

3 Proteinaufreinigung und Kristallisation

3.1 *Mutagenese und Proteinaufreinigung*

Da für diese Arbeit die Präparation von mutierten Varianten der 5'-NT erforderlich war, bestand die Gefahr, bei der Aufreinigung der mutierten Enzymvarianten Verunreinigung des genomisch kodierten Wildtyp-Proteins zu bekommen. Um derartige Kontaminationen zu vermeiden, wurde ein neues Aufreinigungsprotokoll erstellt, das einen Affinitätschromatographischen Schritt über eine Metall-Chelat-Säule beinhaltet. Alle Proteine, auch der Wildtyp, wurden genetisch mit sechs Histidin-Resten am C-Terminus modifiziert, so dass nur die Überexpressionskonstrukte nicht aber das genomisch kodierte Protein an die Affinitätssäule.

3.1.1 **Mutagenese**

Es wurde sowohl die Methode der überlappenden Oligonukleotide „overlap extension method“ (Ho et al., 1989) wie auch die Methode nach Weiner (Weiner et al., 1994) angewandt, um die gewünschten Änderungen in der Proteinsequenz zu erhalten. Erstere führte zu sehr vielen unerwünschten Nebenstellen-Mutationen (second site mutations). Die zweite Methode ist viel weniger anfällig für Nebenstellen-Mutationen und wurde aufgrund ihrer einfachen Handhabung hier vorwiegend verwendet. Die Methode basiert auf der linearen Amplifizierung der beiden Stränge der Ausgangs-DNA (Plasmid) mit zwei die Mutation enthaltenden komplementären Oligonukleotiden. Die parentale DNA wird dann mit dem Enzym DpnI verdaut, da sie im Gegensatz zu der generierten DNA methyliert ist. Die lineare einzelsträngige DNA wird in kompetente Bakterienzellen transformiert, wo sie dann ligiert und komplementarisiert wird, so dass mutiertes Plasmid isoliert werden kann. Diese Methode birgt jedoch zwei Probleme in sich: 1) Anders als bei der Methode nach Ho hier eine Durchmusterung der Transformanten nötig, da diese noch mit Wildtyp-Plasmid kontaminiert sein können. 2) Es kommt sehr häufig zu verkürzten Genfragmenten (exakt bis zum neu eingeführten Triplet).

Das erste Problem ließ sich über die Gensequenzanalyse lösen, was praktikabel ist, weil in der Regel nicht mehr als ein Wildtyp-Gen auf fünf Mutanten kommt, so dass die Anzahl der falsch positiven Konstrukte und damit der Fehlsequenzierungen gering ist. Wenn der Phänotyp gut vorhersagbar ist, kann auch über die oben beschriebene Methode des Aktivitätstests im Medium vorselektiert werden. Das ist beispielsweise bei der in der offenen

Konformation quervernetzten Mutante sehr gut möglich, da sich diese mit DTT aktivieren lässt, wodurch der Test sehr spezifisch ist. Das zweite Problem ist gravierender. Es zeigte sich, dass die eingesetzten Oligonukleotide von extremer Reinheit sein müssen. Alle in dieser Arbeit für Mutagenese-Experimente eingesetzten Oligonukleotide wurden daher von Hand über HPLC gereinigt (Werner Schröder). Es erwies sich auch als günstig, bei Auftragsarbeiten (hier MWG-Biotech) für die Oligonukleotidsynthese stets ein Chromatogramm der Aufreinigung mit anzufordern. Des Weiteren wurden über Überexpression in 3 ml Bakterien-Kulturen, die Konstrukte derart vorselektiert, dass nur mit Proteinen der vollen Länge weitergearbeitet wurde.

Das von der Firma Stratagene vertriebene Kit zur Mutagenese (*Quick-Change™ site-directed mutagenesis kit*), das auf der Weiner-Methode beruht, war nicht notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei längeren Transkripten die „Quick-Solution“ nicht notwendig ist und ohne weiteres durch DMSO ersetzt werden kann. Auch ist die Effizienz der hier verwendeten Elektroporation nicht der Transformationseffizienz der kompetenten Zellen von Stratagene unterlegen. Eine sehr überzeugende Komponente des Stratagene Kits hingegen war die *Pfu*-Ultra Polymerase, die eine sehr hohe Genauigkeit auszeichnet. Es wurden keine „second site“ Mutationen mehr gefunden mit dem Einsatz dieses Enzyms.

Hier stellte sich die Frage, wie sinnvoll das Durchsequenzieren des neuen Konstruktes überhaupt noch ist. Die gängigen Auftragssequenzierungen arbeiten mit einer Fehlerrate von 1 auf 1000 Basenpaaren, wohingegen die *Pfu*-Ultra Polymerase eine Genauigkeit von > 1: 10000 hat. Verbindet man also das zu mutierende Triplet mit einer Restriktionsschnittstelle, kann man mit der beschriebenen Methode zur Überexpressionskontrolle gefolgt von einer Restriktionsanalyse sehr schnell das gewünschte Konstrukt finden.

Insgesamt wurden Überexpressionskonstrukte von folgenden Genvarianten präpariert und sequenzvalidiert:

Einfachmutanten	His-117→Ala; Gly-355→Tyr; Gly-355→Ala; Lys-356→Trp; Asp-120→Ala; Ile-521→Cys; Arg-375→Ala
Doppelmutanten	Ser-228→Cys, Pro-513→Cys; Pro-90→Cys, Leu-424→Cys
Dreifachmutanten	Ser-228→Cys, Pro-513→Cys, Ile-521→Cys; Pro-90→Cys, Leu-424→Cys, Ile-521→Cys

In dieser Arbeit werden nur die beiden Cystein-Doppelmutanten beschrieben.

3.1.2 Überexpression

Das *ush A* Gen auf dem Plasmid pTRC99A (N. Sträter) wurde über die Schnittstellen NdeI und BamHI in den ebenso verdauten Vektor pET22a überführt. Schon bei den ursprünglichen Konstrukten wurde beobachtet, dass das Protein sehr sensitiv ist gegenüber den Induktionszeiten. So konnten nach dreistündiger Induktion mit 1mM IPTG noch 10 mg Protein pro Liter Zellkultur erhalten werden, nach vier Stunden Induktionszeit jedoch nicht mehr als 2 mg. Dieses Problem verschärfte sich noch mit den neuen Überexpressionskonstrukten, hier wurde mit der üblichen IPTG-Konzentration von 1 mM nur noch deutlich unter 1 mg Protein erhalten. Als günstige Optimierungstechnik erwies sich die Messung der BPNP-Hydrolyse. Da die 5'-NT ins Periplasma sezerniert wird, ist es möglich, die Aktivität direkt in einer verdünnten Zellkultur zu messen, indem die Absorption bei 405 nm verfolgt wird. Hierbei wurde vorausgesetzt, dass eine hohe Aktivität mit einer hohen Proteinmenge korreliert. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass maximale Aktivität nach 4-6 h bei 2,5 – 10 μ M erhalten wird (Abbildung 9). Nach Optimierung wurden dann für das Wildtyp-Protein 5 mg Protein pro Liter Zellkultur erhalten.

Es ist unklar, ob die zusätzlichen Histidine, die neue *E. coli* Zelllinie oder beides zu der schlechteren Löslichkeit des Protein geführt haben. Eine interessante Beobachtung war, dass sich die Überexpression der disulfidverbrückten Mutanten durch Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH) verdoppeln ließ. Da nicht deutlich war, ob Glutathion die Enzyme kovalent modifiziert, wurde es jedoch dem Medium nicht zugefügt.

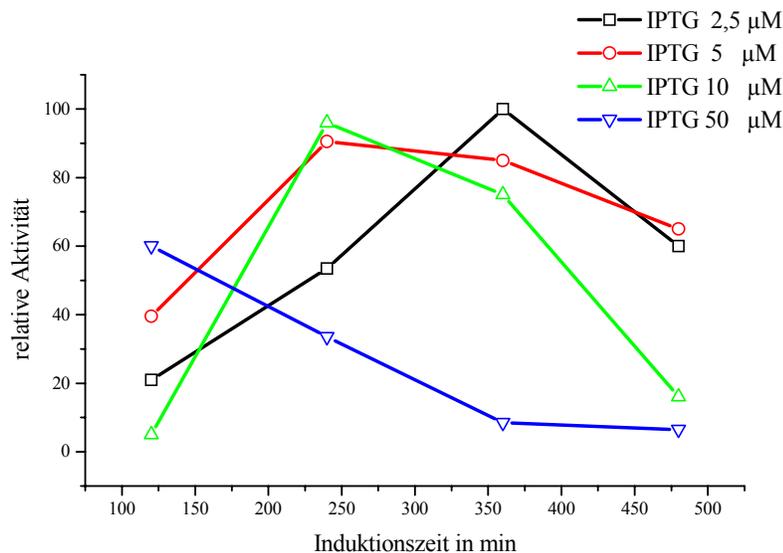


Abbildung 9. IPTG-Konzentrationen und Induktionszeiten für die Proteinaufreinigung. Die höchste Aktivität wurde gleich 100 gesetzt.

3.1.3 Proteinaufreinigung

Wie oben beschrieben, musste das Protokoll zur Proteinaufreinigung geändert werden, um mögliche Kontaminationen mit genomisch kodiertem Wildtyp-Protein zu vermeiden. Vom ursprünglichen Protokoll (Knöfel und Sträter, 1999) wurden hierbei die Gelfiltrations-Säule als letzten Säuberungsschritt sowie der Anionenaustauscher beibehalten. Letzterer wurde jedoch durch ein hochauflösendes Material ersetzt. Die 6x His-Markierung am N-terminalen Ende führte zu einer wesentlich schlechteren Bindung des Proteins an den Anionenaustauscher. Aus diesem Grunde wurde für diesen Reinigungsschritt sämtliches Salz aus dem Puffer entfernt und durch Betain ersetzt. Außerdem wurde der pH-Wert des Puffers auf 8,5 erhöht. Die Ammoniumsulfatfällung wurde anfangs durch eine Hydroxyapatit-Säule ersetzt, später stellte sich heraus, dass diese Säule nicht unbedingt notwendig war und wurde weggelassen. Tabelle 3 vergleicht das neue mit dem alten Aufreinigungsprotokoll.

Tabelle 3. Überblick Proteinaufreinigung.

Aufreinigungsschritt	altes Protokoll	neues Protokoll
Zellaufschluss	French Press	French Press
Protein-„Capture“	Ammoniumsulfatfällung	Metall-Chelat
Umpufferung	Dialyse	Entsalzungschromatografie
Anionenaustauscher	DEAE	PLSAX
Protein-„Polishing“	S75	S75

Das neu etablierte Aufreinigungsprotokoll führt zu der gleichen Proteinreinheit wie das alte Protokoll, das Protein mit His-Markierung lässt sich ebenso kristallisieren (getestet wurde die Kristallform III, PDBID 1ho5) und zeigt dieselben kinetischen Eigenschaften wie das herkömmlich gereinigte Protein. Es hat zudem den Vorzug, dass sich die Präparation wesentlich schneller durchführen lässt. Als ein gravierender Nachteil stellte sich heraus, dass das Protein nach der Aufreinigung nicht in der Apoform vorliegt. Dies wurde ursprünglich erwartet, weil das Protein zuvor in der Apoform erhalten wurde, und die Puffer, vor allem der Laufpuffer für die Gelfiltrations-Säule mit 0,5 mM EDTA beibehalten wurde.

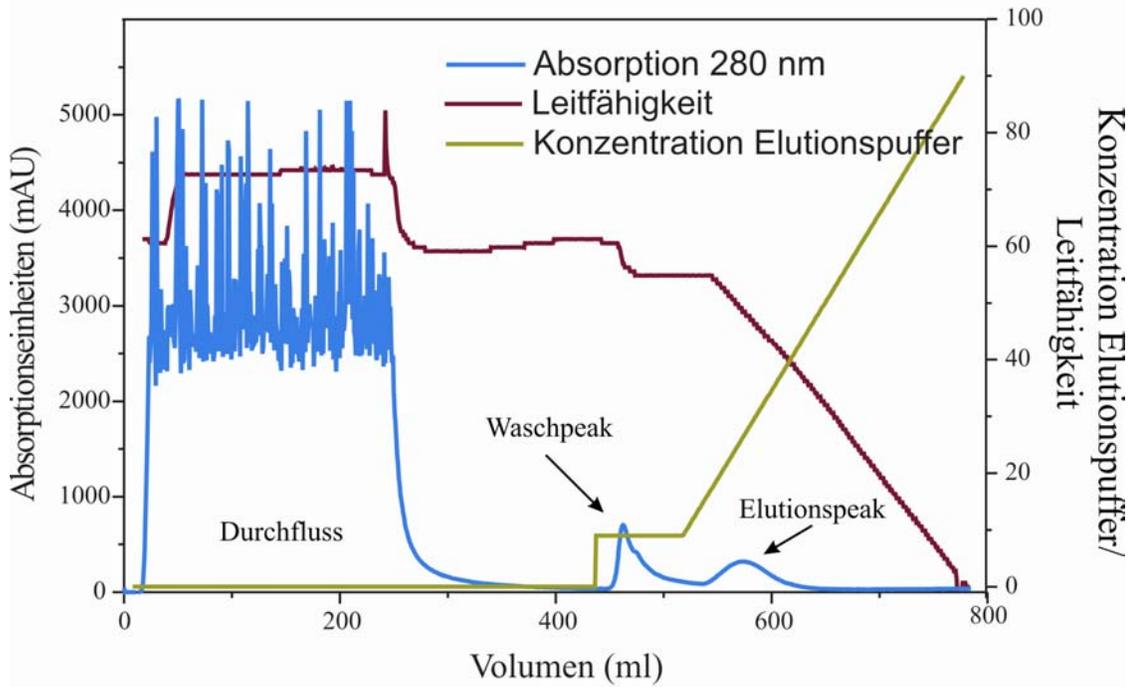
Es zeigte sich in den Kristallstrukturen, dass das Protein ein Metallion im aktiven Zentrum gebunden hatte, auch wenn keine Metallionen im Kristallisationsansatz zugefügt wurden. Dieses Metallion war stets an die Bindestelle 2 gebunden, die schon zuvor als hochaffin beschrieben wurde (McMillen et al., 2003) und auch in Kristallstrukturen schon als stärker besetzt identifiziert wurde als die Metallbindestelle 1. Die Vermutung lag nahe, dass es sich bei dem Metallion um Ni²⁺ handelte, da dieses Ion für die Aufreinigung über die Me-

tallchelatsäule notwendig ist. Eine andere Möglichkeit könnten noch Zn^{2+} -Ionen sein, von denen gezeigt werden konnte, dass sie aus dem Medium mit dem Protein zusammen aufgereinigt werden können (Dvorak und Heppel, 1968; McMillen et al., 2003). Das würde bedeuten, dass im neuen Protokoll die Entsalzungssäule weit weniger effektiv ist als der Dialyseschritt des alten Protokolls oder aber, dass die Ammoniumsulfatfällung im alten Protokoll zur Verdrängung der Metallionen aus dem aktiven Zentrum beigetragen hat.

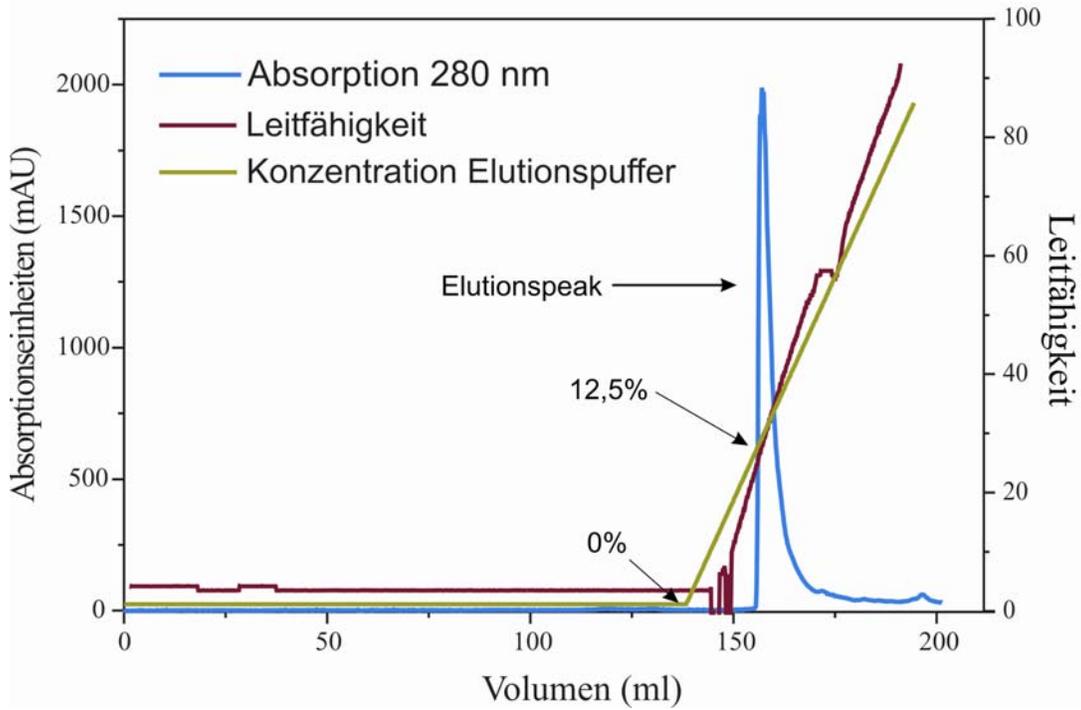
Mittels Atomabsorptionsspektroskopie (durchgeführt vom Protein-Analyse-Zentrum an der Fachhochschule Bingen) konnte festgestellt werden, dass das SP-Protein bei einer Konzentration von $370 \mu\text{M}$ $55 \mu\text{M}$ Ni^{2+} und $210 \mu\text{M}$ Zn^{2+} enthielt (Graphitröhrentechnik, Mittelwerte von 3-facher Bestimmung). Durch Mikrodialyse für 24h bei Raumtemperatur ließen sich diese Werte auf $12,7 \mu\text{M}$ für Ni^{2+} und $20,0 \mu\text{M}$ für Zn^{2+} reduzieren. Die Kinetischen Daten in dieser Arbeit wurden mit dem dialysierten Protein erhoben, die kristallographischen und spektroskopischen Messungen wurden mit dem undialysierten Protein aufgenommen.

Die Aufreinigung war für alle Mutanten identisch. Für die Mutanten mit den eingeführten Cysteinen konnte nur die Hälfte der normalen Proteinmenge isoliert werden. Die Chromatogramme des etablierten Aufreinigungsprotokolls sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Metallchelatsäule (A) erbrachte die erwartete Spezifität. Ein Waschschrift mit 10% des Elutionspuffers war erforderlich, um schwach wechselwirkende Proteine von der Säule zu eluieren und erwies sich als günstiger als einen durchgehenden Gradienten zu fahren. Die Elutionsfraktion bestand bereits zu etwa 90 % aus Nukleotidase (Abschätzung Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung). Die Anionenaustauschchromatografie (B) diente nicht allein einer weiteren Aufreinigung sondern erbrachte auch eine Probenkonzentrierung um das 20-fache. Das Protein eluiert sehr früh und mit einer leichten Schulter, die auf Verunreinigungen oder Isoformen hindeutet, von der Säule. Die Gelfiltration (C) als letzter Schritt überführte das Protein in einen geeigneten Aufbewahrungspuffer und entfernte letzte Unreinheiten. Alle aufgereinigten Proteine eluierten in einem sehr symmetrischen Peak von der Säule, so dass davon ausgegangen wurde, dass das Protein als Monomer vorliegt.

A. Metall-Chelat-Säule



B. Anionenaustauscher



C. Größenausschlusschromatographie

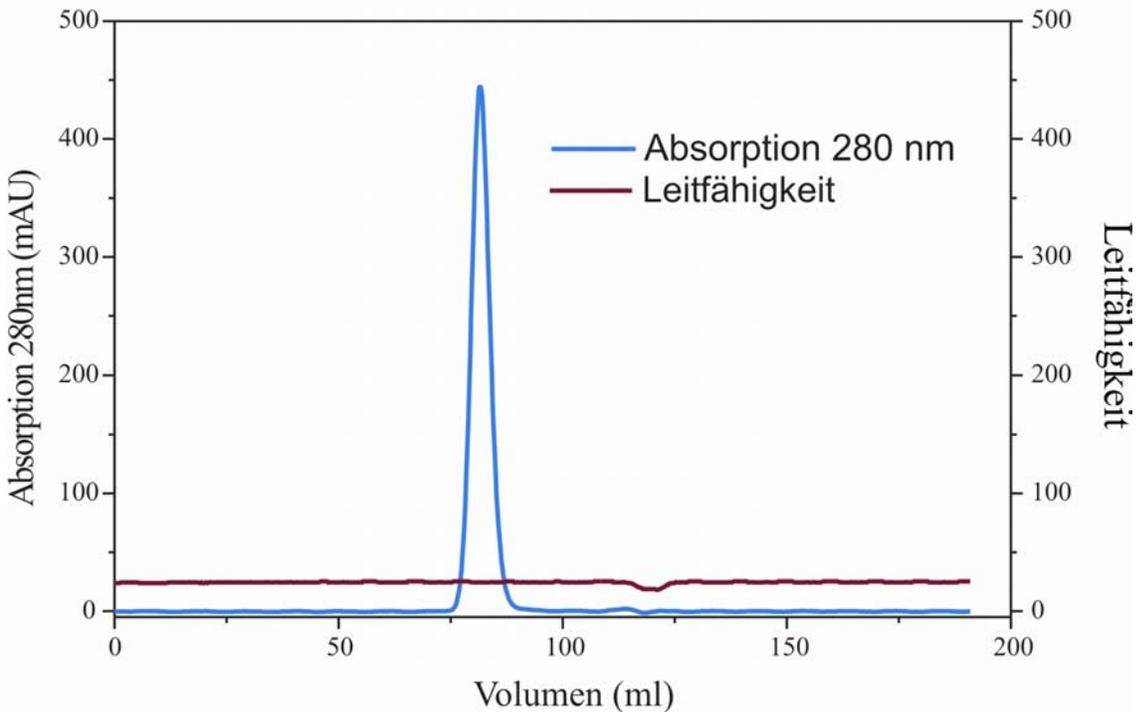


Abbildung 10. Chromatogramme der neuen Aufreinigung der 5'-NT. Siehe Text für weitere Erläuterungen.

Abweichungen von den in Abbildung 10 dargestellten Chromatogrammen wurde für die Dreifachmutante S228C, P513C, I521C erhalten, bei der drei distinkte Fraktionen von der Anionenaustauschersäule eluierten, die alle drei sowohl spezifische 5'-NT Aktivität enthielten als auch gelelektroforetisch nicht voneinander zu unterscheiden waren. Das Protein mit der Mutation Asp-120 →Ala konnte überhaupt nicht aufgereinigt werden, da es unter den etablierten Bedingungen unlöslich vorlag.

Die disulfidverbrückten Proteine wurden nach dem Elman's Test auf freie Thiolgruppen hin überprüft (Ellman, 1959). Da dieser Test in seiner originalen Beschreibung hohe Proteinmengen verbraucht (200 µM) wurde später auch das Thiol-Quantifizierungs-Kit der Firma Molecular Probes eingesetzt, das einen enzymatischen Amplifizierungsschritt der Sulfhydrylgruppen beinhaltet, so dass mit einer 10-fach geringeren Proteinmenge bei gleicher Genauigkeit gearbeitet werden konnte. Zur Kalibrierung des kalorimetrischen Tests wurde Cystein verwendet. Die Ergebnisse des Wildtyp-Proteins wurden gleich Null gesetzt. Für die SP Doppelmutante ergab sich aus dem stöchiometrischen Verhältnis von freien Thiolgruppen zur Proteinkonzentration eine rechnerische Proteinpopulation von 0,2 % mit nicht geschlossener Disulfidbrücke und für die PL-Doppelmutante 3,1%. Als Positivkontrolle wurde das Protein Gly-398 →Cys verwendet, das einen Wert von 94,5% ergab. Ü-

ber diesen Test wurde die Doppelmutante Pro-90→Cys, Thr-501→Cys, die das Protein ebenfalls in einer geschlossenen Konformation fixieren sollte, mit 40,0 % freien Thiolgruppen von weiteren Experimenten ausgeschlossen.

3.1.4 Kristallisation

Es gelang, die beiden über Disulfidbrücken quervernetzten Proteinvarianten der 5'-NT zu kristallisieren. Von dem in der offenen Konformation eingefangenen Protein SP (die Doppelmutante S228C, P513C) konnten zwei verschiedene Kristallformen erhalten werden. Die Kristalle der anvisierten geschlossenen Konformation PL (die Doppelmutante P90C, L424C) wurden zuerst in Ammoniumsulfatbedingungen gefunden. Alle sieben getesteten Kristalle erwiesen sich jedoch als perfekte Zwillinge, deren Struktur nicht bestimmt werden konnte. Erst als das Ammoniumsulfat gegen Lithiumsulfat ausgetauscht wurde, wurden echte Einkristalle erhalten, mit denen die Struktur zu bestimmen war. Es wurden allerdings nicht mehrere Lithiumsulfatkristalle getestet, so dass nicht endgültig bewiesen ist, dass die Entzwilligung auf den Austausch des Salzes zurückzuführen ist. Es gelang nicht, diese Proteinvarianten unter den Wildtyp-Bedingungen zu kristallisieren. Die hier beschriebenen Strukturen basieren alle auf neuen Kristallisationsbedingungen.

Des Weiteren wurde noch das Wildtyp-Protein mit dem Substrat di-Adenosin-tri-Phosphat kristallisiert. Unerwarteterweise kristallisierte dieser Enzym-Substrat-Komplex in einer neuen Kristallform, obwohl die Kristallisationsbedingungen identisch waren mit den Bedingungen des Wildtyp-Proteins (1ho5). Die Proteine Gly-355→Ala und Gly-355→Tyr kristallisierten auch unter den Wildtyp-Bedingungen (1ho5), die Proteine Lys-356→Trp, His-117→Ala und Ile-521→Cys gaben unter den Wildtyp-Bedingungen nur stark verwachsene Kristalle, die nicht streuten. Für Ile-521→Cys wurden sehr gut streuende Kristalle unter Ammoniumsulfat-Bedingungen erhalten.

Tabelle 4 listet die Kristallisationsbedingungen und die Tieftemperaturpuffer der Kristalle auf, die in der vorliegenden Arbeit noch eingehender diskutiert werden. Alle Kristallisationsbedingungen waren gut reproduzierbar und die Kristalle waren sichtbar innerhalb der ersten 5 Tage nach Ansetzen der Kristallisationstropfen. Die Kristalle SP-II und PL konnten sehr groß gezüchtet werden mit bis zu 0,7 mm in der längsten Richtung und je 0,1 mm in den beiden anderen Richtungen. Die Kristalle SP-I hingegen wuchsen eher quaderförmig und sehr viel kleiner mit typischen Ausmaßen von 0,2 mm in 2 Richtungen und 0,1 mm in die dritte Richtung.

Tabelle 4. Kristallisationsbedingungen und Tieftemperaturpuffer.

Kristall	SP-I	SP-II	PL
Protein	Doppelmutation S228C, P513C	Doppelmutation S228C, P513C	Doppelmutation P90C, L424C
Kristallisations- bedingung	2,1 M Malonat pH 6.5	26% PEG 400, 100 mM Kakodylat pH 6.5	1,8 M Li ₂ SO ₄ , 100 mM Tris pH 8,5, 1 mM MnCl, 10 mM Betain, 10% MPD (2-methyl- 2,4-pentandiole)
Tieftemperatur- puffer	direkt tiefgefroren	30% PEG 400	3 M Malonat, pH 6,5
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2