

3 Proteinreinigung und Kristallisation

3.1.1 Proteinreinigung

Nach der in der Literatur beschriebenen (Ruiz *et al.*, 1999) und der vereinfachten modifizierten Reinigung gelang es nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und dreifacher bzw. zweifacher Säulenchromatographie reine 5'-NT aus *E. coli* zu isolieren. Sie wurde in einem Aufbewahrungspuffer mit Zn^{2+} gelagert, um Zinkionen an das aktive Zentrum zu binden. Dagegen wurde die später nach der vereinfachten Methode isolierte 5'-NT in Puffer B gelagert, der keine Übergangsmetallionen enthielt, um bei Kristallisationsexperimenten verschiedene Metallionen einsetzen zu können. Dieses so gelagerte Protein liegt als Apoenzym vor und enthält keine Metallionen im aktiven Zentrum. Zu den Kristallisationsversuchen mit 5'-NT-Stammlösung in Puffer B wurden dann Metallionen (meist zweiwertiges Mangan) im mM-Konzentrationsbereich zugefügt.

3.1.1.1 Charakterisierung der Proteinfractionen

Zur Züchtung von Kristallen ist es notwendig, hochreine Proteinlösungen zu präparieren. Um die Proteinfractionen zu charakterisieren wurden folgende Methoden angewandt: Aktivitätstest, Gelelektrophorese und zur Bestimmung der Molekularmasse MALDI-Massenspektrometrie. Bei der Untersuchung der isolierten Proteinfractionen zeigten die 5'-NT-Fractionen besonders hohe Phosphataseaktivität. Eine weitere Bestätigung ergab die Analyse mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie, die freundlicher Weise von Herrn Dr. P. Franke im Biochemischen Institut der FU-Berlin (im Otto-Hahn Bau, Thielallee) durchgeführt wurde. Diese Analyse ergab für die 5'-NT eine Molekularmasse von 58.1 kDa. Zum Vergleich, die aus der Sequenz berechnete Molekularmasse beträgt 58.2 kDa. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte die 5'-NT eindeutig identifiziert und für den weiteren Einsatz in Kristallisationsexperimenten bereitgestellt werden.

3.1.2 Kristallisation

Im Verlauf der hier vorgelegten Arbeit konnten insgesamt fünf unterschiedliche Kristallformen der 5'-NT erhalten werden. Dazu wurde die auf 20 mg/ml konzentrierte 5'-NT nach der Dampfdiffusionsmethode (Ducruix & Giegé, 1992) nach Art des „hängenden Tropfens“ benutzt. Tabelle 6 listet die Reservoirzusammensetzung, unter denen die Kristalle wuchsen.

Tabelle 6: Kristallisationsbedingungen und kristallographische Daten der fünf erhaltenen Kristallformen.

| | HEX | I | II | III | IV |
|---------------------------------------|--|--|---|---|--|
| Bedingungen | 25 % (w/v) PEG 20000, 0.1 M MES pH 6.5 | 60 % gesätt. Li ₂ SO ₄ , 0.1 M Nacitrat pH 6.6, 0.3 M CsCl | 20 % (v/v) MPEG 550, 0.1 M MES pH 6.5, 15 mM ZnSO ₄ , 4 mM Na ₂ WO ₄ | 16 % (w/v) MPEG 5000, 0.1 M Nacitrat pH 6.0, 0.08 M LiCl, 2 mM MnCl ₂ , 5mM Adenosin, 5 mM KH ₂ PO ₄ | 17 % (w/v) MPEG 5000, 0.1 M Nacitrat pH 6.0, 0.08 M LiCl, 2 mM MnCl ₂ , 1 mM α,β -Methylen-ATP |
| Einheitszellen-Dimensionen (Å) | 87.7, 87.7, 565.1 | 83.6, 83.6, 181.6 | 93.2, 116.3, 132.8 | 69.9, 75.7, 221.7 | 89.6, 90.1, 96.4; 110.7°, 106.4°, 107.7° |
| d_{min} (Å) | 2.50 | 1.70 | 2.20 | 2.10 | 1.85 |
| Raumgruppe | hexagonal | P4 ₁ 2 ₁ 2 | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | P1 |

Abbildung 7 zeigt mikroskopische Aufnahmen der fünf untersuchten Kristallformen. Die Kristalle der hexagonalen Kristallform wuchsen innerhalb von drei Wochen und zeigten bei der Beugung im Röntgenstrahl ein gutes Streuvermögen bis zu einer maximalen Auflösung von 2.5 Å. Allerdings war es aufgrund der sehr langen Zellachse in c-Richtung (über 500 Å) nicht möglich einen Datensatz zu sammeln, da die Reflexe entlang dieser Achse nicht trennbar waren. Dieses Problem ließ sich mit der orthorhombischen Kristallform II beheben. Die Kristalle wuchsen innerhalb von drei Tagen und konnten anschließend mit der „*Micro-Seeding*“-Methode sehr gut kristallisiert werden. Die tetragonalen Kristalle I wuchsen innerhalb von drei bis zu sechs Monaten. Um diese relativ lange Wachstumsphase zu verkürzen, wurden einige Kristallisationsansätze angefertigt, bei denen der Raum zum Reservoir nicht vollständig mit dem Deckglas, an welchem der Proteintropfen hing, verschlossen wurde. Die so erhaltenen Kristalle wuchsen zwar innerhalb von drei Wochen, streuten allerdings die Röntgenstrahlen anstelle von 2.1 Å nur noch maximal bis 2.8 Å. Eine weitere orthorhombische Kristallform (III) wuchs innerhalb von drei Tagen unter den in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen. Sie wurden durch Kokristallisation mit Adenosin und Phosphat erhalten. Die Kristalle wuchsen aber auch ohne Zugabe von Adenosin und Phosphat. Auch ist die Kristallisation in Kristallform III ohne Zugabe von Mangan(II)chlorid zur Apoenzymlösung gelungen. Die Kokristallisation der 5'-NT mit dem Inhibitor α,β -Methylen-ATP resultierte in einer neuen triklinen Kristallform IV. Die triklinen Kristalle wuchsen ebenfalls innerhalb von drei Tagen und zeigten ein gutes Streuvermögen (bis 2.5 Å bei Raumtemperatur und Röntgen Cu-K α -Strahlung).

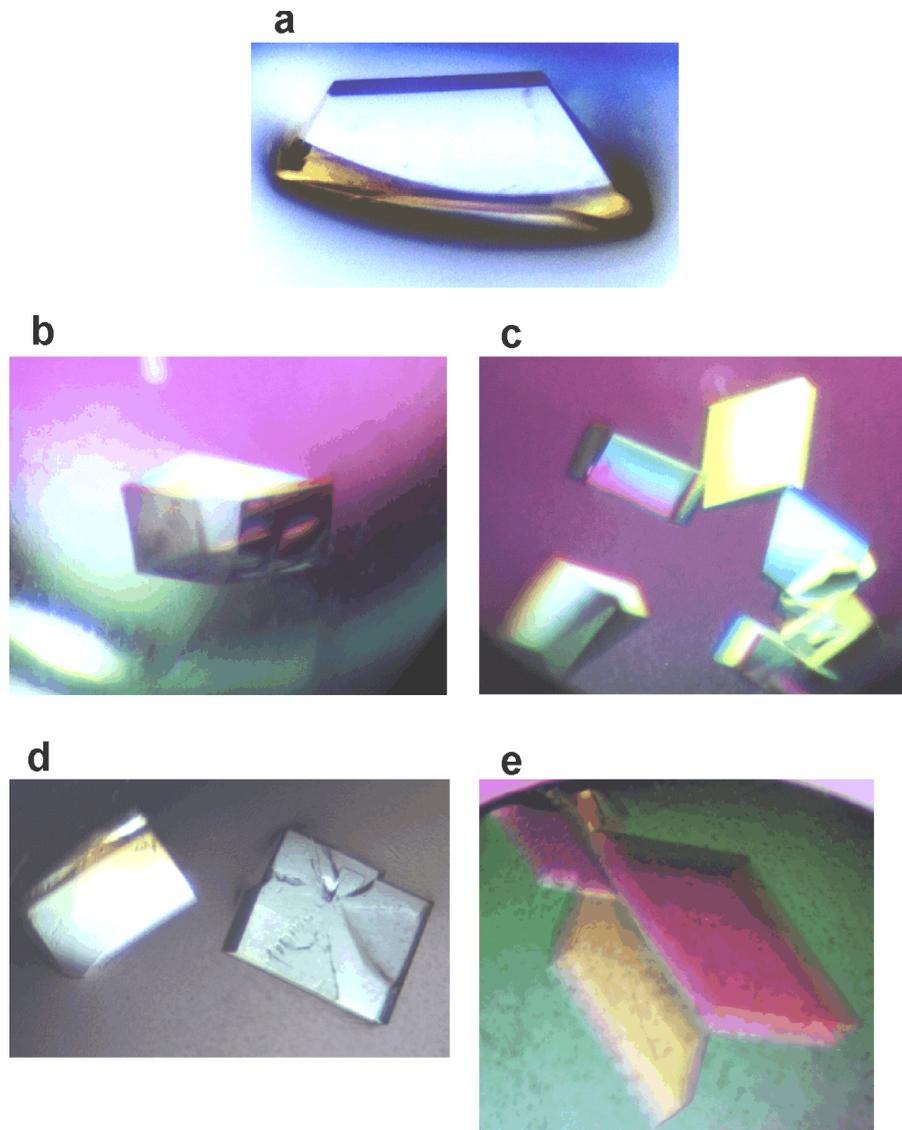


Abbildung 7: Aufnahmen der fünf erhaltenen Kristallformen. **a**, die hexagonale Kristallform; **b**, die tetragonale Form I; **c**, die orthorhombische Form II; **d**, die orthorhombische Form III und **e**, die trikline Form IV.