

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Alle verwendeten und nicht gesondert ausgeführten Chemikalien besitzen Analysequalität und wurden von Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen.

ADP	NEB ( <i>New England Biolabs</i> )
AMPPCP (Adenosin 5'-( $\beta,\gamma$ -methylen) Triphosphat	NEB
APS (Amoniumperoxidisulfat)	
ATP	NEB
ATP- $\gamma$ -S (Phosphothiophosphor Säure-Adenylat Ester)	NEB
Bromphenolblau	Serva
DNA Marker	NEB
Proteinmarker Broad Range 2-212 KDa	NEB
<i>Protease-Inhibitor-Cocktail Complete</i>	Roche
2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD)	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Polyethylenglykol (PEG) (Mw = 200- 20.000 Da)	Sigma-Aldrich, Merck
EDTA	Merck
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethanesulfon Säure	Merck
Temed (N, N, N',N'-Tetramethyldiamid	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
Glyzerin	Merck
TRIS	Roth
Perchlorsäure	Merck
Seleno-D,L-Methionin	SIGMA
Paraffinöl dünnflüssig	Roth
Ethidiumbromid	SIGMA
Biotin	Merck
d(NTP)	NEB
Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	Bio Tech Trade& Service GmbH
<b>Enzyme, Puffer und Proteine</b>	
EcoRI	NEB
NcoI	NEB
BamHI	NEB
BamHI-Puffer	NEB
Vent-DNA-Polymerase	NEB
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	<i>Stratagene</i>
T4-Ligase	NEB
T4-Ligase-Puffer	NEB
BSA ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )	NEB
<b>Bakterienstämme und Plasmide</b>	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Novagen</i>
<i>E. coli</i> BL21	<i>Novagen</i>
<i>E. coli</i> ER2566	NEB

pT7_7	MPI-Berlin (Erich Lanka)
PCR Blunt TOPO	Invitrogen
pBT291	F. Pratto
pUC57	F. Pratto
pUC	F. Pratto

**Kits**

<i>Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>QIA PCR Purification Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>Crystal-Screen I</i>	<i>Hampton Research</i>
<i>Crystal-Screen II</i>	<i>Hampton Research</i>
<i>Index-Screen</i>	<i>Hampton Research</i>
<i>Natrix-Screen</i>	<i>Hampton Research</i>
Salz RX	<i>Hampton Research</i>
<i>MPD-Screen</i>	<i>Jena-Bioscience</i>
<i>Additiv Screen 1-4</i>	<i>Hampton Research</i>

**Nährmedien**

LB-Medium	Caseinpepton	10g/L	Serva
	NaCl	5g/L	Merck
	Hefeextrakt	5g/L	Serva
	pH (RT, 1M NaOH)	7,5	
LBA-Medium	LB-Medium mit Ampicillin		100µg/mL
LBK-Medium	LB-Medium mit Kanamycin		40 µg/mL
LBA-Agar	LB-Medium		
	mit Agar-Agar	15g/L	Roth
	mit Ampicillin	100µ/L	Roth

**Proteinreinigung**

Alle verwendeten Puffer wurden mit Hilfe von 0,22 µm Filtern steril filtriert und anschließend entgast.

**Vorreinigung**

Zellaufschluss-Puffer (PufferA)	50 mM Tris-HCl pH 8.0
	50 mM NaCl
	2 mM EDTA

**Kationenaustausch-Chromatographie**

Puffer A

POROS 20HE (Heparin)

*Applied Biosystems*

**Anionenaustausch-Chromatographie**

Puffer B	50 mM Tris-HCl pH 8.0
	1 M NaCl
	2 mM EDTA

POROS PL\_SAX (*Polymer Laboratories*)

**Gelpermeations-Chromatographie (GPC)**

Puffer GPC	20 mM Tris-HCl pH 8.0
	200 mM NaCl

HiLoad™ Superdex S75 16/60	<i>GE Healthcare</i>
HiLoad™ Superdex S200 16/60	<i>GE Healthcare</i>

**Ultrafiltration**

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

**Proteinbestimmung**

Quick Start Bradford Protein Assay Kit      Biorad

**Kristallisation**

Schalen mit 96 wells (Vertiefungen)	<i>Greiner BioOne</i>
Schalen mit 24 wells, Linbro Zellkultur- Box	<i>Flow Laboratories</i>
Plastik Film 3M	<i>Hampton Research</i>
Nylon-Schlaufen (Mounted Cryo Loops)	<i>Hampton Research</i>
Deckgläser 22 x 22 mm, Stärke 2	Laborhandel
Glaskapillaren	Glas Müller (Berlin)
Quarzkapillaren	Glas Müller (Berlin)

**Geräte**

PCR- <i>Termocycler</i> Tpersonal,	<i>Biometra</i>
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer QS710	Kodak Biomax
ÄKTA Chromatographiesystem	<i>GE Healthcare</i>
DLS-Apparatur <i>Laser Spectroscatter</i> 201	RiNa GmbH
Fraktionssammler SF2120	<i>Applied Biosystems</i>
Binocular Mikroskop SZ60	Olympus
PAGE-Elektrophorese Apparatur	<i>Biometra</i>
French® <i>Pressure Cell Press</i>	<i>Sim Aminco</i>
Mar345 <i>Image Platte</i>	<i>mar-Research</i>
Röntgengenerator FR-571	Enraf-Nonius
<i>Cryosystem</i>	Oxford
UV-VIS-Spektrometer	Shimadzu RF 5000
CD-Spektrometer	Jasco Model 600
Photometer	
Tisch Zentrifuge RT	
Tisch Zentrifuge 4°C	
Ultrazentrifuge	
Ti60 Rotor	
GSA Rotor	
RC560	
Inkubationsschrank 37°C	
Schüttler 37°C	

## 2.2 Biochemische und molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die rekombinierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die 1 %igen Agarose-Gele wurden in folgender Weise angesetzt:

Agarosegel (1 %):

1 %	Agarose NEE0 (w/v)
40 mM	Tris-Base
1.42 %	Eisessig (v/v)
1 mM	EDTA (pH 8.0)

Durch Aufkochen wurde die Agarose-Suspension gelöst und in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Nach Zugabe von Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml erfolgte die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V.

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 Länge der DNA-Fragmente wurde durch einen Vergleich mit 100 bp-DNA-Marker-Fragmenten bestimmt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht in einer Geldokumentations-Anlage erfasst und ausgewertet.

## 2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) (Laemmli, 1970) wurden Protein-Proben auf ihren Reinheitsgrad überprüft. Die SDS-PAGE wurde mit 15 %igen Trenngelen und 3 %igen Sammelgelen durchgeführt. Pro Proben tasche wurden in der Regel 5-20 µg Protein aufgetragen. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben (1-10 µl) mit einem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und 2 min auf 95° C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 170 V durchgeführt. Sobald die Lauffront die untere Gelkante erreichte, wurden die Gele der Kammer entnommen. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen wurden sie in einer Coomassie-Färbelösung für 10 min gefärbt und anschließend in erhitztem Wasser entfärbt.

Trenngel (15 %):

281.25 mM	Tris-HCl pH 8.8
0.08 %	Laurylsulfat (w/v)
46.88 %	Rotiphorese Gel30 (v/v)

Sammelgel (3 %):

93.75 mM	Tris-HCl pH 6.8
0.8 %	Laurylsulfat (w/v)
10.05 %	Rotiphorese Gel30 (v/v)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.05 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin und 0.05 % (v/v) Amoniumperoxidisulfat (APS) 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 %	Glyzerin (v/v)

## Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris-HCl pH 8.3
1.44 %	Glycin (w/v)
0.1 %	Laurylsulfat (w/v)

## Coomassie-Färbelösung:

0.5 %	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> G250 (w/v)
6.25 %	Ethanol (v/v)
4.25 %	Perchlorsäure (v/v)

## 2.3 Gentechnische Methoden

### 2.3.1 Primer-Design

In der Gentechnik werden sowohl für die Überprüfung von DNA-Anschnitten als auch für die Mutagenese *Primer* bzw. DNA-Oligonucleotide benötigt. Das *Primer-Design* erfolgte nach den Empfehlungen von White (1993), und das Programm *Oligonucleotide Properties Calculator* wurde für die Erfüllung der Vorgaben verwendet. Die sowohl für die Sequenzierung als auch für die Herstellung der Konstrukte benötigten *Primer* wurden von Dr. Werner Schröder (Institut für Kristallographie, FU Berlin) synthetisiert.

**Tab. 2** Oligonukleotide zur Herstellung von pT7-7-wt *delta*

Primer	Sequenz	Schnittstelle
Delta- <i>frwd</i> :	5'-CCCGGGCATATGATACAATATTACTATACAA-3'	NdeI
Delta- <i>rev</i> :	5'-GGCCCGGATCCGGACTATTCTTTTCGTT-3'	BamHI
Delta- <i>Mid</i> :	5'-TCCCTTTACAAGCAGAAGAAGAAAGTACAAACAA-3'	_____

### 2.3.2 PCR

Die benötigten DNA-Fragmente wurden mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) an einer Matrizen-DNA gemeinsam mit *Primern* synthetisiert. Zur Vervielfältigung der DNA können DNA-Abschnitte in einen Klonierungsvektor eingebaut oder mit dem Enzym Polymerase amplifiziert werden. Die PCR-Methode ahmt die DNA-Synthese nach. Zunächst erfolgt der Schritt der DNA-Denaturierung (Separierung des DNA-Doppelstranges in seine

beiden Einzelstränge). Daraufhin lagern sich in der Phase des „*Annealings*“ die Primer an die DNA-Einzelstränge an (Kapitel 2.3.1). Bei den Primern handelt es sich um kurze, zur Zielsequenz komplementäre Einzelstrang-DNA-Moleküle (Oligonukleotide), die den zu amplifizierenden Abschnitt an beiden Seiten flankieren.

In einem nächsten Schritt werden die DNA-Stränge in Gegenwart der DNA-Bausteine (einem Gemisch der Desoxynukleosid-Triphosphate dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und dem Enzym DNA-Polymerase (*Pfu*-, *Taq*- oder *Vent*-Polymerase) verlängert (Extension). Aufgrund der Thermostabilität der DNA-Polymerase kann das Reaktionsgemisch auf 96° C erhitzt werden, um den neu synthetisierten DNA-Abschnitt von der Matrize zu lösen. So wird eine neue DNA-Synthese-Runde eröffnet, und jeder weitere PCR-Schritt verdoppelt die Anzahl der DNA-Fragmente, wodurch die DNA-Menge exponentiell zunimmt.

Bei den beiden ersten Amplifikationsschritten entstehen ausschließlich DNA-Stränge, die länger sind als die definierte Zielsequenz. Erst ab dem dritten Zyklus erhält man Amplifikate definierter Länge. Nach etwa 30 bis 40 Zyklen (siehe Tabelle 4) werden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.1) aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Reaktionsansätze wurden kurz bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und die nicht-mischbaren Phasen zu trennen. Das Paraffinöl diente als Kondensationsschutz während der PCR-Thermyklen.

**Tab. 3** Reaktionsansatz für PCR

Substanz	Volumen (µL)
10x <i>Pfu</i> Ultra Reaktionspuffer	5
Template-dsDNA (20-50 ng)	1-2
Delta-NcoI-frwd <i>primer</i> (25 pmol/ µL)	1
Delta-BamHI-rev <i>primer</i> (25 pmol/ µL)	1
dNTP-Mix (25 mM)	1
ddH <sub>2</sub> O	auf 50
<i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/ µL)	1

Matrix-DNA (Template dsDNA) wurde aus angezogenen Plasmid-DNA-enthaltenden *E. coli* Zellen nach Standardmethoden (Plasmid Midi Purification Kit, Qiagen, Hilden) isoliert.

Das Resultat der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.1) überprüft und das amplifizierte DNA-Fragment aus dem Gel nach Kapitel 2.3.4 isoliert und für die weitere Behandlung bereitgestellt

**Tab. 4** PCR-Thermozyklen. Die Schritte 2 bis 4 wurden in einer Schleife 30 Mal durchlaufen, die PCR-Reaktion durch den Schritt 5 beendet und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit[s]
1	95	300
2	95	30
3	55	30
4	72	30
5	72	300
6	4	∞

### 2.3.3 Restriktion, Ligation und Transformation

Restriktionsenzyme sind in der Lage, dsDNA (Doppelstrang DNA) unter Hydrolyse von Phospho-di-ester-Bindungen zu spalten (McClarin *et al.*, 1986). Die Typ-II Restriktionsendonukleasen, die in der Molekularbiologie eingesetzt werden, spalten im Gegensatz zu Typ-I- und Typ-III-Restriktionsenzymen DNA spezifisch nur innerhalb einer 4-8 bp langen, meist palindromischen Erkennungssequenz. Für jedes Enzym wurde der vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlene Puffer verwendet, so dass optimale Bedingungen für einen Restriktionsverdau bereitstanden. In der folgenden Tabelle wurde ein typischer Restriktionsansatz aufgeführt.

**Tab. 5** Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes.

Substanz	Volumen (µL)
dsDNA-Lösung (PCR-Produkt oder Vector)	15
10x Reaktionspuffer	3
Restriktionsenzym 1 (10 U/ µL)	1
Restriktionsenzym 2 (10 U/ µL)	1
ddH <sub>2</sub> O	auf 30

Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für 2 h (siehe Tabelle 5). Die Ligation erfolgte bei 18° C für 4-6 h (siehe Tabelle 6). Das erhaltene Konstrukt wurde in den proteasedefizienten *E. coli*-Expressionsstamm ER2566 transformiert und auf LBA-Agar-Platten selektiert.

**Tab. 6** Der Ligationsansatz

Substanz	Volumen (µL)
Restriktions-Endonuklease-behandeltes PCR-Produkt	20
Restriktions-Endonuklease EcoRI behandeltes pT7-7	3
T4 DNA Ligationspuffer	3
T4 DNA Ligase (≅ 800 U)	2
ddH <sub>2</sub> O	auf 30

### 2.3.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die durch PCR und Restriktionsverdau erzeugten DNA-Fragmente bzw. Plasmide wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick<sup>®</sup>-Gelextraction-Kit (Qiagen) verwendet. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte nach der Anleitung des Kit-Herstellers. Die in der Lösung befindliche DNA wurde anschließend auf eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen und mit 30  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.3.5 Plasmid-Isolierung und Sequenzierung

Die für die Sequenzierung und Transformation benötigte Plasmid-DNA wurde erst durch Plasmidpräparation aus Bakterienzellen mit Hilfe von QIAquick Plasmid Miniprep Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert und anschließend lyophilisiert.

Plasmid-Sequenzierungen nach Sanger (Sanger, *et al.*, 1977) wurden bei der Fa. GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Programm BioEdit (*Ibis Therapeuticus*) ausgewertet.

### 2.3.6 Klonierung von ORF $\delta$

Das *delta*-Gen ( $\delta$ ) wurde von Prof. Dr. J. C. Alonso zur Verfügung gestellt. Um das Konstrukt pT7-7- $\delta$  herzustellen, wurden die in der Tabelle 2 aufgeführten Primer entworfen. Mit Hilfe von diesen Primern wurde das Gen *delta* aus dem Vektor pBT291 (F. Pratto, Spain) in einem PCR-Ansatz (siehe Tabelle 3) unter Anwendung des PCR-Zyklus-Programms (siehe Tabelle 4) gelesen bzw. als DNA-Fragment erzeugt. Das amplifizierte DNA-Fragment (897 bp) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend mittels Gelextraktionskit aus dem Agarosegel extrahiert. Die Ligation des Fragmentes in den PCR-Blunt TOPO Vektor erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem TOPO-Klonierung Kit (Invitrogen). *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden mit dem Konstrukt TOPO- $\delta$  durch Elektroporation transformiert (Kapitel 2.3.3).

Um die Expression zu verbessern, wurde das  $\delta$ -Gen mit der Restriktionsendonuklease EcoRI aus dem Vektor PCR-Blunt-TOPO Vektor herausgeschnitten und in die mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnittene MCS (*multiple cloning site*) des Vektors pT7-7 (bereitgestellt von Prof. Dr. E. Lanka, MPI, Berlin) ligiert (siehe Kap. 2.3.5). Dieser Vektor hat den Vorteil, den sehr effizienten T7 Promotor zu tragen. Als Selektionsmarker diente Ampicillinresistenz. In dem verwendeten Plasmid pT7-7-

$\delta$  befindet sich die Expression des Proteins unter der Kontrolle des Lactose-Operon-Promotors, dessen *lac*-Repressor durch das Substratanalogon Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG) induziert werden kann.

### 2.3.7 Herstellung von bakteriellen Stammkulturen

Die durch Klonierung erzeugten Konstrukte wurden in den jeweiligen Bakterienstamm durch Transformation eingebracht. Um die Bakterienstämme für eine lange Zeit aufzubewahren, wurden die so genannten Glycerin-Stammkulturen angelegt. Zur Herstellung von Stammkulturen wurden vier Einzellkulturen aus der LBA-Agar-Platte mit Hilfe eines Impfstabes unter sterilen Bedingungen in einzelnen Glasröhrchen mit 3 mL LBA-Medium inokuliert. Die Kulturen wurden ü. N. unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurden am nächsten Tag Schikanenkolben mit 100 mL LBA-Medium in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und unter Schütteln bei 37 °C wachsen gelassen, bis die logarithmische Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  von ca. 0.6) erreicht worden war. Aus diesen Log-Phasen-Bakterienkulturen wurde 500  $\mu$ L Bakteriensuspension mit 500  $\mu$ L Glycerin-Rein (96 %) unter Vortexen zusammengemischt und bei -80 °C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

## 2.4 Proteinpräparation

### 2.4.1 Bakterienkultivierung

Zur Bakterienkultivierung wurden aus den Glycerin-Kulturen zuerst Vorkulturen hergestellt, indem eine LBA-Agar-Platte mit 50  $\mu$ L Glycerin-Kultur unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert wurde, sodass anschließend einzelne Kolonien erkennbar wurden. Aus der LBA-Agar-Platte wurden 5 einzelne Kolonien in die Schikanenkolben mit 100 mL LBA-Medium als Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C ü. N. inkubiert.

Die Kultivierung erfolgte im 8 L Maßstab, indem 2 L Schikanenkolben mit je 1 L LBA-Medium angesetzt wurden. Das Medium wurde mit je 10 mL einer ü. N. Kultur der pT7-7 $\delta$  tragenden *E. coli* ER2566 Zellen inokuliert und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  von ca. 0.6), bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen. Die Expression des  $\delta$ -Proteins erfolgte durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM (Induktion). Ab dem Zeitpunkt wurde die Induktion 2 h weiter verfolgt, indem die Abnahme der ersten Probe ( $t_0$ ) gleichzeitig und weitere Proben ( $t_1$  und  $t_2$ ) zur Überprüfung der Expression in zeitlichen Abständen von 1 h abgenommen wurden. Nach 2 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (GSA-Rotor, 6000 x g, 15 min, 4 °C) aus dem

---

Medium getrennt und in Puffer A resuspendiert und bis zum Zellaufschluss bei -80 °C in Falcon-Röhrchen aufbewahrt.

### 2.4.2 Zellaufschluss mittels French<sup>®</sup>-Press

Die zwei auf Eis aufgetauten Zellsuspensionen wurden im ca. dreifachen Volumen des Zellgewichtes im Puffer A mit Hilfe einer 5 mL Pipette verdünnt und resuspendiert. Zur Inhibierung vieler Proteasen wurde zur Zellsuspension pro 20 g Zellmasse eine *Protease-Inhibitor-Coctail (COMPLETE)* zugegeben und resuspendiert. Die Bakterienzellsuspension wurde anschließend zweimal in einer French<sup>®</sup>-Press-Druckentspannungs-Anlage (*SLM Instruments, INC.*) auf Eis mit einem Druck von etwa 100 bar aufgeschlossen.

### 2.4.3 Auftrennung der Zellbestandteile mittels Ultrazentrifugation

Da das  $\delta$ -Protein als eine im Cytosol befindliche ATPase vermutet wurde, wurden zunächst die gesamte Membranfraktion und andere Zellbestandteile der aufgeschlossenen Bakteriensuspension durch Ultrazentrifugation (Ti 60 Rotor, 60.000 x g, bei 4 °C, 1 h) vom Cytosol abgetrennt. Der Überstand der pelletierten Zellbestandteile wurde mit Hilfe von Sterilfiltern (0.45  $\mu$ m und 0.22  $\mu$ m Porengröße, Millipore) von Partikeln befreit.

### 2.4.4 Ionenaustausch-Chromatographie

Einer der kritischen Schritte in der Protein-Kristallographie ist die Aufreinigung eines überexprimierten Proteins. Eine wichtige Methode ist hierbei die Affinität-Chromatographie, bei der an das zu reinigende Protein molekulargenetisch ein s. g. Tag (Ausläufer) angehängt wird, welcher dann mit dem Säulenmaterial während der Aufreinigung chemisch interagieren kann (HisTag mit Hilfe von Ni-Agarose) bzw. an das Säulenmaterial bindet und so das aufzureinigende Protein gezielt auftrennt. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die Ionenaustausch-Chromatographie als Methode verwendet.

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Nettoladung. Letztere wird in Abhängigkeit vom pH-Wert durch den isoelektrischen Punkt (IEP) bestimmt. Liegt der pH-Wert oberhalb der IEPs, ist die Nettoladung des Proteins negativ. Liegt der pH-Wert jedoch unterhalb der Nettoladung, dann ist das Protein positiv geladen. Die Trennung der Proteine beruht auf ihrer reversiblen Bindung an die entgegengesetzt geladenen funktionellen Gruppen der Ionenaustauscher-Matrix. Sie verdrängen dabei die Gegen-Ionen (Salz-Ionen), mit welchen der Austauscher vorher bei niedriger Ionen-Stärke equilibriert wurde. Für die Trennung von anionischen

Proteinen wird eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt, bei kationischen Proteinen eine Kationenaustausch-Chromatographie.

Die Elution der Proteine von der Matrix wird erreicht, indem entweder die Ionenstärke des Elutionspuffers erhöht (steigende Konzentration der Gegen-Ionen) oder der pH-Wert des Elutionspuffers vermindert wird. Binden die zu trennenden Proteine unter den gegebenen Bedingungen unterschiedlich stark an die Matrix, so können sie in getrennten Fraktionen isoliert werden.

#### **2.4.4.1 Kationenaustausch-Chromatographie an Heparin**

Das POROS 20HE Heparin-Säulenmaterial (*Applied Biosystems*) wurde nach Angaben des Herstellers (*Applied Biosystems*) vorbereitet. Das Heparin-Säulenmaterial wurde in einem 6.7 mL Peek-Säulenkörper (*Applied Biosystems*) verwendet. Die Säulen-Chromatographie wurde mit Hilfe einer ÄKTA-Chromatographieanlage durchgeführt.

Die steril filtrierte Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 10 mL/min auf die zuvor mit 3 CV (CV für Säulen-Volumen = *Column volume*) Puffer A äquilibrierte Säule aufgetragen. Bei einer konstanten Flussrate von 7 mL/min wurden die gebundenen Proteine nach dem Auswaschen ungebundener Proteine durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0.05-1 M NaCl gemischt und aus Puffer A und Puffer-B in 5 mL Fraktionen eluiert. Das  $\delta$ -Protein enthaltene Proteingemisch eluierte in einem Bereich, der einer NaCl-Konzentration von 350-400 mM entsprach. Diese Fraktionen wurden vereinigt und anschließend mit 50 mM Tris-HCl pH 8.0 in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt, um die NaCl-Konzentration der proteinhaltigen Lösung auf 50 mM einzustellen und sie so für den 2. Chromatographieschritt (Kapitel 2.4.4.2 PL\_SAX) vorzubereiten.

#### **2.4.4.2 Anionenaustausch-Chromatographie an PL\_SAX**

Der zweite chromatographische Schritt diente der Konzentrierung des Proteinkomplexes. Als starker Anionentauscher erwies sich PL\_SAX. Hierfür wurde eine vorgepackte POROS-Säule der Firma *Applied Biosystems* verwendet (Flussrate: 6.0 ml.min<sup>-1</sup>). Mit Puffer A wurde die Säule equilibriert. Durch kontinuierliche Erhöhung von Puffer B (1M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA) eluierte das  $\delta$ -Protein als ein scharfer *Peak* bei 400 mM NaCl. Die durch SDS-Gelelektrophorese analysierten Proteinlösungen zeigten, dass das Protein ca. 98 % rein vorlag (siehe Kapitel 3.2).

### 2.4.5 Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinfraktionen wurden in s. g. Zentrifugal-Konzentratoren (Fa. Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa konzentriert, indem die Proteinlösung bei 4 °C in 20 min Schritten zentrifugiert (3000 x g) wurde. Die gewünschten proteinhaltigen Fraktionen der Chromatographie wurden anschließend auf 20 mg/mL konzentriert.

### 2.4.6 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Mit Hilfe des *Bradford Essays* (BioRad) wurden die Proteinbestimmungen nach Bradford (1976), und die Konzentration des Proteins nach Angaben des Herstellers bestimmt.

### 2.4.7 Gelpermeations-Chromatographie

In der Gelpermeations-Chromatographie (GPC) werden die Proteine ihrer Molekulargröße nach aufgetrennt, weshalb sie auch als Größenausschluss-Chromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) bekannt ist. Eine HiLoad™-16/60-Superdex 75 und eine Superdex 200 Chromatographie-Säule (CV = 110mL) wurde zu der anschließenden Proteinreinigung verwendet. Die Trennleistung von GPC-Säulen erstreckte sich über einem Bereich von 3-75 kDa bei Superdex 75 und 40-200 kDa bei Superdex 200. Die Chromatographie wurde mit Hilfe einer ÄKTA-Chromatographie-Anlage bei 4 °C durchgeführt. Vor dem Verwenden wurde die GPC-Säule mit dem GPC-Puffer in 2 CV äquilibriert. Nach der Äquilibrierung wurde die Probe mit Hilfe eines Injektors in einem 2 mL aufkonzentrierten und steril filtrierten (Porengröße: 0.22 µm) Volumen aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0.5-1 mL/min. Zur Detektion von δ-Protein wurde die Absorption bei Wellenlängen 260 und 280 nm verfolgt.

## 2.5 Materialcharakterisierung

### 2.5.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Masse von δ und auch die Reinheit der Proteinslösung wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Spectroscopy*) wird die exakte Masse von Makromolekülen bestimmt, indem die möglichst salzfreie Lösung mit einer organischen Matrix (Sinapinsäure 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) vermischt und auf einen Probenträger aufgebracht und nach der Trocknung gemeinsam mit dieser von einem Laserstrahl ionisiert und in einem Flugzeitanalysator charakterisiert wird. Zusätzlich gibt diese Analyseverfahren eine generelle Information über die Reinheit des Proteins. Die

Massenspektren wurden von Dr. Peter Franke im Institut für Biochemie (FU Berlin) aufgenommen. Die Entsalzung der Proteinproben erfolgte mit Hilfe von Zip-Tips (Entsalzungssäulchen von Milipore) nach Angaben des Herstellers.

## 2.5.2 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung von nativem  $\delta$ -Protein wurde im Labor vom Dr. Werner Schröder (Institut für Kristallographie, FU Berlin) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf dem Abbau bzw. der Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren (nach Edman-Abbau). Die N-terminale Sequenzierung von  $\delta$ -Protein hatte ergeben, dass dem Protein nur die erste Aminosäure Methionin fehlt und sich die restliche Polypeptidkette der Primärsequenz entsprechend fortsetzt (NH<sub>2</sub>-IQYYYYTKKEWGVVMEKEELK-COOH).

## 2.5.3 Dynamische Lichtstreuung

Die Methode der Dynamischen Lichtstreuung (*Dynamic light scattering*, DLS) dient zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Moleküle in der Proteinlösung, womit die Modalität des Proteins oder des Protein-DNA-Komplexes ermittelt wird. Liegt eine Proteinprobe monodispers bzw. monomodal vor, so ist die Wahrscheinlichkeit, sie kristallisieren zu können, wesentlich höher als bei polydispersen Systemen (D'Arcy, 1994; Ferre-d'Amare und Daudna, 1997). Ist eine zu überprüfende Protein-Lösung rein, d. h. monodispers, dann bewegt sich die gemessene Intensität zwischen 50-100 kct/s (*kilo counts per second*). Enthält sie aber Partikel auf Grund von Verunreinigungen oder auch der Denaturierung, dann wird der einfallende Laserstrahl stark gestreut. Diese Verschiebung des Lösungszustands wird durch eine in jeder Sekunde gemessene Zählrate (dynamisch) aufgenommen und ist dann äquivalent für die Intensität einer sich in der Lösung befindlichen oder entstehenden Partikelmenge.

**Tab. 7** Zusammensetzung eines DLS-Ansatzes.

Substanz	Vol ( $\mu$ L)	Endkonzentration
$\delta$ (1.6 mg/mL)	4	0.12 mg/mL (= 32 $\mu$ M)
dsDNA (50 ng/ $\mu$ L)	2	2 ng/ $\mu$ L
Omega (1.5 mg/mL)	2	0.06 mg/mL (8 $\mu$ M)
ATP (10 mM)	5	5 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	5	10 mM
GPC-Puffer	auf 50	

Auch die Polymerisation des  $\delta$ -Proteins in Gegenwart von DNA, ATP und wurde mittels DLS ermittelt. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die einzelnen Reaktionsansätze.

Zu der Reaktionslösung wurde ATP zuletzt hinzugefügt und 2 min auf Eis ruhen gelassen, sodass die Reaktion erst in der Meßküvette während des Messvorganges gestartet wurde. Während in den ersten 30 min die Daten (Modalität) in zeitlichen Abständen von einer Minute aufgenommen wurden, wurde in den darauf folgenden Messungen eine zeitliche Periode von 10 min gewählt. Die steril filtrierte Proben von 15 µL mit einer Konzentration von 10-15 mg/ml wurden für DLS eingesetzt und die Messungen nach Angaben des Herstellers (RiNa) durchgeführt. Da die Bestimmung des Molekulargewichtes der Proben aufgrund des mittels DLS gemessenen hydrodynamischen Radius stark fehlerbehaftet ist, wurde lediglich die Anzahl der beobachteten Maxima herangezogen, um die Modalität der Probe zu ermitteln. Lage und Größe der Maxima werden vom verwendeten Programm mittels einer s. g. Autokorrelationsfunktion automatisch berechnet.

#### 2.5.4 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die Methode der Zirkulardichroismus (CD, *Circular dichroism*)-Spektroskopie wird in der Strukturbiologie überwiegend für die Bestimmung der Sekundärstrukturgehalte von Proteinen verwendet (Winter und Noll, 1998). Vor allem ist diese Methode wegen ihrer Fähigkeit, den Faltungszustand des Proteins darzustellen, sehr beliebt. Daher wurden bei diesen Experimenten auch in dieser Arbeit, wo es in erster Linie darum ging, den Faltungszustand und die thermische Stabilität des nativen  $\delta$ -Proteins zu bestimmen, CD-Spektren im kurzwelligen Bereich aufgenommen (190-250 nm). Allein durch die Aufnahme der CD-Spektren lassen sich keine quantitativen Aussagen über die Sekundärstrukturelemente des Proteins machen. Dennoch ist es hierdurch möglich, einen Eindruck über den allgemeinen Faltungszustand des Proteins zu gewinnen.

Für die Messung der CD-Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur bzw. für die Analyse der thermischen Stabilität wurde das gereinigte Protein (15 mg/mL) im Puffer 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 in einer Quarzküvette mit einem Durchmesser von 0.02 cm pipettiert. Die Spektren wurden bei 20 °C und in einem UV-Bereich von 190-250 nm in Schritten von 0.5 nm mehrmals aufgenommen. Um die thermische Stabilität des  $\delta$ -Proteins zu überprüfen, wurde dieselbe Probe von 20 bis 65 °C mit Hilfe eines Wasserbad-Thermostats auf die erwünschte Temperatur in Schritten erhitzt, und die CD-Signale wurden graphisch gegen die UV-Bereiche aufgetragen (Kapitel 3.4).

Die mittlere molare Elliptizität  $[\theta_\lambda]$  pro Aminosäurerest wurde aus dem CD-Signal wie folgt ermittelt,

(Formel 1) 
$$[\theta_\lambda] = 0,1 \times [\theta_\lambda / (c \times d \times n)]$$

wobei  $\theta_\lambda$  die gemessene Elliptizität in Grad (hier in mdeg: *milli degrees* = milligrad) ist, c die Proteinkonzentration in mol/L, n die Anzahl der Aminosäurereste pro  $\delta$ -Monomer (= 297 exklusive des ersten Methionins) und d die Pfadlänge in cm. In der Regel wird die mittlere molare Elliptizität  $[\theta_\lambda]$  in mdeg\* cm<sup>2</sup>\*dmol<sup>-1</sup> angegeben, woraus sich der Multiplikationsfaktor 0,1 ergibt. Die CD-Messungen wurden mit einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 0,02 cm) bei einer Proteinkonzentration c = 46,45  $\mu$ M (bezogen auf die Molmasse des  $\delta$ -Monomers, M = 34 445 g/Mol) durchgeführt.

### 2.5.5 Quervernetzung des $\delta$ -Proteins mit Glutardialdehyd

Als zweites Nachweisverfahren zur Bestimmung des Oligomer-Status des  $\delta$ -Proteins wurde auch die Quervernetzung (*crosslinking*) mit dem sehr reaktiven und relativ unspezifischen Glutardialdehyd getestet (Cheung & Nimni, 1982). Die Quervernetzung des  $\delta$ -Proteins (1.3 mg/mL) wurde mit 0.1 %igem Glutardialdehyd bei RT durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 10-180 min. Die Ansätze wurden im GPC-Puffer durchgeführt, die Reaktion mit dem SDS-Laufpuffer gestoppt und anschließend auf 15 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 3.3).

## 2.6 Kristallisation

Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse erfordert die Kristallisation des gereinigten Proteins. Auch die Qualität der Proteinkristalle ist von Bedeutung. Die Größe, das Streuvermögen sowie die Mosaizität und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Strahlenschäden sind adäquate Voraussetzungen für eine erfolgreiche Strukturbestimmung. Die üblichen Kristallisationsmethoden beruhen auf dem Prinzip, die Löslichkeit des Proteins durch verzögerte Erhöhung der Fällungsmittel-Konzentration zu verringern. Das Fällungsmittel (anorganische Salze und organische Verbindungen) und das in Lösung befindliche Protein konkurrieren dabei um Wassermoleküle. Die Bildung von Kristallkeimen wird durch die unter den spezifischen Puffer- und Fällungsmittelkonzentrationen zur Wechselwirkung kommenden Protein-Protein-Interaktionen verursacht. Die optimalen Bedingungen für die Kristallisation sind nur dann gegeben, wenn wenige Kristallkeime in einem labilen, übersättigten Zustand des Systems gebildet werden. Das Wachstum der Keime erniedrigt die Proteinkonzentration in der Lösung, sodass das System in einen metastatischen Zustand übergeht, der lediglich das Kristallwachstum zulässt, nicht aber die Kristallkeimbildung (McPherson, 1990).

Zum Auffinden einer ersten Kristallisationsbedingung werden s. g. „*Sparse-Matrix-Screens*“ (Jancarik & Kim, 1991) pipettiert. Die *Screens* enthalten eine begrenzte Anzahl unterschiedlichster Kristallisationsbedingungen, die aufgrund einer statistischen Analyse bekannter Kristallisationsbedingungen zusammengestellt sind. Die Auswertung eines *Sparse-Matrix*-Ansatzes liefert in der Regel Hinweise für weiter optimierte Kristallisationsansätze. Verschiedene Techniken der Kristallisation sind: Kristallisation im hängenden oder sitzenden Tropfen (*engl. hanging drop, sitting drop*), Kristallisation unter Öl oder Kristallisation mittels Mikro-Dialyse (Ducruix & Grige, 1992).

Die Kristallisation des  $\delta$ -Proteins erfolgte nach der isothermen Dampfdiffusionsmethode. Die Suche nach der optimalen Kristallisationsbedingung wurde mit Hilfe des *Crystal Screens*, der nach dem entsprechenden *sparse-matrix*-Protokoll von Jancarik und Kim (1991) aus 48 verschiedenen Reservoirlösungen besteht, bei 18° C durchgeführt. Die *Crystal Screens* I und II (*Hampton Research*) wurden für die optimale Konzentration des Proteins mehrmals wiederholt, bis die geeignetste Bedingung gefunden wurde. Dabei wurden Proteinlösungen mit Konzentrationen von 8, 10 und 15 mg/mL in Puffer-GPC (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) eingesetzt. Da die Proteinlösung bei dieser Methode in einem Verhältnis von 1:1 mit der Reservoirlösung gemischt wurde, ist die Endkonzentration sowohl vom Protein als auch vom Proteinpuffer als halbiert zu betrachten.

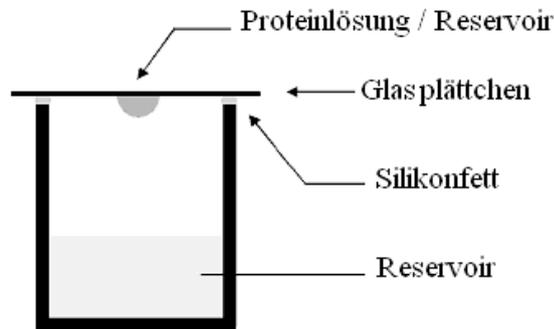
### 2.6.1 *Sitting-Drop*-Verfahren

Für die Kristallisations-Versuche wurde die Dampfdiffusionsmethode verwendet (Ducruix und Giegé, 1999). Für die *Sitting-Drop*-Experimente wurden die Kristallisationsplatten mit 96 Vertiefungen (*engl. „wells“*) eingesetzt. In diesen 96'er Platten wurden 100  $\mu$ L Fällungsmittel pipettiert und in die vorgeformten Vertiefungen 1  $\mu$ L der Proteinprobe und 1  $\mu$ L des Fällungsmittels gemischt. Anschließend wurden die Platten mit einem Plastikfilm (*Hampton Research*) versiegelt. Die jeweiligen Ansätze wurden bei 18 °C aufbewahrt und in den ersten 1-3 Tagen auf das Kristallwachstum hin untersucht.

### 2.6.2 Dampfdiffusionsmethode nach *Hanging-Drop*-Verfahren

Die bei dem *Sitting-Drop*-Verfahren selektierten Bedingungen wurden mittels *Hanging-Drop*-Verfahren in den Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen optimiert. Dabei wurden die Parameter wie die Fällungsmittelkonzentration und der pH-Wert der Reservoirlösung um die Bedingung variiert, sodass eine mögliche Keimbildung zum Kristallwachstum beschleunigt wurde. Wie in der Abb. 11 schematisch dargestellt, wurden in die Vertiefungen dieser Zellkulturschalen 500-700  $\mu$ L der s. g. Fällungsmittellösung

(*Reservoir*) pipettiert. 2-4  $\mu\text{L}$  der zu kristallisierenden Probe wurden mit 2-4  $\mu\text{L}$  des Fällungsmittels auf einem vorher silikonisierten Deckglas vermischt, das Deckglas wurde zum Schluss umgedreht auf den Rand der Vertiefungen hängend gelegt, sodass ein geschlossenes System entstand.



**Abb. 11** Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen.

### 2.6.3 K, Na-Tartrat Kristallisationsbedingung

Auf der Suche nach der Kristallisationsbedingung wurden wie bereits erwähnt die *Crystal Screens* I und II von *Hampton Research* in Betracht gezogen. Die Proteinlösung wurde wie in Kapitel 2.4 beschrieben präpariert und zur Kristallisation eingesetzt. Die in 96'er Platten befindlichen Ansätze wurden bei 18 °C gelagert, und in den ersten 3 Tagen täglich nach Anzeichen für Kristallkeimbildung oder Kristalle mittels Binokular-Lichtmikroskop überprüft.

### 2.6.4 Co-Kristallisation von $\delta$ mit ATP- $\gamma$ -S

Da es sich bei dem  $\delta$ -Protein um eine ATPase handelt, wurden parallel zu den Kristallisationsversuchen des Apo- $\delta$ -Proteins auch Co-Kristallisationsversuche mit ATP, ADP und ATP- $\gamma$ -S unternommen, um Informationen über den Bindungsmodus des Nukleotids zu erhalten. Die gleichen Kristallisationsmethoden und die *Screens*, wie im Kapitel 2.6.3 beschrieben, wurden auch für die Co-Kristallisation eingesetzt. Hierfür wurde die Proteinlösung präpariert und unmittelbar vor der Kristallisation mit 1 mM ATP- $\gamma$ -S und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  gemischt und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Die Kristallisationsversuche mit *Screen* I und II führten zu keinem Ergebnis, sodass auch einige spezielle *Screens* wie SaltRX (Salz-*Screen*) oder auch MPD- und PEG-*Screens* zum Einsatz kamen.

Die bei der MPD-*Screen* festgestellte Bedingung 10 % MPD, 0.1M Na-HEPES pH 7.5 wurde mittels *Hanging-Drop*-Verfahren optimiert, indem sowohl die MPD-Konzentrationen als auch die pH-Bereiche variiert wurden.

Protein-Co-Faktor-Mischung:

Protein (14-15 mg/mL)  
ATP-  $\gamma$ -S (1 mM)  
MgCl<sub>2</sub> (5 mM)

Im Puffer 200 mM NaCl und 20 mM Tris-HCl pH 8 wurden die einzelnen Komponenten zusammengemischt und zur Kristallisation mittels *Hanging-Drop*-Verfahren wurde 1  $\mu$ L der Protein (14-15 mg/mL)-Co-Faktor-Mischung mit 1  $\mu$ L der Reservoirlösung (5 % MPD und 0.1 M Na-HEPES pH 7.5) gemischt.

Kristallisationsbedingung:

MPD	5 %
Na-HEPES	0.1M pH 7.5

Die MPD-Konzentrationen von 5 % und 0.1 mM Na-HEPES pH7.5 lieferten bessere Kristalle. Alle Testversuche, die sowohl mit  $\delta$ -Kristallen aus der Bedingung 0.2 M K, Na-Tartrat als auch mit Co-Kristallen aus der Bedingung 5 % MPD und 0.1 M Na-HEPES pH7.5 in Glaskapillaren mit Hilfe der institutseigenen Drehanode mit *Imageplatte-Detektor* (mar345, MAR research, Norderstedt) durchgeführt wurden, lieferten keine auswertbaren Diffraktionsdaten.

### 2.6.4.1 Die HEPES-Bedingung

Die Beobachtungen bei *Screen I-II* (*Hampton Research*) und bei *Salt-RX Screen* haben die Vermutung nahe gelegt, dass das Protein unter der Bedingung höherer Pufferkonzentration als Fällungsmittel Phasen bildet. Da solche Phasentrennungen in der Regel als Vorstufen der Kristallbildung bekannt sind, wurden einige Ansätze mit höheren Konzentrationen von Pufferlösungen und Salze probiert, in der Hoffnung, bessere Kristallformen zu erreichen. Die Phasentrennung, die durch die Mischung von  $\delta$ -Protein (14 mg/mL), ATP- $\gamma$ -S (1-2 mM) und MgCl<sub>2</sub> (5 mM) mit der Reservoir-Lösung (0.9 M Na-HEPES pH 7.5) zustande kam, konnte erst nach der Behandlung mit Additiven (2-4% Ethanol) mit einer neuen Kristallform verbessert werden.

Protein-Co-Faktor-Mischung: Protein (14-15 mg/mL) im Puffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0  
ATP- $\gamma$ -S (1 mM)  
MgCl<sub>2</sub> (5 mM)

Kristallisationsbedingung: Na-HEPES 0.9 M pH 7.5  
Ethanol 2 %

## 2.7 Montierung von Kristallen in Quarzkapillaren

Die Kristalle wurden für die Messung in Quarzkapillaren montiert. Zuerst wurden die Kristalle mit etwas Reservoirlösung in eine Quarzkapillare mit einem max. Durchmesser von 1.5 mm mittels einer Pipette überführt und mit Hilfe eines nadelförmig aufgerollten Löschpapiers trockengelegt. Um das Austrocknen der Kristalle an der Innenwand der Kapillare zu verhindern, wurde um den Kristall herum ein Flüssigkeitsrest hinterlassen. Die Kapillare wurde anschließend mit Hartwachs luftdicht verschlossen und mit Hilfe eines Goniometerkopfes senkrecht zum Röntgenstrahl zentriert.

## 2.8 Cryo-Bedingungen für Kristalle

Als eine der besten Methode zur Messung der Diffraktionsdaten eines Kristalls gilt die *Cryo*-Methode. Hierfür werden die Kristalle durch rasches Abkühlen in flüssigem Stickstoff schock-gefroren. Um die Zerstörung der Kristalle durch Eisbildung bei der Behandlung mit flüssigem Stickstoff zu verhindern, werden sie vorher schrittweise in einen 15-25 % (v/v) Glycerin enthaltenden Proteinpuffer überführt. Als Alternative zu Glycerin wurde auch PEG 400 (Polyethylenglykol) oder MPD (2-Methyl-2,4-Pentandiol) verwendet.

Für die Kristalle aus der HEPES-Bedingung wurde 22 % (v/v) Glycerin als *Cryo*-Substanz verwendet. Der Kristall wurde aus der Reservoirlösung in den ersten *Cryo*-Puffer (1/4 Glycerin/*Reservoir*) für 2-4 min und dann in den zweiten *Cryo*-Puffer (1/2 Glycerin/*Reservoir*) für 2-4 min und anschließend kurz in 22 % (v/v) Glycerin überführt.

Die Kristalle wurden anschließend mit Nylon-Schlaufen gefischt und direkt in dem 100 K kalten flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die eingefrorenen Kristalle wurden entweder gleich mit Hilfe eines Goniometerkopfes in den 100 K kalten Stickstoffstrom gebracht und gemessen oder in dem Langzeit-Behälter aufbewahrt.

## 2.9 Kristallographische Methoden

Eine genaue Beschreibung der Theorie der Röntgenkristallographie und ihrer experimentellen Umsetzung ist äußerst umfangreich und würde den Rahmen dieser Arbeit bei weitem übersteigen.

### 2.9.1 Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsdaten

Für die Vermessung der Kristallreflexe, des so genannten intensitätsgewichteten reziproken Gitters, müssen die Beugungsbedingungen nach Laue bzw. Bragg erfüllt werden. Dies erfolgt durch Oszillation eines im Röntgenstrahl zentrierten Einkristalls. Während der Kristalldrehung um kleine Winkelbereiche ( $0.5\text{-}2.0^\circ$ ) werden die entstehenden Beugungsmuster durch einen Flächendetektor aufgenommen. Der gesamte Winkelbereich, der für einen vollständigen Datensatz durchfahren werden muss, ist von der Kristallsymmetrie und der Kristallorientierung abhängig. Um möglichst konstante Beugungseigenschaften der Kristalle über den Zeitraum einer Datensammlung zu gewährleisten, werden die Proben kontinuierlich gekühlt. Als Strahlungsquellen dienen Röntgengeneratoren und Synchrotronspeicherringe. Synchrotronstrahlung zeichnet sich gegenüber charakteristischer Strahlung konventioneller Röntgenröhren durch eine höhere Intensität, eine geringere Divergenz und der freien Wahl der Wellenlänge innerhalb des kontinuierlichen Synchrotronpektrums aus.

Die bei den Röntgenbeugungsversuchen eingesetzte Strahlung weist infolge ihrer Frequenz hohe Energie auf, welche neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierung und Radikalbildung im Kristall führt. Aufgrund dieser Radikale, die in einer Kettenreaktion Nachbarmoleküle modifizieren und damit die periodische Anordnung der Gitterbausteine stören, nimmt die Diffraktionsqualität schnell ab. Röntgenbeugungs-Experimente mit Hilfe der Quarzkapillare werden bei Raumtemperaturen durchgeführt. Da die Entstehung und Diffusion der Radikale temperaturabhängig ist, werden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung Datensammlungen von Kristallen an eingefrorenen Kristallen unter ständigem Stickstofffluss bei Temperaturen um 100 K durchgeführt. Dafür werden Kristalle zuerst mit s. g. Frostschutzlösungen (wie Glycerin, Polyethylenglycol 200 und 400, 2-Methyl-2,4-pentandiol, Glykol, Glucose oder Trehalose) behandelt.

Durch einen *Cryo-Screen* wurden die für den jeweiligen Kristall geeigneten *Cryo*-Bedingung bzw. die beste Konzentration der Frostschutzlösung ausgesucht. Es stellte sich heraus, dass die Co-Kristalle der HEPES-Bedingung in max. 20 % (v/v) Glycerin besser geschützt sind und auch keine Eisbildung um den Kristall verursachen. Wie im Kapitel 2.8 beschrieben, wurden die mit Frostschutzlösung behandelten Kristalle im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

Ein nativer Datensatz eines hexagonalen  $\delta$ -Kristalls im Komplex mit ATP- $\gamma$ -S wurde am Strahlrohr BL1.4 des BESSY (Berlin) nach der Oszillationsmethode gesammelt. Die Indizierung und Integration der Reflexe der einzelnen Diffraktionsmuster erfolgte mit DENZO (Otwinowski und Minor, 1997). Mit Hilfe von SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) wurden die Daten skaliert und zu einem Datensatz zusammengefasst.

## 2.9.2 Prozessierung der gemessenen Reflexe

Um aus den bei einer Datensammlung gemessenen Rohdaten Strukturamplituden zu erhalten, müssen noch einige Berechnungen und Korrekturen durchgeführt werden. Diese Arbeitsschritte werden als Datenreduktion bezeichnet und enthalten u. a. die Skalierung der einzelnen Beugungsbilder, die Berechnung integraler Nettointensitäten aus den Zählraten der Reflexe unter Berücksichtigung von Untergrundstrahlung, eine Polarisationskorrektur und die Lorentzkorrektur, die von der Aufnahmegeometrie abhängig ist. Zur Beurteilung der Qualität eines Datensatzes wird durch einen Vergleich symmetrieäquivalenter Reflexintensitäten der so genannte  $R_{\text{sym}}$ -Wert ( $R$  für *reliability index*) berechnet.

Die Reflexe der einzelnen Aufnahmen wurden mit Hilfe des Programms DENZO bzw. HKL2000 (Otwinowski und Minor, 1997) indiziert und integriert. Die Skalierung der Daten und die Mittelung der symmetrieäquivalenten Reflexe erfolgte anschließend mit dem Programm SCALEPACK. Aus den Intensitäten wurden dann mit dem Programm TRUNCATE des CCP4-Programmpakets (CCP4, 1994) Strukturfaktor-Amplituden und ihre Standardabweichungen berechnet.

## 2.9.3 Strukturbestimmung

Von der Überexpression und Aufreinigung eines Proteins über die Kristallisation bis hin zur Strukturlösung müssen viele Hürden in der Kristallographie überwunden werden. Nachdem der erste kristallographisch auswertbare Datensatz aufgenommen wurde, bleibt die Frage offen, ob sich nun die fehlende Phaseninformation mit Hilfe der bekannten Methoden gewinnen lässt.

Das Phasenproblem lässt sich in der Regel mit drei verschiedenen Methoden lösen. Diese sind der multiple isomorphe Ersatz (*multiple isomorphous replacement*, MIR), die multiple Wellenlängen anomale Dispersion (*multiple wavelength anomalous dispersion*, MAD) und der molekulare Ersatz (*molecular replacement*, MR).

### 2.9.3.1 Molekularer Ersatz

Die Methode des molekularen Ersatzes wurde erstmals von Rossmann und Blow (1962) angewendet. Es werden die Atomkoordinaten eines bereits bekannten Makromoleküls benötigt, das eine ähnliche Struktur wie das zu untersuchende Makromolekül besitzt. Die Lokalisierung eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit (Zieleinheit) bedarf einer exakten Orientierung und Positionierung, d. h., eine Rotationsmatrix und ein Translationsvektor werden für eine genaue 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 Atompaares eines Makromoleküls 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 gleich, doch sind sie je nach unterschiedlicher Orientierung unterschiedlich gegeneinander rotiert. Maximale Übereinstimmung liegt vor, wenn sich die Pattersonfunktion des untersuchten Moleküls mit der korrekt rotierten Pattersonfunktion eines bekannten, homologen Moleküls überlagern lässt.

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 Fouriersumation die Übereinstimmung mit den gemessenen Strukturamplituden überprüft und mit Hilfe eines Korrelationskoeffizienten und des R-Wertes die Güte der Lösung wiedergespiegelt. Als Faustregel gilt, dass bei einer 50 %igen Identität der Aminosäuresequenzen zweier Proteine die Strukturen zu ca. 80 % übereinstimmen (Chothia *et al.*, 1989). Bei geringerer Aminosäuresequenzidentität sinkt die Strukturähnlichkeit und kann die Strukturlösung mittels molekularen Ersatzes erschweren.

Für die Bestimmung der Struktur des  $\delta$ -Proteins wurde das Programm PHASER (Storoni *et al.*, 2004) verwendet. Phaser ist ein für die Phasierung makromolekularer Kristallstrukturen entwickeltes Programm, das auf der Methode des *Maximum-Likelihoods* basiert. Das Programm verfügt über die *brute force* und schnelle *likelihood* basierte

Rotations- und Translationsfunktion für die Methode des molekularen Ersatzes. Der *likelihood*-Parameter ist die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der gemessenen Daten mit einem gegebenen Modell. So erlaubt sie uns zu vergleichen, wie gut die verschiedenen Modelle mit den gemessenen Daten übereinstimmen (das Modell besteht im Falle des molekularen Ersatzes aus den Atomkoordinaten und den Rotations- und/oder Translations-Operatoren). Die auch als LLG (*Log Likelihood Gain*) abgekürzte Funktion ist dabei die Differenz zwischen dem Likelihood des Modells und der aus einer Wilson-Verteilung berechneten Likelihood. Der *likelihood*-Parameter misst, wie viel besser die Daten mit dem Modell vorhergesagt werden als mit einer zufälligen Verteilung derselben Atome. Die LLG gibt die Möglichkeit, mehrere Modelle mit demselben Datensatz zu vergleichen, während die LLG-Werte für verschiedene Datensätze nicht miteinander verglichen werden sollten (Storoni *et al.*, 2004).

Die Struktur des Soj-Proteins (PDB Eintrag 2bej) diene als Ausgangsbasis für die Modellierung des Suchmodells. Dabei wurden für das Programm PHASER (Storoni *et al.*, 2004) die voreingestellten Parameter sowie die Protokolle für die Rotations- und Translationssuche sowie Starre-Körper-Verfeinerung angewandt. Die Diffraktionsdaten in einem Auflösungsbereich von 30 bis 2.5 Å wurden für die Suche verwendet. Alle anderen Parameter wurden aus den Beispiel-Daten des Programms übernommen. Die erhaltenen Lösungen für die Rotations- und Translationssuche wurden unter Benutzung des Programms ARP/wARP (CCP4, 1994) auf das Suchmodell angewendet, um anschließend mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) die Kristallpackung darzustellen.

#### 2.9.4 Verfeinerung und Modellbau

Ist ein erster experimenteller Phasensatz aus dem erhaltenen Proteinmodell ermittelt, kann die Elektronendichte mittels Fouriertransformation berechnet werden. Die Qualität dieser Dichten ist jedoch häufig unzureichend und ihre Interpretation oft nicht eindeutig. Zur Verbesserung der Phasen und somit der Genauigkeit einer Elektronendichte sind zusätzliche Informationen nötig. Diese werden in Form von Randbedingungen formuliert und zur Phasenverbesserung verwendet. Dabei müssen folgende Randbedingungen erfüllt sein:

- die Elektronendichte des Proteins (Polypeptidkette) muss kontinuierlich sein,
- die Elektronendichte muss bei hohen Auflösungen an Atompositionen gehäuft sein (Cowtan & Main, 1993),
- Proteinbereiche müssen hohe, Lösungsmittelbereiche niedrige Elektronendichten besitzen (Wang, 1985).

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 ( $F_o$ ; o für *obtained*) und anhand des Modells berechneten Strukturfaktoramplituden ( $F_c$ ; c für *calculated*) minimiert. Zur Lösung dieses Problems gibt es verschiedene rechnerische Ansätze. Das in der vorliegenden Arbeit berechnete Modell wurde mit Hilfe des Programms REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) verfeinert. Das Programm REFMAC5 beschreibt die zu verfeinernden Parameter durch eine Energiefunktion. 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 Strukturamplituden ( $F_o$  und  $F_c$ ) beschreibt. Zur Berechnung der potentiellen Energie wurde ein Kraftfeld benutzt, das auf geometrische Parameter zurückzuführen ist, die speziell zur Verwendung in der Kristallographie aus hoch aufgelösten Kristallstrukturen von Aminosäuren und Polypeptiden ermittelt wurden (Engh und Huber, 1991; Parkinson *et al.*, 1996).

Bei hohen Auflösungen und genauen Startphasen kann der Modellbau mit Hilfe von Computerprogrammen teilweise oder vollständig automatisiert werden. Bei der Strukturverfeinerung wird dann durch Optimierung der Modellparameter (Atompositionen, Temperaturfaktoren und Besetzungsfaktor jedes Atoms) eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen Experiment und Strukturmodell angestrebt.

Die mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) berechneten Elektronendichtekarten dienen dem manuellen Modellbau mit Hilfe des Programms O (Jones *et al.*, 1991). Nach der Verfeinerung wurden mit dem Protokoll ARP/wARP Wassermoleküle der Elektronendichte zugewiesen. Diese wurden anschließend visuell im Programm O auf eine korrekte Koordination durch Protein- oder andere Wassermoleküle überprüft. Gleichzeitig konnten falsche Konformationen der Seitenketten berichtigt werden. Abschließend wurde nach dem Protokoll *minimize* eine Energieminimierung der Torsionswinkel und Bindungslängen des Modells durchgeführt und dieses an die Elektronendichte angepasst, bis eine Konvergenz der Verfeinerung erreicht wurde. Die Richtigkeit des Modells wurde mit dem Programm WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996) überprüft.

### 2.9.5 Abbildungen und Koordinatenanalyse

Die Bewertung der stereochemischen Qualität des Proteins erfolgte mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996). Die Abbildungen wurden mit Hilfe der Programme *Molscript* (Kraulis, 1991), SWISS-PDB-

*Viewer* (Guex & Peitsch, 1997), POV-Ray v3.6 (Christopher Cason, 2003) und PYMOL (*DeLano scientific LLC*, 2005) erstellt. Sowohl die Molekularoberfläche als auch das elektrostatische Potential von Proteinoberflächen wurden mit den Programmen PYMOL und SWISS-PDB-Viewer berechnet.

## 2.10 Funktionsanalyse

### 2.10.1 Enzymaktivitäts-Bestimmungstest (ATPase-Assay)

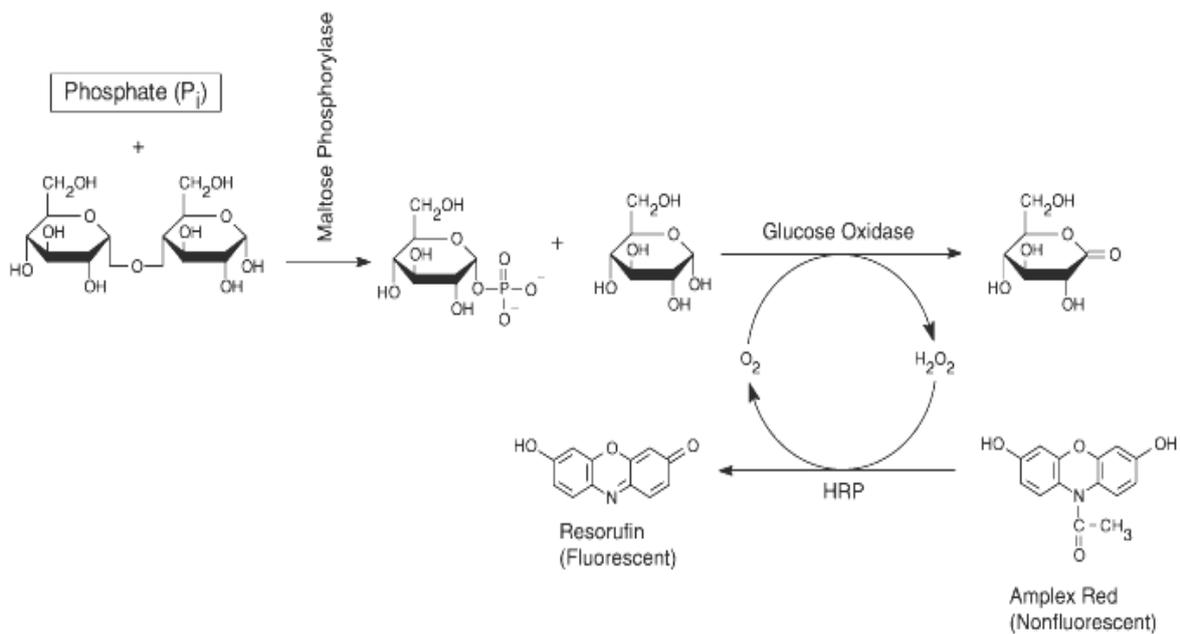
Die Ergebnisse aus BLAST-Search hatten ergeben, dass das  $\delta$ -Protein zu der weit verbreiteten Gruppe der Walker-Typ ATPasen gehört. Dies diente als Grundlage zu Untersuchungen hinsichtlich ihrer Funktion als ATPase. Der ATPase-Assay (*Molecular Probes*) wurde so konstruiert, dass die gewählten Konzentrationen möglichst den zellulären Bedingungen nahe stehen.

Die Enzymaktivität des  $\delta$ -Proteins wurde unter der Annahme eines dynamischen Gleichgewichtes („*steady state*“) bestimmt. Dabei wurde aus den folgenden von Michaelis und Menten, 1913 stammenden Kriterien ausgegangen:

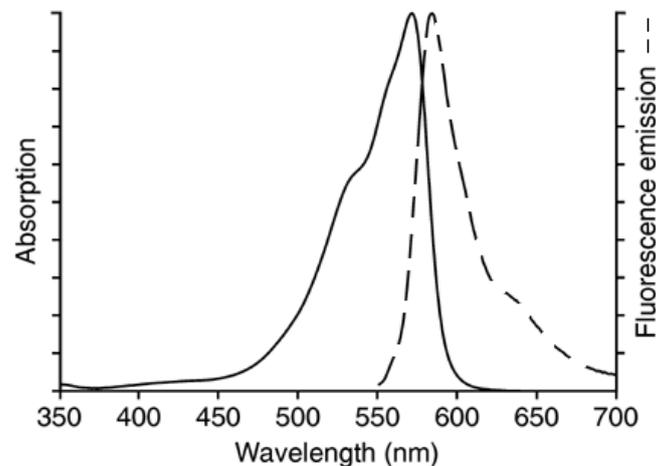
- 1- Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ist über die gesamte Reaktionszeit konstant. D. h. die Substratkonzentration befindet sich immer im Überschuss gegenüber der Enzymkonzentration.
- 2- Die Konzentration des Substrates ist während der gesamten Reaktionszeit im Überschuss gegenüber der Produktkonzentration.
- 3- Der geschwindigkeits-bestimmende Schritt ist die Produktbildung.

Die Aktivität des Enzyms wurde über die Quantifizierung des vom Substrat freigesetzten anorganischen Phosphats ( $P_i$ ) ermittelt. Den oben erwähnten Annahmen nach gilt, dass nach dem Abzug des Nullwertes (*Background*) ein äquimolares Verhältnis zwischen detektiertem Phosphat und umgesetztem Substrat besteht. Dies trifft für solche Substrate zu, die nur ein Phosphat haben, während für die anderen Substrate keine kinetischen Parameter bestimmt werden, sondern lediglich die relative Umsetzungsrate, was eine verstärkte Hydrolyse bzw. Phosphatfreisetzung bedeutet.

Da die Resorufin-Methode (*PiPer-Phosphate-Assay, Molecular Probes*) noch sensitiver war als die Malachitgrün-Methode, wurde die ohnehin schwache Enzymaktivität des  $\delta$ -Proteins mit der Resorufin-Methode bestimmt.



**Abb. 12** Grundlage des PiPer-Phosphate-Assays (*Molecular probes*). HRP (*Horseradish peroxidase*).



**Abb. 13** Absorption und Fluoreszenzemissionsspektren von Resorufin in pH 9.0 Puffer.

In Gegenwart von anorganischem Phosphat wandelt die Maltose-Phosphorylase die Maltose zum Glucose-1-Phosphat und zu Glukose um. Dann wird die Glukose durch die Glukose-Oxidase zu Glukanolaktone und  $H_2O_2$  umgewandelt. Anschließend reagiert das durch die Umwandlung von Glukose zum Glukanolaktone entstandene  $H_2O_2$  unter Katalyse von HRP (*Horseradish peroxidase*) mit dem Reagens *Amplex Red*, um das hoch fluoreszente Resorufin zu generieren. Die daraus resultierende Erhöhung der Fluoreszenz oder der Absorption ist dann proportional zu der Menge des anorganischen Phosphats ( $P_i$ ) in der

Probe (Abb. 13). Das entstehende Resorufin kann mit Hilfe eines Spektrophotometers (Absorption) oder Spektrofluorometers (*Fluorescence Emission*) gemessen werden. Die kinetischen Messungen wurden über die Bestimmung von anorganischem Phosphat ausgeführt.

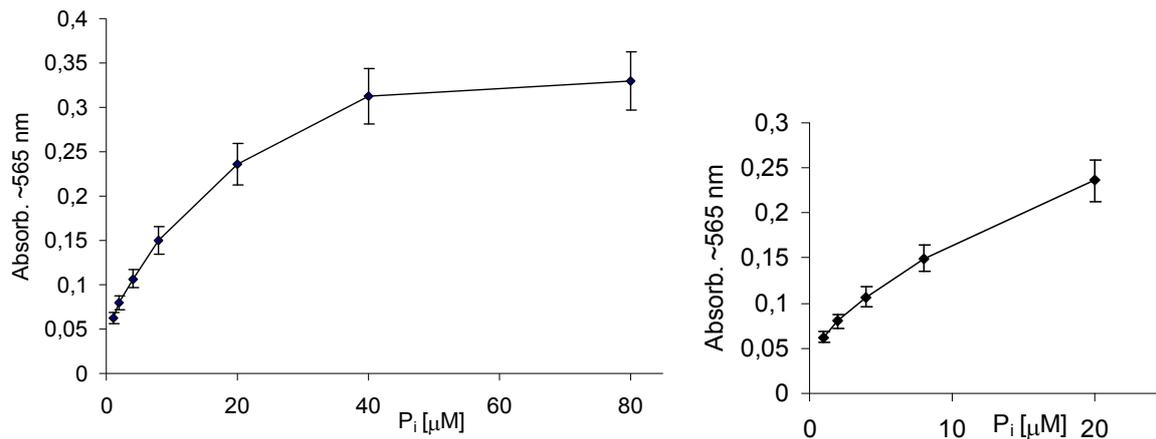
#### Reaktionsansatz:

$\delta$ - Protein	(Enzym)	5 $\mu$ L	20 $\mu$ M
$\omega$ -wt oder $\omega\Delta$ N19	(ParB)	2 $\mu$ L	20 $\mu$ M
ATP	(Substrat)	2 $\mu$ L	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	(Metall- Ion)	4 $\mu$ L	4 mM
<i>parS</i> -DNA	(lin. pUC57)	3 $\mu$ L	2 nM

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde mit 1x Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5) auf 50  $\mu$ L verdünnt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

<u>1x Mastermix 5 mL (für 100 Ansätze):</u>	<u>Volumina</u>	<u>Konzentration</u>
<i>Amplex Red</i>	50 $\mu$ L	(100 $\mu$ M)
Maltose-Phosphorylase	100 $\mu$ L	(4 U/mL)
Glukose-Oxidase	50 $\mu$ L	(2 U/mL)
HRP	20 $\mu$ L	(0.4 U/mL)
Maltose	50 $\mu$ L	(0.4 mM)
1x Reaktionspuffer	4.73 mL	

Die inkubierten Proben wurden mit 1x *Mastermix* (Reaktionslösung von *Molecular Probes*) zusammen gemischt. Der entstehende Resorufin Farbstoff, der zu der Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats proportional ist, wurde anschließend mit Hilfe eines Spektrophotometers als Absorption bei ~565 nm in Zeitintervallen von 60 min gemessen. Als positive Kontrolle wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) eingesetzt. Eine Eich-Kurve wurde für die Reaktion als Bezugswert konstruiert (Abb. 14), indem ein anorganischer Phosphat-Gradient (0-80  $\mu$ M) erstellt wurde. Aus dem annähernd linearen Bereich der Eichkurve (0-20  $\mu$ M) wurden dann die jeweiligen gemessenen Absorptionen um die freigesetzte anorganische Phosphat-Menge (molP<sub>i</sub>/molEnzym) umgewandelt bzw. umgerechnet. Die gemessenen Absorptionen des jeweiligen Reaktionsansatzes bzw. alle Messwerte wurden um eine bestimmte Summe (*Background* und negativ Kontrolle) korrigiert.



**Abb. 14** Der anorganische Phosphat ( $P_i$ )-Gradient in einem Bereich von 1-80  $\mu\text{M}$  (links). Das in Gegenwart von  $P_i$  aus dem non-fluoreszenten *Amplex Red* (10-acetyl-3,7-dihydroxy-phenoxazin) entstehende Resorufin wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers detektiert (Absorption bei  $\sim 565$  nm), gegen unterschiedliche anorganische Phosphat-Konzentrationen aufgetragen und graphisch dargestellt. Ein nahezu linearer Anstieg der Absorption bei  $\sim 565$  nm lässt sich im Bereich von 1-20  $\mu\text{M}$  erkennen (rechts).

## 2.10.2 Sedimentation

Diese Methode beruht auf der Annahme, dass in einem Reaktionsgemisch entstandene Polymere ab bestimmter Größe ( $<1\mu\text{m}$ ) abhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit (50.000-100.000 rpm) pelletiert werden können. Die hier verwendete Methode wurde aus den Arbeiten von Leonard *et al.* (2005) und Barilla *et al.*, (2005) modifiziert übernommen.

Die in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  durchgeführten Ansätze (2-7) wurden jeweils mit  $\delta$  (32  $\mu\text{M}$ ),  $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta\text{N19}$  (8  $\mu\text{M}$ ), 50 ng linearisiertem 3.0 kb großem Plasmid pUC57 mit  $P_{\text{COP}S}$ -Region (*parS*-DNA) und ATP oder ADP (5 mM) sowie  $\text{MgCl}_2$  (10 mM) in einem Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.5 und 0.2 M NaCl) zusammengesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT (Raumtemperatur) wurden die Proben eine weitere Stunde bei 4  $^\circ\text{C}$  und mit einer Umdrehung von 100.000 r.p.m zentriert, und anschließend wurden der Überstand (*Supernatant*, S) und der Pellet (P) getrennt auf ein 15 %iges denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

## 2.10.3 Elektronenmikroskopie

Das Prinzip der Negativkontrastierung bei der Elektronenmikroskopie (EM) beruht auf einer weitgehenden Einhüllung biologischer Objekte in ein amorphes, Elektronen stark

---

streuendes Material, z. B. Schwermetallsalze. Durch Erhöhung der Dichte des Untergrunds mit Hilfe von Schwermetallsalzen wird eine negative Kontrastierung erzielt, wobei nicht nur das Objekt als Ganzes, sondern auch vorhandene Substrukturen negativ kontrastiert werden. Als Kontrastierungsmittel eignen sich Verbindungen mit hohem Atomgewicht, die eine starke Elektronenstreuung bewirken (z. B. Phosphorwolframsäure, Uranylacetat, Uranylformiat, Aurothioglucose, Cadmiumthioglyzerin).

Um die bei den DLS- und Sedimentationsversuchen festgestellte mögliche Filament-Bildung auch durch die Elektronenmikroskopie nachweisen zu können, wurden die exakten Mengen bzw. Konzentrationen der jeweiligen Reaktionskomponente angesetzt. Die in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  durchgeführten EM-Proben wurden jeweils mit  $\delta$  (32  $\mu\text{M}$ ),  $\omega_2$  oder  $\omega_2\Delta\text{N19}$  (8  $\mu\text{M}$ ), 50 ng linearisiertem 3.0 Kb großem Plasmid pUC57 mit  $P_{\text{CopS}}$ -Region (*parS*-DNA) und ATP oder ADP (5 mM) sowie  $\text{MgCl}_2$  (10 mM) in einem Reaktionspuffer (0.2 M NaCl und 0.1 M Tris-HCl pH 7.5) zusammengesetzt. Die Proben wurden sofort für die EM-Darstellung bereitgestellt, um einen möglichen Abbau der Filamente zu vermeiden. Die Behandlung der Proben mit 1 %igem Uranylacetat und die weiteren Präparierungen wurden von Herrn Dr. C. Böttcher (FU Berlin) durchgeführt.