

**„Shotgun-Kristallisation“ – Strukturaufklärung eines Ferritins
und einer Glyzerin-Dehydrogenase aus dem Archaeon
*H. salinarum***

von

Stefanie Offermann

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



**„Shotgun-Kristallisation“ – Strukturaufklärung eines Ferritins
und einer Glycerin-Dehydrogenase aus dem Archaeon**

H. salinarum

von

Stefanie Offermann

München, 2003

Meinen Eltern

... über das Unsichtbare wie über das Vergängliche haben Klarheit die Götter,
die Menschen können bloß Schlüsse ziehen (Alkmaion, um 500 v. Chr.).

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 (3) der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den angegebenen Mitteln erarbeitet zu haben.

München,

.....

Dissertation eingereicht am: 12. 12. 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 03. 2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L.-O. Essen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

Offermann, S., Bieger, B., Essen, L.-O., and Oesterhelt, D. (eingereicht) Crystal structure of an archaeal ferritin from *Halobacterium salinarum*. Structure.

Konferenzpräsentationen:

Offermann, S., Bieger, B., Oesterhelt, D., and Essen, L.-O.: Towards a structural repertoire of halophilism: Crystallization of halophilic proteins from *Halobacterium salinarum*. GBM-Tagung, München, 2000.

Offermann, S., Bieger, B., Essen, L.-O., and Oesterhelt, D.: Structure of a Dps Homolog from *Halobacterium salinarum* Crystallized via an Unusual "Shotgun-Method". Halophiles, Sevilla, 2001.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	WAS SIND HALOBAKTERIEN – WAS ZEICHNET SIE AUS?	1
1.2	SHOTGUN-KRISTALLISATION: HINTERGRUND UND ZIELSETZUNG	4
1.2.1	<i>Eine kurze Geschichte der Kristallisation.....</i>	4
1.2.2	<i>„Shotgun“-Kristallisation.....</i>	6
1.2.3	<i>Überblick über den Wachstumsprozeß von Kristallen.....</i>	9
1.3	FERRITIN.....	12
1.4	GLYZERIN-DEHYDROGENASE	17
1.5	ZIELSETZUNG.....	23
2	MATERIAL UND METHDEN	24
2.1	MATERIAL.....	24
2.1.1	<i>Bakterienstämme</i>	24
2.1.2	<i>Vektoren</i>	24
2.1.3	<i>Oligonukleotide.....</i>	25
2.1.4	<i>Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien</i>	27
2.1.4.1	<i>Chemikalien und Enzyme</i>	27
2.1.4.2	<i>Geräte.....</i>	28
2.1.4.3	<i>Programme.....</i>	29
2.2	STAMMLÖSUNGEN, MEDIEN UND PUFFER.....	30
2.2.1	<i>Proteine.....</i>	30
2.2.2	<i>DNA.....</i>	30
2.2.3	<i>Medien.....</i>	30
2.3	MIKROBIOLOGISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	32
2.3.1	<i>Propagierung und Aufbewahrung von E. coli.....</i>	32
2.3.2	<i>Propagierung und Aufbewahrung von H. salinarum.....</i>	32
2.3.3	<i>Präparation und Transformation elektrokompenter E. coli-Zellen</i>	32
2.3.4	<i>Präparation und Transformation von H. salinarum-Zellen.....</i>	33
2.3.5	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	34
2.3.6	<i>Isolation von genomischer DNA aus H. salinarum.....</i>	34
2.3.7	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	35
2.3.8	<i>Gelelektrophorese von DNA.....</i>	36
2.3.9	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....</i>	36
2.3.10	<i>Restriktionsverdau von DNA.....</i>	37

2.3.11	<i>Ligation von DNA-Fragmenten</i>	37
2.3.12	<i>DNA-Sequenzierung</i>	38
2.3.13	<i>Herstellung der Deletionsmutante von <i>H. salinarum</i>ΔFerr</i>	38
2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	40
2.4.1	<i>SDS-Gelelektrophorese</i>	40
2.4.2	<i>Färben von SDS-Gelen</i>	41
2.4.3	<i>„Elektro Blotting“</i>	43
2.4.4	<i>Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)</i>	44
2.4.5	<i>Aufkonzentrieren von Proteinen</i>	44
2.4.6	<i>Prteinsequenzanalysen</i>	45
2.4.7	<i>Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen</i>	45
2.4.8	<i>Elektronenmikroskopie</i>	45
2.4.9	<i>Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy)</i>	46
2.5	PROTEINEXPRESSION UND -AUFREINIGUNG	46
2.5.1	<i>Zytosolpräparation von <i>H. salinarum</i> (Shotgun-Methode)</i>	46
2.5.2	<i>Fraktionierung von Zytosol aus <i>H. salinarum</i> (Shotgun-Methode)</i>	47
2.5.2.1	<i>Anionenaustauscherchromatographie (AC)</i>	48
2.5.2.2	<i>Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)</i>	49
2.5.2.3	<i>Chromatographie mit Hydroxyapatit</i>	49
2.5.2.4	<i>Gelfiltration (GF)</i>	50
2.5.3	<i>Native Aufreinigung des Ferritins aus <i>H. salinarum</i> TOM</i>	50
2.5.4	<i>Expression des Bacteriorhodopsin-Ferritin-Fusionsproteins</i>	50
2.5.5	<i>Überexpression von mit einem Histidinpeptid versehenem Ferritin</i>	51
2.5.6	<i>Aufreinigung von mit einem Histidinpeptid versehenem Ferritin mittels immobilisierter Metallchelataffinitäts-Chromatographie (IMAC)</i>	52
2.6	PROTEINKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN	53
2.6.1	<i>Techniken der Proteinkristallisation</i>	53
2.6.2	<i>Identifikation von Proteinkristallen</i>	54
2.6.3	<i>Kristallographische Datenerfassung</i>	55
2.6.4	<i>Datenprozessierung</i>	55
2.6.5	<i>Das Phasenproblem</i>	56
2.6.6	<i>Methode des Molekularen Ersatzes (MR)</i>	57
2.6.6.1	<i>Die Rotationsfunktion</i>	58
2.6.6.2	<i>Die Translationsfunktion</i>	58

2.6.7	<i>Modellbau und Verfeinerung</i>	59
2.6.7.1	Graphische Darstellungen	60
2.6.7.2	Analyse von Atommodellen.....	61
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION: SHOTGUN-KRISTALLISATION.....	62
3.1	SHOTGUN-KRISTALLISATION: METHODE.....	64
3.1.1	<i>Gewinnung und Fraktionierung von halobakteriellem Zytosol</i>	65
3.1.2	<i>Kristallisation und Identifikation von halophilen Proteinen</i>	79
3.1.3	<i>Kristalle der Shotgun-Kristallisation</i>	96
3.2	SHOTGUN-KRISTALLISATION: FERRITIN	101
3.2.1	<i>Struktur</i>	101
3.2.1.1	Kristallformen und Qualität der Daten.....	101
3.2.1.2	Phasenbestimmung.....	102
3.2.1.3	Verfeinerung und Qualität des Modells	103
3.2.1.4	Struktureller Vergleich mit anderen Proteinen der Bacterioferritin/Ferritin Superfamilie	103
3.2.2	<i>Eisenbindung und -assimilation</i>	106
3.2.2.1	Bindungsstellen für Eisen.....	106
3.2.2.2	Mögliche Eintrittsstelle für Eisen (Fe ²⁺)	110
3.2.4	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	118
3.2.4.1	Aufreinigung des Ferritins aus <i>H. salinarum</i>	118
3.2.4.3	Ferritin-Deletionsmutante	122
3.2.4.4	Kristallisationsexperimente mit reinem Ferritin	122
3.3	SHOTGUN-KRISTALLISATION: GLYZERIN-DEHYDROGENASE.....	123
3.3.1	<i>Struktur</i>	123
3.3.1.1	Kristallform und Qualität der Daten.....	123
3.3.1.2	Phasenbestimmung.....	124
3.3.1.3	Verfeinerung und Qualität des Modells	124
3.3.1.4	Sequenz- und Strukturvergleich der halobakteriellen GlyDH mit homologen Proteinen.....	125
3.3.1.5	Aktives Zentrum: Bindung von Metallion, Kofaktor und Substrat.....	130
3.3.1.6	Vergleich verschiedener Glyzerin-Dehydrogenasen im Hinblick auf Substrat- und Kofaktorspezifität.....	138
3.4	HALOPHILIE: ANPASSUNG AN HOCHSALZBEDINGUNGEN.....	141

4	ZUSAMMENFASSUNG	149
5	LITERATURVERZEICHNIS	152
6	ANHANG	165
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	165
6.2	ABKÜRZUNGEN DER AMINOSÄUREN	167
6.3	ÜBERSICHT ÜBER DIE WICHTIGSTEN ANSÄTZE DER SHOTGUN-KRISTALLISATION	168
6.4	TABELLARISCHE ÜBERSICHT DER STATISTIKEN ZUR STRUKTURLÖSUNG.....	174
6.4.1	<i>Ferritin</i>	174
6.4.2	<i>Glyzerin-Dehydrogenase (momentaner Stand)</i>	175

1 Einleitung

1.1 Was sind Halobakterien – was zeichnet sie aus?

Die Lebewesen dieser Erde lassen sich in drei große Reiche aufteilen. Carl Woese war der erste, der diese Einteilung vorschlug: er definierte drei Domänen, Archaea, Eubacteria und Eukarya, wobei die letzten beiden gut bekannt sind (s. Abb.1; Woese, 1990; Woese, 1988).

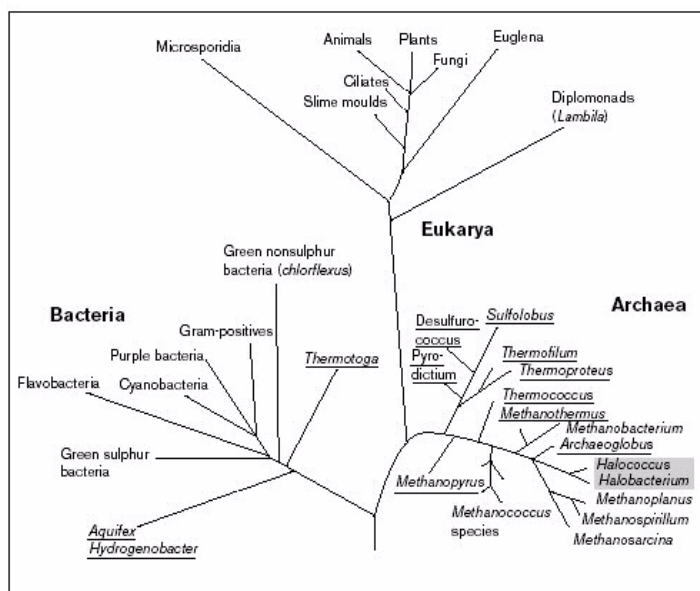


Abb. 1. Phylogenetischer Baum der drei Domänen Archaea, Eubacteria und Eukarya. Diese Aufteilung wurde von Carl Woese nach Vergleichen der 16s rRNA-Sequenzen vorgenommen. Als Beispiele für Extremophile sind halophile Organismen schattiert, thermophile und hyperthermophile unterstrichen dargestellt. Aus: Hough & Danson, 1999.

Die dritte Domäne (Archaea) dagegen wurde bisher in weit geringerem Ausmaß untersucht. Sie weist im Gegensatz zu den anderen beiden Domänen einen auffallenden Anteil an extremophilen Organismen auf (s. Abb. 1). Extremophil („das Extreme liebend“) oder auch poikilotroph („vielfältig genährt“) ist für uns „mesophile“ („das mittlere Maß liebende“) Menschen alles, was nicht den „normalen“ menschlichen Bedingungen entspricht, d.h. Extreme in Temperatur (psychro- und thermophil), Druck (baro- oder piezophil), pH-Wert (acido- und alkaliphil), verfügbarer Sauerstoffmenge, Strahlungstoleranz, verwertbarer Nahrung und ebenso ein Leben unter hohen Salzkonzentrationen (halophil) (Rothschild & Mancinelli, 2001). Gleichzeitig gibt es auch unter den Archaea „normale“, d.h. mesophile Organismen: dazu gehören Mikroorganismen in Böden, Seen und Ozeanen, die erst seit kurzer Zeit kultiviert werden und von denen man annimmt, daß sie sich ausgehend von ihren thermophilen Ahnen entwickelt haben (DeLong, 1998; Olsen, 1994).

Taxonomisch betrachtet sind die Archaea (Domäne) unterteilt in Euryarchaeota (Methanogene und Verwandte), Crenarchaeota (extrem Thermophile und Verwandte) und Korarchaeota. Daneben gibt es noch eine Vielzahl unklassifizierter Archaeota. Neben den methanogenen Organismen enthält der Stamm der Euryarchaeota auch die Klasse der Halobacteria. Folgt man der weiteren Klassifizierung über Halobacteriales (Ordnung), Halobacteriaceae (Familie), Halobacterium (Gattung), gelangt man zur Spezies *Halobacterium salinarum*. Proteine dieses halophilen stäbchenförmigen Mikroorganismus' standen im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit.

Die Besonderheit dieses Archaeons ebenso wie die der übrigen Haloarchaea ist, daß sie fast ausschließlich in Umgebungen mit hohen Salzkonzentrationen (Optimum bei 4.3 M NaCl), wie z.B. dem Toten Meer, leben, die Mindestmenge an Salz, die sie für ihr Wachstum benötigen, liegt bei 2.0 M NaCl (Ginzburg, 1970). Eine „normale“ Zelle, die nicht an diese extremen Bedingungen angepaßt ist, würde aufgrund des osmotischen Drucks schrumpfen und zugrunde gehen. Nicht so die Haloarchaea: sie haben eine Reihe zellulärer Charakteristika entwickelt, die ihnen das Leben unter Hochsalz ermöglichen, sie aber gleichzeitig auch davon abhängig gemacht haben. Dazu gehört zum einen die Fähigkeit, die verschiedensten Arten von Energieumwandlungen nutzen zu können, besonders auch unter anaeroben Bedingungen (Retinal-abhängige Photosynthese), mit der die Entwicklung einer komplexen Signaltransduktion einhergegangen ist. Zum anderen akkumulieren sie in ihrem Zellinneren hohe Konzentrationen an KCl (4 M) und NaCl (1 M) (Christian & Waltho, 1962; Ginzburg, 1970) – ein sehr seltener Vorgang unter den Lebewesen. Diese Eigenart unterscheidet sie von anderen Organismen, die unter hohen Salzkonzentrationen leben können: diese Eubakterien/Eukaryoten, z.B. die Alge *Dunaliella salina*, halten die Salzkonzentration im Zellinnenraum niedrig und können nur durch Anreicherung sogenannter „kompatibler Solute“ überleben (Galinski, 1993). Ihre Zellmaschinerie muß deshalb nicht an Hochsalz angepaßt werden, was bei den Haloarchaea als Folge der zytosolischen Ionenkonzentration unvermeidlich war.

Halophile Archaea müssen aufgrund ihrer Anpassung an Hochsalz Proteine enthalten, die bei einem Salzgehalt von 1 M NaCl und 4 M KCl funktionell sind. Zu unterscheiden sind dabei *halotolerante* Proteine, die auch niedrigere Salzkonzentrationen vertragen, ohne dabei zu denaturieren, und *halophile* Proteine, die nur in nahezu gesättigten Salzlösungen nativ gefaltet und aktiv sind. Ihre Stabilität steigt mit zunehmender Salzkonzentration, zu niedrige Konzentrationen (< 1 M NaCl, Lanyi, 1974) führen zu Denaturierung und Inaktivierung. Welche besonderen Eigenschaften zeichnen nun diese Proteine im Vergleich zu ihren

mesophilen Analoga aus, die sie zu dieser „Laune“ berechtigen können? Eine „Laune“, die ihnen in dem Medium, in dem sich die Zellen befinden, z.B. Salzseen, einen Vorteil bietet, und deren Verständnis uns helfen könnte, diese Eigenschaften biotechnologisch einzusetzen, etwa zur Entwicklung halophiler „Extremozyme“, d.h. von Enzymen (griechisch: ζύμη, Sauerteig), die unter extremen, z.B. Hochsalz-Bedingungen arbeiten (Hough & Danson, 1999; Madigan & Marrs, 1997; Persidis, 1998). Industriell genutzt werden heutzutage v.a. thermostabile Enzyme, eines der bekanntesten Beispiele ist die DNA-Polymerase („Taq-Polymerase“) aus dem Eubacterium *Thermus aquaticus*, die standardmäßig zur PCR verwendet wird (Chien, 1976). Doch auch der Einsatz halophiler Enzyme, z.B. der β -Galaktosidase aus *Haloferax alicantii* oder einer extrazellulären Serinprotease aus *Halobacterium salinarum* (*halobium*), findet immer mehr Interesse, da diese Proteine gegenüber ihren mesophilen Analoga den Vorteil bieten, daß sowohl die Fermentation von halophilen Organismen zur Enzymherstellung als auch die Enzymanwendung selbst aufgrund der hohen Salzkonzentrationen unter nicht-sterilen Bedingungen stattfinden kann (Margesin & Schinner, 2001). Zu beachten ist hierbei allerdings die Existenz halophiler Phagen, deren Wirken rasch zu einer Lyse der gesamten Fermentationskultur führen kann (Torsvik & Dundas, 1974).

Es existiert bereits einiges Wissen über die Eigenschaften, die dazu beitragen, daß ein Protein halophil ist. Schon sehr früh wurde festgestellt, daß diese Proteine einen hohen Prozentsatz an sauren und gleichzeitig eine Verminderung hydrophober Aminosäurereste aufweisen (Lanyi, 1974). Spätere statistische Vergleiche bestätigten diese Entdeckung: eine Analyse von 26 halophilen löslichen Proteinen und ihren nicht-halophilen Homologen zeigte eine erhöhte Zahl saurer, aber auch kleinerer hydrophober Reste (Glyzin, Alanin, Valin) und gleichzeitig einen stark verminderten Gehalt an Lysin, was insgesamt die stark saure Natur halophiler Proteine ausmacht (Madern, 1995; Madern, 2000a). Bisher ist nur eine sehr geringe Zahl an Strukturen halophiler Proteine bekannt, d.h., alle Versuche, den „Mechanismus Halophilie“ besser erklären zu können, müssen sich auf diese wenigen Fälle beschränken. Eine Vermehrung der Beispiele wäre darum von großem Vorteil. Das Vorzeigeprotein – weil am besten untersucht – ist die Malat-Dehydrogenase aus dem halophilen Organismus *Haloarcula marismortui*. Anhand von Studien an diesem Protein bezüglich seiner Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel konnte folgendes Modell erstellt werden: die Stabilisierung des Proteins funktioniert unter Hochsalzbedingungen so, daß sich um das Protein ein Netzwerk aus hydratisierten Kationen ausbildet. Dieser Prozeß führt dazu, daß das halophile Protein in konzentrierten Salzlösungen 0.8 g Wasser/g Protein bzw. 0.35 g Salz/g Protein bindet, was verglichen zu 0.2-0.4 g Wasser/g Protein und so gut wie keinen Kationen bei nicht-halophilen

Proteinen erstaunlich ist (Zaccai, 1989; Danson & Hough, 1997; Bonneté, 1993). Es wurde postuliert, daß die Bindung dieses Netzwerkes aus Kationen über die sauren Gruppen bewerkstelligt wird, die vorrangig an der Oberfläche des Proteins angeordnet sind. Die Bindung hydratisierter Kationen konnte auch für andere halophile Proteine nachgewiesen werden (Frolow, 1996; Pieper, 1998; Britton, 1998). Zusammenfassend geht es hier darum, die Stabilität halophiler Proteine unter Hochsalz zu erläutern, die nach dem vorgestellten Modell auf ihre außergewöhnlich hohe Zahl an negativen Resten zurückgeführt werden kann.

Ein weiterer Versuch, Halophilie zu deuten, geht den umgekehrten Weg und versucht nicht, die besondere Stabilität unter Hochsalz-, sondern die Instabilität unter Niedrigsalzbedingungen zu erklären: diesem Modell liegt eine partielle Häufung saurer Reste („patchwork-artig“) auf der Oberfläche halophiler Proteine zugrunde (L.-O. Essen, unveröffentlicht). Die elektrostatische Abstoßung dieser Aminosäuren bewirkt eine Destabilisierung des Proteins, die nur durch hohe Salzkonzentrationen vermieden werden kann. Dafür spricht eine zunehmende Stabilisierung mit sinkendem pH-Wert unter geringen Salzkonzentrationen, da hier die Carboxylgruppen der sauren Reste zunehmend protoniert und damit neutralisiert werden (Elcock & McCammon, 1998; Böhm & Jaenicke, 1994; Madern, 2000a). Als weitere Besonderheit wurde bei einigen halophilen Proteinen eine zusätzliche Strukturdomäne mit einer Häufung an sauren Aminosäureresten gefunden, die bei ihren mesophilen Analoga fehlt (Hickmann und Oesterhelt, unveröffentlicht; Marg, 2002).

Diese Eigenschaften – Netzwerk aus Kationen, Häufung saurer Reste an der Proteinoberfläche, zusätzliche Strukturdomäne – tragen alle in mehr oder weniger großem Ausmaß zur Stabilisierung halophiler Proteine bei. Es handelt sich in allen Fällen um Besonderheiten der 3D-Struktur, was bedeutet, daß für ein vollständiges Verständnis des halophilen Erscheinungsbildes die Aufklärung weiterer 3D-Strukturen unverzichtbar ist.

1.2 Shotgun-Kristallisation: Hintergrund und Zielsetzung

1.2.1 Eine kurze Geschichte der Kristallisation

Kristallisation – Kristall. Das Wort Kristall stammt von dem griechischen Wort „κρύσταλλος“ – „klares Eis“. Die alten Griechen gaben Quarz-„Kristallen“ diesen Namen, deren Aussehen sie an die Struktur von gefrorenem Wasser erinnerte. Vergleicht man Eis mit Kristallen, seien es nun anorganische Kristalle wie Quarz oder organische Kristalle z.B. aus

Proteinen, erkennt man, daß ihnen ein wichtiger Punkt gemeinsam ist: sie zeigen einen hochgeordneten symmetrischen Aufbau aus einem immer wiederkehrenden Satz von Molekülen bzw. Atomen. Das kleinste und einfachste Volumenelement eines Kristalls nennt man Einheitszelle, seine Gesamtstruktur kann man sich als eine – in der Natur – endlich große Aneinanderreihung dieser Zellen vorstellen – entstanden durch wiederholte Translation, d.h. Verschiebung im dreidimensionalen Raum. Dies impliziert theoretisch eine hohe Perfektion und Reinheit dieser Strukturen, da Fremdkörper (= nicht-dazugehörige Atome) ihren Aufbau stören würden. Praktisch jedoch gibt es den „perfekten“ Kristall nicht, da sich immer Bereiche finden, an denen die Symmetrie gestört ist, z.B. durch den Einschluß von Verunreinigungen (siehe weiter unten).

Allgemein wurde Kristallisation schon sehr früh als (zumeist letzter) Schritt in der Aufreinigung von Proteinen verwendet. Dabei war das Ziel tatsächlich zuerst die Reinigung des jeweiligen Proteins, nicht der Erhalt von Kristallen, die zur Strukturaufklärung eingesetzt werden könnten. Allerdings hatte die Probe auch in diesen Fällen zumeist einen Reinheitsgrad von mindestens 50% erreicht (Jakoby, 1971). Kristalle dienten gleichzeitig als Beleg für die Reinheit eines Proteins, an dem dann weitere Untersuchungen unternommen werden konnten.

Geht man in der Geschichte der Kristallisation in die Frühzeit zurück, fällt auf, daß hier wenig Wert auf Reinheit von Kristallisationsproben gelegt worden ist. Die ersten Berichte über Proteinkristalle liegen mehr als eineinhalb Jahrhunderte zurück: 1840 kristallisierte Hünefeld Hämoglobin aus dem Blut des Regenwurms, aus Blut, einer nicht annähernd homogenen Lösung (Hünefeld, 1840). Hünefeld hatte das Blut zwischen zwei Glasflächen gepreßt und trocknen lassen, d.h. die ersten beschriebenen Kristalle sind ohne vorherige Aufreinigung des Proteins mehr oder weniger zufällig entstanden. Erst zehn Jahre später unternahm Fünke – ebenfalls an Hämoglobin – gezielte Studien im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Kristallwachstum und verwendete als erstes organische Lösungsmittel als Fällungsreagenz. Eine Reihe weiterer erfolgreich kristallisierter Proteine folgten, z.B. Concanavalin A und B (McPherson, 1991b, Sumner, 1919) und als erstes Enzym die Urease der Schwertbohne, *Canavalia ensiformis* (Sumner, 1926). Doch erst 1934 gelang es Bernal und Crowfoot, das erste über Röntgenstrahlung erhaltene Brechungsmuster eines Proteinkristalls, des Pepsins, zu produzieren (Bernal & Crowfoot, 1934). Und es dauerte noch weitere 31 Jahre, bis 1965 die erste röntgenkristallographisch gelöste 3D-Struktur eines Enzyms bekannt wurde: das Lysozym aus Hühnereiweiß (Blake, 1965). Auch hier wurden erfolgreich Versuche durchgeführt, Lysozym direkt aus Hühnereiweiß zu kristallisieren (Alderton & Fevold, 1946).

Zu dieser Zeit spielte die Reinheit der Proteinprobe eine geringere Rolle als die Weiterentwicklung röntgenkristallographischer Techniken. Allerdings gab es auch einen Überfluß an Kristallen, die sich in den Jahren zuvor angesammelt hatten und nur darauf warteten, strukturellen Untersuchungen unterzogen zu werden – ein paradiesischer Zustand für Kristallographen. Das änderte sich Mitte der siebziger Jahre: die Vorräte an Kristallen gingen zur Neige, und die heute allgemein bekannte Tatsache, daß die Kristallisation die größte Hürde in der Strukturlösung darstellt, begann sich abzuzeichnen (McPherson, 1991b). Der Fokus der Forschung wechselte: neue Kristalle mußten gezielt erzeugt, und damit auch geeignete Kristallisationsbedingungen geschaffen werden.

Im Zusammenhang damit war es essentiell, den Prozeß der Kristallisation an sich näher zu betrachten. Schlichtkrull setzte sich als einer der ersten mit diesem Vorgang genauer auseinander, als er die Kristallisation von Insulin untersuchte (Schlichtkrull, 1957). Heutzutage dient Kristallisation in der Industrie oft standardmäßig zur Aufreinigung von chemischen, pharmazeutischen und auch biologischen (Antibiotika, Aminosäuren; Judge, 1998) Substanzen, im Hinblick auf Proteine jedoch wurden in dieser Richtung – nach der „historischen Kristallfrühzeit“ – kaum Studien unternommen. Kristallisation von Proteinen gilt immer noch eher als eine Art von „geheimnisvoller Kunst“, die sehr viel mit Empirie und damit auch Glück oder Zufall zu tun hat, denn als Wissenschaft – obwohl es mittlerweile eine Menge an fundiertem theoretischem Wissen zu dieser „Kunst“ gibt, wie sie funktioniert, wie man sie beeinflussen kann (McPherson, 1989; McPherson, 1991a; Ducruix, 1992). Ein Überblick über den Wachstumsprozeß von Kristallen findet sich unter Abschnitt 1.2.3.

1.2.2 „Shotgun“-Kristallisation

Was soll man unter „shotgun“-Kristallisation verstehen? Eine freie Übersetzung mit „Schrottschuß-Kristallisation“ trifft den Sinn dieser Methode im Prinzip nicht schlecht. Man schießt ungefähr in eine Richtung, weiß aber durch die Waffe, die man einsetzt, schon vorher, daß man kein bestimmtes Ziel treffen wird, was man in diesem Fall allerdings auch nicht anstrebt. Aber man trifft etwas, und zwar auf breiter Front, wenn es gut geht. Die Waffe ist in dem Fall der Kristallisationsansatz, was getroffen werden soll, sind Proteine – hier lösliche Proteine – aus *Halobacterium salinarum*. Das Ziel des Ansatzes ist es also, nicht ein spezielles Protein aus diesem Organismus zu kristallisieren und seine Struktur zu lösen, sondern diejenigen Proteine zu finden, die eine intrinsische Neigung zur Kristallisation zeigen. Das bedeutet, daß mühevoll Klonieren, Exprimieren und Aufreinigen wegfällt und nur eine grobe Fraktionie-

rung des Gesamtzytosols (= Masse der löslichen Proteine) durchgeführt wird. Die Fraktionen, die man dabei erhält und die z.T. noch über 100 verschiedene Proteine enthalten können, werden in Kristallisationsansätze eingebracht – vorerst unter Verwendung käuflich erwerbbarer Kristallisations-„Screens“ (Hampton-Screen). Die Voraussetzung für eine sinnvolle Anwendung dieser Methode ist, daß man mit einem Organismus arbeitet, von dem keine oder nahezu keine Strukturen bekannt sind, dessen Genomsequenz jedoch bekannt ist, so daß man die Proteine, die sich heraus-„kristallisieren“, ohne Problem identifizieren kann. Beide Bedingungen erfüllt das Archaeon *H. salinarum* (s. auch: <http://www.halolex.mpg.de>). Warum zudem besonders halophile Proteine auch biotechnologisch interessant sind, wurde bereits dargelegt. Im weiteren besteht die Möglichkeit, nach Identifikation eines Kristalls das entsprechende Protein gezielt aufzureinigen (mit oder ohne vorangehende Klonierung/Überexpression); der Vorteil ist bei einer anschließenden erneuten Kristallisation des nun aufgereinigten Proteins, daß die Kristallisationsbedingungen dann bereits bekannt sind. So bietet die Schrotschuß-Methode einen effizienten Weg, das Repertoire an halophilen Proteinstrukturen innerhalb einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne erheblich zu erweitern.

Ein Rückblick auf die Anfänge der Kristallisation zeigt, daß der Ansatz der Schrotschuß-Kristallisation große Ähnlichkeit mit der damaligen Vorgehensweise aufweist (s.o.): sowohl damals auch in dieser Arbeit wurde/wird kristallisiert, ohne vorher das Protein zu möglichst 100% aufgereinigt zu haben (Hämoglobin, Lysozym) – was den heutzutage üblichen Strategien vollkommen widerspricht. Dabei ist eine zu 100% aufgereinigte, völlig homogene Probe, ebenso wie ein perfekter Kristall, ohnehin nur theoretisch möglich, was oben bereits dargelegt worden ist. Besonders in der Biochemie, in der Kristalle aus Makromolekülen wie Proteinen, aber auch aus Nucleinsäuren oder Viren gezüchtet werden, muß man mit Verunreinigungen z.B. aufgrund von anderen Makromolekülen rechnen. Heterogenität entsteht zudem durch Denaturierung von Proteinen, die partielle Bindung von Liganden oder durch die besonders hohe Flexibilität eines Makromoleküls; ein prominentes Beispiel hierfür sind die Immunglobuline (McPherson, 1996). Diese Verunreinigungen können theoretisch u.a. zu Morphologieveränderungen, Limitationen beim Kristallwachstum und infolgedessen zu schlechter Auflösung – dem größten Problem – bei der Röntgenmessung führen. Im allgemeinen werden deshalb in der „modernen Kristallisation“ nur hoch aufgereinigte Proben verwendet, eine schlecht aufgereinigte Probe zählt als Hauptursache für ein negatives Kristallisationsergebnis.

Auch jüngste Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Verunreinigungen auf die Kristallisation eines bestimmten Proteins – zumeist Lysozym (Skoury, 1995; Judge, 1998; Caylor, 1999) oder Ovalbumin (Judge, 1995) zeigten, daß der Grundsatz der Reinheit nicht

prinzipiell gilt. In diesen Studien konnte zwei Dinge gezeigt werden: zum einen traten oft abhängig von der Konzentration an Verunreinigung Veränderungen in der Kristallmorphologie (Risse, Sprünge) und auch ein Einbau der Fremdmoleküle in den Kristall auf. Zum anderen hatten diese Verunreinigungen aber meist keinen meßbaren Effekt auf wichtige Parameter der Strukturlösung (Gitterkonstanten, B-Faktoren, Auflösung). Zudem konnten in vielen Fällen trotz Anwesenheit von Fremdmolekülen in der Mutterlösung über Elektrophorese Kristalle mit einer mehr als 99%igen Reinheit nachgewiesen werden. Verunreinigungen scheinen also eher „Schönheitsfehler“ zu bewirken als für den Kristallographen folgenreiche Mängel. Selbstverständlich darf man diese Ergebnisse nicht grundsätzlich auf alle Proteine übertragen, doch die Wahrscheinlichkeit ist hoch, daß auch andere Proteine in ihrem Kristallwachstum nicht von Verunreinigungen beeinträchtigt werden.

Studien dieser Art werden in der Regel mit Proteinen gemacht, die teilweise schon im vorigen Jahrhundert zum ersten Mal kristallisiert wurden, da damals durch einen Mangel an ausgefeilten Techniken der Zwang bestand, sich auf Proteine zu beschränken, die in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen. Diese Proteine stellen ein gut zu untersuchendes System dar etwa für Lichtbrechungs-Experimente, Messungen von Wachstumsraten und die Erprobung neuer Techniken (McPherson, 1991a). Der Ansatz dieser Arbeit greift somit – unter der Verwendung moderner Methoden – auf diese Anfänge zurück: auch hier werden vorrangig Proteine kristallisiert, die in großer Menge vorhanden oder aufgrund bestimmter Eigenschaften prädestiniert für die Kristallisation sind. Eine dieser Eigenschaften könnte eine hohe „Widerstandskraft“ gegenüber dem Einfluß von Verunreinigungen sein.

Da – trotz solcher Studien – der Reinheitsgrundsatz generell noch immer gültig ist, wurde bis jetzt meiner Kenntnis nach kein gezielter Versuch unternommen, Proteine aus dem Zytosol eines bestimmten Organismus´ nur nach grober Fraktionierung zu kristallisieren. Verbunden damit ist die Idee, nicht ein bestimmtes Protein zu kristallisieren, sondern sich auf die Proteine zu konzentrieren, die aus einem gegebenen Organismus am ehesten zur Kristallisation neigen.

Am ehesten dem Schrotschuß-Ansatz vergleichbar ist ein Verfahren, das in der Industrie zur Kristallisation und damit Aufreinigung von vorwiegend anorganischen Stoffen weit verbreitet ist: die sogenannte „*bulk crystallization*“ („Massenkristallisation“). Der Einsatz von Rührkesseln ermöglicht hier eine billige und leicht im Maßstab zu vergrößernde Trennung und Reinigung von Substanzen. Mit Proteinen wurden jedoch bis heute wenige Versuche in dieser Richtung unternommen (Schlichtkrull, 1957a; Judge, 1995); Beispiele sind etwa Enzyme wie

die Glucose-Isomerase (Visuri, 1990) oder eine Lipase aus Pilzen (Jacobsen, 1997). Neben dem Massenansatz, aber auch in Verbindung zu ihm werden vermehrt Bedingungen getestet, deren Anwendung erst seit einigen Jahren überhaupt möglich ist. Ein Ansatz konzentriert sich beispielsweise auf die Wirkung von Schwerelosigkeit (DeLucas, 1989). Seit mittlerweile über 15 Jahren kann man feststellen, daß Mikrogravitätsbedingungen einen positiven Einfluß auf die Kristallisation von Proteinen ausüben, was v.a. auf eine Elimination der Sedimentation von wachsenden Kristallen und einen Wandel des Transports in der Lösung zurückzuführen ist: dazu zählen die Änderung der Wachstumskinetik und ein verringerter Einbau von Verunreinigungen (Koszelak, 1995). Durch das Fehlen von dichte-getriebenen Konvektionsströmen (DeLucas, 1989) bietet der Weltraum die Voraussetzung für ein rein diffusives System. Das führt zu einer verlangsamten Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle, was im Endeffekt ein geordneteres und kontrollierteres Wachstum bewirkt. Auch Verunreinigungen oder Aggregate weisen unter diesen Bedingungen eine geringere Beweglichkeit auf, ihr Einbau wird somit stark erschwert. Damit würde sich dieses System auch als Hintergrund für den Shotgun-Ansatz eignen, der in Anwesenheit einer Vielzahl an Fremdmolekülen durchgeführt wird.

Bei der Kristallisation gibt es beliebig viele Faktoren, welche die Kristallisation von Proteinen beeinflussen können, von physikalischen Parametern wie pH und Temperatur über chemische Parameter (unterschiedliche Pufferzusammensetzungen) bis hin zu allgemeinen Dingen wie der generellen Kristallisationstechnik. Dabei sind diese Faktoren nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig, wodurch die Anzahl der Bedingungen weiter steigt. Wie für jeden Kristallisationsansatz ist es darum auch für den Shotgun-Ansatz entscheidend, von vorneherein bestimmte Bedingungen festzulegen, die durchgehend eingehalten werden. Dazu gehört beispielsweise die Kristallisationstechnik (hier: *hanging drop*) und die Inkubationstemperatur (18°C). Außerdem müssen auch beim Shotgun-Ansatz durch das Filtrieren von Lösungen möglichst alle Staub- und Dreckpartikel entfernt werden, die sonst eine weitere Quelle an Verunreinigung darstellen würden. Nur auf diese Weise ist es möglich, in den Ansatz eine gewisse Systematik zu bringen, die besonders im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Kristallen von entscheidender Bedeutung ist.

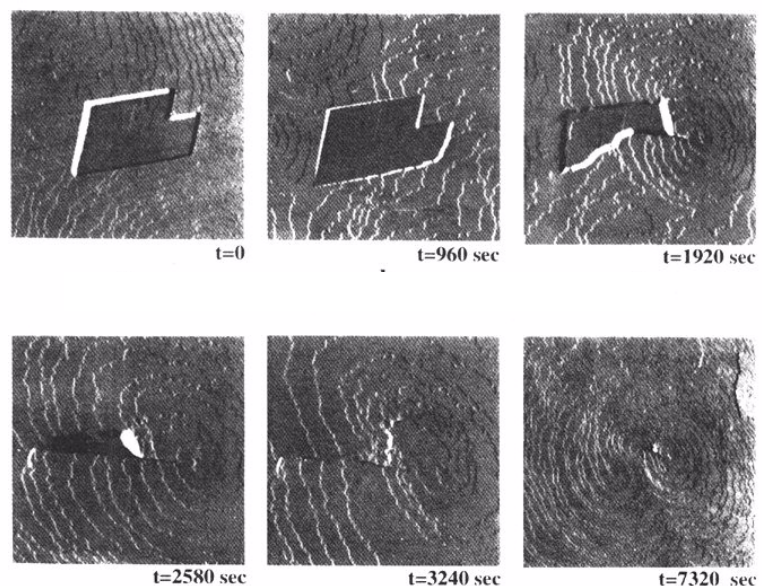
1.2.3 Überblick über den Wachstumsprozeß von Kristallen (McPherson, 1990; Kierzek & Zielenkiewicz, 2001; Rosenberger, 1996)

Man unterscheidet drei Phasen im Wachstum von Kristallen, die Nukleation (Keimbildung), das Wachstum des Kristalls und den Wachstumsstopp. Die Bildung der Nuclei geschieht durch die Zusammenlagerung von Molekülen (Monomere bzw. höhere Aggregatzustände, Kierzek,

2001; Malkin, 1996a). Doch nur diejenigen Nuclei, die eine kritische Größe überschreiten, treten in die zweite Phase ein: sie wachsen durch Anlagerung von weiteren Wachstumseinheiten (s. Abb. 2). Jedes System strebt danach, die Entropie, d.h. das Ausmaß der Unordnung zu erhöhen und seine freie Energie (Gibbs Energie) zu verringern. Erreicht wird Letzteres durch die Bildung von energetisch günstigen Bindungen und Interaktionen. Nur wenn jetzt die kristallinen Wechselwirkungen energetisch stärker sind als die Interaktionen, die sich in Lösung bilden können, wächst der Kristall – trotz einer gleichzeitigen Entropie-Abnahme. Obwohl auch Präzipitate einen Zustand von geringer Energie repräsentieren, werden sie darin von Kristallen noch übertroffen: diese weisen die niedrigste freie Energie in einem System auf. Ein Beweis dafür ist die häufige Beobachtung, daß sich unter gleichzeitigem Auflösen von Präzipitaten Kristalle bilden, niemals aber der umgekehrte Effekt auftritt. Warum das Wachstum oft plötzlich stoppt, ist nicht genau bekannt, man nimmt jedoch an, daß die Ursache in einer übermäßigen Anhäufung von Gitterdefekten und Verunreinigungen zu finden ist (Durbin & Feher, 1996). Diese Annahme wird allerdings durch Fälle in Zweifel gezogen, wo extrem große Kristalle gewachsen sind, die zugleich eine sehr hohe Dichte an Defekten aufwiesen (McPherson, 1996). Ein Wachstumsstop tritt auch ein, sobald sich das System wieder im Gleichgewicht befindet, also keine Übersättigung mehr vorliegt.

Zeichnet man ein Phasendiagramm (Abb. 3), in dem die Löslichkeit eines Proteins in Abhängigkeit der Präzipitanten-Konzentration aufgetragen ist, kann man diese in drei Regionen unterteilen: in der stabilen Region, in der keine Sättigung der Lösung vorliegt, existieren nur freie Protein-Moleküle. Hier herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der löslichen und der festen Phase, d.h. die feste Phase löst sich konstant immer wieder auf.

Abb. 2. Einbau eines Mikrokristalls in einen wachsenden Kristall. Über AFM-Messungen kann demonstriert werden, wie das Wachstum von Kristallen funktioniert: schraubenartig werden neue Wachstumseinheiten, hier ein Mikrokristall, eingebaut. Der Prozeß ist abhängig von der Zeit dargestellt (aus: Malkin, 1996).



Erst wenn die Protein-/Salzkonzentration steigt, Übersättigung und damit ein Ungleichgewicht eintritt, gelangt ein gegebenes Protein in die metastabile und dann in die labile Region. In der letzteren können sich stabile Nuclei (bzw. Präzipitate) bilden *und* Kristalle wachsen, in der metastabilen Region dagegen findet nur Kristallwachstum statt. Allerdings geht ein Molekül nicht zwangsläufig unmittelbar nach dem Eintritt in die labile Phase in einen festen Zustand über, seien es nun Kristalle oder Präzipitate. Ähnlich wie bei der Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion muß eine Energiebarriere überwunden werden, die sogenannte freie Energiebarriere der Nukleation. Oft bilden sich zwar spontan „unstable“ Nuclei, sie haben jedoch die Eigenschaft, sich rasch wieder aufzulösen. Erst ein „stabiler“ Nucleus, dessen Größe und physikalischer Zusammenhalt eher eine Anlagerung als eine Dissoziation neuer Wachstumseinheiten fördert, kann sich zu einem Kristall auswachsen. Da immer eine Art Konkurrenzkampf zwischen Nukleation und Wachstum stattfindet, führt eine Nukleation, die sehr weit innerhalb der labilen Region abläuft, oft zu einem „Nucleus-Schauer“, einer spontanen übermäßigen Bildung von kleinen Nuclei, die dem Experimentator nichts nutzen, da sie das Wachstum großer Kristalle im Normalfall verhindern und aufgrund der zu raschen Bildung eher Wachstumsdefekte aufweisen. Der Idealfall wäre daher, wenn sich das ganze System gleich nach der Nukleation in die metastabile Region bewegen würde, in der dann nur noch ein Wachstum der Nuclei erfolgen kann. Nur dann erhält man zwar weniger, aber dafür im Schnitt größere Kristalle. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, ist das sogenannte „seeding“, das Einbringen von Nuclei, die sich gerade in der metastabilen Phase befinden, in übersättigte Lösungen, um dort Kristallwachstum zu erzielen (Judge, 1995).

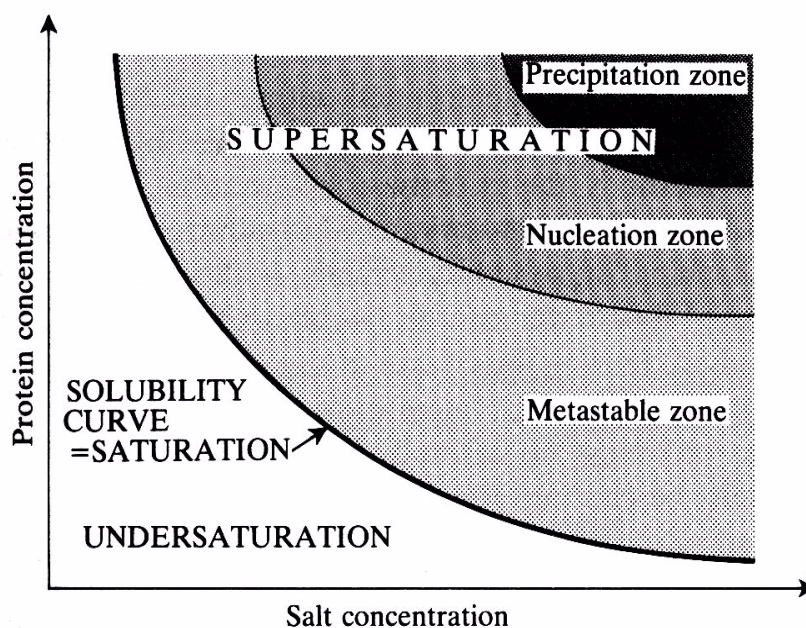


Abb. 3. Phasendiagramm. Die Abbildung zeigt ein typisches Phasendiagramm, das die Löslichkeit eines hypothetischen Proteins als Funktion einer bestimmten Präzipitant (=Salz)-Konzentration darstellt. Die dicke schwarze Linie, auch Sättigungskurve genannt, repräsentiert die maximale Löslichkeit. Der Bereich, in dem Übersättigung vorliegt, ist aufgeteilt in die metastabile und labile (Nucleation zone) Phase, sowie die – schwarz grundierte – Zone, in der nur noch Präzipitation stattfindet (aus: Ries-Kautt & Ducruix, 1992).

1.3 Ferritin

Für eine Zelle hat sich seit der Entstehung von atmosphärischen Sauerstoff eine Reihe von Problemen entwickelt: eines davon war die grundsätzliche Schwierigkeit, mit oxygenem Streß fertigzuwerden, ein anderes war speziell der Umgang mit Eisen. Dieses Metall ist zwar nach Aluminium das zweithäufigste Element auf der Erde, liegt jedoch unter physiologischem pH und oxidierenden Bedingungen in einer unlöslichen Form als anorganisches Erz vor, die es der Zelle beinahe unmöglich macht, Eisen aufzunehmen bzw. im Stoffwechsel weiterzuverwenden. Außerdem bildet freies Eisen innerhalb der Zelle zusammen mit Oxiden wie Superoxid oder Hydrogenperoxid eine toxische Mischung, die hoch reaktive Hydroxylradikale enthält (Harrison & Arioso, 1996). Gleichzeitig ist Eisen ein lebenswichtiges Metall: es dient z.B. als Kofaktor vieler Enzyme (Katalasen, Peroxidasen), ist Bestandteil zellulärer Substanzen, etwa des Hämoglobins im menschlichen Körper, und von zentraler Bedeutung im Elektronentransport und in verschiedenen Oxidation-Reduktions-Reaktionen. Das bedeutet, mit Ausnahme einiger *Laktobazillus*-Stämme, die stattdessen Mangan oder Cobalt verwenden, sind alle Organismen auf Eisen angewiesen (Archibald, 1983).

Um diese beiden – wie es scheint – unvereinbaren Tatsachen verbinden und eine Eisen-Homöostase aufrecht erhalten zu können, waren wesentliche Entwicklungen im Lauf der Evolution nötig. Dazu gehören u.a. die **Ferritine**, Eisen-Speicher-Proteine, die Eisen in einer jederzeit verfügbaren und zudem ungiftigen Form deponieren können. Während die Sequenzähnlichkeit unter den verschiedenen Ferritinen oft sehr gering ist, sind sie gleichzeitig charakterisiert durch einen hoch konservierten dreidimensionalen Aufbau, bei dem normalerweise 24 ähnliche oder identische Untereinheiten zu einer Ball-artigen Struktur zusammengeschlossen sind. Diese hohlen Kugeln haben ein Molekulargewicht von etwa 450 bis 500 kDa und einen inneren Durchmesser zwischen 2.5 und 9 nm (Tonello, 1999; Lawson, 1991; Hudson, 1993). Ein Monomer dieser Kugel zeigt die für Ferritin typische Faltung eines Vier-Helix-Bündels mit einer zusätzlichen fünften Helix am C-Terminus, die etwa im 60°-Winkel zum Bündel geneigt ist (s. Abb. 4A, 5; Boyd, 1985; Hempstead, 1997), der Region, die ohne große strukturelle oder funktionelle Konsequenzen deletiert werden kann (Levi, 1988; Andrews, 1998).

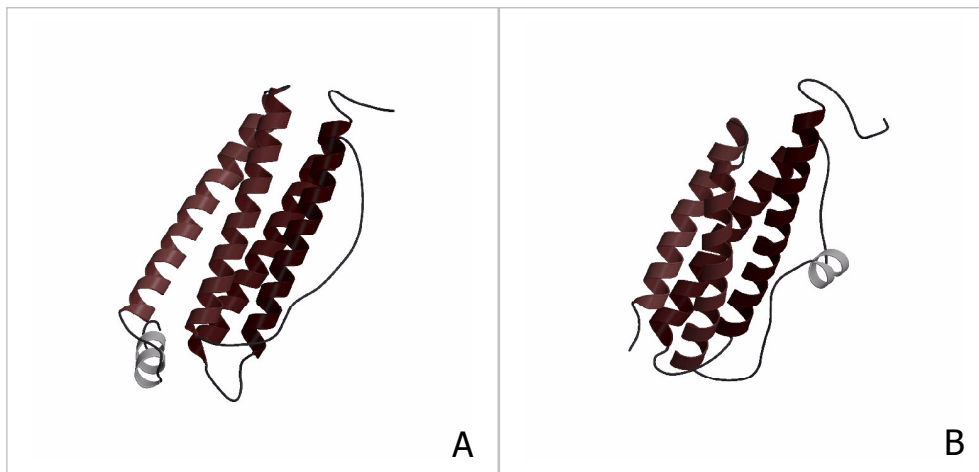


Abb. 4. Monomere Faltung von Proteinen der Ferritin/Bacterioferritin-Superfamilie (siehe Text). Dargestellt sind die H-Kette des menschlichen Ferritin (**A**) und das DpsA aus *E.coli* (**B**). Beide weisen das typische Vier-Helix-Bündel auf (rot), zeigen aber jeweils als Besonderheit eine zusätzliche Helix (grau): das menschliche Ferritin enthält am C-Terminus eine um 60 °C verdrehte Helix E, DpsA besitzt in dem Loop, der die Helices B und C verbindet, eine kurze zusätzliche Schleife.

Trotz der hohen ubiquitären Konservierung der Ferritinstruktur gibt es Unterschiede zwischen Eu- und Prokaryoten, sowie innerhalb der bakteriellen Ferritine. Bei Säugetier-Ferritinen finden sich als monomere Form zwei verschiedene Proteinketten, die H (*heavy*)- und die L (*light*)-Kette, die 55% Aminosäure-Identität und die gleiche dreidimensionale Struktur aufweisen. Die H-Kette dient durch ihr „Ferroxidase-Zentrum“ der Oxidation des Eisens zu Fe(III) nach seiner Aufnahme als Fe(II) (Hempstead, 1994). Die L-Kette enthält kein solches Zentrum, dafür zusätzliche ins Innere der Ferritinkugel gerichtete Glutamatreste als Nukleationsstellen, an denen bevorzugt die Mineralisation des Eisens stattfindet (Boyd, 1985).

Die prokaryotischen Ferritine werden in Ferritine mit einer gebundenen Hämgruppe (Bakterioferritine) und ohne eine Hämgruppe unterteilt. Beide Gruppen setzen sich nur aus einem Typ von Untereinheit zusammen, die Aminosäurereste aufweist, welche dem Ferroxidase-Zentrum der eukaryotischen H-Kette entsprechen (Lawson, 1989; Frazier, 1992). Die übrige Sequenz zeigt wenig Ähnlichkeit zu den eukaryotischen Sequenzen.

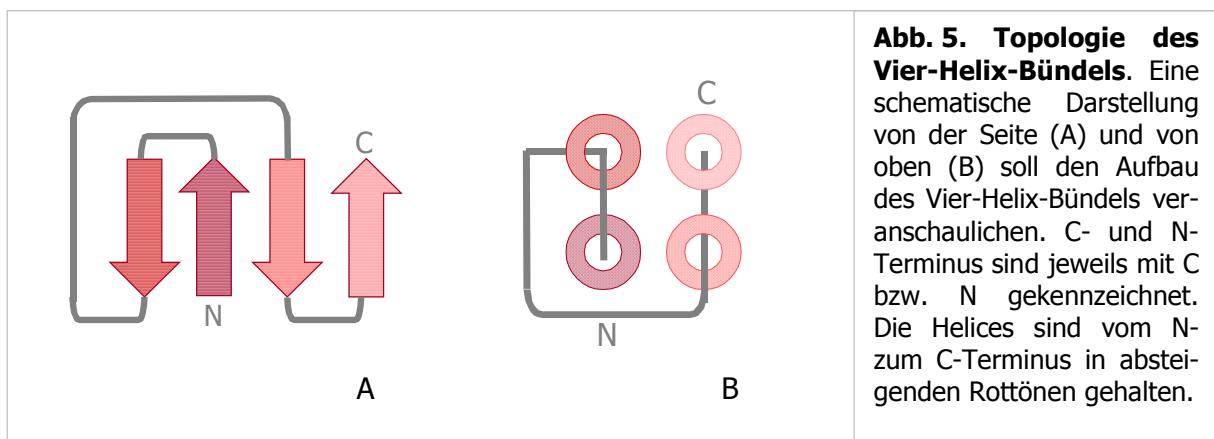


Abb. 5. Topologie des Vier-Helix-Bündels. Eine schematische Darstellung von der Seite (A) und von oben (B) soll den Aufbau des Vier-Helix-Bündels veranschaulichen. C- und N-Terminus sind jeweils mit C bzw. N gekennzeichnet. Die Helices sind vom N-zum C-Terminus in absteigenden Rottönen gehalten.

Es wird generell angenommen, daß Eisen als Fe(II) aufgenommen, im Inneren des Ferritins oxidiert und als Fe(III) akkumuliert wird. Die Speicherform ist eine Art kristalliner Ablagerung: Ferrihydrit, mit einer angenäherten chemischen Zusammensetzung von $5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$; zudem kann dieser Eisenkern wechselnde Mengen an Phosphat enthalten. Eine wichtige Eigenschaft, die dem Aufbau von Ferrihydrit innewohnt, ist, daß die starke Hydratation und das durch viele Leerstellen eher locker gepackte Kristallgitter für eine relativ geringe Stabilität sorgen. Das bedeutet, daß dieses Eisenoxid, das in Ferritinen gebildet wird, eine Quelle für leicht verfügbares und zu verwertendes Eisen darstellt. In Eukaryoten kann der Eisengehalt nach Rekonstitution bis zu 4500 Eisenatome/Apoferritin betragen, in Eubakterien bis zu 2000 Eisenatome/Apoferritin (Chasteen & Harrison, 1999). Allerdings findet man kaum solcherart hoch beladene Ferritinmoleküle *in vivo* (Ford, 1984; Hudson, 1993). Das Ausmaß des Eiseneinbaus hängt von dem zellulären Eisen-Niveau ab. In *E. coli* werden u.a. alle Proteine, die für die Eisenaufnahme verantwortlich sind (z.B. Siderophore), über das Fur (ferric uptake regulator)-Protein reguliert (Escolar, 1999). Dieses Protein bindet spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen, die Fur-Boxen, die normalerweise in der Promotor-Region des Ziel-Gens lokalisiert sind. Auf diese Weise wird die Bindung der RNA-Polymerase blockiert, es findet keine Transkription der betreffenden Gene statt. Dafür benötigt Fur Fe(II) als Kofaktor, mit diesem verliert es gleichzeitig seine Fähigkeit zur Regulation. Ein Mangel an Eisen in der Zelle führt damit zu einer Inaktivierung von Fur und infolgedessen einer normalen Transkription u.a. der Gene, die am Eisenmetabolismus beteiligt sind (Escolar, 1999). Gleichzeitig reguliert Fur auch Gene, die in die Abwehr von oxidativem Streß involviert sind, wie z.B. Superoxid-Dismutasen, und koppelt auf diese Weise Eisenstoffwechsel und Schutz vor oxidativem Streß (Touati, 1995; Hantke, 1982; Escolar, 1999). Die Regulation eines dieser Enzyme, der Eisen-abhängigen Superoxid-Dismutase, aber auch des Ferritins/Bakterioferritins in *E. coli* scheint nicht über eine direkte Interaktion von Fur mit den jeweiligen Genen zu funktionieren, sondern über den

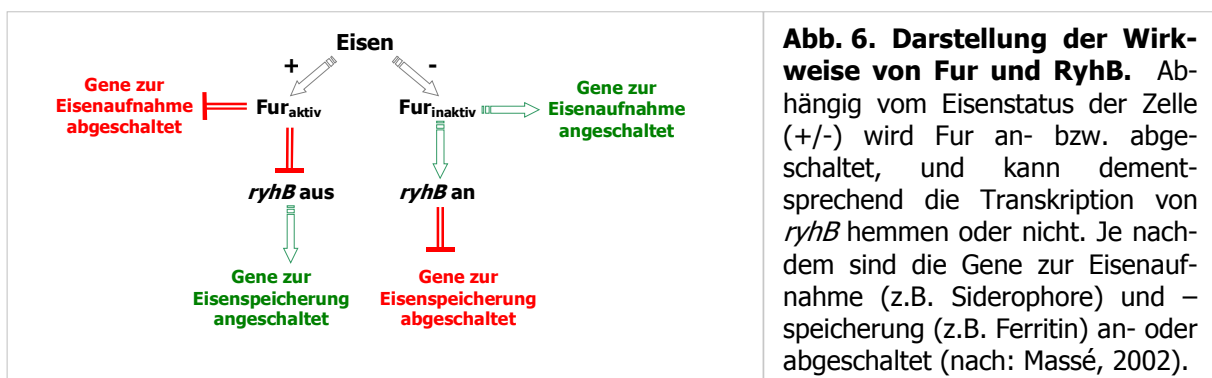


Abb. 6. Darstellung der Wirkweise von Fur und RyhB. Abhängig vom Eisenstatus der Zelle (+/-) wird Fur an- bzw. abgeschaltet, und kann dementsprechend die Transkription von *ryhB* hemmen oder nicht. Je nachdem sind die Gene zur Eisenaufnahme (z.B. Siderophore) und -speicherung (z.B. Ferritin) an- oder abgeschaltet (nach: Massé, 2002).

Zwischenschalter RyhB, eine sRNA (*small noncoding RNA*). Die Transkription von *ryhb* wird durch Fur unterdrückt, während RyhB selbst die Expression der oben angesprochenen Proteine inhibiert. Diese Gene werden also durch Fur positiv reguliert (s. Abb. 6; Massé & Gottesman, 2002). Fur-Proteine konnten bereits in einer Reihe von Mikroorganismen nachgewiesen werden, in Archaea wurde eine *fur*-homologe Sequenz bisher eindeutig nur in *Archaeoglobus fulgidus* identifiziert (Klenk, 1997). Allerdings konnte im Genom von *H. salinarum* eine zum *Archaeoglobus*-Protein homologe Sequenz (50% Ähnlichkeit) gefunden werden (<http://www.halolex.mpg.de>: OE4619R). Gensequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit zu *ryhb* wurden nur in einigen anderen Gram-negativen Bakterien (Enterobacteriaceae) entdeckt.

In Vertebraten funktioniert die Kontrolle des Eisenmetabolismus über die sogenannten IRP's (*iron-regulatory proteins*). Diese binden je nach Eisenstatus der Zelle an die phylogenetisch hoch konservierten IRE's (*iron-responsive elements*) – Haarnadelstrukturen auf untranslatierten Regionen der mRNA – und regulieren damit die Translation – im Gegensatz zur Transkription bei *E. coli*(s.o.) – etwa von Ferritin. Auch hier findet sich die Kopplung mit Streß: Nitritoxid (NO) sowie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) können ebenfalls mit den IRP's wechselwirken und damit auf die Translation Einfluß ausüben (Hentze & Kühn, 1996).

Ferritine sind als ubiquitäre Proteine in verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Organismen gefunden worden, konnten bis jetzt allerdings nicht in Archaea nachgewiesen werden. Auch Kristallstrukturen sind von einigen Ferritinen bekannt, u.a. von Mensch (Lawson, 1991) und Pferd (Hempstead, 1997). Diese beiden Proteine zeigen eine hohe Sequenzidentität (53%) und Strukturähnlichkeit ($rmsd \approx 0.5 \text{ \AA}$; Hempstead, 1997). Auch bakterielle Ferritine, wie z.B. das Bakterioferritin aus *E. coli* und andere Proteine wie das NapA-Protein (modellierte Struktur) aus *Helicobacter pylori* zeigen die hohe Konservierung der Ferritin-Struktur (Dautant, 1998; Tonello, 1999).

Eine andere Proteingruppe, die den gleichen monomeren Aufbau, ein Vier-Helix-Bündel (s. Abb. 4B), besitzt, ist die bakterielle Dps (DNA-binding protein starvation induced)-Familie, zu der das Dps aus *E. coli* und *Synechococcus* sp., sowie das MrgA-Protein aus *B. subtilis* zählen. Wie bereits der Name andeutet, wird die Expression dieser Proteine u.a. durch Streß induziert. Die Bindung von DNA konnte bisher nur bei einigen Mitgliedern dieser Familie demonstriert werden, teilweise ist sie mit der Komplexierung von Eisen verbunden (Grant, 1998; Peña & Bullerjahn, 1995; Chen, 1995). Hier liegt bereits ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang der Dps-Familie und den Ferritinen vor. Dies wird gestützt durch

die bis jetzt einzige bekannte Kristallstruktur eines seiner Proteine, des Dps aus *E. coli*: es bildet ebenso wie die Ferritine eine hohle Kugel – zusammengesetzt allerdings nur aus zwölf Untereinheiten – und weist, wie bereits erwähnt, in seiner monomeren Form ein Vier-Helix-Bündel auf, welchem allerdings die fünfte Helix E fehlt.

In dieser Arbeit wurde das erste bekannte Ferritin eines Archaeons, *H. salinarum*, kristallisiert, das durch seinen Aufbau sowohl den bereits bekannten Ferritinen als auch dem Dps von *E. coli* homolog ist. Obwohl seine oligomere Form eher dem bakteriellen Dps ähnelt, wurde es als Ferritin bezeichnet, da zwar Eisen-, aber bis heute keine DNA-Bindung nachgewiesen werden konnte. Von diesem Gesichtspunkt aus ist es dem Ferritin aus *Listeria innocua* vergleichbar sowie zwei Eisen-bindenden Proteinen aus *B. anthracis*, deren Strukturen jüngst gelöst worden sind. Diese Proteine bestehen in ihrer oligomeren Form wie die Dps-Proteine aus zwölf Monomeren, komplexieren jedoch Eisen. Alle Proteine – aus *H. salinarum*, *L. innocua* und *B. anthracis* – teilen die charakteristische Besonderheit einer neuartigen Eisenbindungsstelle (Bozzi, 1997; Ilari, 2000; Papinutto, 2002).

Möglicherweise lassen sich durch einen Vergleich des halobakteriellen Ferritins mit dem Dps aus *E. coli* bzw. dem Ferritin aus *L. innocua* Theorien bestätigen, die einen gemeinsamen evolutionären Ursprung der Dps- und der Ferritin/Bacterioferritin-Familien vorschlagen (Peña & Bullerjahn, 1995). Darin wird angenommen, daß die Fähigkeit zur DNA-Bindung erst in einem späteren Stadium der Evolution von einigen Metall- und Häm-bindenden Proteinen, z.B. den Ferritinen erworben wurde, woraus sich dann die Dps-Proteine entwickelt haben könnten. Ein Grund für die Selektion einer solchen Fähigkeit wäre der Schutz der DNA vor Oxidation: ein Protein, das in der Lage ist, Eisen zu komplexieren und an die DNA zu binden, kann damit direkt „vor Ort“ die Bildung von Hydroxyl-Radikalen verhindern (Grant, 1998).

Trotz dieser Ähnlichkeiten zu eubakteriellen Proteinen repräsentiert das Ferritin aus *H. salinarum* in Anbetracht des großen Anteils an negativen Ladungen auf der inneren und äußeren Oberfläche ein typisches halophiles Protein. Gleichzeitig ist es aber sowohl unter hohen als auch unter niedrigen Salzbedingungen nativ und aktiv, d.h. es kristallisiert bzw. enthält noch immer einen Eisenkern (eigene Beobachtung; Reindel, 2002).

1.4 Glyzerin-Dehydrogenase

Die Verwertung von Glyzerin durch Mikroorganismen wurde bereits vor über 100 Jahren entdeckt, als Gabriel Bertrand in einer Kultur von *Acetobacter xylinum*, die mit Glyzerin versetzt worden war, kristallines Dihydroxyaceton (DHA) fand, ein Umsetzungsprodukt von Glyzerin (Lin, 1976). Die Aufnahme von Glyzerin in prokaryotische Zellen erfolgt generell über eine „erleichterte“ Diffusion, d.h. ein sogenanntes „Vermittler-(Facilitator)-Protein“ in der Membran katalysiert die Einstellung des Gleichgewichts zwischen der Glyzerinkonzentration in der Zelle und in ihrer Umgebung (Lin, 1976). Dieses Protein gehört zusammen mit den

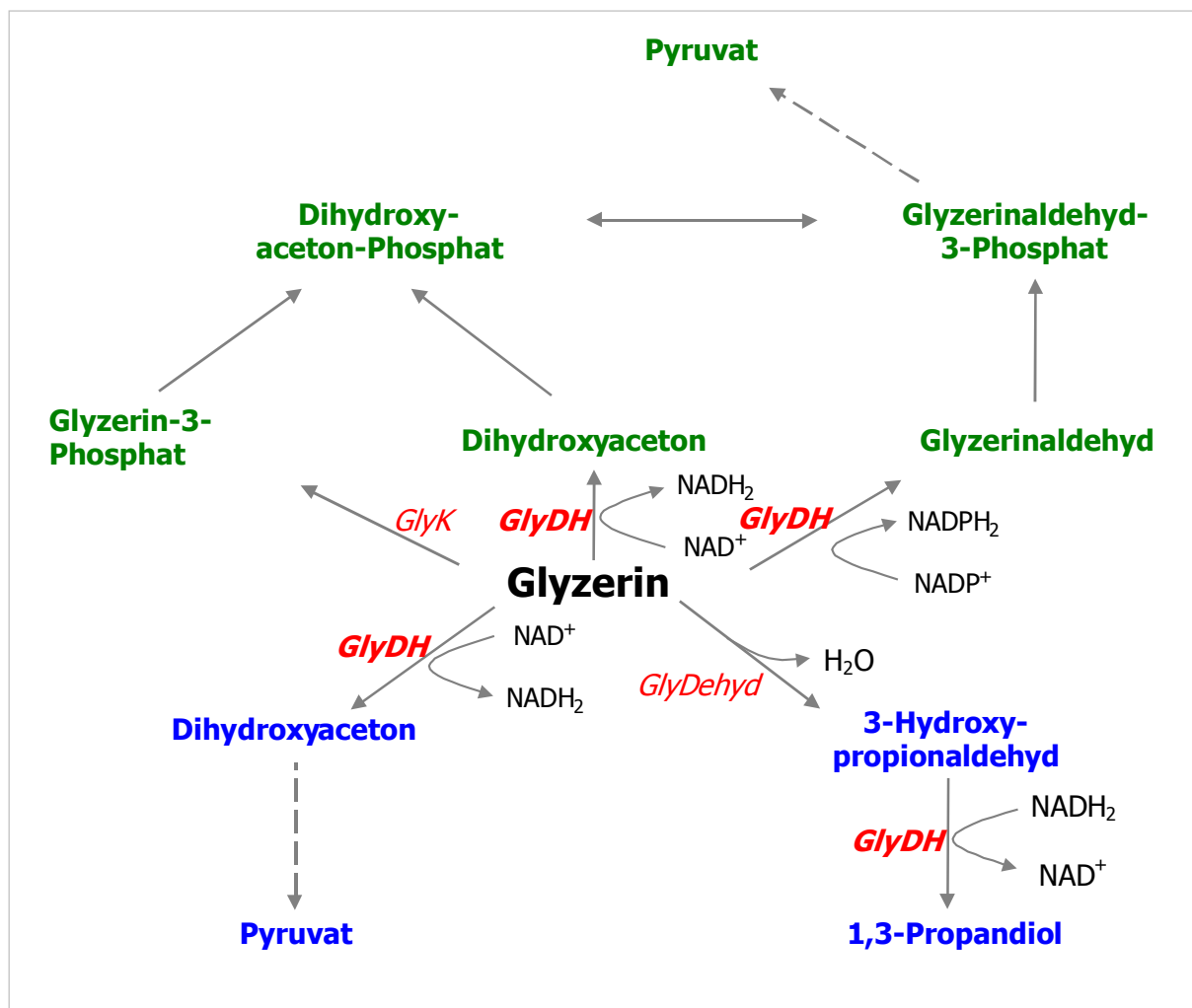


Abb. 7. Überblick über bekannte prokaryotische Glyzerin-Abbauwege. Es sind die verschiedenen Wege dargestellt, Glyzerin umzusetzen, dabei sind die **aeroben** Wege grün, die **anaeroben** blau gekennzeichnet. Alle Enzyme, die direkt mit Glyzerin wechselwirken, sind in rot angegeben, ebenso alle Reaktionen, bei denen die Beteiligung von Glyzerin-Dehydrogenasen (fett) nachgewiesen wurde. GlyDH, Glyzerin-Dehydrogenase; GlyK, Glyzerin-Kinase; GlyDehyd, Glyzerin-Dehydratase. Alternativ können anaerob die Elektronen auf einen Akzeptor wie Fumarat oder Nitrat übertragen werden.

Aquaporinen zur Superfamilie der „*major intrinsic proteins*“ (MIP; Manley, 2000). Mittlerweile sind in Prokaryoten verschiedene Abbauewege für Glyzerin bekannt, grundsätzlich können Mikroorganismen dieses Substrat sowohl aerob als auch anaerob verwerten (s. Abb. 7; Lin, 1976).

Aerob findet primär entweder eine Oxidation oder eine Phosphorylierung des Glyzerins statt. Die *Phosphorylierung* wird durch eine Glyzerin-Kinase (ATP:Glyzerin 3-Phosphotransferase, EC 2.7.1.30) erreicht, die Glyzerinphosphat produziert, das weiter zu DHA-Phosphat (DHAP) umgesetzt wird. Bei der *Oxidation* wird meist über eine NAD^+ -verknüpfte Glyzerin-Dehydrogenase (GlyDH; Glyzerin: NAD^+ 2-Oxidoreduktase, EC 1.1.1.6) DHA gebildet, in manchen Fällen auch Glycerinaldehyd oder DHA über eine NADP^+ -abhängige GlyDH (Glyzerin: NADP^+ Oxidoreduktase, EC 1.1.1.72). DHA wird weiter zu DHAP phosphoryliert, was bedeutet, daß in beiden Fällen (Oxidation und Phosphorylierung) das Endprodukt DHAP ist, das anschließend in die Glykolyse eingeschleust werden kann (Lin, 1976).

Auch unter *anaeroben* Bedingungen nutzen viele Mikroorganismen z.B. der Gattung *Bacillus* und *Klebsiella* Glyzerin als Kohlenstoffquelle, wobei die Umsetzung sowohl fermentativ stattfinden kann als auch über anaerobe Atmung (mit Fumarat als Elektronenakzeptor). *E. coli* etwa setzt Glyzerin anaerob meist in Glyzerin-3-Phosphat um (Glyzerin-Kinase), das dann zu DHAP umgewandelt wird (anaerobe Dehydrogenase), die Elektronen werden auf Nitrat oder Fumarat übertragen. Diese Zellen sind also nicht dazu fähig, Glyzerin zu fermentieren. Die GlyDH, die in einer *E. coli* K12-Mutante gefunden wurde und Glyzerin zu DHA oxidiert, funktioniert nur unter aeroben Bedingungen (Tang, 1979; Truniger & Boos, 1994). Spezies der Gattung *Klebsiella* dagegen können Glyzerin in einen Fermentationsprozeß einschleusen und es mit Hilfe einer anaerob induzierten und aerob inhibierten GlyDH zu DHA umwandeln (Johnson, 1985; Ruch, 1980). Als Endprodukt kann bei diesen Zellen wie auch bei einigen anderen Bakterien (Enterobakterien, Clostridien) u.a. 1,3-Propandiol (Trimethylenglykol) entstehen, eine Verbindung, die insbesondere für die Herstellung neuartiger Kunststoffe, z.B. Teppichfasern, verwendet werden soll (Wittlich, 2001). Generell dient den Mikroorganismen die Bildung dieses Produkts zur Regenerierung von Reduktionsäquivalenten, die bei der Oxidation von Glyzerin verbraucht wurden (Abb. 7). Für die biotechnologische Produktion, etwa mittels immobilisierter Zellen, eignet sich besonders das strikt anaerobe Eubakterium *Clostridium butyricum* (Wittlich, 2001; Malaoui & Marczak, 2001).

Eine wichtige Rolle im Glyzerinstoffwechsel spielen nun die Glyzerin-Dehydrogenasen. Im Gegensatz zu den Ferritinen sind sie bisher noch kaum systematisch und detailliert untersucht worden. Aufgereinigt wurde ein Enzym dieser Gruppe wohl zum ersten Mal in den 50iger Jahren aus *Aerobacter* (*Enterobacter*) *aerogenes* synonym *Klebsiella mobilis* (NCBI, Taxonomie; Burton, 1955). Seitdem wurden GlyDHn aus einigen Organismen isoliert und charakterisiert: dazu gehören Bakterien wie *Bacillus stearotherophilus* (Spencer, 1989), *Klebsiella pneumoniae* (Johnson, 1985) und *Citrobacter freundii* (Daniel, 1995), Pilze wie *Neurospora crassa* (Viswanath-Reddy, 1978) und Hefen wie *Schizosaccharomyces pombe* (May & Sloan, 1981). Auch bei Säugern wurde diese Enzymspezies bereits gefunden, etwa die GlyDH aus dem Hasenmuskel (Kormann, 1972), und bei der halotoleranten Alge *Dunaliella parva*, die Glyzerin als osmoprotektive Substanz benutzt (Ben-Amotz & Avron, 1974). Die letzten beiden Proteine sowie die GlyDH aus *Neurospora crassa* sind Beispiele für Dehydrogenasen, die eine Spezifität für NADP^+ zeigen, die anderen genannten GlyDHn nutzen NAD^+ als Kofaktor. Es handelt sich damit bei allen GlyDHn um lösliche Proteine, die von einem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+ oder NADP^+) als Kofaktor abhängig sind. Eine Ausnahme bildet die membrangebundene GlyDH aus dem Essigsäurebakterium *Glao nobacter industrius*, die Pyrrolochinolinchinon (PQQ) als Kofaktor benötigt (Ameyama, 1985).

Generell kann man die Funktion dieses Enzyms folgendermaßen beschreiben: es katalysiert die Oxidation von Glyzerin zum entsprechenden Keton (DHA) bzw. Aldehyd (Glyzerinaldehyd) unter gleichzeitiger Reduktion des Koenzyms NAD(P)^+ zu NAD(P)H (s. Abb. 8).

Die GlyDHn gehören zur Gruppe der Alkohol-Dehydrogenasen. Die Einteilung dieser Gruppe ist teilweise nicht ganz schlüssig (s.u.), sie beruht grob auf der Art des genutzten Koenzyms und der Größe des Enzyms (Ruzheinikov, 2001). Dabei gibt es einmal die Familie der Zn^{2+} -abhängigen Alkohol-DHn, die eine mittlere Kettenlänge von rund 350-400 Resten sowie drei konservierte Glyzinreste aufweisen und somit zur MDR-Familie (*medium chain dehydroge-*

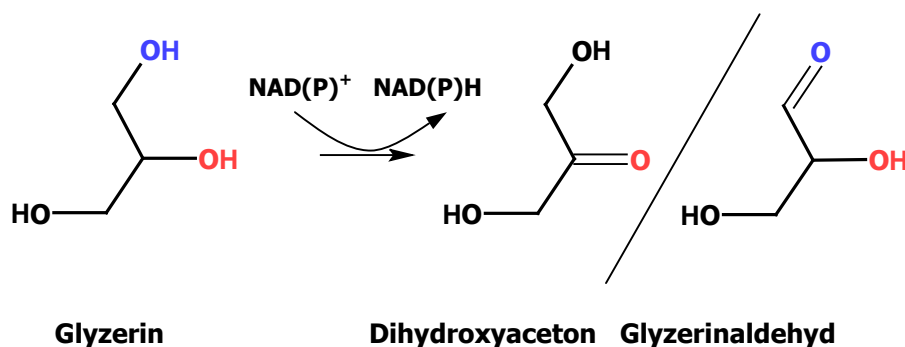


Abb. 8. Reaktion der Glyzerin-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert u.a. die Oxidation von Glyzerin zu Dihydroxyacetone oder Glyzerinaldehyd unter Umsetzung von NAD(P)^+ zu NAD(P)H .

nase/reductase; Persson, 1994) gehören. Ein prominentes Beispiel dieser Familie ist die Alkohol-DH der Pferdeleber. Das katalytisch wichtige Zn^{2+} -Ion wird hier über Cystein-Reste gebunden (Eklund, 1976). Zur zweiten Familie, der SDR-Familie (*short chain dehydrogenase/reductase*) mit durchschnittlich etwa 250 Resten zählt z.B. die Alkohol-DH aus *Drosophila melanogaster*; die kaum Sequenzhomologien zu der eben erwähnten Säuger-Alkohol-DH aufweist, so fehlen etwa die für die Zn^{2+} -Komplexierung benötigten Cysteinreste (Schwartz & Jörnvall, 1976). Die Sequenz und 3D-Struktur der metallfreien Alkohol-DH aus *Drosophila lebanonensis* hat später gezeigt, daß dieses Enzym ebenfalls zu der zweiten Familie gehört, bei der eine bestimmte Triade von Resten (Ser138, Tyr151, Lys155; benannt nach dem *Drosophila*-Enzym), v.a. das Tyrosin hoch konserviert und an der Enzymkatalyse beteiligt ist. Eine weitere Besonderheit der Mitglieder dieser Gruppe ist, daß sie nur eine Domäne in ihrer Struktur aufweisen im Gegensatz zu der 2-Domänen-Struktur der MDR-Familie (Jörnvall, 1995; Benach, 1998). Die dritte Familie wurde lange als die Familie der „Eisen-enthaltenden“ Alkohol-DHn betitelt und beinhaltet Alkohol-DHn sowie viele GlyDHn, die aus Bakterien und Hefen isoliert wurden. Diese letzte Familie ist bis jetzt v.a. strukturell am wenigsten charakterisiert, und es sind bereits Unstimmigkeiten aufgetreten, z.B. bezüglich der Spezifität für das zur Aktivität benötigte Metall. So zeigen zwar tatsächlich einige Mitglieder dieser Familie eine deutliche Abhängigkeit von Eisen, andere sind jedoch auf die Anwesenheit von Zink angewiesen, um ihre Katalyse ausführen zu können. Darum wurde diese Familie von Ruzheinikov *et al.* in die Familie der „Metall-abhängigen“ Alkohol-DHn umbenannt, deren Mitglieder divalente Metallionen benötigen (Ruzheinikov, 2001). Das am besten charakterisierte Protein dieser Familie und auch für einige Zeit das einzige, dessen Struktur gelöst werden konnte, ist die GlyDH aus *B. stearther mophilus* (Ruzheinikov, 2001). Eine weitere Struktur, die des Eubakteriums *Thermotoga maritima*, konnte vor kurzem aufgeklärt werden (noch nicht veröffentlicht, nur PDB-Code 1KQ3). Aus dem Reich der Archaea war bisher keine Struktur dieser Proteinspezies bekannt.

Die Substratspezifität der sogenannten GlyDHn ist insgesamt relativ niedrig, d.h., die meisten GlyDHn zeigen zwar eine Vorliebe für Glycerin oder Propan-1,2-diol, sind jedoch gleichzeitig durchaus in der Lage, auch andere Substrate, wie z.B. Butan-2,3-diol und Ethan-1,2-diol, umzusetzen. Eine wichtige Voraussetzung ist in vielen Fällen die Anwesenheit von zwei benachbarten Hydroxylgruppen, etwa bei der GlyDH von *B. stearothermophilus* und *S. pombe* (Spencer, 1989; Marshall, 1985), eine Selektivität, die später anhand der Struktur erläutert werden wird. Ein weiteres interessantes Substrat ist Methylglyoxal, eine toxische elektrophile Substanz, die z.B. durch die Umsetzung von DHAP durch die Methylglyoxal-Synthase ent-

steht und mit negativ geladenen Zentren biologischer Makromoleküle interagiert. Während für gram-negative Bakterien mehrere Abbauege dieser Substanz bekannt sind (Ferguson, 1998), war bisher nicht klar, wie die Detoxifizierung in gram-positiven Bakterien vonstatten geht. Für die Eubakterien *Clostridium difficile* und *Cl. Beijerinckii* wurde jüngst entdeckt, daß sie in der Lage sind, Methylglyoxal mit Hilfe ihrer GlyDH abzubauen (Linayage, 2001). Auch andere GlyDHn, wie die des Hasenmuskels oder der Gattung *Aspergillus* können diesen Stoff umsetzen (Kormann, 1972; Schuurink, 1990).

Die meisten Mikroorganismen der archaealen Familie Halobacteriaceae nutzen Glyzerin als Kohlenstoff- und Energiequelle, der Hauptproduzent von Glyzerin in ihrem Lebensraum ist die Alge *Dunaliella*. In Hochsalzgebieten wie dem Toten Meer wurden hohe Aufnahmeraten und kurze Umsatzzeiten für Glyzerin gemessen (Oren, 1994). Für *H. salinarum* konnte sowohl die Aktivität einer Glyzerin-Kinase als auch einer NAD⁺-abhängigen GlyDH nachgewiesen werden (Baxter & Gibbons, 1954; Oren, 1994). Vergleichende Studien bei halophilen Archaea zeigten, daß von den untersuchten Organismen nur *H. salinarum* und *H. cutirubrum* eine GlyDH-Aktivität aufweisen, während die Glyzerin-Kinase in all diesen halophilen Zellen gefunden wurde (Oren & Gurevich, 1994). Das bedeutet, daß in *H. salinarum* beide Wege der Glyzerin-Verwertung zu existieren scheinen. Eine Besonderheit dieser archaealen GlyDHn ist, daß bei ihnen NAD⁺ nicht gegen NADP⁺ ausgetauscht werden kann, obwohl bei den Dehydrogenasen von Archaea – im Gegensatz zu Eubakterien und Eukaryoten – oft eine Dualität im Gebrauch von Koenzymen zu bestehen scheint (Danson, 1988), d.h. NAD⁺ oder NADP⁺ wechselweise genutzt werden können (Oren & Gurevich, 1994; Oren, 1994).

Ein Einblick in den Glyzerin-Metabolismus ist gerade bei Archaea von Interesse, deren Membran aus polaren Glyzerinlipiden besteht. Diese enthalten bei halophilen Archaea regelmäßig verzweigte und meist gesättigte Phytanylketten (Isoprenoid-Seitenketten, v.a. 20 und 40 Kohlenstoffatome lang), die über Etherbrücken an das Glyzerinrückrat geknüpft sind (Kates, 1993). Bisher ist nicht sicher, welches Glyzerin-Derivat als Akzeptor für die Phytanylketten dient; z.T. wird postuliert, daß DHA den Vorläufer für den Glyzerinabschnitt der halobakteriellen Lipide darstellt, allerdings bleibt diese Vermutung angesichts der Abwesenheit einer GlyDH-Aktivität, z.B. bei Spezies der Gattungen *Haloferax* und *Halarcula*, fraglich (Oren & Gurevich, 1994). Weiterhin wurde gezeigt, daß der Synthese, welche die Isoprenoidkette überträgt, eine starke Selektivität für Glyzerinphosphat, nicht für DHAP innewohnt (Zhang & Poulter, 1993).

Generell ist das Interesse an GlyDHn in den letzten Jahren gewachsen, da man festgestellt hat, daß es möglich ist, mit ihrer Hilfe den Gehalt an Triglyzeriden im Serum bzw. auch den Gehalt an Glyzerin in alkoholischen Getränken wie Wein zu bestimmen. Dafür wird die GlyDH, z.B. aus einer *Cellulomonas*-Spezies, immobilisiert, und die Menge des umgesetzten Glyzerins anhand des entstehenden NADH gemessen (Winatasaputra, 1982; Prodromidis, 1996).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine neue Methode der Kristallisation, die sogenannte „Shotgun-Kristallisation“ an löslichen Proteinen des Archaeons *Halbac terium salinarum* geprüft werden. Dieser halophile Mikroorganismus wurde gewählt, um mehr über strukturelle Grundlagen der Halophilie (= „Salzliebe“) von Proteinen herauszufinden bzw. bereits bestehendes Wissen zu erweitern.

Im Gegensatz zu „klassischen“ Kristallisationsmethoden, die eine möglichst hohe Reinheit des zu kristallisierenden Proteins voraussetzen, sollte hier versucht werden, inwieweit es möglich ist, auch aus inhomogenen Proteinproben Proteinkristalle zu erhalten. Ein wesentliches Kriterium ist dabei, ob sich die Kristalle bezüglich ihrer Morphologie und Homogenität dazu eignen, der Röntgenstrukturanalyse unterzogen zu werden. Die Shotgun-Methode selbst enthält drei Stufen: Zellaufschluß, Fraktionierung des Zytosols (= Gesamtheit der löslichen Proteine) und Kristallisation. Für den Aufschluß der Zellen von *H. salinarum* sollten verschiedene Methoden untersucht werden, anschließend wurde das Zytosol mithilfe verschiedener Chromatographie-Methoden fraktioniert. Dabei war ein entscheidender Punkt, die native Struktur dieser halophilen Proteine durch ausreichende Salzkonzentrationen oder äquivalente stabilisierende Substanzen in allen Chromatographiepuffern zu erhalten. Die so gewonnenen Fraktionen wurden anschließend direkt in Kristallisationsansätze eingebracht. Als Kristallisationspuffer sollten vorerst konventionell erhältliche Puffer verwendet werden. Sobald sich jedoch „Vorlieben“ der halophilen Proteine für bestimmte Fällungsmittel etc. zeigten, waren neue entsprechend individuell zusammengestellte Kristallisationspuffer geplant.

Die Voraussetzung für die Shotgun-Methode ist, daß das Genom des Organismus, dessen Proteine kristallisiert werden sollen, durchsequenziert ist, sodaß gewachene Kristalle identifiziert werden können. Weiterhin sollten generell nur wenige Proteinstrukturen aus diesem Organismus bekannt sein. Beide Bedingungen erfüllt *H. salinarum*.

Neben der Untersuchung, ob sich diese Methode tatsächlich zur Kristallisation eignet, wurde speziell mit Proteinen des halophilen Archaeons *H. salinarum* gearbeitet, um das nur sehr begrenzte Repertoire an Strukturen halophiler Proteine zu erweitern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für die Arbeit mit *E. coli* verwendet:

Plasmidreplikation:

XL1-Blue (Stratagene) *E. coli* K12 Sicherheitsstamm

sup E44, hsdR17, recA1, gyrAS46, thi-1, relA1, lac⁻[F'proAB⁺, lacI^qlacZΔM15, Tn10(tet^Y)]

Proteinexpression:

BL21(DE3) (Stratagene) *E. coli* B Sicherheitsstamm

F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), dcm⁺, Tet^r, galλ(DE3) endA, Hte [argU ileY leuW Cam^r]

Folgende Bakterienstämme wurden für die Arbeit mit *H. salinarum* verwendet:

TOM (Besir, 2001)

BR⁻, HR⁻, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺

SNOB (Pfeiffer, 1999)

BR⁻, HR⁺, SRI⁺, SRII⁺, Car⁻, Rub⁻, Ret⁺

2.1.2 Vektoren

pBPH-M

Bei pBPH-M handelt es sich um einen *Shuttle*-Vektor (= in mehreren „Zell-Typen“ einsetzbar), der sowohl eine Ampicillin (Amp)-Resistenz für die Selektion in *E. coli* als auch eine Mevinolin (Mev)-Resistenz für die Selektion in *H. salinarum* enthält. Zur Expression eines Proteins in halobakteriellen Zellen befindet sich in diesem Vektor der

Bacteriorhodopsin (BR)-Promotor, der erst bei Sauerstoffmangel bzw. zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase angeschaltet wird.

pHusBrfus

Dieser Vektor stellt ebenso wie pBPH-M einen *Shuttle*-Vektor dar und enthält dieselben Resistenzgene (Amp, Mev). Zusätzlich zum BR-Promotor und unter seiner Kontrolle ist hier noch die BR-Sequenz vorhanden, wobei eine *Multiple-Cloning-Site* am 3'-Ende (C-Terminus) des BR die Herstellung von Fusionsproteinen ermöglicht. Dazu wird deren Sequenz in die *Cloning-Site* eingefügt. Außerdem befindet sich in der Sequenz zwischen BR und Fusionsprotein (sowie abhängig vom Leserahmen am C-Terminus des Fusionsproteins) die Sequenz für die Erkennungsstelle der Protease Faktor Xa, IEGR. Auf diese Weise kann nach der Aufreinigung das Fusionsprotein aus dem C-Terminus des BR herausgeschnitten werden.

pM@β-master (Matthias Koch)

Der Vektor pM@β-master wurde freundlicherweise von Matthias Koch (wird veröffentlicht) bereitgestellt. Auch bei diesem Vektor handelt es sich um einen Shuttle-Vektor, der dieselben Resistenzgene (Amp, Mev) wie die beiden vorherigen Vektoren enthält. Außerdem trägt er eine *Multiple-Cloning-Site*, die zur Klonierung genutzt werden kann sowie die Sequenz der β-Galaktosidase von *H. alicanteals* Indikatorgenen.

pET-28a (Novagen)

Der Vektor pET-28a besitzt eine Kanamycin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*. Die Induktion der Expression in *E. coli* steht unter der Kontrolle des lac-Operons, induziert wird die Expression des gewünschten Proteins durch die Zugabe von IPTG zum Medium. Durch die Klonierung der jeweiligen Gensequenz in die entsprechenden Schnittstellen können Proteine mit Histidin-Peptid am N- oder am C-Terminus hergestellt werden.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit einem automatischen DNA-Synthesegerät (*Applied Biosystems 380B*) nach der Phosphoramidit-Methode hergestellt. Die Restriktionsschnitt-

stellen in den Klonierungsprimern sind unterstrichen, das jeweilige Enzym ist in Klammern hinter der Sequenz angegeben. Alle Sequenzen verlaufen vom 5'- zum 3'-Ende.

Klonierungsprimer

Für pBPH-M:

Dps_NdeI_fwd GGAATTCCATATGATGAGCACGCAAAAGAA (NdeI)

Dps_BamHI_rev2 CGCGGATCCGCGTCATTACTCCAGGGCGCCC (BamHI)

Für pHusBrfus:

DpsBstEII_fwd CGAGCAGGTAACCCGATGAGCACGCAAAAGAACG (BstEII)

DpsEcoRI_rev CCGGAATTCGCTCCAGGGCGCCCTGCGTGAC (EcoRI)

Für pM@β-master:

flseq1for GCGGGGGATCCGCGTTGCCGTGGACGGC (BamHI)

flseq1rev GCGAAAGAACAGTGGTGGTTCTCGCCGGCAACGATTACACGTTGGACCGCCTGC

flseq2for AAGTGGCAGGCGGTCCAACGTGTAATCGTTGCCGGCGAGAACCCACCACTGTTCT

flseq2rev GGTGGCTCTAGAGCCGAACGGCTTGCGGTA (XbaI)

Für pET-28a:

DpsNdeI_fwd GGAATTCCATATGAGCACGCAGAAAAGAACGCGCGA (NdeI)

DpsXhoI_rev CCGCTCGAGTTATCACTACTCCAGGGCGCCCTGCG (XhoI)

Sequenzierungsprimer (pBPH-M):

BPH-M_for TCCGTCACGAGCGTACCATACTGATTGGGT

BPH-M_rev ATTGATCAGAATTCATGGCATGGTGGTG

Sequenzierungsprimer (pHusBrfus):

bobrev26 GAGTACAAGACCGAGTGGGGG

bobseq0⁺ AAATTCGTCACGAGCGTACCATACT

Sequenzierungsprimer (pET-28a):

T7_prom TTAATACGACTCACTATAGGG

T7_term CTAGTTATTGCTCAGCGGTGG

2.1.4 Herstellerfirmen der verwendeten Geräte und Chemikalien

2.1.4.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien hatten die Qualitätsstufe „zur Analyse“. Sie wurden größtenteils von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen. Ausnahmen werden im folgenden aufgeführt:

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid	Biorad (Richmond, USA)
Agarose	Biozym (Oldendorf)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Pharmacia (Freiburg)
DNA-Längenstandard	Boehringer Mannheim GmbH
DNA-Ligase, T4	New England Biolabs (Beverly, USA)
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH
Hefe-Extract	Difco (Detroit, USA)
IPTG	Gerbu
Methanol	Riedel-de Haën
Molekulargewichtsstandard (M6)	Pharmacia (Freiburg)
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Native <i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Protogel-Lösung	National Diagnostics
Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (ohne EDTA)	Roche Diagnostics
Salzsäure, 37% (w/v)	Riedel-de Haën
"Taq Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit"	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad (Richmond, USA)
Tris	Riedel-de Haën

2.1.4.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern	Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried
ÄKTA™ design	Pharmacia Biotech
Blot-Apparatur	Trans-Blot SDBioRad
Cell Disrupter B15	Branson
French Pressure Cell Press	Aminco SLM Instruments Inc., Urbana, USA
Fraktionssammler	Pharmacia Biotech
Gene pulser®	Biorad
Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade	Pharmacia Biotech
Hiload 16/60 Superdex 200 prep grade	Pharmacia Biotech
Hiload 26/60 Superdex 200 prep grade	Pharmacia Biotech
Hiload 16/60 Superdex prep grade	Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge SIGMA 4K15	SIGMA, Osterode
MonoQ HR 5/5 Anionenaustauschersäule	Pharmacia Biotech
MilliQ® Plus Pf, Elix3	Millipore
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech

Photometer UV-2401/PC	Shimadzu
DNA Thermal cycler	Perkin Elmer
Tischzentrifuge	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
ResourceQ Anionenaustauschersäule	Pharmacia Biotech
SDS-Gelgießkammer SE215 Mighty Small	Pharmacia Biotech
Multiple Gel Caster	Eigenbau des MPI für Biochemie, Martinsried
SDS-Gellaufkammer SE250 Mighty Small II	Hoefer / Pharmacia Biotech
Sonifier 450	Branson
Tischautoklav, Autoklav 23	Melag
Ultrazentrifuge TGA-65	Kontron
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman
	mit den Rotoren Ti 60, Ti 45
Varioklav	H + P Labortechnik
Zentrifuge Avanti J25	Beckman
	mit den Rotoren JA10.500, JA25.500
Zentrifuge RC5C	Sorvall
	mit den Rotoren SS34

Alle weiteren Materialien und Geräte sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.1.4.3 Programme

In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den unter den jeweiligen Kapiteln aufgeführten Programmen v.a. noch folgende Programme verwendet:

BioEdit	(Hall, 1999)	Erstellung von Sequenzalignments
Adobe Photoshop		Bearbeitung von Abbildungen
Corel Draw		Bearbeitung von Abbildungen

2.2 Stammlösungen, Medien und Puffer

2.2.1 Proteine

10 x PBS (Puffer für Proteinlösungen)

150 mM NaCl

495 mM KCl

130 mM Na₂HPO₄

20 mM NaH₂PO₄

10 x TBS (Puffer für Proteinlösungen)

250 mM Tris/HCl, pH 7.4

1500 mM NaCl

TE-Puffer (Puffer für DNA-Lösungen)

10 mM Tris/HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, autoklavieren

2.2.2 DNA

10 x DNA-Probenpuffer

0.25% (w/v) Bromphenolblau

50% (v/v) Glycerin

2.2.3 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani Medium), E. coli

1% (w/v) Bacto-Trypton

0.5% (w/v) Bacto-Hefeextract

1% (w/v) NaCl

pH 7.0 mit NaOH einstellen, autoklavieren

TB-Medium (Terrific broth Medium), E. coli

1.2% (w/v) Bacto-Trypton

2.4% (w/v) Bacto-Hefeextract

0.4% (v/v) Glyzerin

pH 7.5 nach dem Autoklavieren mit 100 mM autoklaviertem $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer einstellen.

Halostandard-Medium (Oesterhelt & Krippahl, 1983)

4.3 M NaCl 250 g

80 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 20 g

27 mM KCl 2 g

10 mM Na_3 -Citrat 3 g

Bacto-Pepton 10 g

H_2O ad 1 l

pH 7.0 – 7.2 mit NaOH einstellen, autoklavieren

für Platten: zusätzlich 15 g Agar

Basalsalz

s. Halostandard-Medium, ohne Pepton

Alle weiteren Lösungen und Puffer sind bei der jeweiligen Methode angegeben.

2.3 Mikrobiologische und Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Propagierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Für sogenannte „über-Nacht (üN)-Kulturen“ wurden 35 ml Medium (LB-Medium) – versetzt mit dem jeweiligen Antibiotikum – mit einer Bakterien-Kolonie bzw. aus einer Glycerin-Kultur heraus inokuliert und bei 30 °C mit 250 rpm geschüttelt. Bakterienkolonien auf der Platte (LB-Medium + 1.5% Agar + Antibiotikum) können einige Tage bis Wochen im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt werden. Für einen längeren Zeitraum wurden 0.5 ml einer stationären üN-Kultur mit 1 ml 87% (v/v) Glycerin gemischt und bei –20 °C gelagert.

2.3.2 Propagierung und Aufbewahrung von *H. salinarum*

Für die Anzucht von *H. salinarum*-Zellen wurden 35 ml Halostandard-Medium entweder von der Platte aus oder mit 1 ml Flüssigkultur angeimpft und bei 37 °C und 100 rpm geschüttelt. Um eine Hauptkultur anzupfen, wurde eine derartige Vorkultur (3-4 Tage alt) in 1 l Halo-Medium überführt. Eine stationäre 5-7 Tagekultur kann bei RT luftdicht verschlossen über längere Zeit gelagert werden. Außerdem können 50 µl einer 10⁶-10⁷-fachen Verdünnung ausplattiert werden. Die nach 8-14-tägiger Inkubation erhaltenen Einzelkolonien auf der Platte können ebenfalls bei RT aufbewahrt werden.

2.3.3 Präparation und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurden üN-Kulturen der entsprechenden Stämme in LB-Medium mit dem jeweils erforderlichen Antibiotikum bei 37 °C, 250 rpm angezogen. Dann wurde im Verhältnis 1:100 in 1 l frisches Medium überimpft und bis zu einer OD₅₉₅ von 0.7-1.0 weiter im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 20 min bei 4 °C gekühlt und zentrifugiert (7500 rpm, JA10.500-Rotor, 15 min, 4 °C). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen, und das Zellpellet zunächst in 1 l, nach erneuter Zentrifugation (s.o.) in 0.5 l eiskaltem sterilen Wasser und anschließend Glycerin (10% v/v) resuspendiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden in 50 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

Für die Transformation wurden einzelne Portionen der tiefgefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut. Je eine Portion (50 µl) wurde bereits in einer vorgekühlten Elektroporations-Küvette mit 0.5-1 µl (bei Ligationsansätzen: 3-5 µl) Plasmid-DNA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Vor dem Einbringen der Küvette in das Elektroporationsgerät (*Biorad*) wurden die Kontaktstellen der Küvette gründlich abgetrocknet. Die Elektroporation erfolgte mit einem Puls bei 25 µF, 1.5 kV und 200 Ω, die Zellen wurden anschließend sofort mit 3 ml LB-Medium ohne Antibiotikum gemischt und bei 37 °C, 200 rpm, 45 min inkubiert. Danach wurden verschiedene Mengen dieses Transformationsansatzes (100, 300, 600 µl) auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C üN inkubiert.

2.3.4 Präparation und Transformation von *H. salinarum*-Zellen

Für die Herstellung transformationskompetenter *H. salinarum*-Zellen wurde eine 35 ml Kultur des Stammes TOM bzw. SNOB verwendet, die mindestens zweimal alle zwei Tage überimpft worden war (100 rpm). Nach weiteren 1.5 Tagen Wachstum bei 250 rpm wurden 2-4 ml Kultur (je nach Dichte) abgenommen und 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl sterilem SPH-Puffer durch vorsichtiges Tippen gegen das Eppendorfgefäß resuspendiert. Durch Zugabe von 10 µl 0.5 M EDTA in SPH-Puffer wurden Sphäroplasten erzeugt, deren Ausbildung im Mikroskop überprüft wurde. Von der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden 5-10 µl mit derselben Menge an 4 M NaCl gemischt und zu der Sphäroplasten-Lösung gegeben. Anschließend wurde durch leichtes Schwenken des Gefäßes gemischt, und der Ansatz bei RT 10 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 220 µl 60% PEG 600 in SPH-Puffer: dazu wurde die PEG-Lösung in den Deckel des Gefäßes pipettiert, das Mischen erfolgte durch rasches Schließen und Umschütteln des Gefäßes. Zuletzt wurde das Eppendorfgefäß mit SVL-Puffer bis zum Rand aufgefüllt und bei 4000 rpm, 5 min, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 2 ml Halomedium aufgenommen und bei 37 °C 2-3 Tage in Reagenzgläsern geschüttelt. Je 100- und 200 µl-Aliquots wurden davon auf Platten mit Halostandard-Medium und 10 µg/ml Mevinolin ausplattiert. Wichtig war dabei ein gründliches „Einreiben“ der Aliquots mit dem Drygalski-Spatel in den Agar.

SPH (Sphäroplastenpräparations)-Puffer

2 M NaCl

25 mM KCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.75

15% (w/v) Saccharose, in Wasser

SVL (Sphäroplastenverdünnungs)-Puffer

4.3 M NaCl

80 mM MgCl₂

10 mM Na₃-Citrat

1.4 mM CaCl₂

50 mM Tris/HCl, pH 7.4

15% Saccharose, in Wasser

2.3.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden 5 ml üN-Kulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C, 250 rpm angezogen und anschließend bei 4000 xg für 10 min zentrifugiert. Die eigentliche Isolierung erfolgte mit dem Plasmid-Mini-Kit der Firma *Quiagen*, bei dem die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen werden, und die Plasmid-DNA mittels hydrophober Interaktionschromatographie von der genomischen DNA und den übrigen Zellbestandteilen getrennt wird. Die Ausbeute dieser Methode liegt bei 2-10 µg Plasmid-DNA.

2.3.6 Isolation von genomischer DNA aus *H. salinarum*

Für eine saubere DNA-Präparation wurden 2 ml einer frisch gewachsenen Kultur (2-3 Tage alt) von *H. salinarum* (OD₆₀₀ ungefähr 1.0) abzentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen. Das Pellet wurde zuerst in einem geringen Volumen (etwa 50 µl) Basalsalz resuspendiert, anschließend mit 400 µl Lysepuffer versetzt und mit 800 µl 100% Ethanol überschichtet. Die DNA befand sich in der Interphase und konnte auf einer zugeschmolzenen Glaskapillare aufgerollt werden. Danach wurden die beiden Phasen durch Umschwenken des Eppendorfge-

fäßes gemischt, die Kapillare mit der DNA wurde in dem Gefäß für 7 min stehengelassen. Die Kapillare wurde daraufhin für 2 x 5 min in 100% Ethanol und für ein paar Sekunden in Ether getaucht. Zum Schluß wurde die DNA auf der Kapillare für mindestens 20 min an der Luft getrocknet und danach in Wasser oder TE-Puffer gelöst. Um das Lösen noch zu verbessern, wurde die Suspension für einige Stunden in den Heizblock bei 50 °C gestellt. Von dieser DNA-Lösung wurden üblicherweise 0.5 µl für einen 50 µl-PCR-Ansatz verwendet.

Lysepuffer

4 M NaCl	2.5 ml
2 M Tris/HCl, pH 8.0	0.5 ml
0.5 mM EDTA	0.2 ml
10% (w/v) SDS	0.5 ml
H ₂ O	ad 100 ml

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden im Gene Amp PCR-System 9700 von *Perkin Elmer* durchgeführt. Für die Ansätze wurden je nach Ansatz die *Taq*-Polymerase (analytische PCR; abteilungsinterne Produktion) oder die *Pfu*-Polymerase (präparative PCR) verwendet. In einem typischen Ansatz zur Gewinnung von Genfragmenten aus genomischer DNA wurden ca. 150 ng Matrizen-DNA eingesetzt. Die Menge der Primer wurde so gewählt, daß pro Ansatz 2.5 pmol vorhanden waren.

PCR-Standard-Ansatz

150 ng Matrizen-DNA	x µl
Primer A/B (5-15 pmol)	y µl
10 x Puffer	5 µl
dNTP's (je 25 mM)	1-2 µl
auf 50 µl mit H ₂ O _{bidest} auffüllen	

Der Ansatz wurde für 5 min auf 95 °C erwärmt, die Reaktion durch die Zugabe von 0.5 - 1 µl Polymerase gestartet. Das Standardprotokoll zur Amplifizierung mit 35 Zyklen hatte folgende Einstellungen:

Aufschmelzen:	95 °C, 30 s
Hybridisieren:	T _m 30 s
Elongation:	72 °C, 1 s/10-15 bp DNA

Die Hybridisierungstemperatur T_m errechnete sich näherungsweise aus der Länge und der Sequenz der verwendeten Primer:

$$T_m = [(G/C) \times 4 \text{ °C} + (A/T) \times 2 \text{ °C}] - 4 \text{ °C}$$

2.3.8 Gelelektrophorese von DNA

Für die DNA-Gelelektrophorese wurden 1-1.5% (w/v) Agarose in 1 x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde eine 1/20 000-Verdünnung einer Ethidiumbromidlösung der Konzentration 10 mg/ml zugegeben, und die Agarose-Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Für die Bildung von Geltaschen wurde ein geeigneter Kamm in die dafür vorgesehenen Halterungen gesteckt. Nach Erstarren des Gels wurde es mit 1 x TBE-Puffer überschichtet, die Geltaschen wurden mit den jeweiligen DNA-Proben und Größenstandards in 6 x DNA-Probenpuffer beladen. Bei 50-80 V wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend bei 312 nm in einem UV-Transilluminator detektiert.

10 x TBE-Puffer

1 M Tris-Base

0.83 M Borsäure

10 mM EDTA

2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mithilfe des QIAquick-Gel-Extraktion-Kits der Firma *Qiagen* unter Anwendung des von der Firma angegebenen Protokolls.

2.3.10 Restriktionsverdau von DNA

Die Spaltung von DNA über Restriktionsenzyme erfolgte in Volumina zwischen 15 und 20 μ l unter der Verwendung von 10-20 U Restriktionsenzym und den jeweiligen 10 x Puffern. Der Reaktionsansatz wurde 1-1.5h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (meist bei 37 °C) inkubiert und anschließend in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt.

2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsansätze wurden in Volumina von bis zu 20 μ l und mit DNA-Mengen zwischen 100 und 500 ng durchgeführt. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug üblicherweise 3:1. Als Enzym wurden 1-2 U T4 DNA-Ligase und der entsprechende 5 x Ligasepuffer verwendet. Der gesamte Ansatz wurde einem Ligationsprogramm in einem Thermocycler unterzogen.

Ligations-Standard-Ansatz

Vektor	2 μ l
Insert	5 μ l
5 x Ligase Puffer	4 μ l
T4 DNA Ligase	2 μ l
ATP (100 mM)	1 μ l

Standard-Programm

15 min	24 °C
2 min	24 °C
2 min	18 °C
2 min	12 °C
59 min	12 °C
unbegrenzt	4 °C

Schritt 2-4: 99 x wiederholen

2.3.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Diese wirken als Terminatoren und sorgen auf diese Weise für einen Abbruch der PCR. Da die Termination statistisch erfolgt, entstehen so DNA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge, die chromatographisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung identifiziert werden können. Jedes Didesoxy-dNTP ist an einen anderen Farbstoff gekoppelt, anhand dessen dann die DNA-Sequenz der Matrize bestimmt werden kann. Verwendet wurde der *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* von *Perkin-Elmer Applied Biosystems*.

Reaktionsansatz:

Plasmid	5 µl (500 ng)
Primer	1 µl (5-10 pmol)
Kit	3 µl
ad H ₂ O	10-14 µl

PCR-Programm:

30 s	96 °C
30 s	T _m (Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur)
4 min	60 °C, 30-35 Zyklen

Die Probe wurde anschließend durch Gelfiltration über ein Micro-Spin G-50 Säulchen von *Pharmacia* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator) trocken gezogen. Die Sequenzierung erfolgte per Gelelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer (Modell *ABI Prism 377 DNA Sequencer*).

2.3.13 Herstellung der Deletionsmutante von *H. salinarum*ΔFerr

Um einen Deletionsstamm herzustellen, der das Ferritin-Gen nicht mehr enthält, wurde der Vektor pM@β-master (Matthias Koch) verwendet. Über die Oligonukleotide flseq1for und flseq1rev sowie flseq2for und flseq2rev wurden die beiden etwa 400bp langen flankierenden Bereiche des Ferritins im Genom vervielfältigt. Die PCR-Produkte (flankierende Sequenzen) wurden über Gelelektrophorese visualisiert und aus dem Gel aufgereinigt. In einem

zweiten PCR-Ansatz mit den Primern flseq1for und flseq2rev wurden die beiden flankierenden Enden verknüpft. Das Produkt wurde ebenfalls mittels Gelelektrophorese überprüft, mit BamHI und XbaI geschnitten und in den Vektor pM@β-master kloniert. Dieser Vektor wurde nun nach Amplifikation in *E. coli* in *H. salinarum* SNOB transformiert. In einem ersten *crossover*-Ereignis fand die Integration des Vektors in das Wirtsgenom statt, die transformierten Klone wurden nach dem Blau-Weiß-Screening isoliert: blaue Klone waren positiv, sie enthielten das Plasmid samt der vollständigen β-Galaktosidase, die das auf den Platten (+ Mev, + X-Gal) vorhandene X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactosid) hydrolysieren konnte. Einige der positiven Klone wurden in Flüssigkultur ohne Mevinolin angezogen, sodaß sich ein zweites *crossover* ereignen konnte: dabei wurde entweder der Vektor allein oder samt der Ferritin-Sequenz aus dem Genom wiederausgeschnitten. Nach mehrmaligem Anziehen von derartigen Kulturen, wobei jeweils aus einer alten eine neue Kultur angeimpft wurde, wurden Zellen auf Halomediums-Platten (- Mev, + X-Gal) ausplattiert. Nach 8-10 Tagen waren sowohl blaue als auch rote Kolonien gewachsen. Diesmal repräsentierten die roten Zellen die positiven Klone, d.h. die, in denen das zweite *crossover*-Ereignis (s.o.) aufgetreten war. In etwa 50% der roten Klone war nur der Vektor ausgeschnitten worden, in den anderen 50% der Vektor zusammen mit der Ferritin-Sequenz. Von diesen Klonen wurden wiederum Flüssigkulturen angesetzt, und die genomische DNA isoliert. Über eine PCR mit den Oligonukleotiden flseq1for und flseq2rev wurde das Vorhandensein der beiden flankierenden Sequenzen am Stück, d.h. ohne Ferritin-Gen dazwischen, überprüft.

X-Gal-Lösung:

40 mg X-Gal (*BIOMOL*) auf 1 ml DMF

davon wurden 40 µl mit derselben Menge H₂O auf den Halomediumsplatten ausplattiert und gut getrocknet, danach wurde die Zellsuspension darauf aufgebracht

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe wurden sie mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Dadurch bildet sich ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex (etwa 1 g SDS/1 g Protein), wobei die Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine nahezu vollständig überdeckt. Die Ladung des Komplexes ist somit ungefähr proportional zur Masse des Proteins. Als Matrix für die Auftrennung wurde Acrylamid eingesetzt, das beim Polymerisieren mit dem Quervernetzer Methylenbisacrylamid ein festes Gel ausbildet. Für die Polymerisation wurden Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED) als Radikalstarter verwendet. Der Anteil an Acrylamid bestimmt die Porengröße des Gels und damit seinen Trennungsbereich. Üblicherweise wurden 13.5%ige Gele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Fling & Gregerson (1986) mit *Biorad* Minigel-Apparaturen durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem Probenpuffer versetzt und 5 min, 95 °C gekocht.

4 x Trenngelpuffer für SDS-PAGE

1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

0.5 mM EDTA

0.4% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

0.5 mM EDTA

0.4% (w/v) SDS

5 x SDS-PAGE Probenpuffer

2.3% (w/v) SDS

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

0.1% (w/v) Bromphenolblau

5% (w/v) DTT

10% (w/v) Glycerin

SDS-Gelelektrophoresepuffer (Fling & Gregerson, 1986)

25 mM Tris-Base
 250 mM Glycin-HCl
 0.1% (w/v) SDS

Rezept für 10 Trenngele, 13.5%

30% Protogel (30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid)	27 ml
4 x Trenngelpuffer	15 ml
H ₂ O _{bidest}	9 ml
Glyzerin	9 ml
10% (w/v) APS	200 µl
TEMED	26 µl

Rezept für 10 Sammelgele, 5.4%

30% Protogel (30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid)	4.8 ml
4 x Sammelgelpuffer	8 ml
H ₂ O _{bidest}	13.6 ml
10% (w/v) APS	100 µl
TEMED	13 µl

2.4.2 Färben von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden. Die eine Methode stellte die Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 dar, der sich an die Argininreste der Proteine anlagert. Dabei können bis zu 0.1 µg Protein pro Bande detektiert werden. Für die Anfärbung von SDS-Gelen, die zur Identifikation von Kristallen gemacht wurden, wurde die Silberfärbung angewandt, die erheblich sensitiver ist als die Coomassie-Färbung (Detektion von Proteilmengen bis zu 0.02 µg).

Coomassie-Färbung:

Coomassie-Färbelösung

Coomassie	0.1% (w/v)
45% MeOH	450 ml
10% Eisessig	100 ml
H ₂ O	450 ml

1000 mg Coomassie R-250 wurden 0.5-1 h in 450 ml Methanol gerührt, um den Farbstoff vollständig zu lösen. Danach wurde die Lösung mit H₂O und Eisessig auf einen Liter aufgefüllt. Für die Färbung wurde das Gel mindestens 30 min lang schüttelnd in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde mit 20% MeOH, 10% Eisessig entfärbt.

Silberfärbung:

Fixierlösung 1

- 10% Eisessig
- 30% Methanol, in Wasser

Fixierlösung 2

- 5% Eisessig
- 10% Ethanol, in Wasser

Fixierlösung 3

- 10% Ethanol, in Wasser

Färbelösung A

- 25 µl 37% Formaldehyd
- 21 µl 43% Natriumthiosulfat, in 50 ml Wasser

Färbelösung B

- 25 µl Formaldehyd
- 0.2% Silbernitrat, in 50 ml Wasser

Färbelösung C

25 µl 37% Formaldehyd

5 µl 4.3% Natriumthiosulfat, in 50 ml 6% Natriumcarbonat

Stopplösung

3% Eisessig

5% Glycerin, in Wasser

Das Gel wurde zunächst 15 min in Fixierlösung 1, dann 30 min in Fixierlösung 2 und anschließend je zweimal 15 min in Fixierlösung 3 geschüttelt (2 U/min). Danach wurde das Gel 60 s in Färbelösung A inkubiert und dreimal mit H_2O_{bidest} gewaschen. Nach einer 6-minütigen Inkubation in Färbelösung B wiederum auf dem Schüttler folgten zwei weitere Waschstritte. Zuletzt wurde das Gel in Färbelösung C bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt, zweimal mit Wasser gewaschen und zur Aufbewahrung in Stopplösung gelegt.

2.4.3 „Elektro Blotting“

Proteine können von einem ungefärbten Gel mittels des halbtrockenen Blotverfahrens auf eine Membran übertragen werden. Dazu wurde eine Membran aus PVDF (Immobilon-P Transmembran, Millipore) 15 s in 100% Methanol und anschließend 2 min in H_2O_{bidest} eingelegt und danach zusammen mit dem Blotpapier (Whatmanpapier) und dem Gel kurz in den jeweiligen Blotpuffern (s.u.) geschwenkt. Aus allen drei Komponenten wurde anschließend eine Art Sandwich aufgebaut, das von unten nach oben wie folgt zusammengesetzt war: zwei Lagen Whatmanpapier, Gel, Blotmembran, zwei Lagen Whatmanpapier. Dieses Sandwich wurde auf die Kathodenseite der Blotapparatur gelegt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (80 mA pro Minigel, 1.5 h) wanderten die Protein/SDS-Komplexe in Richtung Anode in die Membran. Zuletzt wurde die Membran in Coomassie-Lösung (s. Färben von SDS-Gelen) eingelegt und mit 80% MeOH, 20% Eisessig entfärbt.

Anodenpuffer I (oberstes Filterpapier)

0.3 M Tris, pH 10.4

10% MeOH

Anodenpuffer II (zweitoberstes Filterpapier, Membran)

25 mM Tris, pH 10.4

10% MeOH

Kathodenpuffer (unterste Filterpapiere, Gel)

25 mM Tris, pH 9.4

10% MeOH

40 mM Glycin

2.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Eine der schnellsten Methoden zur Proteinbestimmung ist der Test nach Bradford. Das hierzu verwendete Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, der an die Argininreste von Proteinen bindet. Durch diese Reaktion verschiebt sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum der Farbe (ohne Protein 465 nm, mit Protein 595 nm). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist damit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Der Grund für die Verschiebung liegt in der Überführung des Farbstoffes von der kationischen in die anionische Form. Für die Messung wurde das Bradford-Reagenz von *Bio-Rad* 1:5 mit H₂O verdünnt. Zu 1 ml dieser Lösung wurden 10 µl der zu vermessenden Proteinprobe gegeben. Nach 5 min bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, und anhand einer mit BSA aufgenommenen Eichgerade die Proteinkonzentration bestimmt.

Bradford Reagenz

0.01% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250

5% (v/v) Ethanol

8.5% (v/v) Phosphorsäure

2.4.5 Aufkonzentrieren von Proteinen

Um Proteine aufzukonzentrieren, wurden folgende Konzentrationszellen verwendet: Centriprep 10 (Volumina > 500 µl) von *Amicon* und Centrisart I, 5000 D (Volumina < 500 µl) von *Sartorius*. Die Zentrifugation fand bei 4 °C und den vom Hersteller angegebenen Drehzahlen statt. Die Bestimmung der Endkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Proben für die Kristallisation wurden – falls möglich – auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt.

2.4.6 Proteinsequenzanalysen

Die N-terminale Sequenzierung wurde in der Arbeitsgruppe Proteinanalytik von Prof. Lottspeich nach der Edman-Methode durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die zu sequenzierenden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt (s. Elektro Blotting). Nach Anfärben der Bande wurde dieselbe ausgeschnitten und in die Sequenzierung eingesetzt. Alternativ konnte auch eine Sequenzierung direkt aus der Proteinlösung heraus durchgeführt werden, falls es sich um aufgereinigtes Protein bzw. in Wasser aufgelöste Proteinkristalle handelte.

2.4.7 Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen

Die Identifikation von Proteinen über ihre Masse mittels MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation) wurde in der Gruppe von Dr. Frank Siedler durchgeführt. Dafür wurde die entsprechende Bande aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten, gelöst und mit Trypsin verdaut (Shevchenko, 1996). Die Cysteine wurde durch Behandlung mit Iodacetamid in Carboxyamidomethyl-Cystein und die Methionine in ihre Methioninsulfoxid-Form umgewandelt. Die spezifische Massenverteilung des verdauten Proteins erlaubte seine Identifizierung.

2.4.8 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden zusammen mit Günter Pfeifer in der Abteilung von Prof. Baumeister durchgeführt. Als Proteinprobe wurden aufgelöste Kristalle (in 400 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8.0) bzw. die Membranfraktion von *H. salinarum* (in Wasser) verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte über das Auftropfen der Proteinlösung auf ein Plättchen aus dünnem Kupfernetz, auf dem sich ein Kohlefilm befand. An diesem adsorbieren die Proteine und wurden mit 2% Phosphorwolframsäure negativ gefärbt. Nach ca. 1 min Einwirkzeit wurde die überschüssige Färbelösung mit einem Filterpapier abgesaugt. Die Messungen erfolgten an zwei verschiedenen *Philips*-Mikroskopen (CM 20 FEG, field emission gun / CM 12), aufgenommen wurden sie mithilfe von CCD-Kameras. Die Kristallinität von Membranbereichen wurde anhand von Diffraktionsbildern kontrolliert, die durch Fourier-Transformation der digitalisierten Negative am PC erstellt wurden.

2.4.9 Rasterkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*)

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Probenoberfläche mit einer feinen Nadel, die sich am freien Ende eines Hebelarms (Cantilever) befindet, rasterförmig abgetastet. Dabei kann sich die Nadel entweder im direkten Kontakt zur Probe befinden (contact mode) oder berührungslos über die Probe geführt werden (non-contact mode), wobei sich bei der zweiten Art van der Waals-Kräfte ausbilden. Die Auslenkung des Hebelarms entsprechend der Topographie der Probenoberfläche dient als Meßsignal und wird optisch über einen Laserstrahl detektiert.

Alle AFM-Messungen wurden freundlicherweise von Harald Janovjak am MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durchgeführt.

2.5 Proteinexpression und -aufreinigung

2.5.1 Zytosolpräparation von *H. salinarum* (Shotgun-Methode)

Um die zytosolische Fraktion von *H. salinarum* zu präparieren, wurden meist Kulturen im 10 l-Maßstab angesetzt, wobei sich jeweils 1 l Kultur in einem 2 l-Erlmeyerkolben bzw. eine 2.5 l Kultur in einem 5 l-Kolben befanden. Die Zellen wurden aerob in Halostandardmedium im Dunkeln bei 37 °C kultiviert und in der stationären Phase ($OD_{600} > 1.0$) durch Zentrifugation bei 5000 x g, 45 min, 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in Basalsalz resuspendiert und nochmals zentrifugiert (SS34, 9000 rpm, 45 min, 4 °C). Für den Aufschluß wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Eine davon war ursprünglich von Christian Klein zur Herstellung einer Ribosomen-freien Membranfraktion erstellt worden. Dabei wurden die Zellen in 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, versetzt mit Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (*Roche*) und DNaseI (*Roche*), 0.5 h bei RT gerührt. Zur besseren Resuspension wurde die Zellmasse vorher in einem Potter homogenisiert. Obwohl bereits unter diesen Bedingungen ein Teil der Zellen lysierte, erfolgte der eigentliche Aufschluß über *French Press* (1100 psi, *Aminco*; 3 Durchläufe). Die zweite Methode bediente sich einer Gallensäure, Taurodesoxycholat (*Sigma*), das in unterschiedlichen Konzentrationen (0.01-0.1%) getestet wurde. Dafür wurden Zellen aus 10 l Kultur nach dem Waschschrift mit Basalsalz in 100 ml 4.3 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 aufgenommen und zusätzlich mit 1.6 ml 1 M $MgSO_4$ versetzt (Kupper, 1994). Unter ständigem Rühren wurde das Taurodesoxycholat (in dem glei-

chen Puffer gelöst) zugegeben. Die Suspension wurde anschließend 1 h bei RT gerührt, die Lyse der Zellen spektroskopisch bei OD₆₀₀ verfolgt.

Bei beiden Methoden wurden abschließend alle nicht-löslichen Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation (200 000 xg, 4 °C, 1.5 h) entfernt. Je nach Verwendungszweck des Zytosols (= Art der chromatographischen Auftrennung, s. 2.5.2) wurde die Proteinlösung gegen den entsprechenden Auftragspuffer (immer Puffer A der jeweiligen Chromatographie-Methode) dialysiert. Die Dialyse erfolgte in einem Dialyseschlauch (*Sigma*) bei 4 °C im Kühlraum. Vor dem Auftrag auf die jeweilige Chromatographie-Säule wurde das Zytosol nochmals mit 200 000 x g zentrifugiert und durch eine Millex HA-Filtrationseinheit, Porengröße 0.45 µm (*Millipore*) filtriert, um eventuell präzipitierte Proteine zu entfernen.

2.5.2 Fraktionierung von Zytosol aus *H. salinarum* (Shotgun-Methode)

Die Fraktionierung erfolgte mittels verschiedener Chromatographie-Methoden: Anionenaustauscher (2.5.2.1), hydrophobe Interaktionschromatographie (2.5.2.2), Gelfiltration (2.5.2.3) oder Chromatographie mit Hydroxyapatit (2.5.2.4). Für jede Methode wurden die entsprechenden Puffer zuvor filtriert (Vakuum-getriebene Steritop-Filtrationseinheit, *Millipore*), um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Verwendet wurde das FPLC-System ÄKTATMdesign (*Pharmacia Biotech*), wobei sowohl mit dem ÄKTAexplorer als auch dem ÄKTApurifier gearbeitet wurde. Für das Packen von Säulen wurden Leersäulen von *Pharmacia Biotech*, XK16/20 und XK26/20 verwendet.

Nach dem Auftrag der staubfreien Proteinlösung in Puffer A wurde die jeweilige Säule in allen Fällen mit dem Auftragspuffer so lange gespült, bis die austretende Lösung frei von Proteinen war. Kontrolliert wurde dies über die Absorption bei 260/280 nm. Die Flußrate wurde den jeweiligen Gegebenheiten angepaßt, höhere Proteinkonzentrationen erforderten z.B. eine niedrigere Flußrate. Die Elution erfolgte durch den Elutionspuffer Puffer B. Mithilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen unterschiedlicher Größe (bei 2.5.2.1-3 jeweils 10-12 ml) gesammelt, deren Proteinzusammensetzung über eine SDS-PAGE kontrolliert wurde. Entsprechend dem Proteinmuster wurden ähnliche Fraktionen vereinigt und aufkonzentriert. Der Aufkonzentration ging je nach Chromatographie-Methode noch ein Dialyseschritt voraus, um die Proteinlösung auf den Kristallisationspuffer (1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) einzustellen.

Die Prinzipien der verschiedenen Chromatographie-Methoden sind im Ergebnis/Diskussions-Teil der Shotgun-Kristallisation erläutert (Kap. 3.1.1).

2.5.2.1 Anionenaustauscherchromatographie (AC)

Für die AC wurden drei verschiedene Säulen verwendet: eine kommerziell erhältliche MonoQ HR 10/10 (*Pharmacia Biotech*) und zwei selbstgepackte Säulen mit DEAE CL-6b (*Pharmacia Biotech*) und verschiedenen Volumina (50 und 200 ml). Die Ladungskapazität dieser Säulen beträgt für die MonoQ typischerweise 25 mg/ml, für das DEAE-Material abhängig von Protein und Flußrate 2-170 mg/ml. Für die Elution der Proteine wurden unterschiedliche Gradienten (linear oder stufenförmig) meist zwischen 100/150 mM und 1 M NaCl angelegt. Der Auftragspuffer (Puffer A) enthielt eine Grundzusammensetzung (s.u.), der je nach Ansatz noch stabilisierende Substanzen hinzugefügt wurden: 20% (v/v) Glycerin, 2 M Glyzin oder 2.5/3 M Betain. Ebenfalls als Stabilisator wurde Ammoniumsulfat verwendet, das in Konzentrationen von 0.6 oder 1.2 M zu dem Basis-Puffer bzw. zu einem Natriumphosphat-Puffer, pH 6.7 (Leicht, 1981) gegeben wurde. Besonders in diesem Fall war eine Zentrifugation der Proteinlösung nach Dialyse gegen den Ammoniumsulfat-haltigen Puffer unumgänglich.

In einem Fall wurde die AC nach der Dialyse des Zytosols durch ein Hohlfasermodule von *Variperm*, *KRONLAB* durchgeführt. Der Dialyse-Prozeß erfolgte mithilfe zweier Schlauchpumpen, die an den inneren und äußeren Kreislauf des Moduls angeschlossen waren. Die Flußgeschwindigkeit betrug innen 1.25 ml/min und außen 8 ml/min, nach ca. 60 min war die Dialyse abgeschlossen.

Puffer A_{AC}

100 / 150 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

20% Glycerin / 2 M Glyzin / 2.5/3 M Betain / 0.6/1.2 M Ammoniumsulfat

Puffer B_{AC}

1 M NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

+ entsprechende Zusätze (s. *Puffer A_{AC}*)

2.5.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Für die HIC wurde eine Säule (XK 26/20) mit Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub; *Pharmacia Biotech*) gepackt. Die Proteinlösung (in 1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0) wurde unter ständigem Rühren mit fein geriebenem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 2.5 M versetzt. Nach dreitägigem Rühren dieser Salz-Protein-Suspension wurden alle durch das Ammoniumsalz präzipitierten Proteine durch Ultrazentrifugation (200 000 $\times g$) abgetrennt. Der Überstand wurde auf die Sepharose-Säule aufgetragen, die zuvor mit Puffer A_{HIC} äquilibriert worden war. Eluiert wurde über einen zwei- oder dreistufigen Gradienten mit Puffer B_{HIC} . Teilweise wurde der Niederschlag der Ammoniumsulfat-Fällung in Ammoniumsulfat-freiem Puffer resuspendiert und ebenfalls auf die Sepharose-Säule aufgetragen.

Puffer A_{HIC}

1 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8.0
2.5 M Ammoniumsulfat

Puffer B_{HIC}

1 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8.0

2.5.2.3 Chromatographie mit Hydroxyapatit

Auch für diese Chromatographie-Methode wurde eine Säule (XK 26/20) selbstgepackt, als Material wurde Hydroxyapatit von *BioRad* verwendet. Die Elution über Puffer B_{HAP} erfolgte durch die erhöhte Phosphat-Konzentration.

Puffer A_{HAP}

3 M KCl oder 2 oder 4 M NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7.2 oder 8.0
2 mM DTT
10 mM MgCl₂
2% Glycerin
10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄

Puffer B_{HAP} , s. Puffer A_{HAP} , abweichend:

90 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4

2.5.2.4 Gelfiltration (GF)

Die Methode der Gelfiltration wurde in einigen Fällen als zweiter Schritt der Fraktionierung verwendet. Gearbeitet wurde dabei mit den kommerziellen Gelfiltrationssäulen Superdex 75 und Superdex 200 (*Pharmacia Biotech*). Auf diese Säulen konnten nur begrenzte Proteinmengen aufgetragen werden, da die Trennkapazität sonst entscheidend nachließ. Darum wurden Volumina von 1-3 ml mit einer Konzentration zwischen 10 und 20 mg/ml eingesetzt. Hier wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt.

Puffer A_{GF}

1 M NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

2.5.3 Native Aufreinigung des Ferritins aus *H. salinarum* TOM

Um das Ferritin aus *H. salinarum* nativ aufzureinigen, wurde dem Protokoll nach Reindel *et al.* (2002) unter leichter Abwandlung gefolgt. Die ursprüngliche Vorschrift beinhaltet die Verwendung eines Tris-Malat-Puffers (pH 7.2) bei der Resuspension und dem Aufschluß der Zellen. Dieser Puffer wurde in der vorliegenden Arbeit durch einen Tris/HCl-Puffer (pH 7.2) ersetzt. Die ersten Schritte der Aufreinigung (Ultraschall, Hitzedenaturierung bei 5 min, 75 °C) wurden dem Protokoll nach durchgeführt, die sich daran anschließende Butanolfällung in manchen Experimenten ausgelassen. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200-Säule (statt Sepharacryl S-300-HR) verwendet, als Anionentauscher wie im Protokoll eine DEAE-Säule. Sämtliche Chromatographie-Schritte wurden im Gegensatz zum Protokoll (RT) bei 4 °C durchgeführt.

2.5.4 Expression des Bacteriorhodopsin-Ferritin-Fusionsproteins

Unter Verwendung der Oligonukleotide DpsBstEII_fwd und DpsEcoRI_rev (s. 2.1.3) wurde die Sequenz des Ferritins aus dem Genom von *H. salinarum* mittels PCR amplifiziert. Nach einem Restriktionsverdau des PCR-Fragments und des Vektors pHBrfus mit BstEII und EcoRI wurde das Fragment in den Vektor ligiert. Der daraus resultierende Vektor

pHusBrfus:*Ferr* wurde anschließend in den *H. salinarum*-Stamm TOM transformiert. Die Expressionskulturen (1 l Halomedium ohne Mevinolin) wurden aus entsprechenden Vorkulturen (35 ml Halomedium mit Mevinolin, unter Sauerstoffmangel und Lichtbestrahlung) angeimpft und bei 37 °C sieben Tage geschüttelt. Für die Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (Beckman, JA 10.500, 9000 rpm, 30 min, 4 °C) und zur Lyse in 100 ml Puffer A resuspendiert. Die Zell-Lösung wurde 3-4 h bei 4 °C gerührt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte. Um die Membranfraktion zu erhalten, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt durchgeführt (Ultrazentrifuge, Ti 45, 40 000 rpm, 30 min, 4 °C). Das Pellet wurde durch Pottern in 5 ml Puffer A resuspendiert und auf einen Zuckergradienten (25-45% Saccharose in Puffer A) aufgetragen. Durch eine letzte Zentrifugation üN (Ultrazentrifuge, TST28, 250 000 rpm, 14 h, 4 °C) wurde die BR- bzw. BR-Ferritin-Fraktion von restlichen Membranbestandteilen abgetrennt. Zur Reinigung wurde die jeweilige Protein-Bande mithilfe einer 1000 ml-Pipette abgenommen, in ein SS34-Röhrchen überführt und mit Puffer A aufgefüllt. Es folgten einige Waschschriffe (Entfernung des Zuckers), wobei die Proteinfraction abwechselnd zentrifugiert (SS34, 20 000, 1 h) und in frischem Puffer A resuspendiert wurde. Abschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

Puffer A

150 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

Proteaseinhibitor-Cocktail, DNase

2.5.5 Überexpression von mit einem Histidinpeptid versehenem Ferritin

Unter Verwendung der Oligonukleotide DpsNdeI_fwd und DpsXhoI_rev (s. 2.1.3) wurde das Ferritingen aus dem Genom von *H. salinarum* mittels PCR amplifiziert. Nach einem Restriktionsverdau des PCR-Fragments und des Vektors pET-28a mit NdeI und XhoI wurde das Fragment in den Vektor ligiert. Nach Transformation des Vektors pET-28a-*Ferr* in den Expressionsstamm *E. coli*BL21(DE3) erfolgte die Expression in einem Volumen von insgesamt 6 l *E. coli*Kultur. Zur Vorbereitung wurde pro 3 l bei 37 °C üN eine 50 ml Vorkultur in LB-Medium angezogen, die mit Kanamycin (Endkonzentration: 35 µg/ml) versetzt war. Diese Kulturen wurden dann am nächsten Morgen zu je 3 l vorgewärmtem TB-Medium gegeben. Die Zellsuspensionen wurden bei 30 °C solange geschüttelt, bis sie eine OD₅₉₅ von 0.6 –0.8 erreicht hatten. Dann wurde die Expression des Ferritins durch Zugabe von 500 µM IPTG

(Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 3-4 h wurden die Zellen abzentrifugiert (18600 x g, 5 min, 4 °C) und in Puffer (Puffer A_{NTA}, s. nächstes Kapitel) resuspendiert. Danach wurden sie entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch eine Ultraschall-Behandlung, danach wurden die lysierten Zellen bei 75 600 x g, 0.5 h zentrifugiert, um nicht-aufgeschlossene Zellen und Membranbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde einer Metallaffinitäts-Chromatographie mit Ni-NTA unterzogen.

2.5.6 Aufreinigung von mit einem Histidinpeptid versehenem Ferritin mittels immobilisierter Metallchelataffinitäts-Chromatographie (IMAC)

Zur Aufreinigung des Ferritins, das mit einem Histidin-Peptid an seinem N-Terminus versehen war, wurde eine Metallaffinitäts-Chromatographie auf Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Sephargose durchgeführt. Dabei macht man sich die relativ spezifische Bindung von Nickel an Imidazolgruppen zunutze. Das Nickelion ist über Nitrilotriessigsäure, einen vierzähligen Liganden, der vier der sechs Koordinationsplätze am Nickelion besetzt, an der Säulenmatrix aus Sepharose immobilisiert. Die freien Koordinationsplätze können von den Stickstoffatomen der Imidazolringe histidinreicher bzw. mit einem Histidinpeptid versehener Proteine besetzt werden. Dadurch binden diese an die Säulenmatrix, während histidinarme Proteine ausgewaschen werden.

Für den Zellaufschluß aus 6 l Kultur wurde eine Säule mit einem Volumen von 50 ml Säulenmaterial (Ni-NTA-Superflow, *Qiagen*) verwendet. Nach dem Auftrag der Proteinlösung, die sich nach dem Aufschluß in Puffer A_{NTA} befand, auf die Säule, wurde solange mit Puffer A_{NTA} gewaschen, bis der Durchfluß proteinfrei war. Anschließend wurde die Konzentration von Puffer B_{NTA} von 0 auf 15% erhöht, und ebenfalls gewaschen, bis keine Proteine mehr detektiert werden konnten. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 15-100% B_{NTA} in einem vier- bis fünffachen Säulenvolumen, die Flußrate wurde auf 1 ml/min eingestellt. Die 5 ml-Fractionen wurden über SDS-PAGE auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Weiterverwendet wurden nur solche Fractionen, die möglichst ausschließlich das Ferritin enthielten. Nach Vereinigung und Aufkonzentrieren der Ferritin-Probe folgte nun eine Abspaltung des Histidin-Peptids mittels der Protease Thrombin (*Pharmacia Biotech*). Dafür wurde die Probe μ N gegen den Thrombin-Puffer dialysiert und anschließend ebenfalls μ N bei 4 °C dem Thrombin-Verdau ausgesetzt. Dafür wurden pro Milliliter Probe (Konzentration 3 mg/ml) 3 U Protease eingesetzt. Um das Histidin-Peptid abzutrennen, folgte eine weitere Chromatographie über Ni-NTA, wobei dieser Prozeß im Batch-Verfahren durch-

geführt wurde. Dafür wurde die Probe direkt nach dem Verdau mit der Protease mit etwa dem 10-fachen Volumen an Ni-NTA-Material versetzt, kurz inkubiert und abzentrifugiert. Das Histidin-Peptid war nun am Säulenmaterial gebunden, der Überstand konnte abgenommen werden. Zum Abtrennen der Protease Thrombin folgte zuletzt noch eine Gelfiltration.

Puffer A_{NTA}

300 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

Puffer B_{NTA}

300 mM NaCl

50 mM Tris/HCl, pH 8.0

250 mM Imidazol

Thrombin-Puffer

150 mM NaCl

20 mM Tris/HCl, pH 8.0

2.5 mM CaCl₂

2.6 Proteinkristallographische Methoden

2.6.1 Techniken der Proteinkristallisation

Der Großteil der Ansätze wurde mithilfe der Methode des „hängenden Tropfen“ (*hanging drop*) durchgeführt (Davis & Seagal, 1971). Dabei bewegte sich die Tropfengröße auf dem Deckgläschen zwischen 2 und 4 µl – abhängig davon, in welchem Verhältnis die Pufferlösung zur Proteinlösung stehen sollte. Gearbeitet wurde mit Kristallisationsplatten (Q Platten, 24 Reservoirbehälter) und Deckgläschen (*Siliconized Circle Cover Slides*, 22 mm) von *Hampton Research*. Die Platten wurden zwei Wochen nach dem Auspipettieren mit Folie (*Crystal Clear Sealing Tape*, *Hampton Research*) luftdicht abgeklebt. Die zweite Methode, die in einigen Fällen verwendet wurde, war die sogenannte „*batch*“-Kristallisation ebenfalls unter Verwendung von Kristallisationsplatten von Hampton (*MicroBatch plates*). Hierbei wurden

2-3 µl der Proteinlösung zusammen mit der gleichen oder der halben/doppelten Menge an Pufferlösung zusammen in die Vertiefungen der Platte pipettiert und anschließend mit einer Mischung aus Silicon- und Paraffin-Öl (*Al's Oil, Hampton*) überschichtet.

Da es für die Kristallisation von halophilen Proteinen nur sehr beschränkte Erfahrungswerte gibt, wurde die Strategie eines *sparse matrix screens* gewählt. Dafür wurde ein Satz von 50-100 Pufferzusammensetzungen, die sogenannten Crystal Screen Kits 1 und 2 (*Hampton Research*) verwendet, in denen Parameter, wie pH-Wert, Fällungsreagenz, Metallionen und Salzkonzentration unabhängig voneinander variiert werden. Die Zusammenstellung der Puffer beruht auf einer Vielzahl empirischer Erfahrungen, die im Zusammenhang mit den unterschiedlichsten Proteinen veröffentlicht wurden (Jancarik & Kim, 1991). Die konventionellen Puffer wurden zusätzlich in den meisten Fällen mit 1 M NaCl, z.T. alternativ mit 0.5 M KCl, 0.5 M (NH₄)₂SO₄ oder 2.5 M Betain versetzt. Dafür wurden z.B. für 1 M NaCl 250 µl einer 4 M NaCl-Lösung in die Reservoirbehälter der Kristallisationsplatten pipettiert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C solange inkubiert, bis die Flüssigkeit verdampft war, und sich eine dünne Salzkruste am Boden der Behälter gebildet hatte. Auf diese Weise wurde die Konzentration der restlichen Pufferkomponenten nicht verändert. Die Konzentration der Proteine betrug meist 10 mg/ml, z.T. wurde den Proben 5% Glycerin beigemischt.

Nach der Analyse des Präzipitationsverhaltens der Proteine in diesem *sparse matrix* Ansatz wurden entsprechend der Ergebnisse systematische zweidimensionale Suchgitter erstellt, bei denen die einzelnen Parameter enger gestreut und optimiert wurden.

2.6.2 Identifikation von Proteinkristallen

Um Kristalle zu identifizieren, wurden sie mithilfe einer Kryoschleife aus ihrem Wachstumstropfen gepickt und in einem kleinen Volumen (5 µl) Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0) bzw. Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde dann einer Analyse über N-terminale Sequenzierung zugeführt. Das Problem war hierbei, daß die Proteinsequenz im Kristall manchmal eine N-terminale Blockierung, d.h. Modifikation, aufwies, welche die Sequenzierung verhindert. Diese Schwierigkeit konnte durch Spaltung der Proteinsequenz mit den Proteasen LysC oder Trypsin umgangen werden. In einigen Fällen reichte die Menge an Kristallen nicht aus, um eine derartige Analyse anzuwenden. Stattdessen wurde hier der Kristall ebenfalls in 5 µl Puffer oder Wasser gelöst und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch die gleichzeitige Auftrennung der Proteinprobe, aus der dieser Kristall gewachsen war, auf demselben Gel und eine anschließende Silberfärbung, konnte die Bande des Kristalls der entsprechenden Bande

der Proteinprobe zugeordnet werden. Um die Bande identifizieren zu können, wurde eine weitere SDS-PAGE mit derselben Proteinprobe in höherer Konzentration gemacht. Nach einem Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (s. Elektro Blotting) wurde die entsprechende Bande aus der Membran ausgeschnitten und ebenfalls über N-terminale Sequenzierung analysiert.

2.6.3 Kristallographische Datenerfassung

Zur Datensammlung (Oszillationsmethode, Arndt & Wonacott, 1977) wurden die Kristalle in einer Kryoschleife bei 100 K schockgefroren und so auf einem Goniometerkopf montiert, daß sie um eine Spindelachse ϕ senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl gedreht werden konnten. Der Winkelbereich, der pro Aufnahme durchlaufen wurde (im allgemeinen 0.3 -0.5 °) wurde so eingestellt, daß bei den gegebenen Kristallvoraussetzungen (Zellmaße, Mosaizität) und der Kristall-Detektor-Distanz keine Überlappung der Reflexe erfolgen und ein optimales Signal/ Rauschen-Verhältnis ($I/\sigma I$) erzielt werden konnte. Welcher Winkelbereich für einen vollständigen Datensatz durchgemessen wurde, hing von der Kristallsymmetrie sowie der Kristallorientierung im Experiment ab und wurde bei der Ferritinstruktur durch die STRATEGY-Option des MOSFLM-Programmpakets (Leslie, 1992) und bei der Struktur der Glycerin-Dehydrogenase mit Hilfe der XDS (X-Ray Detector Software; Kabsch, 2001) während der laufenden Datensammlung bestimmt. Zur Verfügung standen verschiedene Röntgenquellen: Probemessungen wurden an einer RU-200 CuK_α -Drehanode (Rigaku, CuK_α ; $\lambda = 1.518 \text{ \AA}$), MPI vorgenommen, vollständige Datensätze an der ID14/2 und BM14 beamline des ESRF in Grenoble gemessen. Die in dieser Arbeit erhaltenen röntgenkristallographischen Daten wurden auf MAR Research *imaging plates* bzw. CCD-Kameras als Detektoren aufgenommen.

2.6.4 Datenprozessierung

Die Prozessierung der erhaltenen Oszillationsaufnahmen erfolgte mittels der Programmpakete HKL (Otwinowski & Minor, 1997), MOSFLM (Leslie, 1992; Leslie, 1988), XDS (Kabsch, 2001) und CCP4 (CCP4, 1994). Dabei wurden zuerst die Kristallorientierung, die Raumgruppe und die Zellparameter mithilfe von DENZO, MOSFLM oder XDS bestimmt. Danach fand die Integration der Reflexintensitäten aus den einzelnen Aufnahmen statt, wobei gleichzeitig die Filmorientierung sparameter und der Kristall-Detektorabstand verfeinert wurden. Hierbei war es wichtig, daß Form und Größe der Meßbox der Reflexgröße, -form und -separation ent-

sprachen, um das Verhältnis von Hintergrund zu Signal und gleichzeitig die Datenqualität zu optimieren.

Nach der Datenintegration wurde der Datensatz anhand äquivalenter Reflexe mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) skaliert. Ein Maß für die Qualität eines Datensatzes bzw. einzelner Oszillationsaufnahmen ist dabei der R_{merge} -Wert (Gleichung 1).

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - I_i(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei stellt $I_{(hkl)}$ die mittlere Intensität sowie $I_i(hkl)$ die „ i -te“ gemessene und skalierte Intensität des Reflexes hkl bzw. seiner Symmetrieverwandten dar. Zur Bestimmung der Strukturfaktoramplituden aus den Intensitäten der aufgenommenen Reflexe nach Gleichung 3 wurde das Programm TRUNCATE (French & Wilson, 1978) angewandt. Dabei wurde die Intensitätsverteilung der Reflexe mittels Bayesian-Statistik auf eine Wilsonverteilung (Wilson, 1949) abgebildet. Neben der Nichtnegativität aller beobachteten Reflexe erhält man dadurch besonders für schwache Reflexe mit $I < 3 \sigma(I)$ bessere Schätzwerte für die beobachteten Strukturfaktoramplituden F_{obs} .

2.6.5 Das Phasenproblem

Um die Elektronendichte ρ am Ort xyz eines Proteinkristalls zu erhalten, wird eine Fouriertransformation nach Gleichung 2 gerechnet, wobei $|F(hkl)|$ die Strukturfaktoramplitude und $\alpha(hkl)$ den Phasenwinkel des Reflexes (hkl) darstellt.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(hkl)} \quad \text{Gleichung 2}$$

Aus den Reflexintensitäten lassen sich mithilfe von Gleichung 3 nur die Strukturfaktoramplituden $|F(hkl)|$ anhand von Diffraktionsbildern der aufgenommenen Reflexe $I(hkl)$ ermitteln. Der Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ ist dagegen aus den röntgenkristallographischen Messungen nicht ohne weiteres abzuleiten (Phasenproblem).

$$|F(hkl)| \propto \sqrt{I(hkl)}, \text{ mit } I(hkl) \text{ als Reflexintensitäten}$$

Gleichung 3

Damit stellt die Ermittlung der Strukturfaktorphasen das zentrale Problem in der Röntgenstrukturanalyse dar (Hauptman, 1989), generell gibt es vier Techniken für die Lösung des Phasenproblems (Drenth, 1994):

1. **Methode des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR):** dabei werden Schwermetallatome hoher Ordnungszahlen an spezifischen Positionen des Kristallgitters eingelagert. Setzt man voraus, daß die Isomorphie erhalten bleibt, führt diese Einlagerung zu Variationen in den Strukturfaktoramplituden, die für die Phasenkalkulation genutzt werden können.
2. **Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD):** diese Methode nutzt die anomale Streuung von schweren Atomen, die entsteht, wenn die Wellenlänge λ des einfallenden Röntgenstrahls so gewählt wurde, daß inelastische Wechselwirkungen mit den kernnahen Elektronen auftreten.
3. **Methode des molekularen Ersatzes (MR):** hier werden die Phaseninformationen bereits bekannter Strukturen als Ausgangsphasen genutzt, um die Phasen der zu lösenden Struktur zu berechnen.
4. **Direkte Methoden:** diese Art der Phasenbestimmung ist momentan noch nicht sehr weit entwickelt und konnte bisher nur für die Lösung von wenigen, hochaufgelösten Strukturen verwendet werden (Sheldrick, 1993).

In dieser Arbeit wurde nur die Methode des Molekularen Ersatzes genutzt, auf welche im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden soll.

2.6.6 Methode des Molekularen Ersatzes (MR)

Um diese Methode zu nutzen, benötigt man eine Proteinstruktur, die der zu lösenden Struktur bezüglich der 3D-Struktur möglichst homolog ist (Huber, 1965). Dabei wird nach der Patterson-Suchmethode (Hoppe, 1957; Rossmann & Blow, 1962) verfahren, die das sechsdimensionale Suchproblem (drei Parameter für Orientierung, drei für Position) in zwei dreidimensionale Suchereignisse verwandelt. Die Grundlage dieser Methode ist die Pattersonfunktion. Sie wird dazu verwendet, das Suchmodell in der Elementarzelle durch eine

Rotations- und eine sich anschließende Translationssuche mit maximaler Korrelation auf die Molekülpositionen im Kristallgitter abzubilden. Die Pattersonfunktion stellt eine Vektorkarte dar, in der die Abstände aller Atome vom Ursprung aus aufgetragen werden. Dabei werden die *intramolekularen* Atomabstandsvektoren als „Selbstvektoren“ und die *intermolekularen* als „Kreuzvektoren“ bezeichnet.

2.6.6.1 Die Rotationsfunktion

Die Rotationssuche wird im reellen Pattersonraum durchgeführt. Das bedeutet, daß lediglich die Information der gemessenen Intensitäten, nicht aber die Phaseninformation für die Suche benötigt wird. Als Autokorrelationsfunktion enthält die Pattersonsuchfunktion (Gleichung 4) nur Angaben über die relativen Atomabstände innerhalb der Elementarzelle. Ziel der Rotationssuche ist es, die Vektorkarten des Suchmodells mit maximaler Korrelation auf die des zu lösenden Moleküls abzubilden.

$$P_{obs}(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad \text{Gleichung 4}$$

2.6.6.2 Die Translationsfunktion

Im Anschluß an die Rotationssuche, wo die Selbstvektoren aufeinander abgebildet wurden, erfolgt die Translation des Suchmodells durch die asymmetrische Einheit des Kristalls. Prinzipiell wird hier das Suchmodell an jede mögliche Position der Einheitszelle gesetzt; nach der Positionierung werden dann die Strukturfaktoramplituden F_{calc} berechnet und anschließend mit den beobachteten Strukturfaktoramplituden F_{obs} verglichen. Als Maß für die Qualität der gefundenen Translationslösung gelten der R-Faktor (Gleichung 5) und der Korrelationskoeffizient (Gleichung 6). Letzterer wird als Funktion der Molekülposition dargestellt.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - kF_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad \text{Gleichung 5}$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{(obs)}|^2 - |\overline{F_{(obs)}}|^2) \cdot (|F_{(calc)}|^2 - |\overline{F_{(calc)}}|^2)}{\sqrt{\sum_{hkl} (|F_{(obs)}|^2 - |\overline{F_{(obs)}}|^2) \cdot (|F_{(calc)}|^2 - |\overline{F_{(calc)}}|^2)^2}}$$

Gleichung 6

Sowohl die Struktur des Ferritins als auch die der Glycerin-Dehydrogenase wurde nach der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst. Für die Rotations- und Translationsuche wurde im ersten Fall Programme des CNS-Pakets sowie das Programm AMORE (CCP4, 1994), für die zweite Struktur nur Programme des CNS-Pakets (Brünger, 1998) verwendet. Die jeweils eingesetzten Suchmodelle sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Die Suche wurde in einem niedrigen Auflösungsbereich durchgeführt (von 4/5 – 10/15 Å).

In einigen Fällen mußte bestimmt werden, wie stark die Kristalle vertwinnt waren, dafür wurden die Programme DETWIN (CCP4, 1994) und CNS (Brünger, 1998) eingesetzt.

2.6.7 Modellbau und Verfeinerung

Die experimentellen Phasen, die während der Strukturlösung erhalten werden, sind zumeist ungenau oder sogar falsch bestimmt. Daher muß im Anschluß daran eine Strukturverfeinerung stattfinden, deren Ziel ein stereochemisch korrektes Strukturmodell darstellt, das tatsächlich vollständig aus den gemessenen Daten abgeleitet werden kann. In dieser Arbeit erfolgte die Verfeinerung der beider Strukturmodelle sowohl des Ferritins als auch der Glycerin-Dehydrogenase mithilfe der Programm-Suite CNS (Brünger, 1998). Das Ziel war dabei, die beobachteten Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) an die berechneten (F_{calc}) anzugleichen. Als Maß für die Verbesserung der Daten galt dabei der konventionelle R-Faktor (Gleichung 5): er beschreibt den Korrelationsgrad zwischen F_{obs} und F_{calc} und wurde im Lauf der Verfeinerung unter Berücksichtigung der geometrischen Parameter, wie Bindungslängen, -winkel usw. (Engh & Huber, 1991) minimiert (bei gut verfeinerten Strukturen auf < 20%).

Um gleichzeitig zu verhindern, daß man eine Überverfeinerung erhält, die von einem zu hohen *Bias* (Verzerrung) durch das Modell verursacht wird, wurde per Zufallsgenerator ein Testset erstellt. Dieses bestand aus etwa 5-10% der gemessenen Strukturfaktoramplituden und wurde nicht für die Modellverfeinerung herangezogen. Stattdessen wurde es unter analoger Anwendung von Gleichung 5 zur Berechnung des freien R-Faktors (R_{frei}) genutzt. Dieser stellte damit ein objektives Maß für die Qualität des Strukturmodells dar. Während der konvergenten Strukturverfeinerung mußte darauf geachtet werden, daß der Arbeits-R-Faktor

und der freie R-Faktor nicht mehr als 5% auseinander drifteten, da dies ein Zeichen für eine erhebliche Verzerrung durch das Modell bzw. für eine Überverfeinerung war.

Zu Beginn der Verfeinerung der Modelle beider in dieser Arbeit gelösten Strukturen erfolgte eine *rigid-body*-Verfeinerung. Bei dieser wurden die Strukturmodelle zunächst als starre Einheiten betrachtet und mit Temperaturfaktoren von 15 Å und Daten im Bereich zwischen 10 und 3 Å korrekt positioniert. Während des automatischen Verfeinerungsprozesses wurden die Atompositionen in 200 Zyklen und die Temperaturfaktoren in 50 Zyklen iterativ verfeinert. Dabei wurde der Gewichtungsparemeter zwischen dem Röntgen- und dem chemischen Energieterm für die Positionsminimierung der Qualität des Modells angepaßt. War die automatische Verfeinerung bis zur Konvergenz durchgeführt, folgte eine manuelle Korrektur anhand visuell dargestellter Elektronendichtekarten des jeweiligen Modells. Da die Werte der R-Faktoren in allen Fällen zumindest anfangs oberhalb von 30% lagen, wurden *simulated annealing*-Protokolle in den Verfeinerungsprozeß eingeschoben (Kirkpatrick, 1983). Dies war auch besonders wichtig, wenn manuell viele Korrekturen eingeführt worden waren. Da die Qualität der Elektronendichte bei beiden Strukturen sehr gut war, gab es nur bei dem Ferritin einen Bereich (s. dort), der erst nach einigen Zyklen von abwechselndem manuellem Verfeinern und *simulated annealing*-Prozessen sinnvoll gebaut werden konnte. Nachdem alle Seitenketten korrekt modelliert waren, wurden Wassermoleküle in das Modell eingefügt. Dies erfolgte mit einem Programm der CNS-Suite, wobei das Protokoll zur Suche der Wassermoleküle so gewählt wurde, daß nie mehr als 50-80 Wassermoleküle pro Zyklus eingesetzt wurden. Es folgten weitere automatische Verfeinerungszyklen, nach denen die Wassermoleküle anhand ihrer B-Faktoren, Positionen und der mit ihnen assoziierten $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte überprüft und auch eventuell entfernt bzw. durch Mg^{2+} oder Na^+ -Ionen ersetzt wurden. Sobald die freien R-Faktoren durch die automatischen Verfeinerungsprozesse nicht weiter minimiert werden konnten, und in der $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte keine Differenzdichtemaxima > 3 mehr vorhanden waren, galt die Verfeinerung der Modellstrukturen als abgeschlossen.

2.6.7.1 Graphische Darstellungen

Alle Modellstrukturen wurden auf einer Graphikstation der Firma *Silicon Graphics* mit dem objektorientierten Computergraphikprogramm O dargestellt (Jones, 1991). Um die Strukturen graphisch darzustellen, wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) sowie BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) und RASTER3D (Merrit, 1994) verwendet. Der Darstellung von homologen Proteinen lagen die jeweiligen pdb-Dateien aus der NCBI-Datenbank zugrunde.

Sämtliche Proteinoberflächen, -volumina, intermolekulare Oberflächen und Oberflächenpotentiale wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls, 1992) berechnet und dargestellt. Der Probenradius entsprach dabei 1.4 Å. Um die Poisson-Boltzmann-Gleichung der Elektrostatik zu lösen, betrug die simulierte Ionenstärke 0.1 M NaCl. Zur Übereinanderlagerung von Strukturmodellen wurde das Programm GA-FIT (May & Johnson, 1994) verwendet.

2.6.7.2 Analyse von Atommodellen

Die statistische Analyse von Bindungslängen und –winkeln sowie der Temperaturfaktoren der atomaren Modelle erfolgte mit dem Programm CNS, Version 1.1 (Brünger, 1998). Alle weiteren Qualitätsanalysen von Molekülgeometrien wurden mit dem Programm PROCHECK, Version 2.0 (Laskowski, 1993) durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion: Shotgun-Kristallisation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob sich die Methode der Shotgun-Kristallisation prinzipiell eignet, Proteinstrukturen eines Organismus zu erhalten, in diesem Fall des halophilen Archaeons *Halobacterium salinarum*. Dafür wurden verschiedene Methoden zur Proteinauftrennung und -kristallisation untersucht, welche für diese „Schrotschuß-Methode“ geeignet schienen. Das Fernziel war es, mit Hilfe der Strukturen weitere Informationen über Grundlagen der Halophilie dieser Proteine zu erlangen.

Generell wurde mit dem Zytosol von *H. salinarum* gearbeitet, d.h. nur mit löslichen und nicht mit Membranproteinen. Bei allen Experimenten mußte die typische Eigenschaft dieser Proteine beachtet werden: ihre Halophilie bzw. Halotoleranz. Vor diesem Hintergrund war zum einen die Auswahl der Methoden, die im allgemeinen zur Aufreinigung von Proteinen zur Verfügung stehen, erheblich eingeschränkt: übliche Aufreinigungsstrategien wie die Ionenaustauscherchromatographie waren nur unter Bedingungen möglich, die eine vorübergehende Salzarmut oder sogar Salzfreiheit in der Lösung kompensieren konnten. Zum anderen zeigen halophile Proteine auch in nahezu gesättigten Salzlösungen eine extrem hohe Löslichkeit, was ihre Kristallisation stark erschwert (Eisenberg, 1992). Da es sich bei der Kristallisation je nach Protein um einen langwierigen Prozeß handeln kann – zwischen wenigen Minuten bis hin zu mehreren Jahren –, war es wichtig, gleich zu Beginn der Experimente möglichst rasch eine große Zahl verschiedener Kristallisationsansätze zu produzieren. Die eingesetzten Methoden wurden darum im Hinblick auf ihre zeitliche Dauer und Verwendbarkeit für halophile Proteine ausgewählt.

Man kann die gewählte Kristallisationsstrategie in zwei Abschnitte untergliedern. Der *erste Abschnitt* beinhaltet den eigentlichen Schrotschuß-Ansatz, d.h. nach Fraktionierung von halobakteriellem Zytosol werden die daraus resultierenden Proben mit Hilfe eines breit gefächerten Angebots an verschiedenen Fällungsmitteln (*Hampton-Screen*) auf ihre Kristallisationsfähigkeit hin untersucht. Diejenigen Proben, in denen sich Kristallwachstum zeigt, werden weiteren Experimenten unterzogen: diesmal werden jedoch Puffer verwendet, die von der bereits erfolgreichen Kristallisationsbedingung leicht abweichen (anderer pH-Wert/andere Konzentration des Präzipitants). Auf diese Weise soll die Reproduzierbarkeit untersucht und v.a. – falls nötig – eine Verbesserung in Qualität (Größe, Morphologie) und Quantität der Kristalle erzielt werden. Immer wird mit Proben gearbeitet, die eine heterogene

Zusammensetzung an Proteinen enthalten. Soweit möglich schließt der erste Abschnitt die Identifikation aller gewonnenen Kristalle mit ein.

Der letzte Punkt, die Identifikation, stellt die Voraussetzung dar für den *zweiten Abschnitt*: alle – in bezug auf Größe und Form – geeigneten Kristalle werden der Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenbeugung unterworfen. Dies dient zuerst einmal als eine Art Qualitätskontrolle: reicht die Streufähigkeit der Kristalle für eine Strukturaufklärung aus? Ist das der Fall, werden Daten gesammelt und soweit möglich, die entsprechenden Strukturen gelöst. In diesem Abschnitt besteht außerdem die Möglichkeit, sich speziell auf die Proteine zu konzentrieren, deren Strukturen tatsächlich gelöst werden konnten: sie können gezielt aufgereinigt und kristallisiert werden, wobei Informationen, die aus dem eigentlichen Shotgun-Ansatz gewonnen wurden, verwendet und verfeinert werden können.

Im folgenden werden die Ergebnisse des ersten Teils vorgestellt und diskutiert. Dabei wird zuerst auf die Gewinnung und Fraktionierung von halobakteriellem Zytosol eingegangen, anschließend auf die Kristallisation und Identifikation von Proteinen aus den daraus erhaltenen Fraktionen. Im Zusammenhang damit werden Überlegungen angestellt, ob sich aus diesen Resultaten ein generelles Prinzip bezüglich der Kristallisation aus heterogenen Proben ableiten läßt. Am Schluß wird ein Überblick über alle – im Rahmen dieser Methode – entstandenen Kristalle gegeben (3.1). Die Strukturen der beiden halophilen Proteine, deren Kristalle mit Hilfe der Schrotschuß-Kristallisation erhalten wurden, werden als eigene Kapitel (3.2 und 3.3) behandelt werden. Daran wird sich der Versuch anschließen, mittels dieser beiden Strukturen Kenntnisse über die Halophilie von Proteinen zu bekräftigen und u.U. zu ergänzen (3.4).

3.1 Shotgun-Kristallisation: Methode

Ausgehend von Anzucht und Aufschluß von Zellen bis hin zum Aufsetzen eines Proteinkristalls in den Röntgenstrahl gibt es vielfältige Vorgehensweisen. Daher müssen zu Anfang bestimmte Bedingungen festgelegt werden, um eine gewisse Systematik zu erreichen. Ein grobes Schema (s. Abb. 9) gibt einen Überblick über den Weg von der Zelle zum Kristall, wobei auf einigen Stufen unterschiedliche Methoden getestet wurden. Da es neben dem Nachweis, daß die Methode an sich anwendbar ist, d.h. tatsächlich Kristalle liefert, das Hauptziel war, zusätzliche strukturelle Informationen über halophile Proteine zu erhalten, wurde in dieser Arbeit keine durchgehende systematische Untersuchung verschiedener Bedingungen bzw. ihrer Kombination gemacht. Das bedeutet, daß teilweise nicht klar zu entscheiden ist, worauf eine höhere Kristallausbeute zurückzuführen ist, und mancher experimenteller „Ausflug“ als methodischer Vorschlag stehen bleiben muß, dessen Wirkung im einzelnen hier nicht restlos beurteilt werden kann. Außerdem wurden daher auch vielversprechende Ansätze nicht bis zu einer vollständigen Reproduzierbarkeit wiederholt.

Da es kaum möglich ist, Gewinnung/Fraktionierung von Zytosol und Kristallisation vom Ergebnis her zu trennen, wird im ersten Abschnitt immer wieder bereits auf das Endergebnis, das Kristallwachstum, verwiesen werden. Im Anhang findet sich ein Überblick über sämtliche Kristallisationsansätze, in dem alle wichtigen Informationen zusammengefaßt sind (Kap. 6.3).

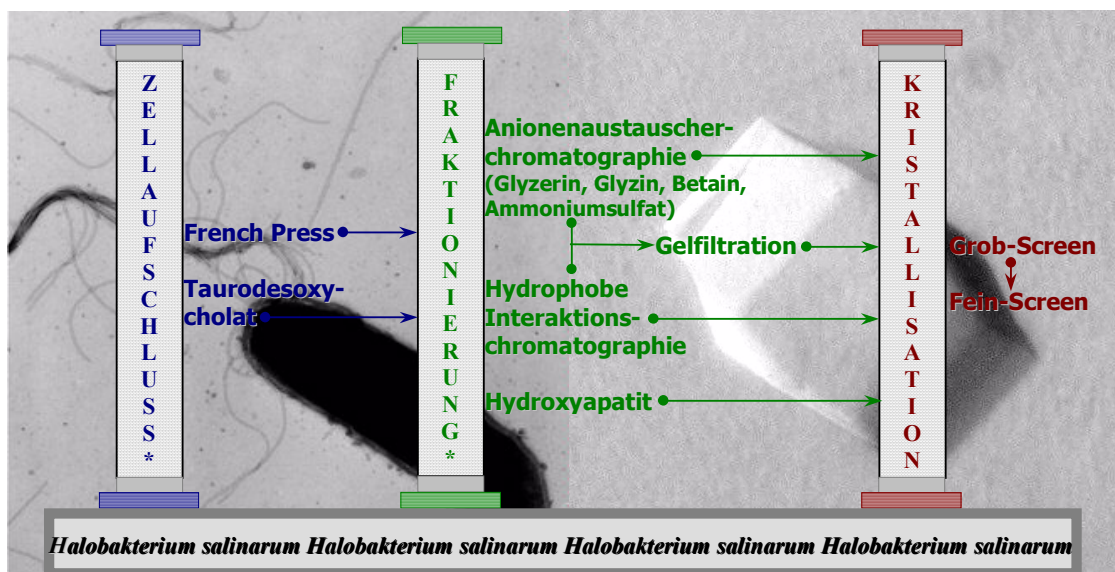


Abb. 9. Flußschema der Schrotschuß-Methode von der Zelle zum Kristall. Die drei Säulen repräsentieren die drei Stufen, Zellaufschluß, Fraktionierung und Kristallisation, die jeweiligen Techniken sind in derselben Farbe angefügt. Die Abbildung der Zelle von *H. salinarum* wurde freundlicherweise von W. Staudinger bereitgestellt.

3.1.1 Gewinnung und Fraktionierung von halobakteriellem Zytosol

Wie in Abb. 9 deutlich zu sehen ist, finden sich auf der Stufe des Zellaufschlusses und der Zytosol-Fraktionierung die meisten Variationen innerhalb des Schrotschuß-Ansatzes. Der Zellaufschluß wurde in etwa 80% der Experimente mit Hilfe der *French Press* durchgeführt, die restlichen 20% über Taurodesoxycholat. Der Grund dafür war, daß die Methode des *French Press*-Aufschlusses aufgrund ihrer hohen Reproduzierbarkeit bereits in der Abteilung etabliert war (persönliche Mitteilung, Christian Klein). Weil die Separation von Membranbestandteilen und löslichen Proteinen durch Ultrazentrifugation unter physiologischen Bedingungen, d.h. unter 4.3 M NaCl, nicht funktioniert, wurden die Zellen vor dem Aufschluß in 1 M NaCl aufgenommen. Gegenüber dem Aufschluß unter Nutzung des osmotischen Effekts, wo die Lyse der Zellen über Suspension in salzfreiem Puffer erzielt wird (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974), stellt diese Methode (1 M NaCl) bereits eine Verbesserung dar. Normalerweise befinden sich jedoch die Proteine im Zytosol von *H. salinarum* in etwa 4 M KCl und 1 M NaCl (Christian & Waltho, 1962), weshalb auch 1 M NaCl als Umgebung nicht optimal ist. Daher wurde versucht, die Zellen über Taurodesoxycholat (s. Abb. 10) aufzuschließen.

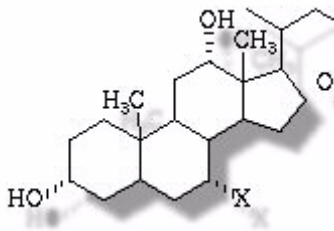


Abb. 10. Taurodesoxycholat. Diese Substanz zählt zu den Gallensäuren, Stoffen, deren Effekt u.a. auf die Lyse von Zellen getestet worden ist (Kamekura, 1988).

Hierbei handelt sich um eine Gallensäure, deren Effekt auf halobakterielle Zellen durch Zufall entdeckt wurde, als Zellen von *H. salinarum* in Bacto-Pepton von Difco lysierten (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974). Jahre später wurde diese Gallensäure als einer der für die Lyse verantwortlichen Faktoren identifiziert, ihre Wirkung scheint sich allerdings auf extrem halophile, nicht Kokken-förmige Bakterien zu beschränken (Kamekura, 1988). Diese Entdeckung wurde später zur Präparation von Zellhüllen mit Flagellen aus *H. salinarum* verwendet, wo durch eine Endkonzentration von 0.01% Taurodesoxycholat die Zellen (aus 1.2 l Kultur) lysiert wurden (Kupper, 1994). In dieser Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen an Gallensäure getestet. Bei einer Menge von 0.06% bei Zellmaterial aus 10 l Kultur verringerte sich die optische Dichte innerhalb von 5 min auf ein Viertel des Ausgangswertes, nach 20 min war die Lyse nahezu vollständig abgeschlossen (s. Abb. 11). Vorteilhaft an dieser Methode ist, daß sie unter 4.3 M NaCl funktioniert: da die Zellhüllen nicht zerkleinert, sondern nur durch-

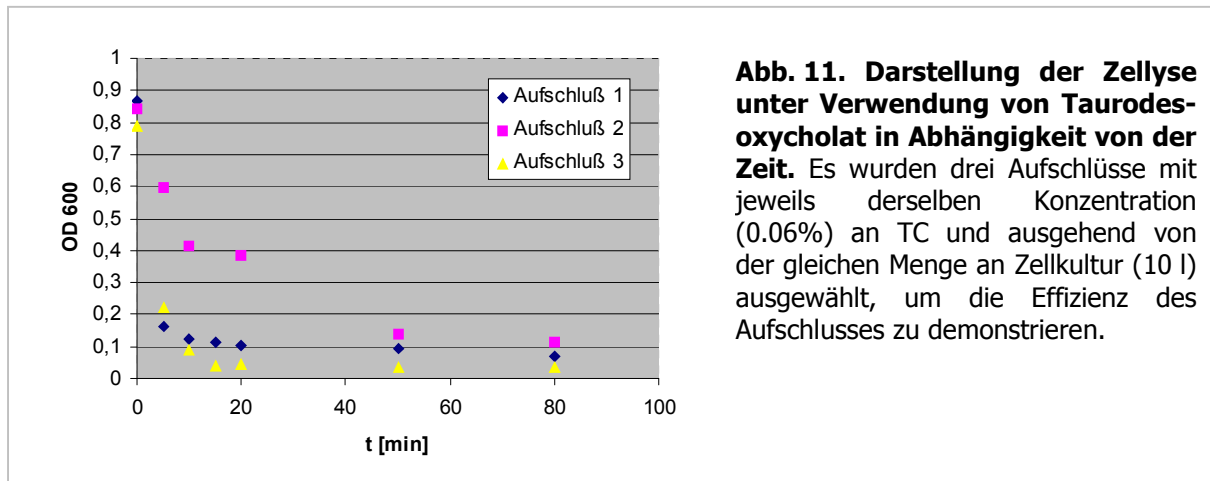


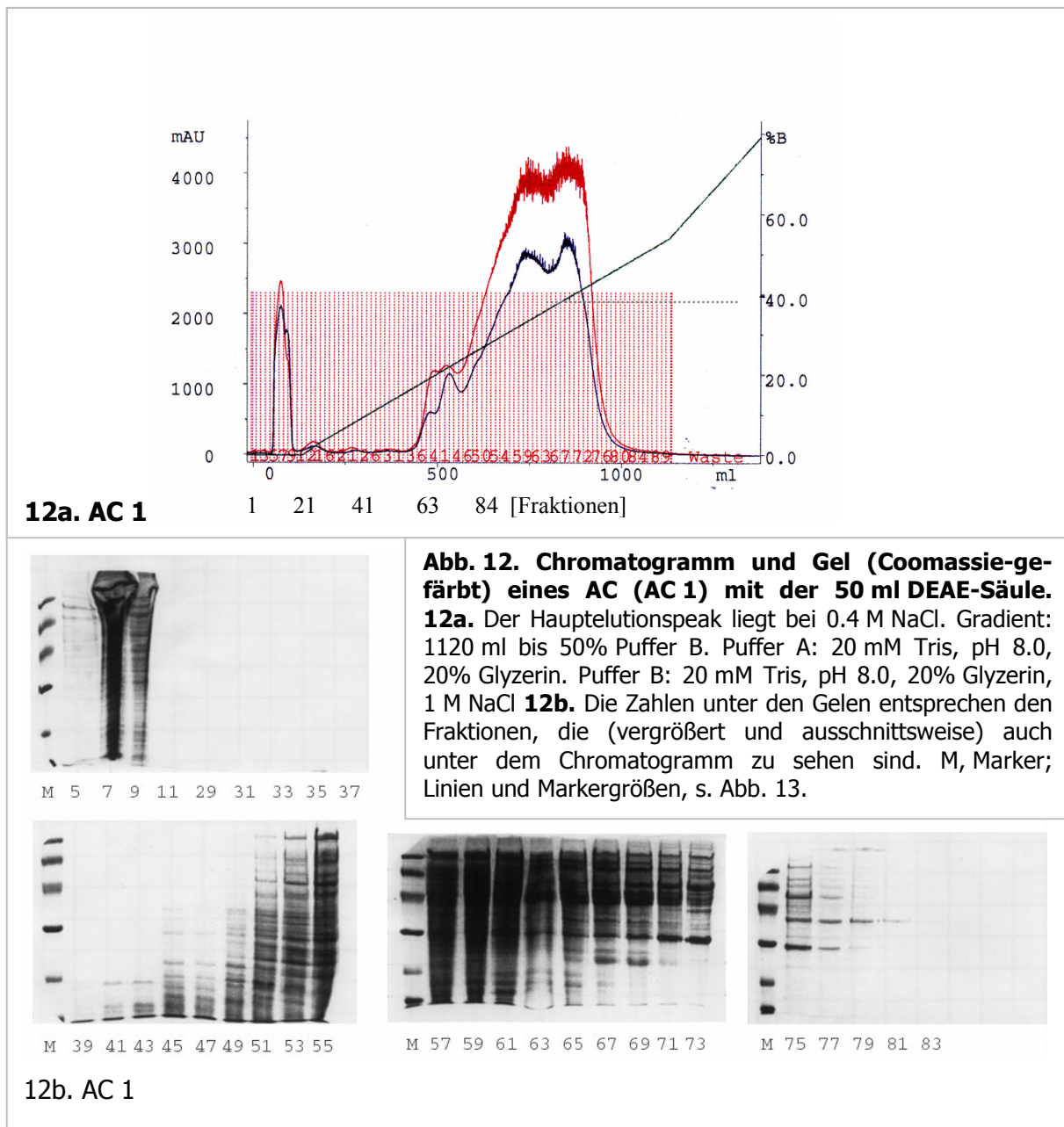
Abb. 11. Darstellung der Zellyse unter Verwendung von Taurodesoxycholat in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden drei Aufschlüsse mit jeweils derselben Konzentration (0.06%) an TC und ausgehend von der gleichen Menge an Zellkultur (10 l) ausgewählt, um die Effizienz des Aufschlusses zu demonstrieren.

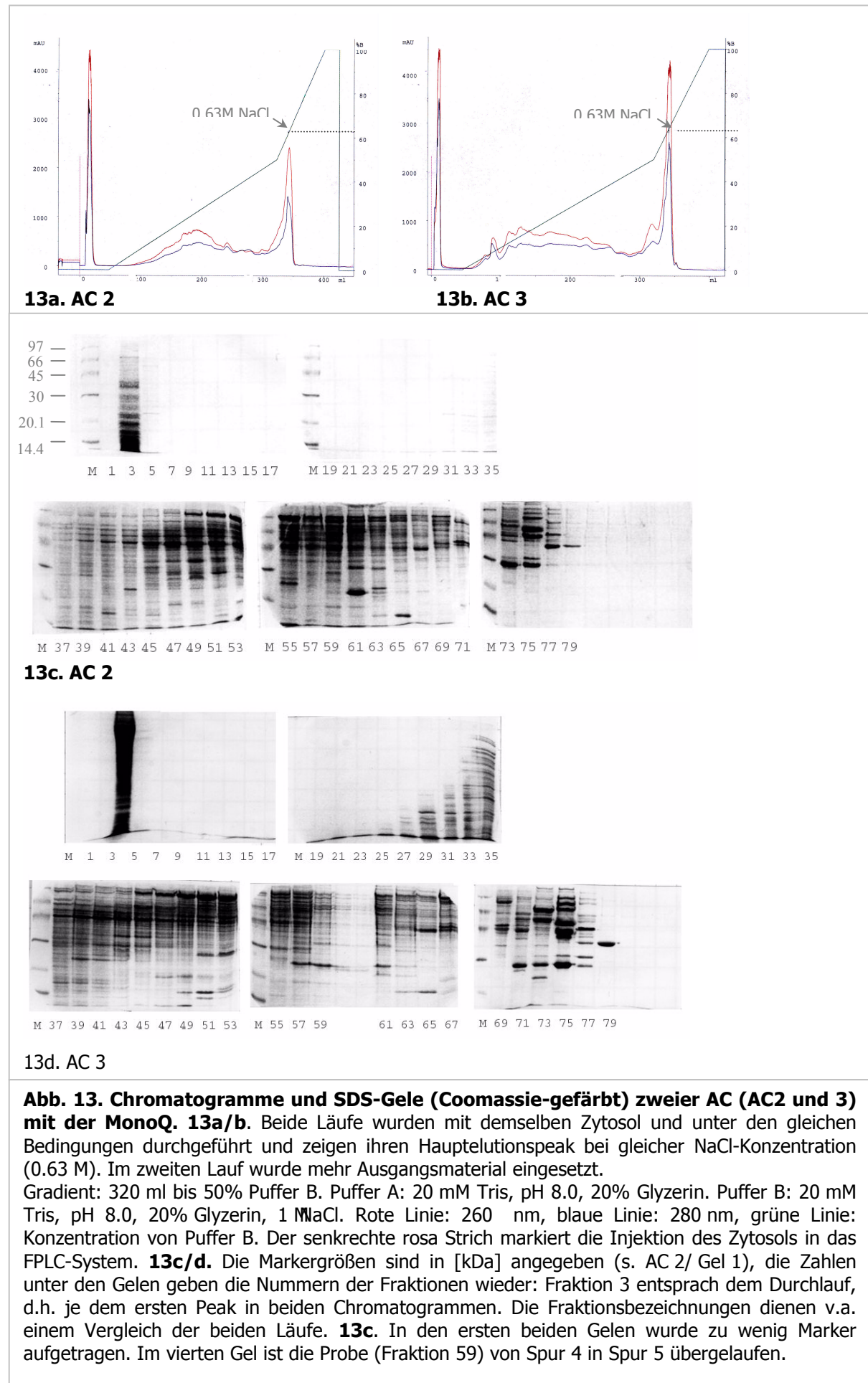
löchert werden, können die fast intakten Membranen samt Zellwandproteinen auch bei 4.3 M NaCl abzentrifugiert werden. Im Gegensatz dazu enthält über *French Press* gewonnenes Zytoplast auch z.B. das Zellwand-Glykoprotein, das in 1 M NaCl solubilisiert wird (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974).

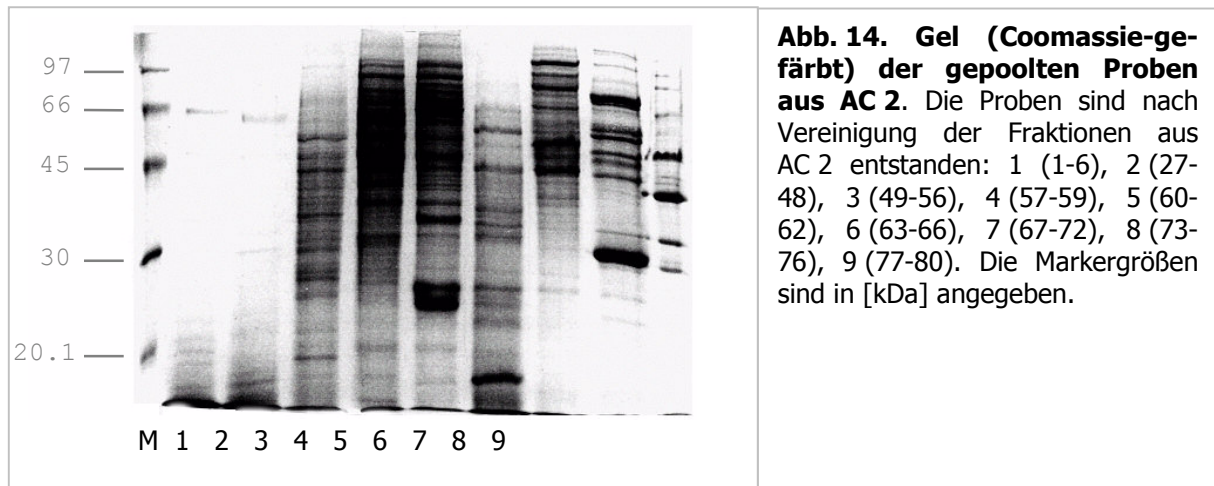
Das Ziel der Fraktionierung war es, durch eine geringe Zahl an Schritten Proteinproben zu erlangen, die möglichst wenig verschiedene Proteine enthalten. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Chromatographie-Techniken ausgetestet.

Die meisten Fraktionierungen erfolgten über **Anionenaustauscherchromatographie (AC)** bei pH 8.0. Viele Proteine zeigen ein Löslichkeitsminimum in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes. Da dieser jedoch bei den meisten Proteinen von *H. salinarum* zwischen Werten von 4 und 5 liegt (persönliche Mitteilung: Christian Klein), sollte bei einem pH-Wert von 8 eine isoelektrische Präzipitation auf der Säule größtenteils vermieden werden. Möglicherweise besteht zudem in Puffern mit pH 8.0 eine höhere Stabilität halophiler Proteine als etwa bei pH 7.0, da gezeigt werden konnte, daß die hMDH unter niedrigeren NaCl-Konzentrationen bei pH 8.0 stabiler ist als bei pH 7.0 (Madern & Zaccari, 1997). Die Technik der AC beruht auf einer reversiblen Adsorption von geladenen Molekülen an einer entgegengesetzt geladenen Matrix. Für halophile Proteine, die eine auffallende Zahl an negativen Ladungen aufweisen, empfiehlt sich die Methode des Anionenaustauschers eher als die des Kationenaustauschers. Verwendet wurde sowohl ein schwacher (DEAE Sepharose CL-6b) als auch ein starker Anionenaustauscher (MonoQ). Der Unterschied liegt darin, wie stark sich die Ionisierung des Materials mit dem pH-Wert ändert: ein starker Austauscher ist über einen breiten pH-Bereich komplett ionisiert. Da auch für die DEAE-Sepharose der pH-Bereich, in dem man arbeiten kann, zwischen 2 und 9 liegt, ist dieses Material ebenfalls für den Ansatz geeignet. Die 50 ml-Säule eignete sich vom Volumen her besser zur Auftrennung von Halozytoplast aus 10 l

Kultur (ca. 400 mg Protein). Ein Vergleich der AC mit der MonoQ (8 ml) und der DEAE-Säule (50 ml) anhand der Chromatogramme und Gelbilder (Abb. 12/13) zeigt zum einen, daß der Hauptelutionspeak bei der MonoQ unter höheren Salzkonzentrationen (0.6 M) als bei der DEAE-Säule (0.5 M, s.u.) erschien. Zum anderen war die Auftrennung der Proteine über die MonoQ im allgemeinen etwas schärfer. Eine Möglichkeit, diesem Widerstreit von Quantität und Qualität zu entgehen, war die Kombination von mehreren ACen mit der MonoQ, die jeweils entsprechenden Fraktionen wurden im Anschluß vereinigt. Die Reproduzierbarkeit zweier solcher Läufe ist in Abb. 13 zu erkennen: im zweiten Lauf wurde mehr Protein aufgetragen, was sich in der Höhe des Hauptelutionspeaks abzeichnet, doch seine Position (0.63 M NaCl) ist in beiden Läufen identisch. Die Gelbilder lassen sich tendenziell gut vergleichen:







im Durchlauf befindet sich eine breite Proteinmasse und mit ansteigender Salzkonzentration erkennt man ebenfalls über den gesamten Größenbereich verteilte Proteinbanden. Hier erfolgte also – mit Ausnahme von zwei Banden (bei > 100 kDa und etwa 60 kDa) – noch keine effiziente Fraktionierung. Erst am Ende der Läufe zeichnen sich deutlich einzelne Proteinbanden ab, die sich in beiden Läufen wiederholen, z.B. die Bande unterhalb der 30 kDa-Markerbande (Ferritin/ Superoxiddismutase, s.u.), aber auch die „Einzelbande“ in den jeweils letzten Gelspuren. Eine weitere Verbesserung der Auftrennung brachte der Einsatz eines Stufengradienten (0, 20, 50% Elutionspuffer) statt eines linearen Gradienten: hier gingen dem sonst einzelnen Hauptpeak noch ein bis mehrere kleinere Peaks voran, und auch die jeweiligen Proteingele zeigten eine bessere Proteinfractionierung. Die Vereinigung der Fraktionen von Lauf 1 ist in Abb. 14 dargestellt: es ist eindeutig, daß in jeder Probe, die anschließend der Kristallisation zugeführt wurde, eine große Anzahl Proteine enthalten war.

Die Methode der AC bietet die Möglichkeit, Proteine rasch und effizient aufzutrennen. Sie eignet sich besonders als erster Schritt einer Fraktionierung, da die Kapazität des Säulenmaterials hoch genug ist, um große Mengen an Material aufzutragen. Doch auch diese Menge ist beschränkt: der Versuch, die nicht-gebundene Proteinfraction eines Chromatographie-Laufs (DEAE-Säule, 50 ml) nochmals auf die Säule aufzutragen, zeigte, daß wiederum Proteine binden, daß also die Säule vorher überladen war. Um diesem Problem zu entgehen, wurde z.T. eine 200 ml-Säule verwendet, die jedoch ihrem Volumen entsprechend eine verlängerte Elutionszeit erforderte, in der sich die Proteine unter Niedrigsalzbedingungen befanden. Der Entschluß, generell mit der 50 ml DEAE-Säule zu arbeiten, stellte also eine Art Kompromiß dar: die MonoQ (8 ml) zeigte zwar eine bessere Auftrennung, dafür jedoch eine geringere Kapazität als die DEAE-Säule, während die 200 ml-Säule mehr Proteine binden konnte, gleichzeitig aber erheblich mehr Zeit für die Elution – unter geringsten Salzkonzentrationen – erforderte.

Dies ist das Hauptproblem an der AC mit halophilen Proteinen: es ist erforderlich, das Zytosol zuvor mehr oder weniger zu entsalzen. Generell wurde eine Konzentration von 100 oder 150 mM NaCl durch Dialyse eingestellt, was für halophile Proteine, die Salzkonzentrationen von 4 M KCl/ 1 M NaCl gewöhnt sind, normalerweise nicht genug ist. Um diesen Salzangel auszugleichen, wurden verschiedene Möglichkeiten ausgetestet.

Eine davon bestand darin, verschiedene organische, in der Natur vorkommende „Osmolyte“ (Betain, Glycerin, Glyzin, s. Abb. 15) einzusetzen. Dabei handelt es sich um niedermolekulare osmoprotektive Substanzen, die gut löslich und polar sind und bekanntermaßen zur Stabilität von Proteinen beitragen. Da sie den Zellmetabolismus trotz zytoplasmatischer Konzentrationen von bis zu 1 M nicht stören, werden sie auch „kompatible Solute“ genannt. Über ihre Wirkungsweise existieren einige Theorien: eine wichtige Rolle spielt wohl der bevorzugte Ausschluß dieser Substanzen von der Proteinoberfläche, und damit eine vermehrte Hydratisierung des Proteins. Dabei steigt die Oberflächenspannung des Wassers, was gleichzeitig einer Vergrößerung der Proteinoberfläche und damit einer Denaturierung entgegenwirkt (Galinski, 1993; Vuillard, 1995; Yancey, 1982). Zusätzlich gibt es auch Beweise für die direkte Interaktion kompatibler Solute mit exponierten Aminosäureresten (Yancey, 1982). Extrem halophile Archaea benötigen diesen Mechanismus der Anpassung eigentlich nicht, da sie ihre gesamte Zellmaschinerie über genetische Veränderung an hohe Salzkonzentrationen adaptiert haben, ein Prozeß, der erheblich komplizierter war und v.a. nicht so flexibel ist wie die Verwendung osmoprotektiver Substanzen. *H. salinarum* besitzt also – wenn man es so nennen will – Kalium als kompatiblen Solut (Yancey, 1982). Daneben konnte aber jüngst demonstriert werden, daß dieses Archaeon auch Betain anhäuft, wenn es im extracellulären Medium vorhanden ist (Kokoeva, 2002). Die Auswahl der hier eingesetzten Solute wurde größtenteils nach allgemeinen Erfahrungen mit mesophilen Proteinen getroffen bzw. aufgrund einiger Experimente, die mit halophilen Proteinen durchgeführt worden sind (s.u.; Vuillard, 1995; Cadenas & Engel, 1994; Guinet, 1988).

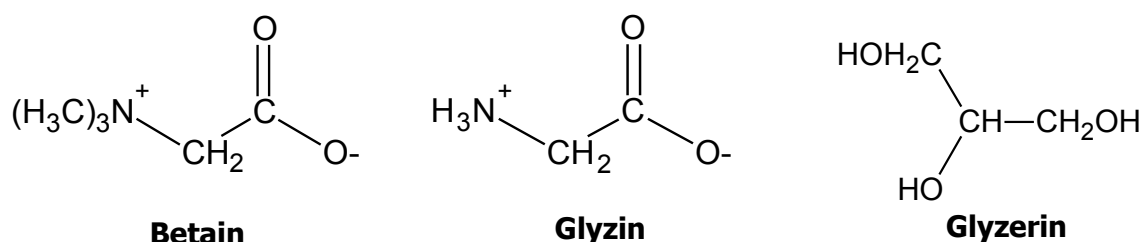


Abb. 15. Osmolyte: Betain, Glyzin und Glycerin. Hierbei handelt es sich um osmoprotektive, niedermolekulare Substanzen, die alle drei zum Schutz von Proteinen eingesetzt werden können.

Glyzerin wird z.B. von der halotoleranten Alge *Dunaliella* sp. unter gesättigten Salzlösungen in so hohen Konzentrationen (> 50% des Trockengewichts) angehäuft, daß sich sogar die biotechnologische Glyzeringewinnung über Anzucht dieser Alge lohnen würde (Ben-Amotz & Avron, 1990). Die Anwendung von Glyzerin zur Stabilisation des nativen Zustands ist weit verbreitet, so werden Proteinkristalle für die Messung unter Stickstoff als Gefrierschutz oft in Glyzerin-haltige Lösungen getaucht, und Bakterienzellen zur Aufbewahrung in Glyzerin eingefroren. Auch der halophile Elongationsfaktor Tu wurde statt unter hohen Salzkonzentrationen in Anwesenheit von 50% Glyzerin aufgereinigt (Guinet, 1988). Problematisch ist, daß bei der großen Menge an Glyzerin, die für den Ersatz von Salz notwendig ist, die Viskosität der Puffer und damit der Rückdruck bei der Chromatographie stark ansteigt, was bei Betain und Glyzin nicht der Fall ist.

Aminosäuren wie **Glycin**, aber auch Prolin und Alanin, und Aminosäure-Derivate wie **Betain** werden von vielen Organismen, z.B. halotoleranten Eubakterien und marinen Invertebraten, als kompatible Solute genutzt (Galinski, 1993). Betain, ein quartäres Methylamin, welches zuerst in der Zuckerrübe entdeckt worden ist, wurde bereits erfolgreich bei nativer Gelelektrophorese von halophilen Proteinen als Salzersatz eingesetzt (Cadenas & Engel, 1994). Eine systematische Studie mit Glyzerin und Betain zeigte, daß beide Substanzen in Konzentrationen von 2.5 – 3.5 M in der Lage sind, ein halophiles Enzym unter Niedrigsalz-Bedingungen über Stunden zu stabilisieren, das ohne diese Stabilisatoren innerhalb weniger Minuten vollständig seine Aktivität verlieren würde (Vuillard, 1995).

Aufgrund dieser positiven Erfahrungen wurden in dieser Arbeit teilweise Glyzerin (20% v/v), Glyzin (2 M) oder Betain (2.5/3 M) zum Schutz der Proteine eingesetzt. Bei den Chromatographien mit Glyzin und Betain fiel auf, daß die Elution der Proteine erst bei höheren Salzkonzentrationen erfolgte: der Hauptpeak erschien bei etwa 0.7 M NaCl statt bei 0.5 M NaCl. Je mehr Betain im Puffer enthalten war, desto mehr verschob sich das Elutionsprofil nach rechts (Betain: 2.5 M zu 3 M; NaCl: 0.66 M auf 0.76 M). Die Zugabe von Glyzerin zum Auftrags- bzw. Elutionspuffer führte zu keiner Verschiebung. Eine Betrachtung der Kristallausbeute zeigt, daß sich unter der Verwendung von Glyzerin und Betain eher Kristalle bildeten als ohne Additiva. Dagegen scheint sich Glyzin als Additiv weniger zu eignen, da hier – auch im Vergleich zu Proben ohne Additiva – die geringste Menge an Kristallen gewachsen ist.

Experimente haben bezüglich des Effektes der beiden kompatiblen Osmolyte Glyzin und Betain verschiedene Ergebnisse gezeigt: es konnte sowohl eine bessere Stabilisierung von Proteinen durch Glyzin bei thermischer Denaturierung (Arakawa & Timasheff, 1983; Santoro,

1992) beobachtet werden als auch der umgekehrte Effekt, daß Betain die Aktivität eines durch Salz inhibierten Enzyms erheblich mehr steigern konnte als Glyzin (Yancey, 1982). Beide Resultate werden auf den unterschiedlichen Methylierungsgrad der Substanzen zurückgeführt (s. Abb. 15). Für die abnehmende Stabilisierung mit steigendem Gehalt an unpolaren Methylgruppen wird deren direkte Interaktion mit exponierten hydrophoben Resten des Proteins verantwortlich gemacht, die so eine vermehrte Hydratation des Proteins verhindert (Santoro, 1992). Da aber bei einem nativen Protein kaum exponierte hydrophobe Reste zu finden sind, dürfte dieser Effekt auf eine Stabilisierung des denaturierten Zustandes von Proteinen zurückzuführen sein, in dem diese erheblich mehr hydrophobe Reste auf ihrer Oberfläche tragen. Auch wurde bereits experimentell gezeigt, daß Betain (drei Methylgruppen) die Hydratisierung von Proteinen sogar in höherem Maß steigert als Glyzin, d.h. die Wirkungsweise von Betain gegenüber nativen Proteinen beruht anscheinend nicht auf seinen Methylgruppen, sondern auf dem restlichen hydrophilen Teil dieser Substanz. Außerdem dürfte das relativ große Volumen von Betain eher dazu beitragen, daß es von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird (Arakawa & Timasheff, 1983). Unterschiedliche Ergebnisse könnten darauf beruhen, daß beide Faktoren (direkte Interaktion mit dem Protein, Wirkung über Hydratation) verschieden stark ausgeprägt sind.

Die Tatsache, daß sich in dieser Arbeit bei der Verwendung von Betain mehr Kristalle gebildet haben als bei Glyzin, paßt zum zweiten Ergebnis, ist aber im Hinblick auf eine Bekräftigung kaum zu diskutieren, da der Versuchsaufbau, v.a. die Zusammensetzung der Proben zu komplex war. Insgesamt hat die Verwendung der drei Substanzen Glycerin, Glyzin und Betain im Vergleich zu den Osmolyt-freien Ansätzen keine erhebliche Steigerung des Kristallwachstums gebracht. Als Ersatz für Salz wirken diese Stoffe vielleicht bei dieser großen Menge an Gesamtprotein nur in höheren Konzentrationen. Das Problem dabei ist, daß ab bestimmten Glycerinmengen der Rückdruck der Chromatographie-Anlage zu stark ansteigt und daß Glyzin bzw. Betain nur bis zu gewissen Konzentrationen löslich sind (Betain: 4.2 M, Glyzin: 3 M in Wasser). Betrachtet man die Stabilisierung eines halophilen Proteins, die am Beispiel der Malat-Dehydrogenase aus *H. marismortui* unter verschiedenen Salzbedingungen (NaCl, KCl, MgCl₂, K-Phosphat) ausführlich studiert und diskutiert worden ist (Zaccai, 1989; Madern, 2000a), so ist es prinzipiell fraglich, ob derartige kompatible Osmolyte überhaupt zum Schutz vieler halophiler Proteine geeignet sind. Ihr Wirkmechanismus müßte – ähnlich wie die Stabilisation der hMDH unter Kaliumphosphat (Zaccai, 1989; Madern, 2000a) – auf einer Verstärkung des hydrophoben Effekts beruhen, da sich der Aufbau eines Netzwerkes aus Wasser und Osmolyten analog dem Wasser-Ionen-Netz schlecht vorstellen läßt. Da aber

dieser Stabilisierungsmechanismus nicht dem unter physiologischen Bedingungen entspricht, könnte das eine geringere Stabilität vieler Proteine unter diesen „Ersatz-Salz“-Bedingungen erklären. „Hydrophober Effekt“ bedeutet, daß ein Protein durch die hydrophoben Reste seines Kerns stabilisiert wird, die in wäßriger Umgebung dazu neigen, sich zusammenzuschließen. Phosphat, ein Salz mit hohem Aussalzeffekt, fördert die Bildung solcher hydrophoben Interaktionen: wird eine hohe Konzentration an stark geladenen Ionen wie Ammonium-Ionen (NH_4^+), Sulfat-Ionen (SO_4^{2-}) oder Phosphat-Ionen (PO_4^{3-}) einer Proteidlösung zugefügt, so werden die Salzionen hydratisiert und entziehen den Proteinen die Hydrathülle (=Aussalzen); das Vermögen von Ionen, ein Protein auszusalzen, ist abhängig von Ladung und Größe eines Ions und wird gerne analog der Hofmeister-Reihe dargestellt (s. Abb. 16). Unter hohen Konzentrationen von NaCl oder KCl (geringer Aussalzeffekt) reichen die wenigen hydrophoben Reste halophiler Proteine für eine Stabilisierung nicht aus, hier kommen die sauren Reste auf der Oberfläche der Proteine ins Spiel (vgl. Einleitung; Zac cai, 1989; Lanyi, 1974).

Ein vergleichsweise besseres Ergebnis wurde durch eine **Sulfat-vermittelte AC** erzielt. Hier wurde zum Schutz der Proteine Ammoniumsulfat eingesetzt, eines der wirksamsten und am häufigsten zum Aussalzen verwendeten Anionen der Hofmeister-Reihe (s. Abb. 16). Normalerweise wird ein Anionentauscher in Anwesenheit von Salz für undurchführbar erachtet, da Salz die Interaktion von Protein und Säulenmatrix schwächt bzw. verhindert. Dennoch wurde diese Methode bei der Trennung zweier halophiler Proteine (halophile Glutamat- und Malat-Dehydrogenase) erfolgreich getestet, und entgegen obiger Annahme schien die Adsorption der Proteine an die Matrix in Gegenwart von Ammoniumsulfat noch verstärkt (Leicht & Pundak, 1981). Dieses Ergebnis bestätigte sich in dieser Arbeit: wie in Gegenwart von Glycin/Betain war eine höhere Konzentration an NaCl (0.6 M) erforderlich, um die Hauptmasse an Protein von der Säule zu eluieren. Möglicherweise ist die Ursache eine Art Aussalz-Mecha-

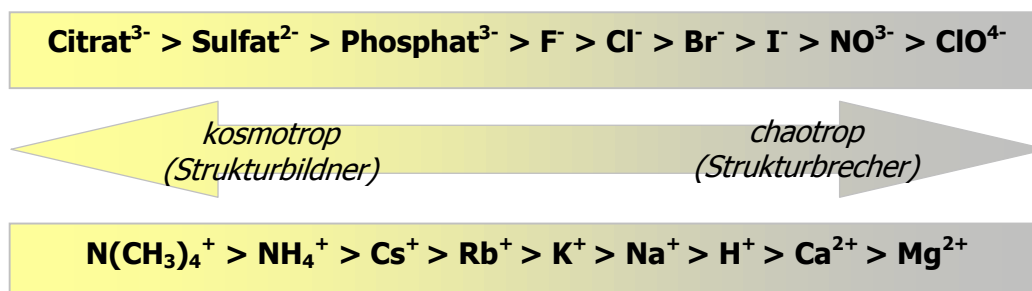


Abb. 16. Hofmeister-Reihe. In dieser Serie werden Anionen/Kationen nach ihrer Fähigkeit, Proteine zu stabilisieren (kosmotrop) oder zu destabilisieren (chaotrop), eingeteilt. Die Anionen und Kationen agieren dabei unabhängig voneinander, ihr Effekt ist additiv (Danson & Hough, 1997).

nismus verursacht durch das Säulenmaterial (von der Haar, 1976; Leicht & Pundak, 1981), der durch NaCl in steigenden Mengen wieder aufgehoben werden kann. Analog der Trennung der beiden halophilen Proteine wurden Konzentrationen von 0.6 oder 1.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet, beide Ansätze zeigten bis auf die Verschiebung der Elution ein ähnliches Elutionsprofil wie ohne Sulfat. Hier war jedoch eine erhebliche Steigerung der Kristallausbeute zu beobachten – auch im Vergleich zu Betain –, fast alle Protein-Fractionen zeigten Kristallwachstum. Ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mit/ohne compatible Osmolyte) waren es im Durchschnitt etwa 50% der Fractionen. Diese Methode hat zwei Nachteile: ein mal war die hohe Salzmenge ein Problem bei der Untersuchung der Fractionen über SDS-PAGE, da das Proteimumster nur schlecht auszuwerten war – eine Entsalzung der Proben vor der PAGE war aufgrund ihrer großen Anzahl nicht möglich. Zum anderen geht mit 0.6 sowie 1.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ein Verlust von Proteinen einher, die unter dieser Salzkonzentration ausfallen und abzentrifugiert werden müssen. Um diesem Verlust zu entgehen, kann man die reversibel präzipitierten Proteine durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -freiem Puffer resuspendieren. Als Salzersatz muß dann eine andere Substanz verwendet werden. Das bedeutet, daß diese Methode bereits zwei Fraktionierungsschritte enthält, eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation und mindestens eine, wenn nicht zwei Anionenaustauscherchromatographien, d.h. die Zeit, die mit der Fraktionierung verbunden ist, nimmt zu – allerdings für den Großteil der Proteine unter „angenehmen“ Bedingungen.

Als weiterer Weg im Hinblick auf die Entsalzung wurde eine **Verkürzung des salzarmen/freien Zustandes** untersucht, entweder durch eine sehr rasche Entsalzung des Zytosols oder durch das Vorlegen von Hochsalzlösung (4 M NaCl) in den Fraktionsgefäßen. Ersteres wurde durch die Verwendung eines Hohlfasermoduls (*Variperm*, *KRONLAB*) erreicht, womit es möglich war, über Gegenstrom-Dialyse innerhalb einer knappen Stunde 25 ml Zytosol zu entsalzen. An einem Enzym aus *H. salinarum* konnte unter Verwendung dieses Moduls der Erhalt von mehr als 50% der katalytischen Aktivität erfolgreich demonstriert werden (Heersche-Wagner, 1995). Auch bei dieser Methode war das Elutionsprofil der AC im Vergleich zur Auftrennung nach normaler Dialyse ohne Additiva verschoben: die Hauptmasse an Protein wurde etwa bei 0.7 M NaCl eluiert. Der Grund hierfür kann kaum ein dem Aussalzen ähnlicher Effekt sein; möglicherweise war die Adsorption der Proteine an die Säulenmatrix unter völliger Salzfreiheit stärker (im Gegensatz zu 150 mM NaCl), oder es wurde durch einen zu plötzlichen Salzzug eine Konformationsänderung vieler Proteine bewirkt, was u.U. auch das vergleichsweise geringe Kristallwachstum erklären könnte. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die Deaktivierung halophiler Proteine unter Niedrigsalz ein Zeit-abhängiger Pro-

zeß ist (Heersche-Wagner, 1995; Lanyi, 1974). Doch zumindest eine Rückfaltung halophiler Proteine scheint oft nur zu funktionieren, wenn das Salz nicht auf einmal zugegeben, sondern die Probe langsam gegen Salzlösungen dialysiert wird (Lanyi, 1974), d.h. eine zu rasche Veränderung der Pufferbedingungen zeigt hier nicht den gewünschten Effekt.

Ob das Vorlegen von Salzlösung in den Reagenzgläsern eine positive Wirkung hatte, war in diesem komplexen Versuchsablauf nicht zu beurteilen; allerdings ist fraglich, ob bei dem Dichteunterschied von Eluat und Hochsalzlösung überhaupt eine Mischung stattfinden konnte. Prinzipiell wurde der salzarme/-freie Zustand durch rasches Arbeiten und sofortige Dialyse der Fraktionen nach der AC gegen 1 M NaCl so kurz wie möglich gehalten.

Eine andere Chromatographie-Methode, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, war die **hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**. Dies ist eine Methode, die sehr häufig zur Aufreinigung halophiler Proteine eingesetzt wird (Eisenberg, 1992). Hier findet wahrscheinlich eine Wechselwirkung zwischen hydrophoben Resten der Matrix und der Proteine statt. Über die Kräfte, die zu dieser Interaktion führen, gibt es verschiedene Theorien: sie reichen von einer thermodynamischen Erklärung über den Vergleich mit dem Aussalz-Effekt zu einfachen van der Waals-Kräften. Welche davon zutrifft oder ob es sich um eine Kombination dieser Mechanismen handelt, ist schwer zu entscheiden (Amersham Pharmacia, HIC, Principles of HIC, 11-12). Obwohl diese Methode für die Auftrennung von halophilen Proteinen auf den ersten Blick untauglich scheint, da ein Großteil dieser Proteine kaum hydrophobe Reste auf der Oberfläche trägt, wurde sie schon relativ früh erfolgreich zur Auftrennung halophiler Enzyme eingesetzt. Verwendet wurde dabei u.a. gänzlich unsubstituierte Sepharose, eine hochvernetzte Matrix aus Polysaccharid-Ketten (Mevarech, 1976; Leicht & Pundak, 1981). Dabei wurde diskutiert, ob es sich bei dem Bindungsmechanismus schlicht um eine Präzipitation der Proteine auf der Gelmatrix handeln könnte: durch das Säulenmaterial ist dafür weniger Salz nötig als in Lösung (von der Haar, 1976; Leicht & Pundak, 1981). In dieser Arbeit bot sich die Verwendung von Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) an, da dieses Material aufgrund seines hohen Substitutionsgrades (40 μmol Phenylgruppen/ ml Gelmatrix) gut zur Auftrennung von Proteinen geeignet ist, die selbst eine geringe Menge an hydrophoben Aminosäuren auf der Oberfläche tragen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß keine Notwendigkeit für eine Entsalzung besteht: parallel zu einer Abnahme des Sulfatgehaltes im Puffer kann die NaCl-Konzentration durchgehend konstant bleiben oder nach Bedarf ansteigen. Ein weiterer Vorteil ist, daß diese Methode wie die AC gut als erster Schritt einer Fraktionierung eingesetzt werden kann, da die Kapazität des Materials sehr hoch ist (bei geeigneten Salzkonzentra-

tionen). Allerdings finden sich hier dieselben Nachteile wie bei der Sulfat-vermittelten AC: die erschwerte Untersuchung der Fraktionen über SDS-PAGE und die Präzipitation eines Großteils der Proteine bei hohen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen. Um diese Proteine nicht zu verlieren, wurde dieses Präzipitat z.T. in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -freiem Puffer (mit 1 M NaCl) resuspendiert und ebenfalls auf die Sepharose-Säule aufgetragen. Unter diesen Bedingungen fand jedoch kaum mehr Bindung an die Sepharose-Matrix statt, so daß die HIC-Läufe in dieser Arbeit nur mit dem Überstand der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung durchgeführt wurden. Die Auftrennung durch Elution über einen dreistufigen Gradienten war sehr gut, das Kristallwachstum in den erhaltenen Fraktionen ähnlich der AC ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Weiterhin wurde für den ersten Fraktionierungsschritt **Hydroxyapatit** (Calciumphosphat) als Trennmaterial untersucht, ein Mineral, das saure Proteine über Komplexbildung der Carboxylgruppen mit Calcium bindet. Die Elution erfolgte durch hohe Konzentrationen eines Iones, das stärkere Komplexe mit Calcium bildet als die Carboxylgruppen, z.B. Phosphat. Der Vorteil dieser Methode ist für die meist negativ geladenen halophilen Proteine, daß unter hohen Konzentrationen an NaCl/KCl gearbeitet werden kann (bis zu 4 M NaCl), da die Gegenwart von Ionen, die Calcium nicht binden, nicht stört. Die Auftrennung war jedoch in allen Fällen erheblich schlechter als bei der AC/HIC: nicht einmal die letzten Fraktionen wiesen prominente Proteinbanden auf. Allgemeine Aussagen über die Tendenz zur Kristallisation können nicht getroffen werden, da nur von einem Lauf Fraktionen in Kristallansätze eingebracht worden waren, in denen sich so gut wie keine Kristalle bildeten. Trotz der relativ hohen Kapazität dieses Materials (20 mg/ml) und der fehlenden Notwendigkeit für eine Entsalzung erwies sich diese Methode als ungeeignet für den ersten Schritt der Zytosol-Fraktionierung. Sie wird jedoch oft als einer der letzten Schritte in der Aufreinigung halophiler Enzyme eingesetzt (Cendrin, 1994; Brown-Peterson & Salin, 1993; Schmitt, 1997)

Alle bisher beschriebenen Techniken konnten mehr oder weniger erfolgreich zur ersten groben Fraktionierung von halobakteriellem Zytosol eingesetzt werden, in manchen Fällen wurde als zusätzlicher Schritt eine **Gelfiltration (GF)** durchgeführt, d.h. eine Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dafür wurden die Proben, die durch Vereinigung und Aufkonzentrieren aus den Fraktionen des ersten Schrittes erhalten wurden, nach Dialyse gegen 1 M NaCl auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Auftrennung war je nach Konzentration der Probe unterschiedlich, teilweise konnte die Separation einzelner Proteine erzielt werden (Coomassie-Färbung). Bei der Kristallisation zeigte sich, daß teilweise vor *und* nach GF die gleichen Kristalle erschienen, z.T. aber auch Kristalle nur vor *oder* nach GF auftraten. Der letzte Fall,

daß in manchen Proben erst nach der GF Kristalle zu finden waren, war sehr selten. Das bedeutet, daß die GF als zweiter Schritt in der Fraktionierung keine großen Vorteile bot: v.a. verlängerte sie die Zeit, bis die Proben zur Kristallisation auspipettiert werden konnten. Außerdem nahm die Menge an Gesamtprotein durch die zweite Fraktionierungsrunde so stark ab, daß teilweise die erforderliche Proteinkonzentration für die Kristallansätze nicht mehr erreicht werden konnte. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß manche Kristalle nur vor der GF gewachsen sind. Der Mangel an Probenmaterial führte auch dazu, daß manche Ansätze, in denen sich Kristalle gezeigt hatten, nicht wiederholt werden konnten. Die GF als ersten Schritt der Fraktionierung einzusetzen, wurde nur zweimal getestet: dabei erwies sich sowohl die stark beschränkte Kapazität von Gelfiltrationssäulen, als auch die schlechte Auftrennung des sehr komplexen Zytosolgemischs als Problem.

Es ist schwierig, das Ziel einer möglichst breiten Fraktionierung des Zytosols von *H. salinarum* mit dem Bedürfnis der halophilen Proteine nach Salz zu vereinen. Die Verwendung von Salzersatzstoffen kann nur auf wenige Untersuchungen zurückgreifen, da sich die meisten Studien zu osmotischem Streß auf den umgekehrten Fall beziehen: nicht-halophile Proteine, die hohen Salzkonzentrationen ausgesetzt werden. So gibt es keinerlei Beweise dafür, daß die verwendeten Osmolyte generell geeignet sind, halophile Proteine vor Niedrigsalz-Streß zu schützen. Allerdings enthält *H. salinarum* auch Proteine, welche die vollständige Entfernung von Salz ertragen, ohne zu denaturieren oder ihre Aktivität zu verlieren (vgl. Purpurchlorophyll, Gasvakuolen; Lanyi, 1974). Durch die teilweise „nicht-halophilen“ Bedingungen im Shotgun-Ansatz fand eine Selektion auf Proteine statt, die unter niedrigen Salzkonzentrationen ihre Stabilität überhaupt bzw. in dem entsprechenden salzarmen/-freien Zeitraum nicht einbüßten. Selektiert wurden zudem Proteine, die ihre native Konformation durch die anschließende Rückdialyse gegen 1 M NaCl zurückgewinnen konnten, oder Proteine, die tatsächlich durch die in diesem Ansatz vorliegende Konzentration an Osmolyten (Betain, Glycerin, Glyzin) geschützt werden konnten. Es wäre interessant, einen Vergleich zu ziehen zwischen der HIC und der AC – mit/ohne Additiva – im Hinblick auf die Proteinspezies, die nach diesen Reinigungstechniken kristallisierten. Doch die geringe Größe vieler Kristalle (s.u.) erlaubte meist nur einen Vergleich bezüglich der Kristallausbeute. Was zur Stabilisierung mancher Proteine beigetragen haben könnte, ist, daß sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in dem Gemisch von Proteinen und zellulären Substanzen noch Substrate oder andere Liganden der jeweiligen Proteine in den erforderlichen Konzentrationen befanden: daß die Anwesenheit von Substrat die Inaktivierung von halophilen Enzymen in Gegenwart von niedrigen Salzbedingungen deutlich verlangsamt (protektiver Effekt) konnte eindeutig gezeigt werden (Lanyi, 1974).

Die Reproduzierbarkeit der Chromatographie-Experimente war unerwartet hoch (s.o.). Eine Kombination mehrerer Läufe hat zwei Vorteile: zum einen wird damit eine Erhöhung der Endproteinmenge erzielt, zum anderen kann die Entscheidung, welche Fraktionen vereinigt werden, über die Chromatogramme getroffen werden, d.h. die zeitraubende oder durch Salz gestörte Untersuchung über SDS-PAGE fällt weg. Eine Addition mehrerer identischer Chromatographie-Läufe wirkt auch dem Problem der beschränkten Bindungskapazität von Säulen entgegen. Diese Arbeit war nicht dazu gedacht, bestimmte Fraktionierungsmethoden miteinander zu vergleichen, sondern so viele Techniken wie möglich auf ihre prinzipielle Verwendbarkeit zu testen. Dennoch ist es möglich, aufgrund der Ergebnisse tendenziell zu sagen, welche der untersuchten Methoden sich – hinsichtlich Proteinen ge und -kristallisationsverhalten – für die Shotgun-Methode am ehesten eignet, und wie sich diese Erkenntnisse für weitere Verbesserungen nutzen lassen. Generell hat sich für die erste Fraktionierung des Zytosols mit seiner breiten Proteinmasse die AC mit Stufengradient (zwei/ mehr Stufen) sehr bewährt, die geringe Salzmenge ließ sich am besten durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgleichen. Eine anschließende Gelfiltration unter mindestens 1 M NaCl diente zwar einer besseren Auftrennung, erbrachte aber keine signifikant höhere Kristallausbeute. Das Problem des Proteimerlustes durch die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation könnte dadurch umgangen werden, daß die ausgesalzten Proteine nach Wiederaufnahme in Puffer über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt werden.

Eine andere Möglichkeit, die ganz auf den Einsatz von Chromatographie und damit auf Salzfreiheit verzichtet, wäre eine fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung in sehr kleinen Schritten. Auch eine Dialyse aller Fraktionen nach der AC gegen Hochsalz (4 M) wäre sinnvoll, da gezeigt wurde, daß etwa die hMDH aus *H. marismortui* für ihre Rückfaltung hohe Salzkonzentrationen benötigt (Hecht & Jaenicke, 1989). Für die anschließende Kristallisation müßten die Proben allerdings wieder in niedrigere Salzkonzentrationen gebracht werden, da 4 M NaCl die Kristallisationsbedingungen zu stark beeinträchtigen würde.

Um zudem die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung von Anfang an zu erhöhen, könnte man eine große Menge an Zellen ziehen, die portionsweise eingefroren und nach Bedarf aufgetaut werden. Dabei besteht die Möglichkeit, Zellen unter verschiedenen Bedingungen (erhöhte Temperatur, verringerte Salzkonzentration) wachsen zu lassen, und damit eine Veränderung des Proteinmusters zu erzielen (z.B. vermehrte Produktion von Streßproteinen), was sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die Art und Menge der Kristalle auswirken würde.

3.1.2 Kristallisation und Identifikation von halophilen Proteinen

Der Ansatz der Shotgun-Kristallisation stellt eine neuartige Methode dar – neu in dem Sinn, daß bisher niemand gezielt untersucht hat, ob in einer solchen Menge verschiedener Proteine Kristalle entstehen können. Damit ergibt sich der Nachteil, daß spezielle Bedingungen für die Kristallisation einzelner Proteine von vornherein ausscheiden. Als Beispiel wäre hier die Zugabe von Liganden, Inhibitoren oder Substraten zu nennen, durch welche die Kristallisation eines Proteins oft beschleunigt bzw. erst ermöglicht wird. Umgekehrt können manche Proteine nur in Abwesenheit von mit ihnen wechselwirkenden Substanzen kristallisiert werden, wie es bei vielen Zucker-bindenden Proteinen, z.B. Lektinen der Fall ist (McPherson, 1990). Auch spezielle Additiva (DTT, EDTA, Metall-Ionen) werden gern eingesetzt, u.a. Cd-Ionen bei der Kristallisation von Ferritin aus Pferdeleber (McPherson, 1990; Granick, 1942). Bei der in dieser Arbeit genutzten Methode hat die Zugabe von Additiva wegen der unübersichtlichen Vielfalt an Substanzen, die einsetzbar wären, wenig Sinn. Außerdem könnte ihre Wirkung durch die gleichzeitige Anwesenheit verschiedener Proteine neben einem positiven auch den negativen Effekt haben, andere Proteine an der Kristallisation zu hindern. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß durch die geringe Aufreinigung z.T. noch Interaktionspartner von Proteinen in den Proben vorhanden sind, die also sowohl kristallisationsfördernd als auch -störend wirken können.

Bei der Kristallisation gibt es – genau wie bei der Aufreinigung von Proteinen – fast unbeschränkte Variationsmöglichkeiten, deshalb soll im folgenden zuerst auf die Bedingungen eingegangen werden, die im Lauf der Arbeit konstant gehalten wurden. Dazu gehörten zum einen die **Temperatur** (18°C) und der **Druck** (Normaldruck), zum anderen die **Kristallisationstechnik** mitsamt der dafür verwendeten Utensilien. Anschließend werden die **Ergebnisse der Methode** selbst – und im Zusammenhang damit die **variablen Faktoren** – dargestellt und diskutiert, wobei jeweils Vorteile und Grenzen dargelegt werden unter Einbeziehung von bisher im Hinblick auf die Kristallisation üblicherweise vertretenen Ansichten.

Temperatur und Druck sind Bedingungen, die großen Einfluß auf die Kristallisation haben können, bereits Temperaturschwankungen von 0.1 °C können den Aufbau eines Kristalls verändern, wobei es sich gezeigt hat, daß diese Schwankungen sich umso weniger auswirken, je sauberer eine Proteinprobe ist (Rosenberger, 1996). Die Erhöhung des Drucks auf z.B. 2000 bar kann die Kristallisationsrate von $0.3 \text{ g} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ auf $5 \text{ g} \times \text{l}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ steigern (Visuri, 1990). Umgekehrt wurde auch über negative Einflüsse von erhöhtem Druck berichtet (Suzuki, 2000).

Als Kristallisationstechnik wurde fast durchgehend die Methode des „*hanging-drop*“ eingesetzt (s. Kap. 2.6.1), die es ermöglicht, viele Ansätze parallel zu pipettieren, was bei der Menge an verschiedenen Proben sehr wichtig war. Weitere Vorteile sind, daß man nicht allzu viel Proteinmaterial braucht, und – ebenfalls entscheidend bei der Breite des Ansatzes – daß die mikroskopische Suche nach Kristallen gut durchführbar war. Ein geringer Prozentsatz der Reproduktionsansätze wurde im **Batch-Verfahren** durchgeführt (s. Kap. 2.6.1), um vergleichen zu können, ob sich Unterschiede zum *hanging drop* im Kristallisationsverhalten zeigten. Bis auf wenige Beispiele, in denen im Batch-Ansatz schönere Kristalle wuchsen, waren generell die Kristalle bei diesem Verfahren kleiner. Durch die **Silikonisierung** der Deckgläschen, auf welche die Tropfen aufpipettiert wurden, wurde die Wirkung ihrer Oberfläche als heterogener Nukleationsbeschleuniger vermindert.

Im Prinzip bestand der Kristallisationsansatz aus zwei Stufen: einer „Grob-Suche“ mit einem breit gefächerten Angebot an Puffern und einer „Fein-Suche“ mit Proteinfractionen, die bereits unter bestimmten Pufferbedingungen Kristallwachstum gezeigt hatten. Bei dieser Fein-Suche wurden dann spezifische Faktoren wie pH-Wert oder Salzkonzentration variiert.

Die Ergebnisse der Shotgun-Methode wurden später genutzt und verfeinert (s. Kap. 3.2.4.4.): so wurden Kristallisationsansätze mit möglichst reinem Protein gemacht, denen bestimmte Additiva (s.o.) zugesetzt wurden, um damit u.U. eine bessere Auflösung oder verschiedene Konformationen eines Proteins zu erhalten. Dieser Teil ist jedoch nicht mehr zur Shotgun-Methode selbst zu rechnen.

Für den ersten Teil („Grob-Suche“) wurden die Proben, die aus der Fraktionierung gewonnen wurden, mit Hilfe des *Hampton*-Screens auf ihr Kristallisationspotential hin untersucht. Es handelt sich bei diesem „Screen“ um einen sogenannten „faktoriellen Ansatz“. Bestimmte Faktoren (Fällungsmittel, pH-Wert etc.), welche die Kristallisation eines Proteins beeinflussen, werden systematisch so miteinander kombiniert, daß ein breiter Bereich abgedeckt ist. Bei der Festlegung der Faktoren spielen außerdem bisherige Erfahrungen über „erfolgreiche“ Kristallisationsbedingungen mit hinein (Carter & Carter, 1979). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl *Hampton*-Screen I und II als auch der Membfac-Screen verwendet, es wurden jedoch nur die Ergebnisse von Screen I ausgewertet, da sich unter Anwendung der anderen beiden Puffermischungen keine (Membfac, *Hampton*) oder nur sehr wenige Kristalle (*Hampton*-Screen II) gebildet hatten.

Bei der Kristallisation von Proteinen ist es der entscheidende Punkt, dafür zu sorgen, daß der Aufbau dieser komplexen und zugleich labilen Makromoleküle stabil erhalten bleibt. Von vornherein scheidet darum Kristallisationsbedingungen aus, die zu starke Konformationsänderungen oder sogar eine vollständige Denaturierung der Moleküle herbeiführen würden. Das bedeutet, daß bei der Kristallisation halophiler Proteine, die bei Salzkonzentrationen von etwa 4 M KCl/1M NaCl arbeiten (Christian & Waltho, 1962), eben dieses Salz unverzichtbar ist. Deshalb wurden in dieser Arbeit die konventionellen Puffer des *Hampton*-Screens I zusätzlich mit Salz bzw. einem Salzersatz versehen, meistens mit NaCl teilweise mit KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder Betain. Das Problem war dabei, daß das Salz bzw. der Salzersatz nur in begrenzter Menge zugegeben werden konnte, wenn sich z.B. eine hohe Salzkonzentration nicht mit den übrigen Pufferkomponenten vereinbaren ließ. Bereits in Anwesenheit von 1 M NaCl wurde die Präzipitation einiger Puffersubstanzen beobachtet.

Die Verwendung von Kalium statt Natrium bot sich an, da viele halophile Proteine eine Vorliebe für Kalium zeigen, was von der Zytosol-Zusammensetzung her verständlich wird (Lanyi, 1974; Christian & Waltho, 1962). Gleichzeitig wurde jedoch für die hMDH sowie für den hEFTu gefunden, daß sie durch NaCl besser stabilisiert werden als durch KCl, ein Effekt, der auf die erhöhte Wasserbindungskapazität von Kalium zurückgeführt wird (Pundak, 1981; Ebel, 1992). In einigen Fällen wurde völlig auf das zusätzliche Salz verzichtet, was möglicherweise gerade bei halophilen Proteinen zur Kristallisation führen könnte, da durch den Entzug von Ionen die Proteine durch Interaktion mit sich selbst versuchen, die elektrostatische Balance zu halten. Auf diese Weise wurde schon eine Reihe von Proteinen (Catalase, Concanavalin B, Immunglobuline) kristallisiert (McPherson, 1990).

Die Auswertung des Kristallwachstums im Rahmen der Shotgun-Methode wurde dadurch erschwert, daß es nicht möglich war, alle Kristalle zu identifizieren, ein Punkt, auf den weiter unten noch genauer eingegangen werden soll. Generell ist bereits die Unterscheidung Protein- oder Salzkristall nicht einfach, da sehr kleine Salzkristalle leicht mit Proteinkristallen verwechselt werden können. In dieser Arbeit mußten darum folgende drei Indizien zutreffen, damit ein Kristall als Proteinkristall angesehen wurde: im Referenztropfen (ohne Protein) befanden sich keine Kristalle gleichen Aussehens, der Kristall polarisierte das Licht (obwohl kubische Proteinkristalle – da optisch isotrop – nicht, dafür manche anorganische Salzkristalle Licht polarisieren) und „zerbröckelte“ nicht bei Berührung, sondern wurde „matschig“. Ein sehr sicherer Hinweis war außerdem die Farbigkeit von Kristallen, d.h. die Ferritin- oder auch Dodecin-Kristalle (gelb) waren gut als Proteinkristalle zu bestimmen.

Um den Einfluß der verschiedenen Pufferbedingungen auf das Kristallwachstum beurteilen zu können, wurden alle Ansätze auf die Bildung von Kristallen hin untersucht. Die Kristalle wurden – soweit sie nicht identifiziert werden konnten (s.u.) – bezüglich ihrer Morphologie (Größe, Form) und Farbe verglichen. Kristalle, die zu klein waren, um diese Kriterien eindeutig erkennen zu lassen, wurden nicht gezählt.

Für die Auswertung wurden die einzelnen Pufferbedingungen (insgesamt 50 im *Hampton*-Screen I) nach ihrem Fällungsmittel in Gruppen eingeteilt: Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, PEG 400/4000/8000, Isopropanol oder MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol). Jede dieser Gruppen enthielt eine bestimmte Anzahl an Bedingungen (N). Auf Puffer, die zwei oder mehr dieser Substanzen enthielten, soll hier nicht eingegangen werden, da ihre Wirkung nicht eindeutig zu klären war. Anschließend wurde für jede einzelne Bedingung innerhalb jeder Gruppe bestimmt, wieviele unterschiedliche Kristalltypen in allen Tropfen der verschiedenen Proteinproben gewachsen waren, diese wurden dann für jede Gruppe addiert (KT). Als Bezugsgröße wurden die Mengen an Kristalltypen jeder einzelnen Bedingung (auch zusätzlich zu den hier aufgeführten Gruppen) im *Hampton*-Screen I addiert, was die Gesamtzahl an Kristallen ergab (GK). Um vergleichbare Werte für die Kristallbildung (K) zu erhalten, wurde für jede Fällungsmittel-Gruppe ihre Menge an Kristalltypen (KT) in Relation zur Gesamtzahl (GK) gesetzt und durch Division mit der Anzahl an Bedingungen pro Gruppe (N) normiert:

$$\text{Gleichung 1} \quad \left[\frac{KT}{GK} \times 100 \right] \div N = K$$

Insgesamt haben sich in 31 von 48 Bedingungen (64.5%) Kristalle gebildet, daraus konnte eine Gesamtzahl an Kristallen (GK) für den *Hampton* Screen I (Bedingung 1-48) von 84 ermittelt werden. In Kapitel 3.1.3 der Arbeit werden die Kristalle beschrieben, die letztendlich identifiziert und teilweise charakterisiert werden konnten. Für jede der oben genannten Gruppen wurde die Kristallbildung K berechnet (s. Tab. 1). Daneben ist jeweils die Zahl der Bedingungen pro Gruppe (N), die Zahl der Kristalltypen (KT) sowie ein Vergleich mit der Literatur aufgeführt. Neben den Fällungsmitteln wurde auch die Abhängigkeit der Kristallisation vom pH-Wert untersucht, wobei hier die Kristalltypen jeder Bedingung einer „pH-Wert“-Gruppe addiert wurden und in Relation zur Gesamtkristallzahl gesetzt wurden (Tab. 2). Auch hier wurde ein Vergleich mit der Literatur gezogen. Zusätzlich sind die vier Bedingungen, unter denen das meiste Kristallwachstum zu beobachten war, in ihren Einzelbestandteilen aufgeführt (Tab. 3).

Gruppe (Fällungsmittel)/N	KT	K	Literaturvergleich
PEG 400 / 3	17	6.7	hvDHFR (Pieper, 1998): PEG 1000
PEG 4000 / 6	7	1.4	
PEG 8000 / 6	11	2.1	
Isopropanol / 5	11	2.6	
(NH ₄) ₂ SO ₄ / 3	12	4.7	
MPD / 4	5	1.5	hMDH (Dym, 1995): MPD

Tab. 1. Grob-Suche: Kristallwachstum in Abhängigkeit vom Fällungsmittel und Vergleich mit der Literatur. Es ist das Kristallwachstum (K) für sechs verschiedene Fällungsmittel aufgeführt (Berechnung siehe Text, Gleichung 1). N, Anzahl an Bedingungen pro Fällungsmittel-Gruppe; KT, Addition der verschiedenen Kristalltypen jeder Bedingung innerhalb einer Gruppe. Zum Vergleich sind die Kristallisationsbedingungen von zwei der bis jetzt kristallisierten löslichen halophilen Proteine angegeben.

pH	Anzahl der gebildeten Kristalle [%]	Literaturvergleich
4.6	16.6	
5.6	2.4	
6.5	19.0	HmFd (Frolow, 1996): pH 7.0 hvDHFR (Pieper, 1998): pH 7.5-8.0
7.5	35.7	
8.5	20.2	

Tab. 2. Grob-Suche: Kristallwachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert und Vergleich mit der Literatur. Hier wird ein Überblick über das Wachstum von Kristallen bei verschiedenen pH-Werten gegeben – in Prozent zur Gesamt-Kristallmenge (GK) –, und – soweit Informationen dazu gefunden wurden – mit Literaturangaben verglichen.

Hampton-Screen [Nr]	Komponenten	Anzahl der gebildeten Kristalle [%]
23	30% PEG 400, 0.1 M Na Hepes, pH 7.5, 0.2 M MgCl ₂	10.7
12	30% Isopropanol, 0.1 M Na Hepes, pH 7.5, 0.2 M MgCl ₂	8.3
6	30% PEG 4000, 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, 0.2 M MgCl ₂	5.9
14	28% PEG 400, 0.1 M Na Hepes, pH 7.5	5.9
47	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M Na Acetat, pH 8.5	5.9

Tab. 3. Grob-Suche: Auflistung der fünf „erfolgreichsten“ Kristallisationsbedingungen. Die Tabelle zeigt die fünf Pufferbedingungen des Hampton-Screen I, unter denen das häufigste Kristallwachstum beobachtet werden konnte. Die Anzahl der Kristalle ist jeweils in Prozent der Gesamt-Kristallmenge (GK) angegeben.

Beim Vergleich der Fällungsmittel treten bestimmte Bedingungen hervor: das meiste Wachstum war mit PEG 400 zu beobachten, gefolgt von (NH₄)₂SO₄. Das geringste Wachstum zeigte sich mit PEG 4000 sowie MPD. Daß mit PEG geringerer Größe (400) mehr Kristallwachstum erzielt wurde als mit PEG eines höheren Polymerisationsgrades (8000)

widerspricht bisherigen Erfahrungen, nach denen Kettenlängen zwischen 2000 und 6000 am gebräuchlichsten sind. Generell teilt PEG folgende Eigenschaften sowohl mit Salzen als auch mit organischen Lösungsmitteln: Salze konkurrieren mit den Proteinen um Wassermoleküle und bewirken so in verschiedenem Ausmaß eine Art Dehydratisierung der Makromoleküle. Organische Lösungsmittel dagegen reduzieren die Dielektrizitätskonstante des Wassers, wodurch elektrostatische Kräfte verstärkt und Proteine dazugetrieben werden, sich zusammenzulagern. Als zusätzliche Besonderheit scheint PEG eine Art Netzwerk zusammen mit Wassermolekülen zu bilden, von dem die Proteine ausgeschlossen werden (McPherson, 1985; McPherson, 1990).

Bei der Betrachtung des pH-Wertes fällt auf, daß sich über 35% der Kristalle bei einem pH-Wert von 7.5 gebildet haben (Tab. 2). Bei einer Abschätzung der pI-Werte aller Proteine von *H. salinarum* (teilweise bisher nur als offene Leserahmen identifiziert; Halolex) sind zwei Maxima zu erkennen, eines bei 4.5 und ein weiteres sehr schwach ausgeprägtes bei 7.5. Wie bereits oben erwähnt (Anionentauscher; Kap. 3.1.1) zeigen viele Proteine ein Löslichkeitsminimum an ihrem isoelektrischen Punkt, was möglicherweise z.T. das hier vorliegende Ergebnis erklären könnte. Allerdings sollte dann die Kristallmenge bei pH 4.6 deutlich höher liegen, da die meisten löslichen Proteine von *H. salinarum* einen theoretischen pI-Wert um 4.5 aufweisen.

Außer dem Einfluß des Fällungsmittels und dem pH-Wert soll hier noch die positive Wirkung von $MgCl_2$ erwähnt werden: drei der Bedingungen, die zum höchsten Kristallwachstum geführt hatten (fast ein Viertel der gewachsenen Kristalle) enthielten $MgCl_2$ (Tab. 3).

Dagegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Additiva (Salze bzw. Salzersatz) festgestellt werden. Das gänzliche Fehlen von Salz bewirkte nur eine leichte Minderung des Kristallwachstums. Auch die Zugabe von Glycerin zur Proteinprobe konnte die Kristallbildung nicht steigern.

Der zweite Teil („Fein-Suche“) wurde vorwiegend mit Proben durchgeführt, die bereits in der Grob-Suche Kristallwachstum gezeigt hatten. Dabei wurden die Ansätze teilweise mit dem gleichen Puffer wiederholt, wobei nur das Verhältnis von Protein zu Pufferlösung variiert wurde. Etwa 40% der Reproduktionsansätze zeigten eine erneute Bildung von Kristallen, bei den anderen 60% konnte kein Kristallwachstum mehr beobachtet werden. Bei einigen Ansätzen zeigte sich eine Verbesserung der Kristallmorphologie (Größe, Form).

Außerdem wurden einige Proben einer Suche unterzogen, in der gezielt Bedingungen variiert wurden, bei denen sich bereits vorher Kristalle gebildet hatten. Getestet wurden verschiedene Konzentrationen an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und PEG 400 bzw. 4000 kombiniert mit unterschiedlichen pH-Werten von 4.5 bis 8.0. Eingesetzt wurden sowohl Proteinproben, aus denen bereits gute Kristalle gewachsen waren, als auch Proben, die bis dahin nur die Bildung von sehr kleinen und daher unbrauchbaren Kristallen bzw. überhaupt kein Kristallwachstum gezeigt hatten. In einigen Fällen wurden die Proben nach Fraktionierung nur dieser Fein-Suche unterzogen – ohne vorhergehende Grob-Suche.

Auch hier wurde für jede Kombination Fällungsmittel/pH-Wert die Zahl an Kristalltypen (KT) bestimmt und dann mittels Division durch die Gesamtzahl an Kristalltypen ($\text{GK} = 60$) und die Zahl an Anwendungen dieser entsprechenden Kombination (M) normiert. Die einzelnen Werte wurden für jedes Fällungsmittel zum jeweiligen Kristallwachstum K aufsummiert.

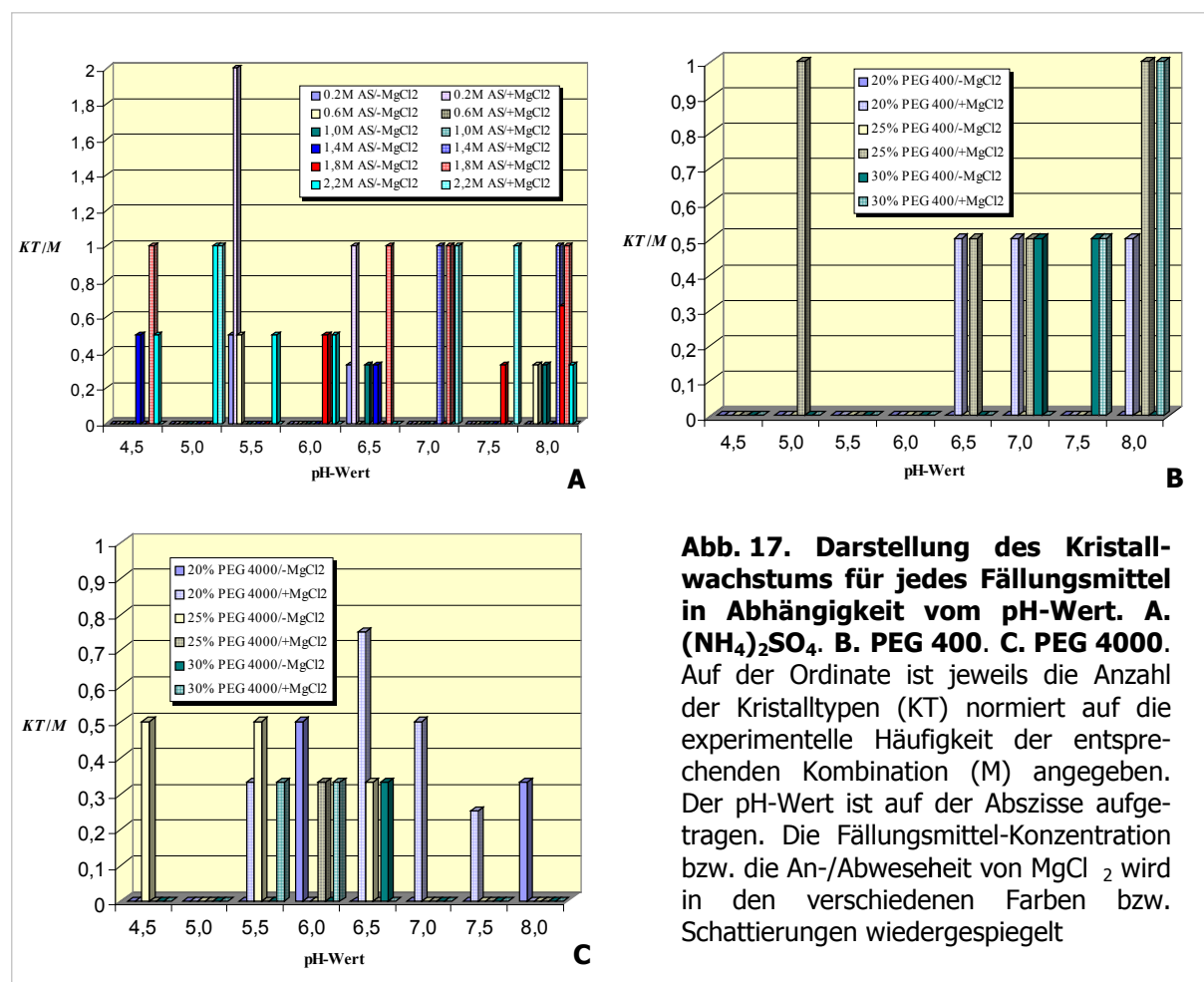
$$\text{Gleichung 2} \quad \sum \left[\frac{KT}{GK} \times 100 \right] \div M = K$$

Unterschieden wurde jeweils noch, ob MgCl_2 anwesend war oder nicht. In Tab. 4 ist für jedes Fällungsmittel das normierte Kristallwachstum (K) angegeben. Wichtig ist, darauf hinzuweisen, daß Ammoniumsulfat generell doppelt so oft wie die beiden PEG-Bedingungen verwendet wurde, da jeweils sechs verschiedene Konzentrationen (PEG: drei) untersucht wurden (s. Abb. 17).

Fällungsmittel	Anzahl der Versuche	Kristallwachstum (K)		
		insgesamt	+ MgCl_2	- MgCl_2
PEG 400	72	13.3	11.66	1.6
PEG 4000	132	8.46	4.3	4.16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	168	32.6	20	12.6

Tab. 4. Ergebnisse der Fein-Suche. Die Anzahl der Versuche entspricht der Zahl an Ansätzen, mit dem entsprechenden Fällungsmittel in der Bodenlösung. Das Kristallwachstum K berechnet sich entsprechend Gleichung 2 (s. Text), es sind sowohl die Gesamtmengen als auch die Mengen aufgeteilt nach An- oder Abwesenheit von MgCl_2 angegeben.

Aus der Tabelle können zwei Schlußfolgerungen gezogen werden: zum einen wurde unter Verwendung von Ammoniumsulfat mit Abstand das höchste Kristallwachstum erzielt, nämlich 16.3% (wenn man den Tabellenwert um die Hälfte reduziert, s.o.). Damit steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den Resultaten der Grob-Suche. Zum anderen zeigt sich deutlich,



daß die Anwesenheit von MgCl_2 sowohl bei PEG 400 als auch bei Ammoniumsulfat die Erfolgsrate erheblich steigert, was mit den Ergebnissen der Grob-Suche gut übereinstimmt.

Um genauer zu sehen, wie jedes dieser drei untersuchten Fällungsmittel in Abhängigkeit vom pH-Wert wirkt, wurde in einem Diagramm der jeweils normierte Wert KT/M (s. Gleichung 2) jeder einzelnen Kombination (Fällungsmittel/ pH-Wert) gegen den pH-Wert aufgetragen.

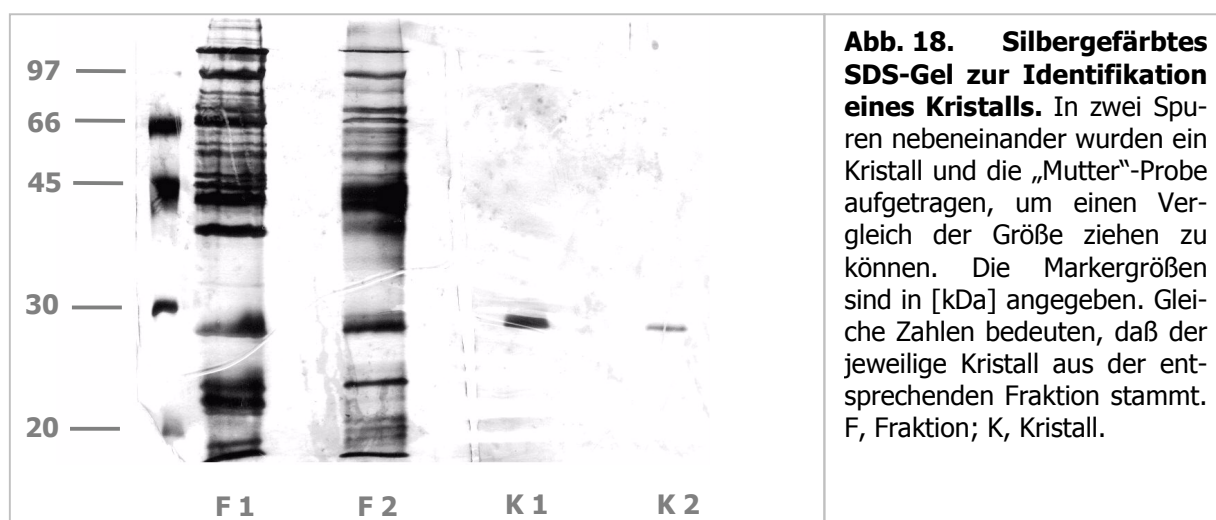
Während bei Ammoniumsulfat und PEG 4000 nahezu über den gesamten pH-Bereich Kristallwachstum auftritt, findet sich bei PEG 400 mit einer Ausnahme zwischen pH 4.5 und 6.0 kein Kristallwachstum, sondern erst ab einem pH von 6.5. Das bedeutet, daß sich das Ergebnis der Grob-Suche (35% des Kristallwachstums bei pH 7.5) hier nicht generell bestätigen läßt – bis auf eine leichte Tendenz mit PEG 400 als Fällungsmittel.

Deutlich ist dem Diagramm auch die Bevorzugung von Bedingungen mit MgCl_2 zu entnehmen (Abb. 17B, PEG 400: karierte Balken).

Bei Betrachtung der Fein-Suche war es interessant, speziell die Reproduzierbarkeit zu untersuchen: von zwölf Proben, in denen auch in den ersten Ansätzen (Grob-Suche) Kristallwachstum beobachtet werden konnte, konnte dies bei neun Proben (75%) wiederholt werden, wo-

von wiederum etwa die Hälfte eine Verbesserung zeigte, d.h. mehr und/oder schönere/größere Kristalle, in drei Fällen auch zusätzlich die Bildung von weiteren Kristallen; bei der anderen Hälfte entsprach das Ergebnis der Reproduktion in etwa den Erstansätzen. In zwei Proben, in denen vorher keine Kristalle gewachsen waren, hatten sich nun welche gebildet. Manche Probeproben er brachten unter keiner der Bedingungen Kristallwachstum, während bei anderen Proben unter einer Reihe von Salz- bzw. PEG-Konzentrationen Kristalle erschienen.

Entscheidend ist zur Beurteilung dieser Ergebnisse im Hinblick auf die Kristallisation halophiler Proteine und bezüglich der Shotgun-Methode selbst die **Identifikation** der Proteinkristalle. Dafür wurden mehrere Wege eingeschlagen, der einfachste war die N-terminale Sequenzierung von Kristallen, wenn genügend Material vorhanden war. Da dies jedoch nur selten der Fall war, mußten andere Methoden zu Hilfe genommen werden, eine davon war die Identifizierung über ein silbergefärbtes SDS-Gel: auf dem gleichen Gel wurden sowohl die Fraktion, aus welcher der Kristall gewachsen war, als auch der Kristall selbst aufgetragen (s. Abb. 18), über den Größenvergleich wurde die entsprechende Bande in der Gesamtfraktion bestimmt und sequenziert. Der Vorteil war, daß meistens ein einziger Kristall ausreichte, da die Silberfärbung sensitiv genug ist; als Nachteil erwies es sich, daß dem Kristall oft Verunreinigungen anhafteten, die nicht abgewaschen werden konnten. Außerdem führte diese Methode zu Falschidentifizierungen: einem Kristall (Ferritin) wurde lange Zeit die falsche Proteisequenz (Superoxid-Dismutase) zugeordnet, weil die entsprechende Fraktionsbande beide Proteine enthielt, wobei die Superoxid-Dismutase im Überschuß vorlag und deshalb ein positives Sequenzierungsergebnis lieferte. Generell ist es schwierig, aus dem Gel heraus eine bestimmte Bande zu sequenzieren, wenn in ihrer Nachbarschaft eine Vielzahl weiterer Banden vorhanden ist. Was zusätzlich für halophile Proteine eine Schwierigkeit darstellt, ist die



Tatsache, daß oft die tatsächliche Größe dieser Proteine nicht anhand der üblichen Marker bestimmt werden kann, die bei der SDS-PAGE verwendet werden. Der Grund dafür ist das ungewöhnliche Laufverhalten von Proteinen aus halophilen Organismen, das auf ihren erhöhten Anteil an negativen Ladungen zurückgeführt wird (Eisenberg, 1992).

Eine weitere Identifizierungsmethode war die Massenbestimmung über MALDI, sie wurde allerdings nur einmal angewandt, wobei eindeutig eine Proteinsequenz zugeordnet werden konnte (Glyzerin-Dehydrogenase).

Identifiziert wurden insgesamt eindeutig sechs Proteine, wovon bei dreien die Struktur gelöst werden konnte (zwei Strukturen wurden im Rahmen dieser Arbeit bestimmt). Die Kristalle der anderen drei Proteine hatten sich nicht reproduzieren lassen, bzw. nicht in einem Zustand, der für eine Identifikation ausgereicht hätte (s. Kapitel 3.1.3, Tab. 5). Betrachtet man die Kristalle, die sich nach obigen Methoden eindeutig oder durch Rückschluß aufgrund ihrer Morphologie/Abstammung (= Proteinprobe) relativ eindeutig identifizieren ließen, kommt man bei der Fein-Suche zu einem ernüchternden Ergebnis: über 50% der Kristalle repräsentierten eines von zwei Proteinen (Dodecin/Ferritin). Von den anderen 50% konnte nur ein Kristall identifiziert werden (Imidazol-Dehydrogenase), die restlichen waren für jede weitere Charakterisierung zu klein. In der Grob-Suche ließen sich nur 25% der Kristalle einem von (hier) vier Proteinen (Dodecin/Ferritin/Ferredoxin/Glyzerin-Dehydrogenase) zuordnen. Dabei ist zu beachten, daß mit großer Wahrscheinlichkeit unter den nicht-identifizierbaren Kristallen ebenfalls Kristalle dieser zwei bzw. vier Proteine enthalten waren.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen folgendes schließen:

1. Es scheint unter den gewählten Bedingungen – einschließlich Zellaufschluß, Fraktionierung, Kristallisation – nur ein sehr begrenztes Repertoire an Proteinen (5) zu geben, die kristallisieren.
2. Bei einem noch kleineren Teil (2) war es möglich, die Kristallbildung aus mehreren unabhängigen Proben heraus zu reproduzieren, dabei wurde eine Bevorzugung bestimmter Pufferbedingungen festgestellt. Der Grund für die geringe Reproduktionsrate war entweder, daß die Auswahl an getesteten Proteinproben in der Fein-Suche nur die beiden Proteine in der passenden Konzentration enthielt, oder, daß die gewählten Bedingungen der Fein-Suche nur für die beiden kristallisierenden Proteine geeignet waren.

3. Möglicherweise kann man eine gewisse Tendenz der Proteine herauslesen, mit PEG 400 oder Ammoniumsulfat als Fällungsmittel zu kristallisieren, die Zugabe von MgCl_2 scheint vorteilhaft zu sein.

Wenn die Kristallisation eines Proteins nicht funktioniert, kann das mehrere Ursachen haben, angefangen bei falschen Pufferbedingungen über eine ungeeignete Temperatur oder Proteinkonzentration bis zu mangelhafter Aufreinigung, die dazu führt, daß Fremdstoffe die Kristallisation verhindern. Sind tatsächlich Kristalle gewachsen, bleibt die Frage, ob sie sich reproduzieren lassen. Die eben genannten Parameter können auch bei diesem Ansatz dazu führen, daß Kristallwachstum nicht in gewünschtem Ausmaß stattfindet, doch wird ihre Problematik durch die besondere Vorgehensweise bei dieser Methode noch verstärkt, daß es sich in den Kristallisationsansätzen generell nicht um *ein* Protein, sondern um eine *Vielzahl* verschiedener Proteine handelt.

Drei Punkte müssen daher noch einmal besonders betrachtet werden: zum einen die Konzentration der Proteine, zum anderen die – bei dieser Methode – unvermeidbar vorhandenen Verunreinigungen. Von Verunreinigungen kann man hier eigentlich nur sprechen, wenn man bis auf ein Protein, nämlich das, das kristallisieren soll, alle anderen als Verunreinigungen bezeichnet. Da man jedoch kein bestimmtes Protein kristallisieren will, kann man eigentlich keines der vorhandenen Proteine als Verunreinigung bezeichnen, da alle potentielle Kristallbildner sind. Der Einfachheit halber wird jedoch diese Bezeichnung beibehalten werden. Ein weiteres ganz spezielles Problem stellt zudem die Identifikation der Proteine dar, worauf ebenfalls im folgenden noch einmal näher eingegangen werden soll.

Die **Konzentration** der Proteinlösung ist ein sehr wichtiger Faktor in der Kristallisation: zu *hohe* Konzentrationen können zu Wachstumsdefekten führen, wenn der Einbau von Wachstumseinheiten zu schnell erfolgt. Außerdem bilden sich hierbei eher spezifische oder zufällige Aggregate, die in Kristalle eingebaut werden und ebenfalls zu Defekten führen können. Darum wird die Konzentration oft verringert, sobald sich das Wachstum defekter Kristalle zeigt (McPherson, 1990; McPherson, 1996). Auf der anderen Seite verhindert eine zu *niedrige* Konzentration von vornherein, daß die Lösung in die Phase der Übersättigung gelangt, d.h. es wachsen überhaupt keine Kristalle. In diesem Ansatz ist es durch die Masse an Proteinen, die sich in einer Probe befindet, schwierig, die „richtige Konzentration“ zu finden. Die „richtige Konzentration“ gibt es ohnehin nicht, da jedes Protein seine eigene „richtige Konzentration“ hat, d.h. es werden sich immer Proteine in der „falschen Konzentration“ befinden.

Durch die vorangegangene Fraktionierung war versucht worden, eine möglichst breite Auftrennung zu erreichen, um die Zahl an verschiedenen Proteinen in den einzelnen Fraktionen weitgehend zu minimieren. Proteine, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen, werden jedoch auch in diesen Fraktionen kaum in den Konzentrationsbereich gelangen, in dem sie kristallisieren würden. Eher würde die Konzentration anderer Proteine so steigen, daß diese aggregieren und damit auch die Kristallisation der übrigen Proteine verhindern würden. Dies stellt eines der Hauptprobleme der Methode dar, eine Verbesserung würde durch die weitere Auftrennung der Fraktionen erreicht werden.

Auch nicht-ionische Detergentien kann man dem Kristallisationsansatz zufügen, etwa β -Octyl-Glucosid. Dessen Wirkung wird darauf zurückgeführt, daß es die hydrophoben Kräfte, die oft zur unspezifischen Aggregation von Proteinen führen, herabsetzt, wodurch – relativ gesehen – die elektrostatischen, gerichteten Interaktionen an Bedeutung gewinnen und damit die Kristallisation fördern (Giegé, 1986; McPherson, 1986). Die Zugabe von Detergentien ist bei der Kristallisation von Membranproteinen bereits etabliert (McPherson, 1986). Bei den bisher begrenzten Versuchen mit löslichen Proteinen konnte demonstriert werden, daß sich auch hier die Qualität und Reproduzierbarkeit von Kristallen deutlich verbessern lassen (McPherson, 1985; Guan, 2001). In dieser Arbeit wurde die Zugabe von β -Octyl-Glucosid zwar untersucht, ein positiver Effekt hat sich jedoch bis jetzt nicht gezeigt. Glycerin und hohe Ionenstärken scheinen das Phänomen der hydrophoben Aggregation ebenfalls zu verringern (Giegé, 1986), beides Bedingungen, die bei diesem Ansatz von Grund auf gegeben waren.

Der zweite Punkt, die **Anwesenheit von Fremdmolekülen** aller Art, hängt mit dem Konzentrationsproblem nicht nur eng zusammen, sondern bedingt dieses mehr oder weniger. Zwei generelle Ansätze wurden bisher unternommen, Proteine unter Bedingungen zu kristallisieren, die nicht dem „kristallographischen Reinheitsgrad“ entsprechen (v.a. McPherson, 1996; Caylor, 1999; Judge, 1995; s.u.): dazu gehören einmal gezielte Untersuchungen zu dem Effekt von Verunreinigungen („*impurities*“) in Kristallisationsansätzen (1), zum anderen die Kristallisation von Proteinen in „Massenansätzen“ (2). Im folgenden soll kurz auf beide Ansätze eingegangen werden, um sie mit der Shotgun-Methode vergleichen zu können.

Die gezielten Versuche (1) wurden mit Proteinproben durchgeführt, die zusätzlich zu einem Protein ein oder mehrere (bis zu drei) weitere Proteine in *definierter* Menge enthielten. Grund für diese Untersuchungen war u.a. die Entdeckung, daß kommerziell erhältliches Lysozym 1-6% an Fremdproteinen enthalten kann (Judge, 1998; Rosenberger, 1996). Die meisten Experimente wurden mit Lysozym durchgeführt, das sich ausgezeichnet kristallisieren läßt und

daher oft zu Studien bezüglich Wachstumsraten von Kristallen herangezogen wird. Als fremde Makromoleküle wurden andere Proteine des Hühnereiweißes zugefügt, z.B. Ovalbumin bzw. Lysozym aus einem verwandten Organismus (meist Truthahn).

Der Einbau von Verunreinigungen bzw. Mikrokristallen wurde z.B. über AFM-Messungen (Malkin, 1996b; McPherson, 1996), Fluoreszenzmarkierung (Caylor, 1999; Kurihara, 1999) und auch einfache chemische Untersuchungen wie Elektrophorese, Chromatographie und Massenspektroskopie sichtbar gemacht. Durchgeführt wurden diese Studien auf der Basis der gängigen Meinung, daß Proteine nur kristallisieren, wenn sie hoch aufgereinigt sind. Die Reinheit der Probe muß von „kristallographischem Grad“ sein, d.h. nicht nur alle Arten von Fremdkontaminationen müssen möglichst restlos entfernt, sondern auch „konformelle Verunreinigungen“ (denaturierte Makromoleküle u.ä.) sollten vermieden werden (Giegé, 1986; Giegé, 1992). Damit werden bereits die unterschiedlichen Arten von Verunreinigungen angesprochen: es gibt sowohl fremde Verunreinigungen (Fremdproteine, Puffer-, zelluläre Substanzen) als auch strukturelle Verunreinigungen. Darunter versteht man Proteine, die z.B. unvollständig posttranslational modifiziert sind – über 150 verschiedene Modifikationen sind bisher bekannt (Han, 1992) –, Bindungspartner besitzen oder aufgrund von Oxidation/Reduktion oder Protease-Befall strukturelle Schäden enthalten. Auch die Anwesenheit von partiell denaturierten oder inaktiven Proteinen sowie Proteinaggregaten zählt zu strukturellen Unebenheiten, ein Fall, der besonders häufig bei hohen Konzentrationen von Proteinen auftritt (Giegé, 1986). Strukturelle Verunreinigungen spielen mit Sicherheit auch in dem Shotgun-Ansatz eine große Rolle, da hier keinerlei Trennung von intaktem und modifiziertem/denaturiertem Protein möglich ist. Zur negativen Wirkung von Proteasen muß angefügt werden, daß in einigen Fällen ein Protein erst durch einen proteolytischen Verdau kristallisiert werden konnte, da durch die Behandlung z.B. flexible Termini entfernt werden (McPherson, 1990). In dieser Arbeit wurden Versuche mit verschiedenen Proteasen unternommen (nicht dargestellt), ein positiver Effekt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Sowohl Fremdkontaminationen als auch strukturelle Verunreinigungen wurden untersucht, dabei kam man zu unterschiedlichen Ergebnissen: teilweise wurde gefunden, daß die Kontaminationen zwar Einfluß auf die Morphologie des Proteinkristalls hatten, daß aber trotzdem nur selten Eigenschaften betroffen waren, die für die Strukturlösung von Bedeutung sind, nämlich B-Faktor, Auflösung und Gitterkonstanten. Teilweise hatten Proteinlösungen mit größerer Sauberkeit tatsächlich eine positive Auswirkung: es bildeten sich Kristalle, die eine höhere Auflösung aufwiesen (Rosenberger, 1996). Veränderungen der Morphologie bedeuten, daß sichtbare Umformungen, Risse und Sprünge auftreten können (Abb. 19A), aber auch

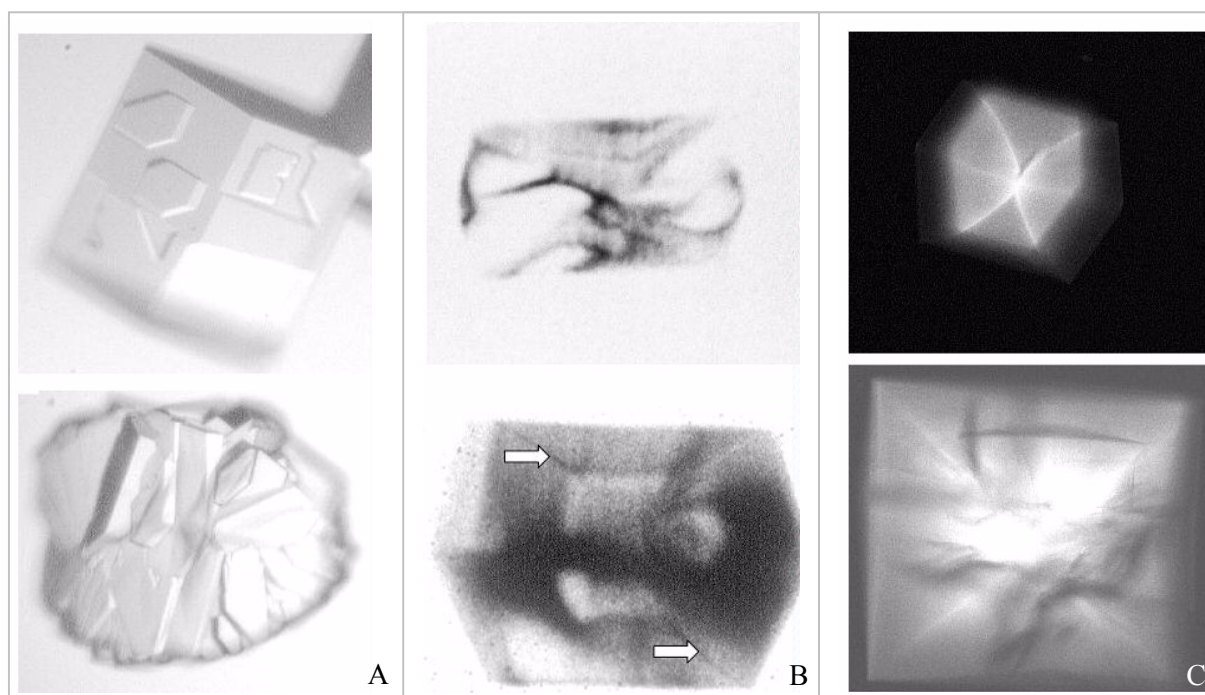


Abb. 19. Verschiedene Nachweise von Verunreinigungen. **A.** Risse bzw. Unebenheiten auf der Oberfläche des Kristalls - rein mikroskopisch betrachtet. **B.** Strukturveränderungen innerhalb des Kristalls – Röntgenstrahl-Topographie. **C.** Einbau von fluoreszenzmarkierter Verunreinigung im Zentrum bzw. an den Grenzflächen der Wachstumssektoren eines Kristalls. Die Pfeile markieren Grenzflächen der Wachstumssektoren. Aus: Caylor, 1999.

Störungen, die für das bloße Auge nicht wahrnehmbar sind (untersucht wurde dies u.a. über Röntgenbeugungsexperimente, s. Abb. 19B; Caylor, 1999).

In vielen Fällen konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von Verunreinigungen in sehr geringem Ausmaß stattfinden muß, da die Kristalle bei einer SDS-PAGE eine Reinheit von mehr als 99% aufwiesen (Caylor, 1999; Skouri, 1995; Judge, 1995). Wenn Einbau stattfindet, werden Verunreinigungen vorwiegend im Kern von Kristallen angesammelt, was über Fluoreszenz-Markierung von Fremdmolekülen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 19C; Caylor, 1999; Vekilov & Rosenberger, 1996).

Eine besondere Eigenschaft von Proteinkristallen im Gegensatz zu anorganischen Kristallen ist ihr hoher Gehalt an Lösungsmittel (30-90%; McPherson, 1990), d.h. es existieren Zwischenräume, die es ermöglichen, daß auch in einen „fertigen“ Kristall Fremdstoffe aufgenommen werden können, was z.B. die Voraussetzung für die Erstellung von Schwermetall-Derivaten eines Kristalls ist. Auch dies fördert den Einbau von Verunreinigungen in Kristallen.

Die meisten der eben genannten Untersuchungen (1) haben tatsächlich einen Effekt von Verunreinigungen auf bestimmte Kristalleigenschaften gezeigt. Dennoch waren es die ersten Versuche, die zumindest ansatzweise mit dem weit verbreiteten Irrglauben aufgeräumt haben, (gut) streuende Kristalle könnten nur aus hochreinen Lösungen wachsen.

Neben diesen gezielten Studien (1) wurden einige Versuche unternommen, Proteine in sogenannten „Massenkristallisations“-Ansätzen (*bulk crystallization*) zu kristallisieren (2). Der entscheidende Punkt dabei ist, daß auch hier Fremdmoleküle vorhanden sind, teilweise werden die zu kristallisierenden Moleküle nur ansatzweise aufgereinigt, d.h. hier dient die Kristallisation als letzter Reinigungsschritt. Ein Beispiel ist eine Glucose-Isomerase, die über Fermentation (*Streptomyces* sp.) produziert und durch Ammoniumsulfat-Fällung zugleich abgetrennt und kristallisiert werden konnte (Visuri, 1990). Ein anderes Enzym, das in Gegenwart von mindestens 20% (nicht-charakterisierter) Kontamination mit Fremdmolekülen allein durch pH-Wert-Veränderung kristallisiert werden konnte, war eine mikrobielle Lipase (Jacobsen, 1998). All diesen Ansätzen ging jedoch zum einen eine Überexpression des jeweiligen Proteins voraus, zum anderen waren die Kristallisationsbedingungen zuvor in kleinen Ansätzen ausgetestet worden und daher im Massenansatz bereits bekannt. Das Ziel war in all diesen Fällen die Herstellung großer Mengen an reinem Material, sonstige Eigenschaften der Kristalle wie Morphologie, Streuungsqualitäten waren unwichtig. Industriell wird dieser Ansatz zahlreich zur Kristallisation von anorganischen Stoffen angewandt, an organischen Materialien werden hauptsächlich Antibiotika, organische Säuren und Aminosäuren auf diese Weise produziert (Judge, 1995). Einige Firmen, etwa die Biotechnologie-Firma Altus¹, sind mittlerweile dabei, auch Proteine und Peptide in derartigen Massenansätzen zu kristallisieren.

Sowohl die gezielte Untersuchung des Effekts von Verunreinigungen (1) als auch die Massenkristallisation (2) wurden im Vergleich zur Schrotschuß-Methode dieser Arbeit unter wahren „Hochreinheits-Bedingungen“ durchgeführt. Die Zusammensetzung der Proben war zumindest bei den ersten Studien (1) bekannt, außer den jeweiligen Fremdproteinen (Ovalbumin etc.) in einigen Prozentanteilen befanden sich – soweit möglich – keine sonstigen Fremdstoffe in der Lösung, z.B. Stoffe, welche die Kristallisation einiger Proteine hätten verhindern können (s.o.). Die Massenkristallisation (2) wurde erst nach Fermentation durchgeführt, d.h. das Zielprotein stellte von vornherein die Hauptmasse der Kristallisationslösung dar. In allen Fällen (1 und 2) handelte es sich bei dem Zielprotein um ein bekanntes und – zumindest bei Lysozym – erschöpfend charakterisiertes Protein, von dem die optimalen Kristallisationsbedingungen jeweils bekannt waren.

In dieser Arbeit verhält es sich ganz anders: die Zusammensetzung der Proben ist nicht nur viel komplexer, sondern auch unbekannt, ebenso wie das zu charakterisierende Protein, d.h. Theorien zur Wirkung von Verunreinigungen können nur zur Kenntnis genommen, aber kaum

¹ http://www.altus.com/altustest/biomedical/crystal/crystal_4.html

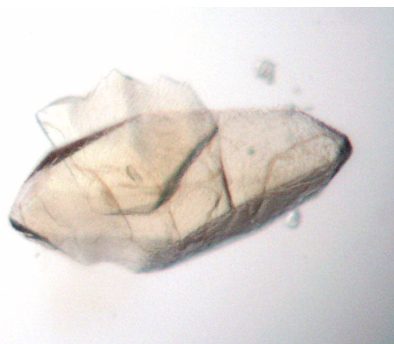


Abb. 20. Darstellung eines Ferritin-Kristalls. Dieser Kristall ergab bei der Röntgenstrahlanalyse eine Auflösung von bis zu 1.2 Å. Deutlich sind Risse und Sprünge zu erkennen.

übertragen werden. Es fand keinerlei Überexpression statt, und das mangelnde Wissen über Kristallisationsbedingungen erschwerte den Ansatz noch zusätzlich. Allerdings war es weder das Ziel dieser Methode, perfekte Kristalle zu erhalten, noch eine riesige Menge von zwar nicht unbedingt perfekten, aber doch möglichst sauberen Kristallen. Im besten Fall reichte *ein* streuender Kristall, und da man festgestellt hat, daß oft in derselben mit Fremdmolekülen kontaminierten Lösung Kristalle mit und gleichzeitig ohne (sichtbare) Defekte wachsen

(Caylor, 1999), bestand auch hier die Möglichkeit, Kristalle zu finden, die keine eklatanten Mängel aufwiesen. Daß das tatsächlich der Fall war, zeigt die Lösung dreier Strukturen, deren Proteinkristalle aus diesem Ansatz gewachsen waren, mit Auflösungen von bis zu 1.2 Å. Auch diese Kristalle zeigten nach außen hin teilweise das Auftreten von Defekten wie z.B. Rissen (s. Abb. 20). Da es gemäß der Art des Ansatzes unmöglich ist, die Verunreinigungen soweit zu entfernen, wie es generell „gefordert“ wird, wurden alle zusätzlichen Gefahren von Verunreinigungen weitestgehend vermieden, z.B. durch die Entfernung von Staub über Filtration von Lösungen oder durch die Zugabe von Protease-Inhibitoren zur Minimierung von Proteinabbau.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Verunreinigungen im Shotgun-Ansatz mit Sicherheit einen Einfluß auf die Kristallisation allgemein haben, sowohl bezüglich Erstkristallisation als auch Reproduktion, daß sie aber zumindest bei den näher untersuchten Kristallen keine negative Auswirkung auf ihre Eigenschaften als „Röntgenstrahlbrecher“ hatten. Das bedeutet, daß diese Methode – wider allen Erwartens – dazu genutzt werden kann, Kristalle zu liefern, die zur Strukturaufklärung geeignet sind.

Während man die eben diskutierten Faktoren, Konzentration und Verunreinigung, eigentlich nicht als Probleme dieses Ansatzes bezeichnen darf, sondern schlicht als einen Teil seiner Eigenschaften, stellte ein wirkliches Problem die Identifizierung der Kristalle dar. Nur in den allerersten Anfängen der Kristallisation standen Forscher vor dem Problem, nicht zu wissen, was sie kristallisiert hatten – und eben bei der Shotgun-Kristallisation, womit eine weitere Gemeinsamkeit mit der Frühzeit der Kristallisation zu Tage tritt. Dabei ist es heute eher eine Frage der Protein- bzw. Kristallmenge als eine Frage der Identifikationsmethode an sich. Die Se-

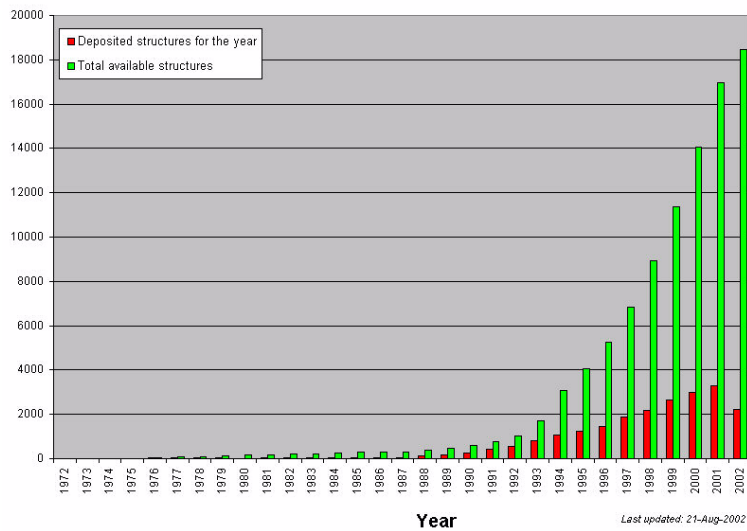


Abb. 21. Überblick über die Zunahme an in der Datenbank abgelegten Strukturen. Darunter fallen hier Proteine, Peptide, Viren, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate. Die Aufstellung beginnt im Jahr 1972. Zu finden unter: <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html#holdings>

quenzierung von Kristallen funktioniert hervorragend, und das Genom von *H. salinarum* ist durchsequenziert, d.h. eine Zuordnung der gefundenen Sequenz ist prinzipiell möglich. Doch die Voraussetzung dafür ist eine genügend große Protein- bzw. Kristallmasse. Das führt bei *einem* Kristall zu Schwierigkeiten, v.a., wenn man diesen auch zur Strukturlösung verwenden möchte. In diesem Fall wäre eine gute Reproduzierbarkeit nötig, die bei der Proteinkristallisation überhaupt und im Shotgun-Ansatz noch zusätzlich durch die Menge an unbekanntem Faktoren erschwert ist. Zwei Dinge könnten helfen: einmal die Verwendung noch sensiblerer Methoden zur Identifikation – bei MALDI reichen wenige Mikromol eines Proteins –, zum anderen ist es möglich, einen Kristall erst *nach* der Vermessung im Röntgenstrahl zu identifizieren, wie es in dieser Arbeit einmal erfolgreich gelungen ist. Es treten zwar durch die Strahlung mit hoher Wahrscheinlichkeit Schäden auch der Primärstruktur auf, doch sollten diese die Identifizierung weder über Sequenzierung noch über Massenspektroskopie erheblich stören (Weik, 2000).

Großangelegte Ansätze zur Charakterisierung von Proteinstrukturen (Proteomics) sind momentan hochmodern; die Zunahme an neu bestimmten Proteinstrukturen ist gewaltig (s. Abb. 21) – zur Zeit sind etwa 16700 Strukturen von Proteinen, Peptiden bzw. Viren bekannt (28.8.2002) - betrachtet man jedoch eine Statistik, welche die einzelnen Stufen vom klonierten Gen zur Proteinstruktur wiedergibt, sieht man, daß der Erfolg in der Strukturbestimmung gerade bei 10% liegt (s. Abb. 22), d.h. nur von 10% der Proteine, deren Gene kloniert wurden, konnte am Ende die Struktur gelöst werden (Chayen, 2002). Auf dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit bietet sich ein direkter Vergleich an: innerhalb kurzer Zeit konnten hier zwei (plus eine weitere außerhalb dieser Arbeit; Bieger, B., eingereicht) Proteinstrukturen gelöst werden – und das mit Hilfe einer Methode, die im ersten Moment durch das völlige Fehlen von Klonierungs- und gezielten Expressionsschritten, dafür durch das Brechen

von Kristallisationstabus sehr unsystematisch und wenig erfolgsversprechend wirken konnte – eine Methode zudem, die aufgrund ihrer Vielfalt, die zugleich eine Schwierigkeit darstellt, noch längst nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft hat. Dazu kommt, daß bisher überhaupt nur drei Kristallstrukturen löslicher halophiler Proteine bekannt waren, d.h. diese Zahl konnte mit Hilfe der Shotgun-Kristallisation schlicht verdoppelt werden. Ein Kristall (Ferritin) erreichte dabei die höchste Auflösung (1.2 Å), die je für ein halophiles Protein beobachtet werden konnte (hFdx, 1.9 Å). Damit konnten durch diese Arbeit erste Anfänge (1), wahre „Kristallisationstabus“ – bezüglich der Kristallisation aus verunreinigten Lösungen – in Frage zu stellen, untermauert und erweitert werden.

3.1.3 Kristalle der Shotgun-Kristallisation

Im Rahmen der Shotgun-Kristallisation war es möglich, eine Reihe von Proteinen (9) zu kristallisieren: sieben davon konnten identifiziert, von dreien konnte die Struktur gelöst werden. In Tabelle 5 sind alle Kristalle mit ihren Kristallisationsbedingungen und – falls identifiziert – mit den dazugehörigen Proteinen aufgeführt. Zusätzlich ist – soweit möglich – angegeben, wie groß die jeweiligen Proteine sind, in welcher Quartärstruktur sie vorliegen und welchen Kofaktor sie enthalten.

Zwei Kristalle konnten nicht identifiziert werden, die einen wegen ihrer geringen Größe, die anderen wegen frühzeitiger Auflösung.

Es fällt auf, daß v.a. Proteine kristallisiert wurden, die in oligomerem Zustand vorliegen und/oder einen Kofaktor enthalten. Beides sind bekanntermaßen Eigenschaften, die zur Stabilität eines Proteins beitragen (Korkin, 1999; Wittung-Stafshede, 2002). Innerhalb eines Oligomers bilden sich neben dem intrinsischen Zusammenhalt des monomeren Proteins (zusammengedehnten v.a. durch hydrophobe Kräfte) zusätzliche Kontakte aus, die den nativen Zustand stabilisieren. Über die Natur der Kräfte, die an den Zwischenflächen einzelner Monomere

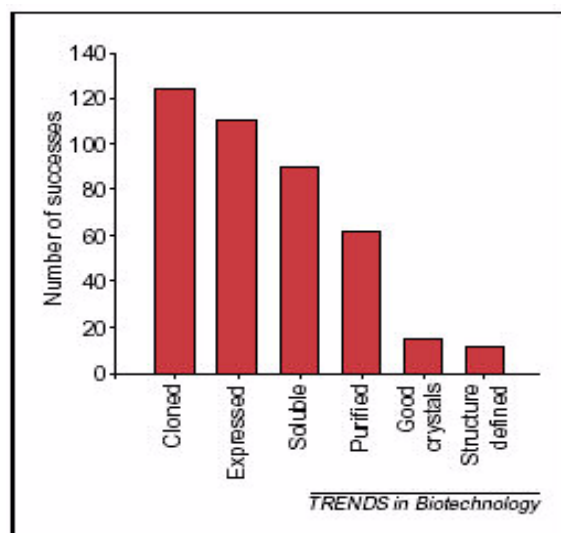


Abb. 22. Übersicht über den Erfolg der Strukturlösung. In diesem Histogramm ist die Erfolgsquote auf dem Weg vom klonierten Gen zur gelösten Struktur des dazugehörigen Proteins dargestellt. Aus: Chayen, 2002.

wirken, gibt es verschiedene Theorien: auch hier sind sicherlich hydrophobe Effekte beteiligt, doch hat sich in den letzten Jahren immer mehr gezeigt, daß auch elektrostatische Wechselwirkungen einen mehr oder weniger großen Anteil daran haben (Larsen, 1998). Speziell bei halophilen Proteinen scheinen Salzbrücken eine wichtige Rolle zu spielen: Untersuchungen der Malat-Dehydrogenase aus *H. marismortui*, die in ihrem nativen Zustand als Tetramer vorliegt, haben gezeigt, daß sich bei der Oligomerisierung (entspricht bei der hMDH dem Zusammenschluß zweier Dimere) ausgeprägte Salzbrücken zwischen beiden Dimeren ausbilden (Richard, 2000; Madern, 2000b). Stabilisierung durch Oligomerisierung – ein Phänomen, das ebenfalls bei thermophilen Proteinen beobachtet wird: die Untersuchung einiger tetramerer Malat-Dehydrogenasen von thermophilen im Vergleich zu mesophilen Organismen sowie zweier Alkohol-Dehydrogenasen bestätigte, daß mit gesteigerter Hitzestabilität v.a. eine verstärkte Interaktion zwischen den Untereinheiten einhergeht. Dadurch findet eine Reduktion von Protein-Innenräumen und eine dichtere Packung der einzelnen Monomere statt (Korkhin, 1999; Dalhus, 2002). Auch bei den thermophilen Organismen ist meist eine gesteigerte Anzahl von Salzbindungen an der Interaktion beteiligt.

Kofaktoren konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß sie oft zur Stabilität der nativen Proteinstruktur beitragen und daß ihre Anwesenheit z.T. sogar für die Faltung essentiell ist (Wittung-Stafshede, 2002). Die hMDH wird unter niedrigen Salzkonzentrationen durch ihren Kofaktor NADH stabilisiert, bei ihrer Reaktivierung und Rückfaltung zum Tetramer bewirkt die Anwesenheit von NADH eine höhere Ausbeute. Allerdings ist in letzterem Fall auch eine ausreichende Menge an Salz notwendig, NADH allein reicht nicht aus, d.h. Ionen spielen bei der Oligomerisierung eine wichtige Rolle (vgl. oben: Salzbrücken; Hecht, 1989; Madern, 1997; Richard, 2000). Auch der halophile Elongationsfaktor Tu wurde in Anwesenheit seines Kofaktors GDP untersucht, der ebenso eine stabilisierende Wirkung zeigte (Ebel, 1992). Bis jetzt wurde die protektive Wirkung von Kofaktoren auf halophile Proteine jedoch noch nicht systematisch untersucht (Mader, 2000a).

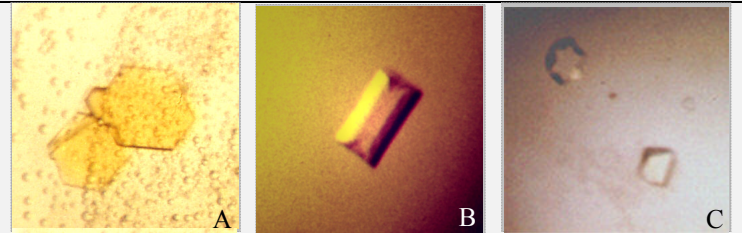
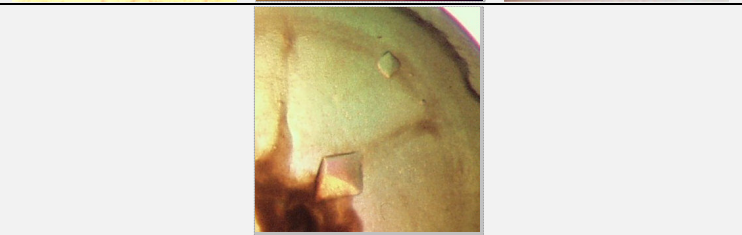
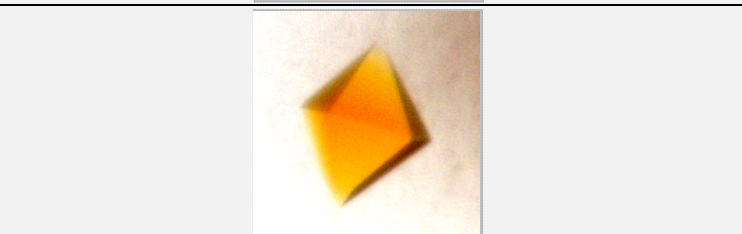

Betrachtet man die wenigen halophilen löslichen Proteine, die bisher kristallisiert worden sind, sieht man, daß es sich dabei mit Ausnahme der hMDH (Tetramer) um Monomere handelt (hvDHFR, hFdx). Dabei enthielt das Ferredoxin aus *H. marismortui* einen Eisen-Schwefel-Cluster als Kofaktor, die hMDH wurde sowohl mit als auch ohne Kofaktor NADH kristallisiert (Frolow, 1996; Dym, 1995; Richard, 2000).

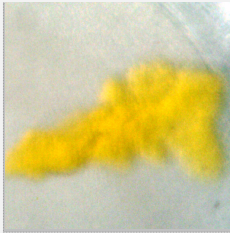



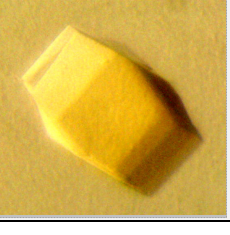
Zusätzlich zu den beiden Punkten Oligomerisierung und Kofaktorbindung wird seit langem angenommen, daß neutrale Salze wie Ammoniumsulfat, aber auch Osmolyte wie Methylamine den oligomeren Zustand von Proteinen stabilisieren (Yancey, 1982). Ob die Konzentrationen der Osmolyte in diesem Ansatz für eine Stabilisierung ausreichen, bleibt fraglich.

Der hohe Prozentsatz an Oligomeren bzw. Kofaktor-enthaltenden Proteinen, die in dieser Arbeit kristallisiert wurden, schließt einen Zufall weitgehend aus. In diesem Zusammenhang wäre es jedoch interessant, herauszufinden, wie viele der Proteine von *H. salinarum* ohnehin in oligomerem Zustand vorliegen bzw. einen Kofaktor binden. Die Betrachtung von modellierten Proteinstrukturen (Essen, unveröffentlicht) und ein Vergleich mit homologen Proteinen könnte diese Frage sicher ansatzweise beantworten. Da oligomere Proteine wohl eher die Regel als die Ausnahme sind (Larsen, 1998), ist es nicht unwahrscheinlich, daß auch bei *H. salinarum* ein wesentlicher Prozentsatz der Proteine als Oligomer existiert. Damit würde sich allerdings das oben dargestellte Ergebnis, daß v.a. oligomere und/oder Proteine mit Kofaktor kristallisieren, relativieren.

Es dürfte schwierig sein, eine allgemein gültige Behauptung aufzustellen, warum gerade diese Proteine in der Arbeit kristallisiert wurden, da mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere Faktoren zusammengetroffen sind. Es ist anzunehmen, daß eine geeignete strukturelle Voraussetzung (Oligomer, Kofaktor), aber auch möglicherweise ein vermehrtes Auftreten des jeweiligen Proteins in der Zelle (Streßprotein, essentielles Stoffwechselprotein) eine Rolle gespielt haben. Vielleicht handelt es sich bei diesen Proteinen durch ihre Strukturbesonderheiten um Grenzfälle: es sind halophile Proteine, deren spezieller Charakter eine vorübergehende Salzarzut nicht mit irreversibler Denaturierung bestraft. Weitere Hinweise auf die Unterschiede von halophilen Proteinen zu ihren nicht-halophilen Vertretern werden im Zusammenhang mit den beiden in dieser Arbeit gelösten Strukturen diskutiert werden.

Tab. 5. Darstellung von Proteinkristallen, die im Rahmen der Shotgun-Kristallisation gefunden wurden. Neben einer Abbildung des jeweiligen Kristalls bzw. der verschiedenen Kristallformen (Ferritin: A, B, C) sind die Wachstumsbedingungen, das entsprechende Protein und weitere Angaben zu Protein und Arbeitsstatus aufgelistet, soweit der Kristall identifiziert werden konnte. Die Angaben in Klammern hinter den Wachstumsbedingungen beziehen sich auf die Numerierung im *Hampton*-Screen I bzw. zeigen, daß es sich um spezielle Bedingungen der Fein-Suche handelte. Fragezeichen hinter Angaben zum Molekulargewicht bedeuten, daß es sich um den aus der Primärsequenz theoretisch berechneten Wert handelt (entnommen: <http://www.halolex.mpg.de>).

Kristall	Wachstumsbedingung (Hampton-Screen/ Fein-Suche)	Protein	Größe [kDa]	Quartärstruktur/ Cofaktor	Momentaner Stand der Arbeit
	30% PEG 400 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Na-Hepes, pH 7.5 <i>(I/23)</i>	Ferritin	20	Dodekamer/ Eisen	3D-Struktur
	25% PEG 4000 0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1 M Na-Acetat, pH 4.6 <i>(I/20)</i>	Glyzerin- Dehydrogenase	38	(wahrscheinlich) Oktamer/ Zink	3D-Struktur
	30% PEG 400 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Na-Hepes, pH 7.5 <i>(I/23)</i>	Dodecin	14	Dodekamer/ Flavin	3D-Struktur (nicht im Rahmen dieser Arbeit, Bieger, eingereicht)
	30% PEG 4000 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Tris/Cl, pH 8.5 <i>(I/6)</i>	Ferredoxin	14	Monomer/ Eisen-Schwefel- Cluster	Identifiziert (NMR-Struktur, Marg, 2001)

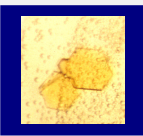
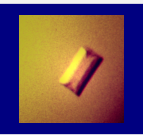
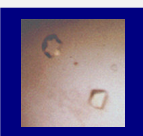
		20% PEG 4000 0.1 M Na-Acetat, pH 4.6 (Fein-Suche)	Imidazol-Glyzerin- Phosphat- Dehydratase	83	Hefe: wahrscheinlich Tetraikosamer/ Vanadium (Peterson, 1997)	Identifiziert
		30% PEG 400 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Na-Hepes, pH 7.5 (I/23)	Catalase- Peroxidase	80 ?	<i>H.marismortui</i> : Dimer/ Häm (Yamada, 2002)	Identifiziert (nicht im Rahmen dieser Arbeit, Bieger, B.)
		30% PEG 400 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Na-Hepes, pH 7.5 (I/23)	Proteasom, -Untereinheit	27 ?	Hefe/ <i>Thermo- plasma</i> : Oktaikosamer (Groll, 1997; Loewe, 1994)	Identifiziert (nicht im Rahmen dieser Arbeit, Bieger, B.)
		18% PEG 8000 0.2 M Zn-Acetat 0.1 Na-Cacodylat, pH 6.5 (I/45)	???	??	-	-
		30% PEG 4000 0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (I/31)	???	??	-	-

3.2 Shotgun-Kristallisation: Ferritin

3.2.1 Struktur

3.2.1.1 Kristallformen und Qualität der Daten

In dieser Arbeit wurden mittels der Shotgun-Kristallisation (s. Kap. 3.1) in einer Reihe von Zyklen (Aufschluß der Zellen über French Press oder Taurodesoxycholat; Anionenaustauscherchromatographie mit/ohne Gelfiltration) drei Kristallformen (A, B, C, s. Tab. 5/6) erhalten, die über N-terminale Sequenzierung dem Ferritin von *H. salinarum* (Halolex: OE4427R) zugeordnet werden konnten (s. <http://www.halolex.mpg.de>).

Kristall	Kristallform	Kristallmaße [mm]	Auflösung [Å]	Raumgruppe	Zellmaße [Å]
	A	0.3-0.8	2.8/1.8	P321	a = 91.13/90.75 b = 91.13/ 90.75 c = 150.42/149.4
	B	Länge: 0.5 Breite: 0.2	3.2	P3 ₁ 21	a = 91 b = 91 c = 223
	C	0.3	-	-	-

Tab. 6. Darstellung der drei Kristallformen, die für das halobakterielle Ferritin erhalten wurden. Auf die Bezeichnung der Kristallformen wird im Text Bezug genommen. Von Kristallen der Form A wurden zwei Datensätze (A.1/ A.2) gemessen, die dazugehörigen Auflösungen bzw. Zellmaße sind hier durch Schrägstrich getrennt. Die Kristalle konnten mithilfe der Shotgun-Kristallisation erhalten werden, näheres zum Aufschluß der Zellen und zur Fraktionierung des Zytosols findet sich in Material und Methoden (Kap. 2.5.1 und 2.5.2).

Die Ursache für die Bildung dieser drei unterschiedlichen Formen muß auf die Zusammensetzung der Proteinlösung bzw. der Probenbereitung zurückzuführen sein, da jeweils der gleiche Puffer verwendet wurde: 30% PEG 400, 0.2 M MgCl₂, 0.1 M Na-Hepes, pH 7.5 (Hampton Screen I, 23). Die beiden Formen A und B wurden in mehreren Kristallisationszyklen gefunden, Form A wurde zur Strukturlösung eingesetzt. Von Kristallform B konnte zwar ein entlang der 2-fachen Achse (entspricht der c-Achse) stark vertwinnter Datensatz aufgenommen

werden, dieser wurde jedoch zur Strukturlösung nicht verwendet. Auffällig sind die Einkerbungen an den schmalen Enden der Säulchen, ein Merkmal, das auf zu schnelles Wachstum und einen damit einhergehenden Mangel an neuen Wachstumseinheiten zurückgeführt werden kann (McPherson, 1990). Die dritte Form C wurde nur ein einziges Mal beobachtet und zum Sequenzieren eingesetzt. Von Kristallform A konnten zwei Datensätze aufgenommen werden, wobei der eine Kristall (A.1) bis 2.8 Å, der andere (A.2) bis 1.8 Å streute. Für A.1 wurde die trigonale Raumgruppe P321 mit den Zellmaßen $a = b = 91.13$ Å, $c = 150.42$, für A.2 dieselbe Raumgruppe mit den Maßen $a = b = 90.75$ Å, $c = 149.4$ Å ermittelt (s. Tab. 6). In beiden Kristallen wurde ein Tetramer pro asymmetrischer Einheit gefunden, was einen berechneten Solvensgehalt von 38% ergab (Matthews, 1968). Da der Puffer, in dem sich die Kristalle gebildet hatten, durch PEG 400 bereits „kryokompatibel“ war, konnten die Kristalle direkt für die Datensammlung in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Sammlung der Datensätze erfolgte für Kristall A.1 an der beamline ID14-2/ESRF, für Kristall A.2 an der Beamline BM14/ESRF, Grenoble, beide wurden mit einem ADSC Q4 Detektor aufgenommen. Die Vollständigkeit der Daten betrug 87.0% mit einem R_{merge} von 0.082 (A.1) bzw. 99.6% mit dem R_{merge} von 0.104 (A.2; s. Tab. 7). Ein dritter Datensatz konnte am Ende der Arbeit aufgenommen werden, in dem eine Auflösung von 1.2 Å erzielt wurde. Die Auswertung ist in Bearbeitung.

3.2.1.2 Phasenbestimmung

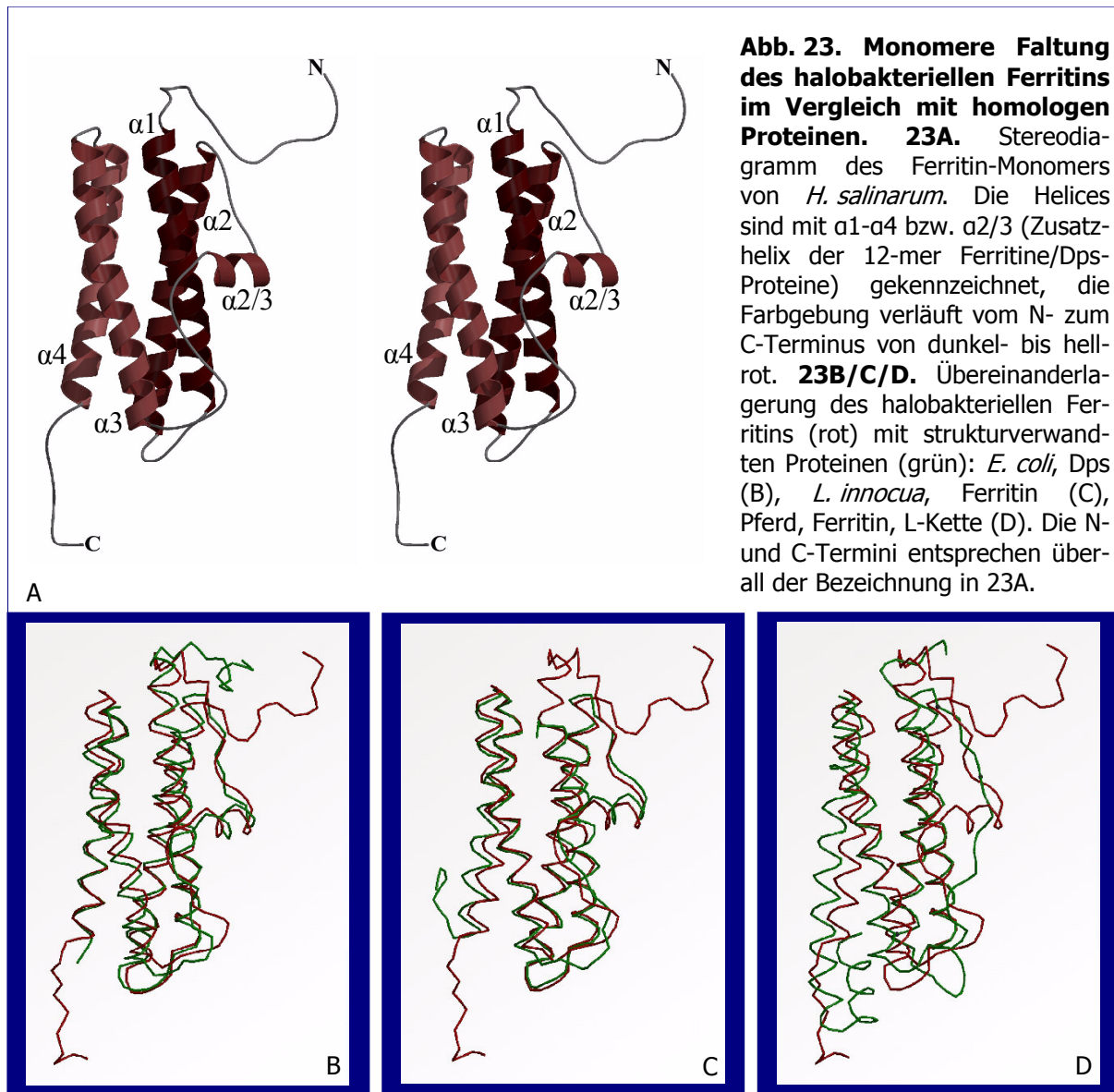
Die Struktur des Ferritins konnte mit Hilfe eines nicht vertwinnten Datensatzes des Kristalls A.1 durch die Methode des molekularen Ersatzes bis zu einer Auflösung von 2.8 Å bestimmt werden. Das tetramere Suchmodell wurde aus den Molekülen A, C, I und K des Dps von *E. coli* (PDB Code: 1DPS; Grant, 1998) erstellt, wobei jede Kette die Reste 25-167 enthielt. Entscheidend waren dafür genaue Analysen der Selbstrotationsfunktion des Datensatzes und die Annahme einer isometrischen Packung. Dies führte zu der Schlußfolgerung, daß es sich bei der Struktur um ein Dodekamer mit einer 23-Symmetrie bei (0.0, 0.0, 0.3) handelt, dessen dreizählige Achse mit der kristallographischen dreizähligen Achse übereinstimmte. Nach der Rotations- und Translationssuche ergab sich für die beste Lösung ein Korrelationskoeffizient von 16.4% und ein R-Faktor von 54%.

3.2.1.3 Verfeinerung und Qualität des Modells

Das Anfangsmodell wurde mit „NCS restraints“ („Non Crystallographic Symmetry“-Einschränkungen) für Daten zwischen 25 und 2.8 Å bis zu einem R-Faktor/freien R-Faktor von 20.6/26.0% verfeinert. Die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarten zeigten auch für die im Modell fehlenden Bereiche am N- und C-Terminus sowie für die drei zusätzlichen Reste (s. 3.2.1.4) im $\alpha 3/\alpha 4$ -Loop eine klar definierte Elektronendichte. Die Endstruktur konnte im folgenden mit Hilfe des ersten Modells und eines zweiten Kristalls der Form A (A.2), der einen fast hemihedral verzwillingten Datensatz (43%) lieferte, durch weitere Verfeinerung bis zu 1.8 Å gewonnen werden. Das Endmodell weist für Daten zwischen 30 und 1.8 Å einen verzwillingten R-Faktor/freien R-Faktor von 15.3/18.8% auf; es enthält pro asymmetrischer Einheit vier Ferritin-Moleküle mit insgesamt 705 Aminosäureresten, 6 Fe^{3+} -Ionen, 4 Mg^{2+} -Bindungsstellen, 2 Na^+ -Ionen und 299 Wassermoleküle. Alle Polypeptidketten waren von Ala7 bis Leu181 durch Elektronendichte klar definiert, zusätzlich war der N-Terminus der Kette A und Symmetrieverwandter Monomere bis zu Ser2 verlängert. Dieser Bereich dient dazu, im Kristall Kontakte mit der Kette A eines benachbarten Dodekamers herzustellen. Eine tabellarische Übersicht über die Statistik findet sich im Anhang (s. Kap. 6.4.1).

3.2.1.4 Struktureller Vergleich mit anderen Proteinen der Bacterioferritin/Ferritin Superfamilie

Das archaeale Ferritin zeigt in seiner monomeren Form das typische 4-Helix-Bündel, das man sowohl bei Ferritinen als auch in der Dps-Familie generell findet (Abb. 23A). Dabei sind 118 von 182 Resten (65%) Bestandteil von α -Helices. Helix $\alpha 2$ und $\alpha 3$ sind durch einen längeren unregelmäßig geformten Bereich verbunden, der in der Mitte von einem kurzen helikalen Segment $\alpha 2/3$ (Pro96 bis Ala103) unterbrochen wird; dieses Segment findet sich nicht in 24-mer Ferritinen, sondern ist beschränkt auf 12-mer Ferritine und das Dps von *E. coli* (vgl. Abb. 23B-D). Eine Übereinanderlagerung des Monomers von *H. salinarum* mit dem von *L. innocua* bzw. *E. coli* (Abb. 23B/C) ergibt einen *rmsd* Wert von 1.34 Å (für 158 C -Positionen) bzw. 1.27 Å (für 149 C -Positionen). Strukturelle Unterschiede zu den eubakteriellen Homologen sind bevorzugt im $\alpha 3/\alpha 4$ -Loop zu finden, der im halobakteriellen Ferritin drei zusätzliche Aminosäurereste enthält, außerdem besitzt letzteres einen um 5 Reste längeren N-Terminus (Ser2-Asn6). Die C-terminale Region unterscheidet sich von der Form her klar sowohl von dem *Listeria*-Ferritin, das hier eine Art „Haken“ ausbildet, der zur Stabilisation des Dodekamers an der dreizähligen Symmetrieachse entlang beiträgt (Ilari, 2000), als auch von 24-mer Ferritinen. Diese, z.B. die L-Kette vom Pferdeferritin (*rmsd* 1.68 Å für 169 C -Posi-



tionen; Abb. 23D), sind durch eine C-terminale fünfte Helix gekennzeichnet, die im 60° -Winkel zum 4-Helix-Bündel abgknickt ist und das oligomere Protein entlang der Kontakte an der vierzähligen Symmetrieachse stabilisiert (Boyd, 1985; Hempstead, 1997).

Geht man vom Monomer zum Oligomer über, so erkennt man, daß sich das halobakterielle Ferritin zu einem Homododekamer mit einer 23-Symmetrie assembliert (s. Abb. 24), d.h. es fehlt die zusätzliche vierzählige Achse, die 24-mer Ferritine aufweisen. Ein Vergleich der schematischen Darstellungen eines 24- und eines 12-mer Ferritins (s. Abb. 25) zeigt deutlich den Unterschied in der Symmetrie. Die Abbildung des 12-mer Ferritins stimmt insofern mit der tatsächlichen Gestalt eines Ferritin-Dodekamers überein, daß ein Fünfeck einem Monomer entspricht, das mit je fünf anderen Monomeren in Kontakt steht. Allerdings hat ein Monomer de facto dieselbe schematische Form wie in der Abbildung des 24-mer Ferritins. Das

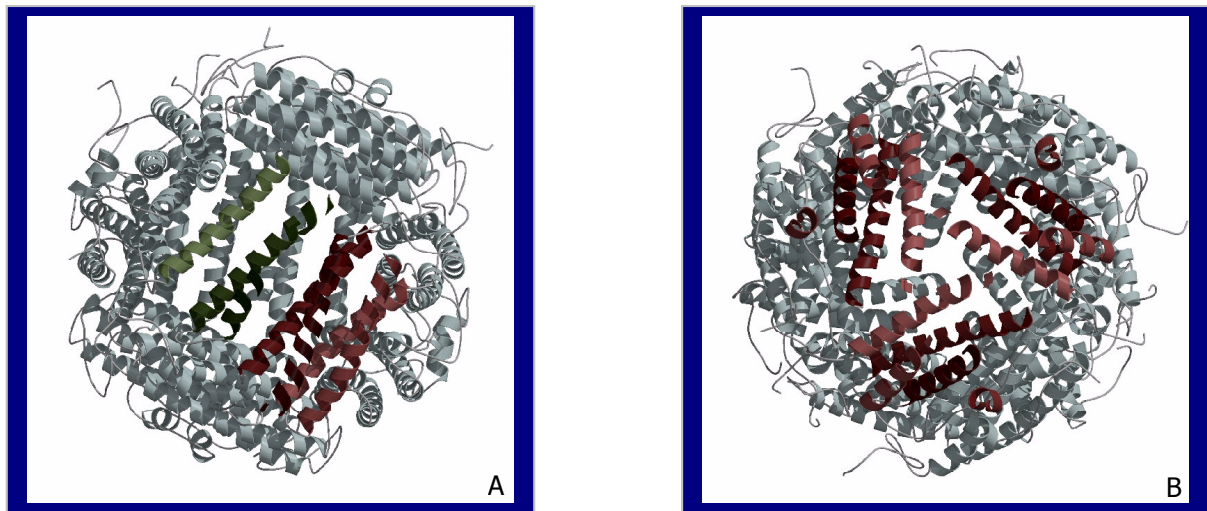


Abb. 24. Dodekamere Gestalt des Ferritins von *H. salinarum*. Im Vergleich sind zwei Ansichten dargestellt: entlang einer zweizähligen (A) und entlang einer dreizähligen Achse (B). Jeweils symmetrieverwandte Monomere sind in grün und rot (A) bzw. nur in rot (B) hervorgehoben. Das Dimer aus Abb. 24A findet sich in Abb. 27 wieder.

innere Volumen des halobakteriellen Dodekamers beträgt 44.7 nm^3 , was etwa dem Volumen des Dps aus *E. coli* von 45.8 nm^3 entspricht. Beide Proteine besitzen damit ein deutlich geringeres Volumen als das *Listeria*-Ferritin (55.2 nm^3), was sich damit erklären läßt, daß im Dodekamer von *L. innocua* Helix $\alpha 4$ um 2.1 \AA nach außen verschoben ist. Dies wird deutlich, wenn man die Dodekamere aufeinander legt (nicht abgebildet). Helix $\alpha 4$ ist ebenso wie Helix $\alpha 2$ zum Inneren des Dodekamers gewandt, letztere nimmt jedoch in allen drei Proteinen von *H. salinarum*, *E. coli* und *L. innocua* eine nahezu identische Position ein. Die funktionelle Rolle von Helix $\alpha 2$ wird zudem durch eine – bei 12-mer Ferritinen – konservierte Eisenbindungsstelle und eine Anhäufung von Carboxylatresten unterstrichen, die der Nukleationsstelle für Eisen in den L-Ketten der Säugetierferritine ähnelt (s. 3.1.2.2).

Ein Vergleich der Primärsequenzen zeigt, daß sich die Homologien ansatzweise auch aus den Primärsequenzen ablesen lassen (s. Abb. 26): die Identität/Ähnlichkeit des *H. salinarum* Ferritins zur Dps-Sequenz aus *E. coli* beträgt 22/ 41%, die Sequenzen von *L. innocua* und *H. salinarum* sind zu 21/ 38% identisch/ähnlich.

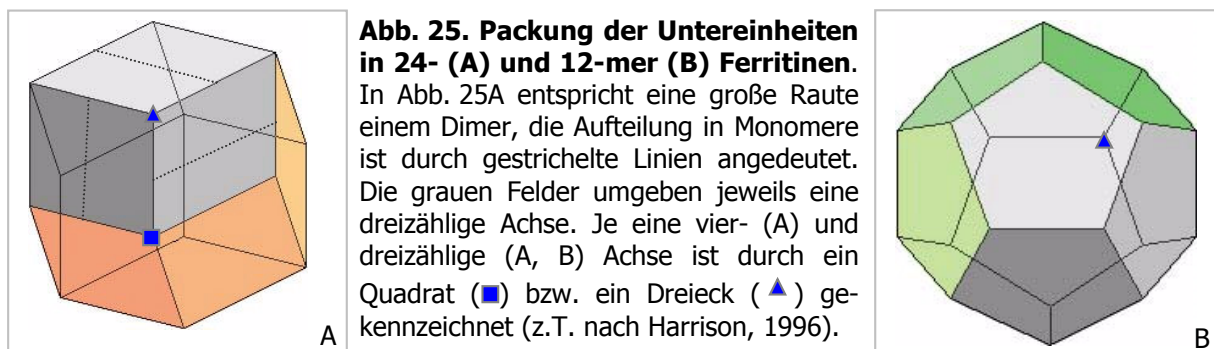


Abb. 25. Packung der Untereinheiten in 24- (A) und 12-mer (B) Ferritinen.

In Abb. 25A entspricht eine große Raute einem Dimer, die Aufteilung in Monomere ist durch gestrichelte Linien angedeutet. Die grauen Felder umgeben jeweils eine dreizählige Achse. Je eine vier- (A) und dreizählige (A, B) Achse ist durch ein Quadrat (■) bzw. ein Dreieck (▲) gekennzeichnet (z.T. nach Harrison, 1996).

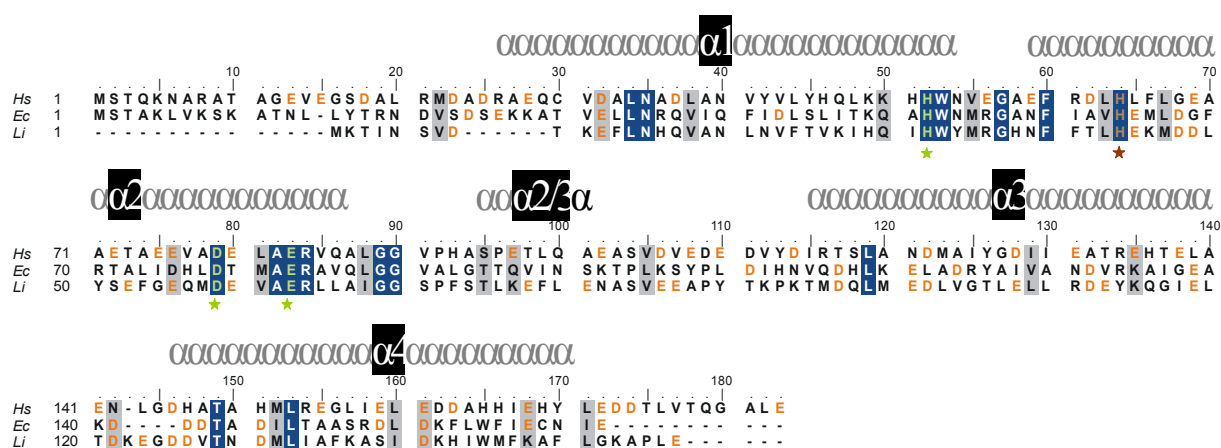


Abb. 26. Sequenzvergleich der 12-mer Ferritine aus *H. salinarum* bzw. *L. innocua* sowie des Dps aus *E. coli*. Die Lage der Helices wurde anhand der halobakteriellen Struktur gewählt, ihre Numerierung entspricht der in Abb. 23A. Die Eisenbindungsstelle vom Typ I ist mit grünen Sternen bezeichnet, der braune Stern markiert als vierten putativen Bindungspartner das zweite Histidin. Alle sauren Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) sind rot hervorgehoben. Hs, *H. salinarum*, Ec, *E. coli*, Li, *L. innocua*.

3.2.2 Eisenbindung und -assimilation

3.2.2.1 Bindungsstellen für Eisen

Um Eisen zu speichern, muß Ferritin aufgenommenes Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidieren, was mit großer Wahrscheinlichkeit an einem „Zwei-Eisenatom“-Ferroxidase-Zentrum stattfindet (Hempstead, 1994). An Nukleationsstellen auf der inneren Oberfläche des Proteins können sich anschließend Nukleationskeime aus Fe^{3+} bilden, die allmählich zu dem Ferritin-Eisenkern anwachsen können (Boyd, 1985). Daß auch das halobakterielle Ferritin die Fähigkeit besitzt, Eisen zu speichern, konnte durch den Nachweis von bis zu 100 Eisenatomen pro Dodekamer nach Aufreinigung des Proteins gezeigt werden (Reindel, 2002). Es ist zwar nicht möglich, diesen undifferenzierten Eisenkern im Kristall zu sehen, doch konnten pro Ferritin-Dodekamer insgesamt 16 strukturell gebundene Eisenatome nachgewiesen werden. Zwölf dieser Bindungsstellen befinden sich an der Grenzfläche zwischen je zwei Monomeren (Typ I), vier weitere an den dreizähligen Symmetrieachsen (Typ II).

Die *Typ I-Bindungsstelle* (s. Abb. 27) wurde als gänzlich neuartig im *Listeria*-Ferritin entdeckt und scheint nach Sequenz- und Strukturvergleichen auf 12-mer Ferritine beschränkt zu sein (s. Abb. 26 und 29; Ilari, 2000; Tonello, 1999; Papinutto, 2002). Das Eisenatom ist (oktaedrisch) koordiniert von drei Aminosäureresten und zwei Wassermolekülen (s. Abb. 27: dort W164 und W165). Beteiligt sind je das His52 von einer Untereinheit sowie zwei saure

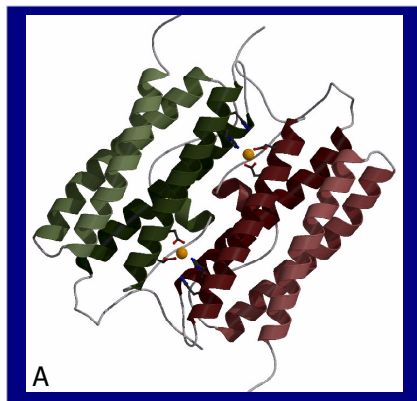
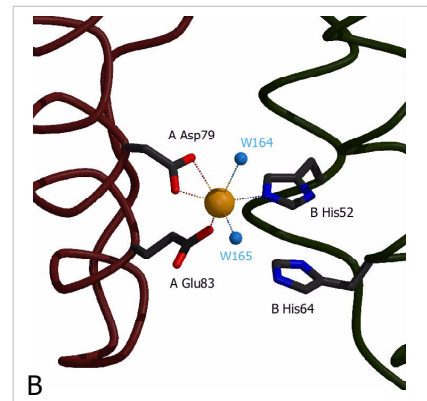


Abb. 27. Bindungsstelle vom Typ I. Abb. 27A zeigt zwei Bindungsstellen dieses Typs zwischen zwei Monomeren (hier A und B), in B ist das Eisenatom (gelb) mit den drei Aminosäureliganden und den beiden Wassermolekülen vergrößert dargestellt (die Farbgebung in rot bzw. grün entspricht Abb. 24A).



Reste Asp79 und Glu83 von der über eine zweifache Symmetrie verwandten Untereinheit. Alle Atom-Abstände sind Tab. 7 zu entnehmen. Im Gegensatz zu 24-mer Ferritinen, die eine Bindungsstelle *innerhalb eines Monomers* aufweisen (Hempstead, 1994; Lawson, 1989), liegt der hier vorgestellte Typ I somit *zwischen zwei Monomeren* (s. Abb. 28).

Die halobakteriellen Liganden His52, Asp79 und Glu83 entsprechen im *Listeria*-Ferritin His31, Asp58 und Glu62 (s. Abb. 26 und 28). Diese Bindungsstelle wird von Ilari *et al.* (2000) als „Zwei-Eisenatom“-Ferroxidase-Zentrum vorgeschlagen analog dem Ferroxidase-Zentrum der H-Kette in Säugetier-Ferritinen (Hempstead, 1994). Ein zweites Histidin (*Listeria*: His43, *Halbac terium*: His64) soll dabei als Bindungsstelle für das zweite Eisenatom dienen (s. Abb. 26). Sowohl im Ferritin von *H. salinarum* als auch in dem von *L. innocua* konnte jedoch pro Typ I-Bindungsstelle nur ein Eisenatom in der Struktur gefunden werden. Anders als bei *H. salinarum* befindet sich im *Listeria*-Ferritin an der putativen Bindungsstelle des zweiten Eisenatoms ein Wassermolekül (H₂O:O - His43:NE2: 2.7 Å; Ilari, 2000), während W165 des halobakteriellen Ferritins, das etwa der Lage des *Listeria*-Wassermoleküls ent-

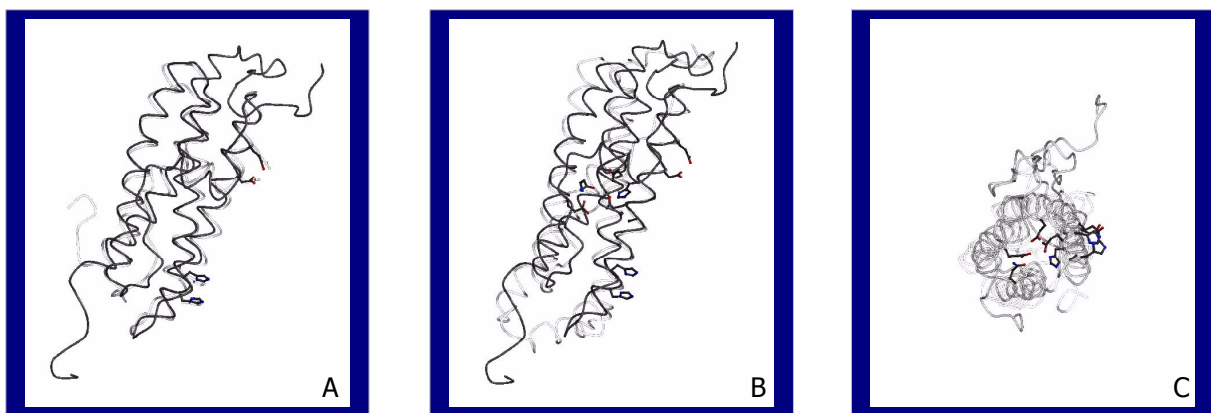


Abb. 28. Vergleich der halobakteriellen Eisenbindungsstelle vom Typ I mit den entsprechenden Stellen bei *L. innocua* und in der H-Kette des humanen Ferritins (1FHA). Dem halobakteriellen Ferritin (dunkelgrau) ist jeweils das homologe Protein (hellgrau, transparent) aufgelagert. **28A.** *L. innocua*. **28B.** 1FHA von der Seite. **28C.** 1FHA von oben. Die Aminosäurereste, die als Eisenliganden fungieren, sind gesondert dargestellt.

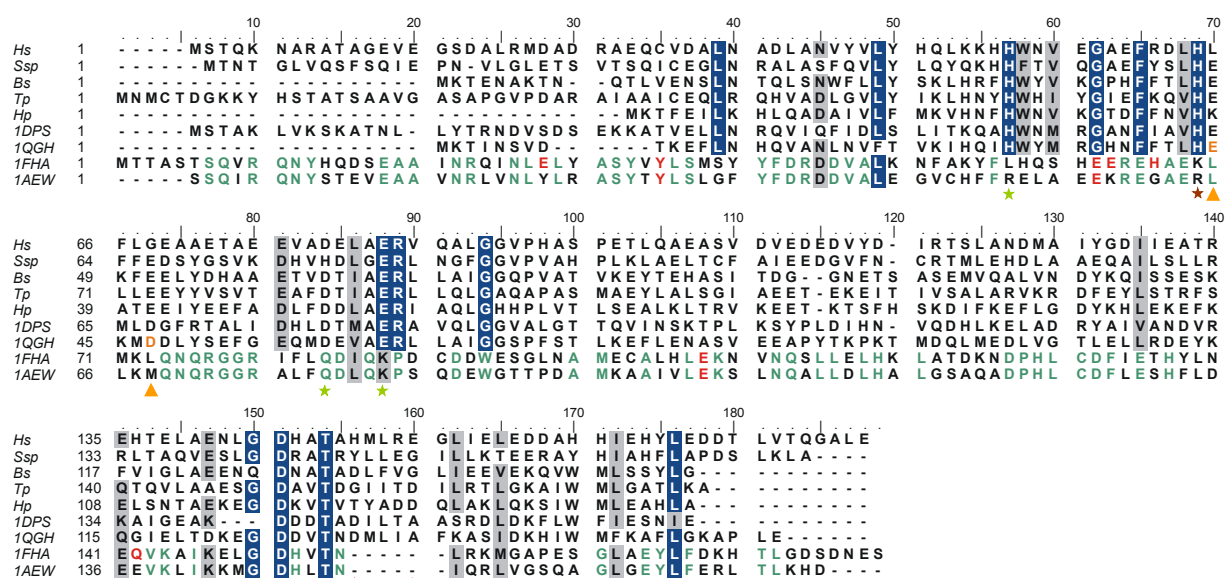


Abb. 29. Sequenzvergleich mehrerer Ferritine und Dps-Proteine. Neben prokaryontischen Proteinen sind hier zusätzlich zwei eukaryontische Ferritine dargestellt: 1FHA, H-Kette des humanen Ferritins und 1AEW, L-Kette des Ferritins vom Pferd. Bei homologen Proteinen, deren Strukturen bekannt sind, ist der pdb-Code angegeben. Die Farbhinterlegung ist gleich derjenigen in Abb. 23, identische Reste der beiden eukaryontischen Ferritine sind grün, die konservierten Eisenbindungsstellen der Ferritin-H-Kette rot dargestellt. Sterne markieren Eisenbindungsstellen: Typ I: grün/braun, Typ II: rot. Die Dreiecke markieren die putative Eisennukleationsstelle im *Listeria*-Ferritin. Hs, *H. salinarum*, Ferritin; Ssp, *Synechococcus* sp. 7942, Dps; Bs, *Bacillus subtilis*, MrgA; Tp, *Treponema pallidum*, putatives Bacterioferritin ; Hp, *Helicobacter pylori*, Nap (Evans, 1995); 1DPS, *E. coli*; 1QGH, *L. innocua*; 1FHA, humanes Ferritin; 1AEW, Ferritin vom Pferd. Schwellenwert: 77.

sprechen würde, zu weit entfernt liegt ($H_2O:O - His64:NE2: 3.63 \text{ \AA}$). Da das zweite Histidin ebenso wie die drei Liganden des ersten Eisenatoms innerhalb der Sequenzen bekannter 12-mer Ferritine und auch der Dps-Familie hoch konserviert ist (s. Abb. 29), ist es nicht unwahrscheinlich, daß es sich bei dieser Bindungsstelle tatsächlich um eine Art „Zwei-Eisenatom“-Ferroxidase-Zentrum handelt. Weiterhin wird von den oben erwähnten Autoren ein möglicher Mechanismus formuliert, wie der Weg der Eisenoxidation und -nukleation in *L. innocua* verlaufen könnte: ein Fe^{2+} wird von His31, Asp58 und Glu62 gebunden und anschließend oxidiert. Danach wechselt es als Fe^{3+} an die zweite mutmaßliche Bindungsstelle (His43, Glu62) – während das nächste Fe^{2+} seinen ursprünglichen Platz einnimmt – und von dort aus zu zwei weiteren negativ geladenen Resten (Glu44 und Asp47), die als Eisennukleationsstelle fungieren sollen. Auch in anderen 12-mer Ferritinen sowie Dps-Proteinen sind die letztgenannten sauren Reste konserviert (s. Abb. 29) – mit Ausnahme des halobakteriellen Proteins: hier sind Glu44 bzw. Asp47 durch Leucin bzw. Glycin (Leu65, Gly68) ersetzt. Da das Ferritin von *H. salinarum* jedoch immer noch Eisen assemblieren kann (Reindel, 2002), bleibt es fraglich, ob das Modell der Eisennukleation von Ilari *et al.* (2000) generell anwendbar ist. Zu erwähnen ist noch, daß für das Dps von *E. coli* zwar keine Eisenbindung

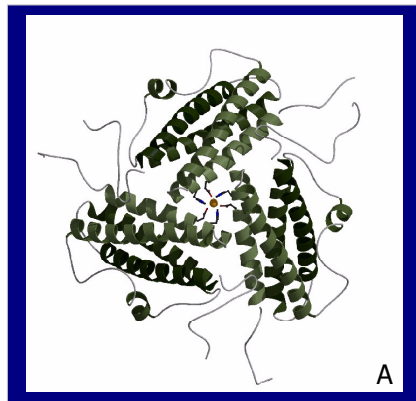
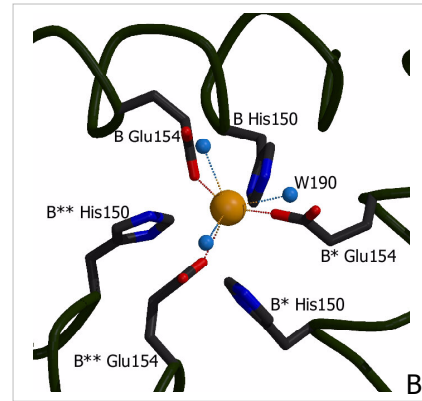


Abb. 30. Bindungsstelle vom Typ II. 30A. Bindungsstelle dieses Typs zwischen drei Monomeren, hier B, B* und B**. **30B.** Schematische Darstellung der Bindungsstelle: Eisenatom (gelb) mit den drei Glutamatliganden (Glu154). Zusätzlich sind die stabilisierenden Histidinreste (His150) abgebildet.



nachgewiesen werden konnte, an der entsprechenden Stelle der Eisenbindung in *H. salinarum* bzw. *L. innocua* jedoch ein Bleiatom gefunden wurde (Grant, 1998).

Für eine rasche Bildung des Eisenkerns im Ferritin ist es günstig, wenn Nukleationsstellen auf der inneren Proteinoberfläche vorhanden sind, an denen sich Eisenkeime ausbilden können. Ein Kandidat für eine derartige Nukleationsstelle in *H. salinarum* ist die *TypII-Bindungsstelle* (s. Abb. 30), an der das Eisen von drei Symmetrie-verwandten Glutamat (Glu154)-Resten und drei ebenfalls über eine dreifache Symmetrieachse verwandte Wassermoleküle komplexiert wird. Die Atom-Abstände sind in Tab. 7 angegeben. Die Konformation der Glutamat-Reste ist jeweils durch eine Wasserstoffbrücke zu einem Histidin (His150) stabilisiert (s. Tab. 7). Dieser Typ II ist einzigartig für das Ferritin von *H. salinarum*, da die Reste Glu154 und His150 in anderen 12-mer Ferritinen und Dps-Proteinen nicht konserviert sind (s. Abb. 29).

Typ der Bindungsstelle	Bindungspartner	Abstand [Å]
I	His52: NE2 - Fe	2.3
I	Asp79: OD2 / OD1 - Fe	2.2 / 2.6
I	Glu83: OE1 - Fe	2.0
I	H ₂ O: O - Fe	2.0
I	H ₂ O: O - Fe	2.5
II	3 x Glu154: OE2 – Fe	2.4
II	3 x H ₂ O: O – Fe	2.9
II	3 x Glu154: OE2 - 3x His150: NE2	2.7
II	3 x Arg153: NH1 - 3 x Arg153: NH1	4.1
II	3 x Glu141: OE2 - 3 x Arg153: NH2	2.8

Tab. 7. Atomare Abstände in den beiden Eisenbindungsstellen. Die Tabelle zeigt die jeweiligen Bindungspartner und ihre Abstände in Å. Der Typ der Bindungsstelle ist in der ersten Spalte angegeben.

3.2.2.2 Mögliche Eintrittsstelle für Eisen (Fe^{2+})

Wie bereits erwähnt (3.2.2.1), bestehen signifikante Unterschiede zwischen den bekannten mesophilen und dem halobakteriellen 12-mer Ferritin entlang der dreifachen Symmetrieachsen der Dodekamere (Typ II-Bindungsstelle). In den Proteinen von *L. innocua* und *E. coli* findet sich an der Stelle, wo die $\alpha 3/\alpha 4$ -Loops von drei symmetrieverwandten Untereinheiten zusammentreffen, eine Pore mit einem Durchmesser von etwa 8 Å, die hauptsächlich von hydrophilen bzw. sehr kleinen Resten (*L. innocua*: Asp121, Asp130, Ala134; *E. coli* Asp142, Asp146, Thr149, Ala150) gesäumt wird (s. Abb. 31). Da dieser Aufbau der Pore sowohl bei 12-mer als auch bei 24-mer Ferritinen gut konserviert ist, wird seit langem angenommen, daß es sich bei dieser Region um die Haupteintrittsstelle für Eisen in die Ferritin-Kugel handelt (Ilari, 2000; Levi, 1996; Lawson, 1991). Im halobakteriellen Ferritin ist diese Pore durch die hintereinandergeschaltete Reihe von Glutamaten (Glu141), Histidinen (His150), Argininen (153) und weiteren Glutamaten (Glu154) versperrt, die jeweils von den drei symmetrieverwandten Molekülen stammen. Im Zentrum dieses „Korkens“ besteht eine hohe positiv geladene Dichte, die durch die große Nähe der Guanidinium-Gruppen der Argininreste (Arg153) gebildet wird. Ausbalanciert wird diese Anhäufung positiver Reste durch Salzbrücken zu den benachbarten Glutamatresten (Glu141; s. Tab. 7). Da dieser Abschnitt der Pore zusätzlich die Eisenbindungsstelle vom Typ II trägt (dreimal Glu154) wäre ein Durchtritt von Eisen auf diesem Weg nur durch gravierende konformelle Änderungen möglich. Die Bindung von Eisen

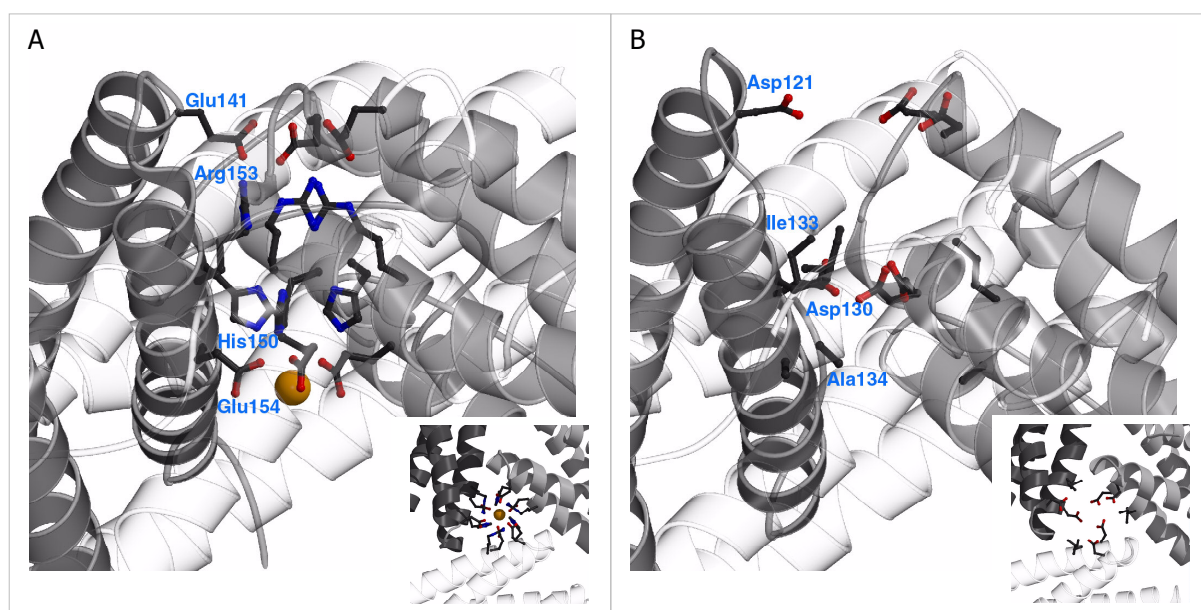


Abb. 31. Ansicht der Pore an der dreizähligen Achse bei *H. salinarum* (A) und *L. innocua* (B). Das große Bild zeigt jeweils die Pore jeweils von der Seite, der Einschub rechts unten von oben. Die Reste, welche die Pore säumen, sind gesondert dargestellt. Im halobakteriellen Ferritin ist im Gegensatz zum *Listeria*-Ferritin ein Eisenatom gebunden.

an dieser Stelle kann allerdings wiederum als ein Hinweis dafür gesehen werden, daß es sich bei dieser Pore auch bei *H. salinarum* um den Haupteintrittspunkt für Eisen in das Ferritin-Dodekamer handelt. Die starke Bindung des Eisenatoms könnte als Möglichkeit zur Kontrolle interpretiert werden: sitzt ein Eisenatom an dieser Stelle, bedeutet es, daß kein weiteres Eisen mehr aufgenommen werden soll.

Außer dieser Pore zeigt ein raumfüllendes Modell des dodekameren Ferritins von *H. salinarum* keinen anderen offensichtlichen Weg als Eingang für Eisenatome. Allerdings gibt es zwei Regionen, an denen Ionen die Proteinhülle durchqueren könnten, ohne daß sich vorher extreme Konformationsänderungen ereignen müßten. Ein Bereich befindet sich nahe der Typ I-Eisenbindungsstelle: hier wurde zweimal in der Kristallstruktur ein Mg^{2+} -Ion gefunden, das im Abstand von 13 Å vom Fe^{3+} an die äußere Oberfläche des Ferritin-Dodekamers gebunden ist. Koordiniert wird es durch Glutamat (Glu56), Glutamin (Gln86) und Histidin (His168), die von je drei benachbarten Monomeren stammen (Abb. 32A). Das Mg^{2+} -Ion sitzt auf dem Grund einer flachen Vertiefung, die umgeben ist von N- (Asp8-Asp18) und C-terminalen (Glu167-Asp173) Resten von zweien der drei Monomere. Diese Regionen enthalten eine Ansammlung von sechs sauren Resten (Glu13, Glu15, Asp18, Glu167, Glu171, Asp173), die ein herankommendes Eisenatom elektrostatisch in das Innere der Ferritin-Kugel geleiten könnten. Hypothetisch könnte man sich diesen Prozeß so vorstellen, daß ein solches Eisenatom (Fe^{2+}) zuerst an derselben Stelle wie das Mg^{2+} -Ion bindet und von dort aus direkt zu der

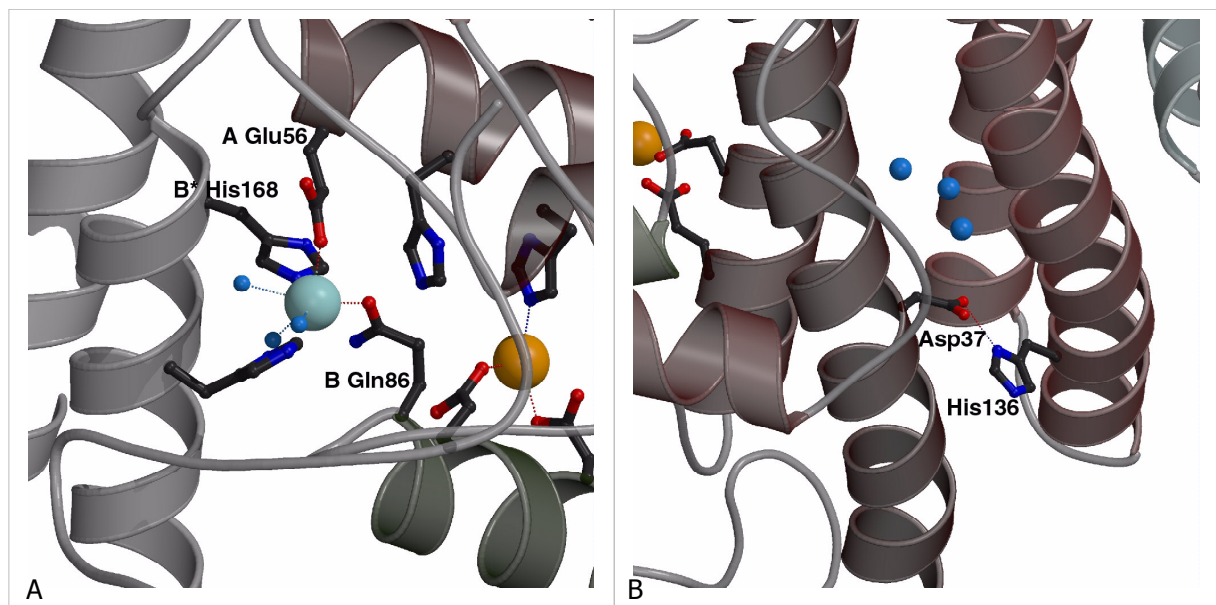


Abb. 32. Alternative Eiseneintrittstellen im halobakteriellen Ferritin. 32A. Dargestellt ist die Magnesium bindungsstelle mit benachbarter Eisenbindungsstelle vom Typ I mit den jeweiligen Aminosäure-Liganden. Hellblau, Magnesium, gelb, Eisen, mittelblau, Wasser. **32B.** Eingang durch das Vier-Helix-Bündel zwischen Helix $\alpha 1$ und $\alpha 3$. Mittelblau, Wasser.

Typ I-Eisenbindungsstelle weitertransportiert und dort oxidiert wird. Ein derartig direkter Transport zu einem Ferroxidase-Zentrum wäre nur für das halobakterielle Ferritin denkbar, da bei *L. innocua* der entsprechende Bereich wegen umfangreicher aromatischer Aminosäuren nicht durchgängig ist.

Ein zweiter möglicher Weg liegt zwischen den Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$ (Abb. 32B). Auch hier trennt nur eine Salzbrücke zwischen Asp37 und His136 das innere Volumen der Ferritin-Kugel von der äußeren Umgebung. Ein Kanal, der mit drei Wassermolekülen gefüllt ist, sorgt für einen kontinuierlichen Durchgang zwischen der Carboxylatgruppe des Asp37 und dem Innenraum des Dodekamers. Das innere Ende dieses Kanals ist von zweien der zwölf putativen Ferroxidase-Stellen jeweils 11 Å entfernt. Auch dieser Weg ist im Ferritin von *L. innocua* versperrt: die meisten der halobakteriellen Reste sind hier durch raumfüllende und aromatische Seitengruppen versperrt, die dem hydrophoben Kernbereich angehören.

Ob einer oder auch mehrere dieser Wege tatsächlich im Ferritin von *H. salinarum* zur Aufnahme von Eisen oder auch z.B. Phosphat-Anionen genutzt werden, bleibt offen. Der Unterschied zu anderen 12-mer und auch 24-mer Ferritinen (Ilari, 2000; Lawson, 1991) im Aufbau der Pore entlang der dreizähligen Achsen könnte ebenso dazu dienen, unter den hohen Salzkonzentrationen die quartäre Struktur zu stabilisieren. Eine Betrachtung der Ladungsverteilung im Ferritin (s. später, s. Abb. 44), die ein extremes Potentialgefälle von der äußeren Umgebung zum Inneren der Ferritin-Kugel zeigt, läßt vermuten, daß auf diese Weise die Eisenionen in das Ferritin-Innere hineingeleitet werden.

Um die hier vorgestellten Möglichkeiten des Eiseneintritts in das halobakterielle Ferritin zu überprüfen, wird es sinnvoll sein, zielgerichtet Mutationen einzuführen von Resten, die an den vorgeschlagenen Eingangsbereichen teilhaben. Dazu gehört besonders das Glu154 in der Pore an der dreizähligen Achse, dessen Eisenbindung in dieser Arbeit gezeigt wurde. Zusätzlich würde es sich anbieten, die drei Aminosäuren, die an der Magnesium-Bindung beteiligt sind, z.B. gegen Alanin zu ersetzen. Um den Weg durch das Vier-Helix-Bündel hindurch (zwischen den Helices $\alpha 1$ und $\alpha 3$) auszuschließen, könnte man zusätzliche große raumfüllende Reste wie Arginin einführen, wobei darauf zu achten ist, daß die Grundstruktur des Helix-Bündels dadurch nicht zerstört wird. Daneben können außerdem auch Veränderungen an der Typ I-Bindungsstelle vorgenommen werden, etwa den Austausch des zweiten Histidin-Restes (His64) gegen Alanin, um die Theorie des Zwei-Eisen-Ferroxidase-Zentrums zu untersuchen.

3.2.3 Evolutionäre Entwicklung

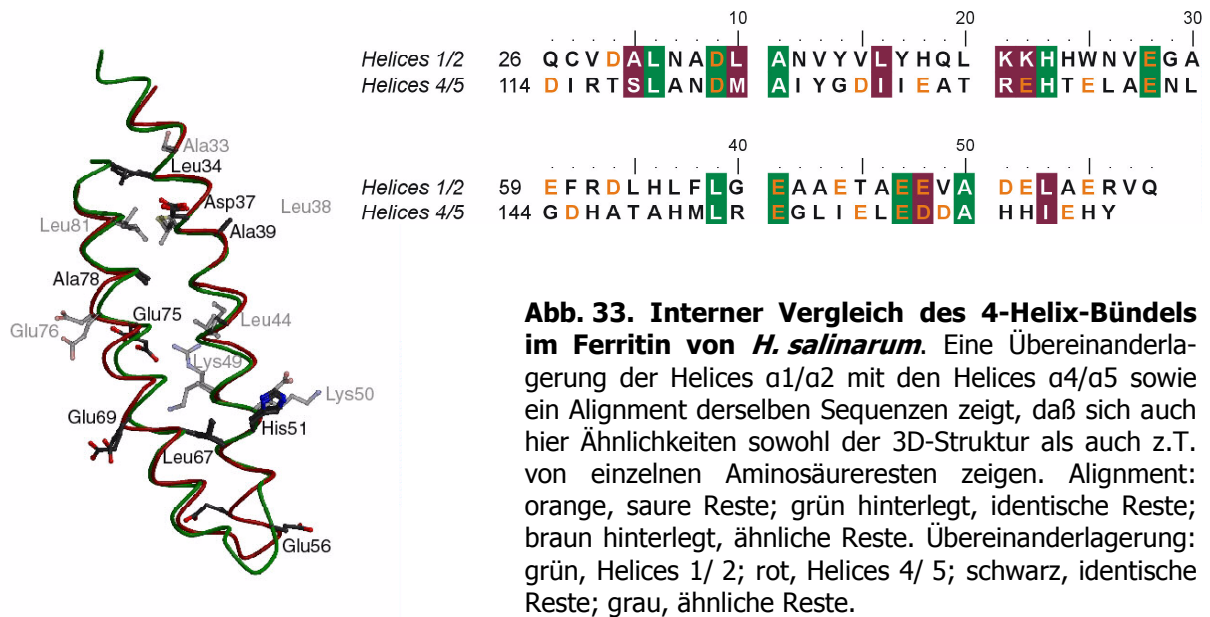
Die Existenz eines 12-mer Ferritins in dem Archaeon *H. salinarum* läßt die Frage nach der biologischen Funktion dieses Proteins aufkommen: dient es schlicht der Eisenspeicherung wie z.B. das 12-mer Ferritin von *L. innocua* oder fungiert es (zusätzlich) als Schutz der DNA, wie ihn das Dps aus *E. coli* zu vermitteln scheint (Frenkiel-Krispin, 2001; Ilari, 2000). Beide Möglichkeiten sind prinzipiell vorstellbar, da es sich bei *H. salinarum* um einen aerob wachsenden Organismus handelt, dessen Genom eine Vielzahl an Genen aufweist, die charakteristisch sind für eine Lebensweise unter Sauerstoff. Beispiele dafür sind Gene der Atmungskette, des Citratzyklus und für die Antwort auf oxygenen Streß (Ng, 2000). Gleichzeitig besitzt *H. salinarum* die Fähigkeit, anaerob phototroph zu wachsen, indem es Arginin fermentiert oder sich des Hauptbestandteils seiner Purpurmembran Bakteriorhodopsin bedient. Dieses ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe, mit deren Hilfe *H. salinarum* einen Protonengradienten über die Membran aufbaut, der anschließend zur ATP-Gewinnung genutzt wird (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971; Oesterhelt & Stoeckenius, 1973).

Ähnlich wie bei vielen Mikroorganismen hat sich auch für *H. salinarum* erst mit der Entstehung einer oxygenen Atmosphäre vor 3.5 Milliarden Jahren die Notwendigkeit ergeben, Gene bzw. Proteine zur Abwehr oder sogar Verwertung des Sauerstoffs zu entwickeln oder „erwerben“. Daß es sich dabei zumindest teilweise tatsächlich um einen „Erwerb“ handelt, scheint mittlerweile gesichert: so sind z.B. die Gene für die Bildung von Gasvesikeln sowie das Gen für Ferredoxin, ein wichtiger Elektronenakzeptor etwa im Citratzyklus, über lateralen Gentransfer in halobakterielle Zellen importiert worden (Pfeifer, 1993; Kerscher & Oesterhelt, 1982). Die Ähnlichkeit des Ferritins von *H. salinarum* zu eubakteriellen Ferritinen spricht sehr dafür, daß auch dieses Protein durch Gentransfer in die halobakterielle Zelle gelangt ist. Zu den Proteinen, die als Schutz vor Folgen der aeroben Atmosphäre dienen, zählen z.B. Katalasen oder Superoxiddismutasen – beides Enzyme, deren gehäuftes Auftreten in *H. salinarum* bereits gezeigt werden konnte (Brown-Peterson, 1993; Long, 2000; eigene Erfahrung). Schutz vor den Folgen des Sauerstoffs (Sauerstoffradikalen) ist also auch für diesen Organismus wichtig.

Aus diesem Grund scheint im Hinblick auf die Entfernung von freiem Eisen die Notwendigkeit einer Eisenspeicherung oder besser -verwahrung gesichert, wenn man sich die eingangs erwähnten Reaktionen betrachtet, die es katalysieren kann (Fenton Reaktion: Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen). Ob die Speicherung auch nötig ist, um eventuell vorkommendem Eisenmangel vorzubeugen, ist fraglich. Allerdings stellt Eisen aufgrund seiner

Eigenschaft, meist als anorganisches – und nicht verfügbares – Erz (z.B. Magnetit, Fe_3O_4 oder Roteisenstein, Fe_2O_3) vorzuliegen, oft einen limitierenden Faktor dar, so z.B. auch in großen Bereichen der Ozeane, wo das Wachstum von Plankton stark durch die Verfügbarkeit dieses Metalls gesteuert wird (Andrews, 1998). Daß das Archaeon *H. salinarum* sein Ferritin als Eisenspeicher verwenden kann, wurde gezeigt (Reindel, 2002), die Bindung von DNA konnte dagegen bisher nicht nachgewiesen werden. Letzteres ist auch aufgrund der Zusammensetzung des halobakteriellen Zytosols kaum vorstellbar: da sowohl im Dps aus *E. coli* als auch im Ferritin von *H. salinarum* kein DNA-Bindemotiv gefunden wurde und die Bindung der DNA im Dps scheinbar über Mg^{2+} -Ionen vermittelt wird, könnte man annehmen, daß dies im archaealen Ferritin auf ähnliche Weise vonstatten ginge. Doch obwohl auch hier die Oberfläche stark negativ geladen ist (s. Abb. 44), dürfte die Konzentration an K^+ -Ionen im Zytosol hoch genug sein, daß sie mit Mg^{2+} -Ionen um die Bindung an den meisten Carboxylatresten konkurrieren könnten.

Zur Entwicklung und Verwandtschaft von Ferritinen bzw. Dps-Proteinen generell gibt es verschiedene Meinungen: Pena and Bullerjahn (1995) schlagen aufgrund der Struktur- aber auch der Sequenzähnlichkeit dieser Proteine vor, daß zu der Bacterioferritin/Ferritin-Superfamilie (Grossmann, 1992) sowohl die 24-mer und 12-mer Ferritine als auch die Dps-Proteine zählen, und postulieren, daß alle diese Proteine einen gemeinsamen Vorläufer haben. Als zusätzliche Eigenschaft hätten die Dps-Proteine die Fähigkeit erworben, DNA zu binden. Andrews (1998) dagegen zweifelt eine nähere Verwandtschaft von Dps-Proteinen und Ferritinen/Bacterioferritinen wegen der geringen Sequenzähnlichkeit an. Er fügt dafür der Superfamilie von Ferritinen noch die Ruberythrine hinzu, eine weitere Eisen-bindende Familie von Proteinen. Die Ähnlichkeit beruht in diesem Fall erheblich stärker auf der Primärsequenz, doch die 3D-Strukturen sind ebenfalls hoch konserviert: die Ruberythrine besitzen ein Vier-Helix-Bündel als Monomer, dem allerdings noch eine für diese Familie typische C-terminale Region aus β -Faltblättern angefügt ist (deMaré, 1996). Auch diese Proteine scheinen in der Lage zu sein, Eisen zu oxidieren, zumindest konnte eine *in vitro* Ferroxidase-Aktivität für das Ruberythrin aus *Desulfovibrio vulgaris* nachgewiesen werden (deMaré, 1996). Eine weitere Besonderheit der Ruberythrine ist, daß innerhalb ihres Vier-Helix-Bündels das N-terminale $\alpha 1/\alpha 2$ -Helix-Paar Homologien aufweist zum C-terminalen $\alpha 3/\alpha 4$ -Helix-Paar (Kurtz, 1991). Daraus schließt Andrews (1998), daß sich diese Proteine und damit auch die Ferritine durch Genduplikation aus einem zweifach helikalen Protein entwickelt haben. So zeigt eine Über-einanderlagerung der Helices $\alpha 1/\alpha 2$ mit den Helices $\alpha 4/\alpha 5$ im halobakteriellen Ferritin



tatsächlich eine hohe Ähnlichkeit der 3D-Struktur ($rmsd= 0.748 \text{ \AA}$ für 52 C -Atome bei Fehlen des Loops zwischen den Helices im zweiten Helixpaar; s. Abb. 33). Betrachtet man einzelne Reste, erscheinen auch hier einige identische (9) bzw. ähnliche Aminosäurereste (7), die sich exakt an derselben Stelle im jeweiligen Helixpaar befinden. Daß hier die Übereinstimmung nicht so groß ist, könnte daran liegen, daß derartige Duplikationsereignisse oft sehr früh in der Evolution aufgetreten sind. Das bedeutet, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zwischenzeit eine Vielzahl an Veränderungen/ Anpassungen aufgetreten sind, welche die Ähnlichkeit verschleiern oder völlig verdecken (Richardson, 1981). Dazu würde im Ferritin beispielsweise die Entwicklung der Eisenbindungs- und nukleationsstellen gehören.

Angesichts von mittlerweile zwei Strukturen von Proteinen, die nachweislich Eisen binden und sich auch aufgrund ihrer monomeren Form (Vier-Helix-Bündel) eindeutig der Ferritin-Familie zuordnen lassen, bietet sich hier die Möglichkeit, die beiden eben vorgestellten Theorien miteinander zu verknüpfen. Denn neben den genannten „ferritinartigen“ Eigenschaften zeigen diese beiden Ferritin-Strukturen zwei neuartige Merkmale: sie sind aus zwölf Monomeren aufgebaut (Ferritine üblicherweise 24) und ihre Eisenbindungsstelle liegt nicht innerhalb eines Vier-Helix-Bündels wie bei den 24-mer Ferritinen, sondern zwischen zwei Monomeren (s. Kap. 3.1.2.1). Die Proteine der Dps-Familie wiederum sind ebenfalls aus zwölf Monomeren aufgebaut, und zeigen eine hohe Konservierung der Aminosäurereste, die sowohl im Ferritin von *H. salinarum* als auch von *L. innocua* als „intermonomere“ Eisenliganden identi-

fiziert werden konnten (s. Abb. 26); zusätzlich binden sie DNA. Damit kann man die 12-mer Ferritine als ein Verbindungsglied zwischen 24-mer Ferritinen und Dps-Proteinen ansehen, wobei die Fähigkeit zur DNA-Bindung vielleicht tatsächlich eine später erworbene Eigenschaft darstellt. Eine ursprüngliche Entwicklung der 24-mer Ferritine und Ruberythrine aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein läßt sich mit dieser Theorie gut vereinbaren. Einen Überblick über Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Ferritinen, Bacterioferritinen und Dps-Proteinen gibt Tabelle 8.

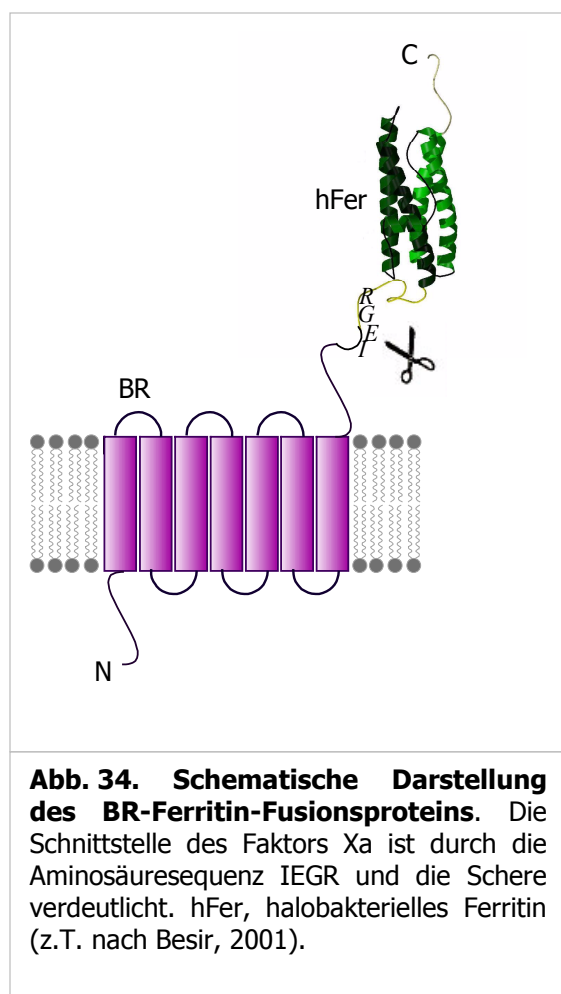
24-mer Ferritine		12-mer Ferritine	Dps-Familie
Eisenbindung		Eisenbindung, aber keine DNA-Bindung	DNA-Bindung und teilweise Eisenbindung
Eukaryontische Ferritine	Prokaryontische Ferritine		
24 ähnliche Untereinheiten: -H-Kette: Ferroxidase-Zentrum -L-Kette: Nukleationsstelle	24 identische Untereinheiten vom H-Typ	12 identische Untereinheiten	12 identische Untereinheiten
	Mit Häm (Bakterioferritine)	Ohne Häm	
Mensch, 2FHA: H-Kette Maus, 1H96: L-Kette Pferd, 1AEW: L-Kette	<i>E.coli</i> , 1BFR <i>A. variabilis</i> (Evans, 1995) <i>R.capsulatus</i> , 1JGC (Cobessi, 2002)	<i>E.coli</i> , 1EUM <i>L.innocua</i> , 1QGH: + Fe (Ilari, 2000) <i>H. pylori</i> , NapA: + Fe (Tonello, 1999) <i>B. anthracis</i> , 1JI5/1JIG: + Fe (Papinutto, 2002)	<i>E. coli</i> 1DPS: - Fe, + Pb (Grant, 1998) <i>Synechococcus</i> sp.: + Fe, + Häm (Pena, 1995) <i>B. subtilis</i> , MrgA: (Chen, 1995)

Tab. 8. Überblick über die Ferritin/Bakterioferritin/Dps-Superfamilie (Pena, 1995) – Auswahl einiger Vertreter jeder Gruppe. Blau gekennzeichnet sind Proteine, deren Kristallstrukturen bekannt sind, die jeweiligen pdb-Codes sind angegeben. Eine grüne Markierung bedeutet, daß bereits Modellstrukturen anhand bekannter Strukturen modelliert worden sind. Eine Gruppe, die weiterhin zu dieser Superfamilie gezählt werden kann, sind die Ruberythrine (Andrews, 1998), von denen bereits eine Struktur (1RYT) des Bakteriums *Desulfovibrio vulgaris*, gelöst werden konnte (deMaré, 1996).

3.2.4 Biochemische Charakterisierung

3.2.4.1 Aufreinigung des Ferritins aus *H. salinarum*

Ein allgemeines Kennzeichen der kugelförmigen, hohlen Ferritine ist ihre extrem hohe Stabilität gegenüber Hitze (5-10 min, 70 °C) und denaturierenden Agentien wie Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid (Harrison & Arosio, 1996); besonders die Hitzestabilität eignet sich zur Gewinnung und Aufreinigung von Ferritinen. Die **native Aufreinigung** analog Reindel (2002) bzw. leicht abgewandelt (ohne Butanolfällung) führte in dieser Arbeit in den meisten Fällen zu einer gleichzeitigen Anreicherung des Ferritins zusammen mit der Superoxid-Dismutase – ein Problem, das erst durch MALDI-Analysen von SDS-Gelen aufgeklärt werden konnte, da beide Proteine in der SDS-PAGE auf gleicher Höhe laufen. Aus diesem Grund wurden drei alternative Aufreinigungs-Ansätze unternommen.



Der erste dieser Ansätze stellte die Herstellung eines **Fusionsproteins** aus Bacteriorhodopsin, dem Hauptmembranprotein von *H. salinarum* und Ferritin dar. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits einige lösliche Proteine, z.B. das Ferredoxin aus *H. salinarum*, aufgereinigt werden (s. Abb. 34; Besir, 2001; Turner, 1999a; Turner, 1999b). Die Fusion von BR mit dem löslichen Protein wird in der Literatur so beschrieben, daß das lösliche Protein in den C-Terminus des BR's inseriert wird. Im Fall der Fusion mit dem Ferritin in dieser Arbeit fand insofern keine *Insertion* statt, als in dem vorliegenden Leserahmen das C-terminale Sequenzende des BRs nicht mehr abgelesen wurde. Generell wird angenommen, daß das C-terminale Ende des BRs für eine optimale Expression entscheidend ist, besonders die letzten Aspartatreste (D. Oesterhelt & J. Tittor, persönliche Mitteilung), doch schien das Fehlen dieses Teils bei der Expression des Fusionsproteins BR-Ferritin nicht zu stören. Die erfolgreiche Transformation des entsprechenden Vektors

118

pHUSBrfus:Ferr in *H. salinarum* TOM wurde über die Sequenzierung genomischer DNA verifiziert, da *H. salinarum* fremde DNA mittels homologer Rekombination über bestimmte Vektorsequenzen in sein Genom einbaut. Da es sich bei TOM um einen *H. salinarum*-Stamm handelt, der kein BR mehr enthält (Besir, 2001), stellte die purpurne Farbe von Zellen einen Hinweis auf ihre gelungene Transformation dar. Die Expression fand teilweise unter selektiven Bedingungen (Mevinolin, Sauerstoffmangel) statt, da durch diese Gegebenheiten (Anaerobiosis) eine Ausbildung der membranständigen Protonenpumpe BR bzw. in dem Fall des Fusionsproteins für die Zellen lebensnotwendig ist. Um die Funktionsleistung des BRs als lichtgetriebene Protonenpumpe gewährleisten zu können, wurden die Kulturen zusätzlich mit Licht bestrahlt. Nach Isolierung der Membranfraktion dieser Zellen fand eine Aufreinigung von BR-Ferritin über einen Zuckergradienten (s. Abb. 35A) statt. Aufgrund der Fusion wurde eine höhere Schwimmdichte erwartet, trotzdem befand sich die Bande des Fusionsproteins auf gleicher Höhe (und bei gleicher Zuckerkonzentration: 46%) wie reines BR. Daß es sich aber tatsächlich um das Fusionsprotein handelt, wurde durch eine SDS-PAGE gezeigt. Die monomere Form des Fusionsproteins sollte theoretisch 58.2 kDa betragen (s. später), man sieht eine entsprechende schwache Bande im SDS-Gel (Abb 35B, violetter Pfeil). Da sich jedoch die Hauptbande des aufgereinigten Proteins auf der Höhe von etwa 110-120 kDa befindet (Abb. 35B, grüner Pfeil), wurde angenommen, daß ein Großteil des Proteins als Dimer vorliegen mußte, das auch durch SDS nicht dissoziiert werden konnte (s. später). Ebenso wie das Wildtyp-BR (28.2 kDa) befindet sich die monomere Form des Fusionsproteins (58.2 kDa) im SDS-Gel bei einem niedrigeren apparenten Molekulargewicht als theoretisch erwartet. Die Spaltung des Fusionsproteins durch die Protease Faktor Xa

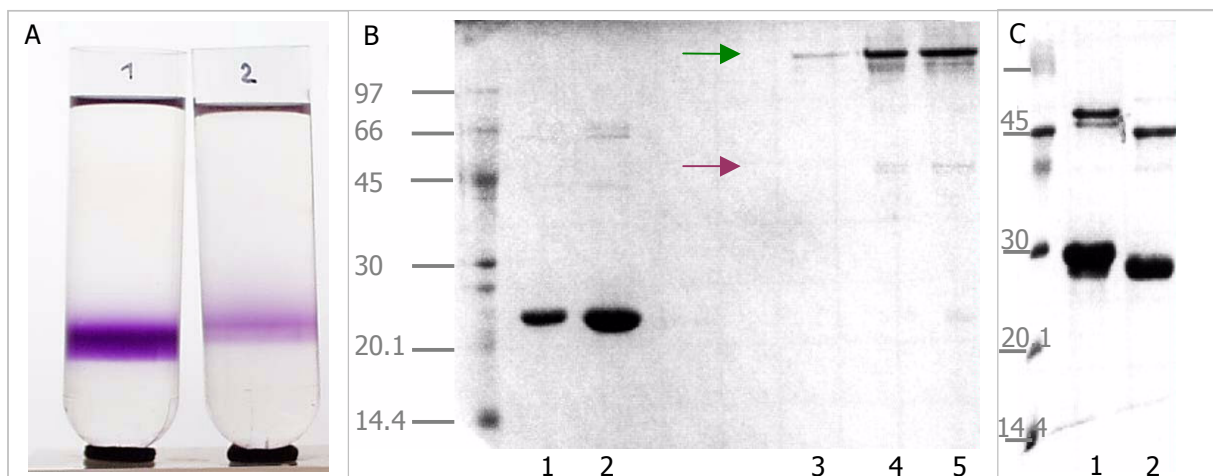


Abb. 35. Aufreinigung von Ferritin. **35A.** Photographie des Zuckergradienten: 1, BR, *H. salinarum*, S9; 2, BR-Ferritin-Fusionsprotein. **35B.** Gel des Fusionsproteins: 1,2, BR; 3,4,5, BR-Ferritin-Fusionsprotein, jeweils in steigenden Konzentrationen von links nach rechts. **35C.** Gel des Ferritins nach Aufreinigung über ein Histidinpeptid am N-Terminus, vor (1) und nach (2) Verdau mit Thrombin. Die Markergrößen sind in 35B angegeben, in 35C entspricht die unterste Bande der ebenfalls untersten Bande in 35B.

konnte erfolgreich durchgeführt werden (nicht abgebildet). Allerdings ergab sich durch den Leserahmen das Problem, daß die zweite Faktor Xa-Schnittstelle, die eigentlich hinter der Ferritin-Sequenz liegen sollte, nicht translatiert worden war, und die Ferritin-Sequenz kein Stopcodon enthielt, sodaß sich am C-Terminus des Ferritins noch ein Stück der translatierten Vektorsequenz befand, ein Grund für die Größe des Fusionsproteins (58.2 statt 48.7 kDa). Aus diesem Grund, und da durch die begrenzte Wirkung der Protease ohnehin keine großen Mengen des Spaltprodukts hergestellt werden konnten, wurden bisher keine weiteren Versuche mit dem Fusionsprotein unternommen. Ein neuer Klonierungsansatz unter Verwendung des richtigen Leserahmens ist bereits erfolgt, es konnte jedoch bis jetzt keine Expression in *H. salinarum* erreicht werden. Da halobakterielle Zellen dazu neigen, derartige „Fremdgene“ wieder aus ihrem Genom zu entfernen, ist es wichtig, durch Mevinolin und Sauerstoffmangel auf Zellen zu selektieren, die das Fusionsgen noch enthalten.

Der zweite Ansatz für eine alternative Aufreinigung des Ferritins bestand in dem Anhängen eines Histidinpeptids an den N-Terminus des Ferritins und eine anschließend heterologe Expression in *E. coli*. So wohl die Expression als auch das Abtrennen des Histidin-Peptids über Thrombin funktionierte sehr gut (s. Abb. 35C). Auf dem SDS-Gel sieht man, daß sich ebenfalls Dimere ausbildeten, die durch SDS und Aufkochen bei 90 °C nicht separiert werden konnten (s. oben). In der Ferritin-Sequenz befindet sich innerhalb der Helix $\alpha 1$ ein einziges Cystein, über welches eine intermolekulare Disulfidbrücke gebildet werden könnte. Da sich über NMR-Untersuchungen nachweisen ließ, daß dieses heterolog exprimierte Ferritin nicht in nativ gefaltetem Zustand (75% α -Helices) vorlag, könnte es sein, daß zwei entfaltete Proteinketten – trotz reduzierender Bedingungen – miteinander über ihre Cysteine reagiert und möglicherweise so eine Rückfaltung verhindert haben. Da dieser Effekt jedoch unabhängig ist von der Anwesenheit eines reduzierenden Agens wie β -Mercaptoethanol, scheint eine Wechselwirkung über Disulfidbrücken eher unwahrscheinlich. Auch bei Lysozym wurde bereits eine ähnlich starke Dimerinteraktion beobachtet (Rosenberger, 1996). Offenbar erbrachte diese Aufreinigung also nur ein mißgefaltetes Protein, das auch durch Dialyse-Experimente in Gegenwart von Eisen und Hochsalz (2 M) nicht in seine native Form überführt werden konnte. Zu beachten ist, daß hier sowohl die monomere als auch die dimere Form des mit einem His-Peptid versehenen Ferritins ein höheres apparentes Molekulargewicht aufweisen als theoretisch erwartet, möglicherweise aufgrund der heterologen Expression in *E. coli*.

Ein dritter Versuch zur Expression umfaßte die Klonierung der Ferritin-Sequenz in den Expressions-Vektor pBPH-M direkt hinter den starken BR-Promotor. Bisher konnte jedoch noch keine erfolgreiche Transformation in *H. salinarum* nachgewiesen werden.

3.2.4.2 Elektronenmikroskopie mit Ferritin/BR-Ferritin-Fusionsprotein

Für die EM-Aufnahmen wurden Ferritin-Kristalle in 400 mM NaCl aufgelöst. Die EM-Bilder demonstrieren, daß das native Ferritin einem ringartigen Komplex von ungefähr 10 nm Durchmesser gleicht, was in etwa der erwarteten Größe (9 nm) entspricht (s. Abb. 36). Vergleiche mit Aufnahmen des MrgA aus *B. subtilis* (Chen, 1995) mit einem Durchmesser von 9.2 nm oder des Dps aus *E. coli* (Wolf, 2001) zeigen, daß die Proteine dort ebenfalls eine derartig ringförmige Struktur aufweisen. Somit konnte auch durch die EM-Aufnahmen der strukturelle Aufbau des halobakteriellen Ferritins und seine Homologie zu anderen Proteinen wie dem Dps aus *E. coli* nachgewiesen werden.

Aufgrund der 3D-Struktur des Ferritins (Dodekamer) besteht die Möglichkeit, daß bei dem BR-Ferritin-Fusionsprotein die Anordnung des BRs in der Membran durch die Wechselwirkung der Ferritin-Monomere gestört werden könnte. BR liegt normalerweise in Form von zweidimensionalen Kristallen mit einer hexagonaler Anordnung von BR-Trimeren vor (Blaurock & Stoeckenius, 1971), was bereits mehrfach auch elektronenmikroskopisch gezeigt werden konnte (Henderson, 1990; Besir, 2001). Theoretisch könnte es nun sein, daß das Ferritin die BR-Moleküle dazu zwingt, sich um seine dodekamere Kugel herum anzuordnen, ein Effekt, der durch den starken Zusammenhalt des Ferritin-Moleküls (extreme Stabilität gegenüber vielen Bedingungen, wie Hitze, Butanol) erklärt werden könnte. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, EM-Aufnahmen von „Fusions-Membranen“ zu erhalten. Dabei zeigte es sich, daß der regelmäßige Aufbau der Purpurmbran gestört war: es konnte keine hexagonale Anordnung mehr beobachtet werden. Dieses Er-

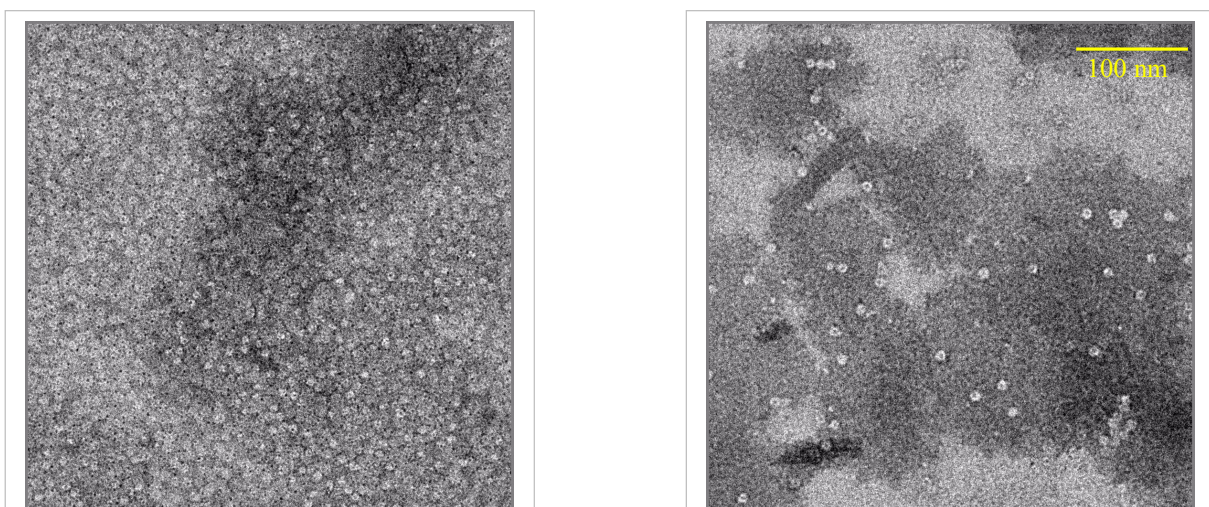


Abb. 36. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des halobakteriellen Ferritin-Komplexes. In beiden Bildern wurden unterschiedliche Probenkonzentrationen verwendet, die Färbung fand in beiden Fällen mit Phosphorwolframsäure statt.

gebnis wurde durch AFM (*atomic force microscopy*)-Messungen insofern bestätigt, daß sich hier im Gegensatz zur gleichzeitig aufgereinigten Wildtyp-PM nicht das übliche Arrangement von BR finden ließ. Ob diese Veränderungen tatsächlich auf der oben genannten Neuordnung beruhen, konnte belegt werden. Zusammenfassend läßt sich aber aus diesen Ergebnissen schließen, daß die Fusion des Ferritins (und der daranhängenden Vektorsequenz) an den verkürzten C-Terminus des BRs dessen oligomeren Aufbau offenbar beeinträchtigt hat.

3.2.4.3 Ferritin-Deletionsmutante

Mithilfe des Vektors pM@β-master (Matthias Koch) wurde eine Ferritin-Deletionsmutante hergestellt. Die Deletion eines Gens in *H. salinarum* erfolgt über ein zweimaliges Rekombinationsereignis, das als Ergebnis statt des entsprechenden Gens nur mehr seine flankierenden Enden im Genom hinterläßt (s. Kap. 2.3.13). Die erfolgreiche Deletion wurde über eine PCR mit den Klonierungsprimern *flseq1for* und *flseq2rev* sowie eine daran angeschlossene Sequenzierung des Produkts nachgewiesen. Als Matrize für die PCR wurde genomische DNA verwendet. Das Produkt bestand tatsächlich aus den flankierenden Enden, die nicht durch das Ferritin-Gen unterbrochen wurden. Ein besonderer Phänotyp konnte bei einfachen Wachstumsexperimenten in Halomedium bisher nicht festgestellt werden.

3.2.4.4 Kristallisationsexperimente mit reinem Ferritin

Das Ziel der Shotgun-Kristallisation war es neben der „zufälligen“ Kristallisation von Proteinen auch, die Erfahrungen bezüglich einzelner Kristallisationsbedingungen auf gereinigte Proteine anwenden zu können. Für das Ferritin von *H. salinarum* hatte sich gezeigt, daß es bevorzugt unter PEG 400-Bedingungen kristallisiert. Es wurden daher Versuche gemacht, (mehr oder weniger) gereinigtes Protein auf diese Weise zu kristallisieren. Dabei zeigte sich tatsächlich Kristallbildung, v.a. in der Kristallform B (Säulchen, s. Tab. 6), allerdings nur bei homolog exprimiertem Protein, das durch Hitzedenaturierung, Anionentauscher und Gelfiltration präpariert worden war. Die Zugabe von 1 mM Eisensulfat als spezielles Additivum (s. Kap. 3.1.2) konnte die Kristallbildung nicht weiter steigern.

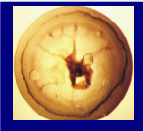
In Proben, die nicht nur ein einzelnes gereinigtes Protein enthalten, sondern eine Mischung verschiedener Proteine bzw. unterschiedliche Formen eines Proteins, treten bei der Kristallisation oft Effekte auf, die z.B. auf eine erhöhte Viskosität zurückzuführen sind (s. Kap. 1.2.2, 3.1.2). Daher könnte man annehmen, daß gereinigtes Protein dann unter anderen Bedingungen kristallisiert. Durch die gerade vorgestellten Ergebnisse konnte jedoch gezeigt werden, daß sich diese Annahme zumindest für das Ferritin aus *H. salinarum* nicht bestätigt hat.

3.3 Shotgun-Kristallisation: Glyzerin-Dehydrogenase

3.3.1 Struktur

3.3.1.1 Kristallform und Qualität der Daten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Kristalle einer tetragonalen Form (s. Tab. 9) gefunden, die über N-terminale Sequenzierung als Glyzerin-Dehydrogenase (GlyDH) von *H. salinarum* (Halolex: OE5160F) identifiziert werden konnten (s. <http://www.halolex.mpg.de>). Die Kristalle hatten sich unter drei verschiedenen Bedingungen gebildet (s. Tab. 9).

Kristall	Kristallmaße [mm]	Auflösung [Å]	Raum- gruppe	Zellmaße [Å]
	0.2-0.6	1.6	P42 ₁ 2	a = 104.1 b = 104.1 c = 136.3
Hampton- Screen I[Nr]	Zusammensetzung			
12	30% Isopropanol, 0.2 M MgCl ₂ , 0.1 M Hepes, pH 7.5			
15	30% PEG 8000, 0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M Na-Cacodylat, pH 6.5			
20	25% PEG 4000, 0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 M Na-Acetat, pH 4.6			

Tab. 9. Darstellung eines Glyzerin-Dehydrogenase-Kristalls sowie Angabe der drei Wachstumsbedingungen. Die tetragonale Kristallform trat unter den aufgeführten Bedingungen in verschiedenen Größen auf; der Datensatz bis zu einer Auflösung von 1.6 Å wurde von einem Kristall, der unter Bedingung 12 gewachsen war, gemessen.

Allen Kristallen lag eine Proteinprobe zugrunde, die durch eine Fraktionierung mittels Anionenaustauscher (DEAE) in Gegenwart von 0.6 M (NH₄)₂SO₄ gewonnen worden war (s. Kap. 3.1.1). Der Kristall, der für die Strukturlösung verwendet wurde, war in einem Replika-Ansatz in der Hampton-Bedingung 12 gewachsen. Replika-Ansatz bedeutet, daß eine identische Proteiprobe vier Monate später erneut den gleichen Bedingungen unterworfen wurde, die bereits zuvor Kristallwachstum gezeigt hatten. Von diesem Kristall konnte ein vollständiger Datensatz mit einer Auflösung bis zu 1.6 Å aufgenommen werden. Es wurde die tetragonale Raumgruppe P42₁2 mit den Zellmaßen $a = b = 104.1 \text{ Å}$, $c = 136.3 \text{ Å}$ ermittelt, die asymmetrische Einheitszelle enthielt ein Dimer, was einen Solvensgehalt von 48.4%

ergab (Matthews, 1968). Nachdem der Wachstumspuffer durch langsame Zugabe von Glyzerin „kryokompatibel“ gemacht worden war, wurde der Kristall für die Datensammlung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Sammlung des Datensatzes erfolgte an der Beamline ID14-2 des ESRF, Grenoble, mit einem ADSC Q4-Detektor. Die Vollständigkeit der Daten betrug 99.3% mit einem R_{merge} von 58.6% im höchsten Auflösungsbereich (1.7-1.6Å) und einem Gesamt- R_{merge} von 12.5%.

3.3.1.2 Phasenbestimmung

Um die Struktur der GlyDH zu lösen, wurde die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Dafür wurden zwei dimere Suchmodelle aus der GlyDH von *B. stearther mophilus* (PDB Code: 1JQ5 bzw. 1JQA; Ruzheinikov, 2001) erstellt: das erste Modell (aus 1JQ5) enthielt die Reste 2-367, das zweite Modell (aus 1JQA) die Reste 2-133/138-367. Das Dimer wurde je so gewählt, daß es den beiden Monomeren entsprach, die in dem GlyDH-Oktamer von *B. stearothermophilus* über eine zweizählige kristallographische Achse miteinander verwandt sind. Der Unterschied der beiden *Bacillus*-Strukturen liegt darin, daß 1JQ5 im Komplex mit NAD^+ und 1JQA mit Glyzerin vorliegt. Nach der Rotations- und Translationssuche ergab sich für die beste Lösung des ersten Modells ein Korrelationskoeffizient von 35% sowie ein R-Faktor von 46.8%, für das zweite Modell ein Koeffizient von 34.5% und ebenfalls ein R-Faktor von 46.8%. Trotz der nahezu identischen Werte zeigte ein Vergleich der beiden zugehörigen Elektronendichtekarten, daß bei der Lösung aus der Suche mit Modell 1 (1JQ5-Dimer) die „ausgesäkräftigste“ Elektronendichte im Bereich der Reste 130-140 zu sehen war. Daher wurde mit der entsprechenden Lösung im folgenden weitergerechnet.

3.3.1.3 Verfeinerung und Qualität des Modells

Die $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarten zeigten zu Anfang im bereits genannten Bereich der Reste 130-140, wo sich das aktive Zentrum des Proteins befindet, trotz der Verbesserung gegenüber dem zweiten Modell (aus JQA) keinen klaren Verlauf der Proteinkette. Nach einigen Zyklen von automatischer und manueller Verfeinerung konnte jedoch auch dieser Bereich richtig modelliert werden. Das gegenwärtige Modell zeigt für Daten zwischen 20 und 1.6 Å einen R-Faktor/ R_{frei} -Faktor von 20.5/24.1% auf. In einer asymmetrischen Einheit befinden sich zwei GlyDH-Moleküle mit insgesamt 730 Aminosäureresten, 2 Glyzerin-Gruppen, 2 Zn^{2+} -Ionen, 1 Mg^{2+} - und 4 Na^+ -Ionen sowie 273 Wassermolekülen. Beide Polypeptidketten sind von Rest 1 bis 365 durch Elektronendichte deutlich definiert. Eine tabellarische Übersicht zur Statistik findet sich im Anhang (s. Kap. 6.2.2).

3.3.1.4 Sequenz- und Strukturvergleich der halobakteriellen GlyDH mit homologen Proteinen

Bisher waren nur zwei GlyDHn aus der Familie der „Metall-bindenden“ Alkohol-Dehydrogenasen strukturell charakterisiert: von dem Enzym aus *B. stearothermophilus* sind drei verschiedene Formen publiziert, eine ohne Substrat/Kofaktor (1JPU), eine mit dem Substrat Glycerin (1JQA) und eine mit NAD^+ (1JQ5), letztere wurde zur Strukturlösung der halobakteriellen GlyDH verwendet (Ruzheinikov, 2001). Die zweite GlyDH aus *Thermotoga maritima* wurde komplexiert mit 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris) kristallisiert (1KQ3; wird veröffentlicht). Die Homologie des halobakteriellen Proteins zu den beiden eubakteriellen GlyDHn ist sehr hoch: die Identität/Ähnlichkeit beträgt 50/67% (*B. stearothermophilus*) bzw. 47/62% (*T. maritima*), und auch die Länge der Polypeptidkette ist fast identisch. Ein Sequenzvergleich der drei Proteine verdeutlicht diese Homologie (s. Abb. 37).

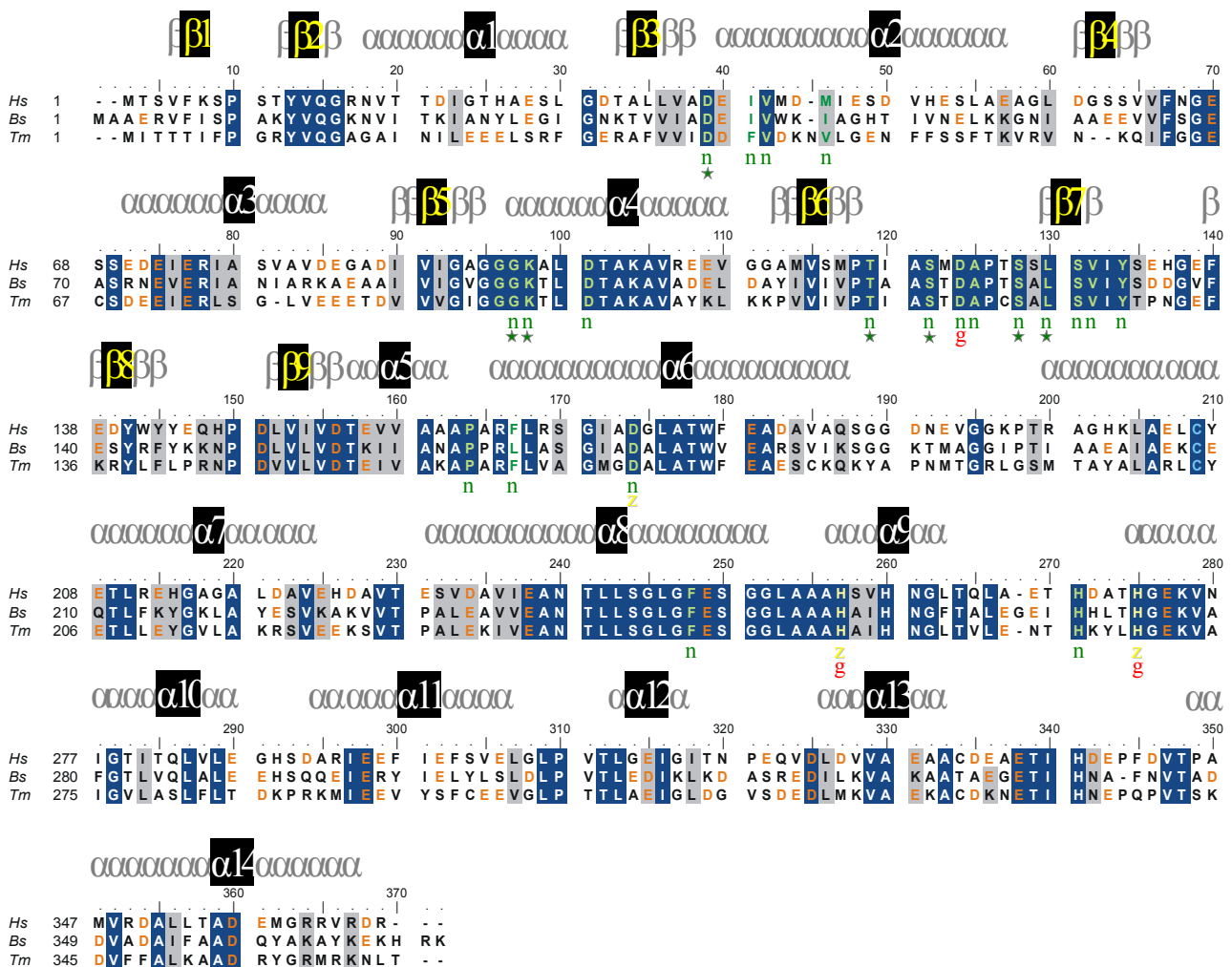


Abb. 37. Alignment der Primärsequenzen von den GlyDHn aus *H. salinarum* (Hs), *B. stearothermophilus* (Bs) und *T. maritima* (Tm). Die Sekundärstrukturelemente wurden nach der halobakteriellen Struktur angelegt, dargestellt sind sowohl α -Helices (grau) als auch β -Stränge (gelb). Alle negativen Reste (Glutamat, Aspartat) sind orange hervorgehoben. g, Glycerin-Bindung; n, NAD*-Bindung; z, Zink-Bindung.

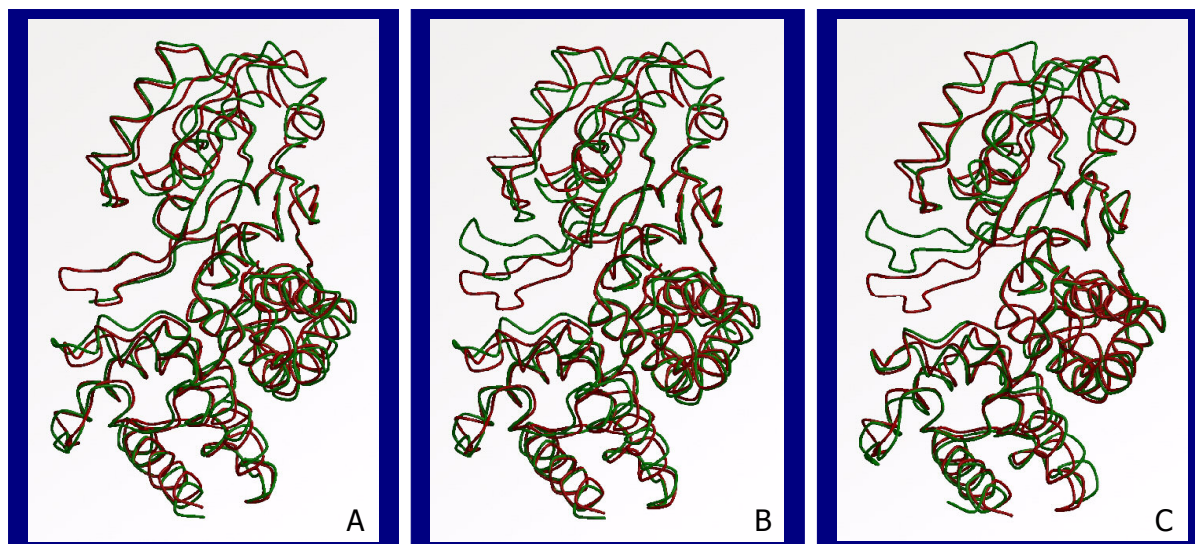


Abb. 38. Vergleich der halobakteriellen Glyzerin-Dehydrogenase mit homologen Proteinen. Übereinanderlagerung der GlyDH aus *H. salinarum* (rot) mit verwandten GlyDHn (grün). **38A.** *B. stearothermophilus* + Glyzerin. **38B.** *B. stearothermophilus* + NAD⁺. **38C.** *T. maritima*. Die N- und C-Termini entsprechen der Benennung in Abb. 39.

An einer Übereinanderlagerung der Strukturen erkennt man, daß sich die Homologie der Sequenzen auch auf die 3D-Struktur erstreckt (s. Abb. 38). Dies äußert sich klar in den *rmsd* Werten, welche für die *Bacillus*-Struktur mit Glyzerin im Vergleich zur halobakteriellen GlyDH (Abb. 38A) auf 1.032 Å (345 C -Positionen) kalkuliert wurden, mit NAD⁺ (Abb. 38B) auf 1.121 Å (für 341 C -Positionen) sowie für die Struktur von *T. maritima* (Abb. 38C) auf 0.983 Å (für 332 C -Positionen).

Alle drei GlyDHn aus *H. salinarum*, *B. stearothermophilus* und *T. maritima* gehören zur Klasse der Multi-Domänen-Proteine (nach: SCOP, *structural classification of proteins*) und sind aus unterschiedlichen Sekundärstrukturanteilen (α -Helices und β -Faltblätter) zusammengesetzt. Das Monomer der halobakteriellen GlyDH ist unterteilt in zwei Domänen, die durch eine tiefe Spalte voneinander separiert sind (s. Abb. 39A). Die N-terminale Domäne (Reste 1-160) besteht aus einem parallelen β -Faltblatt mit 6 β -Strängen (β 2,3,4,5,6,9), dessen relative Strangordnung 165423 beträgt (absolute Ordnung: 296534; s. Abb. 39B) – vergleichbar der *Bacillus*-Struktur. Fast alle β -Stränge sind durch α -Helices (α 1-4) verbunden, außer β 6-9, die durch eine Art β -Turn voneinander getrennt sind – gebildet aus den β -Strängen 7 und 8. Dieser Aufbau der N-terminalen Domäne erinnert an den sogenannten „Rossmann-Fold“ (Kurzabfolge: $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, Abb. 40A), eine „Supersekundärstruktur“, die generell in Dinukleotidbindenden (NADH, FADH) Proteinen auftritt, z.B. der Alkohol-Dehydrogenase der Pferdeliefer (Rossmann, 1974; Ramaswamy, 1994; Eklund, 1976). Es handelt sich dabei um ein paralleles β -Faltblatt, dessen β -Stränge jedoch *alldurch* α -Helices verbunden sind. Ross-

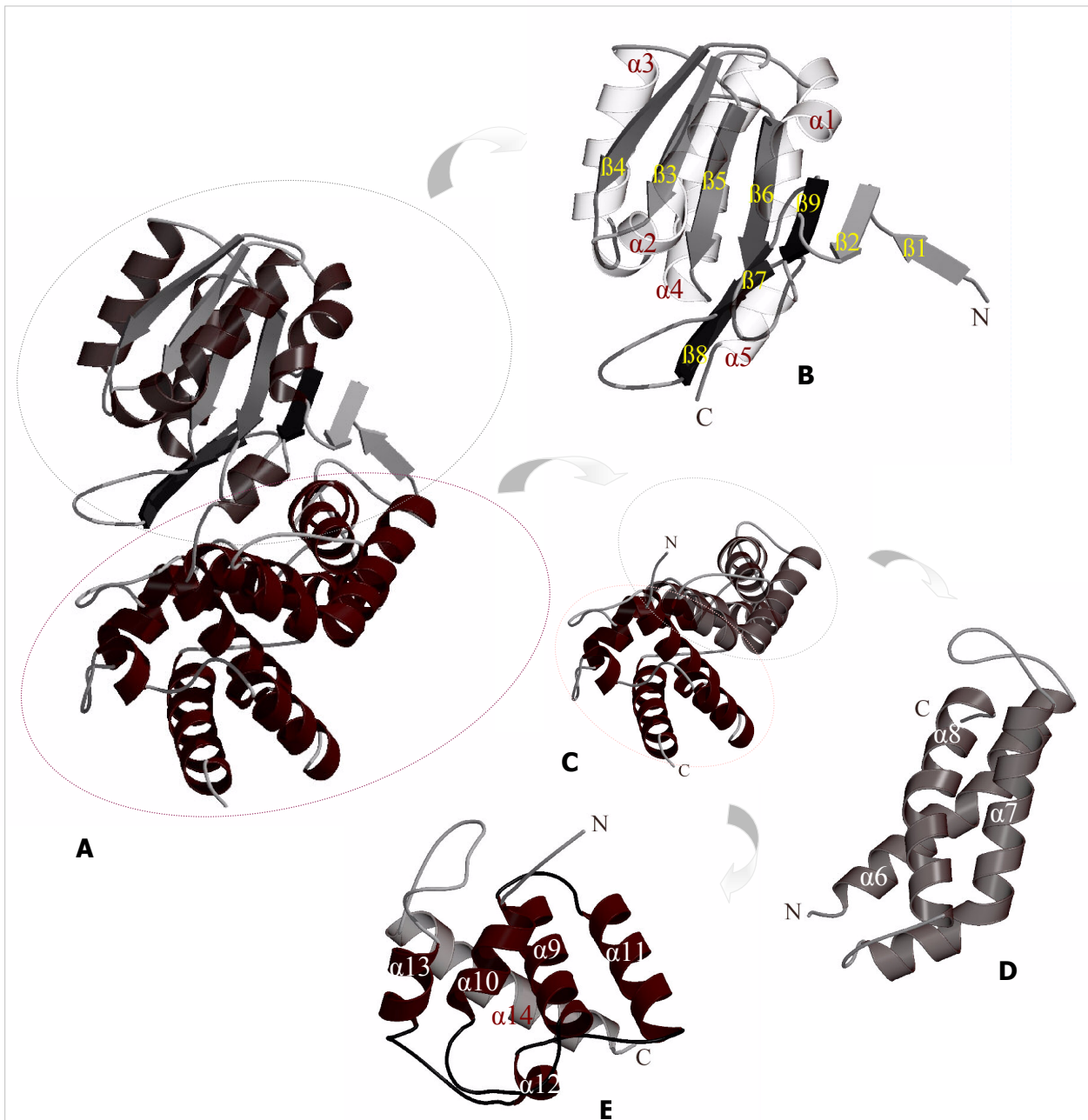


Abb. 39. Darstellung der monomeren Faltung der Glyzerin-Dehydrogenase aus *H. salinarum*. Das Gesamtmonomer (A) ist in der linken Hälfte der Abbildung zu sehen. Durch Umrahmung sind die N- (oben, graue Ellipse) und C-terminale (unten, rote Ellipse) Domäne gekennzeichnet. Folgt man den Pfeilen, gelangt man zu den jeweiligen Vergrößerungen (B und C) der beiden Domänen. Die N-terminale Domäne gleicht vom Aufbau her der Supersekundärstruktur des Rossmann-Folds. Der C-terminale Teil ist selbst untergliedert in zwei Bereiche: einen N-terminalen (D) aus drei α -Helices und einen C-terminalen (E), der dem Strukturmotiv des *greek key*-Helix-Bündels ähnelt.

mann *et al.* (1974) haben vorgeschlagen, daß diese Dinukleotid-Bindedomänen in verschiedenen Dehydrogenasen Gensegmente darstellen, die von einem Organismus in den anderen übertragen und dort jeweils mit verschiedenen katalytischen Domänen kombiniert worden sind. Der Unterschied zu dieser Supersekundärstruktur liegt sowohl bei der halobakteriellen GlyDH, als auch bei den Enzymen aus *B. stearther mophilus* und *T. maritima* in der teilweise abweichenden Verknüpfung der β -Stränge (s.o.). Derartige Phänomene, daß eine Proteidomäne oder -struktur *fast* einem strukturellen Prototyp gleicht,

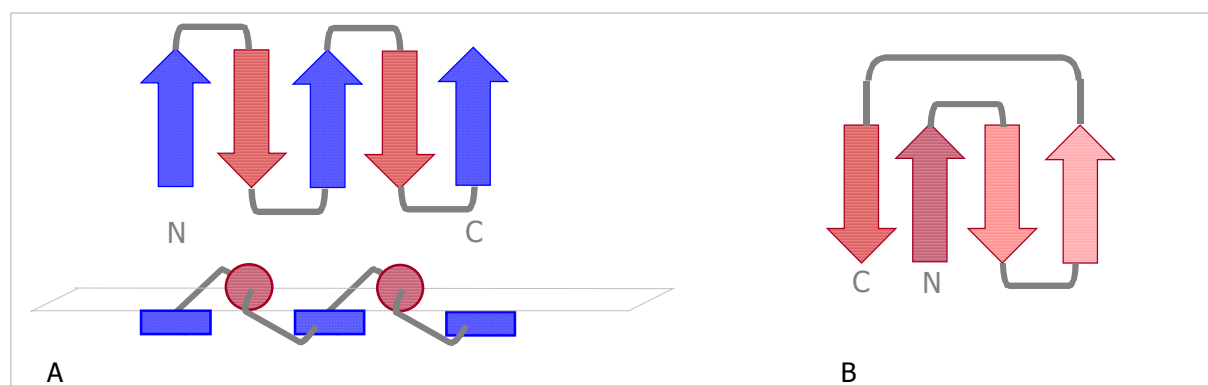


Abb. 40. Schematische Darstellung von Supersekundärstrukturen der halobakteriellen GlyDH. 40A. Rossmann-Fold. Die obere Abbildung zeigt die Abfolge der α -Helices bzw. β -Stränge, die untere verdeutlicht, daß sich die beiden Sekundärelemente in verschiedenen Ebenen befinden. **40B.** Greek key-Helix-Bündel. In beiden Schemata ist der N- bzw. C-Terminus angegeben, rote Pfeile stehen für α -Helices, blaue Pfeile für β -Stränge.

treten relativ häufig auf. Von Richardson wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Abweichungen mit einem zusätzlichen Stabilisationsbedürfnis des jeweiligen Proteins zusammenhängen und als einer der letzten Schritte im Faltungsprozeß auftreten, d.h. daß zuerst tatsächlich der Prototyp entsteht und erst in einem weiteren Schritt die individuelle Anpassung (Richardson, 1981).

Die C-terminale Domäne (Reste 161-365; s. Abb. 39C) enthält selbst wiederum zwei Subdomänen, die beide aus einem Bündel von α -Helices gebildet werden. Die eine Subdomäne ist aus drei α -Helices ($\alpha 6-8$) zusammengesetzt, die ein antiparalleles Helix-Bündel bilden (s. Abb. 39D). In der anderen Subdomäne findet sich ein weiteres bekanntes Strukturmotiv, das sogenannte antiparallele „Greek key“-Helix-Bündel (s. Abb. 39E und 40B), das bei dem halobakteriellen Enzym aus den Helices $\alpha 9-13$ aufgebaut ist. Dieses Strukturmotiv kann ebenso aus antiparallelen β -Strängen bestehen (Richardson, 1981).

Die Spalte, welche die beiden Hauptdomänen voneinander trennt, ist direkt von dem Strukturmotiv des „Greek key helix“-Bündels sowie dem N-terminalen Rossmann-Fold begrenzt (s. Abb. 39A). Der Boden der Spalte wird von dem 3-Helix-Bündel ($\alpha 6-\alpha 8$) gebildet. In dieser Spalte befindet sich bei allen drei Enzymen (*H. salinarum*, *B. stearothermophilus*, *T. maritima*) das aktive Zentrum (s. Kap. 3.1.1.5).

Ein weiteres strukturell nah verwandtes Protein ist die Dehydroquinat-Synthase aus *Emericella (Aspergillus) nidulans* (s. Abb. 44; 1DQS). Dabei handelt es sich um ein homodimeres NAD^+ - sowie Zn^{2+} -bindendes Enzym, das am sogenannten Shikimat-Weg beteiligt ist, der Synthese von aromatischen Komponenten in Bakterien und Pflanzen (Carpenter, 1998). Die Ähnlichkeit der beiden Strukturen aus *H. salinarum* und *E. nidulans* (Übereinanderlagerung nicht dargestellt) ist noch relativ hoch, der *rmsd*-Wert beträgt für 216 C -Atome 1.79 Å.

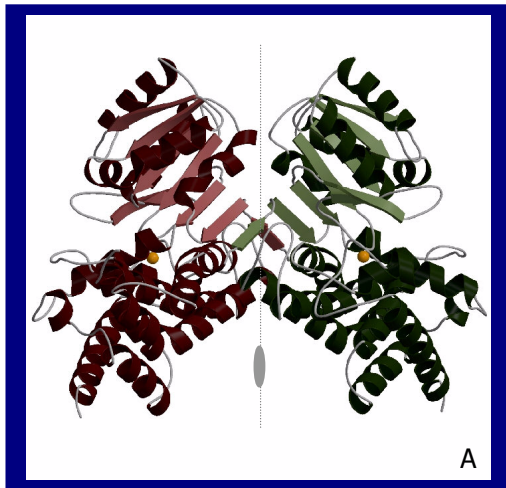
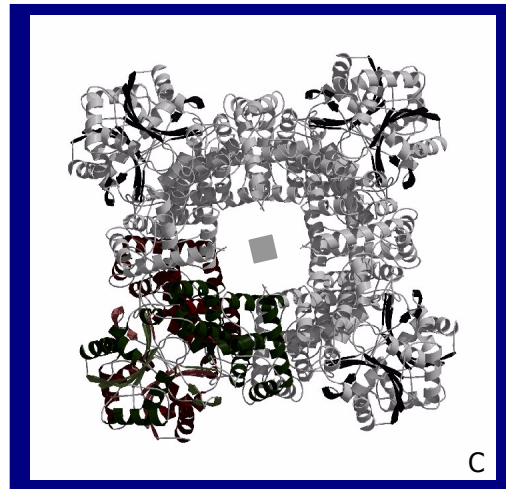
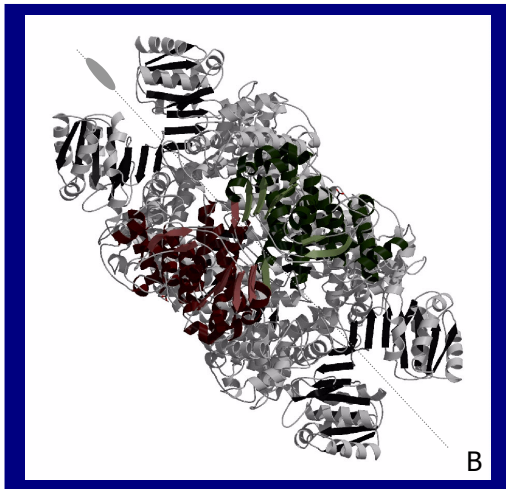


Abb. 41. Beobachteter quartärer Zustand der halobakteriellen GlyDH. 41A. Je zwei Monomere der GlyDH (rot bzw. grün) wechselwirken miteinander v.a. über ihre ersten beiden β -Stränge ($\beta 1$ und $\beta 2$). Die beiden Zinkatome (eines pro Monomer) sind gelb dargestellt. **41B/C.** Modellierte Struktur eines GlyDH-Oktamers mit Blick entlang der **B.** zweizähligen Achse. **C.** vierzähligen Achse. Ein Dimer (s. Abb. 41A) ist in beiden Oktameren rot/grün hervorgehoben.



Beide Enzyme zeigen eine nahezu identische Orientierung der N- und C-terminalen Domäne sowie in der N-terminalen Domäne das Dinukleotid-Bindemotiv des Rossmann-*Folds*.

Bis heute ist keinerlei biochemische Charakterisierung der halobakteriellen GlyDH bezüglich ihres oligomeren Zustandes erfolgt, Vorhersagen müssen sich daher auf die kristallographischen Daten und Homologien stützen. Im Kristallgitter liegt pro asymmetrischer Einheit ein „krabben-ähnliches“ Dimer vor, dessen Monomere über eine zweizählige Achse miteinander verwandt sind (s. Abb. 41A). Die Interaktion dieser Monomere findet v.a. über die ersten beiden β -Stränge ($\beta 1$ und $\beta 2$) statt. Zusätzlich sind noch Salzbrücken sowie hydrophobe Wechselwirkungen über Reste der Helices $\alpha 7$ und $\alpha 8$ (Drei-Helix-Bündel, z.B. Arg197:NH2-Glu228:OE2: 2.89 Å) sowie der ersten Helix $\alpha 1$ und dem Loop zwischen den Strängen $\beta 8$ und $\beta 9$ (Glu144:CD-Ser27:CB, 2.98 Å) beteiligt. Es ist jedoch möglich, daß die halobakterielle GlyDH in ihrem nativen Zustand als Oktamer mit einer 42-Symmetrie vorliegt (modellierte Struktur, s. Abb. 41B/C), da Studien mit dem homologen Protein aus *B. stearothermophilus* gezeigt haben, daß dieses Enzym offensichtlich sowohl als Tetramer (Elektronenmikroskopie) als auch als Oktamer (Gelfiltration) vorliegen kann (Ruzheinikov, 2001). Für einen oktameren

Zustand der halobakteriellen GlyDH spricht zum einen die Packung im Kristall, wobei die vierzählige Achse einer Achse parallel zur kristallographischen c-Achse auf der Höhe von $a/2$ entspricht. Zum anderen sind neben den umfangreichen Interaktionen der Monomere über die zweizählige Achse (s. Abb. 41B) auch entlang der vierzähligen Achse (s. Abb. 41C) ausgeprägte Wechselwirkungen möglich: beteiligt wären daran Reste der Helix $\alpha 7$, des Verbindungsloops $\alpha 7/8$ und $\alpha 10/11$ sowie der Helices $\alpha 11$ und $\alpha 14$ (z.B. His223:NH2-Glu357:OE1: 2.79 Å). Einige dieser Reste sind – auch bezüglich der intermolekularen Wechselwirkung im *B. stearothermophilus* -Enzym konserviert (z.B. HsAsp219/BsAsp221 oder HsArg15/BsArg17).

3.3.1.5 Aktives Zentrum: Bindung von Metallion, Kofaktor und Substrat

Wie bereits in Kap. 3.1.1.4 erwähnt, liegt Homologievergleichen zufolge das aktive Zentrum der halobakteriellen GlyDH in der Spalte zwischen den beiden Hauptdomänen, d.h. hier ist sowohl das Zn^{2+} -Ion, als auch – falls vorhanden – das Substrat (Glyzerin) und der Kofaktor NAD^+ gebunden (s. Abb. 42 und 43).

Alle drei Proteine, das halophile sowie die beiden eubakteriellen, wurden mit Zn^{2+} -Atomen kristallisiert. Bei den hoch konservierten Aminosäure-Liganden des Zn^{2+} -Atoms handelt es sich in den Strukturen von *H. salinarum*, *B. stearothermophilus* und *T. maritima* um ein Aspartat (*Hs*Asp171; *Bs*Asp173; *Tm*Asp169) und zwei Histidinreste (*Hs*His254/271; *Bs*His256/274; *Tm*His252/269). Die 3D-Anordnung der Reste ist in den homologen Proteinen aus *H. salinarum* und *B. stearothermophilus* nahezu identisch (s. Abb. 42). Zusätzlich zu den Aminosäureliganden findet bei letzteren beiden Proteinen noch eine Wechselwirkung zwischen dem Zn^{2+} -Atom und mindestens einem Sauerstoffatom des Glyzerins statt. Ein zweites Sauerstoffatom (*Hs*O3 bzw. *Bs*O2) steht ebenfalls in unmittelbarer Nachbarschaft des Zn^{2+} -Atoms (s.u.; s. Abb. 42 und 45). Bei *B. stearothermophilus* ist in der Struktur ohne Glyzerin das Sauerstoffatom des Alkohols durch ein Wassermolekül (W1; Zn^{2+} -W1: 1.9 Å) als Ligand

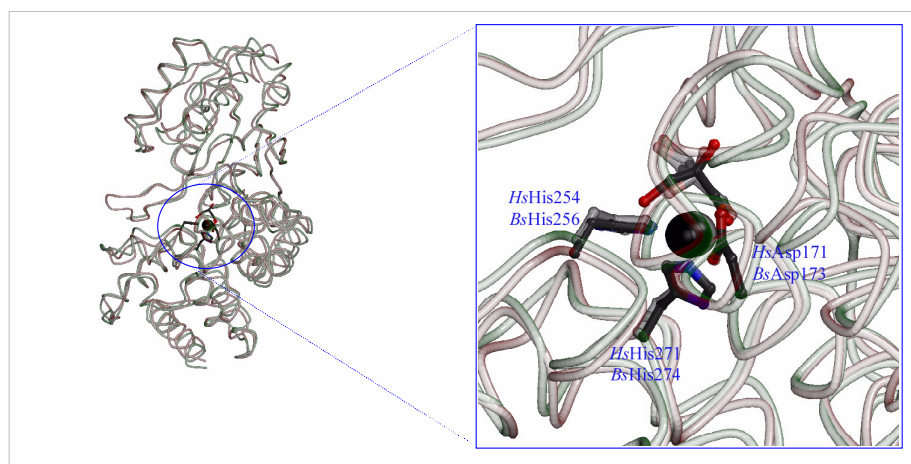


Abb. 42. Vergleich der Zn^{2+} -Bindestelle in den GlyDHn aus *H. salinarum* und *B. stearothermophilus*. Die beiden Strukturen wurden übereinandergelegt (links), die Bindestelle samt Glyzerin ist vergrößert dargestellt (rechts). Schwarz, Zn^{2+} -Ion.

ersetzt (Ruzheinikov, 2001). Die Abstände der Liganden zu dem Zn^{2+} -Ion in der halobakteriellen GlyDH verglichen zum *Bacillus*-Enzym können Tab. 10 entnommen werden.

Auch in der Dehydroquinat-Synthese von *E. nidulans* finden sich als Zn^{2+} -Liganden die beiden Histidin-Reste (His271, His287), das Aspartat ist allerdings gegen ein Glutamat (Glu194) ausgetauscht (s. Abb. 44). Das Zn^{2+} -Ion nimmt bei beiden Strukturen eine vergleichbare Position ein (nicht dargestellt).

Ligand des Zn^{2+} -Atoms	Abstand in <i>H. salinarum</i>	Abstand in <i>B. stearothermophilus</i>
Aspartat (<i>Hs</i> Asp171, OD1; <i>Bs</i> Asp173, OD1)	2.07	2.05
Histidin 1 (<i>Hs</i> His254; <i>Bs</i> His256)	2.06	2.03
Histidin 2 (<i>Hs</i> His271; <i>Bs</i> His274)	2.01	2.04
Glyzerin (<i>Hs</i> O1; <i>Bs</i> O1)	2.29	1.97
Glyzerin (<i>Hs</i> O3; <i>Bs</i> O2)	2.76	2.41

Tab. 10. Abstände des Zn^{2+} -Atoms zu seinen Liganden. Neben den drei Aminosäure-Liganden tritt in der halobakteriellen sowie in der *Bacillus*-Struktur mit Glyzerin mindestens ein Glyzerin-Sauerstoffatom in Wechselwirkung mit dem Zn^{2+} -Ion. Die Abstände sind in Å angegeben. *Hs*, *H. salinarum*; *Bs*, *B. stearothermophilus*.

Zur Familie der Metall-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen (s. Einleitung) gehören auch Eisen-bindende Enzyme, z.B. die ADH aus *T. maritima* (1J5R, wird veröffentlicht). Bis jetzt ist nicht geklärt, wie die Kationenspezifität jeweils geregelt wird. Ein Vergleich der halophilen GlyDH mit dem Enzym aus *T. maritima* – das übrigens $NADP^+$ als Kofaktor gebunden hat – zeigt einen *rmsd*-Wert von 1.787 Å für 233 C_{α} -Atome. Die ADH enthält – bis auf eine Ausnahme – die gleichen Liganden, die auch bei den GlyDHn auftreten: ein Aspartat (Asp189) und zwei Histidinreste (His256, His270). Zusätzlich findet sich hier jedoch noch ein weiterer Histidinrest (His193:NE2- Zn^{2+} : 2.28 Å), dem ein vergleichbares Äquivalent in der halobakteriellen GlyDH fehlt (Thr175- Zn^{2+} : 7.34 Å; s. Abb. 43) und das möglicherweise eine Rolle spielt in der Auswahl des Metallatoms.

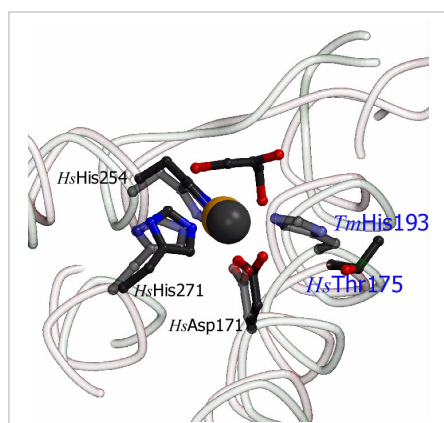


Abb. 43. Vergleich des aktiven Zentrums der halobakteriellen GlyDH mit der ADH aus *T. maritima*. Übereinanderlagerung der Metall-Bindestelle der GlyDH aus *H. salinarum* mit der entsprechenden Bindestelle der ADH aus *T. maritima*. Bezeichnet sind neben den voneinander abweichenden Resten (blau) nur die Zink-Liganden der GlyDH aus *H. salinarum* (schwarz). Schwarz, Zink-Atom; gelb, Eisen-Atom.

Von den Proteinen, die hier verglichen werden, hat nur eine der *Bacillus*-Strukturen (1JQ5) tatsächlich NAD⁺ gebunden, die GlyDHn der anderen beiden Mikroorganismen wurden ohne diesen Kofaktor kristallisiert. Die Aminosäurereste, die in der GlyDH von *B. stearothermophilus* für die NAD⁺-Bindung verantwortlich sind – sei es direkt durch Wasserstoffbrücken oder indirekt durch Bildung der Bindetasche –, sind sowohl in dem Enzym von *H. salinarum* als auch bei *T. maritima* nahezu vollständig konserviert (s. Abb. 44, Tab. 11; Ruzheinikov, 2001: Text; Alignment, Fig. 2; Bindungstasche, Fig.6). Sie befinden sich fast alle (mit Ausnahme der letzten beiden, s. Tab. 11) in der N-terminalen Domäne des Enzyms, die dem klassischen Rossmann-Fold ähnelt. Dieses Faltungsmotiv findet sich ebenfalls in der hMDH aus *H. marismortui* (Dym, 1995).

<i>B. stearothermophilus</i>	<i>H. salinarum</i>	<i>T. maritima</i>	Indirekte Beteiligung (Bt)	Direkte Beteiligung (Hb)
Asp39	Asp37	Asp37		Hb
Ile41	Ile39	<i>Phe39</i>	Bt	
Val42	Val40	Val40	Bt	
Ile45	<i>Met43</i>	<i>Val44</i>	Bt	
Gly95	Gly93	Gly91	Bt	
Gly96	Gly94	Gly92		Hb
Lys97	Lys95	Lys93		Hb
Asp100	Asp98	Asp96		Hb
Thr118	Thr116	Thr114		Hb
Ser121	Ser119	Ser117		Hb
Asp123	Asp121	Asp119	Bt	
Ala124	Ala122	Ala120	Bt	
Ser127	Ser125	Ser123		Hb
Leu129	Leu127	Leu125		Hb
Ser130	Ser128	Ser126	Bt	
Val131	Val129	Val127	Bt	
Tyr133	Tyr131	Tyr129	Bt	
Pro163	Pro161	Pro159	Bt	
Leu166	<i>Phe164</i>	<i>Phe162</i>	Bt	
Asp173	Asp171	Asp169	Bt	
Phe247	Phe245	Phe243	Bt	
His274	His271	His269	Bt	

Tab. 11. NAD⁺-Bindestelle. Vergleich der Liganden bzw. Reste der Bindetasche für NAD⁺ aus der GlyDH von *B. stearothermophilus* mit den entsprechenden Resten aus *H. salinarum* und *T. maritima*. Dargestellt sind alle Liganden, die nach Ruzheinikov *et al.* (2001) teilhaben an der Bindetasche bzw. sogar durch direkte Interaktion mit NAD⁺ über Hb. Abweichungen der letzten beiden Strukturen zu der *Bacillus*-Struktur sind durch kursive Schrift und linksbündige Darstellung gekennzeichnet. Hb, Wasserstoffbrücke; Bt, Bindetasche.

Man hat entdeckt, daß viele NAD⁺-bindende Domänen, z.B. die der ADH aus Pferdeleber als hoch konserviertes Motiv die Konsensus-Sequenz Gly-X-Gly-X-X-Gly (X ist irgendeine Aminosäure) aufweisen. Jedem der Glyzine wird eine spezielle Aufgabe zugeschrieben: die

ersten beiden sind in die Bindung des Nukleotids involviert, das dritte Glyzin sorgt für eine enge Packung der nachfolgenden α -Helix gegen das β -Faltblatt. Weiterhin findet sich noch ein negativ geladener Rest (meist Aspartat) am C-Terminus des zweiten β -Stranges, der eine Wasserstoffbrücke mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose des Adenosin-Restes im NAD^+ bildet (Scrutton, 1990; Lesk, 1995). Das dritte Glyzin sowie das Aspartat sind Reste, die an der Unterscheidung in der Bindungsspezifität für NAD^+ bzw. NADP^+ beteiligt sind. Durch Austausch dieser Reste sowie fünf weiterer Aminosäuren war es möglich, die Spezifität eines ursprünglich NADP^+ -bindenden Proteins auf die bevorzugte Bindung von NAD^+ „umzupoolen“ (Scrutton, 1990). In den GlyDHn von *H. salinarum*, *B. stearothermophilus* und *T. maritima* findet sich ebenfalls ein Glyzin-reicher Abschnitt und zwar am Übergang von $\beta 5$ zu $\alpha 4$, die Sequenz ist folgendermaßen aufgebaut: Gly-X-Gly-Gly-Gly-K (s. Abb. 37; *HsGly90-HsLys95*). Dieses Motiv ist auch in anderen homologen GlyDHn hoch konserviert, wobei sich die meisten Abweichungen bei dem ersten Glyzinrest zeigen, der in wenigen Fällen, u.a. der Dehydroquinat-Synthase aus *E. nidulans*, gegen Alanin ersetzt ist (s. Abb. 44). Obwohl nur für das *Bacillus*-Enzym tatsächlich NAD^+ -Bindung nachgewiesen wurde, kann anhand von Sequenz- und Strukturhomologien davon ausgegangen werden, daß auch die halobakterielle GlyDH den Kofaktor NAD^+ mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ähnliche Art bindet. In Abb. 45 ist das aktive Zentrum der GlyDH aus *H. salinarum* dargestellt, in das der Kofaktor NAD^+ aus der *Bacillus*-Struktur (1JQ5) hineinmodelliert wurde, um die relative Anordnung von NAD^+ zum Zn^{2+} -Ion bzw. zum Substrat Glyzerin zu verdeutlichen (s. Abb. 45B).

Aus dem eben vorgestellten Glyzin-Motiv sind bei *B. stearothermophilus* die Peptid-Stickstoffatome der Reste Gly96 (*HsGly94*) sowie Lys97 (*HsLys95*) über Wasserstoffbrücken an die Sauerstoffatome der Pyrophosphat-Gruppe des NAD^+ gebunden. Weitere ebenfalls konservierte Reste, die direkt Wasserstoffbrücken mit dem Nikotinamid-Ring des NAD^+

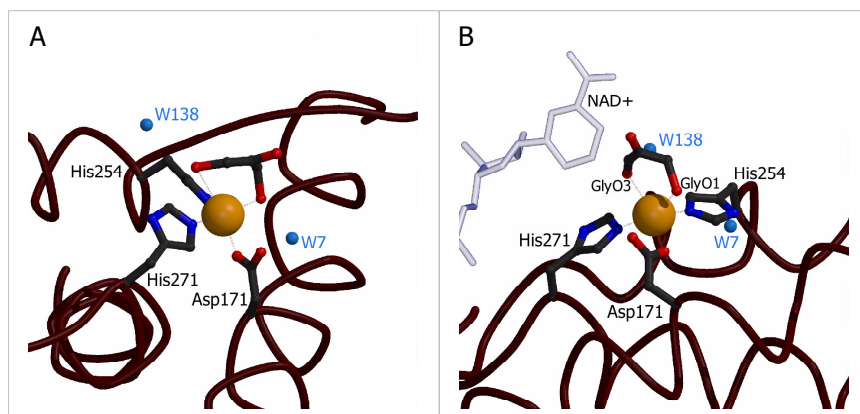


Abb. 45. Aktives Zentrum: Bindung von NAD^+ und Glyzerin. **45A.** Der Blickwinkel dieser Ansicht entspricht dem in Abb. 43. **45B.** Das NAD^+ wurde aus der Struktur der GlyDH aus *B. stearothermophilus* (1JQ5) in die halobakterielle Struktur modelliert. Blau, Wassermoleküle; gelb, Zn^{2+} -Ion.

bilden, sind Asp100, Ser127 und Leu129 (*Hs*Asp98, Ser125, Leu127). Auch die drei Aminosäurereste Asp39, Thr118 sowie Ser121 (*Hs*Asp37, Thr116, Ser119), die gleichfalls über Wasserstoffbrücken verknüpft sind mit dem NAD^+ -Molekül, sind gut konserviert in den zu der halobakteriellen GlyDH homologen Proteinen (s. Abb. 44). Zwischen NAD^+ und Glyzerin bzw. dem Zn^{2+} -Ion scheint keine direkte Überbrückung zu bestehen. Wie nun die exakte Position des Kofaktors NAD^+ in der GlyDH aus *H. salinarum* aussieht, wird sich durch weitere Kristallisationsexperimente in Anwesenheit dieses Dinukleotids erweisen.

Der letzte Abschnitt dieses Kapitels behandelt Art und Bindung des Substrats in der Kristallstruktur der halobakteriellen GlyDH, wobei es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Glyzerin handelt. Dafür gibt es mehrere Hinweise: zum einen befindet sich an der Stelle, die in der GlyDH aus *B. stearther mophilus* als Glyzerin-Bindestelle nachgewiesen wurde, eindeutig Elektronendichte (s. Abb. 46). Für die *Bacillus*-GlyDH wurden dabei zwei mögliche Konformationen vorgeschlagen: eine bevorzugte, *major*, und eine nicht bevorzugte, *minor* (s.u.; Ruzheinikov, 2001). Zum anderen zeigt ein Vergleich der beiden Strukturen (s. Abb. 38A/B), daß sich die Schlaufe der Reste 130-140 in der *Bacillus*-Struktur mit Glyzerin (1JQA) besser mit der entsprechenden halobakteriellen Region übereinanderlagern läßt als die der Glyzerin-freien Struktur (1JQ5). Das ist der Bereich, der sich über dem aktiven Zentrum befindet. Hinzu kommt, daß auch tatsächlich Glyzerin für die Bindung zur Verfügung stand – und zwar in dem Puffer, der in dieser Arbeit zum Frieren des Kristalls verwendet worden war. Dies alles deutet darauf hin, daß die GlyDH aus *H. salinarum* tatsächlich mit dem Substrat Glyzerin kristallisiert worden ist. Betrachtet man sich die Orientierung und die (wahrscheinli-

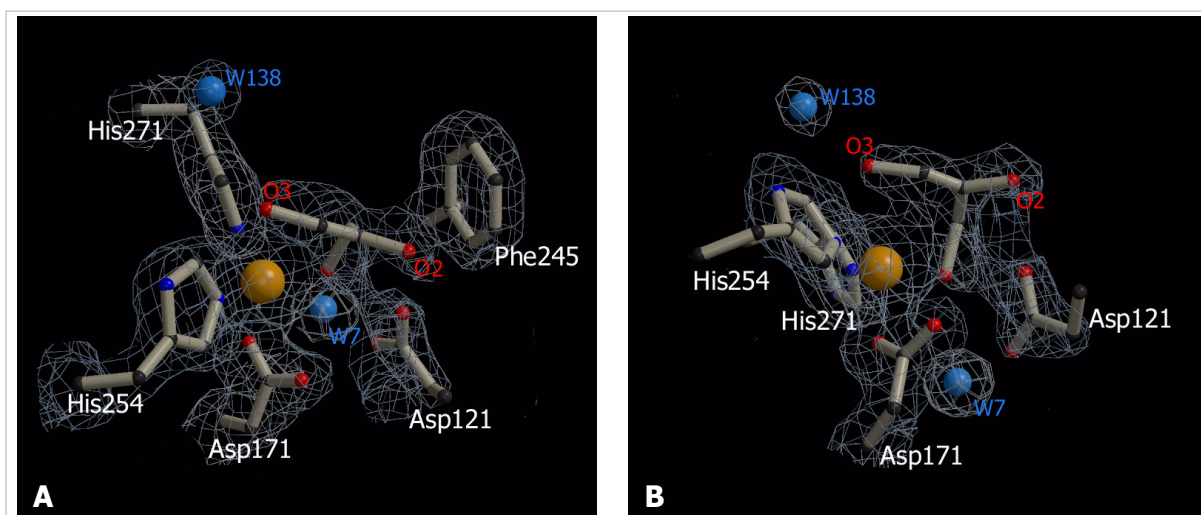


Abb. 46. Darstellung der $|2F_o - F_c|$ -Elektronendichte im Bereich der Glyzerin-Bindestelle. Beide Abbildungen zeigen das Substrat Glyzerin sowie seine Aminosäure-Liganden, die benachbarten Wasseratome (blau) und das Zn^{2+} -Ion (gelb). Abb. **46A** enthält im Unterschied zu **46B** noch das Phe245, einen weiteren das Glyzerin stabilisierenden Rest.

chen) Liganden des Glycerins in der GlyDH-Struktur von *H. salinarum*, erkennt man deutlich, daß alle Aminosäure-Liganden konserviert sind – verglichen mit der GlyDH aus *B. stearothermophilus* (s. Abb. 46; Abb. 37; Tab. 12).

Sowohl bei der GlyDH aus *H. salinarum* als auch bei dem Enzym aus *B. stearothermophilus* findet sich als direkter Ligand für die erste Hydroxylgruppe (O1) des Glycerins das Zn^{2+} -Ion. Zum anderen befinden sich *HsAsp121/ BsAsp123* und *HsHis254/ BHis256* in unmittelbarer Nähe, was ebenfalls auf eine signifikante Interaktion hindeutet (s. Abb. 46; Tab. 12). Insofern entspricht sich die Glycerin-Orientierung in beiden Strukturen. Nun zeigen sich jedoch Unterschiede: bei der halobakteriellen GlyDH bieten sich als weitere Liganden für O1 das zweite Aspartat *HsAsp171 (BsAsp173)*, das Sauerstoffatom der Peptidbindung von *HsMet122 (BThr122)* sowie ein Wassermolekül *HsW7 (BW3)* an. Aufgrund der Abstände kann jedoch angenommen werden, daß es im Gegensatz zur bevorzugten (*major*) Konformation der *Bacillus*-GlyDH in dem halobakteriellen Enzym keine Wechselwirkung zwischen dem O2 des Glycerins und dem Zn^{2+} -Atom gibt, dafür aber zwischen dem Metall-Atom und dem O3 des Substrats (Abstände, s. Tab. 12). Ebenso existiert keine Wechselwirkung zwischen dem O2 und den Histidinen, *HsHis254 (BHis256)* und *HsHis274 (BHis276)* im halobakteriellen Enzym. Bei einem weiteren Liganden der dritten Hydroxylgruppe im Glycerin (O3), dem Wassermolekül W1 aus der *Bacillus*-Struktur, fehlt das entsprechende Äquivalent in der halobakteriellen Struktur (Ersatz möglicherweise: Wassermolekül W138).

Glycerin-Atom	<i>H. salinarum</i> / Struktur-Atom	Abstand [Å]	<i>B. stearothermophilus</i> / Struktur-Atom	Abstand [Å]
O1	Zn^{2+}	2.00	Zn^{2+}	1.97
	Asp121-OD1	2.44	Asp123-OD1	2.41
	Asp121-OD2	2.8	Asp123-OD2	2.98
	Asp171-OD1	2.07	Asp173-OD1	3.13
	Asp171-OD2	2.86	Asp173-OD2	3.34
	His254-NE2	2.74	His256-NE2	2.87
	His271-NE2	3.91	His274-NE2	3.87
O2	W7	3.25	W3	3.41
	Zn^{2+}	4.24	Zn^{2+}	2.41
	His254-NE2	5.42	His256-NE2	3.23
	His271-NE2	5.29	His274-NE2	2.75
O3	Met120-O (Peptid)	2.54	Thr122-O (Peptid)	7.82
	Zn^{2+}	2.77	Zn^{2+}	5.44
	-	-	W1	2.91
	W138	3.28	W2	4.62

Tab. 12. Glycerin-Bindestelle. Vergleich der Liganden der GlyDHn aus *B. stearothermophilus* und *H. salinarum* sowie Angabe der Abstände zwischen den Glycerin-Sauerstoff-Atomen und den jeweiligen Aminosäureresten.

Betrachtet man sich jedoch die nicht-bevorzugte (*minor*) Konformation der *Bacillus*-GlyDH, in der das Glyzerin-Molekül einmal um seine eigene Achse gedreht ist, sieht man, daß auch dort die Wechselwirkung zwischen dem Zn^{2+} -Atom und dem O2-Hydroxyl des Glyzerins fehlt. Das bedeutet, daß die Situation des halobakteriellen Enzyms in diesem Punkt mit der alternativen Konformation in der GlyDH aus *B. stearothermophilus* übereinstimmt. Allerdings konnte von Ruzheinikov *et al.* (2001) gezeigt werden, daß die nicht-bevorzugte Konformation in Anwesenheit von NAD^+ aufgrund sterischer Konflikte nicht möglich ist.

Erst eine Kokkristallisation der halobakteriellen GlyDH mit NAD^+ und Glyzerin wird zeigen können, ob die hier vorliegende Konformation des Glyzerins nur eine Art Übergangszustand repräsentiert oder tatsächlich die für die Oxidation des Glyzerins passende Position. Möglicherweise liegt der Unterschied der halobakteriellen Struktur zur bevorzugten (*major*) Konformation im *Bacillus*-Enzym an den verschiedenen Methoden, wie das Glyzerin in den Kristall eingebracht wurde: die GlyDH von *Bacillus* wurde mit Glyzerin kokkristallisiert, während bei der GlyDH aus *Halobacterium* das Glyzerin nachträglich durch eine Umpuffung in den Kristall eingebracht wurde.

Die eben vorgestellten Unterschiede haben Auswirkungen auf eine Theorie zur Substratspezifität, die von Ruzheinikov *et al.* (2001) vorgeschlagen wurde: Glyzerin-Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation einer Hydroxylgruppe zum entsprechenden Keton. Bei der GlyDH aus *B. stearothermophilus* und wahrscheinlich aufgrund der hohen strukturellen Homologie auch bei der aus *H. salinarum* handelt es sich dabei um einen Zn^{2+} - und NAD^+ -abhängigen Prozeß. Einen ähnlichen Reaktionsablauf findet man ebenfalls bei der Dehydroquinate-Synthase aus *E. nidulans* (Carpenter, 1998; Ruzheinikov, 2001). Die Selektivität von GlyDHn ist insgesamt gesehen nicht sehr hoch (s.u., Tab. 13), es wird jedoch generell angenommen, daß das Substrat für die Bindung an das Enzym eine wichtige Voraussetzung aufzuweisen hat: zwei Hydroxylgruppen an zwei benachbarten Kohlenstoffatomen, wie z.B. im Glyzerin, aber auch bei dem Alkohol 1,2-Propandiol. Der Grund für diese Annahme ist nach Ruzheinikov *et al.* (2001) eine Bindung der beiden benachbarten Hydroxylgruppen (bei Glyzerin: O1 und O2) an das Zn^{2+} -Atom, wie es in der Struktur des *Bacillus*-Enzyms gefunden wurde (Ruzheinikov, 2001; Spencer, 1989). In der halobakteriellen Struktur scheinen jedoch – wie oben dargelegt – nicht zwei benachbarte Hydroxylgruppen mit dem Metallatom verbunden zu sein, sondern die beiden jeweils außen liegenden Gruppen des Glyzerins (O1 und O3). Ein ähnliches Ergebnis findet sich bei der GlyDH aus *T. maritima*: hier ist das – in der Struktur gebundene – Substrat

zwar nicht Glyzerin, sondern ein 1,3-Propandiol-Derivat, doch auch hier treten zwei Hydroxylgruppen mit dem Metall in Wechselwirkung, die nicht an zwei benachbarten C-Atomen sitzen. Vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses muß die erwähnte Theorie bezüglich der Substratspezifität neu überdacht werden.

3.3.1.6 Vergleich verschiedener Glyzerin-Dehydrogenasen im Hinblick auf Substrat- und Kofaktorspezifität

In Tab. 13 sind die meisten der GlyDHn, die in der Literatur bereits beschrieben wurden, mit einigen ihrer spezifischen Eigenschaften aufgeführt. Dazu gehören einmal das Molekulargewicht sowohl in monomerer als auch in oligomerer Form, der verwendete Kofaktor, die Substratspezifität sowie eine Auswahl an Substanzen (Metalle bzw. EDTA), die aktivierend oder hemmend wirken. Dabei wurde nur die „Hinreaktion“ berücksichtigt, also die Oxidation des Substrates, z.B. Glyzerin.

Das mit am besten untersuchte Protein dieser Zusammenstellung ist die GlyDH aus *B. stearothermophilus*. Wie man der Tabelle entnehmen kann, handelt es sich bei diesem Enzym um eine NAD⁺-abhängige Oxidoreduktase, die divalente Kationen wie Zn²⁺, aber auch Cd²⁺, Co²⁺ oder Mn²⁺ bindet. Monovalente Kationen haben keinen aktivierenden Effekt. Ohne Zn²⁺, z.B. nach Zugabe von EDTA findet keine Katalyse mehr statt. Durch Zugabe von Zn²⁺ kann diese Hemmung wieder rückgängig gemacht werden. Das Substratspektrum ist insgesamt relativ breit, es gibt jedoch Vorlieben, so wird Glyzerin eher umgesetzt als 1,2-Propandiol (Spencer, 1989). Ähnlich verhält sich die GlyDH aus *B. megaterium*. Eine weitere Gruppe läßt sich aus den Proteinen von *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. pombe* bilden, aus dem Rahmen fällt dabei die *E. coli*-GlyDH mit einem niedrigeren Oligomerezustand.

Die bisher bekannten (monomeren) Molekulargewichte der Enzyme sind insgesamt relativ ähnlich (zwischen 38000 und 47000 kDa). Ansonsten gibt es immer wieder Ähnlichkeiten zwischen einzelnen Enzymen, aber keine Übereinstimmung in allen Punkten, d.h. Molekulargewicht, Kofaktor, Substratspezifität und aktivierende/hemmende Metalle. Im Hinblick auf den Kofaktor lassen sich die Enzyme der Tabelle klar gruppieren: alle bakteriellen Proteine sowie eine einzige eukaryontische GlyDH aus *S. pombe* verwenden bevorzugt NAD⁺, die übrigen eukaryontischen GlyDH NADP⁺ als Kofaktor. Letztere zeigen zudem eher ein engeres Substratspektrum. Dabei ist es noch einmal wichtig, darauf hinzuweisen, daß nur die Oxidationsreaktion beachtet wurde, denn z.B. für die Enzyme aus *E. coli* und *S. pombe* kann bei der Reduktion von DHA NADH⁺ durch NADPH⁺ ersetzt werden.

Zwei GlyDHn fallen prinzipiell aus dem Rahmen: einmal das Enzym aus *G. industrius*, das als einziges Protein dieser Tabelle membrangebunden vorliegt und PQQ (Pyrroloquinolinchinon) als Kofaktor verwendet. Zum anderen setzt die GlyDH aus *Cl. butyricum* als einziges Enzym nahezu kein 1,2-Propandiol um, stattdessen das Isomer 1,3-Propandiol.

Betrachtet man sich die Abhängigkeit dieser GlyDH von Metall-Ionen, fällt auf, daß fast alle Enzyme ein derartiges Ion (in keinem Fall Eisen) für die Katalyse zu benötigen scheinen und durch EDTA gehemmt werden. Das bedeutet, daß sie damit zu der Familie der „Metall-abhängigen Alkohol-DHn“ gerechnet werden können, die von Ruzheinikov *et al.* (2001) im Gegensatz zur Bezeichnung der „Eisen-abhängigen Alkohol-DHn“ postuliert worden ist. Die Gruppe der Alkohol-Dehydrogenasen wird nach dem verwendeten Koenzym und der Größe des Proteins in drei Familien aufgeteilt: dazu gehören die MDR- (z.B. ADH aus Pferdeleber; Eklund, 1976) und die SDR-Familie (z.B. ADH aus Drosophila; Schwartz & Jörnvall, 1976) sowie die bis jetzt so benannten Eisen-abhängigen Alkohol-DHn (vgl. Einleitung, Kap. 1.4). In letzterer Familie erfolgt die Bindung des Metall-Ions Sequenzvergleichen nach zumindest für die GlyDHn aus *Bacillus*, *Halobacterium*, *C. freundii*, *E. coli* und *S. pombe* nicht über Cystein-Reste, wie sie in der Gruppe der mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR-Familie) vorliegt (s. Abb. 44). Bezogen auf das Molekulargewicht gleichen die GlyDHn aus Tab. 13 jedoch den Mitgliedern der MDR-Familie. Ob es sich aufgrund der Vielfalt an aktivierenden Metall-Ionen lohnen würde, diese Familie der Metall-abhängigen Alkohol-DHn noch in einzelne Untergruppen zu unterteilen, wird sich durch weitere Charakterisierung von Proteinen dieser Familie erweisen.

In dieser Arbeit konnte durch die Strukturaufklärung der GlyDH aus *H. salinarum* eindeutig bewiesen werden, daß dieses Enzym aufgrund seiner Größe, der Art des gebundenen Metallions (Zn^{2+} -Atom) und dessen Bindungsliganden zur dritten Familie der Alkohol-DHn (Metall-bindende Alkohol-DHn) zählt. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Kristallstruktur das Substrat Glyzerin gebunden hat, ist sehr hoch, weitere Kristallisationsstudien ohne Substrat bzw. mit anderen Substraten sowie mit dem Kofaktor NAD^+ und biochemische Untersuchungen werden dazu beitragen, die Bindungsspezifität dieses Enzyms genauer aufzuklären.

Organismus	Molekulargewicht [kDa] (Oligomer/Monomer/ Untereinheiten)	Ko- faktor	Substrat- spezifität	aktiviert durch:	gehemmt durch:	Referenz
<i>Bacillus megaterium</i>	156000 / 38000 / 4	NAD ⁺	G > PD, rel. breit	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	EDTA; nb	Scharshmidt, 1983
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	180000 / 39500 / 4	NAD ⁺	G > PD, rel. breit	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	EDTA	Spencer, 1989
<i>Citrobacter freundii</i>	246000 / 43000 / 6	NAD ⁺	G > PD, breit	Mn ²⁺	EDTA; Zn ²⁺	Daniel, 1995
<i>Clostridium butyricum Wt</i>	181000 / nb / 4 (?)	NAD ⁺	G > 1,3-PD, eng	Mn ²⁺	nb	Malaoui, 2001
<i>Erwinia aroideae</i>	nb	nb	PD > G, rel. breit	nb	nicht EDTA, Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Sugiura, 1978
<i>Escherichia coli K12 Mutante</i>	310000 (81000) / 39000 / 8 (2)	NAD ⁺	PD > G, breit	NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺	EDTA; Cu ²⁺	Tang, 1979
<i>Gluconobacter industrius</i>	nb	PQQ	breit	nb	EDTA; nb	Ameyama, 1985
<i>Halobacterium salinarum</i>	nb / 38000 / nb	nb	nb	nb	nb	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	180000 / 40000 (79000) / 4 (2)	NAD ⁺	PD > G, breit	Mn ²⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺	EDTA; Zn ²⁺	Lin, 1976; Ruch, 1980
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	400000 / 47000 / 8	NAD ⁺	PD > G, breit	K ⁺ , NH ₄ ⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺	EDTA; Li ⁺ , Na ⁺	Marshall, 1985
<i>Aspergillus niger/nidulans</i>	38000 / 38000 / 1	NADP ⁺	G, Erythritol, eng	nb	nb	Schuurink, 1990
<i>Neurospora crassa</i>	160000 / 43000 / 4	NAD(P) ⁺	G, eng	nb	(EDTA)	Viswanath-Reddy, 1978
<i>Dunaliella parva</i>	65000 / nb	NADP ⁺	G >>> PD, eng	z.T. durch NH ₄ ⁺	nicht EDTA	Ben-Amotz, 1973/74
<i>Oryctolagus cuniculus (Hase)</i>	34000 / nb	NADP ⁺	PD > G, breit	nb	nb	Kormann, 1972; Flynn, 1982

Tab. 13. Vergleich verschiedener Glyzerin-Dehydrogenasen. Dargestellt sind einige eukaryontische und prokaryontische Glyzerin-Dehydrogenasen bezüglich ihres Molekulargewichtes, ihrer Substrat/Kofaktor-Spezifität und einiger hemmender/aktivierender Substanzen. Die Angaben wurden dabei soweit gemacht, wie sie in den jeweiligen Literaturangaben dargelegt waren. Betrachtet wurde jeweils nur die Oxidationsreaktion, d.h. etwa von Glyzerin zu DHA. Bei der GlyDH z.B. aus dem Hasen findet man mit NAD⁺ noch 10% der Aktivität mit NADP⁺. Das Molekulargewicht wurde für den oligomeren Zustand meist über Gelfiltration, für den monomeren Zustand über SDS-PAGE bestimmt. Für Aktivatoren/Inhibitoren wurden nur Metallionen/EDTA aufgezählt. nb, nicht bestimmt; G, Glyzerin; PD, 1,2-Propandiol; 1,3-PD, 1,3-Propandiol; Wt, Wildtyp (*Cl. butyricum* Wt setzt nahezu kein PD um!).

3.4 Halophilie: Anpassung an Hochsalzbedingungen

Unter Halophilie versteht man die Anpassung von Mikroorganismen und damit ihrer „Proteomaschinerie“ an Hochsalzbedingungen – ein Phänomen, das bis heute nicht vollständig verstanden ist. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wäre interessant nicht nur bezogen auf halophile Proteine selbst, sondern generell, um einen tieferen Einblick in Faltung und Stabilisierung von Proteinen zu erlangen.

Bei den frühesten Untersuchungen in dieser Richtung handelte es sich um Vergleiche von Primärsequenzen, um mehr über die Aminosäure-Zusammensetzung halophiler Proteine herauszufinden. Die wichtigsten Schlußfolgerungen daraus waren, daß diese Proteine eine verstärkte Ausprägung saurer (Glutamat, Aspartat) sowie sogenannter „Grenzfall“ (*borderline*)-hydrophober Reste (Threonin, Serin) und gleichzeitig eine Verminderung basischer Aminosäuren (Lysin) gegenüber nicht-halophilen Proteinen aufweisen (Lanyi, 1974).

Erst einige Zeit später bot sich die Gelegenheit derartige Sequenzvergleiche unter Einbeziehung struktureller Gegebenheiten zu ziehen: die Grundlage dafür lieferte die Aufklärung der 3D-Struktur eines Proteins (Ferredoxin von *Spirulina platensis*), von dem Aminosäuresequenzen sowohl diverser nicht-halophiler als auch halophiler Homologa bekannt waren (Rao & Argos, 1981). Dabei wurden frühere Ergebnisse bestätigt und ergänzt: der Überschuß an negativen Resten, der sich bereits in der Sequenz abgezeichnet hatte, zeigte sich in der 3D-Struktur bevorzugt auf der Oberfläche verteilt und kaum in der Nähe des aktiven Zentrums. Im Schlußwort bezeichnen die Autoren halophile Proteine vereinfacht als „große Anionen, die effektiv mit den vielen Salzionen ihrer Umgebung um Wassermoleküle konkurrieren“ (Rao & Argos, 1981).

Einen weiteren Unterschied von halobakteriellen Proteinen zu ihren mesophilen Verwandten stellt das Mengenverhältnis von Arginin zu Lysin dar, das in halophilen Proteinsequenzen stark erhöht ist. Es wird darauf zurückgeführt, daß Arginin eine höhere Wasserbindekapazität zeigt als Lysin, was auch daran liegt, daß Lysin durch seinen längeren hydrophoben Teil stark wasserabweisend ist (Pieper, 1998).

Einen großen Fortschritt brachten Studien an halophilen Proteinen in Lösung („*solution studies*“; Zaccai, 1989; Ebel, 1992; Bonnetè, 1993; Ebel, 1995) sowie die Analyse modellierter Strukturen etwa der DHFR aus *H. volcanii* (Böhm & Jaenicke, 1994). Einige Jahre später konnten dann die ersten wenigen 3D-Strukturen halophiler Proteine über Kristall-

strukturanalyse bzw. über NMR erhalten werden (Dym, 1995; Frolow, 1996; Pieper, 1998; Marg, 2002). Die sogenannten „*solution studies*“ befassen sich v.a. mit der Interaktion von Proteinen und den sie umgebenden Lösungsmittel-Molekülen und weisen nach, daß sie bei halophilen Proteinen im Vergleich zu ihren mesophilen Analoga deutlich verstärkt ist, was durch die erhöhte Salz- und Wasserbindung der Proteine gezeigt wurde (Zaccai, 1989; Bonneté, 1993). Auf dieser Grundlage wurde das Modell erstellt, daß halophile Proteine stabilisiert werden, indem sie über ihre Vielzahl an negativen Ladungen ein Netzwerk aus Wassermolekülen und Salzionen binden (Zaccai, 1989).

Es ist anzunehmen, daß die Adaptation an Hochsalz und damit z.B. der Überschuß an negativen Ladungen sich im Lauf der Evolution entwickelt hat. Das bedeutet, daß die adaptierte Struktur das Salz nun zur Stabilität braucht, um die negativen Ladungen auf der Oberfläche abzuschirmen und ihre gegenseitige Abstoßung zu vermeiden (Böhm & Jaenicke, 1994). Da für die vollständige Abschirmung jedoch eine Salzkonzentration von 1 M NaCl ausreichen würde und z.B. die hMDH durch ihren Kofaktor NADH unter niedrigen Salzkonzentrationen ebenso effektiv stabilisiert wird wie durch 4 M NaCl (Mevarech, 2000), bleibt die Frage, warum viele halophile Proteine trotzdem Konzentrationen von 2 M und höher für ihre Stabilität und Funktionalität benötigen. Möglicherweise kann nur bei molaren Salzkonzentrationen die zwar spezifische, aber von einer sehr schwachen Affinität geprägte Bindung der wenigen Ionen überhaupt stattfinden (Mevarech, 2000). Zusammenfassend kann man sagen, daß halophile Adaptation nicht „darauf abzielt, ein Enzym vor extremen Salzbedingungen zu schützen...“, sondern sich im Gegenteil aus Mechanismen zusammensetzt, die sich die hohe Ionenkonzentration in der Umgebung zunutze machen“ (Zitat: Richard, 2000; Madern, 2000).

In dieser Arbeit war es möglich, die geringe Zahl an Kristallstrukturen halophiler Proteine um zwei weitere Strukturen zu ergänzen. Sowohl bei dem Ferritin als auch bei der Glyzerin-Dehydrogenase aus *H. salinarum* handelt es sich ihren strukturellen Eigenschaften nach (v.a. Primär- und Tertiärstruktur) um typische halophile Proteine (s.u.). Betrachtet man jedoch ihre jeweilige Bereitschaft zur Kristallisation, ein Verhalten, das mit der Struktur unmittelbar zusammenhängt, in das aber noch weitere Faktoren involviert sind, zeigen sich Unterschiede: während die GlyDH nur aus einer einzigen Probe heraus kristallisiert werden konnte (nach: Gallensäure-Aufschluß bei 4.3 M NaCl – Anionentauscher unter 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Gelfiltration unter 1 M NaCl), bei deren Herstellung nie völlige Salzfreiheit geherrscht hat, zeigte das Ferritin von allen in dieser Arbeit kristallisierten Proteinen die höchste Kristalli-

sationsneigung. Aus einer Vielzahl an Aufreinigungs- und Kristallisationszyklen heraus haben sich immer wieder Ferritin-Kristalle gebildet, v.a. der Kristallform B (Säulen). Es scheint sich also bei diesem Protein eher um ein moderat halophiles Protein zu handeln, das auch salzfreie Umgebungen akzeptiert, ohne signifikant in seiner Struktur beeinflusst zu werden (persönliche Erfahrung; Reindel, 2002).

Auch andere Proteine aus halophilen Organismen zeigen derartige nicht-halophile Eigenschaften, wie etwa die DHFR, die bis zu Konzentrationen von 0.5 M NaCl stabil und aktiv bleibt (Pieper, 1998). Gleichzeitig besitzen das Ferritin ebenso wie die GlyDH aus *H. salinarum* die typischen Eigenheiten, die bisher für halophile Proteine beobachtet wurden (s.o.; Eisenberg, 1992; Madern, 2000): dazu gehört z.B. das erhöhte Verhältnis von Arginin zu Lysin sowie die vermehrte Ausprägung negativer Reste. Allerdings liegt im Gegensatz zu den beiden Proteinen Ferritin und GlyDH bei den meisten anderen Proteinen aus *H. salinarum* eher ein Überschuß an Aspartat gegenüber Glutamat vor (s. Tab. 13; L.-O. Essen, unveröffentlicht).

Beide halobakteriellen Proteine haben mehr als doppelt so viele Arginin-Reste in ihrer Sequenz wie Lysinreste: das Verhältnis beträgt für Ferritin 2.75, für die GlyDH 2.25 (berechnet aus den Prozentangaben). In den meisten der Vergleichsproteine ist das Mengenverhältnis genau umgekehrt, eine Ausnahme ist das Dps aus *Synechococcus sp.*, bei dem ebenfalls mehr Arginin als Lysin vorhanden ist (Arg/Lys: 1.6). In noch stärkerem Ausmaß findet sich dieses Verhältnis bei der halophilen DHFR aus *H. volcanii* (Arg/Lys: 6.6; Pieper, 1998).

Ferritin (F)/ Dps (D)					Glyzerin-Dehydrogenase				
Organismus	Arg	Lys	Asp	Glu	Organismus	Arg	Lys	Asp	Glu
<i>H. salinarum, F</i>	4.4	1.6	9.9	13.7	<i>H. salinarum</i>	3.6	1.6	8.2	11.0
<i>E.coli, D</i>	4.8	7.2	9.6	4.8	<i>B. stearothermophilus</i>	2.7	7.8	4.9	8.9
<i>L. innocua, F</i>	1.3	8.3	7.7	10.3	<i>T. maritima</i>	4.1	6.9	4.7	9.3
<i>Synechococcus sp., D</i>	4.5	2.8	4.0	9.1	<i>S. enterica</i>	3.3	3.3	4.4	7.4
<i>H. pylori, F</i>	1.4	11.8	6.9	11.1	<i>E. coli</i>	3.2	3.7	4.2	7.6

Tab. 13. Vergleich von positiv und negativ geladenen Resten in Ferritin und GlyDH aus *H. salinarum* im Vergleich zu homologen Proteinen. Die Angaben der jeweiligen Aminosäuren sind in Prozent der Gesamtzahl an Aminosäuren im entsprechenden Protein dargestellt. Als homologe Sequenzen wurden die Proteine herangezogen, die bereits in den Strukturkapiteln (3.2 und 3.3) als Vergleich dienten sowie je zwei weitere Proteine aus den gezeigten Alignments (Abb. 29 und 41).

Die Verteilung der Arginin-Reste in der 3D-Struktur ist ebenfalls auffällig: bei der hMDH hat sich erwiesen, daß die meisten der Arginin-Reste mit einem sauren Rest in Kontakt sind und sich bevorzugt an *intermolekularen* Wechselwirkungen beteiligen (Dym, 1995). Diese Beobachtung bestätigt sich v.a. in der Ferritin-Struktur: von den acht Arginin-Resten sind sechs (Arg8, 21, 61, 84, 116, 134) mit Resten eines Nachbarmoleküls verknüpft, in vier der Fälle mit einem Glutamat oder Aspartat. Nur einer der Arginin-Reste ist in den homologen Sequenzen aus *E. coli* bzw. *L. innocua* konserviert (Arg84; s. Abb. 26). Bei der GlyDH sieht es anders aus: hier stehen nur drei von 13 Arginin-Resten (Arg15, 197, 361) in Kontakt mit negativen Resten eines benachbarten Monomers, vier der übrigen Arginine (Arg75, 163, 349, 360) bilden jedoch *intramolekulare* Bindungen zu sauren Gruppen. Auffällig ist der Cluster von fünf Arginin-Resten am C-Terminus, von dem drei der Reste in der *Bacillus*-Sequenz gegen Lysin ausgetauscht sind, eine Bestätigung für den Befund der Bevorzugung von Arginin gegenüber Lysin in halophilen Proteinen. Insgesamt sind nur zwei (Arg75, 163) der 13 Arginin-Reste in den GlyDHn aus *B. stearothermophilus* und *T. maritima* konserviert, davon ist keiner an einer *intermolekularen* Bindung beteiligt.

Eine Eigenschaft der beiden halobakteriellen Proteine, die hier besonders hervorgehoben werden soll, ist das Ausmaß und die Verteilung ihrer negativen Ladungen. In ihrer Aminosäurezusammensetzung haben das Ferritin mit 9.9% (Asp) bzw. 13.7% (Glu) und die GlyDH mit 8.2% (Asp) und 11.0% (Glu) den mit Abstand höchsten Prozentsatz an negativen Ladungen in ihrer jeweiligen Proteinfamilie (Ferritin: 23.6%, GlyDH: 19.2%).

Geht man nun über zur Proteinstruktur und untersucht, wo diese negativen Reste vorrangig lokalisiert sind, findet man, daß sie beim Ferritin v.a. auf der Proteinoberfläche zu liegen kommen. Ein Vergleich mit dem Dps aus *E. coli* zeigt, daß sowohl die innere als auch die äußere Oberfläche einer Ferritin-Halbkugel erheblich negativer (rot) geladen ist als die Dps-Halbkugel; beide Halbkugeln bestehen aus jeweils sechs Monomeren (s. Abb. 47). Diese Verteilung ist auch an den einzelnen Monomeren zu erkennen. Wenn man die innere bzw. äußere Oberfläche des Ferritin-Dodekamers mit 344 nm^2 bzw. 85 nm^2 kalkuliert, beträgt die Dichte der negativen Ladungen 0.95 bzw. 1.98 Reste pro nm^2 . Ein Vergleich mit Proteinen aus nicht-halophilen Organismen zeigt, daß diese eine durchschnittliche Oberflächen-Dichte von 0.3 sauren Resten pro nm^2 oder weniger aufweisen (L.-O. Essen, unveröffentlicht). Allerdings ist die negative Dichte der inneren Ferritin-Oberfläche auch verglichen mit den äußeren Oberflächen anderer halophiler Proteine (0.43-0.65 saure Reste/ nm^2 ; Dym, 1995; Frolow, 1996; Pieper, 1998) noch sehr hoch. Eine plausible Erklärung ist, daß die meisten dieser negativen Reste im Inneren des Ferritin-Dodekamers als Nukleationsstellen für das Eisen und

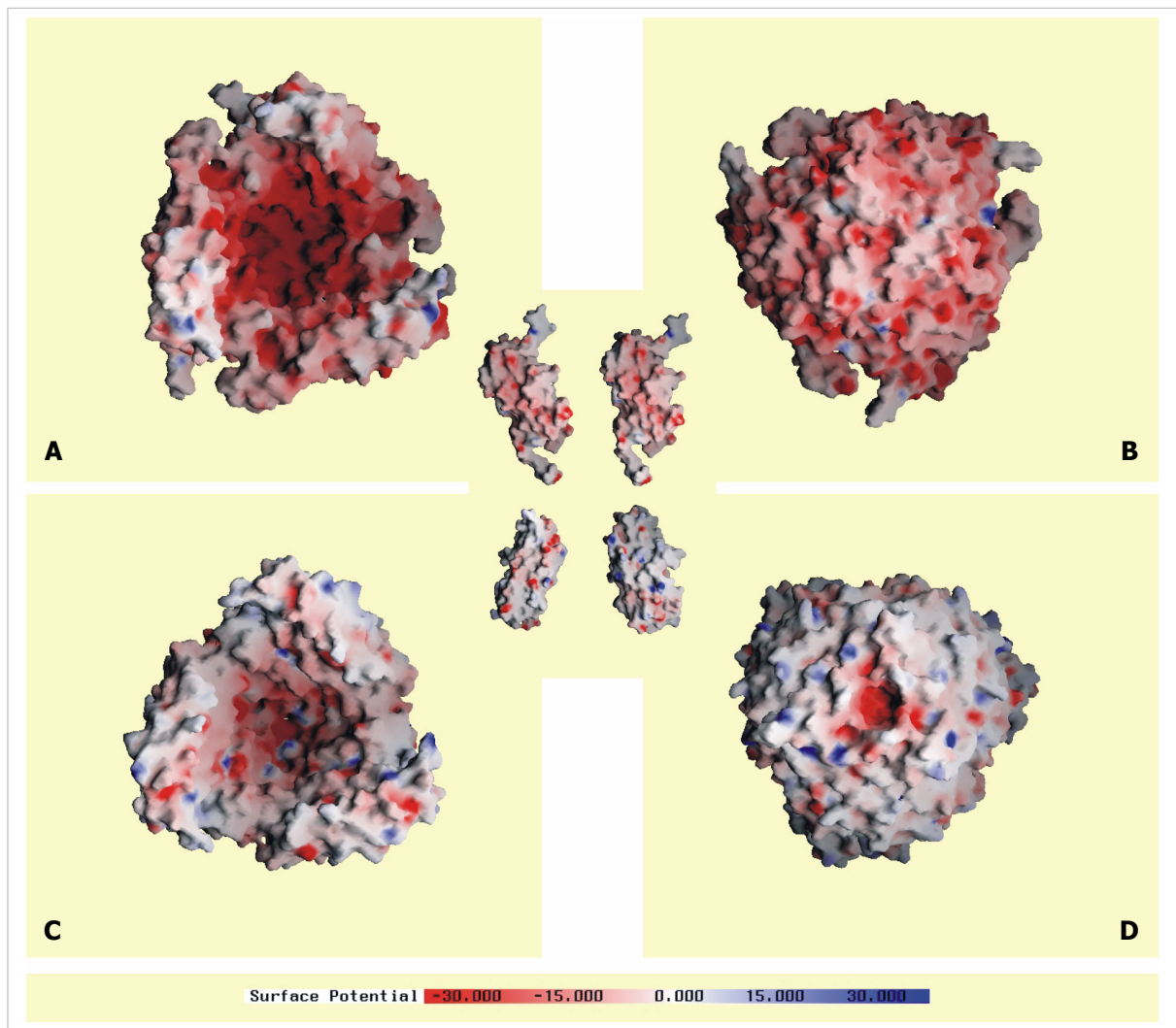


Abb. 47. Präsentation der elektrostatischen Oberfläche des Ferritins aus *H. salinarum* (A/B) sowie des Dps aus *E. coli* (C/D) mit Blick entlang der dreizähligen Achse. Dargestellt ist jeweils eine Halbkugel des entsprechenden Proteins – bestehend aus sechs Monomeren sowie aus jeder Halbkugel ein Monomer. Links ist bei beiden Proteinen ihre innere Oberfläche (A/C), rechts ihre äußere Oberfläche gezeigt (B/D). Rot, negative Ladung; blau, positive Ladung (vgl. Potentialleiste).

somit für die spezielle Funktion dieses Proteins dienen. Der Potentialunterschied zwischen Umgebung und dem Ferritin-Inneren ermöglicht so den gezielten Eintritt des Eisens in das Dodekamer (s. Kap. 3.2.2.2). Sehr deutlich erkennt man bei dem Dps aus *E. coli* – dessen innere Oberfläche auch Regionen höherer negativer Dichte aufweist (s. Abb. 47C) –, daß die Region um die potentielle Ionen-Eintrittsstelle an der dreizähligen Achse eine Ansammlung negativer Reste enthält. Ähnlich verhält es sich auch bei dem halobakteriellen Ferritin – abgesehen von den wenigen positiv geladenen Resten (His150, Arg153, s. Abb. 31) in der Mitte der Pore. Hier hebt sich dieser Bereich jedoch nicht so auffallend von seiner ebenfalls stark sauren Umgebung ab – daher dient zur Attraktion des Eisens möglicherweise hier der stärker negativ geladene Innenraum (s. Kap. 3.2.2.2).

Auch bei der GlyDH aus *H. salinarum* zeigt die äußere Oberfläche mehr negative Ladung als die der entsprechenden homologen Proteine (im Oktamer mit einer Oberfläche von 965.5 nm^2 wären es 0.53 saure Reste/ nm^2 ; s. Abb. 48A), allerdings in weit geringerem Ausmaß als beim Ferritin. Der Hauptunterschied in der Ladungsverteilung liegt dabei in der N-terminalen Domäne, wobei die GlyDH aus *H. salinarum* die höchste Ausprägung negativer Reste zeigt, und das Enzym aus *T. maritima* die geringste (s. Abb. 48).

Charakteristisch für beide Proteine, das Ferritin und die GlyDH aus *H. salinarum* sowie auch z.B. für die hMDH (Dym, 1995; Dalhus, 2002) ist, daß sich bei ihnen bestimmte Sequenz- und damit auch Struktureigenschaften wiederfinden, die dafür bekannt sind, daß sie thermophile Proteine stabilisieren: als ein Beispiel wurde bereits die Oligomerisierung erwähnt (Kap. 3.1.3; Korkhin, 1999). Diese führt besonders im halobakteriellen Ferritin zu einer starken Wechselwirkung zwischen den einzelnen Untereinheiten: jedes Monomer des halobakteriellen Ferritins steht mit 45% (4854 \AA^2) seiner Gesamt-Oberfläche (10736 \AA^2) in Kontakt mit seinen Nachbarn (*E. coli* Dps: 41% , *L. innocua*: 36%). Entsprechend können 18 Salzbrücken und 43 H-Brücken pro Monomer gezählt werden, über die es Verbindungen mit benachbarten Molekülen ausbildet. Bei der GlyDH ist es aufgrund der Unklarheit bezüglich ihres oligomeren Zustandes nur möglich, Spekulationen über den Prozentsatz ihrer Oberflächenkontakte anzustellen. Nimmt man an, das Enzym liegt als Oktamer vor, dann berührt ein Monomer mit 16.8% (2467 \AA^2) seiner gesamten Oberfläche (14635 \AA^2) die insgesamt drei

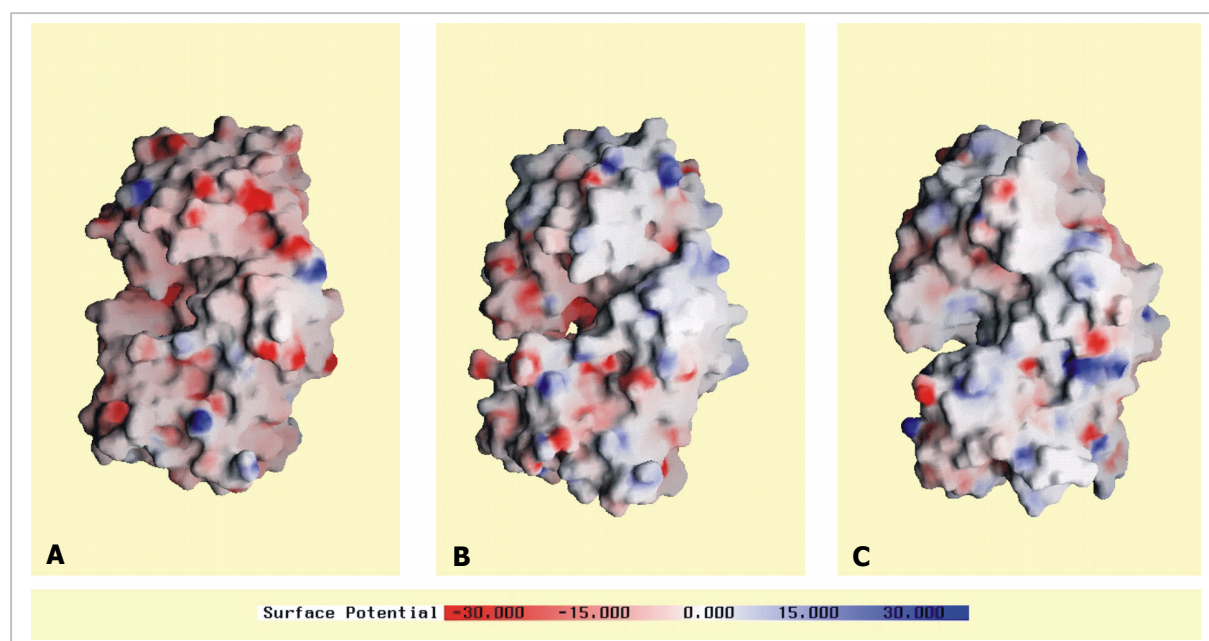


Abb. 48. Präsentation der elektrostatischen Oberfläche der GlyDHn aus *H. salinarum* (A), *B. stearotheophilus* (B) und *T. maritima* (C). Dargestellt ist jeweils ein Monomer in derselben Orientierung wie in den Superpositionen (Abb. 35) und der Monomer-Präsentation (Abb. 36), d.h. links in der Mitte befindet sich das aktive Zentrum. Rot, negative Ladung; blau, positive Ladung (vgl. Potentialleiste).

Nachbarmonomere (*B. stearothermophilus*, GlyDH: 17.2%). Der geringe Unterschied zu dem homologen Enzym aus *Bacillus* bestätigt die Behauptung (s.o.), daß halophile und thermophile Organismen ähnliche Struktureigenschaften aufweisen.

Eine weitere Gemeinsamkeit dieser extrem stabilen Proteine (thermophil bzw. halophil) ist eine signifikant erhöhte Menge an Alaninresten innerhalb ihrer α -Helices (Dalhus, 2002; Dym, 1995; Korkhin, 1999; Li, 1999). Diese hydrophoben Reste sollen dazu dienen, die Stabilität der Helices zu erhöhen. Im Ferritin übersteigt die Anzahl an Alanin-Seitenketten mit insgesamt 14.8%² bzw. innerhalb von Helices 8.2% auffallend die Anzahl dieses Restes im Dps von *E. coli* (10.8 bzw. 8.4%) und im Ferritin von *L. innocua* (5.8 bzw. 3.8%). Bei der GlyDH zeigt ein Vergleich, daß die *Bacillus*-GlyDH etwas mehr Alaninreste (insgesamt 15.9% bzw. in Helices: 10.5%) enthält als die halobakterielle GlyDH (12.3 bzw. 7.9%) und das Enzym aus *T. maritima* (9.3 bzw. 7.4%).

Für das Stabilisierungsmodell, wie es von Zaccai *et al.* (1989) vorgeschlagen wurde, daß halophile Proteine in NaCl über ein Netzwerk aus hydratisierten Salzionen stabilisiert werden, gab es bis jetzt keinerlei strukturelle Hinweise: das Ferredoxin wurde allerdings in Phosphat kristallisiert, und die Auflösung der hMDH (2.6 Å) reichte möglicherweise nicht aus, um diese Salz-Wasser-Strukturen erkennen zu können (Mevarech, 2000). Auch durch die in dieser Arbeit gelösten Strukturen kann das Modell nicht untermauert werden: sowohl das Ferritin als auch die GlyDH weisen nur eine sehr begrenzte Ionenbindung auf (Ferritin: 2 Na⁺-/ 4 Mg²⁺-Ionen pro Tetramer, GlyDH: 8 Na⁺-/ 2 Mg²⁺-Ionen pro Dimer). Allerdings ist fraglich, ob man aus einer Kristallstruktur tatsächlich auf den Zustand dieser Proteine in Lösung Rückschlüsse ziehen darf.

Prinzipiell kann man sagen, daß durch die Strukturen des Ferritins und der GlyDH aus *H. salinarum* bisherige Erkenntnisse über halophile Proteine bestätigt werden konnten. Dazu gehören ein Übermaß an negativen Ladungen, die vorrangig an der Oberfläche der Proteine liegen, ein vermehrtes Auftreten von Arginin-Resten im Vergleich zu Lysin und Salzbrücken aus Arginin und Aspartat/Glutamat sowie eine ausgeprägte Wechselwirkung zwischen den Monomeren im oligomeren Zustand. Mit Sicherheit wird die Stabilität von Proteinen unter hohen Salzkonzentrationen ebenso wie z.B. unter extremen Temperaturen durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren hervorgerufen – spezifisch für jedes Protein (Korkhin, 1999). Man hat gefunden, daß die Energiedifferenz zwischen dem nativen und dem ungefalteten Zustand eines Proteins nur sehr gering ist (30-65 kJ/Mol). Daher handelt es sich bei den

² immer in Prozent der gesamten Aminosäurezahl.

Veränderungen, welche für die Stabilität von Proteinen unter anderen als den „normalen“ Bedingungen vollzogen werden mußten, nur um minimale Einzelmodifikationen (Jaenicke, 1991) – Abweichungen, die erst durch ihr Zusammenwirken eine spezifische Wirkung zeigen.

Inwieweit die vorgestellten Theorien tatsächlich generell auf halophile Proteine übertragen werden können, muß durch weitere Untersuchungen bewiesen werden, einen wichtigen Platz nimmt dabei mit Sicherheit die Aufklärung weiterer 3D-Strukturen ein.

4 Zusammenfassung

Bei *H. salinarum* handelt es sich um einen Mikroorganismus, dessen Genomsequenz zwar mittlerweile bekannt ist, von dem aber bisher nur wenige 3D-Proteinstrukturen veröffentlicht wurden. Diese geringe Zahl zu erweitern, ist von großer Bedeutung, da so Kenntnisse zur Stabilität von Proteinen unter extremen Bedingungen – hier hohen Salzkonzentrationen – ausgeweitet werden können. Attraktiv ist eine derartige Erweiterung gerade vor der biotechnologischen Entwicklung der letzten Jahre, bei der immer mehr Interesse an strukturellen Besonderheiten von extremophilen Proteinen aufgekommen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Einbeziehung löslicher Proteine des halophilen Archaeons *H. salinarum* eine neuartige Kristallisationsmethode („**Shotgun-Kristallisation**“) angewandt. Die Grundidee dieser Methode ist es, nicht ein bestimmtes Protein zu kristallisieren, sondern den umgekehrten Weg zu gehen, d.h. Proteine zu selektieren, die unter den gewählten Bedingungen von sich aus eine hohe Kristallisationsneigung zeigen. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtheit der löslichen Proteine von *H. salinarum* (Zytosol) durch verschiedene Methoden der Proteinnäherung grob in Fraktionen unterteilt, die immer noch eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen enthielten. Diese Fraktionen wurden in Kristallisationsansätzen verschiedener Zusammensetzung untersucht. Entstandene Proteinkristalle wurden – soweit es ihre Größe zuließ – identifiziert (Sequenzierung, Massenspektroskopie) und der Röntgenstrukturanalyse unterzogen.

Mit der Zeit wurde deutlich, daß bestimmte Fällungsmittel (Polyethylenglykol, Ammoniumsulfat) und Zusätze (Magnesiumsulfat) die Kristallbildung der halophilen Proteine besonders förderten. Mit diesen Substanzen wurden im folgenden weitere Kristallisationsexperimente gemacht, in denen systematisch einzelne Parameter (pH, Konzentration des Fällungsmittels) verändert wurden. Durch ihre Grundvoraussetzung, daß ein Protein nicht rein sein muß, um zu kristallisieren, bietet diese Methode eine grundsätzliche Alternative zu bisherigen Methoden der Proteinkristallisation. Dies konnte anhand zweier gelöster Proteinstrukturen (Auflösungen von 1.9 bzw. 1.6 Å) bewiesen werden.

Bei der einen Struktur handelt es sich um **Ferritin**, ein Protein, das zur Speicherung von Eisen in der Zelle dient (s. Abb. A). Das Ferritin aus *H. salinarum* zeigt die typische monomere Faltung der Ferritine, ein Vier-Helix-Bündel, weicht jedoch durch seine oligomere

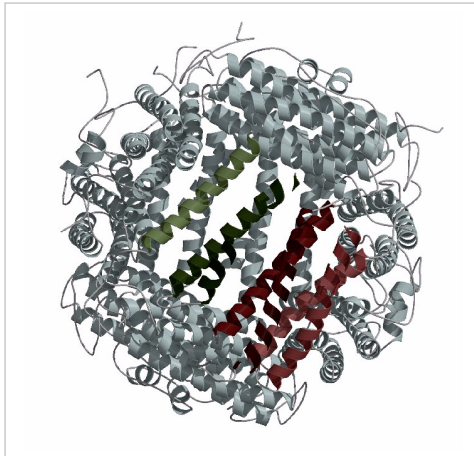


Abb. A. Struktur des dodekameren Ferritins aus *H. salinarum*.

Zusammensetzung zu einer dodekameren Hohlkugel von dem üblichen Ferritinaufbau (Tetraikosamer) ab. Außerdem weist es eine neuartige intermolekulare Eisenbindungsstelle auf – im Gegensatz zur intramolekularen bei 24-mer Ferritinen. Damit gliedert es sich in eine jüngst entdeckte Gruppe von 12-mer Ferritinen ein, zu der u.a. ein homologes Protein aus *L. innocua* gehört. Verwandt sind die 12-mer Ferritine der Familie der Dps-Proteine, deren Mitglieder DNA sowie z.T. ebenfalls Eisen binden und auch aus einer Kugel mit zwölf Untereinheiten bestehen.

Das zweite Protein, dessen Struktur in dieser Arbeit gelöst werden konnte, stellt eine **Glycerin-Dehydrogenase** dar, ein NAD^+ - und Zink-bindendes Enzym aus dem Glycerin-Stoffwechsel (s. Abb. B). Der 3D-Aufbau ist in zwei Domänen unterteilt, die jeweils unterschiedliche Supersekundärstrukturen enthalten: im N-terminalen Bereich findet sich das für NAD^+ -bindende Proteine typische Motiv des Rossmann-Folds, ein mehrsträngiges β -Faltblatt, das von α -Helices eingerahmt wird. Die C-terminale Region läßt sich selbst in zwei Teile untergliedern, ein Drei-Helix-Bündel und das sogenannte *greek key*-Helix-Bündel, eine spezielle Abfolge von α -Helices.

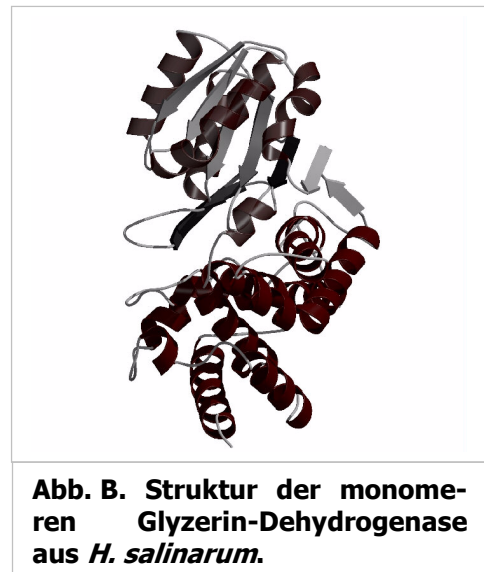


Abb. B. Struktur der monomeren Glycerin-Dehydrogenase aus *H. salinarum*.

Beide Proteine zeichnen sich durch für halophile Proteine typische Eigenschaften ihrer Primärsequenz und damit auch ihrer Struktur aus. Dazu gehört zum einen ein Übermaß an negativ geladenen Resten (Aspartat und Glutamat), die sich v.a. auf der Oberfläche der Proteine anordnen, zum anderen eine vermehrte Ausprägung von Arginin-Resten, welche oft an inter- und intramolekularen Salzbrücken beteiligt sind. Ein weiteres Merkmal halophiler Proteine, das sich besonders im Ferritin wiederfindet, und das sie mit thermophilen Proteinen teilen, ist eine verstärkte Interaktion der einzelnen Monomere im oligomeren Zustand. Dies

zeigt sich durch eine Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen einzelnen Seitenketten, aber auch generell an der breiten Kontaktfläche zwischen den Monomeren.

Somit konnten durch die vorliegende Arbeit zum einen die Wirksamkeit und der Nutzen der neuartigen Shotgun-Kristallisationsmethode gezeigt werden, wodurch grundlegende Thesen zur Proteinkristallisation in Zweifel gezogen wurden. Zum anderen konnten Erkenntnisse über die besonderen Eigenschaften halophiler Proteine durch zwei weitere lösliche Kristallstrukturen bestärkt werden. Beide Strukturen, sowohl die des Ferritins als auch diejenige der Glycerin-Dehydrogenase, stellen zudem die ersten archaealen Vertreter ihrer jeweiligen Proteinfamilie dar.

5 Literaturverzeichnis

- Alderton, G. and Fevold, H. L. (1946). "Direct Crystallization of Lysozyme from Egg White and Some Crystalline Salts of Lysozyme." *J. Biol. Chem.* **164**: 1-5.
- Ameyama, M., Shinagawa, E., Kazunobu, M. and Adachi, O. (1985). "Solubilization, Purification and Properties of Membrane-Bound Glycerol Dehydrogenase from *Gluconobacter Industrius*." *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1001-10.
- Andrews, B. M. (1998). "Iron Storage in Bacteria." *Advances in Microbial Physiology* **40**: 283-351.
- Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1983). "Preferential Interactions of Proteins with Solvent Components in Aqueous Amino Acid Solutions." *Arch. Biochem. Biophys.* **224**: 169-77.
- Archibald, F. (1983). "*Lactobacillus Plantarum*, an Organism Not Requiring Iron." *FEMS Microbiol. Lett.* **19**: 29-32.
- Arndt, U. W. and Wonacott, A. J. (1977). *The Rotation Method in Crystallography*. North-Holland, Amsterdam.
- Baxter, R. M. and Gibbons, N. E. (1954). "The Glycerol Dehydrogenase of *Pseudomonas Salinaria*, *Vibrio Costicola* and *Escherichia Coli* in Relation to Bacterial Halophilism." *Can. J. Biochem. Physiol.* **32**: 206-17.
- Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R. and Ladenstein, R. (1998). "The Refined Crystal Structure of *Drosophila Lebanonensis* Alcohol Dehydrogenase at 1.9 Å Resolution." *J. Mol. Biol.* **282**: 383-99.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1973). "NADP Specific Dihydroxyacetone Reductase from *Dunaliella Parva*." *FEBS Letters.* **29**: 153-5.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1974). "Isolation, Characterization, and Partial Purification of a Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Dihydroxyacetone Reductase from the Halophilic Alga *Dunaliella Parva*." *Plant Physiology* **53**: 628-31.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1990). "The Biotechnology of Cultivating the Halotolerant Alga *Dunaliella*." *TIBTECH* **8**: 121-26.
- Bernal, J. D. and Crowfoot, D. (1934). "X-Ray Photographs of Crystalline Pepsin." *Nature* **133**: 794-5.
- Besir, H. (2001). *Untersuchung der Lipidvermittelten Kristallisation von Bacteriorhodopsin und Halorhodopsin aus *H. salinarum**. München, LMU
- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., *et al.* and Sarma, V. R. (1965). "Structure of Hen Egg Lysozyme." *Nature* **206**: 757-61.
- Blaurock, A. E. and Stoeckenius, W. (1971). "Structure of the Purple Membrane." *Nature New Biology* **233**: 152-5.

- Böhm, G. and Jaenicke, R. (1994). "A Structure-Based Model for the Halophilic Adaptation of Dihydrofolate Reductase from *Halobacterium Volcanii*." *Protein Engineering* **7**: 213-20.
- Bonneté, F., Ebel, C. and Zaccai, G. (1993). "Biophysical Study of Halophilic Malate Dehydrogenase in Solution: Revised Subunit Structure and Solvent Interactions of Native and Recombinant Enzyme." *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89**: 2659-66.
- Boyd, D., Vecoli, C., Belcher, D.M., Jain, S.K. and Drysdale, J.W. (1985). "Structural and Functional Relationships of Human Ferritin H and L Chains Deduced from cDNA Clones." *J. Biol. Chem.* **260**: 11755-61.
- Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., *et al.* and Chiancone, E. (1997). "A Novel Non-Heme Iron-Binding Ferritin Related to the DNA-Binding Proteins of the Dps Family in *Listeria Innocua*." *J. Biol. Chem.* **272**: 3259 - 65.
- Bradford, M. M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Britton, K. L., Stillman, T. J., Yip, K. S. P., *et al.* and Rice, D. W. (1998). "Insights into the Molecular Basis of Salt Tolerance from the Study of Glutamate Dehydrogenase from *Halobacterium Salinarum* ." *J. Biol. Chem.* **273**: 9023-30.
- Brown-Peterson, N. J. and Salin, M. L. (1993). "Purification of a Catalase-Peroxidase from *Halobacterium Halobium*: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzyme." *J. Bacteriol.* **175**: 4197-202.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., *et al.* and Warren, G. L. (1998). "Crystallography and NMR System - a New Software Suite for Macromolecular Structure Determination." *Acta Cryst.* **D 54**: 905-21.
- Burton, R. (1955). "Glycerol Dehydrogenase from *Aerobacter Aerogenes*." *Methods Enzymol.* **1**: 397-400.
- Cadenas, Q. and Engel, P. C. (1994). "Activity Staining of Halophilic Enzymes: Substitution of Salt with a Zwitterion in Non-Denaturing Electrophoresis." *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**: 785-92.
- Carpenter, E. P., Hawkins, A. R., Frost, J. W. and Brown, K. A. (1998). "Structure of Dehydroquinase Synthase Reveals an Active Site Capable of Multistep Catalysis." *Nature* **394**: 299-302.
- Carter, C. W., Jr. and Carter, C. W. (1979). "Protein Crystallization Using Incomplete Factorial Experiments." *J. Biol. Chem.* **254**: 12219-23.
- Caylor, C. I., Dobrianov, I., Lernay, S. G., *et al.* and Thorne, R. E. (1999). "Macromolecular Impurities and Disorder in Protein Crystals." *PROTEINS: Struct., Funct. Gen.* **36**: 270-81.
- CCP4. (1994). "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography." *Acta Cryst.* **D 50**: 760-3.
- Cendrin, F., Jouve, H. M., Gaillard, J., *et al.* and Zaccai, G. (1994). "Purification and Properties of a Halophilic Catalase-Peroxidase from *Haloarcula Marismortui*." *Biochim. Biophys. Acta* **1209**: 1-9.
- Chasteen, N. D. and Harrison, P.M. (1999). "Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage." *J. Struct. Biol.* **126**: 182-94.
- Chayen, N. E. (2002). "Tackling the Bottleneck of Protein Crystallization in the Post-Genomic Era." *TRENDS in Biotechnology* **20**: 98.

- Chen, L. and Helmann, J.D. (1995). "Bacillus Subtilis MrgA Is a Dps(Pexb) Homologue - Evidence for Metalloregulation of an Oxidative-Stress Gene." *Mol. Microbiol.* **18**: 295-300.
- Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M. (1976). "Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus Aquaticus*." *J. Bacteriol.* **127**: 1550-57.
- Christian, J. H. B. and Waltho, J. A. (1962). "Solute Concentrations within Cells of Halophilic and Non-Halophilic Bacteria." *Biochim. Biophys. Acta* **65**: 506-08.
- Dalhus, B., Saarinen, M., Sauer, U.H., *et al.* and Eklund, H. (2002). "Structural Basis for Thermophilic Protein Stability: Structures of Thermophilic and Mesophilic Malate Dehydrogenases." *J. Mol. Biol.* **318**: 707-21.
- Daniel, R., Stuert, K. and Gottschalk, G. (1995). "Biochemical and Molecular Characterization of the Oxidative Branch of Glycerol Utilization by *Citrobacter Freundii*." *J. Bacteriol.* **177**: 4392-401.
- Danson, M. J. (1988). "Archaeobacteria: The Comparative Enzymology of Their Central Metabolic Pathways." *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 165-231.
- Danson, M. J. and Hough, D. W. (1997). "The Structural Basis of Protein Halophilicity." *Comparative Biochemistry & Physiology* **117**: 307-12.
- Dautant, A., Meyer, J.-B., Yariv, J., *et al.* and Frolow, F. (1998). "Structure of a Monoclinic Crystal Form of Cytochrome B1 (Bacterioferritin) from *E. coli*" *Acta Cryst.* **D 54**: 16-24.
- Davis, D. R. and Seagal, D. M. (1971). "Protein Crystallisation: Micro Techniques Involving Vapour Diffusion." *Methods Enzymol.* **22**: 266-9.
- DeLong, E. F. (1998). "Everything in Moderation: Archaea as 'Non-Extremophiles'." *Curr. Opin. Gen. Develop.* **8**: 649-54.
- DeLucas, L. J., Smith, C. D., Smith, H. W., *et al.* and Bugg, C. E. (1989). "Protein Crystal Growth in Microgravity." *Science* **246**: 651-4.
- deMaré, F., Kurtz, D. M. and Nordlund, P. (1996). "The Structure of *Desulfovibrio Vulgaris* Ruberythrin Reveals a Unique Combination of Rubredoxin-Like FeS₄ and Ferritin-Like Diiron Domains." *Nature Struct. Biol.* **3**: 539-46.
- Drenth, J. (1994). Principles of Protein X-Ray Crystallography. New York, Springer.
- Ducruix, A. and Giege, R. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. New York, Oxford University Press.
- Durbin, S. D. and Feher, G. (1996). "Protein Crystallization." *Ann. Rev. Phys. Chem.* **47**: 171-204.
- Dym, O., Mevarech, M. and Sussman, J. L. (1995). "Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium." *Science* **267**: 1344-46.
- Ebel, C., Faou, P., Kernel, B. and Zaccai, G. (1999). "Relative Role of Anions and Cations in the Stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase." *Biochemistry* **38**: 9039-47.
- Eisenberg, H., Mevarech, M. and Zaccai, G. (1992). "Biochemical, Structural, and Molecular Genetic Aspects of Halophilism." *Adv. Prot. Chem.* **43**: 1-62.
- Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., *et al.* and Brändén, C.-I. (1976). "Three-Dimensional Structure of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase at 2.4 Å Resolution." *J. Mol. Biol.* **102**: 27-59.

- Elcock, A. H. and McCammon, J. A. (1998). "Electrostatic Contributions to the Stability of Halophilic Proteins." *J. Mol. Biol.* **280**: 731-48.
- Engh, R. A. and Huber, R. (1991). "Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein Structure Refinement." *Acta Cryst.* **A47**: 392-400.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. and de Lorenzo, V. (1999). "Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein." *J. Bacteriol.* **181**: 6223-29.
- Esnouf, R. M. (1997). "An Extensively Modified Version of Molscrip That Includes Greatly Enhanced Coloring Capabilities." *J. Mol. Graph.* **15**: 132-4.
- Ferguson, G. P., Töttemeyer, S., MacLean, M. J. and Booth, I. R. (1998). "Methylglyoxal Production in Bacteria: Suicide or Survival." *Arch. Microbiol.* **170**: 209-19.
- Fling, S. P. and Gregerson, D. S. (1986). "Peptide and Protein Molecular Weight Determination by Electrophoresis Using a High-Molarity Tris Buffer System without Urea." *Anal. Biochem.* **155**: 883-8.
- Flynn, T. G. and Cromlish, J. A. (1982). "Glycerol Dehydrogenase from Rabbit Muscle." *Methods Enzymol.* **89**: 237-42.
- Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., *et al.* and Yariv, J. (1984). "Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule." *Philos. Trans. R. Soc. London:* **B 304**: 551-65.
- Frazier, B. A., Pfeifer, J.D., Russell, D.G., *et al.* and Normark, S.J. (1992). "Paracrystalline Inclusions of a Novel Ferritin Containing Nonheme Iron, Produced by the Human Gastric Pathogen *Helicobacter Pylori* Evidence for a Third Class of Ferritins." *J. Bacteriol.* **175**: 966-72.
- French, S. and Wilson, K. (1978). "On the Treatment of Negative Intensity Observations." *Acta Cryst.* **A34**: 517-25.
- Frenkiel-Krispin, D., Levin-Zaidman, S., Shimoni, E., *et al.* and Minsky, A. (2001). "Regulated Phase Transitions of Bacterial Chromatin: A Non-Enzymatic Pathway for Generic DNA Protection." *EMBO Journal* **20**: 1184-91.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J. L., *et al.* and Shoham, M. (1996). "Insights into Protein Adaptation to a Saturated Salt Environment from the Crystal Structure of a Halophilic 2Fe-2S Ferredoxin." *Nature Struct. Biol.* **3**: 452-8.
- Galinski, E. A. (1993). "Compatible Solutes of Halophilic Eubacteria: Molecular Principles, Water-Solute Interaction, Stress Protection." *Experientia* **49**: 487-96.
- Giegé, R., Dock, A. C., Kern, D., *et al.* and Moras, D. (1986). "The Role of Purification in the Crystallization of Proteins and Nucleic Acids." *J. Cryst. Growth* **76**: 554-61.
- Giegé, R. and Ducruix, A. (1992). An Introduction to the Crystallogenes of Biological Macromolecules. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach. Ducruix, A. and Giegé, R. New York, Oxford University Press: 1-15.
- Ginzburg, M., Sachs, L. and Ginzburg, B. Z. (1970). "Ion Metabolism in a Halobacterium. I. Influence of Age of Culture on Intracellular Concentrations." *J. Gen. Physiol.* **55**: 187-207.
- Granick, S. (1942). "Ferritin. I. Physical and Chemical Properties of Horse Spleen Ferritin." *J. Biol. Chem.* **146**: 451-61.

- Grant, R. A., Filman, D.J., Finkel, S.E., *et al.* and Hogle, J.M. (1998). "The Crystal Structure of Dps, a Ferritin Homolog That Binds and Protects DNA." *Nature Struct. Biol.* **5**: 294 - 303.
- Grossman, M. J., Hinton, S. M., Minak-Bernero, V., *et al.* and Stiefel, E. I. (1992). "Unification of the Ferritin Family of Proteins." *PNAS* **89**: 2419-23.
- Guan, R.-J., Wang, M., Liu, X.-Q. and Wang, D.-C. (2001). "Optimization of Soluble Protein Crystallization with Detergents." *J. Cryst. Growth* **231**: 273-79.
- Guinet, F., Frank, R. and Leberman, R. (1988). "Polypeptide Elongation Factor Tu from *Halobacterium Marismortui*." *Eur. J. Biochem.* **172**: 687-94.
- Han, K. K. and Martinage, A. (1992). "Post-Translational Chemical Modifications of Proteins." *Int. J. Biochem.* **24**: 19-28.
- Hantke, K. (1982). "Negative Control of Iron Uptake Systems in *Escherichia Coli*." *FEMS Microbiol. Lett.* **15**: 83-6.
- Harrison, P. M. and Arosio, P. (1996). "Ferritins - Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation." *Biochim. Biophys. Acta* **1275**: 161-203.
- Hauptman, H. A. (1989). "The Phase Problem of X-Ray Crystallography." *Phys. Today* **42**: 24-9.
- Hecht, K. and Jaenicke, R. (1989). "Malate Dehydrogenase from the Extreme Halophilic Archaeobacterium *Halobacterium Marismortui*. Reconstitution of the Enzyme after Denaturation and Dissociation in Various Denaturants." *Biochemistry* **28**: 4979.
- Heesche-Wagner, K., Schwarz, T., Bartholmes, P. and Kaufmann, M. (1995). "Purification of Unstable Proteins from *Halobacterium Salinarium* Crude Cell Extracts: Combined Cell Disruption and Desalting by a Hollow-Fiber Membrane Module as an Access to Perform Ion-Exchange Chromatography." *J. Chromat.. A* **711**: 175-9.
- Hempstead, P. D., Hudson, A.J., Artymiuk, P.J., *et al.* and Harrison, P.M. (1994). "Direct Observation of the Iron Binding Sites in a Ferritin." *FEBS Lett.* **350**: 258-62.
- Hempstead, P. D., Yewdall, S. J., Fernie, A. R., *et al.* and Harrison, P. M. (1997). "Comparison of the Three-Dimensional Structures of Recombinant Human H and Horse L Ferritins at High Resolution." *J. Mol. Biol.* **268**: 424-48.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A. *et al.*, and Downing, H.K. (1990). "Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-Resolution Electron Cryo-Microscopy." *J. Mol. Biol.* **213**: 899-930.
- Hentze, M. W. and Kühn, L., C. (1996). "Molecular Control of Vertebrate Iron Metabolism: mRNA-Based Regulatory Circuits Operated by Iron, Nitric Oxide, and Oxidative Stress." *PNAS* **93**: 8175-82.
- Hoppe, W. (1957). "Die "Faltmolekülmethode"- Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannter Molekülstruktur." *Acta Cryst.* **10**: 750-1.
- Hough, D. W. and Danson, M. J. (1999). "Extremozymes." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 39-46.
- Huber, R. (1965). "Die Automatische Faltmolekülmethode." *Acta Cryst.* **19**: 353-56.
- Hudson, A. J., Andrews, S. C., Hawkins, C. *et al.*, and Guest, J. R. (1993). "Overproduction, Purification and Characterization of the *Escherichia Coli* Ferritin." *Eur. J. Biochem.* **218**: 985-95.

- Hünefeld, F. G. (1840). Die Chemismus in Der Thierischen Organization. Leipzig.
- Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., and Tsernoglou, D. (2000). "The Dodecameric Ferritin from *Listeria Innocua* Contains a Novel Intersubunit Iron-Binding Site." *Nature Struct. Biol.* **7**: 38 - 43.
- Jacobsen, C., Garside, J. and Hoare, M. (1998). "Nucleation and Growth of Microbial Lipase Crystals from Clarified Concentrated Fermentation Broths." *Biotechnology and Bioengineering* **57**: 666-75.
- Jacoby, W. B. (1971). "Crystallization as a Purification Technique." *Methods Enzymol.* **22**: 248-52.
- Jaenicke, R. (1991). "Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions." *Europ. J. Biochem.* **202**: 715-728.
- Jancarik, J. and Kim, S. H. (1991). "Sparse Matrix Sampling: A Screening Method for Crystallization of Proteins." *Journal of Applied Crystallography* **24**: 409-11.
- Johnson, E. A., Levine, R. L. and Lin, E. C. (1985). "Inactivation of Glycerol Dehydrogenase of *Klebsiella Pneumoniae* and the Role of Divalent Cations." *J. Bacteriol.* **164**: 479-83.
- Jones, T. A., Zhou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard, M. (1991). "Improved Methods for Binding Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in These Models." *Acta Cryst. A* **47**: 110-19.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., *et al.*, and Ghosh, D. (1995). "Short-Chain Dehydrogenases Reductases (SDR)." *Biochemistry* **34**: 6003-13.
- Judge, R. A., Forsythe, E. L. and Pusey, M. L. (1998). "The Effect of Protein Impurities on Lysozyme Crystal Growth." *Biotechnology and Bioengineering* **59**: 776-85.
- Judge, R. A., Johns, M. R. and White, E., T. (1995). "Crystallization: The Recovery of Ovalbumin." *Biotech. Bioeng.* **48**: 316-23.
- Kabsch, W. (2001). „Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post Refinement. Crystallography of Biological Macromolecules.“ Rossmann, M. G. and Arnold, E. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Kamekura, M., Oesterhelt, D., Wallace, R., *et al.*, and Kushner, D. J. (1988). "Lysis of Halobacteria in Bacto-Peptone by Bile Acids." *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 990-5.
- Kates, M. (1993). Membrane Lipids of Archaea. The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria). Kates, M., Elsevier Science Publishers B.V.
- Kerscher, L. and Oesterhelt, D. (1982). "Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase: New Finding on an Ancient Enzyme." *TIBS* **7**: 371-4.
- Kierzek, A. M. and Zielenkiewicz, P. (2001). "Models of Protein Crystal Growth." *Biophys. Chem.* **91**: 1-20.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, c. D. and Vecchi, M. P. (1983). "Optimization by Simulated Annealing." *Science* **220**: 671-80.
- Klenk, H.-P., Clayton, R. A., Tomb, *et al.*, and Venter, J. C. (1997). "The Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic, Sulphate-Reducing Archaeon *Archaeoglobus Fulgidus*." *Nature* **390**: 364-70.

- Kokoeva, M. V., Storch, K. F., Klein, C. and Oesterhelt, D. (2002). "A Novel Mode of Sensory Transduction in Archaea: Binding Protein-Mediated Chemotaxis Towards Osmoprotectants and Amino Acids." *EMBO Journal* **21**: 2312-22.
- Korkhin, Y., Kalb, J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y. and Frolow, F. (1999). "Oligomeric Integrity - the Structural Key to Thermal Stability in Bacterial Alcohol Dehydrogenases." *Protein Science* **8**: 1241-49.
- Kormann, A. W., Hurst, R. O. and Flynn, T. G. (1972). "Purification and Properties of an NADP⁺-Dependent Glycerol Dehydrogenase from Rabbit Skeletal Muscle." *Biochim. Biophys. Acta.* **258**: 40-55.
- Koszelak, S., Day, J., Leja, C., *et al.*, and McPherson, A. (1995). "Protein and Virus Crystal Growth on International Microgravity Laboratory-2." *Biophys. J.* **69**: 13-19.
- Kraulis, P. (1991). "Molscript: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures." *J. Appl. Cryst.* **24**: 946-50.
- Kupper, J., Marwan, W., Typke, D., *et al.*, and Oesterhelt, D. (1994). "The Flagellar Bundle of *Halobacterium Salinarum* Is Inserted into a Distinct Polar Cup Structure." *J. Bacteriol.* **176**: 5184-7.
- Kurihara, K., Miyashita, S., Sasaki, G., *et al.*, and Ohki, K. (1999). "Incorporation of Impurity to a Tetragonal Lysozyme Crystal." *J. Cryst. Growth* **196**: 285-90.
- Kurtz, D. M. and Prickril, B. C. (1991). "Intrapeptide Sequence Homology in Ruberythrine from *Desulfovibrio Vulgaris*: Identification of Potential Ligands to the Diiron Site." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 337-41.
- Lanyi, J. K. (1974). "Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria." *Bact. Rev.* **38**: 272-90.
- Larsen, T. A., Olson, A. J. and Goodsell, D. S. (1998). "Morphology of Protein-Protein Interfaces." *Structure* **6**: 421-7.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. and Thornton, J. M. (1993). "Procheck: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures." *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-91.
- Lawson, D. M., Treffry, A., Artymiuk, P.J., *et al.*, and Arosio, P. (1989). "Identification of the Ferroxidase Centre in Ferritin." *FEBS Lett.* **254**: 207-10.
- Lawson, D. M., Artymiuk, P.J., Yewdall, S.J. *et al.*, and Harrison, P.M. (1991). "Solving the Structure of Human H Ferritin by Genetically Engineering Intermolecular Crystal Contacts." *Nature* **349**: 541-4.
- Leicht, W. and Pundak, S. (1981). "Large-Scale Purification of Halophilic Enzymes by Salting-out Mediated Chromatography." *Anal. Biochem.* **114**: 186-92.
- Lesk, A. M. (1995). "NAD-Binding Domains of Dehydrogenases." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 775-83.
- Leslie, A. G. W. (1992). "Recent Changes to the Mosfilm Package for Processing Image Plate Data." *CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* **26**.
- Leslie, A. G. W., Wonacott, A. J., Dockerill, S. and Brick, P. (1988). *Oscillation Program Systems*. Cambridge.

- Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., *et al.*, and Arosio, P. (1996). "Evidence That Residues Exposed on the Three-Fold Channel Have Active Roles in the Mechanism of Ferritin Iron Incorporation." *Biochem. J.* **317**: 467-73.
- Li, C., Heatwole, J., Soelaiman, S. and Menachem, S. (1999). "Crystal Structure of a Thermophilic Alcohol Dehydrogenase Substrate Complex Suggests Determinants of Substrate Specificity and Thermostability." *PROTEINS: Struct., Funct. Genet.* **37**: 619-627.
- Lin, E. C. (1976). "Glycerol Dissimilation and Its Regulation in Bacteria." *Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 535-78.
- Liyanage, H., Kashket, S., Young, M. and Kashket, E. R. (2001). "*Clostridium Beijerinckii* and *Clostridium Difficile* Detoxify Methylglyoxal by a Novel Mechanism Involving Glycerol Dehydrogenase." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2004-10.
- Long, S. and Salin, M. L. (2000). "Archaeal Promoter-Directed Expression of the *Halobacterium Salinarum* Catalase-Peroxidase Gene." *Extremophiles* **4**: 351-6.
- Madern, D., Pfister, C. and Zaccai, G. (1995). "Mutation at a Single Acidic Amino Acid Enhances the Halophilic Behaviour of Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* in Physiological Salts." *Eur. J. Biochem.* **230**: 1088-95.
- Madern, D. and Zaccai, G. (1997). "Stabilisation of Halophilic Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui* by Divalent Cations - Effects of Temperature, Water Isotope, Cofactor and pH." *Eur. J. Biochem.* **249**: 607-11.
- Madern, D., Ebel, C. and Zaccai, G. (2000a). "Halophilic Adaptation of Enzymes." *Extremophiles* **4**: 91-98.
- Madern, D., Ebel, C., Mevarech, M., *et al.*, and Zaccai, G. (2000b). "Insights into the Molecular Relationships between Malate and Lactate Dehydrogenases: Structural and Biochemical Properties of Monomeric and Dimeric Intermediates of a Mutant of Tetrameric L-[Ldh-Like] Malate Dehydrogenase from the Halophilic Archaeon *Haloarcula Marismortui*." *Biochemistry* **39**: 1001-10.
- Madigan, M. T. and Mairs, B. L. (1997). "Extremophiles." *Scientific American*: 66-71.
- Malaoui, H. and Marczak, R. (2001). "Separation and Characterization of the 1,3-Propanediol and Glycerol Dehydrogenase Activities from *Clostridium Butyricum* E5 Wild-Type and Mutant D." *J. Appl. Microbiol.* **90**: 1006-14.
- Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. and McPherson, A. (1996a). "Incorporation of Microcrystals by Growing Protein and Virus Crystals." *PROTEINS: Struct., Funct. Gen.* **24**: 247-52.
- Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. and McPherson, A. (1996b). "Defect Structure of Macromolecular Crystals." *J. Struct. Biol.* **117**: 124-37.
- Marg, B. (2002). Struktur und Halophilie eines Archaealen Ferritins. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Margesin, R. and Schinner, F. (2001). "Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology." *Extremophiles* **5**: 73-83.
- Marshall, J. H., May, J. W. and Sloan, J. (1985). "Purification and Properties of Glycerol NAD 2-Oxidoreductase EC-1.1.1.6 Glycerol Dehydrogenase from *Schizosaccharomyces Pombe*." *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1581-8.

- Massé, E. and Gottesman, S. (2002). "A Small RNA Regulates the Expression of Genes Involved in Iron Metabolism in *Escherichia coli*." *PNAS* **99**: 4620-25.
- Matthews, B. W. (1968). "Solvent Content of Protein Crystals." *J. Mol. Biol.* **33**: 491-7.
- May, A. C. and Johnson, M. S. (1994). "Protein Structure Comparisons Using a Combination of a Genetic Algorithm, Dynamic Programming and Least-Squares Minimization." *Prot. Engin.* **7**: 475-85.
- May, J. W. and Sloan, J. (1981). "Glycerol Utilization by *Schizosaccharomyces Pombe* Dehydrogenation as the Initial Step." *J. Gen. Microbiol.* **123**: 183-86.
- McPherson, A. (1985). "Use of Polyethylene Glycol in the Crystallization of Macromolecules." *Methods Enzymol.* **114**: 120-25.
- McPherson, A. (1990). "Current Approaches to Macromolecular Crystallization." *Eur. J. Biochem.* **189**: 1-23.
- McPherson, A. (1991a). "Useful Principles for the Crystallization of Proteins." aus: Michel, H.: „Crystallization of Membrane Proteins“. Frankfurt/Main, Germany.
- McPherson, A. (1991b). "A Brief History of Protein Crystal Growth." *J. Cryst. Growth* **110**: 1-10.
- McPherson, A., Koszelak, S., Axelrod, *et al.*, and Cascio, D. (1986). "An Experiment Regarding Crystallization of Soluble Proteins in the Presence of β -Octyl Glucoside." *J. Biol. Chem.* **261**: 1969-75.
- McPherson, A., Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G. and Koszelak, S. (1996). "Incorporation of Impurities into Macromolecular Crystals." *J. Cryst. Growth* **168**: 74-92.
- Merrit, E. A. and Murphy, M. E. P. (1994). "Raster 3D Version 2.0. A Program for Photorealistic Molecular Graphics." *Acta Cryst.* **D 50**: 869-73.
- Mevarech, M., Leicht, W. and Werber, M. M. (1976). "Hydrophobic Chromatography and Fractionation of Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria Using Decreasing Concentration Gradients of Ammonium Sulfate." *Biochemistry* **15**: 2383-6.
- Mevarech, M., Frolow, F. and Gloss, L.M. (2000). "Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt." *Biophys. Chem.* **86**: 155-164.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., *et al.* and DasSarma, S. (2000). "From the Cover: Genome Sequence of *Halobacterium* Species NRC-1." *PNAS* **97**: 12176-81.
- Nicholls, A. (1992). Graphical Representation and Analysis of Surface Properties. Columbia University, NY.
- Oesterhelt, D. and Krippahl, G. (1983). "Phototrophic Growth of Halobacteria and Its Use for Isolation of Photosynthetically-Deficient Mutants." *Ann. De Microbiol.* **134B**: 137-50.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1971). "Rhodopsin-Like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium Halobium*." *Nature New Biol.* **233**: 149-52.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1973). "Functions of a New Photoreceptor Membrane." *PNAS* **70**: 2853-7.
- Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974). "Isolation of the Cell Membranes of *Halobacterium Halobium* and Its Fractionation into Red and Purple Membrane." *Methods Enzymol.* **31**: 667-78.

- Olsen, G. J. (1994). "Archaea, Archaea, Everywhere." *Nature* **371**: 657-8.
- Oren, A. (1994). "Enzyme Diversity in Halophilic Archaea." *Microbiologia* **10**: 217-28.
- Oren, A. and Gurevich, P. (1994). "Distribution of Glycerol Dehydrogenase and Glycerol Kinase Activity in Halophilic Archaea." *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 311-16.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). "Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode." *Methods Enzymol.* **276**: 307-26.
- Papinutto, E., Dundon, W. G., Pitulis, N., *et al.* and Zanotti, G. (2002). "Structure of Two Iron-Binding Proteins from *Bacillus Anthracis*." *J. Biol. Chem.* **277**: 15093-98.
- Peña, M. M. O., and Bullerjahn, George S. (1995). "The DpsA Protein of *Synechococcus* sp. Strain PCC7942 Is a DNA-Binding Hemoprotein Linkage of the Dps and Bacterioferritin Protein Families." *J. Biol. Chem.* **270**: 22478 - 82.
- Persidis, A. (1998). "Extremophiles." *Nature Biotech.* **16**: 593-4.
- Pfeifer, F., Griffig, J. and Oesterhelt, D. (1993). "The Fdx Gene Encoding the [2Fe-2S] Ferredoxin of *Halobacterium Salinarium* (*H. Halobium*)." *Mol. Gen. Genet.* **239**: 66-71.
- Pfeiffer, M., Rink, T., Gerwert, K., Oesterhelt, D. and Steinhoff, H.J. (1999). "Site-directed Spin-labeling Reveals the Orientation of the Amino Acid Side-chains in the E-F Loop of Bacteriorhodopsin." *J. Mol. Biol.* **287**, 163-171
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. and Herzberg, O. (1998). "Structural Features of Halophilicity Derived from the Crystal Structure of Dihydrofolate Reductase from the Dead Sea Halophilic Archaeon, *Haloferax Volcanii*." *Structure* **6**: 75-88.
- Prodromidis, M. I., Stalikas, C. D., Tzouwarakarayanni, S. M. and Karayannis, M. I. (1996). "Determination of Glycerol in Alcoholic Beverages Using Packed Bed Reactors with Immobilized Glycerol Dehydrogenase and an Amperometric Fia System." *Talanta* **43**: 27-33.
- Pundak, S., Aloni, H. and Eisenberg, H. (1981). "Structure and Activity of Malate Dehydrogenase from the Extreme Halophilic Bacteria of the Dead Sea. 2. Inactivation, Dissociation and Unfolding at NaCl Concentrations Below 2m. Salt, Salt Concentration and Temperature Dependence of Enzyme Stability." *Eur. J. Biochem.* **118**: 471-77.
- Ramaswamy, S., Eklund, H. and Plapp, B. V. (1994). "Structures of Horse Liver Alcohol Dehydrogenase Complexed with NAD⁺ and Substituted Benzyl Alcohols." *Biochemistry* **33**: 5230-37.
- Rao, J. K. and Argos, P. (1981). "Structural Stability of Halophilic Proteins." *Biochemistry* **20**: 6536-43.
- Reindel, S., Anemüller, S., Sawaryn, A. and Matzanke, B. F. (2002). "The Dpsa-Homologue of the Archaeon *Halobacterium Salinarum* Is a Ferritin." *Biochim. Biophys. Acta* **1598**: 140-6.
- Richard, S. B., Madern, D., Garcin, E. and Zaccari, G. (2000). "Halophilic Adaptation: Novel Solvent Protein Interactions Observed in the 2.9 and 2.6 Resolution Structures of the Wild Type and a Mutant of Malate Dehydrogenase from *Haloarcula Marismortui*." *Biochemistry* **39**: 992-1000.
- Richardson, J. (1981). "The Anatomy and Taxonomy of Protein Structures." *Adv. Prot. Chem.* **34**: 168-339.

- Ries-Kautt, M. and Ducruix, A. (1992). Phase Diagrams. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. New York, Oxford University Press.
- Rosenberger, F., Vekilov, P. G., Muschol, M. and Thomas, B. R. (1996). "Nucleation and Crystallization of Globular Proteins - What We Know and What Is Missing." *J. Cryst. Growth* **168**: 1-27.
- Rossmann, M. G. and Blow, D. M. (1962). "The Detection of Subunits within the Crystallographic Asymmetric Unit." *Acta Cryst.* **15**: 24-31.
- Rossmann, M. G., Moras, D. and Olson, K. W. (1974). "Chemical and Biological Evolution of a Nucleotide-Binding Protein." *Nature* **250**: 194-9.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). "Life in Extreme Environments." *Nature* **409**: 1092-101.
- Ruch, F. E., Lin, E. C., Kowitz, J. D., *et al.* and Goldberg, A. L. (1980). "In Vivo Inactivation of Glycerol Dehydrogenase in *Klebsiella Aerogenes*: Properties of Active and Inactivated Proteins." *J. Bacteriol.* **141**: 1077-85.
- Ruzheinikov, S. N., Burke, J., Sedelnikova, S. *et al.*, and Rice, D. W. (2001). "Glycerol Dehydrogenase: Structure, Specificity, and Mechanism of a Family III Polyol Dehydrogenase." *Structure* **9**: 789-802.
- Santoro, M. M., Liu, Y., Khan, S. M. A., *et al.*, and Bolen, D. W. (1992). "Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Naturally Occurring Osmolytes." *Biochemistry* **31**: 5278-83.
- Scharshmidt, M., Pfeleiderer, G., Metz, H. and Brummer, W. (1983). "Isolierung und Charakterisierung von Glycerin-Dehydrogenase aus *Bacillus Megaterium*." *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**: 911-21.
- Schlichtkrull, J. (1957). "Insulin Crystals. III. Determination of the Rhombohedral Zinc-Insulin Unit-Cell by Combined Microscopical and Chemical Examinations." *Acta Chem. Scand.* **11**: 291-98.
- Schmitt, C. (1997). Studien zur halobakteriellen Chemotaxis. Dissertation. München, Ludwig-Maximilians-Universität
- Schuurink, R., Busink, R., Hondmann, D. H., *et al.*, and Visser, J. (1990). "Purification and Properties of NADP(+)-Dependent Glycerol Dehydrogenases from *Aspergillus Nidulans* and *A. Niger*." *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1043-50.
- Schwartz, M. F. and Jörnval, H. (1976). "Structural Analysis of Mutant and Wild-Type Alcohol Dehydrogenases from *Drosophila Melanogaster*." *Eur. J. Biochem.* **68**: 159-68.
- Scrutton, N. S., Berry, A. and Perham, R. N. (1990). "Redesign of the Coenzyme Specificity of a Dehydrogenase by Protein Engineering." *Nature* **343**: 38-43.
- Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., *et al.* and Sieker, L. C. (1993). "The Application of Direct Methods and Patterson Interpretation to High-Resolution Native Protein Data." *Acta Cryst.* **D49**: 18-23.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996). "Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver Stained Polyacrylamide Gels." *Anal. Biochem.* **68**: 850-8.

- Skouri, M., Lorber, B., Giege, R., *et al.* and Candau, J. S. (1995). "Effect of Macromolecular Impurities on Lysozyme Solubility and Crystallizability: Dynamic Light Scattering, Phase Diagram, and Crystal Growth Studies." *J. Cryst. Growth* **152**: 209-20.
- Spencer, P., Bown, K. J., Scawen, M. D., *et al.*, and Gore, M. G. (1989). "Isolation and Characterisation of the Glycerol Dehydrogenase from *Bacillus Stearothermophilus*." *Biochim. Biophys. Acta.* **994**: 270-9.
- Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K., *et al.*, and Hirata, F. (1978). "Purification and Some Properties of Glycerol Dehydrogenase from *Erwinia Aroideae*." *Chem. Pharm. Bull.* **26**: 716-21.
- Sumner, J. B. (1919). "The Globulins of the Jack Bean, *Canavalia Ensiformis*." *J. Biol. Chem.* **37**: 137-41.
- Sumner, J. B. (1926). "The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease." *J. Biol. Chem.* **69**: 435-41.
- Suzuki, Y., Miyashita, S., Sazaki, G., *et al.*, and Komatsu, H. (2000). "Effects of Pressure on Growth Kinetics of Tetragonal Lysozyme Crystals." *J. Cryst. Growth* **208**: 638-44.
- Tang, C. T., Ruch, F. E. and Lin, E. C. (1979). "Purification and Properties of a Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Linked Dehydrogenase That Serves an *Escherichia Coli* Mutant for Glycerol Catabolism." *J. Bacteriol.* **140**: 182-7.
- Tonello, F., Dundon, W. G., Satin, B. *et al.* and Montecucco, C. (1999). "The *Helicobacter Pylori* Neutrophil-Activating Protein Is an Iron-Binding Protein with Dodecameric Structure." *Mol. Microbiol.* **34**: 238-46.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., *et al.*, and Despied, S. (1995). "Lethal Oxidative Damage and Mutagenesis Are Generated by Iron in Delta Fur Mutants of *Escherichia Coli*: Protective Role of Superoxide Dismutase." *J. Bacteriol.* **177**: 2305-14.
- Truniger, V. and Boos, W. (1994). "Mapping and Cloning of Glda, the Structural Gene of the *Escherichia Coli* Glycerol Dehydrogenase." *J. Bacteriol.* **176**: 1796-800.
- Turner, G. J., Miercke, L. J. W., Mitra, A. K. *et al.*, and Winter-Vann, A. (1999a). "Expression, Purification, and Structural Characterization of the Bacteriorhodopsin-Aspartyl Transcarbamylase Fusion Protein." *Protein Expression & Purification* **17**: 324-38.
- Turner, G. J., Reusch, R., Winter-Vann, A., Martinez, L. and Betlach, M. C. (1999b). "Heterologous Gene Expression in a Membrane-Protein-Specific System." *Protein Expression & Purification* **17**: 312-23.
- Vekilov, P. G. and Rosenberger, F. (1996). "Dependence of Lysozyme Growth Kinetics on Step Sources and Impurities." *J. Cryst. Growth* **158**: 540-51.
- Visuri, K., Kaipainen, E., Kivimäki, J., *et al.*, and Palosaari, S. (1990). "A New Method for Protein Crystallization Using High Pressure." *Nature Biotech.* **8**: 547-9.
- Viswanath-Reddy, M., Pyle, J. E. and Branch Howe, H. (1978). "Purification and Properties of NADP⁺-Linked Glycerol Dehydrogenase from *Neurospora Crassa*." *J. Gen. Microbiol.* **107**: 289-96.
- von der Haar, F. (1976). "Purification of Proteins by Fractional Interfacial, Salting out on Unsubstituted Agarose Gels." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**: 1009-13.

- Vuillard, L., Madern, D., Franzetti, B. and Rabilloud, T. (1995). "Halophilic Protein Stabilization by the Mild Solubilizing Agents Nondetergent Sulfobetaines." *Anal. Biochem.* **230**: 290-94.
- Weik, M., Ravelli, R. B. G., Kryger, G., *et al.*, and Sussman, J.L. (2000). "Specific Chemical and Structural Damage to Proteins Produced by Synchrotron Radiation." *PNAS* **97**: 623-28.
- Wilson, A. J. C. (1949). "The Probability Distribution of X-Ray Intensities." *Acta Cryst.* **2**: 318-21.
- Winartasaputra, H., Kuan, S. S. and Guilbault, G. G. (1982). "Amperometric Enzymic Determination of Triglycerides in Serum." *Analytical Chemistry* **54**: 1987-90.
- Wittlich, P. (2001). Biotechnische Herstellung von 1,3-Propanediol aus Glycerin mit Immobilisierten Zellen von *Clostridium Butyricum* NRRL B-1024 und Thermophilen Mikroorganismen. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina. Braunschweig
- Wittung-Stafshede, P. (2002). "Role of Cofactors in Protein Folding." *Acc. Chem. Res.* **35**: 201-8.
- Woese, C. R. (1990). "Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya." *PNAS* **87**: 4576-79.
- Woese, C. R. (1998). "The Universal Ancestor." *PNAS* **95**: 6854-9.
- Wolf, S. G., Frenkiel-Krispin, D., Arad, T. *et al.*, and Minsky, A. (1999). "DNA Protection by Stress-Induced Biocrystallization." *Nature* **400**: 83 - 85.
- Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T. *et al.*, and Tanaka, N. (2002) "The 2.0 Å Crystal Structure of Catalase-Peroxidase from *Haloarchula marismortui*". *Nature Struct. Biol.* **9**: 691-5.
- Yancey, P. H., Clark, M., E., Hand, S. C., *et al.*, and Somero, G. N. (1982). "Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte System." *Science* **217**: 1214-22.
- Zaccai, G., Cendrin, F., Haik, Y., *et al.*, and Eisenberg, H. (1989). "Stabilization of Halophilic Malate Dehydrogenase." *J. Mol. Biol.* **208**: 491-500.
- Zhang, D. and Poulter, C. D. (1993). "Biosynthesis of Archaeobacterial Lipids in *Halobacterium Halobium* and *Methanobacterium Thermoautotrophicum*." *J. Org. Chem.* **58**: 3919-22

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AC	Anionenaustauscherchromatographie
AFM	<i>atomic force spectroscopy</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BR	Bacteriorhodopsin
CCD	<i>charged coupled devices</i>
DH	Dehydrogenase
DHA	Dihydroxyaceton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FPLC	<i>fast pressure liquid chromatography</i>
GF	Gelfiltration
GlyDH	Glyzerin-Dehydrogenase
hEF-Tu	halophiler Polypeptid-Elongationsfaktor Tu aus <i>H. marismortui</i>
hFdx	halophiles Ferredoxin aus <i>H. marismortui</i>
hGAPDH	halophile Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus <i>H. vallismortui</i>
hMDH	halophile Malat-Dehydrogenase aus <i>H. marismortui</i>
hvDHFR	halophile Dihydrofolat-Reduktase aus <i>H. volcanii</i>
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton

kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation</i>
MeOH	Methanol
MR	<i>Molecular Replacement</i> (Molekularer Ersatz)
Mev	Mevinolin
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MW	Molekulargewicht
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (als Einheit einer Enzymaktivität)
üN	über Nacht
Wt	Wildtyp

6.2 Abkürzungen der Aminosäuren

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

6.3 Übersicht über die wichtigsten Ansätze der Shotgun-Kristallisation

Datum der Auftrennung	Aufschluß	Art der Auftrennung	Fraktionsbezeichnung	Kristalle: Wann auspipettiert? Wann entdeckt? Was für ein Kristall in welcher Probe (s. Fraktionsbezeichnung)	Bedingung	Reproduzierbar?	Identifikation über:	Anmerkungen über besondere Zusätze o.ä.
11.1.00	FP (CK)	HIC: nach AS-Fällung nur mit Überstand	I/1-14	17.1.00/ 6.7.00: Ferritin (klein, gelb; I/9) #:? (hexagonal, klein, I/10+11) #: Ferritin (kleine Säulchen); ? (3 große gelbe Kristalle, I/9+10); #: Ferritin (kleine Säulchen, I/10) #: Dodecin (gelb, hexagonal, I/11) 18.1.00/6.7.00: ? (hexagonal, klein-mittelgroß, I/4) #: ? (langgestreckt, I/1) #: ? (Sterne, I/10) #: ? (Prisma, I/10+11)	I/23 I/32 I/41 I/47 I/4 II/23 II/21 II/27 II/45	+ + - +	RS RS RS	
19.1.00	FP (CK)	A, MonoQ	II/1-10	20.1.00/ 6.7.00: ? (Stäbchen, II/3) 24.1.00/ 8.7.00: ? (viele kleine hexagonale, II/15), ? (drei große gelbe, II/16) #: ? (schmale Stäbchen, II/16) #: ? (klein hexagonal, II/15), Ferritin (Säulchen, II/16) #: Ferritin (schöne Säulchen)	I/20 I/31 I/32 I/47 I/48	-	RS RS RS	
20.1.00	FP (CK)	A, MonoQ	III/1-9	Platten eingetrocknet				Fraktionen durch Zugabe von Salz auf 1 M gebracht
28.1.00	FP (CK)	A, MonoQ (stemq3)	IV/1-7	Platten eingetrocknet	-	-	-	Protease-Verdau der Fraktionen vor Auspipettieren
4.2.00	FP	A, ResourceQ (stresq1)	-	-	-	-	-	Auftrennung erst nach Protease-Verdau
7.2.00	FP	A, ResourceQ (stresq2)	„II15/16“	11.2.00: Platten eingetrocknet	-	-	-	Gradient 25 SV
7.2.00	FP	A, ResourceQ (stresq3)						Gradient 50 SV
7.2.00	FP	A, ResourceQ (stresq4)						Gradient 100 SV
9.2.00	FP	A, MonoQ (stemq4)	V/1-11	11.2.00: Platten eingetrocknet	-	-	-	Zweimal genau der gleiche Lauf,
9.2.00	FP	A, MonoQ (stemq5)	-	-	-	-	-	relativ ähnliche Chromatogramme

17.2.00	FP	A, MonoQ (2x)	VI/1-8	Nur VI/8 später weiterauspipettiert: 26.4.00/10.7.00: ? (MK) #: Ferritin (Scherben) #: Ferritin (Säulchen) 28.4.00/10.7.00: ? (MK) #: ? (MK) #: ? (kleine Kristalle)	I/10k I/14k I/4k I/31k I/41k I/46k	+	RS RS	Zweimal der gleiche Lauf, beim 2.Mal mehr Protein, prominente Banden vergleichbar. Zusatz: 20% Glycerin
17.2.00	FP		VI/9	#				
28.2.00 1./2.3.00	FP	A, MonoQ (2x) + GF (s2001-5)	2D/1-8	14.3.00/ 6.7.00: ? (würfelförmig, relativ groß) #: Ferritin (schöne, hexagonale Kristalle) 15.3.00/8.6.00: Ferritin (Säulchen) #: ? (Würfel) #: ? (MK)	I/4 I/12 I/35 I/47 I/32		SEQ RS	Zusammengepoolte Fraktionen aus Ain GF
7.3.00	FP	HIC, Phesechs, Überstand	VII.1-3	15.3.00/8.7.00: Ferritin (Säulchen)	I/47		RS	HIC nach AS-Fällung (2.5 M AS); mit
8.3.00	FP	bzw.Niederschlag	VII.4-7					DTT; anschließende GF (10./13.3.00)
10.3.00	FP	GF	VII.1.1-VII.3.4	14.3.00/8.7.00: ? (kleine Nadeln) #: ? (kleine Würfel)	I/13 I/12			
13.3.00	FP	GF	-	-	--	-	-	
17.3.00	FP	A, DEAE s	-	-				20% Glycerin,
21.3.00	FP	A, DEAE s	VIII.1-7	24.3.00/8.7.00: ? (VIII.3, kleine Nadeln) #: ? (kleine unregelmäßige, VIII.3) #: ? (lange Stäbchen, VIII.4) 20.4.00/7.9.00: ? (winzige Nadeln, VIII.1)	I/14 I/46 I/46 I/23			Anschluß einer GF (23./24.3.00)
23./ 24.3.00	FP	GF	VIII.1.1-VIII.7.3	24.3.00/8.7.00: Ferritin (Säulchen) #: ? (VIII.3, winzige Nadeln) #: ? (roter Kristall) #: ? (größere Stäbchen, VIII.3.3) 26.3.00/8.7.00: ? (lange, spitze Nadeln, VIII.7.2) #: ? (große, viele Kristalle, VIII.6.2) #: Ferredoxin (großer roter Kristall, VIII.5.3) 20.4.00/7.9.00: ? (kleine würfelförmige, VIII.5.2) #: ? (lange sternförmige Nadeln, VIII.7.2)	I/22 I/14 I/1 I/46 I/13 I/18 I/6 I/18o I/23o		RS SEQ	nicht auf siliconisierten Deckgläsern, z.T. ohne Salz in Tropfen, nur in Bodenlösung (o)
17.4.00	FP	A, DEAEks	SO ₄ -A.1-4	25.4.00/10.7.00: ? (unregelmäßig, klein, 1u) #: ? (kleine Kügelchen, 2u, 2v) #: Ferritin (unregelmäßige Säulchen, 1u) #: ? (kleine Stäbchen, 2u) #: ? (schöne trapezförmige, 4u) 26.4.00/10.7.00: ? (Sterne, 3u) #: Ferritin (Säulchen, 1u) 28.4.00/107.00: ? (Klötzchen, 2u)	I/12 I/12 I/21 I/21 I/21 I/10k I/23k I/47k		RS *	SO ₄ -vermittelter A (1.2 M AS); Elutionspuffer mit 2M NaCl; Vorlegen von Salz in Reagenzgläsern, unverdünntes (u) und verdünntes (v) Auspipettieren; z.T. KCl in Puffer statt NaCl (k)

19.4.00	FP	A, DEAEks	SO ₄ -A.1a-3a	25.4.00/10.7.00: ? (unregelmäßige Stäbchen, 1au) #: ? (unregelmäßige Stäbchen, 3au) #: ? (kleine Stäbchen, 1au) #: ? (kleine Stäbchen, 2au) #: ? (kleine Stäbchen, 3a) #: ? (Stäbchen, 1au) #: ? (Stäbchen, 2au) #: ? (Stäbchen, 3a) #: ? (runde Kristalle, 3a) #: ? (Nadeln, 1a) 26.4.00/10.7.00: ? (Würfelchen, 3au) #: ? (Stäbchen, 2au) #: ? (Sternchen, 1a) #: ? (Kugeln, 2au, v) 28.4.00/10.7.00: ? (große Stäbchen, 1au, v)	I/6 I/6 I/12 I/12 I/12 I/21 I/21 I/21 I/21 I/24 I/46 I/12k I/12k I/23k I/23k I/48k	- - -		SO ₄ -vermittelter A (1.2 M AS), Vorlegen von Salz (NaCl) in Reagenzglasern; z.T. KCl in Puffer statt NaCl (k); Elutionspuffer mit 2M NaCl; z.T. AS in Bodenlösung (a)
4.5.00	FP	A, DEAEgs	SO ₄ -A.003.1-8	12.5.00/10.7.00: ? (Sterne, 3) #: ? (Sterne, 4) #: ? (MK, 1) #: ? (MK, 7) #: ? (Würfelchen, 8) #: ? (MK, 1u) #: ? (Klumpen, 1,3,7) #: ? (großer Würfel, 7) #: ? (kleine Würfelchen, 8) #: ? (MK, 1u) #: ? (MK, 1) #: ? (Klumpchen, 3) #: ? (Brocken, 8) #: ? (großer roter Stab, 6) #: ? (kleine unregelmäßige, 1) #: ? (mittelgroße, unregelmäßige, 3) #: ? (kleine unregelmäßige, 5) #: ? (MK, 1,1u) #: ? (rel.große Stäbchen, 3,4,5) #: ? (ein trapezförmiger Kristall, 7) #: ? (türkise MK, 8) #: ? (schöne Stäbchen, 1) #: ? (kleine Nadeln, 1) #: ? (etwas größere Nadeln, 3) #: ? (MK, 1u)	I/6 I/6 I/12 # # # I/4 I/21 # # 1/23 # I/24 I/14 I/6a # # I/12a # # # I/18a I/23a # I/16a	* * *		SO ₄ -vermittelter A (1.2 M AS); z.T. AS in Bodenlösung (a); anschließend GF (26.5.00)
22.5.00	FP	A, DEAEgs	HfMan001.1-11	29.5.00/17.7.00: ? („Chromosomen“, 8) #: Dodecin (gelbe Kristalle, 10) #: Ferritin (Scherben, 10)	I/23 # #		RS RS	

26.5.00	FP	GF, S75/S200	SO ₄ -A.003.I.1-VIII.3	8.6.00/11.6.00: ? (viele kleine Würfelchen, II.3-75) 8.6.00/4.7.00: ? (kleine Stäbchen, IV.1) 11.6.00/14.6.00: ? (kleine spitze Nadeln, V.2) 11.6.00/14.6.00: ? (kleine würfelchen, V.2) #/14.6.00: Ferritin (Scherben, eine rot, V.2) #/4.1.01: Ferritin (Scherben, VII.3) #/14.6.00: Ferritin (kleine Scherben, VII.3) #/19.6.00: Ferritin (Säulen, groß, V.2) #: ? (lange Stäbe, VII.3) #/6.7.00: ? (roter Kristall)	I/23 I/2 I/14 # I/23 # # I/4 I/10 I/7	*	RS RS RS RS	z.T. S75 oder S200;
7.6.00	FP	A, DEAEks	IX.1-7	13.6.00/19.6.00: Ferritin (Scherbe, IX.6) #: Ferritin (Säulchen, IX.6) #/6.7.00: Ferritin (Minisäulchen, IX.6) #/6.7.00: ? (MK, IX.6) #/19.7.00: ? (MK, IX.6) 15.6.00/6.7.00: ? (relativ groß, unregelmäßig, IX.5)	I/23 I/19 I/4 I/6 I/12 I/11g	+	RS RS RS	20% Glycerin, in Reagenzgläsern 4 M NaCl vorgelegt; z.T. 5% Glycerin in Proteinprobe in Kristallisationsansatz (g)
12.6.00	FP	A, DEAEks	gly001-gly007	15.6.00/19.6.00: ? (klein, unregelmäßig, gly2) #: ? (fasrig, klein, gly1) #/6.7.00: ? (unregelmäßig, groß, gly2)	I/14 I/23 I/46			2 M Glyzin in Puffern, in Reagenzgläsern 4 M NaCl vorgelegt
16.6.00	FP	A, DEAEks	beta001.1-5	23.6.00/25.6.00: ? (MK, 5g/og) #/3.7.00: # (MK, 1og) #: Ferritin (scherbenartig, 1og) #: Ferritin, ? (scherben, 1og) #: Dodecin (kleine Stäbchen, 4og) 26.6.00/17.7.00: ? (MK, 4og) #: ? (MK, 2og) #: ? (MK, 5og) 26.6.00/4.7.00: ? (rote Kristalle, 5og) #: ? (klein, hexagonal, 5g) #: ? („Chromosomen“, 5g) #: ? (MK, 1og)	I/14 I/6 I/23 # # I/37 I/45 I/31 I/9b I/10b I/6b I/14b	+	RS RS SEQ	2.5 M Betain in Puffern, 4 M NaCl vorgelegt; z.T. 2.5 M Betain in Bodenlösung (b); z.T. mit/ohne 5% Glycerin in Bodenlösung (g/og)
7.7.00	FP	A, DEAEks	beta002.1-7	17.7.00/21.7.00: ? (MK, 1) #: ? (MK, 1) #: Dodecin (gelb, 5u) 20.7.00/25.7.00: ? (groß, unregelmäßig, 5u) #/9.5.00: Ferritin (Säulchen, 5v)	I/6b I/6ob I/23 I/47 I/41	+	RS RS	3 M Betain in Puffern, 4 M NaCl vorgelegt
18.9.00	FP	HIC, PheSeph	HIC01.1-8	22.9.00/29.7.01: Dodecin(gelbe Würfel, groß, 5) #/25.9.00: Ferritin (große, gelbe Säulchen, 5) #/10.11.00: ImG-P-Dehydratase (gelb, 5) #: ? (klein, rot, 6) #: ? (klein, rot, 6) #: Ferritin (kleine, gelbe Säulchen, 6)	PEG AS PEG # # #	+	RS SEQ SEQ RS	HIC nach AS-Fällung (2.5 M AS, 3 Tage gerührt), nur Verwendung des Überstands; z.T. FS mit PEG 4000 + 0.2 M MgCl ₂ oder mit AS + 0.2 M MgCl ₂

1.10.00	FP	HIC, PheSeps	HIC0.2.1-6	6.10.00/9.10.00: Ferritin (riesige Säulen, 4) #/17.10.00: Ferritin (Säule, 4) #/29.5.01: ? (kubisch, durchsichtig, 5)	AS # #		RS RS	HIC nach AS-Fällung (2.5 M AS, 3 Tage gerührt), nur Verwendung des Überstands, FS mit AS + 0.2 M MgCl ₂
3.1.01	FP	A, DEAE-Riesensäule	3.1.01.1-7	12.1.01/23.1.01: ? (neongelb, 6) #: Ferritin (kleine Säulchen, 4) #/9.5.01: ? (rot-orange, rund, 4)	PEG AS #		SEQ RS	z.T. FS mit PEG 4000 oder mit AS
16.1.01 18.1.01	FP	A, DEAE+ GF, S75	„2G“, „3G“ GF18101/1-6	23.1.01/9.5.01: ? (gelbes Klötzchen, „2G“) #: ? (gelb, unregelmäßig, 4) #: ? (gelbe Stäbchen, 1) #/25.1.01: Ferritin (kleine Säulchen, 1) #/9.5.01: ? (klein, rot, rund, 2) #: Ferritin (Minisäulchen, 1)	I/4 I/13 I/23 I/32 I/42 I/47	+	RS RS	Puffer mit 20% Glycerin, anschließende GF
2.2.01	TC	HAP	-	-	-	-	-	Puffer mit 4 M NaCl
5.2.01 8.2.01	TC	A, DEAEks + GF (bilegf08/090201)	BILENAIO1-3 BILEGF1-7	13.2.01/9.5.01: ? („Puzzle-Kristalle, A2) #: ? (Nadeln, GF2,3) #: GlyDH (Würfel, A2) #: ? (kleine Würfel, G5) #: Dodecin (gelb, G5) #: ? (MK, A2) #: GlyDH (groß, hexagonal, A2) #: GlyDH (feine Plättchen, A2) #: Dodecin (gelb, G5) #: GlyDH (Plättchen, A2) #: GlyDH (große Plättchen, A2)	I/2 I/13 I/15 I/18 I/18 I/23 I/20 I/12 I/47 I/38 I/44	+	SEQ RS SEQ SEQ RS RS	SO ₄ -vermittelter A (0.6 M AS), anschließende GF
22.2.01	TC	A, DEAEks	-	-	-	-	-	SO ₄ -vermittelter A (0.6 M AS), Durchfluß nochmals aufgetragen, s. 28.2.01
28.2.01 3.3.01	TC	A, DEAEks mit Durchfluß vom 22.2.02 + GF, S75 groß/klein	- GF030301.1-12	6.3.01/9.5.01: ? (kleine Stäbchen, 8) #: ? (MK, 3) #: ? (kleine Würfel, 9)	I/36 I/46 I/41			Puffer ohne AS, aber mit 20% Glycerin; anschließende GF
13.3.01	TC	A, DEAEks	BROOK 1-6	-	-	-	-	nur für 2D-Gele
16.5.01 22.5.01	TC (CK)	A, DEAEks + GF mit b-1	bileanio160501-1-4 dpsnatgf220501.5/6	29.5.01/29.5.01: Ferritin (Säulchen, b-3) #/31.5.01: ? (kleine Würfel, b-3) 1.6.01/5.6.01: Ferritin (schöne, gelbe Scherben, b-3) #: Ferritin (große gelbe Scherben, b-3)	I/14 I/13 FS FS	+		nur zur nativen Aufreinigung von Ferritin; FS mit PEG 400 +/- MgCl ₂
20.6.01	TC (CK)	HAP, HAPs	BILEHAP21.6.01	27.6.01/17.1.02: ? (groß, unregelmäßig, b-7) #: ? (MK fast überall)	I/7 I/16			Puffer mit 2 M NaCl
22.6.01	TC	A, DEAEks	BILEANIO22.6.01. 1-7	29.6.01/6.12.01: Dodecin (viele gelbe, b-6)	I/24			

Tab. 14. Überblick über die wichtigsten Zyklen der Shotgun-Kristallisation (Aufschluß, Fraktionierung und Kristallisation) im Rahmen dieser Arbeit. Neben dem Datum der Aufreinigung ist auch Datum des Kristallisationsansatzes/Kristallfunds angegeben, um vergleichen zu können, wieviel Zeit das Kristallwachstum in etwa in Anspruch genommen hat. Weiterhin ist die Art des Aufschlusses und der Aufreinigung aufgelistet sowie der entsprechende Name der daraus resultierenden Proben. In *Spalte fünf* finden sich die Kristalle (und ihre Morphologie), die sich unter den Bedingungen, die in *Spalte sechs* angegeben sind, gebildet haben und die dazugehörige Probennummer. Dabei ist soweit möglich der Name des zugrundeliegenden Proteins aufgeführt, ansonsten steht ein Fragezeichen für nicht-identifizierte Kristalle. Die Identifikation erfolgte entweder über direkte Sequenzierung (SEQ) oder über „Rückschluß“ (RS), d.h. ein Kristall zeigte z.B. die gleiche Form oder war aus der gleichen Fraktion/in der gleichen Bedingung gewachsen wie ein sequenzierter Kristall. In *Spalte 6* sind entweder die Bedingungen des Hampton-Screens aufgelistet oder unter welcher Art von Feinscreen (FS) sich ein Kristall gebildet hatte. Desweiteren gibt *Spalte sieben* wieder, ob sich die Bildung eines Kristalls hat wiederholen lassen, keine Angabe in dieser Spalte bedeutet, daß es nicht versucht wurde. Die letzte Spalte enthält einige Angaben bezüglich besonderer Pufferzusätze bzw. sonstige Bemerkungen zu dem betreffenden Zyklus.

Abkürzungen:

2. Spalte (Aufschluß): FP, French Press; TC, Taurodesoxycholat; CK, Zytosol von Christian Klein

3. Spalte (Fraktionierung): A, Anionentauscher; GF, Gelfiltration; HAP, Hydroxyapatit; HIC, hydrophobe Interaktionschromatographie; DEAEks, kleine DEAE-Säule selbstgepackt; DEAEgs, große DEAE-Säule selbstgepackt; PheSeph, Phenylsepharose selbstgepackt; HAPs, Hydroxyapatit-Säule, selbstgepackt

5./6. Spalte: o, kein Salz in Bodenlösung; k, 0.5 M KCl in Bodenlösung; a, 0.5 M Ammoniumsulfat in Bodenlösung; b, Betain in Bodenlösung; g, Glycerin im Kristallisationsansatztropfen; og, ohne Glycerin; v, verdünnt; u, unverdünnt; MK; Minikristalle; ImG-P-Dehydratase, Imidazolglyzerin-Phosphat-Dehydratase, FS, Feinscreen

7. Spalte (Reproduzierbarkeit aus gleicher Fraktion und unter gleicher Bedingung): +, reproduzierbar, *, reproduziert im batch-Ansatz, -, nicht reproduzierbar,

8. Spalte (Identifikation): SEQ, Sequenzierung; RS, Rückschluß

9. Spalte: AS, Ammoniumsulfat

6.4 Tabellarische Übersicht der Statistiken zur Strukturlösung

6.4.1 Ferritin

Datensammlung			
Röntgenquelle	BM14	ID14-2	ID14-1
Wellenlänge	0.9762 Å	0.933 Å	0.934 Å
Raumgruppe	P321	P321	I222
Zelldimensionen (<i>a, b, c</i>)	90.75 Å	91.13 Å	92.498 Å
	90.75 Å	91.13 Å	97.130 Å
	149.4 Å	150.42 Å	128.66 Å
Auflösung	1.8 Å	2.8 Å	1.1 Å
Beobachtungen, einmalige Reflexe	392342, 66071	29975, 17777	732207, 224888
Mosaizität	0.238	0.480	
Wilson B-Faktor	18.7 Å ²	35.9 Å ²	
$I/\sigma(I)$ ^a , R_{merge} ^b	12.25, 0.096	9.4, 0.082	4.96, 0.024
Vollständigkeit	99.6%	87.0%	89.4%
Verfeinerungsstatistik (CNS)			
Auflösung	30-1.9 Å		
Reflexe ($F > 0$)	56417		
Verhältnis der Vertwinnung (<i>h, k, l</i> / <i>-h-, -k, l</i>)	0.57 / 0.43		
R-Faktor, R_{frei} ^c	0.147, 0.182		
Gesamtzahl der Atome	5772		
Mittlerer B-Wert	18.5 Å ²		
<i>rmsd</i> Bindungen, Winkel	0.006 Å, 1.08 °		

6.4.2 Glyzerin-Dehydrogenase (momentaner Stand)

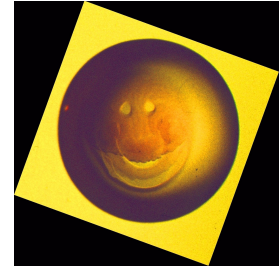
Datensammlung	
Röntgenquelle	ID14-2
Wellenlänge	0.934 Å
Raumgruppe	P42 ₁ 2
Zelldimensionen (<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i>)	104.3 Å 104.3 Å 136.3 Å
Auflösung	1.6 Å
Beobachtungen, einmalige Reflexe	606308, 97361
Mosaizität	0.237
Wilson B-Faktor	22.5 Å ²
$I/\sigma(I)$ ^a , R_{merge} ^b	9.44, 0.012
Vollständigkeit	99.3 %
Verfeinerungsstatistik (CNS)	
Auflösung	20-1.6 Å
Reflexe ($F > 0$)	97361
R-Faktor, R_{frei} ^c	0.205, 0.241
Gesamtzahl der Atome	5681
Mittlerer B-Wert	26.2 Å ²
<i>rmsd</i> Bindungen, Winkel	0.028 Å, 2.2 °

a) Berechnet mit dem Programm TRUNCATE (CCP4, 1994) bei dem Ferritin oder XDS (Kabsch, 2001) bei der Glyzerin-Dehydrogenase

b) $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$; die Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsstufe

c) R-Faktor = $\frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$; R_{frei} berechnet mit 9.9% (Ferritin) bzw. 10% (Glyzerin-Dehydrogenase) der Daten

Danksagung



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung von Prof. Dr. D. Oesterhelt unter Anleitung von Prof. Oesterhelt und Prof. Essen angefertigt.

Mein Dank gilt zuerst meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung sowie für sein Interesse, seine wertvollen Anregungen und Ratschläge und v.a. seine außerordentliche Fähigkeit zu begeistern und zu motivieren.

Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die Betreuung besonders während des ersten Teils meiner Arbeit, was er auch nach seiner Berufung nach Marburg - soweit es möglich war - über die Ferne fortgesetzt hat. Seine stete Gesprächsbereitschaft und sein breites Wissen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ursel und Benjamin möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen: Ursel für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, die schöne Zeit, die wir zusammen im Labor verbracht haben, und einige leckere Buttermilchhasen - und Benjamin, ohne ihn hätte mir in den letzten drei Jahren etwas Wichtiges gefehlt - und nicht nur mein Computer wäre traurig gewesen!

Insgesamt möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe Oe sehr herzlich danken für ihre Hilfsbereitschaft, die außergewöhnlich freundliche und kollegiale Atmosphäre und nicht zuletzt für die Geduld mit meinem (vielleicht manchmal/selten tatsächlich etwas schrillen) Pfeifen.

Besonders erwähnen möchte ich hier Kornelius und seine zahlreichen fachlichen Ratschläge - Frau Haack und Jörg und besonders beider Organisationskunst - Rita und nicht wenige abwechslungsreiche Gespräche mit ihr - Boris, der ursprünglich die Idee für die Shotgun-Kristallisation hatte und mir gerade zu Beginn mit Rat und Tat geholfen hat - Bianca und Alex, deren Herzlichkeit, Unterstützung und Interesse mich immer wieder überrascht haben.

Auch den Mitgliedern der Gruppe, die mich auf technischer Ebene hervorragend unterstützt haben, gilt mein Dank: Uta Schimanko für die Oligo-Synthese, Kiki Weihrauch und Karin Rodewald für die DNA-Sequenzierung, Walter Erhardt und Johann Schiefele für ausführliche Antworten und Reaktionen auf alle „computerellen und mechanischen Probleme“ sowie Lizzy Weyher-Stingl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Moroder für ihre Unterstützung bei CD- und DSC-Messungen, deren Ergebnisse ich dann leider garnicht mehr in der Arbeit unterbringen konnte, Günter Pfeifer aus der Abteilung von Prof. Baumeister für seine freundliche Einweisung und stete Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und Reini Mentele aus der Abteilung von Prof. Lottspeich für die sooft besonders rasche Sequenzierung meiner Kristalle!

Und - nur hier - zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester Julia danken: dafür, daß sie immer an mich glauben und für mich da sind, und mir damit, auch wenn´s mal nicht so gut läuft, einen starken Rückhalt geben.

STEFANIE OFFERMANN

Landsbergerstraße 455 / 81241 München
Telephon: ++49-89-83969279

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum	2. Januar 1975
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

AUSBILDUNGSWEG/ SCHULE/ UNIVERSITÄT

9/1981 – 6/1994	Camerloher Grundschule (München) Karls gymnasium (München/Pasing)
1994	Abitur
11/1994-10/1999	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (München) mit Schwerpunkt Mikrobiologie, Biochemie, Genetik
1996	Vordiplom
1998	Diplom
1/1999-9/1999	Diplomarbeit am Botanischen Institut (München) unter Betreuung von Prof. Dr. J. Ebel; Thema: CHARAKTERISIERUNG DES BETA-GLUCAN-REZEPTORKOMPLEXES AUS SOJABOHNE (<i>GLYCINE MAX L.</i>) UNTER ANWENDUNG EINES ZWEIHYBRIDSYSTEMS IN HEFE UND BIOCHEMISCHER TECHNIKEN
Ab 1/2000-2/2003 (voraussichtlich)	Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) in der Abteilung von Prof. Dr. D. Oesterhelt; Thema: „SHOTGUN-KRISTALLISATION“ – STRUKTURAUFKLÄRUNG EINES FERRITINS UND EINER GLYZERIN-DEHYDROGENASE AUS DEM ARCHAEON <i>H. SALINARUM</i>

München, den 9. Dezember 2002