

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Alle verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Chemikalien besitzen Analysenqualität und wurden bei Sigma-Aldrich, Merck oder Roth bezogen.

Bromphenolblau	Serva	
PMSF	Serva	
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete	Roche	
DNA Marker	NEB (New England Biolabs)	
Proteinmarker Broad Range 2-212 kDa	NEB (New England Biolabs)	
Dinatrium-Malonat	Merck	
6-Amino-Capronsäure	SIGMA-ALDRICH	
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (LMP)	BRL, heute Teil von Invitrogen	
2-Methyl-2,4-Pentadiol	Merck	
Sterilfilter (0,22 µm Porengrösse)	Millipore	
Polyethylenglykole ( $M_w = 200 - 20.000$ Da)	Sigma-Aldrich, Merck	
<b>Enzyme und Proteine</b>		
EcoRI	NEB (New England Biolabs)	
NcoI	NEB (New England Biolabs)	
BamHI	NEB (New England Biolabs)	
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene	
T4-Ligase	NEB (New England Biolabs)	
Benzonase	Merck	
<b>Kits</b>		
Qiaprep Spin Plasmid Miniprep kit	Qiagen	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	
Crystal-Screen	Hampton Research	
Crystal-Screen II	Hampton Research	
Index-Screen	Hampton Research	
Natrix-Screen	Hampton Research	
Salt RX	Hampton Research	
<b>Expressionsvektoren und Bakterienstämme</b>		
<i>E. coli</i> BL21	Novagen	
<i>E. coli</i> ER2566	NEB (New England Biolabs)	
pET28a	Novagen	
PCR blunt TOPO	Invitrogen	
pTrc99a	GE Healthcare	
<b>Nährmedien für die Zellanzucht</b>		
LB-Medium	Caseinpepton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	pH 7,5 (RT, 1 M NaOH)	

LBA-Medium	LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/mL
LBK-Medium	LB-Medium mit Kanamycin	30 µg/mL
LBA-Agar	LB-Medium mit Agar-Agar Ampicillin	15 g/L 100 µg/mL

### Proteinreinigung

Alle verwendeten Puffer wurden mit 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> versetzt.

#### *Kationenaustausch-Chromatographie*

Puffer A	50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl
Puffer B	1 M NaCl in Puffer A
SP Sepharose	GE Healthcare
Phosphocellulose	Whatman
POROS 20HE	Applied Biosystems

#### *Entsalzung*

HiPrepDesalting	GE Healthcare
ZipTip <sup>®</sup> C <sub>18</sub> Entsalzungssäulchen	Millipore

#### *Gelpermeations-Chromatographie*

Puffer GPC	20 mM Tris/HCl(pH 7,5), 300 mM NaCl
HiLoad <sup>™</sup> Superdex75 16/60	GE Healthcare

#### *Konzentratoren*

Amicon Ultra; 3, 10, 30 kDa; 5, 15 mL Volumen	Millipore, Schwalbach
--	-----------------------

#### *Proteinbestimmung*

Quick Start Bradford Protein Assay Kit	BioRad
--	--------

### Reinigung von DNA

#### *Anionenaustausch-Chromatographie*

Puffer-Q	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
Puffer-Q2	1 M NaCl in Puffer-Q
MonoQ 5/5	GE Healthcare

### Reinigung von ω-DNA

#### *Gelpermeations-Chromatographie*

Puffer-GF	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 30 mM KCl
HiLoad <sup>™</sup> Superdex75 16/60	GE Healthcare

### Kristallisation

Schalen mit 24 Vertiefungen, Linbro Zellkultur-Box	Flow Laboratories
Schalen mit 12 Vertiefungen, Modell Groningen	Nelipak bv (Niederlande)
Schalen mit 96 Vertiefungen	Greiner BioOne
Plastikfilm	3M (bezogen über Hampton Research)
Nylon-Schlaufen (Mounted Cryo Loops)	Hampton Research
Deckgläser 22 × 22 mm, Stärke 2	Laborhandel
Glaskapillaren, Ø = 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 mm	Glas Müller (Berlin)
Quarzkapillaren, Ø = 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 mm	Glas Müller (Berlin)

### Geräte

Agarose-Gelelektrophorese Kammer QS710	Kodak Biomax
ÄKTA Chromatographiesystem	GE Healthcare
Binokularmikroskop SZ60	Olympus
DLS-Apparatur Laser Spectroscatter 201	RiNA GmbH

BioCad Chromatographiesystem Fraktionsammler SF2120	Perceptive Biosystems Applied Biosystems
PAGE-Elektrophoreseappartur French®Pressure Cell Press Elektroporator Easyject Prima Mar345 Image Plate Röntngengenerator FR-571 mit rotierender Anode Cryosystem Thermocycler Tpersonal, Trio Thermoböock UV-VIS-Spektrometer	Biometra Sim Aminco EquiBio mar-Research Enraf-Nonius Oxford Biometra Shimadzu

## 2.2 Allgemeine biochemische und molekularbiologische

### Arbeitsmethoden

#### 2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Expressionsrate und Reinheit der Proteine  $\omega$  und  $\Delta 19\omega$  wurden mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (Laemmli, 1970).

Die SDS-PAGE wurde mit 4%igen Sammelgelen und 20%igen Trenngelen durchgeführt. In der Regel wurden pro Proben tasche 2-20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Die Proben ( $\leq 10 \mu\text{L}$ ) wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und 2 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 170 V durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Gelkante erreichte, wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung etwa 10 min gefärbt, um anschließend in erhitztem  $\text{H}_2\text{O}$  entfärbt zu werden.

Trenngel (20 %):

375 mM Tris/HCl pH 8,8  
0,1 % Laurylsulfat (w/v)  
62,5 % Rotiphorese Gel30 (v/v)

Sammelgel (4 %)

125 mM Tris/HCl, pH 6,8  
0,1 % Laurylsulfat (w/v)  
13,4 % Rotiphorese Gel30 (v/v)

Die Polymerisation wurde mit 0,05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TMEDA) und 0,05 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat gestartet.

Probenpuffer (5x):

50 mM Tris/HCl, pH 7,0  
10 % Laurylsulfat (w/v)  
0,1 % Bromphenolblau (w/v)  
1 % 2-Mercaptoethanol (v/v)  
14 % 1,4-Dithiothreitol (w/v)  
10 % Glycerin (v/v)

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,3  
1,44 % Glycin (w/v)  
0,1 % Laurylsulfat (w/v)

Coomassie-Färbelösung:

0,5 % Coomassie Brilliant-Blue G250 (w/v)  
6,25 % Ethanol (v/v)  
4,25 % Perchlorsäure (v/v)

## 2.3 Gentechnische Methoden

### 2.3.1 Transformation und Stammkulturen

Die Einführung von DNA in kompetente (aufnahmebereite) Zellen erfolgte durch Elektroporation (Potter, 1988). Dazu benötigte elektrokompente Zellen wurden nach Herstellerprotokoll (EquiBio) vorbereitet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (EquiBio).

Zur Herstellung von Gefrierkulturen wurden 10 mL LBA- oder LBK-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und ü. N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Von der resultierenden Bakteriensuspension wurden je 700  $\mu\text{L}$  mit 700  $\mu\text{L}$  Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 2.3.2 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Zur Transformation und Sequenzierung wird gereinigte Plasmid-DNA benötigt. Die Plasmidpräparation wurde mit dem QIAquick Plasmid Miniprep Kit der Firma

Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde die Plasmid-DNA lyophilisiert.

Plasmid Sequenzierungen nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) wurden am MPI für molekulare Genetik (Berlin) und bei Fa. GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben. Für Sequenzierungen benötigte *primer* wurden nach Kap. 2.3.3 entworfen und von Dr. W. Schröder (Institut für Kristallographie, FU Berlin) synthetisiert. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Programm BioEdit (Ibis Therapeutics) ausgewertet.

### 2.3.3 *primer*-Design für die Mutagenese

Sowohl für die Mutagenese selbst als auch für deren Verifizierung mit Hilfe der DNA-Sequenzierung werden DNA-Oligonucleotide benötigt. Die *primer* wurden nach Empfehlungen von (White, 1993) entworfen und die Erfüllung der Vorgaben mit dem Programm Oligonucleotide Properties Calculator verifiziert. Mit diesem Programm (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) wurden auch *primer* ausgeschlossen, die in der Lage sind, Sekundärstrukturen ausbilden zu können.

### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1%igen Agarose-Gels wurde folgende Agarose-Suspension angesetzt:

1 % Agarose NEEO (w/v)  
40 mM Tris  
1,14 % Eisessig (v/v)  
1 mM EDTA, pH 8,0

Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf 60°C Ethidiumbromidlösung bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL zugegeben. Anschliessend wurde das Gel in die Kammer gegossen.

DNA-Probenpuffer (5x)  
0,25 % Bromphenolblau (w/v)  
0,25 % Xylen Cyanol (w/v)  
40 % D(+)-Saccharose (w/v)

Elektrophoresepuffer (1x):  
40 mM Tris  
1,142 % Eisessig (v/v)  
1 mM EDTA, pH 8,0

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Die DNA-Längen-Bestimmung erfolgte mit Hilfe von Eichfragmenten in Form von 100-bp- bzw. 1000-bp-Leiter-Standards. Gele wurden unter UV-Licht mit einer Photodokumentations-Anlage ausgewertet.

### 2.3.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA unter Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen zu spalten (McClarin et al., 1986). Die in der Gentechnik verwendeten Typ-II Restriktionsendonukleasen spalten im Gegensatz zu Typ-I- und Typ-III-Restriktionsenzymen DNA spezifisch nur innerhalb einer 4-8 bp langen, meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit definierter Länge und definierten Enden entstehen.

Um optimale Bedingungen für einen Restriktionsverdau bereitzustellen, wurde für jedes Enzym der vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlene Puffer verwendet. Bei Doppelverdauen wurden Puffer gewählt, die für beide Enzyme zufrieden stellende Aktivität ermöglichte. In Tab. 5 ist die Zusammensetzung eines typischen Ansatzes aufgeführt. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 5** Typische Zusammensetzung eines Restriktionsverdau

Substanz	Volumen (µL)
DNA-Lösung	5
10×Puffer	1
Restriktionsenzym # 1 (10 U/µL)	1
Restriktionsenzym # 2 (10 U/µL)	1
ddH <sub>2</sub> O	add 10

### 2.3.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick<sup>®</sup> Gel-Extraction-Kit der Fa. Qiagen verwendet.

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Bande von Interesse mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte nach der Anleitung des Herstellers mit einem chaotropen Puffer und die Lösung wurde

auf eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden mit 30  $\mu\text{L}$  auf 55°C temperiertem vollentsalztem Wasser eluiert.

### 2.3.7 Klonierung von $\Delta 19\omega$

Zur Herstellung der Deletionsmutante  $\Delta 19\omega$  bzw.  $\omega(20-71)$  wurden die in Tab. 2 aufgeführten *primer* mit dem Plasmid pTrc99A- $\omega$  als Vorlage in einem PCR-Ansatz nach Tab. 3 unter Anwendung des Temperaturprogramms von Tab. 4 amplifiziert. Das erzeugte DNA-Fragment wurde nach Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.3.4) und Gel-Extraktion (Kap. 2.3.6) in den PCR-Blunt TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers ligiert, um das Konstrukt TOPO- $\Delta 19\omega$  zu erhalten. *E.coli* ER2566 Zellen wurden mit diesem Konstrukt transformiert (Kap. 2.3.1) und auf LBK-Agar-Platten selektiert. Sechs Einzelkolonien wurden zur Inokulation von je 10 mL LBK-Medium verwendet und nach Inkubation ü. N. unter Schütteln bei 37°C wurden die Plasmide nach Kap 2.3.2 isoliert und sequenziert (Kap. 2.3.2).

**Tabelle 2** Oligonucleotide zur Herstellung der Deletionsmutante  $\Delta 19\omega$

Primer	Sequenz	Schnittstelle
$\Delta 19\text{-NcoI}$	5'-CAT GCC ATG GGT GCA AAA AAA GAT-3'	NcoI
Rev-BamHI	5'-TCC CGG GAT CCC GTT AAA GTT TGT CAG-3'	BamHI

**Tabelle 3** Reaktionsansatz für die PCR

Substanz	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10 $\times$ <i>Pfu</i> Ultra Reaktionspuffer (Stratagene)	5
dsDNA- <i>template</i> (5-50 ng)	0,5-2
$\Delta 19\text{-NcoI-}i\text{primer}$ (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ) (Tab. 2)	1
Rev-BamHI- <i>primer</i> (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ) (Tab. 2)	1
dNTP-Mix (25 mM)	1
ddH <sub>2</sub> O	add 50
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{L}$ )	1

**Tabelle 4**

Temperaturprogramm für die PCR. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 Mal in einer Schleife durchlaufen und die PCR-Reaktion durch den 5. Schritt beendet.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	95	120
2	95	30
3	55	30
4	65	30
5	65	2

Aus der *multiple cloning site* eines TOPO- $\Delta 19\omega$ -Klons, der das  $\Delta 19\omega$ -Genfragment in der gewünschten Orientierung trug, wurde das  $\Delta 19\omega$ -Genfragment durch Verdau mit den Restriktionsenzymen NcoI und BamHI herausgeschnitten (Kap. 2.3.5) und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten Vektor pET28a (Novagen) nach Angaben des Herstellers für die T4-Ligase (New England Biolabs) ligiert. Zusätzlich zu den Kodons 20-71 des  $\omega$ -Repressors wurde ein Startkodon angefügt, so dass das erhaltene Konstrukt für das Protein Met19- $\omega$ (20-71) kodiert, das im Folgenden vereinfachend  $\Delta 19\omega$  genannt wird.

## 2.4 Proteinpräparation

### 2.4.1 Bakterienkultivierung

Zur Bakterienkultivierung wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, indem 100 mL LBA- oder LBK-Medium mit 10  $\mu$ L einer Glycerin-Stammkultur unter sterilen Bedingungen angeimpft wurden. Die Kulturen wurden ü. N. unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Die präparative Kultivierung erfolgte im 8 L Maßstab, indem acht 2 L Schikanekolben mit je 1 L LBA- bzw. LBK-Medium angesetzt wurden. Das Medium wurde mit je 10 mL einer Übernachtskultur der plasmidtragenden *E. coli* Zellen inokuliert. Während der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von etwa 0.6) wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM die Expression

induziert. Nach 2 h weiterer Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet ( $5.000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) und bis zum Zellaufschluss bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.2 Zellaufschluss

Die aufgetaute Bakterienpaste wurde im etwa dreifachen Volumen des Zellgewichts in Puffer-A resuspendiert. Pro 20 g Zellen wurde entweder eine Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail COMPLETE zugegeben oder die Suspension mit PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Zum Abbau von DNA wurden 2  $\mu\text{L}$  Benzonase (500 U) zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde zweimal in einer French<sup>®</sup> Press-Druckentspannungs-Anlage bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem Druck von etwa 100 bar aufgeschlossen.

### 2.4.3 Vorreinigung von $\Delta 19\omega$

Zunächst wurde die Gesamtmembranfraktion und Zelltrümmer der aufgeschlossenen Bakteriensuspension (Kap. 2.4.2) durch Zentrifugation ( $30.000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 min) vom Cytosol abgetrennt. Der Überstand wurde auf Reagenzgläser (10 mm  $\varnothing$ ) verteilt, und 10 min im Wasserbad auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt, wobei verbliebene Proteine des heterologen Wirts denaturierten (Fabry *et al.*, 1988). Nach dem Erhitzen wurden die Ansätze auf RT abgekühlt, anschließend vereinigt und zentrifugiert ( $30.000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 min).

### 2.4.4 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Anionenaustausch-Chromatographie beruht auf der elektrostatischen Bindung der Proteinkationen an die negativ geladenen funktionellen Gruppen des chemisch inerten Säulenmaterials. Die Proteinkationen werden im Laufe der Reinigung reversibel durch die im Elutionspuffer enthaltenen Kationen verdrängt. Der pH-Wert ist so zu wählen, dass das zu reinigende Protein in seiner kationischen Form vorliegt.

#### 2.4.4.1 Kationenaustausch-Chromatographie an Phosphocellulose

Die Phosphocellulose wurde nach Angaben des Herstellers (Whatman) vorbereitet. Der Überstand der Hitzedenaturierung wurde mit Hilfe von Sterilfiltern (0,22 µm Porengröße, Millipore) von Schwebstoffen befreit und bei einer Flussrate von 0,7 mL/min auf die mit Puffer-A äquilibrierte Phosphocellulose-Säule (CV = 60 mL, XK-Säulenkörper mit 26 mm Ø, GE Healthcare) aufgetragen. Zur Abtrennung ungebundener Proteine wurde mit Puffer-A bis zu einer konstant niedrigen Absorption gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0,05 - 1 M NaCl in Puffer-A über ein Volumen von 10  $V_t$  bei einer Flussrate von 0,7 mL/min eluiert. Die Bestimmung des Proteingehalts in den Fraktionen gelang anhand der bei 215 und 280 nm aufgezeichneten Chromatogramme und mit Hilfe analytischer SDS-PAGE (Kap. 2.2.1). Gewünschte proteinhaltige Fraktionen der Phosphocellulose-Chromatographie wurden auf 2 mL konzentriert (Kap. 2.4.5) und bis zum anschließenden Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin bei 4°C aufbewahrt.

#### 2.4.4.2 Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin

Es wurde POROS 20HE Heparin-Säulenmaterial (Perceptive Biosystems) in einem 1,7 mL Peek-Säulenkörper (Perceptive Biosystems) verwendet. Die Chromatographie wurde mit Hilfe einer BioCad Chromatographieanlage durchgeführt. Die auf 2 mL konzentrierte Proteinprobe der Phosphocellulose-Reinigung (Kap. 2.4.4.1) wurde mit Puffer-A im Verhältnis 1:10 verdünnt und mit einer Flussrate von 5 mL/min auf die zuvor mit 5 CV Puffer-A äquilibrierte Säule aufgetragen. Bei einer konstanten Flussrate von 6 mL/min wurde die gebundenen Proteine nach dem Auswaschen ungebundener Proteine durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0,05 - 1 M NaCl in Puffer-A über ein Volumen von 20 CV eluiert. Die gewünschten proteinhaltigen Fraktionen der Chromatographie wurden auf 25 mg/mL konzentriert.

#### 2.4.5 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinfraktionen wurden durch Ultrafiltration in Zentrifugal-Konzentrationszellen (Fa. Millipore) über Membranen mit Ausschlussgrenzen von 3 kDa und 10 kDa konzentriert. Vorbehandlung der Konzentratoren und Zentrifugation erfolgten nach den Angabe des Herstellers.

### 2.4.6 Gelpermeations-Chromatographie

Zur Proteinreinigung wurde eine HiLoad™-16/60-Superdex75 Chromatographie-Säule (CV = 110 mL) verwendet, deren Trennleistung sich über einen Bereich von 3 bis 75 kDa erstreckt. Die Chromatographie wurde mit Hilfe eines ÄKTA-FPLC-Systems bei 4°C durchgeführt. Nach Äquilibration der Säule mit 2 CV GPC-Puffer wurden über einen Injektor maximal 2 mL einer steril filtrierten (Porengröße: 0,22 µm) Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0.9 mL/min. Zur Detektion von WT ω- und Δ19ω-Protein wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 215 nm aufgezeichnet, während für die Detektion von Protein-DNA-Komplexen die Absorption bei 215 als auch bei 260 nm verfolgt wurde. Wurde WT ω- oder Δ19ω-Protein für die Herstellung von DNA-Komplexen eingesetzt, wurden die proteinhaltigen Fraktionen des Gelfiltrationslaufes auf 20 mg/mL konzentriert (Kap. 2.4.5), die Probe mit Puffer-GF 1:5 verdünnt und erneut auf 20 mg/mL konzentriert.

### 2.4.7 Herstellung von Doppelstrang-DNA

Die verwendeten Oligodesoxyribonucleotide wurden größtenteils von Dr. Werner Schröder (Institut für Kristallographie, FU Berlin) hergestellt. Ansonsten wurden Oligonucleotide bei MWG Biotech (Ebersberg) oder bei TIB Molbiol (Berlin) in Auftrag gegeben.

Zur Herstellung von Doppelstrang-DNA (dsDNA) wurde eine Lösung aus äquimolaren Mengen zweier komplementärer DNA-Einzelstränge (ssDNA) so in Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl) gemischt, dass die DNA-Konzentration 5 mg/mL betrug. Anschließend wurde die Lösung im Thermoblock 2 min auf 90°C erhitzt und zur Hybridisierung ü. N. auf 4°C abgekühlt.

Mittels Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ (CV = 1 mL, GE Healthcare) wurde dsDNA von überschüssiger ssDNA abgetrennt. Die hybridisierten Oligonucleotide wurden dazu auf die mit Puffer-Q (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl) äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einem Gradienten von 0,1 – 1 M NaCl in Puffer-Q über ein Volumen von 30 CV eluiert. Dabei wurden maximal 2 mg DNA pro Lauf aufgetragen. Fraktionen, die dsDNA enthielten, wurden auf 1 mL konzentriert, 1:5 mit Puffer-GF verdünnt und erneut auf 1 mL konzentriert.

## 2.4.8 Herstellung von $\omega$ -DNA Komplexen

Da die verwendeten DNA-Fragmente zwei oder drei Heptaden als potentielle Bindungsstellen für  $\omega$ -Dimere aufweisen, wurde der Repressor in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1,1:1 von Repressor-Dimer:Heptade zugegeben, um eine vollständige Absättigung der vorhandenen Bindungsstellen zu erreichen. Repressor-dsDNA-Lösungen wurden in Puffer-GF 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann auf eine mit Puffer-GF äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad<sup>TM</sup> Superdex75 16/60, GE Healthcare) aufgetragen zu werden. Elution und Detektion erfolgten wie in Kap. 2.4.6 beschrieben. Fraktionen, die den Protein-DNA-Komplex enthielten, wurden auf 10,5 mg/mL konzentriert und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt.

## 2.5 Proteincharakterisierung

### 2.5.1 Konzentrationsbestimmungen

Proteinbestimmungen nach (Bradford, 1976) wurden mit Hilfe des Bradford-Essay Kits der Fa. BioRad nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Konzentrationen der Oligonucleotide wurden über ihre Absorption bei 260 nm bestimmt, der molare Extinktionskoeffizient wurde mit dem Programm Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/olgocalc.html>) berechnet.

### 2.5.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann die Masse von Makromolekülen bestimmt werden. Hierzu wird die möglichst salzfreie Proteinlösung mit einer organischen Matrix vermischt und auf einen Probenträger aufgebracht. MALDI-TOF Spektren wurden von Dr. Peter Franke (Institut für Biochemie, FU Berlin) und Dr. Sascha Sauer (MPI für molekulare Genetik, Berlin) aufgenommen.

Die Entsalzung der Proben erfolgte mit Hilfe von Zip-Tips (Entsalzungssäulchen von Millipore) nach Anleitung des Herstellers. Bestand die Probe aus Lösungen von Kristallisationsansätzen, die Protein-DNA-Komplexe enthielten, wurde von Dr. S. Sauer ein spezielles Protokoll zur Entsalzung der Probe angewendet.

### 2.5.3 Dynamische Lichtstreuung

Mit der Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann der hydrodynamische Radius der Moleküle in der Probe bestimmt, und damit die Modalität von Proteinen oder Protein-DNA-Komplexen in Lösung ermittelt werden. Liegt eine Probe monomodal vor, so ist die Wahrscheinlichkeit, sie kristallisieren zu können, wesentlich höher als bei polydispersen Systemen (D'Arcy, 1994; Ferre-d'Amare und Doudna, 1997).

Für die DLS wurden steril filtrierte Proben von 20  $\mu\text{L}$  mit einer Konzentration von 1 mg/mL eingesetzt und die Messungen nach Angaben des Herstellers (RiNA) durchgeführt.

Da die Bestimmung des Molekulargewichtes aufgrund des mittels DLS gemessenen hydrodynamischen Radius stark fehlerbehaftet ist, wurde lediglich die Anzahl der beobachteten Maxima herangezogen, um die Modalität der Probe zu beurteilen. Lage und Größe der Maxima werden vom verwendeten Programm mittels einer so genannten Autokorrelationsfunktion automatisch berechnet.

## 2.6 Kristallisation

Für die Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse sind Einkristalle der zu untersuchenden Probe notwendig. Für die Qualität der Kristalle sind neben Größe und Streuvermögen auch die Mosaizität und Widerstandsfähigkeit gegenüber Strahlenschäden ausschlaggebend.

Gängige Kristallisationsmethoden beruhen auf dem Prinzip, die Löslichkeit des Proteins durch verzögerte Erhöhung der Fällungsmittel-Konzentration zu verringern. Das Fällungsreagenz (anorganische Salze, organische Verbindungen) und das in Lösung befindliche Protein konkurrieren dabei um Wassermoleküle. Unter spezifischen Puffer- und Fällungsmittelkonzentrationen kann es zu Protein-Protein- bzw. DNA-DNA-Wechselwirkungen kommen, die zur Bildung von Kristallkeimen führen. Kristallkontakte, die auf Protein-DNA-Wechselwirkungen beruhen, werden in der Regel nicht beobachtet (Ducruix und Giegé, 1999). Eine ideale Kristallisations-Bedingung ist gegeben, wenn nur wenige Kristallkeime in einem labilen, übersättigten

Zustand des Systems gebildet werden. Das Wachstum der Keime erniedrigt die Proteinkonzentration in der Lösung; das System geht in einen metastabilen Zustand über, der lediglich das Kristallwachstum zulässt, nicht aber die Kristallkeimbildung (McPherson, 1990).

Für die Kristallisations-Experimente wurde die Dampfdiffusionsmethode verwendet (Ducruix und Giegé, 1999). Die Experimente wurden entweder in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen und Einwegeinsätzen mit 12 Vertiefungen oder in Kristallisationsplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. In den Zellkulturschalen wurden 500 - 700  $\mu\text{L}$  der so genannten Fällungsmittellösung in der Vertiefung vorgelegt. 2 - 4  $\mu\text{L}$  der zu kristallisierenden Probe wurden mit 2 - 4  $\mu\text{L}$  des Fällungsmittels auf einem silikonisierten Deckglas vermischt, das Deckglas anschließend umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt, so dass ein geschlossenes System entstand.

Zur Kristallisation im Format mit 96 Vertiefungen wurden 100  $\mu\text{L}$  Fällungsmittellösung vorgelegt, und in die vorgeformten Vertiefungen wurden 1  $\mu\text{L}$  der Probe und 1  $\mu\text{L}$  des Fällungsmittels gemischt. Zum Schluss wurde die Platte mit einem Plastikfilm (3M, Hampton research) versiegelt.

Die Kristallisationsansätze wurden in der Regel bei 18°C gelagert (in seltenen Fällen auch bei 4°C) und nach 1 – 3 Tagen auf Kristallwachstum untersucht.

### 2.6.1 Kristallisation in Kapillaren

Es wurden Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 0,3 und 0,5 mm verwendet. Die Fällungsmittellösung wurde auf 40°C erwärmt und mit 60°C warmer Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (LMP Agarose) bis zu einer Endkonzentration von 0,1% vermischt und bis in den sich verjüngenden Bereich der Kapillare gesaugt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das erstarrte Gel-Bett mit 10  $\mu\text{L}$  Protein-DNA-Lösung überschichtet. Die offenen Enden der Kapillare wurden anschließend mit Hartwachs verschlossen und die Kapillaren aufrecht stehend bei 18°C aufbewahrt. Für röntgenkristallographische Messungen wurden die Kapillaren an einem Goniometerkopf befestigt und senkrecht zum Röntgenstrahl justiert.

## 2.7 Kristallographische Methoden

### 2.7.1 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden nach der Rotationsmethode aufgenommen (Arndt und Wonacott, 1977). Die Kristalle wurden für die Messung entweder in Glaskapillaren montiert oder in Schlaufen schockgefroren. Im ersten Fall wurden die Kristalle mit etwas Mutterlauge oder Fällungsmittellösung in eine Quarzkapillare mit einem maximalen Durchmesser von 1,5 mm überführt und trockengelegt. Das Austrocknen der Kristalle wurde durch Flüssigkeitsreste an der Innenwand der Kapillare verhindert. Die Kapillare wurde mit Hartwachs luftdicht verschlossen und mit Hilfe eines Goniometerkopfes senkrecht zum Röntgenstrahl zentriert.

Im zweiten Fall wurden die Kristalle durch rasches Abkühlen schockgefroren. Falls erforderlich, wurden die Kristalle vorher schrittweise in 20 - 25% (v/v) Glycerin enthaltende Fällungsmittellösung überführt. Das Glycerin verhindert die Eisbildung beim Einfrieren. Litt die Kristallqualität unter der Verwendung von Glycerin, wurde auf eine andere Cryoschutzlösung zurückgegriffen, die z. B. Glucose, Trehalose, Glykol oder 2-Methyl-2,4-Pentadiol enthielt. Die Kristalle wurden anschließend mit Nylon-Schlaufen gefischt und entweder direkt in den 100 K kalten Stickstoffstrom gebracht oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Diffraktionsdaten wurden überwiegend an der hauseigenen Drehanode mit Imageplate-Detektor (mar345, MAR research, Norderstedt) oder den FU-eigenen Strahlrohren BL1 und BL2 des BESSY II in Berlin gemessen. Des Weiteren wurde am Strahlrohr ID14-2 des ESRF in Grenoble und an den Strahlrohren X11 und BW7 des DESY in Hamburg gemessen.

Die Reflexe der einzelnen Aufnahmen wurden mit dem Programm DENZO bzw. HKL2000 (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert und integriert. Anschließend wurden die Daten mit dem Programm SCALEPACK aufeinander skaliert und symmetrieäquivalente Reflexe gemittelt. Aus den Intensitäten wurden dann mit dem Programm TRUNCATE des CCP4-Programmpakets (CCP4, 1994) Strukturfaktor-Amplituden und ihre Standardabweichungen berechnet.

## 2.7.2 Strukturbestimmung

Aufgrund der fehlenden Phaseninformation bei Diffraktionsexperimenten ist neben der Kristallisation die Phasenbestimmung ein weiterer Flaschenhals der Röntgenstrukturanalyse. Das Phasenproblem und damit die Struktur eines kristallisierten Makromoleküls kann mit drei verschiedenen Methoden gelöst werden. Diese sind der multiple isomorphe Ersatz (MIR), die multiple Wellenlängen anomale Dispersion (MAD) und der Molekulare Ersatz. Da die Strukturen der  $\omega$ -DNA Komplexe mittels Molekularen Ersatzes gelöst wurden, wird diese Methode im Folgenden eingehender beschrieben.

### 2.7.2.1 Molekularer Ersatz

Erstmals wurde die Methode des Molekularen Ersatzes von Rossmann und Blow (1962) angewendet. Sie benötigt eine zu dem zu untersuchenden Makromolekül ähnliche Struktur, die bereits bekannt ist. Die Lokalisierung eines Moleküls in der Zieleinheit zelle bedarf einer genauen Orientierung und Positionierung, d. h., eine Rotationsmatrix und ein Translationsvektor werden für eine exakte Positionierung benötigt. Diese Lokalisierung erfolgt im Pattersonraum. Da im Pattersonraum Vektoren zwischen zwei realen Atomen des realen Raumes als Vektor vom Ursprung aufgetragen werden, können diese im Falle von Molekülkristallen in zwei Gruppen unterteilt werden: Intramolekulare Vektoren stellen Vektoren von Atompaaren eines Moleküls dar. Diese sind verhältnismäßig kurz und nahe des Ursprungs im Pattersonraum zu beobachten. Intermolekulare Vektoren sind länger und deshalb im Pattersonraum weiter vom Ursprung entfernt.

Die Maxima der intramolekularen Vektoren liegen im Pattersonraum also um den Ursprung und zeichnen einen Radius, der den Dimensionen des Moleküls entspricht. Liegen mehrere identische Untereinheiten in der asymmetrischen Einheit vor, so ist die Verteilung der intramolekularen Vektoren für alle Moleküle die Gleiche, doch sind sie je nach unterschiedlicher Orientierung unterschiedlich gegeneinander rotiert. Maximale Übereinstimmung liegt vor, wenn die Pattersonfunktion des untersuchten Moleküls mit der korrekt rotierten Pattersonfunktion eines bekannten, homologen Suchmoleküls überlagert wird.

Anschließend folgt die Translation der Pattersonvektoren ausgehend vom Ursprung der Elementarzelle. Dabei wird das Molekül schrittweise in der asymmetrischen Einheit bewegt. Für jede mögliche Ursprungswahl wird nach einer Fouriersumme die Übereinstimmung mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden überprüft und mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten und des R-Wertes die Güte der Lösung widerspiegelt. Als Faustregel gilt, dass bei einer 50%igen Identität der Aminosäuresequenzen zweier Proteine die Strukturen ungefähr zu 80 % übereinstimmen (Chothia *et al.*, 1989). Bei geringerer Aminosäuresequenzidentität sinkt die Strukturähnlichkeit und kann die Strukturlösung mittels Molekularen Ersatz erschweren.

Die Strukturbestimmung der  $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexe erfolgte mit den Programmen PHASER (Storoni *et al.*, 2004) und MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997). Dabei wurden für das Programm PHASER die voreingestellten Parameter für die Anisotropiekorrektur der Röntgendaten sowie die Protokolle für die Rotations-, Translationssuche und Starre-Körper-Verfeinerung angewandt. Für den molekularen Ersatz wurden Diffraktionsdaten in einem Auflösungsbereich von 20 bis 3.5 Å verwendet. Alle anderen Parameter wurden aus den Beispiel-Daten des Programms übernommen. Die Struktur des  $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexes in der Raumgruppe C2 wurde mit einem modellierten Startmodell gelöst (siehe Ergebnisse). Die Struktur des MetJ-DNA-Komplexes (PDB Eintrag 1CMA) diente dabei als Ausgangsbasis für die Modellierung des Suchmodells.

Die Kristallstruktur des  $\omega$ -DNA-Komplexes in der Raumgruppe  $P2_1$  wurde unter Verwendung des Programms MOLREP und unter Zuhilfenahme des verfeinerten Modells des  $\Delta 19\omega$ -DNA-Komplexes der Raumgruppe C2 bestimmt.

Da aus den Diffraktionsdaten nur das Kristallsystem (z. B. primitiv oder orthorhombisch), nicht aber die Raumgruppe ( $P2$  oder  $P2_1$ ) bestimmt werden konnte, wurde die korrekte Raumgruppe anschließend anhand der Korrelationskoeffizienten des Programms MOLREP bestimmt.

Die erhaltenen Lösungen für die Rotations- und Translationssuche wurden unter Verwendung des Programms PDBSET (CCP4, 1994) auf das Suchmodell angewendet, um anschließend mit dem Programm O (Jones, 1978) die Kristallpackung darzustellen.

### 2.7.2.2 Verfeinerung und Modellbau

Ziel der Verfeinerung ist es, ein atomares Strukturmodell mit einer möglichst guten Geometrie zu erhalten, welches die experimentell bestimmten Daten optimal erklärt. Dazu wird die Differenz zwischen gemessenen ( $F_o$ ) und anhand des Modells berechneten Strukturfaktoramplituden ( $F_c$ ) minimiert. Zur Lösung dieses Problems gibt es verschiedene rechnerische Ansätze. In der vorliegenden Arbeit wurden die Modelle nach der Methode der Maximalen-Wahrscheinlichkeit mit Hilfe des Programms REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) und nach der aus der Moleküldynamik entlehnten Methode des *simulated annealing* mit dem Programmpaket CNS (Brunger *et al.*, 1998) verfeinert.

Mit dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Programm REFMAC5 werden die zu verfeinernden Parameter durch eine Energiefunktion beschrieben. Neben der potentiellen Energie des Systems, welche die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen berücksichtigt, geht in diese Energiefunktion ein Pseudo-Energieterm ein, der die Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden beschreibt. Zur Berechnung der potentiellen Energie wurde ein Kraftfeld benutzt, das auf geometrische Parameter zurückzuführen ist, die speziell zur Verwendung in der Proteinkristallographie aus hochaufgelösten Kristallstrukturen von Aminosäuren und Polypeptiden ermittelt wurden (Engh und Huber, 1991; Parkinson *et al.*, 1996b).

Die mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) berechneten  $2F_o - F_c$  bzw.  $F_o - F_c$  Elektronendichtekarten dienten für den manuellen Modellbau und Korrekturen der Protein-DNA-Modelle mit Hilfe des Programms O (Jones, 1978).

### 2.7.2.3 Koordinatenanalyse und Abbildungen

Überlagerungen von Atomkoordinaten wurden mit dem Programm LSQKAB (Kabsch *et al.*, 1976) durchgeführt, die Bewertung der stereochemischen der Qualität der Proteine erfolgte mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996). Zur Darstellung von Rotationsachsen bzw. pseudo-zweizähligen Rotationsachsen wurden zum Beispiel die beiden Untereinheiten eines Dimers zunächst überlagert und anschließend anhand der erhaltenen Rotations- und Translationsmatrix mit dem Programm MATCON (W. Bennett, nicht

veröffentlicht) die Rotationsachse berechnet. Die Geometrien der DNA wurde mit den Programmen 3DNA (Lu und Olson, 2003) und Curves (Lavery und Sklenar, 1988; Lavery und Sklenar, 1989; Ravishanker *et al.*, 1989) berechnet. Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme Molscript (Kraulis, 1991), Raster3D (Merritt und Bacon, 1997) und der grafischen Benutzeroberfläche MOLDRAW (Prof. Norbert Sträter, Universität Leipzig, nicht veröffentlicht) erstellt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm MSMS (Sanner *et al.*, 1996a) generiert, während das elektrostatische Potential von Proteinoberflächen mit dem Programm DELPHI berechnet wurde (Honig und Nicholls, 1995).