

# **Thermostabilität und funktionelle Vielfalt ubiquitärer Proteinfaltungsdomänen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
“Doktor der Naturwissenschaften“  
- Dr. rer. nat. -  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Diplomkristallograph  
Heinrich Delbrück

Berlin 2002

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1995 bis September 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch angefertigt

1 Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann  
2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Eingereicht am: 18.04.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2002

Für Heide,  
Amalie und Dorothea



# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	-I-
II. Abkürzungsverzeichnis	-III-
1. Einleitung	-1-
1.1. Das Kälteschockprotein	-2-
1.2. Das Repressorprotein KorB aus RP4 infizierten <i>Escherichia coli</i>	-6-
2. Grundlagen	-8-
2.1. Proteinaufbau	-8-
2.2. Proteininstabilität	-8-
2.3. Proteinreinigung	-10-
2.4. Protein-DNA-Essay	-10-
2.5. Limitierte Proteolyse	-10-
2.6. Kristallisation	-11-
2.7. Röntgenbeugungsexperiment	-14-
2.8. Lösung des kristallographischen Phasenproblems	-17-
2.9. Verfeinerung des Modells	-24-
3. Materialien	-27-
4. Strukturanalyse ortsgerichtet mutierter Kälteschockproteine	-29-
4.1. Ergebnisse	-29-
4.2. Diskussion	-38-
5. Kristallographische Untersuchungen an KorB	-52-
5.1. Kristallisation von KorB	-52-
5.2. Das N-terminale Fragment KorB-N	-54-
5.3. Die C-terminale Domäne KorB-C	-63-
5.4. Diskussion	-82-
6. Zusammenfassung	-89-
6.1. Kristallstrukturanalyse ortsspezifisch mutierter Kälteschockproteine	-89-
6.2. Kristallographische Untersuchungen an KorB	-90-

7. Summary	-91-
7.1. Crystal structure analysis of site directed mutated Cold Shock Proteins	-91-
7.2. Crystallographic investigations on KorB	-92-
8. Literatur	-93-
8.1. Veröffentlichungen	-104-
Danksagung	-105-
Curriculum vitae	-106-
Eidesstattliche Erklärung	-107-

## II. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström, 1 Å = 10 <sup>-10</sup> m
Abb.	Abbildung
ADP	Atomarer Auslenkungsfaktor
bp	Basenpaar
<i>B. caldolyticus</i>	<i>Bacillus caldolyticus</i>
B-Faktor	Temperaturfaktor
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Bc-Csp	Kälteschockprotein aus <i>Bacillus caldolyticus</i>
Bs-CspB	Kälteschockprotein aus <i>Bacillus subtilis</i>
CD	Circular Dichroismus
Csp	Kälteschockprotein
CV	Säulenvolumen
ΔG <sub>D</sub>	Freie Energie der Entfaltung
DNA	2'Deoxy-D-Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
Glg.	Gleichung
FPLC	fast performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kD	kiloDalton, 1 kD = 1.66018 • 10 <sup>-21</sup> g
M	Molarität, [mol l <sup>-1</sup> ]
MIR	multiple isomorphous replacement
MIRAS	multiple isomorphous replacement including anomalous scattering
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	Molekularer Ersatz
Mops	3-Morpholinopropanesulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NCS	Nichtkristallographische Symmetrie
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
rmsd	root mean square deviation
RNA	D-Ribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

SDS	sodium dodecyl sulfate
SIRAS	single isomorphous replacement including anomalous scattering
Tab.	Tabelle
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
$V_M$	Matthews-Koeffizient

### **Symbole für Aminosäuren**

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

### **Symbole für Nukleinsäuren**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin