

**Strukturuntersuchungen an Proteinen der
bakteriellen Stressantwort:
NblA von Anabaena sp. PCC 7120
und
Csp:ssDNA-Komplexe von
Bacillus caldolyticus und Bacillus subtilis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Ing. (FH) Ralf Bienert

geboren am 26.05.1969 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

in Vertretung Prof. Dr. H. J. Prömel

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. T. Buckhout, PhD.

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Heinemann
2. Prof. Dr. R. Borriss
3. Prof. Dr. W. Lockau

eingereicht: 22.12.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2006

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 DIE BAKTERIELLE STRESSANTWORT	9
1.2 GRUNDLAGEN DER RÖNTGENKRISTALLOGRAPHIE	11
1.2.1 <i>Beugung von Röntgenstrahlen und die Braggsche Reflexionsbedingung...</i>	11
1.2.2 <i>Strukturfaktoren</i>	12
1.2.3 <i>Das Phasenproblem</i>	13
1.2.4 <i>TLS-Verfeinerung</i>	15
2 DIE KRISTALLSTRUKTUR VON NBLA AUS ANABAENA SP. PCC 7120 ...	17
2.1 EINLEITUNG	17
2.1.1 <i>Cyanobakterien</i>	17
2.1.2 <i>Allgemeine Stressantwort der Cyanobakterien auf nährstofflimitierende Bedingungen - mit Fokus auf Nbla.....</i>	20
2.1.3 <i>Nbla aus Anabaena sp. PCC 7120.....</i>	23
2.2 AUFGABENSTELLUNG UND VORAUSSETZUNGEN	26
2.3 EXPERIMENTELLES	27
2.3.1 <i>Molekularbiologische und biochemische Methoden</i>	27
2.3.2 <i>Kristallographische Methoden</i>	38
2.4 ERGEBNISSE	44
2.4.1 <i>nbla-Überexpression, Proteinaufreinigung und biophysikalische Charakterisierung</i>	44
2.4.2 <i>Kristallisation und Nachweis der Präsenz des Volllängenproteins im Kristall</i>	50
2.4.3 <i>Röntgenbeugungsexperimente und ihre Auswertung</i>	52
2.4.4 <i>Phasierung, Strukturbaue und -verfeinerung</i>	54
2.4.5 <i>Qualität der Struktur</i>	60
2.4.6 <i>Die Struktur von Nbla</i>	63
2.4.7 <i>Kristallpackung und nicht-kristallographische Symmetrie</i>	70
2.4.8 <i>Vergleich der 12 Nbla-Proteine in der asymmetrischen Einheit</i>	74
2.5 DISKUSSION	78
2.5.1 <i>Strukturüberlegungen</i>	78
2.5.2 <i>Bindungsstudien mit Nbla und Phycobiliproteinen</i>	83
2.5.3 <i>Modelle der Nbla-Phycobilisomen-Bindung</i>	86
2.6 FAZIT	94
3 KÄLTESCHOCKPROTEINE AUS BACILLUS CALDOLYTICUS UND BACILLUS SUBTILIS IN KOMPLEX MIT EINZELSTRÄNGIGER DNA.....	95
3.1 EINLEITUNG	95
3.2 AUFGABENSTELLUNG UND VORAUSSETZUNG (CSP).....	99
3.3 EXPERIMENTELLES	100
3.3.1 <i>Material</i>	100
3.3.2 <i>Methoden</i>	101
3.4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	104

3.4.1	<i>Bc-Csp:(dT)₆-Komplex</i>	104
3.4.2	<i>Bs-CspB:(dT)₆-Komplex</i>	109
3.4.3	<i>Bs-CspB:(dT)₇</i>	114
3.5	FAZIT.....	115
4	ZUSAMMENFASSUNG	116
4.1	DEUTSCH.....	116
4.1.1	<i>Die Kristallstruktur von NblA aus Anabaena sp. PCC 7120</i>	116
4.1.2	<i>Kälteschockproteine aus Bacillus caldolyticus und Bacillus subtilis in Komplex mit einzelsträngiger DNA</i>	118
4.2	ENGLISH	119
4.2.1	<i>Crystal structure of NblA from Anabaena sp. PCC 7120</i>	119
4.2.2	<i>Cold-shock proteins from Bacillus caldolyticus und Bacillus subtilis in complex with single stranded DNA</i>	120
5	VERÖFFENTLICHUNGEN	121
	LITERATURVERZEICHNIS	122
	DANKSAGUNG	135
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	136
	ANHANG	137

Abkürzungsverzeichnis

Ala, A	Alanin
AP	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
ASU / AU	asymmetrische Einheit (asymmetric unit)
<i>Bc</i> -Csp	Hauptkälteschockprotein aus <i>Bacillus caldolyticus</i>
<i>Bs</i> -CspB	Hauptkälteschockprotein B aus <i>Bacillus subtilis</i>
CD	Circulardichroismus
cP	centipoise (1 cP = 1 mPa·s = 10 ⁻³ Ns/m ²)
CP43 / CP47	integrale Chlorophyll <i>a</i> bindende Proteine
CpcE	Phycocyanin- α -Untereinheit Phycocyanobilinlyase
CSD	Cold-shock domain
Csp	Kälteschock-Protein (Cold-shock protein)
Cys, C	Cystein
D1 / D2	Proteine des Reaktionszentrums
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(dT) ₆	Desoxyhexathymidin
(dT) ₇	Desoxyheptathymidin
DTB	Desktop Beamline
DTT	Dithiotreitol
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisierung Massenspektrometrie
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
nbl	nicht-bleichend (non-bleaching)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phycobilisomen
PC	Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
PEC	Phycoerythrocyanin
PEG	Polyethylenglycol
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SeMet	Selenomethionin
Ser, S	Serin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TLS	Translation, Libration, Schraubenachse; Methode zur anisotropen Verfeinerung pseudostarrer Gruppen
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin
V_M	Matthew Koeffizient ($\text{\AA}^3 \text{ Da}^{-1}$)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Die bakterielle Stressantwort

Bakterien sind in ihrer Lebensumgebung einer Vielzahl variabler Faktoren - Temperaturänderungen, Verfügbarkeit von Nährstoffen und Wasser, Änderungen der Osmolarität und des pH-Wertes, Strahlung sowie der Präsenz von toxischen Stoffen (Ramos *et al.*, 2001) - ausgesetzt. Für photosynthetisierende Mikroorganismen, wie zum Beispiel Cyanobakterien, sind zudem noch die Lichtintensität sowie die Wellenlänge des Lichtes bedeutsam. Um den Herausforderungen der sich ständig verändernden Umgebung entgegenzutreten und so unter Stressbedingungen zu überleben, haben Bakterien Anpassungsprozesse entwickelt (Abee und Wouters, 1999). Diese basieren in der Mehrzahl der Fälle auf der Aktivierung der Transkription von Genen, deren Produkte den neuen Umwelteinflüssen gerecht werden und auf diese Weise die Bakterien an die veränderten Bedingungen anpassen. Zum Beispiel erfolgt als Antwort auf Dehydrierung - diese führt zu DNA-Schäden, hat einen denaturierenden Effekt auf Proteine und verursacht einen Anstieg der Schmelztemperatur der Zellmembran – die Synthese und intrazelluläre Akkumulation von Disacchariden (Saccharose, Trehalose), die Proteine und andere Makromoleküle schützen und sie in ihrer nativen Konformation stabilisieren. Weiterhin wird durch Wechselwirkungen zwischen Saccharose und der Membran letztere im flüssig-kristallinen Zustand gehalten (Welsh und Herbert, 1999).

Eine Änderung der Temperatur hat ebenso wie die Dehydrierung Einfluss auf die Membranfluidität, beeinflusst jedoch auch die Proteinflexibilität und die Konformation von Nucleinsäuren mit wichtigen regulatorischen Konsequenzen. So antworten die meisten Organismen auf einen drastischen Anstieg der Temperatur mit einer transienten Synthese einer Reihe von Hitzeschockproteinen (HSP). HSP fungieren als molekulare Chaperone, d.h. sie interagieren mit anderen Proteinen, damit diese nicht untereinander unerwünschte Wechselwirkungen eingehen, oder sie erkennen und binden Proteine, die nicht ihre native Konformation haben, sei es wegen proteindenaturierendem Stress oder weil sie nicht vollständig synthetisiert, gefaltet oder zusammengesetzt sind. Die Bindung und/oder Freisetzung dieser Proteine wird häufig durch die Assoziation und/oder Hydrolyse von Nucleotiden reguliert (Feder und Hofmann, 1999). Die bakterielle Reaktion auf eine

Verringerung der Temperatur wird im Abschnitt "Kälteschockantwort und Kälteschockproteine" detailliert beschrieben.

Bei der Reaktion von Bakterien auf Nährstoffmangel unterscheidet man zwischen einer spezifischen und einer allgemeinen Antwort. Die spezifische Antwort wird durch den Mangel eines bestimmten Nährstoffes ausgelöst und bewirkt eine Erhöhung der Synthese spezifischer Transportsysteme und Enzyme, die zunächst unzugängliche Formen von Nährstoffen in solche umwandeln, die von der Zelle aufgenommen und metabolisiert werden können. Als Beispiele wären das Sulfattransportsystem während sulfatlimitierten Wachstums und die periplasmatische alkalische Phosphatase während phosphatlimitierten Wachstums zu erwähnen (Bhaya *et al.*, 2000). Die allgemeine Stressantwort auf nährstofflimitierende Bedingungen beinhaltet Änderungen der zellulären Morphologie und Physiologie. So sind beispielsweise Veränderungen in der Ultrastruktur von Cyanobakterien unter ungünstigen Nährstoffbedingungen zu beobachten (Grossman *et al.*, 1993). Dieses Thema wird ausführlich im Abschnitt über Cyanobakterien erläutert.

Über die molekularen Wechselwirkungen, die zu diesen Adaptionsreaktionen führen, ist bisher wenig bekannt. Strukturanalysen beteiligter Komponenten können daher zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen.

1.2 Grundlagen der Röntgenkristallographie

Dieses Kapitel soll einen groben Überblick über die Röntgenkristallographie von Makromolekülen mit Fokus auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden geben.

1.2.1 Beugung von Röntgenstrahlen und die Braggsche Reflexionsbedingung

Werden innerhalb eines Kristalls die Elektronen der regelmäßig angeordneten Atome durch Röntgenstrahlen zu periodischen Schwingungen angeregt, so entstehen eine Vielzahl von Strahlungsquellen mit einer mit der einfallenden Strahlung identischen Wellenlänge. Von jedem schwingenden Elektron breiten sich kugelförmig Wellenfronten aus, die sich überlagern und Anlass zum Auftreten von Interferenzerscheinungen geben. Damit es zu einem Verstärkungseffekt der gebeugten Wellen am Kristallgitter kommt, müssen bestimmte geometrische Bedingungen erfüllt sein, wie sie von W.H. und W.L. Bragg dargelegt wurden. Dabei werden Kristalle als aus gleichwertigen parallelen Ebenen in einem konstanten Abstand d (Netzebenenabstand) Ebenen aufgebaut beschrieben. Trifft ein Röntgenstrahl auf eine solche Netzebene, so kann die Beugung als Reflexion aufgefasst werden. Diese an verschiedenen Netzebenen reflektierten Strahlen schwingen nur dann in Phase, wenn der Weglängenunterschied Δ zwischen eintretenden und reflektierten Röntgenstrahlen mit dem Reflexionswinkel θ ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge, $n\lambda$, beträgt (Abbildung 1.1): $2d \sin\theta = n\lambda$.

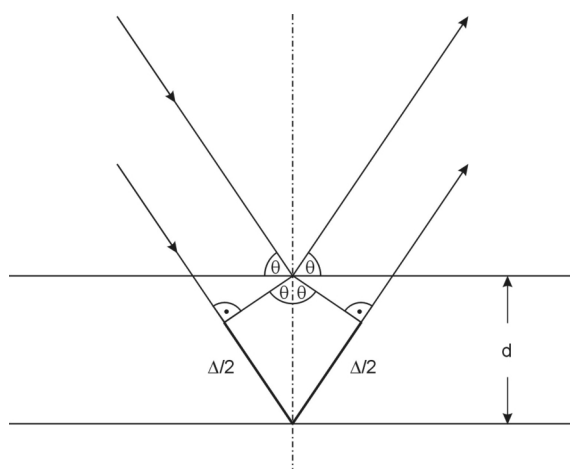


Abbildung 1.1: Zur Ableitung der Braggschen Gleichung

1.2.2 Strukturfaktoren

Der Streubeitrag eines Einzelatoms im Kristall kann als Produkt des Atomformfaktors f und einer e-Funktion mit dem Phasenwinkel als Exponent - einer komplexen Größe - ausgedrückt werden:

$$F = f \cdot e^{i\varphi}$$

Fernab der Absorptionskante des betrachteten Atoms entspricht der atomare Formfaktor einer reellen Zahl zwischen der Ordnungszahl des Atoms bei sehr kleinen Beugungswinkeln (θ) und sehr kleinen Werten bei großen Beugungswinkeln und ist eine von der Wellenlänge unabhängige Größe. Durch thermische Schwingung bzw. Auslenkung erfolgt eine zusätzliche Schwächung der Streukraft, die in Form des Temperaturfaktors B berücksichtigt wird.

$$f = f_{\theta \rightarrow 0} \cdot e^{-B \cdot \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}}$$

Die Phasenverschiebung φ_j einer von einem Atom der Sorte j ausgehenden Streuwelle, bezogen auf den Ursprung der Elementarzelle, lässt sich mittels fraktioneller Koordinaten angeben.

$$\varphi_j = 2\pi(hx_j + ky + lz_j)$$

In einem Kristall überlagern sich für einen Reflex hkl nun die Streuwellen aller j Atome in der Elementarzelle unter Berücksichtigung ihrer individuellen Phasenverschiebungen. Die für die gesamte Struktur resultierende Streuwelle, der Strukturfaktor, ergibt sich durch Summation für jeden Reflex hkl .

$$F_{hkl} = \sum f_j \cdot e^{i2\pi(hx+ky+lz)}$$

Da die Röntgenstrahlen über die Elektronenhülle mit den Atomen wechselwirken, lässt sich der Strukturfaktor auch über die Integration der Elektronendichte ρ erhalten.

$$F_{hkl} = \iiint \rho(x, y, z) \cdot e^{i2\pi(hx+ky+lz)} dx \cdot dy \cdot dz$$

Die Fourier-Transformation dieses Ausdrucks führt zu der nachfolgenden Gleichung:

$$\rho_{x,y,z} = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz) + i\varphi_{hkl}}$$

Somit kann die Elektronendichte in der Elementarzelle aus den Beiträgen der Strukturfaktoramplitude $|F_{hkl}|$ und den Phasen φ_{hkl} berechnet werden.

1.2.3 Das Phasenproblem

Ein Röntgenbeugungsexperiment am Einkristall liefert nun innerhalb eines bestimmten Auflösungsbereiches die Intensitäten I der Reflexe hkl , die mit den Struktur Faktoren F_{hkl} in direkter Beziehung stehen.

$$|F|^2 \sim I$$

Die Phase kann im Experiment jedoch nicht messtechnisch erfasst werden, wird aber für die Berechnung der Elektronendichte und somit zur Bestimmung der Molekülstruktur benötigt. Dieses wird im Allgemeinen als das Phasenproblem der Kristallographie bezeichnet. Verschiedene Ansätze wurden zur Bestimmung der nicht direkt zugänglichen Phaseninformation entwickelt (direkte Methode, MIR, MR, MAD usw.).

Die **direkte Methode** findet vorrangig in der Kleinmolekülkristallographie Anwendung und basiert auf der statistischen Wahrscheinlichkeitstheorie (Lockau et al., 1988).

Die Technik des multiplen isomorphen Ersatzes (**MIR**) brachte den historischen Durchbruch in der Proteinkristallographie. Hierbei werden native und mit Schweratomen versetzte Proteinkristalle mit gleichen Zellparametern (isomorph) vermessen. Die Intensitätsdifferenzen in den Beugungsbildern beruhen somit nur auf der Anwesenheit der Schweratome, deren Lagen durch die Patterson-Funktion bestimmt werden können. Mit dieser Substruktur erfolgt eine erste Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur (Taylor, 2003).

Die *multi-wavelength anomalous diffraction-* (**MAD**) und die *single-wavelength anomalous diffraction-* (**SAD**) Methode nutzen die Wellenlängenabhängigkeit des atomaren Streufaktors von anomal streuenden Atomen zur Lösung des Phasenproblems. Insbesondere die SAD-Technik fand in den letzten Jahren eine verstärkte Anwendung zur Strukturaufklärung von Proteinen. Dieses ist vor allem auf die verbreitete Nutzung von Synchrotronstrahlung und der damit verbundenen feinen Einstellung des zu nutzenden Wellenlängenbereichs, aber auch auf verfeinerte Algorithmen der Phasenverbesserung zurückzuführen. Die anomale Streuung ist eine atomare Eigenschaft und geht mit dem atomaren Streufaktor in die Strukturformelgleichung ein.

Dieser setzt sich aus dem "normalen" atomaren Streufaktor f_0 , der vom Bragg-Winkel abhängt, und der komplexen anomalen Korrektur mit dem Realteil f' und der imaginären Komponente f'' zusammen, die von der Wellenlänge abhängt.

$$f(\theta, \lambda) = f_0(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda)$$

Da der Absorptionsterm $f''(\lambda)$ 90° in Phase ist, wird das Friedelsche Gesetz gebrochen, ($F_{hkl} \neq F_{-h-k-l}$) was zu anomalen oder Bijvoet-Differenzen ($|F_{PH(+)}| - |F_{PH(-)}|$) führt, die zur Lokalisation der anomalen Streuer über die Patterson-Methode oder direkte Methoden genutzt werden können (Dauter et al., 2002: ; Dodson, 2003: ; Smith, 1997).

Mit Hilfe des molekularen Ersatzes (**MR**) werden unter Verwendung ähnlicher Strukturen die Phasen für die zu bestimmende Kristallstruktur hergeleitet. Diese Methode findet mit Zunahme der Proteindatenbankeinträge (PDB) einen verstärkten Einsatz. Hierbei wird ein Satz an Koordinaten in einen weiteren transformiert, wobei die Rotation durch Anwendung der Pattersonfunktion von der Translation entkoppelt werden kann und demnach zunächst nur eine Suche nach drei Variablen erfolgen muß (Rossmann und Blow, 1962).

1.2.4 TLS-Verfeinerung

Atomare Auslenkungsparameter von Röntgenkristallstrukturen können statische Unordnung (entspricht den Unterschieden zwischen equivalenten Atomkoordinaten verschiedener Einheitszellen), dynamische Unordnung (da Diffraktionsdaten eine Zeitmittelung sich bewegender Atome repräsentieren) und Fehler im Modell widerspiegeln.

Eine gute Abschätzung der Auslenkungsparameter eines Atoms ist notwendig, um eine gute Anpassung des Strukturmodells an die Diffraktionsdaten zu erreichen und somit eine zuverlässige Bestimmung der mittleren Atomposition zu erlauben. Im allgemeinen enthält das Strukturmodell Parameter, die die Auslenkung (u) eines jeden Atoms über ein isotropes oder anisotropes Modell beschreiben. Hierbei findet der Temperaturfaktor oder B-Faktor Anwendung, der ein Maß für die mittlere quadratische Auslenkung eines Atoms um seine mittlere Position darstellt.

Isotroper Temperaturfaktor: $B = 8\pi^2 u_m^2$

Eine bessere Beschreibung kann jedoch erfolgen, wenn die einzelnen Beiträge zum gesamten atomaren Auslenkungsparameter separat betrachtet werden:

$$u = u_{\text{cryst}} + u_{\text{TLS}} + u_{\text{internal}} + u_{\text{atom}}$$

Hierbei repräsentiert u_{cryst} die Anisotropie des Kristalls und wird auf die gesamte Einheitszelle angewendet. Mit u_{TLS} wird die gemeinsame anisotrope Auslenkung von Atomen einer pseudo-starren Gruppe innerhalb der asymmetrischen Einheit des Kristalls berücksichtigt. u_{internal} beinhaltet verschiedene Arten von intramolekularen kollektiven Bewegungen und u_{atom} repräsentiert letztendlich die Auslenkung von individuellen Atomen, die idealerweise nur die lokale Auslenkung beinhaltet.

Die dynamische Unordnung in Protein- und Nukleinsäurekristallen liefert Informationen über die Dynamik der Makromoleküle. Andererseits begrenzt die dynamische wie auch die statische Unordnung die Diffraktionseigenschaften der meisten makromolekularen Kristalle zu Auflösungen, die schlechter als 1 Å, häufig sogar schlechter als 2 Å sind, verursacht durch die Schwächung der Braggreflexionen zusammen mit einem Anstieg der

diffusen Röntgenstreuung. Das daraus resultierende schlechte Daten-zu-Parameter-Verhältnis führt in der Proteinkristallographie häufig zu Modellen mit nur isotropen mittleren quadratischen Auslenkungsparametern für individuelle Atome. Eine individuelle anisotrope Verfeinerung würde zu einem sechsfachen Anstieg der Zahl der benötigten Auslenkungsparameter führen.

Um dennoch eine Modellverfeinerung mit anisotropen Auslenkungsparametern durchführen zu können, besteht die Möglichkeit, ausgewählte Gruppen von Atomen als starre Körper zu behandeln. (Cruickshank, 1956) beschrieb als erster die mittlere quadratische Auslenkung dieser starren Körper als Vibration mit zwei symmetrischen Tensoren für Libration (L) und Translation (T). Später wurde dieses Modell durch die Einführung eines weiteren Tensors S (Schraubenachse) erweitert (Schomaker und Trueblood, 1968), der die Translation und Libration der starren Körper miteinander korreliert. Durch die Einbeziehung des Tensors S als symmetrisches Element in die Modellanalyse ist die Übereinstimmung der beobachteten und berechneten Auslenkungsparameter unabhängig vom Ursprung des starren Körpers, wodurch eine Vereinheitlichung der Datenreporte erreicht werden konnte.

Die Implementierung der TLS-Parameterisierung (Winn *et al.*, 2001) in das makromolekulare Verfeinerungsprogramm REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) eröffnete einem breiten Nutzerkreis die Möglichkeit - selbst bei moderater kristallographischer Auflösung - unter Einhaltung realistischer Daten-zu-Parameter-Verhältnisse gute Modelle in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu entwickeln. Ferner können individuelle anisotrope quadratische Auslenkungsamplituden der Gruppenatome aus den verfeinerten TLS-Tensoren, zum Beispiel mit dem Programm TLSANL (Howlin *et al.*, 1993), berechnet werden.

2 Die Kristallstruktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120

2.1 Einleitung

2.1.1 Cyanobakterien

Die ältesten bekannten sedimentären Felsformationen sind ungefähr 3,7 Milliarden Jahre alt und enthalten Mikrofossilien von cyanobakterienähnlichen Organismen (Palinska *et al.*, 2002). Cyanobakterien, auch unter den Namen Blaualgen oder Blau-Grün-Algen bekannt, sind prokaryotische Mikroorganismen, die eine pflanzentypähnliche Photosynthese durchführen, bei der Licht und Wasser für die Reduktion von Kohlendioxid genutzt wird. So ist es diesen Organismen zu verdanken, dass sich auf der Erde eine aerobe Atmosphäre entwickelt hat, die zu jener enormen Artenvielfalt führte, die wir heute kennen. Mit der Möglichkeit sich an verschiedenste, auch extreme Umweltbedingungen anzupassen, sind Cyanobakterien nahezu in allen aquatischen und terrestrischen Ökosystemen anzutreffen (Palinska *et al.*, 2002).

Der Photosyntheseapparat von Cyanobakterien ähnelt in Struktur, Funktion und molekularen Eigenschaften dem eukaryotischer Algen und Pflanzen. Vier membranassoziierte makromolekulare Komplexe nehmen direkt an der Photosynthese teil und sind sowohl in Pflanzen als auch in Cyanobakterien anzutreffen: Photosystem II (PSII), Cytochrom *b₆f* Komplex, Photosystem I (PSI) und der ATP-Synthasekomplex. Die Interaktion zwischen diesen Multiproteinkomplexen wird durch verschiedene Proteine und Moleküle wie Plastoquinon, Plastocyanin, Ferredoxin und Protonen erreicht (Grossman *et al.*, 1995). Ein Unterschied zwischen dem Photosyntheseapparat von Cyanobakterien und dem von Pflanzen besteht in der Architektur ihrer lichtsammelnden Komplexe, die Lichtenergie absorbieren und diese zu den entsprechenden Photosystemen führen. So haben höhere Pflanzen ähnlich wie Grünalgen Antennensysteme, die membraneingebaute Proteine zusammen mit Chlorophyll b als auch Chlorophyll a enthalten. Im Gegensatz dazu nutzen Cyanobakterien ebenso wie die Chloroplasten von Rotalgen Phycobilisomen, große Multiproteinkomplexe, die mit der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembran verbunden sind (Green, 2001). Die Phycobilisomen (PBS) bestehen aus

Phycobiliproteinen, die mit offenkettigen Tetrapyrrolchromophoren pigmentiert sind, und aus den meist nicht-pigmentierten Linkerproteinen. Die hauptsächlich anzutreffenden Phycobiliproteine sind Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (AP), wobei einige Stämme auch noch Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrocyanin (PEC) synthetisieren. Sie bestehen aus α - und β -Untereinheiten, die zunächst zu $\alpha\beta$ -Heterodimeren assoziieren und dann $(\alpha\beta)_3 * (\alpha\beta)_3$ -Komplexe in Form von dicken Scheiben bilden (Abbildung 2.1).

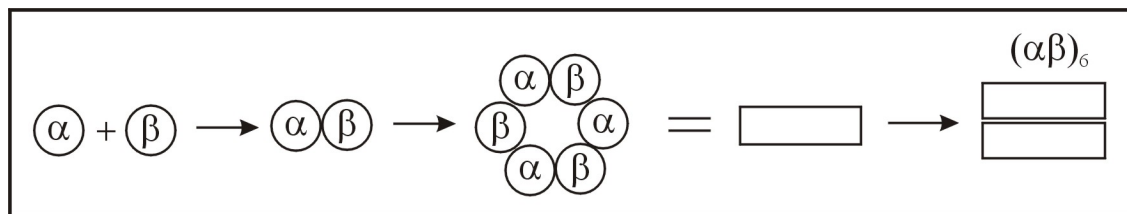


Abbildung 2.1: Zusammensetzung der Phycobiliproteine

Die Phycobilisomenform, die man in vielen Cyanobakterien findet, besteht aus einem Kern aus drei kurzen Stäbchen, die aus Allophycocyanin (APC) bestehen, deren Ringflächen senkrecht zur Membranoberfläche oberhalb des Photosystems II angeordnet sind. Um den Kern herum sind sechs periphere Stäbchen angeordnet, die aus Phycocyaninhexameren (oder anderen Phycobiliproteinvarianten) bestehen (Abbildung 2.2) (Glazer, 1982: ; Tandeau de Marsac und Houmard, 1993).

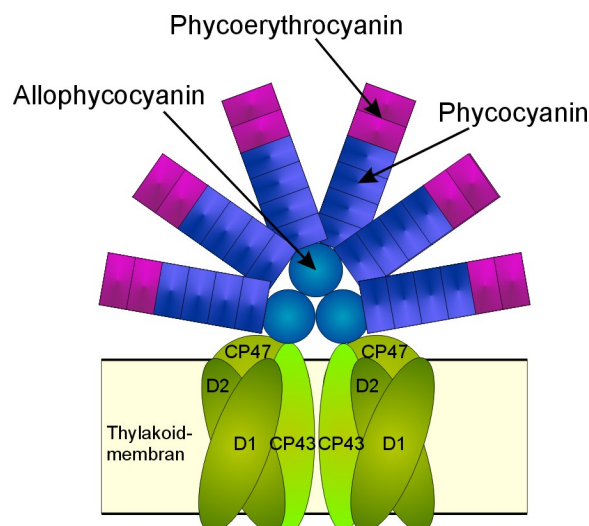


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines am Photosystem II assoziierten Phycobilisoms

Zusätzlich zu den pigmentierten Phycobiliproteinen wurden verschiedene Linkerproteine gefunden, die an die Phycobilisomenkomponenten binden (Glauser *et al.*, 1992). Diese besetzen Positionen innerhalb der Kavitäten der Phycobiliproteinscheiben und spielen eine Rolle in der Komplexstabilisierung, dem Kern-Stab-Zusammenbau und in der Richtungsweisung des Energietransfers zum Photosystem II.

Cyanobakterien können einzellig sein oder aber Koloniestrukturen wie zum Beispiel Filamente ausbilden. Einige dieser filamentösen Cyanobakterien, wie zum Beispiel *Anabaena* oder *Calothrix*, bilden spezialisierte Zellen, die sogenannten Heterozysten, aus. Diese dienen dazu, eine Mikro-Sauerstoffumgebung für die Stickstofffixierung unter Stickstoffmangelbedingungen zu schaffen. Die Fixierung von N_2 selbst ist ein stark energieverbrauchender Prozess, der von einem extrem O_2 -labilen Enzym, der Nitrogenase, katalysiert wird. Ausgereifte Heterozysten unterscheiden sich von vegetativen Zellen metabolisch als auch morphologisch auf verschiedene Weisen: Sie besitzen keine Photosystem-II-Aktivität und produzieren daher keinen Sauerstoff, sie haben sehr wenige Phycobilisomen und können kein CO_2 fixieren, ferner haben sie eine erhöhte respiratorische Elektronentransportrate und besitzen eine dicke Hülle, die aus einer inneren Glycolipidschicht und einer äußeren Polysaccharidschicht besteht (Ernst und Maldener, 2001; ; Wolk *et al.*, 1994).

2.1.2 Allgemeine Stressantwort der Cyanobakterien auf nährstofflimitierende Bedingungen - mit Fokus auf NblA

Cyanobakterien entfalten eine ganze Reihe von Mechanismen während des Wachstums unter Nährstoffmangel. Optisch sichtbar ist der Abbau der Phycobilisomen. Durch den Phycobilisomenabbau werden freigesetzte Aminosäuren als Substrat für die *de novo* Synthese von Proteinen bereitgestellt, die für einen Anpassungsprozess benötigt werden; ferner wird eine mögliche Photoschädigung unter diesen Stressbedingungen verhindert. Dieser geordnete proteolytische Prozess wird als *chlorosis* oder *bleaching* bezeichnet (Allen und Smith, 1969) und beginnt mit der zügigen Degradation der endständigen Hexamere der peripheren Stäbchen mit den assoziierten Linkerpolypeptiden, wird in Richtung PBS-Kern fortgesetzt und kann nach vollständigem Stababbau zur Zerstörung des gesamten PBS-Kernkomplexes führen. In *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wird ein kompletter PBS-Abbau unter stickstoff- und schwefellimitierenden Bedingungen und ein partieller PBS-Abbau unter phosphatlimitierenden Bedingungen beobachtet (Collier und Grossman, 1992). Im Gegensatz dazu scheint ein Schwefelmangel in *Synechocystis* PCC 6803 keinen Einfluss auf die PBS-Integrität zu haben (Richaud *et al.*, 2001).

Die Charakterisierung von nicht-bleichenden Mutanten von *Synechococcus* PCC 7942 führte zur Identifikation des Gens *nbla* (*nbl* steht für non-bleaching). Untersuchungen mit weiteren Cyanobakterienstämmen bestätigte die zentrale Rolle von NblA bei der Phycobilisomendegradation. So ist die Expression von *nbla* für diesen Prozess nicht nur in dem ebenfalls unizellulären Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Baier *et al.*, 2001: ; Li und Sherman, 2002: ; Richaud *et al.*, 2001) nötig, sondern auch in den filamentösen Cyanobakterien *Tolypothrix* sp. PCC 7601 (Ochoa de Alda *et al.*, 2004) und *Anabaena* sp. PCC 7120 (Baier *et al.*, 2004). *nbla*-homologe Gene sind in allen PBS-enthaltenen Organismen, Cyanobakterien und Rotalgen, zu finden. *nbla* kodiert für ein kleines Polypeptid von 54-65 Aminosäuren, das keine Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion aufweist. So wurden anfänglich einige molekulare Mechanismus für den NblA getriggerten PBS-Abbau diskutiert (Collier und Grossman, 1994: ; Grossman *et al.*, 1993). Demnach könnte NblA direkt als phycobiliproteinspezifische Protease fungieren, es könnte die Spezifität und Prozessivität allgemeiner Proteasen zum entsprechenden Substrat verändern oder aber die Phycobilisomen über ionische

Wechselwirkungen zerreißen. Ein anderer möglicher Mechanismus könnte darauf beruhen, dass NblA die Phycobiliproteine für die zelluläre proteolytische Maschinerie markiert. Dieses könnte in Analogie zu Ubiquitin (Hershko und Ciechanover, 1986; ; Rechsteiner, 1987) erfolgen, welches andere Proteine kovalent bindet und diese somit für das 26S-Proteasom eukaryotischer Zellen zugänglich macht. Ähnlichkeiten bestehen auch mit dem *response regulator* RssB, der den ClpXP-abhängigen Abbau der σ^S -Untereinheit der RNA-Polymerase in *E. coli* triggert (Muffler et al., 1996; ; Studemann et al., 2003).

Neben der Kontrolle der *nblA*-Transkription über die Nährstoffverfügbarkeit gibt es auch Hinweise auf die Regulation der Expression von *nblA* aufgrund veränderter Redox- oder Lichtbedingungen. So konnte zum Beispiel in einer RppA (*regulator of photosynthesis- and photopigmented-related gene expression*) Mutante von *Synechocystis* PCC 6803 eine starke *nblA*-Expression unter photoautotrophen Bedingungen gezeigt werden (Li und Sherman, 2000). Ferner wurde ebenfalls für *Synechocystis* PCC 6803 der Nachweis erbracht, dass *nblA* ein lichtreguliertes Gen ist (Eriksson et al., 2000). Zudem wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese und genomische DNA-Mikroarrays das Verständnis über die Anpassung des Cyanobakteriums *Fremyella diplosiphon* an sich verändernde Lichtspektren erweitert. Stowe-Evans und Mitarbeiter fanden dabei heraus, dass sich der Spiegel von nahezu 80 Proteinen, darunter NblA, in Zellen die in grünem gegenüber rotem Licht wachsen, ändert (Stowe-Evans et al., 2004).

In *Synechococcus* sp. PCC 7942 wird die Transkription des *nblA*-Gens vom NblS-NblR-Zweikomponentensystem kontrolliert, das allgemein in die Weiterleitung von Stresssignalen (Nährstoffmangel als auch sich verändernde Lichtbedingungen) involviert ist (Schwarz und Grossman, 1998; ; van Waasbergen et al., 2002). Ferner wurde für diesen Organismus eine *nblA*-Aktivierung durch NtcA (Genprodukt vom *nitrogen-dependent transcriptional control gene A*) unter stickstoffspezifischem, jedoch nicht unter schwefel-spezifischem Stress gefunden (Luque et al., 2001). Demgegenüber wird der Transkriptionsfaktor NtcA in anderen cyanobakteriellen Spezies zwar für den sequentiellen Abbau der Pigmente und das Überleben der Zelle benötigt, inwiefern jedoch NtcA direkt an der Transkription von *nblA* beteiligt ist, ist noch unklar (Herrero et al., 2001; ; Sauer et al., 1999).

Eine weitere *nbl*-Mutante wurde in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 durch *nblB* komplementiert (Dolganov und Grossman, 1999). NblB zeigt Sequenzähnlichkeit zu Untereinheiten von Lyasen (z. B. CpcE), die die kovalente Anheftung von Phycobilinen an die Apophycobiliproteinuntereinheiten katalysiert. Dieses lässt vermuten, dass NblB direkt mit den an Phycobiliproteinen gebundenen offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophoren interagiert und möglicherweise diese Bindung spaltet, so dass die Phycobiliproteinuntereinheiten unter bestimmten Stressbedingungen degradiert werden können. *nblB* wird konstitutiv transkribiert und steht nicht unter der Kontrolle von NblR (Dolganov und Grossman, 1999).

2.1.3 NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120

Das diazotrophe, filamentöse Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 baut in den ersten Stunden nach einer Stickstoffunterversorgung in allen Zellen die Phycobilisomen ab. Wenn die Heterocysten voll entwickelt sind und Nitrogenase aktiv ist werden in den vegetativen Zellen die lichtsammelnden Komplexe resynthetisiert, während in den Heterocysten der Phycobilisomengehalt sehr gering bleibt.

Anabaena sp. PCC 7120 verfügt über zwei *nblA*-homologe Gene. Das eine ist auf dem Chromosom lokalisiert (*nblA*, ORF asr4517), das andere liegt auf dem Plasmid Delta (*nblA-p*, ORF asr8504). Northern-Blot-Analyse zeigte jedoch, dass *nblA-p* nach einem Herabsetzen des Stickstoffgehalts im Nährmedium nicht expremiert wird. So zeigen die $\Delta nblA-p$ Mutanten auch den gleichen Phenotyp wie Wildtyp-Zellen (Abbildung 2.3). $\Delta nblA$ Mutanten sind demgegenüber unfähig die Phycobilisomen abzubauen, was in den nicht gebleichten Heterocysten am besten zu beobachten ist (Abbildung 2.3).

Im Folgenden wird nur das vom chromosomalen Gen kodierte Protein besprochen (im Weiteren als NblA bezeichnet), da es Gegenstand dieser Arbeit ist.

NblA besteht aus 65 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 7542 Da. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 5,08 und reflektiert den sauren Charakter des Proteins; unter physiologischen Bedingungen hat NblA eine Nettoladung von ca. -3. Auf Grundlage des Elutionsverhaltens bei der Größenausschlusschromatographie lag das ermittelte apparente Molekulargewicht von NblA im Bereich von 19-24 kDa, was auf ein Trimer hinweist. Die Assoziation von NblA zu einem Trimer wurde auch von analytischen Ultrazentrifugationsdaten gestützt, die mit einem Monomer-Trimer-Modell am besten korrespondierten (Strauss *et al.*, 2002). Diese Interpretation wurde später korrigiert (Strauss, 2003)

CD-spektroskopische Untersuchungen von NblA unter nativen Bedingungen weisen für das Protein eine spektrale Charakteristik mit mehrheitlich α -helikalen Sekundärstrukturelementen auf (Abbildung 2.4 A), hier mit einem Maximum bei 192 nm und Doppelminima bei 222 und 208 nm (Strauss *et al.*, 2002). Die thermisch induzierte Entfaltung von NblA, die ebenfalls durch CD verfolgt wurde, deutete auf die Präsenz nur einer Domäne hin, was für solch ein kleines Protein nicht ungewöhnlich erscheint (Abbildung 2.4 B).

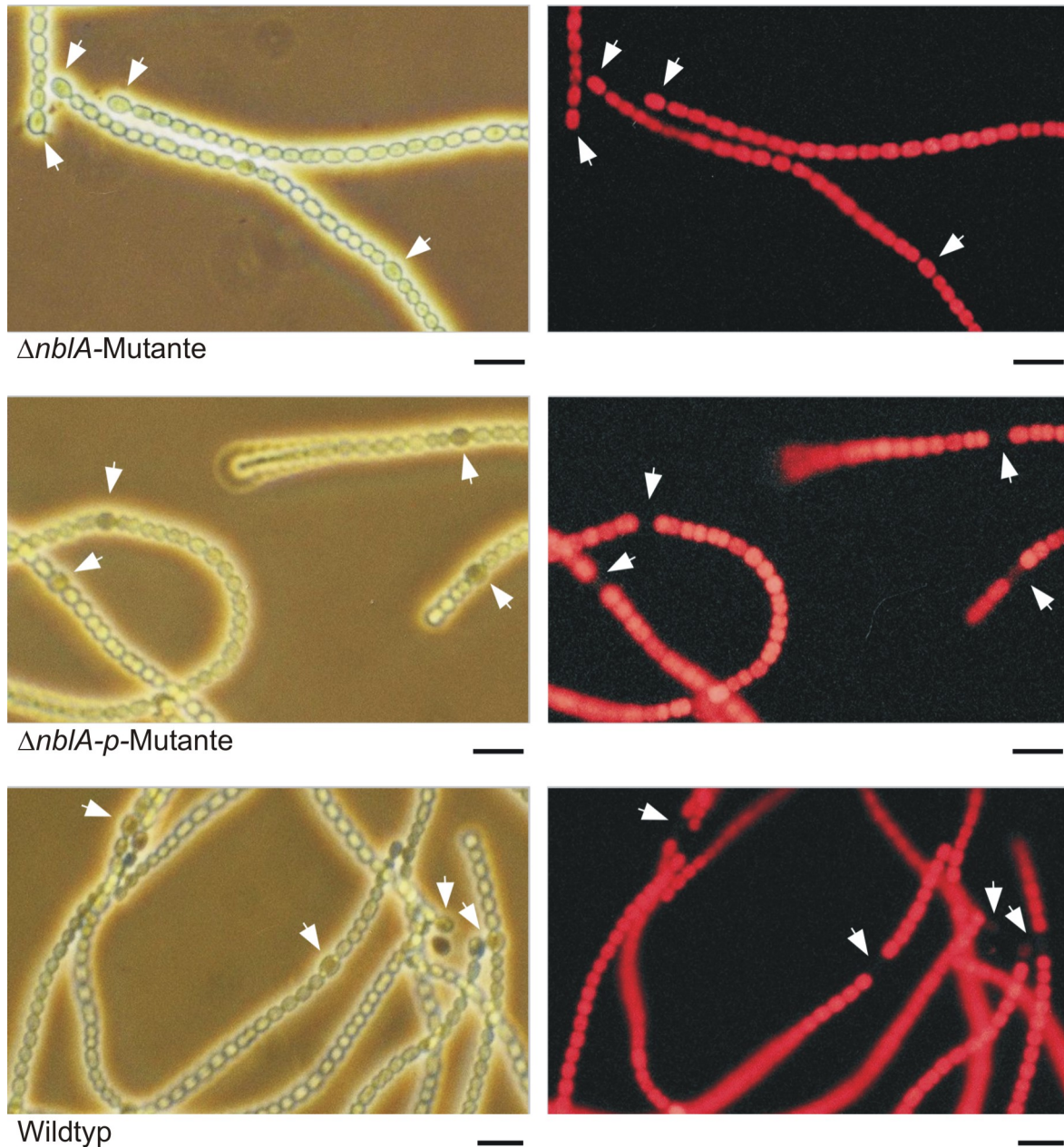


Abbildung 2.3: Phasenkontrast-lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Anabaena* sp. PCC 7120 Wildtyp und $\Delta nblA$ - sowie $\Delta nblA-p$ -Mutanten, die ohne kombinierte Stickstoffquellen (BG11₀) wuchsen. Heterocysten sind mit weißen Pfeilen markiert. Die Skalierung entspricht 10 μm (aus (Baier *et al.*, 2004).

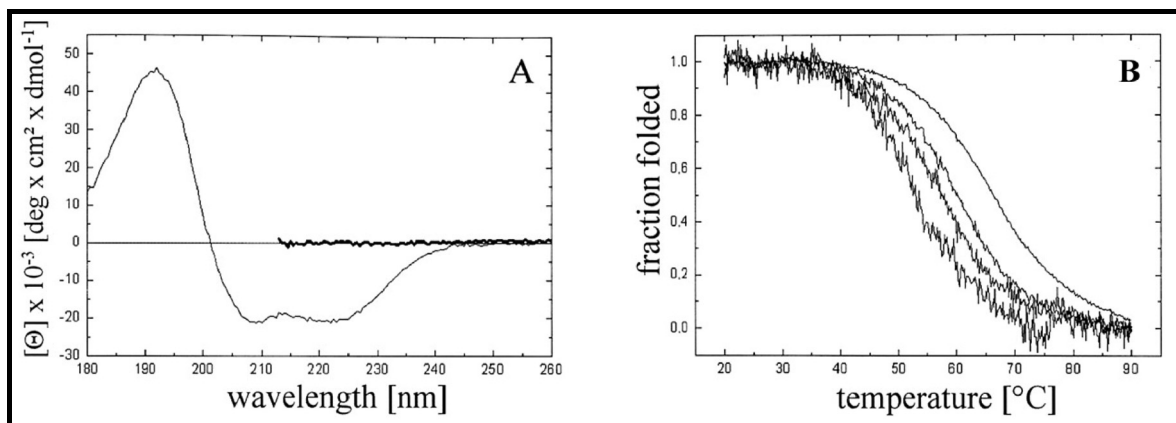


Abbildung 2.4: Ferne UV-CD-Spektren von NblA von *Anabaena* sp. PCC 7120 (A), thermische Denaturierung von NblA (B)

(A) Die Spektren wurden in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5 (dünne Linie) und in 7 M Guanidiniumhydrochlorid (dicke Linie) bei 20°C aufgenommen. (B) Die temperatur-induzierte Entfaltung wurde über die Änderung der Elliptizität bei 222 nm in 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5 bei Proteinkonzentrationen von 0,54, 5,4, 15,0 und 43,7 mM (4,1, 40,7, 113 und 330 mg/l) verfolgt (Entfaltungskurven von links nach rechts) (entnommen aus Strauss et al., 2002).

Die Vorhersage der Sekundärstruktur, zum Beispiel mit dem Programm PHD (Rost, 1996), klassifizierte NblA ebenfalls als ein vorwiegend α -helikales Protein (Abbildung 2.5).

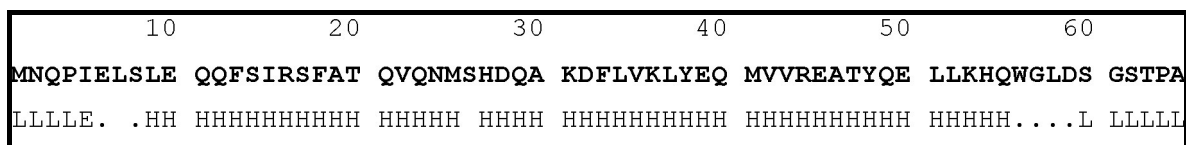


Abbildung 2.5: Sequenz und PHD Sekundärstrukturvorhersage von NblA (H-Helix, E-Extended, L-Loop)

Weiterhin wurde mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen gezeigt, dass das Tryptophan 56 in einer hydrophilen Umgebung, also nicht im hydrophoben Kern des Proteins vorliegt (Strauss *et al.*, 2002). Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wurde das Emissionsmaximum bei 346 nm gefunden.

2.2 Aufgabenstellung und Voraussetzungen

NblA, ein aus 65 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, ist in den Phycobilisomenabbau unter nährstofflimitierten Bedingungen involviert. NblA-Homologe sind in allen Phycobilisomen enthaltenden Organismen wie Cyanobakterien und Rotalgen zu finden, was die wichtige Rolle dieses Proteins in dem als Chlorosis bezeichneten geordneten proteolytischen Prozess unterstreicht.

Im Rahmen der Promotion sollte die Struktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120 bestimmt werden und in den biologischen Kontext gesetzt werden. Voraussetzung hierfür war die Überproduktion von selenomethioninsubstituierten NblA in *E. coli*, dessen Kristallisation und anschließende Kristallstrukturbestimmung.

Durch die Zusammenarbeit mit Dr. Kerstin Baier aus der Arbeitsgruppe "Biochemie der Pflanzen" der Humboldt-Universität zu Berlin unter Leitung von Prof. Dr. W. Lockau stand bereits zum Anfang der Arbeit das Plasmid pBB8 zur Verfügung, welches das chromosomale *nblA*-Gen aus *Anabaena* PCC 7120 in einem Expressionsvektor darstellt. Bereits im Vorfeld wurde NblA umfassend physikochemisch charakterisiert (Strauss *et al.*, 2002).

2.3 Experimentelles

2.3.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

Im Allgemeinen wurden molekularbiologische und biochemische Methoden verwendet, wie sie in (Sambrook und Russell, 2000) und (Ausubel *et al.*, 1992) beschrieben sind. In diesem Kapitel werden deshalb nur jene Methoden näher erläutert, die in den angegebenen Referenzen nicht aufgeführt oder dem allgemeinen Verständnis der durchgeführten Tätigkeiten dienlich sind.

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Regel bei der Firma Roth, Fluka oder Sigma-Aldrich bestellt und hatten einen Reinheitsgrad von 99.9%. Speziell für die Kristallisation wurde auf die Verwendung identischer Chargen geachtet.

2.3.1.1 *nblA*-Überexpression und Proteinaufreinigung

Für die röntgenkristallographische Strukturanalyse von NblA war es notwendig, Selenomethionin anstelle von Methionin in das Protein einzubauen und letzteres aufzureinigen, um mittels *single-* oder *multiple-wavelength anomalous dispersion* (SAD oder MAD) das Phasenproblem zu lösen. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* B834 (DE3) Zellen mit dem Plasmid pBB8 transformiert. Bei dem Bakterienstamm B834 handelt es sich um einen methioninauxotrophen Stamm, d.h. die Zellen sind nicht in der Lage, Methionin selbst zu synthetisieren und sind demzufolge auf die Zufuhr von außen angewiesen. Das Plasmid pBB8 basiert auf dem Plasmid pET11a (Novagen), welches das NblA-kodierende Gen *asr4517* von *Anabaena sp.* PCC 7120 zwischen den Restriktionsschnittstellen Nde I und BamH I enthält (Abbildung 2.6).

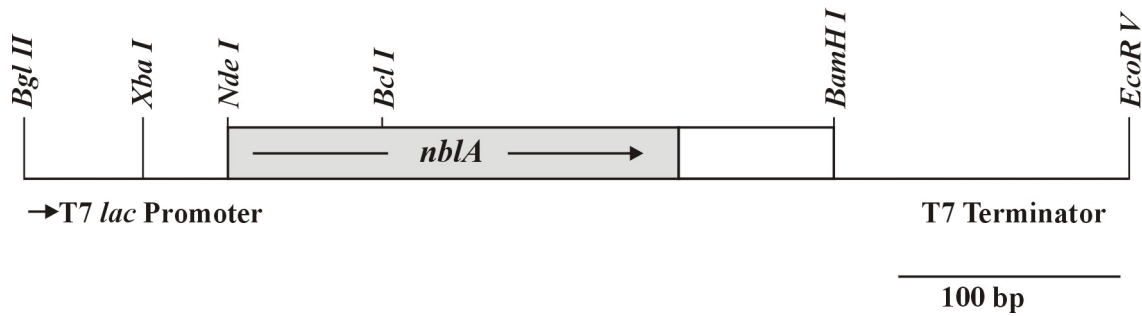


Abbildung 2.6: Restriktionskarte der T7 lac Promoter-*nblA*-Region des Plasmids pBB8

Im Folgenden werden die Schritte der Herstellung kompetenter Zellen, deren Transformation und die Überproduktion sowie Aufreinigung SeMet-substituierter NblAs beschrieben.

2.3.1.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983). 5 ml LB-Medium wurden mit einer einzigen *E.coli*-Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und bei 37°C über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Diese Zellbrühe wurde zum Animpfen einer 100 ml LB-Kultur verwendet, welche wiederum bei 37°C geschüttelt wurde, bis eine optische Dichte bei 600 nm von ca. 0.6 erreicht wurde. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Für die Ernte der Zellen wurde die Kultur im Eisbad schnell abgekühlt und die Zellen für 5 Minuten bei 2500 x g sedimentiert. Diese wurden dann in 30 ml TFB1 (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, der pH-Wert wurde mit 20 %-iger Essigsäure auf 5.8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert) resuspendiert, nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wie oben beschrieben abzentrifugiert und anschließend in 8 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,8 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert) resuspendiert. Aliquote von je 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -70°C gelagert.

2.3.1.1.2 Transformation

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von ca. 100 ng Plasmid und sanftem Mischen erfolgte eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis mit anschließendem Hitzeschock von einer Minute bei 42°C. Nach erneuter Inkubation auf Eis wurde den Zellen 500 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugefügt, um ihnen das Wachstum im 37°C warmen Schüttelinkubator zu erlauben. Nach 45 Minuten wurden die Zellen auf eine LB-Agarplatte mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.3.1.1.3 Überproduktion SeMet-substituierter NblAs

Die Herstellung SeMet-substituierter NblAs (Met1SeMet, Met25SeMet, Met41SeMet) erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von (Budisa *et al.*, 1995). Dementsprechend erfolgte das Wachstum der methioninauxotrophen Zellen im Minimalmedium NMM mit einer allmählichen Erhöhung der SeMet-Konzentration.

Zusammensetzung des *New Minimal Mediums* (NMM)

7,5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
8,5 mM	NaCl
55 mM	KH ₂ PO ₄
100 mM	K ₂ HPO ₄
1 mM	MgCl ₂
20 mM	Glucose
1 mg/l	Ca ²⁺
1 mg/l	Fe ²⁺
1 µg/l	Cu ²⁺
1 µg/l	Mn ²⁺
1 µg/l	Zn ²⁺
1 µg/l	MoO ₄ ²⁻
10 mg/l	Thiamin
10 mg/l	Biotin

je 50 mg/l	alle Aminosäuren (L-Stereoisome) außer Methionin, zuvor in NaCl/P _i (137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na _x H _y PO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,0) gelöst
je 0.5 g/l	Adenin, Guanosin, Thymin, Uracil (Basen)

Eine Kolonie der B834 (DE3) Bakterienzellen mit dem Plasmid pBB8 wurde von einer LB-Agarplatte zum Animpfen von 2,5 ml NMM mit 30 mg/l L-Methionin genutzt. In diesem als auch in den nachfolgenden Schritten enthielt das Medium jeweils 100 mg/l Ampicillin. Nach einer Inkubation, die über Nacht bei 37°C erfolgte, wurde diese Kultur zu 100 ml NMM mit 5 mg/l L-Methionin und 30 mg/l L-Selenomethionin hinzugefügt. Nach einer zehnstündigen Inkubationsphase wurden die Zellen unter den oben angegebenen Bedingungen abzentrifugiert, in NMM resuspendiert und zur Animpfung von drei Litern NMM mit 30 mg/l L-Selenomethionin verwendet. Dieses entsprach einer optischen Dichte (OD₆₀₀) der Kultur von ca. 0,15. Die Expression des rekombinanten Gens wurde 7 h später bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit einer Endkonzentration von 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid induziert. Nach weiteren 9 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (3500 x g) geerntet und bei -70°C gelagert.

2.3.1.1.4 Zellaufschluss und Reinigung von NblA

Der Zellaufschluss als auch die Aufreinigung von NblA wurde ausschließlich bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt, um das Risiko eines proteolytischen Abbaus so gering wie möglich zu halten.

Das Zellpellet aus drei Litern Kultur wurde in 70 ml Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und die Zellen mit einem *French Press* Homogenisator aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 40 Minuten bei 31000 x g zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Da das Protein kein Affinitätstag enthält, fand als erster Reinigungsschritt die klassische Ammoniumsulfatfällung Anwendung. Hierbei wurde zuvor gemörsertes Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren in kleinsten Portionen dem Zellüberstand zugeführt, bis eine Ammoniumsulfatsättigung von 30% erreicht war. Der Rührprozess wurde über Nacht fortgeführt. Nachdem das

ausgefällte Material für 10 Minuten bei 14000 x g abzentrifugiert wurde, erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 30 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). Diese Proteinlösung wurde mittels Gelchromatographie (Superdex75 26/60, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) weiter aufgereinigt, bei der pro Lauf 10 ml auf die zuvor mit Puffer A equilibrierte Säule gegeben wurde. Die Flussrate betrug 3 ml/min. Die Nbla enthaltenden Fraktionen wurden mittels 20%iger SDS-PAGE bestimmt und dem abschließenden Reinigungsschritt, der Anionenaustauschchromatographie (HiTrapQ 5 ml, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) zugeführt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte über einen Salzgradienten von 0.05 M bis 0.5 M NaCl in Puffer A innerhalb von 30 Minuten bei einer Flussrate von 1 ml/min. Aufgrund der sehr hohen Proteinkonzentration des Eluates konnte eine Umpufferung entfallen und die Proteinlösung brauchte für die Kristallisationsexperimente nur mit Puffer A verdünnt zu werden.

2.3.1.2 Qualitätskontrolle der Proteinlösung

Organische Makromoleküle, die für die Kristallisation eingesetzt werden sollen, müssen bestimmte Bedingungen an Reinheit, Größen- und Ladungshomogenität erfüllen. Um die Qualität der Proteinlösungen zu ermitteln, wurden verschiedene Techniken verwendet, die im Folgenden näher erläutert werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte ausschließlich über die UV-Absorption bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 8250 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$, $M_{\text{wSeMet}} = 7683 \text{ g/mol}$).

2.3.1.2.1 SDS-PAGE

Neben der SDS-PAGE (Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese) nach (Laemmli, 1970), fand in dieser Arbeit das Elektrophoresesystem nach (Schägger und Jagow, 1987), das eine gute Trennung von Proteinen im Bereich von 1 bis 100 kDa erreicht, Anwendung.

Tricin als Führungslinien erlaubt hier im Bereich moderater Acrylamidkonzentrationen eine hohe Auflösung kleiner Proteine, was insbesondere auf scharfe Banden im kritischen Molekulargewichtsbereich zurückzuführen ist. Das hier angewendete Minigel (80 mm x 60 mm x 0,5 mm) bestand aus einem kleinporigen Trenngel (16%) das mit einem kurzen *Spacer*-Gel (10%) überschichtet und mit diesem gemeinsam auspolymerisiert wurde;

dieses wurde dann vom Sammelgel (4%) überschichtet. Die Gele wurden in eine senkrechte Elektrophoreseapparatur eingesetzt und der obere Puffertank mit Kathodenpuffer und der untere Puffertank mit Anodenpuffer gefüllt. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer gemischt, 2 Minuten gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Der hier verwendete Probenpuffer enthält gegenüber dem klassischen keinen Tris-Puffer, sondern Phosphatpuffer. Somit kommt es beim Aufkochen der Proben zu keiner drastischen pH-Verschiebung in den sauren Bereich, wodurch säurelabile Peptidbindungen (z.B. Asp-Pro) möglicherweise gespalten werden könnten (Cannon-Carlson und Tang, 1997).

Zusammensetzung eines Minigels nach Schägger und Jagow:

Trenngel:

2.70 ml	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
1,70 ml	3 x Gelpuffer
0.62 ml	86% Glycerol
2 µl	TEMED
17 µl	10% APS

Spacer-Gel für ca. 1 cm:

0,83 ml	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
0,83 ml	H ₂ O
0,83 ml	3 x Gelpuffer
0,83 µl	TEMED
8,3 µl	10% APS

Sammelgel für ca. 0,5 cm:

0.33 ml	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
1,54 ml	H ₂ O
0,62 ml	3 x Gelpuffer
1,25 µl	TEMED
12,5 µl	10% APS

3 x Gelpuffer:

3 M Tris/HCl pH 8,45

0,3% SDS

10 x Anodenpuffer:

2 M Tris pH 8,9

10 x Kathodenpuffer:

1 M Tris pH 8,45

0.3% SDS

4 x SDS-Probenpuffer (reduzierend):

0,0625 M Phosphat pH 7,0

10% (v/v) Glycerol

2% SDS

0,001% Bromphenolblau

5% 2-Mercaptoethanol

2.3.1.2.2 Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von NblA wurde eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75 16/60, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) mit folgenden Proteinen als Standard verwendet:

Trypsininhibitor (Rinderlunge)	6500
Cytochrom c	12500
Trypsininhibitor (Sojabohne)	21000
Carboanhydrase	29000
Ovalbumin	43000

Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM NaCl. Es wurden 100 μ l Probenvolumen auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

2.3.1.2.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Neben den Qualitätskontrollen mittels SDS-PAGE und Größenausschlusschromatographie, mit denen Aussagen über die Reinheit und gegebenenfalls Oligomerenbildung einer Proteinprobe getroffen werden können, ist die dynamische Lichtstreuung eine sehr schnelle Methode zur Bestimmung der Größenhomogenität. Dieses ist von besonderer Bedeutung für die Kristallisation von biologischen Makromolekülen, da sich im Allgemeinen nur Proteine mit einer monomodalen Größenverteilung kristallisieren lassen.

Für die dynamische Lichtstreuung wurde ein Laser-Spectroscatter 201 (RiNA Netzwerk RNA Technologien GmbH, Berlin) mit einer Wellenlänge von 687 nm verwendet. Die Proteinprobe hatte eine Konzentration von 10 mg/ml. Es wurden 10 Messungen mit einer Messzeit von je 30 Sekunden bei einer Temperatur von 20°C aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Annahme einer Viskosität von 1,010 cP und einem Brechungsindex von 1,33.

2.3.1.2.4 Massenspektrometrie

Die Molekulargewichtsbestimmungen der Proteine mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden von Dr. Eva-Christina Müller (MDC, Berlin) an einem Q-TOF Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinproben mit ZipTip_{C4} Pipettenspitzen (Millipore) entsalzt und anschließend in Methanol mit 1% Ameisensäure gelöst. Für die massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus Kristallen wurden die Kristalle zuvor hinreichend in der entsprechenden Reservoiirlösung gewaschen, um noch in Lösung vorkommende Proteine von den Kristallen zu entfernen.

2.3.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese

2.3.1.3.1 Quick Change Mutagenesis

Zur Identifikation von Aminosäuren von NblA, die an der Bindung von Phycobilisomen beteiligt sind, wurden ortsgerechte Mutagenesen durchgeführt. Die hier verwendete Prozedur der *Quick Change Mutagenesis* (QCM) nach (Wang und Malcom, 1999) basiert

auf dem *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis* Protokoll der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA). Diese Technik erlaubt neben einer einzelnen Punktmutation auch multiple Mutationen sowie Deletionen und Insertionen längerer DNA-Abschnitte.

Die Ausführung der Mutagenese erfolgte in zwei Schritten: Im ersten wurde die Verlängerungsreaktion in zwei separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt; eins enthielt den Vorwärtsprimer und das andere den Rückwärtsprimer. Im zweiten Schritt wurden die beiden Reaktionen gemischt und die Standard-QCM durchgeführt. Anschließend wurde die methylierte Matrizen-DNA zerstört. Hierfür wurden 10 Einheiten des Restriktionsenzym DpnI dem Reaktionsansatz hinzugefügt und bei 37°C für drei Stunden inkubiert. Für die folgende Transformation von elektrokompetenten Top10-Zellen wurden jeweils 2 µl des Endproduktes verwendet und 1%, 10% beziehungsweise 89% der Transformationsansätze auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Als Kontrollen wurden QCM-Ansätze, die nicht mit DpnI verdaut wurden, und DpnI-verdaute Reaktionsansätze, die keine Turbo-Pfu-Polymerase und Primer enthielten, mitgeführt. Ein zusätzlicher Nachweis des DpnI-Verdaus wurde zuvor durch Probenauftrag (entsprechend 150 ng DNA-Ausgangsmaterial) auf ein 0,75%iges Agarosegel mit anschließender Anfärbung durch Ethidiumbromid geführt.

Vorwärtsprimer: ForH27AD28A

5-acc^acaagtgcagaatatgagcCGGCGCcaagccaaagatTTTTTGGTC-3

Rückwärtsprimer: RevH27AD28A

5-gac^acaaaaaatcttggcttgCGCCGCgctcatattctgcacttgggt-3

Die unterstrichenen Nukleotide zeigen den zu mutagenisierenden Teil an.

Reaktionsgemisch für die QCM

1 µl	pBB10 [35 ng/µl]
2,5 µl	Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer [10 pmol/µl]
4 µl	dNTP-Mix [5 mM]
5 µl	10 x Reaktionspuffer
1 µl	TurboPfu-Polymerase [2,5 U/µl]
36,5 µl	dH ₂ O

Thermocycler-Programm für die Verlängerungsreaktion

30"	95°C
	4 mal
30"	95°C
1'	55°C
10'	68°C
~	4°C

Thermocycler-Programm für die Standard-QCM

30"	95°C
	20 mal
30"	95°C
1'	55°C
10'	68°C
15'	68°C
~	4°C

2.3.1.3.2 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparationen wurden mit dem Mini-Prep-Kit von QIAGEN (Hilden, Germany) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.1.3.3 DNA-Sequenzierung

Der Erfolg der QCMs wurde durch DNA-Sequenzierungen an einem ABI PRISM[®] Genetic Analyzer von Applied Biosystems bestätigt. Die hier verwendete Technik basiert auf der Dideoxy-Kettenabbruchsreaktion unter Verwendung von BigDye[™], einer Reaktionsmischung, die markierte ddNTPs auf der Grundlage von Rhodaminfarbstoffen enthält.

Die Sequenzierung setzt sich aus den Schritten der Kettenabbruchreaktion, die in einem *Thermocycler* erfolgt, der Produktfällung und der eigentlichen Sequenzanalyse zusammen.

Ansatz der Kettenabbruchsreaktion:

H ₂ O	6 µl
2,5 x Reaktionspuffer	6 µl
Plasmid (100 ng/µl)	3 µl
5' oder 3' pGEX-Sequenzierungsprimer (5 pmol/µl)	3 µl
BigDye TM	2 µl

3' pGEX-Sequenzierungsprimer: 3'-d[CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG]-5'

5' pGEX-Sequenzierungsprimer: 5'-d[GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG]-3'

Standard Sequenzierungsprogramm:

3'	95°C
	25 mal
30''	96°C
12''	50°C
4'	60°C

Produktfällung

Zur Fällung der Produkte der Kettenabbruchsreaktion zur Sequenzanalyse wurden die folgenden Lösungen gemischt und nach 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert:

Reaktionsprodukt	20 µl
VE-Wasser	70 µl
Na-Acetat (3 M)	10 µl
Ethanol (100%, unvergällt)	300 µl

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 250 µl eiskaltem 70%-igen Ethanol gewaschen. Nach der vollständigen Trocknung der Produkte wurden diese in 20 µl Hi-DiTM (deionisiertes Formamid) resuspendiert, 2 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt.

Die Auswertung der Sequenziererergebnisse erfolgte mit dem Programm BioEdit¹.

¹ Hall, T.A. (1999), BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

2.3.2 Kristallographische Methoden

2.3.2.1 Kristallisation

Die Kristallisation von SeMet-NbIA erfolgte mit der Dampfdiffusions-Methode im hängenden Tropfen. Hierbei wurden je 1 μl Proteinlösung mit 1 μl Reservoirlösung auf einem Deckgläschen (22 mm) gemischt und über einem Reservoir von 700 μl luftdicht aufgebracht. Für alle Kristallisationsexperimente wurden Linbro-Schalen (ICN Flow, Meckenheim), die jeweils 24 Einzelexperimente zulassen, eingesetzt. Zunächst wurden in einem faktoriellen Ansatz (Carter und Carter, 1979) solche Kristallisationslösungen verwendet, die denen von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) entsprachen (Protein Screen I, II und Lite). Ausgehend von den dort gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden diverse Feinscreens angesetzt, die zu Kristallen führten, die hinsichtlich ihrer Morphologie, Größe, Stabilität sowie ihres Diffraktionsvermögens den Kriterien zur Sammlung kompletter Datensätze hoher Auflösung genügten. Parallel dazu wurde darauf acht gegeben, dass die Daten bei 100 bzw. 110 K, das heißt unter Kryobedingungen, aufgenommen werden konnten, um somit eine Verbesserung der Datenqualität erzielen zu können. Diese ist im Vergleich zu Diffraktionsexperimenten, die bei Raumtemperatur erfolgten, vor allem auf die Verringerung von Strahlenschäden sowie ein geringeres Hintergrundrauschen zurückzuführen. Veränderungen der Kristallisationstemperatur von 293 K auf 283 K bzw. 277 K führten im Allgemeinen zu keiner nennenswerten Verbesserung der Kristallqualität.

2.3.2.2 Datensammlung

Für die Diffraktionsexperimente wurden die Kristalle mit einer Kryoschleife gefischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zunächst wurden diese am Drehanoden-Generator (Rigaku RU H2B 2x0.2 Fokus, MarResearch IMAGING PLATE 300 mm, Graphit-Monochromator, Kühlsystem von Oxford Cryosystems) der Arbeitsgruppe getestet, um die Qualität beurteilen zu können. Von Kristallen mit den besten Diffraktionseigenschaften wurden Datensätze am Messplatz ID14-4 am Elektronensynchrotron ESRF in Grenoble aufgenommen. Dieser Messplatz verfügt über einen XFlash Fluoreszenzdetektor von Röntec und die Energie kann in einem Bereich von 9,6 bis 14,5 keV eingestellt werden;

somit ist dieser für SAD- bzw. MAD-Experimente geeignet. Des Weiteren ist dieser Messplatz mit einem Q4R ADSC CCD-Detektor für die schnelle Datenakquisition und einem Kryosystem ausgestattet.

Die Bestimmung der NblA-Struktur erfolgte mit Hilfe der *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) Methode. Hierfür wurde ein Datensatz mit der Wellenlänge an der Röntgen-Absorptionskante eines schweren Streuers, in diesem Fall der von Selen, aufgenommen. Die Bestimmung dieser *Peak*-Wellenlänge basierte auf einer Fluoreszenz-Scan-Messung eines SeMet-NblA-Kristalls entlang der theoretischen K-Absorptionskante von Selen. Zusätzlich wurde von einem zweiten Kristall ein Datensatz bei höherer Energie aufgenommen, mit dem eine höhere Auflösung erzielt wurde. Beide Datensätze wurden jeweils mit dem Programm *XDS* (Kabsch, 1993) prozessiert und die integrierten Reflexe mit dem Skalierungsprogramm *XSCALE* (Kabsch, 1993) in Abhängigkeit von der Raumgruppe zusammengefasst, zueinander skaliert und die redundanten Reflexe gemittelt. Die Bestimmung der Raumgruppe erfolgte auf der Grundlage der Laue-Symmetrie und unter Berücksichtigung von systematisch abwesenden Reflexen.

2.3.2.3 Strukturbestimmung mittels der *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) Methode

Die Lösung des Phasenproblems und die damit einhergehende Bestimmung der Schweratomlagen erfolgte nach der SAD-Methode mit dem Programm *SOLVE* (Terwilliger und Berendzen, 1999). Hierfür wurde der Peak-Datensatz mit einem Auflösungsbereich von 25,0 – 2,2 Å verwendet. Das Programm *RESOLVE* (Terwilliger, 2000; Terwilliger, 2003) wurde zur Verbesserung der initialen Phasen und zum Bau eines Startmodells von NblA verwendet. Die Dichtemodifikation in diesem Programm basiert auf der Methode der größten Wahrscheinlichkeit (*maximum likelihood*) und verwendet die Verfahren der Solvensmittelung (*solvent flattening*) und der Histogrammanpassung (*histogram matching*), zusätzlich ist eine Mittelung über nichtkristallographische Symmetrien (*NCS averaging*) implementiert.

2.3.2.4 Strukturverfeinerung

Das mit *RESOLVE* erzeugte Strukturmodell enthielt 14 Proteinfragmente, die über mehrere Elementarzellen verteilt waren, so dass es zunächst mit dem CCP4-Programm *PDBSET* in einer asymmetrischen Einheitszelle gebündelt werden musste. 5% der Reflexe wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und wurden nicht für die Strukturverfeinerung verwendet, jedoch zur Berechnung der Dichtekarten herangezogen. Dieser Testdatensatz wurde für die Kreuz-Validierung des Verfeinerungsprozesses auf der Grundlage des freien R-Wertes (R_{free}) verwendet (Brünger, 1992). Die Verfeinerung des NblA-Modells erfolgte durch alternierende Schritte manuellen Modellbaus mit dem Programm *O* (Jones *et al.*, 1991) und mehreren Zyklen der Verfeinerung der atomaren Ortsparameter und Temperaturfaktoren nach der Methode der größten Wahrscheinlichkeit unter Verwendung des Programms *REFMAC* (Version 5.1.24.) (Murshudov *et al.*, 1997). Damit wurde das Modell dahingehend verändert, dass es zu einer besseren Übereinstimmung der beobachteten und berechneten Strukturfaktoramplituden und somit zu einer Verbesserung der R-Werte, unter Einbehaltung chemisch sinnvoller Parameter, kam. Zunächst wurde das Modell gegen Daten des Peak-Datensatzes mit einer Auflösung von bis zu 2.2 Å verfeinert. Anschließend wurde dieses Modell gegen den zweiten Datensatz, mit höherer Auflösung, verfeinert. Um die geringen Unterschiede in den Dimensionen der Einheitszellen der beiden Datensätze auszugleichen, wurde mit einer Verfeinerung der "starrten Körper" begonnen, um dann mit der klassischen Verfeinerung von Ortsparametern und Temperaturfaktoren fortzufahren. Der Einbau von Wassermolekülen erfolgte im Wesentlichen mit dem Programm ARP / wARP (Perrakis *et al.*, 1999). Die eingebauten Wassermoleküle erfüllten am Ende der Verfeinerung folgende Kriterien:

- definierte $2F_o-F_c$ -Elektronendichte bei 1σ konturiert und F_o-F_c -Elektronendichte in der *Omit-map* bei 3σ konturiert
- Temperaturfaktoren unter 75 \AA^2
- Wasserstoffbrückenabstand zum Protein oder zu anderen Solvensmolekülen im Bereich von $2,4 \text{ \AA}$ bis $3,6 \text{ \AA}$.

Eine weitere Verbesserung des Modells und somit der R-Werte wurde durch die Einführung von *riding hydrogens* erreicht, das heißt von Wasserstoffatomen, die relativ zu anderen Atomen lokalisiert werden. Sie selbst werden nicht unabhängig verfeinert, dienen

jedoch der Validierung der Genauigkeit der verfeinerten Atome, zur Strukturfaktor-berechnung und allgemein zur Verbesserung der Geometrie des Modells.

Aufgrund des schlechten Daten-zu-Parameter-Verhältnisses bei einer Auflösung von 1,8 Å konnten die individuellen atomaren Auslenkungsparameter nicht anisotrop verfeinert werden, jedoch wurde nach erfolgter Konvergenz der Verfeinerung zur Modellierung anisotroper Auslenkungen TLS Parameter, zur Beschreibung der Translation, der Libration und der Schraubenrotation von pseudo-starren Körpern, eingeführt. Zu diesem Zweck wurden folgende 18 TLS-Gruppen (pseudo-starre Körper) definiert (A, B, ... L sind die Molekülkettenbezeichnungen):

TLS-Gruppe 1:	A10 – A25 und B10 – B25
TLS-Gruppe 2:	A26 – A50
TLS-Gruppe 3:	B26 – B50
:	:
:	:
TLS-Gruppe 16:	K10 – K25 und L10 – L25
TLS-Gruppe 17:	K26 – K50
TLS-Gruppe 18:	L26 – L50

Es wurden jeweils 20 Zyklen TLS-Verfeinerung unter Verwendung der zuvor verfeinerten B-Faktoren durchgeführt. Der TLS-Parameter-Bestimmung und -Verfeinerung schlossen sich Zyklen der "normalen" Verfeinerung an, bei der die Positionen und die individuellen Temperaturfaktoren der Atome unter Berücksichtigung der TLS-Parameter bis zur Konvergenz der R-Werte verfeinert wurden.

Während der gesamten Verfeinerung wurden keine NCS-Beschränkungen verwendet, um die Unabhängigkeit der einzelnen Moleküle nicht einzuschränken.

2.3.2.5 Strukturvalidierung und grafische Darstellung

Das Modell wurde während der Verfeinerung regelmäßig mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und WHATCHECK (Hoofstede *et al.*, 1996) hinsichtlich seiner stereochemischen Qualität überprüft.

Die Berechnung von Oberflächenpotentialen der Moleküle wurde mit dem Programm DELPHI (Rocchia *et al.*, 2002) durchgeführt; die graphische Darstellung derselbigen erfolgte mit dem Programm GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). Alle weiteren Moleküldarstellungen wurden mit den Programmen MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) und POV-Ray v.3.5. (www.povray.org) erzeugt.

2.3.2.6 Verwendete Programme

Datenprozessierung und –reduktion

XDS (Kabsch, 1993)

XSCALE (Kabsch, 1993)

Strukturbestimmung (Schweratomsuche und Dichtemodifikation)

SOLVE (Terwilliger, 2003: ; Terwilliger und Berendzen, 1999)

RESOLVE (Terwilliger, 2000)

Modellbau

O (Jones *et al.*, 1991)

ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 2001: ; Perrakis *et al.*, 1999)

Modellverfeinerung

REFMAC5 (CCP4, 1994: ; Murshudov *et al.*, 1997)

CNS (Brünger *et al.*, 1998)

Datenmodifikationsprogramme

CCP4 (CCP4, 1994)

Modellvalidierung

WHATCHECK (Hooft *et al.*, 1996)

PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993)

Berechnung und Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials

DELPHI (Rocchia *et al.*, 2002)

GRASP (Nicholls *et al.*, 1991)

Linkage Plot

XSAE¹

Moleküldarstellungen

MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996)

POV-ray (www.povray.org)

¹ Broger, C., XSAE Vers. 1.5 Clemens.Broger@Roche.com

2.4 Ergebnisse

Die Struktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC7120 wurde mittels SAD bestimmt. Die Koordinaten und Strukturparameter sind bei der *Protein Data Bank* unter dem Zugangscode 1OJH deponiert worden.

Im Folgenden werden die Schritte, die zur Struktur führten sowie die Struktur an sich detailliert beschrieben.

2.4.1 *nblA*-Überexpression, Proteinaufreinigung und biophysikalische Charakterisierung

SeMet-NblA wurde in methioninauxotrophen *E. coli*-Zellen produziert und mittels Ammoniumsulfatfällung, Größenausschlusschromatographie und anschließender Anionenaustauschchromatographie, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, bis zur Homogenität aufgereinigt. Das Ergebnis war beeindruckend: Aus drei Litern Bakterienkultur mit einer OD600 von 1,9 vor der Zellernte konnten 325 mg sauberes SeMet-NblA gewonnen werden.

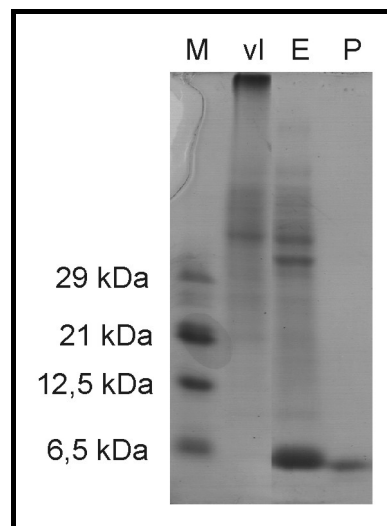


Abbildung 2.7: Reinheit von SeMet-NblA

16,5 %iges SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987); M: Molekulargewichtsmarker Mix5 von Serva; vI: Zellen vor der Induktion; E: Zellen 9 Stunden nach der Induktion (Ernte); P: 3,5 μ g aufgereinigtes Protein

In Abbildung 2.7 ist ein SDS-PAGE nach Schägger und Jaggow (1987) dargestellt, das die Überexpression von *nbla* in *E. coli* B348 (DE3) und die Reinheit der SeMet-Nbla-Präparation zeigt.

Bereits die Ammoniumsulfatfällung führte zu einer starken Anreicherung von Nbla. Das Elutionsprofil der darauffolgenden Größenausschlusschromatographie zeigte zwei gut voneinander separierte *Peaks*. Demnach konnten die verbleibenden Verunreinigungen, die von größeren Proteinen bzw. Proteinaggregaten gebildet wurden, von Nbla getrennt werden. So wurde schon nach diesem zweiten Schritt eine geschätzte Reinheit des Proteins von 98% erreicht (siehe Abbildung 2.8).

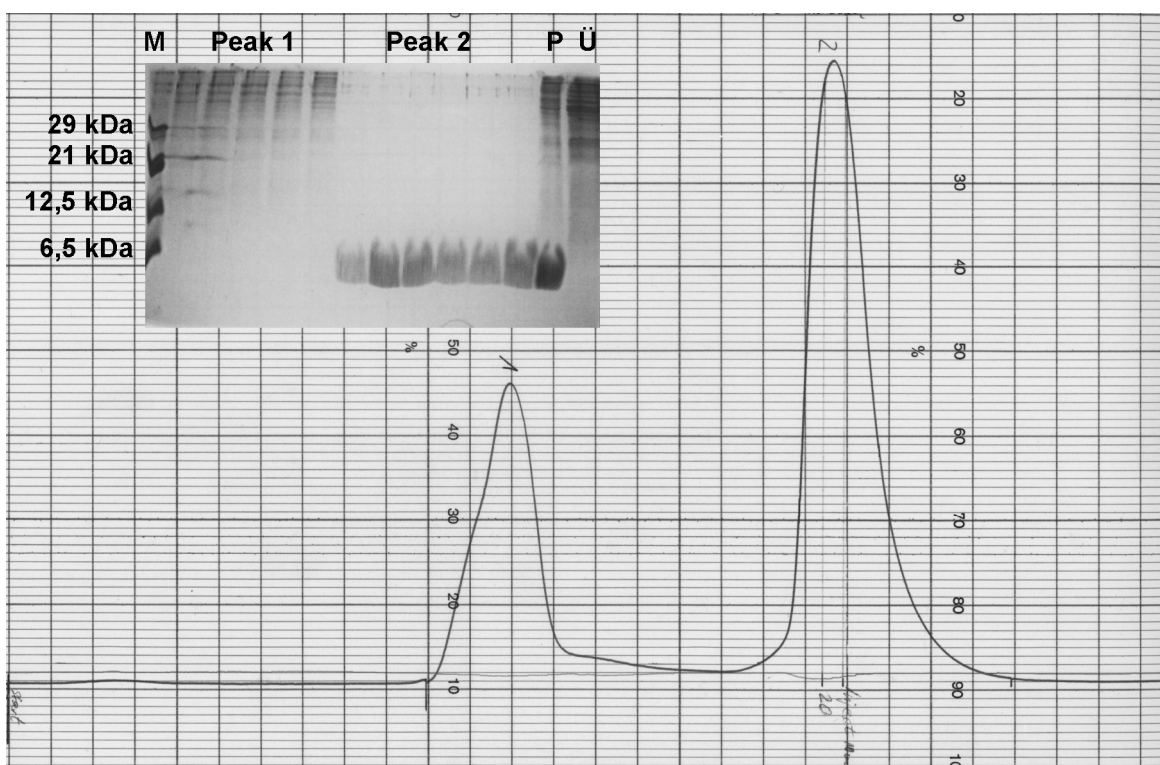


Abbildung 2.8: Chromatogramm eines Gelchromatographielaufes (Superdex75, 26/60) zur Aufreinigung von Nbla nach erfolgter Ammoniumsulfatfällung und ein entsprechendes 17,5%iges SDS-PAGE

Es wurden pro Lauf 10 ml des aufgelösten Pellets der Ammoniumsulfatfällung aufgetragen. Der Scheitelpunkt von Peak 2 liegt in etwa bei 3 Absorptionseinheiten für die Absorption von UV-Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Auf dem stark überladenen, Coomassie gefärbten Gel wurden Fraktionen von Peak 1 und 2 sowie Aliquote des Überstands (Ü) und des Präzipitats (P) der Ammoniumsulfatfällung als auch ein Molekulargewichtsmarker (M) aufgetrennt.

Der letzte Schritt, die Anionenaustausch-Chromatographie, diene lediglich dem *polishing* und dem Zweck, nur Proteine mit einer einheitlichen Oberflächenladungsverteilung für die Kristallisation einzusetzen.

Das Elutionsverhalten von SeMet-NblA von Gelchromatographiesäulen weist auf eine Oligomerisierung des Proteins hin. Abbildung 2.9 zeigt den Graphen, der aus zwei Molekulargewichtsstandardläufen mit einer Superdex75 16/60 Gelfiltrationssäule resultierte und der zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von NblA herangezogen wurde. Die daraus ermittelte Gleichung lautet:

$$\text{Volumen [ml]} = -24,84 * \ln \text{Mw [Da]} + 313,13.$$

Mit Elutionsvolumina von 66,7 ml, 66,4 ml und 69,4 ml liegt somit das scheinbare Molekulargewicht von SeMet-NblA im Bereich von 18,3 bis 20,6 kDa.

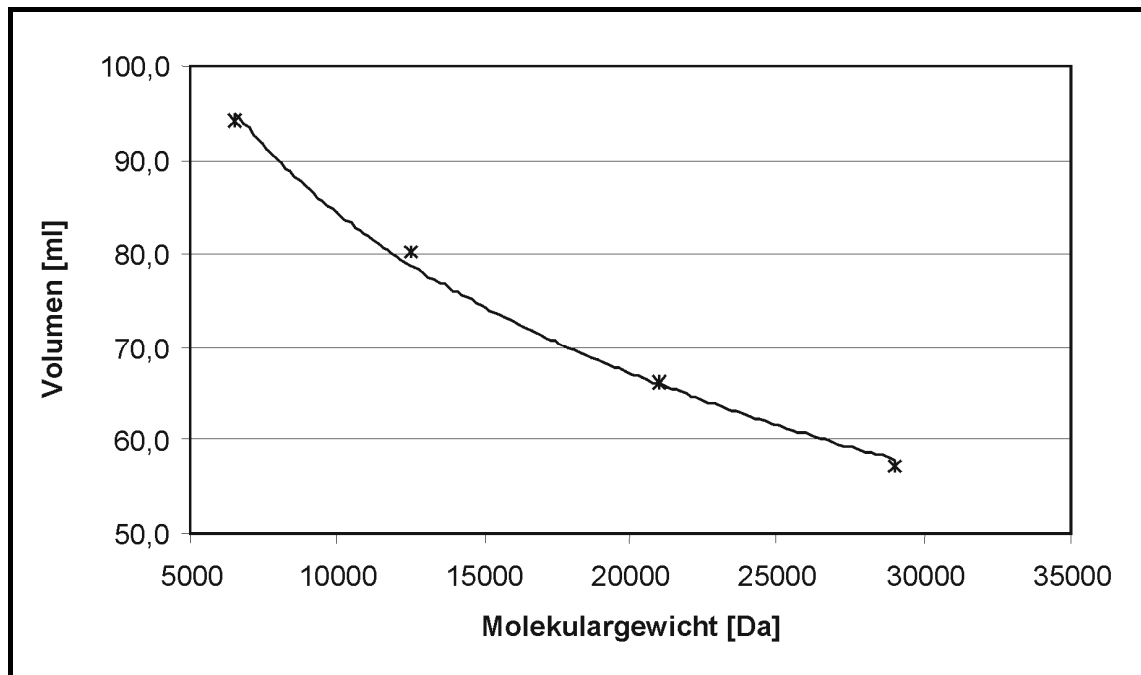


Abbildung 2.9: Graphische Darstellung des Molekulargewichtes gegenüber dem Elutionsvolumen zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von Proteinen unter Verwendung der Gelfiltrationssäule Superdex75 16/60

Als Standardproteine wurden Trypsininhibitor (Rinderlunge, 6500 Da), Cytochrom C (12500 Da), Trypsininhibitor (Sojabohne, 21000 Da) und Carboanhydrase (29000 Da) verwendet.

Für die Kristallisation von Proteinen ist es unerlässlich, Informationen über mögliche Aggregationen zu erhalten. Aus diesem Grund wurden bei der für die Kristallisation

verwendeten Proteinkonzentration Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) durchgeführt. Als Ergebnis (siehe Abbildung 2.10) wurde eine monomodale Partikelgrößenverteilung beobachtet. Demnach kam es bei einer Proteinkonzentrationen von 10 mg/ml zu keiner Aggregatbildung.

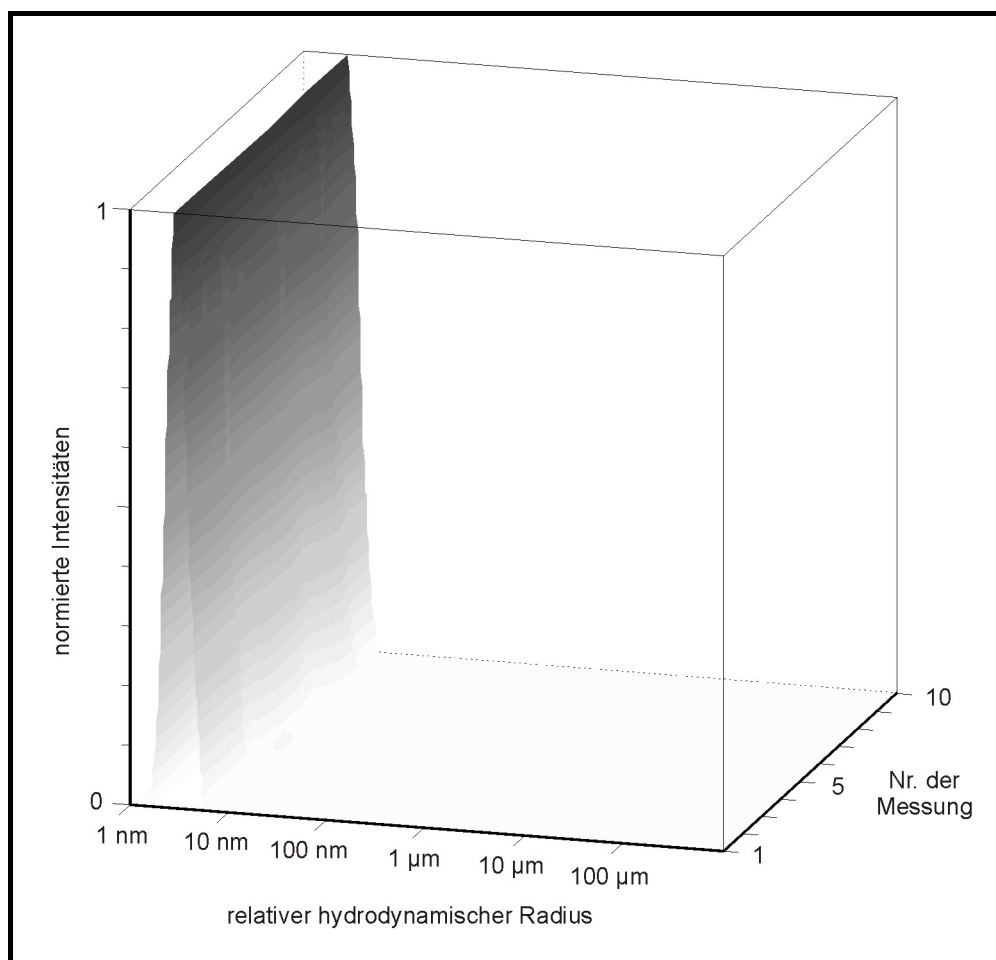


Abbildung 2.10: Plot der dynamischen Lichtstreuung der NblA-Präparation
Die Datenauftragung zeigt 10 DLS-Messungen bei einer SeMet-NblA-Konzentration von 10 mg/ml. Es wurde der hydrodynamische Durchmesser gegen normierte Intensitäten aufgetragen.

Der Einbau von Selenomethionin anstelle von Methionin in NblA wurde durch Elektrosprayionisierungsmassenspektrometrie nachgewiesen. Aufgrund der Präsenz von drei Methioninen in NblA wurde ein Anstieg des Molekulargewichtes von 7542,5 g/mol für NblA auf 7683 g/mol für SeMet-NblA erwartet. Dieser Wert konnte im Rahmen der Messgenauigkeit des Gerätes ermittelt werden (Abbildung 2.11). Der *Peak* bei 7704 Da weist auf ein Na-Adukt von SeMet-NblA hin; diese werden häufig in der Massenspektrometrie von Biomolekülen beobachtet. Das Massenspektrum dient neben dem SDS-PAGE und der analytischen Anionenaustauschchromatographie (das Chromatogramm wurde hier nicht gezeigt) auch als Nachweis für die hohe Reinheit dieser SeMet-NblA-Präparation.

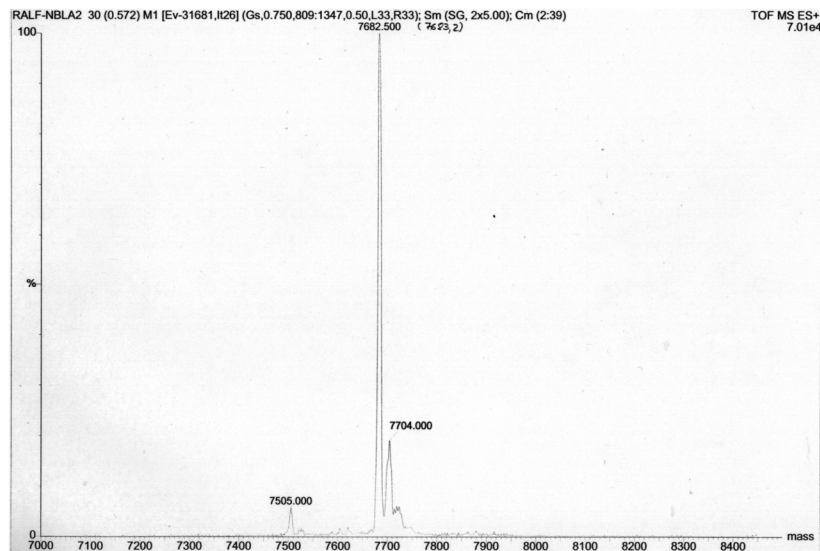


Abbildung 2.11: Massenspektrum von SeMet-NblA

Der Einbau von Selen in NblA konnte weiterhin durch eine Fluoreszenzmessung entlang der theoretischen K-Absorptionskante von Selen nachgewiesen werden (Abbildung 2.12). Die Messung wurde an einem SeMet-NblA-Kristall am Messplatz ID29 an der ESRF Grenoble (Frankreich) durchgeführt. Das Fluoreszenzspektrum zeigt ein Absorptionsmaximum nahe dem theoretisch erwarteten Energiewert von 12.6578 keV.

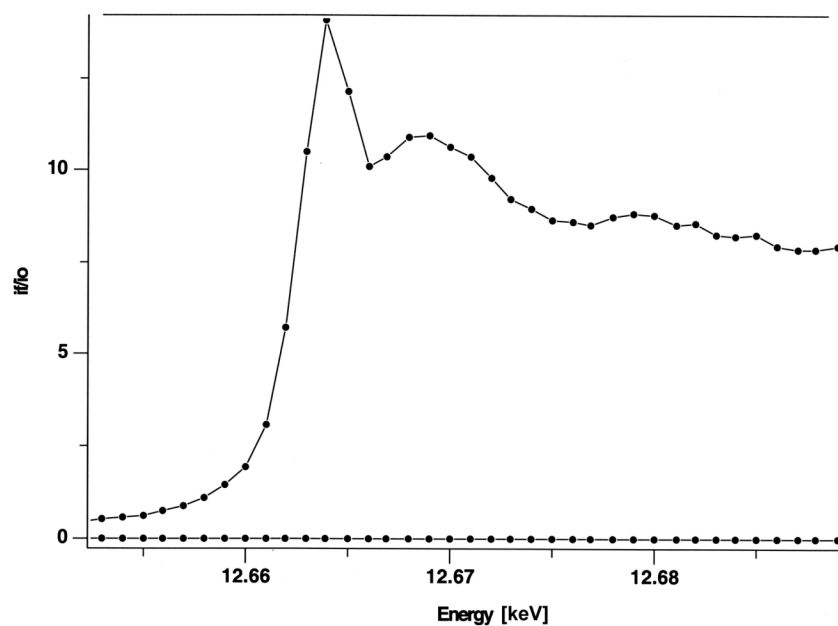


Abbildung 2.12: Fluoreszenzspektrum eines SeMet-NblA-Kristalls entlang der K-Absorptionskante von Selen

2.4.2 Kristallisation und Nachweis der Präsenz des Volllängenproteins im Kristall

SeMet-NblA kristallisierte im Konzentrationsbereich von 7 – 13 mg/ml in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA unter verschiedenen Polyethylenglycol- (PEG-) Bedingungen. Um jedoch unverwachsene Kristalle ausreichender Größe mit glatten Oberflächen zu erhalten, mussten die Bedingungen variiert werden. Insbesondere der Zusatz von Ethylenglycol und $MgCl_2$ führte zum erwünschten Erfolg. Hinreichend große Kristalle mit guten Diffraktionseigenschaften, die direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren werden konnten, wuchsen über einer Reservoirlösung, bestehend aus 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 100 mM $MgCl_2$, 10% (w/v) PEG 2000 und 15% Ethylenglycol, bei einer Temperatur von 20°C. Diese Kristalle hatten die Form von langen, jedoch dünnen Stäbchen ($1.0 \times 0.15 \times 0.05 \text{ mm}^3$) (Abbildung 2.13) und gehörten zur primitiv monoklinen Raumgruppe $P2_1$.

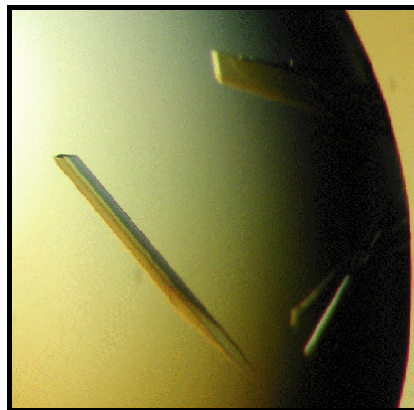


Abbildung 2.13: Typische SeMet-NblA-Kristalle

Wie sich später bei der Strukturbestimmung und -verfeinerung herausstellte, konnten nicht alle Reste von NblA modelliert werden. Um sicherzustellen, dass dieses nicht auf Proteaseaktivitäten zurückzuführen ist, musste der Nachweis für die Präsenz des Volllängenproteins im Kristall erfolgen. Hierfür wurden Kristalle aufgelöst und massenspektrometrisch untersucht. Aufgrund von Verunreinigungen durch die Kristallisationslösung ist in diesem Spektrum ein starkes Hintergrundrauschen zu beobachten (Abbildung 2.14). Dennoch ist ein hinreichend eindeutiges Signal für die Masse von SeMet-NblA zu verzeichnen. Die anderen beobachteten Massensignale konnten

in keiner Weise Fragmenten von SeMet-NblA zugeordnet werden. Wegen des "unsauberen" Massenspektrums wurden die Proteine der Kristalle auch in einem SDS-PAGE nach Schägger und Jagow getrennt (Abbildung 2.14). Obwohl es sich hierbei um ein denaturierendes Gel handelt und die Proben zuvor drei Minuten gekocht wurden, scheint es so, dass verschiedene NblA-Oligomere voneinander getrennt wurden. Leider gibt es hierfür keine Erklärung und es wurden auch keine weiteren Anstrengungen unternommen, dieses Phänomen aufzuklären. Jedoch ist auch hier im Vergleich zum NblA-Ausgangsmaterial keine Größenabnahme zu beobachten, die auf Proteolyse hätte schließen lassen. Demnach ist das verkürzte NblA-Modell lediglich auf die hohe Flexibilität der Proteinenden zurückzuführen.

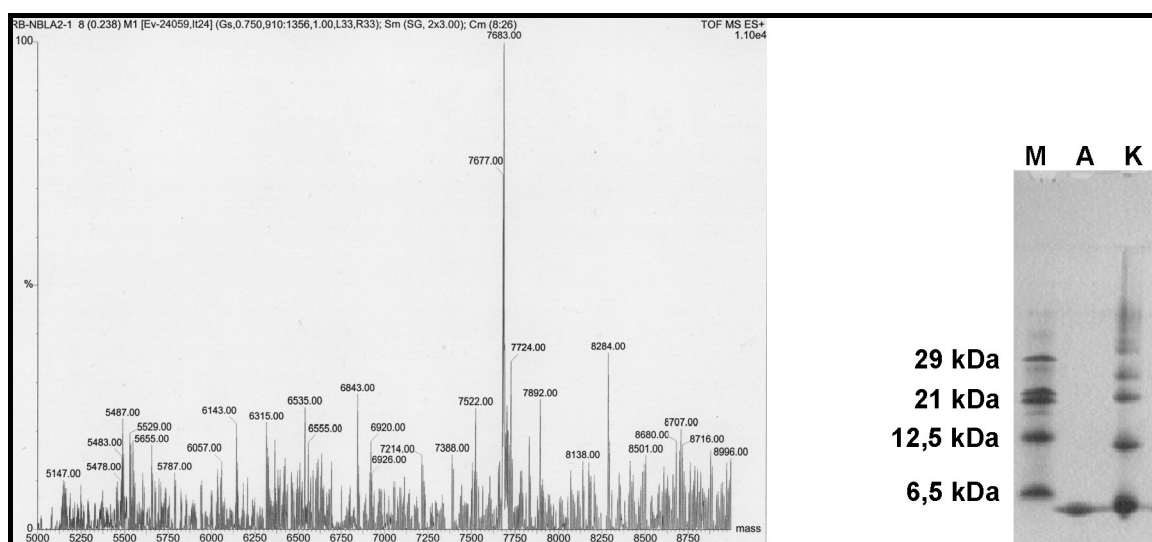


Abbildung 2.14: Nachweis des SeMet-NblA-Volllängenproteins im Kristall

Massenspektrum von aufgelösten SeMet-NblA-Kristallen, SDS-Page: M – Marker, A – SeMet-NblA-Ausgangsmaterial für die Kristallisation, K – aufgelöste SeMet-NblA-Kristalle

2.4.3 Röntgenbeugungsexperimente und ihre Auswertung

Die Kristalle wurden zunächst am Drehanoden-Generator bei 110 K auf ihre Diffraktionseigenschaften getestet. Hierbei streuten die Kristalle bis zu einer maximalen Auflösung von 2.8 Å. Am Messplatz ID14-4 an der ESRF, Grenoble (Frankreich), wurde mit 1.6 Å eine weitaus bessere Auflösung erzielt.

Vor der Aufnahme eines kompletten Datensatzes wurde ein Fluoreszenzscan zur Bestimmung der sogenannten *Peak*-Wellenlänge durchgeführt. Bei der hier ermittelten Wellenlänge von 0.9794 Å (entspricht 12,6553 keV) ist das anomale Signal, welches von den "schweren Streuern", hier Selen, verursacht und für die Bestimmung der initialen Phasen verwendet wurde, am größten.

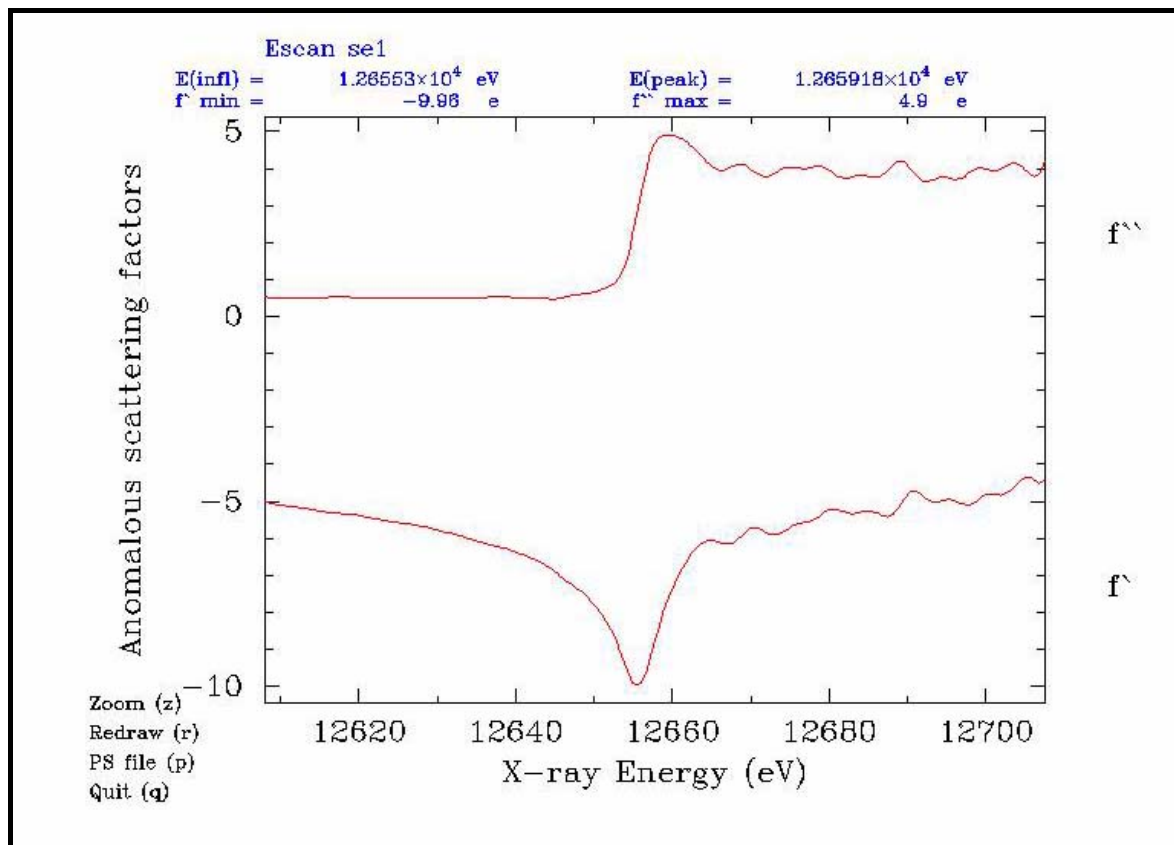


Abbildung 2.15: Auftragung von f' und f'' gegen die Energie entlang der K Absorptionskante von Selen

Die Röntgen-Fluoreszenz, die von einem Atom als Ergebnis der Absorption emittiert wird, ist dieser direkt proportional. Daher lässt sich der imaginäre Korrekturterm f'' , der auf den normalen atomaren Formfaktor bei anomaler Streuung angewendet wird ($f = f_0 + f' + if''$), auf

Grundlage der Fluoreszenzmessung berechnen. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der Schweratomlagen mit dem Programm SOLVE eingesetzt und in der Verfeinerung mit dem Programm REFMAC berücksichtigt.

Die Berechnung des imaginären Korrekturterms f'' aus dem Rohfluoreszenzspektrum erfolgte mit dem Programm CHOOCH (Evans und Pettifer, 2001). Der Plot als Ergebnis der Berechnung ist in Abbildung 2.15 dargestellt und gibt einen Wert von 4,9 für f'' an. Der f'' -Wert findet bei der hier genutzten SAD-Technik keine Anwendung.

Insgesamt wurden zwei Datensätze aufgenommen. Bei der *Peak*-Wellenlänge wurden 360 Aufnahmen mit einer jeweiligen Kristallrotation von 1° aufgenommen. Von einem zweiten Kristall wurden bei einer Wellenlänge von $0,9393 \text{ \AA}$ 180 Aufnahmen gesammelt, bei denen der Kristall ebenfalls jeweils um 1° gedreht wurde. Die Auswertung der einzelnen Datensätze erfolgte mit dem XDS-Paket (siehe Tabelle 2.1). Hierbei zeigte sich auch, dass die Reflexe in den höheren Auflösungsschalen ($1,61 - 1,80 \text{ \AA}$) des zweiten Datensatzes auf Grund schlechter statistischer Werte nicht für die Verfeinerung eingesetzt werden konnten.

Tabelle 2.1: Statistik der Datensammlung und -auswertung

	1. Datensatz (<i>Peak</i>)	2. Datensatz
Messplatz	ESRF ID14-4	ESRF ID 14-4
Wellenlänge(Å)	0,9794	0,9393
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
Dimensionen der Einheitszelle (Å, °)	43,1; 96,5; 105,2; 96,9	43,2; 95,9; 104,8; 97,0
Auflösung (Å)	28 – 2,22 (2,25 – 2,22) ¹⁾	20 – 1,80 (1,97 – 1,80)
Gemessene Reflexe ²⁾	220756	292512
Unabhängige Reflexe	80434 ⁴⁾	74292
Vollständigkeit (%)	96,5 (69,0)	99,8 (100)
R_{merge} ³⁾ (%)	5,4 (19,8)	6,9 (47,3)
$I/\sigma(I)$ (letzte Schale)	11,9 (3,8)	9,4 (2,8)
<i>Figure of merit</i> vor / nach der Dichtemodifikation	0,38 / 0,57	

¹⁾ Die Werte in Klammern gelten für die höchste Auflösungsschale.

²⁾ Die Werte gelten für $I/\sigma(I) \geq -3$

³⁾ Für die Definition des R_{merge} siehe (Diederichs und Karplus, 1997).

⁴⁾ Die Friedel-Paare wurden hier nicht zusammengefasst.

2.4.4 Phasierung, Strukturbau und –verfeinerung

Die initialen Phasen, mit denen eine erste Elektronendichtekarte berechnet werden konnte, wurden über die Lokalisation der Schweratomlagen anhand anomaler Signale unter Verwendung des Programms SOLVE bestimmt.

Jedes NblA-Molekül enthält drei Selenatome, die über den Einbau von Selenomethionin in das Protein inkorporiert wurden. Um jedoch Aufschluss über die Zahl der Selenatome in der asymmetrischen Einheit (ASU) zu erhalten, die für die Phasierung verwendet werden können, wurden (mit der Erwartung, dass NblA als Trimer vorliegt) Matthews Koeffizienten V_M berechnet (siehe Tabelle 2.2). Diese liegen im Allgemeinen für Kristalle globulärer Proteine im Bereich von 1,68 bis 3,53 Å³/Da und lassen eine Abschätzung über die mögliche Anzahl an Proteinmolekülen in der ASU zu. Demnach wurden 9 bis 15 Proteinketten, entsprechend 27 bis 45 Selenatome, in der ASU erwartet.

Tabelle 2.2: Die Berechnung der Matthews Koeffizienten dient der Abschätzung der Anzahl der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit

Anzahl der Proteinmoleküle / ASU	Matthews Koeffizient V_M	Lösungsmittelanteil im Kristall
3	9,6	87,1
6	4,8	74,2
9	3,2	61,3
12	2,4	48,4
15	1,9	35,6
18	1,6	22,7

Mit dem Programm SOLVE wurden 30 Schweratome gefunden (Tab. 4.3). Eine spätere Zuordnung der Schweratomlagen zu den Koordinaten der Selenatome im verfeinerten Modell zeigte, dass die ersten 24 gefundenen Schweratome den Selenatomen der Reste SeMet25 und SeMet41 von insgesamt 12 Proteinketten zugeordnet werden konnten. Die anderen fünf Schweratompositionen konnten nicht zugeordnet werden, wobei das Schweratom 26 an einer potentiellen Stelle eines N-terminalen Selenomethionins lokalisiert ist. Dass die meisten Selenatompositionen von N-terminalen Selenomethioninen nicht lokalisiert werden konnten, wird allgemein häufig beobachtet und ist auf die große Beweglichkeit der Proteintermini zurückzuführen. Charakteristisch für die letzten

Schweratompositionen in Tabelle 2.3 sind auch die geringen relativen Besetzungszahlen (rel. Occ.) im Zusammenhang mit eher hohen Temperaturfaktoren.

Tabelle 2.3: Parameter der mit SOLVE berechneten Schweratomlagen

Nummer	Atomtyp	x	y	z	rel. Occ.	Temperaturfaktor
1	Se	8.543	25.962	37.652	1.53	44.9
2	Se	15.723	91.086	40.780	1.07	46.6
3	Se	0.131	2.026	10.897	1.47	43.0
4	Se	41.859	73.788	8.653	1.35	42.3
5	Se	24.930	82.608	35.919	1.23	39.8
6	Se	17.301	67.797	46.367	1.71	48.3
7	Se	5.938	28.979	12.230	1.48	58.0
8	Se	34.366	89.914	17.169	1.05	36.0
9	Se	32.649	75.841	16.907	0.95	46.3
10	Se	0.176	33.648	33.903	1.45	56.6
11	Se	14.627	87.385	44.899	0.92	51.9
12	Se	36.462	24.805	41.339	0.97	55.6
13	Se	21.149	58.560	36.878	1.09	57.0
14	Se	26.716	68.615	38.007	0.92	43.8
15	Se	1.019	93.930	7.054	0.75	43.7
16	Se	38.543	66.076	19.774	1.16	60.0
17	Se	21.365	28.156	8.561	1.17	60.0
18	Se	-2.976	22.616	42.255	0.89	56.1
19	Se	14.615	63.833	47.663	1.15	60.0
20	Se	33.652	5.760	18.827	0.77	35.2
21	Se	14.290	35.409	17.397	1.03	46.5
22	Se	17.474	26.606	7.394	0.75	54.6
23	Se	25.536	94.686	33.047	1.03	37.5
24	Se	15.584	92.347	40.537	0.92	29.8
25	Se	1.300	69.499	8.049	0.62	45.5
26	Se	12.814	21.054	40.279	0.32	41.1
27	Se	12.396	92.565	41.799	0.24	39.6
28	Se	18.389	19.397	49.127	0.29	60.0
29	Se	23.069	3.478	25.511	0.31	59.5
30	Se	32.836	1.666	0.641	0.35	60.0

Die aus den Schweratompositionen berechneten Phasen hatten eine mittlere *figure of merit* von 0,38. Ein Bereich der daraus berechneten Elektronendichtekarte ist in Abbildung 2.16 (links) dargestellt. Die darauffolgende Prozedur der Dichtemodifikation mit dem Programm RESOLVE führte zu einer enormen Verbesserung der Qualität der Elektronendichtekarte (siehe Abbildung 2.16 rechts). Hierbei wurden die Schritte *Solvent flattening*, *Histogram matching* und *NCS averaging* miteinander kombiniert. Die daraus resultierende mittlere *figure of merit* betrug 0.57. Das Programm RESOLVE wurde auch zum Bau eines ersten Proteinmodells verwendet. Somit konnten allein in diesem Schritt 60% der Aminosäuren der 12 Proteinketten in die Elektronendichtekarte modelliert werden. Das längste gebaute Fragment enthielt bereits die Reste 7 bis 52, das zum Teil mehrfach zum Bau anderer Proteinketten in der ASU herangezogen wurden.

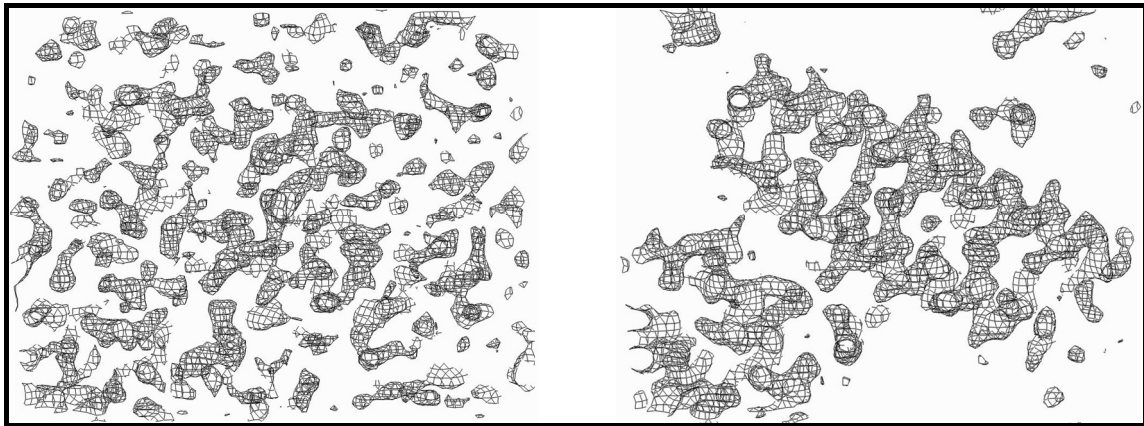


Abbildung 2.16: Elektronendichte vor (links) und nach (rechts) der Dichtemodifikation

Es wurde in beiden Fällen der gleiche Bereich der Elektronendichtekarte bei gleicher Konturierung von $1,5 \sigma$ dargestellt. Für die Dichtemodifikation wurde *Solvent flattening*, *Histogram matching* und die Mittelung über nicht-kristallographische Symmetrien verwendet.

Die Strukturverfeinerung erfolgte mit dem Programm REFMAC. Im ersten Schritt wurde eine Verfeinerung der starren Körper gegen den *Peak*-Datensatz bis zu einer Auflösung von $2,22 \text{ \AA}$ durchgeführt, in dem jedes von RESOLVE gebaute Fragment eine starre Gruppe darstellte. Dieses ergab in einem Modell mit einem freien R-Wert von 0,382 und einem R-Wert von 0,336. Der weitere Modellbau und die Ausrichtung der Seitenketten mit dem Programm O führten zu einer weiteren Verbesserung der R-Werte und somit einer Annäherung der berechneten an die beobachteten Strukturfaktoramplituden. Dieses Modell wurde anschließend gegen den 2. Datensatz weiter verfeinert, wobei die zum Teil bereits

eingebauten Wassermoleküle nicht mit übernommen wurden. Aufgrund geringer Unterschiede in den Zelldimensionen wurde auch hier mit einer Verfeinerung der starren Körper begonnen. Der Fortschritt der Verfeinerung ist für einige ausgewählte Schritte aus Tabelle 2.4 ersichtlich.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Verfeinerung war der Einbau von 320 Wassermolekülen, mit Temperaturfaktoren unter 65 \AA^2 , deren Positionen mit Arp/wArp bestimmt wurden. Dieses verringerte den freien R-Wert um ein Prozent, vergrößerte aber auch die Differenz der beiden R-Faktoren zueinander. Auch die Einführung der sogenannten *riding hydrogens* führte zu einem Modell, mit dem eine weitere Annäherung der kalkulierten an die beobachteten Strukturfaktoramplituden erreicht wurde. Dieses wird durch die Verringerung beider R-Werte um 0,5% reflektiert. Am Ende der Verfeinerung wurden TLS-Parameter zur Beschreibung anisotroper atomarer Auslenkungen eingeführt (siehe Tabelle 2.5 für Statistik).

Tabelle 2.4: Fortschritt der Verfeinerung¹⁾

Verfeinerungsschritt	R / R _{free} vorher	R / R _{free} nachher
Starre-Körper-Verfeinerung nach RESOLVE ²⁾	-	0,336 / 0,382
Starre-Körper-Verfeinerung mit <i>Peak</i> -Datensatz-Modell gegen den 2. Datensatz ³⁾	0,225 / 0,267	0,277 / 0,307
Einbau von Wasser (Arp/wArp)	0,245 / 0,278	0,223 / 0,268
Einführung von <i>riding hydrogens</i>	0,218 / 0,268	0,212 / 0,262
TLS-Verfeinerung	0,199 / 0,241	0,182 / 0,217

¹⁾Der Fortschritt der Verfeinerung wird für einige ausgewählte Schritte gezeigt. Die manuelle Anpassung des Modells an die Elektronendichte zwischen den hier gezeigten Verfeinerungsschritten und die daraus resultierende Änderung des R-Faktors werden hier nicht dargestellt.

²⁾Verfeinerung gegen *Peak*-Datensatz bis zu einer Auflösung von $2,22 \text{ \AA}$.

³⁾Hier wurde Daten bis $1,61 \text{ \AA}$ verwendet, anschließend wurden jedoch nur noch Daten bis $1,80 \text{ \AA}$ eingesetzt.

Tabelle 2.5: Statistik des verfeinerten Modells

Auflösung (Å)	20.00 – 1.80
R-Faktor (%) / R _{free} ¹⁾ (%)	18.2 / 21.7
Anzahl der Proteinketten pro ASU	12
Anzahl der Proteinatome	5182
Anzahl der Wassermoleküle	254
Anzahl der Ethylenglykole	2
mittlerer B-Faktor für Hauptkettenatome (Å ²)	46.9
mittlerer B-Faktor für Seitenkettenatome (Å ²)	56.0
mittlerer B-Faktor für nicht-Proteinatome (Å ²)	52.9
rmsd. ²⁾ Bindungslänge (Å)	0.015
rmsd. ²⁾ Bindungswinkel (°)	1.48
rmsd. ²⁾ Torsionswinkel (°)	4.6
rmsd. ²⁾ Planarität (Å)	0.006
rmsd. ³⁾ B-Faktoren für Hauptkettenatome (Å ²)	3.8
rmsd. ³⁾ B-Faktoren für Seitenkettenatome (Å ²)	7.1
Ramachandran Diagramm erlaubt / zusätzlich erlaubt / nicht erlaubt (%)	99.8 / 0.2 / 0.0

¹⁾R-Faktor = $\frac{\sum ||F_{\text{beob}}| - |F_{\text{kalk}}||}{|F_{\text{beob}}|}$ wird für 95% zufällig selektierter Reflexe berechnet. R_{free} wurde für die anderen 5% der Reflexe berechnet.

²⁾mittlere Abweichung von Standardwerten

³⁾gilt für benachbarte Haupt- bzw. Seitenkettenatome

Somit konnte letztendlich ein Modell erzeugt werden, das 619 der erwarteten 780 Aminosäurereste (79,4%) mit 254 Wassermolekülen sowie zwei Ethylenglykole enthält und einen R-Wert / freien R-Wert von 18,2% bzw. 21,7% hat. Unter Berücksichtigung aller Reflexe beträgt der R-Wert 18,4%. In Tabelle 2.6 sind die gebauten Aminosäuren der 12 in der asymmetrischen Einheit vorkommenden Proteinketten, die mit den Buchstaben A bis L bezeichnet wurden, aufgelistet. Ferner muss darauf hingewiesen werden, dass im Modell die Seitenketten der Reste Ile A5, Glu A6, Ile B5, Glu B6, Gln D3, Glu D6, Ile E5, Glu E10, His E54, Ile F5, Glu F6, His F54, Pro G4, Lys G53, Ile H5, Glu H6, Lys H53, His H54, Pro I4, Glu I6, Leu J7, Trp K56, Glu L6 sowie His L54 nach dem C β -Atom und His G54 bereits nach dem C α -Atom abgeschnitten wurden, da die Elektronendichte in diesen Bereichen von unzureichender Qualität war.

Tabelle 2.6: Aminosäuren, die im finalen Proteinmodell enthalten sind

Kette	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Position	5-56	5-54	6-58	2-57	5-54	5-54	4-56	5-54	4-57	7-57	7-56	5-54
Anzahl	52	50	53	56	50	50	53	50	54	51	50	50

2.4.5 Qualität der Struktur

Die Qualität der verfeinerten Struktur wurde nach geometrischen Gesichtspunkten mit den Programmen PROCHECK und WHATCHECK evaluiert.

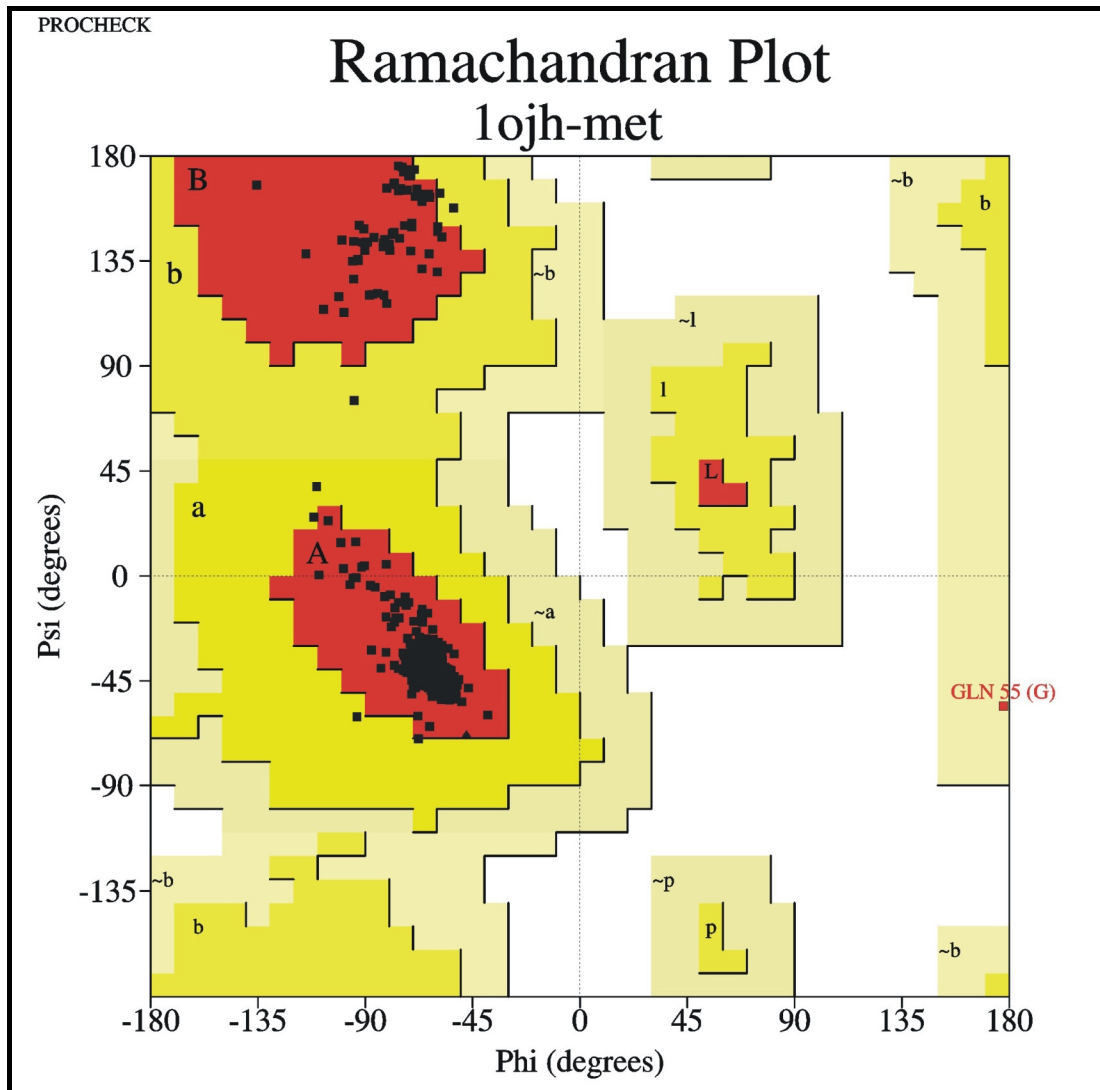


Abbildung 2.17: Ramachandran-Diagramm aller Proteinketten einer asymmetrischen Einheit

Da PROCHECK Selenomethionin als Bestandteil eines Proteins nicht akzeptiert, wurde diese Aminosäure in der PDB-Datei in Methionin umgewandelt. Rot: energetisch stark favorisierte Region, gelb: zusätzlich erlaubte Region, beige: großzügig erlaubte Region, A: rechtsgängige α -Helix, B: β -Faltblatt, L: linksgängige α -Helix; Die Analyse basiert auf 118 Strukturen mit Auflösungen von wenigstens 2 Å und R-Faktoren nicht größer als 20%.

Das Ramachandran-Diagramm (Ramachandran und Sasisekharan, 1968) des gesamten Proteinmodells (Abbildung 2.17) zeigt, dass abgesehen von Glutamin 55 der Kette G, die

Phi- und Psi-Winkel aller Aminosäuren in den favorisierten bzw. zusätzlich erlaubten Regionen liegen.

Die Verfeinerung der Struktur mit geometrischen Beschränkungen (*Restraints*) führte zu einer guten Übereinstimmung der Parameter mit den Standardparametern von Proteinen (Engh und Huber, 1991). So liegen die rms-Abweichungen der Bindungslängen bei 0,015 Å, die der Bindungswinkel bei 1,48° und die der Torsionswinkel bei 4,6° (siehe auch Tabelle 2.5).

Der mittlere Temperaturfaktor der Struktur liegt bei 51,7 Å² und spiegelt somit die hohe Flexibilität der Proteinketten wieder. Insbesondere die Termini der Proteinketten weisen große Unordnung auf (Abbildung 2.18), die sich in einer unzureichenden Qualität der Elektronendichte dieser Bereiche für den Modellbau widerspiegelt.

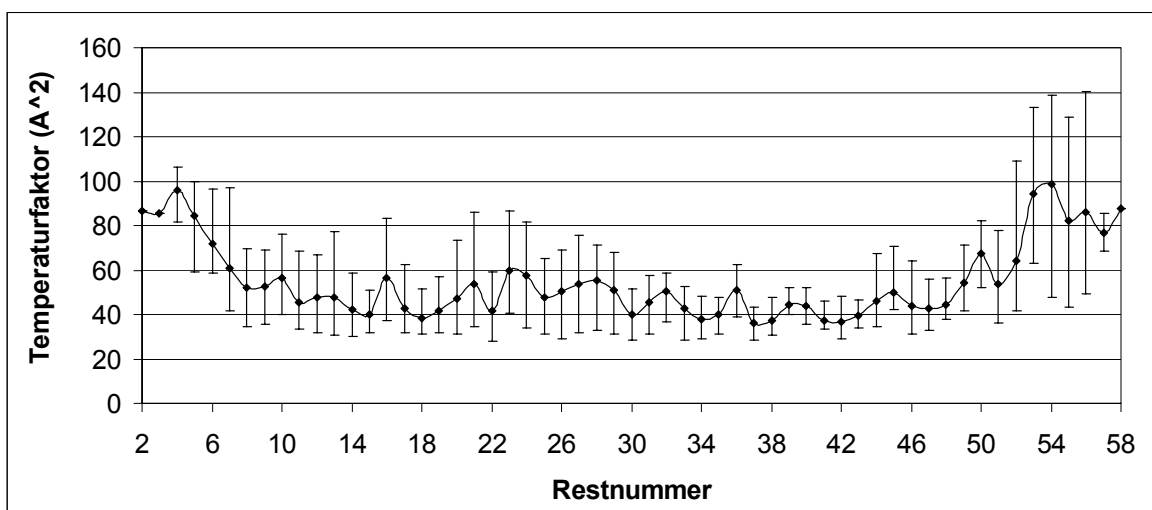


Abbildung 2.18: Verlauf des mittleren Temperaturfaktors

Hier wurden die mittleren Temperaturfaktoren der 12 Proteinketten in der asymmetrischen Einheit mit den entsprechenden Maximal- und Minimalwerten gegen die Restnummer aufgetragen.

Neben den Bereichen der Proteinketten, die aufgrund ihrer hohen Flexibilität unzureichende Elektronendichten aufweisen, gibt es doch für die hier erreichte Auflösung des Diffraktionsexperimentes von 1,8 Å hervorragend definierte Bereiche der Elektronendichtekarte, die - wie auch in anderen Strukturen - speziell im hydrophoben Kern zu finden sind (siehe Abbildung 2.19).

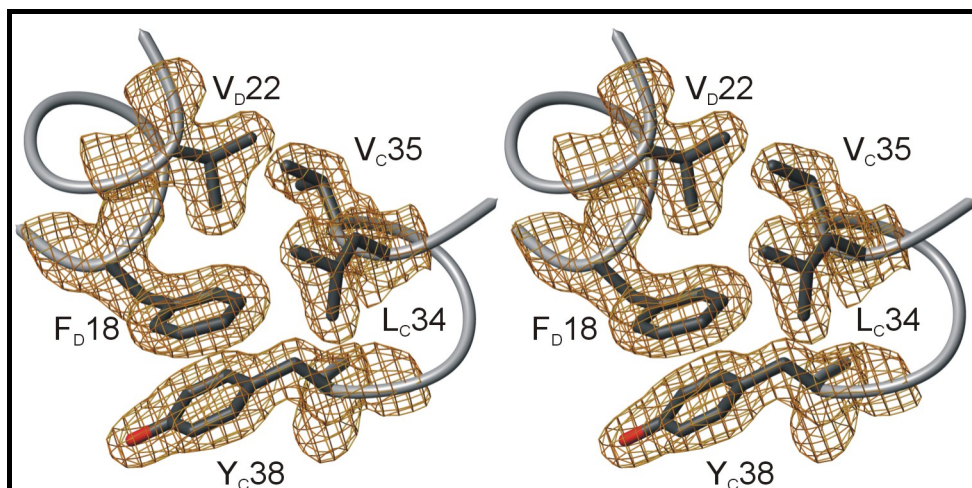


Abbildung 2.19: $2F_o-F_c$ -Elektronendichte in dem finalen Modell konturiert bei 1σ , mit Resten, die in die Dimerbildung von NblA involviert sind. (entspricht dem Bereich von Box A in Abbildung 2.22)

2.4.6 Die Struktur von NblA

Das kleine NblA-Protein von 65 Aminosäuren besteht aus zwei α -Helices, die im Mittel in einem Winkel von $26,5^\circ$ antiparallel zueinander (keilförmig) angeordnet sind (Abbildung 2.20). Die erste Helix, α_1 , erstreckt sich von Ser8 bis Gln23, Asn24 bzw. SeMet25; die zweite Helix, α_2 , wird von den Aminosäuren Ser26 bis Lys53, His54 bzw. Gln56 gebildet, je nachdem welches Molekül in der asymmetrischen Einheit betrachtet wird.

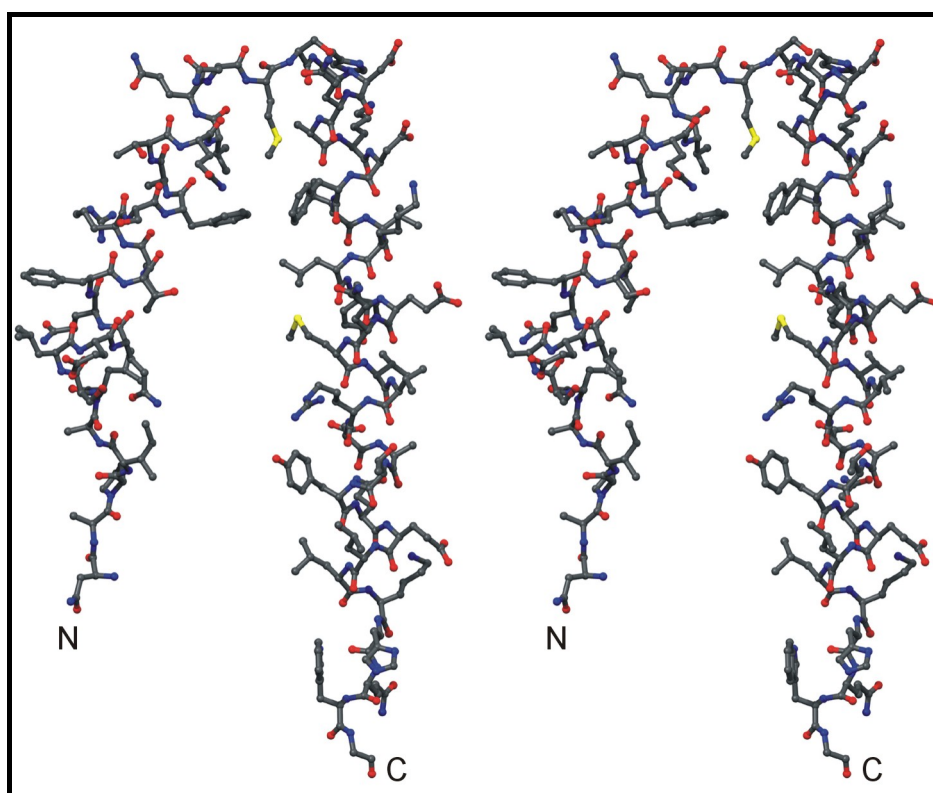


Abbildung 2.20: Stereoabbildung eines NblA-Monomers als Kugel-Stab-Modell

Die interne Stabilität der Proteinketten wird durch das für α -Helices typische Wasserstoffbrückenmuster des Rückgrats gewährleistet. Die kurze Helix, α_1 , wird am N-Terminus durch den Rest Ser8 stabilisiert, der eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe und dem Amidstickstoff von Gln11 ausbildet. Für eine weitere Stabilisierung dieser Region des Proteins ist die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Gln11 zum Amidstickstoff von Ser8 verantwortlich. Eine sehr ähnliche Anordnung ist auch am N-Terminus der langen Helix anzutreffen. Hier wird sowohl eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff von

Ser26 und dem Carbonylsauerstoff der Seitenkette von Gln29 als auch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxylsauerstoff von Ser26 und dem Amidstickstoff der Seitenkette von Gln29 ausgebildet. Die Kehre zwischen den beiden Helices wird von den Resten Asn24, SeMet25 und Ser26 gebildet. Hierbei haben diese Aminosäuren mittlere Torsionswinkel von -91° , -82° bzw. -73° für Phi und -1° , 145° bzw. 170° für Psi. In den meisten NblA-Molekülen der asymmetrischen Einheit wird die Kehre durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff der Seitenkette von Asn24 und dem Carbonylsauerstoff von Thr20 stabilisiert. Diese Wasserstoffbrücke kann aber auch als *Capping* des carboxyterminalen Endes der kurzen Helix betrachtet werden.

Zwei dieser NblA-Monomere bilden die grundlegende strukturelle Einheit von NblA, ein 4-Helixbündel, bei dem sich die Spitzen der Keile auf der gleichen Seite des Dimers überlagern (Abbildung 2.21 und Abbildung 2.22). Die beiden Moleküle des Dimers sind durch eine zweizählige nichtkristallographische Achse ineinander überführbar und schirmen im Durchschnitt eine lösungsmittelzugängliche Fläche von 1553 \AA^2 pro Monomer ab, was etwa 30% der totalen lösungsmittelzugänglichen Fläche entspricht.

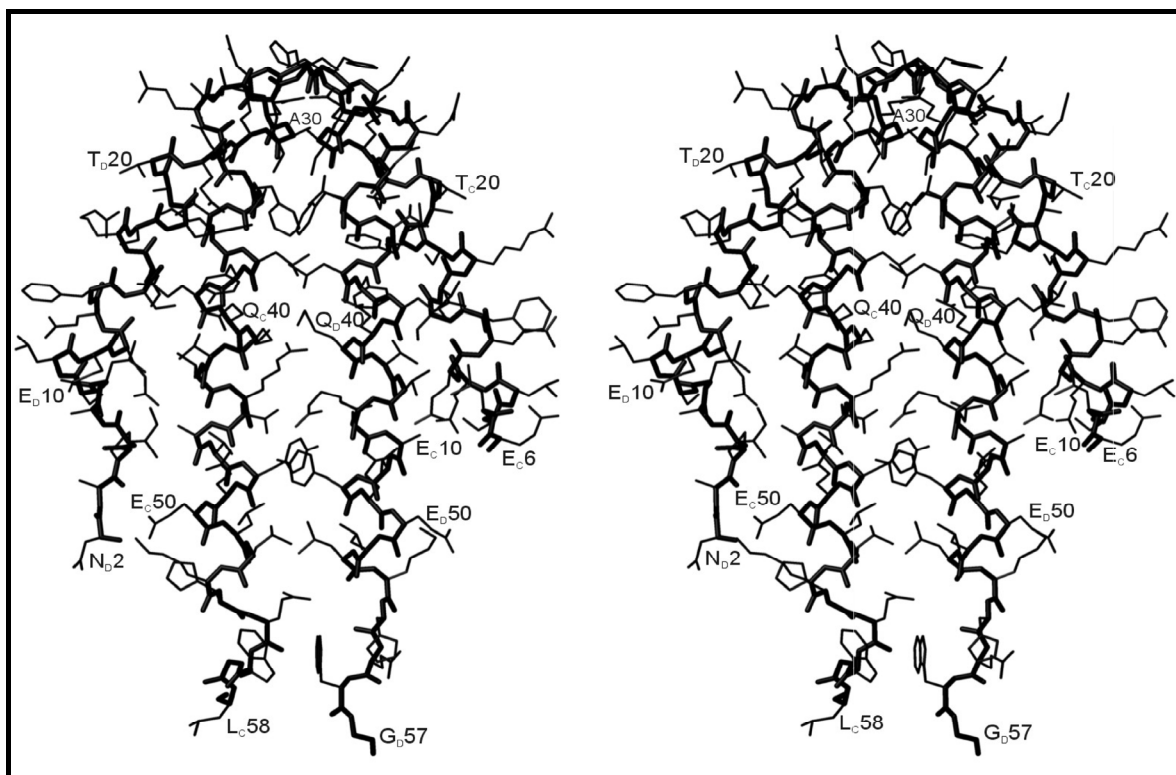


Abbildung 2.21: Stereodarstellung eines NblA-Dimers

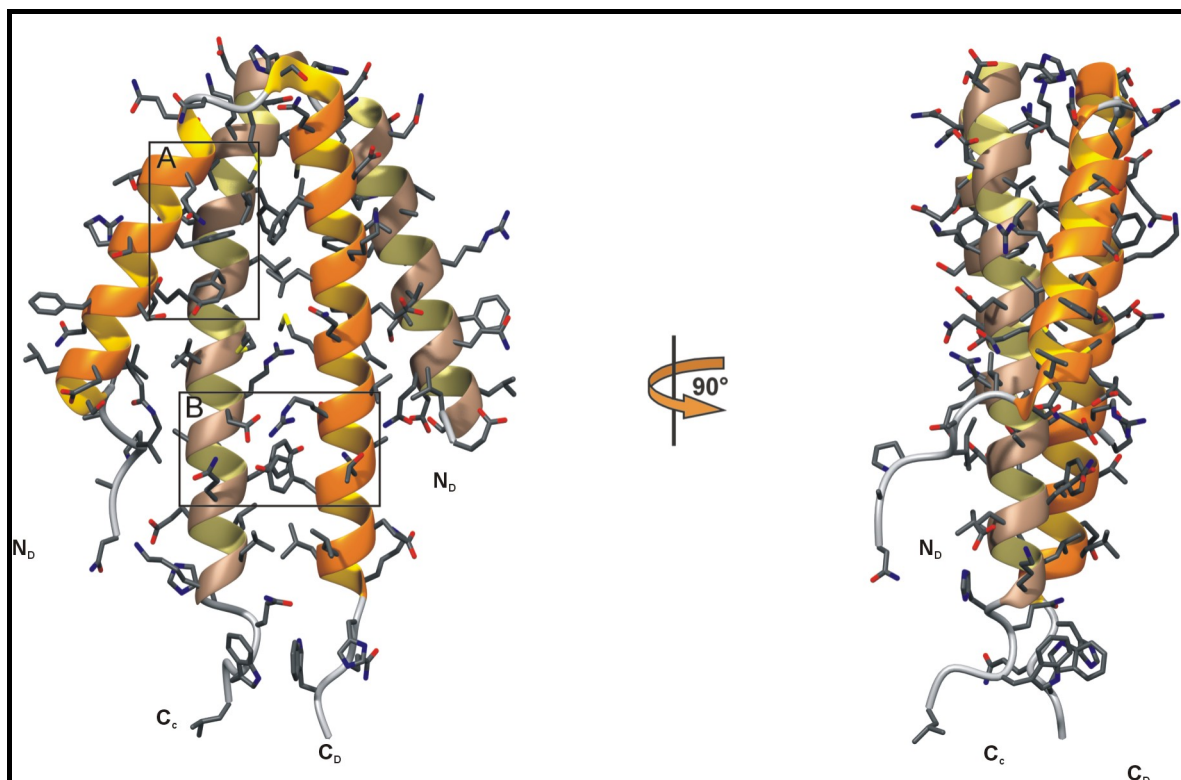


Abbildung 2.22: Das NblA-Dimer in der Bänderdarstellung

Der Bereich von Box A wird als $2F_o - F_c$ -Elektronendichte in Abbildung 2.19 dargestellt. Die polaren Wechselwirkungen in Box B werden in Abbildung 2.24 gezeigt.

Die beiden langen Helices (α_2) sind über die Reste Ala30, Leu34, Leu37 und SeMet4 einer jeden Kette in Kontakt und bilden so eine langgestreckte hydrophobe Oberfläche, die von beiden Seiten von Ile15, Phe18 und Ile22 der beiden kurzen Helices flankiert wird und zusammen mit Val35 den hydrophoben Kern des Dimers bildet (Abbildung 2.23). Hier interagiert Phe18 mit Tyr38 über die aromatischen Ringe ihrer Seitenketten. Die Hauptkette von SeMet25 und die Seitenkette von Lys31 schirmen den oberen Teil des hydrophoben Kerns vom Lösungsmittel ab. Auf Grund der flachen Anordnung der beiden Monomere handelt es sich hier jedoch nicht um einen hydrophoben Kern im klassischen Sinne.

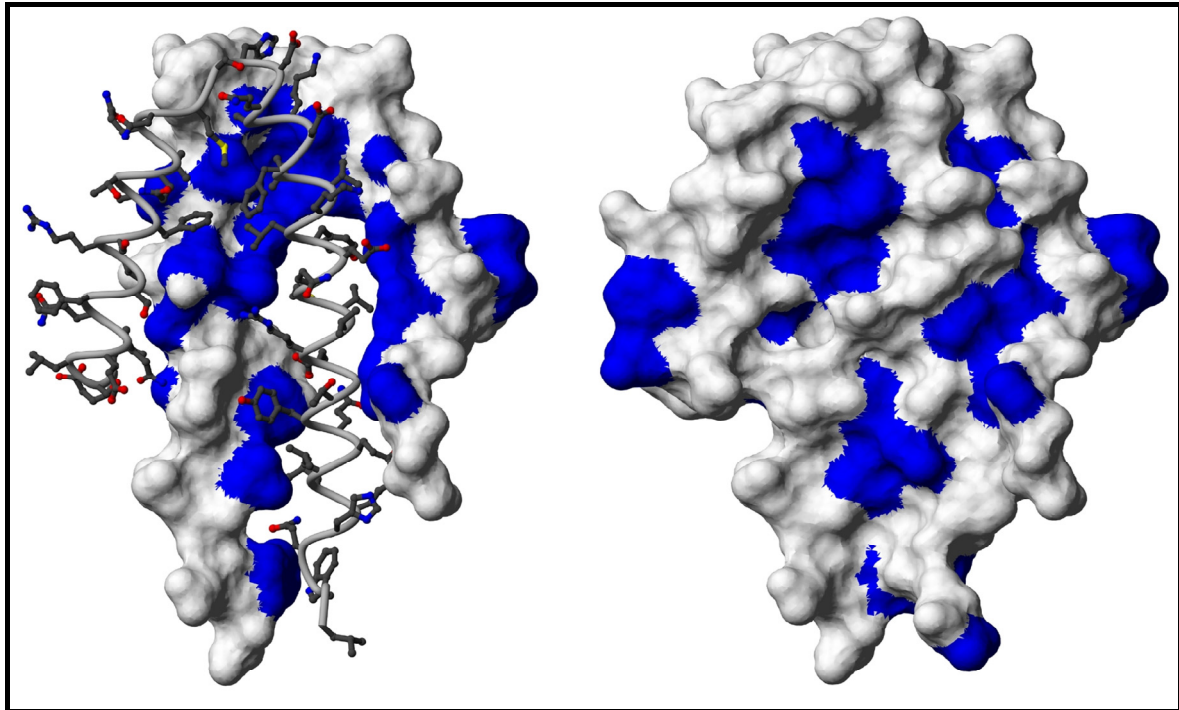


Abbildung 2.23: Oberflächendarstellung von Nbla

Hydrophobe Bereiche wurden blau hervorgehoben. In a) ist deutlich der langgestreckte hydrophobe Bereich der Proteinkette D dargestellt, der maßgeblich zur Dimerbildung mit der Kette C beiträgt. In b) wird das CD-Nbla-Dimer in der Oberflächendarstellung gezeigt.

Zusätzlich zu den zahlreichen hydrophoben Interaktionen wird das Dimer auch durch wenige polare Kontakte, die in allen sechs Dimeren der asymmetrischen Einheit gefunden werden, stabilisiert. Diese sind zwischen der Carboxylatgruppe von Glu45 von Molekül A und dem Guanidiniumrest von Arg44 sowie der Hydroxylgruppe von Tyr48 des B-Moleküls. Dieses polare Netzwerk wird weiter durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amidstickstoff der Seitenkette von Gln49 und dem Hydroxylsauerstoff von Tyr48 des Partnermoleküls sowie der Carboxylatgruppe von Glu45 innerhalb der Proteinkette stabilisiert (Abbildung 2.24).

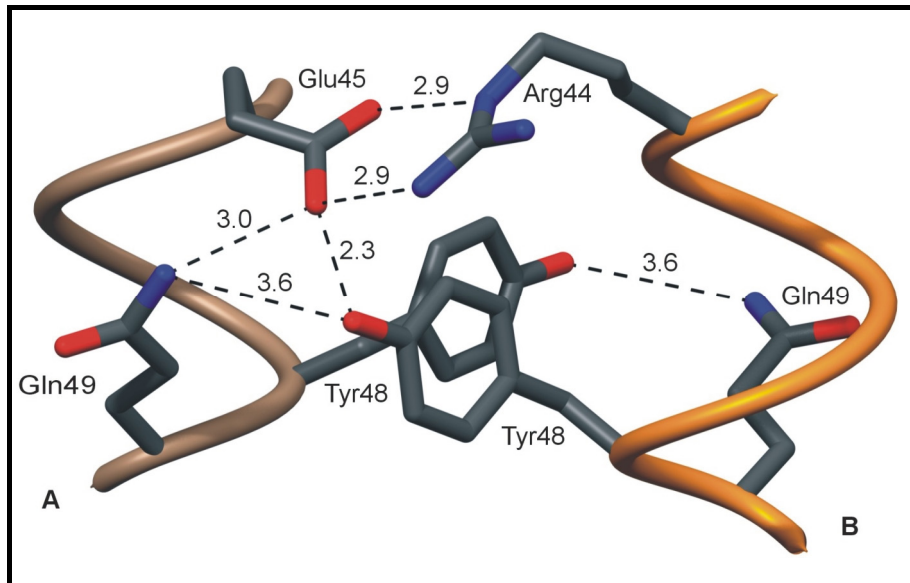


Abbildung 2.24: Polare Wechselwirkungen an den Enden der C-terminalen Helices bewirken eine weitere Stabilisierung der Dimere.

Die Distanzwerte wurden in Ångström (Å) angegeben.

In Abbildung 2.25 sind nochmals alle Kontakte, die im Dimer zwischen zwei NblA-Molekülen bestehen, graphisch dargestellt. In diesem *Linkage*-Plot wird neben der jeweiligen Kontaktfläche auch der Charakter der Bindung angegeben.

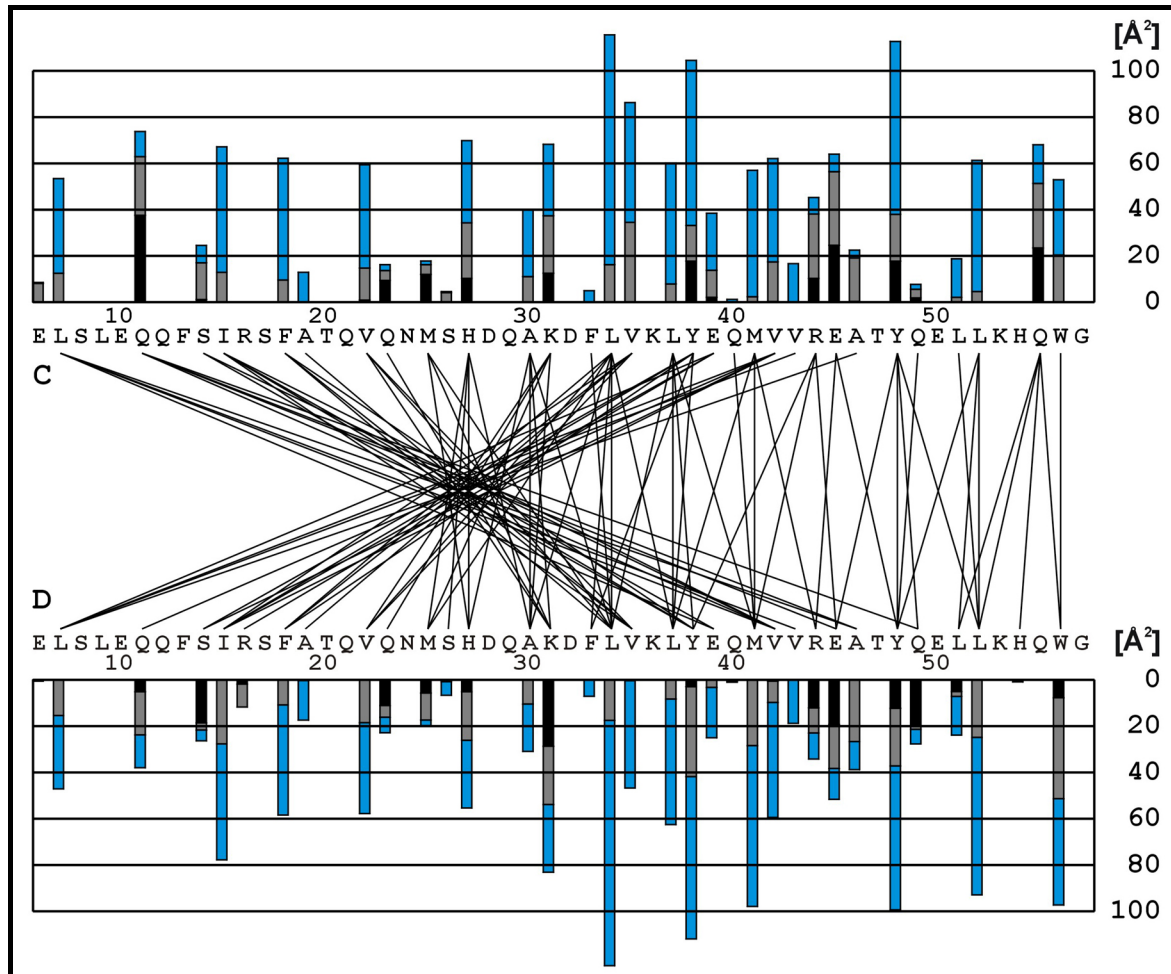


Abbildung 2.25: Linkage-Plot zur Darstellung der Dimerisierungskontakte von NblA

Der Linkage-Plot wurde für das Dimer CD mit dem Programm XSAE¹ erstellt. Aminosäuren, die während der Dimerisierung in Kontakt treten, sind durch schwarze Linien miteinander verbunden. Der Charakter der Bindung wird durch den Farbcode der Balken, die durch ihre Länge auch die Kontaktfläche angeben, gekennzeichnet: blau – hydrophob, schwarz – polar, grau – gemischt. Dieser Linkage-Plot zeigt deutlich den vorwiegend hydrophoben Charakter der Wechselwirkungen zwischen zwei Monomeren und macht deutlich, dass die N-terminalen Teile von NblA (Reste 6-24) untereinander keine Kontakte eingehen.

Die Oberfläche des NblA-Dimers (Abbildung 2.26) ist im Gegensatz zum NblA-Monomer gleichmäßig von polaren Resten überzogen, was unter anderem durch die guten Löslichkeitseigenschaften im wässrigen Milieu reflektiert wird.

¹ Broger, C., XSAE Vers. 1.5 Clemens.Broger@Roche.com

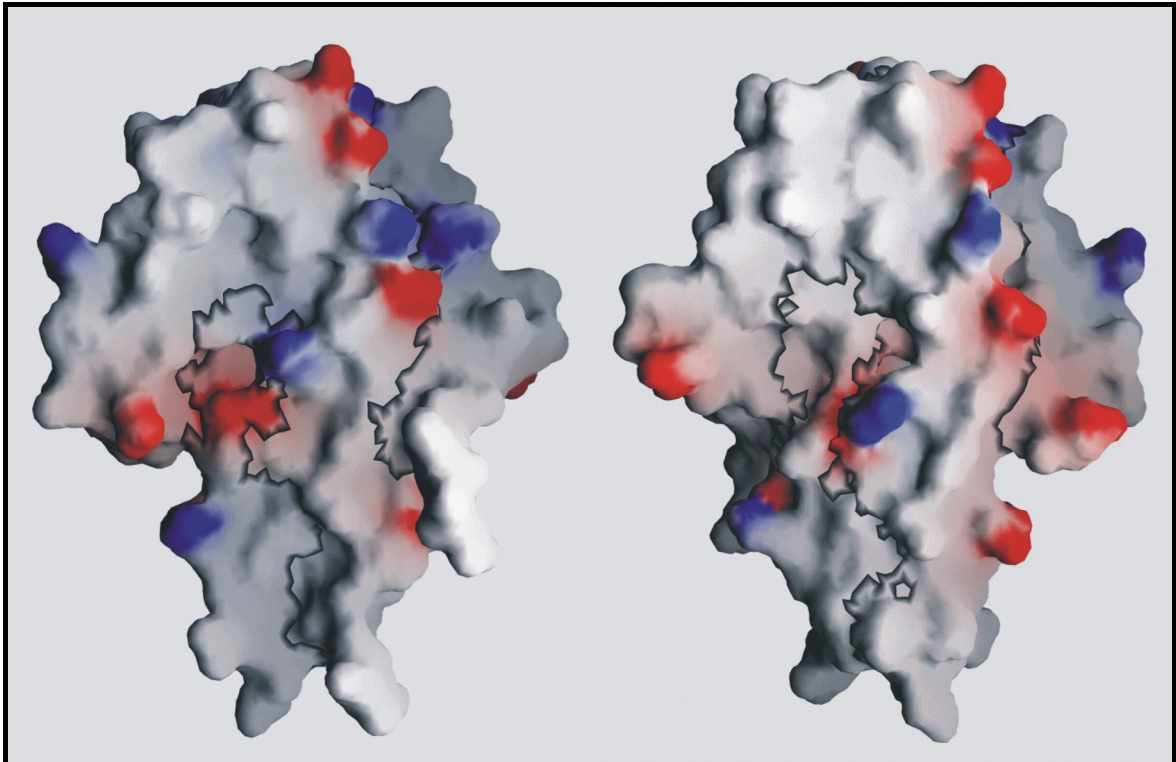


Abbildung 2.26: Oberflächenpotentialdarstellung des NblA-Dimers

Potentiale von -10 kT/e und weniger sind rot dargestellt, neutrale Potentiale (0 kT/e) farblos und Potentiale von $+10$ kT/e und mehr blau. Es ist sowohl die Vorder- als auch die Rückansicht dargestellt.

2.4.7 Kristallpackung und nicht-kristallographische Symmetrie

Die Einheitszelle der primitiv monoklinen Raumgruppe $P2_1$ besteht aus zwei asymmetrischen Einheiten, jede davon enthält 12 NblA-Moleküle. Demnach umfasst die Einheitszelle insgesamt 24 Proteinketten.

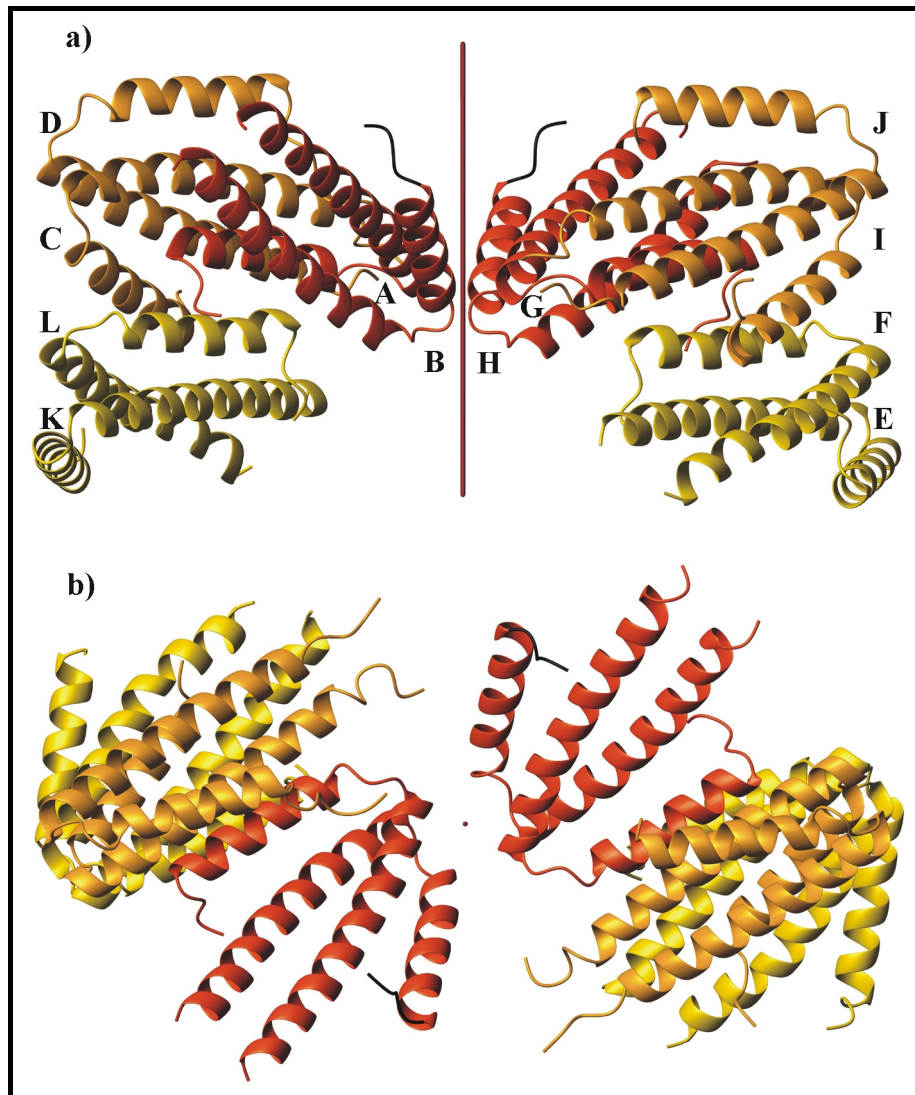


Abbildung 2.27: Die asymmetrische Einheit wird durch zwei Hexamere gebildet, die über eine NCS miteinander verbunden sind.

a) Darstellung erfolgte entlang der a-Achse; b) Darstellung erfolgte entlang der pseudo-zweizähligen Rotationsachse.

Das Zellvolumen beträgt 430877 \AA^3 mit einem Lösemittelgehalt von 47%, dieses entspricht einem Matthews-Koeffizienten von $2,3 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Die 12 NblA-Moleküle in der asymmetrischen Einheit sind so geordnet, dass jeweils drei Dimere ein Hexamer bilden,

welches zu einem weiteren Hexamer über eine nicht-kristallographische zweizählige Rotationsachse in Verbindung steht (Abbildung 2.27).

Die Rotationsachse ist durch die Polarwinkel $\omega = 94,2^\circ$, $\phi = -90,4^\circ$ und $\kappa = 179,1^\circ$ definiert. Sie liegt zu keiner der Zellachsen parallel, was auf eine höhere Raumgruppensymmetrie hätte schließen lassen können. Ferner beträgt der Winkel zwischen der Rotationsachse und dem Vektor der Massenschwerpunkte der beiden Hexamere $88,7^\circ$; demnach handelt es sich hier um eine nahezu reine Rotation, das heißt ohne Translationsanteil. Trotz der geringen rms-Abweichung (root mean square, Quadratwurzel des Mittelwertes der quadrierten Abstände äquivalenter Atome) von 0,63 der Ortsparameter der $C\alpha$ -Atome (Reste 7-54) die die hohe Ähnlichkeit der beiden Hexamere widerspiegelt, wurde diese NCS nicht für die Strukturverfeinerung berücksichtigt.

Die Hexamere selbst bilden relativ dicht gepackte Bereiche innerhalb der Elementarzelle, die von verhältnismäßig großen Solvensbereichen flankiert sind (Abbildung 2.28). Korrekterweise muss auch hier wieder darauf hingewiesen werden, dass die nicht modellierten Proteinkettentermini (das entspricht 20% der Proteine) auch dem Lösemittelbereich zugerechnet werden.

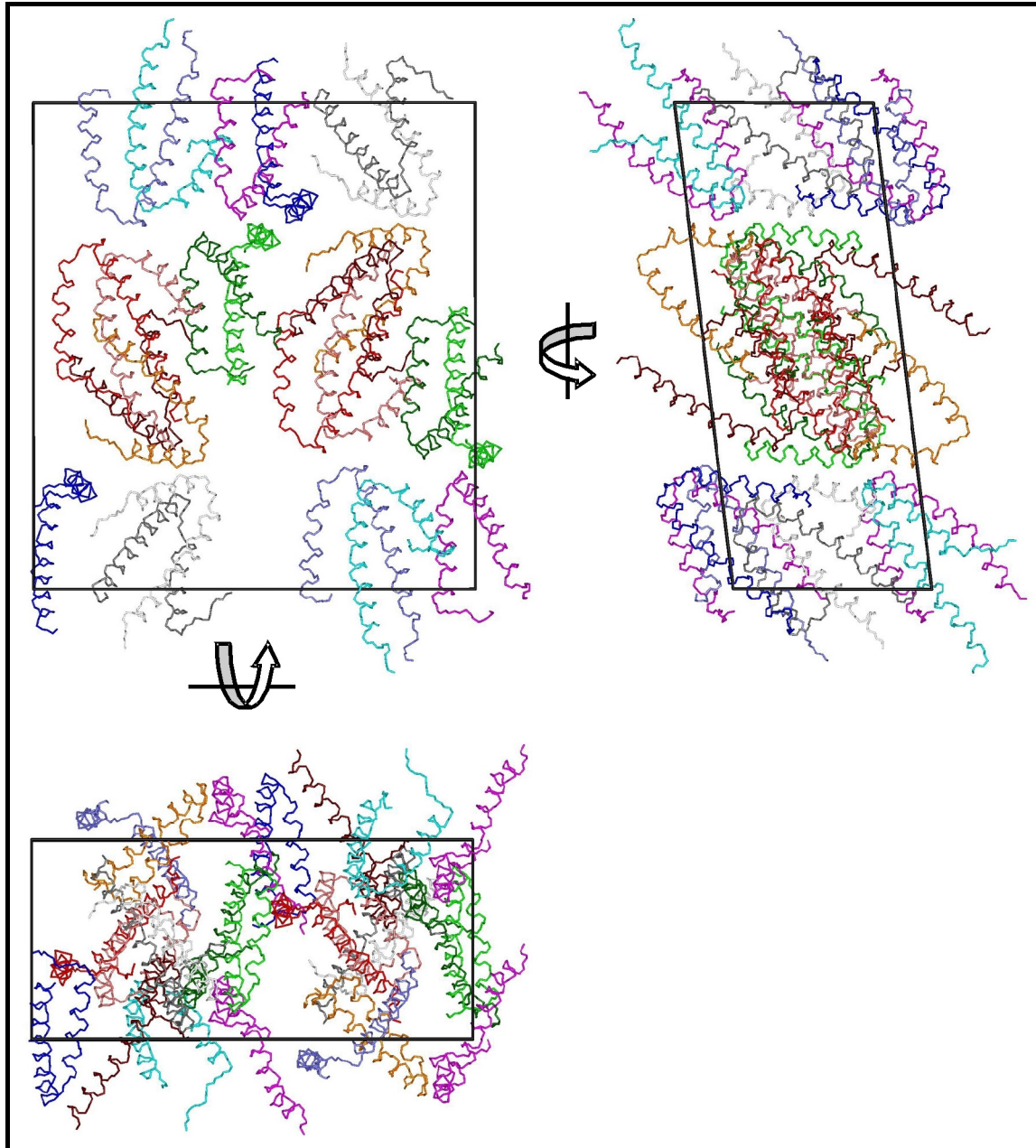


Abbildung 2.28: Kristallpackung von NblA in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$

Die gesamte Einheitszelle wird in drei Raumrichtungen dargestellt, entlang der a -, der b - und der c - Achse.

Durch die flache Anordnung der helikalen Strukturen innerhalb der Dimere ist die Struktur sehr flexibel, wird jedoch durch zahlreiche Kristallkontakte stabilisiert. Dieses wird besonders bei den C-terminalen Helices der Dimere CD und IJ deutlich, die mit den Dimeren AB bzw. GH tetramere Strukturen ausbilden. So erfolgt, hier am Beispiel von CD, zum einen eine Stabilisierung durch die Bildung eines 3-Helix-Bündels mit der N-terminalen Helix der Proteinkette A, zum anderen kommt es zur Ausbildung eines

ausgeprägten Wasserstoffbrückennetzwerkes mit der carboxyterminalen Helix des symmetrieverwandten Moleküls der Proteinkette A und ihrem Dimerisierungspartner, der Kette B (Abbildung 2.29).

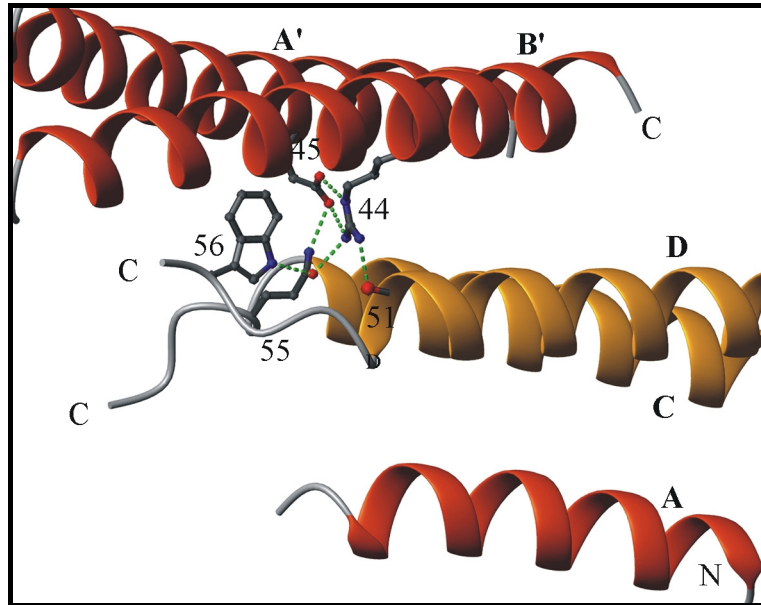


Abbildung 2.29: Kristallpackungskontakte führen zu signifikant geringeren B-Faktoren

Exemplarisch wird hier das CD-Dimer gezeigt, das durch Kristallpackungskontakte zum AB-Dimer und A'B'-Dimer stabilisiert wird. Die Proteinketten wurden mit Fettdruck bezeichnet. A' ist das symmetrieverwandte Molekül von A. B' ist der Dimerisierungspartner von A'.

2.4.8 Vergleich der 12 NblA-Proteine in der asymmetrischen Einheit

Wie soeben erwähnt, gibt es signifikante Unterschiede in der Temperaturfaktorverteilung vor allem an den Termini der modellierten Proteinketten, die auf unterschiedliche Kristallpackungskontakte zurückzuführen sind. Dieses wird mithilfe der Temperaturfaktor-Auftragung der unabhängigen Proteinketten verdeutlicht (Abbildung 2.30). So ist auch ersichtlich, dass der N-terminale Bereich der langen Helices bezüglich der B-Faktoren wesentlich invarianter ist als der Rest der Proteinketten. Dieses kann auf die zahlreichen Kontakte zurückgeführt werden, die nicht nur zwischen den Monomeren im Dimer ausgebildet werden, sondern auch durch Kristallkontakte verursacht werden. Dieser Bereich der 12 Proteinketten in der asymmetrischen Einheit wurde auch mit dem Programm ESCET (Schneider, 2002) als konformationsinvariante Region identifiziert. Mit diesem Programm werden Proteinmoleküle bezüglich ihrer Ortsparameter und ihrer entsprechenden individuellen Temperaturfaktoren miteinander verglichen. Somit wurde eine invariante Region von Rest 33 bis Rest 45 definiert. Mit einer Überlagerung der 12 in der asymmetrischen Einheit vorkommenden Monomere können auf dieser Grundlage speziell die strukturellen Unterschiede hervorgehoben werden, da diese durch eine Überlagerung unter Verwendung aller gemeinsamen Atome nicht nivelliert werden (Abbildung 2.31a). So sind signifikante strukturelle Unterschiede in den Proteinketten C, I sowie F und L zu beobachten. In den Ketten C und I werden diese durch eine kleine Veränderung der Kehre zwischen den beiden Helices und dem damit verbundenen wesentlich geringeren Winkel der Helices zueinander von ca. $18,7^\circ$ verursacht. Im Gegensatz dazu treten die Unterschiede in den Proteinketten F und L an der langen Helix auf, die im Bereich der Aminosäure 46 leicht geknickt ist.

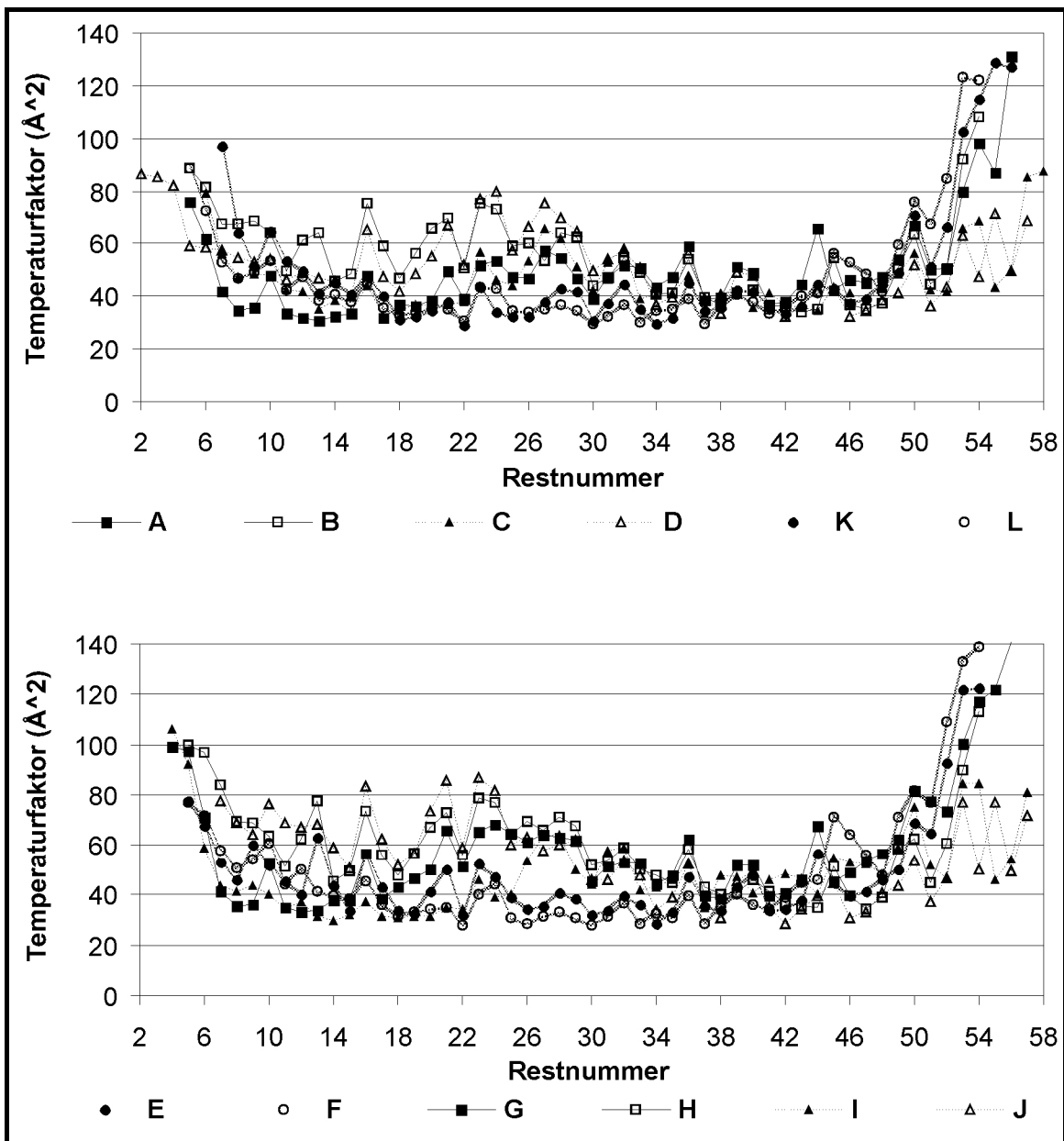


Abbildung 2.30: Temperaturfaktoren der individuellen Proteinketten der asymmetrischen Einheit

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde je ein Diagramm pro Hexamer dargestellt (vergleiche hierzu auch Abbildung 2.27a). Die Dimere, welche über die nicht-kristallographische Rotationsachse ineinander überführt werden können, wurden auf die jeweils gleiche Weise abgebildet.

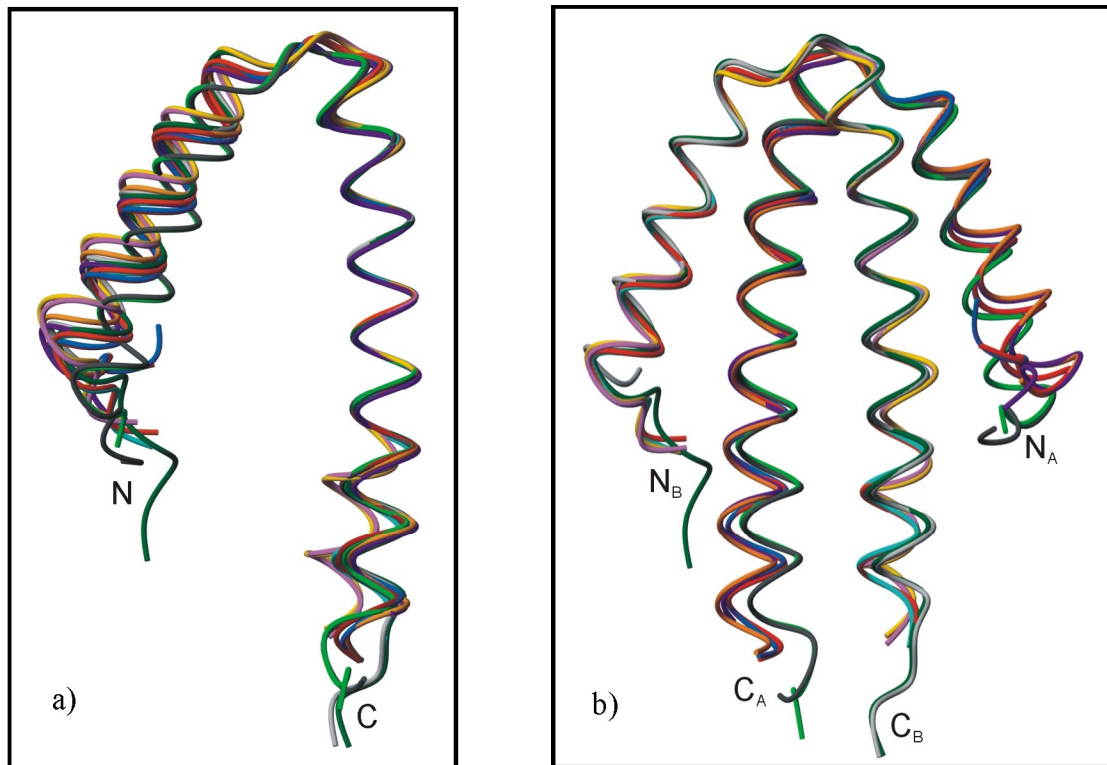


Abbildung 2.31: Überlagerung der 12 in der ASU befindlichen NblA-Moleküle

Für die Überlagerung der Monomere wurden die $C\alpha$ -Atome der Reste 33 bis 45 verwendet, die dem mit dem Programm ESCET bestimmten konformationsinvarianten Bereich der NblA-Proteinketten entsprechen (a). Die Überlagerung der NblA-Dimere erfolgte unter Berücksichtigung der $C\alpha$ -Atome der Reste 7 bis 54 (b). Molekülzuordnung: A-dunkelrot, B-orangerot, C-hellgrün, D-dunkelgrün, E-dunkelviolett, F-hellviolett, G-königsblau, H-cyanblau, I-grau, J-dunkelgrau, K-orange, L-goldgelb

Wie im Kapitel über Kristallpackung und NCS bereits erwähnt, bilden die Proteinketten A, B, C und D sowie G, H, I und J tetramere Strukturen aus. Dies trifft jedoch nicht für die Dimere EF und KL zu, die als eine Art Verknüpfung zwischen den Tetrameren im Kristall betrachtet werden können. Demnach kommt es hier auch zu veränderten Kristallpackungskontakten. So werden die verhältnismäßig hydrophoben Enden der langen Helices, die zueinander über die Reste Thr47, Tyr48, Leu51 und Leu52 in Kontakt treten, im Dimer EF nur über Leu9 der Kette J sowie durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidstickstoff von Gln49 der Kette F und dem Hauptkettensauerstoff von Leu7 der Kette J stabilisiert. Für das Dimer KL ergibt sich ein vergleichbares Bild, obwohl hier neben Leu9 der Kette D auch noch Phe13 involviert ist und Gln49_L zu Gln12_D sowie Arg44_K zu Glu10_D Wasserstoff- bzw. Salzbrücken ausbilden.

Trotz dieser lokalen Unterschiede ähneln sich die Konformationen der 12 Proteinketten in der asymmetrischen Einheit mit einer mittleren rms-Abweichung von 1,14 Å für alle 66

möglichen paarweisen Überlagerungen (unter Verwendung der Ca-Atome der Reste 7 bis 54, berechnet mit dem Programm LSQKAB (Kabsch, 1976)) sehr. Auch die sechs Dimere unterscheiden sich nur mit einer mittleren rms-Abweichung von 1,28 Å.

2.5 Diskussion

Mit der Kristallstruktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120 gelang es erstmalig, die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu bestimmen, das direkt in den Abbauprozess der Phycobilisomen von Cyanobakterien involviert ist (Baier et al., 2001: ; Collier und Grossman, 1994: ; Li und Sherman, 2002: ; Richaud et al., 2001). Sie wird maßgeblich für ein besseres Verständnis spezifischer Prozesse unter bestimmten Stresssituationen, wie z. B. Nährstoffmangel, beitragen.

2.5.1 Strukturbetrachtungen

Die Struktur von NblA ist sehr einfach konzipiert, sie besteht aus zwei Helices, die über eine Kehre miteinander verbunden sind. In der Kristallstruktur, die hier präsentiert wird, kann jedoch gezeigt werden, dass je zwei NblA-Moleküle ein Dimer formen, das durch diverse Kontakte - insbesondere hydrophober Natur - ausgebildet wird. Ein solches Dimer ist insgesamt sechsmal in der asymmetrischen Einheit anzutreffen. Die Dimere unterscheiden sich geringfügig in ihrer dreidimensionalen Struktur (mit einer mittleren rms-Abweichung von 1,28 Å), was auf verschiedene Kristallpackungskontakte zurückgeführt werden kann. Werden nun physikochemische Untersuchungen, die zur Größe bzw. Oligomerbildung von NblA in Lösung gemacht wurden, betrachtet, so kommt es zunächst zu einer Diskrepanz zwischen diesen Werten und dem Dimer, das in der Kristallstruktur beobachtet wurde. Das apparente Molekulargewicht von NblA, das mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie ermittelt wurde, weist auf ein Trimer in Lösung hin, wobei auch ein Dimer nicht ausgeschlossen werden kann (18,3 bis 20,6 kDa gegenüber einem theoretischen Wert von 22,6 kDa für ein Trimer und 15,1 kDa für ein Dimer). Hier muss jedoch beachtet werden, dass solche Molekulargewichtsabschätzungen genau genommen nur für globuläre Proteine gelten und dass NblA unter Berücksichtigung der Hydrathülle und unter Vernachlässigung der nichtmodellierten terminalen Reste eher die Form eines flachen Ellipsoids hat. Ferner konnten Daten der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) von NblA in Lösung an ein Monomer-Trimer-Modell angepasst werden (Strauss *et al.*, 2002). Jedoch wurden die Messungen nach der Strukturbestimmung von NblA wiederholt und neu ausgewertet. Diesmal zeigte sich, dass NblA als Dimer in

Lösung vorliegt (Strauss, 2003). Somit konnte nachgewiesen werden, dass NblA im Kristall den gleichen Oligomerisierungsgrad wie in Lösung hat. Die Unterschiede in der Konformation der 12 Ketten scheint auch auf eine inhärente Flexibilität hinzuweisen. Die Kristallkontakte bedienen sich dieser Eigenschaft.

Vergleicht man die Struktur von NblA mit Proteinstrukturen in der PDB (Dali-Suche) so sind keine signifikanten Ähnlichkeiten zu finden, unabhängig davon, ob man die Suche mit einem NblA-Monomer oder -Dimer durchführt. Sicherlich gibt es diverse Strukturen, die helikale Elemente enthalten, jedoch besitzt keines der Proteine zwei bzw. vier Helices, die in der gleichen Weise wie im NblA-Protein angeordnet sind.

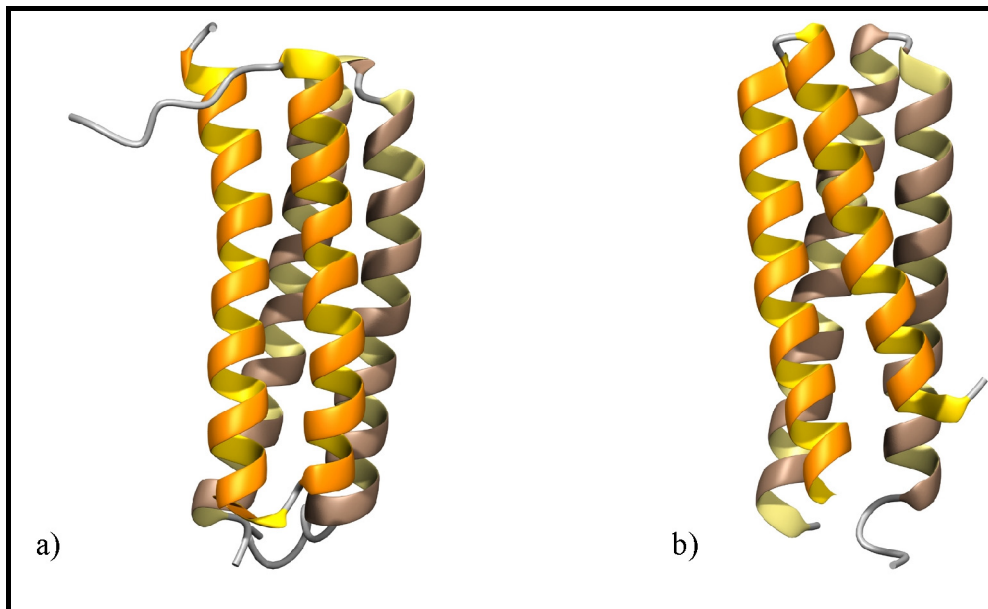


Abbildung 2.32: Bänderdarstellung des Rop-Proteins aus *E. coli* in der nativen (a, 1RPR.pdb) und der mutagenisierten (b, 1F4N.pdb) Form.

Ein vielfach strukturell untersuchtes Protein ist das ColE1 *repressor of primer* (Rop) - Protein aus *E. coli* (PDB-Einträge: 1RPR, 1ROP, 1F4N, 1F4M, ...), das in regulatorische Mechanismen der Replikation des ColE1-Plasmids einbezogen ist. Das Rop-Protein bindet an RNA und bildet als Homodimer ein Vier-Helix-Bündel mit einem gut definierten hydrophoben Kern aus. In der Wildtyp-Struktur von Rop liegen die Helixkehren der dimerisierenden Monomere an entgegengesetzten Enden der Struktur (Abbildung 2.32a) (Eberle *et al.*, 1991). Mutationen innerhalb des hydrophoben Kerns führten zu einer

völligen Umordnung der Struktur, so dass jetzt – vergleichbar mit der Struktur von NblA – die beiden helixverbindenden Kehren auf der gleichen Seite der Struktur liegen (Abbildung 2.32b). Im Gegensatz zu NblA bilden jedoch beide Strukturen eine *Coiled-coil*-Struktur unter Einbeziehung aller vier Helices aus (Willis *et al.*, 2000).

NblA kommt in allen Phycobilisomen enthaltenden Organismen vor, von Rotalgen bis Cyanobakterien und bei letztgenannten unabhängig davon, ob sie Heterozysten ausbilden oder nicht (Abbildung 2.33).

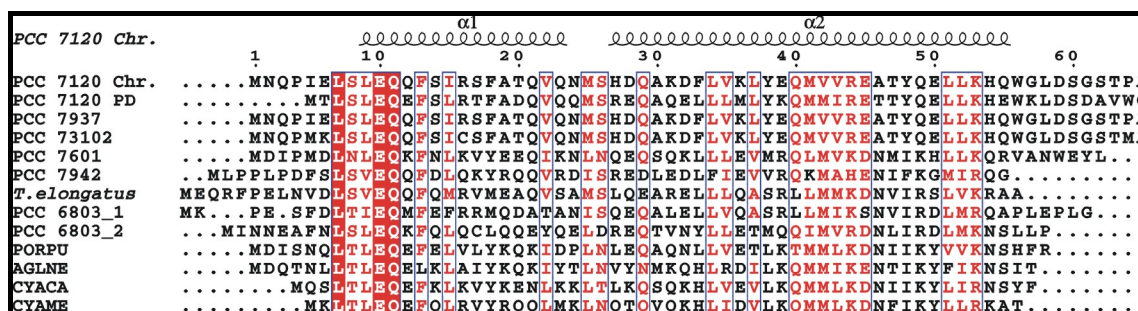


Abbildung 2.33: Sequenzvergleich von NblA von Cyanobakterien und Rotalgen

Sekundärstrukturelemente oberhalb der Sequenzen sind von der NblA-Kristallstruktur von *Anabaena* sp. PCC 7120. Korrespondierende Reste mit mehr als 80% Ähnlichkeit werden in blauen Kästen gezeigt. Identische Aminosäuren sind weiß auf rotem Grund dargestellt. Die Sequenzen entstammen dem National Center for Biological Information (NCBI) und der Cyanobase (www.kazuka.or.jp/cyano/cyano.html) und repräsentieren die folgenden Organismen: PCC 7120 – *Anabaena* sp. (Chr. – chromosome, PD – plasmid Delta); PCC 7937 – *Anabaena variabilis*; PCC 73102 - *Nostoc punctiforme*; PCC 7601 – *Tolypothrix* sp.; PCC 7942 – *Synechococcus* sp.; *T. elongatus* – *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; PCC 6803 – *Synechocystis* sp.; chloroplast ORF Ycf18 from PORPU – *Porphyra purpurea*, AGLNE – *Aglaothamnion neglectum*, CYACA – *Cyanidium caldarium*, CYAME – *Cyanidoschyzon merolae*. Die Sequenzanpassung wurden mit CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) am NPS@-Server (Combet *et al.*, 2000) durchgeführt.

Das gemeinsame Merkmal aller bisher näher untersuchten Spezies ist, dass sie *nblA* als Antwort auf nährstoffbedingten Stress, wie Stickstoff- und in manchen Organismen auch Schwefel- oder Phosphormangel, exprimieren. Die Sequenzidentitäten zwischen den NblA-Sequenzen liegen im Bereich zwischen 19% für *Synechocystis* zu *Caldarium* bis 100% für *Anabaena* PCC 7120 zu *Anabaena* ATCC 29413.

Mit Hilfe von SwissModel (EXPASY) (Peitsch und Guex, 1996), welches das Modellierungsprogramm ProModII und das Programm GROMOS96 zur Energieminimierung implementiert hat, wurden NblA-Modelle von *Calothrix* PCC 7601 ,

Synechococcus PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 auf Grundlage der Kristallstruktur von NblA von *Anabaena* PCC 7120 (PDB-Eintrag 1OJH, Kette A und B) erstellt. Zwei Monomere wurden - unter Verwendung des Programms LSQKAB - jeweils zur biologischen Einheit zusammengefügt. Für NblA von *Calothrix* PCC 7601 und *Synechococcus* PCC 7942, die als Homodimere generiert wurden, zeigt sich eine sehr ähnliche Verteilung von Ladungen und hydrophoben Bereichen, die zur Dimerisierung beitragen (Abbildung 2.34). Im Gegensatz dazu wurde für *Synechocystis* PCC 6803 ein NblA-Heterodimer modelliert. Dieses basiert auf experimentellen Daten, die belegen, dass die beiden *nblA*-homologen Gene, *nblA1* und *nblA2*, bei Stickstoffmangel simultan exprimiert werden und beide für den Abbau von Phycobilisomen erforderlich sind (Baier *et al.*, 2001). Hierbei zeigte sich jedoch, dass es zu zahlreichen unerlaubten Kontakten zwischen den beiden Monomeren kommt. Dieses kann auf die nicht durchgeführte Energieminimierung bei der Dimerbildung zurückgeführt werden oder aber darauf, dass das mögliche Heterodimer von *Synechocystis* PCC 6803 eine andere Form als das Homodimer von *Anabena* PCC 7120 annimmt und demzufolge diese Kristallstruktur nicht als Vorlage geeignet ist. Des Weiteren kann auch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, ob überhaupt ein Heterodimer gebildet wird.

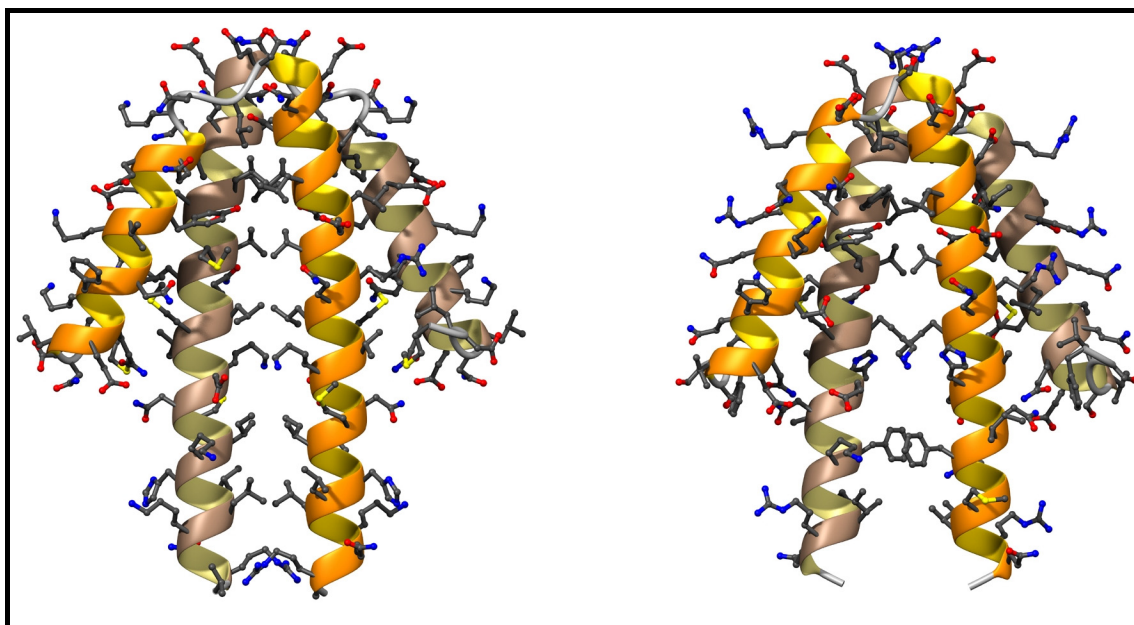


Abbildung 2.34: NblA-Dimer-Modelle von a) *Tolypothrix* sp. PCC 7601 und b) *Synechococcus* sp. PCC 7942

Betrachtet man nun die generierten NblA-Dimer-Modelle von *Tolypothrix* PCC 7601 und *Synechococcus* PCC 7942 (Abbildung 2.34), die Kristallstruktur des NblA-Dimers von *Anabaena* sp. PCC 7120 (Abbildung 2.22) sowie den Sequenzvergleich des NblA-Proteins von Cyanobakterien und Rotalgen (Abbildung 2.33) als auch den Linkage-Plot (Abbildung 2.25) so ist es möglich, verschiedenen konservierten Aminosäuren Funktionen zuzuordnen, die im Zusammenhang mit dem Aufbau des NblA-Monomers oder –Dimers stehen. So stabilisieren die Reste Ser8 und Gln11 (entsprechend der Nummerierung von *Anabaena* sp. PCC 7120) den N-Terminus der kleinen Helix, die Aminosäuren Leu7, Gln11, Ile15, Val22, Leu34, Val35, Leu37, Met41, Val42, (Arg44), Glu45 und Leu52 sind maßgeblich an der Dimerbildung beteiligt und die Reste Met25 und Ser26 sind für die Ausbildung einer definierten Kehre zwischen den beiden Helices verantwortlich, wobei dem Rest Gln29 eine stabilisierende Funktion derselben zukommt. Ist diese Zuordnung nicht möglich und sind die Aminosäuren in flexiblen Regionen lokalisiert oder im Dimer solvensexponiert, so wäre es denkbar, dass es sich hier um eine Bindungsstelle für die am Phycobilisomenabbau beteiligten Proteine, einschließlich der Phycobiliproteine selbst handelt.

2.5.2 Bindungsstudien mit NblA und Phycobiliproteinen

Neben der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von NblA war es auch von Interesse einen möglichen Mechanismus des Phycobilisomenabbaus als Antwort auf Nährstoffmangel zu postulieren. Zu diesem Zweck wurden von Dr. R. Volkmer (Charité Universitätsmedizin Berlin) Peptid-Blot-Assays durchgeführt. Diese sollten zur Identifikation der Bindungsstellen von NblA an die Phycobilisomen dienen. Es wurden synthetische Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren und einem Versatz von je 3 Aminosäuren mit den Sequenzen der α - bzw. β -Untereinheiten von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin von *Anabaena* sp. PCC 7120 auf eine Zellulosemembran gespottet und mit einem GST-NblA-Fusionsprotein (pBB10) inkubiert. Gebundene NblA-Fusionsproteine wurden mit anti-GST-monoklonalen Mausantikörpern markiert und durch daran bindende POD-markierte monoklonale anti-Maus-Antikörper über Chemolumineszenz detektiert (Boisguerin et al., 2004: ; Landgraf et al., 2004: ; Reineke et al., 2001: ; Weiser et al., 2005).

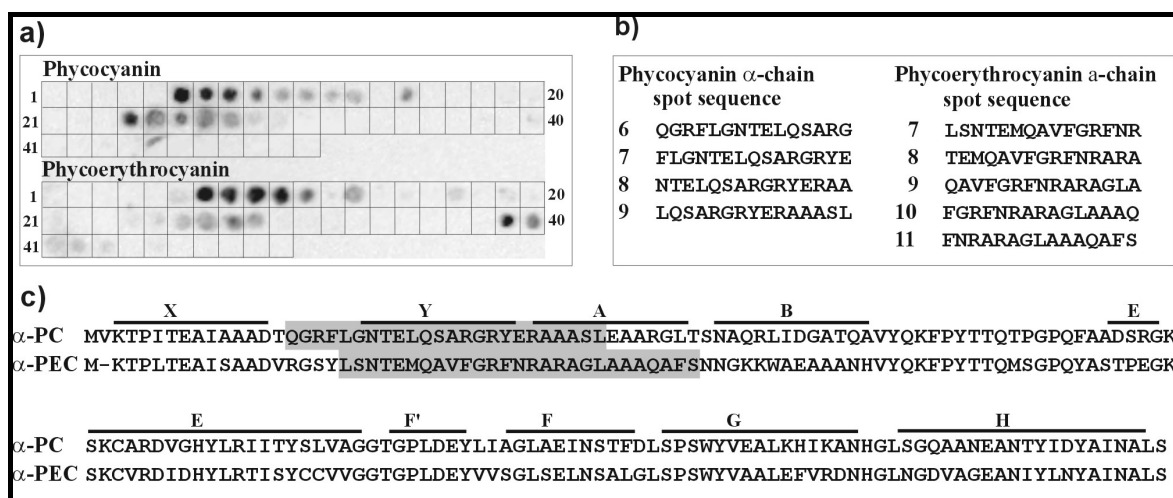


Abbildung 2.35: *In vitro* Bindung von NblA an synthetische Peptide der Phycocyanin- und Phycoerythrocyanin- α -Ketten

a) Um jeweils 12 Aminosäuren überlappende 15-mer Peptide, welche die gesamte α -Kette von Phycocyanin bzw. Phycoerythrocyanin repräsentieren, wurden auf modifizierte Zellulosemembranen gespottet. Diese wurde mit GST-NblA-Fusionsprotein inkubiert. Die Detektion der gebundenen NblA-Moleküle erfolgte über anti-GST Antikörper. Dunkle Spots repräsentieren Peptide, die NblA gebunden haben. Korrespondierende Peptidsequenzen wurden explizit in b) dargestellt. In c) sind die Sequenzen von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin mit Angabe der Helixbezeichnungen dargestellt. Die grau unterlegten Aminosäuren werden entsprechend den Peptidscandaten von NblA stark gebunden. Die Cysteine, an denen Chromophore gebunden sind, wurden durch einen Unterstrich hervorgehoben.

Die Peptidscans zeigten nur schwache Bindungen zwischen den β -Ketten von Phycocyanin (Gln64 – Arg79) bzw. Phycoerythrocyanin (Ala72 – Gly87) und NblA auf. Zwischen den α -Ketten und NblA konnten jedoch starke Interaktionen beobachtet werden (Abbildung 2.35), die auf einen biologischen Hintergrund schließen lassen. Diese Wechselwirkungen zu NblA werden über die Reste Gln16 bis Leu39 von Phycocyanin und die Reste Leu19 bis Ser45 von Phycoerythrocyanin vermittelt.

Zuvor wurden bereits *pull-down*-Assays mit GST-NblA-Fusionsproteinen und *Anabaena*-Rohextrakten durchgeführt (Abbildung 2.36). Diese Experimente lieferten den Nachweis für die Bindung von NblA an Phycobilisomen in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Bienert *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde diese Bindung anhand von *pull-down*-Assays auch für *Calothrix*, ebenfalls ein filamentöses, heterocystenbildendes Cyanobakterium, nachgewiesen (Luque *et al.*, 2003). Luque und seine Mitarbeiter konnten weiterhin zeigen, dass NblA zwar an Phycoerythrin und Phycocyanin, jedoch weder an Allophycocyanin des gleichen Organismus noch an Phycobiliproteine anderer Cyanobakterienspezies bindet, was in Anbetracht der hohen Sequenzhomologie der einzelnen PBS-Komponenten zwischen den Spezies auf eine hohe Spezifität der NblA-Bindung hindeuten würde. Es lässt sich jedoch keine Allgemeingültigkeit ableiten, da diese Ergebnisse zum Teil im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Arbeitskreis von K. Baier stehen, die zumindest für *Anabaena* eine NblA-Allophycocyanin-Bindung sowie eine Bindung von NblA von *Anabaena* an Phycobiliproteine anderer cyanobakterieller Spezies wie *Synechococcus* PCC 7942 und *Synechocystis* PCC 6803 beobachten konnte (Bienert *et al.*, 2005). Eine quantitative Auswertung von *pull-down*-Assays mittels Saccharose-Viskositäts-Gradienten und anschließender Acrylamidgeltrennung offenbarte, dass NblA von *Calothrix* eine Präferenz zu den α -Untereinheiten von Phycoerythrin hat; hier konnte das α/β -Verhältnis von Phycocyanin jedoch nicht hinreichend genau quantifiziert werden (Luque *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse korrespondieren sehr gut mit den zuvor gezeigten Peptidscandaten für *Anabaena*, die ebenfalls eine eindeutige Präferenz zu den α -Untereinheiten vorweisen.

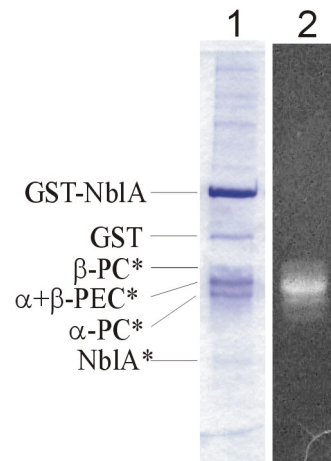


Abbildung 2.36: Bindung von Phycobiliproteinen an GST-NblA

NblA wurde mit einem N-terminalen GST-tag produziert, an Glutathion-Sepharose gebunden und mit *Anabaena* Rohextrakt inkubiert. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit Glutathion eluiert und in einer SDS-PAGE getrennt. Die mit Stern markierten Banden in Spur 1 wurden mittels Peptide Mass Fingerprint analysiert. Zink-verstärkte Bilinfluoreszenz ist in Spur 2 gezeigt (aus Bienert et al., 2005).

2.5.3 Modelle der NblA-Phycobilisomen-Bindung

Basierend auf der Kristallstruktur von NblA und den Peptidscan-Daten wurde ein vorläufiges Modell für die Bindung von NblA an Phycobilisomen erstellt. Als Grundlage hierfür diene zusätzlich die Kristallstruktur von Phycocyanin (α - und β -Kette) von *Cyanidium caldarium*, einer Rotalge. Diese Struktur wurde unter den vielen in der PDB zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen von Phycocyanin ausgewählt, da der hier betrachtete Sequenzabschnitt die höchste Identität (78%) zu der Sequenz von *Anabaena* sp. PCC 7120 aufweist (Abbildung 2.37).

PDB-ID & Organismus	Sequenz	Identität
Anabaena sp. PCC 7120	RFL GNTELQSARG RYERAAASLE	-
1PHNA <i>Cyanidium caldarium</i>	RFL SNTELQAVNG RYQRAASLE	78%
1KTPA <i>Synechococcus vulanicus</i>	RFL SNTELQAVDG RFKRAVASME	65%
1JBOA <i>Synechococcus elongatus</i>	RFL SNTELQAVDG RFGRAVASME	65%
1HA7A <i>Spirulina platensis</i>	RFL SSTEIQVAFG RFRQAKAGLE	57%
1CPCA <i>Fremyella diplosiphon</i>	RFL SSTEIQTAFG RFRQASASLA	57%

Abbildung 2.37: Sequenzvergleich der Bindungsregion der α -Kette von Phycocyanin an NblA von Organismen, deren PC-Struktur bereits aufgeklärt wurde

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, setzen sich die peripheren Stäbchen der Phycobilisomen von *Anabaena* sp. PCC 7120 aus Hexameren von Phycoerythrocyanin und Phycocyanin zusammen. Die Hexamere werden aus zwei Trimeren von $\alpha\beta$ -Dimeren gebildet. Somit stellen die Hexamere hochsymmetrische Strukturen dar, bei denen die α -Untereinheiten die Kontakte der beiden Trimere vermitteln (Sandwich-Struktur). An die jeweiligen Kreuzungspunkte der beiden Y-Helices der α -Untereinheiten bindet das NblA-Dimer (Abbildung 2.38). Dieses Modell wird durch die Präsenz von zweizähligen Rotationssymmetrien an den Kreuzungspunkten der YA-Helices von PC und am NblA-Dimer als auch durch die elektrostatische Komplementarität der Kontaktflächen gestützt. Die in Abbildung 2.39 dargestellten elektrostatischen Oberflächenpotentiale von NblA und Phycocyanin deuten zudem darauf hin, dass NblA zur Hexamerebene von Phycocyanin geneigt vorliegt.

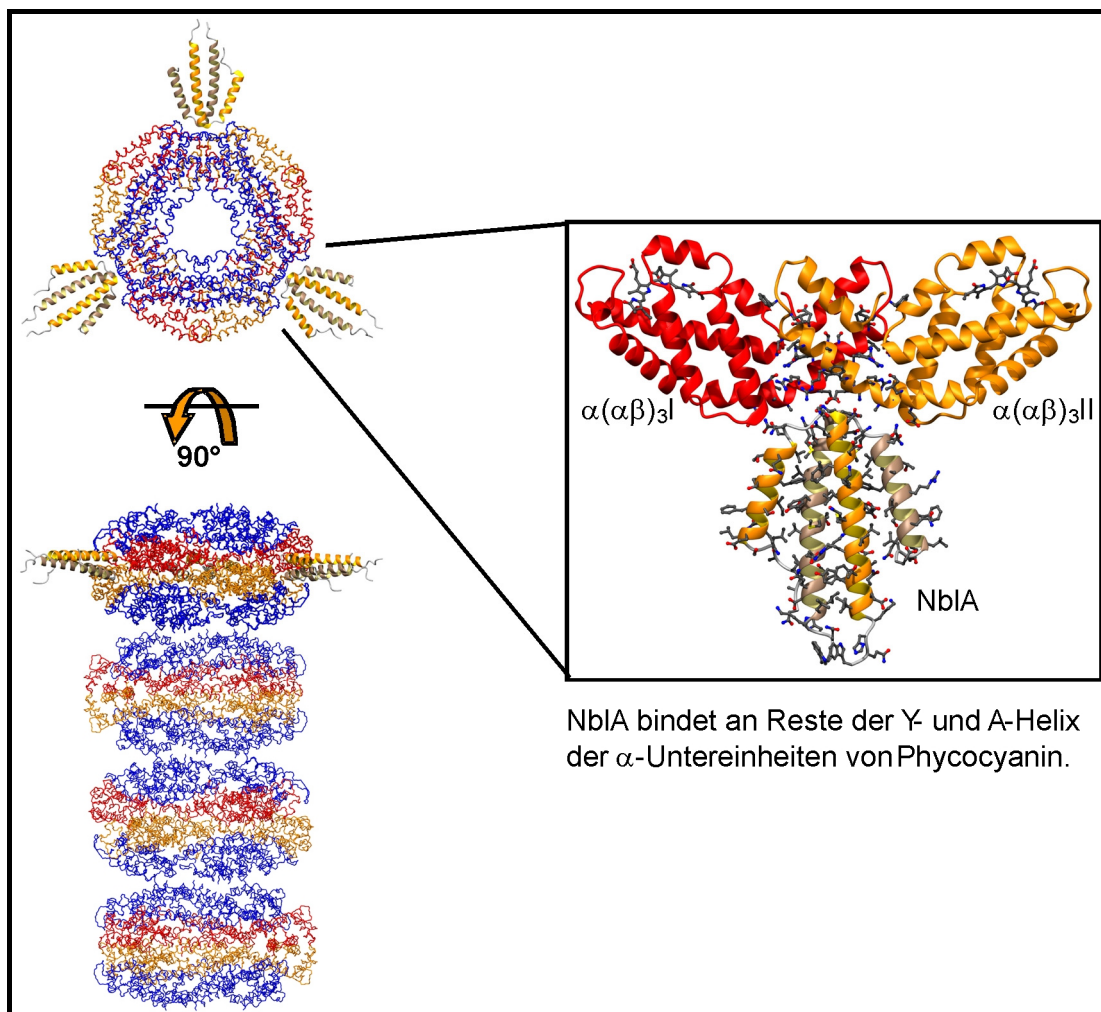


Abbildung 2.38: Modell für die Bindung von NblA an Phycobilisomen

Aufgrund der Symmetrie von Phycoerythrocyanin bzw., wie hier gezeigt, von Phycocyanin hat NblA drei Bindungsstellen pro Hexamer. Das Modell der Phycocyaninstruktur von *Anabaena* sp. PCC 7120 basiert auf der Kristallstruktur von Phycocyanin von *Cyanidium caldarium* (PDB-ID: 1PHNA). In der Vergrößerung (rechts im Bild) werden die α -Untereinheiten (rot und gold) von zwei hexamerbildenden $\alpha\beta$ -Trimeren - $(\alpha\beta)_3$ I und $(\alpha\beta)_3$ II - gezeigt. Die β -Untereinheiten im Übersichtsbild (links oben) werden blau dargestellt. Eine schematische Darstellung der Stabstruktur der Phycobilisomen ist links unten gezeigt.

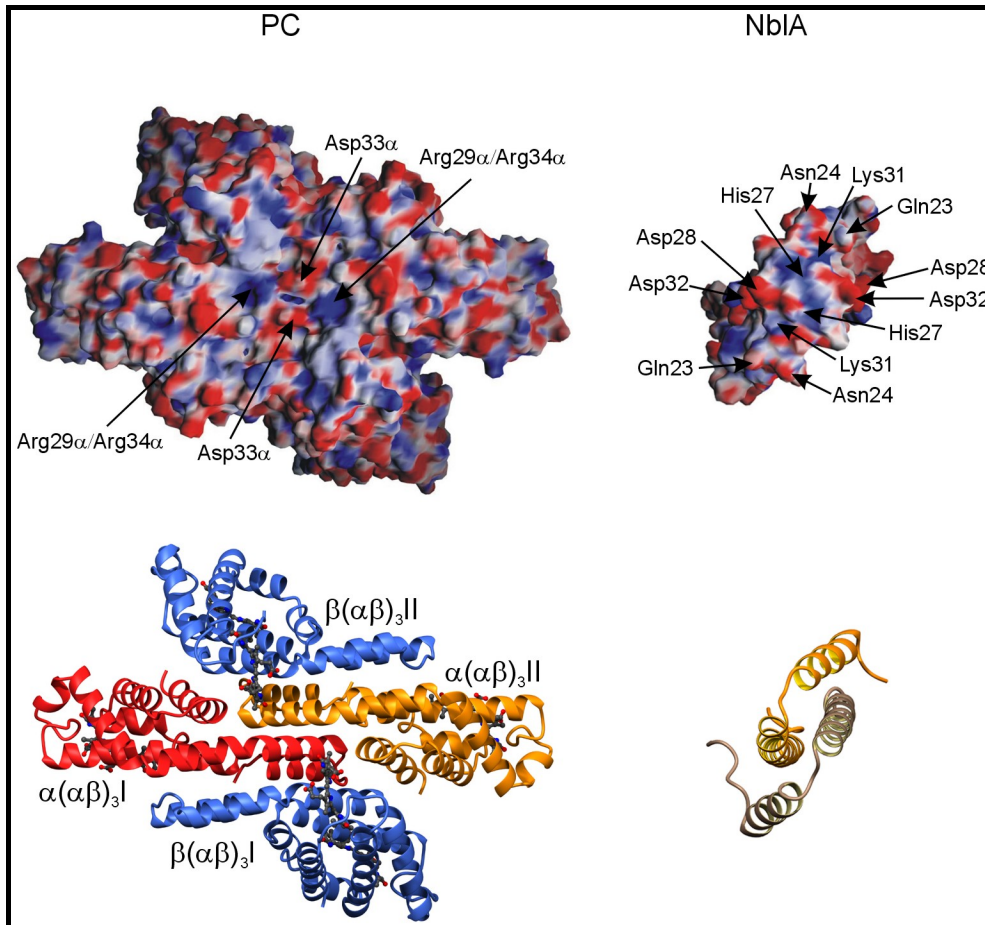


Abbildung 2.39: Darstellung der elektrostatischen Oberflächenpotentiale der Bindungsregionen von Phycocyanin und NblA

Im unteren Teil der Abbildung wird die korrespondierende Bänderdarstellung gezeigt. Die α -Untereinheiten von Phycocyanin werden in rot bzw. gold dargestellt, die β -Untereinheiten in blau.

Basierend auf diesem Modell wurden die diversen Kontakte zwischen den beiden Bindungspartnern ermittelt. Es werden vorrangig Wechselwirkungen zwischen dem NblA-Dimer und den α -Untereinheiten von Phycocyanin beobachtet (Tabelle 2.7). Die Kontakte zu den β -Untereinheiten werden insbesondere über Phycocyanobilin vermittelt, das an Cystein 154 gebunden ist. So ist es auch verständlich, dass die Peptidscandaten nur eine schwache Bindung zwischen NblA und der β -Untereinheit von Phycocyanin nachweisen konnten, da nur mit Peptiden ohne gebundene Chromophore gearbeitet wurde.

Tabelle 2.7: Kontakte zwischen NblA und Phycocyanin entsprechend dem vorläufigen Bindungsmodell (Cyc = Phycocyanobilin)

NblA	Phycocyanin
His A27	Glu $\alpha(\alpha\beta)_3$ I32
His A27	Glu $\alpha(\alpha\beta)_3$ II33
Asp A28	Arg $\alpha(\alpha\beta)_3$ II29
Ser B26	Glu $\alpha(\alpha\beta)_3$ II33
His B27	Glu $\alpha(\alpha\beta)_3$ I33
His B27	Glu $\alpha(\alpha\beta)_3$ II33
Asp B28	Arg $\alpha(\alpha\beta)_3$ I29
Gln A23	Cyc $\beta(\alpha\beta)_3$ II54
Asn A24	Lys $\beta(\alpha\beta)_3$ I33
Lys A31	Asn $\beta(\alpha\beta)_3$ II36
Lys A31	Cyc $\beta(\alpha\beta)_3$ II154
Gln B23	Cyc $\beta(\alpha\beta)_3$ II154
Asn B24	Lys $\beta(\alpha\beta)_3$ II33

Um die Richtigkeit des postulierten Modells zu prüfen, wurden Bindungsstudien mit NblA-Varianten durchgeführt. Zunächst wurden die Aminosäuren His27 und Asp28 zu Alanin mutiert (siehe QCM-Protokoll im Materialteil). Die sich anschließenden *pull-down*-Assays – in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Lockau durchgeführt – zeigten jedoch keine verminderte Bindung von GST-NblA an PC, wie aus dem postulierten Modell erwartet wurde (siehe Abbildung 2.41). *Pull-down*-Assays mit weiteren NblA-Varianten zeigten, dass nicht Reste aus der Helixkehren-Region des NblA-Dimers, sondern die Aminosäuren Leu51 und Lys53 vom C-terminalen Ende der langen Helix an der Bindung beteiligt sind (Abb. 4.40). Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren erfolgte unter anderem auf der Grundlage struktureller Überlegungen; so wurden hauptsächlich Reste mutiert, die nicht an der Dimerbildung von NblA beteiligt sind. Ferner wurden die hochkonservierten Reste Leu7, Glu10, Gln11 und Phe13 zu Alanin umgewandelt, da diesen eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben wird (siehe Abb. 4.33: Sequenzvergleich von NblA). Keine der durchgeführten Mutationen hatte Einfluss auf die Integrität des NblA-Dimers, wie mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden konnte (Baier und Lockau, 2005).

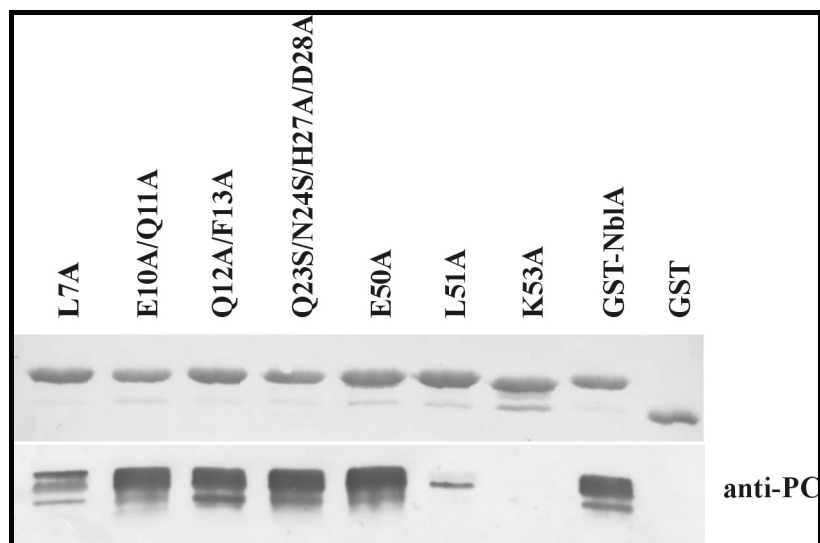


Abbildung 2.40: Der Effekt von Punktmutationen in nblA auf die Bindung an Phycobiliproteinen

NblA und verschiedene NblA-Varianten wurden als GST-Fusionsproteine hergestellt und pull-down-Assays wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Immunoblot-Analyse der gebundenen Proteine eines typischen pull-down-Assays ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Zur Beurteilung der relativen Mengen werden im oberen Teil der Abbildung die mit Ponceau-Rot angefärbten GST-NblA-Fusionsproteine bzw. GST gezeigt.

Die Erstellung eines neuen Modells für die Bindung von NblA an PC mit den NblA-Bindungspunkten Leu51 und Lys53 stellte sich als außerordentlich schwierig heraus, da es meist zu sterischen Abstoßungen zwischen PC und der N-terminalen Helix bzw. dem C-Terminus von NblA kommt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass aufgrund der hohen Flexibilität der C-Termini das NblA-Dimer dennoch symmetrische Kontakte zu PC ausbilden kann (siehe hierzu auch das B-Faktor-Diagramm, Abb 4.18) und demnach ein neues Model für die Bindung von NblA an die Phycocyanin-Hexamere entsprechend Abbildung 2.41 postuliert werden kann. So wird an dem Gedanken festgehalten, dass beide Monomere des NblA-Dimers an der Bindung beteiligt sind und somit die zweizählige Achse der Bindungsstelle von Phycocyanin im NblA-Dimer eine Weiterführung findet. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass das NblA-Dimer erst nach einer partiellen oder vollständigen Dissoziation der beider Phycocyanintrimere binden kann.

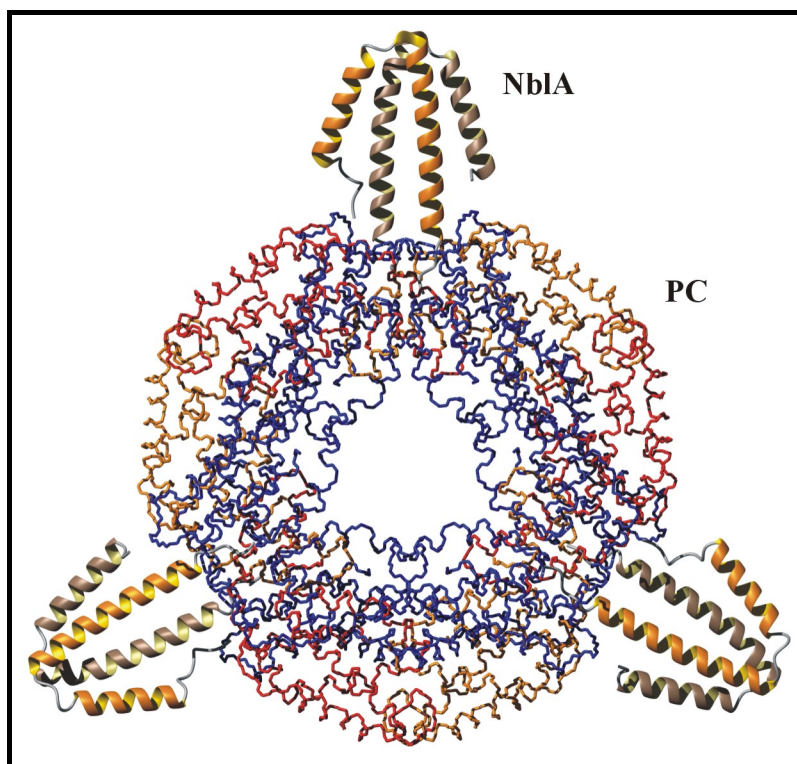


Abbildung 2.41: Neues Modell der NblA-PC-Bindung

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Struktur von Phycoerythrocyanin der von Phycocyanin sehr ähnelt, kann das vorgeschlagene Modell auch auf Phycoerythrocyanin

übertragen werden. Die Ähnlichkeit der Strukturen der beiden Phycobiliproteine wurde für *Mastigocladus laminosus* gezeigt (Duerring *et al.*, 1990). Nach Überlagerung der Strukturen weisen die Positionen der 162 C^α Atome der α-Untereinheit eine mittlere Abweichung von 0,71 Å und die Positionen der 171 C^α Atome der β-Untereinheit eine mittlere Abweichung von 0,51 Å auf.

Obwohl die Bedeutung von NblA am Abbau der Phycobilisomen für verschiedene cyanobakterielle Spezies gut dokumentiert ist (Baier *et al.*, 2001: ; Collier und Grossman, 1994: ; Li und Sherman, 2002: ; Richaud *et al.*, 2001) wird der Mechanismus zur Degradation der komplexen Phycobilisomenstruktur bisher noch nicht verstanden. Ursprünglich wurden verschiedene molekulare Mechanismen für NblA beschrieben (Collier und Grossman, 1994). Demnach könnte NblA als phycobiliprotein-spezifische Protease wirken, die Spezifität und Prozessivität allgemeiner Proteasen zum gegebenen Substrat verändern oder aber die Phycobilisomen durch ionische Wechselwirkungen zerstören. NblA selbst verfügt jedoch über keine detektierbare proteolytische Aktivität und auch die Zugabe von NblA zu Rohextrakten von *Anabaena* PCC 7120 führte zu keinem Abbau von Phycobiliproteinen. Demnach müssen noch weitere Proteine bzw. Kofaktoren für den Phycobilisomenabbau notwendig sein. Ein anderer möglicher Mechanismus besteht darin, dass NblA die Proteine für den zellulären proteolytischen Apparat markiert, ähnlich dem Ubiquitin, das kovalent an andere Proteine bindet und diese so dem 26S Proteasome in eukaryotischen Zellen zugänglich macht (Hershko und Ciechanover, 1986: ; Rechsteiner, 1987) oder in Analogie zum *response regulator* RssB, der den ClpXP-abhängigen Abbau der σ^S-Untereinheit der RNA-Polymerase in *Escherichia coli* auslöst (Muffler *et al.*, 1996: ; Studemann *et al.*, 2003). Sollte NblA auf diese Art wirken, so sollte eine Protease gefunden werden, die in der Lage ist Phycobiliproteine abzubauen. Entsprechende proteolytische Aktivitäten wurden *in vitro* gezeigt, die Rolle dieser Proteasen *in vivo* ist jedoch noch unklar (Boussiba und Richmond, 1980: ; Foulds und G., 1977: ; Lockau *et al.*, 1988: ; Maldener *et al.*, 1991: ; Nanni *et al.*, 2001: ; Wood und Haselkorn, 1979). Alternativ könnten Phycobiliprotein-Lyasen in den Abbau involviert sein, die - nach Bindung von NblA - Phycobilinchromophore schneiden, somit die Phycobiliproteine destabilisieren und einem Abbau zugänglich machen (Toole *et al.*, 1998). NblB, das durch Komplementationsexperimente einer nicht-bleichenden Mutante

von *Synechococcus* PCC 7942 identifiziert wurde (Dolganov und Grossman, 1999) und eine signifikante Ähnlichkeit zur 'Phycocyanin α -Untereinheit Phycocyanobilin Lyase' aufweist, könnte eine solche Rolle zukommen. Jedoch verursachte eine Inaktivierung aller *nblB*-homologer Gene in *Synechocystis* PCC 6803 und *Anabaena* 7120 (je zwei in jeder Spezies) keine Verminderung des Phycobilisomenabbaus (Baier und Lockau, 2005; ; Li und Sherman, 2002). Ferner wurde kürzlich gezeigt, dass die Dephosphorylierung der Linkerproteine innerhalb der Phycobilisomen das teilweise Aufbrechen der Phycobilisomenstruktur benötigt und zu ihrer kompletten Zerlegung *in vitro* beiträgt (Piven *et al.*, 2005). Somit könnte ein weiterer Interaktionspartner von NblA eine bisher unbekannte Protein-Phosphatase sein.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um Interaktionspartner von NblA zu finden, die den Phycobilisomenabbau initiieren. Diese Proteine oder Kofaktoren können an die N-terminale Helix binden, die sowohl den Sequenzbereich mit dem höchsten Konservierungsgrad vorweist (siehe Sequenzalignment Abb. 4.33) als auch in dem vorgestellten Bindungsmodell frei zugänglich ist (siehe Modell Abb. 4.41).

2.6 Fazit

In dieser Arbeit wird die Röntgenkristallstruktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120 mit einer Auflösung von 1,8 Å vorgestellt. Dieses kleine Protein besteht aus zwei α -Helices in einer antiparallelen keilförmigen Anordnung, wobei zwei dieser Moleküle die grundlegende strukturelle Einheit von NblA, ein Vier-Helix-Bündel mit den Spitzen der Keile auf einer Seite des Dimers überlagernd, bilden. Der Oligomerisierungsgrad von NblA konnte nach einer nochmaligen kritischen Betrachtung von analytischen Ultrazentrifugationsdaten bestätigt werden, so dass jetzt davon ausgegangen werden kann, dass die biologisch aktive Form von NblA nicht ein Trimer, sondern ein Dimer ist.

Die Flexibilität der Termini von NblA ist – nicht unerwartet - hoch. Sie spiegelt sich in der unzureichenden Qualität der Elektronendichte in diesem Bereich wider, weshalb die Termini von NblA nicht vollständig modelliert werden konnten.

Auf der Basis der Strukturuntersuchungen und von Mutageneseexperimenten werden erste Vorschläge für ein Modell der NblA-Phycobilisomen-Interaktion gemacht.

Um ein genaues Bild von der Bindung zu bekommen, wäre es sinnvoll, die Kristallstruktur eines NblA-PC-Komplexes zu bestimmen – eine Aufgabe, die nicht trivial sein dürfte. Ferner muss zum Verständnis des gesamten Prozesses des PBS-Abbaus neben der Bindung von NblA an Phycobiliproteine auch die Rolle anderer Komponenten, wie NblB, berücksichtigt werden.

3 Kälteschockproteine aus *Bacillus caldolyticus* und *Bacillus subtilis* in Komplex mit einzelsträngiger DNA

3.1 Einleitung

Die Reaktion von Bakterien auf Temperaturerniedrigung

Bakterien reagieren auf Temperaturerniedrigung in spezifischer Weise. Kälteeinwirkung führt zu einer Reduktion der Proteinexpression und schließlich zu einer Hemmung von Zellwachstum und Zellproliferation. Überraschenderweise wird aber die Synthese einer Reihe von Proteinen erhöht und die Expression dieser kälteschockinduzierten Proteine erreicht während der Anpassung an die Kälteschockbedingungen ein Maximum. Anschließend nimmt die Synthese dieser Proteine wieder ab und ein neues Gleichgewicht der Proteinbiosynthese stellt sich auf einem vergleichsweise niedrigem Niveau ein. Die am häufigsten bisher identifizierten kalteinduzierten Proteine sind relativ kleine (65-70 Aminosäurereste) Proteine, von denen das Hauptkälteschockprotein (major cold-shock protein A) CspA aus *Escherichia coli* als erstes gefunden wurde (Jones *et al.*, 1987). Mittlerweile sind Csp-ähnliche Proteine aus mehr als 50 bakteriellen Spezies charakterisiert worden (Graumann und Marahiel, 1998).

Trotz einer Vielzahl zellbiologischer Studien ist die Bedeutung dieser Proteinklasse für die bakterielle Proteinbiosynthese unter den Bedingungen des Kältestresses (und unter Normalbedingungen) noch weitgehend ungeklärt. Ein Sequenzvergleich der Hauptkälteschockproteine bakteriellen Ursprungs – die eine einzelne Kälteschockdomäne (CSD) repräsentieren - mit einer Reihe von Proteinen aus Eukaryoten offenbarte aber eine hohe Sequenzhomologie mit den Nukleinsäure-bindenden Domänen eukaryotischer genregulatorischer (Y-Box) Faktoren (Abbildung 3.1) (Ermolenko und Makhatadze, 2002). Y-Box-Proteine wurden als ATTGG-Motiv (Y-Box)-erkennende (cis-acting DNA regulatory element) Domänen beschrieben, die an der Regulation von Transkription und Translation beteiligt sind. Sowohl die Csp als auch die Y-Box-Proteine weisen die Nukleinsäure-bindenden Motive RNP1 (K/R-G-F/Y-G/A-F-V/I-X-F/Y) und RNP2 (L/I-F/Y-V/I-G/K-N/G-L) auf. Aus der hohen Homologie kann abgeleitet werden, dass auch für die Csp eine Rolle bei der Regulation von Transkription/Translation anzunehmen ist. So konnte bereits gezeigt werden, dass Csp einzelsträngige RNA und DNA (ssRNA und

ssDNA) binden können (Schindelin et al., 1993: ; Zeeb und Balbach, 2003) sowie als Transkriptionsaktivatoren durch die Bindung an Promotorregionen verschiedener kälteschockinduzierbarer Gene wirken (Jones et al., 1992).

		<u>RNP1</u>	<u>RNP2</u>
CSPA <i>E. coli</i>	/4-70	KMTGIVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
CSPB <i>E. coli</i>	/4-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFISPVDDGSKDVFVHFSAIQNDN---	YRTLFEQGQKVTFF---SIES--GAKGPAANVIT
CSPC <i>E. coli</i>	/2-68	KIKGQVKMFNFKSGGFGFITPADGSKDVFVHFSAIQNGG---	FKTLAEGQNVVF---EIQD--GQKGPAAVNVTAI
CSPD <i>E. coli</i>	/1-67	MEKGTVKMFNNAKGGFGFITCPEDGGGEDIFFAHYSTIQMDG---	YRTLKAGQSVQF---DVHQ--GPKGNHASVIVPV
CSP E. coli	/2-68	KIKGNVKMFNFKSGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQTNG---	FKTLAEGQNVVF---EITN--GAKGPAANVIAL
CSPF <i>E. coli</i>	/3-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSND---	FKTLTENQVEVF---GIEN--GPKGPAANVHVAL
CSPG <i>E. coli</i>	/4-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSNE---	FRTLNEQKVEVF---SIEQ--GQKGPAAANVVTL
CSPI <i>E. coli</i>	/4-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSND---	FKTLTENQVEVF---GIEN--GPKGPAANVHVAL
CSPB <i>B. subtilis</i>	/1-66	MLEGKVKMFNFKSGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSNG---	FKTLAEGQNVVF---EIVE--GNRGPQAANVTKE
CSPC <i>B. subtilis</i>	/1-66	MEQGTVKMFNFKSGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSDG---	FKSLDEGGQKVSF---DVEQ--GARGQAANVQKA
CSPD <i>B. subtilis</i>	/1-66	MEKGTVKMFNNAKGGFGFITCPEDGGGEDIFFAHYSTIQMDG---	YRTLKAGQSVQF---DVHQ--GPKGNHASVIVPV
CSPA <i>Salmonella typhimurium</i>	/4-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
CSPA <i>Streptococcus pyogenes</i>	/1-66	MAQGTVKMFNNAKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQTNG---	FKTLAEGQNVVF---DVEE--GQKGPQAANVITKL
CSPA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	/1-67	MPQGTVKMFNNAKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQTNG---	FKTLAEGQNVVF---DVEE--GQKGPQAANVITKL
CSPA <i>Micrococcus luteus</i>	/1-67	MAVGTVKMFNNAKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNGG---	FKTLAEGQNVVF---DVEE--GQKGPQAANVITKL
CSPA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/4-69	RQNGTVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNGG---	FKTLAEGQNVVF---DVEE--GQKGPQAANVITKL
CSPA <i>Listeria monocytogenes</i>	/1-66	MEQGTVKMFNNAKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQSDG---	FKSLDEGGQKVSF---DVEQ--GARGQAANVQKA
CSPB <i>Yersinia pestis</i>	/4-70	KMTGLVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDN---	YRTLFEQGQKVTFF---SIES--GAKGPAANVIT
CSPD <i>Haemophilus influenzae</i>	/1-67	MEIGTVKMFNNAKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
YB-1 human	/58-128	KVLGTVKMFNVRNGYGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
DBPA human	/90-160	KVLGTVKMFNVRNGYGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
Cla h 8 <i>Caldosporium herbarum</i>	/7-73	RQNGTVKMFNADKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
LIN-28 <i>C. elegans</i>	/52-120	RYFGSCKMFNVSQGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
CRHSP-24 human	/62-129	VYKGVCKCFCRSKGGFGFITPDDGSKDVFVHFSAIQNDG---	YKSLDEGGQKVSF---TIES--GAKGPAAGNVTSL
UNR human	/185-248	RCQGVVVCAMKE--AFGFIERGDVVKEIFFHYSSEPKGDL---	ETLQPSDDVEF---TIKD--RNGKEVATDVRLL

Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der Kälteschockdomänen verschiedener Proteine

Die Zahlen korrespondieren mit den Positionen der Kälteschockdomäne in der Aminosäuresequenz des gesamten Proteins. Reste, die in diesen Sequenzen zu mehr als 60% konserviert sind, wurden blau dargestellt, und solche zu mehr als 80% rot. Die Nukleinsäurebindungsmotive RNP1 und RNP2 sind unterstrichen (aus (Ermolenko und Makhatadze, 2002).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur verschiedener Kälteschock-Proteine (Abbildung 3.2) (Mueller et al., 2000: ; Newkirk et al., 1994: ; Schindelin et al., 1994: ; Schindelin et al., 1993) zeigt eine klare Zuordnung zu der Familie der OB-fold-Proteine (oligonucleotide/oligosaccharide binding), die durch ein fünfsträngiges β -Fass charakterisiert sind. Diese Proteine binden Oligonukleotide und/oder Oligosaccharide und haben oft Funktionen, die im Zusammenhang mit Teilschritten der ribosomalen Biosynthese stehen (z.B. das ribosomale Protein S1, der Translations-Initiationsfaktor 1a, die RNA-bindende Domäne des Terminationsfaktors Rho). Durch die Faltung der Hauptkälteschock-Proteine werden konservierte basische und hydrophobe Aminosäurereste auf einer Seite des Proteins unter Ausbildung einer (putativen) Oligonukleotidbindenden Oberfläche orientiert (K7, K13, H29, R56, W8, F15, 17, 27, 30 in CspB aus *Bacillus subtilis*).



Abbildung 3.2: Kälteschockprotein aus *Bacillus caldolyticus* in der Bänderdarstellung.

Die beiden Darstellungen sind um 90° zueinander gedreht (PDB-Eintrag: 1C9O, (Mueller et al., 2000)).

Die bisher vorliegenden Bindungsdaten verschiedener Csp mit doppel- und einzelsträngiger DNA sowie einzelsträngiger RNA lassen allerdings noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Rolle der Proteine bei der Oligonukleotid-Bindung bzw. -Erkennung zu, obwohl eine grobe Charakterisierung der Bindungseigenschaften bereits möglich ist: Offensichtlich binden die Csp keine doppelsträngigen DNA- und RNA-Ketten, jedoch einzelsträngige DNA und RNA (allerdings bindet das eukaryotische Csp-Homologe Clah8 auch doppelsträngige DNA). Die Affinität liegt in der Regel im mikromolaren Bereich. Die Spezifität gegenüber der Oligonukleotid-Sequenz ist gering. *Bs-CspB* bindet bevorzugt Polypyrimidin-reiche einzelsträngige DNA und RNA. Eine Proteindomäne kann offensichtlich einen Oligopyrimidin-Strang von sechs bis sieben Basen binden, wie durch Studien mit Poly-T-Oligonukleotiden gezeigt werden konnte. Verschiedene NMR-, Fluoreszenzspektroskopie- sowie Mutationsstudien wurden zur Identifikation der Reste durchgeführt, die an der Bindung der Csp an einzelsträngige RNA oder DNA involviert sind, jedoch liegen noch keine Strukturdaten auf atomarem Niveau vor (Kloks et al., 2002; ; Lopez et al., 1999; ; Schindler et al., 1998; ; Schröder et al., 1995; ; Zeeb und Balbach, 2003).

Bemerkenswert ist, dass, obwohl nur wenige experimentelle Daten zur Interaktion zwischen Csp und einzelsträngiger RNA vorliegen, sich dennoch die meisten Hypothesen zur Funktion dieser Proteine um Aufgaben bei der Regulation von RNA-Funktionen

ranken. So wird vermutet, dass Csp RNA-Sekundärstrukturen destabilisieren könnten und eine Rolle als RNA-Chaperon spielen. Unter Kälteschock-Bedingungen ist die bakterielle Csp-Konzentration sehr hoch und es könnte eine weitgehende Bindung der Proteine an RNA und damit eine Regulation der ribosomalen Translation erfolgen (Bae et al., 2000: ; Jiang et al., 1997).

3.2 Aufgabenstellung und Voraussetzung (Csp)

Die Hauptkälteschockproteine (Csp) aus Bakterien (*major cold-shock proteins*) sind kleine kompakte β -Fassproteine, die nach einer abrupten Senkung der Umgebungstemperatur verstärkt produziert werden. Sie binden an einzelsträngige Nukleinsäuren und fungieren auf diesem Wege als "RNA-Chaperons". Bisher wurde Csp vorrangig als Modellproteine für Stabilitätsuntersuchungen verwendet (Delbrück et al., 2001: ; Mueller et al., 2000) und nur wenige Arbeiten wurden zur Nukleinsäureerkennung von Csp durchgeführt (Kerr et al., 2003: ; Manival et al., 2001: ; Phadtare et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Csp-ssDNA-Komplexe hergestellt, gereinigt sowie kristallisiert und erste kristallographische Daten präsentiert werden. Grundlage dafür ist eine Kooperation mit Dr. Jochen Balbach von der Universität Bayreuth, der sowohl die benötigten Proteine als auch Daten zu Csp-ssDNA-Wechselwirkungen (Zeeb und Balbach, 2003) zur Verfügung stellte.

3.3 Experimentelles

3.3.1 Material

3.3.1.1 Protein

Die Hauptkälteschockproteine aus *Bacillus subtilis* (*Bs-CspB*) und aus *Bacillus caldolyticus* (*Bc-Csp*) (Abbildung 3.3) wurden in lyophilisierter Form von Herrn Dr. J. Balbach von der Universität Bayreuth zur Verfügung gestellt. Die Herstellung dieser Proteine erfolgte über die Überexpression der entsprechenden Gene in *E. coli* unter Verwendung eines T7 RNA-Promotor-Systems (Schindelin *et al.*, 1992), die Aufreinigung von *Bs-CspB* und *Bc-Csp* nach den bereits beschriebenen Methoden (Mueller *et al.*, 2000; ; Schindler *et al.*, 1995).

<i>Bs-CspB</i>	MLEGKVKWFN	SEKGF	GFIEV	EGQDD	VFVHF	SAIQGEG	FKT	LEEGQ	AVSFE	IVEG	NRGPQA	ANVTKEA
<i>Bc-Csp</i>	MQRGKVKWFN	NEKGY	GFIEV	EGGSD	VFVHF	TAIQGEG	FKT	LEEGQ	EVSFE	IVQG	NRGPQA	ANVVKL

Abbildung 3.3: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Kälteschockproteine

Dargestellt sind die Sequenzen von CspB aus *Bacillus subtilis* und Csp aus *Bacillus caldolyticus*. Die 12 unterschiedlichen Aminosäurepositionen wurden rot gekennzeichnet.

Bs-CspB hat ein Molekulargewicht von 7365,1 g/mol, einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,54 und einen Extinktionskoeffizienten von 5690 M⁻¹cm⁻¹ bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Bc-Csp hat ein Molekulargewicht von 7333,2 g/mol, einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,25 und einen Extinktionskoeffizienten von 6970 M⁻¹cm⁻¹ bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Die Proteinkonzentrationen wurden entsprechend dem Lambert-Beerschen-Gesetz über die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm bzw. mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

3.3.1.2 Nukleinsäuren

Die HPLC-gereinigten DNA-Fragmente (dT)₆ und (dT)₇ wurden von der Firma BioTeZ (Berlin, Deutschland) bezogen.

Die DNA-Konzentration wurde über die Absorption der Lösung am Absorptionsmaximum bestimmt.

3.3.2 Methoden

3.3.2.1 Komplexbildung von *Bs*-CspB:(dT)₆ und *Bc*-Csp:(dT)₆

Die lyophilisierten Proteinproben wurden zunächst in Puffer (20 mM TRIS, pH 7,5; 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl) aufgenommen und nach einer pH-Korrektur gegen den gleichen Puffer dialysiert (2 x 200 ml, Dialyseschlauch mit einem Molekulargewichtsausschluss von 3000 Da). Die einzelsträngige DNA wurde ebenfalls in dem oben beschriebenen Puffer gelöst.

Zur Komplexbildung wurden Protein und (dT)₆ im molaren Verhältnis von 1:1,2 gemischt. Die überschüssige DNA wurde unter Verwendung einer selbstgepackten G25 Größenausschluss säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland; Trennbereich 1000 - 5000 Da, l = 10 cm, d = 0,5 cm, V = 2 ml) abgetrennt und der Protein-ssDNA-Komplex mit Vivaspin 3 kDa Konzentratoren (Vivascience, Hannover, Deutschland) für die Kristallisation aufkonzentriert.

3.3.2.2 Kristallisationsexperiment

Die Kristallisation der *Bs*-CspB:(dT)₆- und *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplexe erfolgte - wie in Kapitel 2.3 beschrieben - mit der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen mit Lösungen, die denen vom Protein Screen I und II von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) entsprachen, sowie entsprechenden Variationen. Die Kristallisationsexperimente wurden bei 293 K durchgeführt.

3.3.2.3 Identifikation der DNA im Kristall

Zur Identifikation der makromolekularen Komponenten in den Kristallen wurden sowohl Raman-spektroskopische Analysen als auch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt.

3.3.2.3.1 Raman-spektroskopische Identifikation der Thymine im Kristall

Für die Aufnahme von Raman-Spektren einzelner Kristalle von *Bs*-CspB- und *Bc*-Csp-Oligonukleotidkomplexen sowie ihrer Reservoirlösungen wurde ein T64000 Raman-

Spekrometer (Jobin Yvon, Longjumeau, Frankreich), das mit einem Olympus BH-2 Mikroskop ausgerüstet ist, verwendet. Das Mikroskop wurde entweder auf die Oberfläche des sich im hängenden Tropfen befindlichen Kristalls oder aber auf ein Volumenelement der ihn umgebenden Mutterlösung fokussiert. Raman-Streuung des Kristalls bzw. der Mutterlösung wurde durch einen Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von ca. 40 mW auf der Probe angeregt. Das Raman-Licht wurde in 180° Rückstreugeometrie aufgenommen.

3.3.2.3.2 Natives Polyacrylamidgel

Unter Bedingungen der nativen PAGE behalten Proteine ihre natürliche Konformation bei und können so weiterhin mit ihren Bindungspartnern wie zum Beispiel anderen Proteinen oder Nukleinsäuren interagieren.

Die Zusammensetzung der nativen PAGE ist mit der klassischen Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) vergleichbar, wobei hier auf Natriumdodecylsulfat (SDS) im Gel als auch im Laufpuffer verzichtet wird, reduzierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (DTT) im Allgemeinen nicht eingesetzt werden und die Proben vor der Elektrophorese nicht aufgekocht werden.

Das in dieser Arbeit eingesetzte native 20 %ige Mini-Gel setzt sich wie folgt zusammen:

6,6 ml	AA/Bis (30 % / 0,8 %)
102 ml	10xTBE-Puffer
2,4 ml	H ₂ O
32 μ l	TEMED
400 μ l	10 %-ige APS-Lösung

10 x TBE-Puffer

108 g	Tris-Base
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M EDTA
add 1 l	dH ₂ O

Maximal 5 μ l der Komplex- bzw. Proteinlösung wurden mit 3 μ l Glycerol (86 %) und 1 μ l Farblösung (ca. 1 mg/ml Bromphenolblau in 20 % Ethanol) vermischt und direkt auf das Gel geladen. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet.

3.3.2.4 Datensammlung und Prozessierung

Sowohl Testmessungen von Kristallen als auch die Aufnahme eines kompletten Datensatzes wurden im Röntgenlabor der Arbeitsgruppe an der MAR 345 Desktop Beamline (Mar Research, Norderstedt, Deutschland), die mit einem Rigaku RU H2B Drehanodengenerator ausgerüstet ist, durchgeführt. Zur Aufnahme der Rotationsbilder wurden die Kristalle auf 110 K gekühlt. Die Daten wurden mit den Programmen XDS und XSCALE (Kabsch, 1993) bzw. DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) ausgewertet.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Bc-Csp:(dT)₆-Komplex

Für die Komplexbildung zwischen dem Hauptkälteschockprotein des thermophilen Bakteriums *Bacillus caldolyticus* (Bc-Csp) und dem Desoxyhexanukleotid (dT)₆ wurden beide Komponenten in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 gemischt. Die Stöchiometrie wurde zuvor von Markus Zeeb (Uni Bayreuth) über Fluoreszenzquenchingtitration für das Hauptkälteschockprotein CspB aus *Bacillus subtilis* bestimmt und mit 1,1:1 angegeben (Zeeb, 2003). Überschüssige DNA konnte mit Hilfe einer selbstgepackten G25 Größenausschlussssäule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) erfolgreich abgetrennt werden. Die Komplexbildung wurde zunächst anhand von UV-Spektren kontrolliert (siehe Abbildung 3.4a). Hierbei liegt das Absorptionsmaximum von (dT)₆ bei 267 nm, das von Bc-Csp bei 281 nm und das des Komplexes bei 270 nm. Ferner konnte der Erfolg der Komplexierung mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gezeigt werden (siehe Abbildung 3.4b). So ist das Laufverhalten des Komplexes durch eine höhere Mobilität im Gel gekennzeichnet. Diese wird durch eine höhere negative Nettoladung des Komplexes gegenüber dem Protein verursacht.

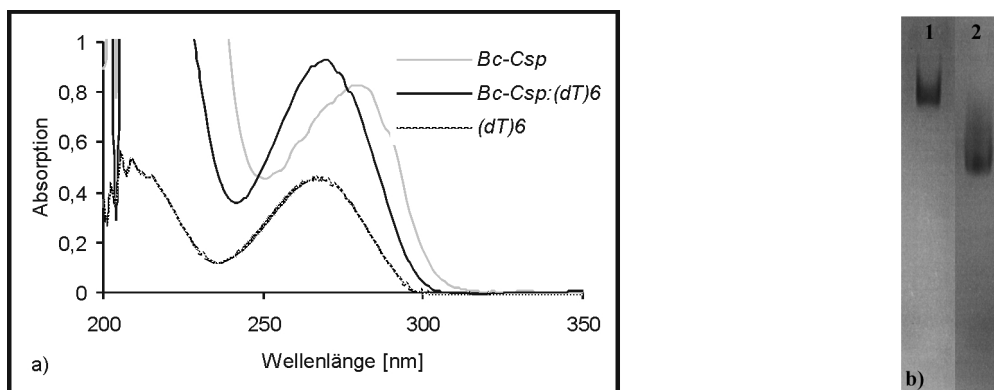


Abbildung 3.4: UV-Spektren und native PAGE zur Verfolgung der Bc-Csp:(dT)₆-Komplexierung

In a) sind sowohl die UV-Spektren der Einzelkomponenten als auch des Komplexes dargestellt. In Spur 1 des nativen PAGE (b) wurde Bc-Csp allein und in Spur 2 der Bc-Csp:(dT)₆ Komplex aufgetragen.

Hier sei auch noch einmal darauf hingewiesen, dass die bakteriellen Hauptkälteschockproteine einen für DNA-bindende Proteine atypisch niedrigen

isoelektrischen Punkt besitzen, woraus eine negative Nettoladung unter physiologischen pH-Bedingungen resultiert. *Bc*-Csp ist mit einem pI von 5,25 leicht sauer und verfügt über 9 negativ geladene Aminosäuren gegenüber 7 positiv geladenen.

Nach anschließender Aufkonzentrierung unter Verwendung von Mikrokonzentratoren lagen die zur Kristallisation eingesetzten DNA-Protein-Komplexe in einem Konzentrationsbereich von 6 - 11 mg/ml in 20 mM TRIS-Puffer, pH 7,5; 50 mM KCl und 3 mM MgCl₂ vor. Die Kristallisationsexperimente wurden bei 293 K mit der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen durchgeführt. Stäbchenförmige Kristalle von *Bc*-Csp (Abbildung 3.5), die zur Datensammlung geeignet waren, wuchsen in Anwesenheit von (dT)₆ innerhalb einer Woche nach dem Mischen gleicher Volumina von Komplexlösung und Reservoirlösung bestehend aus 35% (v/v) 2-Methyl-2,4-Pentandiol, 0,1 M Natriumacetat und 0,02 M CaCl₂. Die maximal beobachtete Größe der Kristalle betrug 400 x 50 x 40 μm³ (Bienert *et al.*, 2004).

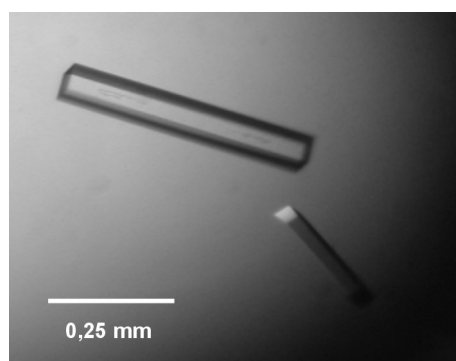


Abbildung 3.5: Typischer Kristall des *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplexes

Zur Identifikation der makromolekularen Komponenten innerhalb des Kristalls wurden die Kristalle Raman-spektroskopisch analysiert. Die in Abbildung 3.6 gezeigten Spektren sind Mittelwerte von 30 Aufnahmen von je 20 Sekunden Dauer. Die Beiträge von Pufferkomponenten wurden in den Spektren nicht korrigiert. Es wurden sowohl Spektren mit Fokus auf einen Kristall (Abbildung 3.6b) sowie - zum Vergleich - auf ein Volumeninkrement der Mutterlösung (Abbildung 3.6a) aufgenommen. Die Peaks im Spektrum des kristallinen Komplexes wurden mit Wellenzahlen entsprechend etablierter Thyminbanden markiert (Deng *et al.*, 1999; ; Thomas, 1993). Hier ist jedoch darauf hinzuweisen, dass es bei den Banden mit den Wellenzahlen 1236 und 1668 zu Überlagerungen mit den Amidbanden III und I des Proteins kommt, die im Bereich der

Wellenzahlen 1245 (im Allgemeinen sehr breit) bzw. 1666 liegen. Die Bande bei der Wellenzahl 1003 ist als Nachweis für die Präsenz von Protein zu betrachten. Diese Bande wird durch die Schwingung des aromatischen Ringes von Phenylalanin verursacht. Somit wurden durch die Raman-Analyse Thymin als auch Protein klar als Komponenten des Kristalls nachgewiesen, was schlussfolgern lässt, dass der *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplex im Ganzen kristallisierte.

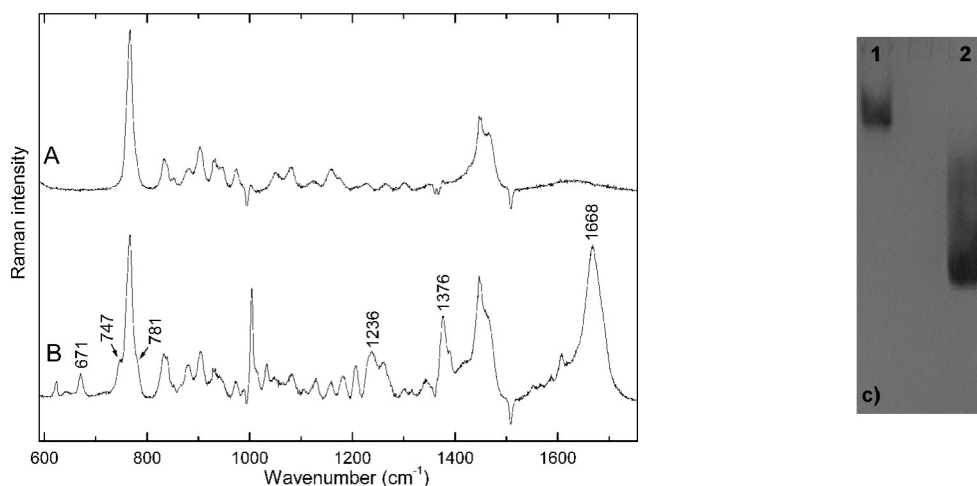


Abbildung 3.6: Raman-Spektrum und natives PAGE zum Nachweis des *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplexes im Kristall

A zeigt das Spektrum der den Kristall umgebenden Lösung, in B wurde auf den Kristall fokussiert. In C ist ein coomassiegefärbtes, 10% natives Polyacrylamidgel gezeigt. Spur 1 enthält *Bc*-Csp, auf Spur 2 wurden aufgelöste Kristalle aufgetragen (aus Bienert et al. 2004).

Zum Nachweis der Komponenten in den Kristallen wurde neben der Raman-spektroskopischen Analyse Kristalle aufgelöst und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Zuvor wurden jedoch die Kristalle ausgiebig in der Reservoirlösung gewaschen, um die in der Mutterlauge befindlichen Komponenten, d.h. *Bc*-Csp und (dT)₆, vom Kristall zu trennen. Damit sollte sichergestellt werden, dass durch die native PAGE keine falsch positiven Ergebnisse erbracht werden. Das native Polyacrylamidgel in Abbildung 3.6c zeigt in Spur 1 *Bc*-Csp und in Spur 2 den aufgelösten Kristall. Aufgrund des Laufverhaltens der makromolekularen Komponenten im Gel und im Vergleich zum nativen Polyacrylamidgel in Abbildung 3.4b konnte ebenfalls der Nachweis für die Co-Kristallisation von *Bc*-Csp mit Desoxyhexathymidin erbracht werden.

Für das Diffraktionsexperiment konnten die Kristalle aufgrund der hohen Konzentration an 2-Methyl-2,4-Pentandiol (35% (v/v)) in der sie umgebenden Lösung direkt in flüssigem

Stickstoff schockgefroren werden. So zeigten sich im Diffraktionsbild keine Eisringe, die bei der Auswertung ein hohes Störpotential darstellen bzw. die Daten in dem entsprechenden Auflösungsbereich unbrauchbar machen. Durch die Messung bei Tieftemperaturen (110 K) im gasförmigen Stickstoffstrom wird auch die Datenqualität maßgeblich verbessert, was hauptsächlich auf weniger Strahlenschäden und ein geringeres Hintergrundrauschen zurückzuführen ist.

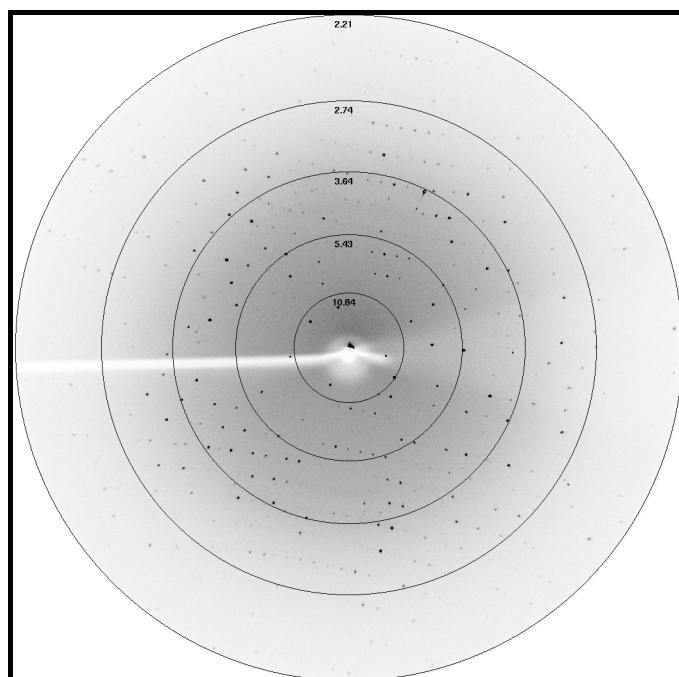


Abbildung 3.7: Typisches Diffraktionsbild eines Bc -Csp:(dT)₆-Komplex-Kristalls
Die Aufnahme erfolgte an der MarDTB im kristallographischen Labor des Max-Delbrück-Centrums. Der Kristall-Detektor-Abstand betrug 200 mm, die Messung erfolgte bei 110 K.

Tabelle 3.1: Kristallographische Parameter des *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplexes

Messplatz	MarDTB (<i>in-house</i>)
Wellenlänge (Å)	1,54
Detektor	MAR 345
Temperatur (K)	110
Zellparameter	
<i>a</i> (Å)	74,6
<i>b</i> (Å)	65,0
<i>c</i> (Å)	31,2
V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2,1
Anzahl der Moleküle pro AU	2
Lösemittelgehalt (%)	40
Auflösung (Å)	13,8 – 2,23
letzte Schale ¹	2,35 – 2,23
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2
beobachtete Reflexe ²	29269 (3850)
unabhängige Reflexe ²	7737 (1059)
$I/\sigma(I)$	22,4 (15,0)
Vollständigkeit (%)	98,7 (95,8)
R_{meas} ³ (%)	4,7 (8,3)

¹ Daten in Klammern gelten für die letzte Schale

² Werte gelten für den Bereich: $I/\sigma(I) \geq -3$

³ Multiplizitätskorrigierter R_{sym} nach (Diederichs und Karplus, 1997)

102 Diffraktionsaufnahmen mit einem Oszillationsbereich von jeweils 1° wurden an der Heimanlage (Mar DTB) bei einem Kristall-Detektor-Abstand von 200 mm mit Daten bis zu $2,23 \text{ \AA}$ Auflösung aufgenommen (siehe hierzu auch Abbildung 3.7). Die Prozessierung (Tabelle 3.1) dieses Datensatzes ergab einen niedrigen Verzerrungsindex für ein einfach orthorhombisches Gitter mit einem R_{meas} -Wert von 4,7% nach XSCALE. Durch systematische Auslöschungen der ungeradzahligen Reflexe entlang der Achsen a und b konnte der vermessene Kristall der Raumgruppe $P2_12_12$ zugeordnet werden. Dieser verfügt über die Zellparameter $a = 74,6 \text{ \AA}$, $b = 65,0 \text{ \AA}$ und $c = 31,2 \text{ \AA}$. Da die Kristallisationsbedingung sowie die Raumgruppe und die Zellparameter von denen des Bc -Csp-Proteins abweichen (100 mM Hepes (pH 7,5), 65% (v/v) 2-Methyl 2,4 Pentandiol; tetragonale Raumgruppe $I4_1$ mit $a = 76,99 \text{ \AA}$ und $c = 47,07 \text{ \AA}$, PDB-Code 1C9O, (Mueller *et al.*, 2000)), konnte auch auf dieser Grundlage davon ausgegangen werden, dass es sich um den kristallisierten Komplex und nicht um das freie Protein handelte.

Mit zwei Protein-DNA-Komplexen in der asymmetrischen Einheit wurde ein Matthews Koeffizient von $2,1 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ berechnet, der einem Lösemittelgehalt im Kristall von 40,5% entspricht.

Weiterführend wurde ein Datensatz eines Bc -Csp:(dT)₆-Komplex-Kristalls von Klaas Max (MDC Berlin, FG Heinemann) an der Strahlführung der Proteinstrukturfabrik ID14.2 am BESSY Berlin bis zu einer Auflösung von $1,29 \text{ \AA}$ aufgenommen. Die Strukturbestimmung und Verfeinerung der Struktur des Komplexes erfolgte im Wesentlichen ebenfalls durch Klaas Max. Das Phasenproblem konnte über die Methode des Molekularen Ersatzes mit dem freien Protein als Modell vorgenommen werden. Detaillierte Ergebnisse werden demnächst in Form von Journalartikeln und in der Doktorarbeit von Klaas Max veröffentlicht werden.

3.4.2 ***Bs*-CspB:(dT)₆-Komplex**

Die Komplexierung des Hauptkälteschockproteins B aus *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB) mit dem Desoxyhexanukleotid (dT)₆ sowie die Reinigung und die Kristallisation des Komplexes erfolgten im Wesentlichen wie zuvor für den Bc -Csp:(dT)₆-Komplex beschrieben. Nach dem Zusammenfügen der beiden Komponenten im molaren Verhältnis 1:1,2 (Protein:DNA) wurde die überschüssige DNA ebenfalls mit einer selbstgepackten G25 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) vom

entstandenen Komplex getrennt, der anschließend mit Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 3 kDa von Vivascience, Deutschland, Hannover) auf 11 mg/ml aufkonzentriert wurde. Der Erfolg der Komplexbildung konnte durch UV-Spektren (Abbildung 3.8a) und nativer Polyacrylgelelektrophorese (PAGE) (Abbildung 3.8b) bestätigt werden. Die Absorptionsmaxima liegen hier bei 284 nm, 269 nm und 272 nm für *Bs*-CspB, (dT)₆ bzw. den *Bs*-CspB:(dT)₆-Komplex. In der nativen PAGE weist der Komplex ein schnelleres Laufverhalten gegenüber dem *Bs*-CspB-Protein allein auf. Die Verschiebung im Gel ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei dem *Bc*-Csp:(dT)₆-Komplex, da der pI von *Bs*-CspB mit einem Wert von 4,54 wesentlich niedriger ist als der von *Bc*-Csp und demnach der Beitrag der DNA geringer ausfällt. Hier stehen 12 negativ geladene Reste nur 6 positiv geladenen Aminosäuren gegenüber.

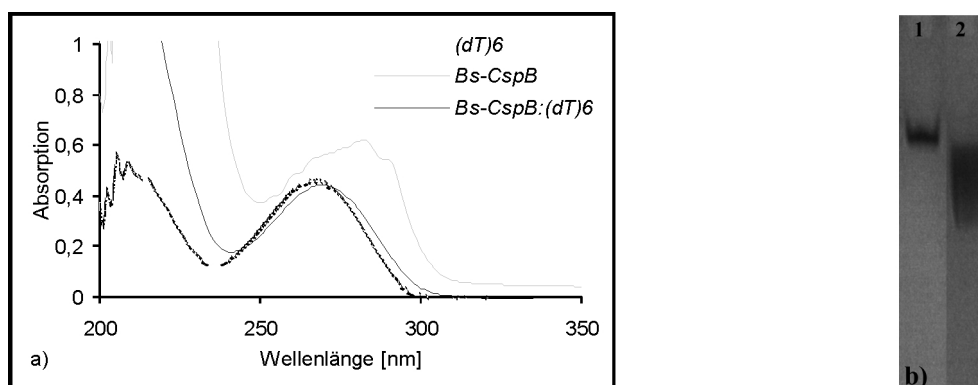


Abbildung 3.8: UV-Spektrum und natives PAGE der *Bs*-CspB:(dT)₆-Komplexierung

In a) sind sowohl die UV-Spektren der Einzelkomponenten als auch die des Komplexes dargestellt. In Spur 1 des nativen PAGE (b) wurde *Bs*-CspB allein und in Spur 2 der *Bs*-CspB:(dT)₆-Komplex aufgetragen.

Kleine plättchenförmige Kristalle (siehe Abbildung 3.9) wuchsen nach einigen Tagen unter Verwendung der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen, nachdem ein Volumen Komplexlösung mit einem Volumen Reservoirlösung, bestehend aus 0,1 M Natriumcacodylat (pH 6,5), 0,2 M Calciumacetat und 18% (w/v) Polyethylenglycol 8000 gemischt wurde. Die maximalen Dimensionen der Kristalle betragen 100 x 40 x 10 μm³.

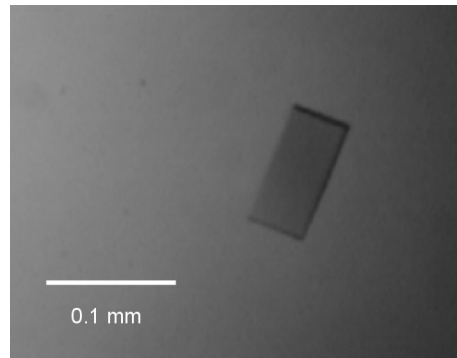


Abbildung 3.9: Typischer Kristall des *Bs*-CspB:(dT)6-Komplexes

Um sicherzustellen, dass beide Komponenten - Protein und DNA - im Komplex auskristallisierten, wurden die Kristalle wiederum Raman-spektroskopisch untersucht. Abbildung 3.10 zeigt zwei Spektren mit Fokus auf die Reservoirlösung (A) und auf einen Kristall (B) mit den markierten Peaks für etablierte Thyminbanden. Zusätzlich ist das Maximum bei der Wellenzahl 1003 cm^{-1} der Aminosäure Phenylalanin zuzuordnen. Somit konnten sowohl die DNA als auch das Protein im Kristall nachgewiesen werden.

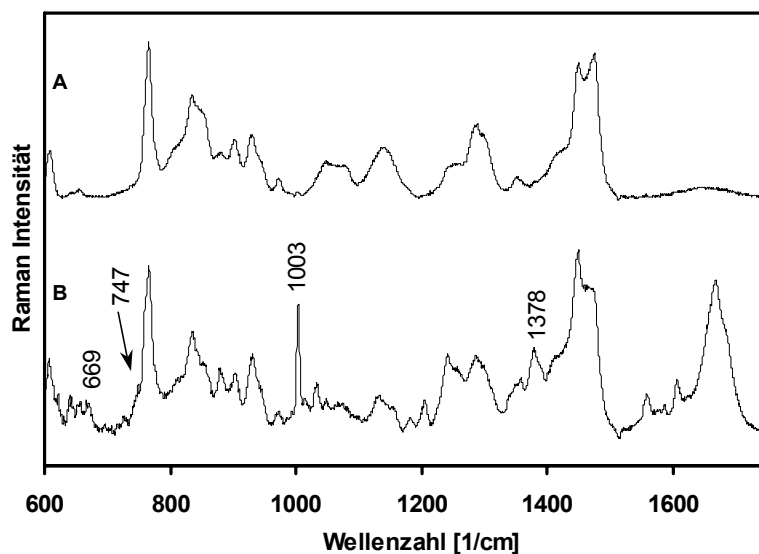


Abbildung 3.10: Raman-Spektrum zum Nachweis des *Bs*-CspB:(dT)₆-Komplexes im Kristall

Der obere Teil der Abbildung (A) zeigt das Raman-Spektrum der den Kristall umgebenden Lösung, im unteren Teil (B) wurde auf den Kristall fokussiert.

Für Beugungsexperimente unter Kryobedingungen musste zunächst eine Mutterlösung gefunden werden, in der die Kristalle hinreichend stabil sind und zudem bei der Messung keine Eisinge im Diffraktionsbild entstehen. Hierbei zeigte sich eine mit 10% (v/v) Glycerol versetzte Reservoirlösung als geeignet. Testmessungen für die Auswahl von Kristallen, mit denen später Daten an einem Synchrotron-Messplatz gesammelt werden konnten, wurden zunächst an der MAR 345 Desktop Beamline im Röntgenlabor der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. So mussten ca. 20 Kristalle getestet werden, um letztendlich eine Selektion von drei Kristallen für Messungen am Synchrotron - die von Klaas Max durchgeführt wurden - zur Verfügung zu stellen.

Bei der Präparation und Messung der Kristalle stellte speziell die dritte Dimension mit 10 μm ein Problem dar, da die Kristalle mechanisch äußerst instabil waren. Die Reflexprofile sowie die Auflösung erreichten auch bei weitem nicht die Güte der Komplexkristalle mit dem Kälteschockprotein von *Bacillus caldolyticus*. So streuten die *Bs*-CspB:(dT)₆-Komplex-Kristalle an der Hausanlage bis zu einer maximalen Auflösung von 2,4 \AA (Abbildung 3.11).

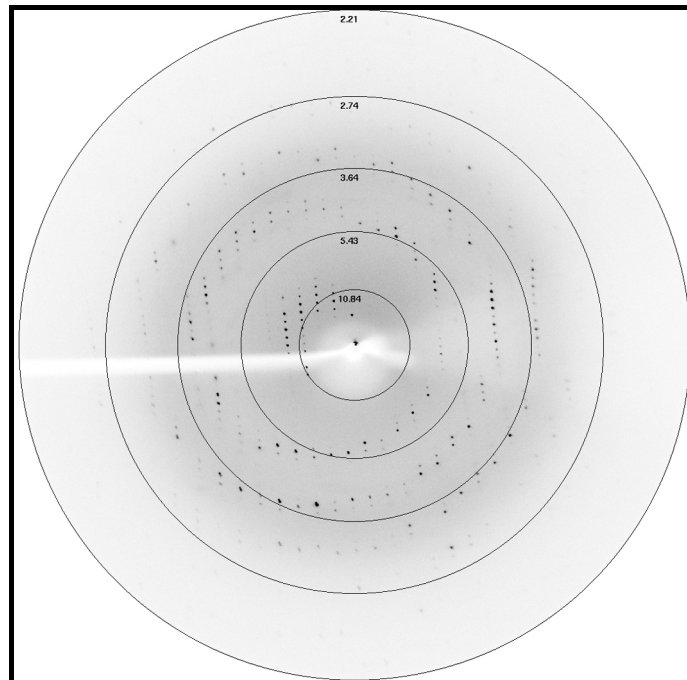


Abbildung 3.11: Diffraktionsbild eines *Bs-CspB:(dT)6*-Komplex-Kristalls

Die Aufnahme erfolgte an der MarDTB im kristallographischen Labor des Max-Delbrück-Centrums. Der Kristall-Detektor-Abstand betrug 200 mm, die Messung erfolgte bei 110 K im Rotationsmodus über einem Winkelinkrement von 1° .

Der an der Strahlführung ID14.2 der Proteinstrukturfabrik am BESSY aufgenommene Datensatz des Komplexkristalls erreichte eine maximal auswertbare Auflösung von 1,78 Å. Diese Messung als auch die Auswertung der Daten wurden von Klaas Max durchgeführt (Max *et al.*, 2005).

3.4.3 *Bs-CspB:(dT)₇*

Überraschenderweise war die Kristallisation des *Bs-CspB:(dT)₇*-Komplexes, die nach den zuvor beschriebenen Methoden für die anderen Komplexe versucht wurde, nicht erfolgreich. Auch *Bs-CspB:(dT)₇*-Komplexe in 20 mM Natriumcacodylat-Puffer, pH 7 mit 3 mM MgCl₂, die direkt zur Kristallisation mit dem "Magic Ehmke"-Screen eingesetzt wurden, führten nicht zum erwünschten Erfolg. Dieser Screen findet speziell für Protein-DNA-Komplexe Anwendung. Die Rezeptur -siehe Anhang- wurde von Ehmke Pohl, EMBL-Hamburg, zur Verfügung gestellt. Lediglich kleine pyramidenförmige Kristalle konnten bei der Verwendung von 50 mM Tris (pH 8,5), 20% PEG350mme und 50 mM CsCl als Reservoirolösung beobachtet werden. Diese konnten jedoch weder durch Variation der Kristallisationsbedingungen noch durch *Macro seeding* (Bergfors, 1999) vergrößert werden und wiesen am Synchrotron (ESRF, Frankreich, Grenoble) auch nur marginale Streueigenschaften auf.

3.5 Fazit

Mit diesen Arbeiten konnten Komplex-Kristalle aus bakteriellen Kälteschockproteinen und einzelsträngiger DNA hergestellt und charakterisiert werden und somit die Basis für die Strukturaufklärung dieser Komplexe geschaffen werden, die nicht nur einen vertiefenden Einblick in die Bindungsmodi von Proteinen an DNA im Allgemeinen darstellt, sondern vielmehr zum weiteren Verständnis der funktionellen Rolle von Kälteschockproteinen bei der Adaption an sich rasch ändernde Umweltbedingungen beiträgt.

Weiterführend können diese ssDNA-Protein-Komplexstrukturen mit anderen Kristallstrukturen und NMR-Daten von Proteinen, die den OB-Faltungstyp als Domäne enthalten (Kerr et al., 2003: ; Lei et al., 2003: ; Lingel et al., 2003: ; Yang et al., 2002: ; Zeeb und Balbach, 2003) verglichen werden, um Erkenntnisse über die affinitäts- und spezifitätsbestimmenden Faktoren dieser Klasse von Proteinen gegenüber Nukleinsäuren zu gewinnen.

4 Zusammenfassung

4.1 Deutsch

4.1.1 Die Kristallstruktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC 7120

Die meisten Cyanobakterien und Chloroplasten von Rotalgen verfügen über Phycobilisomen, große lichtsammelnde Multiproteinkomplexe, die an der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembran gebunden vorliegen, die Lichtenergie absorbieren und diese zu den entsprechenden Photosystemen führen. Unter stickstofflimitierten Bedingungen werden die Phycobilisomen proteolytisch abgebaut, ein Prozess, der als Chlorose oder Bleichen bezeichnet wird. Dieser schützt vor Fotoschäden unter den gegebenen Stressbedingungen und liefert gleichzeitig einen großen Vorrat an Stickstoff enthaltenden Substanzen.

Das Gen *nblA*, welches in allen Phycobilisomen enthaltenden Organismen vorkommt, kodiert für ein Polypeptid von ungefähr 7 kDa, das eine Schlüsselrolle im Abbau der Phycobilisomen einnimmt. Die Wirkungsweise von NblA dabei wird jedoch bisher kaum verstanden.

Ein Selenomethioninderivat von NblA des filamentösen Cyanobakteriums *Anabaena* sp. PCC 7120 wurde in *Escherichia coli* rekombinant produziert und über Ammoniumsulfatfällung sowie Größenausschluss- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Kristalle wurden nach der Methode des hängenden Tropfens über einer Reservoiirlösung, bestehend aus 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 100 mM MgCl₂, 10% (w/v) PEG 2000 and 15% Ethylenglycol bei 20°C hergestellt. Lange stäbchenförmige NblA-Kristalle der monoklinen Raumgruppe P2₁ verfügen über die Zellparameter $a = 43,2 \text{ \AA}$, $b = 95,9 \text{ \AA}$, $c = 104,8 \text{ \AA}$ und $\beta = 97,0^\circ$. Die Röntgenkristallstruktur von NblA wurde mithilfe der *single-wavelength anomalous dispersion*-Methode bis zu einer Auflösung von 1,8 Å bestimmt. Das finale Modell verfügt über einen kristallographischen R-Wert von 18,2% und einen freien R-Wert von 21,7%.

Das kleine NblA-Protein von 65 Aminosäuren besteht aus zwei α -Helices, die in einem ca. 37°-Winkel in einer antiparallelen, V-förmigen Anordnung zueinander stehen. Zwei dieser Monomere bilden die grundlegende strukturelle Einheit von NblA, ein vier-Helix-Bündel,

bei dem sich die Spitzen der "Vs" auf der gleichen Seite des Dimers überlagern und über eine nicht-kristallographische zweizählige Achse miteinander verknüpft sind.

Auf der Grundlage von Bindungsstudien und der Kenntnis der NblA-Struktur konnte ein Modell für die Bindung von NblA an die Phycobilisomenstruktur postuliert werden. Hierbei interagiert NblA über die Reste Leu51 und Lys53 mit den Kreuzungspunkten der α -Untereinheiten (Y-Helix) der Phycocyaninhexamere. Dieses Modell wird von Bindungsstudien sowie der Beobachtung gestützt, dass sowohl NblA als auch Phycocyanin eine zweifache Rotationsachse an ihren Bindungsstellen aufweisen. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu Phycocyanin lässt sich dieses Modell auch auf Phycerythrocyanin übertragen. Verschiedene Mechanismen des Phycobilisomenabbaus unter besonderer Berücksichtigung von NblA wurden diskutiert.

4.1.2 Kälteschockproteine aus *Bacillus caldolyticus* und *Bacillus subtilis* in Komplex mit einzelsträngiger DNA

Die Kälteschockantwort wurde bisher für verschiedene bakterielle Spezies beschrieben. Sie ist durch eine Änderung des intrazellulären Proteinmusters der betroffenen Organismen charakterisiert, wobei ein Satz kälte-induzierbarer Proteine besonders häufig auftritt. Bei dieser Klasse der Hauptkälteschockproteine, hier für das mesophile Bakterium *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB) und das thermophile Bakterium *Bacillus caldolyticus* (*Bc*-Csp) beschrieben, handelt es sich um kleine 5-strängige β -Faltblattproteine vom Faltungstyp der Oligonukleotid / Oligosaccharid bindenden Proteine (OB-Faltungstyp). Sie binden einzelsträngige Nukleinsäuren und wirken so vermutlich als "RNA-Chaperone".

Für einen tieferen Einblick in die Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung und die funktionelle Rolle dieser Klasse von Proteinen wurden zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur Komplexe, bestehend aus einzelsträngiger DNA ($(dT)_6$) und *Bc*-Csp bzw. *Bs*-CspB, gebildet und von den Einzelkomponenten gereinigt. Die Kristallisation des *Bc*-Csp:($(dT)_6$)-Komplexes erfolgte im hängenden Tropfen über einer Reservoirolösung bestehend aus 35% (v/v) 2-Methyl-2,4-Pentandiol, 0,1 M Natriumacetat und 0,02 M $CaCl_2$. Die stäbchenförmigen Kristalle mit den Kantenlängen $400 \times 50 \times 40 \mu m^3$ gehörten zur primitiv orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ mit den Zellparametern $a = 74,3 \text{ \AA}$, $b = 64,9 \text{ \AA}$ und $c = 31,2 \text{ \AA}$. Die Prozessierung der Daten ergab einen R_{meas} von 4,6%. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten für zwei Protein-DNA-Komplexe in der asymmetrischen Einheit resultierte in einem Wert von $2,1 \text{ \AA}^3/Da$, der einem Lösemittelgehalt im Kristall von 40,5% entspricht. Der *Bs*-CspB:($(dT)_6$)-Komplex konnte über einer Reservoirolösung aus 0,1 M Natriumcacodylat (pH 6,5), 0,2 M Calciumacetat und 18% (w/v) PEG8000 kristallisiert werden und bildete flache plättchenförmige Kristalle.

Die Protein- und DNA-Komponenten in den Kristallen wurden mittels Raman-Spektroskopie nachgewiesen.

4.2 English

4.2.1 Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120

Cyanobacterial light harvesting complexes, the phycobilisomes, are proteolytically degraded when the organisms are starved for combined nitrogen, a process referred to as chlorosis or bleaching. Gene *nblA*, present in all phycobilisome-containing organisms, encodes a protein of about 7 kDa that plays a key role in phycobilisome degradation. To gain deeper insights into the mode of action of NblA in this degradation process the crystal structure of NblA was determined and a model of its binding to phycobilisomes was proposed.

For this purpose, NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120 was produced as selenomethionine NblA derivative in *Escherichia coli* B834 (DE3) and purified *via* ammonium sulfate precipitation, followed by size exclusion and anion exchange chromatography. Crystals were grown using the hanging-drop vapor-diffusion method over a reservoir solution containing 100 mM Tris/HCl (pH 8.5), 100 mM MgCl₂, 10% (w/v) poly(ethylene glycol)2000 and 15% ethylene glycol, at 20 °C. NblA crystals grew as long, but thin rods (1.0 × 0.15 × 0.05 mm³) and belong to the monoclinic space group P2₁ with cell parameters of $a = 43.2 \text{ \AA}$, $b = 95.9 \text{ \AA}$, $c = 104.8 \text{ \AA}$ and $\beta = 97.0^\circ$. They contain twelve NblA monomers in the asymmetric unit. The crystal structure with a resolution of 1.8 Å was determined using the single-wavelength anomalous dispersion (SAD) technique and refined to final values for R_{work} and R_{free} of 0.182 and 0.217, respectively.

The small NblA polypeptide of 65 amino acids consists of two α -helices which are assembled at a $\sim 37^\circ$ angle in an antiparallel, V-shaped arrangement. Two NblA monomers form the basic structural unit of NblA, a four-helix bundle with the tips of the V superimposing on the same side of a dimer. The dimer is formed by two molecules related by a non-crystallographic dyad axis.

Based on the crystal structure presented here, pull-down experiments, and peptide scan data a model of binding of NblA to phycobilisomes was proposed. Considering the entire phycobilisome structure, NblA is predicted to bind *via* its amino acids Leu51 and Lys53 to the trimer-trimer interface of the phycobiliprotein hexamers.

4.2.2 Cold-shock proteins from *Bacillus caldolyticus* und *Bacillus subtilis* in complex with single stranded DNA

The cold-shock response has been described for several bacterial species. It is characterized by distinct changes in intracellular protein patterns whereby a set of cold-shock-inducible proteins become abundant. This is achieved by an increase in transcription of their genes and by the stabilization of their mRNA. Cold-shock proteins bind to mRNA to destabilize non-productive secondary structures and are therefore also called "RNA chaperone".

The major cold-shock proteins of the thermophilic *Bacillus caldolyticus* (*Bc-Csp*) and the mesophilic bacterium *Bacillus subtilis* (*Bs-CspB*) are small OB-fold proteins that have been described to bind single-stranded nucleic acids. *Bc-Csp* and *Bs-CspB* were crystallized in the presence of the deoxyhexanucleotide (dT)₆.

Nice rod-like crystals of the *Bc-Csp*-(dT)₆ complex suitable for diffraction experiments grew after mixing equal volumes of protein solution and reservoir solution containing 35% (by vol.) 2-methyl-2,4-pentanediol, 0.1 M sodium acetate and 0.02 M CaCl₂. They grew in the primitive orthorhombic space group P2₁2₁2 with unit cell parameters $a = 74.3 \text{ \AA}$, $b = 64.9 \text{ \AA}$ and $c = 31.2 \text{ \AA}$. Data processing yield a R_{meas} of 4.6% . Two protein-DNA complexes in the asymmetric unit yield a Matthews coefficient of $2.1 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ which corresponds to a 40.5 % solvent content in the crystal.

Smaller plate-like single crystals grew with (dT)₆ bound to *Bs-CspB*. Here, two volumes of protein solution were mixed with one volume reservoir solution containing 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 0.2 M calcium acetate and 18% (w/v) PEG 8000. For diffraction experiments under cryo conditions, the *Bs-CspB*:(dT)₆ crystals were transferred to reservoir solution containing 10% (by vol.) glycerol and then flash-frozen, whereas the *Bc-Csp*:(dT)₆ crystals could be directly frozen in liquid nitrogen.

The presence of protein and DNA in the crystals was demonstrated by Raman spectroscopy.

5 Veröffentlichungen

Bienert, R., Baier, K., Volkmer, R., Lockau, W. & Heinemann, U. (2005). Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *J. Biol. Chem.*, im Druck.

Bienert, R., Zeeb, M., Dostál, L., Feske, A., Magg, C., Max, K., Welfle, H., Balbach, J. & Heinemann, U. (2004). Single-stranded DNA Bound to Bacterial Cold-shock Proteins: Preliminary Crystallographic and Raman Analysis. *Acta Crystallogr. Sect. D* 60, 755-757.

Max, K., Zeeb, M., Bienert, R., Balbach, J. & Heinemann, U. (2005). T-rich DNA single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein *Bs-CspB*. *Nucleic Acids Res.*, eingereicht.

Odintsova T. I., Muller E.-C., Ivanov A. V., Egorov T. A., Bienert R., Vladimirov S. N., Kostka S., Otto A., Wittmann-Liebold B., Karpova G.G. (2003). Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *J. Protein Chem.* 22 (3), 249-258.

PDB-Eintrag: 1OJH

Struktur von NblA aus *Anabaena* sp. PCC7120

Literaturverzeichnis

Abee, T. und Wouters, J. A. (1999): Microbial stress response in minimal processing, *Int. J. Food Microbiol.* 50 [1-2], Seite 65-91.

Allen, M. M. und Smith, A. J. (1969): Nitrogen chlorosis in blue-green algae, *Arch. Microbiol.* 69, Seite 114-120.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D. ; Seidman, J. G.; Smith, J. A. und Struhl, K. (1992): *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition. Auflage, John Wiley & Sons, Inc.

Bae, W.; Xia, B.; Inouye, M. und Severinov, K. (2000): Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97 [14], Seite 7784-7789.

Baier, K.; Lehmann, H.; Stephan, D.P. und Lockau, W. (2004): NblA is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts, *Microbiology* 150, Seite 2739–2749.

Baier, K. und Lockau, W. (2005), unpublished results.

Baier, K.; Nicklisch, S.; Grundner, C.; Reinecke, J. und Lockau, W. (2001): Expression of two nblA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803, *FEMS Microbiol. Lett.* 195 [1], Seite 35-9.

Bergfors, T.M. (1999): *Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips*. A Laboratory Manual, Biotechnology Series, 1, International University Line, La Jolla.

Bhaya, D.; Schwarz, R. und Grossman, A. R. (2000): Molecular responses to environmental stress, Whitton, B. A. und Potts, M., *The Ecology of Cyanobacteria* Seite 397 - 442, Kluwer Academic Publishers.

Bienert, R.; Baier, K. ; Volkmer; Lockau, W. und Heinemann, U. (2005): Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation, *J. Biol. Chem.*, submitted.

Bienert, R.; Zeeb, M.; Dostál, L.; Feske, A.; Magg, Ch.; Max, K.; Welfle, H.; Balbach, J. und Heinemann, U. (2004): Single-stranded DNA bound to bacterial cold-shock proteins:

Preliminary crystallographic and Raman analysis, *Acta Crystallogr. Sect. D* 60, Seite 755-757.

Boisguerin, P.; Leben, R.; Ay, B.; Radziwill, G.; Moelling, K.; Dong, L. und Volkmer-Engert, R. (2004): An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies, *Chem. Biol.* 11, Seite 449-459.

Boussiba, S. und Richmond, A. E. (1980): C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*, *Arch. Microbiol.* 125, Seite 143-147.

Brünger, A.T. (1992): Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355, Seite 472-475.

Brünger, A.T.; Adams, P.D.; Clore, G.M.; DeLano, W.L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Jiang, J.-S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N.S.; Read, R.J.; Rice, L.M.; Simonson, T. und Warren, G.L. (1998): Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination., *Acta Crystallogr. Sect D* 54, Seite 905-921.

Budisa, N.; Steipe, B.; Demange, P.; Eckerskorn, C.; Kellermann, J. und Huber, R. (1995): High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 230 [2], Seite 788-796.

Cannon-Carlson, S. und Tang, J. (1997): Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels, *Anal. Biochem.* 246 [1], Seite 146-148.

Carter, C. W., Jr. und Carter, C. W. (1979): Protein crystallization using incomplete factorial experiments, *J. Biol. Chem.* 254 [23], Seite 12219-12223.

CCP4 (1994): The CCP4 suite: Programs for protein crystallography (Collaborative Computing Project. Number 4), *Acta Crystallogr. Sect. D* 50, Seite 760 - 763.

Collier, J. L. und Grossman, A. R. (1992): Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same, *J. Bacteriol.* 174, Seite 4718-4726.

- Collier, J. L. und Grossman, A. R. (1994): A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria, *EMBO J.* 13 [5], Seite 1039-1047.
- Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C. und Deléage, G. (2000): NPS@: Network Protein Sequence Analysis, *Trends Biochem. Sci.* 25 [3], Seite 147-150.
- Cruickshank, D.W.J. (1956), *Acta Crystallogr.* 9, Seite 754-756.
- Dauter, Z.; Dauter, M. und Dodson, E. (2002): Jolly SAD, *Acta Crystallogr. Sect. D* 58, Seite 494-506.
- Delbrück, H.; Mueller, U.; Perl, D.; Schmid, F. X. und Heinemann, U. (2001): Crystal structures of mutant forms of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein differing in thermal stability, *J. Mol. Biol.* 313 [2], Seite 359-369.
- Deng, H.; Bloomfield, V.A.; Benevides, J.M. und Thomas, G.J., Jr. (1999): Dependence of the Raman Signature of Genomic B-DNA on Nucleotide Base Sequence, *Biopolymers* 50, Seite 656-666.
- Diederichs, K. und Karplus, P. A. (1997): Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography, *Nat. Struct. Biol.* 4 [4], Seite 269-275.
- Dodson, E. (2003): Is it jolly SAD?, *Acta Crystallogr. Sect. D* 59, Seite 1958-1965.
- Dolganov, N. und Grossman, A. R. (1999): A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes, *J. Bacteriol.* 181 [2], Seite 610-617.
- Duerring, M.; Huber, R.; Bode, W.; Ruembeli, R. und Zuber, H. (1990): Refined three-dimensional structure of phycoerythrocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7 Å, *J. Mol. Biol.* 211 [3], Seite 633-644.
- Eberle, W.; Pastore, A.; Sander, C. und Rosch, P. (1991): The structure of ColE1 rop in solution., *J. Biomol. NMR* 1 [1], Seite 71-82.
- Engh, A. und Huber, R. (1991): Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement, *Acta Crystallogr. Sect. A* 47, Seite 392-400.

- Eriksson, J.; Salih, G. F.; Ghebramedhin, H. und Jansson, C. (2000): Deletion mutagenesis of the 5' psbA2 region in *Synechocystis* 6803: identification of a putative cis element involved in photoregulation, *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 3 [5], Seite 292-298.
- Ermolenko, D. N. und Makhatadze, G. I. (2002): Bacterial cold-shock proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 [11], Seite 1902-1913.
- Ernst, A. und Maldener, I. (2001): Cyanobacterial heterocysts, *Encyclopedia of Life Sciences* Seite 1-7, Nature Publishing Group.
- Evans, Gwyndaf und Pettifer, Robert F. (2001): CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra, *J. Appl. Crystallogr.* 34 [1], Seite 82-86.
- Feder, M.E. und Hofmann, G.E. (1999): Heat-shock proteins, molecular chaperons, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology, *Annu. Rev. Physiol.* 61, Seite 243-282.
- Foulds, I. J. und G., Carr N. (1977): A proteolytic enzyme degrading phycocyanin in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, *FEMS Microbiol. Lett.* 2, Seite 117-119.
- Glauser, M.; Bryant, D. A.; Frank, G.; Wehrli, E.; Rusconi, S. S.; Sidler, W. und Zuber, H. (1992): Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120, *Eur. J. Biochem.* 205 [3], Seite 907-915.
- Glazer, A. N. (1982): Phycobilisomes: structure and dynamics, *Annu. Rev. Microbiol.* 36, Seite 173-198.
- Graumann, P. L. und Marahiel, M. A. (1998): A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain, *Trends Biochem. Sci.* 23 [8], Seite 286-290.
- Green, B. R. (2001): Was "molecular opportunism" a factor in the evolution of different photosynthetic light-harvesting pigment systems?, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 [5], Seite 2119-2121.
- Grossman, A. R.; Bhaya, D.; Apt, K. E. und Kehoe, D. M. (1995): Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution, *Annu. Rev. Genet.* 29, Seite 231-288.

Grossman, A. R.; Schaefer, M. R.; Chiang, G. G. und Collier, J. L. (1993): Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria, *J. Bacteriol.* 175 [3], Seite 575-582.

Grossman, A. R.; Schaefer, M. R.; Chiang, G. G. und Collier, J. L. (1993): The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions, *Microbiol. Rev.* 57 [3], Seite 725-749.

Hanahan (1983): RbCl method.

Herrero, A.; Muro-Pastor, A. M. und Flores, E. (2001): Nitrogen control in cyanobacteria, *J. Bacteriol.* 183 [2], Seite 411-425.

Hershko, A. und Ciechanover, A. (1986): The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 33, Seite 19-56.

Hooft, R. W.; Vriend, G.; Sander, C. und Abola, E. E. (1996): Errors in protein structures, *Nature* 381 [6580], Seite 272.

Howlin, B.; Butler, S.A.; Moss, D.S.; Harris, G.W. und Driessen, H.P.C. (1993): TLSANL: TLS parameter-analysis program for segmented anisotropic refinement of macromolecular structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26, Seite 622-624.

Jiang, W.; Hou, Y. und Inouye, M. (1997): CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone, *J. Biol. Chem.* 272 [1], Seite 196-202.

Jones, P. G.; Krah, R.; Tafuri, S. R. und Wolffe, A. P. (1992): DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 174 [18], Seite 5798-5802.

Jones, P. G.; VanBogelen, R. A. und Neidhardt, F. C. (1987): Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 169 [5], Seite 2092-2095.

Jones, T. A.; Zou, J. Y.; Cowan, S. W. und Kjeldgaard (1991): Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr. Sect. A* 47, Seite 110-119.

Kabsch, W. (1976): A solution for the best rotation to relate two sets of vectors, *Acta Crystallogr. Sect. A* 32 [5], Seite 922-923.

Kabsch, W. (1993): Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *J. Appl. Crystallogr.* 26, Seite 795-800.

- Kerr, I. D.; Wadsworth, R. I. M.; Cubeddu, L.; Blankenfeldt, W.; Naismith, J. H. und White, M. F. (2003): Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein, EMBO J. 22 [11], Seite 2561-2570.
- Kloks, C. P.; Spronk, C. A.; Lasonder, E.; Hoffmann, A.; Vuister, G. W.; Grzesiek, S. und Hilbers, C. W. (2002): The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1, J. Mol. Biol. 316 [2], Seite 317-326.
- Koradi, R.; Billeter, M. und Wüthrich, K. (1996): MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, J. Mol. Graph. 14 [1], Seite 51-55.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 [259], Seite 680-685.
- Landgraf, C.; Panni, S.; Montecchi-Palazzi, L.; Castagnoli, L.; Schneider-Mergener, J.; Volkmer-Engert, R. und Cesareni, G. (2004): Protein interaction networks by proteome peptide scanning, PLoS Biol. 2 [Epub 2004 Jan 20], Seite E14.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993): PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures, J. Appl. Crystallogr. 26, Seite 283-291.
- Lei, M.; Podell, E.R.; Baumann, P. und Cech, T.R. (2003): DNA self-recognition in the structure of POT1 bound to telomeric single-stranded DNA, Nature 426, Seite 198-203.
- Li, H. und Sherman, L. A. (2000): A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, J. Bacteriol. 182 [15], Seite 4268-4277.
- Li, H. und Sherman, L. A. (2002): Characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and delta nblA mutants under nitrogen-deficient conditions, Arch. Microbiol. 178 [4], Seite 256-266.
- Lingel, A.; Simon, B.; Izaurralde, E. und Sattler, M. (2003): Structure and the nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain, Nature 426, Seite 465-469.
- Lockau, W.; Massalsky, B. und Dirmeier, A. (1988): Purification and partial characterization of a calcium-stimulated protease from the cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, Eur. J. Biochem. 172 [2], Seite 433-438.

- Lopez, M. M.; Yutani, K. und Makhatadze, G. I. (1999): Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition, *J. Biol. Chem.* 274 [47], Seite 33601-33608.
- Luque, I.; Ochoa De Alda, J. A.; Richaud, C.; Zabulon, G.; Thomas, J. C. und Houmard, J. (2003): The NblAI protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components, *Mol. Microbiol.* 50 [3], Seite 1043-1054.
- Luque, I.; Zabulon, G.; Contreras, A. und Houmard, J. (2001): Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Mol. Microbiol.* 41 [4], Seite 937-947.
- Maldener, I.; Lockau, W.; Cai, Y. P. und Wolk, C. P. (1991): Calcium-dependent protease of the cyanobacterium *Anabaena*: molecular cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*, sequencing and site-directed mutagenesis, *Mol. Gen. Genet.* 225 [1], Seite 113-120.
- Manival, X.; Ghisolfi-Nieto, L.; Joseph, G.; Bouvet, P. und Erard, M. (2001): RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins, *Nucleic Acids Res.* 29 [11], Seite 2223-2233.
- Max, K.; Zeeb, M.; Bienert, R.; Balbach, J. und Heinemann, U. (2005): T-rich DNA single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein *Bs*-CspB, *Nucleic Acids Res.*, Seite eingereicht.
- Mueller, U.; Perl, D.; Schmid, F. X. und Heinemann, U. (2000): Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein, *J. Mol. Biol.* 297 [4], Seite 975-988.
- Muffler, A.; Fischer, D.; Altuvia, S.; Storz, G. und Hengge-Aronis, R. (1996): The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*, *EMBO J.* 15 [6], Seite 1333-1339.
- Murshudov, G. N.; Vagin, A. A. und Dodson, E. J. (1997): Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. Sect. D* 53 [3], Seite 240-255.

- Nanni, B.; Balestreri, E.; Dainese, E.; Cozzani, I. und Felicioli, R. (2001): Characterisation of a specific phycocyanin-hydrolysing protease purified from *Spirulina platensis*, *Microbiol. Res.* 156 [3], Seite 259-266.
- Newkirk, K.; Feng, W.; Jiang, W.; Tejero, R.; Emerson, S. D.; Inouye, M. und Montelione, G. T. (1994): Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 [11], Seite 5114-5118.
- Nicholls, A.; Sharp, K.A. und Honig, B. (1991): Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 11, Seite 281-296.
- Ochoa de Alda, J. G.; Lichtle, C.; Thomas, J. -C. und Houmard, J. (2004): Immunolocalization of NblA, a protein involved in phycobilisome turnover, during heterocyst differentiation, *Microbiol.* 150, Seite 1377-1384.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997): Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276, Seite 307-326.
- Palinska, K.A.; Horgan, W.A. und Krumbein, W.E. (2002): Cyanobacteria, *Encyclopedia of Life Sciences* Seite 1-8, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group.
- Peitsch, M.C. und Guex, N. (1996): PROMOD and SWISS-MODEL: Internet-based tools for automated comparative protein modelling, *Biochem. Soc. Trans.* 24, Seite 274.
- Perrakis, A.; Harkiolaki, M.; Wilson, K. S. und Lamzin, V. S. (2001): ARP/wARP and molecular replacement, *Acta Crystallogr. Sect. D* 57 [Pt 10], Seite 1445-1450.
- Perrakis, A.; Morris, R. und Lamzin, V. S. (1999): Automated protein model building combined with iterative structure refinement, *Nat. Struct. Biol.* 6, Seite 458-463.
- Phadtare, S.; Alsina, J. und Inouye, M. (1999): Cold-shock response and cold-shock proteins, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 [2], Seite 175-180.
- Piven, I.; Ajlani, G. und Sokolenko, A. (2005): Phycobilisome linker proteins are phosphorylated in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 280 [22], Seite 21667-21672.

- Ramachandran, G. und Sasisekharan, V. (1968): Conformation of polypeptides and proteins., *Adv. Protein Chem.* 23, Seite 283-438.
- Ramos, J. L.; Gallegos, M. T.; Marques, S.; Ramos-Gonzalez, M. I.; Espinosa-Urgel, M. und Segura, A. (2001): Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 [2], Seite 166-171.
- Rechsteiner, M. (1987): Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis, *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, Seite 1-30.
- Reineke, U.; Volkmer-Engert, R. und Schneider-Mergener, J. (2001): Applications of peptide arrays prepared by the spot technology, *Curr. Opin. Biotech.* 12, Seite 59-64.
- Richaud, C.; Zabulon, G.; Joder, A. und Thomas, J. C. (2001): Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803, *J. Bacteriol.* 183 [10], Seite 2989-2994.
- Rocchia, W.; Sridharan, S.; Nicholls, A.; Alexov, E.; A., Chiabrera und Honig, B. (2002): Rapid grid-based construction of the molecular surface for both molecules and geometric objects: Applications to the finite difference Poisson-Boltzmann method, *J. Comp. Chem.* 23, Seite 128-137.
- Rossmann, M.G. und Blow, D.M. (1962): The detection of sub-units within the Crystallographic Asymmetric Unit, *Acta Crystallogr.* 15, Seite 24-31.
- Rost, B. (1996): PHD: predicting one-dimensional structure by profile based neural networks, *Methods Enzymology* 266, Seite 525-539.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2000): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, J.; Gorl, M. und Forchhammer, K. (1999): Nitrogen starvation in *synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival, *Arch. Microbiol.* 172 [4], Seite 247-255.
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Analyt. Biochem.* 166, Seite 368-379.

- Schindelin, H.; Herrler, M.; Willimsky, G.; Marahiel, M. A. und Heinemann, U. (1992): Overproduction, crystallization, and preliminary X-ray diffraction studies of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*, CspB, *Proteins* 14 [1], Seite 120-124.
- Schindelin, H.; Jiang, W.; Inouye, M. und Heinemann, U. (1994): Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 [11], Seite 5119-5123.
- Schindelin, H.; Marahiel, M. A. und Heinemann, U. (1993): Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein, *Nature* 364 [6433], Seite 164-168.
- Schindler, T.; Herrler, M.; Marahiel, M. A. und Schmid, F. X. (1995): Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates, *Nat. Struct. Biol.* 2 [8], Seite 663-73.
- Schindler, T.; Perl, D.; Graumann, P.; Sieber, V.; Marahiel, M. A. und Schmid, F. X. (1998): Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*, *Proteins* 30 [4], Seite 401-6.
- Schneider, T. R. (2002): A genetic algorithm for the identification of conformationally invariant regions in protein molecules, *Acta Crystallogr. Sect. D* 58 [Pt 2], Seite 195-208.
- Schomaker, V. und Trueblood, K.N. (1968): On the rigid-body motion of molecules in crystals, *Acta Crystallogr. Sect. B* 24, Seite 63-76.
- Schröder, K.; Graumann, P.; Schnuchel, A.; Holak, T. A. und Marahiel, M. A. (1995): Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif, *Mol. Microbiol.* 16 [4], Seite 699-708.
- Schwarz, R. und Grossman, A. R. (1998): A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 [18], Seite 11008-11013.
- Smith, J. L. (1997): Multiwavelength anomalous diffraction in macromolecular crystallography, *CCP4 Proceedings 1997*, Seite 1-9. URL: www.ccp4.ac.uk/courses/proceedings/1997/j_smith/main.html

- Stowe-Evans, E. L.; Ford, J. und Kehoe, D. M. (2004): Genomic DNA microarray analysis: identification of new genes regulated by light color in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*, *J. Bacteriol.* 186 [13], Seite 4338-4349.
- Strauss, H. (2003), persönliche Mitteilung.
- Strauss, H.; Misselwitz, R.; Labudde, D.; Nicklisch, S. und Baier, K. (2002): NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120 is a mostly alpha-helical protein undergoing reversible trimerization in solution, *Eur. J. Biochem.* 269 [18], Seite 4617-4624.
- Studemann, A.; Noirclerc-Savoye, M.; Klauck, E.; Becker, G.; Schneider, D. und Hengge, R. (2003): Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX, *EMBO J.* 22 [16], Seite 4111-4120.
- Tandeau de Marsac, N. und Houmard, J. (1993): Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms, *FEMS Microbiol. Rev.* 104, Seite 119-190.
- Taylor, G. (2003): The phase problem, *Acta Crystallogr. Sect. D* 59, Seite 1181-1890.
- Terwilliger, T. C. (2000): Maximum-likelihood density modification, *Acta Crystallogr. Sect. D* 56, Seite 965-972.
- Terwilliger, T. C. (2003): Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension, *Acta Crystallogr. Sect. D* 59 [Pt 1], Seite 38-44.
- Terwilliger, T. C. und Berendzen, J. (1999): Automated MAD and MIR structure solution, *Acta Crystallogr. Sect. D* 55, Seite 849-61.
- Thomas, G.J., Jr., Tsuboi, M. (1993): Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes, *Adv. Biophys. Chem.* 3, Seite 1-70.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22, Seite 4673-4680.
- Toole, C. M.; Plank, T. L.; Grossman, A. R. und Anderson, L. K. (1998): Bilin deletions and subunit stability in cyanobacterial light-harvesting proteins, *Mol. Microbiol.* 30 [3], Seite 475-486.

van Waasbergen, L. G.; Dolganov, N. und Grossman, A. R. (2002): nblS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *J. Bacteriol.* 184 [9], Seite 2481-2490.

Wang, W. und Malcom, B. A. (1999): Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertations using QuickChange™ site-directed mutagenesis, *BioTechniques* 26 [4], Seite 680-682.

Weiser, A.A.; Or-Giul, M.; Tapia, V.; Leichesenring, A.; Schuchhardt, J.; Frömmel, C. und Volkmer-Engert, R. (2005): SPOT synthesis: Reliability of array-based measurement of peptide binding affinity, *Anal. Biochem.* 342 [2], Seite 300-311.

Welsh, D.T. und Herbert, R.A. (1999): Osmotically-induced intracellular trehalose, but not glycine betaine accumulation promotes desiccation tolerance in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 174, Seite 57-63.

Willis, M. A.; Bishop, B.; Regan, L. und Brunger, A. T. (2000): Dramatic Structural and Thermodynamic Consequences of Repacking a Protein'S Hydrophobic Core, *Structure* 8 [12], Seite 1319-1328.

Winn, M. D.; Isupov, M. N. und Murshudov, G. N. (2001): Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement, *Acta Crystallogr. Sect. D* 57 [Pt 1], Seite 122-133.

Wolk, C. P.; Ernst, A. und Elhai, J. (1994): Heterocyst metabolism and development, Bryant, D. A., *The Molecular Biology of Cyanobacteria* Seite 769-823, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Wood, N. B. und Haselkorn, R. (1979): Proteinase activity during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing cyanobacteria, Cohen, G.N. und Holzer, H., *Limited Proteolysis in Microorganisms* Seite 159-166, U.S. Government Printing Office, Washington D.C.

Yang, H.; Jeffrey, P. D.; Miller, J.; Kinnucan, E.; Sun, Y.; Thoma, N. H.; Zheng, N.; Chen, P. L.; Lee, W. H. und Pavletich, N. P. (2002): BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure, *Science* 297 [5588], Seite 1837-1848.

Zeeb, M. (2003), persönliche Mitteilung.

Zeeb, M. und Balbach, J. (2003): Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterization, *Protein Sci.* 12 [1], Seite 112-123.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Supervisor Prof. Udo Heinemann, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Forschungsgruppe die Doktorarbeit anzufertigen. Des Weiteren danke ich Prof. Borriss für die Möglichkeit, an der Humboldt-Universität Berlin promovieren zu können. Ebenfalls danken möchte ich Prof. Wolfgang Lockau und Dr. Kerstin Baier für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit beim NblA-Projekt sowie Markus Zeeb und Dr. Jochen Balbach für die Kooperation auf dem Gebiet der Kälteschockproteine. Ein besonderes Dankeschön an Anette Feske für die Kristallisation der Csp:ssDNA-Komplexe und die schnellen Bestellungen, wenn mal wieder die Luft brannte, Lubomir Dostál für die Raman-Messungen, Dr. E.-Ch. Müller für die massenspektrometrischen Analysen und Dr. R. Volkmer (Charité Universitätsmedizin Berlin) für die Peptid-Blot-Assays. Ferner gilt mein Dank all meinen Arbeitskollegen: für das gute Arbeitsklima sowie für die viele Hilfe, die Anregungen und den Spaß. Jürgen danke ich für das Auffinden des fehlenden Punktes im Skript und die sonstige Hilfe bei der Bestimmung und Verfeinerung der Struktur und vor allem Klaas für die vielen Gespräche und den regen Gedankenaustausch fachlicher und zunehmend auch privater Natur. Vergessen möchte ich auch nicht unsere guten Geister im Sekretariat und Röntgenraum, Birgit und Andreas, sowie Katja für die zahlreichen Kristallansätze.

Danken möchte ich herzlich auch meiner Familie, die mich dorthin gebracht hat, wo ich heute stehe, Claudia für die Liebe, die sie mir entgegenbringt und die Freude und den Spaß, den wir mit unseren Kindern Martin und Hanna haben; meinen Eltern für ihre Unterstützung jeglicher Art, die viele gemeinsame Zeit und den Tritt in den H..., wenn es nicht so richtig vorwärts ging und meinen Brüdern Kai und Roland, die ich leider viel zu selten sehe.

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 1999 bis Dezember 2005 am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, Dezember 2005

Anhang

Magic Ehmke Screen

Crystallisation screen especially for protein - DNA complexes

50 mM buffer	Precipitating agent	salt / additive
Citrate pH 5.5	1 M LiSO ₄ (25ml/2M)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-(2.5 ml/1M)	10% t-butanol (5ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	20% MPD (10ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	30% Glycerol (17.44ml/89%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	15% 2,3-butandiol (7.5ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M) 0.15M NaCl (3.75ml/2M)
-"	25%DMSO (12.5ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	10% PEG 200 (5ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	10% PEG 400 (5ml/100%)	0.2 ml KCl (5ml/2M)
-"	10% PEG 550mme (5ml/100%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	10% PEG 1000 (10ml/50%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M)
-"	5% PEG 8000 (5ml/50%)	5mM MgCl ₂ (0.25ml/1M) 0.2M KCl (5ml/2M)
-"	10%PEG 8000 (10ml/50%)	0.1M MgCl ₂ (5ml/1M)
MES pH 6.0	1.75M AS (25ml/3.5M)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-(2.5ml/1M)	20% ethanol(10ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	10% PEG 3400 (10ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	10% PEG 400 (5ml/100%)	5mM BaCl ₂ (0.5ml/0.5M)
-"	15% PEG 2000mme (15ml/50%)	-----
-"	20% PEG 8000 (20ml/50%)	-----
Cacodylate	20% 1,3 - propandiol (10ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-" pH 6.5	1.5M Li ₂ SO ₄ (37.5ml/2M)	-----
-(2.5ml/1M)	10% ethanol(5ml/100%)	5mM BaCl ₂ (0.5ml/0.5M)
-"	20% PEG 200 (10ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	15% Isopropanol (7.5ml/100%)	0.1M KCl (2.5ml/2M)
-"	10% MPD (5ml/100%)	0.1M MgCl ₂ (5ml/1M)
-"	20% PEG 3400 (20ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	15% Glycerol (8.7ml/86%)	10mM CsCl
-"	10% PEG 400 (5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	20% Ethylenglycol (10ml/100%)	-----
-"	10% PEG 1000 (10ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	12.5% PEG 5000mme (12.5/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M) 0.1M KCl (2.5ml/2M)
Cacodylate	5% Ethylenglycol (2.5ml/100%)	1.5M NaCl (37.5ml/2M)
-" pH 7.0	20% Ethylenglycol (10ml/100%)	5mM BaCl ₂ (0.5ml/0.5M)
-(2.5ml/1M)	20% 2,3 - butandiol (10ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	10% PEG 550mme (5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	30% MPD (15ml/100%)	0.1M MgCl ₂ (5ml/1M)
-"	15% Isopropanol (7.5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M) 1M KCl (2.5ml/2M)
-"	30% PEG 350mme (15ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	10% PEG 400 (5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M) 0.1 KCl (2.5ml/2M)
-"	10% PEG 1000 (10ml/50%)	-----
-"	20% PEG 3000 (20ml/50%)	0.2M KCl (5ml/2M)
-"	2.5% PEG 8000 (2.5ml/50%)	0.4; KCl (10ml/2M)
-"	10% PEG 8000 (10ml/50%)	10mM BaCl ₂ (1ml/0.5M)
Tris pH 7.5	15% ethylenglycol (7.5ml/100%)	-----
-(2.5ml/1M)	25% PEG 550mme (12.5ml/100%)	-----
-"	30% 1,3 - propandiol (15ml/100%)	-----
-"	30% Glycerol (17.44ml/86%)	0.2MLiCl (5ml/2M)

ANHANG

-"	15% Isopropanol (7.5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M) 0.2M KCl (5ml/2M)
-"	20% MPD (10ml/100%)	0.1M CsCl (5ml/1M)
-"	20% PEG 400 (10ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.25ml/2M) 0.1M KCl (2.5ml/2M)
-"	25% PEG 1000 (25ml/50%)	-----
-"	40% PEG 600 (40ml/50%)	0.2M KCl (5ml/2M)
-"	20% PEG 2000mme (20ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5/1M)
-"	12.5% PEG 3400 (12.5ml/50%)	0.2M KCl (5ml/2M)
-"	10% PEG 8000 (10ml/50%)	5% Ethylenglycol (2.5ml/100%)
Tris pH 8.0	20% DMSO (10ml/100%)	-----
-" (2.5ml/1M)	2.5M NaCl (31.25/4M)	6% Glycerol (3.49ml/86%)
-"	20% PEG 3400 (20ml/50%)	50mM MgCl ₂ (2.5ml/1M)
-"	10% MPD (5ml/100%)	0.2M MgCl ₂ (10ml/1M)
-"	30% Ethylenglycol (15ml/100%)	5mM BaCl ₂ (0.5ml/0.5M)
-"	10% PEG 200 (5ml/100%)	0.2M MgCl ₂ (10ml/1M)
-"	30% t-butanol (15ml/100%)	0.2M LiCl (5ml/2M)
-"	20% PEG 600 (10ml/100%)	5% MPD (5ml/50%)
-"	25% PEG 1000 (25ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	20% PEG 3400 (20ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	5% PEG 2000mme (5ml/50%)	10% Ethylenglycol (5ml/100%)
-"	20% PEG 8000 (20ml/50%)	0.1M CsCl (5ml/1M)
-"	25% 2,3 - butanol (12.5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	1.0M Li ₂ SO ₄ (25ml/2M)	5% Ethylenglycol (2.5ml/100%)
-"	30% Ethylenglycol (15ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	12.5% PEG 3000 (12.5ml/50%)	0.1M MgCl ₂ (5ml/1M)
-"	25% 5000mme (25ml/50%)	10mM ZnAc (0.5ml/1M)
-"	30% Glycerol (17.44ml/86%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
Tris pH 8.5	15% Ethanol (7.5ml /100%)	6%Glycerol (3.49ml/86%)
-" (2.5ml/1M)	20% MPD (10ml/100%)	0.2M KCl (5ml/2M)
-"	20% PEG 2000mme (20ml/50%)	0.1M MgCl ₂ (5ml/1M)
-"	35% PEG 400 (17.5ml/100%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	10% PEG 600 (5ml/100%)	0.5 NaCl (12.5ml/2M)
-"	20% PEG350mme (10ml/100%)	50mM CsCl (2.5ml/1M)
-"	10% PEG 1000 (10ml/50%)	10mM ZnAc (0.5ml/1M)
-"	20% PEG 4000 (20ml/50%)	0.2M KCl (5ml/2M)
-"	15% PEG 2000mme (15ml/50%)	50mM CsCl (2.5ml/1M)
-"	20% PEG 3400 (20ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	5% PEG 5000mme (5ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M) 10% Glycerol (6.97ml/86%)
-"	5% PEG 8000 (5ml/50%)	-----
CHES pH 9	1.5M NaCl (37.5ml/2M)	5% MPD (2.5ml/100%)
-" (5ml/0.5M)	10% PEG 2000mme (10ml/50%)	50mM MgCl ₂ (2.5ml/1M)
-"	10% 2,3 - butandiol (5ml/100%)	-----
-"	12% Glycerol (6.98ml/86%)	0.1M CsCl (5ml/1M)
-"	15% Isopropanol (7.5ml/100%)	50mM MgCl ₂ (2.5ml/1M)
-"	20% MPD (10ml/100%)	50mM MgCl ₂ (2.5ml/1M)
-"	25%PEG 200 (12.5ml/100%)	-----
-"	10%PEG 550mme (5ml/100%)	0.5M MgCl ₂ (25ml/1M)
-"	20%PEG 5000mme (20ml/50%)	10mM MgCl ₂ (0.5ml/1M)
-"	25%PEG 350mme (12.5ml/100%)	5% Isopropanol (2.5ml/100%)
-"	10%PEG 8000 (10ml/50%)	6%Glycerol (3.49ml/86%)
-"	12.5%PEG 8000 (12.5ml/50%)	0.2M MgCl ₂ (10ml/1M)

Each x-tal solution contains 0.001% NaN₃ (5µl à 10% to 50ml).

Stock solution:

3.5M AS2.0M KCl; 2.0M NaCl; 4.0M NaCl; 1.0M MgCl₂; 2.0M Li₂SO₄; 1.0M CsCl

All stock solution are filtered.