

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-Caprinsäure	SIGMA-ALDRICH	
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (LMP)	BRL, heute Teil von Invitrogen	
2-Methyl-2,4-Pentadiol	Merck	
Sterilfilter (0,22 µm Porengrösse)	Millipore	
Polyethylenglykol (M _w = 200 – 20.000 Da)	Sigma-Aldrich, Merck	
Enzyme und Proteine		
EcoRI	NEB (New England Biolabs)	
NdeI	NEB (New England Biolabs)	
BamHI	NEB (New England Biolabs)	
XhoI	NEB (New England Biolabs)	
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene	
T4-Ligase	NEB (New England Biolabs)	
DNaseI	Merck	
Thrombin	Sigma-Aldrich	
Trypsin	Sigma-Aldrich	
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich	
ProteinaseK	Sigma-Aldrich	
Kits		
Qiaprep Spin Plasmid Miniprep kit	Qiagen	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	
Expressionsvektoren und Bakterienstämme		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen	
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	Novagen	
<i>E. coli</i> B834(DE3)	Novagen	
<i>E. coli</i> ER2566	NEB (New England Biolabs)	
pET28a	Novagen	
Nährmedien für die Zellanzucht		
LB-Medium	Caseinpepton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	pH 7,5 (RT, 1 M NaOH)	
LBK-Medium	LB-Medium mit Kanamycin	40 µg/ml
LB-Agar	LB-Medium mit	

M9-Minimal Medium	Agar-Agar	15 g/l
	Natriumhydrogenphosphat	6 g/l
	Kaliumdihydrogenphosphat	3 g/l
	Ammoniumchlorid	1 g/l
	Natriumchlorid	0,5 g/l
	Glukose	5 g/l
	Thiamin	1 mg/l
	Magnesiumsulfat	1 mM

Selenomethionin ACROS Organics

Proteinreinigung

Reinigung von $\Delta 18$ -aeNAC:

Ni-Affinitäts-Chromatographie (Quiagen-Ni-NTA)

Waschpuffer 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol

Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 200 mM Imidazol

Dialyse

Pufferlösung 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM KCl ; 2 mM CaCl₂

Kationenaustausch-Chromatographie (PL-SAX)

Puffer A 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 500 mM KCl ; 1 mM EDTA

Puffer B 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 M KCl ; 1 mM EDTA

Gelfiltration (HiLoad Superdex75 16/60)

Pufferlösung 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM KCl ; 1 mM EDTA

Reinigung von humanem β NAC(38-98)- α NAC(71-130)

Ni-Affinitäts-Chromatographie (HisTrap – Amersham Biosciences)

Puffer A 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl

Puffer B 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 200 mM Imidazol

Dialyse

Pufferlösung 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 500 mM NaCl ; 2 mM CaCl₂

Gelfiltration (HiLoad Superdex75 16/60)

Pufferlösung 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl ; 1 mM EDTA

Konzentratoren

Amicon Ultra; 3 kDa; 15 ml

Proteinbestimmung

Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BioRad)

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 Schleifens)

Hampton Research

Deckgläser 22 × 22 mm, Stärke 2

Laborhandel

Glaskapillaren, $\varnothing = 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5$ mm

Glas Müller (Berlin)

Quarzkapillaren, $\varnothing = 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5$ mm

Glas Müller (Berlin)

Crystal-Screen I

Hampton Research

Crystal-Screen II

Hampton Research

Index-Screen

Hampton Research

Natrix-Screen

Hampton Research

Salt RX

Hampton Research

PEG/Ion-Screen	Hampton Research
Quick-Screen	Hampton Research
MPD-Grid-Screen	Hampton Research
Ammonium Sulfat-Grid-Screen	Hampton Research
PEG/LiCl-Grid-Screen	Hampton Research
NaCl-Grid-Screen	Hampton Research
Malonat-Grid-Screen	Hampton Research
PEG6000-Grid-Screen	Hampton Research
Additive-Screens I-III	Hampton Research
Detergent-Screen I	Hampton Research
Geräte	
Agarose-Gelelektrophorese Kammer QS710	Kodak Biomax
ÄKTA Chromatographiesystem	GE Healthcare
Binokularmikroskop SZ60	Olympus
DLS-Apparatur Laser Spectroscatter 201	RiNA GmbH
CD Spektrometer JASCO-J600	Jasco Labor und Datentechnik
BioCad Chromatographiesystem	Perceptive Biosystems
Fraktionsammler SF2120	Applied Biosystems
PAGE-Elektrophoreseappatur	Biometra
French [®] Pressure Cell Press	Sim Aminco
Elektroporator Easyject Prima	EquiBio
Mar345 Image Plate	mar-Research
Röntgeneratore FR-571 mit rotierender Anode	Enraf-Nonius
Cryosystem	Oxford
Thermocycler Tpersonal, Trio Thermoböck	Biometra
UV-VIS-Spektrometer	Shimadzu

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 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°C gelagert. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (EquiBio).

2.2.2 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 bei Fa. GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben.

2.2.3 Planen von *primern* 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 waren, Sekundärstrukturen ausbilden zu können.

2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Restriktionsverdau wurde nach Standardprotokollen und den Empfehlungen von New England Biolabs durchgeführt und variiert. Um optimale Bedingungen für einen Restriktionsverdau bereitzustellen, wurde für jedes Enzym der vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlene Puffer verwendet. Bei Doppelverdau mit zwei Enzymen wurden Puffer gewählt, die für beide Enzyme zufrieden stellende Aktivität ermöglichten.

2.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick[®] Gel-Extraction-Kit der Fa. Qiagen verwendet. Die DNA-Banden durch 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 10 mM Tris (pH 8,0) eluiert.

2.2.6 Klonierung der verschiedenen NAC Konstrukte

Als Ausgangsprodukt für alle weiteren Konstrukte dienten bereits vorhandene Konstrukte des humanen α - und β -NAC bzw. des archaebakteriellen NAC (aeNAC)

aus *Methanothermobacter marburgensis* im Vektor pET28a von B. Beatrix. Ausgehend von diesen vorhandenen Plasmiden wurden die verschiedenen weiteren Konstrukte von humanem und archaebakteriellem NAC nach Standardprotokollen kloniert (Sambrook, 1989). Die klonierten Konstrukte umfassen die unterschiedlichen Verkürzungen von humanem α - bzw. β -NAC und aeNAC und Punktmutationen. Die jeweiligen über PCR amplifizierten Konstrukte wurden in den Vektor pET28a (Novagen) mit N-terminalem HisTag und Thrombin Schnittstelle kloniert. Zur Expression des heterodimeren NAC Komplexes wurden die Gene von α - und β -NAC hintereinander in die MCS (Multiple Cloning Site) des pET28a Vektors kloniert. Die verschiedenen Konstrukte, bzw. das erste Gen der Konstrukte, wurden jeweils über die erste in der MCS des pET28a Vektors vorhandene Schnittstelle (NdeI) kloniert, so dass nach der Abtrennung des HisTag über die Thrombinschnittstelle noch 3 weitere Aminosäuren (GHS) am N-Terminus verblieben. Für die notwendige Optimierung der Koexpression von α - und β -NAC wurde die Reihenfolge und Position der α - bzw. β -NAC Gene in der MCS des pET28a Vektors variiert. Darüber hinaus wurde für einige der Konstrukte eine RBS (Ribosome Binding Site) vor das zweite Gen gesetzt. Das Vorhandensein der RBS vor dem zweiten Gen und die Orientierung der Klonierung der für α - und β -NAC kodierenden Gene erwies sich als essentiell für die erfolgreiche Koexpression des heterodimeren NAC. Die erfolgreich in ausreichender Menge koexprimierten Konstrukte von heterodimerem humanem NAC sind in Abschnitt 3.5.1 in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 3 gibt die für die Klonierung der kristallisierten Konstrukte von verkürztem $\Delta 18$ -aeNAC und verkürztem heterodimerem humanem NAC [β NAC(38-98)- α NAC(71-130)] verwendeten *primer* an. Beschrieben sind jeweils die *forward* und *reverse primer* und die darüber eingeführten Restriktionsschnittstellen. Die über PCR amplifizierten Gensequenzen wurden über die eingeführten Schnittstellen in die MCS des Vektors pET28a kloniert. Die *primer* für das verkürzte α -NAC Gen enthalten außerdem eine RBS vor dem Startkodon, so dass die Sequenzen die für die verkürzten α - und β -NAC Gene kodieren in der Orientierung β NAC(38-98)-RBS- α NAC(71-130) in die MCS des pET28a mit N-terminalem HisTag und Thrombinschnittstelle an β -NAC kloniert wurden.

Tabelle 3 Verwendete *primer* für die Klonierung der kristallisierten Konstrukte von archaebakteriellem NAC (α eNAC) und heterodimerem humanen $\alpha\beta$ -NAC. In Klammern sind die eingeführten Restriktionsschnittstellen beschrieben.

Δ 18- α eNAC aus *M. marburgensis* :

forward primer (NdeI) : 5' -GGGCTTTCATATGAAGCAGATGGGTATGGATATGAAGG -3'

reverse primer (EcoRI) : 5' -TTTGAATTCTCAGCTCAGCCTCATAAATTCCTCTGC -3'

β NAC (38-98) - α NAC (71-130) aus *H. sapiens*

β NAC (38-98)

forward primer (NdeI) : 5' -AAAAAACATATGGCAGATGACAAAAAAGTTTCAGTTCTC-3'

reverse primer (EcoRI) : 5' -TGAATTCTTACTGCTTCGTCTCAGCATGGC -3'

α NAC (71-130)

forward primer (EcoRI) : 5' -TGAATTCAGAAGGAGATATACCATGCGTAGCGAAAAGAA
GGCA -3'

reverse primer (XhoI) : 5' -TTTCTCGAGTTAATCTTCGATCTTGGCTTCCCCAAAACG
AT -3'

2.3 Proteinpräparation

2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Bakterienkultivierung wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, indem 100 ml LBK-Medium mit einer Einzelkolonie einer frisch transformierten Kultur angeimpft wurden. Die Kulturen wurden über Nacht nach Zusatz von Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Die präparative Kultivierung erfolgte im 8 l Maßstab, indem acht 2 l Schikanekolben mit je 1 l LBK-Medium angesetzt wurden. Das Medium wurde mit je 10 ml der Übernachtskultur der plasmidtragenden *E. coli* Zellen inokuliert. Während der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von etwa 0.6) wurde die Expression durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 3 h weiterer Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5.000×g, 4°C, 10 min) und entweder direkt aufgeschlossen oder bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert.

2.3.2 Expression und Reinigung von Selenomethionin-derivatisiertem Protein

Zur Gewinnung eines vollständig Selenomethionin-derivatisierten Variante von $\Delta 18$ -aeNAC wurde der Vektor, der das Gen für $\Delta 18$ -aeNAC trägt, in den Methionin-auxothrophen *E. coli* Stamm B834(DE3) von Novagen transformiert und nach der Methode von Budisa et al. exprimiert (Budisa et al., 1995). Nach der Expression wurde das Protein wie Methionin- $\Delta 18$ -aeNAC gereinigt und kristallisiert. Im Unterschied zum Protokoll des Methionin Derivats wurden alle Puffer sorgfältig entgast, mit Stickstoff gespült und mit 5 mM EDTA und 10 mM DTT versetzt.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Einbaus von Selenomethionin wurde das gereinigte Proteine mit MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert.

2.3.3 Zellaufschluss

Die zentrifugierten Zellen wurden im etwa dreifachen Volumen des Zellgewichts in Puffer mit physiologischem pH und mindestens 500 mM NaCl 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 μ M versetzt. Zum Abbau von DNA wurden 2 μ l DNaseI (500 U) zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde zweimal in einer French[®] Press-Druckentspannungs-Anlage bei 4°C mit einem Druck von etwa 75 bar aufgeschlossen.

2.3.4 Proteinreinigung durch chromatographische Methoden

Zunächst wurde die Gesamtmembranfraktion und Zelltrümmer der aufgeschlossenen Bakteriensuspension (Abschnitt 2.3.3) durch Zentrifugation (30.000 \times g, 4°C, 30 min) vom Cytosol und der löslichen Fraktion abgetrennt. Da alle Konstrukte in den Vektor pET28a kloniert waren und damit einen N-terminalen HisTag und eine Thrombin Schnittstelle an einer der NAC Untereinheiten trugen, wurde als erster Aufreinigungsschritt in allen Fällen die Nickel – Affinitätschromatographie gewählt. Die Affinitätschromatographie wurde entweder mit dem Nickel-NTA Material von Qiagen im *batch* Verfahren oder mit der HisTrap Säule (Amersham Biosciences) an der Äkta Chromatographie Anlage durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde das

vereinigte Eluat über Nacht bei 4°C dialysiert und gleichzeitig durch Zugabe von Thrombin der HisTag entfernt. Die Menge an eingesetztem Thrombin pro mg zu schneidendem Protein wurde je nach Konstrukt geringfügig variiert (etwa 0,2 µl Thrombin (1 U/µl) auf 1 mg Protein des Eluates der Ni-Affinitätschromatographie).

Nach dem ersten Schritt der Affinitätschromatographie wurde je nach Reinheitsgrad und Empfindlichkeit des Proteins entweder eine Kombination von Heparin (20HE, POROS), Anionen Austausch Chromatographie (10HQ, POROS bzw. PL-SAX, PolymerLabs) und Gelfiltration (Superdex-S75/S200, Amersham Biosciences) angewandt, oder das Produkt wurde, besonders bei starker Bindung des His-*getagten* Proteins an die Ni-Matrix, nach dem Thrombinverdau eine zweites Mal über die HisTrap Säule (Amersham Biosciences) aufgereinigt und der Durchlauf nach Konzentration weiter über Gelfiltration (Superdex-S75/S200, Amersham Biosciences) aufgetrennt. Die Reinigungen wurden bei neutralem pH und ohne Zusatz von Reduktionsmitteln durchgeführt.

Anhang 7.1 beschreibt beispielhaft das optimierte Aufreinigungsprotokoll von heterodimerem humanem WT – NAC, das eine hohe Protease-Sensibilität zeigte.

Das Konstrukt $\Delta 18$ -aeNAC, das kristallisiert und dessen Kristallstruktur bestimmt werden konnte, wurde durch die Kombination von Ni-NTA Affinitätschromatographie, anschließenden Thrombinverdau, Anionen Austausch Chromatographie (PL-SAX) und Gelfiltration (S75) aufgereinigt. Das Konstrukt das für die humane NAC-Domäne kodiert und dessen Kristallstruktur später bestimmt werden konnte, wurde über die HisTrap – Säule (Amersham Biosciences), anschließenden Thrombinverdau und einer abschließenden Gelfiltration (S75) gereinigt (siehe Abschnitt 2.1 für verwendete Pufferlösungen).

2.3.5 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 Angaben des Herstellers.

2.4 Proteincharakterisierung

2.4.1 Konzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach den Methoden von Bradford (Bradford, 1976) oder BCA (Smith et al., 1985) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Essay Kits der Fa. BioRad nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Bestimmung nach der BCA Methode wurde mit dem Kit der Fa. BioRad ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Proteinstandard diente für beide Bestimmungsmethoden BSA (Bovine Serum Albumin).

2.4.2 Native Polyacrylamid Geleelektrophorese (PAGE) und

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Bestimmung der Reinheit und Homogenität der aufgereinigten Proteine und Komplexe wurden denaturierende SDS – PAGE, sowie native PAGE und Isoelektrische Fokussierung verwendet. In der nativen PAGE werden die Proteine unter nicht denaturierenden, nativen Bedingungen nach Ladung und Größe getrennt und es lässt sich besonders die Homogenität und das Oligomerisierungsverhalten von Komplexen analysieren. Die Isoelektrische Fokussierung liefert eine analytische Auftrennung der Proteine nach deren isoelektrischen Punkt und erlaubt eine weitergehende Aussage über die Homogenität der gereinigten Komplexe. Durch Komplementierung der unterschiedlichen Elektrophorese Methoden mit den Ergebnissen der Gelfiltration und der DLS ließ sich eine genaue Aussage über den Reinheitsgrad, die Homogenität und das Oligomerisierungsverhalten der aufgereinigten Probe treffen.

Sowohl native PAGE als auch IEF wurden an dem PHAST-System von Amersham Biosciences und den zugehörigen Gelen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie kann die Masse von Makromolekülen bestimmt werden. Die Methode wurde zur Analyse der gereinigten Komplexe und des Selenomethionin Derivats verwendet. Hierzu wird die möglichst salzfreie Proteinlösung mit der organischen Matrix (Sinapinsäure) vermischt und auf einen Probenträger aufgebracht. MALDI-TOF Spektren wurden von Dr. Peter Franke (Institut für Biochemie, FU Berlin) durchgeführt. Die Entsalzung der Proben erfolgte mit Hilfe von Zip-Tips (Entsalzungssäulchen von Millipore) nach Anleitung des Herstellers.

2.4.4 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 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).

Für die DLS wurden steril filtrierte Proben von 20 µl des gereinigten und konzentrierten, für die Kristallisation vorbereiteten, Proteins eingesetzt und die Messungen nach Angaben des Herstellers (RiNA) durchgeführt. Da die Bestimmung des Molekulargewichts 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 sogenannten Autokorrelationsfunktion automatisch berechnet.

2.4.5 Circular Dichroismus - Spektroskopie

Die Methode der Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie wurde für eukaryontisches NAC und aeNAC verwendet, um eine Aussage über die Sekundärstrukturverteilung der gereinigten Komplexe zu erhalten und um mögliche strukturelle Änderungen bei Zugabe von Zusätzen oder Kofaktoren zu analysieren. Für

eine detaillierte Besprechung der möglichen Aussagen der CD Spektroskopie und den Nutzen dieser Methode in Kombination mit der Kristallographie siehe CCP4 Newsletter 37:29-30, 1999 (CCP4, 1994).

Die CD Spektren wurden an einem JASCO-J600 CD Spektrometer (JASCO Labor- und Datentechnik) in einem Wellenlängenbereich von 190 nm – 240 nm gemessen. Die Proben wurden in 10mM Natriumphosphat pH 7,5, 50 mM NaCl vermessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Verdünnen auf einen für die Messung optimalen Bereich eingestellt, und anschließend wurde die Konzentration bestimmt. Die reduzierten und normierten Spektren wurden verglichen um mögliche Änderungen festzustellen oder mit dem Programm K2D analysiert (Andrade et al., 1993).

2.4.6 NMR - Spektroskopie (^1H 1D - NMR)

Mit ^1H 1D-NMR kann qualitativ zwischen ungefalteten und gefalteten Proteinen unterschieden werden (siehe Abbildung 7). Signale ungefalteter Proteine haben kaum Dispersion, d.h. die ^1H -Frequenzen der verschiedenen Aminosäuren sind ähnlich und die Signale überlappen. Gefaltete Proteine erzeugen dagegen eine mehr oder weniger gute Dispersion, wodurch einzelne Signale oberhalb 8.5 ppm und unterhalb 0.5 ppm auftreten. Proteine mit hohem Anteil an β -Strängen zeigen gute Dispersion, während vorwiegend α -helikale Proteine eher geringe Dispersion zeigen. Proteine, die keine aromatischen Seitenketten enthalten, weisen generell weniger Dispersion auf. Sind die Signale verbreitert, so deutet dies auf instabile Faltung (*molten globule, extended disorder, random coil*) hin.

Die NMR Spektren von humanem, heterodimerem WT-NAC wurden in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Oschkinat (FMP, Berlin – Buch) am FMP aufgenommen. Das gereinigte Protein lag dafür in einer Konzentration von 10mg/ml mit 20mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und 50 mM NaCl vor.

6 - 10 ppm N¹H-Rückgrat, N¹H₂-(Asn,Gln):

8,5 - 9,5 ppm β - Strang

8 - 8,5 ppm *Random Coil*

7,5 - 8 ppm α - Helix

6,5 - 7,5 ppm ¹H-Aromaten

3,5 - 5,5 ppm ¹H - C_α

-0,5 - 2 ppm C¹H₂- Seitenketten

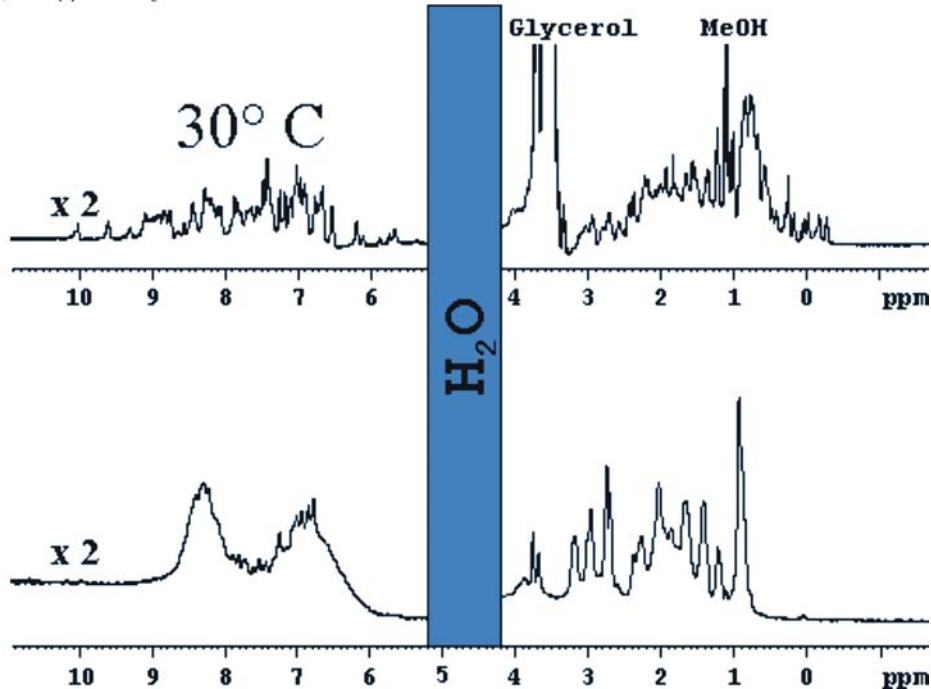


Abbildung 7 ¹H1D-NMR Vergleichs - Spektren eines Modellproteins. Die obere Darstellung zeigt das Spektrum des gefalteten Proteins, während das untere Spektrum das Protein im entfalteten Zustand zeigt. Die Legende beschreibt die für die Proteinanalytik relevanten Bereiche der chemischen Verschiebung.

2.4.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die Methode der Analytischen Ultrazentrifugation untersucht die Bewegung und Konzentrationsverteilung von Biomolekülen in Lösung und wird besonders zur Analyse von Assoziationsgleichgewichten von Proteinen verwendet, da sie im Gegensatz zu vielen anderen Methoden eine Analyse von kurzlebigen Komplexen erlaubt.

Die Methode wurde verwendet, um im Falle des aeNAC festzustellen, ob aeNAC als Monomer, Dimer oder Tetramer vorkommt und wie die Gleichgewichtsverteilung dieser Spezies in Lösung ist. Verwendet wurde gereinigtes Δ18-aeNAC in 20mM Tris pH 7,5 und 150 mM NaCl. Die Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente und die Analyse der Daten wurden von Prof. J. Behlke (MDC, Berlin - Buch) durchgeführt.

2.4.8 Limitierte Proteolyse

Zur Analyse von möglichen flexiblen Sequenz- oder Schleifen-bereichen der Struktur von humanem und archaebakteriellem NAC wurde eine limitierte Proteolyse mit vier Proteasen unterschiedlicher Spezifität (Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase-K, Thrombin) durchgeführt.

Die vier Proteasen wurden im Massenverhältnis 1:1000 Protease:NAC eingesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeiten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Aufkochen gestoppt und die Proben über SDS-PAGE analysiert.

2.5 Biochemische Charakterisierung

Die biochemische Charakterisierung von archaebakteriellem NAC aus *Methanothermobacter marburgensis* wurde in Zusammenarbeit mit B. Beatrix wie in Spreter et al., 2005 beschrieben durchgeführt.

2.5.1 Antikörper

Gereinigtes aeNAC mit HisTag wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Davids Biotechnologie, Regensburg). Präimmun-Serum desselben Kaninchens reagierte im Western Blot mit keinem Protein aus dem Rohextrakt von *M. marburgensis*.

2.5.2 *In vitro* Transkription, Translation und Isolierung von Ribosome Nascent Chain Complexes

Ribosome Nascent Chain Complexes (RNCs) wurden in einem zellfreien Kaninchen Retikulocyten-Lysat System (Promega) hergestellt, das mit geschnittener synthetischer mRNA, die für die ersten 77 Aminosäuren der Firefly-Luziferase kodiert, in Gegenwart von L-[³⁵S]-Methionin programmiert wurde (Beatrix et al., 2000).

2.5.3 Photoaktivierbarer Querverknüpfungs-Nachweis

Für den Querverknüpfungs-Nachweis wurde das photoaktivierbare Agens 4-[Trifluoromethyl-Diazirino]-Benzolsäure (TDBA) an Lys-tRNA^{Lys} gekoppelt und zum *in vitro* Translations-System gegeben (Beatrix et al., 2000; Gorlich et al., 1991).

2.5.4 Assoziation von aeNAC mit Ribosomen

10 g *M. marburgensis* Rohextrakt wurden in 25 ml Pufferlösung (20 mM HEPES, pH 7,4; 50 mM Mg(Ac)₂; 100 mM KCl; 5 mM Dithiothreitol; 0,5 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid; 0,1 mg DNaseI) resuspendiert, mit FrechPress aufgeschlossen und bei 38.000 Umdrehungen/min für 40 min bei 4°C in einem 60Ti-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wird im weiteren S100 genannt. Teilproben des S100 wurden auf die Endkonzentrationen 150 mM, 300 mM, 500 mM 1000mM KAc gebracht. 80 µl der jeweiligen Teilproben wurde auf jeweils ein 120 µl Saccharose-Kissen (20 mM HEPES, pH 7,4; 25 mM Mg(Ac)₂; 5 mM Dithiothreitol; 0,1 mM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid; 1 M Saccharose und 100, 300, 500 bzw. 1000 mM KAc) aufgetragen und für 1 h bei 100.000 Umdrehungen/min in einem TLA-100 Rotor (Beckman) bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand und das Pellet über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Analyse des Ribosomen Fraktion wurde die rRNA extrahiert und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Spreter et al., 2005).

2.6 Kristallisation

Für die Kristallisations - Experimente wurde hauptsächlich die Dampf-diffusionsmethode verwendet. 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 µl der so genannten Fällungsmittellösung in der Vertiefung vorgelegt. 2 - 4 µl der zu kristallisierenden Probe wurden mit 2 - 4 µl 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 µl Fällungsmittellösung vorgelegt, und in den vorgeformten Vertiefungen

wurden 1 μl der Probe und 1 μl 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 Mikro Seeding

Die Methode des Mikro Seeding ermöglicht eine Optimierung von Kristallen, indem es die Prozesse der Keimbildung und des Kristallwachstums voneinander trennt. Beim Mikro Seeding werden ‚frische‘ Mikrokristalle in einen vorequilibrierten Kristallisationsansatz, dessen Fällungsmittelkonzentration unterhalb des übersättigten Bereiches liegt, eingeführt (für detaillierte Besprechung der Methode siehe Bergfors, 2003).

Zum Mikro Seeding wurde das *streak seeding* Protokoll verwendet, indem Mikrokristalle, die sich in verschiedenen Ansätzen gebildet hatten, durch eine Metallspitze zerstört und mit dieser Metallspitze durch den vorequilibrierten Ansatz gezogen wurden (Bergfors, 2003). Wenn die Konzentration des Fällungsmittels richtig eingestellt ist, sollte Kristallwachstum nur an den eingeführten Keimen stattfinden und sich dadurch eine Anhäufung von Kristallen in Form eines Striches zeigen (siehe Abbildung 19). Die Anzahl der eingeführten Keime wurde durch die Vorequilibrierungszeit des Ansatzes, in den die Mikrokristalle eingeführt wurden, kontrolliert.

2.7 Kristallographische Methoden

2.7.1 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden nach der Rotationsmethode aufgenommen. Die Kristalle wurden für die Messung entweder in Glaskapillaren montiert oder in Nylon-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 Goniometerkopfs im 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. Glukose, 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.

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden an der hauseigenen Drehanode mit Imageplate-Detektor (mar345, MAR research, Norderstedt) oder den FU-eigenen Strahlrohren BL1 und BL2 am Synchrotron BESSY II in Berlin gemessen. Weiterhin wurde am Strahlrohr ID14-2 und ID29 des Synchrotrons ESRF in Grenoble gemessen.

2.7.2 Indizierung und Integration der Diffraktionsdaten

Die Reflexe der einzelnen Aufnahmen wurden mit den Programmen DENZO bzw. HKL2000 (Otwinowski und Minor, 1997), MOSFLM (CCP4, 1994) und XDS (Kabsch, 1993) indiziert und integriert. Anschließend wurden die Daten mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) oder SCALA (CCP4, 1994) aufeinander skaliert und symmetrieäquivalente Reflexe gemittelt. Aus den Intensitäten wurden mit dem Programm TRUNCATE des CCP4-Programmpakets Strukturfaktor-Amplituden und ihre Standardabweichungen berechnet.

Die Daten für die Strukturbestimmung von $\Delta 18$ -aeNAC wurden mit DENZO / SCALEPACK prozessiert. Für die Prozessierung des nativen Datensatzes der humanen NAC-Domäne ergab das Programm XDS die besten Ergebnisse.

2.7.3 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 es keine homologen Proteine zu NAC gibt, mussten für die Strukturbestimmung von $\Delta 18$ -aeNAC die Phasen über MIR oder MAD gelöst werden. Die Kristalle von $\Delta 18$ -aeNAC erwiesen sich als sehr fragil und differierten darüber hinaus in den Zelldimensionen, was eine Phasenbestimmung über MIR unmöglich machte. Die Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC wurde über MAD mit 3 Wellenlängen des Selenomethionin Derivats bestimmt.

Nachdem die Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC bekannt war konnte die Struktur der humanen heterodimeren NAC-Domäne mit der Methode des Molekularen Ersatzes und $\Delta 18$ -aeNAC als Suchmodell ermittelt werden.

Strukturbestimmung von $\Delta 18$ -aeNAC mit 3 Wellenlängen Multipler Anomaler Dispersion (MAD)

Die prozessierten Datensätze der drei Wellenlängen wurden mit dem Programm SCALEIT des CCP4 Programmpakets aufeinander skaliert (siehe Tabelle 4, Abschnitt 3.3.3 für Details). Ausgehend von diesen Datensätzen wurde die Position der Selenomethionine über deren anomalen Beitrag zur Streuung mit dem Programm HySS (*Hybrid Substructure Search*) des PHENIX Projekts ermittelt (Adams et al., 2002). Obwohl nach dem Matthews Koeffizienten zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit und damit 12 Selenomethionine zu erwarten waren, konnten die Programme zur Substrukturanalyse nur 4-6 Positionen ermitteln. Die anfänglichen 6 Schweratomlagen aus dem HySS Programm dienten dazu mit dem Programm SHARP (SHARP) eine erste Elektronendichtekarte zu berechnen. Die Schweratomlagen wurden mit SHARP verfeinert es konnten aus der Differenz-Elektronendichtekarte die restlichen 8 Schweratompositionen lokalisiert und für die Phasierung verwendet werden. Anschließende Modifikation der Elektronendichte und automatischer Modellbau mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2002; Terwilliger und Berendzen, 1999) führte zu einem 70% vollständigen Modell von $\Delta 18$ -aeNAC. Das restliche Modell wurde manuell mit dem Programm O (Jones et al., 1991) gebaut (Statistiken der Datensammlung, Prozessierung und Phasierung siehe Tabelle 4, Ergebnisse).

Strukturbestimmung der heterodimeren humanen NAC-Domäne mit Molekularem Ersatz

Die Strukturbestimmung der humanen NAC-Domäne erfolgte mit dem Programm PHASER (Storoni et al., 2004). Dabei wurden für das Programm PHASER die voreingestellten Parameter für eine Anisotropiekorrektur der Röntgendaten sowie die Protokolle für die Rotations-, Translationssuche und Starre-Körper-Verfeinerung angewandt und lediglich die Funktion des ‚*Peak-Clustering*‘ der Rotationsfunktion ausgestellt. Für den molekularen Ersatz wurden Diffraktionsdaten in einem Auflösungsbereich von 20 bis 4.0 Å verwendet. Als Suchmodell wurde ein gemischtes Modell der NAC-Domäne der $\Delta 18$ -aeNAC Struktur verwendet, in dem nach dem Vergleich der Sequenzen von aeNAC und humanem NAC alle identischen Aminosäuren erhalten, aber alle differierenden Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden. Das Modell besaß somit alle zwischen aeNAC und humanem NAC konservierten Seitenketten und die differierenden Seitenketten waren durch Alanine ersetzt. Außerdem wurden die Schleifenbereiche der NAC-Domäne entfernt. Die Rotations- und Translationssuche mit PHASER ergab zwei sich stark absetzende Lösungen, in denen die NAC-Domäne um 180° gedreht war. Anschließende Modifikation der Elektronendichte mit DM (CCP4, 1994) und die Berechnung einer *model-bias* freien ‚*prime and switch*‘ Elektronendichte mit RESOLVE ermöglichte die Unterscheidung der beiden Lösungen und die Zuordnung der Seitenketten. Das Modell wurde durch iterative Zyklen von manuellem Modellbau mit Coot (CCP4, 1994) und Verfeinerung mit CNS (Brunger et al., 1998) vervollständigt (für Statistiken siehe Tabelle 6, Ergebnisse).

2.7.4 Modellbau und Verfeinerung

Ziel der Verfeinerung ist es, ein atomares Strukturmodell mit einer möglichst guten Geometrie zu erhalten, welches die experimentell bestimmten Röntgen-Diffraktionsdaten optimal erklärt. 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 entliehenen Methode des *simulated annealing* mit dem Programmpaket CNS (Brunger et al., 1998) verfeinert.

Das Modell des $\Delta 18$ -aeNAC wurde anfänglich mit CNS verfeinert. Nachdem dieses Modell durch manuelles Bauen vervollständigt worden war, wurde die Struktur gegen einen *low remote* Datensatz eines anderen Selenomethionin Derivats, das eine höherer Auflösung und bessere Datenqualität zeigte, verfeinert. Das endgültige Modell des $\Delta 18$ -aeNAC wurde mit TLS-Verfeinerung und anschließender isotroper B-Faktor Verfeinerung berechnet (siehe Tabelle 4, Ergebnisse). Die zusätzliche Verfeinerung der TLS Parameter ergab für das $\Delta 18$ -aeNAC Modell eine erhebliche Verbesserung der R-Faktoren (Winn et al., 2001).

Zum manuellen Modellbau wurden mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) die gewichteten $2F_o - F_c$ bzw. $F_o - F_c$ Elektronendichten berechnet. Für die Strukturbestimmung der humanen NAC-Domäne war außerdem die Berechnung einer *model-bias* freien Elektronendichte mit der Methode des ‚*prime and switch*‘ aus dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2002) von Bedeutung. Mit Hilfe der Programme Coot (CCP4, 1994) und O wurden die Elektronendichten dargestellt und das Modell manuell vervollständigt.

2.7.5 Koordinatenanalyse und Abbildungen

Die Bewertung der stereochemischen Qualität der Proteine erfolgte mit den Programmen PROCHECK und WHATCHECK (Hooft et al., 1996). Zur Überlagerung von Atomkoordinaten wurden die Programme LSQKAB (CCP4, 1994) und SSM (Krissinel und Henrick, 2004) verwendet.

Die 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., 1996) generiert, während das elektrostatische Potential von Proteinoberflächen mit dem Programm DELPHI berechnet wurde (Nicholls und Honig, 1991). Für einen Teil der Abbildungen wurde außerdem das Programm PYMOL verwendet (DeLano Scientific LLC, <http://pymol.sourceforge.net/>).

2.8 Proteinstruktur Vorhersage

2.8.1 Vorhersage von intrinsisch ungeordneten Sequenzbereichen

Ausgehend von der Primärstruktur eines Proteins ermöglichen eine Reihe von Programmen die Vorhersage von in Lösung ungefalteten Sequenzbereichen. Die Programme geben eine Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein bestimmter Sequenzbereich in Lösung als *molten globule*, *extended disorder* oder *random coil* vorliegt und damit ungeordnet ist (Für die Definition und Charakterisierung von intrinsischer Unordnung siehe Dyson und Wright, 2005). Zur Vorhersage von ungeordneten Sequenzbereichen wurden die Programme PONDR und DISOPRED verwendet (Molecular Kinetics, <http://www.pondr.com/>; Ward et al., 2004).

2.8.2 Faltungserkennung und Homologie-Modellierung

Für die Vorhersage der Tertiärstruktur von kurzen, unbekanntem Sequenzbereichen wurden die Programme PHYRE und 3D-PSSM verwendet (Kelley et al., 2000). Die Programme entwickeln über eine Datenbanksuche nach homologen Sequenzen und einen Threading Algorithmus, der ein 3D-Alignment der homologen Sequenzen berechnet, Homologie-Modelle für die unbekanntem Struktur und liefern eine Angabe über die Qualität der Modelle. Im Falle der Strukturvorhersage der N-terminalen 24 Aminosäuren von aeNAC wurden die Lösungen mit der höchsten Qualität untereinander verglichen und die Lösung gewählt, die die höchste Übereinstimmung mit der vorhergesagten Sekundärstruktur zeigte.

Das Homologie-Modell der heterodimeren NAC-Domäne aus Hefe (egd2-egd1) wurde ausgehend von der homodimeren Struktur des $\Delta 18$ -aeNAC mit dem Programm SWISS-MODEL berechnet (Schwede et al., 2003). Die Sequenzen von aeNAC und Hefe NAC wurden an der Konsensus-Sequenz der konservierten NAC-Domäne nach Definition der Conserved Domains Database (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2002) orientiert und für die Berechnung des Homologie-Modells zur aeNAC Struktur verwendet. Die Qualität des Modells wurde mit dem Programm WHATCHECK überprüft.