

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bakterieller Stamm

DS957: Derivat von *E. coli* K-12 AB1157 (Bachmann, 1972). Der Stamm wird beschrieben als AB1157 *recF lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 pepA::Tn5* (McCulloch *et al.*, 1994).

#### 2.1.2 Expressionsvektoren

pTRC99A (von Pharmacia mit Gen *ushA* )

#### 2.1.3 Lösungen und Puffer

Puffer für die Proteinreinigung:

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 500 mM NaCl, 0.5 mM EDTA

Puffer B: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA

Puffer C: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 M KCl, 0.5 mM EDTA

Puffer D: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM KCl, 0.5 mM EDTA

Aufbewahrungspuffer:

5 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM KCl, 0.05 mM ZnCl<sub>2</sub>

#### 2.1.4 Nährmedien für die Zellanzucht

LB Medium: 10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl werden nach dem Autoklavieren mit Ampicillin (100 mg/l) versetzt.

Amp-Platten: 1.5 % (w/v) Agar in LB Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen unter 60 °C wurde das Antibiotikum Ampicillin (100 mg/l) zugegeben und die Platten gegossen.

#### 2.1.5 Chemikalien und Proteine

Marker für SDS-PAGE (*low molecular weight marker*, LMW-Marker) (Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa), α-Lactalbumin (14.4 kDa)) stammte von Amersham Pharmacia Biotech.

ATP (Sigma)

Adenosin (Sigma)

$\alpha,\beta$ -Methylen-ATP (Sigma)

Sonstige Chemikalien und Puffersubstanzen wurden von Merck, Biomol, Sigma, Serva oder Fluka bezogen und hatten mindestens Analysenqualität.

## **2.2 Biochemische Methoden**

Die *E. coli* Zellen des Stammes K12 mit dem Plasmid pTRC99A, welches das Gen *ushA* aus dem Bakterium *Escherichia coli* enthält, wurden von Herrn Dr. N. Sträter zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1 Zellanzucht**

Der *E. coli* Stamm mit dem Gen *ushA* in Plasmid pTRC99A wurde bei  $-70^{\circ}$  C in einer Glycerinlösung (30 % Glycerin und 70 % Wasser) aufbewahrt. Zur Anzucht wurden Zellen auf Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}$  C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 3 ml steriles LB Medium, dem zuvor 3  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) zugefügt wurden, angeimpft und bei  $37^{\circ}$  C und 240 UpM über Nacht geschüttelt. Für die Anzucht der Hauptkultur wurden 1 l LB Medium mit 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) in einem 2-Liter-Schüttelkolben vorgelegt und mit 1 ml (1:1000) der ausgewachsenen Bakterienkultur angeimpft. Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die Absorption von 1 ml Aliquots der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm halbstündlich gemessen. Bei einer Extinktion von 0.8 (etwa drei bis vier Stunden nach dem Animpfen), wurde die Expression der 5'-NT durch Zugabe von 2.5 ml einer IPTG-Lösung (0.2 mol/l) induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen in einem GS3 Rotor (Sorvall) bei 9000 UpM 15 min zentrifugiert. Aus 1 l Medium wurden durchschnittlich 6 g Zellen erhalten (Naßgewicht). Die Zellen wurden entweder gleich weiterverarbeitet oder bei  $-70^{\circ}$  C über Nacht aufbewahrt.

### **2.2.2 Zellaufschluß und Proteinreinigung**

Sämtliche nachfolgend beschriebenen Schritte wurden bei  $4^{\circ}$  C durchgeführt und beziehen sich auf 2 l Anzuchtkultur. Zum Zellaufschluß wurden die in 60 ml von Puffer A resuspendierten Bakterienzellen dreimal mit einer Zellpresse (French Press, Aminco) bei einer Druckdifferenz von 6 MPa behandelt. Nach anschließender Abzentrifugation (13000 UpM, 30 min, SS34 Rotor, Sorvall) der Zellrückstände wurde der Überstand mit Puffer B auf 200 ml aufgefüllt. Hierauf

folgten zwei Schritte einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung. Im ersten Schritt wurden innerhalb von 30 min insgesamt 46 g Ammoniumsulfat (40 %ige Sättigung) zu den vorgelegten 200 ml Rohproteinlösung gegeben. Nach 30 min Rühren erfolgte eine 90-minütige Zentrifugation (12000 UpM, GSA-Rotor, Sorvall). Anschließend wurden schrittweise 70 g Ammoniumsulfat (innerhalb von 30 min, 85 %ige Sättigung) zum Überstand aus dem vorausgegangenen Schritt der Ammoniumsulfatfällung zugegeben. Eine Zentrifugation des ausgefallenen Proteins erfolgte etwa 30 min nach der letzten Ammoniumsulfatzugabe (90 min, 12000 UpM, GSA-Rotor, Sorvall). Dabei wurden etwa 8 g nasses Pellet aus dem zweiten Fällungsschritt gewonnen. Das in 8 ml von Puffer B resuspendierte Pellet wurde gegen Puffer B über Nacht dialysiert.

Die weiteren Reinigungsschritte beruhen auf chromatographischen Techniken, die, wenn nicht anderes angegeben, an einer FPLC Anlage (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt wurden. Der Verlauf der Chromatographie wurde anhand der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Die Zusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde mittels denaturierender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) festgestellt.

#### *2.2.2.1 Proteinisolierung in Anlehnung an Ruiz et al.*

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Protein in Anlehnung an eine Reinigungsprozedur von Ruiz und Mitarbeitern (1989) isoliert. Hierzu wurde das gegen Puffer B dialysierte Rohprotein auf 5 ml konzentriert und auf eine mit Puffer B äquilibrierte Sephacryl-S200 Gelfiltrationssäule (600 ml Säulenmaterial von Pharmacia) aufgetragen, und diese mit einer Peristaltikpumpe (P-1 von Pharmacia) mit einer Flußrate von 1 ml/min betrieben. Der Verlauf der Gelfiltration wurde mittels Absorption bei 280 nm verfolgt, und es wurden Fraktionen von 5 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers (LKB-SuperFrac von Pharmacia) gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels 15 %iger SDS-PAGE auf ihre Bestandteile überprüft. Des Weiteren wurde ein Aktivitätstest zur Identifizierung der 5'-NT benutzt (Kapitel 2.2.3).

Die auf diesem Wege identifizierten Nucleotidase-Fraktionen wurden vereinigt und für den zweiten chromatographischen Reinigungsschritt auf einen Anionenaustauscher (170 ml Säulenvolumen, DEAE Sepharose Fast Flow von Pharmacia, Flußrate 2 ml/min), der an eine Hi-Load Anlage von Pharmacia angeschlossen war, appliziert. Der Anionenaustauscher wurde zuvor mit Puffer C gewaschen (ein Säulenvolumen) und mit Puffer B auf eine Kaliumchloridkonzentration von 50 mM eingestellt (1.5 Säulenvolumen). Die Elution der 5'-NT erfolgte in 2.5 ml Fraktionen mit einem linearen Salzgradienten. Dazu wurden Puffer B und Puffer D in

folgender Weise gemischt: Von 0 bis 30 ml wurde nur Puffer B auf die Säule gegeben, danach wurde die Konzentration von Puffer D linear erhöht, sie betrug bei 170 ml schließlich 100 % und wurde für weitere 30 ml aufrecht erhalten, somit wurden insgesamt 200 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mittels 15 %iger SDS-PAGE und Aktivitätstest auf ihren Gehalt an 5'-NT überprüft und vereinigt.

Hieran schloß sich eine weitere Sephacryl-S200 Gelfiltration an. Sie erfolgte auf dem gleichen Wege wie oben beschrieben. Die Identifizierung der 5'-NT geschah erneut mit Hilfe einer 15 %igen SDS-PAGE und dem Aktivitätstest. Die reinen 5'-NT Fraktionen wurden vereinigt und gegen den Aufbewahrungspuffer, der 0.05 mM ZnCl<sub>2</sub> enthielt dialysiert. Anschließend wurde das Protein in Centripreps (Ausschlußvolumen 30 kDa, Amicon) auf 20 mg/ml konzentriert und bei 4 °C gelagert. Die Ausbeute lag bei 20 bis 30 mg 5'-NT pro 1 l Zellanzucht.

#### *2.2.2.2 Vereinfachte Proteinisolierung*

Die chromatographischen Reinigungsschritte wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit vereinfacht. Dazu wurde der gegen Puffer B dialysierte Proteinrohextrakt auf ein Gesamtvolumen von 75 ml mit Puffer B verdünnt und auf eine zuvor auf Puffer B äquilibrierte DEAE-Säule gegeben (Auftragungsgeschwindigkeit 1.5 ml/min). Um reines DEAE-Säulenmaterial (200 ml Volumen) zu gewährleisten wurde das Material zuvor mit Puffer C regeneriert (1.5 Säulenvolumen). Danach wurden für ein Säulenvolumen die nichtbindenden Verunreinigungen mit Puffer B eluiert (Flußrate 3.0 ml/min), und die Elution der 5'-NT erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0 mM bis 500 mM KCl. Dazu wurde Puffer B innerhalb von 1.6 Säulenvolumen mit einer Flußrate von 3.0 ml/min mit Puffer D gemischt. Fraktionen mit einem Volumen von 2.5 ml wurden gesammelt und auf ihren Gehalt an 5'-NT mittels 15 %iger SDS-PAGE und dem Aktivitätstest überprüft.

Die vereinigten 5'-NT Fraktionen wurden im Centriprep (Ausschlußvolumen 30 kDa, Amicon) auf 2 ml konzentriert und zur Abtrennung von Schwebeteilchen und Oligomeren zentrifugiert (14000 UpM, 5 min, 1378 Rotor, Heraeus). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte Superdex 75 Gelfiltrationssäule (120 ml Volumen, prep grade, Pharmacia Biotech) appliziert. Bei einer Flußrate von 1 ml/min wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und die 5'-NT innerhalb eines Säulenvolumens eluiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an 5'-NT an Hand einer 15 %igen SDS-PAGE und des Aktivitätstestes analysiert. Die reinen 5'-NT Fraktionen wurden vereinigt und auf 20 mg/ml im Centricon (30 kDa

Ausschlußvolumen, Amicon) konzentriert und bei 4 °C gelagert. Als Ausbeute wurden zwischen 20 und 30 mg 5'-NT pro 1 l Zellanzucht erhalten.

### **2.2.3 Aktivitätstest**

Zur Überprüfung der Enzymaktivität der 5'-NT wurde in Puffer B eine Konzentration von 1 mM Mangandichlorid und 3 µM Bis-(p-Nitrophenyl)phosphat Natriumsalz (Sigma) eingestellt. Zu 995 µl der so erhaltenen Lösung wurden 5 µl Proteinlösung zugesetzt. Die Freisetzung von p-Nitrophenol durch die Hydrolyse des Enzyms wurde anhand der Absorption bei 405 nm verfolgt.

### **2.2.4 Konzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentration der 5'-NT wurde die Bradford-Methode (Bradford, 1976) verwendet. Hierbei wird die Absorption der Proteinlösung bei 600 nm nach Zugabe des Bradford Reagenz bestimmt. Anhand einer mit Rinder-Albumin erstellten Eichkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

## **2.3 Kristallographische Methoden**

### **2.3.1 Kristallisation**

Zur Kristallisation der 5'-NT wurde die jeweilige Proteinstammlösung zentrifugiert (14000 UpM, 5 min, 1378 Rotor, Heraeus) und filtriert (0,2 µm Durchmesser). Für die Kristallisationsexperimente wurde die Dampfdiffusionsmethode (Ducruix & Giegé, 1992) nach Art des „hängenden Tropfens“ verwendet. Die Experimente wurden in Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen (Nelipak bv, Niederlande) durchgeführt. 500 µl Kristallisationspuffer wurden in der Vertiefung (Reservoir) vorgelegt, 2 µl der zu kristallisierenden Probe und 2 µl Reservoirlösung auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert, das Deckglas umgedreht und auf den gefetteten Rand der Vertiefung gelegt, so daß ein geschlossenes System entstand. Nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden jeweils 3 µl der Proteinstamm- und der Reservoirlösung auf das Deckglas pipettiert, um den Kristallen ein größeres Ausbreitungsvolumen zur Verfügung zu stellen. Die Schalen wurden bei 18 °C aufbewahrt und nach dem Ansetzen täglich, später in größeren Abständen unter einem Binokularmikroskop (Olympus SZ60) kontrolliert.

Als Kristallisationsscreens wurden der Crystal screen, Crystal screen 2 und die Grid screens von Hampton Research benutzt. Diese enthalten Reagentien wie Fällungsmittel und

Puffer, die sich bisher sehr gut bei der Kristallisation von Proteinen bewährt haben. Des weiteren wurde eine zusätzliche Kristallisationsmatrix angesetzt, deren Reagentien in Tabelle 3 gelistet sind.

Tabelle 3: Reagentien der zusätzlichen Kristallisationsmatrix

<b>Puffersysteme</b> (1 M Stammlösungen)	<b>Fällungsmittel</b> (Stammlösungen in (w/w))	<b>Salze</b> (1 M Stammlösungen)
Natriumacetat/Essigsäure pH 3.5 - 6.0	Ammoniumsulfat gesätt.	Natriumchlorid
Natriumcitrat/Citronensäure pH 3.5 - 8.0	Lithiumsulfat gesätt.	Natriumcitrat
Imidazol/Natronlauge pH 5.5 - 9.0	MPD (100 %)	Lithiumsulfat
Tris/Salzsäure pH 6.5 - 9.5	PEG 400 (50 %)	Cäsiumchlorid
	PEG 3350 (30 %)	Magnesiumchlorid
	PEG 6000 (30 %)	Calciumchlorid
		Ammoniumacetat
		Zinkacetat

Die zusätzliche Kristallisationsmatrix wurde in folgende zwei Puffersysteme eingeteilt: Puffersystem I (Acetat- und Trispuffer, pH-Bereich 4 bis 9) und Puffersystem II (Citrat- und Imidazolpuffer, pH-Bereich ebenfalls 4 bis 9). Kristallisationsexperimente wurden für die beiden Puffersysteme in pH-Schritten von eins angesetzt (somit lagen die pH-Werte bei: 4, 5, 6, ... , 9; Pufferkonzentration 100 mM), wobei die Art des Salzes (jeweils 200 mM) und die des Fällungsmittels (jeweils 350 µl) variiert wurden.

Bei den Bedingungen, unter denen sich eine Kristallbildung andeutete, wie beispielsweise Bildung von Mikrokristallen oder Nadeln, wurde die Fällungsmittelkonzentration in 3 %igen Schritten und der pH-Wert des Puffers in Inkrementen von 0.2 verändert. Diese Methode wurde sowohl bei den von Hampton Research angegebenen Kristallisationslösungen als auch bei der zusätzlich angefertigten Kristallisationsmatrix ausgenutzt, um die Kristallqualität zu verbessern oder um überhaupt Kristalle zu erhalten, mit denen Röntgenbeugungsexperimente möglich waren.

### **2.3.2 Silikonisierung der Deckgläser**

In eine Glasschale mit 500 ml deionisiertem Wasser wurden 1000 Deckgläser gegeben. Zur Entfernung der Luftbläschen unter den Deckgläsern wurde mit einem Glasstab vorsichtig gerührt, bis nur noch wenige Bläschen an den Glasplättchen hingen. Anschließend wurden 5 ml Silikonisierungslösung (Prosil, Alfa) hinzugegeben und für 20 bis 30 Sekunden vorsichtig gerührt. Nun wurden die Deckgläser in einen Glastrichter gegeben und drei bis fünf mal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Um die Deckgläser zu trocknen, wurden sie bei 37 °C im Trockenschrank über Nacht aufbewahrt.

### **2.3.3 Messung von Röntgen-Diffraktionsdaten**

Sämtliche Diffraktionsdaten der Kristalle wurden mit der Rotationsmethode (Arndt & Wonacott, 1977) entweder in Quarzglaskapillaren (Firma W. Müller, Berlin) bei Raumtemperatur oder in Schlaufen (Hampton Research) unter Stickstoffstrom bei 100 K an Imageplate-Systemen (Firma MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Als Strahlungsquelle in Berlin diente ein Röntgenerators mit rotierender Kupferanode (ENRAF-Nonius FR571, Delft). Hochaufgelöste Synchrotron Datensätze wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg an den Meßstationen X11, X31 und BW7A und BW7B des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) gemessen. Die MAD-Daten wurden in Grenoble (Frankreich) an einem MAR Research Imageplate-System an der Meßstation BM14 des ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) aufgenommen.

#### *2.3.3.1 Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei Raumtemperatur*

Für die Datensammlung bei Raumtemperatur wurde ein Kristall mit so wenig Mutterlauge wie möglich in eine Quarzglaskapillare (Wandstärke 0.01 mm, Durchmesser je nach Kristallgröße 0.5 bis 1.0 mm, Firma W. Müller, Berlin) gesaugt und mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette von Mutterlauge befreit. Um zu verhindern, daß der Kristall austrocknet, wurde an einem Ende der Kapillare Mutterlauge oder Reservoiurlösung eingebracht, die Kapillare mit Hartwachs (Harvard, Glaswachs, Berlin) auf beiden Seiten versiegelt und auf einem Goniometerkopf mit Hartwachs oder Plastillin (Knete) befestigt.

### 2.3.3.2 Vorbereitung der Kristalle zum Messen bei 100 K

Für die Datensammlung bei tiefen Temperaturen (100 K) wurde ein Kristall mit Hilfe einer Schlaufe (Firma Hampton Research, Kalifornien, USA) entweder in eine spezielle Pufferlösung (Tieftemperaturpuffer, s.u.), oder in einen Tropfen Paratone-N (Olefin Copolymer, Exxon Chemical Co.) überführt. Nach Überführung in das Öl wurde der Kristall zur Entfernung der Mutterlauge, welche am überführten Kristall haften blieb, behutsam im Paratone-N Tropfen umhergezogen, um die Mutterlauge abzustreifen. Alternativ wurden dünne Papierstreifen vorsichtig nahe an den Kristall gebracht, um den Puffer abzusaugen. Anschließend wurde der Kristall ebenfalls mit Hilfe einer Schlaufe entweder im Stickstoffstrom oder für den Transport in flüssigem Propan gefroren (Rodgers, 1994). Der Vorteil des Einfrierens in flüssigem Propan liegt im schnelleren Gefrieren der Kristalle (Teng & Moffat, 1998) und somit in einer Verringerung der Mosaizität des Kristalls, d.h. der in Propan gefrorene Kristall besitzt meist eine höhere Ordnung des Kristallgitters als ein im Stickstoffstrom gefrorener Kristall. Die Ursache hierfür liegt in einer Isolationsschicht, die sich beim Einfrieren in Propan nicht ausbilden kann, wohl aber beim Frieren in flüssigem Stickstoff. In Tabelle 4 sind die Tieftemperaturpuffer der in dieser Arbeit untersuchten Kristalle aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Tieftemperaturpuffer für die untersuchten Kristallformen.

II	I	I_ATP	III <sup>a</sup>	IV <sup>b</sup>
100 mM MES pH 6.5, 15 mM ZnSO <sub>4</sub> , 2 mM Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> , 30 % (v/v) MPEG 550, 30 % (v/v) Glycerin	Paratone-N	Paratone-N	100 mM Nacitrat pH 6.0, 80 mM LiCl, 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5 mM Adenosin, 2 mM MnCl <sub>2</sub> , 16 % (w/v) MPEG 5000, 25 % (v/v) Ethylendiol	100 mM Nacitrat pH 6.0, 80 mM LiCl, 2 mM MnCl <sub>2</sub> , 17 % (w/v) MPEG 5000, 30 % (v/v) Ethylendiol

<sup>a</sup> Zu dem Kristall im Kristallisationstropfen (ca. 5 µl) wurden schrittweise 4 µl Tieftemperaturpuffer 20 min vor der Messung gegeben.

<sup>b</sup> Zu dem Kristall im Kristallisationstropfen (ca. 5 µl) wurden schrittweise 3 µl Tieftemperaturpuffer 10 min vor der Messung gegeben.

Anschließend wurden die Kristalle in eine Nylonschlaufe überführt und gefroren.

### 2.3.3.3 Datensammlung

Vor der Sammlung eines Datensatzes wurde ein Oszillationsbild aufgenommen und mit DENZO in Verbindung mit dem Graphikprogramm XDISPLAYF (Otwinowski, 1993) indiziert und prozessiert. Mit den Programmen PREDICT oder STRATEGY wurde unter Vorgabe der ange-

strebten Vollständigkeit der Datensammlung der optimale totale Rotationswinkel und Startwinkel bestimmt. 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). Nach der Messung wurden die einzelnen Aufnahmen mit DENZO ausgewertet (Integration der Reflexintensitäten). In SCALEPACK (Otwinowski, 1993) wurden die einzelnen integrierten Beugungsbilder aufeinander skaliert, die partiellen Reflexe aufsummiert und die Kristallparameter wie Gitterkonstanten und Mosaizität verfeinert. Dabei wurden die Gitterkonstanten und die Mosaizität einheitlich für den gesamten Datensatz berechnet und nicht unabhängig für jedes Bild. Aus den Intensitäten und ihren Standardabweichungen wurden dann mit dem Programm TRUNCATE (CCP4, 1994) Strukturfaktoramplituden mit ihren Standardfehlergrenzen berechnet.

Vor der Aufnahme des MAD-Datensatzes wurden Röntgen-Fluoreszenzspektren an der Wolframkante und der Zinkkante eines orthorhombischen Kristalls der 5'-Nucleotidase aufgenommen, aus denen die zur Datenaufnahme verwendeten Wellenlängen entnommen wurden.

#### 2.3.3.4 *Das Phasenproblem*

Um die unbekannt Struktur eines Proteins kristallographisch bestimmen zu können, benötigt man Kristalle vom dem zu untersuchenden Protein, an dessen Kristallgitter die Röntgenstrahlen gebeugt werden. Bei der Messung von Beugungsdaten wird der Proteinkristall Röntgenstrahlung ausgesetzt und für jeden Reflex die Intensität bestimmt. Ziel ist, eine Elektronendichteverteilung der Elementarzelle zu berechnen, in der sich die Struktur des untersuchten Proteins widerspiegelt.

Jeder Reflex wird durch den als Strukturfaktor bezeichneten Wellenvektor  $\mathbf{F}_{hkl} = F_{hkl} \cdot \exp(i\alpha_{hkl})$  vollständig charakterisiert, wobei  $F$  die Amplitude und  $\alpha$  den Phasenwinkel der gebeugten Röntgenwelle darstellt. Die Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle lässt sich durch eine Fourierreihe mit den Strukturfaktoren  $\mathbf{F}_{hkl}$  als Fourierkoeffizienten berechnen. Aufgrund des Zusammenhangs  $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$  können die Amplituden  $|F_{hkl}|$  direkt über das Beugungsexperiment bestimmt werden. Die Phasenwinkel  $\alpha_{hkl}$  entziehen sich jedoch einer direkten experimentellen Messung. Diese Schwierigkeit ist als „Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse“ bekannt. Zur Lösung dieses Problems sind fünf Methoden bekannt:

1. Die Methode des **multiplen isomorphen Ersatzes** (*multiple isomorphous replacement*, MIR) beruht auf der Anbindung von Schweratomen an die Proteinmoleküle im Kristall.
2. Die Methode der **multiplen anomalen Dispersion** (MAD). Der Erfolg dieser Methode hängt von der Gegenwart von ausreichend stark anomal streuenden Atomen in der Proteinstruktur ab.
3. Die Methode des **molekularen Ersatzes** basiert auf der Ähnlichkeit der unbekanntes Struktur zu einer bereits aufgeklärten Proteinstruktur.
4. Die **direkten Methoden**, welche für kleine Moleküle häufig zur Strukturlösung herangezogen werden. Ihre Anwendbarkeit auch für kleine Proteine ist in der Entwicklungsphase.
5. Die **Patterson-Methode**, auf der auch die MIR-Methode basiert, ermöglicht für kleine Moleküle mit einem stärker streuenden Atom die direkte Phasenbestimmung.

### 2.3.4 Strukturbestimmung der orthorhombischen Kristallform mit Wolframat

#### 2.3.4.1 Kristallisation

Die als Komplex mit Wolframat wachsende orthorhombische Kristallform II wurde unter folgenden Bedingungen mit der oben beschriebenen Dampfdruck-Diffusionsmethode erhalten: 100 mM MES pH 6.5, 15 mM ZnSO<sub>4</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> und 20 % (v/v) Polyethylenglycolmonomethylether (MPEG) mit einer mittleren Molekularmasse von  $M_r \sim 550$  in der Reservoirlösung. Als Protein-stammlösung wurde das sich im Aufbewahrungspuffer befindliche Enzym verwendet und 1:1 mit der Reservoirlösung gemischt. Die Kristalle bildeten sich innerhalb von 21 Tagen.

Um eine größere Anzahl an Kristallen und ein schnelleres Kristallwachstum zu erhalten wurde die Methode des *Microseeding* (Ducruix & Giegé, 1992) benutzt. Dazu wurde ein unter den oben beschriebenen Bedingungen gewachsener Proteinkristall (im Komplex mit Wolframat) in demselben Tropfen, in dem er gewachsen ist, mit Hilfe einer zugeschmolzenen Glaskapillare, die aus einer ausgezogenen Pasteurpipette erhalten wurde, in kleine Mikrokeime zerkleinert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:20, 1:100 bis 1:500 in Inkrementen von 100 angesetzt. Diese Verdünnungsreihe wurde erhalten, indem 2 µl des Tropfens, der die Mikrokeime enthielt, zu 18 µl Reservoirlösung (gleiche Zusammensetzung wie sie zur Kristallisation der orthorhombischen Kristalle im Komplex mit Wolframat verwendet wurde) gegeben wurden (Verdünnung 1:10). Nun wurde aus dieser neu gewonnenen Verdünnung

(1:10) ein Volumen von 2  $\mu\text{l}$  entnommen und erneut mit 18  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung verdünnt (Verdünnung nun 1:20). Nach diesem Muster wurden anschließend die noch fehlenden Verdünnungen hergestellt. Für die Kristallisation nach der Dampfdruck-Diffusionsmethode wurde zu den 2  $\mu\text{l}$  Proteinstammlösung 2  $\mu\text{l}$  aus der jeweiligen Verdünnungslösung (anstelle der Reservoirlösung) auf das Deckglas gegeben. Die nach dem Impfen erhaltenen Kristalle bildeten sich innerhalb von drei Tagen.

#### 2.3.4.2 Darstellung der Schweratomderivate

Um das Phasenproblem bei der Röntgenstrukturanalyse mit Hilfe des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) zu lösen, ist es notwendig, zum nativen Kristall isomorphe Schweratomderivate herzustellen, d. h., daß sich die Kristallparameter und die molekulare Struktur des Proteins im Vergleich zum nativen Datensatz nicht ändert. Die Suche nach Schweratomderivaten ist nach wie vor eine eher empirische Methode, bei der viele Schweratomverbindungen ausprobiert werden müssen, bevor ein geeignetes Derivat gefunden ist. Zur Darstellung der Derivate wurden die Kristalle mit den entsprechenden Schweratomlösungen bei 18 °C inkubiert. Die Kristalle wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen wie beschrieben bei Raumtemperatur vermessen und die Daten prozessiert. In Tabelle 5 sind die vermessenen vermeintlichen Derivate, die eingesetzte Konzentration an Schweratomverbindung, die Inkubationsdauer, die Vollständigkeit des gemessenen Datensatzes, die Qualität ( $R_{\text{sym}}$ -Wert) der symmetrieäquivalenten Reflexe und der R-Wert im Vergleich zum nativen Kristall ( $R_{\text{iso}}$ ) gezeigt.

#### 2.3.4.3 Bestimmung der Schweratomlagen

Die Bestimmung der Schweratomlagen geschah mit Hilfe der Pattersonfunktion. Die Pattersonfunktion  $P(uvw)$  ist eine Fourierreihe mit den Reflexintensitäten  $|F_{\text{hkl}}|^2$  als Fourier-Koeffizienten und  $u, v, w$  als Ortskoordinaten im Pattersonraum. Im Unterschied zur Elektronendichtekarte, in welcher die Atomlagen direkt ersichtlich sind, ist die Pattersonfunktion eine Karte aller interatomaren Vektoren. Der Wert eines Maximums in der Patterson-Karte ist dem Produkt der Elektronenzahlen eines vektoriell verknüpften Atompaares proportional. Symmetrieelemente erzeugen eine Ansammlung von Maxima entlang von Geraden (Harker-Geraden) oder Ebenen (Harker-Schnitten). Die Bestimmung der Atompositionen erfolgt über die symmetrieeerzeugten Selbstvektoren der Atome in den Harker-Schnitten. Die Atompositionen werden dann über die Kreuzvektoren zwischen den Atomen auf einen gemeinsamen Ursprung bezogen.

Tabelle 5: Suche nach Schweratomderivaten

Verbindung	Konzentration (mM)	Inkubation (h)	Vollständigkeit (%)	R <sub>sym</sub> (%) <sup>a</sup>	R <sub>iso</sub> (%) <sup>b</sup>
EMTS	5	24	95.6	7.1	7.7
Hg <sub>2</sub> Ac <sub>2</sub>	2	24	80.5	5.6	4.2
HgAc <sub>2</sub>	2	24	69.2	6.7	5.9
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	2	24	96.9	6.7	7.0
TAMM	1	24	90.6	7.0	7.2
KAu(CN) <sub>2</sub>	5	24	97.7	6.0	7.7
UO <sub>2</sub> Ac <sub>2</sub>	1	24	81.4	14.8	13.5
Na <sub>2</sub> PtI <sub>6</sub>	2	24	95.8	6.9	19.8
PIP	gesättigt	24	98.6	9.6	22.1
EuCl <sub>3</sub>	5	3	98.2	10.5	26.8
ErCl <sub>3</sub>	5	3	83.4	9.3	32.5
SmCl <sub>3</sub>	2	16	98.5	6.9	18.9

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$$

$$^b R_{\text{iso}} = \frac{\sum |F_{\text{ph}}^2 - F_{\text{p}}^2|}{\sum (F_{\text{ph}}^2 + F_{\text{p}}^2)}$$

Mit dem Programm SCALEIT (CCP4, 1994) wurden die Schweratomdatensätze auf einen nativen Datensatz skaliert. Die Schweratomlagen der einzelnen Derivate wurden mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994) aus isomorphen Differenz-Patterson-Dichten bestimmt. In der Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> existiert für jede Schweratomlage jeweils ein Peak in den Harker-Schnitten ½vw, u½w und uv½.

#### 2.3.4.4 Anomale Dispersion

Beim Streuprozess an freien Elektronen unterscheidet sich die Phase des gebeugten Strahls von der des einfallenden Strahls um genau 180°. Dieses Modell ist auf den Streuvorgang am Atom übertragbar, betrachtet man die Elektronen eines Atoms als freie Elektronen. Besonders für die Atome mit hoher Kernladung sind die inneren Elektronen stark am Kern gebunden. Für diese Elektronen der inneren Schale beträgt der Phasenunterschied zwischen einfallendem und gebeugtem Strahl nicht länger 180°. Sein Streuverhalten ist anomal und für den Streufaktor

ergibt sich:  $f_{\text{anom}} = f + \Delta f + if'' = f' + if''$ .  $\Delta f$  ist die Änderung der realen Komponente des Streufaktors und  $f''$  die Änderung der imaginären Komponente. Da die anomalen Komponenten nur eine geringe Abhängigkeit nach  $(\sin\theta)\lambda^{-1}$  zeigen, fällt die anomale Dispersion besonders bei hohen Streuwinkeln ins Gewicht.

Als Folge der anomalen Streuung wird der atomare Streuvektor im Argand-Diagramm gegen den Uhrzeigersinn gedreht (Abbildung 6). Dies wiederum setzt das Friedelsche Gesetz außer Kraft, und damit sind die Beträge der Strukturfaktoren  $F_{hkl}$  und  $F_{-h-k-l}$  nicht mehr gleich.

Für die Friedel-Paare gilt dann:

$$F_{PH(+)} = F_H'(+)+ i F_H''(+)+ F_P(+)$$

$$F_{PH(-)} = F_H'(-)+ i F_H''(-)+ F_P(-)$$

wobei  $F_P$  den Strukturfaktor des Proteins,  $F_{PH}$  den des Schweratomderivats und  $F_H$  den des Schweratoms darstellt.

Definiert man:

$$\Delta |F|_{\text{ano}} = \{ |F_{PH(+)}| - |F_{PH(-)}| \} f'/2f''$$

so kann in der mit  $(\Delta |F|_{\text{ano}})^2$  berechneten Patterson-Karte der anomale Streuer lokalisiert werden. Bei diesem kann es sich entweder um ein an das Protein angebundenes Schweratom handeln oder um das Metallatom eines Metalloproteins. Auch Selen, welches gentechnisch durch den Austausch von Methionin gegen Selenomethionin in das Protein eingebaut werden kann, stellt einen starken anomalen Streuer dar.

Ebenso können mit Hilfe der anomalen Dispersion Phaseninformationen gewonnen werden. Durch Messung mehrerer Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen, der multi-Wellenlängen anomalen Dispersion (MAD), kann eine Phasenbestimmung durchgeführt werden. Oft führt auch die Kombination der Phaseninformationen aus dem multiplen isomorphen Ersatz von Schweratomderivaten und der anomalen Dispersion der Schweratome zu verwertbaren Proteinphasen (MIRAS-Methode). Die Problematik liegt vor allem in der geringen Größe der durch die anomale Streuung hervorgerufenen Intensitätsänderungen. Dieser Nachteil wird allerdings zum Teil durch die vollkommene Isomorphie der mit der anomalen Dispersion aus demselben Kristall gewonnenen „Derivat“-Datensätze wieder aufgehoben.

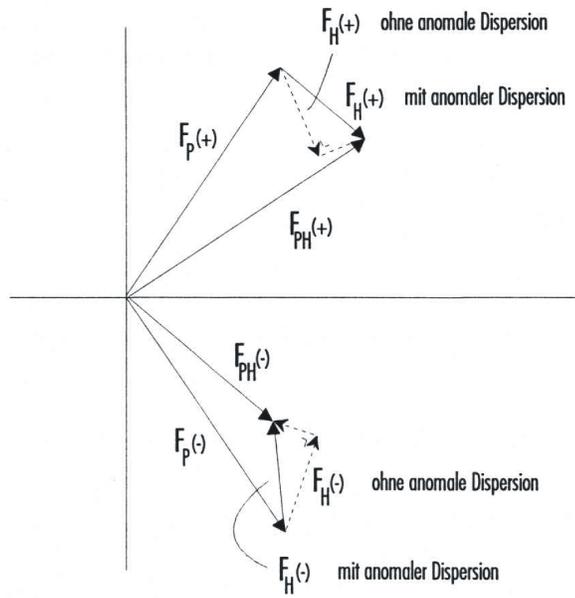


Abbildung 6: Argand-Diagramm. Die Ordinate stellt den imaginären Teil der Strukturfaktoren dar und die Abzisse den realen Teil.  $F_P^{(+)}$  und  $F_P^{(-)}$  sind in Bezug auf die horizontale Achse im Argand-Diagramm symmetrisch, solange kein anomaler Streuer im Protein gebunden ist. Ohne anomalen Streubeitrag sind auch  $F_H^{(+)}$  und  $F_H^{(-)}$  symmetrisch zueinander. Der imaginäre Teil des anomalen Streubeitrages ist überspitzt dargestellt. In diesem Beispiel ist  $|F_{PH}^{(+)}| > |F_{PH}^{(-)}|$ .

#### 2.3.4.5 Bestimmung der Lagen anomal streuender Schweratome

Vor der Bestimmung der Lagen der anomal streuenden Schweratome Wolfram, Zink, und Samarium wurden die aufgenommenen Beugungsdaten an der jeweiligen Wellenlänge mit DENZO und SCALEPACK reduziert, mit SCA2PREP (CCP4, 1994), ROTAPREP (CCP4, 1994) und AGROVATA (CCP4, 1994) skaliert und die Strukturfaktoren berechnet (mittels TRUNCATE). Anschließend wurden die MAD-Datensätze mit dem Programm SCALEIT (CCP4, 1994) aufeinander skaliert, wobei die Wellenlänge, an der  $f''$  von Zink sein Maximum besitzt, als Bezugswellenlänge gewählt wurde. Nun wurden die anomalen Patterson-Karten berechnet. Bei den MAD-Daten wurden zur Berechnung der anomalen Differenzen, diejenigen Wellenlängen verwendet, an denen  $f''$  von Wolfram und Zink ihre Maxima besitzen. Die Schweratomlagen wurden mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994) aus den anomalen Patterson-Dichten bestimmt.

Für die Berechnung der dispersiven Patterson-Karten, aus denen sich die Wolfram- und Zinklagen ermitteln lassen, wurden die MAD-Daten nach der Datenreduktion mit dem Programm SCALA (CCP4, 1994) auf den Datensatz, der bei maximalem  $f''$  von Zink aufgenommen wurde, skaliert und Strukturfaktoramplituden berechnet. Die Wolfram- und Zinkbindungsstellen wurden

durch Kreuzvektoren in einer dispersiven Differenz-Pattersonanalyse, auf einen gemeinsamen Ursprung bezogen, wobei die Differenzen zwischen den beiden Absorptionskanten verwendet wurden.

#### *2.3.4.6 Phasenbestimmung mittels MIRAS*

Für die Berechnung der MIRAS-Phasen wurden die Koordinaten, sowie die Besetzungs- und Temperaturfaktoren aller Schweratome verfeinert. Hierbei wurden das  $\text{SmCl}_3$ -Derivat und das PIP-Derivat zur Bestimmung von Proteinphasen mit Hilfe des Programms MLPHARE (CCP4, 1994) verwendet. Dabei wurde der PIP-Datensatz als nativer Datensatz benutzt (da er eine geringere Besetzung der Wolframatbindungsstellen aufwies, als ein Kristall der Kristallform II des nativen Proteins, der zuvor mit keiner Schweratomverbindung inkubiert wurde) und das native Protein (mit Wolframat) sowie das  $\text{SmCl}_3$ -Derivat als Schweratomdatensätze eingesetzt. Für das  $\text{SmCl}_3$ -Derivat wurden die anomalen Differenzen zur Phasenbestimmung mit einbezogen.

#### *2.3.4.7 Phasenbestimmung mittels MAD*

Mit dem Programm SHARP (De La Fortelle & Bricogne, 1997) wurden die Lagen und Temperaturfaktoren der Wolfram- und Zink-Schweratome verfeinert und die Phasen berechnet. Die Verfeinerung bis zur Konvergenz der Besetzungs- und B-Faktoren der Derivate erfolgte abwechselnd in Kombination mit den Schweratomkoordinaten.

#### *2.3.4.8 Kombination der MIRAS und MAD Phaseninformationen*

Da die Raumtemperaturdatensätze, aus denen die MIRAS-Phasen berechnet wurden, und die MAD-Datensätze der gefrorenen Kristallform einen hohen Grad an Nicht-Isomorphie der Kristalle aufwiesen, konnten deren Phaseninformationen nicht direkt kombiniert werden, sondern wurden über eine Mittelung der Elektronendichtekarten mit dem Programm DMMULTI (Cowtan, 1994) über verschiedene Kristalle kombiniert und verfeinert.

#### *2.3.4.9 Berechnung der Elektronendichte und Phasenverfeinerung*

Elektronendichten wurden mit dem Programm FFT (CCP4, 1994) aus den nativen Strukturfaktoramplituden und denen aus dem multiplen isomorphen Ersatz plus anomaler Dispersion (MIRAS) bzw. der multi-Wellenlängen anomalen Dispersion (MAD) erhaltenen Phasenwinkeln

berechnet. Die Programme DM (CCP4, 1994) und SOLOMON (CCP4, 1994) wurden eingesetzt, um mit der Dichtemodifikation (*solvent flattening*) in einem iterativen Prozeß die Phasen zu verbessern. Mit den so erhaltenen Elektronendichtekarten konnten Proteinbereiche und Lösungsmittelbereiche der orthorhombischen Kristallform II erkannt werden. Aus einer Berechnung des Lösungsmittelanteils folgte, daß die asymmetrische Einheit mindestens zwei Proteinmoleküle umfaßt. Weiterhin konnten in den Elektronendichtekarten Wolframationen, die zwischen zwei Proteinmolekülen gebunden sind, erkannt werden. Unter der Annahme, daß die Wolframate auf einer nicht-kristallographischen zwei-zähligen Drehachse liegen, wurde mit den Positionen der Zinkionen ein erster, angenäherter Operator für das nicht-kristallographische Symmetrieelement bestimmt. Dieser Operator wurde durch Elektronendichtekorrelation optimiert. Weiter wurde auch die nicht-kristallographische Symmetrie zur Phasenverfeinerung in den Programmen DM und RAVE (Kleywegt, 1999) eingesetzt. Nach der MAD- und MIRAS-Phasenkombination (mittels DMMULTI) wurden mit Hilfe einer Korrelation der MAD- und MIRAS-Elektronendichtekarten Symmetrieeoperatoren bestimmt und die Phasen durch *Solvent Flattening*, *Histogramm Matching* und Dichtemittelung über die Raumtemperatur- und Tieftemperaturkristalle verbessert.

#### 2.3.4.10 Modellbau

Zum Modellbau wurde das Programm O (Jones *et al.*, 1991) verwendet, welches gleichzeitig Elektronendichte, Protein-umhüllende Masken und Modellkoordinaten darstellen kann. Die Interpretation der Elektronendichte erfolgte in vier Schritten:

1. Berechnung einer Maske. Die 5'-NT der Kristallform II kristallisiert mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Um während der Interpretation der Elektronendichte in den Bereichen der Kristallkontakte nicht in das nächste, kristallographisch identische Molekül zu „rutschen“, erzeugt man eine Maske mit dem Programm MAMA (Kleywegt & Jones 1993) um das Enzym und schneidet die Elektronendichte, die außerhalb der Maske liegt, ab.
2. Erzeugung eines Grundgerüsts innerhalb der Elektronendichte. Mit den „bones“ Befehlen der O Software wurde der experimentellen Dichte ein sogenanntes „bones“-Modell (Atomskelett) angepaßt. Der Vorteil der Skelettstruktur liegt in der einfachen Editierung der Koordinaten und Atomverbindungen. Im ersten Schritt sucht die Software nach Dichtemaxima mit einer vorgegebenen Höhe ( $1.35 \sigma_{\text{rms}}$ ) und plaziert im Zentrum eines jeden Dichtemaximums ein Skelettatom. Sind die Abstände der einzelnen Skelettkoordinaten kürzer als 1.6 Å, werden diese automatisch verbunden.

3. Bau einer Polyalaninkette anhand des Skelettes. Das Ersetzen des Atomskelett-Modells durch ein Polyalaninmodell erfordert die Festlegung der Richtung der Kette. Dies kann mit Hilfe der „Tannenbaum“-Struktur von  $\alpha$ -Helices erfolgen. Die Struktur einer  $\alpha$ -Helix in Verbindung mit ihren Seitenketten erinnert, wenn man senkrecht auf die vertikal ausgerichtete Helixachse blickt, an einen Tannenbaum, wenn der C-Terminus dessen Spitze bildet, d. h. die Seitenketten weisen vorwiegend in Richtung des N-Terminus. Es wurde ein gut definierter helikaler Bereich in der Elektronendichte gesucht und so am Grafikdisplay orientiert, daß der „Tannenbaum“ und damit die Richtung der Polypeptidkette erkennbar wurde. Strukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge wurden in die Dichte eingepaßt und mit dem „*baton\_build*“ Befehl entlang des Skelettmodells verbunden. Die korrekte Stereochemie des Polyalaninmodells wurde mit dem „*refine*“ Befehl erzeugt.
4. Austausch der Polyalaninkette mit der Aminosäuresequenz der 5'-NT aus *Escherichia coli*. Die Polyalaninkette wurde am Grafikdisplay Aminosäure für Aminosäure gegen die reale Aminosäurekette der 5'-NT ausgetauscht („*mutate\_replace*“) und in die Elektronendichte eingepaßt.

#### 2.3.4.11 Verfeinerung der Struktur

Die kristallographische Verfeinerung des Startmodells erfolgte durch Molekulardynamik-Verfeinerung mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992), CNS der Version 0.4 (Brünger *et al.*, 1998) oder CNSolve v0.9 (Brünger, 1998). Dabei wurden die vom Autor angegebenen Protokolle verwendet. Das benutzte Kraftfeld war von Engh und Huber (1991). Zur Berechnung eines freien R-Wertes wurden ca. 2000 Reflexe als Testreflexe mittels einer Zufallsroutine mit dem Protokoll „*setup\_free\_r*“ in einer Datei, die die gemessenen Reflexe enthielt, markiert. Mit dem Protokoll „*generate*“ wurde auf der Grundlage des vorliegenden Modells eine Datei erzeugt, die die später benötigten Informationen über die Molekülstruktur enthielt. Im ersten Schritt der kristallographischen Prozessierung wurde das Modell mit einer Starre-Körper-Anpassung (Protokoll „*rigid*“) mit anschließender simulierter Aufheizung und Abkühlung des Enzyms (Molekulardynamik-Verfeinerung, Protokoll „*anneal*“) an die Daten angepaßt. Dabei wurde eine Starttemperatur von 3000 K gewählt.

In einem iterativen Verfahren wurden dann Koordinatenverfeinerung („*minimize*“) und konventionelle individuelle B-Faktorverfeinerung („*bindividual*“) mit Beschränkungen der Stereochemie (*constraints* und *restraints*) bis zur Konvergenz des freien R-Wertes durchgeführt. Der

optimale Gewichtungsfaktor des kristallographischen Terms in Relation zu den stereochemischen Termen wurde in Testverfeinerungsläufen bestimmt. Der freie R-Faktor diente als Gütekriterien für den Fortgang der Verfeinerung. Nach jedem Zyklus wurde mit den neuen Strukturfaktoren eine Elektronendichtekarte mit dem Protokoll „map“ berechnet und das resultierende Modell im Vergleich mit denen mit den älteren Strukturfaktoren berechneten Dichtekarten begutachtet und eventuelle Modifikationen vorgenommen (Programm O).

Für das Solvensmodell wurden in die Maxima der Differenzelektronendichte nahe der Oberfläche (max. 4 Å) des Proteinmodells Wassermoleküle eingefügt („water\_pick“) und anhand der Abstände zu benachbarten Donatoren und Akzeptoren manuell am Grafikdisplay auf ihre Richtigkeit überprüft.

## **2.3.5 Kristallisation und Strukturbestimmung der tetragonalen Kristallstruktur**

### *2.3.5.1 Kristallisation*

Tetragonale Kristalle (Kristallform I) der 5'-NT wurden nach der oben beschriebenen Dampfdruck-Diffusionsmethode unter folgenden Bedingungen kristallisiert: 100 mM Natriumacetat pH 6.6, 300 mM Cäsiumchlorid und 60 % gesättigte Lithiumsulfat-Lösung in der Reservoirlösung. Als Stammlösung wurde das sich im Aufbewahrungspuffer befindliche Protein benutzt. Die Kristalle bildeten sich innerhalb von drei bis sechs Monaten.

### *2.3.5.2 Molekularer Ersatz*

Die Phasenberechnung der hochaufgelösten Struktur der 5'-NT erfolgte mit Hilfe des molekularen Ersatzes mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994). Als Suchmodell dienten dabei die teilweise verfeinerten Atomkoordinaten der orthorhombischen Kristallform II, die aus den MAD und MIRAS Phaseninformationen erhalten wurden. Die Strukturfaktoren wurden in einer tetragonalen Zelle mit  $a = 84.6 \text{ \AA}$  und  $c = 184.6 \text{ \AA}$  berechnet. Der Auflösungsbereich für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug 10 bis 4 Å, der für die Suche der Translationsfunktion 20 bis 4 Å und für Starre-Körper-Verfeinerung wurde ebenfalls ein Auflösungsbereich von 20 bis 4 Å gewählt. Der Integrationsradius für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug 30 Å. Das verwendete Suchmodell wurde gemäß der erhaltenen Rotations- und Translationslösungen mit dem Programm PDBSET (CCP4, 1994) transformiert.

### 2.3.5.3 *Bau und Verfeinerung der hochaufgelösten Struktur*

Der Modellbau erfolgte mit dem Programm O und die Verfeinerung mit dem X-PLOR Paket der Version 3.845 (Brünger, 1992). Der genaue Gang der Verfeinerung verlief wie im Fall der orthorhombischen Kristallstruktur II. Am Ende erfolgte wie bei den anderen Strukturen das Einpassen von Wassermolekülen in die Differenzelektronendichte. Die Qualität der Elektronendichte reichte aus, um anfänglich modellierte Wassermoleküle im Verlauf der Verfeinerung als Sulfatmoleküle zu identifizieren.

## 2.3.6 **Darstellung und Strukturbestimmung eines Substratkomplexes der 5'-NT mit ATP**

### 2.3.6.1 *Darstellung des Substratkomplexes*

Ein Kristall der tetragonalen Kristallform wurde für 30 min mit einer wäßrigen ATP-Lösung versetzt. Dazu wurde ein Deckglas von der Kristallisationsschale vorsichtig abgehoben und zu dem Tropfen, der den Kristall enthielt, wurde ein zehntel des geschätzten Tropfenvolumens von einer 10 mM ATP-Lösung pipettiert, so daß die Endkonzentration 1 mM ATP im Tropfen betrug. Im Anschluß wurde der Kristall kristallographisch bei 100 K vermessen.

### 2.3.6.2 *Bau und Verfeinerung des Substratkomplexes*

Als Modell diente die hochaufgelöste, tetragonale Struktur der Kristallform I der 5'-NT. Sie wurde in O der neu gemessenen Substratstruktur angepaßt und mit CNSolve v0.9a (Brünger *et al.*, 1998) wie oben beschrieben verfeinert. Am Ende der Verfeinerung wurde ein ATP-Molekül in die Dichte eingepaßt und in die Verfeinerung einbezogen. Anschließend erfolgte das Einpassen von Wasser- und Sulfatmolekülen in die Differenzelektronendichte.

## 2.3.7 **Kokristallisation und Strukturbestimmung eines Produktkomplexes der 5'-NT mit Adenosin und Phosphat**

### 2.3.7.1 *Kokristallisation des Produktkomplexes*

Zur Kokristallisation des 5'-NT-Komplexes mit Adenosin und Phosphat (Kristallform III) wurden 3 µl Proteinstammlösung (20 mg/ml Protein in Puffer B) zu 3 µl Reservoirlösung, die 100 mM Natriumcitrat pH 6.0, 80 mM LiCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Adenosin, 2 mM MnCl<sub>2</sub> und 16 % (w/v) MPEG mit einem mittleren Molekulargewicht von  $M_r \sim 5000$  enthielt, auf einem Deckglas

zusammen gegeben. Anschließend wurde der Produktkomplex nach der Diffusions-Dampfdruckmethode kristallisiert.

#### 2.3.7.2 Molekularer Ersatz

Das Phasenproblem wurde mit Hilfe des molekularen Ersatzes gelöst. Als Modell dienten die Atomkoordinaten der hochaufgelösten tetragonalen 5'-NT-Struktur der Kristallform I. Die beiden Domänen (N-terminale Domäne: Reste 26-355; C-terminale Domäne: Reste 356-550) wurden separat für die Rotations- und Translationsuche mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) verwendet. Die Strukturfaktoren wurden in einer orthorhombischen Zelle mit  $a = 70.3 \text{ \AA}$ ,  $b = 76.0 \text{ \AA}$  und  $c = 222.2 \text{ \AA}$  berechnet. Der Auflösungsbereich für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug 10 bis  $4.5 \text{ \AA}$ , der für die Berechnung der Translationsfunktionen 20 bis  $4 \text{ \AA}$  und für die Starrkörper-Verfeinerung wurde ebenfalls ein Auflösungsbereich von 20 bis  $4 \text{ \AA}$  gewählt. Der Integrationsradius für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug  $25 \text{ \AA}$ . Die als Suchmodell verwendeten Domänen wurden gemäß der erhaltenen Rotations- und Translationslösungen mit dem Programm PDBSET (CCP4, 1994) transformiert. Diese so erhaltenen N- und C-terminalen Domänen wurden in das Modellbauprogramm O eingelesen, um zusammengehörende Domänen zu identifizieren und in eine gemeinsame Atomkoordinatendatei zu speichern.

#### 2.3.7.3 Bau und Verfeinerung des Produktkomplexes

Für die Strukturverfeinerung mit CNS Version 0.9a (Brünger *et al.*, 1998) wurde die aus AMORE erhaltene Produktkomplexstruktur per Starrkörper-Anpassung mit anschließender Moleküldynamik an die kristallographischen Daten angepaßt. Alle weiteren Verfeinerungen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt, wobei zuerst das Modell des Proteins optimiert und danach die Adenosin- und Phosphatmoleküle in die Restelektronendichte eingepaßt wurden. Anschließend erfolgte wie bei den anderen Strukturen das Einpassen von Wassermolekülen in die Differenzelektronendichte.

### 2.3.8 Kokristallisation und Strukturbestimmung eines Inhibitor-Komplexes mit $\alpha,\beta$ -Methylen-ADP

#### 2.3.8.1 Kokristallisation des Inhibitor-Komplexes

Zur Kokristallisation des triklinen Inhibitor-Komplexes (Kristallstruktur IV) wurden auf ein Deckglas  $3 \text{ \mu l}$  Proteinstammlösung ( $20 \text{ mg/ml}$  in Puffer B),  $1 \text{ \mu l}$  Inhibitorlösung (bestehend aus:  $100 \text{ mM}$

Natriumcitrat pH 6.0, 80 mM LiCl, 2mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP und 17 % (w/v) MPEG 5000) und 2  $\mu$ l Reservoirlösung (Bestandteile: 100 mM Natriumcitrat pH 6.0, 80 mM LiCl, 20 mM MnCl<sub>2</sub> und 13 % (w/w) MPEG 5000) pipettiert. Als Kristallisationsmethode wurde die Dampfdruck-Diffusion nach der Methode des „hängenden Tropfens“ verwendet.

#### 2.3.8.2 Molekularer Ersatz

Die Phasenberechnung des Inhibitor-Komplexes erfolgte mittels molekularem Ersatz. Als Suchmodell in AMORE (Navaza, 1994) wurden die Atomkoordinaten des Monomers A (IIIa) aus dem Produktkomplex mit Adenosin und Phosphat benutzt. Die Strukturparameter wurden in einer triklinen Zelle mit  $a = 89.1 \text{ \AA}$ ,  $b = 89.9 \text{ \AA}$ ,  $c = 96.5 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 110.4^\circ$ ,  $\beta = 106.4^\circ$  und  $\gamma = 107.6^\circ$  berechnet. Der Auflösungsbereich für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug 10 bis 4.5  $\text{\AA}$ , der für die Suche der Translationsfunktionen 20 bis 4  $\text{\AA}$  und für die Starre-Körper-Verfeinerung wurde ebenfalls ein Auflösungsbereich von 20 bis 4  $\text{\AA}$  gewählt. Der Integrationsradius für die Kreuz-Rotationsfunktion betrug 25  $\text{\AA}$ . Mit dem Programm PDBSET (CCP4, 1994) wurden die Atomkoordinaten des Suchmodells anhand der gefundenen Rotations- und Translationslösungen transformiert.

#### 2.3.8.3 Bau und Verfeinerung des Inhibitor-Komplexes

Für die Strukturverfeinerung mit CNS Version 0.9a (Brünger *et al.*, 1998) wurde die aus AMORE erhaltene Inhibitor-Komplexstruktur per Starrer-Körper-Anpassung mit anschließender Moleküldynamik an die kristallographischen Daten angepaßt. Alle weiteren Verfeinerungen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt, wobei zuerst das Modell des Proteins optimiert wurden und danach die Inhibitor-Moleküle in die Restelektronendichte eingepaßt wurden. Anschließend erfolgte wie bei den anderen Strukturen das Einpassen von Wassermolekülen in die Differenzelektronendichte.

#### 2.3.9 Koordinatenanalyse und Koordinatenhinterlegung in der Protein-Datenbank

Die Atomkoordinaten wurden mit den Programmen CNS (Brünger *et al.*, 1998), O (Jones *et al.*, 1991), PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Vriend, 1990) analysiert. Als Kriterien zur Evaluierung der Qualität der Proteinstruktur dienten die verschiedenen Indikatoren nach Kleywegt (2000).

Für die Strukturhinterlegung der nativen (1ush und 2ush), der ATP-gebundenen (3ush), der Produkt gebundenen (4ush) und Inhibitor-gebundenen Form (5ush) der 5'-Nucleotidase aus *Escherichia coli* wurde das Hilfsprogramm ADIT der PDB (Bernstein *et al.*, 1977) und das Skript „*xal\_pdbsubmission*“ aus CNS verwendet.

### **2.3.10 Analyse der Domänenrotation mit dem Programm DYNDOM**

Zur Bestimmung der Domänenrotationen der einzelnen Konformere untereinander wurde das Programm DYNDOM (Hayward *et al.*, 1998) benutzt. Dieses Programm berechnet relativ zueinander bewegliche Domänen und deren Interdomänenschraubenachse. Dabei wurden die Domänen als nahezu starre Körper betrachtet. Außerdem wurden Interdomänenbereiche bestimmt, deren Konformation sich im Gegensatz zu den starren Domänen bei der Domänenrotation stark verändert. Als Eingabe wurden jeweils zwei unterschiedliche Konformere der 5'-NT benutzt. Damit die resultierenden Rotationsachsen auf eine gemeinsame Orientierung bezogen waren, mußten die Konformere in ihrer räumlichen Orientierung übereinstimmen, wobei nur die allen Strukturen gemeinsamen Aminosäurereste benutzt wurden. Dazu wurden die Atomkoordinaten der verwendeten Konformere zuvor mit dem Program LSQKAB (CCP4, 1994) nach der Methode der Kleinsten-Quadrate überlagert. Folgende, allen Konformeren gemeinsamen Reste, wurden dabei verwendet: 26-177, 183-321, 332-469 und 479-549. Für die Identifizierung der Domänen wurde der Parameter „*clusters*“ auf 20 gesetzt. Dieser Parameter bestimmt die maximale Anzahl der zu identifizierenden Domänen. Der Parameter „*iterations*“ wurde auf den Wert 100 gesetzt. Damit wird DYNDOM eine 100malige Wiederholung des Clusteralgorithmus zur Identifizierung der Domänen erlaubt. Der „*window*“-Parameter des Programms wurde auf den Wert 5 gesetzt. Dieser Parameter steht für die Anzahl der Aminosäurereste, die in einem entlang der Proteinkette bewegten Fenster die Berechnung der Rotationsvektoren für den Clusteralgorithmus benutzt werden. Der Parameter „*domain*“ wurde auf den Wert 50 gesetzt. Er bestimmt die minimale Anzahl an Aminosäureresten, aus der eine identifizierte Domäne bestehen darf. Für das minimale Verhältnis der Abstandsänderungen von Interdomänen- zu Intradomänenpositionen innerhalb eines Domänenpaars wurde der „*ratio*“-Parameter auf den Wert 1.0 gesetzt.