank an Dr. Alexander Marx, Jens Müller, Dr. Young-Hwa Song und Dr. Manfred Thormählen. Darüberhinaus bin ich Dr. Frank Kozielski für die Zusammenarbeit am Kinesin-Dimer zu Dank verpflichtet.
- Für die Zusammenarbeit im Bereich der Enolpyruvyltransferase gilt mein Dank Dr. Ernst Schönbrunn. Darüberhinaus danke ich Dr. Anastassis Perrakis (EMBL) sowie Florian Krekel und Prof. Nikolaus Amrhein (ETH Zürich).
- Den Mitarbeitern der Nachbargruppen und Institute der MPG, des EMBL und des UKE sei für die stete Hilfsbereitschaft und Auskunftsfreude nicht nur in kristallographischen Fragen gedankt. Insbesondere danke ich Dr. Zbyszek Dauter, der mit nie versiegender Geduld komplizierte Dinge einfach erklärt.
- Auch den vielen anderen Kollegen, die mir teils persönlich, teils per e-mail Tips und Anregungen gegeben haben, möchte ich an dieser Stelle danken.
- Last but not least bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner Familie für die unendliche Geduld, das große Verständnis und die dauerhafte Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte zustande kommen können.
Vielen Dank, Oma und Bodika und besonders Scharik und Mark.

Literaturverzeichnis

- Abel, K., Yoder, M., Hilgenfeld, R. und Journak, F. (1996). An α to β conformational switch in EF-Tu. *Structure*, 4:1153–1159.
- Abrahams, J. und Leslie, A. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁-ATPase. *Acta Cryst.*, D52:30–42.
- Abrahams, J., Leslie, A., Lutter, R. und Walker, J. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, 370:621–628.
- Alexeev, D., Baxter, R. und Sawyer, L. (1994). Mechanistic implications and family relationships from the structure of dethiobiotin synthetase. *Structure*, 2:1061–1072.
- Amor, J., Harrison, D., Kahn, R. und Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature*, 372:704–708.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C., Schirmer, N., Sprinzl, M. und R. Hilgenfeld (1993). Crystal structure of active elongation factor tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, 365:126–132.
- Bernstein, F., Koetzle, T., Williams, G., Meyer, E., Brice, M., Rodgers, J., Kennard, O., Shimanouchi, T. und Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, 112:535–542.
- Berry, M., Meador, B., Bilderback, T., Liang, P., Glaser, M. und Phillips, G. (1994). The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins*, 19:183–198.
- Blundell, T. L. und Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Brady, S. (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317:73–75.
- Branden, C. und Tooze, J. (1991). *Introduction to protein structure*. Garland Publishing, New York.
- Brünger, A. (1992a). The free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–474.
- Brünger, A. (1992b). *X-PLOR Version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR*. Yale Univ. Press, New Haven, CT.

- Brünger, A. (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: The free R value. Methods and applications. *Acta Cryst.*, D49:24–36.
- Brünger, A., Krukowski, A. und Erickson, J. (1990). Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Cryst.*, A46:585–593.
- Buth, G., Kölln, I. und Bartunik, H. (1996). Beam line diagnostics for protein crystallography using synchrotron radiation. zur Veröffentlichung eingereicht in *Rev. Sci. Instrum.*
- Case, R., Pierce, D., Hom-Booher, N., Hart, C. und Vale, R. (1997). The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell*, 90:959–966.
- Cassidy, P. und Kahan, F. (1973). A stable enzyme-phosphoenolpyruvate intermediate in the synthesis of uridine-5'-diphospho-n-acetyl-2-amino-2-deoxyglucose 3-o-enolpyruvyl ether. *Biochemistry*, 12:1364–1374.
- CCP4 (1994). Collaborative computational project no.4: The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.*, D50:760–767.
- Coleman, D., Berghuis, A., Lee, E., Linder, M., Gilman, A. und Sprang, S. (1994). Structures of active conformations of $G_{i\alpha 1}$ and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science*, 265:1405–1412.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. und Moore, P. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.*, 13:3661–3668.
- Davies, G., Gamblin, S., Littlechild, J., Dauter, Z., Wilson, K. und Watson, H. (1994). Structure of the ADP complex of the 3-phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å. *Acta Cryst.*, D50:202–209.
- Drenth, J. (1994). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer, New York, Heidelberg.
- Engh, R. A. und Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, A47:392–400.
- Fisher, A., Smith, C., Thoden, J., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. und Rayment, I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with $MgADP \cdot BeF_x$ and $MgADP \cdot AlF_4^-$. *Biochemistry*, 34:8960–8972.
- Fourme, R., Dhez, P., Benoit, J., Kahn, R., Dubuisson, J., Besson, P. und Frouin, J. (1992). Bent crystal, bent multilayer optics on a multipole wiggler line for an x-ray diffractometer with an imaging plate detector. *Rev. Sci. Instrum.*, 63:982–987.
- Furey, W. und Swaminathan, S. (1997). Phases-95: A program package for the processing and analysis of diffraction data from macromolecules. *Meth. Enzymol.*, 277:590–620.
- Georgiadis, M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. und Rees, D. (1992). Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science*, 257:1653–1659.
- Green, D. W., Ingram, V. M. und Perutz, M. F. (1954). The structure of haemoglobin IV. Sign determination by the isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. A*, 225:287–307.

- Gulick, A., Song, H., Endow, S. und Rayment, I. (1998). X-ray crystal structure of the yeast kar3 motor domain complexed with MgADP to 2.3 Å resolution. *Biochemistry*, 225:im Druck.
- Harker, D. (1936). The application of the three-dimensional patterson method and the crystal structures of proustite Ag_3AsS_3 , and pyrrargyrite, Ag_3SbS_3 . *J. Chem. Phys.*, 4:381-390.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors of non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphic replacement. *Acta Cryst.*, 9:1-9.
- Helliwell, J. R. (1992). *Macromolecular Crystallography with Synchrotron radiation*. Cambridge University Press. ISBN 0521334675.
- Hendrickson, W. (1985). Stereochemically restrained refinement for macromolecular structures. *Meth. Enzymol.*, 115:252-271.
- Hendrickson, W., Horton, J. und LeMaster, D. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.*, 9:1665-1672.
- Hendrickson, W., Smith, J., Phizackerley, R. und Merritt, E. (1988). Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins*, 4:77-88.
- Hendrix, J., Koch, M. und Bordas, J. (1979). A double focusing X-ray camera for use with synchrotron radiation. *J. Appl. Cryst.*, 12:467-472.
- Henningsen, U. und Schliwa, M. (1997). Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature*, 389:93-96.
- Hoenger, A., Sack, S., Thormählen, M., Marx, A., Müller, J., Gross, H. und Mandelkow, E. (1998). Image reconstruction and X-ray structure of the kinesin-microtubule complex. Zur Veröffentlichung eingereicht in *J. Cell Biol.*
- Holmes, K. (1997). The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.*, 7:R112-R118.
- Honig, B. und Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, 268:1144-1149.
- Hope, H. (1990). Crystallography of biological macromolecules at ultra-low temperature. *Ann. Rev. Bioph. & Biophys. Chem.*, 19:107-126.
- Hope, H., von Boehlen, F. F. K., Makowski, I., Kratky, C., Halfon, Y., Danz, H., Webster, P., Bartels, K., et al. (1989). Cryocrystallography of ribosomal particles. *Acta Cryst.*, B45:190-199.
- Huang, W., Jia, J., Gibson, K., Taylor, W., Rendina, A. und Lindqvist, G. S. Y. (1995). Mechanism of an ATP-dependent carboxylase, dethiobiotin synthetase, based on crystallographic studies of complexes with substrates and a reaction intermediate. *Biochemistry*, 34:10985-10995.

- Hutchinson, E. und Thornton, J. (1996). PROMOTIF - a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Science*, 5:212-220.
- Jones, T., Zou, J.-Y., Cowan, S. und Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, A47:110-119.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R., Wyckoff, H. und Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 181:662-666.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, C. und Vecchi, M. (1983). Optimization by simulated annealing. *Science*, 220:671-680.
- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. und Nyborg, J. (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, 1:35-50.
- Kjeldgaard, M. und Nyborg, J. (1992). Refined structure of elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 223:721-742.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. und Clark, B. (1996). The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.*, 10:1347-1368.
- Kleywegt, G. (1996). Use of non-crystallographic symmetry in protein structures. *Acta Cryst.*, D52:842-847.
- Kleywegt, G. und Jones, T. (1995). Where freedom is given liberties are taken. *Structure*, 3:535-540.
- Kleywegt, G. und Jones, T. (1996). Efficient rebuilding of protein structures. *Acta Cryst.*, D52:829-832.
- Kozielski, F. (1997). *Die Röntgenstrukturanalyse des Motorproteins Kinesin - von der cDNA zur Proteinstruktur*. Dissertation, Univ. Hamburg.
- Kozielski, F., Schönbrunn, E., Sack, S., Müller, J., Brady, S. und Mandelkow, E. (1997a). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the single-headed and double-headed motor protein kinesin. *J. Struct. Biol.*, 119:28-34.
- Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormählen, M., Schönbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E.-M. und Mandelkow, E. (1997b). The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, 91:985-994.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 24:946-950.
- Kull, F., Sablin, E., Lau, P., Fletterick, R. und Vale, R. (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, 380:550-554.
- Lambright, D., Noel, J., Hamm, H. und Sigler, P. (1994). Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*, 369:621-628.

- Lamzin, V. und Wilson, K. (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Cryst.*, D49:129-147.
- Laskowski, R. A., Arthur, M. W. M., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26:283-291.
- Loewe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20s proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 268:533-539.
- Mandelkow, E. und Mandelkow, E. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:72-81.
- Marquardt, J. (1993). *Molecular studies of the enzymes involved in UDP-N-acetylmuramic acid biosynthesis*. Dissertation, Harvard Univ.
- Marquardt, J., Siegele, D., Kolter, R. und Walsh, C. (1992). Cloning and sequencing of *Escherichia coli* murz and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *J. Bacteriol.*, 174:5748-5752.
- Matte, A., Goldie, H., Sweet, R. und Delbaere, L. (1996). Crystal structure of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase: a new structural family with the P-loop nucleoside triphosphate hydrolase fold. *J. Mol. Biol.*, 256:126-143.
- Matthews, B. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33:491-497.
- Mixon, M., Lee, E., Coleman, D., Berghuis, A., Gilman, A. und Sprang, S. (1995). Tertiary and quaternary structural changes in G_{iα} 1 induced by GTP hydrolysis. *Science*, 270:954-960.
- Moore, J. und Endow, S. (1996). Kinesin proteins: a phylum of motors for microtubule-based motility. *BioEssays*, 18:207-219.
- Mueller-Dieckmann, H.-J. und Schulz, G. (1994). The structure of uridylate kinase with its substrates, showing the transition state geometry. *J. Mol. Biol.*, 236:361-367.
- Murshudov, G., Vagin, A. und Dodson, E. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst.*, D53:240-255.
- Murthy, H., Hendrickson, W., Orme-Johnson, W., Merritt, E. und Phizackerley, R. (1988). Crystal structure of clostridium acidi-urici ferredoxin at 5 Å resolution based on measurements of anomalous X-ray scattering at multiple wavelengths. *J. Biol. Chem.*, 263:18430-18436.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Block, C., Janknecht, R. und A. Wittinghofer (1996). Ras/rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat. Struct. Biol.*, 3:723-729.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.*, A50:157-163.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. und Honig, B. (1993). GRASP: a graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.*, 64:A166.

- Nicholls, A., Sharp, K. und Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *PROTEINS, Structure, Function and Genetics.*, 11:281–296.
- Noel, J., Hamm, H. und Sigler, P. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature*, 366:654–663.
- Nogales, E., Wolf, S. und Downing, K. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391:199–203.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.*, 276:307–326.
- Padgett, S., Re, D., Barry, G., Eichholtz, D., Delannay, X., Fuchs, R., Kishore, G. und Fraley, R. (1996). *Herbicide-Resistant Crops, Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory, and Technological Aspects* (ed. S.O. Duke), chapter 4: New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. CRC Press Inc.
- Pai, E., Kabsch, W., Krenkel, U., Holmes, K., John, J. und A. Wittinghofer (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the h-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*, 341:209–214.
- Patterson, A. (1934). A fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.*, 46:372–376.
- Perutz, M. F. (1956). Isomorphous replacement and phase determination in non-centrosymmetric space groups. *Acta Cryst.*, 9:867.
- Pettifer, R. und Hermes, C. (1985). Absolute energy calculations of X-ray radiation from synchrotron sources. *J. Appl. Cryst.*, 18:404–412.
- Poland, B., Hou, Z., Fromm, C. B. H. und Honzatko, R. (1996). Refined crystal structures of guanine nucleotide complexes of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 271:15407–15413.
- Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C. und Nyborg, J. (1996). Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure*, 4:1141–1151.
- Ramakrishnan, C. und Ramachandran, G. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. ii. allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys. J.*, 5:909–933.
- Read, R. J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Cryst.*, A42:140–149.
- Rhodes, G. (1993). *Crystallography Made Crystal Clear*. Academic Press, San Diego.
- Richardson, J. (1985). Schematic drawings of protein structures. *Meth. Enzymol.*, 115:359–380.
- Rittinger, K., Walker, P., Eccleston, J., Smerdon, S. und Gamblin, S. (1997). Structure at 1.65 Å of rhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, 389:758–762.

- Sablin, E., Kull, F., Cooke, R., Vale, R. und Fletterick, R. (1996). Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature*, 380:555-559.
- Sablin, E., Vale, R. und Fletterick, R. (1998). Struktur des dimeren Motor-Proteins ncd. unveröffentlichte Ergebnisse.
- Sack, S., Dauter, Z., Wanke, C., Amrhein, N., Mandelkow, E. und Schönbrunn, E. (1996). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase of *enterobacter cloacae*. *J. Struct. Biol.*, 117:73-76.
- Sack, S., Müller, J., Marx, A., Thormählen, M., Mandelkow, E.-M., Brady, S. und Mandelkow, E. (1997). X-ray structure of motor and neck domains of rat brain kinesin. *Biochemistry*, 36:16155-16165.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. und Wittinghofer, A. (1997). The ras-rasGAP complex - structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science*, 277:333-338.
- Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W. und Wittinghofer, A. (1995). Crystal structure of the nuclear ras-related protein ran in its GDP-bound form. *Nature*, 374:378-381.
- Scheffzek, K., Kliche, W., Wiesmuller, L. und Reinstein, J. (1996). Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P1-(5'-adenosyl) P5-(5'-uridyl) pentaphosphate (UP5A) and Mg²⁺ at 2.2 Å: implications for water-mediated specificity. *Biochemistry*, 35:9716-9727.
- Schiltz, M., Prangé, T. und Fourme, R. (1994). On the preparation and X-ray data collection of isomorphous xenon derivatives. *J. Appl. Cryst.*, 27:950-960.
- Schönbrunn, E., Sack, S., Eschenburg, S., Perrakis, A., Krekel, F., Amrhein, N. und Mandelkow, E. (1996). Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase, the target of the antibiotic fosfomycin. *Structure*, 4:1065-1075.
- Silva, M., Poland, B., Hoffman, C., Fromm, H. und Honzatko, R. (1995). Refined crystal structures of unligated adenylosuccinate synthetase from *escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 254:431-446.
- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S., Kelly, V. und Duncan, K. (1996). Structure of the UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure*, 4:1465-1474.
- Smith, C. und Rayment, I. (1996a). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.*, 70:1590-1602.
- Smith, C. und Rayment, I. (1996b). X-ray structure of the magnesium(II)·ADP·vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, 35:5404-5417.

- Song, Y.-H. und Mandelkow, E. (1993). Recombinant kinesin motor domain binds to β -tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1671–1675.
- Stallings, W., Abdel-Meguid, S., Lim, L., Shie, H.-S., Dayringer, H., Leimgruber, N., Stegmann, R., Anderson, K., Sikorski, J., Padgett, S. und Kishore, G. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: A distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5046–5050.
- Stehle, T. und Schulz, G. (1992). Refined structure of the complex between guanylate kinase and its substrate GMP at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 224:1127–1141.
- Story, R. und Steitz, T. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*, 355:374–376.
- Story, R., Weber, I. und Steitz, T. (1992). The structure of the *E. coli* recA protein monomer and polymer. *Nature*, 355:318–325.
- Stout, G. und Jensen, L. (1989). *X-ray Structure Determination: a practical guide*. John Wiley, New York, second edition.
- Stryer, L. (1987). *Biochemie*. Vieweg, Braunschweig.
- Tari, L., Matte, A., Pugazhenti, U., Goldie, H. und Delbaere, L. (1996). Snapshot of an enzyme reaction intermediate in the structure of the ATP-Mg²⁺-oxalate ternary complex of *Escherichia coli* PEP carboxykinase. *Nat. Struct. Biol.*, 3:355–363.
- Teng, T. (1990). Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film. *J. Appl. Cryst.*, 23:387–391.
- Teplyakov, A., Sebastiao, P., Obmolova, G., Perrakis, A., Brush, G., Bessman, M. und Wilson, K. (1996). Crystal structure of bacteriophage T4 deoxynucleotide kinase with its substrates dGMP and ATP. *EMBO J.*, 15:3487–3497.
- Thormählen, M., Marx, A., Mueller, S., Song, Y.-H., Mandelkow, E.-M., Aebi, U. und Mandelkow, E. (1998). Interaction of monomeric and dimeric kinesin with microtubules. *J. Mol. Biol.*, 275:795–809.
- Tong, L., de Vos, A., Milburn, M. und Kim, S. (1991). Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J. Mol. Biol.*, 217:503–516.
- Vale, R. (1996). Switches, latches, and amplifiers: Common themes of G proteins and molecular motors. *J. Cell. Biol.*, 135:291–302.
- Vale, R. und Fletterick, R. (1997). The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:745–777.
- Vale, R., Reese, T. und Sheetz, M. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42:39–50.
- van Silfhout, R. und Hermes, C. (1995). X-ray instrumentation for a focused wiggler beamline at the EMBL outstation Hamburg. *Rev. Sci. Instrum.*, 66:1818–1820.

- Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. und Gay, N. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, 1:945-951.
- Wallace, A., Laskowski, R. und Thornton, J. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering*, 8:127-134.
- Wang, B. (1985). Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Meth. Enzymol.*, 115:90-112.
- Wanke, C. (1993). *The UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase from Enterobacter cloacae*. Dissertation, ETH Zürich.
- Wanke, C., Falchetto, R. und Amrhein, N. (1992). The UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl-transferase of *enterobacter cloacae*. molecular cloning, sequencing of the gene and overexpression of the enzyme. *FEBS-Lett.*, 301:271-276.
- Woehlke, G., Ruby, A., Hart, C., Ly, B., Homboother, N. und Vale, R. (1997). Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell*, 90:207-216.
- Yang, J., Laymon, R. und Goldstein, L. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analysis. *Cell*, 56:879-889.

Index

Autorenindex

- Abel et al. (1996), 70
- Abrahams et al. (1994), 21, 74
- Abrahams und Leslie (1996), 21
- Alexeev et al. (1994), 74
- Amor et al. (1994), 68
- Berchtold et al. (1993), 68
- Bernstein et al. (1977), 1, 74
- Berry et al. (1994), 74
- Brünger et al. (1990), 23, 39
- Brünger (1992a), 27, 39, 89
- Brünger (1992b), 26, 38, 39, 89
- Brünger (1993), 39, 89
- Brady (1985), 4
- Branden und Tooze (1991), 9
- Buth et al. (1996), 14
- CCP4 (1994), 25, 81, 89, 90
- Case et al. (1997), 55-57
- Cassidy und Kahan (1973), 7
- Coleman et al. (1994), 68
- Czworkowski et al. (1994), 66, 68
- Davies et al. (1994), 74
- Drenth (1994), 16
- Engh und Huber (1991), 23, 26
- Fisher et al. (1995), 68
- Fourme et al. (1992), 15
- Furey und Swaminathan (1997), 24, 29, 34, 36, 83, 84
- Georgiadis et al. (1992), 74
- Green et al. (1954), 16
- Gulick et al. (1998), 6, 56, 62
- Harker (1936), 17
- Harker (1956), 18
- Hendrickson et al. (1988), 19, 30
- Hendrickson et al. (1990), 32
- Hendrickson (1985), 26, 89, 90
- Hendrix et al. (1979), 14
- Henningsen und Schliwa (1997), 55
- Hoenger et al. (1998), 63
- Holmes (1997), 71
- Honig und Nicholls (1995), 28
- Hope et al. (1989), 13
- Hope (1990), 13
- Huang et al. (1995), 74
- Hutchinson und Thornton (1996), 51, 94
- Jones et al. (1991), 25, 41, 68
- Kendrew et al. (1958), 1
- Kirkpatrick et al. (1983), 23, 39
- Kjeldgaard et al. (1993), 68
- Kjeldgaard et al. (1996), 67
- Kjeldgaard und Nyborg (1992), 66, 68
- Kleywegt und Jones (1995), 27
- Kleywegt und Jones (1996), 26, 41
- Kleywegt (1996), 26, 61
- Kozielski et al. (1997a), 29, 37, 56
- Kozielski et al. (1997b), 6, 29, 37, 44, 63
- Kozielski (1997), 29, 37, 38, 44, 56, 61, 63
- Kraulis (1991), 27
- Kull et al. (1996), 6, 50, 56, 60, 62, 63, 65, 71
- Lambright et al. (1994), 68
- Lamzin und Wilson (1993), 45, 89, 90
- Laskowski et al. (1993), 27, 40, 46, 101
- Loewe et al. (1995), 3
- Mandelkow und Mandelkow (1995), 3
- Marquardt et al. (1992), 79, 96
- Marquardt (1993), 79
- Matte et al. (1996), 74
- Matthews (1968), 21, 34, 82
- Mixon et al. (1995), 68
- Moore und Endow (1996), 5
- Murshudov et al. (1997), 26, 39, 45
- Murthy et al. (1988), 19, 30
- Nassar et al. (1996), 68
- Navaza (1994), 25, 38
- Nicholls et al. (1991), 28, 55, 104
- Nicholls et al. (1993), 28, 55
- Noel et al. (1993), 68
- Nogales et al. (1998), 55, 66

Otwinowski und Minor (1997), 24, 34, 80
 Padgette et al. (1996), 8
 Pai et al. (1989), 66, 68
 Patterson (1934), 17, 29, 82
 Perutz (1956), 1, 16
 Pettifer und Hermes (1985), 14
 Poland et al. (1996), 74
 Polekhina et al. (1996), 70
 Ramakrishnan und Ramachandran (1965),
 27, 46
 Read (1986), 26
 Richardson (1985), 27
 Rittinger et al. (1997), 67
 Sablin et al. (1996), 6, 50, 51, 56, 60–62, 65
 Sablin et al. (1998), 56
 Sack et al. (1996), 79
 Sack et al. (1997), 6, 56
 Schönbrunn et al. (1996), 79, 96, 105, 106
 Scheffzek et al. (1995), 68
 Scheffzek et al. (1996), 74
 Scheffzek et al. (1997), 67
 Schiltz et al. (1994), 85
 Silva et al. (1995), 74
 Skarzynski et al. (1996), 79, 100, 102–105,
 109
 Smith und Rayment (1996a), 76
 Smith und Rayment (1996b), 68
 Song und Mandelkow (1993), 6
 Stallings et al. (1991), 8, 86, 96, 109
 Stehle und Schulz (1992), 74
 Story et al. (1992), 74
 Story und Steitz (1992), 74
 Stryer (1987), 7
 Tari et al. (1996), 74
 Teng (1990), 13, 81
 Teplyakov et al. (1996), 74
 Thormählen et al. (1998), 63
 Tong et al. (1991), 68
 Vale et al. (1985), 4
 Vale und Fletterick (1997), 55
 Vale (1996), 65, 71
 Walker et al. (1982), 65
 Wallace et al. (1995), 53
 Wang (1985), 21, 35
 Wanke et al. (1992), 79, 86
 Wanke (1993), 79
 Woehlke et al. (1997), 50, 54, 55, 62

Yang et al. (1989), 50, 54
 van Silfhout und Hermes (1995), 14

Themenindex

Absorptionskante, 19, 30, 34
 AEGT-Motiv, 97
 α -Helix, 10
 Aminosäuren, 9
 AMoRe, 25, 38
 anomale Beugung, 19, 30, 84
 ARP, 45
 Auflösungs Grenze
 effektive, 86
 β -Faltblatt, 10
 Beugungsbild
 EPT, 80
 Bijvoet-Paare, 19
 Bildplatte, 12
 Bildplattenscanner, 12

 CCD, 12
 CCP4, 25
 Chromosomen, 5
 Coiled-coil Helix, 56, 63
 constraints, 22
 Cyclohexylammonium, 80, 100

 Datenreduzierung, 34
 Denzo, 24, 34
 DESY, 13
 Dichtemodifikationen, 21
 nicht-kristallographische Symmetrie, 22
 Solvent Flipping, 22
 Solvent Flattening, 21
 Domäne, 10
 DORIS, 13
 Drehanodengenerator, 11
 Dynein, 5

 EF-G, 66
 EF-Tu, 66, 69
 Einheitszelle
 EPT, 80
 Kinesin-Monomer, 38
 Elektronendichte, 10, 18
 Dichtemodifikationen, 21
 elektrostatisches Potential, 28

- Kinesin-Oberfläche, 54
 Enolpyruvyltransferase, 6
 EPSP
 Faltungseinheiten, 96
 Vorläuferprotein, 96
 EPSP-Synthase, 8, 86
 Alignment mit EPT, 106
 Vergleich mit EPT, 106
 EPT, 6
 AEGT-Motiv, 97
 Alignment mit EPSP-Synthase, 106
 Beugungsbild, 80
 Cis-Peptide, 100
 Domänen, 92, 93
 Einheitszelle, 80
 Faltungseinheiten, 92, 93
 Verbindung zwischen, 96, 98
 Fourierdifferenzdichtekarten, 87
 Frostschuttlösung, 81
 Funktion, 7
 Harker-Ebene, 82
 Hinge, 104
 Hinge-Region, 99
 Klonierung, 79
 Konformation
 geschlossene, 103
 offene, 103
 Kristall-Packung, 100
 Kristallisation, 79
 Kryobedingungen, 81
 Lösungsmittelglättung, 85
 Loop 111-122, 105
 LXXXG(A)-Motiv, 96
 Matthews-Parameter, 82
 MIRAS, 84
 Modellbau, 89
 Molekularer Ersatz, 86
 Patterson-Funktion, 82
 pharmakologische Bedeutung, 8
 Phasenbestimmung, 84
 Phasenerweiterung, 85
 Phasierungsstatistik, 85
 Qualität des Modells, 101
 Ramachandran-Plot, 101
 Raumgruppe, 80, 82
 Refinement, 89
 Scharnier, 104
 Scharnier-Region, 99
 Schweratomderivate, 82, 84, 87
 Bindungsstellen, 87
 Gold, 87
 Platin, 87
 Xenon, 88
 Selbstrotation, 81
 solvent flattening, 85
 Struktur, 91
 Stereobild, 91
 Strukturbestimmung, 79
 Substrat-Inhibitor-Komplex, 79, 102, 105
 Suche nach Wassermolekulan, 90
 Symmetrie, 82
 Temperaturfaktoren, 102
 Topologie, 92
 Verfeinerung, 89
 Probsq, 90
 Simulated Annealing, 89
 Vergleich mit EPSP-Synthase, 106
 Vergleich nativ und Substrat-Inhibitor-Komplex, 102
 Vorläuferprotein, 96
 Wasserstoffbrückenbindung, 94
 Xenon-Methode, 86
 ESRF, 15, 30
 ETH Zürich, 79
 figure of merit, 18
 Fosfomycin, 7, 79, 102
 Fourier-Dichtekarte
 Differenz-, 31
 Fouriertransformation, 10
 Frostschuttlösung, 13
 $G_{i\alpha}$, 66
 $G_{t\alpha}$, 66
 G-Proteine, 65, 66, 75
 EF-G, 66, 68
 EF-Tu, 66, 68, 69
 $G_{i\alpha}$, 66, 68
 $G_{t\alpha}$, 66, 68
 human ribolysation factor, 68
 Nukleotidbindung, 66, 68
 geschlossene Konformation, 68
 offene Konformation, 68
 p21^{H-ras}, 66, 68
 Ran, 68

- Rap, 68
- Switchregionen, 65, 71
- GEF, 67
- genetischer Code, 9
- Glyphosat, 8
- GRASP, 28, 55
- GTPase aktivierendes Protein, 67

- Harker-Ebene, 17, 82
- Harker-Konstruktion, 18
- Harker-Linie, 17

- Image Plate, 12
- Inside-out- α - β -Barrell, 91
- Intensitäten
 - Integration von, 24
- isomorpher Ersatz, 16

- Kar3, 56, 62
- Kinesin, 3
 - Ähnlichkeit mit anderen Proteinen, 65
 - Bedeutung in der Zellteilung, 5
 - Bindung auf Mikrotubulus, 63
 - Dimer, 63
 - Coiled-coil Helix, 63
 - Differenz-Fourier-Dichtekarte, 31
 - Einheitszelle, 29
 - Figure of merit, 34
 - Kristalle, 29
 - MAD, 30
 - Matthews-Parameter, 34
 - MIRAS, 32
 - NCS, 35
 - Patterson-Funktion, 29
 - Phase extension, 35
 - Phasenbestimmung, 29
 - Phasing Power, 34
 - Quecksilberbindungsstelle, 31
 - Quecksilberderivat, 29
 - Raumgruppe, 29
 - Schweratomderivat, 29
 - Selenomethioninderivat, 32
 - SIRAS, 30
 - Solvent Flattening, 34
 - Strukturbestimmung, 29
 - Vergleich mit Monomer, 63
 - Dimerisierung, 51
 - Direktionalität, 55
 - Domänenstruktur, 5
 - elektronenmikroskopische Untersuchungen, 63
 - Funktion, 4
 - Halshelix, 51
 - Konformationsänderung, 71
 - menschliches, 60
 - Mikrotubuli-Bindungsregion, 54
 - Monomer
 - Einheitszelle, 38
 - Molekularer Ersatz, 38
 - Nukleotidbindungsstelle, 53, 54, 62
 - Out-of-register-Fehler, 42
 - Qualität des Modells, 47
 - Ramachandran-Plot, 46
 - Raumgruppe, 38
 - Strukturbestimmung, 37
 - Strukturmodell, 49
 - Suche nach Wassern, 45
 - Temperaturfaktoren, 48
 - Topologie, 50
 - Umbau, 39
 - Verfeinerung, 39
 - Vergleich mit Dimer, 63
 - Wasserstoffbrückenbindungen, 51
 - Motordomäne, 5
 - Nukleotidbindung, 71
 - Nukleotidbindungsstelle, 53, 62, 73
 - phylogenetischer Baum, 5
 - Struktur, 6
 - Strukturelemente, 50
 - Strukturmodell, 49
 - Switch Region, 58
 - Topologie, 50
 - Vergleich
 - Nukleotidbindungsstelle, 62
 - Vergleich mit ncd, 61
 - Vergleich von, 60
 - Vesikeltransport, 4

- Lösungsmittelglättung, 21
- lack of closure, 16
- LSQMAN, 26
- LURE, 86
- LURE(Orsay), 15
- LXXXG(A)-Motiv, 96

- MAD, 16, 19, 30

- Matthews-Parameter, 21, 34, 82
 Mikrotubuli, 3
 dynamische Instabilität, 4
 Transportvorgänge an, 4
 Mikrotubuli assoziiertes Protein (MAP), 3
 Mikrotubulus
 Minusende, 4
 Plusende, 4
 Millersche Indices, 10
 Millersche Indizes, 24
 MIR, 15
 MIRAS, 16, 32
 EPT, 84
 Moleküldynamik, 26
 Molekularer Ersatz, 16, 19, 25, 38
 AMoRe, 38
 EPT, 86
 Moleman, 26
 Molscript, 27
 Motorprotein, 3
 Motorproteine
 Minusmotoren, 56
 Plusmotoren, 56
 MR, 16, 19
 Multipler isomorpher Ersatz, 15
 Myosin, 65, 68, 70, 75
 Nukleotidbindung, 70

 ncd, 4, 61, 62
 NCS, 22, 35
 nicht-kristallographische Symmetrie, 22, 35
 Nukleinsäuren, 9

 O, 25
 OOPS, 26
 Oszillationsaufnahme, 24

 P-Loop, 65, 66, 74–76
 Proteine mit, 74
 p21^{H-ras}, 66
 Patterson-Funktion, 17, 29, 82
 Differenz-, 17
 Peptid, 9
 Peptidoglykan, 7
 Synthese, 7
 Phase extension, 35
 Phasenbestimmung
 EPT, 84

 Kinesin-Dimer, 29
 Kinesin-Monomer, 38
 Phases-Programmsuite, 24, 29, 33
 Phosphoenolpyruvat, 7, 106
 Poisson-Boltzmann-Gleichung, 28
 Polypeptid, 9
 Primärstruktur, 9
 Procheck, 27
 PROLSQ, 26
 Protein, 9
 Aufbau, 9
 Domäne, 10
 Faltung, 10
 Primärstruktur, 9
 Sekundärstruktur, 9
 Darstellung, 27
 Stereochemie, 27
 Struktur, 9
 Modellbau, 25
 Verfeinerung, 22
 Tertiärstruktur, 10
 ProteinDataBank (PDB), 1
 Proteinkristall
 Einfrieren von, 13
 Strahlenschaden, 13

R-Faktor, 22, 39
 Röntgengenerator, 11
 Röntgenkristallographie, 1
 Röntgenstrukturanalyse, 1
 Raumgruppe
 EPT, 80
 Kinesin-Monomer, 38
 Refinement, 22
 Refmac, 26, 39
 restraints, 22
*R*_{free}-Faktor, 39
 Rotationsfunktion, 20
 Roundup Ready™, 8

 Scalepack, 24
 Schweratomderivate
 EPT, 82
 Kinesin-Dimer, 29
 Schweratome, 17
 Sekundärstruktur, 9
 Selbstrotationsfunktion, 20, 81
 Selenomethioninderivat, 32

- Shikimate-Zyklus, 106
- Simulated Annealing, 23, 89
- SIRAS, 16, 19, 30
- Solvent Flattening, 21, 34
- Solvent Flipping, 22
- Spindelapparat, 5
- Stereomonitor, 25
- Strahlenschaden, 13
- Strukturfaktor, 10, 16
 - Phase, 15
- Suchmodell, 19
- Switch-Regionen, 58, 65, 73
 - Switch I, 65
 - Switch II, 65
- Synchrotronstrahlführung, 13
 - BM14, 15, 30
 - BW6, 14, 37
 - BW7b, 14, 83
 - W32, 15, 86
 - X11, 14
 - X31, 14, 80
- Synchrotronstrahlung, 30
- Tertiärstruktur, 10
- Translationsfunktion, 20
- Tubulin, 55, 66
- UDP-N-acetylglucosamin, 102
- Verfeinerung, 22
 - Dictionary, 23
 - Methode der kleinsten Quadrate, 23
 - Refmac, 45
 - Rigid-Body, 38
 - Simulated Annealing, 39, 40
 - Simuliertes Annealing, 23
- Wiggler, 14
- X-PLOR, 26, 38, 39
- X31, 80
- Xenon-Methode, 15, 85
- Zellwand
 - bakterielle, 6