

2 Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde auf die in der Arbeitsgruppe traditionell übliche ausführliche Darstellung der Theorie der Röntgenkristallographie verzichtet, da dem nichts Neues mehr hinzugefügt werden kann und genügend Promotionsarbeiten öffentlich zugänglich sind. Die gebräuchlichen Methoden der Proteinaufreinigung, Kristallisation und Strukturlösung werden hier nur soweit sie zum Verständnis der Arbeit und zum Reproduzieren der Ergebnisse nötig sind, dargelegt. Die in der Arbeitsgruppe weniger häufig beschriebenen (und verwendeten) Methoden der anorganischen Phosphatbestimmung für kinetische Untersuchungen sowie der Zirkulardichroismus-Spektroskopie werden stattdessen auch in ihrer Theorie ausführlich beschrieben.

2.1 *Probenbereitung*

Klonierung

Um chromosomal kodierte 5'-NT von Proteinen aus Überexpressionskonstrukten trennen zu können, wurde eine Affinitätsmarkierung an die kodierende Sequenz des Enzyms kloniert. Hierzu wurde das Gen *ushA* (Burns und Beacham, 1986), das die 5'-Nukleotidase (Synonym: UDP-Zucker-Hydrolase (Glaser et al., 1967)) kodiert, von einem pTRC99A Vektor (Knöfel und Sträter, 1999) umklont in einen pET 28a Vektor der Firma Novagen (Vertrieb: Merck Biosciences GmbH, Schwalbach). Durch die Umklonierung wurden C-terminal 1 Glutaminrest sowie 6 Histidin-Reste angefügt. Das Gen wurde mit folgenden Oligonukleotiden (hauseigene Synthese, Werner Schröder) aus dem pTRC99A Vektor amplifiziert:

5'-CCG GCT CGT ATA ATG TGT GG -3'

5'-ACA ATA GGC CGC TCG AGC TGC CAG CTC ACC TCA CC -3'

Das amplifizierte Fragment wurde über die derart eingefügten Schnittstellen mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.) verdaut (20 units je Enzym) gelchromatografisch aufgetrennt (1% Agarose in TNE Puffer), aufgereinigt (Plasmid/PCR Aufreinigungskits der Firma Qiagen, Hilden) und in den ebenso präparierten Vektor pET 28A mit dem Enzym T4 DNA Ligase (New England Biolabs) ligiert (2000 units, 3 Std bei 18°C).

Mutagenese

Die Cystein-Punktmutationen, die zu einer domänenverbrückenden Disulfidbindung führen sollten, wurden mit dem Programm SSBOND (Hazes und Dijkstra, 1988) berechnet. Hierbei wurden bis auf die erlaubten Energiedifferenzen zwischen mehreren Lösungen eines Aminosäurepaares, die auf 5 kcal/mol hochgesetzt wurden, die Default-Parameter verwendet. Die PDB Einträge 1hp1 und 1hpu Kette C, die der am meisten geöffneten bzw. am meisten geschlossenen 5'-NT-Konformationen entsprechen (Knöfel und Sträter, 2001a), wurden als Eingabe-Koordinaten vorgegeben.

Die Mutagenese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

5 µl Pfu Ultra Reaktionspuffer (Stratagene)
1 µl DNA Template (5 ng/µl)
2 µl je Oligonukleotid (100 ng/µl), siehe Tabelle 2
2 µl dNTP Mischung (Sigma 25 mM)
37 µl ddH₂O

1 µl *Pfu* Ultra (Stratagene) wurde nach Aufheizen des Reaktionsvolumens auf 90°C dazu-pipettiert.

Die DNA Amplifizierung wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt mit folgendem Programm:

1. 2 min 95°C
2. 50 sec 95°C
3. 50 sec 63°C
4. 18 min 68°C
5. 7 min 68°C

die Schritte 2 bis 4 wurden 18-mal wiederholt bevor mit Schritt 7 beendet wurde.

Als Primer wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Die Konstrukte wurden sequenziert (GATC Biotech GmbH, Konstanz), um die Mutationen zu verifizieren und um die Sequenz zu validieren.

Tabelle 2. Oligonukleotide für die Mutagenese

Mutation	Oligonukleotid 5'→ 3'
Pro-90 →Cys, 5'→ 3'	GCG ACA TTA ACA CTG GCG TGT GCG AGT CTG ACT TAC AGG ATG CC
Pro-90→Cys, 3'→ 5'	GGC ATC CTG TAA GTC AGA CTC GCA CAC GCC AGT GTT AAT GTC GC
Leu-424→Cys, 5'→ 3'	GGC GAT ATC AGC TCT AAA AAC GTG TGT AAA GTG CAG CCA TTC GGC
Leu-424→Cys, 3'→ 5'	GCC GAA TGG CTG CAC TTT ACA CAC GTT TTT ATA GCT GAT ATC GCC
Ser-228→Cys, 5'→ 3'	CGA TAA TGG TGA GCA CGG CTG TAA CGC ACC GGG CGA TGT GG
Ser-228→Cys, 3'→ 5'	CCA CAT CGC CCG GTG CGT TAC AGC CGT GCT CAC CAT TAT CG
Pro-513→Cys, 5'→ 3'	GGA TAT CCG CGC CTT GAT AAC AAA TGT GGC TAT GTG AAT ACC GGC
Pro-513→Cys, 3'→ 5'	GCC GGT ATT CACATA GCC ACA TTT GTT ATC AAG GCG CGG ATA TCC

Überexpression und Proteinaufreinigung

Die Mutationskonstrukte sowie das Wildtyp-Plasmid wurden mit einem Easyjekt Prima E-
lektroporator der Firma EquiBio Ltd (Massachusetts, USA) bei 1800 V in elektrokompetente
E. coli Zellen (hergestellt nach Protokoll von EquiBio Ltd) ER2566 (New England
Biolabs) transformiert. Den Bakterien-Kulturen wurden im Folgenden konstant 40 µg/l Ka-
namycin zugesetzt, um auf Zellen mit dem Überexpressionskonstrukt zu selektieren. Die
Zellen wurden in LB Medium angezogen. Die Genexpression wurde bei einer optischen
Dichte bei 610 nm von 0,8 mit 3 µM IPTG (AppliChem, Chemos GmbH, Regenstauf) in-
duziert. Die Zellkultur wurde für weitere 5,5 Stunden bei 37°C und 250 UpM angezogen.
Die Zellen wurden in einer Sorvall Zentrifuge bei 4000 UpM 10 min geerntet und in 20 mM
K₂HPO₄ pH 7,5 and 250 mM NaCl aufgenommen. Die Zellen wurden mechanisch mit ei-
ner Zellpresse (French Press, Aminco) aufgeschlossen und der Überstand durch Zentrifu-
gation (2x 60 min bei 15 000 UpM) vom Zellpellet, das verworfen wurde, getrennt. Das im
Überstand befindliche Protein wurde dann bis zur kristallographischen Reinheit mit fol-
gendem Protokoll aufgereinigt:

Die Proteinlösung wurde auf eine Metall-Chelat-Säule (Poros MC 20, Applied Biosystems,
Darmstadt) über ein Äkta Chromatographie-System (Amersham Biosciences, Freiburg)
aufgetragen, mit 25 mM Imidazol (Merck, Darmstadt) in 20 mM Tris (Merck) HCl –Puffer
(eingestellt auf pH 8,0) gewaschen und mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumina

(SV) mit 250 mM Imidazol im selben Puffer eluiert. Über eine Größenausschlusschromatografie (Sephadex G25 fein, Amersham Bioscience) mit 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM Betain (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 0,5 mM EDTA (Carl Roth GmbH) wurde der Puffer ausgetauscht, um auf einen Anionenaustauscher (PLSAX 1000 Å/10 µm, Polymer Laboratories, Darmstadt) aufgetragen werden zu können. Von der PLSAX Säule wurde das Protein mit einem Gradienten über 20 Säulenvolumina von 20 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM Betain, 0,5 mM EDTA zu 500 mM KCl im selbem Puffer eluiert. Der finale Aufreinigungsschritt bestand aus einer Größenausschlusschromatografie (Superdex 75, Amersham Bioscience), die mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 0,5 mM EDTA equilibriert war. Das Protein wurde auf 15 mg/ml mit einem Bradford Assay (Bradford, 1976) für die Kristallisationsansätze eingestellt. Um gleich bleibende Proteinqualität zu gewährleisten wurde für die biochemischen Untersuchungen das Protein auf 22 mg/ml eingestellt, aliquotiert und unter flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die CD-spektroskopischen Messungen wurden die Proteinkonzentrationen über den molaren Absorptionskoeffizienten von $66830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die modifizierte 5'-NT eingestellt (Gill und von Hippel, 1989).

Kristallisation

Zum Auffinden anfänglicher Kristallisationsbedingungen wurden Durchmusterungstests der Firma Hampton Research („Crystal Screen I“, „Crystal Screen II“) genutzt, um eine große Zahl verschiedener Fällungsmittel, pH-Bereiche und Salzkonzentrationen mit minimalen Proteineinsatz zu testen. Das Protein wurde hierfür in dem Puffer des letzten Reinigungsschritts direkt verwendet in einer Konzentration von 15 mg/ml. Vor der Kristallisation wurde das Protein jeweils für 1 min bei 15 000 UpM zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen. Die Kristallisationsexperimente erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen (Ducruix und Giege, 1999). Dabei wurden 500 µl der Kristallisationslösungen in die Vertiefungen (Reservoir) von Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Nelipak bv, Niederlande) vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl der Reservoirlösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert und mit 2 µl der Proteinlösung gemischt, bevor das Deckglas umgedreht und über die zugehörige Vertiefung gelegt wurde. Der Rand der Vertiefung wurde dabei mit Silikonfett beschichtet, so dass ein dichter Verschluss des Reservoirs durch das aufliegende Deckglas erfolgte. Die Schalen wurden bei 18°C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen unter einem Binokularmikroskop auf Kristallwachstum überprüft. Die Deckgläschen wurden in 500 ml deionisiertem Wasser mit 5 ml Silikonisierungslösung (Prosil, Alfa) rund 1 min lang silikonisiert.

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde die Konzentration und der pH-Wert des Fällungsmittel systematisch variiert. Weitere Zusätze wurden über den Hampton

Research „Additive Screen“ getestet. Die optimierten Bedingungen der Kristalle sind im Abschnitt 3.1.4 tabellarisch zusammengefasst.

Zur Tieftemperaturmessung wurden einzelne Kristallisationsansätze geöffnet und ein Kristall mit einer eingefassten Nylonschlaufe (Hampton Research) in einen 10 µl Tropfen mit Tieftemperaturpuffer gehoben. Alle verwendeten Tieftemperaturpuffer sind ebenfalls im Abschnitt 3.1.4 aufgeführt. Nach einer Minute im Tieftemperaturpuffer wurden die Kristalle in eine Nylon-Schlaufe gehoben und mit dieser schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2 Kristallographische Datensammlung

Alle Kristalle wurden mit der Rotationsmethode (Arndt und Wonnacott, 1997) in Nylon-Schlaufen (Hampton Research) unter Stickstoffstrom bei 100 K vermessen. Die Datensammlungen für die SP-Kristalle erfolgten im Institut mit einem Röntgeneratorsystem mit rotierender Kupferanode (ENRAF-Nonius FR571, Delft, Niederlande) und einem angeschlossenen Imageplate-System (MAR Research GmbH, Norderstedt) zur Datendetektion. Der PL-Kristall wurde am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg an der Messstation BW7B des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) gemessen. Auch hier wurde für die Detektion ein Imageplate-System der Firma MAR Research verwendet.

Mit den Programmen DENZO und XDISPLAYF aus dem HKL Paket (Otwinowski und Minor, 1997) oder MOSFLM (Leslie, A.G.W., 1992, Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26) wurden vor jeder Datensammlung 1-5 Oszillationsbilder indiziert und prozessiert, um unter Vorgabe der angestrebten Vollständigkeit einen optimierten totalen Rotationswinkel und Startwinkel mit den Programmen marPREDICT und marSTRATEGY (Mar Research GmbH) oder dem Unterprogramm STRATEGY aus dem Programm MOSFLM zu berechnen. Das Winkelinkrement und der Abstand zwischen Detektor und Kristall wurden ebenfalls mit Hilfe des am Anfang aufgenommenen Beugungsbildes unter Berücksichtigung der Zellparameter, der Kristallmosaizität, der Strahleigenschaften und der zu messenden Auflösung gewählt (Dauter, 1999).

Die Auswertung des Datensatzes wurde ebenfalls mit dem HKL Software-Paket oder mit dem Programm MOSFLM durchgeführt. Die Reflexe wurden für jedes Beugungsbild einzeln mit DENZO (Unterprogramm Integrate in MOSFLM) integriert und mit dem Programm SCALEPACK oder SCALA, aus dem CCP4 Programmpaket (Bailey, 1994), aufeinander skaliert, die partiellen Reflexe aufsummiert und die Kristallparameter wie Gitterkonstanten und Mosaizität verfeinert. Mosaizität und Gitterkonstanten wurden hierbei einheitlich für den gesamten Datensatz berechnet.

Die Statistik der Datensammlung ist im Ergebnisteil der jeweiligen Strukturbesprechung zusammengefasst.

2.3 Strukturbestimmung durch molekularen Ersatz

Zur Lösung des Phasenproblems wurde ausschließlich die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Als Modell dienten die Atomkoordinaten der 5'-NT-Strukturen 1hp1 und 1hpu Kette C wie jeweils im Ergebnisteil angegeben. Alle Strukturen ließen sich mit einem oder einer Kombination der folgenden Programme lösen: AMORE (Navaza, 1994; Navaza und Saludjian, 1997), BEAST (Read, 2001) und MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997). Die beiden Domänen wurden separat für die Rotations- und Translationssuche verwendet (N-terminale Domäne: Reste 26-355, C-terminale Domäne: Reste 356-550). Die Lösungen wurden mit dem Programm PDBSET (Bailey, 1994) transformiert. Diese so erhaltenen N- und C-terminalen Domänen wurden in das Modellbauprogramm O eingelesen (Jones et al., 1991), um zusammengehörende Domänen zu identifizieren und in eine gemeinsame Atomkoordinatendatei zu speichern. Die so erhaltene Modelle wurden mit dem Programm REFMAC (Murshudov et al., 1997) durch einer Starre-Körper-Verfeinerung verbessert, wobei die Domänen als Starre-Körper definiert wurden, und mit dem Programm ARPWARP (Perrakis et al., 1999) weiter optimiert. Hierbei wurden für die Kreuzvalidierung bereits 5 % aller Reflexe zufällig ausgewählt und von allen folgenden Verfeinerungsschritten ausgeschlossen. Die gewählten Auflösungsbereiche für die Rotations- und Translationssuchen sowie für die Starre-Körper-Verfeinerung sind ebenfalls im Ergebnisteil für jede Struktur aufgeführt.

2.4 Modellbau und Modellverfeinerung

Da die im Molekularen Ersatz verwendeten Suchmodelle bis auf die eingeführten Mutationen und den angefügten 7 C-terminalen Aminosäuren identisch waren mit den neuen Strukturen, beschränkte sich der Modellbau auf die Einführung der Mutationen, den Bau von Schlaufenumlagerungen (180iger Schlaufenbereich), den Bau zuvor ungeordneter Schlaufenbereiche (321-332), die Anpassung der domänenverbindenden Helix an die neue Konformation, sowie die Korrektur von Seitenketten und kleineren Konformationsänderungen. Der Modellbau erfolgte grafisch mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) und alternierend mit der Modellverfeinerung.

Die kristallographische Verfeinerung des Startmodells erfolgte durch Molekulardynamik-Verfeinerung mit dem Programmpaket CNS der Version 1.0 (Brunger et al., 1998), wobei die vom Autor bereitgestellten Eingabeskripte verwendet wurden. Die geometrischen

Randbedingungen wurden nach (Engh und Huber, 1991) beschränkt. Mit dem Skript „*generate*“ wurde auf Grundlage des vorliegenden Modells eine Datei erzeugt, die die später benötigten Informationen über die Molekülstruktur enthielt. Im weiteren Verlauf kamen dann die folgenden Eingabeskripte in der angegebenen Reihenfolge zum Einsatz:

minimize zur Koordinatenverfeinerung
bindividual zur Anpassung der isotropen Temperaturfaktoren
water_pick zur Suche von Wassermolekülen in der Fo-Fc Elektronendichtekarte
water_delete zur Entfernung potentiell falscher Wassermoleküle (beide Protokolle wurden 3-mal hintereinander alternierend eingesetzt)

minimize
bindividual
model_map zur Berechnung einer gewichteten Elektronendichtekarte (2Fo-Fc)
model_map zur Berechnung einer einfachen Differenzelektronendichtekarte (Fo-Fc)

Das Modell wurde dann mit dem Programm O manuell durchgesehen und korrigiert, um dann wieder mit diesem Protokoll verfeinert zu werden. Alle Wassermoleküle wurden visuell mit dem O Hilfsprogramm XONO (Sträter, unveröffentlicht) anhand der Abstände zu benachbarten Donatoren und Akzeptoren und der Elektronendichte kontrolliert. Diesem Schema wurde iterativ bis zur Konvergenz des freien R-Werts gefolgt.

Da aus früheren Strukturlösungen der 5'-NT bekannt war, dass zum Teil große Konformationsunterschiede zwischen den Monomeren in einer asymmetrischen Einheit vorliegen, wurde auf die Anwendung von Symmetriebeschränkungen (Randbedingung zur nicht-kristallographischen Symmetrie) verzichtet.

Nach Konvergenz des freien R-Wertes mit dem CNS Protokollen, wurden noch mit dem Programm REFMAC (Murshudov et al., 1997) 20 Zyklen TLS-Verfeinerung durchgeführt, um die Strukturmodelle auf anisotrope Bewegung zu untersuchen, wobei die Temperaturfaktoren konstant gehalten wurden. Die Domänengrenzen wurden hierbei von 26-340 und von 360-549 gewählt. Die TLS-Verfeinerung wurde gefolgt von 15 weiteren Verfeinerungszyklen unter Einschluss der Temperaturfaktoren.

Die Verfeinerungsstatistiken sind im Ergebnisteil der jeweiligen Strukturbesprechung zusammengefasst.

Die Strukturen wurden bei der Proteindatenbank in Brookhaven, USA wie folgt hinterlegt:

SP-I PDBID: 1oe1
SP-II PDBID: 1od1
PL PDBID: 1oi8

2.5 Modellanalyse

Die Bewertung der stereochemischen Qualität der Modelle erfolgte mit den Programmen WHATCHECK (Hooft et al., 1996) und PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

Um die Qualität der Disulfidbrücken unabhängig vom Ausgangsmodell bewerten zu können, wurden Elektronendichtekarte unter Auslassung der mutierten Cystein-Reste sowie zweier N- und C-terminal benachbarter Reste mit dem CNS-Skript *sa_omit_map* berechnet.

Für die Berechnung von Koordinaten-Überlagerungen um die Domänenrotationsbewegung, die mittlere quadratische Atomabweichung, das aktive Zentrum und die Orientierung von Molekülen darzustellen, wurde das Programm LSQKAB verwendet (Kabsch et al., 1976). Zur Analyse der TLS Tensoren wurde das Programm TLSANL verwendet (Howlin et al., 1993). Die starren Körper wurden dafür wie folgt definiert: N-terminale Domäne Reste 26-340, C-terminale Domäne Reste 360-549. Zur Bestimmung der Domänenrotation der einzelnen Konformere wurde das Programm DYNDOM Version 1.5 benutzt (de Groot et al., 1998; Hayward und Berendsen, 1998; Hayward und Lee, 2002), das die Interdomänenschraubenachsen relativ zueinander beweglicher Domänen berechnet. Im Text wird diese Achse vereinfachend als Rotationsachse bezeichnet. Es wurden für alle Bewegungen die Default Parameter verwendet. Rotationsbewegungen von weniger als 2° konnten mit diesem Programm nicht analysiert werden (auch nicht mit anderen Parameter-Einstellungen) und wurden nach Überlagerungen der N-terminalen Domänen (26-340) anhand der Translation und der Rotationsmatrix der Überlagerungen der C-terminalen Domänen (360-549) mit dem Programm MATCON (W. Bennett) berechnet.

Die CCP4 Programme (Bailey, 1994) CONTACT und ACT wurden für die Analyse der Kristallkontakte und der Bindungen zu den Metallionen verwendet, wobei die gewählten Abstände jeweils angegeben sind, das CCP4 Programm BAVERAGE (Bailey, 1994) wurde benutzt, um die Temperaturfaktoren aus den Koordinatendateien zu extrahieren. Wann immer es möglich war, wurde die Oberfläche CCP4i für die Berechnungen verwendet (Bailey, 1994).

Für die grafische Moleküldarstellung wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Merritt und Murphy, 1994) unter Verwendung der grafischen Benutzeroberfläche MOLDRAW (N. Sträter, nicht veröffentlicht) verwendet. Darstellungen mit Swiss PDB Viewer (Guex und Peitsch, 1997) wurden mit dem Programm POV-RAY bearbeitet. Die Darstellung der thermalen Ellipsoide wurde mit dem Programm POVScript+ (Fenn et al., 2003) erstellt. Das elektrostatische Potential der Proteinoberfläche wurde mit dem Programm DELPHI berechnet (Honig und Nicholls, 1995).

2.6 *Kinetische Messungen*

2.6.1 **Theorie des Aktivitätsbestimmungstest**

Die Enzymaktivität wurde unter der Annahme eines dynamischen Gleichgewichts ("steady state") bestimmt. Hierbei wurde von folgenden Prämissen ausgegangen (Michaelis und Menten, 1913):

- Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ist über die gesamte Reaktionszeit konstant. Das heißt, die Substratkonzentration befindet sich immer im Überschuss gegenüber der Enzymkonzentration.
- Die Konzentration des Substrats ist während der gesamten Reaktionszeit im Überschuss gegenüber der Produktkonzentration.
- Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Produktbildung.

Die Aktivität wurde ermittelt über die Quantifizierung des vom Substrat freigesetzten anorganischen Phosphats. Nach den oben erwähnten Annahmen gilt, dass nach Abzug des Nullwerts ein equimolares Verhältnis zwischen detektierten Phosphat und umgesetzten Substrat besteht; dies gilt bei Substraten, die nur ein Phosphat haben. Für andere Substrate wurden keine kinetischen Parameter bestimmt. Hier wurde lediglich die Umsatzrate relativ verglichen unter der Annahme, dass verstärkte Phosphatfreisetzung auch größeren Umsatz bedeutet.

Die verwendete Aktivitätsbestimmung basiert auf der Komplexbildung des anorganischen Phosphats mit Molybdat (Fiske und SubbaRow, 1925). Der Phosphatmolybdat-Komplex kann grundsätzlich über eine Reduktion angefärbt werden (Murphy und Riley, 1962) oder über einen Farbstoff (Soyenkoff, 1947). Gegenwärtig wird in der Regel Malachitgrün als Farbstoff verwendet (Itaya und Ui, 1966), da diese Methode bis zu fünfmal sensitiver ist. Eine weitere wesentliche Verbesserung war die Einführung von verschiedenen Reagenzien, die den Phosphatmolybdat-Komplex stabilisieren (Baykov et al., 1988; Lanzetta et al., 1979; Van Veldhoven und Mannaerts, 1987). Vor wenigen Jahren wurde die Aktivitätsbestimmung über anorganische Phosphat-Quantifizierung auch für den Roboter-Einsatz adaptiert (Cogan et al., 1999). Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz beruht auf der Publikation von Van Veldhoven und Mannaerts aus dem Jahre 1986, wurde aber abgewandelt, so dass er im Abschnitt 2.6.2 detailliert beschrieben wird.

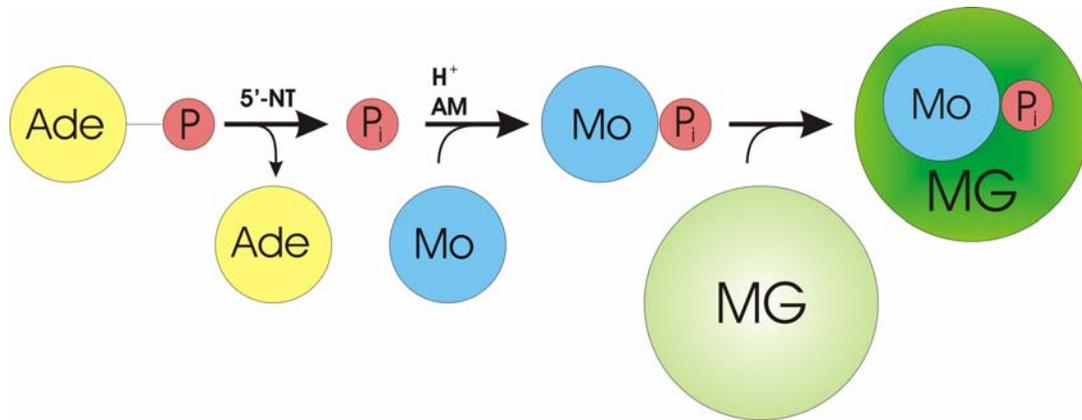
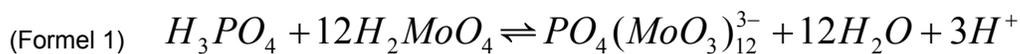


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Aktivitätsbestimmungstests. Ade = Adenosin, P = Phosphat, Mo = Molybdat, AM = Ammoniummolybdat, MG = Malachit Grün, H^+ = Säure (H_2SO_4). Siehe Text für Erläuterung zu einzelnen Schritten.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des Aktivitätsbestimmungstests. Die hydrolytische Phosphatabspaltung durch die 5'-Nukleotidase wird durch Zugabe von Säure gestoppt. Die Säure hat gleichzeitig die Funktion, die Bildung einer Heteropolysäure aus dem freigesetzten Phosphat mit dem ebenfalls zugesetzten Molybdat zu katalysieren (Lyhamn und Pettersson, 1980):



Aus der Formel wird deutlich, dass der Phosphatmolybdat-Komplex nur im Sauren stabil ist. Des Weiteren ist zu beachten, dass ein beachtlicher Überschuss an Molybdat zur Verfügung stehen muss, um das Gleichgewicht der Reaktion weit auf der rechten Seite zu haben. Wie oben erwähnt kann dieser Komplex über Reduktion in Molybdatblau überführt werden. Wesentlich sensitiver ist es jedoch, den Komplex mit Malachitgrün (*bis*-p-Dimethylamino-phenylphenylmethyliumchlorid,

Abbildung 5) anzufärben. Malachitgrün ist oberhalb von pH 2 kräftig blau-grün, unterhalb von pH 2 jedoch schwach gelblich. Nur die deprotonierte Form reagiert mit dem Phosphatmolybdat-Komplex, so dass diese dem Gleichgewicht entzogen wird und sich die Reaktionslösung langsam blau-grün färbt. Daraus ergibt sich, dass das Reaktionsgemisch einen pH von deutlich unter 2 haben muss und dass genügend Zeit für die Farbentwicklung gegeben werden muss. In der Praxis haben sich 20 min für die Farbentwicklung als hinreichend erwiesen, der pH-Bereich des Tests liegt zwischen 0,5 und 1,0.

Ein Nachteil dieses Farbtests gegenüber den Bestimmungsmethoden, die auf Molybdatblau basieren, ist die Instabilität des Phosphatmolybdat-Komplexes. Das Malachitgrün

setzt die negative Ladung des Komplexes herab, wodurch er wieder leichter in Lösung geht. Verschiedene Reagenzien wurden ausprobiert, um den Komplex zu stabilisieren (s.o.). Der in dieser Arbeit verwendete Polyvinylalkohol hielt die Farbe über einen langen Zeitraum stabil (bis zu 6h).

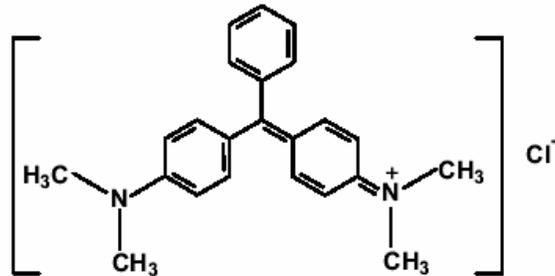


Abbildung 5. Strukturformel von Malachitgrün *bis-p*-Dimethylaminophenylphenylmethyliumchlorid.

2.6.2 Experimentelles Vorgehen

2.6.2.1 Ansatz

Die kinetischen Messungen wurden über Bestimmung von anorganischem Phosphat ausgeführt (vgl. Abschnitt 2.6.1). Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet:

10 μl Enzym in den entsprechenden Verdünnungen. Das Enzym wurde verdünnt in Reaktionspuffer (s.u.). Die Ausgangskonzentration für alle Proteine war eingestellt auf 22 mg/ml. Dies entspricht 378,5 μM . Die Verdünnungen wurden jeden Messtag neu angesetzt.

10 μl Substrat (alle Substrate von Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in den entsprechenden Verdünnungen. Die Stammlösung Substrat wurde auf 685 mM eingestellt.

880 μl Reaktionspuffer. Der Reaktionspuffer wurde vor der Reaktion mit dem entsprechenden Metallion versetzt.

Die Reaktion wurde gestoppt mit 100 μl 4,5 M H_2SO_4 (Merck GmbH, Darmstadt).

Freies Phosphat wurde zur Komplexbildung für 5 min mit 200 μl 1,75 % (w/v) Ammoniumheptamolybdat (Riedel-de-Haen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 0,9 M H_2SO_4 inkubiert.

Die Farbreaktion wurde gestartet mit 0,035 % Malachitgrün (Sigma-Aldrich) in 0,35 % Polyvinylalkohol (durchschnittliches Molekulargewicht 14 000 Da, FLUKA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München).

Nach 20 min Farbentwicklung wurde die Absorption gegen den Nullwert (Ansatz ohne Metallion, Substrat und Enzym) bei 610 nm mit einem Shimadzu UV-160A Photospektrometer (Shimadzu GmbH, Duisburg) gemessen. Hiefür wurden 1,5 ml Küvetten (PMMA Einmalküvetten, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet.

Als Reaktionspuffer wurde Tris-HCl verwendet:

20 mM Tris mit HCl eingestellt auf pH 7,5

50 mM KCl

0,5 mM EDTA

(alle Chemikalien von Merck)

Alle Reaktionen wurden bei 25° C ausgeführt. Alle Reaktionen zur Bestimmung kinetischer Parameter wurden in Gegenwart von 5 mM CoCl_2 (Merck) durchgeführt, weil das am stärksten aktivierende Metallion ist (Neu, 1967a). Die Experimente unter reduzierenden Bedingungen wurden in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. Da DTT und Co^{2+} einen starken schwarzen Niederschlag geben, wurden hier anstelle der Kobaltionen 5 mM MnCl_2 (Merck) verwendet. Die Reaktionen unter reduzierenden Bedingungen wurde mit 1 mM DTT (AppliChem GmbH, Darmstadt) durchgeführt und 760 μM des entsprechenden Substrats, wobei das Protein zuvor mit 20 mM DTT für 10 min inkubiert wurde. Höhere DTT-Konzentrationen oder längere Inkubationszeiten führten nicht zu anderen Ergebnissen. Bei den verwendeten Konzentrationen hatte DTT keinen Einfluss auf die Reaktion mit dem Wildtyp-Protein.

2.6.2.2 Auswertung

Der erhaltene Absorptionswert wurde jeweils mit der Kontrollreaktion (Reaktionsansatz ohne Enzym) subtrahiert, um für autohydrolytische Effekte zu korrigieren. Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte von vier unabhängig voneinander durchgeführten Reaktionsansätzen. Die Fehler werden angegeben als Standardabweichungen σ . Hierbei gilt die Beziehung (Formel 2)

(Formel 2)
$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

wobei n die Probengröße ist, x der jeweilige Messwert und \bar{x} der Mittelwert.

Die Berechnungen der „steady state“ kinetischen Parameter basieren alle auf der Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 3):

(Formel 3)

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit ist, V_{\max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$ die Substratkonzentration und K_M die Michaelis-Menten Konstante. Die Berechnung der Parameter erfolgte über die Methode der „Anpassung der kleinsten Quadrate“ (Kakkar et al., 1999) anstelle der üblichen Linearisierungsverfahren der Michaelis-Menten-Gleichung.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind angegeben als Wechselzahl k_{cat} , wobei gilt $k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E]$ mit $[E]$ der Enzymkonzentration. Dies gilt nur für Phosphomonoester-Substrate, bei denen nur eine Phosphatgruppe durch Hydrolyse freigesetzt werden kann. Bei Phosphoanhydriden, bei denen die Reaktion über mehrere Zwischenschritte zum Endprodukt führt, wurde angenommen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur P_i Produktion verläuft, aber kein Versuch unternommen, die Reaktionsgeschwindigkeit einzelner Zwischenschritte zu bestimmen. Folglich wurden hier auch keine kinetischen Parameter bestimmt.

2.6.2.3 Kalibrierung

Die Phosphatquantifizierung wurde kalibriert mit einem kommerziellen Phosphatstandard (Molecular Probes Europe BV, Leiden). Hierbei ergab sich ein sigmoidaler Verlauf der Absorptionskurve (Abbildung 6 A). Um größtmögliche Sensitivität der Messungen zu gewährleisten, wurden nur Messergebnisse aus dem linearen Bereich der Kurve berücksichtigt (Abbildung 6 B). Es ist zu beachten, dass es die Anwesenheit von Metallionen (getestet wurden Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) und von DTT die Kalibrierung nicht beeinflusst hat (Daten nicht gezeigt).

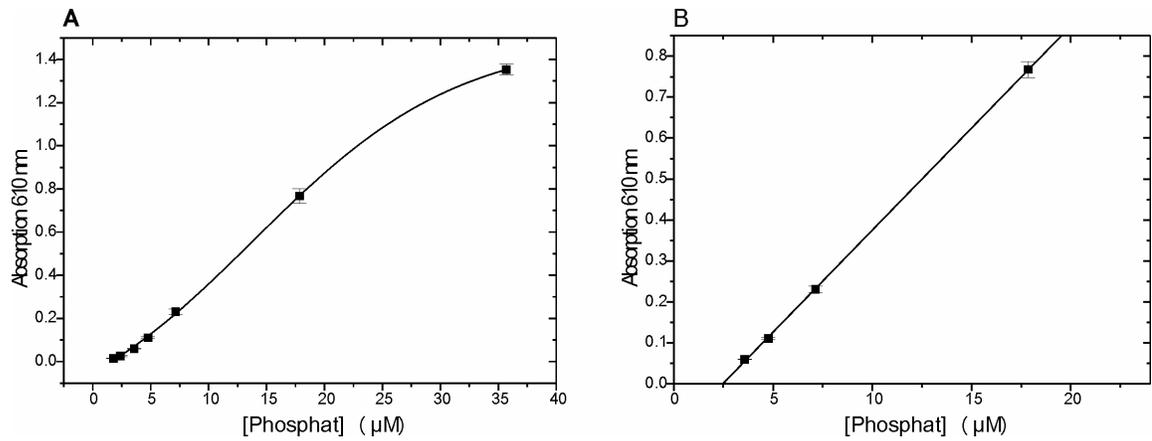


Abbildung 6. Kalibrierung zur Phosphatquantifizierung. A. Sigmoidaler Verlauf im Konzentrationsbereich von 1,8 bis 35,7 µM Phosphat. B. Lineare Anpassung des Konzentrationsbereichs von 3,6 bis 17,9 µM.

Aus der linearen Anpassung der in Abbildung 6B dargestellten Messwerte ergeben sich die Geradenparameter $A = -0,123$ und $B = 0,0498$.

2.7 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

In den vergangenen Jahren hat sich die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) zu einer nützlichen komplementären Methode der Proteinkristallographie entwickelt. Die Messungen sind schnell und nicht-invasiv, so dass mit relativen geringen Proteinmengen gearbeitet werden kann. So können bereits vor der röntgenkristallographischen Strukturbestimmung wichtige strukturelle Informationen über das Protein gewonnen werden. Darüber hinaus hat die CD-Spektroskopie den Vorteil, dass die Messungen in Lösung vorgenommen werden können und auch zeitabhängige Messungen etwa von Konformationsänderungen möglich sind.

Information über die Sekundärstruktur liefern die Elektronenübergänge der Amidgruppen im Proteinerückgrat im fernen UV-Bereich (~180-220 nm), wohingegen die Elektronenübergänge der aromatischen Seitenketten (~260-290 nm) des Proteins Aufschluss über die Tertiärstruktur des Proteins geben können. Wallace gibt im Zusammenhang mit der Proteinkristallographie folgende nützliche Einsatzmöglichkeiten der CD-Spektroskopie zu bedenken (1999, CCP4 Newsletter 37:29-30, *Circular Dichroism Spectroscopy and X-ray Crystallography: A Dynamic Duo*):

- Die Ermittlung des Sekundärstrukturgehalts kann einen Hinweis darauf geben, wie geeignet ein bestimmtes Protein ist, um es als Suchmodell für den molekularen Ersatz zur Phasenbestimmung zu verwenden.
- Liganden, die in der Kristallisation verwendet werden, können daraufhin getestet werden, ob sie eine Konformationsänderung des Proteins induzieren. Über die Titration von Liganden kann so ermittelt werden, ab welcher Konzentration eine einheitliche Proteinspezies vorliegt – eine wichtige Voraussetzung für den Kristallisationserfolg.
- Über die CD-Spektroskopie kann auch ermittelt werden, ob es zu einer Komplexbildung mit anderen Makromolekülen kommt.
- Der Einfluss des pH-Wertes, von Detergentien, Lösungsmitteln und Additiven auf die Proteinkonformation kann untersucht werden und Hinweise auf sinnvolle Bedingungen für die Kristallisation liefern.
- Die Bestimmung der Sekundärstruktur kann wichtige Informationen liefern über Proteindomänen, die einzeln exprimiert wurden und gibt Aufschluss über den Erfolg von Renaturierungsversuchen, wenn das Protein in so genannte „inclusion bodies“ über-exprimiert und aufgereinigt wurde.
- Proteine und Proteinvarianten können auf ihre Hitzebeständigkeit untersucht werden. Hitzebeständige Proteine sind häufig weniger flexibel und daher oft besser zu kristallisieren.

2.7.1 Theorie der Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie misst den Unterschied zwischen den Extinktionskoeffizienten für links (ϵ_L) und rechts (ϵ_R) zirkular polarisierten Lichts:

(Formel 4)
$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

Hieraus geht hervor, dass die erhaltenen Werte sowohl positiv als auch negativ sein können. Das führt zu einer sehr viel schärferen Auflösung von Absorptionsbanden als es die Absorptionsspektroskopie zu leisten vermag (Quadrioglio und Urry, 1968).

Ein Molekül absorbiert links und rechts zirkular polarisiertes Licht nur dann unterschiedlich, d.h. es ist optisch aktiv, wenn sein elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht genau senkrecht aufeinander stehen (Adler et al., 1973). In symmetrischen Molekülen ist dies immer der Fall, da hier einstrahlende elektromagnetische Wellen einen Stromfluss induzieren zu dem das elektrische Dipolmoment parallel liegt, und folglich das magnetische Dipolmoment senkrecht dazu steht. In einem asymmetrischen Molekül hingegen entsteht ein Stromfluss, der nicht in einer einzigen Ebene liegt und dadurch helikalen Charakter besitzt. Das elektrische Dipolmoment weist auch eine Komponente in Richtung der Helixachse auf, zu diesem steht dann parallel ein zum helikalen Strom senkrecht induziertes magnetisches Dipolmoment (Abbildung 7).

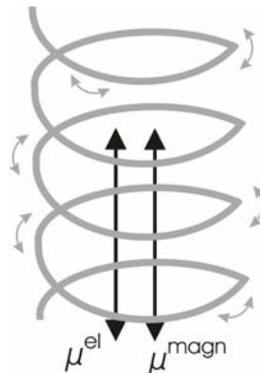


Abbildung 7. Kolinearität des elektrischen (μ^{el}) und des magnetischen (μ^{magn}) Dipolmoments. Durch Einstrahlung elektromagnetischer Wellen entsteht ein oszillierender elektrischer Dipol entlang der Helix. Senkrecht zum helikalen Stromfluss wird ein magnetisches Dipolmoment, parallel zum elektrischen Dipolmoment, induziert (Abbildung nach Winter und Noll, (1998)).

Diese Eigenschaften der optischen Aktivität machen den Einsatz der CD-Spektroskopie in der Proteinbiochemie in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen lassen sich mit der CD-

Spektroskopie besonders gut supra-asymmetrische Strukturen untersuchen, wie sie die Sekundärstrukturen der Proteine bieten, zum anderen ist die Methode besonders geeignet, die Umgebung von Chromophoren zu untersuchen. Dies liegt daran, dass biologische Chromophore an sich symmetrisch sind und erst durch den Einfluss der benachbarten Übergangsdipolmomente Asymmetrie erzeugt wird, woraus ein CD-Signal resultiert. Dadurch wird es möglich, identische Chromophore in unterschiedlicher räumlicher Anordnung voneinander zu unterscheiden, wie es in der vorliegenden Arbeit gewünscht ist, in der unterschiedliche Rotationskonformere der 5'-NT identifiziert werden sollen.

Von beiden Möglichkeiten, der Sekundärstrukturanalyse und der Konformationsanalyse, wird in der Praxis (wie auch in dieser Arbeit) Gebrauch gemacht. Hierbei werden die Sekundärstrukturen im Absorptionsbereich der Peptidbindungen gemessen, der auch als UV-ferner Bereich bezeichnet wird, und der Einfluss der Konformation wird im Absorptionsbereich der aromatischen Proteinseitenketten gemessen, der auch als UV-naher Bereich bezeichnet wird. Die Messungen für beide Bereiche müssen in der Regel unabhängig voneinander durchgeführt werden, da die Absorptionsintensitäten sehr unterschiedlich sind. Da bei kurzweiliger Strahlung das Rauschen sehr groß wird, muss in diesem Bereich mit hohen Konzentrationen bei geringer Pfadlänge gearbeitet werden, während im UV-nahen Bereich zur Signalamplifizierung typischerweise eine größere Pfadlänge gewählt werden muss.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen supra-asymmetrischen Eigenschaften lassen sich im CD-Spektrum die Sekundärstrukturelemente eines Proteins als α -Helix, β -Faltblatt und als Zufallsknäuel zuordnen (Abbildung 8).

Unter der Annahme, dass Seitenketteneffekte vernachlässigt werden können, können die CD-Spektren auch über folgende Beziehung berechnet werden:

(Formel 5)
$$[\theta_\lambda] = f_h \cdot [\theta_\lambda^H] + f_f \cdot [\theta_\lambda^F] + f_s \cdot [\theta_\lambda^Z]$$

mit $[\theta_\lambda]$ der mittleren molaren Elliptizität (s.u.), f der Fraktion des entsprechenden Sekundärstrukturanteils H (Helix), F (Faltblatt) und Z (Zufallsknäuel). Im Prinzip kann über eine Anpassung der Parameter f_i ein Spektrum des fernen UV-Bereichs mit dieser Formel in Übereinstimmung gebracht werden. In der Praxis spielt jedoch die Größe der Strukturelemente eine bedeutende Rolle, weshalb die Berechnungen noch mit Datensätzen von Proteinen bekannter Struktur korrigiert werden.

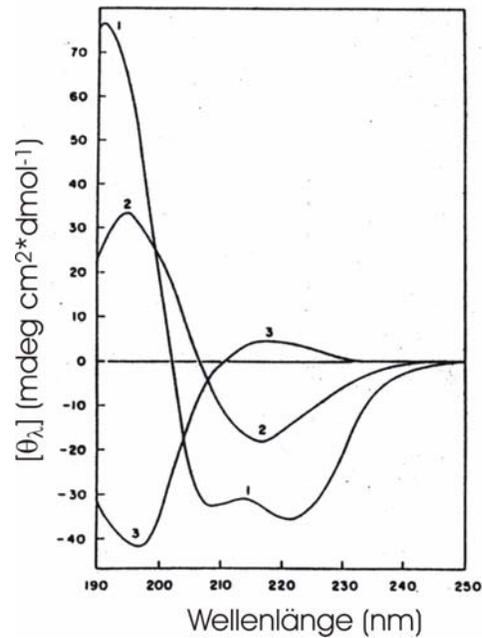


Abbildung 8. Die Fasman Standard-Spektren. Poly-L-Lysin Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen, so dass das Peptid entweder reine α -Helices (1), reines β -Faltblattstruktur (2) oder als Zufallsknäuel (3) vorliegt. Nach Greenfield und Fasman (1969).

Alle CD-Spektrometer messen anstelle von $\Delta\varepsilon$ die Elliptizität θ . Beide Messgrößen sind über die folgende Beziehung miteinander verknüpft:

(Formel 6)

$$\theta_{\lambda} = \ln 10 \cdot \frac{180^{\circ}}{4\pi} \cdot \Delta\varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit c der Konzentration und d der Pfadlänge durch die Probe. In dieser Arbeit wurde die in der Literatur übliche Angabe der mittleren molaren Elliptizität gewählt (s. Abschnitt 2.7.2.1).

2.7.2 Experimentelles Vorgehen

2.7.2.1 Messungen im fernen UV-Bereich

Die Daten für die Spektren im fernen UV-Bereich wurden am Strahlrohr 3m-NIM-1c am Berliner Elektronen Speicherring (BESSY II) aufgenommen. Die Proteine wurden hierfür auf eine Konzentration von 115 μM eingestellt. Es wurde ein Kakodylat-Puffer (Merck, Darmstadt) mit einer Konzentration von 5 mM verwendet, der auf einen pH von 7.4 titriert wurde. Die Messungen wurden bei 20° C in 0,001 cm Küvetten (Hellma, Mühlheim) durchgeführt. Jede Proteinprobe wurde dabei zweimal in voneinander unabhängigen Ansätzen gemessen. Beide Spektren wurden danach gemittelt. Ein Spektrum wurde von 170-250 nm in Schritten von 0,5 nm aufgenommen, wobei für jeden Schritt 5 sek lang gemessen wurde. Die Spektren wurden über die Absorption bei 280 nm auf den Wert des Wildtyp-Proteins angepasst.

Die mittlere molare Elliptizität wurde aus dem erhaltenen CD-Signal wie folgt ermittelt:

(Formel 7)
$$[\theta_\lambda] = 0,1 \frac{\theta_\lambda}{c \cdot d \cdot n}$$

wobei θ_λ die Elliptizität in Grad ist, c die Proteinkonzentration in mol/l und d die Pfadlänge in cm. Aus historischen Gründen wird die mittlere molare Elliptizität meistens in mgrad*cm²/dmol angegeben, woraus sich der Multiplikationsfaktor 0,1 ergibt.

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur wurden die Daten zwischen 185 und 245 nm verwendet. Hierzu wurde das Programm SELCON 3 verwendet (Sreerama et al., 1999), das über die Oberfläche des DichroWeb-Servers (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) von der Birkbeck Universität in London bedient wurde (Lobley et al., 2002). Zum Vergleich wurde der Sekundärstrukturgehalt des kristallographischen Modells der 5'-NT mit dem Programm DSSP (Kabsch und Sander, 1983) anhand der Kristallform II (PDB ID 1ush) berechnet.

2.7.2.2 Messungen im nahen UV-Bereich

Die Spektren im nahen UV-Bereich wurden an einem JASCO-600 CD-Spektrometer gemessen (JASCO Labor-und Datentechnik GmbH, Gross-Umstatt). Das Instrument wurde mit einem konstanten Stickstoff-Strom von 5 l/min gespült. Alle Spektren wurden bei 20° C aufgenommen. Die Proteinproben wurden auf eine Konzentration von 18,6 μM eingestellt, wobei auch hier auf die Absorption des Wildtyps bei 280 nm normalisiert wurde. Die Messungen wurden in 20 mM TrisHCl-Puffer (Merck, Darmstadt) pH 7,4 mit 50 mM KCl

(Merck, Darmstadt) und 0,5 mM EDTA (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Messungen der Proteine mit den Punktmutationen Lys355Trp, Gly356Tyr und His117Ala wurden in 5 mM Kakodylat-Puffer (Merck, Darmstadt) pH 7,4 durchgeführt. Für Experimente unter reduzierenden Bedingungen wurden 10 mM Dithiothreitol (DTT, AppliChem, Chemos GmbH, Regenstauf) zugefügt. Als Inhibitor wurden 37,5 μ M Adenosin-5- α , β -Methylen-diphosphat (AMPCP, Sigma-Aldrich, München) verwendet. Die Messungen wurden in einer 1 cm langen Küvette durchgeführt (Hellma, Mühlheim), wobei jede Messung zweimal unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Jeder Lauf bestand aus 5 Akkumulationen im Wellenlängenbereich von 240 bis 300 nm, wobei in Schritten von 0,2 nm gemessen wurde. Die Messgeschwindigkeit betrug 20 nm/min. Die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität erfolgte wie angegeben im Abschnitt „Messungen im fernen UV-Bereich“ (s. Formel 1). Die Daten wurden ausgewertet mit der Standard-Software des Herstellers.