

## **Teil III**

# **Kristallisation von membranständigem TF**

# Kapitel 8

## *Full length*–TF

### 8.1 TF–263

Bei den Kristallisationsversuchen wurden die von [52], [53] und [79] beschriebenen Lösungen eingesetzt (kommerziell verfügbar als *Crystal Screen I<sup>TM</sup>*, *Crystal Screen II<sup>TM</sup>* und *Membfac<sup>TM</sup> Screen*, Hampton Research Corp., Laguna Niguel, USA). Das Detergens C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> wurde in den Mengen 4–10-facher CMC–Werte eingesetzt, um die Variation von Proteinkonzentrationen (8–20 mg/ml), Temperatur (4° C, 20° C) und Salz im Probenpuffer (bis 200 mM NaCl) durchzuführen, was jedoch nicht zur Ausbildung von Kristallen führte. Lediglich Spherulite erschienen bei Kristallisationsbedingungen von 30 % PEG 3000, 0,1 M Tris/HCl, 100 bis 200 mM NaCl–, LiCl–, MgCl<sub>2</sub>– oder CaCl<sub>2</sub>–Salz und einem pH–Wert zwischen 7,5–9,0.

Die von [80] speziell für das C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>–Detergens<sup>1</sup> entwickelten Kristallisationslösungen für 4° C und 20° C zeigten bei 4,5-facher CMC–Konzentration keine erfolgversprechenden Resultate, ebensowenig wie das C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>–Detergens mit den Kristallisationslösungen des *Membfac Screens<sup>TM</sup>*. Auch der 2-fache Lauf einer Sephadex–G25–Säule, der den vollständigen Detergentenaustausch gewährleisten sollte, führte mit 3-facher CMC–Konzentration von  $\beta$ –OG im Proteinpuffer nicht zu Kristallen.

Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, zeigten sich im Laufe der Zeit für die Proteinlösung höhermolekulare Banden in der SDS–PAGE, die wahrscheinlich auf Aggregate durch das freie Cystein an Position 245 zurückzuführen waren.

---

<sup>1</sup>Tetraethylenglykol–Monoocetyler

Deshalb endete hier das Kristallisationsvorhaben des nativen TF-263. Stattdessen sollte die im folgenden Kapitel beschriebene Mutante TF-263 C245S kristallisiert werden.

## 8.2 TF-263, Mutante C245S

Protein, das nach dem in Kapitel 3.3 beschriebenen Reinigungsprotokoll mit einer Konzentration von 8,8 mg/ml gewonnen wurde, zeigte kleine, sternförmigen Kristalle bei 2-facher CMC-Konzentration von  $\beta$ -OG mit einer Kristallisationslösung, die Formiat in einer Konzentration zwischen 3,8 und 4,8 M enthielt. Der Einsatz von 16 Detergentien aus dem *detergent screen I* von Hampton Research zeigte nur wenig Einfluß auf die Kristalle, so daß keine Vergrößerung der Kristalle erreicht werden konnte.

Erst eine Variation der Reinigung (Kapitel 3.3.5) lieferte Proteinlösung mit einer maximalen Konzentration von 0,9 mg/ml, die in kleinen, blättchenförmig verwachsenen Kristalle von etwa  $25 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$  Abmessung kristallisierte. Diese Kristalle drehen aber nicht die Polarisationssebene von Licht.

Die weitere Reinigung mit reduzierten Waschschritten (siehe Kapitel 3.3.5), ergab eine Proteincharge mit einer Konzentration von 8,4 mg/ml in 20 mM Phosphatpuffer, 0,1 M NaCl, 1,5 %  $\beta$ -OG bei pH 7,4. Mit dieser Proteinlösung konnten die besten Kristalle bezüglich Größe und Drehung der Polarisationssebene des Lichtes gezüchtet werden.

Abbildung 8.1 zeigt Kristalle, die unter der Bedingung von

2 % PEG 400, 2,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Na-Hepes bei pH 7,5 (links)  
1,0 M Na-Citrat, 0,1 M Na-Hepes bei pH 7,5 (rechts)

gewachsen sind. Kleinere und ebenfalls verwachsene Kristalle waren auch unter den folgenden Bedingungen zu beobachten:

1,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Na-Hepes, 0,1 M NaCl bei pH 7,5 und  
1,6 M  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 M MES<sup>2</sup> bei pH 6,5

Das Montieren der Kristalle in den *loops* erwies sich als schwierig, da die Kristalle sehr weich waren und leicht zerfielen. Zum Einfrieren wurde dem Kristallisationspuffer  $\approx 20$  % Glycerin zugesetzt. Testmessungen an der *Beamline* ID14-2 (ESRF, Grenoble) ergaben Diffraktionsbilder, die vereinzelte Reflexe bis zu einer Auflösung von  $20 \text{ \AA}$  zeigten (Abbildung 8.1, unten).

<sup>2</sup>2-Morpholinoethansulfonsäure

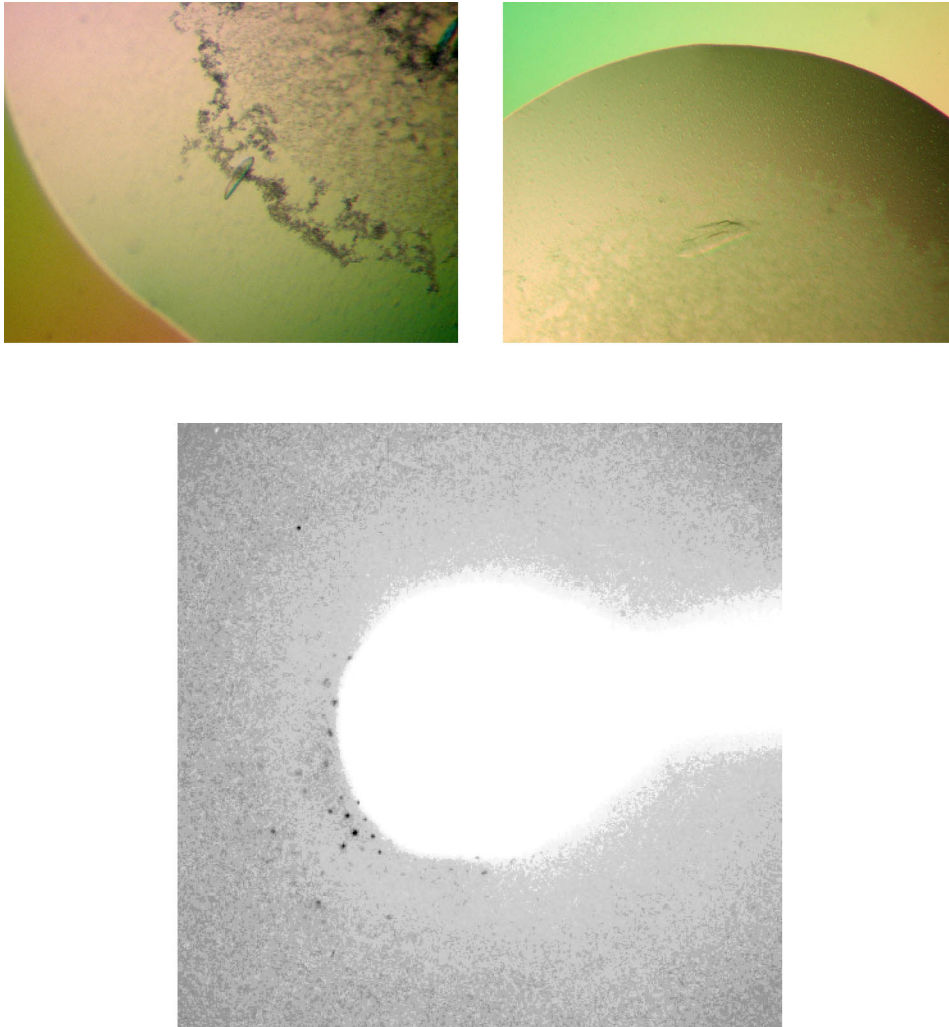


Abbildung 8.1: Oben sind zwei Fotografien von TF-263 C245S Kristallen abgebildet, die bis zu einer Größe von etwa  $30 \times 70 \times 250 \mu\text{m}^3$  wuchsen. Wie auf dem rechten Bild besser zu erkennen ist, sind diese Kristalle verwachsen bzw. gefächert. Ein einkristallines Bruchstück eines Kristalls zeigt das im unteren Teil der Abbildung dargestellte Streubild mit Reflexen bis zu einer Auflösung von  $20 \text{ \AA}$ . Diese Aufnahme erfolgte am Synchrotron in Grenoble, ESRF. Die abgeschätzten Zellparameter betragen  $a=b=c=80 \text{ \AA}$

Kristalle, die mit der vorherigen Proteincharge in Na-Formiat-Kristallisationslösung wuchsen (s.o.), konnten mit dieser Reinigungscharge nicht reproduziert werden.

### 8.3 TF-263 im Komplex mit Fab-Fragment D3

Nach Aufreinigung des Komplexes (Kapitel 4) waren die Kristallisationsversuche von TF-263·D3 bei 20° C für eine Proteinkonzentration von 14 mg/ml in 20 mM Tris/HCl-Puffer bei 3-facher CMC-Konzentration von C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> für folgende Bedingungen erfolgreich:

1,0–1,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M ADA<sup>3</sup>, pH 6,5  
1,0–1,2 M K/Na-Tartrat, 0,1 M Na-Hepes, pH 7,3–8,0  
0,9–1,0 M (Na/K)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 M Na-Hepes, 0,05–0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH  
7,5–8,0  
0,7–0,8 M Na-Citrat, 0,1 M Na-Hepes, pH 7,5

Unter allen Bedingungen wuchsen lange, sehr dünne Nadeln bis zu einer maximalen Größe von 10 x 10 x 500 μm<sup>3</sup>. Diese Nadeln waren sehr temperaturanfällig. Nach wenigen Minuten reichte die Wärmeabgabe des Mikroskopes aus, um die Nadeln aufzulösen. In vielen Fällen wurden nach 1–2 Tagen Nadeln beobachtet, die nach 3 Tagen wieder in Lösung gingen, was für eine Abhängigkeit der Kristallbildung von der Konzentration der Proteinlösung spricht.

Aufgrund der geringen Größe der Kristalle und der damit verbundenen Probleme beim Montieren eines Kristalles in einen *loop* wurden keine Streuexperimente mit den im Institut vorhandenen Versuchsaufbauten vorgenommen.

---

<sup>3</sup>n-(2-Acetamido)iminodiacetsäure

# Kapitel 9

## TF-243

### 9.1 TF-243

Die Kristallisation einer Protein-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Tris/HCL-Puffer mit 4-facher CMC-Konzentration von C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> war ebenso erfolglos wie die Versuche mit 4,5-facher CMC-Konzentration von C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>.

Erst die Verwendung der Original-TF-243-Proteinlösung (10 mg/ml, 20 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 % β-OG) mit Zusatz von 1 CMC-Konzentration β-OG (0,5 %) führte zu Kristallen, die bei 20° C unter den Bedingungen

0,8–1,5 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M Tris/HCl, 0–10 mM NiCl bei pH 8,0–8,5, und  
0,8–1,5 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M Bicine<sup>1</sup>, 0–10 mM NiCl bei pH 9,0–10,5

wuchsen. Mit zunehmender Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Konzentration veränderte sich die Stäbchenform der Kristalle (10 x 10 x 60 μm<sup>3</sup>) zu einer Linsenform (15 μm<sup>3</sup>), wie sie auch für TF-219, die extrazelluläre Domäne, beobachtet wurde. Obwohl diese Kristalle die Polarisationsebene des Lichtes drehten, war bei Testmessungen an der *Beamline* ID14-2 am Synchrotron in Grenoble keine Streuung zu detektieren.

### 9.2 TF-243 im Komplex mit Fab-Fragment D3

Nach erfolgreicher Separation des Komplexes von freiem D3 lag TF-243·D3 mit einer Konzentration von 12 mg/ml in 20 mM Tris/HCl, 0,012 % C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, 0,01 % NaN<sub>3</sub> bei pH 7,5 vor. Aus dieser Proteinlösung und der Kristallisationslösung, die 1,0 M Na-/K-Tartrat, 0,1 M Na-Hepes bei pH 7,5 enthielt, wuchsen nadelförmige Kristalle. Die Nadeln erreichten ein Volumen von 50 x 150 x 1000 μm<sup>3</sup> (Abb. 9.1) und reagier-

---

<sup>1</sup>n,n-Bis(2-hydroxyethyl)glycin

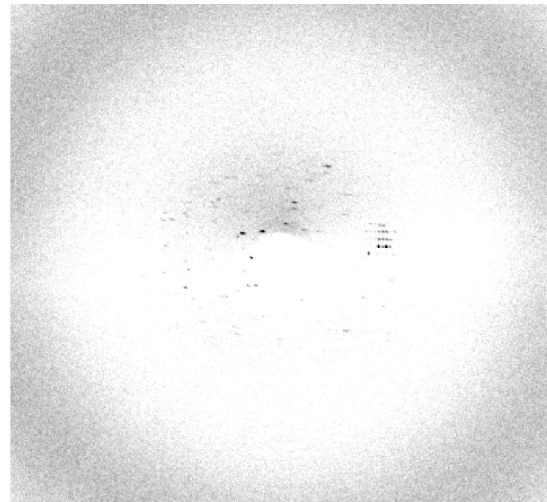
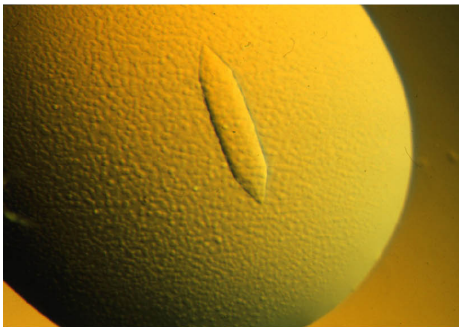


Abbildung 9.1: Links ist ein typischer Kristall des TF-243·D3 Komplexes zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, daß dieser Kristall nicht die Polarisierung der Lichts verändert. Das Diffraktionsbild rechts wurde von einem in einer Kapillare montierten Kristall bei Raumtemperatur aufgenommen und zeigt Streuung bis etwa  $7 \text{ \AA}$ , das beste erreichte Ergebnis für TF-243·D3-Kristalle. Die hypothetischen Zellachsen konnten zu  $80 \text{ \AA}$ ,  $140 \text{ \AA}$  und  $270 \text{ \AA}$  abgeschätzt werden

ten empfindlich mit Auflösungserscheinungen auf die Wärmeabgabe des Mikroskops. Dieses Verhalten zeigten sie auch bei der Suche nach der optimalen Lösung zum Einfrieren in Stickstoff (Kapitel 5). Nur schnelles Waschen und Einfrieren der Kristalle konnte die Auflösungserscheinungen einschränken. Testmessungen an der *Beamline* BW7B (EMBL, Hamburg) an TF-243·D3 Kristallen im 110 K Stickstoffstrom zeigten einzelne Reflexe bis  $12 \text{ \AA}$  Auflösung auf den Diffraktionsbildern.

Ein besseres Ergebnis konnte mit Kristallen erzielt werden, die in einer Kapillare montiert und bei Raumtemperatur gemessen wurden. Hier entfiel der Zusatz eines Kryoprotektanten und die damit verbundenen Auflösungserscheinungen konnten vermieden werden. Abbildung 9.1 zeigt eine dieser Aufnahmen, die mit einer rotierenden Kupfer-Drehanode gemessen wurden. Diese Aufnahme mit Reflexen bis etwa  $7 \text{ \AA}$  zeigt das beste für TF-243·D3-Kristalle erreichte Ergebnis.

# Kapitel 10

## Diskussion und Ausblick

Als Ergebnis dieser Studie kann die erfolgreiche Kristallisation der Proteine TF-263 C245S und TF-243 und der Komplexe TF-263·D3 und TF-243·D3 vorgestellt werden. Leider reichten die Größe und / oder die Qualität der Kristalle nicht aus, um in Streuexperimenten eine Auflösung von besser als 3.3 Å erzielen, die zur Strukturlösung notwendig ist.

Es sind unterschiedliche Faktoren denkbar, die einen Einfluß auf die Kristallisation und die Qualität der Kristalle haben.

Im Gegensatz zur Kristallisation von globulären Proteinen ist bei Membranproteinen die Wahl des Detergens von entscheidender Bedeutung [56], [81], [82], [83]. Das Detergens, das mit dem hydrophoben Bereich und der polaren Kopfgruppe die Membran ersetzen soll, indem es die Membrandomäne des Proteins mizellenartig umschließt, muß der Struktur des Proteins angepaßt werden. So kann sowohl ein Detergens mit zu langem hydrophoben Bereich als auch ein Detergens mit zu großer polarer Kopfgruppe die Ausbildung von Kristallpackungskontakten stören oder verhindern.

Wahrscheinlich ist das für den TF-243·D3-Komplex der Fall. Die Abmessungen der Kristalle dieses Komplexes lassen einerseits auf die Ausbildung von intermolekularen Packungskontakten schließen. Andererseits deuten die Auflösung der Diffraktion und das Nicht-drehen der Polarisationssebene von Licht darauf hin, daß die Kristalle eine sehr hohe Mosaizität besitzen und somit aus mehreren geringfügig gegeneinander verschobenen einkristallinen Bereichen bestehen. Für diese Kristalle führt wahrscheinlich die ausgedehnte Variation unterschiedlichster Detergentien zu einer Verbesserung der Auflösung. Vielleicht würde auch die Kristallisation mittels "Kubischer Phasen" (*lipidic cubic phases*), die für Bacteriorhodopsin [84], [85] zu einer deutlichen Steigerung der Auflösung führte, bessere TF-243·D3-Kristalle liefern. Dabei wird aus einer Mischung von Lipiden eine flüssige Matrix erzeugt, die ein räumliches Gitter



aus hydrophoben Tunneln und polaren Zwischenbereichen ausgebildet. Membranproteine können sich in diese Umgebung einbetten und vororientieren. Durch Proteinfällung kann es schließlich zur Kristallisation kommen [86], [87], [88].

Die Kristalle vom TF-263·D3-Komplex waren sehr klein. Die Kristallisation des TF-263·D3-Komplexes könnte durch das freie Cystein an Position 245 in TF beeinflusst sein, das zur Aggregation der Moleküle führen kann. Die Mutante TF-263 C245S im Komplex mit D3 liefert vielleicht bessere und größere Kristalle. Die Verwendung des D3H44-Fab-Fragments anstelle des D3-Fab-Fragments für die Komplexbildung mit TF-243 und TF-263 C245S könnte sich auch auf die Größe und die Qualität der Kristalle auswirken.

Für die freien TF-Moleküle TF-243 und TF-263 C245S fällt auf, daß Sulfat-Ionen bei der Kristallisation anwesend sind. Es wäre denkbar, daß sie die Funktion der Phosphatgruppen in der Membran übernehmen. Vielleicht sind Sulfat- oder Phosphat-Ionen wichtig, um die Transmembrandomäne gegenüber der extrazellulären Domäne von TF zu stabilisieren. Die Kristallstruktur von FhuA [89] zeigte erstmals ein assoziiertes Lipopolysaccharid, das während der Aufreinigung von FhuA nicht durch Detergenmoleküle ersetzt werden konnte. Für TF-263 C245S weist die Abhängigkeit des Kristallisationsverhaltens von der Intensität der Waschschriffe bei der Aufreinigung auf die Bedeutung von Lipiden zur Stabilisierung der Domänen hin. Weitere Variationen des Aufreinigungsprotokolls verbessern wahrscheinlich die Qualität der TF-263 C245S-Kristalle. Die Kristallisation mit "Kubischen Phasen" könnte einen ähnlichen Stabilisierungseffekt haben und zu verbesserten Kristallen führen.

Das Ziel der Studie, die Strukturen der integralen Membrandomäne von TF und der zytoplasmatischen Domäne zu lösen, ist nicht erreicht worden. Daß die Kristallisation von Membranproteinen weitaus mehr Schwierigkeiten bereitet als die von globulären Proteinen, ist auch an der Anzahl bislang publizierter Kristallstrukturen abzulesen. Derzeit stehen in der Protein-Datenbank [78] etwa 40 Strukturen von Membranproteinen mehr als 12000 Protein-Strukturen von globulären Proteinen gegenüber. Das Verhältnis von 1:300 verdeutlicht, wie schwierig die Kristallisation von solubilisierten Membranproteinen ist.

Zusammenfassend liefert diese Studie Ergebnisse, die eine Basis zur Lösung der Struktur von TF mit der Transmembrandomäne und *full length*-TF bilden.