
Kristallographischer Teil

5 Kristallisation

5.1 Methode

Die Kristallisation des $\epsilon_x\zeta_y$ Proteinkomplexes erfolgte nach der Methode der isothermen Dampfdiffusion (Ducruix und Giegé, 1992). Bei dieser Methode wird ein Tropfen, der Protein und Fällungsmittel (in einer Konzentration, bei der das Protein noch in Lösung bleibt) enthält, über eine Reservoirlösung mit einer höheren Fällungsmittelkonzentration gebracht. Der Ausgleich des Konzentrationsgradienten erfolgt ausschließlich über Diffusion des Lösungsmittels aus dem Tropfen, da dieser nicht mit dem Reservoir in direktem Kontakt steht. Weil der verwendete Experimentaufbau erlaubt, pro Ansatz 2 μl Proteinlösung mit 2 μl Reservoirlösung pro Tropfen zu mischen und gegen 800 μl Reservoirlösung zu equilibrieren, ist diese materialsparende Methode besonders geeignet zur Suche nach Kristallisationsbedingungen. Dies wurde mit Hilfe des *Crystal Screens*, der entsprechend dem *sparse-matrix* Protokoll von Jancarik und Kim (1991) aus 48 verschiedenen Reservoirlösungen besteht, bei 291 K durchgeführt. Dabei wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von ca. 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\epsilon_x\zeta_y$ Proteinkomplex in Puffer HEP_{LAUF} eingesetzt.

5.2 Kristallisationsbedingungen

5.2.1 Kristallisation des Wild-Typ Proteins bei saurem pH-Wert

Kommt eine Reservoirlösung bestehend aus 100 mM Natriumcitrat pH 5.6, 20 % (v/v) 2-Propanol und 20 % (w/v) PEG 4000 zum Einsatz, so kristallisiert der $\epsilon_x\zeta_y$ Proteinkomplex in Individuen rhombischer Morphologie aus (Abb.5.2.1.1.a). Dabei sind neben Kristallen disphenoidischer Tracht auch Kombinationsformen aus Prisma, Pinakoid und Disphen (Abb.5.2.1.1.b), Kombinationen aus linkem und rechtem Disphen gelegentlich zu beobachten. Diese erreichen Kantenlängen bis zu 0.1 mm, neigen jedoch schon nach wenigen Tagen dazu, sich anzulösen. Dabei rauhen die Flächen an, Kanten verrunden und die Kristalle spalten mit nicht orientiertem muscheligen Bruch (Abb.5.2.1.1.c). Verfeinerungen der Kristallisationsbedingungen zeigten, dass ein Ersatz der Puffersubstanz durch 100 mM Natriumacetat pH 4.6 die Kristallqualität verbesserte. Ebenso führten PEG verschiedenster Größe von 1 500 bis 8 000 Da zum Erfolg. Für die anschließenden Vorbereitungen zu Röntgenbeugungsexperimenten erwies sich eine Substitution von 2-Propanol durch 2-Methyl-2,4-pentandiol und Ethylenglykol als vorteilhaft. Kristalle, die in der

Gegenwart einer der beiden Additiva gezüchtet wurden, zeigten eine höhere Stabilität gegen Dehydratation an der Luft, doch war die Zugabe dieser Additiva nicht immer notwendig. Zur Verfeinerung und anschließenden Kristallisation für Material zur Datensammlung wurde die Konzentration an Wild-Typ Protein auf ca. 16 mg.ml^{-1} $\epsilon_x \zeta_y$ Proteinkomplex in Puffer HEP_{LAUF} erhöht.

Stöchiometrische Unregelmäßigkeiten ($\epsilon_1 \zeta_2 / \epsilon_2 \zeta_2$) jeder einzelnen Proteinaufreinigung erschwerten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Kristallisationsexperimente. Deshalb mussten die genauen Konzentrationsverhältnisse der Präzipitanten durch Variation immer neu bestimmt werden.

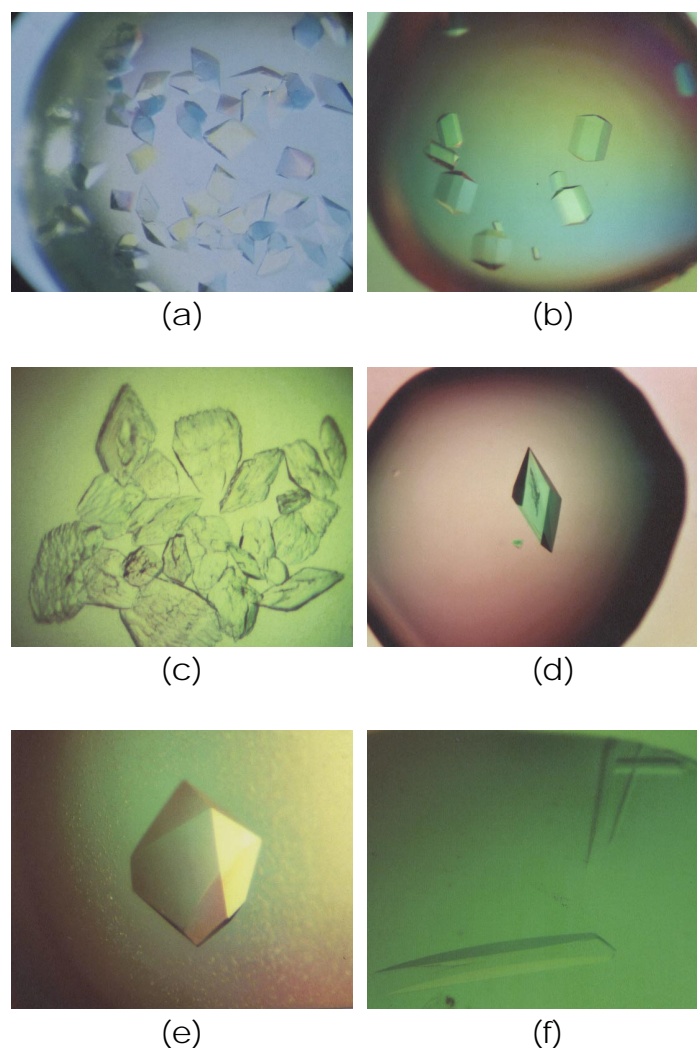


Abb.5.2.1.1 Kristalle von Abb. a bis e wurden bei pH 5, (f) bei pH 7 gezüchtet. **(a)** Kristalle des Crystal-Screens **(b)** verfeinerte Kristallisationsbedingungen **(c)** Kristalle nach ca. 2 Wochen Lagerung im Kristallisationsansatz **(d)** häufige Defektform als zentraler Riss **(e)** idiomorpher optisch defektfreier Kristall **(f)** nadelige Tracht der rhombischen Modifikation gezüchtet bei pH 7.0

Kamen Reservoirösungen bestehend aus 100 mM Natriumacetat pH 4.6, 10 % (w/v) PEG 6 000 und 15 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol zum Einsatz, so konnten pro Tropfen drei verschiedene Kristallmodifikationen beobachtet werden. Einerseits waren Kristalle der oben beschriebenen Tracht zu beobachten. Ebenso kristallisierten xenomorphe Individuen ohne planparallele Flächen mit verrundeten Kanten aus, die mehr an erstarrte Glastropfen erinnerten. Kristalle der dritten Modifikation hatten tetragonal-pyramidale Tracht. Diese Polymorphie zeigte jedoch nur eine Charge an aufgereinigtem Protein und konnte in anschließenden Aufreinigungen nicht reproduziert werden.

Wegen der Variabilität der Kristallisationsbedingungen kann in dieser Arbeit keine exakte, optimale Kristallisationsbedingung angegeben werden. Eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins erfolgte mit Reservoirösungen folgender Konzentrationen:

- 100 mM Natriumacetat pH 4.6,
- 12 - 17 % (w/v) PEG (1 500 bis 3 350 Da) und
- 15 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol oder
- 15 % (v/v) Ethylenglykol als Additiva;

Unter diesen Voraussetzungen wurden ausschließlich idiomorphe, rhombische Kristalle mit einer Kantenlänge bis zu 0.6 mm beobachtet.

5.2.2 Kristallisation des Wild-Typ Proteins bei neutralem pH-Wert

Native und vermeintliche Schweratom-Datensätze ermöglichten kein Lösen des Phasenproblems mit Hilfe der Methode des isomorphen (isotypen) Ersatzes. Deshalb wurde eine Variation des pH-Wertes in den Kristallisationsbedingungen durchgeführt, um eine Schweratombindung an das Protein zu verbessern. Es zeigte sich, dass der Proteinkomplex auch bei einer Reservoirösung bestehend aus 50 mM Natriumacetat und 50 mM Pipes titriert zu pH 7.0, 10 % (w/v) PEG 3 350 und 15 % Ethylenglykol in rhombischer, nadelig bis tafeliger Tracht kristallisiert (Abb.5.2.1.1.f). Diese Platten zeigten gute Spaltbarkeit parallel zu Flächen senkrecht zur geringsten Ausdehnungsrichtung.

5.2.3 Kristallisation des Selenomethionin-derivatisierten Proteins

Zur Kristallisation des Selenomethionin-derivatisierten Proteinkomplexes lag eine Konzentration von ca. 8 mg.ml⁻¹ in Puffer HEP_{LAUF} mit 5 mM 1,4-Dithiothreitol vor. Ansonsten waren die Kristallisationsbedingungen gleich zum Wild-Typ Proteinkomplex. Wurde eine

Reservoirlösung mit Konzentrationen von 100 mM Natriumacetat pH 4.5, 15 % (w/v) PEG 1500 and 10 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol verwendet, kristallisierten Individuen rhombischer, idiomorpher Tracht aus, doch war deren maximale Kantenlänge auf kleiner als 0.3 mm beschränkt.

5.2.4 Kristallisation der punktmultierten Proteine

Zur Kristallisation des Proteinkomplexes mit punktmultiertem ζ -Protein wurde die Standardkonzentration von 16 mg.ml⁻¹ gewählt. Ansonsten konnten Bedingungen wie beim Wild-Typ Protein gewählt werden. Auch hier kristallisierten Individuen mit idiomorpher Morphologie. Wie auch für das Wild-Typ Protein mussten die Kristallisationsbedingungen für jede Aufreinigung neu verfeinert werden. Die Konzentrationen der jeweiligen Reservoirlösungen sind in Tab.5.2.4.1. aufgelistet.

Punktmutante	Zusammensetzung der Reservoirlösung
$\epsilon_2\zeta(K46A)_2$	100 mM Natriumacetat pH 4.6, 16.7 % (w/v) PEG 2 000, 10 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol;
$\epsilon_2\zeta(R171S)_2$	100 mM Natriumacetat pH 4.6, 15 % (w/v) PEG 2 000, 10 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol;

Tab.5.2.4.1 Kristallisationsbedingungen der punktmultierten Proteinkomplexe.

5.2.5 Kristallisation des $\epsilon,\zeta(Val234Stop)$ Proteins

Da diese Mutation zu verkürztem ζ -Protein führte, waren neue Kristallisationsbedingungen zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde zu Beginn ein *Crystal Screen* (siehe oben) durchgeführt. Es wurden unter mehreren Bedingungen dünne Tafeln erhalten, die zu polykristallinen Aggregaten verwachsenen waren. Einheitlich enthielten diese Bedingungen hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat (≥ 800 mM $(NH_4)_2SO_4$).

Nach einer Verfeinerung kristallisierten einkristalline Tafeln hexagonaler Morphologie. Die Reservoirlösung hatte folgende Zusammensetzung:

100 mM Hepes pH 7.5,
1.65 M $(NH_4)_2SO_4$ und
10 % (v/v) PEG 400.

5.2.6 Kurioses

Abschließend sollen noch einige ungeklärte Eigenschaften erwähnt werden:

Wurden 2 μl Proteinlösungen mit Konzentrationen von ca. $16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ $\epsilon_x\zeta_y$ Proteinkomplex mit 2 μl der entsprechenden Reservoirlösung gemischt, so kam es spontan zu einer reversiblen Präzipitation des Proteins. Nach wenigen Minuten ging das Präzipitat wieder in Lösung. Grund dafür könnte eine spontane Übersättigung an der Phasengrenze Proteinlösung - Reservoirlösung sein, da diese nicht gemischt wurden, sondern ineinander diffundieren sollten.

Wurden Proteinlösungen mit Proteinkonzentrationen höher als $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ zur Kristallisation eingesetzt, so blieb das Protein im Tropfen ohne zu präzipitieren für einige Wochen stabil, fiel dann jedoch aus, ohne zu kristallisieren.

Frisch aufgereinigte Präparationen ergaben Kristalle, die sich nach kurzer Zeit anlösten und bei der Präparation zur Röntgenbeugung spalteten. Wurde die Proteinlösung vor der Kristallisation für ca. eine Woche bei 4°C gelagert, so war die erzielte Kristallqualität erheblich besser. Mögliche Erklärung könnte freies ζ -Protein sein, das thermisch instabil ist (Alonso, pers. Mitt.) und erst abgebaut werden muss. Dies scheint jedoch nur in sehr geringen Mengen zu erfolgen, da Coomassie-gefärbte SDS-Gele keine Abbaubanden zeigten. Bei einer Lagerung bei 4°C spaltet sich freies ζ Protein nach einiger Zeit autokatalytisch (Alonso, pers. Mitt.). Ebenso könnte eine stöchiometrische Heterogenität der Grund dafür sein. Da der Proteinkomplex von Phenylether bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen 1.3 M eluiert und bei dieser Ionenstärke der Komplex bereits zerfällt, könnte eine langsame Rückorientierung zu $\epsilon_2\zeta_2$ bei niedrigen Salzkonzentrationen diesen Lagerungseffekt verursachen.