Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie

UNI DO

Kristallstruktur der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* im Komplex mit DNA und einem Cofaktoranalogon

Der katalytische Mechanismus und der durch DNA-Kompression induzierte Nukleotidausklappmechanismus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Dokor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Karsten Goedecke

aus Darmstadt

Dortmund, im Juni 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Juni 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Dr. Elmar Weinhold und Dr. Axel J. Scheidig in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. R.S. Goody

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung **1**

1 DNA als Träger der genetischen Information 1

2 Die Struktur der DNA 2

3 DNA-bindende Proteine 4

3.1 Das Helix-Turn-Helix-Motiv 5

3.2 Das Zinkfinger-Motiv 6

3.3 Das Leucin-Zipper-Motiv 7

4 Die DNA-Methylierung 8

5 Die DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* (M·*Taq*I) 12

B Aufgabenstellung und Zielsetzung **15**

C Ergebnisse und Diskussion **16**

1 Kristallstruktur des binären Komplexes aus M·*Taq*I und 5‘-[2-(Amino)ethylthio]-5‘-desoxyadenosin (AETA) 16

1.1 Kristallisationsbedingungen 16

1.2 Datensammlung 16

1.3 Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung 19

1.4 Mess- und Verfeinerungsstatistik 20

1.5 Die dreidimensionale Struktur des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA 22

1.6 Beschreibung der AETA-Bindung im binären Komplex 28

1.7 AETA ist kein Substratanalogon für einen positiven Übergangszustand 31

2 Kristallstruktur des ternären Komplexes au M·*Taq*I, DNA und AETA 34

2.1 Kristallisationsbedingungen 34

2.2 Datensammlung 37

2.3 Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung 39

2.4 Mess- und Verfeinerungsstatistik 41

2.5 Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA 46

2.6 Vergleich der Struktur von M·*Taq*I im ternären Komplex und binären Komplex mit AdoMet 51

2.7 Beschreibung der DNA-Konformation und -Bindung 56
2.8 Beschreibung der AETA-Bindung im ternären Komplex 71
2.9 Vergleich der AETA-Bindung in der ternären Struktur mit der AETA-Bindung und der AdoMet-Bindung in den binären Strukturen 73
2.10 Der Nukleotidausklappmechanismus 76
2.11 Der katalytische Mechanismus der Methylierung 79
2.12 Vergleich mit anderen Methyltransferasen und pharmakologische Relevanz 83

D Zusammenfassung und Ausblick 88

E Experimenteller Teil 90

1 Materialien 90
1.1 Geräte 90
1.2 Chemikalien 90
1.3 Protein 90
1.4 Cofaktoranalogon 91
1.5 Oligodesoxyribonukleotide 91
2 Programme und Programmpakete 92
2.1 Prozessierung und Skalierung 92
2.2 Phasierung 92
2.3 Verfeinerung 92
2.4 Grafikprogramme 94
2.5 Stereochemische Analyse 95
3 Methoden 95
3.1 Konzentrationsbestimmung von M·*Taq*I 95
3.2 Hybridisierung der Oligodesoxyribonukleotide 95
3.3 Vorbereitung der Proben für die Kristallisation 95
3.4 Silanisieren der Deckgläser 95
3.5 Kristallisationsansätze und -bedingungen 96
3.6 Kristallmontage 98
3.7 Aufnahme der Röntgendiffraktionsdaten 99

F Literaturverzeichnis 100

Verwendete Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 10^{-10} m)
AdoHcy	*S*-Adenosylhomocystein
AdoMet	*S*-Adenosyl-L-methionin
AETA	5‘-[2-(Amino)ethylthio]-5‘-desoxyadenosin
B-Faktor	Temperaturfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
h	Stunden
H-Brücken	Wasserstoffbrückenbindungen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
K	Kelvin
K_D	Dissoziationskonstante
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
M·*Taq*I	N6-Adenin-DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus*
ncs	nicht kristallographische Symmetrie
pdb	Format für Koordinatendatei (*protein data base*)
PEG	Polyethylenglykol
r.m.s.	Wurzel des kleisten Quadrates (*root mean square*)
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Röntgenstrukturanalyse
RT	Raumtemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Ein- und Dreibuchstabencode von L-Aminosäuren und Nukleobasen

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Adenin	A	Ade
Cytosin	C	Cyt
Guanin	G	Gua
Thymin	T	Thy

A Einleitung

1 DNA als Träger der genetischen Information

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der Träger der gesamten Erbinformation eines jeden aus Zellen bestehenden Organismus und vieler Viren. Jede Zelle besitzt diese vollständige Information in Form von DNA. Dabei ist die genetische Information in der Sequenz der vier Nukleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin gespeichert. Begonnen hat die Identifizierung der DNA als Träger der Erbinformation 1866 mit der Veröffentlichung der Vererbungsgesetze durch Gregor Mendel. Er erhielt diese nach ihm benannten Gesetze durch Kreuzungsversuche mit Pflanzen und deren Auswertung. Der Höhepunkt der wissenschaftlichen Untersuchung von DNA war sicherlich die dreidimensionale Strukturaufklärung der DNA von Watson und Crick im Jahre 1953 (Watson & Crick, 1953). Die Struktur der DNA bildete die Grundlage für die Entwicklung der Molekularbiologie, die für das Verständnis des Lebens eine immer größere Rolle spielt.

Die komplette DNA eines Organismus, die die Erbinformation trägt, liegt in Form von Chromosomen vor. Diese Chromosomen beinhalten die einzelnen Gene, die man als die kleinste vererbbare Einheit eines DNA-Moleküls bezeichnen kann. Jedem Gen, mit Aussnahme der Gene für ribosomale und Transfer-RNA, kann dabei eine Peptidkette zugeordnet werden (Löffler & Petrides, 1997). Somit kodiert die DNA die für den Aufbau, Erhalt und Funktion des Lebens notwendigen Proteine. Die Proteinbiosynthese findet dabei mit Hilfe von Ribonukleinsäuren (RNA) in den Ribosomen statt. Dieser schematisch einfache Aufbau des Lebens wird im zentralen Dogma der Molekularbiologie ersichtlich (Schema 1).

Schema A1.1

Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Die Bedeutung des dreidimensionalen Verständnis von Biomolekülen wurde kürzlich durch die Bestimmung der Ribosomstruktur durch Ban *et al.* (1999) erneut verdeutlicht. Mit dem strukturellen Wissen über das Ribosom kann jetzt das letzte noch wenig bekannte Gebiet im Rahmen der Proteinbiosynthese aufgeklärt werden.

2 Die Struktur der DNA

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der DNA mittels Röntgenbeugung durch Watson und Crick war der Durchbruch für das Verständnis der Erbinformation. Die DNA ist ein kettenförmiges Biopolymer, das sich aus zwei antiparallelen Strängen zusammensetzt, die eine Doppelhelix mit einem Durchmesser von 20 Å ausbilden. Jeder einzelne Strang besteht aus Nukleosiden, die über eine 3‘-5‘-Phosphordiesterbindung miteinander verknüpft sind. Eine Nukleotideinheit besteht aus einem Phosphat-, einem 2‘-Desoxyriboserest und einer von vier möglichen Nukleobasen, die β-glykosidisch mit dem C1‘-Atom der 2‘-Desoxyribose verbunden sind. Diese aromatischen Nukleobasen sind Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Jede dieser Basen paart über Wasserstoffbrücken mit einer Base des anderen Strangs, wobei immer Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin ein Basenpaar bilden. Die Basenpaare sind dabei im Inneren der DNA-Doppelhelix lokalisiert und stapeln sich senkrecht zur Helixachse. Sie werden durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat, das die Peripherie der Doppelhelix bildet, umhüllt. Die DNA kann in verschiedenen Konformationen vorkommen, wobei die drei wichtigsten die A-, B- und die Z-Form sind (Dickerson *et al.*, 1982). Die B-Form ist dabei die normalerweise bevorzugte und physiologisch am häufigsten vorkommende Form. Die B-DNA bildet eine rechtsgängige Helix mit einer großen und einer kleinen Furche, die beide in etwa die gleiche Tiefe besitzen. Allerdings ist die Form der DNA hauptsächlich abhängig von äußeren Einflüssen wie Wassergehalt, Salzgehalt und -konzentration sowie pH-Wert. Die bei niedrigen Wasser- und Salzgehalt vorkommende A-DNA bildet ebenfalls eine rechtsgängige Doppelhelix mit einer kleinen und einer großen Furche aus. Der Durchmesser der A-DNA ist allerdings größer und die große Furche ist tief im Gegensatz zur extrem abgeflachten kleinen Furche. Diese Struktur resultiert aus der Lage der Basenpaare, die um ca. 20° zur Helixachse geneigt sind. Z-DNA unterscheidet sich von A- und B-DNA durch eine linksgängige Doppelhelix. Innerhalb der Z-DNA-Struktur verläuft das Zucker-Phosphat-Rückgrat in einer Zick-Zack-Form, was der Z-DNA ihren Namen gab. Ausserdem besitzt Z-DNA eng benachbarte Phosphatgruppen und die große Furche ist flach, wogegen die kleine Furche eng und tief ist. Obwohl alle beschriebenen Formen der DNA in röntgenkristallographischen oder NMR-Untersuchungen nachgewiesen sind (Wells, 1988), wird die biologische Relevanz von A- und Z-DNA noch immer diskutiert (Jaworski *et al.*, 1987). In diesem Zusammenhang ist die Strukturbestimmung der DNA-Bindungsdomäne einer RNA-Adenosindesaminase im Komplex mit Z-DNA besonders interessant (Schwartz *et al.*, 1999).

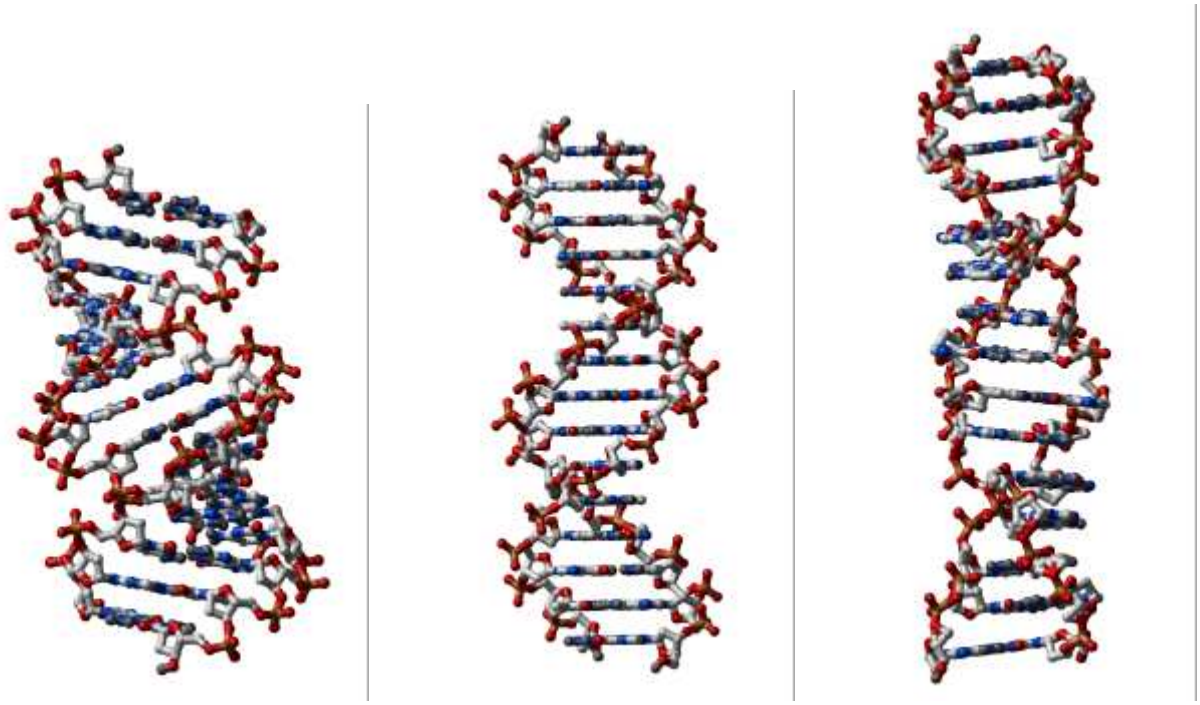


Abbildung A2.1

Darstellung der Idealstrukturen von A-, B- und Z-DNA. Die Strukturen wurden mit dem Programm NAMOT generiert und beinhalten alle eine Sequenz von 15 Basenpaaren.

Um die biologische Funktion der Speicherung der Erbinformation zu gewährleisten, muss die DNA eine Reihe von Eigenschaften erfüllen. Eine wichtige Eigenschaft ist dabei sicherlich die mechanische Stabilität. Voet & Voet (1992) vergleichen die DNA als ungekochte Spaghetti von mehreren Kilometern Länge. Da in jedem Zellkern die komplette Erbinformation des Organismus in Form von DNA gespeichert ist, muss die DNA mechanischen Belastungen standhalten können. Dies macht ein Grössenvergleich deutlich: Das menschliche Genom ist fast zwei Meter lang und besitzt einen Durchmesser von ca. 20 Å, ein Zellkern hat einen Durchmesser von 0,5 µm. Dies zeigt die Flexibilität der DNA, die eine dichte Packung im Zellkern mit Hilfe von Histon-Proteinen einnimmt. Diese Proteine bilden als Dimere die Nucleosomen, von denen vier Dimere wiederum eine octamere, scheibenförmige Nucleosomen-Core-Struktur ausbilden. Um diese Struktur windet sich die DNA, wobei sie eine flache, linksgängige Superhelix ausbildet. Diese Nukleosomen bilden weitere dichte, kondensierte Überstrukturen, die man als Chromatin bezeichnet (Kornberg & Lorch, 1992).

3 DNA-bindende Proteine

Die Komplexität des Lebens auf molekularer Ebene bewirkt ein ständiges Wechselwirken der Biomoleküle untereinander. Unter den biologischen Makromolekülen besitzen die DNA als Erbinformationsträger und die Proteine als funktionelle Bausteine eine herausragende Stellung. Die Wechselwirkungen dieser beiden Biopolymere ist ein seit langer Zeit detailliert untersuchtes Forschungsgebiet. Welche Proteine binden an DNA und wie tun sie dies? Die Anzahl der DNA-bindenden Proteine ist enorm. Aufgrund der universellen Bedeutung der DNA kommen DNA-bindende Proteine in allen Organismen vor. Die Funktion der einzelnen Proteine ist dabei höchst unterschiedlich. Zu den DNA-bindenden Proteinen gehören unter anderem Aktivator- und Repressorproteine, Histone, Polymerasen, Nukleasen, Glykosylasen und DNA-modifizierenden Proteine wie Methyltransferasen.

Die Art und Weise der DNA-Bindung ist dabei sehr komplex. So binden einige der genannten Proteine nur innerhalb bestimmter Sequenzen an der DNA. Damit muss das Protein in der Lage sein, nicht nur die DNA an ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zu erkennen, sondern auch die Basen im Inneren der Doppelhelix zu diskriminieren. In fast allen Fällen verändert sich die Konformation der DNA bei der Bindung von Proteinen. Eine häufig beobachtete Änderung der DNA-Konformation ist das Knicken. Die Stärke der Krümmung ist dabei unterschiedlich und variiert von wenigen Grad (Newman *et al.*, 1995) über 90° (Schultz *et al.*, 1991) bis zu 180° (Rice *et al.*, 1996). Allerdings finden sich bei Proteinen auch Gemeinsamkeiten bei der DNA-Bindung und -Erkennung. Diese sind neben ähnlicher Tertiärstrukturen bei verwandten Proteinen vor allem die Motive, mit denen die DNA erkannt und gebunden wird. Diese Motive finden sich in Proteinen mit den unterschiedlichsten Funktionen und sind bereits gut untersucht. Die folgenden wichtigsten und am besten charakterisierten Proteinmotive, die für DNA-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich gemacht werden, werden näher erläutert:

- Das Helix-Turn-Helix-Motiv
- Das Zinkfinger-Motiv
- Das Leucin-Zipper-Motiv

3.1 Das Helix-Turn-Helix-Motiv

Das Helix-Turn-Helix-Motiv wurde zuerst als ein konserviertes Tertiärstrukturelement in Repressoren gefunden, die von Lambdaphagen aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium* codiert werden (Travers, 1994). Dieses Strukturelement wurde in einer Vielzahl von DNA-bindenden Proteinen in Prokaryoten und Eukaryoten wiedergefunden und besitzt einen hohen strukturellen Konservierungsgrad. Das Helix-Turn-Helix-Motiv ist direkt an der sequenzspezifischen DNA-Erkennung beteiligt und besteht aus zwei α-Helices, die über eine β-Schleife miteinander verbunden sind. Die β-Schleife besteht aus vier Aminosäureresten, von denen der zweite ein Glycinrest ist. Dabei beteiligt sich die β-Schleife nicht an der DNA-Bindung, sondern unterstützt die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren. Die kurze und flexible β-Schleife dient als Scharnier und ermöglicht es den Helices, gegenseitige hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen. Dadurch werden die Helices relativ zueinander stabilisiert und bilden ein Tertiärstrukturelement (Steitz, 1993).

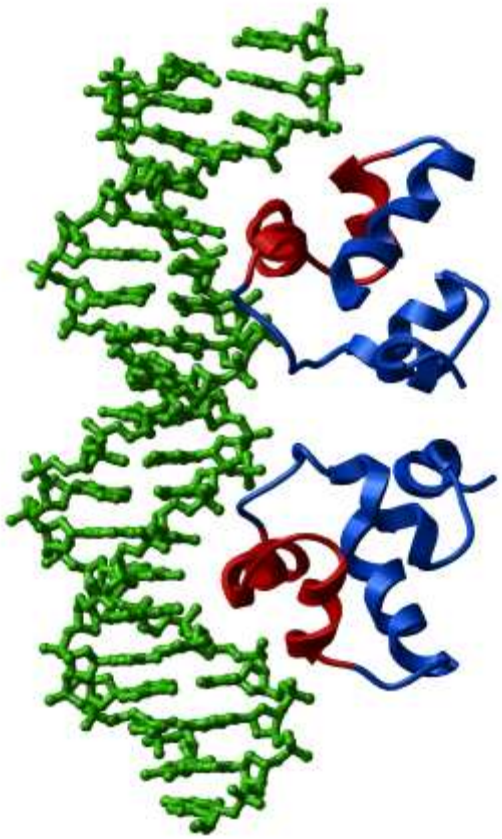


Abbildung A3.1

Kristallstruktur eines Dimers des Lambda-Phagen-434-Repressor-Proteins (blau) im Komplex mit DNA (grün). Die Helix-Turn-Helix-Motive sind in rot dargestellt (Aggarwal et al., 1988).

Obwohl die Struktur dieses Strukturelementes hoch konserviert ist, kann die Orientierung des Motivs zur DNA-Bindungsstelle variieren. Die Erkennung der DNA erfolgt in der Regel über eine der beiden Helices. Diese lagert sich in der großen Furche der DNA an und wechselwirkt dort hauptsächlich sequenzspezifisch über Aminosäureseitenketten mit den Nukleobasen. Dabei spielt nicht nur die Basensequenz der DNA eine Rolle, sondern auch die Verformbarkeit und Biegsamkeit des DNA-Rückgrats. In Abbildung A3.1 ist exemplarisch die Kristallstruktur des Lambda-Phagen-434-Repressor-Proteins im Komplex mit DNA dargestellt.

3.2 Das Zinkfinger-Motiv

Ein weiteres in vielen DNA-bindenden Proteinen anzutreffendes Strukturelement ist das Zinkfinger-Motiv. Ursprünglich wurde dieses Motiv beim Transkriptionsfaktor TFIIIA beobachtet (Klug & Rhodes, 1987). Die Fingerstruktur entsteht durch Positionierung von Cysteinyl- und Histidinylresten innerhalb einer Peptidkette durch Komplexierung mit einem Zinkion. Dabei entsteht eine schleifenförmige Struktur, die α-helikale und β-Faltblattstrukturen ausbilden kann. Dieser Zinkfinger kann die DNA sequenzspezifisch in der großen Furche erkennen (Abbildung A3.2). Die Fingerstruktur wird nicht nur durch die tetraedrische Koordination zum Zinkion, sondern auch durch eine hydrophobe Tasche im Inneren der Struktur stabilisiert. Diese Tasche beinhaltet eine Reihe von hochkonservierten Aminosäureresten. Das Sequenzmotiv eines Zinkfingers hat die Form X_3-Cys-X_{2-4}-Cys-X_{12}-His-X_{3-4}-His-X_4, wobei X jeder beliebige Aminosäurerest sein kann. Allerdings findet man neben Cys_2/His_2- auch Cys_2/Cys_2-Zinkfinger. Ähnlich wie beim Helix-Turn-Helix-Motiv wechselwirkt beim Zinkfinger eine α-Helix mit der großen Furche der DNA. Dabei erkennt ein Zinkfinger normalerweise drei Basenpaare. Außerdem hat es den Anschein, dass im Gegensatz zu anderen DNA-Bindungsmotiven beim Zinkfinger die Kontakte zwischen Arginin- und Guaninresten besonders wichtig sind (Pavletich & Pabo, 1991).

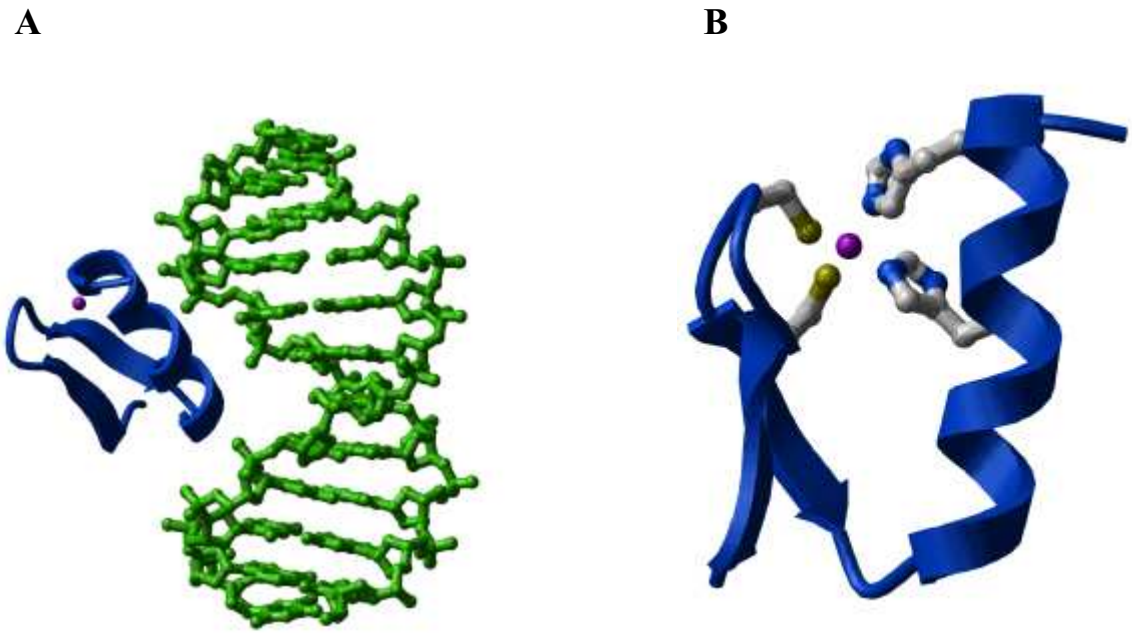


Abbildung A3.2

Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Zinkfingerproteins Zif268 (blau) im Komplex mit DNA (grün) (Pavletich & Pabo, 1991).

(A) Gesamtansicht eines Teils des Komplexes mit einem Zinkion (magenta).

(B) Vergrößerung des Zinkfingermotives mit den vier komplexierten Aminosäureresten und den Zinkion.

3.3 Das Leucin-Zipper-Motiv

Als Monomere bestehen Leucin-Zipper-Proteine aus zwei Domänen. Die eine Domäne ist eine α-Helix, die besonders Leucin-haltig ist. Die andere ist eine Region mit hauptsächlich basischen Aminosäuren, die die sequenzspezifische Bindung an DNA ermöglicht. Dabei wird erst bei der Bindung an DNA aus dieser zweiten Region eine α-Helix gebildet (Weiss *et al.*, 1990). Ein besonderes Merkmal der Leucin-Zipper-Proteine ist ihre Fähigkeit, zu dimerisieren (Abbildung A3.3). Diese Dimerisierung erfolgt über die Leucin-haltige α-Helix und bildet eine Coiled-Coil-Struktur. Dabei interagieren die Leucinreste der beiden α-Helices über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander. Des weiteren wird der Dimer durch eine Reihe von intra- und innerhelikalen Salzbrücken stabilisiert. Erkannt wird die DNA durch spezifische und unspezifische Wechselwirkungen in der großen Furche.

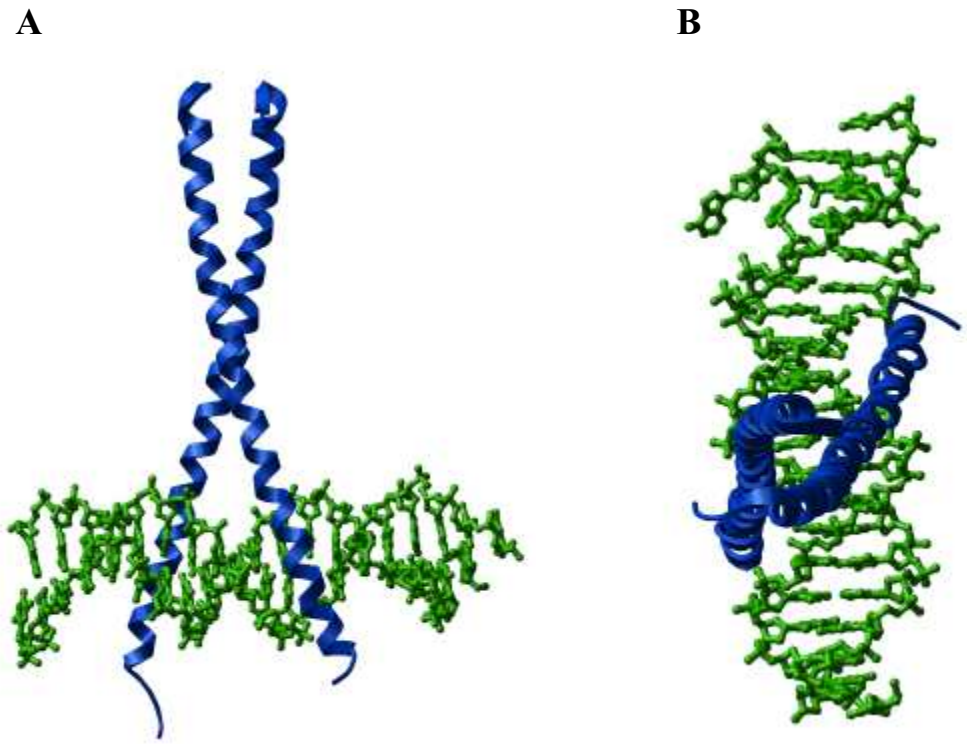


Abbildung A3.3

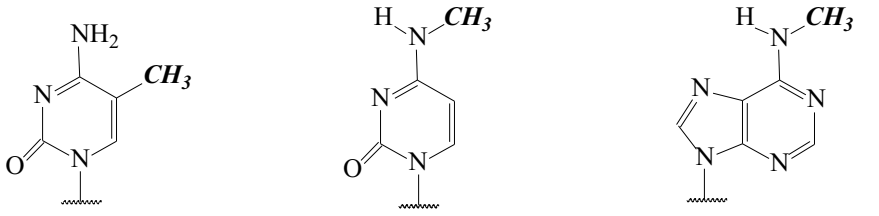
Kristallstruktur des GCN4 Leucin-Zippers (blau) im Komplex mit DNA (grün) (Ellenberger et al., 1992). Die Ansichten (A) und (B) sind zueinander um 90° gedreht.

4 Die DNA-Methylierung

Die chromosomale DNA ist ständigen Einflüssen unterworfen. Diese sind mechanischer, chemischer oder physikalischer Natur und können die DNA modifizieren und damit schädigen. Aus diesem Grund gibt es Reparaturenzyme, die diese Schädigungen beheben und so dafür sorgen, dass die DNA ihre Funktion als Erbinformationsträger fehlerfrei ausüben kann. Es gibt jedoch auch gezielte Modifikationen der DNA, die Einfluss auf wichtige biologische Prozesse haben. Zu diesen Modifikationen zählt die DNA-Methylierung. Formal stellt die DNA-Methylierung eine Erhöhung des Informationsgehalts der DNA dar. Diese Reaktion kommt in fast allen ein- und mehrzelligen Organismen vor. So ist zum Beispiel ungefähr fünf Prozent aller Basen im Genom von Säugetieren methyliert. Die Funktion der DNA-Methylierung ist vielfältig. In Prokaryoten dient die DNA-Methylierung oft dem Schutz vor endogenen Restriktionsendonukleasen, die diese Einzeller wiederum vor in die Zelle eindringender viraler DNA schützen. Dabei erfolgt die DNA-Methylierung einer Base meist innerhalb der spezifischen DNA-Erkennungssequenz von den zelleigenen

Restriktionsenzymen, die die Fragmentierung (Hydrolyse) der DNA katalysieren. Die fremde, nicht methylierte DNA wird von den Restriktionsendonukleasen zerstört, wogegen die zelleigene DNA durch die Methylierung geschützt ist (Wilson & Murray, 1991). Eine weitere biologische Funktion hat die DNA-Methylierung bei der Reparatur von Basenfehlpaarungen. Im Verlauf der DNA-Replikation behält der parentale Strang seine methylierten Basen, während der neu synthetisierte Strang nicht methyliert ist. Erst nach der Replikation wird der neu synthetisierte Strang methyliert, die DNA-Methylierung ist also postreplikativ. Somit lassen sich Basenfehlpaarungen direkt nach der Replikation durch DNA-Reparaturenzyme zugunsten des parentalen Stranges korrigieren (Modrich, 1994). Die DNA-Methylierung in Eukaryoten spielt eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und der Regulierung der Genexpression. Durch diese regulatorische Bedeutung hat die DNA-Methylierung auch eine Bedeutung bei der Krebsentstehung (Spruck III *et al.*, 1993).

Vollzogen wird die DNA-Methylierung durch DNA-Methyltransferasen, die den enzymatischen Transfer der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors *S*-Adenosyl-L-methionin (AdoMet) (**1**, Schema A5.1) auf verschiedene Basen der DNA innerhalb einer Erkennungssequenz katalysieren (Abbildung A4.1). Die DNA-Methyltransferasen werden in zwei Klassen unterteilt. Die Klasse der C-DNA-Methyltransferasen katalysiert die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors AdoMet auf die C5-Position eines Cytosinrestes. Die Klasse der N-DNA-Methyltransferasen katalysiert die Methylierung der exozyklischen Aminogruppen von Cytosin- und Adeninresten.



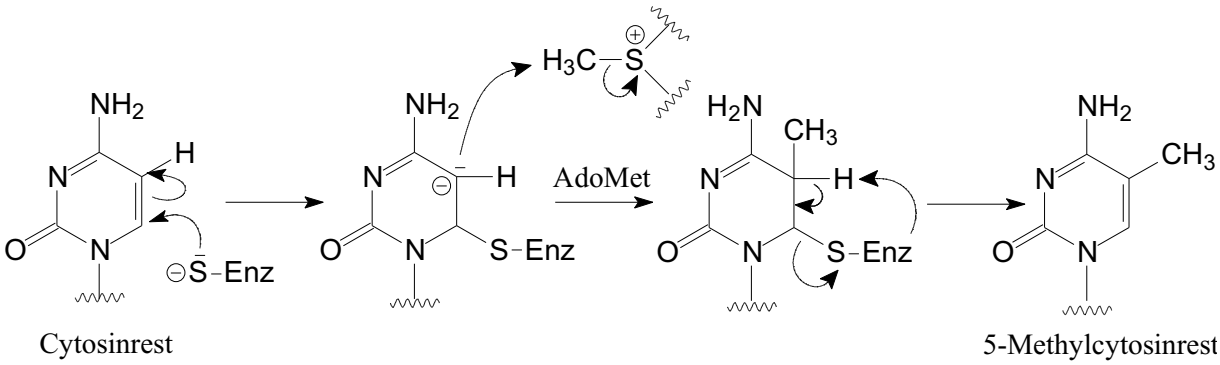
C5-Methylcytosinrest N4-Methylcytosinrest N6-Methyladeninrest

Abbildung A4.1

Enzymatisch methylierte Basen in der DNA.

Ein Sequenzvergleich aller AdoMet-abhängigen C5-Cytosin-DNA-Methyltransferasen hat gezeigt, dass es zehn konservierte Aminosäuremotive gibt (Lauster *et al.*, 1989; Posfai *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 1994). Der Mechanismus der Methylgruppenübertragung der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferasen ist weitgehend aufgeklärt (Wu & Santi, 1987). Der erste Schritt ist dabei der nukleophile Angriff der Thiolgruppe eines konservierten Cysteinrestes des

Motivs IV auf die C6-Position des Cytosinrestes. Durch dieses kovalente Addukt wird die C5-Position des Cytosinrestes aktiviert, und die ebenfalls aktivierte Methylgruppe des Cofaktors AdoMet (**1**) kann nukleophil angegriffen werden. Dann erfolgt eine β-Eliminierung des C5-Protons und des Thiolatrests an der C6-Position des methylierten Cytosinrestes (Schema A4.1). Wenn man das Zielcytosin gegen ein 5-Fluorocytosin ersetzt, kann man die Reaktion auf der Stufe des kovalenten Zwischenprodukts anhalten, da beim 5-Fluorocytosin keine β-Eliminierung erfolgen kann (Osterman *et al.*, 1988).



Schema A4.1

Mechanismus der durch C5-Cytosin-DNA-Methyltransferasen katalysierten Methylierung.

Auch die Kristallstrukturen der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferasen M·*Hha*I im Komplex mit DNA und dem Cofaktor AdoMet und M·*Hae*III im Komplex mit DNA haben zum Verständnis des katalytischen Mechanismus der C-DNA-Methyltransferasen erheblich beigetragen (Klimasauskas *et al.*, 1994; Reinisch *et al.*, 1995). Diese beiden Strukturen waren bisher die einzigen DNA-Methyltransferasen, deren Kristallstruktur im Komplex mit DNA bestimmt werden konnte (Abbildung A4.2). Da das zu methylierende 5-Kohlenstoffatom des Zielcytosins im Inneren der DNA-Doppelhelix lokalisiert ist, stellt sich die Frage, wie es für eine Reaktion zugänglich gemacht wird. In beiden Strukturen ist eine erstaunliche Verzerrung der DNA zu erkennen, die es den Enzymen auf elegantem Wege ermöglicht, das Zielcytosin zu methylieren. In beiden Strukturen ist das Zielcytosin aus der DNA-Doppelhelix um 180° herausrotiert, ohne dass kovalente Bindungen innerhalb der DNA aufbrechen. Diese DNA-Konformation bringt das Zielcytosin mit dem zu methylierenden 5-Kohlenstoffatom in räumliche Nähe zum Cofaktor AdoMet, so dass die oben beschriebene Methylgruppenübertragungsreaktion stattfinden kann.

A **B**

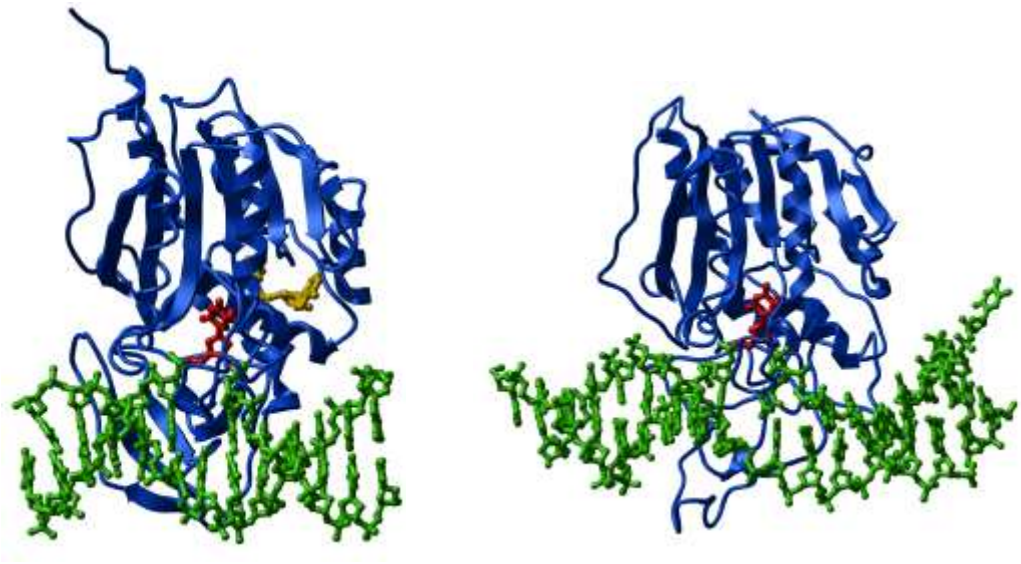


Abbildung A4.2

*(A) Kristallstruktur der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferasen M·*Hha*I im Komplex mit DNA (grün) und AdoMet (gelb) (Klimasauskas* et al.*, 1994). (B) Kristallstruktur der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferase M·*Hae*III im Komplex mit DNA (grün) (Reinisch* et al.*, 1995). Die ausgeklappten Zielcytidine sind in rot dargestellt.*

Im Gegensatz zum katalytischen Mechanismus der C-DNA-Methyltransferasen ist über den katalytischen Mechanismus der N-DNA-Methyltransferasen weniger bekannt. Sequenzvergleiche der N-Methyltransferasen haben gezeigt, dass diese der Klasse der C-DNA-Methyltransferasen strukturell ähnlich sind und dass man ihnen neun der zehn für C-DNA-Methyltransferasen gefundenen Motive zuordnen kann (Malone *et al.*, 1995). Dabei spielen die Motive I, II, III und X eine Rolle bei der AdoMet-Bindung, die Motive IV-VIII haben katalytische Funktion. Die Klasse der N-Methyltransferasen wird aufgrund der unterschiedlichen sequenziellen Anordnung der Motive in drei weitere Gruppen unterteilt. Die Enzyme der α-Gruppe haben folgende Reihenfolge der funktionalen Elemente: AdoMet-Bindungsregion, DNA-Erkennungsregion und katalytische Region. In den Enzymen der β-Gruppe lautet die Reihenfolge: Katalytische Region, DNA-Erkennungsregion und AdoMet-Bindungsregion, wogegen die γ-Gruppe die Reihenfolge AdoMet-Bindungsregion, katalytische Region und DNA-Erkennungsregion aufweist.

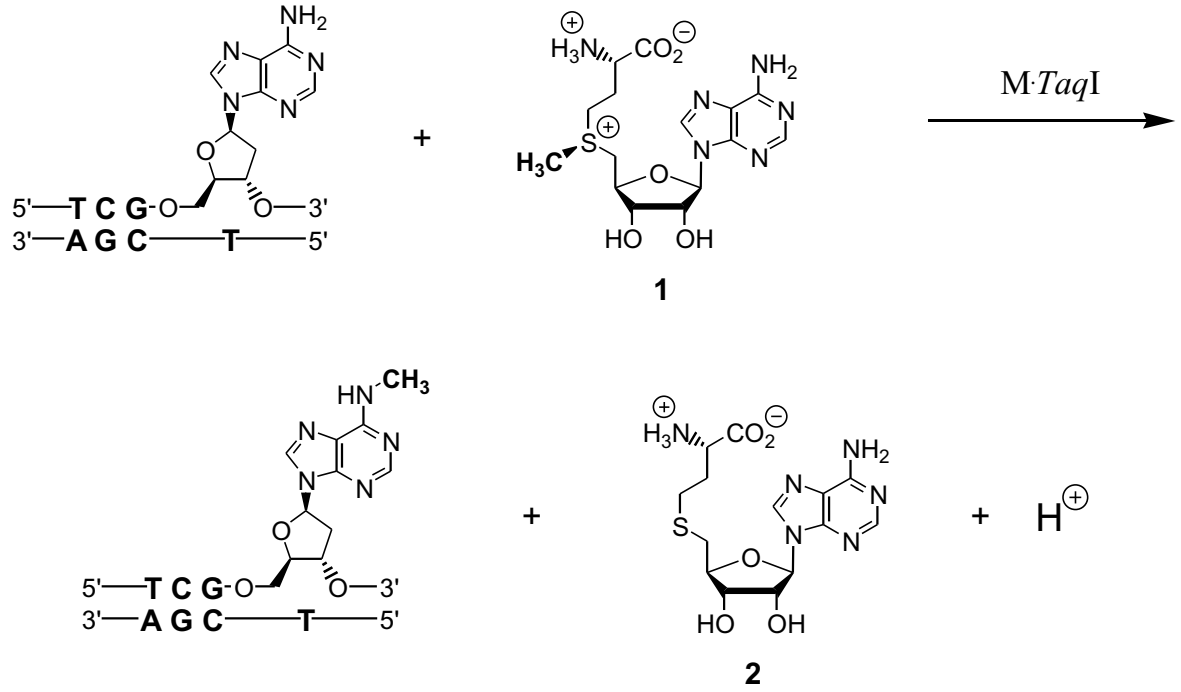
Der katalytische Mechanismus der N-Methyltransferasen kann trotz der beschriebenen Sequenzhomologien nicht von den C-DNA-Methyltransferasen abgeleitet werden, da ein anderes Atom methyliert wird. Bei der chemischen Methylierung von Adenin wird die Methylgruppe zuerst auf die N1-Position des Adenins übertragen. Dann erfolgt eine hydrolytische Spaltung der N1-C2-Bindung, an die sich eine Rotation der C5-C6-Bindung

anschließt. Nach der Dehydratation findet der Ringschluss zum N6-Methyladenin statt (Haines *et al.*, 1964). Diesen Mechanismus nennt man Dimroth-Umlagerung. Pogolotti *et al.* (1988) konnten zeigen, dass die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase M·*EcoR*I die direkte Übertragung der Methylgruppe katalysiert und somit keine Dimroth-Umlagerung stattfindet. Des weiteren erfolgt bei der enzymatischen Methylierung des Adenins mit M·*EcoR*I eine Inversion der Konfiguration der übertragenen Methylgruppe (Ho *et al.*, 1991). Dies lässt auf einen S_N2-Mechanismus bei der Reaktion schließen.

Die einzigen dreidimensionalen Kristallstrukturen von N-DNA-Methyltransferasen, die bisher charakterisiert wurden, sind die von M·*Taq*I (Labahn *et al.*, 1994), von M·*Pvu*II (Gong *et al.*, 1997) und von DpnM (Tran *et al.*, 1998). Alle drei Strukturen wurden jedoch nur ohne DNA bestimmt, so dass detaillierte Aussagen über den Mechanismus der DNA-Methylierung nicht getroffen werden können. Strukturell deutet allerdings vieles darauf hin, dass alle drei Enzyme ähnlich wie die C-DNA-Methyltransferasen einen Basenausklappmechanismus vollziehen. Unterstützt wird diese Vermutung durch Titrationsexperimente von Holz *et al.* (1998), die einen Basenausklappmechanismus für M·*Taq*I implizieren.

5 Die DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* (M·*Taq*I)

Die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase M·*Taq*I katalysiert die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors AdoMet (**1**) auf die N6-Position des Adenins innerhalb der palindromischen Sequenz 5‘-TCG**A**-3‘ von doppelsträngiger DNA (Schema A5.1). Das Reaktionsprodukt dieser Reaktion ist neben der methylierten DNA das Cofaktorprodukt *S*-Adenosyl-L-homocystein (**2**, AdoHcy) und ein Proton. M·*Taq*I stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und bildet zusammen mit der Restriktionsendonuklease R·*Taq*I ein Restriktions-Modifikationssystems. Erhalten kann man das Enzym durch Überexpression in *E. coli* (Slatko *et al.*, 1987). M·*Taq*I besteht aus 421 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 47856 g/mol (Barany *et al.*, 1992). Aufgrund der Anordnung der neun konservierten Motive gehört M·*Taq*I zur γ-Klasse der N-Methyltransferasen.



Schema A5.1

*Die von M·*Taq*I katalysierte Methylgruppentransferreaktion.*

M·*Taq*I besteht aus zwei Domänen, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Die katalytische Domäne beinhaltet die Cofaktorbindungsstelle und alle neun konservierten Motive. Das zentrale Strukturmerkmal dieser Domäne ist ein β-Faltblatt, welches sich aus neun β-Strängen zusammensetzt. Diese β-Faltblatt wird von sechs α-Helices flankiert. Die kleinere Domäne besteht aus einer Vielzahl von α-Helices und β-Strängen. Bisher wurde M·*Taq*I in den binären Komplexen mit dem Cofaktor AdoMet, dem Cofaktorprodukt AdoHcy und dem Inhibitor Sinefungin strukturell charakterisiert (Labahn, *et al.*, 1994; Schluckebier *et al.*, 1997). Obwohl die Strukturen ohne DNA gelöst wurden, gibt es deutliche Hinweise für die DNA-Bindungsstelle. So spannen die beiden Domänen eine Furche auf, die einen Durchmesser von 20 Å besitzt und somit in der Lage sein sollte, B-DNA zu binden. Ein weiterer Hinweis für die DNA-Bindung an dieser Stelle ist die große Anzahl der basischen Aminosäureresten, die innerhalb der Furche an der Oberfläche des Enzyms lokalisiert sind. Da diese Aminosäurereste bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, sollten sie die negativ geladene DNA gut binden können (Abbildung A5.1).

Die detaillierte Bindung der DNA an M·*Taq*I ist allerdings noch nicht bekannt. Dies wäre jodoch für das Verständnis des katalytischen Mechanismus der Methylgruppenübertragung

unerlässlich. Man nimmt zwar für M·*Taq*I einen Basenausklappmechanismus an (Holz *et al.*, 1998), die Art und Weise der DNA-Bindung und -Erkennung, sowie die Lage eines extrahelikalen Zieladenins ist jedoch nicht vorhersagbar. Die einzige Möglichkeit, diese Fragen zu beantworten, ist die Strukturaufklärung eines Komplexes aus M·*Taq*I und DNA.

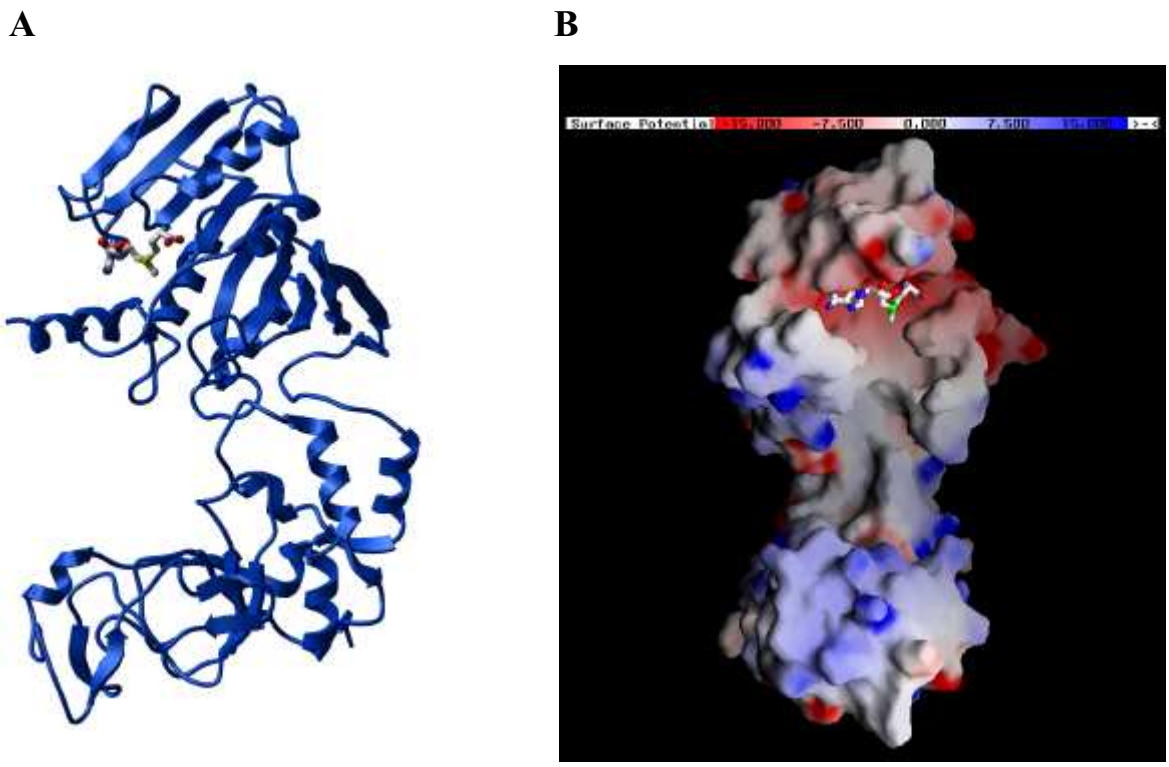


Abbildung A5.1

*Kristallstruktur von M·*Taq*I im Komplex mit AdoMet (Schluckebier et al., 1997). (A) Darstellung der Sekundärstrukturelemente und (B) des Oberflächenpotentials in Coulomb. Beide Ansichten sind um 90° zueinander gedreht.*

B Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll mit kristallographischen Methoden der katalytische Mechanismus der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* (M·*Taq*I) aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck soll ein ternärer Komplex aus M·*Taq*I, DNA und Cofaktor bzw. einem Cofaktoranalogon kristallisiert werden. Da ein Hauptproblem der Proteinkristallographie die Herstellung von geeigneten Kristallen zur dreidimensionalen Strukturaufklärung ist, sollen Oligodesoxynukleotide verschiedener Längen und mit verschiedenen Sequenzen für die Kristallisation eines ternären Komplexes eingesetzt werden. Obwohl die dreidimensionalen Kristallstrukturen von M·*Taq*I im binären Komplex mit dem Cofactor AdoMet, dem Cofactorprodukt AdoHcy und dem Inhibitor Sinefungin bereits bekannt sind (Labahn, *et al.*, 1994; Schluckebier *et al.*, 1997), ist die Struktur eines ternären Komplexes für das Verständnis des katalytischen Mechanismus von entscheidendem Interesse. Zwar wurde für M·*Taq*I ein Basenausklappmechanismus mit fluoreszenz-spektroskopischen Methoden nachgewiesen (Holz *et al.*, 1998), die Art und Weise der Bindung der extrahelikalen Zielbase im katalytischen Zentrum des Enzyms ist jedoch nicht bekannt. Die exakte Bestimmung der Lage der Zielbase im Enzym würde es jedoch ermöglichen, einen katalytische Mechanismus abzuleiten. Des weiteren könnte ein ternärer Komplex einen Mechanismus für das Basenausklappen liefern, da immer noch wenig darüber bekannt ist, wie N-DNA-Methyltransferasen im allgemeinen und M·*Taq*I im besonderen die Zielbase aus der DNA-Doppelhelix herausrotieren, um die Methylierung der exozyklischen Aminogruppe zu katalysieren.

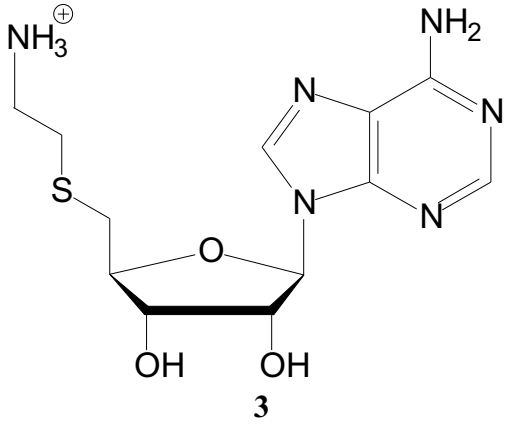
Dieses Wissen um den katalytischen Mechanismus von N-DNA-Methyltransferasen könnte in Zukunft ein wichtiges Kriterium für die Synthese neuer Antibiotika sein. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein *Salmonella typhimurium* Bakterienstamm, der die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam nicht besitzt, seine Virulenz und somit die Fähigkeit zur Infektion verloren hat (Heithoff *et al.*, 1999; García-del Portillo *et al.*, 1999). Da die Dam DNA-Methyltransferase in vielen pathogenen Bakterienstämmen wie *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Haemophilus influenzae* und *Treponema pallidum* hoch konserviert ist, könnten spezifische Inhibitoren der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam ein breites Anwendungsspektrum als Antibiotika haben.

C Ergebnisse und Diskussion

1 Kristallstruktur des binären Komplexes aus M·*Taq*I und 5‘-[2-(Amino)ethylthio]-5‘-desoxyadenosin (AETA)

1.1 Kristallisationsbedingungen

Die Kristalle des binären Komplexes aus M·*Taq*I und 5‘-[2-(Amino)ethylthio]-5‘-desoxyadenosin (AETA) (**3**) (Abbildung C1.1) konnten basierend auf den bereits veröffentlichten Bedingungen für M·*Taq*I im Komplex mit dem Cofaktor AdoMet problemlos erhalten werden (Schluckebier *et al.*, 1997) (Abbildung C1.2). Dabei wurde die Methode des hängenden Tropfens gewählt, bei der die Kristalle durch Dampfdiffusion erhalten werden.



3

Abbildung C1.1

Das Cofaktoranalogon 5‘-[2-(Amino)-ethylthio]-5‘-desoxyadenosin (AETA).

Abbildung C1.2

*Kristalle des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA. Die Breite des Bildes entspricht ca. 1mm.*

1.2 Datensammlung

Für die Datensammlung wurde der Kristall des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA bei 100 K in einer Schleife zusammen mit einer Kryoprotektant-Lösung schockgefroren (vgl. Abbildung C1.3). Diese beinhaltet neben PEG 6000 auch Glycerin, was dazu führt, daß die Lösung inklusive Kristall glasartig gefriert und der

Kristall nicht zerstört wird. Damit ist gewährleistet, daß der Kristall bei Temperaturen um 100 K vermessen werden kann, was den Strahlenschaden durch die auftreffende Röntgenstrahlung drastisch vermindert.

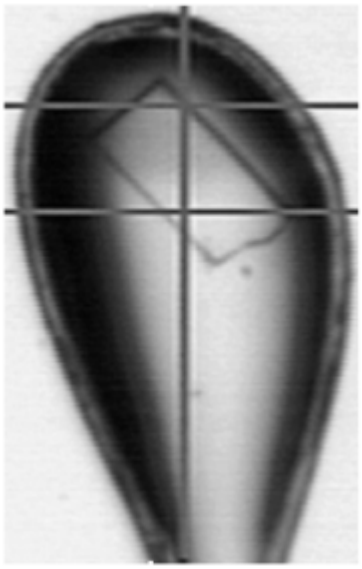


Abbildung C1.3

Gefrorener Proteinkristall in einer Schleife mit einem Durchmesser von ca. 500 µm

Setzt man Proteinkristalle Röntgenstrahlung aus, dann tritt im allgemeinen eine Schädigung der Kristallstruktur auf. Diese Schädigung wird von freien Elektronen und erzeugten Radikalen verursacht, die durch den Photoelektrischen-, Auger- oder Compton-Effekt entstehen (Gonzales *et al.*, 1994). Bemerkbar macht sich dieser Strahlenschaden u.a. an der mit der Dauer der Belichtungszeit abnehmenden Auflösung. Durch die Messung bei Temperaturen um 100 K können sich die austretenden Radikale nicht mehr im Kristall fortbewegen, wodurch die Strahlenschäden vermindert werden. Experimente an Lysozym-Kristallen haben gezeigt, daß sich die Qualität der Daten bei hoher Auflösung während der Bestrahlung mit hochenergetischer Röntgenstrahlung bei 120 K nach acht Stunden nicht änderte und die Kristalle somit keinen Strahlenschaden erlitten (Young *et al.*, 1990). Durch das glasartige Gefrieren der Kryoprotektant-Lösung ist außerdem sichergestellt, daß sich keine Wasserkristalle bilden, welche besonders stark mit Röntgenstrahlen wechselwirken und das Diffraktionsbild des Proteinkristalls durch Überlagerung mit den Eiskristalldiffraktionsbildern verfälschen.

Die Datensammlung für den binären Komplex aus M·*Taq*I und AETA erfolgte am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg. Die Messung wurde an der Messstation BW6 mit einem Phosphor-Bildplatten-(*Image-Plate*-) Detektor bei 100 K durchgeführt. Ein Diffraktionsbild während einer Drehung des Kristalls um 0,25° ist exemplarisch in Abbildung C1.4 dargestellt. Die maximale Auflösungsgrenze des Kristalls liegt bei 1,9 Å. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programmpacket Denzo/Scalepack (Otwinowski, 1993). Es zeigte sich, daß der binäre M·*Taq*I-AETA-Komplex genau wie der binäre Komplex aus M·*Taq*I und AdoMet in der Raumgruppe $P2_12_12$ kristallisiert. Die erhaltenen Daten aus der Prozessierung sind in Tabelle C1.1 aufgeführt.

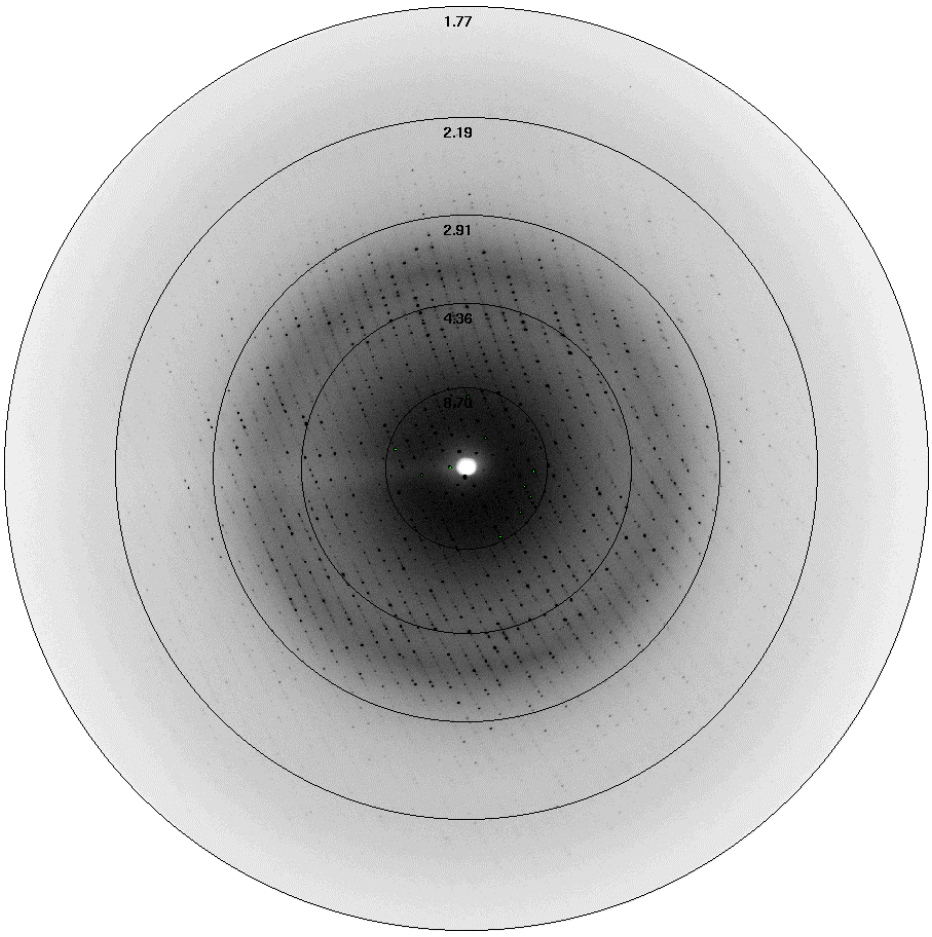


Abbildung C1.4

*Rotations-Diffraktionsbild des Kristalls aus M·*Taq*I und AETA während einer Drehung um 0,25°, aufgenommen mit einem Phosphor-Bildplatten-Detektor an der Messstation BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron. Die äußeren Reflexe sind innerhalb der dargestellten Kontour mit dem Auge nicht mehr zu sehen, konnten aber von der Software bis 1,9 Å erkannt werden.*

1.3 Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung

Für die Phasenbestimmung des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA wurde die Methode des molekularen Ersatzes mit M·*Taq*I im Komplex mit AdoMet (Schluckebier *et al.*, 1997) als Suchmodell gewählt. Da die Kristalle der binären Komplexe von M·*Taq*I und AETA und M·*Taq*I und AdoMet in der selben Raumgruppe und mit nahezu identischen Zellparametern kristallisieren und ebenfalls zwei Komplexe in der asymmetrischen Einheit aufweisen, war es nicht notwendig, die Translations- und Rotationsfunktionen anzuwenden. Nach der Berechnung der Elektronendichteverteilung durch Kombination der gemessenen Strukturamplituden mit den berechneten Phasen aus dem Strukturmodell wurde die Struktur verfeinert. Dies bedeutet eine schrittweise Energieminimierung der Gesamtenergie, die sich aus den empirischen Energien der Bindungslängen und -winkel, der Torsionswinkel, der Planarität von Aromaten, der Chiralität, der Wasserstoffbrückenbindungen, der Van-der-Waals und der elektrostatischen Wechselwirkungen sowie der effektiven Energiedifferenz aus den gemessen und berechneten Strukturfaktoren zusammensetzt. Mit der fortschreitenden Energieminimierung nähern sich die aus dem Model berechneten Strukturfaktoramplituden F_{calc} den observierten Strukturfaktoramplituden F_{obs} immer mehr an. Dies erreicht man durch mathematische Operationen, bei denen unter anderem die Ortskoordinaten (x_j, y_j, z_j) und die Temperaturfaktoren B_j jedes einzelnen Atoms j verändert werden. Ein Problem der Verfeinerung ist, daß diese mathematischen Operationen alleine oft nicht ausreichen, aus einem fehlerhaften Modell ein fehlerfreies Modell zu generieren. Dies liegt vor allem daran, daß die Verfeinerungsmethode in ein lokales Energieminimum führen kann und nicht, wie gewünscht, in das absolute Energieminimum. Deshalb muß manuell in die Verfeinerung eingegriffen werden. Dies erreicht man, indem die berechnete Elektronendichte zusammen mit dem Modell graphisch auf einem Bildschirm dargestellt wird. Die durch die Interpretation dieser Graphik erkannten Modellfehler können dann mit Hilfe von Modellbauoperationen eines Graphikprogramms korrigiert werden. Das korrigierte Modell bildet dann wieder die Grundlage für die erneute rechnerische Verfeinerung. Diese beiden Schritte werden abwechselnd durchgeführt, bis die berechneten und gemessenen Strukturfaktoramplituden möglichst gut übereinstimmen.

Die Energieminimierungen wurden mit dem Programm XPLOR (Brünger, 1992a) gerechnet, das Interpretieren der Elektronendichteverteilung und das Modellieren der Aminosäurereste wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt. Das Energieminimieren beinhaltete folgende Verfeinerungsprozeduren: Nach der erfolgreichen Phasenbestimmung wurde zunächst einmalig eine *rigid body* Verfeinerung gestartet. Anschließend wurden eine *simulated annealing*, eine *B*-Faktor und eine *positional* Verfeinerung durchgeführt.

Dann wurde mit den neuen Koordinaten eine Elektronendichtekarte berechnet, die manuell interpretiert wurde und anhand derer eventuelle Änderungen bzw. Neuerungen in das Modell eingebracht wurden. Dieses verbesserte Modell wurde dann wieder mit den Verfeinerungsprozeduren energieminimiert. So war es möglich, im Verlauf der einzelnen Verfeinerungszyklen den Cofaktor AETA innerhalb der Cofaktorbindungstasche exakt zu lokalisieren. Das bereits vorhandene Modell des Proteins konnte so ebenfalls zur korrekten Struktur verbessert werden. Die abschließenden Werte für den kristallographischen R-Faktor und den freien R-Faktor liegen bei 0,211 bzw. bei 0,263. Dabei wurde der freie R-Faktor mit 10 % aller Reflexe berechnet, die zufällig ausgewählt wurden (Brünger, 1992).

1.4 Mess- und Verfeinerungsstatistik

Von den Kristallen des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA wurden 284410 Reflexe bis zu einer Auflösungsgrenze von 1,9 Å gemessen. Damit steht ein sehr gutes Verhältnis der Daten zu den Parametern für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur zur Verfügung. Die Mess- und Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle C1.1 aufgeführt.

Tabelle C1.1

*Mess- und Verfeinerungsstatistik des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA*

Raumgruppe	$P2_12_12$
Zellkonstanten	a = 126,04 Å b = 139,84 Å c = 52,15 Å a = β = γ = 90,0°
Asymmetrische Einheit	2 Moleküle
Auflösungsbereich	40 – 1,9 Å
Anzahl aller Reflexe	284410
Anzahl der *unique* Reflexe	70959
Reflexe für *cross validation*	7052
R_{sym} (letzte Schale, 1,9-1,97 Å) [1]	7,5 (46,9)
R_{work} [2]	0,211
R_{free} [3]	0,263
Vollständigkeit % (letzte Schale)	96,4 (95,1)
Durchschnittlicher *B*-Faktor	27,78 Å^2
Hauptketten A (B)	25,96 Å^2 (26,63 Å^2)
Seitenketten A (B)	29,61 Å^2 (31,62 Å^2)
AETA A (B)	23,77 Å^2 (22,71 Å^2)
Wasser	32,50 Å^2
$\langle I/\sigma \rangle$ (letzte Schale)	96,4 (95,1)
Mittlerer Koordinatenfehler <u>	0,247 Å
R.m.s. Unterschiede für	
Bindungen	0,0095 Å
Winkel	1,55°
Improper Winkel	1,36°
Nicht modellierte Aminosäuren	1; 12-21; 112-122; 414-421
Anzahl der Wasser Atome	329

[1] $R_{sym} = \sum | I - \langle I \rangle | / \sum I$

[2] $R_{work} = \sum | | F_{obs} | - | F_{calc} | | / \sum | F_{obs} |$

[3] R_{free} wurde aus 10 % zufällig ausgewählter Reflexe bestimmt (Brünger, 1992).

Die ϕ- und ψ-Winkelverteilung der beiden Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA ist im Ramachandran Diagramm in Abbildung C1.5 dargestellt (Ramachandran *et al.*, 1963). Man erkennt, dass die drei Aminosäurereste A49, E355 und R398 bei beiden Proteinmolekülen innerhalb oder nahe der nicht erlaubten Regionen liegen. Für eine Interpretation dieser ungünstigen Konformationen wird auf Abschnitt C2.5 verwiesen.

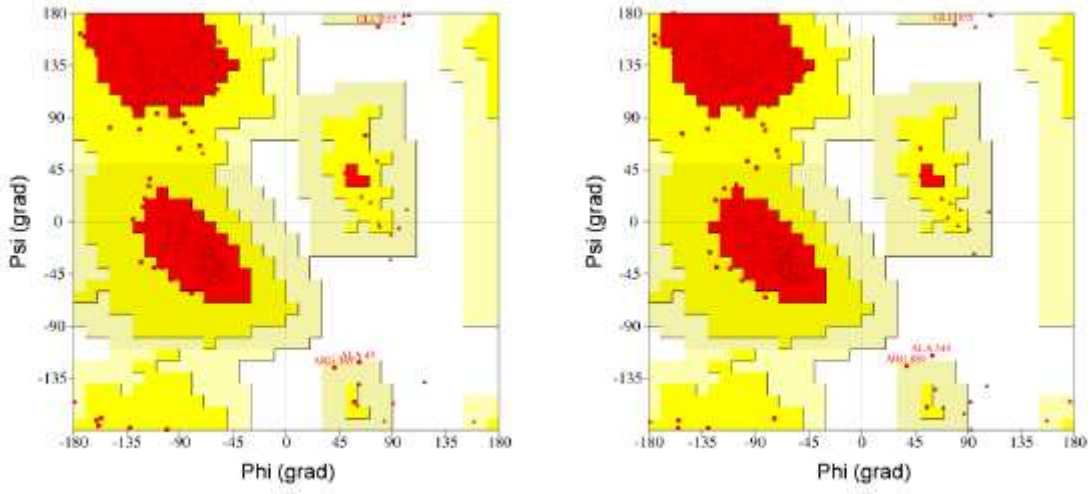


Abbildung C1.5

*Ramachandran Diagramm der Proteinmoleküle A und B in der asymmetrischen Einheit des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA. Glycinreste sind als Dreiecke eingezeichnet, alle anderen Aminosäurereste als Quadrate. Die drei Aminosäurereste A49, E355 und R389 liegen nahe oder innerhalb des nicht erlaubten, weiß gekennzeichneten Bereichs.*

1.5 Die dreidimensionale Struktur des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA

Der binäre Komplex aus M·*Taq*I und AETA kristallisiert als Dimer mit zwei Komplexen in der asymmetrischen Einheit. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Komplexen sind aber so gering, dass im weiteren Verlauf nur Komplex A besprochen wird. Der r.m.s. Unterschied zwischen Komplex A und B liegt bei 0.394 Å. In Abbildung C1.6 ist die Topologie von M·*Taq*I im Komplex mit AETA dargestellt. Die Berechnung der Sekundärstrukturelemente wurde mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1983) durchgeführt. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms TOPS (Westhead *et al.*, 1998; Westhead *et al.*, 1999).

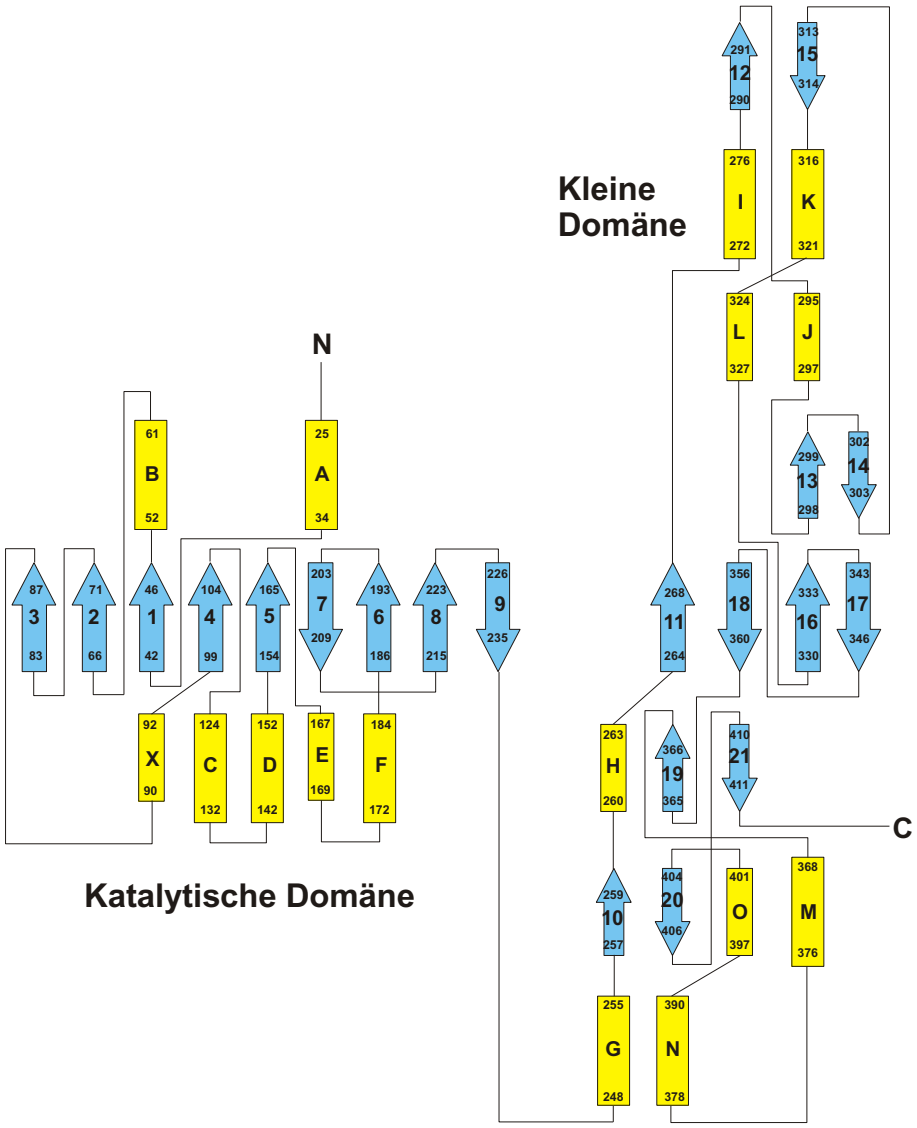


Abbildung C1.6

*Topologie von M·*Taq*I im Komplex mit AETA. Die Bezeichnung der Helices (Buchstaben) und Faltblattstränge (große Zahlen) sind von Schluckebier* et al. *(1997) übernommen. Die kleinen Zahlen bezeichnen jeweils den Aminosäurerest, mit der das Sekundärstrukturelememt beginnt bzw. endet.*

M·*Taq*I im Komplex mit AETA besteht wie M·*Taq*I im Komplex mit AdoMet aus zwei Domänen, der katalytischen und der kleinen Domäne. Die Topologie von M·*Taq*I in den beiden Komplexen unterscheidet sich kaum. Der einzige Unterschied ist eine zusätzliche 3_{10}-Helix, die die Aminosäurereste 90 bis 92 beinhaltet (Helix X in Abbildung C1.5). Warum Helix X in der binären Struktur von M·*Taq*I und AdoMet

nicht vorliegt, ist strukturell nicht zu erklären. Der Verlauf der C_α-Atome der Aminosäurereste 90 und 92 unterscheidet sich zwischen den binären Komplexen kaum. Wahrscheinlich reichen geringfügige Änderungen innerhalb diese Bereiches aus, damit das Programm DSSP diesen Bereich im binären Komplex mit M·*Taq*I und AETA als 3_{10}-Helix interpretiert.

Die dreidimensionale Struktur von M·*Taq*I im Komplex mit AETA ist in Abbildung C1.7 dargestellt. Das Enzym besteht aus zwei Domänen, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Die obere, katalytische Domäne (Aminosäurereste 1-243) beinhaltet das Cofaktoranalogon AETA. Sie besteht aus einem zentralen Faltblatt, das sich aus neun β-Strängen zusammensetzt sowie sieben α-Helices, die dieses Faltblatt flankieren. Die untere, kleine Domäne besteht aus sich abwechselnden, kleineren α-Helices und β-Strängen.

Flexible Bereiche des Proteins sind anhand der Temperaturfaktoren (*B*-Faktoren) zu erkennen. Abbildung C1.8 zeigt die Verteilung des durchschnittlichen Temperaturfaktors der Aminosäurereste. Man erkennt, dass die Aminosäurereste vor und nach einem flexiblen, nicht sichtbaren Bereich (Aminosäurereste 12-21, 112-122 und 414-423) hohe *B*-Faktoren besitzen. Dies ist unmittelbar einsichtig, da flexible Bereiche nicht abrupt auftreten, sondern sich innerhalb eines Bereiches von mehreren Aminosäureresten entwickeln. Die hohen *B*-Faktoren für die Aminosäurereste 2-11 resultieren aus einer im Vergleich zum restlichen Protein relativ hohen Flexibilität. In der binären Kristallstruktur von M·*Taq*I mit AdoMet ist dieser Teil aufgrund seiner Flexibilität und der niedrigeren Auflösung des zugrundeliegenden Datensatzes überhaupt nicht zu erkennen.

Ferner sind in Komplex B die Aminosäurereste 116-122, die im Komplex A nicht erkennbar sind, teilweise sichtbar. Da die zugrundeliegende Elektronendichte allerdings nicht die exakten Positionen der Aminosäurereste 116-122 beschreibt, ist dieser Bereich zwar modelliert, eine Interpretation ist jedoch nur bedingt möglich. Wie in Abschnitt C2.6 beschrieben, nimmt diese Schleife erst bei der DNA-Bindung eine geordnete Position ein. Dabei unterscheidet sich die Lage der Aminosäurereste 116-122 in Komplex mit und ohne DNA deutlich.

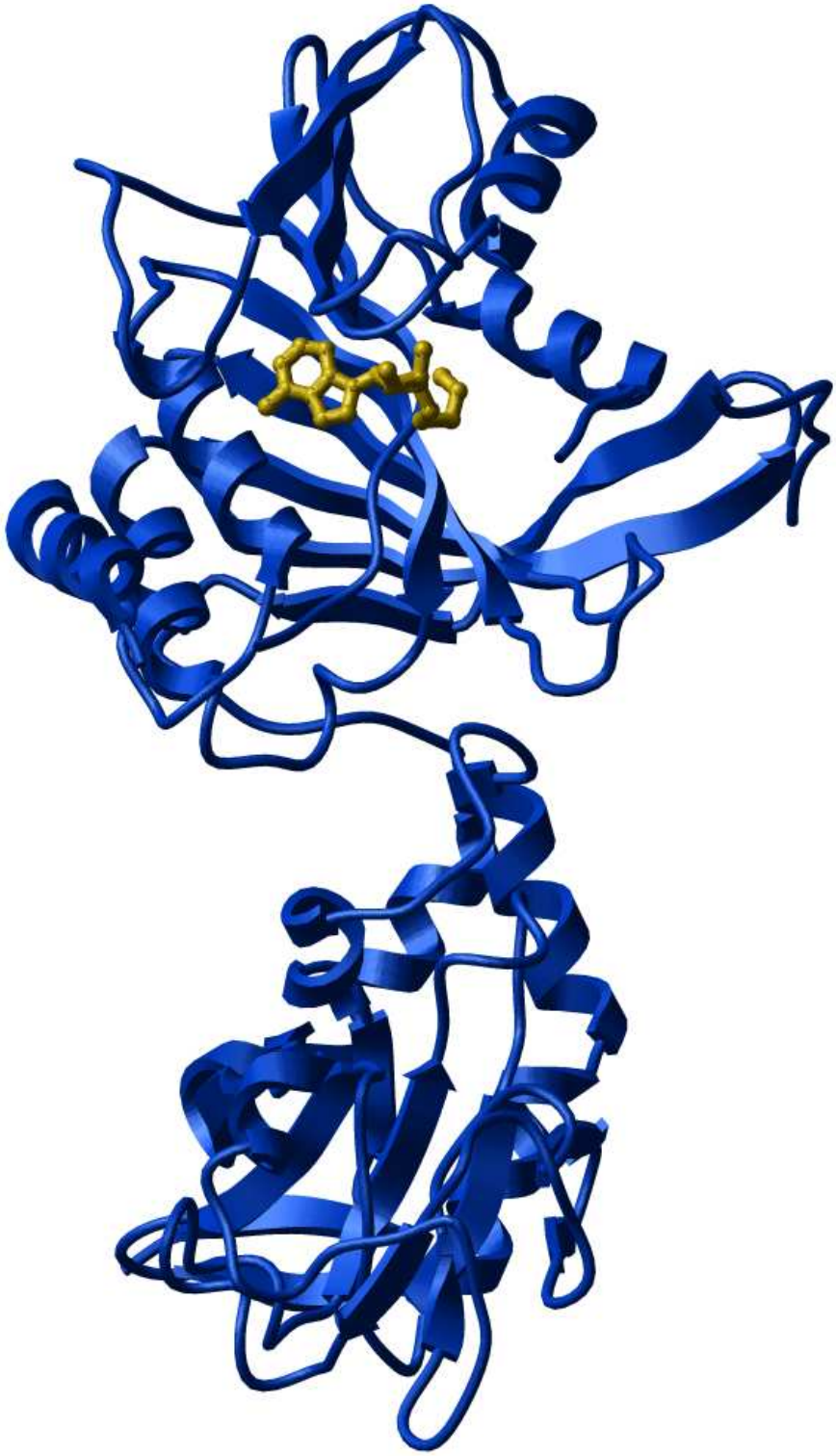


Abbildung C1.7

*Kristallstruktur des binären Komplexes aus M·*TaqI *und AETA. Der Verlauf der Hauptkettenatome von M·TaqI mit Sekundärstrukturelementen ist in blau und das Cofaktoranalogon AETA in gelb dargestellt.*

Damit ist es zum ersten Mal möglich, die Lage des N-Terminus von M·*Taq*I zu lokalisieren. Strukturelle Aussagen in Hinblick auf die Struktur in Lösung sind allerdings nicht oder nur bedingt möglich, da der N-Terminus Kristallpackungswechselwirkungen mit dem zweiten Monomer der asymmetrischen Einheit eingeht. Der hohe Temperaturfaktor des Aminosäurerestes 224 kann strukturell nicht erklärt werden.

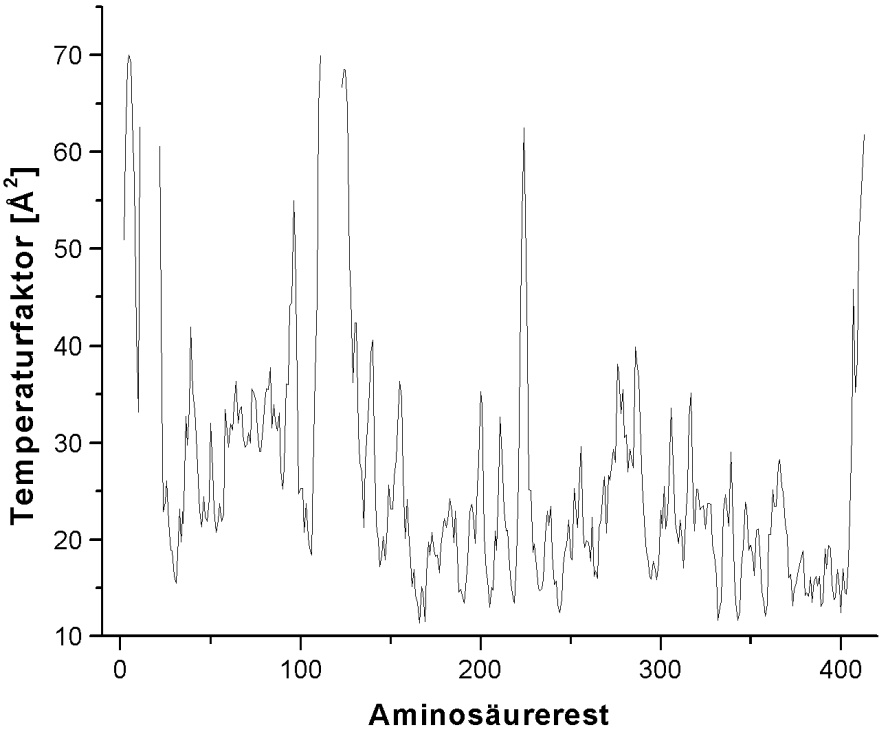


Abbildung C1.8

*Temperaturfaktorverteilung von M·*Taq*I im Komplexes mit AETA. Aufgetragen ist der durchschnittliche Temperaturfaktor der Aminosäurereste.*

In Abbildung C1.9 ist das Oberflächenpotential von M·*Taq*I in Komplex mit AETA dargestellt. Man erkennt die unterschiedlichen Ladungsverteilungen innerhalb des Proteins. Die Cofaktorbindungsstelle ist negativ und die DNA Bindungsstelle positiv geladen.

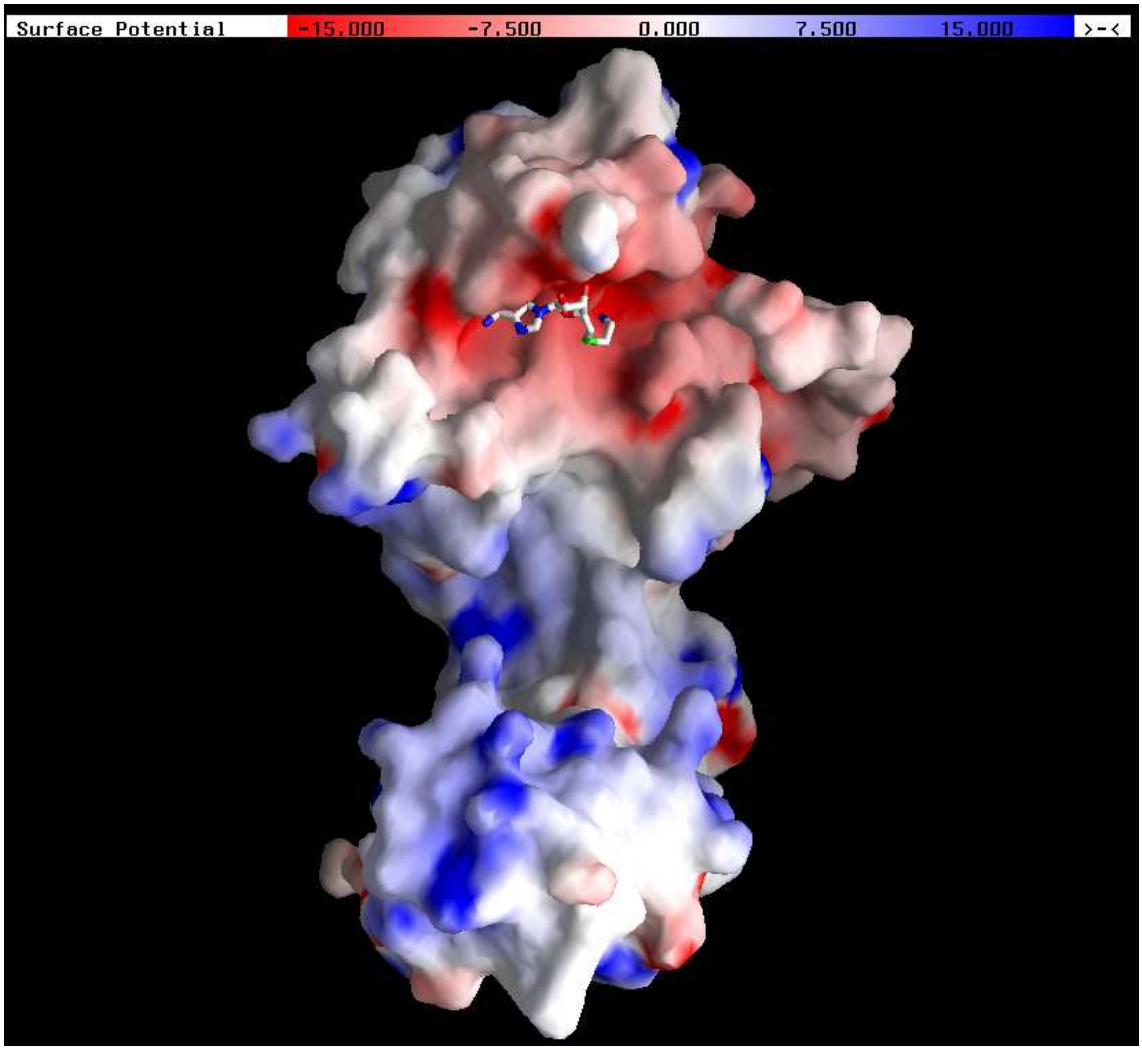


Abbildung C1.9

*Kristallstruktur des binären M·*Taq*I-AETA Komplexes. Nur das Oberflächenpotential des Proteins ist dargestellt. Das Cofaktoranalogon AETA ist im Kugelstab-Modell dargestellt. Negatives Potential ist rot und positives Potential ist blau koloriert, die Einheit des Potentials ist Coulomb.*

Eine Überlagerung der M·*Taq*I Strukturen in den binären Komplexen mit AETA und AdoMet ist in Abbildung C1.10 dargestellt. Man erkennt, dass der Verlauf der Hauptkette von M·*Taq*I in beiden Komplexen nahezu identisch ist. Der einzige signifikante Unterschied ist der N-Terminus, der nur im binären Komplex mit AETA sichtbar ist. Der r.m.s. Unterschied zwischen beiden Komplexen beträgt 0,62 Å.

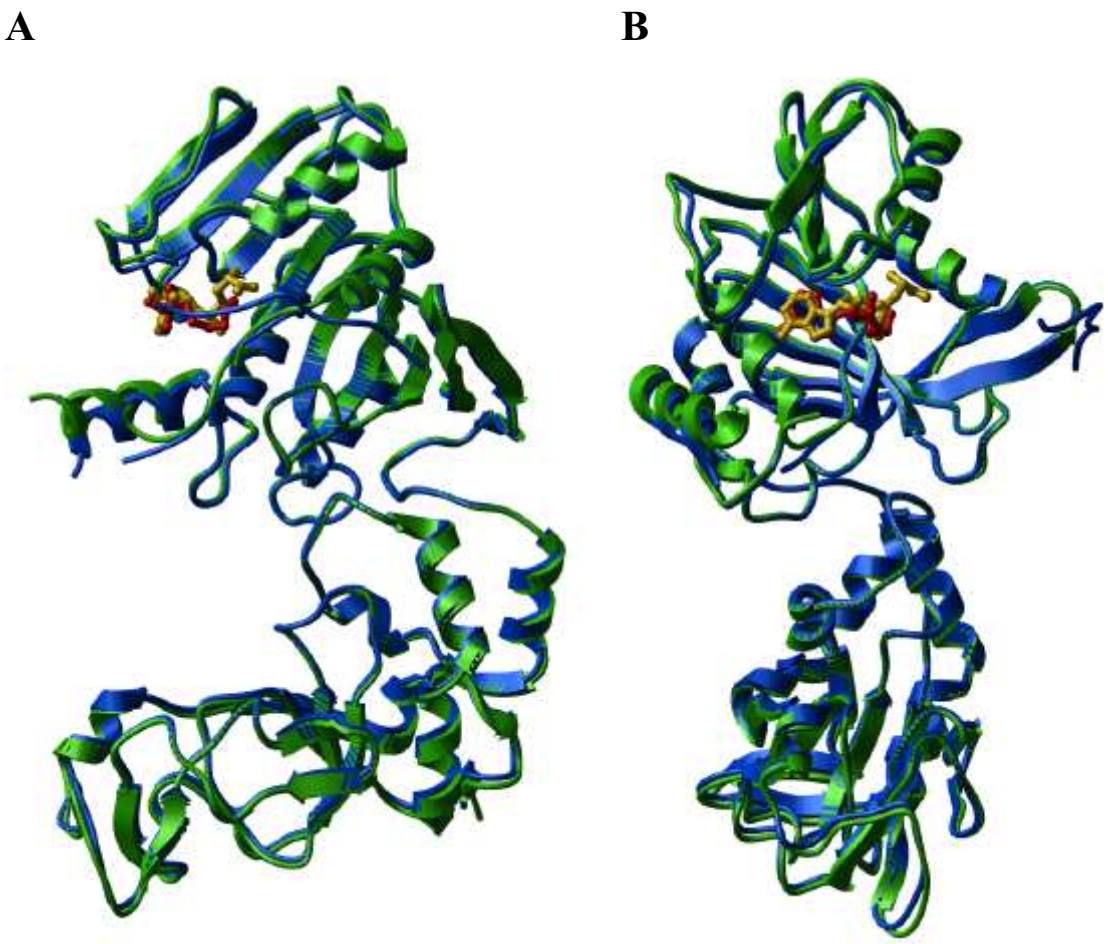


Abbildung C1.10

*Überlagerung der Kristallstrukturen der binären Komplexe aus M·*Taq*I (blau) und AETA (rot) sowie M·*Taq*I (grün) und AdoMet (gelb). Ansicht (A) und (B) sind zueinander um 90° gedreht.*

Aufgrund der nahezu identischen Strukturen von M·*Taq*I in den beiden binären Komplexen wird die Sekundär- und Tertiärstruktur von M·*Taq*I innerhalb dieser Arbeit nicht mehr ausführlich beschrieben und diskutiert, da dies bereits von Gerd Schluckebier durchgeführt wurde (Schluckebier, 1996).

1.6 Beschreibung der AETA-Bindung im binären Komplex

Das Cofaktoranalogon AETA bindet innerhalb der Cofaktorbindungstasche von M·*Taq*I in der katalytischen Domäne. Dabei bindet der modifizierte Aminosäurerest von AETA nicht in Richtung des katalytischen NPPY-Motivs (Motiv IV) von M·*Taq*I, sondern zum

Inneren des Proteins. Damit nimmt AETA eine ähnlich Position wie AdoMet innerhalb der Cofaktorbindungstasche ein und unterscheidet sich deutlich von dem Cofaktorprodukt AdoHcy, dessen Seitenkette mit den Aminosäureresten des NPPY-Motivs wechselwirkt. Der Adeninrest von AETA wird durch H-Brücken von D89 OD1 zu N6 und F90 NH zu N1 erkannt und stabilisiert. Weiterhin sind hydrophobe Wechselwirkungen von I72 CB mit C2, I72 CG2 mit C4 und C5 sowie von A47 CB mit C4 zu erkennen. Außerdem interagiert P107 CG mit C8. Zusätzlich wird die Base durch *edge* to *face* π-Stapelung durch die aromatische Seitenkette von F146 positioniert. Die Ribose von AETA interagiert durch hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen mit M·*Taq*I. E71 OE1 und OE2 bilden H-Brücken mit O3‘ und O2‘ aus. E71 CD vollzieht hydrophobe Wechselwirkungen mit C1‘. Der modifizierte Aminosäurerest wird ebenfalls durch hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen gebunden. So bilden P107 CA und CD hydrophobe Interaktionen zu S aus. A47 O und N105 O erkennen über H-Brücken die Aminogruppe des Cofaktoranalogons. Details der einzelnen Wechselwirkungen zwischen AETA und M·*Taq*I sind in Tabelle C1.2 aufgeführt.

Tabelle C1.2

*Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und AETA (Komplex A)*

Amino-säurerest	Atom	Motiv[1]	AETA Atom	Abstand [Å]	Art der Wechselwirkung
A47	O	I	N	2,9	H-Brücke
	CB		C1‘	3,8	Hydrophob
	CB		C4	3,7	Hydrophob
E71	OE1	II	O3‘	2,6	H-Brücke
	OE2		O2‘	2,5	H-Brücke
	OE2		O3‘	2,9	H-Brücke
	CD		C1‘	3,6	Hydrophob
I72	CB	II	C2	3,6	Hydrophob
	CG2		C5	3,7	Hydrophob
	CG2		C4	3,5	Hydrophob
D89	OD1	III	N6	2,9	H-Brücke
F90	NH	III	N1	3,0	H-Brücke
N105	O	IV	N	2,6	H-Brücke
P107	CG		C8	3,3	Hydrophob
	CA		S	3,9	Hydrophob
	CD		S	4,0	Hydrophob
F146	CZ	IV	C6	3,5	Hydrophob
	Phenyl-ring	V	Adenin	3,6	edge to face π-Stapelung

[1]Die Zuordnung der individuellen Aminosäurereste zu Motiven erfolgt nach Malone *et al.* (1995).

AETA wird durch eine Reihe von Wechselwirkungen innerhalb der Cofaktorbindungstasche stabilisiert. Abbildung C1.11 zeigt eine Stereodarstellung der Cofaktorbindungstasche mit den H-Brücken zwischen AETA und M·*Taq*I. Der Pseudorotationsmodus von AETA ist in beiden Komplexen $C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo*. Außerdem liegt AETA in der für Nukleotide bevorzugten *anti* Konformation vor. Betrachtet man den Winkel zwischen C4'und C5', dann erkennt man, daß AETA in der *trans* Konformation vorliegt. Die wichtigsten Torsionswinkel von AETA sind in Tabelle C1.3 aufgeführt.

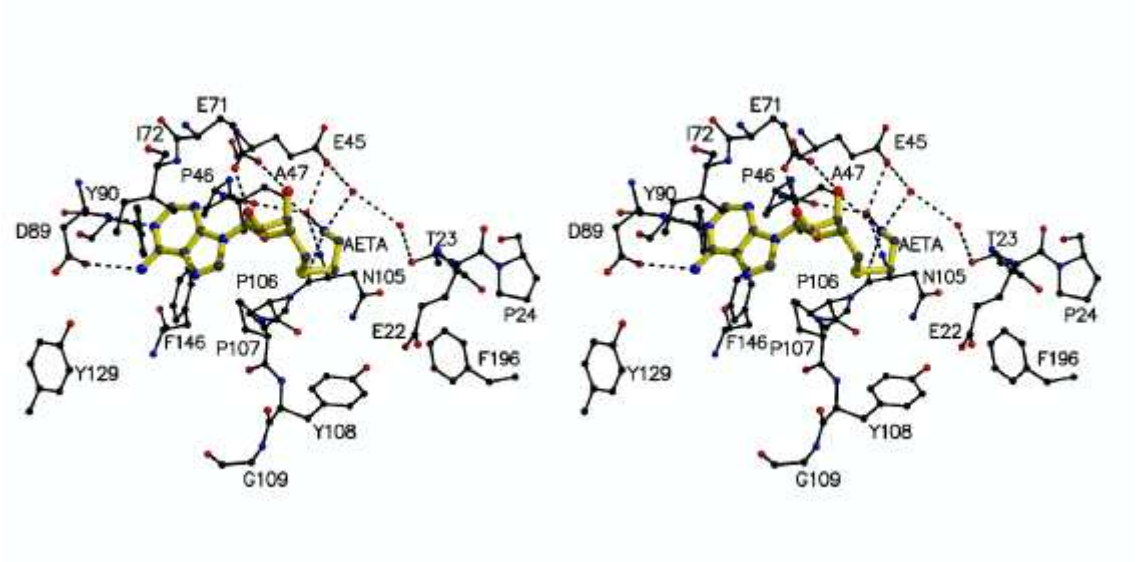


Abbildung C1.11

*Stereodarstellung der Cofaktorbindungstasche von M·*Taq*I (Komplex A) mit AETA (gelb). H-Brücken zwischen M·*Taq*I und AETA sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.*

Tabelle C1.3

Torsionswinkel von AETA im Komplex A und B

Beteiligte Atome	Torsionswinkel von AETA [°]	
	A	B
N-C‘‘-C‘-S	-75	-63
C‘‘-C‘-S-C5‘	-69	-74
C‘-S-C5‘-C4‘	113	110
S-C5‘-C4‘-C3‘	168	170
C5‘-C4‘-C3‘-O3‘	144	141
C5‘-C4‘-C3‘-C2‘	-99	-102
C4‘-C3‘-C2‘-O2‘	-158	-155
C4‘-C3‘-C2‘-C1‘	-42	-38
C3‘-C2‘-C1‘-O4‘	50	47
C3‘-C2‘-C1‘-N9	158	156
O4‘-C1‘-N9-C4 (χ)	-112	-112
C2‘-C1‘-O4‘-C4‘	-40	-39
C1‘-O4‘-C4‘-C3‘	13	15
C2‘-C3‘-C4‘-O4‘	19	16
Phasenwinkel P der Pseudorotation	147	144
Maximaler Pseudorotationswinkel v_{max}	50	47
Pseudorotationsmodus	$C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo*	$C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo*

1.7 AETA ist kein Substratanalogon für einen positiven Übergangszustand

AETA bindet mit erstaunlich hoher Affinität an M·*Taq*I. Die Dissoziationskonstante zwischen AETA und M·*Taq*I beträgt 0,7 µM und ist damit ca. zweimal kleiner als die von AdoMet (1,5 µM) und AdoHcy (2,5 µM) (Pignot, 1999) und das, obwohl die Seitenkette von AETA im Vergleich zu AdoMet bzw. AdoHcy verkürzt ist. Es stellt sich daher die Frage, ob AETA ein gut bindendes Übergangszustandsanalogon ist. Angenommen, bei der von M·*Taq*I katalysierten Methylgruppenübertragung entsteht an der 6-Aminogruppe des Zieladenins ein positives Intermediat, so könnte eine positiv geladene Ammoniumgruppe des AETA diesen Übergangszustand oder ein entsprechendes positives Intermediat nachahmen. Für den Mechanismus von M·*Taq*I würde dies bedeuten, dass die Methylgruppe übertragen wird, bevor ein Proton von der 6-Aminogruppe abstrahiert wird. Dieser positive Übergangszustand müsste dann natürlich von M·*Taq*I stabilisiert werden. Da bei der Aufklärung der Kristallstruktur des M·*Taq*I-AETA-Komplexes die Struktur des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und

AETA noch nicht gelöst war, war auch die exakte Lage des extrahelikalen Zieladenins nicht bekannt. Man wusste nur, dass die Zielbase innerhalb des katalytischen NPPY-Motivs (Motiv IV) bindet (Pues *et al.*, 1999; Holz *et al.*, 1999). In der Kristallstruktur der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferase M·*Hha*I im Komplex mit DNA und AdoMet ist das zu methylierende Kohlenstoffatom des Zielcytosins ungefähr 5 Å vom Schwefelatom des Cofaktors AdoMet entfernt (Klimasauskas *et al.*, 1994). Stellt man sich vor, dass das extrahelikale Zieladenin im Komplex mit M·*Taq*I auch ungefähr 5 Å von dem Schwefelatom von AdoMet entfernt ist, dann könnte man AETA als Analogon eines positiven Übergangszustandes beschreiben, da die Aminogruppe in AETA bei neutralem pH-Wert protoniert sein sollte und der intramolekulare Abstand der Aminogruppe zum Schwefelatom ca. 4-5 Å beträgt.

Aus Kapitel C1.7 wird allerdings deutlich, dass der modifizierte Aminosäurerest von AETA mit der Aminogruppe nicht in Richtung des katalytischen NPPY-Motivs (Motiv IV) gerichtet ist, sondern zum Inneren des Proteins bindet. Damit nimmt die Seitenkette von AETA eine ähnliche Konformation wie der Aminosäurerest von AdoMet im binären Komplex mit M·*Taq*I ein. Deshalb fungiert AETA im binären Komplex mit M·*Taq*I nicht als Analogon eines positiv geladenen Übergangszustandes oder Intermediates. Die hohe Bindungsaffinität von AETA zu M·*Taq*I läßt sich neben den Wechselwirkungen der Base und der Ribose mit den zahlreichen H-Brücken der Aminogruppe erklären. Durch die im Vergleich zu AdoMet um eine Methylengruppe verkürzte Seitenkette ist die Aminogruppe in einer Position, in der sie neben den direkten H-Brücken zum Protein mit einem Netzwerk von lokalisierten Wassermolekülen interagieren kann.

Da der modifizierte Aminosäurerest von AETA wie der von AdoMet zum Inneren des Proteins bindet, kann AETA als ein nicht reaktives AdoMet Analogon betrachtet werden. Bisher sind drei Kristallstrukturen von M·*Taq*I in den binären Komplexen mit dem Cofaktor AdoMet, dem Cofaktorprodukt AdoHcy und dem Inhibitor Sinefungin beschrieben worden (Schluckebier *et al.*, 1997). Innerhalb dieser drei Strukturen unterscheiden sich M·*Taq*I kaum in seiner Sekundär- und Tertiärstruktur. Auch die Position der Base und Ribose von AdoMet, AdoHcy und Sinefungin ist nahezu identisch. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in der Lage der

Aminosäureseitenketten, die im Fall von AdoMet zum Inneren des Proteins und im Fall von AdoHcy und Sinefungin in Richtung des katalytischen NPPY-Motivs (Motiv IV) zeigt. AdoHcy und Sinefungin besitzen keine aktivierte Methylgruppe und sind somit keine Substrate für die Methylierung durch M·*Taq*I. Da jedoch ihre Aminosäureseitenketten im Vergleich zu AdoMet eine andere Lage einnehmen, sind sie keine nicht-reaktiven AdoMet Analoga. Betrachtet man die Konformation von AETA im binären Komplex mit M·*Taq*I, erkennt man, dass AETA in ähnlicher Weise wie AdoMet an M·*Taq*I bindet. Dadurch, dass AETA keine aktivierte Methylgruppe am Schwefelatom besitzt und somit auch keine Methylierungsreaktion eingehen kann, ist AETA ein ideales nicht-reaktives AdoMet Analogon. Somit könnte AETA ein geeignetes Cofaktoranalogon für die Cokristallisation eines ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA sein.

2 Kristallstruktur des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA

2.1 Kristallisationsbedingungen

Die Herstellung von qualitativ hochwertigen Kristallen ist eine entscheidende Voraussetzung für die Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen durch Röntgendiffraktion. Um Kristalle des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA zu erhalten, müssen eine Reihe von Bedingungen erfüllt sein. Ein wichtiger Faktor für die Kristallisation des ternären Komplexes ist die Länge der DNA. Zu diesem Zweck wurden Duplex-Oligodesoxynukleotide mit verschiedenden Längen in den Kristallisationsansätzen verwendet. Dabei variierte die Länge der eingesetzten Duplex-Oligodesoxynukleotide zwischen sieben und 14 Basenpaaren. Es zeigte sich, dass nur die Duplex-Oligodesoxynukleotide mit einer Länge von zehn Basenpaaren Kristalle des ternären Komplexes bilden konnten. Dies läßt sich mit Hilfe der entstandenen Kristallpackung erklären, da nur bei DNA mit einer Länge von zehn Basenpaaren die entstehenden Kristallkontakte stark genug sind, um diese Packung aufzubauen. Die DNA ist im Kristall an ihren Enden aneinandergereiht, so dass der Eindruck entsteht, sie würde kontinuierlich durch den Kristall laufen. Dabei verläuft die DNA parallel zur kristallographischen *b*-Achse. Wie später in Kapitel C2.7 gezeigt wird, ist die Länge der *b*-Achse ein Vielfaches der Länge der DNA. Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine erfolgreiche Kristallisation ist die Sequenz der eingesetzten Duplex-Oligodesoxynukleotide. So war es nur möglich, Cokristalle mit der DNA-Sequenz 5‘-GT**TCGA**TGTC-3‘ und 5‘-GACA**TCGM**AC-3‘ (M = N6-methyl-2‘-desoxyadenosin) zu erhalten, wobei der Einsatz von N6-methyl-2‘-desoxyadenosin im Gegenstrang für den Erhalt der Kristalle nicht zwingend notwendig war. Die Qualität der Kristalle wurde jedoch durch Methylierung des Gegenstranges deutlich verbessert. Duplex-Oligodesoxynukleotide, die die Erkennungssequenz von M·*Taq*I nicht enthielten, lieferten keine Kristalle. In Tabelle C2.1 sind alle Duplex-Oligodesoxynukleotidsequenzen aufgeführt, die für die Kristallisation des ternären Komplexes getestet wurden.

Tabelle C2.1

*Duplex-Oligodesoxynukleotidsequenzen, die zur Kristallisation des ternären Komplexes getestet wurden. Nur DNA mit den Sequenzen 5'-GT**TCGA**TGTC-3' und 5'-GACA**TCGA**AC-3' bzw. 5'-GACA**TCGM**AC-3' (M = N6-methyl-2'-desoxyadenosin) lieferte Kristalle des ternären Komplexes.*

Sequenz	Länge	Merkmale
5'-TCAGT**TCGA**TGTAGC-3' 3'- GTCA**MGCT**ACATCGT-5'	14mer	mit Überhängen und Erkennungssequenz
5'-TAGCC**TCGA**GGCT-3' 3'- TCGG**AGCT**CCGAT-5'	12mer	mit Überhängen und Erkennungssequenz
5'-GT**TCGA**TGTC-3' 3'-CA**MGCT**ACAG-5'	10mer	mit Erkennungssequenz
5'-GT**TCGA**TGTC-3' 3'-CA**AGCT**ACAG-5'	10mer	mit Erkennungssequenz
5'-GTTCTATGTC-3' 3'-CAAGATACAG-5'	10mer	ohne Erkennungssequenz
5'-GTCAGTTGTC-3' 3'-CAGTCAACAG-5'	10mer	ohne Erkennungssequenz
5'-GT**TCGA**TGT-3' 3'-CA**AGCT**ACA-5'	9mer	mit Erkennungssequenz
5'-GT**TCGA**TG-3' 3'-CA**AGCT**AC-5'	8mer	mit Erkennungssequenz
5'-T**TCGA**TG-3' 3'-A**AGCT**AC-5'	7mer	mit Erkennungssequenz

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Kristallisation ist die Wahl des Cofaktors. Prinzipiell standen drei natürliche Cofaktoren oder Cofactoranaloga zur Auswahl, deren Struktur im binären Komplex mit M·*Taq*I bereits bekannt war (Schluckebier *et al.*,

1997). Diese sind der Cofaktor AdoMet, das Cofaktorprodukt AdoHcy sowie der Inhibitor Sinefungin. Von diesen drei Nukleosiden ist AdoMet am wenigsten geeignet, da es in Gegenwart von AdoMet, M·*Taq*I und DNA, welche die Erkennungssequenz von M·*Taq*I beinhaltet, zwangsläufig zur Methylgruppenübertragung kommt. Die beiden anderen natürlichen Nukleoside AdoHcy und Sinefungin kommen aus strukturellen Gründen nicht oder nur bedingt für die Kristallisationsansätze in Frage: In der binären Kristallstruktur von M·*Taq*I mit AdoHcy bzw. mit Sinefungin wechselwirkt der Aminosäurerest der beiden Nukleoside mit dem katalytischen NPPY-Motiv (Motiv IV) von M·*Taq*I. Dieses Motiv wird allerdings für die Bindung des extrahelikalen Zieladenins verantwortlich gemacht (Schluckebier *et al.*, 1998), so dass es zu einer sterischen Überlappung bei der Bindung von DNA und AdoHcy bzw. Sinefungin an M·*Taq*I kommen könnte. Trotz dieses Umstandes konnten Kristalle des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AdoHcy erzeugt werden. Diese wiesen allerdings während der Messung von Diffraktionsbildern schlechte Streueigenschaften auf, was sich durch eine maximale Auflösungsgrenze von 3-4 Å bemerkbar machte. Diese Tatsache konnte durch den Einsatz des Cofaktoranalogons AETA umgangen werden. Wie in Kapitel C1 gezeigt, nimmt AETA in der binären Struktur aus M·*Taq*I und AETA eine gestreckte Konformation ein, so dass der modifizierte Aminosäurerest nicht mit dem katalytischen NPPY-Motiv wechselwirkt. Des weiteren trägt AETA am Schwefelatom keine Methylgruppe, so dass ein Methylgruppentransfer nicht erfolgen kann. Damit ist AETA ein ideales Cofaktoranalogon für den Einsatz in Cokristallisationsexperimenten mit M·*Taq*I und DNA. Tatsächlich zeigt sich, dass die Kristalle des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA bis zu einer maximalen Auflösungsgrenze von 2.0 Å streuen. Erhalten wurden die Kristalle des ternären Komplexes durch Dampfdiffusion mit der Methode des hängenden Tropfens. Dabei zeigte sich, dass erst durch Animpfen der neu erstellten Tropfen mit Keimen von vorher gewachsenen Kristallen mit Hilfe eines Haares das Kristallwachstum so beeinflusst werden konnte, dass nicht zu viele und qualitativ hochwertige Kristalle entstanden (Abbildung C2.1).

Abbildung C2.1

*Optimierung der Kristalle des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA von den ersten Nadelbüscheln (A) über angeimpfte Kristalle (B) zu messbaren Einkristallen (C). Die Breite der Bilder entspricht ca. 1 mm.*

2.2 Datensammlung

Für die Datensammlung wurde der Kristall des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA bei 100 K in einer Nylonfaser-Schleife zusammen mit einer Kryoprotektant-Lösung schockgefroren. Die Datensammlung für den ternären Komplex aus M·*Taq*I, DNA und AETA erfolgte an einer rotierenden Kupferanode mit einem Phosphor-Bildplatten-(*Image-Plate*-) Detektor bei 100 K. Ein Diffraktionsbild während einer Drehung des Kristalls um 0,25° ist exemplarisch in Abbildung C2.2 dargestellt. Die maximale Auflösungsgrenze des Kristalls liegt bei 2,0 Å. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit den Programmen XDS98 und XSCALE98 (Kabsch *et al.*, 1993). Die Indizierung der Beugungsdaten zeigte, dass der ternäre Komplex in der Raumgruppe $P2_1$ kristallisiert. Die erhaltenen Daten aus der Prozessierung sind in Tabelle C2.2 aufgeführt.

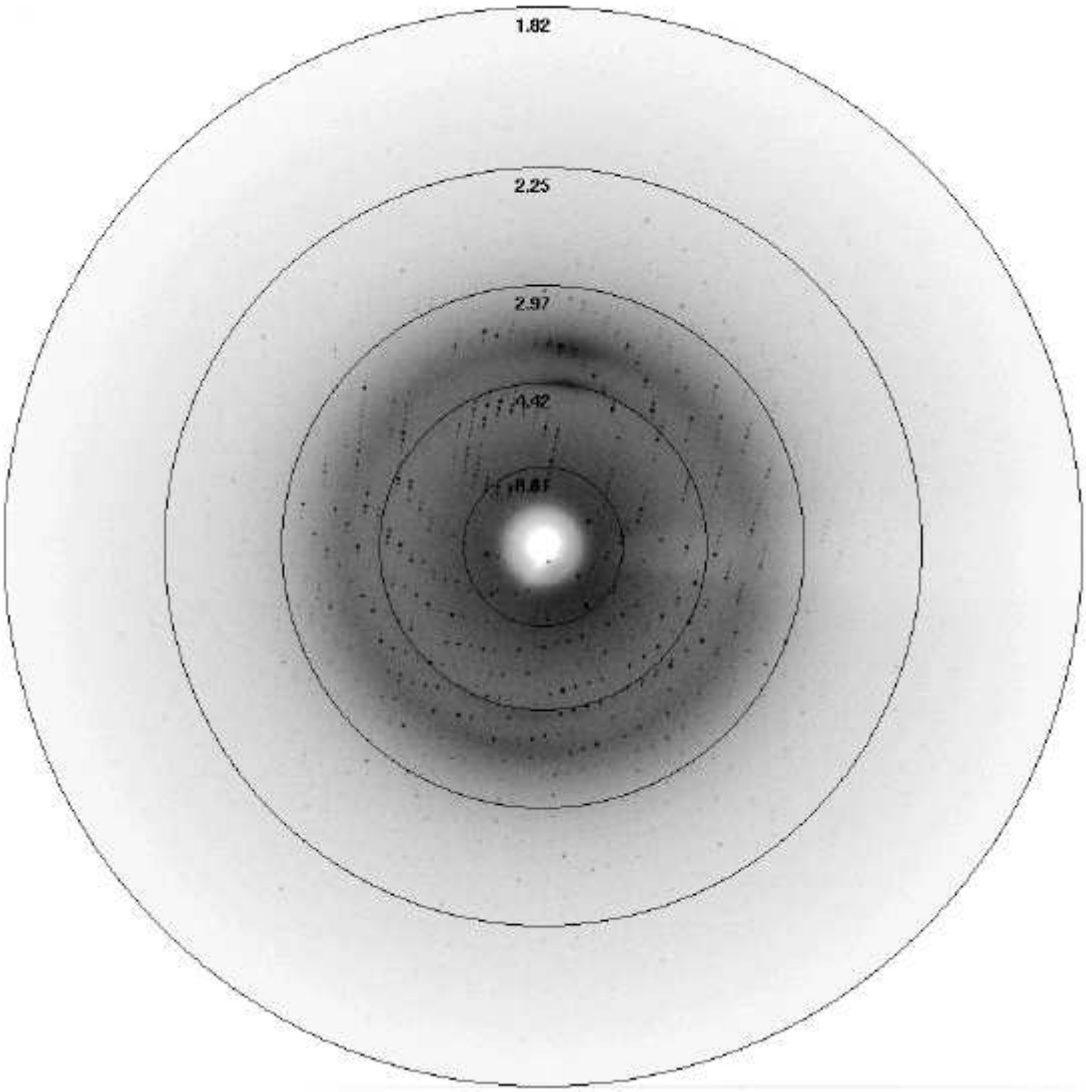


Abbildung C2.2

*Rotations-Diffraktionsbild des Kristalls aus M·*Taq*I, DNA und AETA während einer Drehung um 0,25°, aufgenommen mit einem Phosphor-Bildplatten-Detektor an einer rotierenden Kupferanode. Die äußeren Reflexe sind innerhalb der dargestellten Kontour mit dem Auge nicht mehr zu sehen, konnten aber von der Software bis 2,0 Å erkannt werden. Die Zahlenwerte an den Ringen bezeichnen die jeweilige Auflösungsgrenze in Å.*

2.3 Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung

Bei der Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung können die Phasen der gebeugten Röntgenstrahlen während des Experiments nicht gemessen werden. Dies führt dazu, dass diese nachträglich ermittelt werden müssen. Im Fall des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA lag es nahe, die Phasen mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes zu ermitteln, da die dreidimensionale Struktur von M·*Taq*I in den binären Komplexen mit AETA, AdoMet, AdoHcy und Sinefungin bereits bekannt war. Der molekulare Ersatz wurde mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) aus dem CCP4 Programmpaket (CCP4, 1994) durchgeführt. Als Suchmodell diente die bereits bekannte Struktur von M·*Taq*I in Komplex mit AdoMet, wobei der Cofaktor AdoMet nicht in das Suchmodel aufgenommen wurde. Für die Rotationsfunktionssuche wurden Beugungsdaten des Auflösungsbereiches von 15,0 – 4,0 Å, für die Translationssuche des Auflösungsbereiches von 7,0 – 4,0 Å und für die anschließende *rigid body* Verfeinerung des Auflösungsbereiches von 10,0 – 4,0 Å berücksichtigt. Die Rotationssuche erfolgte in einem Radius von 30 Å. Die Ergebnisse der Rotations- und Translationssuche, sowie der anschließenden *rigid body* Verfeinerung sind in Tabelle C2.2 zusammengefasst. Von den in den einzelnen Schritten jeweils gefundenen vier Lösungen sind nur die ersten beiden dargestellt. Die weiteren Lösungen repräsentieren die Lage jeweils symmetrieverwandter Moleküle und sind somit redundant. Dies bedeutet, dass zwei Proteine in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind. Die Tatsache, dass keine falschen Lösungen gefunden wurden, liegt daran, dass der Wert für das Signallimit auf 0,5 eingestellt war. Dies führt dazu, dass nur Signale mit einem Wert, der größer ist als die Hälfte des maximalen Wertes, für die Auswertung herangezogen werden. Dieses Kriterium erfüllte kein falsches Signal, was auf die gute Übereinstimmung des Suchmoleküles und des zu suchenden Moleküls zurückzuführen ist.

Tabelle C2.2

*Ergebnisse der Phasenbestimmung durch die Methode des molekularen Ersatzes für den ternären Komplex aus M·*Taq*I, DNA und AETA*

Rotationssuche			
1.Lösung			
Euler Winkel (α, β, γ)	89,31	89,71	138,00
Korrelationskoeffizient [%]	19,0		
2.Lösung			
Euler Winkel (α, β, γ)	270,50	98,66	319,15
Korrelationskoeffizient [%]	19,6		
Translationssuche mit einem Molekül			
1.Lösung			
Euler Winkel (α, β, γ)	89,31	89,71	138,00
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,0156	0,0	0,1083
Korrelationskoeffizient [%]	18,3		
R-Faktor [%]	48,7		
2.Lösung			
Euler Winkel (α, β, γ)	270,50	98,66	319,14
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,0469	0,0	0,3917
Korrelationskoeffizient [%]	20,3		
R-Faktor [%]	48,2		
Translationssuche mit dem 2. Molekül (Molekül 1 fest)			
1.Molekül			
Euler Winkel (α, β, γ)	89,31	89,71	138,00
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,0156	0,0	0,1083
2.Molekül			
Euler Winkel (α, β, γ)	270,50	98,66	319,14
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,5523	0,5166	0,3898
Korrelationskoeffizient [%]	38,0		
R-Faktor [%]	43,3		
***Rigid body* Verfeinerung**			
1.Molekül			
Euler Winkel (α, β, γ)	90,40	90,45	138,39
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,0216	-0,0017	0,1060
2.Molekül			
Euler Winkel (α, β, γ)	270,14	99,16	319,01
Fraktionelle Koordinaten (x,y,z)	0,5518	0,5160	0,3896
Korrelationskoeffizient [%]	42,8		
R-Faktor [%]	42,5		

Nach der Bestimmung der Phasen wurde die Struktur durch Energieminimierungen verfeinert. Diese Energieminimierungen wurden mit dem Programm CNS 0.5 (Brünger *et al.*, 1998) gerechnet, das Interpretieren der Elektronendichteverteilung und das Modellieren der Aminosäurereste wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt. Das Energieminimieren beinhaltete folgende Verfeinerungsprozeduren: Nach der erfolgreichen Phasenbestimmung wurde zunächst einmalig eine *rigid body* Verfeinerung gestartet. Anschließend wurden eine *simulated annealing*, eine B-Faktor und eine *positional* Verfeinerung durchgeführt. Dann wurde mit den neuen Koordinaten

eine Elektronendichtekarte berechnet, die manuell interpretiert wurde und an Hand derer eventuelle Änderungen bzw. Neuerungen in das Modell eingebracht wurden. Dieses verbesserte Modell wurde dann wieder mit den Verfeinerungsprozeduren energieminimiert. So war es möglich, im Verlauf der einzelnen Verfeinerungszyklen die DNA und das Cofaktoranalogon AETA innerhalb der Elektronendichte zu lokalisieren. Das bereits vorhandene Modell des Proteins konnte so ebenfalls zur korrekten Struktur verbessert werden. Ein erstes Modell für das DNA Molekül (*pdb* Format) wurde mit dem Programm NAMOT (Tung und Carter, 1994) generiert. Die abschließenden Werte für den kristallographischen R-Faktor und den freien R-Faktor liegen bei 0,196 bzw. bei 0,233. Dabei wurde der freie R-Faktor mit 10 % aller Reflexe berechnet, die zufällig ausgewählt wurden (Brünger, 1992). Bezogen auf die Hauptkettenatome haben die beiden Proteinmoleküle der asymmetrischen Einheit einen r.m.s. Unterschied von 0,44 Å.

2.4 Mess- und Verfeinerungsstatistik

Der von Kristallen des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA gemessene Datensatz ist für die Strukturbestimmung hervorragend geeignet. Es wurden 216768 Reflexe bis zu einer Auflösungsgrenze von 2,0 Å gemessen. Mit diesen Informationen und den gleichzeitig während der Verfeinerung einbezogenen stereochemischen Einschränkungen steht für die Strukturbestimmung ein gutes Parameter zu Daten Verhältnis zur Verfügung. Dies zeigte sich während einer Verfeinerungsprozedur, bei der testweise nicht kristallographische Symmetrie (*ncs, non crystallographic symmetry*) mit einbezogen wurde. Diese wird in der Regel dazu genutzt, das Parameter zu Daten Verhältnis zu verbessern, indem es die Moleküle in der asymmetrischen Einheit, die über nicht-kristallographische Symmetrieoperationen verwandt sind, mit Matrix-operationen ineinander überführt. Dies führt dazu, dass sich bei zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit die Anzahl der zu verfeinerten Parameter halbiert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Struktur beider Moleküle gemittelt wird, was sich bei leichten Abweichungen innerhalb der Strukturen nachteilig auf die Elektronendichtekarte auswirken kann. Dies war auch der Fall bei der Verfeinerung des

ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA, da bei einer probeweisen Einführung der *ncs* sowohl der kristallographische als auch der freie R-Faktor (R_{work} und R_{free}) anstiegen. Dies läßt sich damit begründen, dass tatsächlich leichte Abweichungen zwischen den beiden Komplexen A und B existieren und dass genügend Daten gemessen wurden, um die Struktur für jeden einzelnen Komplex ohne Anwendung von *ncs* zu bestimmen. Die zugehörige Mess- und Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle C2.3 aufgeführt.

Tabelle C2.3

*Mess- und Verfeinerungsstatistik des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA*

Raumgruppe	$P2_1$
Zellkonstanten	a = 59,50 Å b = 68,65 Å c = 114,43 Å β = 92,20°
Asymmetrische Einheit	zwei Moleküle
Auflösungsbereich	50 – 2,0 Å
Anzahl aller Reflexe	216768
Anzahl der *unique* Reflexe	54457
Reflexe für *cross validation*	5538
R_{sym} (letzte Schale, 2,0-2,1 Å) [1]	0,088 (0,191)
R_{work} [2]	0,196
R_{free} [3]	0,233
Vollständigkeit % (letzte Schale)	87,2 (66,8)
Durchschnittlicher *B*-Faktor	15,53 Å^2
Hauptketten A (B)	13,48 Å^2 (14,11 Å^2)
Seitenketten A (B)	15,18 Å^2 (15,72 Å^2)
DNA A (B)	10,85 Å^2 (15,23 Å^2)
AETA A (B)	11,24 Å^2 (10,67 Å^2)
Wasser	19,76 Å^2
$\langle I/\sigma \rangle$ (letzte Schale)	10,53 (2,74)
Mittlerer Koordinatenfehler <u>	0,224 Å
R.m.s. Unterschiede für	
Bindungen	0,005 Å
Winkel	1,38°
Dihedrale Winkel	23,66°
Improper Winkel	1,17°
Seitenketten mit der Besetzungszahl = 0	
Molekül A:	R39, E59, R66, E224, E249, E362, R365, E378, R385
Molekül B:	R39, E59, E224, E248, E249, E362, R365, E378, E408
Nicht modellierte Aminosäuren	1 – 20, 414 – 421
Anzahl der Wasser Atome	496

[1] $R_{sym} = \sum | I - \langle I \rangle | / \sum I$

[2] $R_{work} = \sum | | F_{obs} | - | F_{calc} | | / \sum | F_{obs} |$

[3] R_{free} wurde aus 10 % zufällig ausgewählter Reflexe bestimmt (Brünger, 1992).

Das Ramachandran-Diagramm der ϕ- und ψ-Winkelverteilung beider Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA ist in Abbildung C2.3 dargestellt. Es zeigt für die beiden Monomere A und B jeweils zwei Aminosäurereste, die in nicht erlaubten Regionen liegen. Diese Aminosäurereste sind A49 und E355. Außerdem liegt der Aminosäurerest R389 in unmittelbarer Nähe der nicht erlaubten Region.

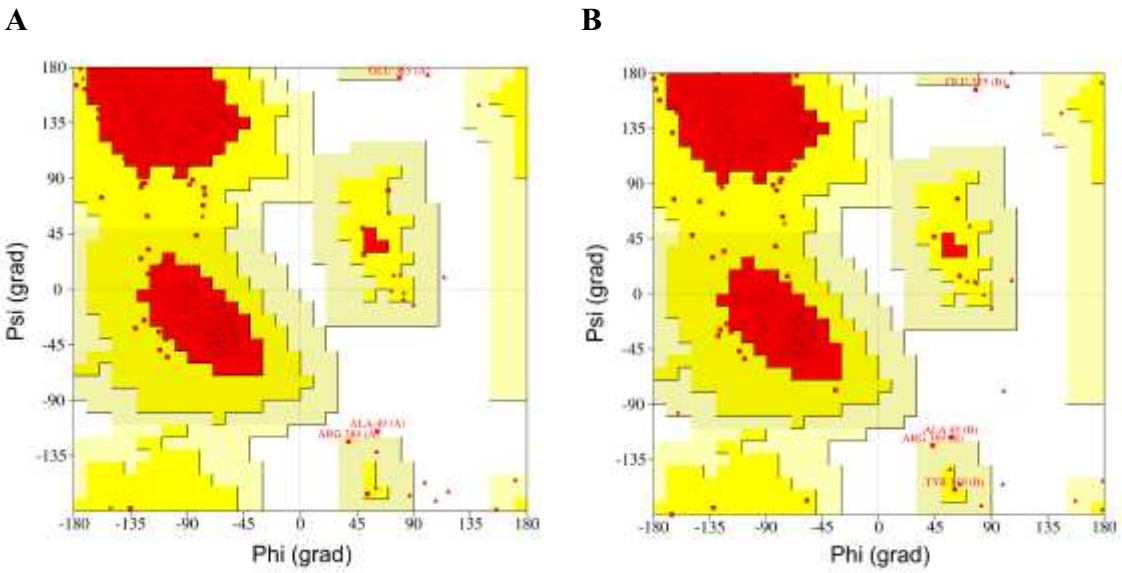


Abbildung C2.3

*Ramachandran Diagramm der Proteinmoleküle A und B in der asymmetrischen Einheit des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA. Glycine sind als Dreiecke eingezeichnet, alle anderen Aminosäurereste als Quadrate. Nur die beiden Aminosäurereste A49 und E355 liegen im nicht erlaubten, weiß gekennzeichneten Bereich.*

Diese Aminosäurereste liegen auch in den binären Komplexen von M·*Taq*I und seinen Cofaktoren bzw. Cofaktoranaloga in den unerlaubten Bereichen. Für A49 und R389 gibt es plausible Erklärungen, warum diese eine stereochemisch ungünstige Position einnehmen. A49 ist Teil der in der Cofaktorbindung involvierten β-Schleife zwischen β1 und αB. Diese Schleife gehört zum für Methyltransferasen konservierten Glycin-

reichen Motiv I (Malone *et al.*, 1995) und beinhaltet in den meisten Fällen an der Position des A49 ein Glycin, welches nicht, wie das Cβ-Atom von A49, mit dem vorangehenden Carbonylsauerstoffatom innerhalb der Van der Waals Radien überlappt. Warum in M·*Taq*I an dieser Position ein Alanin vorliegt, ist strukturell nicht zu erklären. Eine mögliche Stabilisierung der ungünstigen Konformation von Ala49 könnte durch eine C-H···O Wasserstoffbrücke zwischen A49 Cβ und C48 O erfolgen (Derewenda *et al.*, 1995). R389 bildet eine Salzbrücke zu D219 und spielt somit eine Rolle in der Stabilisierung der beiden Domänen untereinander. Da die beiden Aminosäuren A49 und R389 nahezu identische Positionen im Ramachandran-Diagramm im Vergleich zu den binären Strukturen aufweisen, wurden die Erklärungen für ihre ungünstige Konformation bereits von Gerd Schluckebier angeführt (Schluckebier, 1996).

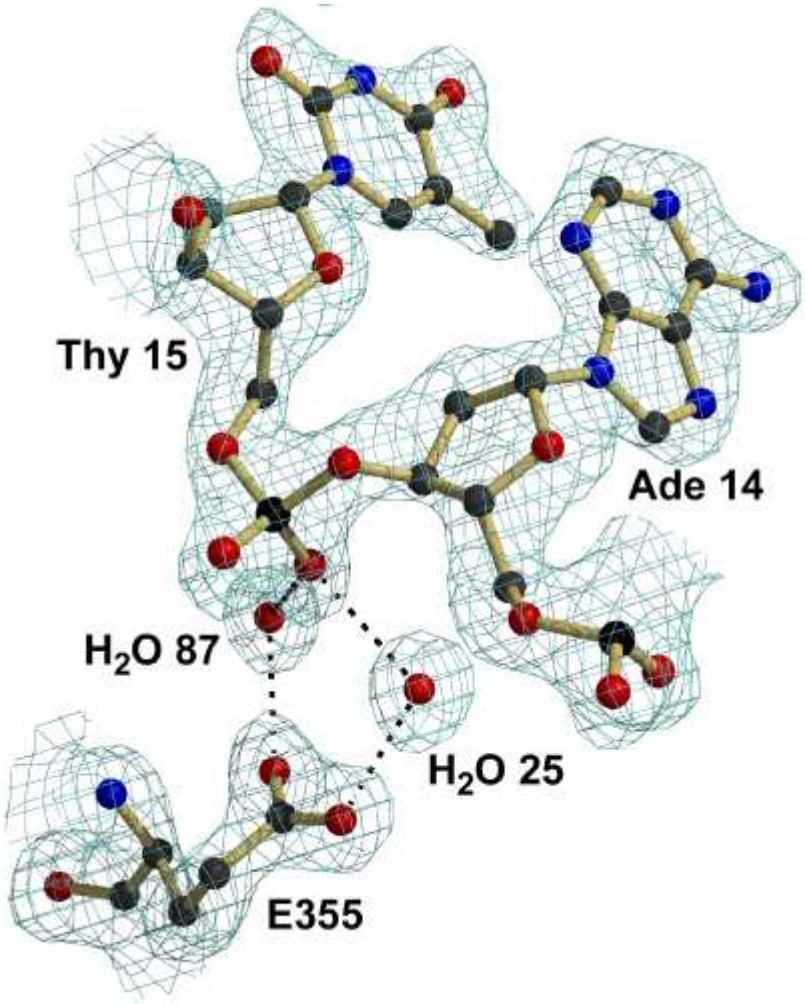


Abbildung C2.4

Darstellung der wasserverbrückten Wechselwirkung von Glu 355 mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA. Die dargestellte $2F_o$-F_c Differenzelektronendichte hat einen Kontourgrad ab 1,5 σ.

Die ungünstige Konformation von E355 läßt sich durch die ternäre Struktur erklären: E355 bildet mit den beiden Sauerstoffatomen OD1 und OD2 eine über Wasser verbrückte H-Brücke zum Phosphat-Rückgrat der DNA aus und leistet somit einen Beitrag zur unspezifischen DNA-Bindung (Abbildung C2.4).

Der Aminosäurerest K213, der in der binären Struktur von M·*Taq*I mit AdoMet im nicht erlaubten Bereich liegt, nimmt im ternären Komplex eine komplett andere Konformation ein, so dass er jetzt im erlaubten Bereich des Ramachandran Diagramms liegt. Dies resultiert aus einem leicht unterschiedlichen Verlauf der Hauptkette innerhalb dieses Bereichs im Vergleich zur binären Struktur mit AdoMet. Dieser

Unterschied hat allerdings nichts mit der DNA-Bindung zu tun und läßt sich durch die Flexibilität dieses an der Oberfläche des Proteins lokalisierten Bereichs erklären. Durch die größere Anzahl an gemessenen Daten zur Bestimmung des ternären Komplexes konnte so der Verlauf der Hauptkette in diesem Bereich und damit die Position von K213 besser bestimmt werden.

2.5 Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA

Der ternäre Komplex aus M·*Taq*I, DNA und AETA kristallisiert mit zwei Komplexen in der asymmetrischen Einheit. Die Unterschiede der beiden Komplexe sind allerdings sehr gering, so dass im Folgenden nur Komplex A besprochen wird. Komplex A weist im Vergleich zu Komplex B eine besser definierte Elektronendichtekarte auf und besitzt außerdem im Mittel niedrigere *B*-Faktoren. Sollten Unterschiede zwischen beiden Monomeren bei der Interpretation eine Rolle spielen, so werden diese explizit erwähnt. Die Topologie von M·*Taq*I im Komplex mit DNA und AETA ist in Abbildung C2.5 dargestellt. Die Berechnung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1983) und die Darstellung wurde mit Hilfe des Programms TOPS (Westhead *et al.*, 1998; Westhead *et al.*, 1999) durchgeführt. Im Vergleich zur Topologie von M·*Taq*I in den binären Strukturen gibt es bis auf eine zusätzliche 3_{10}-Helix (Helix X in Abbildung C2.5) keine Unterschiede. Diese Helix beinhaltet die Aminosäurereste 90-92 und wechselwirkt mit Helix C. Warum Helix X in den binären Strukturen von M·*Taq*I nicht vorliegt, ist nicht unmittelbar erklärbar. Der Verlauf der Cα Atome der Aminosäurereste 90-92 unterscheidet sich kaum in der ternären und den binären Strukturen. Es genügen wahrscheinlich leichte Veränderungen innerhalb dieses Bereichs, damit das Programm DSSP diesen als 3_{10}-Helix interpretiert. Für den Vergleich beider Strukturen ist dies jedoch nicht relevant und wird daher nicht weiter diskutiert.

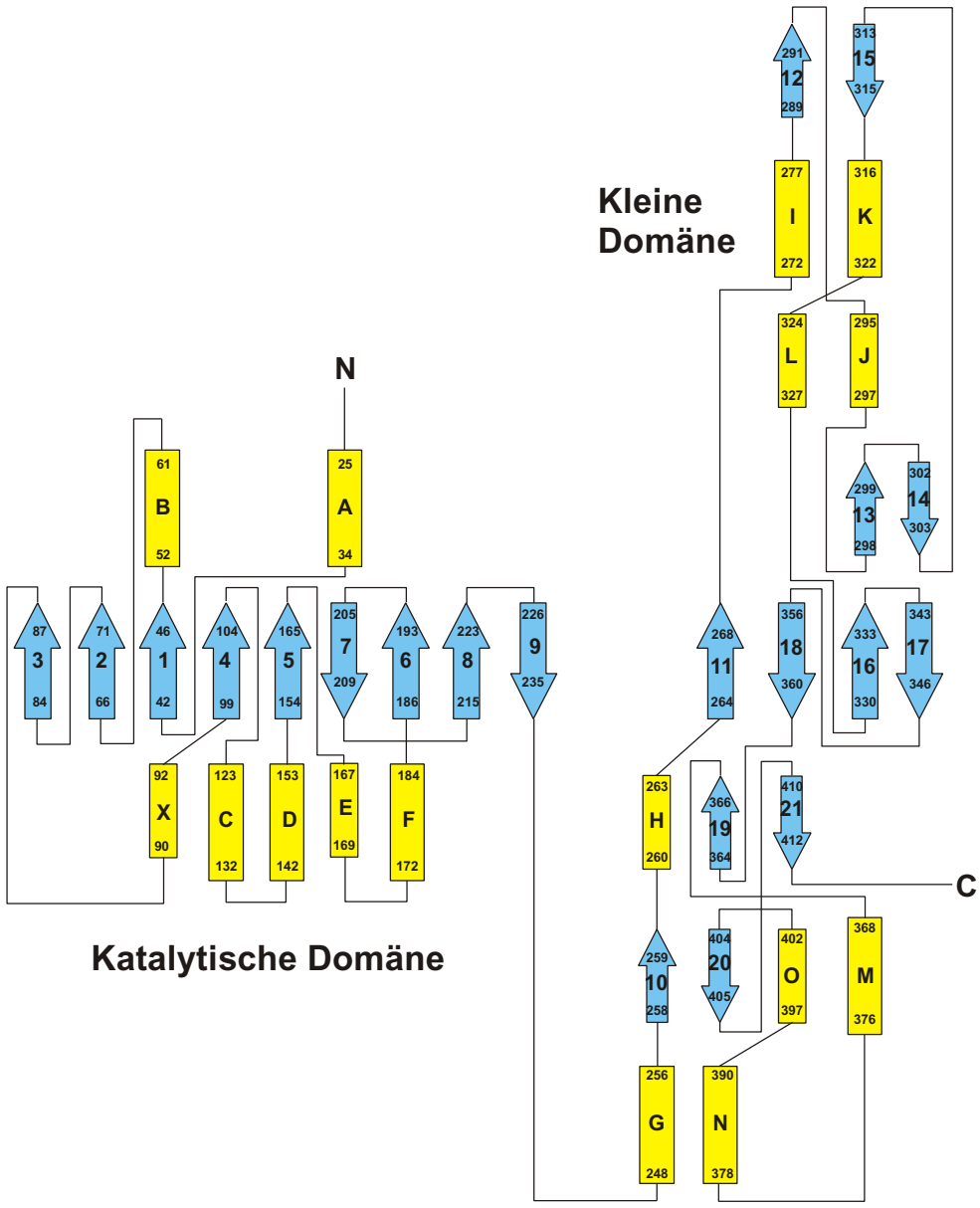


Abbildung C2.5

*Topologie von M·*Taq*I. Die Bezeichnung der Helices (Buchstaben) und Faltblattstränge (große Zahlen) sind von Schluckebier* et al. *(1997) übernommen. Die kleinen Zahlen bezeichnen jeweils den Aminosäurerest, mit der das Sekundärstrukturelememt beginnt bzw. endet.*

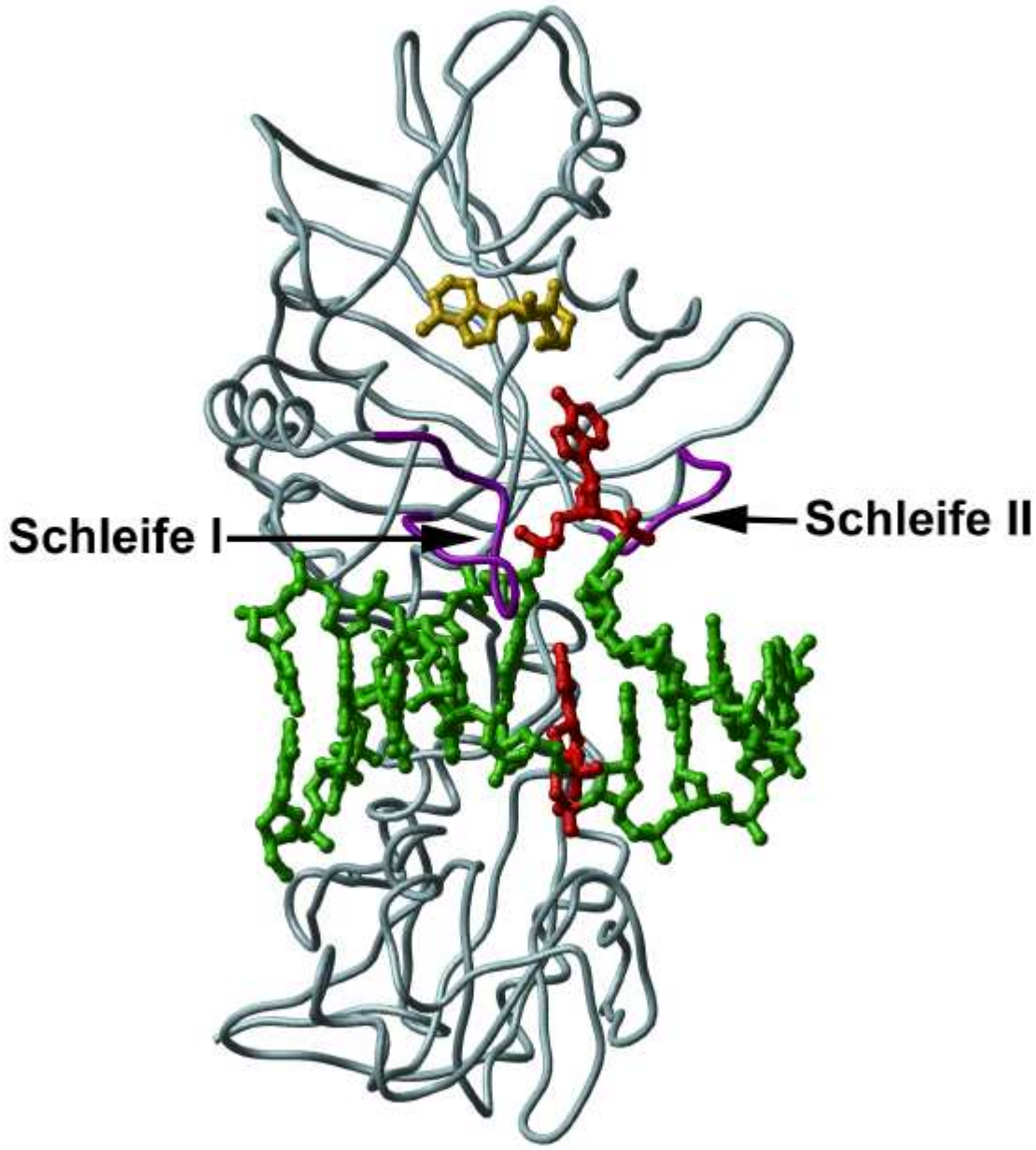


Abbildung C2.6

*Kristallstruktur des ternären Komplexes. Der Verlauf der Hauptkettenatome von M·*Taq*I ist in hellblau und die beiden Schleifen, die ihre Konformation während der DNA-Bindung ändern, sind in magenta dargestellt. Das Cofaktoranalogon AETA ist gelb, die DNA grün und das extrahelikale Zieladenin mit dem Partner Thymin und den jeweils benachbarten Phosphatresten ist rot koloriert.*

Die dreidimensionale Struktur des ternären Komplexes ist in Abbildung C2.6 dargestellt. M·*Taq*I besteht aus zwei Domänen, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Beide Domänen spannen eine Furche auf, die positiv geladen ist und innerhalb derer die DNA bindet. Die größere, katalytische Domäne beeinhaltet die

Aminosäurereste 1-243 und bindet das Cofaktoranalogon AETA. Sie besteht aus einem zentralen Faltblatt, welches sich aus neun β-Strängen zusammensetzt und sieben α-Helices, die dieses Faltblatt flankieren. Die kleinere Domäne, welche aus den Aminosäurereste 244-421 gebildet wird, besitzt eine Reihe sich abwechselnder, kleinerer α-Helices und β-Stränge. Die DNA vollzieht innerhalb des ternären Komplexes eine drastische Konformationsänderung. Dies äußert sich in der extrahelikalen Position des Zieladenins, das zusammen mit den benachbarten Phosphatgruppen aus der DNA Doppelhelix herausgeklappt ist.

Flexible Bereiche innerhalb des Proteins sind anhand der atomaren Temperaturfaktoren (*B*-Faktoren) zu erkennen. Abbildung C2.7 zeigt den Verlauf der *B*-Faktoren in Abhängigkeit der Aminosäurereste. Insbesondere N- und C-Terminus sind durch ihre hohe Flexibilität gekennzeichnet. Dies erklärt, warum für die ersten 20 und die letzten acht Aminosäurereste keine Elektronendichte gefunden wurde.

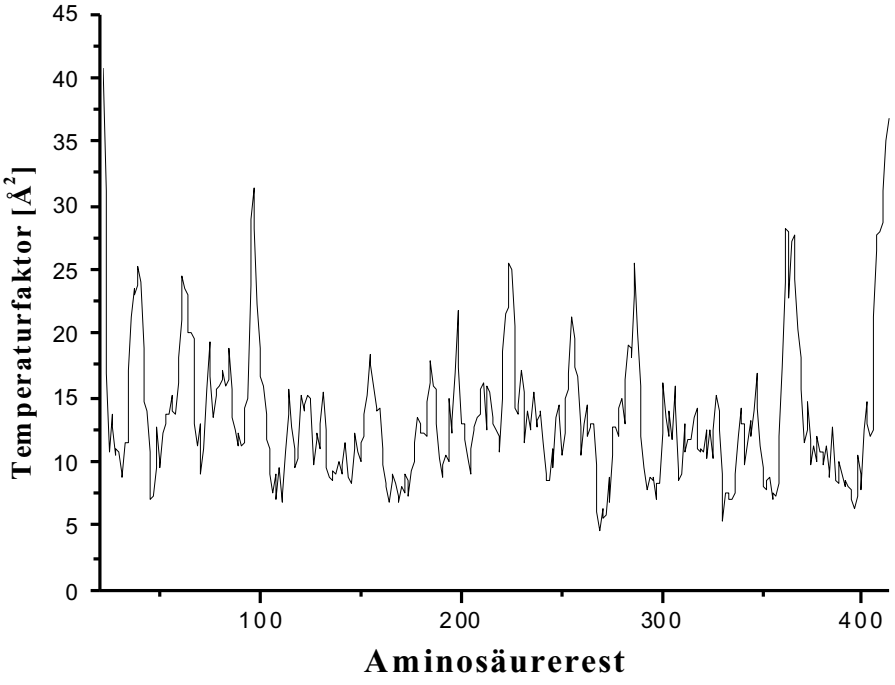


Abbildung C2.7

Temperaturfaktorverteilung der Hauptkettenatome des ternären Komplexes.

Eine Darstellung des Oberflächenpotentials von M·*Taq*I zeigt die unterschiedlichen Ladungsverteilungen innerhalb des Proteins. Die Cofaktorbindungsstelle ist negativ und die DNA Bindungsstelle positiv geladen (Abbildung C2.8). Ferner erkennt man deutlich das Eindringen des Proteins in die kleine Furche der DNA.

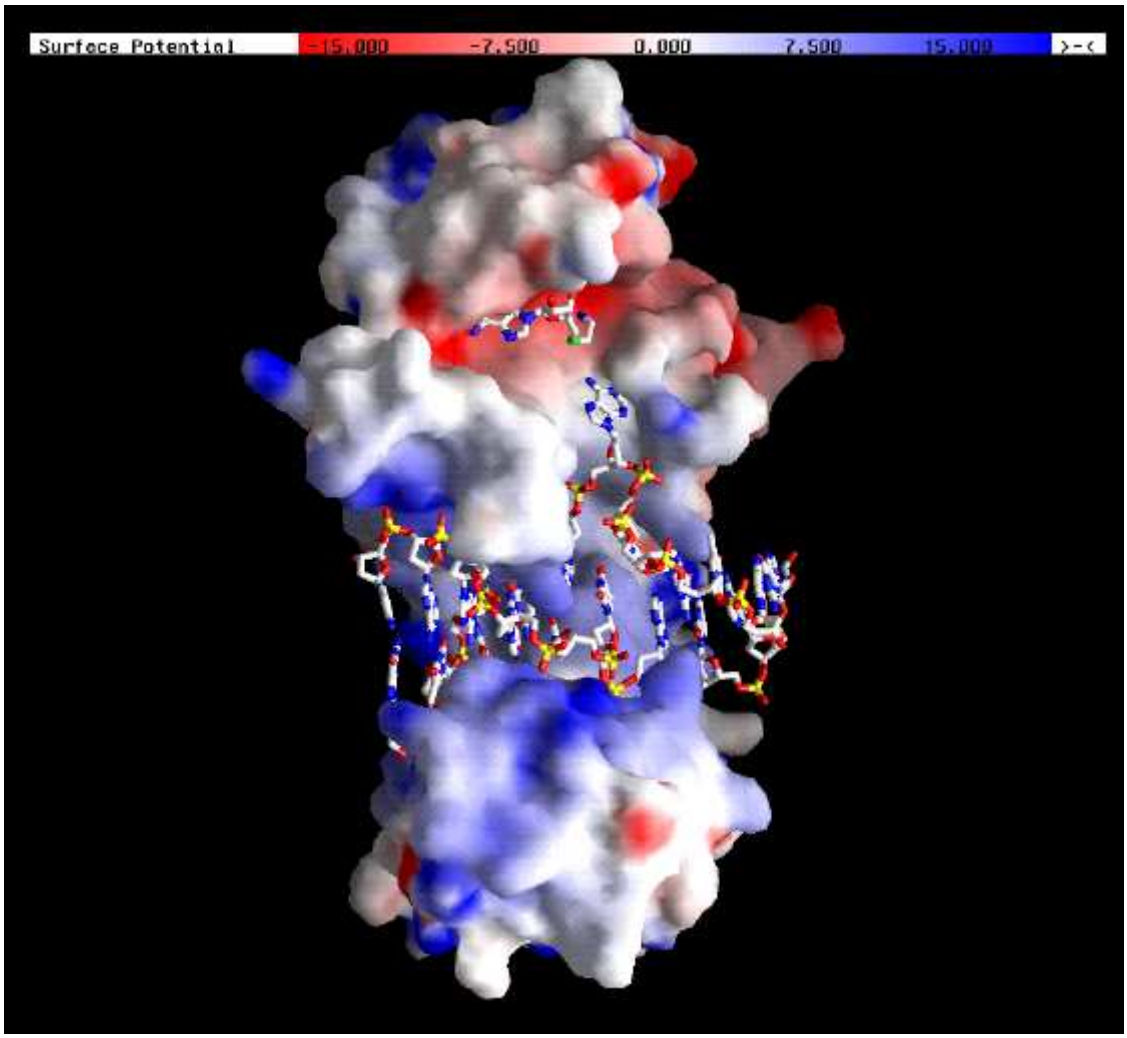


Abbildung C2.8

Kristallstruktur des ternären Komplexes. Nur das Oberflächenpotential des Proteins ist dargestellt. Das Cofaktoranalogon AETA und die DNA sind als Kugelstab-Modell wiedergegeben. Negatives Potential ist rot und positives Potential ist blau koloriert, die Einheit des Potentials ist Coulomb.

2.6 Vergleich der Struktur von M·*Taq*I im ternären Komplex und binären Komplex mit AdoMet

Die Kristallstruktur von M·*Taq*I im ternären Komplex mit DNA und AETA unterscheidet sich in drei entscheidenden Punkten von der Kristallstruktur des Enzyms im binären Komplex mit AdoMet. Diese drei Unterschiede sind:

- die Domänenbewegung der beiden Domänen von M·*Taq*I zueinander
- die Orientierung von Schleife I (Aminosäurereste 112-121) zur kleinen Furche der DNA mit sequenzspezifischer Erkennung
- die Umorientierung von Schleife II (Aminosäurereste 197-201), wodurch K199 zur Bildung der Bindungstasche für das Zieladenin beiträgt

Der größte Unterschied besteht dabei in der Domänenbewegung, die M·*Taq*I bei der DNA-Bindung vollzieht. So bewegt sich die kleinere Domäne relativ in Richtung der großen Domäne in einer Scharnierbewegung um den Aminosäurerest I243 (Abbildung C2.9). Während dieser Bewegung ändert sich die Tertiärstruktur der kleinen Domäne jedoch nicht. Auch die Tertiärstruktur der katalytischen Domäne bleibt bis auf die erwähnten Änderungen der Schleifen I und II erhalten. Diese neue Konformation wird durch eine zusätzliche Salzbrücke zwischen E172 und R398 stabilisiert (Abbildung C2.10). Diese Salzbrücke ist in der Kristallstruktur von M·*Taq*I im binären Komplex nicht vorhanden.

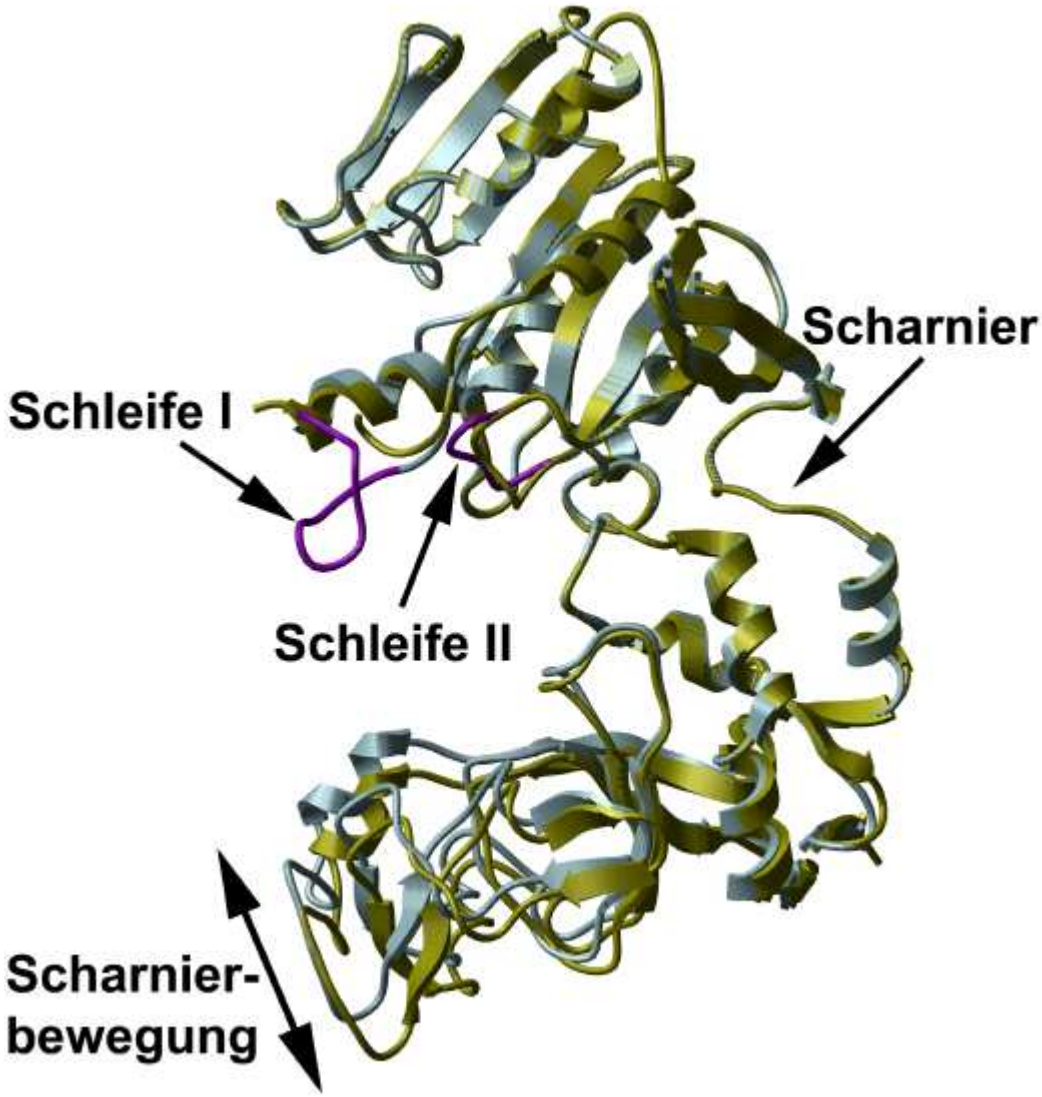


Abbildung C2.9

*Scharnierbewegung von M·*TaqI*. Das Protein im ternären Komplex (hellblau, ohne DNA und AETA) vollzieht eine Scharnierbewegung im Vergleich zu der Struktur im binären Komplex mit AdoMet (grün, ohne AdoMet). Die Superpositionierung beider Kristallstrukturen erfolgte für die Aminosäurereste 22-243.*

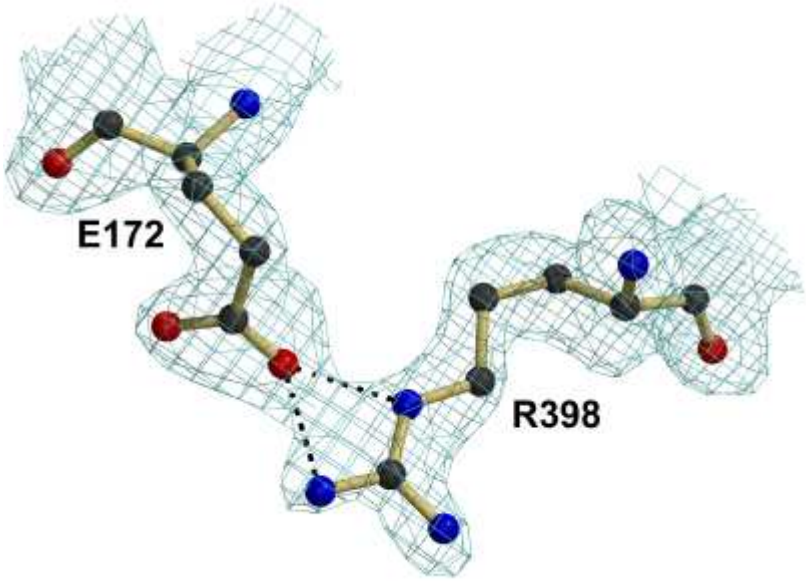


Abbildung C2.10

Salzbrücke zwischen E172 und R398 mit dargestellter $2F_o$-F_c Differenzelektronendichteverteilung mit einer Kontour ab 1,2 σ.

Um die Scharnierbewegung in den Vergleich des binären und ternären Komplexes miteinzubeziehen, werden die einzelnen Domänen separat miteinander verglichen. Der r.m.s. Unterschied korrespondierender Hauptkettenatome der katalytischen Domäne beträgt 0,87 Å, der der kleineren Domäne 0,62 Å. Trotz dieser geringen Werte gibt es zwei wichtige Unterschiede zwischen den Komplexen, die in zwei Schleifenregionen liegen. Die erste Schleife (Schleife I) beinhaltet die Aminosäurereste 112-121 und verbindet die beiden Sekundärstrukturelemente β4 und αC (vergl. Abbildung C2.5). Schleife I ist in der Kristallstruktur von M·*Taq*I ohne DNA aufgrund ihrer Flexibilität nicht sichtbar. In der ternären Struktur dagegen besitzt Schleife I eine eindeutige Konformation. Sie spielt eine wichtige Rolle in der sequenzspezifischen DNA-Erkennung und verhindert zusätzlich das Zurückklappen der extrahelikalen Zielbase. Die zweite Schleife (Schleife II) beinhaltet die Aminosäurereste 197-201 und verbindet die Sekundärstrukturelemente β6 und β7. Das Resultat dieser Schleifenbewegung ist eine Umorientierung der Seitenkette von K199 (Abbildung C2.11), so dass diese an der Bildung der Bindungstasche für das Zieladenin beteiligt ist.

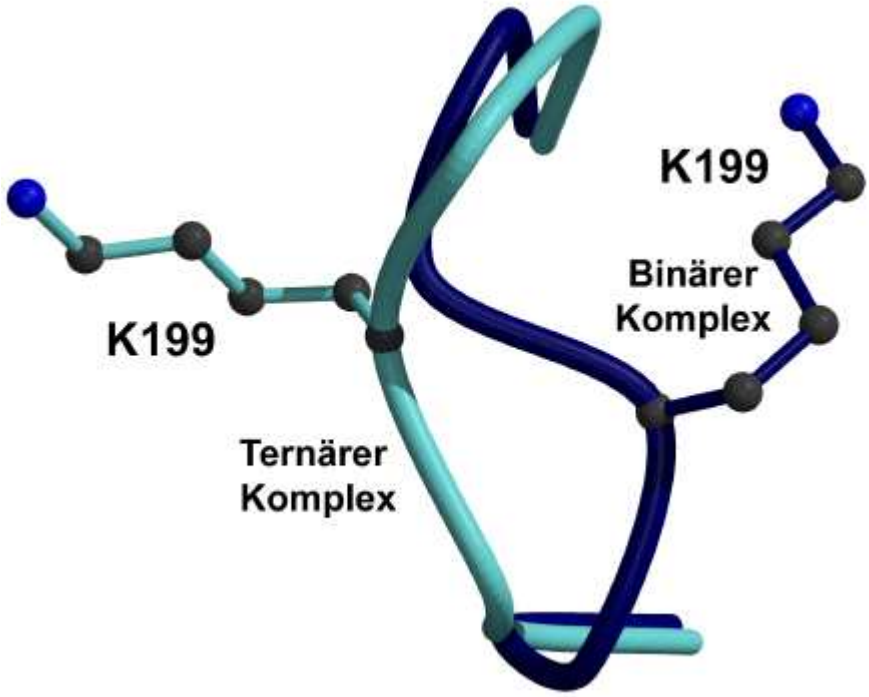


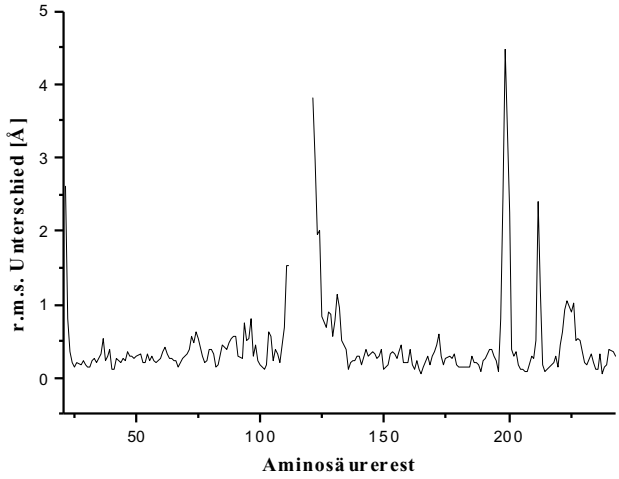
Abbildung C2.11

Eine Überlagerung des ternären Komplexes (hellblau) mit dem binären Komplex mit AdoMet (dunkelblau) zeigt die Umorientierung von K199.

Trägt man den r.m.s. Unterschied der beiden Domänen beider Komplexe gegen die einzelnen Aminosäurereste auf, sieht man unterschiedliche flexible Bereiche (Abbildung C2.12). Diese befinden sich natürlich im Bereich der Schleife II (Schleife I kann nicht verglichen werden, da sie in der binären Struktur nicht sichtbar ist) aber auch im Bereich von N- und C-Terminus. Die Unterschiede in den terminalen Bereichen des Enzyms kommen durch die Flexibilität zustande. Da N- und C-Terminus nicht sichtbar sind, sind auch die folgenden bzw. vorangehenden Aminosäurereste nicht so klar definiert, dass ihre Struktur eindeutig festgelegt werden kann. Dies bedeutet, dass Flexibilität in einer Struktur nicht von einem Aminosäurerest zum nächsten auftritt, sondern dass sich diese Flexibilität über einen Bereich entwickelt. Das führt dazu, dass am Anfang eines flexiblen Bereichs die Elektronendichte einzelner Aminosäuren nicht eindeutig interpretiert werden kann und führt zu einer so schlechten Elektronendichtekarte, dass keine Aminosäure mehr positioniert werden kann. Für N- und C- Terminus bedeutet dies, dass die r.m.s. Unterschiede in den Termini keine

Bedeutung für die Funktionsweise von M·*Taq*I haben, sondern auf die Flexibilität beider Enden zurückzuführen ist.

A



B

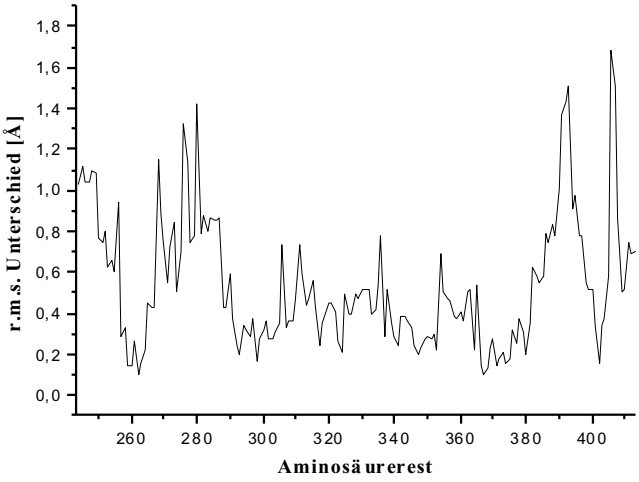


Abbildung C2.12

*R.m.s. Unterschiede zwischen M·*Taq*I im ternären Komplex und im binärem Komplex mit AdoMet. Dabei wurden beide Domänen separat miteinander überlagert, so dass die Domänenbewegung nicht berücksichtigt ist. (A) zeigt die katalytische Domäne, (B) die kleine Domäne.*

Des weiteren erkennt man Bereiche mit größeren r.m.s. Unterschieden, die am Anfang und am Ende der kleineren Domäne lokalisiert sind. Diese deuten auf eine leichte

Verschiebung von Sekundärstrukturelementen innerhalb dieser Domäne hin, können aber keiner unmittelbaren Funktion im Zusammenhang mit der DNA-Bindung zugeordnet werden. Ob diese leichten Veränderungen überhaupt signifikant sind, ist fraglich. An den separaten Überlagerungen der beiden Domänen erkennt man, dass diese sich in ihrer Tertiärstruktur kaum unterscheiden (Abbildung C2.13). Die leichten Verschiebungen könnten auch ein Resultat der Kristallisation sein, da die Kristallstruktur nur eine bestimmte Konformation widerspiegelt, in Lösung jedoch Bewegungen innerhalb der Tertiärstruktur auftreten.

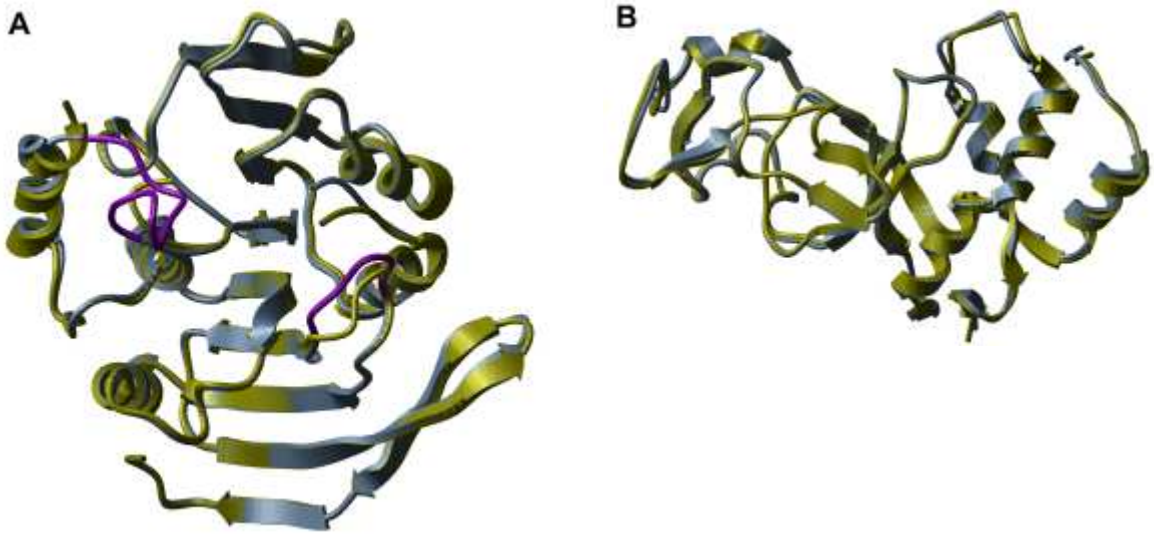


Abbildung C2.13

Domänenüberlagerung des ternären Komplexes (hellblau) mit dem binären Komplex mit AdoMet (grün). (A) zeigt die katalytische Domäne mit den beiden Schleifen I und II (magenta) und (B) die kleinere Domäne. Beide Domänen sind separat voneinander anhand ihrer C_α-Atome überlagert.

2.7 Beschreibung der DNA-Konformation und -Bindung

Innerhalb des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA besitzt die DNA B-DNA Charakter, sie ist im Vergleich zu B-DNA allerdings stark deformiert (Abbildung C2.14). Die größte Änderung ist dabei die Lage des Zieladenins (Ade6, für die Basennumerierung wird auf Abbildung C19 verwiesen), die zusammen mit ihrem Zucker und den benachbarten Phosphatresten aus der DNA-Doppelhelix herausgeklappt

ist. Dies beweist zum ersten Mal, dass auch eine N-DNA-Methyltransferase ähnlich wie die C-DNA-Methyltransferasen M·*Hha*I und M·*Hae*III in der Lage ist, ihre Zielbase aus der DNA-Doppelhelix herauszurotieren (Klimasauskas *et al.*, 1994, Reinisch *et al.*, 1995).

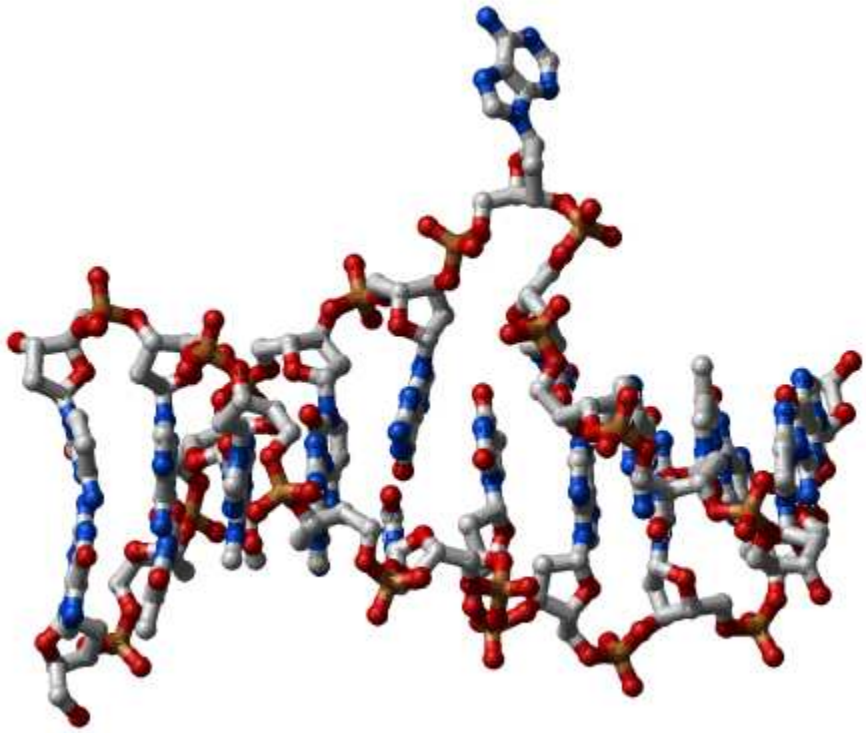


Abbildung C2.14

*Struktur der DNA im Komplex mit M·*Taq*I und AETA (Monomer A). Man erkennt, dass die Steigung der DNA größer als zehn Basenpaare ist, da sie innerhalb der vorhandenen zehn Basenpaare keine vollständige Windung eingeht. Die Länge der DNA beträgt ca. 34 Å.*

Das Zieladenin (Ade6) wird durch zahlreiche Wechselwirkungen stabilisiert. Dabei schließt M·*Taq*I die Zielbase Adenin von allen Seiten ein. Die Aminosäurereste V21, N105, P106, P107, Y108, F196 und K199 bilden dabei die Adenin-Bindungstasche aus und wechselwirken mit dem Zieladenin. Die adeninspezifische Erkennung erfolgt dabei durch H-Brücken von N105 ND2 zu Ade6 N1, von N105 OD1 und P106 O zur extrahelikalen 6-Aminogruppe und von Y108 zu Ade6 N7. Die Aminosäurereste V21, Y108, F196 und K199 bilden hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Zieladenin aus.

Zusätzlich wird die Zielbase durch *edge to edge* π-Stapelung zu Y108 und *edge to face* π-Stapelung zu F196 stabilisiert (Abbildung C2.15).

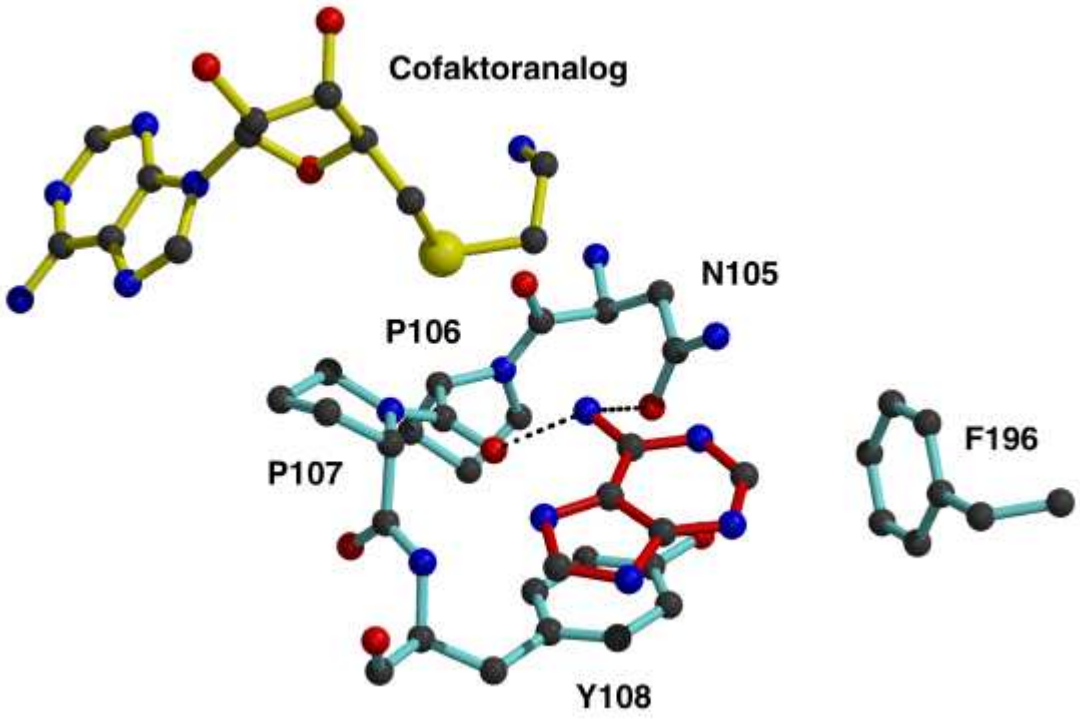


Abbildung C2.15

NPPY-Motiv und F196 (hellblau) mit extrahelikalem Zieladenin (rot) und AETA (gelb). Die Aktivierung der exocyklischen 6-Aminogruppe erfolgt durch die beiden H-Brücken von Ade N6 zu N105 OD1 und P 106 O.

Details der einzelnen Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen sind in den Tabellen C2.6 und C2.8 aufgelistet.

Des weiteren ist die kleine Furche der DNA im Bereich der Erkennungssequenz ca. 3 Å breiter als in B-DNA. Dies ermöglicht dem Zieladenin (Ade6), durch die kleine Furche aus der Doppelhelix herauszurotieren. Außerdem ist das DNA-Rückgrat an der Position des Partnerthymins (Thy15) um ca. 2 Å senkrecht zur Helixachse komprimiert, wodurch die Partnerbase in Richtung des Zentrums der Doppelhelix verschoben wird. Das Resultat dieser Verschiebung ist ein diskontinuierlicher Verlauf der π-Stapelung entlang dieses Stranges. Dies bedeutet, dass die Partnerbase Thymin (Thy15) nicht mehr mit ihren beiden 3‘- und 5‘-Nachbarbasen eine π-Stapelung eingehen kann. Dafür geht die Partnerbase Thymin (Thy15) mit Guanin (Gua5), der 5‘-Nachbarbase des Zieladenins

(Ade6), eine π-Stapelung ein (Abbildung C2.16A). Da die π-Stapelung des Zielstranges durch die aus der Doppelhelix ausgeklappte Zielbase Adenin (Ade6) ebenfalls diskontinuierlich ist, könnte man erwarten, dass die π-Stapelung durch die Position der Partnerbase Thymin (Thy15) wieder kontinuierlich wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die 3‘-Nachbarbase Thymin (Thy7) des Zieladenins (Ade6) ist in Richtung der großen Furche verschoben und kann so weder eine π-Stapelung mit seiner 3‘-Nachbarbase Guanin (Gua8), noch mit der Partnerbase Thymin (Thy15) eingehen, obwohl Thy7 nach wie vor Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen mit seiner Partnerbase Adenin (Ade14) ausbildet. Der Deoxyriboserest von Thymidin (Thy7) ist an die Stelle verschoben, an der normalerweise der Deoxyriboserest des Zieladenin (Ade6) lokalisiert wäre.

Die beschriebenen Veränderungen der DNA im Vergleich zu B-DNA bewirken auch eine Verzerrung der gesamten helikalen Struktur der DNA. Da aus dem Zielstrang die Zielbase Adenin (Ade6) zusammen mit ihrem Desoxyriboserest und den beiden benachbarten Phosphatresten herausgeklappt ist und die Desoxyribose von Thymidin (Thy7) die Stelle besetzt, an der normalerweise die Desoxyribose des Zieladenins (Ade6) lokalisiert wäre, kommt es formal zu einer Verkürzung des Zielstranges um ein Nukleotid. Da sich dieses Nukleotid (Ade6) in der Mitte der zehn Basenpaar langen DNA Doppelhelix befindet und alle anderen Basenpaare normale Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, kommt es zu einer Struktur, die vergleichbar ist mit der doppelhelikalen Struktur eines neun basenpaarlangen Einzelstranges mit einem Strang aus zehn Basenpaaren. Dies führt dazu, dass die DNA an einem Ende aufgewunden ist und dadurch ihre Steigung im Vergleich zu B-DNA größer wird (Abbildung C2.14). Dazu muss man allerdings anmerken, dass die DNA im ternären Komplex nur zehn Basenpaare lang ist. Dies bedeutet, dass eine Aufwindung energetisch leichter zu vollziehen ist als für eine DNA, bei der noch hunderte oder tausende Nukleotide folgen, wie dies in einer Zelle der Fall ist. Die Frage, wie eine längere DNA an M·*Taq*I bindet, läßt sich allerdings mit der vorliegenden Struktur nicht eindeutig klären. Fest steht aber, dass die DNA eine Aufwindung eingehen muss, um die Deformation des Zielstranges mit dem aus der Doppelhelix ausgeklappten Zieladenin (Ade6) zu kompensieren. Ob diese Aufwindung für längere DNA entsprechend erfolgt, ist jedoch spekulativ.

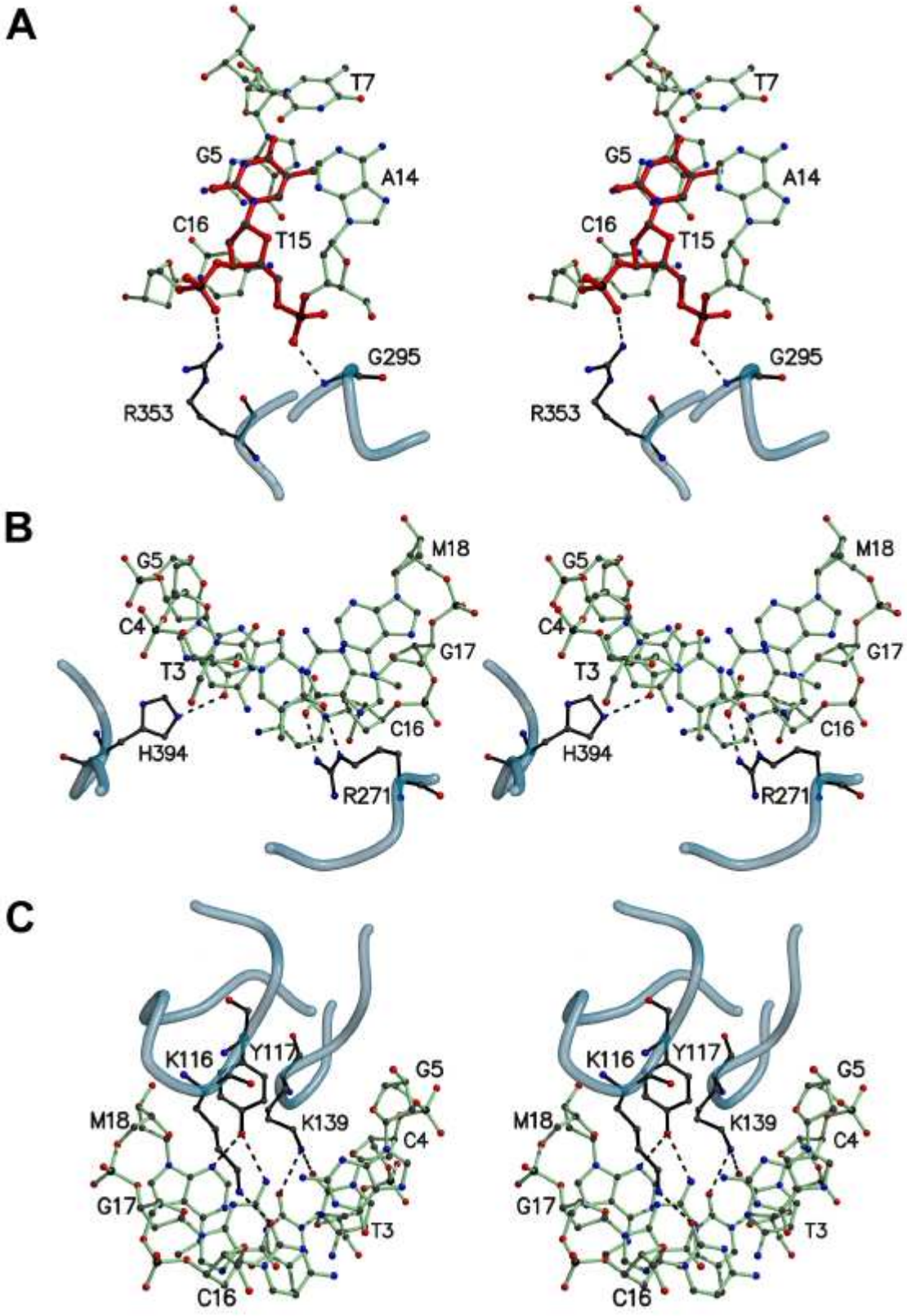

A
T7
G5
A14
C16
T15
G295
R353
T7
G5
A14
C16
T15
G295
R353
B
M18
G5
C4
G17
T3
C16
H394
R271
M18
G5
C4
G17
T3
C16
H394
R271
C
K116
Y117
G5
M18
K139
C4
G17
T3
C16
K116
Y117
G5
M18
K139
C4
G17
T3
C16

Abbildung C2.16

*Stereodarstellungen der Wechselwirkungen von M·*Taq*I mit der DNA Erkennungssequenz*

(A) π-Stapelung zwischen Thymin (Thy15) und Guanin (Gua5). Das Partnernukleosid mit seinen benachbarten Phosphatresten ist rot, die restlichen Nukleotide sind grün gefärbt. G295 und R353 aus der kleinen Domäne von M·*Taq*I*, welche die DNA durch Interaktionen mit den 5'- und 3'-Phosphodiestergruppen der Partnerbase Thymin komprimieren, sind schwarz dargestellt. Das Rückgrat der beiden Schleifen ist hellblau koloriert.*

*(B) Sequenzspezifische Erkennung in der großen Furche. Die ersten drei Basenpaare der doppelsträngigen Erkennungssequenz 5'-TCGA-3' sind in grün koloriert. Wechselwirkende Proteinreste der kleinen Domäne von M·*Taq*I sind schwarz und das Rückgrat der Schleifen, die diese Aminosäuren beinhalten, ist in hellblau dargestellt.*

(C) Sequenzspezifische Erkennung in der kleinen Furche. Die ersten drei Aminosäuren sind im Vergleich zu (B) um 180° gedreht. Die Kolorierung entspricht der von (B). K116 und Y117 sind Teil der Schleife I, die auf das katalytische Motiv IV (NPPY) folgt. Diese Schleife ist in Gegenwart von DNA stabilisiert und verhindert das Zurückklappen des extrahelikalen Zieladenins.

Der B-DNA Charakter, der im ternären Komplex vorliegenden DNA, soll im folgenden dargelegt werden. Die dreidimensionale Struktur von B-DNA ist gut charakterisiert. Dies gilt für Bindungslängen und -winkel, sowie für Torsionswinkel und Pseudorotationsmodi (*pucker*). Betrachtet man die einzelnen Nukleotide, so gibt es bevorzugte Konformationen (Saenger, 1984). So ist die hauptsächlich beobachtete Konformation der Zucker Pseudorotationsmodi in B-DNA die $C_{2'}$-*endo* bzw. die verwandte $C_{3'}$-*exo* Konformation. Durch diese Zuckeranordnung haben die benachbarten Phosphoratome einen Abstand von 7,0 Å, was für eine B-DNA Konformation charakteristisch ist. Weiterhin liegt der bevorzugte χ-Winkel in B-DNA, welcher die Rotation um die glykosidischen Bindung beschreibt, im Bereich zwischen -90° und -120°. Zum Vergleich dazu ist der bevorzugte Pseudorotationsmodus in A-DNA $C_{3'}$-*endo*, was einem Abstand benachbarter Phosphoratome von 5,9 Å entspricht und der bevorzugte χ-Winkel liegt bei ca. -160°. In Tabelle C2.4 sind der Pseudorotationsmodus, der Phasenwinkel P der Pseudorotation und der maximalen Pseudorotationswinkel ν_{max} der einzelnen Nukleotide der gebundenen DNA zusammengefasst. Dabei beschreibt der Phasenwinkel P die Konformation der Ribose und der Pseudorotationswinkel ν_{max} die Stärke der Wellung der Ribose (Altona &

Sundaralingam, 1972). Zusätzlich sind in Tabelle C2.5 die χ-Winkel, die Basenabstände und die Abstände benachbarter Phosphoratome angegeben.

Tabelle C2.4

Pseudorotationsmodi, Phasenwinkel P der Pseudorotation und maximaler Pseudorotationswinkel v_{max} der einzelnen Nukleotide

Nukleotid	Pseudorotationsmodus		Phasenwinkel P der Pseudorotation [°]		Maximaler Pseudo-rotationswinkel v_{max}[°]	
Zielstrang	A	B	A	B	A	B
Gua1	$C_{2'}$-*endo*	$C_{4'}$-*exo*	161	42	25	30
Thy2	$C_{2'}$-*endo*	$C_{1'}$-*exo*	159	110	45	28
Thy3	$C_{1'}$-*exo*	$C_{3'}$-*endo*	127	29	36	27
Cyt4	$C_{1'}$-*exo*	$C_{3'}$-*endo*	129	36	24	31
Gua5	$C_{2'}$-*endo*	$C_{1'}$-*exo*	169	112	39	11
Ade6	$C_{2'}$-*endo*	$C_{4'}$-*exo*	173	61	37	8
Thy7	$C_{3'}$-*exo*	$C_{1'}$-*endo*	183	319	33	13
Gua8	$C_{2'}$-*endo*	$C_{3'}$-*endo*	162	35	33	25
Thy9	$C_{1'}$-*exo*	$C_{4'}$-*exo*	140	55	41	37
Cyt10	$C_{1'}$-*exo*	$C_{3'}$-*endo*	118	33	28	41
Gegenstrang						
Gua11	$C_{2'}$-*endo*	$C_{4'}$-*exo*	166	39	35	33
Ade12	$C_{2'}$-*endo*	$C_{3'}$-*endo*	172	18	38	24
Cyt13	$C_{2'}$-*endo*	$C_{4'}$-*exo*	168	62	39	36
Ade14	$O_{1'}$-*endo*	$C_{3'}$-*endo*	106	30	18	35
Thy15	$C_{2'}$-*endo*	$C_{1'}$-*exo*	161	124	42	13
Cyt16	$C_{2'}$-*endo*	$O_{1'}$-*endo*	164	106	40	21
Gua17	$C_{2'}$-*endo*	$O_{1'}$-*endo*	148	99	42	29
Mea18	$C_{2'}$-*endo*	$C_{3'}$-*endo*	173	22	34	22
Ade19	$C_{1'}$-*exo*	$C_{4'}$-*exo*	133	38	30	35
Cyt20	$C_{1'}$-*exo*	$C_{4'}$-*exo*	137	41	35	37

Tabelle C2.5

χ-Winkel, Basenabstände und P-P Abstände der einzelnen Nukleotide

Nukleotid	χ-Winkel [°]		Basenabstand[1] [Å]		P-P Abstand[2] [Å]	
Zielstrang	A	B	A	B	A	B
Gua1	-148,3	-148,0	3,7	3,7	-[3]	-[3]
Thy2	-110,2	-137,9	2,9	3,0	6,6	6,4
Thy3	-117,7	-160,4	2,5	2,4	6,4	6,6
Cyt4	-72,5	-91,4	3,7	3,6	6,6	6,5
Gua5	-76,4	-95,5	-	-	6,7	6,7
Ade6	-87,8	-94,1	-	-	5,7	5,6
Thy7	174,2	160,8	2,5	2,5	6,1	6,0
Gua8	-92,6	-119,6	2,9	2,8	6,6	6,5
Thy9	-98,0	-120,5	3,0	3,2	6,8	6,4
Cyt10	-129,4	-123,1	-	-	-	-
Gegenstrang						
Gua11	-144,8	-146,2	3,3	3,4	-[3]	-[3]
Ade12	-108,7	-131,6	2,6	2,8	6,7	6,6
Cyt13	-72,3	-122,6	3,6	3,1	6,4	6,5
Ade14	-162,4	-165,0	3,8	4,1	6,7	6,9
Thy15	-175,9	174,0	4,1	4,2	5,6	5,7
Cyt16	-59,7	-84,4	3,1	3,2	6,8	6,7
Gua17	-88,1	-109,8	3,2	3,3	6,6	6,7
Mea18	-94,9	-124,3	3,3	3,0	7,0	7,1
Ade19	-107,2	-127,3	3,4	3,5	6,1	6,2
Cyt20	-118,3	-135,6	-	-	-	-

[1]Angegeben ist der Abstand zur folgenden Base
[2]Angegeben ist der Abstand zum folgenden Phosphoratom
[3]Gua1 und Gua11 besitzen kein Phosphoratom

Die Daten der Tabellen C3 und C4 zeigen, dass es starke Abweichungen der Pseudorotationsmodi, χ-Winkel, Basenabstände und P-P Abstände im Vergleich zu den bevorzugten Werten für B-DNA gibt. Des weiteren erkennt man bei den Werten für die Pseudorotationsmodi starke Unterschiede zwischen den Komplexen A und B. Dazu muss man allerdings anmerken, dass die Lage der Zuckeratome und damit die Pseudorotationsmodi im Monomer B wesentlich schlechter durch die umhüllende Elektonendichte charakterisiert sind. Dies wird auch durch den B-Faktor deutlich, der im Mittel für die DNA Atome in Komplex B bei 15,23 $Å^2$ und für Komplex A bei 10,85 $Å^2$ liegt. Da die genauen Pseudorotationsmodi aber nur durch eine eindeutige Elektronendichteverteilung exakt bestimmt werden können, was bei Komplex B nicht der Fall ist, werden diese nicht weiter in die Diskussion mit einbezogen, sondern nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Dies gilt ebenfalls für die χ-Winkel in Monomer B,

da diese direkt mit dem Pseudorotationsmodus korrelieren. Die Basenabstände und P-P Abstände sind davon allerdings nicht betroffen, weil die Position aller Basen und Phosphoratome in Monomer B durch die Elektronendichte eindeutig festgelegt ist. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sowohl die aromatische Base als auch die Phosphoratome elektronenreicher sind als die Kohlenstoff- und Sauerstoffatome der Ribose. Trotz der teilweise sehr unterschiedlichen Parameter innerhalb der DNA in Komplex A und B ist die Gesamtstruktur beider Moleküle jedoch nahezu identisch. Dies wird durch eine Überlagerung, die in Abbildung C2.17 dargestellt ist, deutlich. Auch die r.m.s. Differenz von 0,68 Å, sowie der Korrelationskoeffizient von 0,79 zeigen die Ähnlichkeit beider DNA-Moleküle.

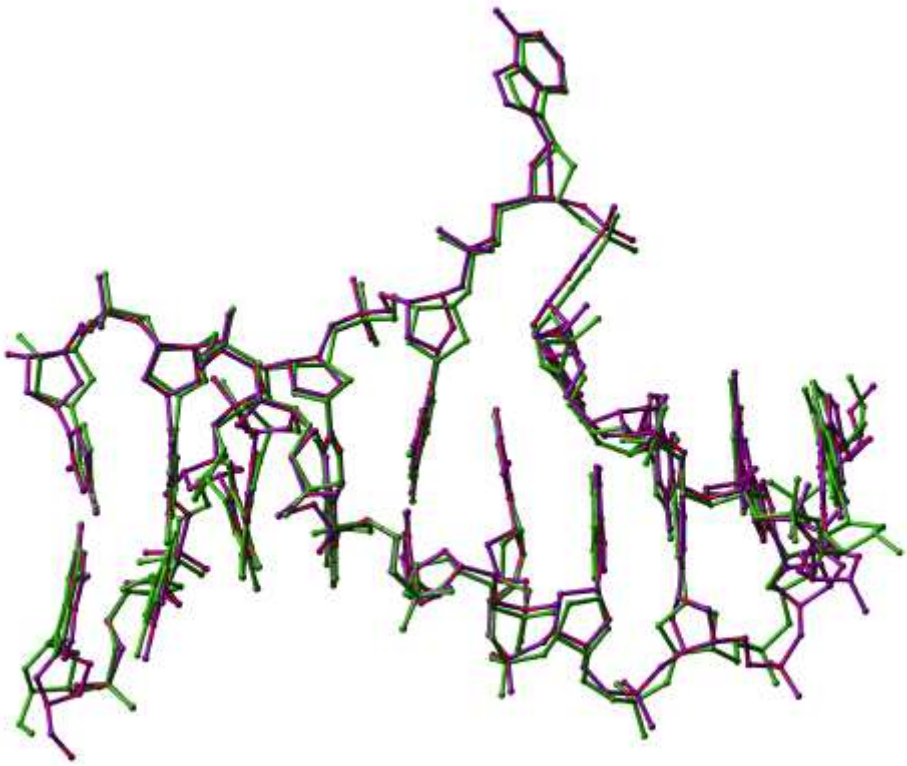


Abbildung C2.17

Überlagerung der DNA des Komplexes A (magenta) und des Komplexes B (grün).

Für die Pseudorotationsmodi im Komplex A wird die für A-DNA bevorzugte C_3'-*endo* Konformation nicht beobachtet. Lediglich die χ-Winkel von Gua1, Gua11, Ade14 und Thy15 weisen auf A-DNA Charakter hin. Bei Gua1 und Gua11 ist der sehr niedrige χ-Winkel auf die terminale Lage beider Nukleotide innerhalb der Doppelhelix

zurückzuführen, da diese Kristallpackungswechselwirkungen mit benachbarten DNA Molekülen eingehen. Die für B-DNA ungünstigen χ-Winkel von Ade14 und Thy15 können durch das Aufweiten der kleinen Furche der DNA an dieser Stelle erklärt werden. Dadurch ändert sich die helikale Struktur der DNA an dieser Stelle und besitzt nicht mehr normalen B-DNA Charakter. Eine weitere Begründung für den kleineren χ-Winkel von Thy15 liegt in der Tatsache begründet, dass Thy15 durch seine zur Helixachse verschobene Lage keine für B-DNA typische innerhelikale Position aufweist. Thy7 wird durch die extrahelikale Lage von Ade6 in eine Position verschoben, in der es keine π-Stapelung mit anderen Basen eingehen kann. Durch diese ungünstige Position ist auch der große Wert für den χ-Winkel zu erklären. Die relativ hohen χ-Winkel von Cyt4, Gua5, Cyt13 und Cyt16 könnten als strukturelle Ursache ebenfalls die Aufweitung der kleinen Furche innerhalb dieses Bereichs der DNA haben. Die Tatsache, dass Purinbasen generell weniger negative χ-Winkel als Pyrimidinbasen bevorzugen (Zimmerman & Pheiffer, 1979), wird in der vorliegenden Komplexstruktur allerdings nicht beobachtet.

Das häufige Auftreten der $C_{1'}$-*exo* Konformation der Ribosereste kann ebenfalls mit der Verzerrung der DNA erklärt werden. Die $C_{1'}$-*exo* Konformation erleichtert der Base eine Rotationsverdrehung (*rotational twist*) zur Helixachse. Da der Verlauf beider DNA Stränge durch die Position der jeweils komplementären Basen stark beeinflusst ist, bewirkt eine Änderung des Verlaufs des DNA-Rückgrates gleichzeitig eine Änderung der Basenpositionen. Das Rückgrat der DNA zeigt -wie bereits beschrieben- im Bereich der Erkennungssequenz eine Aufweitung der kleinen Furche und 3‘ zur Zielbase eine Aufwindung. Dies hat Auswirkungen auf die Lage der Basen, wobei eine $C_{1'}$-*exo* Konformation der Ribosereste ein Wegdrehen der Base von der Helixachse erleichtert.

Der Basenabstand, der im Mittel 3,1 Å beträgt, gibt allerdings keinen Aufschluss über die Konformation der DNA. Der mittlere Basenabstand in B-DNA liegt zwischen 3,0 und 3,4 Å und in A-DNA zwischen 2,6 und 3,3 Å. Außerdem variiert der Basenabstand der einzelnen Nukleotide in der gebundenen DNA erheblich. Dies spiegelt eher die generelle Verzerrung der DNA wider, als dass sie einer eindeutigen DNA Konformation zuzuschreiben ist. Dagegen deuten die P-P Abstände auf eine B-DNA Konformation hin. Zwar liegen fast alle Abstände zwischen 6,5 und 7,0 Å, was nicht ganz dem für B-DNA erhaltenen Wert von 7 Å entspricht, aber nur vier Abstände deuten auf A-DNA

hin. Dies sind die Abstände zwischen den Nukleotiden Ade6 und Thy7, Thy7 und Gua8, Thy15 und Cyt16, sowie Ade19 und Cyt20. Dabei läßt sich jeder dieser Abstände durch die besondere Position der beteiligten Basen erklären. Ade6, Thy7 und Thy15 haben -wie beschrieben- im Vergleich zu B-DNA eine veränderte Lage in der DNA. Dies spiegelt sich natürlich auch in den Werten für die Basenabstände wider. Der für B-DNA zu geringe Abstand zwischen Ade19 und Cyt20 kann durch die verschobene Position von Cyt20 erklärt werden, da dieses Nukleotid Kristallpackungswechselwirkungen eingeht und in Richtung von Ade19 verschoben ist. Des weiteren liegt der Durchmesser der DNA bei 18 Å. Dies ähnelt dem Durchmesser von B-DNA, der 20 Å beträgt und nicht dem von A-DNA, der bei 26 Å liegt (Voet & Voet, 1990). Die beiden Furchen der DNA, von denen die große Furche breit und tief und die kleine Furche -trotz Aufweitung- eng und tief ist, besitzen ebenfalls B-DNA Charakter. Betrachtet man die oben beschriebenen Ergebnisse, so kann man die im kristallinen Komplex von M·*Taq*I, DNA und AETA vorliegende DNA als stark verzerrte B-DNA charakterisieren.

Eine schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen M·*Taq*I und DNA ist in Abbildung C2.18 dargestellt. Acht Aminosäurereste erkennen die DNA sequenzspezifisch und 13 Aminosäurereste interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken mit den Phosphat- oder Ribosesauerstoffatomen der DNA. Unter den acht Aminosäureresten, die sequenzspezifisch mit der DNA wechselwirken, sind drei, die nur mit dem extrahelikalen Zieladenin interagieren. Diese sind N105, P106 und Y108, welche alle zu dem für N-DNA-Methyltransferasen konservierten katalytischen Motivs IV (N/D/S P P Y/F) gehören (Abbildung C16). Die anderen sequenzspezifisch wechselwirkenden Aminosäurereste sind in Schleifenbereichen lokalisiert. K116 und Y117 sind Teil von Schleife I und erkennen zusammen mit K139 aus Schleife αC/αD die Nukleobasen der kleinen Furche der DNA. R271 (Schleife β11/αI) und H394 (Schleife αN/αO) erkennen die DNA sequenzspezifisch in der großen Furche (Abbildung C2.16, Tabelle C2.6).

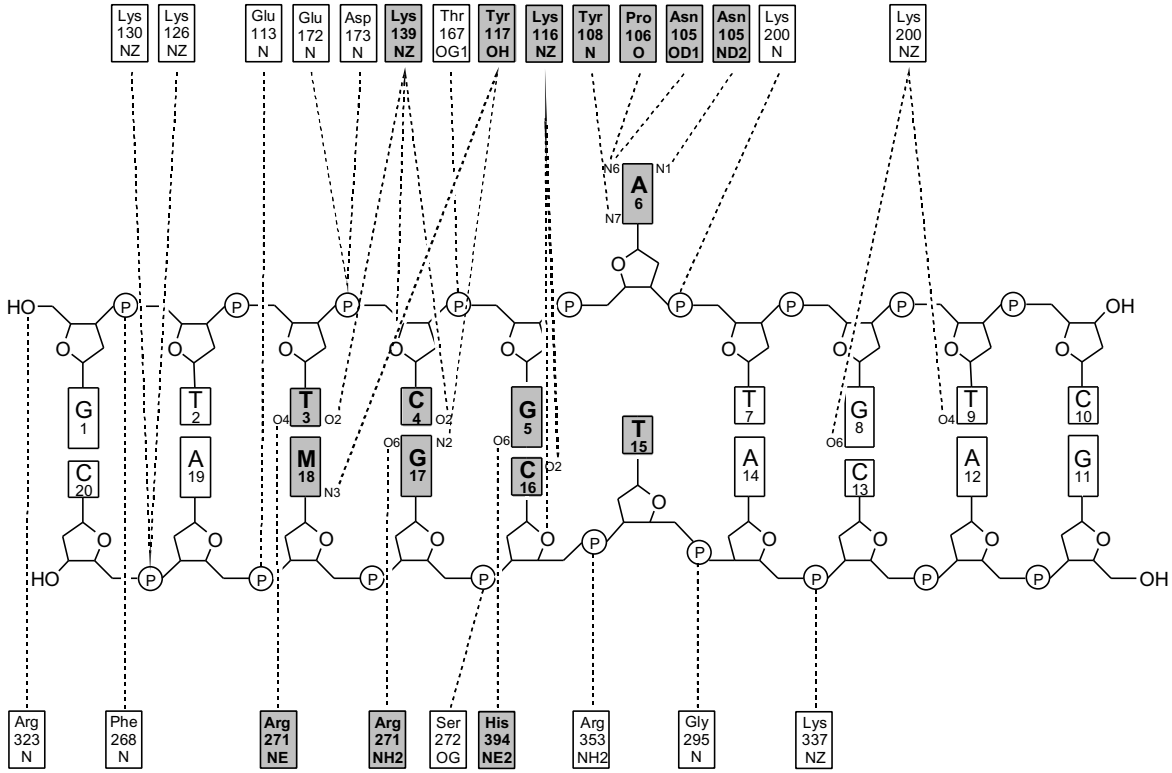


Abbildung C2.18

*Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen M·*Taq*I und DNA (Komplex A). Die grau unterlegten Boxen kennzeichnen Reste, die sequenzspezifische Wechselwirkungen eingehen.*

Die Position und Länge der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen M·*Taq*I und DNA aus Komplex A sind in Tabelle C2.6 erfasst.

Tabelle C2.6

*Position und Länge der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen M·*Taq*I und DNA (Komplex A)*

Aminosäurerest	Atom	Motiv[1]	Nukleotid	Atom	Länge [Å]
N105	OD1	IV	Ade6	N6	3,2
	ND2		Ade6	N1	3,0
P106	O	IV	Ade6	N6	2,9
Y108	N	IV	Ade6	N7	3,1
E113	N	IV	Ade19	O2P	3,0
K116	NZ	IV	Cyt16	O2	2,8
	NZ		Cyt16	O4‘	2,9
Y117	OH	-	Gua17	N2	3,1
	OH		Mea18	N3	2,8
K126	NZ	-	Cyt20	O2P	2,9
K130	NZ	-	Cyt20	O2P	2,7
K139	NZ	-	Thy3	O2	2,8
	NZ		Cyt4	O2	3,1
	NZ		Cyt4	O4‘	3,0
T167	OG1	VI	Gua5	O2P	2,8
E172	N	-	Cyt4	O2P	3,3
D173	N	-	Cyt4	O2P	2,8
K200	N	VIII	Thy7	O1P	2,9
	NZ		Gua8	O6	2,8
	NZ		Thy9	O4	3,1
F268	N	-	Thy2	O2P	3,0
R271	NE	-	Thy3	O4	2,9
	NH2		Gua17	O6	2,8
S272	OG	-	Gua17	O1P	2,6
G295	N	-	Thy15	O2P	2,8
R323	NE	-	Gua1	O5‘	3,1
K337	NZ	-	Ade14	O1P	2,8
R353	NH2	-	Cyt16	O1P	2,6
H394	NE2	-	Gua5	O6	2,9

[1]Die Zuordnung der individuellen Aminosäurereste zu Motiven erfolgt nach Malone *et al.*(1995).

Des weiteren finden sich noch eine Reihe von wasserverbrückten Protein-DNA-Wechselwirkungen. Diese sind in Tabelle C2.7 aufgeführt. Auffällig ist, dass von diesen 32 Wechselwirkungen nur 4 sequenzspezifisch sind.

Tabelle C2.7

Position der wasserverbrückten Wasserstoffbrückenbindungen

*zwischen M·*Taq*I und DNA (Monomer A)*

Aminosäurerest	Atom	Motiv[1]	Wasser	Nukleotid	Atom
I110	N	IV	64	Ade6	O1P
S115	OG	IV	193	Mea18	O2P
K116	O	IV	290	Gua8	O2P
	NZ		360	Thy15	O2
K126	NZ	-	30	Ade19	O2P
W136	NE1	-	53	Cyt20	O2P
G138	O	-	53	Cyt20	O2P
N141	ND1	V	29	Cyt4	O3‘
	ND1		29	Gua5	O2P
	ND2		51	Ade6	O1P
E172	N	-	24	Cyt4	O1P
K199	NZ	VIII	495	Thy7	O2P
K200	NZ	VIII	456	Gua11	O6
I266	O	-	120	Thy2	O1P
F268	O	-	69	Gua1	O5‘
	O		69	Thy2	O2P
	O		62	Thy2	O2P
A269	O	-	62	Thy2	O2P
R296	O	-	479	Ade14	O2P
	NH1		68	Thy15	O2P
	NH2		223	Cyt13	O2
K299	NZ	-	479	Ade14	O2P
H309	O	-	322	Cyt16	O1P
R323	NE	-	69	Gua1	O5‘
	NE		69	Thy2	O2P
	NH2		62	Thy2	O2P
T336	OG1	-	87	Thy15	O1P
E354	OE1	-	47	Cyt16	N4
E355	OE1	-	87	Thy15	O1P
	OE2		25	Thy15	O1P
H394	ND1	-	107	Gua5	O1P
L397	N	-	97	Thy3	O1P

[1]Die Zuordnung der individuellen Aminosäureresten zu Motiven erfolgt nach Malone *et al.* (1995).

Zu den bereits beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken kommen noch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und DNA. Diese sind in Tabelle C2.8 zusammengefasst.

Tabelle C2.8

*Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und DNA (Komplex A)*

Aminosäurerest	Atom	Motiv[1]	Nukleotid	Atom	Länge [Å]
V21	CG1	X	Ade6	C2	3,9
	CG1			C5	3,8
	CG1			C6	3,3
Y108	CB	IV		C8	3,6
	CG			C5	3,6
	CG			C8	3,7
	CE1			C6	3,9
	CD2			C4	3,3
	CD2			C6	3,8
	CD2			C5	3,3
	CD2			C8	3,6
	CE2			C4	3,5
	CE2			C2	3,5
	CE2			C6	3,5
	CE2			C5	3,5
	CZ			C6	3,5
E113	CD	IV	Mea18	C5‘	3,8
K116	CB	IV		C4‘	3,8
Y117	CE1	-		C1‘	3,9
	CE1		Ade19	C5‘	3,8
L171	CD1	-	Cyt4	C3‘	3,5
D173	CB	-		C5‘	3,9
	CG			C5‘	3,7
F196	CG	VIII	Ade6	C2	3,9
	CD1			C2	3,8
	CE1			C2	3,9
K199	CG	VIII		C1‘	3,7
K200	CG	VIII	Thy7	C6	3,8
	CG			C4	3,6
	CG			C5	3,4
	CG			C5M	3,7
	CD			C2	3,8
	CD			C4	3,4
	CD			C5	3,8
F268	CB	-	Thy2	C2‘	3,8
	CD1		Thy3	C5M	3,7
	CE1			C5M	3,8
R271	CG	-	Thy2	C4	3,6
	CG			C5	3,8
	CG			C5M	3,8
	CZ		Thy3	C5M	3,9
P273	CG	-	Gua17	C2‘	3,7
T336	CG2	-	Ade14	C2‘	3,7
	CG2		Thy15	C5M	3,8
E354	CD	-	Cyt16	C6	3,9
	CD			C5	3,5
P393	CB	-	Thy7	C4	3,9
	CG		Thy15	C5M	3,5
H394	CE1	-	Cyt4	C5	3,9
	CE1		Gua5	C6	3,9
	CE1			C5	3,6
	CE1			C8	3,8

[1]Die Zuordnung der individuellen Aminosäureresten zu Motiven erfolgt nach Malone *et al.* (1995).

Anhand der Daten für die Wechselwirkungen von M·*Taq*I und DNA kann man erklären, warum M·*Taq*I in der Lage ist, nicht nur spezifische, sondern auch unspezifische DNA mit K_D-Werten im nM Bereich zu binden. Die große Anzahl von sequenzunspezifischen Wechselwirkungen ist dafür verantwortlich, dass der K_D-Wert für unspezifische DNA bei 72,5 nM liegt. Für spezifische DNA beträgt der K_D-Wert 8,3 nM (Friederich, 2000).

2.8 Beschreibung der AETA-Bindung im ternären Komplex

Das Cofaktoranalogon AETA bindet innerhalb der Cofaktorbindungsstelle von M·*Taq*I, die sich in der katalytischen Domäne befindet. Der modifizierte Aminosäurerest von AETA bindet wie erwartet nicht in Richtung des NPPY-Motivs, sondern, wie in der binären Struktur ohne DNA, zum Inneren des Proteins. Damit ist die Position von AETA im ternären Komplex annähernd identisch zu der Lage im binären Komplex (vgl. Kapitel C2.10). Die einzelnen Wechselwirkungen von AETA zu M·*Taq*I sind in Tabelle C2.9 aufgeführt, eine Gesamtansicht der Cofaktorbindungstasche zeigt Abbildung C2.19. Da die AETA Moleküle in beiden Komplexen in der asymmetrischen Einheit durch ihre umhüllende Elektronendichte gut beschrieben sind und außerdem nahezu identische Konformationen und Wechselwirkungen aufweisen, wird im weiteren Verlauf nur Komplex A diskutiert. Falls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Komplexen auftreten, werden diese explizit erwähnt.

Tabelle C2.9

*Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und AETA (Komplex A)*

Amino-säurerest	Atom	Motiv	AETA Atom	Länge [Å]	Art der Wechselwirkung
V21	CG1	X	CG	3,8	Hydrophob
A47	O	I	N	2,7	H-Brücke
	CB		C1‘	3,8	Hydrophob
	CB		C4	3,8	Hydrophob
E71	OE1	II	O3‘	2,6	H-Brücke
	OE2		O2‘	2,5	H-Brücke
	OE2		O3‘	3,4	H-Brücke
	CD		C1‘	3,8	Hydrophob
I72	CB	II	C2	3,7	Hydrophob
	CG2		C5	3,6	Hydrophob
	CG2		C4	3,4	Hydrophob
D89	OD1	III	N6	3,0	H-Brücke
F90	NH	III	N1	3,0	H-Brücke
N105	O	IV	N	2,9	H-Brücke
P107	CG		C8	3,9	Hydrophob
	CB		SD	3,8	Hydrophob
	CA		SD	3,8	Hydrophob
	CD		SD	3,8	Hydrophob
F146	CZ	IV	C6	3,7	Hydrophob
	Phenyl-ring	V	Adenin	3,7	edge to face π-Stapelung

Man erkennt, dass AETA durch eine Reihe von Wechselwirkungen in der Cofaktorbindungstasche stabilisiert wird. Für einen Vergleich mit AdoMet oder anderen Cofaktoranaloga wird auf den nächsten Abschnitt hingewiesen.

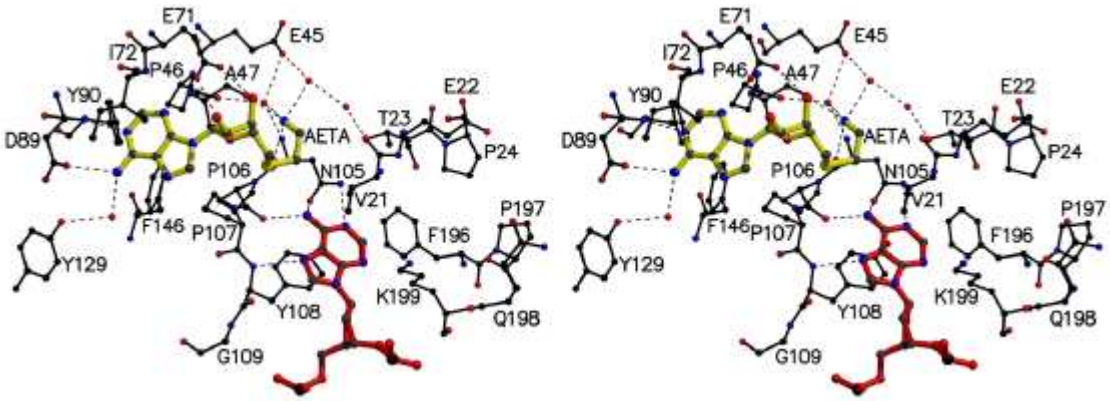


Abbildung C2.19

*Stereodarstellung der Cofaktorbindungstasche von M·*Taq*I (Komplex A). AETA ist in gelb und das extrahelikale Zieladenosin mit seinen benachbarten Phosphatresten in rot dargestellt.*

Die genaue Konformation von AETA kann durch die Angabe von Torsionswinkeln, entsprechend der Nukleotide in der DNA, beschrieben werden. So besitzt AETA den $C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo* Pseudorotationsmodus. Außerdem liegt AETA in der für Nukleotide bevorzugten *anti* Konformation vor. Betrachtet man den Winkel zwischen C4‘ und C5‘, erkennt man, dass AETA in der *trans* Konformation vorliegt. Die wichtigsten Torsionswinkel von AETA sind in Tabelle C2.10 aufgeführt.

Tabelle C2.10

Torsionswinkel von AETA im Komplex A und B

Beteiligte Atome	Torsionswinkel von AETA [°]	
	A	B
N-Cβ-Cγ-Sδ	-69	-59
Cβ-Cγ-Sδ-C5‘	-66	-71
Cγ-Sδ-C5‘-C4‘	112	114
Sδ-C5‘-C4‘-C3‘	174	177
C5‘-C4‘-C3‘-O3‘	138	143
C5‘-C4‘-C3‘-C2‘	-105	-100
C4‘-C3‘-C2‘-O2‘	-153	-157
C4‘-C3‘-C2‘-C1‘	-36	-40
C3‘-C2‘-C1‘-O4‘	47	48
C3‘-C2‘-C1‘-N9	156	157
O4‘-C1‘-N9-C4 (χ)	-113	-110
C2‘-C1‘-O4‘-C4‘	-40	-38
C1‘-O4‘-C4‘-C3‘	17	12
C2‘-C3‘-C4‘-O4‘	13	18
Phasenwinkel P der Pseudorotation	141	147
Maximaler Pseudorotationswinkel v_{max}	47	48
Pseudorotationsmodus	$C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo*	$C_{2'}$-*endo*-$C_{1'}$-*exo*

2.9 Vergleich der AETA-Bindung in der ternären Struktur mit der AETA-Bindung und der AdoMet-Bindung in den binären Strukturen

Die AETA Bindungen im ternären und binären Komplex unterscheiden sich kaum. Vergleicht man die Wechselwirkungen, die AETA in beiden Komplexen eingeht, erkennt man, dass diese nahezu identisch sind (Tabelle C2.11). Das Cofaktoranalogon wird über die selben Wechselwirkungen erkannt und stabilisiert, wobei sich einzig die

Länge der Wechselwirkungen leicht unterscheidet. Damit kann man sagen, dass AETA in beiden Komplexen in der selben Art und Weise an M·*Taq*I bindet.

Tabelle C2.11

*Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und AETA im ternären Komplex im Vergleich zu M·*Taq*I und AETA im binären Komplex (jeweils Komplex A).*

Amino-säurerest	Atom	Motiv	AETA Atom	Abstand [Å]		Art der Wechselwirkung
				AETA (ter.)	AETA (bin.)	
A47	O	I	N	2,7	2,9	H-Brücke
	CB		C1‘	3,8	3,8	Hydrophob
	CB		C4	3,8	3,7	Hydrophob
E71	OE1		O3‘	2,6	2,6	H-Brücke
	OE2		O2‘	2,5	2,5	H-Brücke
	OE2		O3‘	3,4	2,9	H-Brücke
	CD		C1‘	3,8	3,6	Hydrophob
I72	CB	II	C2	3,7	3,6	Hydrophob
	CG2		C5	3,6	3,7	Hydrophob
	CG2		C4	3,4	3,5	Hydrophob
D89	OD1	III	N6	3,0	2,9	H-Brücke
F90	NH	III	N1	3,0	3,0	H-Brücke
N105	O	IV	N	2,9	2,6	H-Brücke
P107	CG	IV	C8	3,9	3,3	Hydrophob
	CB		SD	3,8	4,2	Hydrophob
	CA		SD	3,8	3,9	Hydrophob
	CD		SD	3,8	4,0	Hydrophob
F146	CZ	V	C6	3,7	3,5	Hydrophob
	Phenyl-ring		Adenin	3,7	3,6	edge to face π-Stapelung

Auch der Vergleich der AETA-Bindung im ternären Komplex mit der AdoMet-Bindung im binären Komplex (Schluckebier *et al.*, 1997) zeigt nur geringe Unterschiede zwischen den Cofaktoren. Diese liegen in erster Linie darin begründet, dass AETA und AdoMet unterschiedliche Seitenketten haben. So fehlt AETA im Vergleich mit AdoMet neben der Carboxylgruppe und einer Methylengruppe innerhalb der Seitenkette auch die aktivierte Methylgruppe am Schwefelatom. Dies hat unmittelbar zur Folge, dass AETA einige bei AdoMet gefundenen Wechselwirkungen nicht eingehen kann. Trotz dieser Tatsache kommt es zu einer Vielzahl von identischen Wechselwirkungen, die dazu beitragen, dass AETA und AdoMet in ähnlicher Art und Weise an M·*Taq*I binden. Tabelle C2.12eigt einen Vergleich der Wechselwirkungen von AETA und AdoMet.

Tabelle C2.12

*Wechselwirkungen zwischen M·*Taq*I und AETA im ternären Komplex im Vergleich zu M·*Taq*I und AdoMet im binären Komplex (jeweils Komplex A). Werte in Klammern können nur noch als schwache Wechselwirkungen bezeichnet werden und sind nur zum Vergleich aufgeführt*

Amino-säurerest	Atom	Motiv	Ligand Atom	Abstand [Å]		Art der Wechselwirkung
				AETA	AdoMet	
V21	CG1	X	CG	3,8	(5,5)	Hydrophob
T23	OG1	X	O1	-	3,3	H-Brücke
E45	OE2	I	OE2	-	3,3	H-Brücke
A47	O	I	N	2,7	-	H-Brücke
	CB		C1‘	3,8	3,9	Hydrophob
	CB		C4	3,8	(4.1)	Hydrophob
	CB		C4‘	(4,1)	3,4	Hydrophob
	CA		C4‘	(4,6)	3,7	Hydrophob
	C		C4‘	(4,5)	3,6	Hydrophob
	CB		C5‘	(4,8)	3,2	Hydrophob
C48	O	I	N	-	3,0	H-Brücke
P52	CG	I	C	-	3,9	Hydrophob
E71	OE1	II	O2‘	3,6	3,2	H-Brücke
	OE1		O3‘	2,6	(3,9)	H-Brücke
	OE2		O2‘	2,5	2,6	H-Brücke
	OE2		O3‘	3,4	(4,6)	H-Brücke
	CD		C1‘	3,8	3,5	Hydrophob
I72	CB	II	C2	3,7	3,8	Hydrophob
	CG2		C5	3,6	(4,0)	Hydrophob
	CG2		C4	3,4	3,6	Hydrophob
D89	OD1	III	N6	3,0	3,2	H-Brücke
F90	NH	III	N1	3,0	3,3	H-Brücke
N105	O	IV	N	2,9	-	H-Brücke
P106	C	IV	CE	-	3,9	Hydrophob
P107	CG	IV	C8	3,9	3,8	Hydrophob
	CB		SD	3,8	(5,2)	Hydrophob
	CA		SD	3,8	(5,0)	Hydrophob
	CD		SD	3,8	(5,0)	Hydrophob
	CA		CE	-	3,8	Hydrophob
	CG		C5‘	(5,1)	3,4	Hydrophob
F146	CZ	V	C6	3,7	3,6	Hydrophob
	Phenyl-ring		Adenin	3,7	3,6	edge to face π-Stapelung

Die Tatsache, dass die Abstände äquivalenter Atompaare variieren, ist auf leichte Konformationsunterschiede im Protein und in den Cofaktoren zurückzuführen. So bewirken die verschiedenen Pseudorotationsmodi von AETA und AdoMet, dass die Entfernungen zu den Riboseatomen unterschiedlich sind. Auch die unterschiedliche Wellung von P107 in den beiden Komplexen macht sich in den atomaren Abständen bemerkbar. Damit ergibt sich, dass die Lage von AETA und AdoMet vergleichbar ist und dass man AETA als ein nichtreaktives AdoMet-Analogon ansehen kann. Dies ist

für die Interpretation der ternären Struktur im Hinblick auf den katalytischen Mechanismus von entscheidender Bedeutung (vgl. Kapitel C2.12).

2.10 Der Nukleotidausklappmechanismus

In der Kristallstruktur des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA ist die extrahelikale Position des Zieladenins (Ade6) eindeutig bestimmt. Da es sich bei der Kristallstruktur des ternären Komplexes nur um eine einzige Konformation der beteiligten Moleküle handelt und man sie somit mit einer Momentaufnahme auf der Reaktionskoordinate der DNA-Methylierung vergleichen kann, können nur wenig Aussagen über die dynamischen Prozesse, die zu dieser Konformation führen, getroffen werden. So ist zwar die extrahelikale Lage der Zielbase bewiesen, einen Mechanismus, der zu dieser Konformation führt, liefert die Struktur alleine jedoch nicht. Dazu muss man die Struktur interpretieren und wenn möglich, andere Strukturen zum Vergleich heranziehen. Vergleicht man die Struktur des ternären Komplexes mit der Struktur des binären Komplexes mit AdoMet, erkennt man drei wesentliche Unterschiede (vgl. Kapitel C2.7): Das Protein vollzieht während der DNA Bindung eine Scharnierbewegung, so dass sich beide Domänen zueinander bewegen. Außerdem gibt es noch zwei Schleifenbewegungen bei der DNA Bindung. Eine Interpretation dieser Unterschiede in der Konformation von M·*Taq*I führt zu einem Nukleotidausklapp-mechanismus.

Die Scharnierbewegung ist dabei der entscheidende Schritt zum Ausklappen der Zielbase. Durch die Bewegung der beiden Domänen in Richtung der DNA Bindungstasche kommen die 5‘- und 3‘-Phosphodiestergruppen der Partnerbase Thymin (Thy15) in direkten Kontakt mit G295 NH und R353 NH2 (Abbildung C2.16A). Dadurch kommt es zu einer Kompression an dieser Position der DNA wodurch die Partnerbase Thymin (Thy15) zur DNA Helixachse und damit in Richtung des komplementären Stranges verschoben wird. In dieser Position würde sie allerdings mit der Zielbase Adenin (Ade6) sterisch überlappen, wenn diese eine innerhelikale Position besetzten würde. Dadurch ist die Partnerbase Thymin (Thy15) direkt am Herausdrängen der Zielbase Adenin (Ade6) aus der DNA-Helix und in das aktive Zentrum, wo die

Katalyse stattfindet, beteiligt. Diese Art eines Nukleotidausklappmechanismus wurde bisher noch nicht beobachtet. In allen bisher bekannten Protein-DNA-Komplexstrukturen, in denen extrahelikale Nukleotide gefunden wurden, findet man Aminosäurereste, die in die DNA Helix eindringen, um das Basenausklappen zu unterstützen oder zu initiieren (Klimasauskas *et al.*, 1994; Reinisch *et al.*, 1995; Vassylyev *et al.*, 1995; Slupphaug *et al.*, 1996; Barret *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 1998; Hosfield *et al.*, 1999). Dies ist bei M·*Taq*I nicht der Fall, da das Ausklappen des Nukleotids nicht durch einen in die DNA-Helix eindringenden Aminosäurerest, sondern durch Kompression der DNA erreicht wird (Abbildung C2.20). Diese Art der DNA-Kompression repräsentiert einen neuen Mechanismus, um Nukleotide aus der DNA-Doppelhelix herauszuklappen.

Die beiden Schleifen, die ihre Konformation während der DNA-Bindung ändern, beinhalten die Aminosäurereste 110-121 (Schleife I) und 197-201 (Schleife II). Schleife I ist im binären Komplex von M·*Taq*I flexibel und damit nicht sichtbar. In der ternären Struktur nimmt Schleife I eine geordnete Konformation ein und die Aminosäurereste K116 und Y117 wechselwirken über die kleine Furche sequenzspezifisch mit der DNA. Während dieser Konformation von Schleife I ist es dem extrahelikalem Zieladenin nicht möglich, in die innerhelikale Position zurückzurotieren. Dies bedeutet für den Nukleotidausklappmechanismus, dass das Zieladenin nur ausklappen kann, wenn Schleife I noch nicht in der geordneten, mit der DNA-wechselwirkenden Konformation vorliegt. Somit reduzieren sich die sequenzspezifischen Wechselwirkungen vor dem Ausklappen des Zieladenins auf drei Aminosäurereste, die insgesamt sechs sequenzspezifische H-Brücken ausbilden. Diese sind K139, R271 und H394. Diese Annahme gilt natürlich nur unter der Voraussetzung, dass sich die Konformationen sowohl von M·*Taq*I (Schleife I ausgenommen), als auch der DNA im Bereich der Erkennungssequenz nicht drastisch ändern.

Die Bewegung von Schleife II führt dazu, dass der Aminosäurerest K199 seine Orientierung ändert und zur Formierung der Tasche für das Zieladenin beiträgt. Ob diese Änderung vor, während oder nach dem Ausklappen des Zieladenins stattfindet, kann man an Hand der ternären Struktur jedoch nicht ableiten. Fest steht jedoch, dass das Zieladenin sowohl in der Orientierung von K199 in der binären und der ternären Struktur ohne sterische Hinderungen aus der DNA-Doppelhelix ausklappen könnte.

Somit kann man die Bewegung von Schleife II nicht in den Nukleotidausklappmechanismus einbeziehen.

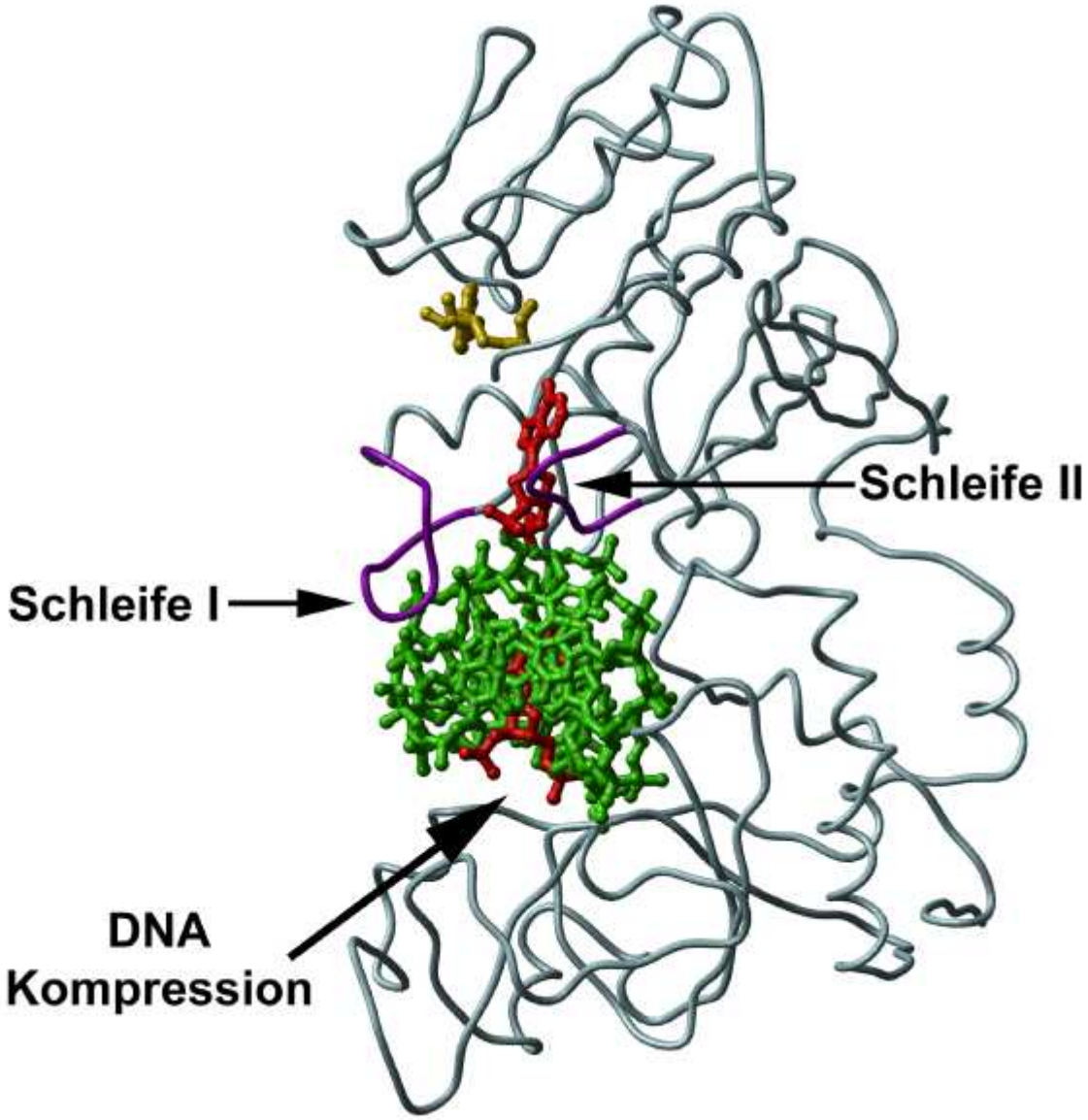


Abbildung C2.20

*Die dreidimensionale Struktur von M·*Taq*I im Komplex mit DNA und AETA. Der Verlauf der Hauptkettenatome von M·*Taq*I ist in hellblau und die beiden Schleifen, die ihre Konformation während der DNA-Bindung ändern, sind in magenta dargestellt. Das Cofaktoranalogon AETA ist gelb, die DNA grün und die extrahelikale Zielbase Adenin mit ihrer Partnerbase Thymin und den jeweils benachbarten Phosphatresten ist rot koloriert. Der Blick entlang der DNA Achse zeigt die Kompression durch M·*Taq*I*

2.11 Der katalytische Mechanismus der Methylierung

Die bereits erwähnte große strukturelle Ähnlichkeit des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA mit dem binären Komplex aus M·*Taq*I und AdoMet erlaubt Rückschlüsse über den katalytischen Mechanismus der Methylierung. In Abbildung C2.21 ist die Überlagerung des katalytischen Zentrums der beiden Komplexe dargestellt. Man erkennt, dass die katalytische NPPY-Sequenz (Motiv IV) in beiden Strukturen nahezu identische Konformationen besitzen. Dies bedeutet, dass Motiv IV bei der DNA-Bindung keine Konformationsänderung eingeht. Die Lage von AdoMet und AETA ist ebenfalls sehr gut vergleichbar (vgl. Kapitel C2.7).

Durch die Überlagerung erkennt man, dass die Methylgruppe von AdoMet fast genau auf die exocyklische Aminogruppe der Zielbase Adenin gerichtet ist. Der Abstand zwischen dem Schwefelatom in AdoMet und der 6-Aminogruppe von Adenin beträgt 4,7 Å, was annähernd dem entsprechenden Abstand in der ternären Struktur der C5-Cytosin-DNA-Methyltransferase M·*Hha*I entspricht (Klimasauskas *et al.*, 1994). Dort beträgt der Abstand zwischen dem Schwefelatom und dem 5-Kohlenstoffatom von Cytosin 5 Å. Diese stukturelle Anordnung in M·*Taq*I zeigt, dass die Methylgruppe direkt auf die 6-Aminogruppe von Adenin übertragen wird. Es stellt sich allerdings die Frage, wie die relative schwach nukleophile exocyklische Aminogruppe für einen direkten nukleophilen Angriff aktiviert wird.

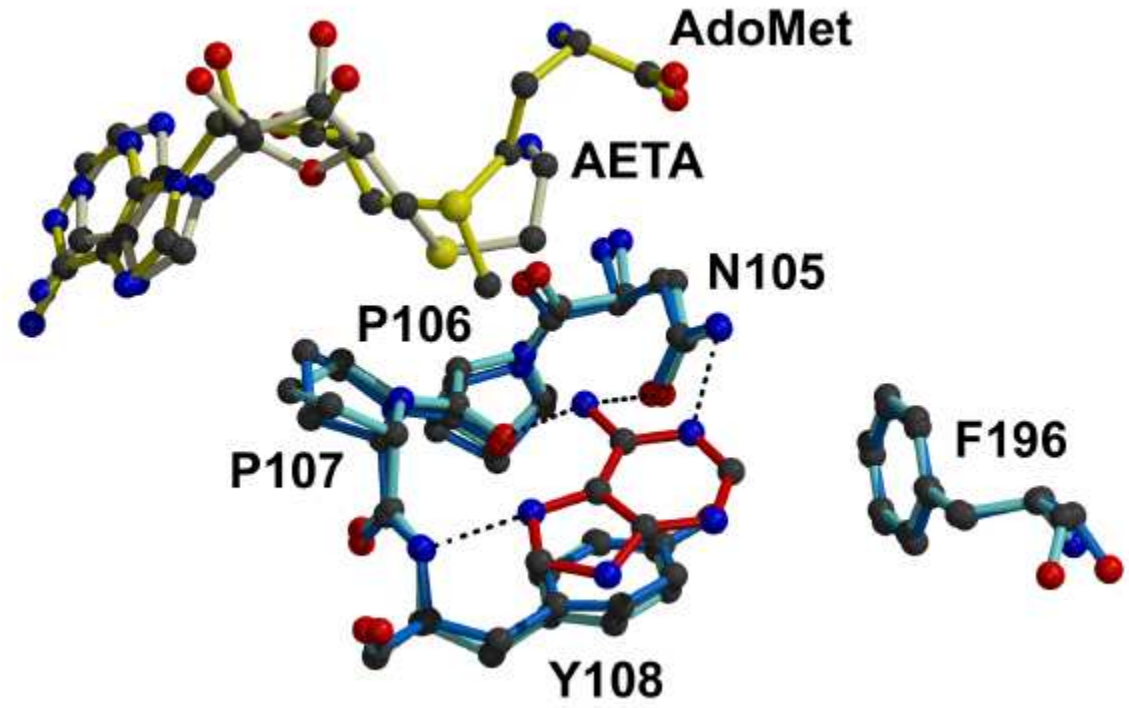


Abbildung C2.21

Überlagerung des NPPY-Motivs des ternären Komplexes mit DNA und AETA und des binären Komplexes mit AdoMet im Bereich des aktiven Zentrums. Das Cofaktoranalogon AETA, die Proteinreste 105-108 und 195 und die extrahelikale Zielbase des ternären Komplexes sind in hellgelb, hellblau und rot gefärbt. Der natürliche Cofaktor AdoMet und die Proteinreste 105-108 und 195 aus dem binären Komplex sind gelb bzw. blau gefärbt.

Formal katalysiert M·*Taq*I den Austausch eines Protons an der 6-Aminogruppe von Adenin gegen eine Methylgruppe. Dabei könnte die Deprotonierung vor, während oder nach der Methylgruppenübertragung erfolgen. Der pK_a-Wert der 6-Aminogruppe in Adenosinderivaten liegt bei ungefähr 20 (Kettani *et al.*, 1997), weshalb für eine Deprotonierung vor der Methylgruppenübertragung eine sehr starke Base nötig wäre. Da aber im ternären Komplex von M·*Taq*I in der Nähe der 6-Aminogruppe von Adenin kein basischer Rest vorliegt, scheidet diese Art der Aktivierung der 6-Aminogruppe aus. Die Aktivierung der 6-Aminogruppe erfolgt durch die bereits beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen von N6 zu OD1 von N105 und O von P106. Durch diese Interaktionen wird die Elektronendichte und damit die Nukleophilie von N6 erhöht und ein nukleophiler Angriff auf die aktivierte Methylgruppe von AdoMet möglich. Betrachtet man die Stereochemie dieses nukleophilen Angriffs, erkennt man, dass die beiden Akzeptorsauerstoffatome OD1 von N105 und O von P106 unterhalb der Ebene

des Adeninrings liegen. Die aktivierte Methylgruppe von AdoMet liegt dagegen über der Ringebene. Diese Anordnung liefert die Erklärung dafür, dass M·*Taq*I die Zielbase Adenin nur einfach methylieren kann. Nach der Übertragung einer Methylgruppe kann die extrahelikale Zielbase nicht mehr in der vorliegenden Konformation binden, da es zu sterischen Überlappungen der Methylgruppe mit OD1 von N105 oder mit O von P106 kommen würde. Eine senkrechte Anordnung der gebildeten 6-Aminomethylgruppe zum Adeninring wäre zwar denkbar, ist aber energetisch ungünstig, da die Konjugation des freien p-Orbitals von N6 mit dem π-Orbital des aromatischen Ringes aufgehoben wäre. Außerdem wäre eine Aktivierung von N6 durch Wasserstoffbrückenbindungen dann nicht mehr möglich.

Die Stereochemie liefert außerdem plausible Hinweise auf den detaillierten Mechanismus der Methylgruppenübertragung. Die beiden Wasserstoffatome an N6 liegen aufgrund der Konjugation des freien p-Orbitals von N6 mit dem π-Orbital des aromatischen Ringes in der Ringebene. Durch die Lage der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren unterhalb der Ringebene des Adenins, erfahren die Wasserstoffatome eine Kraft, die sie unterhalb der Ringebene zieht. Dies liegt daran, dass in dieser Position die Wasserstoffe mit den freien Sauerstoffatomorbitalen besser überlappen können. Dies könnte eine Änderung der Hybridisierung an N6 von sp^2 zu sp^3 unterstützen, so dass das freie p-Orbital von N6 nicht mehr mit dem aromatischen Adeninring konjugiert ist, sondern entspechend der Tetraedergeometrie der sp^3 Hybridisierung in Richtung der aktivierten Methylgruppe von AdoMet zeigt. Damit wäre eine Geometrie geschaffen, die eine Orbitalüberlappung und damit die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen N6 und aktivierter Methylgruppe zuläßt (Abbildung C2.22).

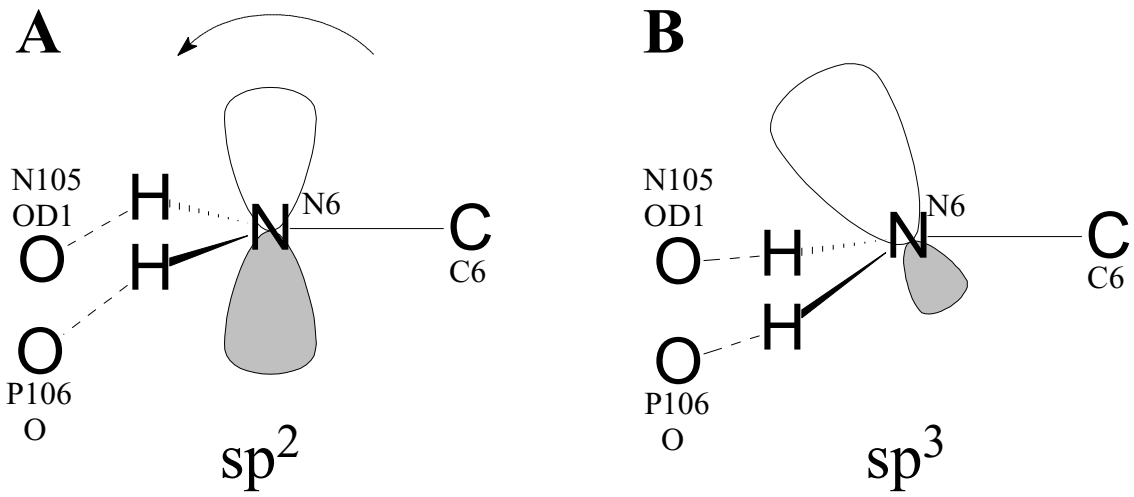


Abbildung C2.22

Hypothetische Änderung der Hybridisierung an N6 der Zielbase Adenin in der extrahelikalen Position. (A): Das freie Elektronenpaar ist mit den π-Elektronen der Base konjugiert und steht senkrecht zur Ringebene. N6 ist sp^2 hybridisiert. (B): Die Wasserstoffatome an N6 werden zu ihren Akzeptor Sauerstoffatomen gezogen. Die Hybridisierung an N6 ändert sich zu sp^3.

Dieser Mechanismus würde bedeuten, dass die 6-Aminogruppe erst nach der Methylgruppenübertragung deprotoniert würde. Ein weiteres Indiz für diese Tatsache ist die Position des aromatischen Restes von Y108, der sich 3,7 Å unter dem Mittelpunkt der N6-C6 Bindung der extrahelikalen Zielbase Adenin befindet. Dieser elektronenreiche Phenolring sollte in der Lage sein, das nach der Methylgruppenübertragung entstandene positiv geladene 6-Methylammonium-Ion durch Kation-π-Wechselwirkungen zu stabilisieren (McCurdy *et al.*, 1992; Dougherty, 1996). Solche Kation-π-Wechselwirkungen wurden bereits in anderen Protein und Protein-Ligand-Strukturen gefunden (Burley & Petsko, 1988). Die Bedeutung des aromatischen Aminosäurerestes Y108 für die Katalyse wird durch Mutationsexperimente unterstützt (Pues *et al.*, 1998). Eine M·*Taq*I Mutante, in der dieser Tyrosinrest gegen einen Alaninrest ausgetauscht ist, kann die Zielbase zwar noch aus der DNA Helix herausklappen, die katalytische Aktivität ist aber um den Faktor 55 reduziert.

Während der Methylgruppenübertragung fällt der pK_a-Wert der gebildeten 6-Methyl-ammonium-Gruppe drastisch ab. Schätzungen für pK_a-Werte von N6-protonierten Adenosinderivaten liegen bei Werten zwischen -3 und -10 (Kettani *et al.*, 1997). Somit kann man erwarten, dass die Sauerstoffatome OD1 von N105 und O von P106 mit pK_a-Werten von 0-1 (Arnett, 1963) basisch genug sind, um das 6-Methylammoniumadenin-Intermediat zu deprotonieren. Die Folge dieser Deprotonierung wäre die Wiederherstellung der sp^2-Hybridisierung an N6. Anschließend sollte zur Wiederherstellung der Konjugation des freien p-Orbitals mit dem π-Orbital des Adeninringes eine Rotation der exocyklischen Aminomethylgruppe um die N6-C6-Bindung erfolgen. Da in dieser Konformation die Methylgruppe an N6 mit den Sauerstoffatomen OD1 von N105 oder O von P106 sterisch überlappen würde, sollte dies das Zurückklappen des methylierten Adenins in die DNA-Doppelhelix unterstützen.

2.12 Vergleich mit anderen Methyltransferasen und pharmakologische Relevanz

Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz lassen sich DNA Methyltransferasen in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe katalysiert die Methylierung der endozyklischen C5 Position von Cytosin und die zweite die der exozyklischen Stickstoffatome von Adenin und Cytosin. Im Gegensatz zur ersten Gruppe, die eine einfache, homologe Klasse darstellt, ist die zweite Gruppe heterogener und beinhaltet drei generelle Aminosäuresequenz-Architekturen, die als α, β und γ bezeichnet werden. Diese N-DNA-Methyltransferasen teilen zwar gemeinsame Motive, die Position, Anordnung und Charakteristika dieser Motive sind jedoch unterschiedlich. M·*Taq*I gehört zur γ-Klasse der N-DNA-Methyltransferasen (Wilson, 1992). Aus der Klasse der N-DNA-Methyltransferasen ist M·*Taq*I das einzige Enzym, welches strukturell im Komplex mit DNA bekannt ist. Die einzigen N-DNA-Methyltransferasen, deren Struktur ohne DNA bekannt ist, sind die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase DpnM (Tran *et al.*, 1998) und die N4-Cytosin-DNA-Methyltransferase M·*Pvu*II (Gong *et al.*, 1997). Eine Überlagerung der katalytischen Domäne von M·*Taq*I mit DpnM zeigt die Ähnlichkeit

beider Enzyme (Abbildung C2.23). Insbesondere die zentralen β-Faltblätter überlagern sehr gut.

A **B**

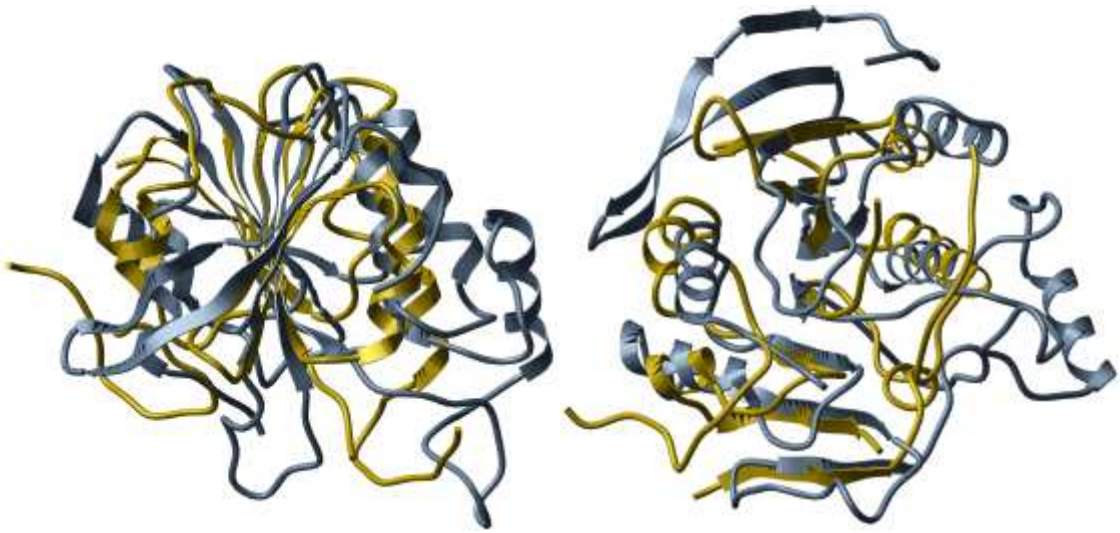


Abbildung C2.23

*Überlagerung der katalytischen Domänen von M·*Taq*I (hellblau) mit DpnM (gelb). Ansicht (A) ist im Vergleich zu (B) um 90° gedreht. Man erkennt deutlich die Ähnlichkeit der Tertiärstruktur der katalytischen Domänen beider Enzyme.*

Die Überlagerung des für N-Methyltransferasen konservierten Motivs IV (N/D/S P P Y/F) zeigt die strukturelle Ähnlichkeit von M·*Taq*I und DpnM im aktiven Zentrum der beiden Enzyme. In Abbildung C2.24 ist das NPPY-Motiv von M·*Taq*I (Aminosäurereste 105-108) mit dem überlagerten DPPY-Motiv von DpnM (Aminosäurereste 194-197) dargestellt.

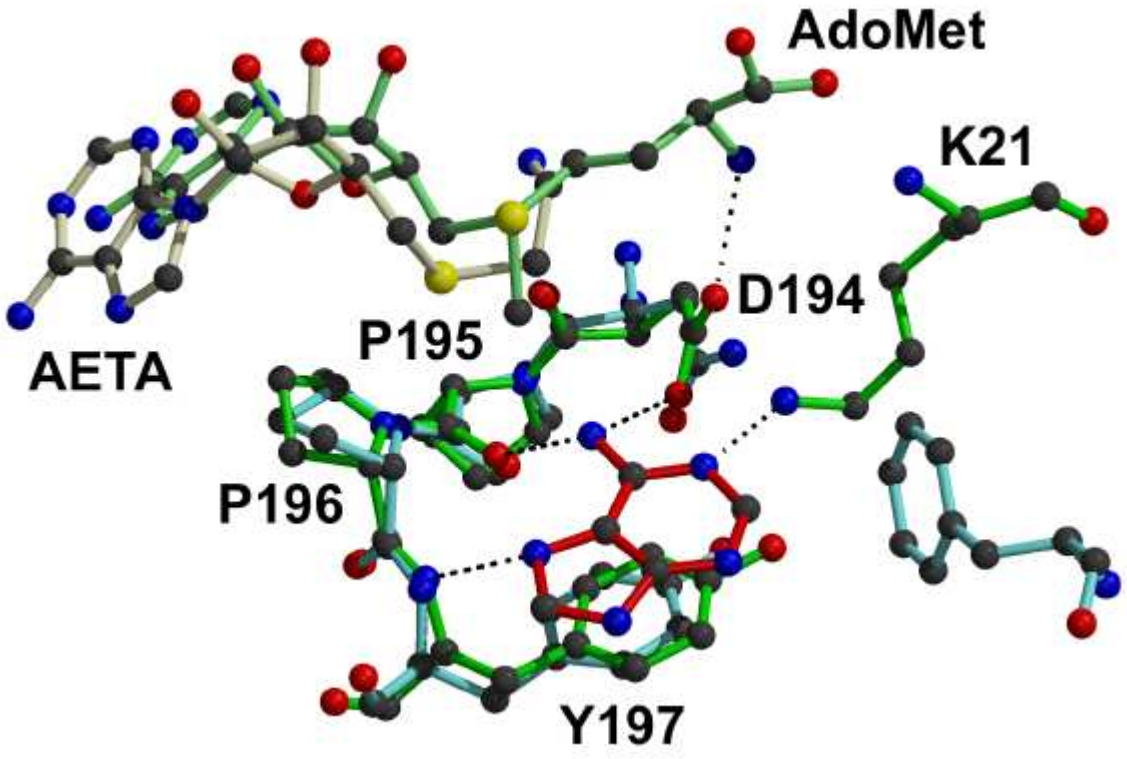


Abbildung C2.24

*Überlagerung des NPPY-Motivs von M·*Taq*I (hellblau) aus der ternären Struktur mit AETA (beige) mit dem DPPY-Motiv von DpnM (grün) mit AdoMet (hellgrün). Die Bezeichnungen der Aminosäurereste bezieht sich auf die DpnM-Struktur. Das extrahelikale Zieladenin aus dem Komplex mit M·*Taq*I ist in rot dargestellt. Die eingezeichneten Wasserstoffbrückenbindungen sind mögliche Wechselwirkungen zwischen DpnM und dem extrahelikalem Zieladenin.*

Die NPPY-Sequenz in M·*Taq*I st sehr rigide und wird durch H-Brücken zwischen der Hydroxylgruppe von Y108 zu ND2 von N105 und andererseits dem Hauptkettencarbonylsauerstoffatom von V163 stabilisiert. Außerdem ändert sich die Konformation des NPPY-Motivs während der Bindung des extrahelikalen Zieladenins nicht. In der DPPY-Sequenz von DpnM tritt diese interne Stabilisierung nicht auf, weil eine H-Brücke zwischen OD2 von D194 und der Seitenkettenaminogruppe des Cofaktors AdoMet die Seitenkette von D194 stabilisiert. Somit ist diese Seitenkette in einer Position, in der sie nicht mehr mit Y197 wechselwirken kann. Allerdings ist die Seitenkette von Y197 durch eine H-Brücke zwischen der Hydroxylgruppe und der Seitenkette von E276 stabilisiert. Dieser Glutamatrest ist unter den Mitgliedern der DpnM-Familie hoch konserviert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass auch das DPPY-

Motiv in DpnM rigide ist und sich seine Konformation während der Bindung des extrahelikalen Zieladenins nicht ändert.

Zusätzlich zu der großen strukturellen Ähnlichkeit des katalytischen Motives IV von M·*Taq*I und DpnM passt auch das extrahelikale Zieladenin hervorragend in das aktive Zentrum von DpnM. Individuelle Aminosäurereste könnten ähnliche Wechselwirkungen mit dem Zieladenin machen, wie sie für M·*Taq*I beobachtet werden. Das Carbonylsauerstoffatom von P195 könnte eine H-Brücke mit der 6-Aminogruppe von Adenin und das Amidstickstoffatom von Y197 könnte eine H-Brücke mit N7 von Adenin bilden. Außerdem könnte die aromatische Seitenkette von Y197 eine *face-to-face* π-Stapelungswechselwirkung mit der unteren Seite des Zieladenins eingehen. Zusätzlich könnte ein Seitenkettensauerstoffatom von D194 eine H-Brücke zum zweiten Wasserstoffatom der 6-Aminogruppe des Zieladenins bilden. Da das zweite Sauerstoffatom der Seitenkette von D194 mit der Aminogruppe der Seitenkette von AdoMet wechselwirkt, könnte die für M·*Taq*I beobachtete H-Brücke zwischen ND2 von N105 und N1 von Adenin durch die Seitenkette von K21 in DpnM übernommen werden. Der Aminosäurerest K21 (Motiv X) in DpnM ist in allen N6-DNA-Methyltransferasen, die das DPPY-Motiv besitzen, konserviert. Zusätzlich zu diesen Kontakten, die auch von Tran *et al.* vorgeschlagen wurden, könnten die Aminosäurereste 260-271, die β6 und β7 verbinden, eine wichtige Rolle spielen. Diese Aminosäurereste sind in der Elektronendichte von DpnM nicht sichtbar und somit flexibel. Sie könnten, ähnlich wie die Schleife II i M·*Taq*I, in der DNA-Bindung und dem Schließen der Adenin-Bindungstasche involviert sein.

Aufgrund der Tatsache, dass das Zieladenin aus der ternären Struktur mit M·*Taq*I exzellent in das aktive Zentrum von DpnM passt, können Schlüsse auf den katalytischen Mechanismus von DpnM gezogen werden. Wie für M·*Taq*I diskutiert, könnten die H-Brücken der 6-Aminogruppe zum Hauptkettensauerstoffatom von P195 und zur Carboxylatgruppe von D194 die partielle negative Ladung an N6 vergrößern und so seine Nukleophilie erhöhen. Eine Deprotonierung vor der Methylgruppenübertragung ist auch hier sehr unwahrscheinlich, da die Carboxylatgruppe nicht basisch genug ist. Die pK_a-Werte für Asparaginsäurereste in Proteinen liegen zwischen 2,0 und 5,5 (Fersht, 1985). Deshalb sollte der nach der Methylgruppenübertragung erhaltene positiv

geladene Übergangszustand oder das positiv geladene Intermediat an N6, wie bei M·*Taq*I, durch Kation-π-Wechselwirkungen mit der aromatischen Seitenkette von Y197 stabilisiert werden. Die positive Ladung an N6 würde dann den pK_a-Wert der 6-Methylammonium-Gruppe drastisch senken und die Deprotonierung könnte während oder direkt nach der Methylgruppenübertragung durch die Carboxylatgruppe von D194 stattfinden. Deshalb sollte der katalytische Mechanismus für M·*Taq*I und DpnM sehr ähnlich sein. Da alle N6-Adenin-DNA-Methyltransferasen der γ-Gruppe die katalytische NPPY/F-Sequenz (Motiv IV) besitzen und fast alle der α- oder β-Gruppe die DPPY-Sequenz (Motiv IV) und einen konservierten Lysinrest (Motiv X), dienen M·*Taq*I und DpnM als Musterbeispiele für alle N6-Adenin-DNA-Methyltransferasen und ein gemeinsamer katalytischer Mechanismus für alle N6-Adenin-DNA-Methyltransferasen ist sehr wahrscheinlich.

Diese Tatsache ist im Hinblick auf die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam von besonderem Interesse, da sie eine große Homologie zu DpnM aufweist. Vor kurzem wurde beobachtet, dass *Salmonella typhimurium* Bakterienstämme, denen die Dam-Methyltransferase fehlt, nicht mehr pathogen sind (Heithoff *et al.*, 1999; García-del Portillo *et al.*, 1999). Unter der Annahme, dass die Dam-Methyltransferasen einen ähnlichen katalytischen Mechanismus wie M·*Taq*I und die verwandte DpnM besitzt, sollte die präsentierte Struktur von M·*Taq*I im Komplex mit DNA den rationalen Entwurf von Inhibitoren der Dam-Methyltransferase unterstützen. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Dam Methyltransferase in vielen pathogenen Bakterien hoch konserviert ist. Zu diesen Bakterien gehören *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Haemophilus influenzae*, and *Treponema pallidum*. Somit könnten spezifische Inhibitoren in Zukunft von großem pharmazeutischen Interesse sein und ein breites antibiotisches Spektrum besitzten.

D Zusammenfassung und Ausblick

Im Gegensatz zu den C-DNA-Methyltransferasen ist der katalytische Mechanismus der N-DNA-Methyltransferasen noch weitestgehend unbekannt. Als ein Vertreter dieser Enzymklasse sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der katalytische Mechanismus der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* (M·*Taq*I) aufgeklärt werden. Diese katalysiert die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors *S*-Adenoslyl-L-methionin (AdoMet) auf die N6-Position des Adenins innerhalb der palindromischen Sequenz 5‘-TCG**A**-3‘ doppelsträngiger DNA. Die Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Methylgruppenübertragung wurde mit röntgenkristallographischen Methoden erreicht. Zu diesem Zweck wurden zuerst Kristalle eines ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und des nichtreaktiven Cofaktoranalogons 5‘-[2-(Amino)ethylthio]-5‘-desoxyadenosin (AETA) hergestellt. Die Kristallstruktur dieses ternären Komplexes wurde dann mittels Röntgenbeugung ermittelt. Es zeigte sich, dass das Zieladenin mit dem Riboserest und den benachbarten Phosphatresten um ca. 180° aus der DNA-Doppelhelix herausrotiert ist. Das Zieladenin bindet so im aktiven Zentrum des Enzyms und kommt mit der 6-Aminogruppe in räumliche Nähe zum Cofaktor. In dieser Position wird die 6-Aminogruppe durch zwei Wasserstoffbrücken von N105 OD1 und P106 O aktiviert und kann so die aktivierte Methylgruppe des Cofaktors direkt nukleophil angreifen.

Außerdem konnte durch die Bestimmung der Kristallstruktur des ternären Komplexes auch der Ablauf des Nukleotidausklappmechanismus hergeleitet werden. Vergleicht man die Strukturen von M·*Taq*I im Komplex mit und ohne DNA, dann erkennt man, dass M·*Taq*I bei der DNA-Bindung eine Scharnierbewegung eingeht. Bei dieser Konformationsänderung bewegen sich die beiden Domänen von M·*Taq*I zueinander, ohne dass sich die Tertiärstrukturen der beiden Domänen grundlegend ändern. Dies führt zu einer Komprimierung der DNA, die zwischen den beiden Domänen gebunden ist. Dabei erfolgt die Komprimierung an den beiden benachbarten Phosphatresten der zum Zieladenin komplementären Partnerbase Thymin. Dadurch wird dieses Thymin zur Helixachse der DNA gedrückt und das Zieladenosin zusammmen mit seinen benachbarten Phosphatresten aus der DNA-Doppelhelix herausgedrückt.

Die Kristallstruktur zeigt weiterhin, dass bis auf die Komprimierung und die extrahelikale Position der Zielbase die DNA im wesentlichen in der B-Form vorliegt. Des weiteren erkennt man bei der DNA-Bindung zwei Änderungen in Schleifenregionen von M·*Taq*I. Die

Änderung der einen Schleife führt dazu, dass sich die Position der Seitenkette von K199 ändert und so zur Bildung der katalytischen Tasche für das extrahelikale Zieladenin beiträgt. Die andere Schleife ist in den Kristallstrukturen von M·*Taq*I ohne DNA aufgrund ihrer Flexibilität nicht sichtbar und nimmt in der Kristallstruktur mit DNA eine definierte Konformation ein. Dort wechselwirkt sie mit der DNA sequenzspezifisch und verhindert zusätzlich das Zurückklappen der extrahelikalen Zielbase.

Die Bedeutung der innerhalb dieser Arbeit erstmalig bestimmten Kristallstruktur einer N6-Adenin-DNA-Methyltransferase im Komplex mit DNA wurde kürzlich durch Experimente mit einem pathogenen Bakterium hervorgehoben. Die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam aus *Salmonella typhimurium* katalysiert ebenfalls die Methylierung der exocyklischen Aminogruppe eines Adeninrests in DNA und als Ergebnis dieser Arbeit kann man davon ausgehen, dass M·*Taq*I und Dam einen ähnlichen katalytischen Mechanismus besitzen. Es wurde gezeigt, dass ein *Salmonella typhimurium* Bakterienstamm, der die N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam nicht besitzt, seine Virulenz verliert. Auf der Basis der ternären Struktur aus M·*Taq*I, DNA und AETA sollte es nun möglich sein, Inhibitoren für N6-Adenin-DNA-Methyltransferasen im allgemeinen oder für die DNA-Methyltransferase Dam im besonderen zu entwerfen und derartige Inhibitoren könnten als Wirkstoffe zur Abwehr von Bakterienerkrankungen fungieren. Da die Dam DNA-Methyltransferase in vielen pathogenen Bakterienstämmen wie *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Haemophilus influenzae* und *Treponema pallidum* hoch konserviert ist, könnten spezifische Inhibitoren der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase Dam ein breites Anwendungsspektrum als Antibiotika finden.

E Experimenteller Teil

1 Materialien

1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
Cryostream Cooler	Oxford Cryosystems (Oxford, U.K.)
Deionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Goniometerkopf	Huber (Rimsting)
Grafik Workstation	Silicon Graphics (Mountain View, U.S.A.)
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne (Cambridge, England)
Image-Plate-Detektor Mar345	Mar Research (Hamburg)
Linbro-Zellkulturschalen	ICN (Meckenheim)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Röntgengenerator	Siemens (Karlsruhe)
Synchrotronbeamline BW6	DESY (Hamburg)
Tischzentrifuge: *Centrifuge* 5415 C	Eppendorf (Köln)
Ultraschallbad: Sonorex Super RK 103 H	Bandelin (Berlin)
UV-Vis Spektrophotometer Cary 3E	Varian (Darmstadt)
Vakuumdialyseapparatur	Schleicher & Schuell (Dassel)

1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden im Reinheitsgrad p.a. verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt. Stammlösungen wurden steril filtriert (0,2 µm Filter) und bei 4°C gelagert.

1.3 Protein

Die Expression und Präparation von M·*Taq*I wurde von N. Bleimling durchgefürt (Holz *et al.*, 1998). Die Lagerung von M·*Taq*I erfolgte in einem Puffer aus 20 mM Tris/Acetat pH 7.9, 300 mM Kaliumchlorid, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM 1,4-Dithio-D,L-threit (DTT) und 50 % Glycerin bei -20°C.

1.4 Cofaktoranalogon

Das Cofaktoranalogon AETA wurde von Dr. M. Pignot zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte in wässriger Lösung bei -20 °C.

1.5 Oligodesoxyribonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen und sind in ihrer Sequenz vom 5'- zum 3'-Ende aufgeführt. Die Erkennungssequenz von M·*Taq*I ist in Fettdruck dargestellt. Die Extinktionskoeffizienten wurden nach Cantor *et al.* (1970) berechnet.

Name	Sequenz	$\varepsilon_{260}/cm^{-1}M^{-1}10^3$
O7:	T **TCGA** TG	66,3
U7NM:	CA **TCGA** A	72,4
O8:	GT **TCGA** TG	77,6
U8NM:	CA **TCGA** AC	78,2
O9:	GT **TCGA** TGT	86,1
U9NM:	ACA **TCGA** AC	92,0
PH10:	GCC **TCGA** GGC	101,4
O10:	GT **TCGA** TGTC	102,3
U10:	GACA **TCGA^{Me}**AC	116,7
U10NM:	GACA **TCGA** AC	116,7
O10sbs:	GT TCTA TGTC	91,8
U10sbs:	GACA TAGA AC	108,0
O10ran:	GT CAGT TGTC	93,8
U10ran:	GACA ACTG AC	100,2
PH13(T,T):	TAGCC **TCGA** GGCT	135,2
O15(5'T):	TCAGT **TCGA** TGTAGC	163,5
U15(5'A):	TGCTACA **TCGA^{Me}**ACTG	161,5

2 Programme und Programmpakete

2.1 Prozessierung und Skalierung

Die Prozessierung und Skalierung der gemessenen Reflexe des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA erfolgte mit dem DENZO/Skalepack Programmpaket von Otwinowski (1993). Der ternäre Komplex aus M·*Taq*I, DNA und AETA wurde mit dem Programm XDS 98 prozessiert und mit XSCALE 98 skaliert (Kabsch *et al.*, 1993). Bis auf die im folgenden angegebenen spezifischen Parameter wurden ausschliesslich Standardwerte benutzt.

Spezifische Parameter für DENZO waren:

Profile fitting radius	30.00		
Box	2.0	2.0	
Mosaicity	0.6		
Spot elliptical	0.6	0.6	90.0
Background elliptical	0.8	0.8	90.0

Spezifische Parameter für XDS 98 waren:

Reflecting range	3.30
Reflecting range E.S.D.	0.55
Beam divergence	0.84
Beam divergence E.S.D.	0.14

2.2 Phasierung

Die Phasierung des ternären Komplexes erfolgte mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) aus dem CCP4 Programmpacket (CCP4, 1994). Details der Phasierung sind ausführlich in Abschnitt C 2.3 beschrieben.

2.3 Verfeinerung

Die Verfeinerung der binären Struktur aus M·*Taq*I und AETA erfolgte mit dem Programm XPLOR (Brünger, 1992a), die der ternären Struktur aus M·*Taq*I, DNA und AETA mit dem Programm CNS 0.5 (Brünger *et al.*, 1998). Beide Verfeinerungen umfassten einmalig eine *rigid body* Verfeinerung und anschliessend mehrere Zyklen der Energieminimierung. Ein solcher Zyklus beinhaltete eine Positionsverfeinerung (*positional refinement*), eine simulierte Abkühlung (*simulated annealing*) und eine *B*-Faktor Verfeinerung (Read, 1986; Brünger *et al.*, 1987; Brünger *et al.*, 1990; Brünger, 1992b; Rice & Brünger, 1994; Kleywegt & Brünger, 1996; Pannu & Read, 1996; Brünger *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1997). Zusätzlich wurde eine Lösungsmittelkorrektur (*bulk solvent correction*) errechnet. Falls für die angegebenen Programme keine Standardwerte benutzt wurden, sind die tatsächlichen Werte im folgenden aufgeführt.

Rigid body Verfeinerung mit XPLOR:

Anzahl der Minimierungsschritte:	40
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Toleranz	0.0
Wichtungsfaktor für Amplituden:	300000
Wichtung der Phasenbeschränkung:	0
Starrer Körper:	Aminosäurereste 21-413

Rigid body Verfeinerung mit CNS 0.5:

Unterdrückungskriterium:	nach Amplituden
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Ausreisser *cutoff*:	10000
B-Faktor Korrektur:	anisotropisch
Auflösungslimit für die B-Faktor Korrektur:	6.0 Å
Starre Körper:	Aminosäurereste 21-112, 121-413
Anzahl der Minimierungsschritte:	20
Anzahl der Zyklen:	1
Verfeinerungszielfunktion:	*Maximum likelihood* mit Amplituden

Positionsverfeinerung mit XPLOR:

Anzahl der Minimierungsschritte:	50-300 (bis der R-Faktor minimal ist)
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Toleranz:	0.05
Harmonische Energiekonstante	
für Cα-Atome	20.0 kcal/mol
für nicht Cα-Atome	0.0 kcal/mol

Positionsverfeinerung mit CNS 0.5:

Unterdrückungskriterium:	nach Amplituden
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Anzahl der Minimierungsschritte:	50-300 (bis der R-Faktor minimal ist)
Sigma *cutoff*:	0.0
B-Faktor Korrektur:	anisotropisch
Auflösungslimit für die B-Faktor Korrektur:	6.0 Å
Harmonische Energiekonstante:	10.0 kcal/mol
Art der Molekulardynamik:	Torsion

Simulierte Abkühlung mit XPLOR:

Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Starttemperatur:	300 K
Höchsttemperatur:	3000 K
Endtemperatur:	300 K
Heizstufen:	5
Abkühlungsstufen:	25
Molekulardynamische Toleranz:	0.005
Zeitstufe:	0.001 ps
Harmonische Energiekonstante:	0.0 kcal/mol

Simulierte Abkühlung mit CNS 0.5:

Unterdrückungskriterium:	nach Amplituden
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
B-Faktor Korrektur:	anisotropisch
Harmonische Energiekonstante:	10.0 kcal/mol
Art der Molekulardynamik:	Torsion
Molekulardynamik Schema:	*slowcool*
Starttemperatur:	2500 K
Abkühlungsstufen:	25
Zeitstufe:	0.004 ps
Verfeinerungszielfunktion:	*Maximum likelihood* mit Amplituden

Individuelle B-Faktorverfeinerung mit XPLOR:

Anzahl der Verfeinerungsschritte:	15
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
Molekulardynamische Toleranz:	0.0
Maximaler B-Faktor:	70 $Å^2$
Minimaler B-Faktor:	10 $Å^2$
Standardabweichung der Bindungslängen:	
Für Cα-Atome:	1.5 σ
Für nicht Cα-Atome:	2.0 σ
Standardabweichung der Bindungswinkel:	
Für Cα-Atome:	2.0 σ
Für nicht Cα-Atome:	2.5 σ

Individuelle B-Faktorverfeinerung mit CNS 0.5:

Anzahl der Verfeinerungsschritte:	30
Unterdrückungskriterium:	nach Amplituden
Sigma *cutoff* für Amplituden:	0.0
B-Faktor Korrektur:	anisotropisch
Maximaler B-Faktor:	100 $Å^2$
Minimaler B-Faktor:	2 $Å^2$
Standardabweichung der Bindungslängen:	
Für Cα-Atome:	1.5 σ
Für nicht Cα-Atome:	2.0 σ
Standardabweichung der Bindungswinkel:	
Für Cα-Atome:	2.0 σ
Für nicht Cα-Atome:	2.5 σ
Verfeinerungszielfunktion:	*Maximum likelihood* mit Amplituden

2.4 Grafikprogramme

Für die dreidimensionale Darstellung und Modellierung der Kristallstrukturen sowie der Interpretation von Elektronendichtekarten des binären und ternären Komplexes von M·*Taq*I wurde das Programm O verwendet (Jones *et al.*, 1991). Die grafische Darstellung der beiden Komplexe erfolgte mit den Programmen ICM (Abagyan *et al.*, 1994), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) und ADOBE PHOTOSHOP.

2.5 Stereochemische Analyse

Für die Überprüfung der Modellstatistik und der stereochemischen Stimmigkeit von M·*Taq*I im binären und ternären Komplex wurde das Programm PROCHECK benutzt (Laskowski *et al.*, 1993).

3 Methoden

3.1 Konzentrationsbestimmung von M·*Taq*I

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die Proteinlösung (1-10 µl) mit Wasser auf 100 µl verdünnt und mit 900 µl Bradford-Reagenz versetzt (Bradford, 1976). Die Lösung wurde 15 min bei RT inkubiert und danach die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit einer Eichgeraden, die mit BSA erstellt wurde.

3.2 Hybridisierung der Oligodesoxyribonukleotide

Zur Bildung der Duplex-Oligodesoxyribonukleotide für die Kristallisationsexperimente wurden die komplementären Einzelstränge hybridisiert. Dazu wurden Lösungen mit äquimolaren Mengen der beiden Oligodesoxyribonukleotide (200 µM) in dem gewünschten Kristallisationspuffer hergestellt und bei 95°C in einem Heizblock 2 min inkubiert. Anschliessend wurde der Heizblock während 1-2 h auf RT abgekühlt.

3.3 Vorbereitung der Proben für die Kristallisation

Für die Kristallisationsansätze wurde das Protein in den gewünschten Kristallisationspuffer überführt und aufkonzentriert. Dies wurde durch Vakuumdialyse realisiert. Dabei wurde die Proteinlösung (500 µl) in eine Dialysehülse überführt und mehrmals gegen den gewünschten Puffer (200 ml) dialysiert. Anschliessend wurde ein Wasserstrahlvakuum angelegt (30-60 min) und die Proteinlösung bis zu der gewünschten Konzentration aufkonzentriert.

3.4 Silanisieren der Deckgläser

Die zu silanisierenden Deckgläser wurde in einem dafür vorgesehenen Teflonhalter fixiert. Dann wurde sie abwechselnd mit Ethanol (techn., 400 ml, 20 min) und Wasser (400 ml, 20 min) gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Deckgläser im Ofen getrocknet (65°C, 1 h). Das Silanisieren erfolgte mit einer Dichlordimethylsilan-

Lösung (2%ig in Toluol, 30 min). Anschließend wurde erneut dreimal mit Ethanol (techn., 400 ml, 20 min) und Wasser (400 ml, 20 min) gewaschen und im Ofen getrocknet (65°C, 1 h). Abschließend wurden die silanisierten Deckgläser in einen Aluminiumbehälter überführt und im Ofen erhitzt (110°C, 12 h).

3.5 Kristallisationsansätze und -bedingungen

Es wurden ausschließlich Ansätze mit der Methode des hängenden Tropfens in Linbro-Zellkulturschalen durchgeführt. Zuerst wurden die Ränder der Vertiefungen eingefettet (Baysilone-Paste, mittelviskos, Bayer AG). In die einzelnen Vertiefungen wurden dann die vorher hergestellten Reservoirlösungen (1 ml) pipettiert. Auf die silanisierten Deckgläser wurde Reservoirlösung (2 µl) und Proteinlösung (2 µl) pipettiert und der entstandene Tropfen gemischt. Die Deckgläser wurden umgedreht auf den gefetteten Rand der Vertiefungen gesetzt und vorsichtig angedrückt.

Für die Herstellung von Kristallen des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA wurden die in Abschnitt D1.5 aufgelisteten Oligodesoxyribonukleotide getestet. Zusätzlich wurden die Bedingungen der einzelnen Kristallisationsansätze variiert. Basierend auf den Experimenten von Jancarik & Kim (1991) wurden verschiedene *crystal screens* von der Firma Hampton Research getestet. Innerhalb dieser *screens* variieren Gehalt und Konzentration von verschiedenen Fällungsmitteln, Salzen, Additiven und Puffersystemen sowie pH-Werten. Die ersten Kristalle eines ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA wurden mit dem *natrix screen* der Firma Hampton Research erhalten. Dieser *screen* enthält 48 Lösungen, die im folgenden aufgelistet sind.

1. 0.01 M Magnesiumchlorid	1. 0.05 M MES pH 5.6	1. 2.0 M Lithiumsulfat
2. 0.01 M Magnesiumacetat	2. 0.05 M MES pH 5.6	2. 2.5 M Ammoniumsulfat
3. 0.1 M Magnesiumacetat	3. 0.05 M MES pH 5.6	3. 20% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol
4. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg sulfat	4. 0.05 M MES pH 5.6	4. 10% v/v PEG 400
5. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	5. 0.05 M MES pH 5.6	5. 5% w/v PEG 8000
6. 0.1 M Ammoniumsulfat, 0.01 M Mg chlorid	6. 0.05 M MES pH 5.6	6. 20% w/v PEG 8000
7. 0.02 M Magnesiumchlorid	7. 0.05 M MES pH 6.0	7. 15% v/v iso-Propanol
8. 0.1 M Ammoniumacetat, 0.005 M Mg sulfat	8. 0.05 M MES pH 6.0	8. 0.6 M Natriumchlorid
9. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	9. 0.05 M MES pH 6.0	9. 10% v/v PEG 400
10. 0.005 M Magnesiumsulfat	10. 0.05 M MES pH 6.0	10. 5% w/v PEG 4000
11. 0.01 M Magnesiumchlorid	11. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	11. 1.0 M Lithiumsulfat
12. 0.01 M Magnesiumsulfat	12. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	12. 1.6 M Lithiumsulfat
13. 0.015 M Magnesiumacetat	13. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	13. 1.7 M Ammoniumsulfat
14. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.025 M Mg chlorid	14. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	14. 15% v/v iso-Propanol
15. 0.04 M Magnesiumchlorid	15. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	15. 5% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol
16. 0.04 M Magnesiumacetat	16. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	16. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol
17. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.01 M Ca chlorid	17. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.0	17. 10% w/v PEG 4000
18. 0.01 M Magnesiumacetat	18. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	18. 1.3 M Lithiumsulfat
19. 0.01 M Magnesiumsulfat	19. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	19. 2.0 M Ammoniumsulfat
20. 0.1 M Ammoniumacetat, 0.015 M Mg acetat	20. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	20. 10% v/v iso-Propanol
21. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.005 M Mg chlorid	21. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	21. 10% w/v 1,6 Hexandiol
22. 0.08 M Magnesiumacetat	22. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	22. 15% v/v PEG 400
23. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	23. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	23. 10% w/v PEG 4000
24. 0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Ca chlorid	24. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	24. 10% w/v PEG 4000
25. 0.08 M Magnesiumacetat	25. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	25. 30% w/v PEG 4000
26. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.1 M Mg acetat	26. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	26. 10% w/v PEG 8000
27. 0.2 M Ammoniumacetat, 0.01 M Mg acetat	27. 0.05 M Na Cacodylate pH 6.5	27. 30% w/v PEG 8000

28. 0.05 M Magnesiumsulfat	28. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	28. 1.6 M Lithiumsulfat
29. 0.01 M Magnesiumchlorid	29. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	29. 4.0 M Lithiumchlorid
30. 0.01 M Magnesiumchlorid	30. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	30. 1.6 M Ammoniumsulfat
31. 0.005 M Magnesiumchlorid	31. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	31. 25% v/v PEG Monomethylether 550
32. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	32. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	32. 20% w/v 1,6 Hexandiol
33. 0.2 M Ammonium hlorid, 0.01 M Mg chlorid	33. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	33. 30% w/v 1,6 Hexandiol
34. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.005 M Mg sulfat	34. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	34. 15% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol
35. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	35. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	35. 5% v/v PEG 400
36. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.01 M Ca chlorid	36. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	36. 10% v/v PEG 400
37. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.025 M Mg sulfat	37. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	37. 20% v/v PEG 200
38. 0.2 M Kaliumacetat, 0.15 M Mg acetat	38. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	38. 5% w/v PEG 4000
39. 0.1 M Ammoniumacetat, 0.02 M Mg chlorid	39. 0.05 M Na HEPES pH 7.0	39. 5% w/v PEG 8000
40. 0.01 M Magnesiumchlorid	40. 0.05 M Tris HCl pH 7.5	40. 1.6 M Ammoniumsulfat
41. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.015 M Mg chlorid	41. 0.05 M Tris HCl pH 7.5	41. 10% v/v PEG Monomethylether 550
42. 0.01 M Magnesiumchlorid	42. 0.05 M Tris HCl pH 7.5	42. 5% v/v iso-Propanol
43. 0.05 M Ammoniumacetat, 0.01 M Mg chlorid	43. 0.05 M Tris HCl pH 7.5	43. 10% v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol
44. 0.2 M Kaliumchlorid, 0.05 M Mg chlorid	44. 0.05 M Tris HCl pH 7.5	44. 10% w/v PEG 4000
45. 0.025 M Magnesiumsulfat	45. 0.05 M Tris HCl pH 8.5	45. 1.8 M Ammoniumsulfat
46. 0.005 M Magnesiumsulfat	46. 0.05 M Tris HCl pH 8.5	46. 35% w/v 1,6 Hexandiol
47. 0.1 M Kaliumchlorid, 0.01 M Mg chlorid	47. 0.05 M Tris HCl pH 8.5	47. 30% v/v PEG 400
48. 0.2 M Ammoniumchlorid, 0.01 M Ca chlorid	48. 0.05 M Tris HCl pH 8.5	48. 30% w/v PEG 4000

Ausgehend von den Kristallisationsbedingungen, bei denen die ersten Kristalle des ternären Komplexes erhalten wurden, wurden diese Bedingungen weiter optimiert. Dazu wurden die folgenden Parameter variiert:

- pH-Wert
- Fällungsmittel-, Salz- und Pufferkonzentration
- Temperatur
- Animpfen

Insgesamt wurden ca. 3600 Kristallisationsansätze durchgeführt, um die Kristallisationsbedingungen zu optimieren, die für die Herstellung von messbaren Kristallen des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA nötig waren.

Die Herstellung der Kristalle des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA bedurfte nur kleinerer Optimierungen, da im wesentlichen die Bedingungen, die für den binären Komplex aus M·*Taq*I und AdoMet (Schluckebier *et al.*, 1997) bekannt waren, übernommen wurden. Die Kristalle des binären und ternären Komplexes wurden bei einer Temperatur von 20 °C erhalten. Dabei wurden 2 µl Proteinlösung und 2 µl Reservoirlösung zu einen Tropfen gemischt. Für die Herstellung der Kristalle des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA, die zur Strukturbestimmung eingesetzt wurden, sind folgende Lösungen eingesetzt worden:

Proteinlösung:	M·*Taq*I	(75 µM)
	PH13(T,T)	(100 µM)
	NaCl	(300 mM)
	Tris/HCl pH 7,3	(100 mM)
	AETA	(250 µM)
Reservoirlösung:	NaCl	(50 mM)
	Tris/HCl pH 7,3	(50 mM)
	PEG 6000	(13 % w/v)

Für die Herstellung der Kristalle des ternären Komplexes aus M·*Taq*I, DNA und AETA, die zur Strukturbestimmung eingesetzt wurden, sind folgende optimierte Lösungen eingesetzt worden:

Proteinlösung:	M·*Taq*I	(75 µM)
	O10/U10	(100 µM)
	NaCl	(300 mM)
	Tris/HCl pH 7,3	(10 mM)
	AETA	(2 mM)
Reservoirlösung:	KCl	(100 mM)
	$MgCl_2$	(25 mM)
	NaCacodylat pH 6,0	(50 mM)
	Isopropanol	(15 %)

Die Kristalle beider Komplexe wuchsen innerhalb von 1-2 Tagen. Grosse Kristalle des ternären Komplexes konnten nur durch Animpfen (*microseeding*) mit bereits erhaltenen kleineren Kristallen gezüchtet werden. Dazu wurde ein Tropfen mit geeigneten Kristallen des ternären Komplexes ausgewählt und diese mit einem Skalpell in möglichst kleine Bruchstücke zerkleinert. Durch diese Lösung wurde dann ein Haar gezogen, an welchem die Impfkristalle hängenblieben. Diese Haar wurde dann durch den frisch hergestellten Tropfen gezogen, in dem neue Kristalle des ternären Komplexes wachsen sollten.

3.6 Kristallmontage

Die Kristalle beider Komplexe wurden ausschliesslich unter Cryo-Bedingungen vermessen. Bevor der Kristall in flüssigen Stickstoff überführt wurde, mussten Bedingungen ausgearbeitet werden, die für die Cryo-Messung geeignet sind. Der Kristall musste in einer Lösung eingefroren werden, die zum einen den Kristall nicht zerstört und zum anderen glasartig gefriert. Dazu wurden verschiedene Lösungsmittel in unterschiedlichen Verhältnissen mit der Mutterlauge gemischt. Mit Hilfe einer kleinen Schleife wurden die Mischungen in flüssigen Stickstoff getaucht. Dieser Prozess wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Ziel war es, eine Mischung auszuwählen, die den höchsten Anteil an Mutterlauge besitzt und glasartig gefriert. Für das Einfrieren der Kristalle des binären und ternären Komplexes wurde folgende Lösung gewählt:

Cryolösung:	PEG 6000	12 % w/v
	NaCl	200 mM

Tris/HCl pH 7,3	100 mM
Glycerin	17,1 % v/v

Der zu vermessende Kristall wurde mit Hilfe einer Schleife, die an einem Goniometerkopfaufsatz befestigt ist, direkt aus der Mutterlauge in die Cryo-Lösung getaucht. Von dort wurde er mit der Schleife in flüssigen Stickstoff überführt. Dann wurde der Goniometerkopfaufsatz mit der Schleife und dem darin eingefrorenen Kristall auf den Goniometerkopf plaziert und in einem Stickstoffstrom bei -173°C vermessen.

3.7 Aufnahme der Röntgendiffraktionsdaten

Der Kristall des binären Komplexes aus M·*Taq*I und AETA wurde an der Beamline BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg bei einer Wellenlänge von 1,0500 Å vermessen. Die Detektion der Reflexe erfolgte mit einem Phosphor-Bildplatten- (*Image-Plate*-) Detektor. Für die Strukturanalyse des Kristalls aus M·TaqI, DNA und AETA wurde monochromatisierte-Cu-K_λ-Röntgenstrahlung (λ = 1,5405 Å) verwendet. Diese wurde von einem Röntgengenerator mit rotierender Anode erzeugt, der mit 45 kV bei 100 mA betrieben wurde. Die Detektion der Reflexe wurde mit einem Phosphor-Bildplatten- (*Image-Plate*-) Detektor durchgeführt.

F Literaturverzeichnis

Abagyan, R.A., Totrov, M.M. & Kuznetsov, D.N. (1994). ICM - a new method for protein modeling and design. Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J.Comp.Chem*. **15**, 488-506.

Adams, P.D., Pannu, N.S., Read, R.J. & Brünger, A.T. (1997). Cross-validated Maximum Likelihood Enhances Crystallographic Simulated Annealing Refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5018-5023.

Aggarwal, A.K., Rodgers, D.W., Drottar, M., Ptashne, M. & Harrison, S.C. (1988). Recognition of a DNA Operator by the Repressor of Phage 434: A View at High Resolution. *Science* **242**, 899-907.

Altona, C. & Sundaralingam, M. (1972). Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation. *J. Amer. Chem. Soc*. **94**, 8205-8212.

Arnett, E.M. (1963). Quantitative comparisons of weak organic bases. *Progr. Phys. Org. Chem.* **1**, 223-403.

Barany, F., Slatko, B., Danzitz, M., Cowburn, D., Schildkraut, I. & Wilson, G. (1992). The corrected nucleotide sequences of the *Taq*I restriction and modification enzymed reveal a thirteen-codon overlap. *Gene* **112**, 91-95.

Barrett, T.E., Savva, R., Panayotou, G., Barlow, T., Brown, T., Jiricny, J. & Pearl, L.H. (1998). Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions. *Cell* **92**, 117-129.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 284-253.

Brünger, A.T., Kuriyan, J. & Karplus, M. (1987). Crystallographic R factor Refinement by Molecular Dynamics. *Science* **235**, 458-460.

Brünger, A.T., Krukowski, A. & Erickson, J. (1990). Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Cryst*. **A46**, 585-593.

Brünger, A.T. (1992a). X-PLOR Version 3.1. A System for X-ray Crystallography and NMR. *Yale University Press, New Haven und London*.

Brünger, A.T. (1992b). The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.

Brünger, A.T., Adams, P.D. & Rice, L.M. (1997). New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Structure* **5**, 325-336.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr*. **D54**, 905-921.

Burley, S. K. & Petsko, G.A. (1988). Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Prot. Chem*. **39**, 125-189.

Cantor, C.R., Warshaw, M.M. & Shapiro, H. (1970). Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**, 1059-1077.

CCP4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst*. **D50**, 760-763.

Derewenda, Z.S., Lee, L. & Derewenda, U. (1995). The occurrence of C-H···O hydrogen bonds in proteins. *J. Mol. Biol*. **252**, 248-262.

Dickerson, R.E., Drew, H.R., Conner, B.N., Wing, R.M., Fratini, V. & Kopka, M.L. (1982). The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **216**, 475-485.

Dougherty, D. A. (1996). Cation–π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**, 163-168.

Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K. & Harrison, S.C. (1992). The GCN4 Basic Region Leucine Zipper Binds DNA as a Dimer of Uninterrupted α Helices: Crystal Structure of the Protein-DNA Complex. *Cell* **71**, 1223-1237.

Fersht, A. (1985). Enzyme Structure and Mechanism. *156 (W. H. Freeman and Company, New York).*

Friederich, A. (2000). Pers. Mitteilung.

García-del Portillo, F., Pucciarelli, M.G. & Casadesús, J. (1999). DNA adenine methylase mutants of Salmonella typhimurium show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11578-11583.

Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R.M. & Cheng, X. (1997). Structure of PvuII DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2702-2715.

Gonzalez, A. & Nave, C. (1994). Radiation Damage in Protein Crystals at Low Temperature. *Acta Cryst.*, **D50**, 874-877.

Haines, J.A., Reese, C.B. & Todd, L. (1964). The methylation of nucleosides and mononucleotides with diazomethan. *J. Chem. Soc*., 1406-1412.

Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A. & Mahan, M.J. (1999). An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**, 967–970.

Ho, D., Wu, J., Santi, D. & Floss, H. (1991). Stereochemical studies of the C-methylation of deoxycytidine catalyzed by *Hha*I methylase and the N-methylation of deoxyadenosine catalyzed by *EcoR*I methylase. *Arch. Biochem. Biophys*. **284**, 264-269.

Holz, B., Klimasauskas, S., Serva, S. & Weinhold, E. (1998). 2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases. *Nucl. Acids Res*. **26**, 1076-1083.

Holz, B., Dank, N., Eickhoff, J.E., Lipps, G., Krauss, G. & Weinhold E. (1999). Identification of the binding site for the extrahelical target base in N6-adenine DNA methyltransferases by photo-cross-linking with duplex oligodeoxyribonucleotides containing 5-iodouracil at the target position. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15066-15072.

Hosfield, D.J., Guan, Y., Haas, B.J., Cunningham, R.P., & Tainer, J.A. (1999). Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell* **98**, 397-408.

Jancarik, j. & Kim, S.H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallisation of proteins. *J. Appl. Cryst*. **24**, 409-411.

Jaworski, A., Hsieh, W.T., Blaho, J.A., Larson, J.E. & Wells, R.D. (1987). Left-handed DNA in vivo. *Science* **238**, 773-777.

Jones, T. A., Cowan, S., Zou, J.-Y. & 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.

Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.

Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst*. **26**, 795-800.

Kettani, A., Guéron, M. & Leroy, J.-L. (1997). Amino proton exchange processes in mononucleosides. *J. Am. Chem. Soc*. **119**, 1108-1115.

Kleywegt, G.T. & Brünger, A.T. (1996). Checking your imagination: Applications of the free R value. *Structure* **4**, 897-904.

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., & Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**, 357-369.

Klug, A. & Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **52**, 473-482.

Kornberg, R.D. & Lorch, Y. (1992). Chromatin structure and transcription. *Annu. Cell Biol.* **8**, 563-587.

Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a programm to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.

Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R.J. & Wilson, G.G. (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucl. Acids Res*. **22**, 1-10.

Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D. P., Jack, W. E., Schildkraut, I., & Saenger, W. (1994). Three-dimensional structure of the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10957-10961.

Laskowski, R., MacArthur, W., Moss, D. & Thornton, J. (1993). PROCHECK: A programm to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.

Lau, A.Y., Schärer, O.D., Samson, L., Verdine, G.L. & Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell* **95**, 249-258.

Lauster, R., Trautner, T.A. & Noyer-Weidner, M. (1989). Cytosin-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognition domains. *J. Mol. Biol*. **206**, 305-312.

Löffler, G. & Petrides, P.E. (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Malone, T., Blumenthal, R. M. & Cheng, X. (1995). Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol*. **253**, 618-632.

McCurdy, A., Jimenez, L., Stauffer, D. A. & Dougherty, D. A. (1992). Biomimetic catalysis of SN2 reactions through cation–π interactions. The role of polarizability in catalysis. *J. Am. Chem. Soc*. **114**, 101314-10321.

Modrich, P. (1994). Mismatch repair, genetic stability and cancer. *Science*, **266**, 1959-1960.

Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst*. **A50**, 157-163.

Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L.F., Schildkraut, I. & Aggarwal, A.K. (1995). Structure of Bam HI Endonuclease Bound to DNA: Partial Folding and Unfolding on DNA Binding. *Science* **269**, 656-663.

Nicholls, A., Sharp, K. & Honig, B. (1991). Protein Folding and Association: Insights from the Interfacial and Thermodynamic Properties of Hydrocarbons. *Proteins* **11**, 281-296.

Osterman, D.G., DePillis, G.D., Wu, J.C., Matsuda, A. & Santi, D.V. (1988). 5-Fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of HhaI methylase. *Biochemistry* **27**, 5204-5210.

Otwinowski, Z. (1993). Oscillation data reduction program. In: *Proceedings of the CCP4 Study Weekend: Data Collection and Processing*, (Sawyer, L., Isaacs, N. & Bailey, S., eds). SERC Laboratory Daresbury, 56-62.

Pannu, N.S. & Read, R.J. (1996). Improved structure refinement through maximum likelihood. *Acta Cryst*. **A52**, 659-668.

Pavletich, N.P. & Pabo, C.O. (1991). Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817.

Pignot, M. (1999). Dissertation.

Pogolotti, A., Ono, A., Subramaniam, R. & Santi, D. (1988). On the mechanism of DNA-adenine methylase. *J. Biol. Chem*. **263**, 7461-7464.

Posfai, J., Bhagwat, A.S., Posfai, G. & Roberts, R.J. (1989). Predictive motifs derived from cytosin methyltransferases. *Nucl. Acids Res*. **17**, 2421-2435.

Pues, H., Bleimling, N., Holz, B., Wölcke, J. & Weinhold, E. (1999). Functional roles of the conserved aromatic amino acid residues at position 108 (motif IV) and position 196 (motif VIII) in base flipping and catalysis by the N6-adenine DNA methyltransferase from Thermus aquaticus. *Biochemistry* **38**, 1426-1434.

Ramachandran, G., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configuration. *J. Mol. Biol*. **7**, 95-99.

Read, R.J. (1986). Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Cryst*. **A42**, 140-149.

Reinisch, K. M., Chen, L., Verdine, G. L., & Lipscomb, W. N. (1995). The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* **82**, 143-153.

Rice, L.M. & Brünger, A.T. (1994). Torsion Angle Dynamics: Reduced Variable Conformational Sampling Enhances Crystallographic Structure Refinement. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **19**, 277-290.

Rice, P.A., Yang, S.-W., Mizuuchi, K. & Nash, H.A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced U-turn. *Cell* **87**, 1295-1306.

Sänger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure. *Springer-Verlag New York.*

Schluckebier, G. (1996). Dissertation.

Schluckebier, G., Kozak, M., Bleimling, N., Weinhold, E. & Saenger, W. (1997). Differential binding of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase M.*Taq*I. *J. Mol. Biol*. **265**, 56-67.

Schluckebier, G., Labahn, J., Granzin, J. & Saenger, W. (1998). M.TaqI: possible catalysis via cation-π interactions in N-specific DNA methyltransferases. *Biol Chem*. **379**, 389-400.

Schultz, S.C., Shields, G.C. & Steitz, T.A. (1991). Crystal Structure of a CAP-DNA Complex: The DNA Is Bent by 90°. *Science* **253**, 1001-1007.

Schwartz, T., Rould, M.A., Lowenhaupt, K., Herbert, A. & Rich, A. (1999). Crystal Structure of the Zα Domain of the Human Editing Enzyme ADAR1 Bound to Left-Handed Z-DNA. *Science* **284**, 1841-1845.

Slatko, B.E., Benner, J.S., Jager-Quinton, T., Moran, L.S., Simcox, T.G., Van Cott, E.M. & Wilson, G.G. (1987). Cloning, sequencing and expression of the TaqI restriction-modification system. *Nucl. Acids Res*. **15**, 9781- 9796.

Slupphaug, G., Mol, C.D., Kavli, B., Arvai, A. S., Krokan, H.E. & Tainer, J.A. (1996). A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. *Nature* **384**, 87-92.

Spruck III, C.H., Rideout III, W.M. & Jones, P.A. (1993). DNA methylation and cancer. In *DNA methylation: Molecular biology and biological significance*, (Jost, J.P. & Saluz, H.P., Hrsg.). Birkhäuser Verlag, Basel.

Steitz, T.A. (1993) Structural studies of protein-nucleic acid interactions: the sources of sequence-specific binding. *University Press, Cambridge*.

Tran, P.H., Korszun, Z.R., Cerritelli, S., Springhorn, S.S. & Lacks, S.A. (1998). Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the DpnII restriction system of Streptococcus pneumoniae bound to S-adenosylmethionine. *Structure* **6**, 1563-1575.

Travers, A. (1994). DNA-Protein interactions. *Chapman & Hall, London*.

Tung, C.S. & Carter, E.S. 2nd (1994). Nucleic acid modeling tool (NAMOT): an interactive graphic tool for modeling nucleic acid structures. *Computer Applications in the Biosciences* **10(4)**, 427-433.

Vassylyev, D.G., Kashiwagi, T., Mikami, Y., Ariyoshi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E. & Morikawa, K. (1995). Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition. *Cell* **83**, 773-782.

Voet, D. & Voet, J.G. (1992). Biochemistry. *VCH Verlagsgesellschaft Weinheim*.

Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. **171**, 737-745.

Weiss, M.A., Ellenberger, T., Wobbe, C.R., Lee, J.P., Harrison, S.C. & Struhl, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* **347**, 575-578.

Wells, R.D. (1988). Unusual DNA structures. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 1095-1098.

Westhead, D.R., Hatton, D.C. & Thornton, J.M. (1998). An atlas of protein topology cartoons available on the World Wide Web. *Trends in Biochemical Sciences*. **23 1**, 35-36.

Westhead, D.R., Slidel, T.W., Flores, T.P. & Thornton, J.M. (1999). Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Science*. **8 (4)**, 897-904.

Wilson, G.G. (1992). Amino acid sequence arrangements of DNA-methyltransferases. *Methods Enzymol*. **216**, 259-279.

Wilson, G.G. & Murray, N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet*. **25**, 585-627.

Wu, J.C. & Santi, D.V. (1987). Kinetic and katalytic mechanism of *Hha*I methyltransferase. *J. Biol. Chem*. **263**, 319-326.

Young, A. & Dewan, J. (1990). Enhancement in resolution and lack of radiation damage in a rapidly frozen lysozyme crystal subjected to high-intensity synchrotron radiation. *J. Appl. Cryst.* **23**, 215-218.

Zimmerman, S.B. & Pheiffer, B.H. (1979). A direct demonstration that the ethanol-induced transition of DNA is between the A and B forms: an X-ray diffraction study. *Journal of Molecular Biology*. **135(4)**, 1023-1027.

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen. Ich danke deshalb...

... meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Elmar Weinhold für die hervorragende Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und viel Motivation und
... Dr. Axel J. Scheidig für die ebenfalls hervorragende Betreuung seitens der Proteinkristallographie und die gute Zusammenarbeit insbesondere bei Synchrotronmessungen in Hamburg und Grenoble.
... meinem Dokorvater Prof. Dr. Roger S. Goody für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und die Bereitstellung der Voraussetzungen zum Gelingen dieser Arbeit.
... Prof. Dr. Wolfgang Kreiser für die Begutachtung dieser Arbeit und seinem Interesse gegenüber dem vorliegenden Thema.
... Nathalie Bleimling, die mir immer genügend Protein zur Verfügung stellte und mich mit viel Geduld in die Welt der Molekularbiologie einführte.
... Dr. Marc Pignot für die gute Zusammenarbeit und das Bereitstellen des Cofaktoranalogons.
... Christian Dahlhoff, Manuela Linker und Stephan Milardovic, die im Rahmen dieser Arbeit ein erfolgreiches Praktikum absolviert haben.
... Dr. Michael Weyand für die Hilfe bei der Erstellung von Abbildungen und für das Korrekturlesen.
... Dr. Nils Ostermann für die Bereitstellung diverser Inputfiles.
... Georg Holtermann für die stets zuverlässige Betreuung der Röntgengeneratoren.
... meinen Gruppenmitstreitern Almut, Birgit, Goran, Heike, Julian, Lili für viel Unterstützung und ein angenehmes Gruppenklima.
... Mathias für Freundschaft und viele Tipps, innerhalb und außerhalb der Chemie.
... der X-ray Gruppe am MPI für abteilungsübergreifende Hilfestellungen.
... der Abteilung III für das hervorragende Arbeitsklima.
... meinen Freunden, die mir auch ein Leben außerhalb des Labors ermöglicht haben.