

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

**Röntgenkristallographische Untersuchungen an der Tricorn-Protease aus
Thermoplasma acidophilum und an der funktionell homologen
Trilobed-Protease aus *Pyrococcus furiosus***

Jürgen Bosch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher

Die Dissertation wurde am 12.03.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.05.2003 angenommen.

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, daß die Dinge so sind, wie sie sind.

Aristoteles (384 - 322 v. Chr.), griechischer Philosoph, Schüler Platos,
Lehrer Alexanders des Großen von Mazedonien

Inhaltsangabe

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Allgemeine Einführung	3
2.2 Spezielle Einführung	4
2.3 Ziel der Arbeit und Motivation	9
3. Material und Methoden	10
3.1 Materialien	10
3.1.1 Substanzen	10
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	10
3.2 Biochemische Methoden	12
3.2.1 Gentechnische und mikrobiologische Methoden	12
3.2.2 Plasmide und Bakterienstämme	12
3.2.3 Transformation von rekombinanten Plasmiden in <i>E. coli</i>	13
3.2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	13
3.2.3.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen	14
3.2.3.3 Stammhaltung	14
3.2.3.4 Plasmid-Reinigung	14
3.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNS	16
3.2.4 Nährmedien und Puffer	17
3.2.5 Proteinreinigung	19
3.2.5.1 Proteinisolierung der Tricorn-Protease	19
3.2.5.2 Proteinisolierung der Trilobed-Protease (TLP)	20
3.2.5.3 Proteinisolierung der β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease	21

3.2.6 Proteinanalytische Methoden	21
3.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
3.2.6.2 Coomassie Färbung nach Neuhoff	22
3.2.6.3 Proteinbestimmung mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten	23
3.2.6.4 Konzentrierung von Proteinen	23
3.2.6.5 Peptidase-Aktivitätsmessung	24
3.3 Röntgenkristallographische Methoden	25
3.3.1 Proteinkristallisation	25
3.3.2 Datensammlung und Datenreduktion	26
3.3.3 Phasierung	27
3.3.4 Modellbau und Strukturverfeinerung	29
3.3.4.1 Tricorn-Protease	30
3.3.4.2 β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease	30
3.3.4.3 Trilobed-Protease	30
3.4 Benutzte Programme zur Erstellung der Abbildungen	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Tricorn-Protease	32
4.1.1 Rekombinante Expression und Proteinreinigung	32
4.1.2 Kristallisation und Datensammlung	35
4.1.3 Auswertung der Daten und Herleitung eines Packungsmodells	37
4.1.4 NCS-Mittelung - Einstufung der Tricorn-Protease	41
4.1.5 <i>Ab initio</i> Mittelung durch Phasenextension mit einer umhüllenden Maske	44
4.1.6 NCS-Mittelung - Problematik Tricorn-Protease	52
4.1.7 NCS-Mittelung - Schlußfolgerung	55
4.1.8 Strukturlösung der C2-Kristallform durch molekularer Ersatz mit 1K32	58
4.2 Trilobed-Protease β -Propellerdomäne	62
4.2.1 Expression und Proteinreinigung	62
4.2.2 Kristallisation der β -Propellerdomäne	64
4.2.3 Auswertung der Daten	66
4.2.4 Phasierung und Strukturlösung	68

4.2.5	Struktur der Trilobed β -Propellerdomäne	69
4.2.6	Strukturbasiertes Sequenzalignment der β -Propellerblätter	75
4.2.7	Oberflächeneigenschaften der Trilobed β -Propellerdomäne	76
4.2.8	Tripeptid PAW gebunden an Trilobed β -Propellerdomäne	78
4.3	Trilobed-Protease	80
4.3.1	Expression und Proteinreinigung der Trilobed-Protease	80
4.3.2	Kristallisation der Trilobed-Protease	82
5. Analyse und Diskussion		83
5.1	Tricorn-Protease	83
5.1.1	Funktion und Domänenaufbau der Tricorn-Protease	83
5.1.2	Alternativer Weg des Substrats zum aktiven Zentrum der Tricorn-Protease	87
5.1.3	Ausbildung des supramolekularen Tricorn-Capsids	89
5.1.4	Ausblick	95
5.2	Trilobed-Protease	96
5.2.1	Funktion und Domänenaufbau der Trilobed-Protease	96
5.2.2	Hypothetische Anordnung der Trilobed-Protease als Trimer	100
5.2.3	Funktion der β -Propellerdomäne in der Trilobed-Protease	101
5.2.4	Ausblick	104
6. Literaturverzeichnis		105
7. Abkürzungen		115
8. Anhang		120
8.1	Tricorn - gemessene Schwermetallderivate	120
8.2	Tricorn - Procheck Ergebnisse	121
8.3	Trilobed β -Propellerdomäne - Procheck Ergebnisse	127
8.4	Strukturvorhersage der katalytischen Domäne der Trilobed-Protease	135

1. Zusammenfassung

In den meisten intrazellulären Abbauprozessen von Proteinen erfolgt zunächst ein Angriff auf Zielproteine über ATP-abhängige Proteasen. Diese Proteasen sind in der Regel größere makromolekulare Komplexe, die eine faßartige Architektur aufweisen und ihre proteolytischen Aktivitäten in eigenen Reaktionskammern durchführen. Da diese Reaktionskammern für die meisten gefalteten Proteine unzugänglich sind, müssen diese zunächst von spezifischen ATPasen gebunden und entfaltet werden bevor sie weiter zum katalytischen Zentrum geleitet werden können. Dort werden die Zielproteine zu Peptiden mit einer Länge von 6-12 Aminosäuren gespalten und wieder freigesetzt. Um die Abbauprodukte der Zelle für den Metabolismus wieder zur Verfügung zu stellen, müssen diese kurzen Peptide zu freien Aminosäuren weiter hydrolysiert werden. In *Thermoplasma acidophilum* wird dies unter anderem von der Tricorn-Protease und den Tricorn-Faktoren F1, F2 und F3 bewerkstelligt.

Die Tricorn-Protease aus *Thermoplasma acidophilum* ist ein homohexameres Enzym mit einem Molekulargewicht von 121 kDa pro Untereinheit. Der Hexamere Komplex stellt die katalytisch aktive Einheit dar. Der Name leitet sich von der Dreispitz-ähnlichen Struktur des hexameren Komplexes aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen ab. *In vivo* kann eine ikosaedrische Capsidstruktur, bestehend aus 20 hexameren Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 14.6 MDa beobachtet werden. Diese supramolekulare Organisation könnte der effizienteren Substratzuführung an mit Tricorn interagierenden Aminopeptidasen (F1, F2, F3) dienen. Diese Aminopeptidasen hydrolysieren die von der Tricorn-Protease freigesetzten Di- bis Tetra-Peptide weiter zu freien Aminosäuren.

Für röntgenkristallographische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinant exprimierte Tricorn-Hexamere kristallisiert und analysiert. Es wurde der Versuch der *ab initio* Phasierung durch Kombination von elektronenmikroskopischen und röntgenkristallographischen Daten mit einer aus 3D-Rekonstruktionen erhaltenen Elektronendichte zu atomarer Auflösung unternommen. Der Einsatz von Molekularer Ersatz Techniken führte zu einem Atommodell mit einer Auflösung von 2.2 Å.

Untersuchungen an einem funktionellen Homolog der Tricorn-Protease aus *Pyrococcus furiosus* der Trilobed-Protease wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Dabei gelang es geeignete Bedingungen für ein Kristallwachstum der N-terminalen Propellerdomäne wie auch der Gesamtprotease zu etablieren. Der Name der Protease leitet sich ebenfalls aus der elektronenmikroskopisch beobachteten Kleeblatt-ähnlichen Struktur ab.

Röntgenkristallographische Untersuchungen der Trilobed-Propellerdomäne führten zu einem Atommodell mit einer Auflösung von 2.0 Å. Die Trilobed-Propellerdomäne wie auch beide Propellerdomänen der Tricorn-Protease gehören der Familie der „non-Velcro“ Propeller an. Bei diesen Propellerdomänen erfolgt ein offener Ringschluß zwischen dem ersten und letztem Propellerblatt. Im Gegensatz zu den „Velcro“ Propellerdomänen, bei denen jeweils das letzte Propellerblatt sowohl von N- wie auch C-terminalen β -Faltblattsträngen gebildet wird.

Ein hypothetisches Modell der Gesamtprotease wird im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt und bedarf weiterer röntgenkristallographischer Untersuchungen für dessen Bestätigung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

Bosch, J., Tamura, T., Bourenkov, G., Baumeister, W., and Essen, L. O. (2001). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of the tricorn protease hexamer from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Structural Biology* 134, 83-87.

Bosch, J., Tamura, T., Baumeister, W., Essen, L. O. (2003). 2.0 Å Crystal structure of the Trilobed β -Propeller Domain from *Pyrococcus furiosus*. Manuskript in Vorbereitung.

Bosch, J., Tamura, T., Essen, L. O., Baumeister, W. (2003). Alternative Substrate pathway reveals disagreement with previous Tricorn results. Manuskript in Vorbereitung.

2. Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Proteasen sind in der Natur weit verbreitet und erfüllen eine Vielfalt an Funktionen. Beispielsweise codieren virale Gene für Proteasen, die in der Lage sind, Vorläuferproteine ihrer viralen Strukturproteine zu spalten um sie nutzen zu können. Bakterien produzieren verschiedene extrazelluläre Proteasen, um andere Proteine in ihrer Umgebung abzubauen und anschließend zu verwerten. Höhere Organismen sind in der Lage mit Hilfe von Proteasen verschiedene Funktionen wie Nahrungsmittel-Verdauung, Spaltung von Signalpeptiden, Kontrolle von Blutdruck und Blutgerinnung etc. auszuführen. Viele Proteasen sind Bestandteile von großen Multienzym-Komplexen, andere sind unabhängige Einzelproteine oder bilden Homooligomere. Multimere Proteasen können dabei eine faßartige Struktur ausbilden, die es ihnen erlaubt Reaktionen in einem kontrolliertem Umfeld ablaufen zu lassen (Lupas et al., 1997). Häufig werden durch Proteasen enzymatisch katalysierte im Vergleich zu nicht katalysierten Reaktionen unter identischen Bedingungen um den Faktor 10^6 - 10^{12} beschleunigt. *In vivo* wird die Aktivität vieler Proteasen durch endogene Inhibitoren reguliert.

Die dreidimensionalen Strukturen einer Vielzahl kleinerer Proteasen und der entsprechenden Inhibitor-Komplexe wurden mit NMR- oder röntgenkristallographischen Methoden bestimmt. Sie erlauben einen generellen Rückschluß auf die vier verschiedenen Protease-Familien (Serin-, Cystein-, Aspartat- oder Metallo-Proteasen), denen alle bisher charakterisierten Proteasen angehören. Die Einteilung erfolgt anhand der am aktiven Zentrum beteiligten Reste und ihres Wirkungsmechanismus. Je nach Angriffsort unterscheidet man weiter nach Endo- und Exoproteasen. Endoproteasen spalten das Substrat an jeweils spezifischen, internen Aminosäuren und erzeugen so ein für jedes Protein charakteristisches Peptidmuster. Dagegen bauen Exoproteasen Peptidketten von ihrem C- oder N-terminalen Ende her unspezifisch ab. Bis auf wenige Ausnahmen sind Angehörige einer Protease-Familie evolutionär miteinander verwandt. Die dreidimensionale Anordnung der Reste im aktiven Zentrum und in der direkt benachbarten Umgebung bestimmen die Substratspezifität der Protease.

2.2 Spezielle Einführung

Eine in dem Archaeon *Thermoplasma acidophilum* entdeckte, hochmolekulare Protease, die aufgrund ihres Erscheinungsbildes in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Tricorn-Protease (französisch *Tricorne* = Dreispitz) benannt wurde, nimmt in der proteolytischen Abbaukette des Organismus eine zentrale Rolle zwischen 20S Proteasom und Aminopeptidasen ein (Tamura et al., 1996). Die optimalen Reaktionsbedingungen der Protease liegen bei einem pH-Wert von 8.2 - 8.5 bei 65°C und somit leicht über der optimalen Wachstumstemperatur von 55°C. Die natürliche Umgebung von *Thermoplasma acidophilum* sind Kohlereservoirs mit Pyritvorkommen und organischen Materialien bei einem pH-Wert von 2. Die katalytisch aktive Einheit der Tricorn-Protease setzt sich aus einem homohexameren Komplex mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von jeweils 121 kDa, zusammen. Sie weist tryptische und chymotryptische Eigenschaften auf.

Denaturierte und entfaltete Proteine werden in der Zelle zunächst vom 20S Proteasom in Fragmente mit einer Länge von 6-12 Aminosäuren gespalten. Diese Spaltprodukte können nicht direkt von Aminopeptidasen in freie Aminosäuren hydrolysiert werden. Die Tricorn-Protease ist jedoch in der Lage solche Peptidfragmente in Di- bis Tetrapeptide weiter zu hydrolysieren und sie dadurch Aminopeptidasen zugänglich zu machen (Tamura et al., 1998). Die freigesetzten Aminosäuren stehen dem Organismus wieder für anabole Prozesse zur Verfügung. Abbildung 2.1 faßt dies in einer schematischen Übersicht zusammen.

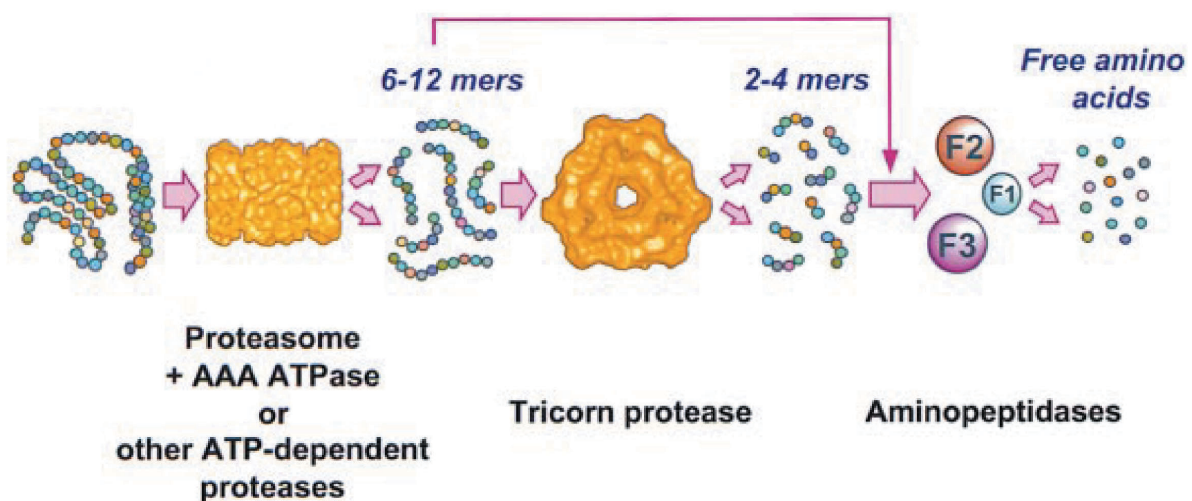


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des proteolytischen Abbauweges in *T. acidophilum* (Tamura et al., 1998).

Durch biochemische Untersuchungen konnte eine Änderung der Substratspezifität der Tricorn-Protease beobachtet werden, wenn diese mit den Tricorn-interagierenden Faktoren F1, F2 und F3 inkubiert wurde (Tamura et al., 1996). Dabei entstanden neuartige Substratspezifitäten, die bei den Einzelkomponenten nicht vorhanden waren. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Peptidfragmente zunächst von Tricorn vorprozessiert und anschließend von den Aminopeptidasen zu einzelnen Aminosäuren abgebaut werden (Tamura et al., 1998).

Ungewöhnlich ist die Fähigkeit der Tricorn-Protease *in vivo* einen supramolekularen Komplex, bestehend aus 20 hexameren Tricorn-Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 14.6 MDa, zu bilden. Die Capsid-Struktur mit einem Durchmesser von ca. 55 nm folgt einer ikosaedrischen Symmetrie und entspricht der Größe eines Virus (Walz et al., 1997). Abbildung 2.2 zeigt die Tricorn-Capsid-Struktur entlang der Fünffach-, Dreifach- und Zweifach Symmetrieachse.

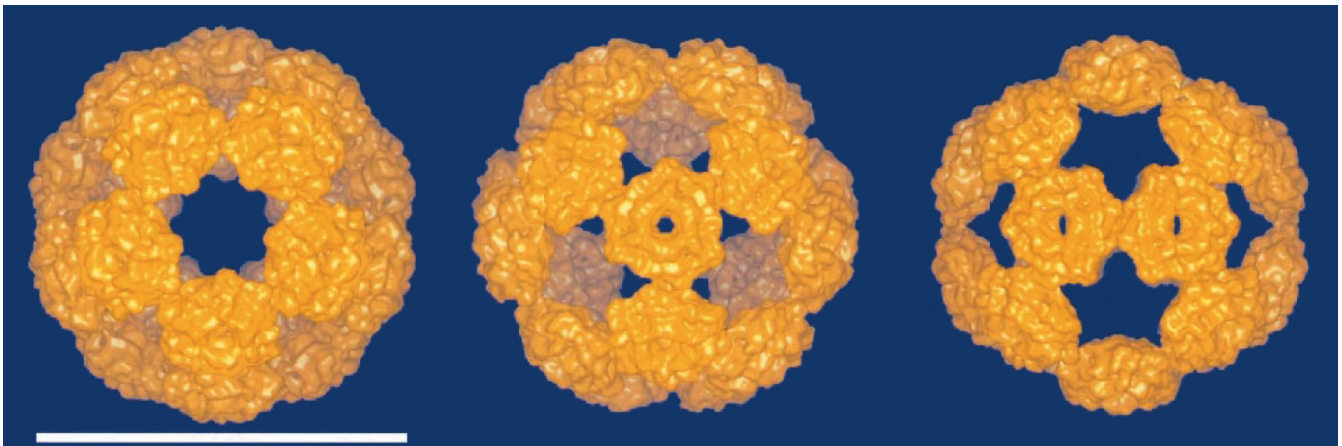


Abb. 2.2: Oberflächendarstellung der Capsid-Struktur mit einer nominellen Auflösung von 1.3 nm entlang der Fünffach-, Dreifach- und Zweifach Symmetrieachse (Walz et al., 1999).

Als mögliche Funktion der Capsid-Struktur wurde eine Gerüstfunktion für die Ausbildung eines Multienzym-Komplexes mit den Faktoren F1, F2 und F3 und somit eine verbesserte Zuführung der vorprozessierten Substrate zu den Aminopeptidasen in Erwägung gezogen. Bislang konnte jedoch kein direkter biochemischer Nachweis für eine stabile Interaktion zwischen den Faktoren F1, F2 und F3 mit Tricorn erbracht werden.

Anhand von Sequenzhomologien konnten zu Tricorn verwandte Proteasen in weiteren Organismen identifiziert werden z.B. *Sulfolobus acidocaldarius*, *Streptomyces coelicolor*, *Shewanella putrefaciens*, *Prevotella sp. RS2*. In manchen Organismen wurden keine zu Tricorn-sequenzhomologen Proteine gefunden. Da diese Organismen aber ebenfalls ausgeschiedene Peptidfragmente des Proteasoms zu einzelnen Aminosäuren weiterprozessieren, um sie wieder in den Stoffwechsel der Zelle einzubinden, muß dies durch ein zu Tricorn funktionell homologes Protein oder über andere Proteasen erfolgen (Tamura et al., 2001).

Ein solches Beispiel stellt die Trilobed-Protease aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* dar. *Pyrococcus* wächst bei Temperaturen von 70 bis 106°C, die optimale Wachstumstemperatur beträgt etwa 80°C. Die Trilobed-Protease (72 kDa) weist nur geringe Sequenzhomologie zu Tricorn (121 kDa) auf und entspricht größenmäßig nur etwa der Hälfte einer Tricorn-Untereinheit. Sie ist jedoch funktionell gesehen eng mit der Tricorn-Protease verwandt. Erste elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine trimere Anordnung der Untereinheiten mit einem Gesamt-Molekulargewicht von ca. 220 kDa. Der N-terminale Teil der Trilobed-Protease wurde über Sequenz- und Strukturhomologien als β -Propellerdomäne identifiziert, der C-terminale Teil entspricht einer α/β -Hydrolase Domäne (Tamura et al., Manuskript in Vorbereitung).

β -Propellerdomänen sind ubiquitär in Archäen, Bakterien und Eukaryonten vertreten. Sie können als unabhängige Domäne oder in Verbindung mit anderen Domänen eine Vielzahl an Funktionen übernehmen (Fülöp et al., 1999). Beispielsweise sind sie unter anderem beteiligt an der Substraterkennung, dem intrazellulärem Transport, der Immunantwort, der Zellinvasion, dem Hormonmetabolismus, der Stützfunktion oder dem Abbau von Zuckern und Säuren. Tabelle 2.1 zeigt eine kleine Auswahl bereits röntgenkristallographisch untersuchter β -Propellerdomänen.

Anzahl Propellerblätter	Protein	Funktion	Organismus	PDB	Referenz
4	Hämopexin	Häm-Bindung und Transport	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1QHU	Faber et al., 1995
5	Tachylektin	Zuckererkennung, Immunantwort	<i>Tachyleum tridentatus</i>	1TL2	Beisel et al., 1999
6	Neuraminidase	Entfernen von Sialsäure	Influenza-Virus	1NN2	Varghese et al., 1983
7	Methylamin-dehydrogenase	Oxidation primärer Amine	<i>Thiobacillus versutus</i>	2BBK	Vellieaux et al., 1989
8	Methanol-dehydrogenase	Oxidation primärer Alkohole	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	4AHH	Xia et al., 1992

Tab. 2.1: Übersicht einiger Proteine mit β -Propellerdomänen. Es wurden jeweils die zuerst gefundenen Strukturen einer Familie in Bezug auf die Anzahl der Propellerblätter aufgeführt.

Abbildung 2.3 zeigt die oben tabellarisch aufgeführten Proteine als Fadenmodell ihrer C_{α} -Kette mit einem Gradienten von blau zu rot im Uhrzeigersinn vom N-Terminus beginnend. Die einzelnen Propellerblätter sind am deutlichsten bei Tachylektin (2) zu erkennen, da sie fast identisch sind und nur geringe Unterschiede in ihrer Sequenz zueinander aufweisen. Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen an 226 β -Untereinheiten von G-Proteinen (7-blättrige Propellerdomäne) eine Sequenzidentität von nur 16 %. Trotz dieser geringen Identität wird die Grundtopologie der Propellerdomäne beibehalten. Wie Murzin (1992) beschreibt, ist der hydrophobe Charakter der an den Kontakten zwischen zwei benachbarten Propellerblättern beteiligten Reste für die Propellerdomänenstruktur wichtig. Aus diesen Betrachtungen ergibt sich auch die generelle Präferenz zu einer 7-blättrigen Propellerdomäne.

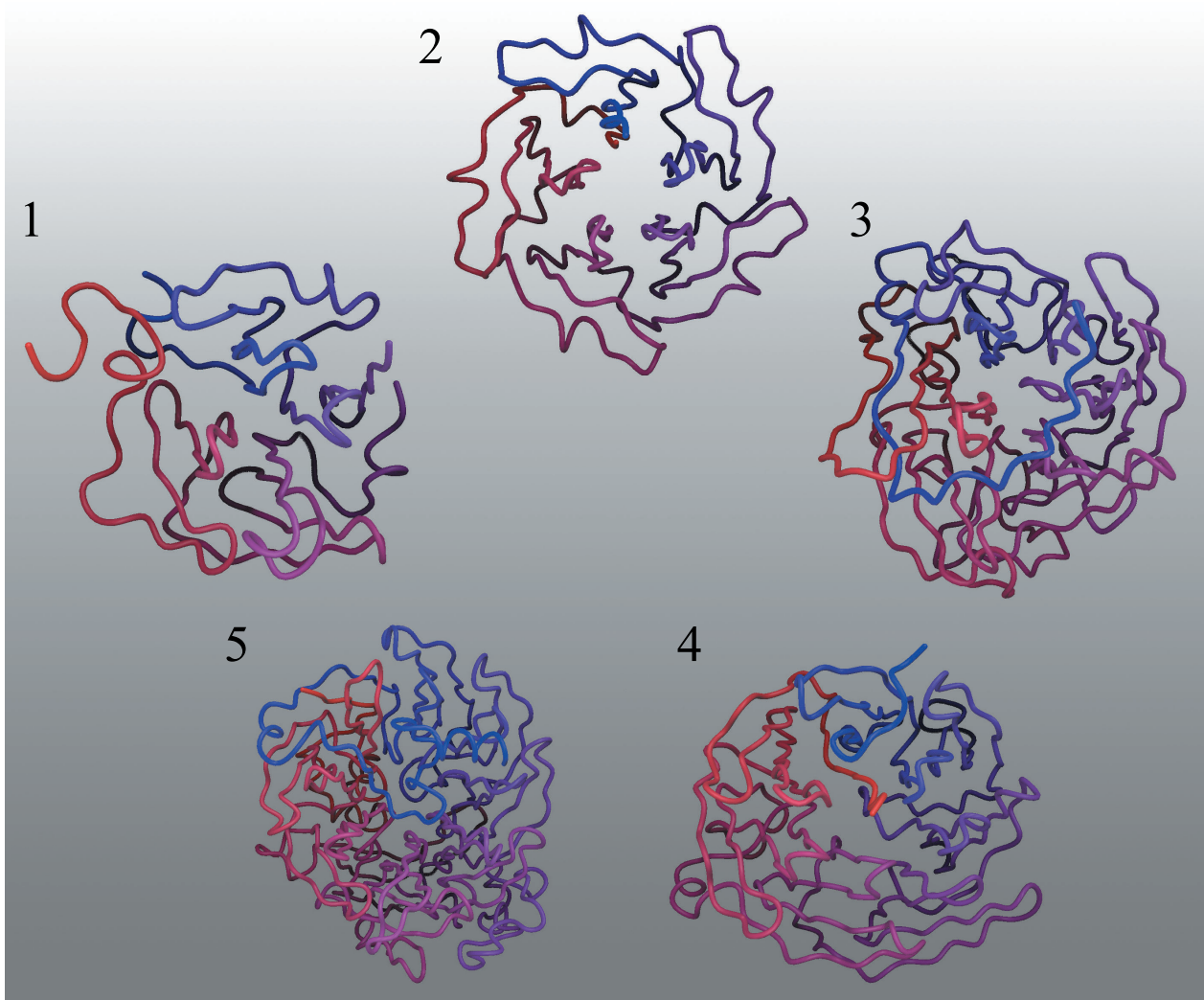


Abb. 2.3: Übersicht einiger β -Propellerdomänen mit unterschiedlicher Anzahl an Propellerblättern (4-8). Nur die Reste der C_{α} -Kette sind in einem Gradienten von blau (N-Terminus) zu rot (C-Terminus) dargestellt. 1) 1QHU - Hämopexin (Faber et al., 1995) 2) 1TL2 - Tachylektin (Beisel et al., 1999) 3) 1NN2 - Neuraminidase (Varghese et al., 1983) 4) 2BBK - Methylamindehydrogenase (Vellieux et al., 1989) 5) 4AHH - Methanoldehydrogenase (Xia et al., 1992).

Nur bei vierblättrigen Propellerdomänen sind Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Propellerblättern zwingend erforderlich, um die Stabilität zu gewährleisten. Ein Propellerblatt umfaßt in der Regel vier antiparallel verlaufende β -Faltblattstränge und ist zwischen 40 und 80 Aminosäuren lang. Benachbarte Propellerblätter werden über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Funktion einer Domäne wird durch die Aminosäuren der Schleifenbereiche und benachbarter Domänen bestimmt.

Ein weiterer Faktor, der die Stabilität der Propellerdomänen erhöht, ist die Art des Ringschlusses. Hierbei unterscheidet man zwischen zwei Möglichkeiten; „Velcro“ (Klettverschluß) und „non-Velcro“. Bei der Klett-Variante kommt der Ringschluß des Propellers unter Beteiligung sowohl von N-terminalen wie auch C-terminalen β -Faltblattsträngen im ersten Propellerblatt zustande. Am häufigsten ist das 1:3 Motiv zu beobachten. Der „non-Velcro“ Schließmechanismus wurde bisher nur in einer Struktur, der Prolyl-Oligopeptidase aus Schwein (POPase), beobachtet (Fülöp et al., 1998). Abbildung 2.4 verdeutlicht den Unterschied der verschiedenen Ringschlußmechanismen anhand von Beispielen.

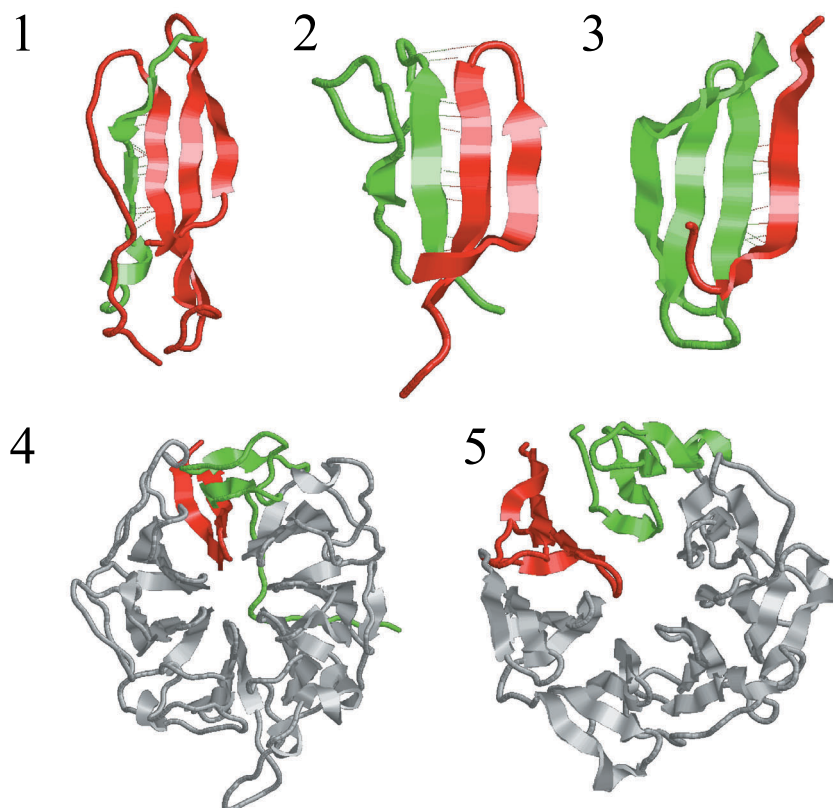


Abb. 2.4: Grün sind jeweils die N-terminalen, rot die C-terminalen β -Faltblätter dargestellt. In 1-3 ist jeweils nur das erste Propellerblatt in einer Seitenansicht gezeigt, Wasserstoffbrücken sind als Striche zwischen N- und C-terminalen Faltschichten zu erkennen. 1) 1NN2 (Varghese et al., 1983) mit dem gängigsten 1:3 Motiv. 2) 1A12 (Renault et al., 1998) mit einem 2:2 Motiv. 3) 2BBK (Vellieux et al., 1989) mit einem 3:1 Motiv. 4) 1A12 (Renault et al., 1998) als Gesamtübersicht der Propellerdomäne mit Velcro-Ringschluß. 5) Prolyl-Oligopeptidase (Fülöp et al., 1998) als einzige bisher bekannte Struktur ohne Velcro-Ringschluß.

2.3 Ziel der Arbeit und Motivation

Durch eine Kombination von Röntgenkristallographie und bereits vorhandenen Daten aus der Elektronentomographie sollte der Versuch einer *ab initio* Mittelung am Beispiel der Tricorn-Protease unternommen werden. Eine Etablierung dieser Methode und somit eine generelle Anwendung auf weitere große, makromolekulare Komplexe hätte den Vorteil, das weite Feld elektronenmikroskopischer Daten nutzen zu können, um an die Phaseninformation zu gelangen. Dadurch wäre eine aufwendige Suche nach geeigneten Schwermetallderivaten für Anfangsphasen nicht nötig.

Aus dem resultierenden 3D-Strukturmodell könnten Hinweise über die genaue Lage der katalytischen Reste sowie deren Funktionsmechanismus gewonnen werden, die für weitere Arbeiten an Mutanten nötig sind. Weiterhin können aus der Struktur Mechanismen für die Ausbildung der supramolekularen Capsid-Struktur abgeleitet werden.

Die bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Trilobed-Protease, einem funktionellem Homologen der Tricorn-Protease, zeigten eine trimere Anordnung. In diesem Zusammenhang ist es interessant, wie beide Proteasen bei unterschiedlich ausgeprägter Gesamtstruktur ihre Funktion als solche erfüllen. Weitere Informationen bezüglich Thermostabilität könnten aus dem Vergleich der Strukturmodelle der Tricorn- bzw. Trilobed-Protease gewonnen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Substanzen von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und USB (Cleveland, USA) bezogen und besaßen mindestens den Reinheitsgrad *pro analysi*. Wässrige Lösungen wurden mit deionisiertem und filtriertem Wasser aus einer Deionisierungsanlage der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) angesetzt. Konzentrationsangaben sind für Flüssigkeiten in (v/v), für Feststoffe in (w/v) angegeben.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ADSC (Povay, USA): Quantum-4 CCD-Detektor

Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden): FPLC-System ÄKTA Purifier10, Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalting, Gelfiltrationsmaterial Superose 6 Fast Flow, Gelfiltrationsmaterial Sephacryl S-300, Gelfiltrationsmaterial Superdex 75, ResourceQ, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub)

Avestin Inc. (Ottawa, Canada): Emulsiflex C5 Cell Disruptor

Beckman (München, Deutschland): Kühlzentrifuge Avanti J-25

Charles Supper Company (Massachusetts, USA): Doppelfokussierendes Spiegelsystem 7616

Deutsches Elektronensynchrotron (DESY, Hamburg): Synchrotron Meßstation BW6 (MPG/GBF), Synchrotron-Meßstation X31, BW7B (EMBL)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland): Kühlzentrifuge 5417R, Laborzentrifuge 5415C

European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich): Synchrotron Meßstation ID14-3, ID 14-1 (EMBL) ID 09

Hampton Research (Laguna Niguel, USA): Crystal Screen und Crystal Screen II, Kristallisationsplatten VDX, silikonisierte Glasplättchen

MarResearch (Hamburg, Deutschland): Image Plate MAR300, MARCCD-Detektor

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Millipore (Eschborn, Deutschland): Deionisierungsanlage Milli-Qplus PF, Sterilfilter 0.45 µm Millex-HA

Mytron (Heiligenstadt, Deutschland) Kristallzüchtungsschrank WBK 120

National Synchrotron Light Source (NSLS, Brookhaven, USA); Synchrotron-Meßstation X12B, X25, X12C

Novagen (Madison, WI USA)

Olympus (Hamburg, Deutschland): Stereomikroskop SZH10

Oxford Cryostreams (Oxford, England): Cryostream Oxford

Pall-Filtron (Northborough, USA): Ultrafiltrations-Einheit Jumbosep, Macrosep, Microsep (10, 30, 100 kDa)

Qiagen (Valencia, USA): Nickelchelat Matrix Ni-NTA Superflow

Rigaku (Berlin, Deutschland): Röntgenerators RU-200

Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Stratagene (La Jolla, CA USA)

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Gentechnische und mikrobiologische Methoden

Alle Geräte zum Arbeiten mit Bakterien wurden vor und nach Benutzung autoklaviert oder mit 70 % Ethanol sterilisiert, alle verwendeten Lösungen wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.2 Plasmide und Bakterienstämme

Mos-Blue <i>E. coli</i> (Amersham)	endA1 hsdR17(rk12-mk12+)supE44 thi-1 recA1 gyr A96relA1 lac[F' proA+B+lacqZD M15:Tn10(TcR)]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) CodonPlus™-RIL (Stratagene)	B strain F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m ^{B-}) dcm ⁻ Tet ^r galλ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r]
<i>E. coli</i> B834(DE3)pLysS (Novagen)	B strain F ⁻ ompT hsdSB(r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm met (DE3)

Zur rekombinanten Expression nativer Proteine wurde der Bakterienstamm *E. coli* BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL (Stratagene) eingesetzt. Der methioninauxotrophe Stamm *E. coli* B834 (DE3) pLysS (Novagen) wurde für die Expression von selenomethioninmarkiertem Protein verwendet. Dieser Stamm besitzt das Plasmid pLysS, welches neben einer Chloramphenicolresistenz ein Gen für die Expression von Lysozym sowie einen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase enthält. Nach Induktion der Zellen wird dadurch auch Lysozym exprimiert, das den Zellaufschluss erleichtert.

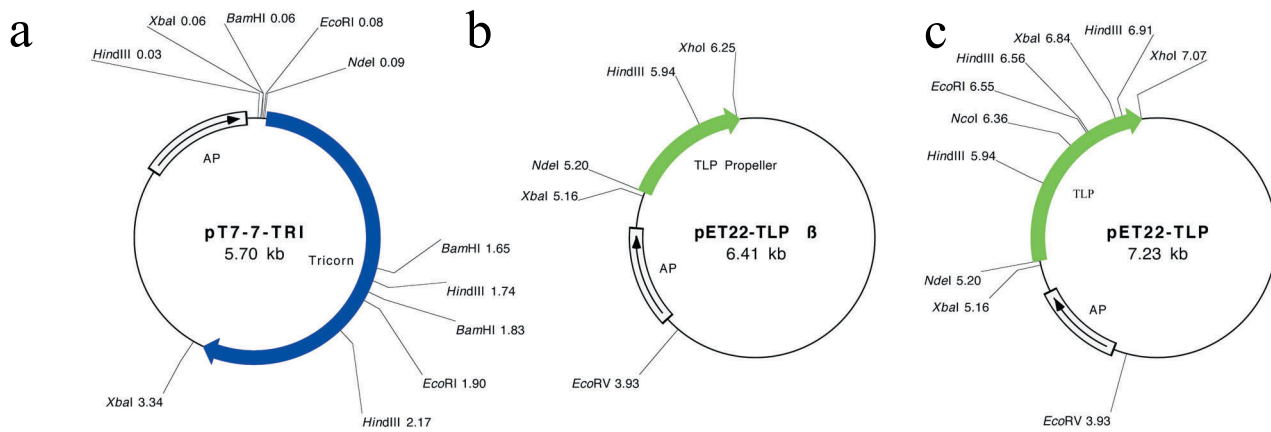


Abb. 3.1: a) Plasmidkarte der Tricorn Protease in pT-7-7 ligiert. b) Plasmidkarte der Trilobed β -Propellerdomäne (Met 1 - Lys 348) in pET22b. c) Plasmidkarte der Trilobed-Protease (Met 1 - 620 Glu) in pET22b. Die auf den Plasmiden liegende Ampicillin Antibiotika-Resistenz sind mit AP gekennzeichnet.

3.2.3 Transformation von rekombinanten Plasmiden in *E. coli*

3.2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Aus den erworbenen Stämmen wurden zunächst 1 ml LB-Flüssigkulturen mit dem entsprechendem Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB Medium mit den benötigten Antibiotika versetzt und mit dieser 1 ml Vorkultur beimpft. Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda=600$ nm verfolgt. Nach Erreichen einer $OD_{600}=0.5$ wurden die Zellen bei 2000 x g, 5 Minuten, 4 °C geerntet. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen; anschließend wurde das Zellpellet in 30 ml kaltem (4 °C) TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach erneutem Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Verwendung in 200 μ l Aliquots in sterilen Eppendorf Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

TFB1-Puffer (steril filtriert)	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KAc, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, pH 5.8
TFB2-Puffer (autoklaviert)	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, pH 8.0

3.2.3.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 – 50 ng Plasmid-DNS für 30 Minuten auf Eis mit gelegentlichem Schütteln inkubiert. Durch einen 90 Sekunden dauernden Hitzeschock in einem $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad nehmen die kompetenten Zellen die Plasmid-DNS auf. Nach einer zweiminütigen Abkühlphase auf Eis werden die Zellen in $500\text{ }\mu\text{l}$ SOC-Medium resuspendiert und in einem sterilen Röhrchen 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler inkubiert. Um positive Transformanten zu identifizieren, werden $100\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit dem jeweils selektiven Antibiotikum über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.

3.2.3.3 Stammhaltung

Einzelkolonien von LB-Agarplatten mit Selektiv-Antibiotikum werden in 10 ml Flüssigkultur über Nacht inkubiert. Diese Kultur wird mit 10 ml sterilem 50 % Glycerin versetzt und gut durchmischt. Anschließend werden Aliquots zu je 1 ml in Schraubdeckelröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.4 Plasmid-Reinigung (Miniprep)

Verwendet wurde der Plasmid Mini Kit der Firma *QIAGEN*. Puffer P1, P2, P3, QBT, QC und QF sind im Kit enthalten, Isopropanol, 70 % Ethanol und TE-Puffer müssen selbst angesetzt werden. Die Reinigungsprozedur wurde leicht modifiziert.

Zusammensetzung der Puffer:

P1	50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A
P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3	3 M Kaliumacetat pH 5.5
QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Isopropanol, 0.15 % Triton X-100
QC	1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Isopropanol
QF	1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.5, 15 % Isopropanol

Arbeitsprotokoll:

- Das Zellpellet einer Übernachtskultur aus 10 ml LB-Medium wurde in 400 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer P2 und gründlichem, aber vorsichtigem Mischen wurde 5 Minuten bei RT inkubiert.
- Anschließende Zugabe von 400 µl vorgekühltem Puffer P3 zum Ansatz und weitere 5 Minuten Inkubation auf Eis (Neutralisierung und Ausfällung des SDS Mitfällung von Zell-Debris, Proteinen und chromosomaler DNS, nicht aber der kleineren Plasmide).
- 10 Minuten Zentrifugieren bei 15000 rpm [21000 x g] und 4 °C (Entfernen des Debris).
- Für jede Plasmid-Reinigung verwendet man ein eigenes QIAGEN-tip 20, das zuvor mit 1 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde.
- Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren auf das QIAGEN-tip 20 (Anionenaustauscher) aufgetragen (DNS bindet an das Säulenmaterial).
- Überstand vollständig durchlaufen lassen; 4x Waschen mit je 1 ml QC-Puffer (Entfernung von eventuellen Kontaminanten, z.B. RNA, RNase, DNS-bindende Proteine und unspezifische, hydrophobe Interaktionen).
- Die Elution der Plasmid-DNS erfolgte mit 800 µl Puffer QF (alkalischer pH und erhöhte Salzkonzentration).
- Durch Zugabe von 600 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNS gefällt. 30 Minuten Zentrifugieren bei 15000 rpm [21000 x g].
- Das DNS-Pellet wurde mit 1 ml 70 % EtOH gewaschen (Entfernung von restlichem Salz) und anschließend für 5 Minuten an Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen.

3.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNS

DNS-Fragmente werden generell ihrer Größe nach in Agarose-Gelen zwischen 0.5 % bis 2 % getrennt. Als DNS-Standard verwendet man z.B. BstEII-geschnittene λ -DNS. In dieser Arbeit wurden ausschließlich 1 % Agarose-Gele benutzt.

1 % Agarose (Firma *FMC*, Typ *SeaKem LE*) wurde in TAE-Puffer aufgelöst und in einem Mikrowellengerät zum Kochen gebracht. Die erhitzte Agarose-Lösung wurde nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C in eine vorbereitete Gelwanne gegossen. Mit einem Gelkamm wurden Taschen für die Proben ausgespart. Die Proben wurden mit 1/10 Probenauftragspuffer vermischt und in die Taschen pipettiert. Als Referenz zur Bestimmung der Fragmentlängen wurden 5 μ l [100 ng/ μ l] λ -BstEII-Marker aufgetragen, der Elektrophoreselauf erfolgte bei 60 mA und ca. 60 V für 1-2 h.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Agarose-Gele mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid [10 μ g/ml] für 15-30 Minuten gefärbt, überschüssiges EtBr wurde durch 15 minütiges Waschen mit $H_2O_{\text{dest.}}$ entfernt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm für Dokumentationszwecke fotografiert.

Probenauftragspuffer	0.25 % Bromphenolblau gelöst in 50 % Glycerin
TAE-Puffer (50x)	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM NaEDTA, pH 8.5

3.2.4 Nährmedien und Puffer

Alle verwendeten Medien wurden 20 Minuten bei 1 bar Überdruck und 121 °C autoklaviert. Festmedien wurde 15 g Agar pro Liter zugesetzt. Antibiotika (aus sterilfiltrierten Aliquots) wurden den Medien kurz vor dem Beimpfen zugesetzt. Bei Festmedien erfolgte die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika nach Abkühlung auf 45 °C.

LB-Medium	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, pH 7.4 ad 1 l H ₂ O _{bidest}
LB-Agarplatten	15 g/l Agar in LB-Medium, Autoklavieren; nach Abkühlung mit Antibiotika versetzen; in Plastik-Petrischalen ausgießen
SOC-Medium	0.5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7.0
M9-Medium	200 ml M9-Salzlösung, 2.0 ml 1 M MgSO ₄ , 20 ml 20 % Glucoselösung, 0.1ml 1 M CaCl ₂ -Lösung, ad 1 l H ₂ O _{bidest}
M9-Salzlösung	64 g Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2.5 g NaCl, 5.0 g NH ₄ Cl, ad 1 l H ₂ O _{bidest}
TB-Medium	12.0 g Bacto-Trypton, 23.9 g Hefeextrakt, 8.0 ml Glycerin, 2.2 g KH ₂ PO ₄ , 9.4 g K ₂ HPO ₄ , pH 7.0, ad 1 l H ₂ O _{bidest}

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Puffer A	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 4 mM MgSO ₄ , pH 6.0
Puffer B	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 % (v/v) Glycerin, pH 8.0
Puffer C	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 % (v/v) Glycerin, 300 mM Imidazol, pH 8.0
Puffer D	50 mM Tris/HCl, pH 8.0
Puffer E	50 mM Tris/HCl, 2 M NaCl, pH 8.0
Puffer F	20 mM Tris/HCl, pH 8.0
Puffer G	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0
Puffer H	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 2 M NaCl, pH 8.0

TB-Medium diente als Nährmedium für *E. coli* BL21 (DE3) Zellen zur Expression nativer Proteine. Für die Expression von Selenomethionin-markierten Proteinen wurden B834 (DE3) Zellen in Minimalmedium M9 (Sambrook et al., 1989) unter Zugabe von 50 mg/l L-Selenomethionin kultiviert. Für ein beschleunigtes Zellwachstum wurde das Medium zusätzlich mit allen anderen Aminosäuren (jeweils 50 mg/l) angereichert. Alle Medien waren mit Ampicillin und Chloramphenicol (Endkonzentrationen von 0.1 mg/ml bzw. 0.025 mg/ml) versetzt.

Die Kultivierung von 0.8-l-Flüssigkulturen erfolgte in 2-l-Schikanekolben unter Schütteln (250 rpm) bei 37 °C. Um eine konstante Sauerstoffzufuhr mittels Diffusion zu gewährleisten, wurde übermäßige Schaumbildung durch Zugabe von ca. 20 µl AntiFoam Se-15 (Sigma) pro 0.8 l Flüssigkultur unterdrückt. Die Kolben wurden aus einer Übernachtskultur angeimpft, die ihrerseits aus einer isolierten Einzelkolonie hervorging.

Erreichten die Zellen eine $OD_{600} = 2$, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration von 1 mM) induziert. Nach weiteren 10 - 12 h Inkubation wurde die Kultivierung beendet und die Zellen in einer Zentrifuge abgeerntet (10 min, 5000 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in Puffer A resuspendiert (ca. 2 ml pro Gramm Feuchtmasse). Nach Zugabe von Benzonase (Merck, 10 U pro 1 ml Zellsuspension), 1 µM Aprotinin (Sigma) und 0.1 mM Leupeptin (Sigma) wurde die Suspension in einem Eis-Wasser-Gemisch mit einem Emulsiflex C5 Cell Disruptor (Avestin Inc.) bei 200 MPa aufgeschlossen. Das Lysat wurde dann abzentrifugiert (45 min, 75000 x g, 4 °C), der klare Überstand dekantiert und direkt für die ersten Reinigungsschritte verwendet.

3.2.5 Proteinreinigung

Alle säulenchromatographischen Trennungen wurden mit dem FPLC-System ÄKTA-Purifier 10 (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Aufarbeitung der nativen und der mit Selenomethionin-markierten Proteine erfolgten nach den gleichen Protokollen.

3.2.5.1 Proteinisolierung der Tricorn-Protease

Das partikelfreie Rohlysat wurde mit in Puffer A voräquilibriertem Ni-NTA Superflow-Material in einem Becherglas auf einem Magnetrührer bei 4 °C für 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei Raumtemperatur gepackt, indem ein konstanter Unterdruck durch eine Peristaltikpumpe (Biorad) oder eine 50 ml Spritze angelegt wurde. Hierdurch wurde das Rohlysat sukzessiv mit dem darin enthaltenen Säulenmaterial langsam in die Säule überführt. Unter Ausschluß von Luftblasen wurde der Säulenkopf leicht auf das Ni-NTA Bett gedrückt und verschlossen. Nach etwa zehn Säulenvolumina Waschen mit Puffer A stellte sich eine stabile Absorptionslinie bei $\lambda=280$ ein. Durch anschließendes Waschen mit Puffer B wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix ausgespült, und nach Erreichen einer stabilen Absorptionslinie ein Imidazol-Gradient (0 - 300 mM) mit Puffer C über 5 Säulenvolumina gestartet. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen in Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt und anschließend per SDS-PAGE und Aktivitätstest geprüft.

Aktive Fraktionen wurden vereinigt, mit einer HiPrep 26/10 Desalting-Säule in Puffer D umgepuffert und anschließend über einen Anionenaustauscher über einen NaCl-Gradienten mit Puffer E weiter aufgereinigt. Auch hier erfolgte eine Überprüfung der erreichten Reinheit per SDS-PAGE und Aktivitätstest.

Die aktiven Fraktionen wurden über Spin-Konzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa auf ein Volumen von 1.5 – 2 ml eingengt und anschließend per Gelfiltration mit einer Sephacryl S-300 Säule in Puffer F von Salzen und anderen kleinen Molekülen getrennt. Nach SDS-PAGE und Aktivitätstest wurde das gereinigte Protein auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml aufkonzentriert und für Kristallisationsansätze verwendet.

3.2.5.2 Proteinisolierung der Trilobed-Protease (TLP)

Das Zellpellet wurde pro Gramm Feuchtmasse mit 2 ml Puffer G resuspendiert und mit einem Emulsiflex C5 Cell Disruptor (Avestin Inc.) bei 200 MPa aufgeschlossen. Das partikelfreie Rohlysate wurde mit Puffer G um den Faktor fünf verdünnt und anschließend im Wasserbad bei 70 °C für 20 Minuten unter gelegentlichem Schwenken hitzegefällt. Anschließend erfolgte 10 minütiges Abkühlen in einem Eis-Wasser Gemisch und Überführung in 500 ml Zentrifugenbecher. Nach Pelletieren der Proteinaggregate bei 6000 x g für 20 Minuten bei 4 °C wurde das so vorgeklärte Lysat in 50 ml Zentrifugenbecher überführt und für weitere 60 Minuten bei 75000 x g von restlichen denaturierten Proteinen und Partikeln befreit. Um das Lysat für die nächste Reinigungsstufe vorzubereiten, wurde NaCl bis zu einer 2 M Endkonzentration zugeführt und für 30 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Eventuell ausgefallene Proteine wurden mittels Filtration durch einen 0.45 µm Filter entfernt und anschließend mit einer Flußrate von 3 ml/min auf eine Hydrophobe Interaktionssäule (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub) aufgetragen.

Nach Waschen mit 10 Säulenvolumina Puffer H stellte sich eine stabile Absorptionslinie bei $\lambda=280$ nm ein. Ein linearer Gradient über 10 Säulenvolumina mit Puffer G führte durch einen abfallenden NaCl-Gradienten zum Ablösen der gebundenen Proteine von der Säule, die fraktioniert gesammelt wurden. Nach Beurteilung der Reinheit der Fraktionen per SDS-PAGE und Aktivitätsbestimmung wurden die so ausgewählten Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen Puffer G dialysiert um die Salzkonzentration weiter zu erniedrigen. Die dialysierte Probe wurde mit einem Resource Q Anionenaustauscher durch einen linearen NaCl-Gradienten über 10 Säulenvolumina mit den Puffern G und H weiter aufgereinigt. Anhand eines Aktivitätstests und SDS-PAGE wurden die aktiven und reinen Fraktionen vereinigt und mit einer HiPrep 26/10 Desalting-Säule in Puffer F überführt. Anschließend wurde das Protein auf 20 mg/ml aufkonzentriert und für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

3.2.5.3 Proteinisolierung der β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease

Das partikelfreie Rohlysat wurde mit in Puffer A-voräquiliertem Ni-NTA Superflow-Material in einem Becherglas auf einem Magnetrührer bei 4 °C für 60 Minuten inkubiert und anschließend wie oben beschrieben in eine Säule überführt. Es wurde mit Puffer B gewaschen, bis sich eine stabile Absorptionslinie einstellte. Danach wurden die gebundenen Proteine über einen Imidazol-Gradienten über 5 Säulenvolumina mit Puffer C eluiert und fraktioniert gesammelt.

Die gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf ihre Homogenität geprüft, vereinigt und anschließend über eine HiPrep 26/10 Desalting-Säule in Puffer D überführt. Die entsalzte Probe wurde über einen Resource Q-Anionenaustauscher weiter aufgereinigt. Durch einen steigenden Salzgradienten wurden die gebundenen Proteine von der Säule verdrängt und fraktioniert gesammelt. Nach einer erneuten Prüfung per SDS-PAGE wurden die homogenen Fraktionen vereinigt und auf ein Volumen von 1.5 ml aufkonzentriert. Abschließend erfolgte eine Gelfiltration über eine Superdex 75 Säule. Nach Vereinigung der homogenen Fraktionen wurden diese auf 30 mg/ml aufkonzentriert und anschließend entweder in Aliquots bei -180 °C gelagert oder sofort für Kristallisationsansätze eingesetzt.

3.2.6 Proteinanalytische Methoden

3.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem (Laemmli et al., 1970) wurde zur Expressionskontrolle und Überprüfung einzelner Reinigungsstufen der Proteinisolation eingesetzt. Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Auftragspuffer gemischt. Bakteriensedimente wurden nach Zentrifugation direkt in Auftragspuffer aufgenommen und zur vollständigen Denaturierung für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Vor Auftrag auf das Gel wurden die festen Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA pro Gel in einer wassergekühlten Gelkammer. Als Molekulargewichtsstandard wurde der High Molecular Standard der Firma Biorad verwendet. Die Gele wurden entweder über Nacht in Färbelösung inkubiert oder für wenige Minuten mit Färbelösung in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt.

Auftragspuffer	3.3 ml H ₂ O bidest, 1.2 ml 0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 2 ml 87 % Glycerin, 2 ml 10 % SDS-Lösung, 1 ml 0.1 % Bromphenolblau
Biorad High Molecular Standard	20 µl Standard Konzentrat, 380 µl Auftragspuffer, 5 % Mercaptoethanol

5 % Mercaptoethanol wurden der benötigten Menge an Auftragspuffer immer frisch zugesetzt.

Der Marker wurde 5 Minuten bei 96 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Pro Gelspur wurden 5 µl Markerlösung verwendet.

Sammelgel	4.5 % Acrylamid, 0.1 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.06 % SDS, 20 µl 10 % APS, 5 µl TEMED
Trenngel	12.5 % Acrylamid, 0,4 % Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1 % SDS, 50 µl 10 % APS, 20 µl TEMED
Laufpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl pH 8.3, 1 % SDS
Färbelösung	40 ml 10 % (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 % H ₃ PO ₄ , 10 ml Methanol, 400 µl 5 % Coomassie G250 Lösung

3.2.6.2 Coomassie Färbung nach Neuhoff

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel 30 Minuten in einer 12 % TCA-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler inkubiert. Anschließend wurde die TCA-Lösung entfernt und das Gel 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Wassers wurde das Gel mit ca. 50 ml Färbelösung in einer luftdicht verschließbaren Schüssel für 2-6 h bei Raumtemperatur inkubiert (1 h bei 60 °C oder ca. 5 Minuten in der Mikrowelle), überschüssiges Coomassie wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser entfärbt (Neuhoff et al., 1988).

Die Gele wurden nach ausreichender Entfärbung des Hintergrunds zurechtgeschnitten und - zwischen zwei Lagen Cellophanfolie (Biorad) gespannt - für ca. 3 h in einer BIORAD-Geltrocknungsanlage getrocknet.

3.2.6.3 Proteinbestimmung mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten

Die konzentrierte Proteinlösung wurde in einer 100 µl Küvette in einer 1:20 oder 1:50 Verdünnung in dem entsprechenden Puffer mit einem Spektralphotometer vermessen. Dazu wurde ein Wellenlängenscan von 250 nm bis 350 nm durchgeführt, um gegebenenfalls vorhandene DNS-Verunreinigungen zu bemerken. Die vorhandene Proteinkonzentration errechnet sich gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

$$c[\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{A_{280}}{\epsilon \cdot d} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Molekulargewicht}$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; d = Schichtdicke der Küvette; Molekulargewicht in Da

Der molare Extinktionskoeffizient eines Proteins bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm kann nach folgender Formel oder durch Angabe der Proteinsequenz mit Hilfe des Programm-Moduls ExpASy-ProtParam tool (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/protparam.html>) abgeschätzt werden (Pace et al., 1995).

$$\epsilon(280) \left[\frac{1}{\text{M} \cdot \text{cm}} \right] = 5500 \cdot (\# \text{Trp}) + 1490 \cdot (\# \text{Tyr}) + 125 \cdot (\# \text{Cys})$$

3.2.6.4 Konzentrierung von Proteinen

Proteine wurden durch Ultrafiltration in Zentrifugenkonzentratoren der Firma Pall Filtron gemäß Gebrauchsanleitung bei 4 °C aufkonzentriert. Dabei wurden je nach Menge der Proteinlösung Jumbo-, Macro- oder Microsep Konzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa für die β -Propellerdomäne von TLP und 30 kDa beziehungsweise 100 kDa für die intakten Komplexe von TLP und TRI eingesetzt.

3.2.6.5 Peptidase-Aktivitätsmessung

Um die gleichen Bedingungen für alle Proben zu gewährleisten, wurde zunächst ein Reaktionsmix entsprechend der Probenanzahl gemischt und auf die vorgesehene Anzahl an Eppendorf Reaktionsgefäßen verteilt. Nach Zugabe der Probe wurde der Ansatz kurz gemischt und solange in ein Eis-Wasser-Gemisch gestellt, bis alle Ansätze fertig waren. Ein Eppendorf Reaktionsgefäß nur mit Reaktionsmix diente als Nullwert für die spontane Spaltung des Substrats.

Die Reaktion wurde mit der Inkubation der Proben in einem Wasserbad bei 60 °C für 30 Minuten gestartet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl 10 % SDS-Lösung. Um für die fluorometrische Messung ein ausreichendes Volumen zu erhalten, wurden noch 1000 µl 0.1 M Tris/HCl pH 9.0 dazu pipettiert.

Die Proben wurden an einem Fluorometer bei einer Absorptionswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen. Da es sich hierbei um eine relative Messung handelte, wurde zunächst das Fluorometer anhand der Messung der Referenzproben auf einen 100 % Wert geeicht. Anschließende Messungen wurden in Bezug auf den 100 % Wert angegeben.

Die Berechnung der Aktivität der einzelnen Proben ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Aktivität [nM x ml}^{-1} \text{ x h}^{-1}] = \frac{(\text{Meßwert} - \text{Nullwert})}{100\% \text{ Wert}_{\text{gemittelt}}} \times [\text{AMC-Standard}] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zeit}$$

Die spezifische Aktivität läßt sich mit Kenntnis der Proteinkonzentration ausrechnen.

100% Referenz	10 µl 0.2 mM AMC in DMSO, 90 µl 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 µl 10 % SDS-Lösung, 1000 µl 0.1 M Tris/HCl pH 9.0
Reaktionsansatz	10 µl 0.5 M Tris/HCl pH 8.0, 10 µl 1 mM H-AAF-AMC, 75 µl Milli Q, 5 µl Protein-Fraktion

3.3 Röntgenkristallographische Methoden

3.3.1 Proteinkristallisation

Eine wesentliche Grundbedingung für eine Röntgenstrukturanalyse ist das Vorhandensein von Proteinkristallen, die zunächst „gezüchtet“ werden müssen. Voraussetzung für die Kristallisation von Proteinen ist aber die Bildung stabiler Kristallisationskeime aus einer übersättigten Lösung. Üblicherweise erfolgt dies durch eine kontinuierliche Erhöhung der Protein- und Fällungsmittelkonzentration durch Diffusion innerhalb eines abgeschlossenen Systems.

Da die Bestimmung der Kristallisationsbedingungen für Proteine auf rein empirischen Methoden basiert, handelt es sich meist um eine zeitintensive und unter Umständen mühsame Prozedur, beispielsweise im Auffinden von geeigneten Pufferlösungen. Das bedeutet, daß die verschiedenen Einflußfaktoren, die das Kristallisationsverhalten und das anschließende Kristallwachstum beeinflussen, für eine erfolgreiche Kristallzucht vorab in Testreihen bestimmt werden müssen. Zu diesen bestimmenden Faktoren zählen beispielsweise die Temperatur, der pH Wert, die Pufferart, die Konzentration und die Art des Fällungsmittels, die Ionenstärke, sowie die Proteinkonzentration und die Reinheit des Proteins.

Zum Austesten einer größeren Zahl von Bedingungen wird das Prinzip des Sparse-Matrix-Screens angewandt (Jancarik et al., 1991; Cudney et al., 1994). Diese Screens basieren auf bereits bekannten Kristallisationsbedingungen und enthalten damit eine begrenzte Anzahl an freien Kristallisationsparametern für das Kristallwachstum. Die Auswertung von Sparse-Matrix-Screens gibt somit Hinweise auf das jeweilige Verhalten des Proteins unter den vordefinierten Bedingungen. Darauf aufbauende Rasterscreens ermöglichen dann eine weitere Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen um schließlich Einkristalle zu erhalten. Für eine weitere Optimierung der Bedingungen lassen sich auch verschiedene Kristallisationstechniken anwenden. Zu den gebräuchlichsten Techniken zählen: Hanging Drop, Sitting Drop, Kristallisation unter Öl, Mikrodialyse und die Kristallisation in einer Kapillare.

Die zur Dampfdiffusionstechnik gehörenden Verfahren der Hanging Drop beziehungsweise Sitting Drop Technik sind anhand einer schematischen Zeichnung in Abbildung 3.2 näher erläutert.

Einige μl der konzentrierten Proteinlösung werden mit dem gleichen Volumen Reservoirlösung vermischt. Durch die unterschiedlichen Partialdrücke des Wassers wird dem hängenden bzw. sitzendem Tropfen solange Wasser entzogen, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Tropfen und Reservoir eingestellt hat.

Dabei können unterschiedliche Effekte auftreten: Durch den Wasserentzug steigt sowohl die Proteinkonzentration wie auch die Fällungsmittelkonzentration (Salz, PEG, etc.). Die erhöhte Salzkonzentration kann die Löslichkeit des Proteins erhöhen oder erniedrigen (Einsalz- bzw. Aussalzeffekt). Schließlich kann die Erhöhung des Präzipitanz aber auch ein ungeordnetes Ausfällen des Proteins zur Folge haben. Idealerweise kommt es aber zur Keimbildung (Nukleation) und daraufhin zu geordnetem Kristallwachstum.

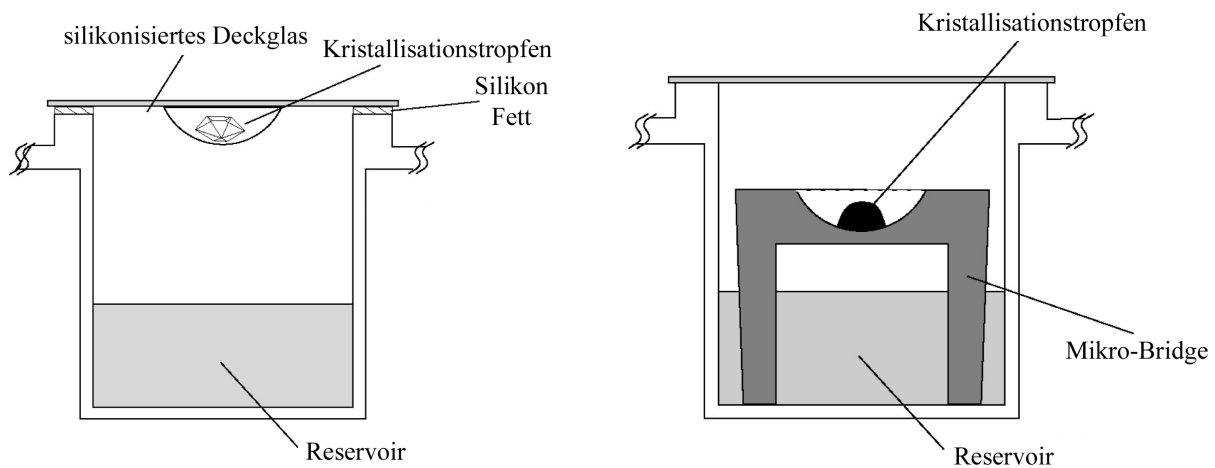


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Hanging- und Sitting-Drop Technik. In beiden Fällen ist eine Seitenansicht eines einzelnen Reservoirs einer VDX bzw. Linbro Platte der Firma Hampton Research dargestellt.

3.3.2 Datensammlung und Datenreduktion

Einkristalle werden mit Schleifen aus Kunstfasern (Hampton Research) aus den Kristallisationslösungen gefischt und in flüssigem Stickstoff anschließend schockgefroren. Um die Ausbildung von Wasserkristallen zu vermeiden muß zunächst geprüft werden, ob der Kristallisationspuffer für Messungen unter Cryo-Bedingungen geeignet ist. Hierfür wird eine Schleife mit dem Kristallisationspuffer benetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff oder im Cryostrahl schockgefroren.

Eine erste Röntgenstrahlenuntersuchung gibt Aufschluß, ob sich Eiskristalle in der Lösung gebildet haben. Dies läßt sich durch Pulverringe, die Eis anzeigen (3.66 \AA , 2.5 \AA , 1.9 \AA), im Beugungsbild leicht feststellen. Falls Vereisung beim Schockgefrieren eintritt, muß der Einkristall zunächst in eine andere,

geeignere Cryolösung überführt werden. In der Regel wird dies durch sukzessive Erhöhung der Konzentration von Glycerin, langkettigen Polyethylenglykolen oder Zuckern erreicht. Dabei sollten die Kristalle in dieser Cryolösung stabil sein und keinerlei morphologische Veränderungen aufweisen.

Der tiefgefrorene Einkristall wird auf einem Goniometerkopf im Röntgenstrahl zentriert und anschließend während der Belichtungszeit um einen bestimmten Drehwinkel von $0.5 - 2^\circ$ auf einer Drehanode (Rigaku RU-200, 50 kV, 80 mA) mit MAR345 Bildplatte (Image-plate, MAR Research) vermessen. Untersuchungen mittels Synchrotronstrahlung (DESY Hamburg, ESRF Grenoble, NSLS Brookhaven) ergaben Datensätze für eine hochaufgelöste Feinstrukturanalyse. Die Diffraktionsbilder werden dabei mit einer CCD Kamera detektiert. Um eine möglichst effiziente und optimale Nutzung der verfügbaren Synchrotronzeit zu gestatten, werden mehrere Einkristalle bereits an der Drehanode vorcharakterisiert und im tiefgefrorenem Zustand in einem Trockendewar (CP100) transportiert.

Die Bestimmung der Zellparameter und der Orientierung des Kristalls, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit dem Programm MOSFLM v6.1 (CCP4, 1994). Um einen optimalen und möglichst vollständigen Datensatz zu sammeln (hohe Redundanz, Friedel-Paare in engem zeitlichen Abstand gemessen), wurde die Option STRATEGY nach der Indizierung und Abschätzung der Mosaizität durchgeführt. Die Datenreduktion und Skalierung wurde mit dem Programm SCALA und TRUNCATE (CCP4, 1994) durchgeführt. Zur Beurteilung der Qualität eines Datensatzes wurde durch Vergleich symmetrieäquivalenter Reflexe der sogenannte R_{sym} -Wert (reliability index) berechnet.

3.3.3 Phasierung

Proteinstrukturen können mit verschiedenen Methoden gelöst werden. Bei kleinen Proteinen (ca. 1500 Atome) und atomarer Auflösung kann der Einsatz sogenannter direkter Methoden z.B. Shake & Bake (Weeks et al., 1999), arp/Warp (Perrakis et al., 1997; Perrakis et al., 1999), ACORN (CCP4, 1994) bereits mit einem nativen Datensatz zum Erfolg führen.

Da die meisten Proteine jedoch größer sind und meist auch die Reflexe höherer Ordnung nicht gemessen werden können, kann der Einsatz der direkten Methoden bei den meisten Proteinen nur zur Lösung sogenannter Substrukturen herangezogen werden. Als Substrukturen werden die Positionen von Schwermetallen bezeichnet, die zuvor entweder durch Inkubation des Kristalls in Kristallisationspuffer mit Schwermetall oder durch Bioinkorporation von beispielsweise Selen-substituiertem Methionin während des Zellwachstums in das Protein eingebaut wurden.

Die Technik des Einbaus von Selenomethionin ist von erheblichen Vorteil (Hendrickson et al., 1985, Hendrickson et al., 1989), da man nicht verschiedene Schwermetalle ausprobieren muß, um ein brauchbares isomorphes Derivat zu erhalten. Ein Selenatom reicht aus, um ca. 7-10 kDa Protein zu phasieren und seine geordnete Lage im Kristallgitter stellt einen weiteren Vorteil dar. Der Verlauf der Peptidkette kann in den meisten Fällen anhand der Position der Selenatome eindeutig identifiziert werden. Das Selenatom weist zudem eine weitere Eigenschaft auf, die für die Röntgenkristallographie von Bedeutung ist: Normalerweise sind die Intensitäten der zwei Reflexe $I(h,k,l)$ und $I(-h,-k,-l)$, die durch Inversionsymmetrie miteinander verknüpft sind und als Friedel-Paare bezeichnet werden, identisch (Friedelsches Gesetz). Die Intensitäten der Friedel-Paare können sich jedoch bei Anwesenheit bestimmter Schwermetallatome messbar unterscheiden. Liegt das Röntgenabsorptionsmaximum (K- oder L-Kante) des eingesetzten Metalls beispielsweise in der Nähe der verwendeten Wellenlänge, kommt es zur Mitwirkung der Elektronen aus inneren Schalen am Streuvorgang und so zur anomalen Dispersion durch eine Phasenverschiebung.

Die Phasierung mit der MAD-Methode (multiple anomalous dispersion) erfordert die Anwesenheit von einem oder mehreren anomal streuenden Atomen, deren Absorptionskanten bei zugänglichen Wellenlängen liegen ($\lambda=0.6 \text{ \AA} - 2 \text{ \AA}$) (Hendrickson et al., 1991). Die unterschiedlichen anomalen Beiträge bei verschiedenen Wellenlängen im Bereich der Absorptionskante führen zu Intensitätsunterschieden zwischen den einzelnen Datensätzen, die analog zur MIR-Methode für die Phasierung verwendet werden können. Für eine eindeutige Phasierung müssen mindestens zwei Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Ein erfolgreiches MAD-Experiment kann Phasen anhand eines Kristalls bis zur Auflösungsgrenze dieses Kristalls liefern, da man in der Regel keine Isomorphieprobleme während der Messung beobachtet.

Der isomorphe Ersatz (MIR - multiple isomorphous replacement) - eingeführt von Bragg und Perutz (Bragg et al., 1954; Green et al., 1954; Perutz, 1956) - beruht auf dem Einbau von Schwermetallen (z.B. Pt, Hg, Au, etc.) in das Kristallgitter. Isomorpher Ersatz bedingt, daß das Kristallgitter durch den Einbau von Schwermetallatomen nur geringfügige ($< 1 \%$) beziehungsweise keine Veränderungen verglichen mit dem ursprünglichen (nativen) Kristallgitter aufweist. In diesem Falle ist es notwendig einen nativen Datensatz (ohne Schwermetall) und mindestens zwei unterschiedliche Derivate zu vermessen um eine erfolgreiche Phasierung durchzuführen. Die Lage des Schwermetallatoms kann dabei entweder über Patterson-Techniken oder, wie oben beschrieben mit direkten Methoden gelöst werden.

Eine weitere Methode zur Phasierung stellt der molekulare Ersatz dar. Hierbei werden bekannte sequenzhomologe Strukturen verwendet, um die unbekannt Struktur zu phasieren. Dies erfordert die korrekte Platzierung der bekannten Struktur in der Elementarzelle der unbekannt Struktur. Etablierte Programme wie AMORE (CCP4, 1994) oder MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) werden für diese Technik eingesetzt.

Ein Spezialfall des molekularen Ersatzes stellt die Phasierung mit einem niedrig aufgelösten, elektronenmikroskopischen Modell dar. In diesem Fall muß zunächst diese Modell für den weiteren Einsatz in röntgenkristallographischen Programmen dahingehend modifiziert werden, daß das Modell nur positive Dichte enthält. Nach erfolgreicher Lösung der Kristallpackung kann die atomare Struktur durch anschließende Phasenextension durch nichtkristallographische Mittelung (non crystallographic averaging) zu höherer Auflösung gelöst werden.

3.3.4 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die aus der Phasierung bestimmte Elektronendichte kann durch Dichtemodifikation wie z.B. *Solvent Flattening* oder nichtkristallographische Mittelung der Proteindichte, optimiert werden. Anschließend wird anhand der Proteinsequenz ein möglichst vollständiges Strukturmodell in die Dichte eingepaßt. Bei hoher Auflösung und definierten Startphasen kann dies auf automatisierter Weise mittels Computerprogrammen teilweise oder vollständig erfolgen arp/Warp (Perrakis et al., 1997; Perrakis et al., 1999), X-AUTOFIT (Quanta, 2002), MAIN (Turk, 1996), MAID (Levitt, 2001). Bei der Strukturverfeinerung werden stereochemische Randbedingungen, z.B. Bindungslängen, Torsionswinkel, häufige Rotamere etc., berücksichtigt, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen gemessenem Experiment und Strukturmodell zu erhalten. Dieser Prozess verläuft zyklisch, bis keine Verbesserung des Modells mehr möglich ist. Zur qualitativen Beurteilung des optimierten Strukturmodells werden mehrere statistische Faktoren einbezogen, wie z.B. R_{Free} .

3.3.4.1 Tricorn-Protease

Der Versuch, die Struktur ausschließlich über Phasenextension aus den niedrig aufgelösten elektronenmikroskopischen Phasen zu erhalten konnte leider nicht erfolgreich mit einem Strukturmodell abgeschlossen werden. Es wurden jedoch zahlreiche Erkenntnisse aus dieser Kristallform gewonnen, die anhand der klassisch gelösten Struktur der Tricorn-Protease (Brandstetter et al., 2001) ohne Einschränkungen bestätigt wurden.

Trotz einer Vielzahl isomorpher Schwermetalldatensätzen konnte kein Derivat identifiziert werden. Somit war eine Phasierung über den Isomorphen Ersatz nicht möglich. Durch Kenntnis der dreidimensionalen, niedrig aufgelösten elektronenmikroskopischen Hexamer-Struktur der Tricorn-Protease war es aber möglich, ein Packungsmodell für die vorhandene Kristallform abzuleiten und eine *ab initio* Mittelung, ausschließlich bestimmt durch die Abgrenzung zwischen Solvent und Protein, mit hoher Auflösung durchzuführen.

3.3.4.2 β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease

Schweratompositionen wurden automatisch durch Pattersontechniken mit dem Programm SOLVE (Terwilliger et al., 1999) gefunden. Die Verfeinerung der Positionen und Besetzungsgrade erfolgte mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994). Nach einer Dichtemodifikation und Optimierung der Phasen mit RESOLVE (Terwilliger, 1999) wurden erste atomare Strukturmodelle automatisch mit dem Programm MAID (Levitt, 2001) erstellt. Ausgehend von diesem unvollständigen ersten Strukturmodell wurden die fehlenden Aminosäuren durch Begutachtung der Elektronendichtekarten mit Hilfe des Programmes O (Jones et al., 1991) in Kombination mit dem Verfeinerungsprogramm CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) in einem zyklischen Verfahren manuell soweit wie möglich ergänzt.

3.3.4.3 Trilobed-Protease

Erste Versuche, die gesamte Trilobed-Protease zu kristallisieren, führten im Verlauf dieser Arbeit zu vielversprechenden Einkristallen. Eine erste röntgenkristallographische Charakterisierung der Kristalle war bislang jedoch nicht möglich.

Die Strukturlösung der gesamten Protease sollte entweder über einen molekularen Ersatz mit der β -Propellerdomäne der Protease, oder durch Derivatisierung mit den bereits für die TLP- β Propellerdomäne erfolgreich verwendeten Schwermetallatomen möglich sein.

3.4 Benutzte Programme zur Erstellung der Abbildungen

Da für die verschiedenen Abbildungen dieser Arbeit zahlreiche Programme verwendet wurden, sind diese der Übersicht halber mit dem Typ der Abbildung versehen und tabellarisch in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Die überwiegende Anzahl an Abbildungen wurde mit dem Programm DINO (Philippsen, 2002) erstellt und wird im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter zitiert. Abbildungen, die nicht mit DINO (Philippsen, 2002) erstellt wurden sind entsprechend gekennzeichnet.

Programm	Author	Art der Abbildung
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated	schematische Zeichnungen, Hintergrundverläufe
DINO 0.8.4-22	Philippsen, 2002	Modellstrukturen, Oberflächen, Elektronendichtekarten
GRASP 1.3.6	Nicholls et al., 1991	Elektrostatische Ladungsverteilungen
Kaleidagraph 3.0.4	Abelbeck Software, 1994	Graphen
MSMS 2.5.3	Sanner et al., 1996	Oberflächenberechnungen
O 7.0	Jones et al., 1991	Elektronendichtekarten
POV-Ray 3.5	Persistence of Vision Development Team, 2002	Rendern der DINO Abbildungen
RagTime 5.6.2	RagTime GmbH, 2001	Tabellen, Skizzen, Graphen
Rasmol 2.7.2	Sayle et al., 1995	Übersichtsdarstellungen

4. Ergebnisse

4.1 Tricorn-Protease

4.1.1 Rekombinante Expression und Proteinreinigung

Reinheit und Ausbeute an rekombinatem Tricorn konnte gegenüber vorherigen Reinigungsverfahren (Tamura et al., 1996; Bosch, 1998) um das Zehnfache auf ca. 10 mg pro Liter Medium weiter gesteigert werden. Die Hauptursache für die erhöhte Ausbeute lag in der Verwendung von *E.coli* Zellen mit Helfer-Plasmiden, die für tRNA's mit in *E.coli* seltenen Codons für Arginin, Isoleucin und Leucin kodieren. Die Expression und Reinigung des Proteins erfolgte wie im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschrieben (vgl. Punkt 3.2.5.1).

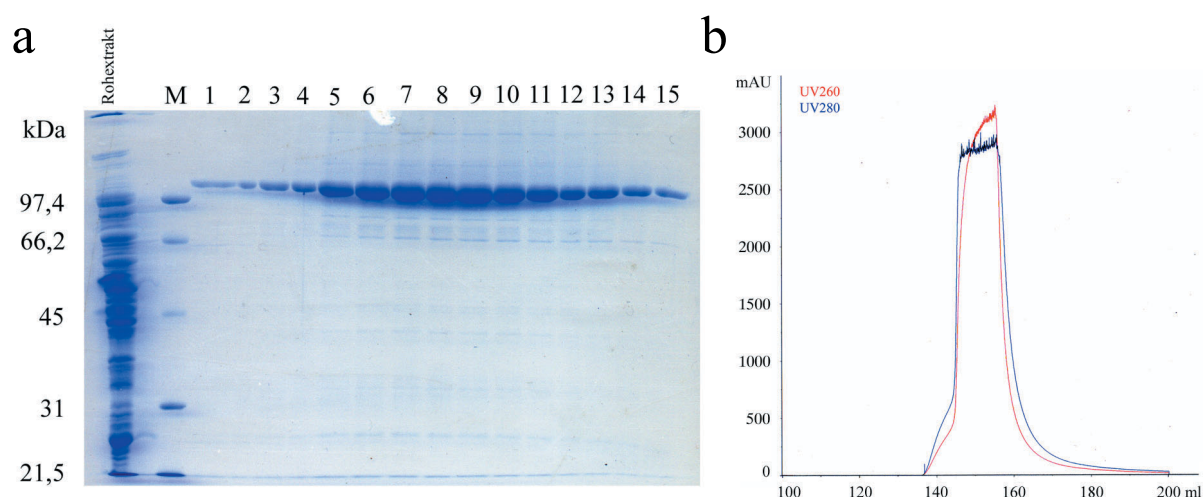


Abb. 4.1: a) 12.5 % SDS-PAGE Gel der Ni-NTA gereinigten Fraktionen mit dazugehörigem Chromatogramm (b). Nach Klären des Lysats wurde 1 μ l des Rohextrakts links neben der Marker Bande (M) aufgetragen, ansonsten wurden jeweils 3 μ l der gesammelten 1 ml Fraktionen (#1-15) mit der gleichen Menge Auftragspuffer versehen und auf das SDS-PAGE Gel mit einer Hamilton Spritze appliziert.

Die aktiven Fraktionen wurden nach Auswertung des SDS-PAGE Gels (vgl. Abbildung 4.1) vereinigt und gegebenenfalls auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit Jumbosept oder Macrosept Konzentratoren (Ausschlußgröße 30 kDa) aufkonzentriert, um anschließend durch Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt zu werden.

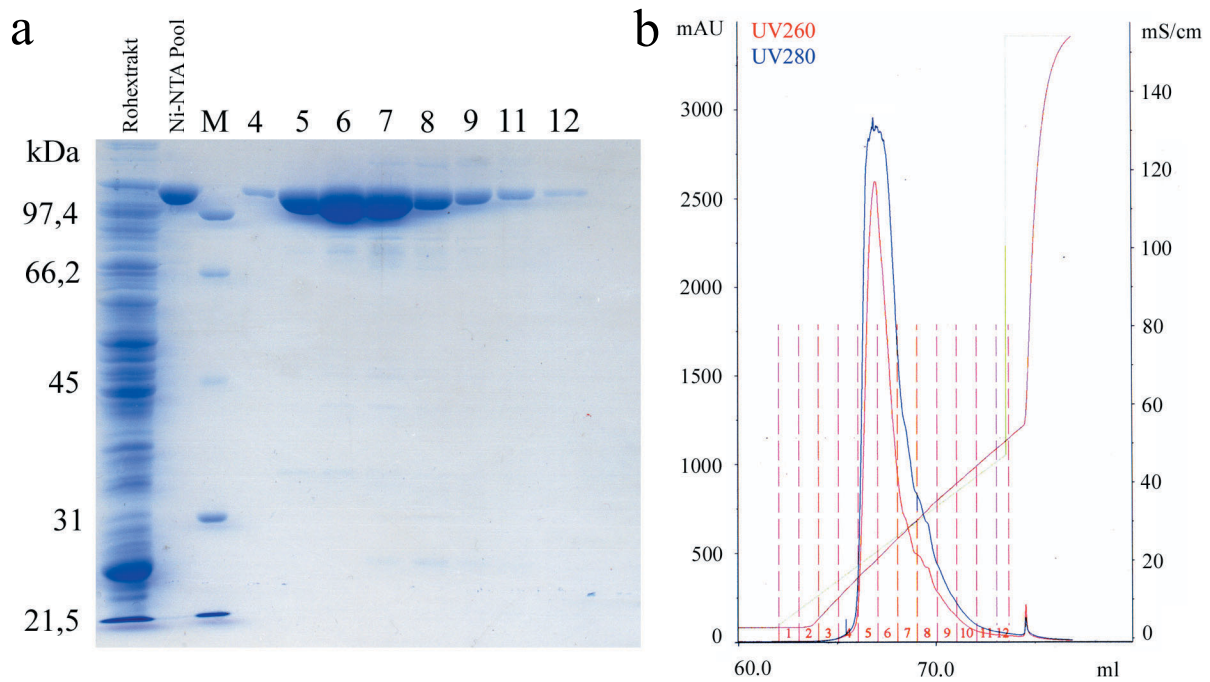


Abb. 4.2: a) 12.5 % SDS-PAGE Gel nach Anionenaustauschchromatographie mit Chromatogramm (b). Um den Reinigungserfolg zu verdeutlichen wurde 1 μ l Rohextrakt und 1 μ l des Ni-NTA Pools neben die Marker Bande aufgetragen. Auf den weiteren Spuren des SDS-PAGE Gels ist jeweils 1 μ l der nach dem Anionenaustauscher gesammelten Fraktionen aufgetragen.

Im Chromatogramm in Abbildung 4.2 ist eine leichte "Schulter" ab Fraktion #8 zu erkennen. Je nach Qualität der Präparation konnte diese bei höherer Salzkonzentration eluierende Tricorn-Population bis zu 90% der Gesamtproteinmenge ausmachen. In diesem Fall war es nicht möglich, erfolgreiche Kristallisationsbedingungen zu finden. Die weiteren Reinigungsversuche wurden abgebrochen und mit einer frischen Kultivierung erneut gestartet.

Die aktiven Fraktionen wurden nach Vergleich mit der SDS-PAGE Analyse vereinigt und auf ein Endvolumen von 1.5 - 3 ml eingengt. Eine maximale Proteinkonzentration von ca. 30 mg/ml wurde dabei nicht überschritten, um bei der anschließenden Gelfiltration einen negativen Einfluss auf die Trennleistung zu vermeiden.

Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse der Gelfiltrationsreinigung der Tricorn-Protease. Durch die beim Aufkonzentrieren auftretende hohe Proteinkonzentration, kam es teilweise zur Ausbildung von Tricorn-Aggregaten, zum Teil auch in Capsid-Form, welche im Ausschlußvolumen der Säule (Fraktionen #1 - #6) von intakten Homohexameren getrennt werden konnten. Für die anschließenden Kristallisationsexperimente wurden die Fraktionen #8 - #40 vereinigt und auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml eingestellt.

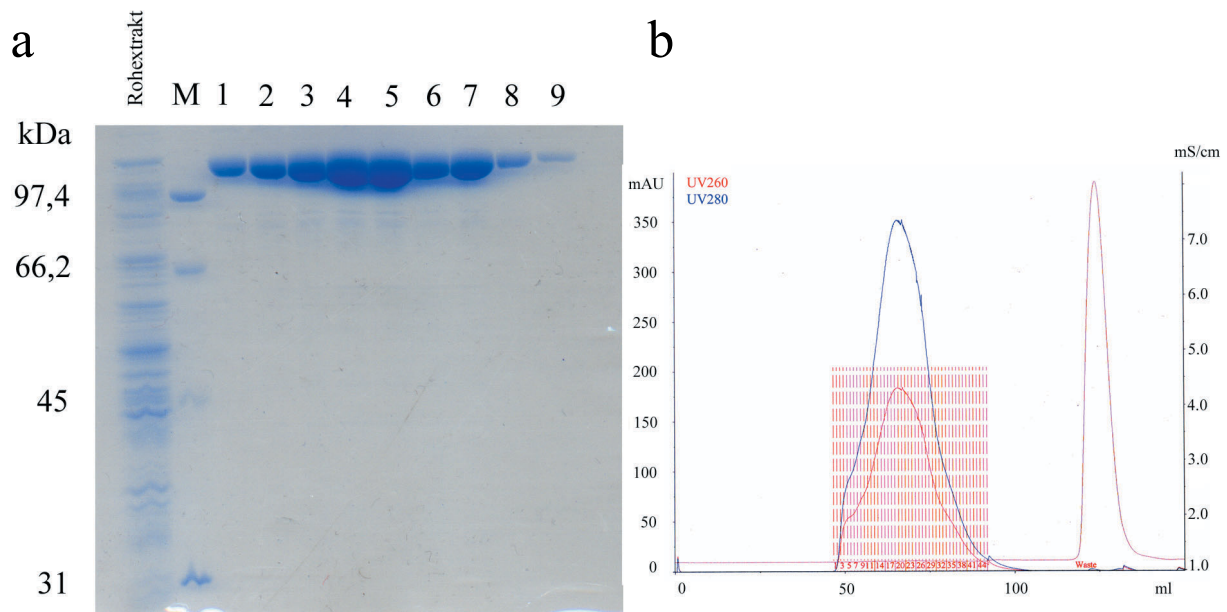
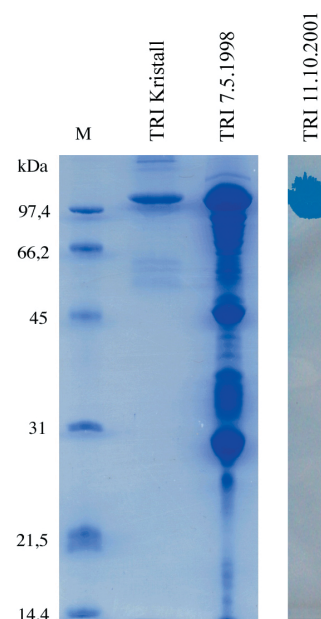


Abb. 4.3: a) 12.5 % SDS-PAGE Gel nach abschließender S-300 Sephacryl-Gelfiltration mit Chromatogramm (b). 1 μ l des Rohextrakts wurde neben die Markerspur aufgetragen. In Spur 1 bis 9 wurden jeweils 5 μ l von jeder dritten Fraktion beginnend mit Fraktion #8 aufgetragen.

Durch die beschriebene Reinigungsprozedur konnte die Homogenität der für die Kristallisations-experimente verwendeten Proteinlösung deutlich verbessert werden, wie der Vergleich mit einer früher eingesetzten Proteinlösung zeigt (Abbildung 4.4). Einzelne Tricorn-Kristalle wurden in Puffer resuspendiert und auf ihre H-AAF-AMC-Aktivität positiv getestet. Mittels SDS-PAGE Analyse wurde die Homogenität der Kristalle untersucht (Bosch, 1998). Wie aus Abbildung 4.4 ersichtlich, bestanden die Kristalle nahezu ausschließlich aus der Tricorn Proteinbande. Durch die erhöhte Ausbeute an homogenem Tricorn-Material konnten deutlich größere Tricorn Kristalle gezüchtet werden.

Abb. 4.4: 12.5 % SDS-PAGE Gel des zur Kristallisation eingesetzten Proteins (TRI 7.5.1998) und daraus hervorgegangene Kristalle (TRI Kristall). Einzelne Kristalle wurden aus der Kristallisationslösung entfernt und mit Reservoirlösung kurz gewaschen. Anschließend wurden die Kristalle in 20 mM Tris pH 8.0 aufgelöst und mit SDS-Auftragspuffer vermennt. Unter optimierten Expressionsbedingungen konnte die Homogenität der Aufreinigung deutlich gesteigert werden, wie anhand eines Vergleichs zwischen den Proteinbanden der Proben TRI 7.5.1998 und TRI 11.10.2001 im SDS-PAGE Gels zu erkennen ist.



4.1.2 Kristallisation und Datensammlung

Mit Hilfe der Sparse-Matrix-Screens „Crystal Screen“ und „Crystal Screen II“ konnte eine erste Kristallisationsbedingung mit Mikrokristallen gefunden werden. Die Optimierung dieser Bedingungen lieferte stabile Kristalle mit einer durchschnittlichen Größe von ca. $0.25 \times 0.25 \times 0.2 \text{ mm}^3$ (siehe Abbildung 4.5 b).

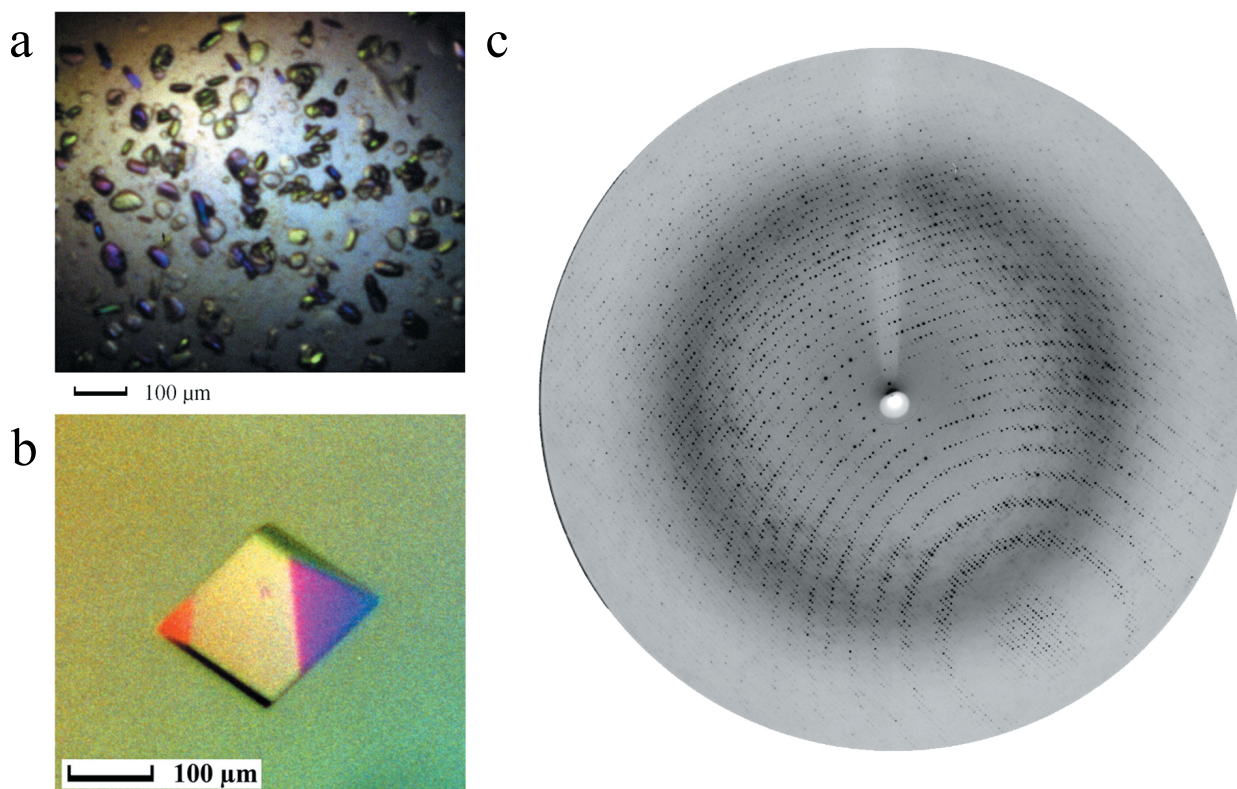


Abb. 4.5: a) Tricorn-Mikrokristalle aus Hampton Crystal Screen I Bedingung 23 (200 mM MgCl_2 , 100 mM HEPES pH 7.5, 30% PEG 400). b) Tricorn-Kristalle, die unter optimierten Kristallisationsbedingungen (200 mM MgCl_2 , 100 mM HEPES pH 6.0, 300 mM 1,6-Hexanediol, 10% Glycerin, 18% PEG 250 DME) erzeugt wurden. Beide Fotografien wurden unter polarisiertem Licht aufgenommen. c) Oszillationsaufnahme eines Tricorn-Kristalls aufgenommen am ESRF Grenoble ID09 ($\Delta\omega=0.25^\circ$, $t = 10 \text{ s}$).

Erste röntgenkristallographische Charakterisierungen erfolgten an einer Drehanode ($U = 50 \text{ kV}$, $I = 80 \text{ mA}$, CuK_α ; $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) bis zu einer maximalen Auflösung von 3.3 \AA . Der Tricorn Kristall wurde direkt aus der Kristallisationslösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend mit einer Cryozange auf die Drehanode aufgesetzt und bei 100 K vermessen. In einer kontinuierlichen Serie von Oszillationsaufnahmen (Drehwinkel $\Delta\omega = 1^\circ$, Belichtungszeit $t = 3600 \text{ s}$) wurden insgesamt 120° vermessen. Die Datenreduktion wurde mit dem Programm MOSFLM v6.1 (CCP4, 1994) durchgeführt. Aus diesem Datensatz ging hervor, daß es sich um eine monokline Symmetrie mit der Raumgruppe C2 und den Zellparametern $a=310 \text{ \AA}$, $b=164 \text{ \AA}$, $c=221 \text{ \AA}$, $\beta = 105.4^\circ$ handelte.

Um einen möglichst vollständigen Datensatz zu erhalten wurde zunächst die Orientierung des Kristalls anhand einer Einzelbelichtungsaufnahme und der STRATEGY-Option des Programms MOSFLM v6.1 (CCP4, 1994) analysiert. Die Datensammlung wurde dann wie von der STRATEGY-Routine vorgeschlagen begonnen. Um eine höhere Redundanz zu erhalten wurde über die für diese Raumgruppe geforderten 180° hinaus weiter gesammelt. Insgesamt wurden Daten über einen Drehwinkelbereich von 200° aufgenommen. Ein hochaufgelöster, vollständiger nativer Datensatz bis 2.2 Å wurde an der Beamline ID09 ($\lambda = 0.7535 \text{ \AA}$, Drehwinkel $\Delta\omega = 0.25^\circ$, Belichtungszeit $t = 10 \text{ s}$) des ESRF, Grenoble gemessen (vgl. Tabelle 4.1).

Datensammlung	Tricorn, nativ
X-ray Beamline, Wellenlänge	ID09, 0.7535 Å
Detektor	MAR CCD 130 mm
Raumgruppe	C2
Einheitszelle in Å	307.48, 163.15, 220.93, $\beta = 105.51^\circ$
Auflösung	44 – 2.2 Å
Anzahl gesammelter Reflexe	5957126
Anzahl einzigartiger Reflexe	525533
Mosaizität	0.29°
Wilson B-Faktor	34 Å ²
I/ σ (I)	5.9 (2.3)
R _{merge}	0.082 (0.247)
Vollständigkeit	99.1 (94.2)

Tab. 4.1 Statistik des hochaufgelösten nativen Tricorn-Datensatzes (ESRF, Grenoble ID09). Werte in Klammern entsprechen den statistischen Werten in der höchsten Auflösungsschale des Datensatzes von 2.32 – 2.20 Å.

Es wurden zudem noch verschiedene Schwermetallderivate und ein Selenomethioninderivat an verschiedenen Meßstationen gesammelt (Desy BW6, X31, BW7b, NSLS X25, X12b, X12c, ESRF ID14-1, ID14-3) siehe Tabelle der potentiellen Schwermetallderivate im Anhang 8.1.

Sofern es möglich war, wurden die Schwermetallderivate an den Absorptionskanten des jeweiligen Schwermetallatoms gemessen, um vorhandene anomale Signale zu maximieren. Da die meisten Derivate durch Einlegen in eine Mischung aus Schwermetalllösung und Kristallisationspuffer über Stunden bis Tage erfolgte, wurden die so „getränkten“ Kristalle für wenige Sekunden durch Kristallisationspuffer ohne Schwermetall gezogen. Schwermetallatome, die entweder unspezifisch gebunden waren oder sich in der umgebenden Lösung befanden, konnten dadurch größtenteils entfernt werden.

Durch die Aufnahme eines Röntgenfluoreszenzspektrums während der Belichtung mit Röntgenstrahlen läßt sich eine Aussage treffen, ob eventuell Schwermetallatome an das Protein gebunden sind oder nicht. Eine qualitative und quantitative Aussage über das Derivat läßt sich dabei jedoch nicht treffen, da die Bindungsstellen der Schwermetallatome auch ungeordnet sein könnten und damit nicht für eine Phasierung bei hoher Auflösung geeignet wären.

4.1.3 Auswertung der Daten und Herleitung eines Packungsmodells

Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) ergab einen Hinweis auf 6 oder 9 Moleküle in der asymmetrischen Einheit mit 66 % beziehungsweise 43 % Solvent-Gehalt. Aus der mit dem Programm MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) berechneten Selbstrotationsfunktion ist eindeutig die 32 Punktsymmetrie des Moleküls wieder zu erkennen, wodurch die Orientierung des Partikels in der asymmetrischen Einheit festgelegt ist (Bosch et al., 2001). Die dreizählige Achse des Partikels läuft dabei nahezu parallel mit der kristallographischen a-Achse (Abbildung 4.6 $\chi=180^\circ$), das Partikel ist um 2.62° zur b-Achse verkippt wie in Abbildung 4.6, $\chi=120^\circ$, zu erkennen ist.

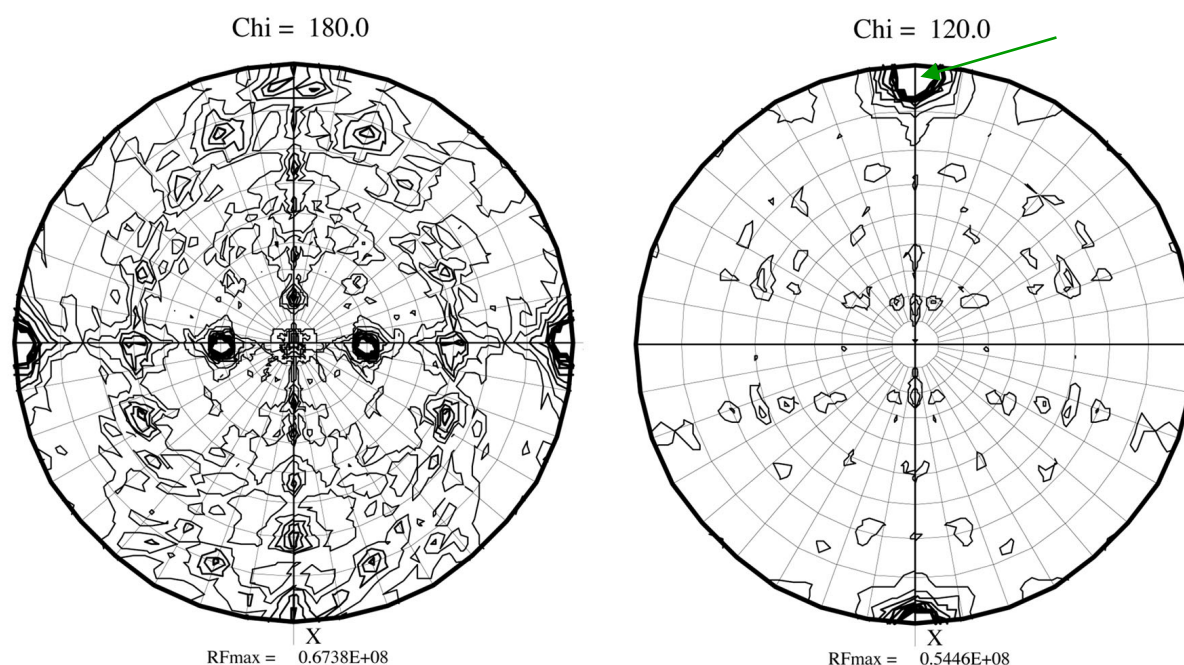


Abb. 4.6: Selbstrotationsfunktion des nativen Datensatzes gesammelt an der Beamline ID09 ESRF, Grenoble (benutzte Daten 40 – 2.5 Å). Der Konturierungslevel der Karten wurden automatisch durch das Programm MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) bestimmt. Deutlich zu erkennen ist die Verkipfung der dreizähligen Achse (grüner Pfeil).

Bei Berechnung einer nativen Pattersonmap (Abbildung 4.7 a) fällt ein hoher Peak bei $(\frac{1}{3} \ 0 \ \frac{1}{3})$ auf der $u0w$ -Sektion der Einheitszelle auf. Dieser sogenannte Pseudo-Ursprungspeak ist abhängig von der Auflösung, bis zu der die Pattersonmap berechnet wurde. Bei niedriger Auflösung entspricht seine Höhe 90% des Ursprungspeaks bei $(0 \ 0 \ 0)$, mit Zunahme der Auflösung nimmt die relative Höhe des Pseudo-Ursprungspeaks kontinuierlich ab (vgl. Abbildung 4.7 b).

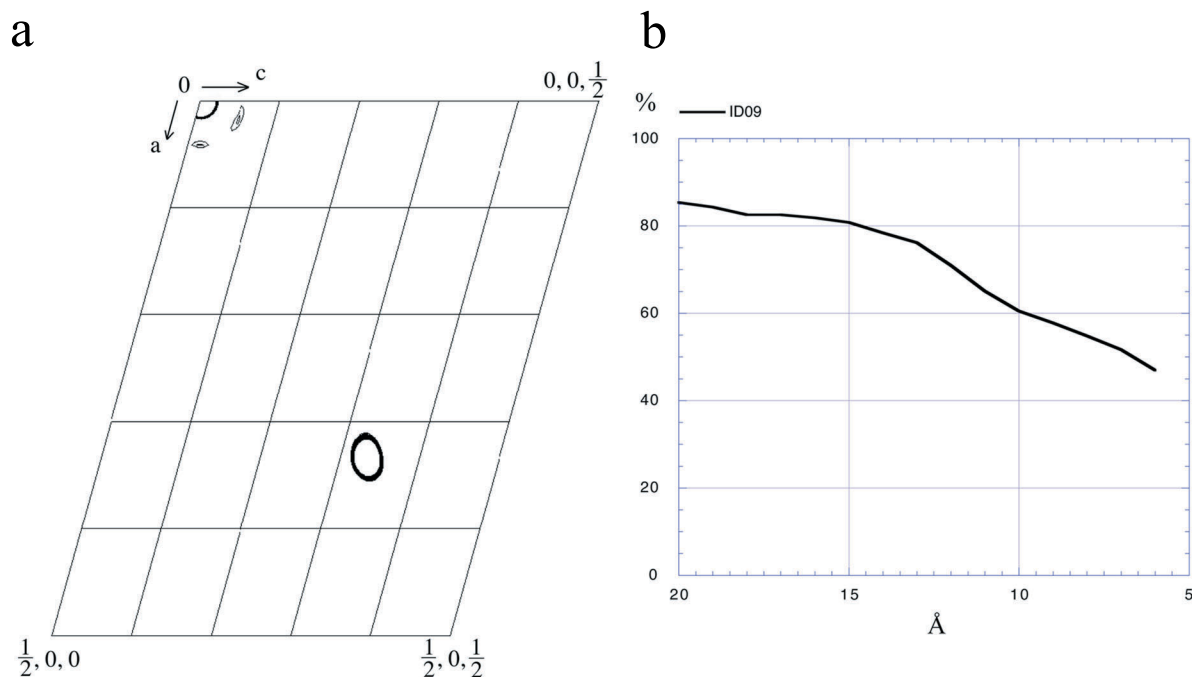


Abb. 4.7: a) Native Pattersonmap des ID09 Datensatzes mit einem Konturierungslevel von 5σ (nativer Datensatz benutzte Daten 40-15 Å). b) Zusammenhang zwischen Ursprungspeak und Pseudo-Ursprungspeak in Abhängigkeit der gewählten Auflösung.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Selbstrotationsfunktion ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Packungsmodelle. Die Kristallpackung besteht entweder nur aus einem Hexamer pro asymmetrischer Einheit, verschoben um ca. $(\frac{1}{3} \ 0 \ \frac{1}{3})$, oder aus $1 \frac{1}{2}$ Hexameren, wobei durch die kristallographische Symmetrie aus einem nahe des Ursprungs positionierten Trimer ein vollständiges Hexamer entsteht.

Beide Modelle sind allein durch die Pattersonmap nicht zu unterscheiden, auch ein erster Blick auf die Selbstrotationsfunktion läßt beide Modellstrukturen möglich erscheinen. Bei genauerer Untersuchung der relativen Höhe des Pseudo-Ursprungspeaks ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede, die die Möglichkeit eines Hexamer-Modells ausschließen (siehe Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9).

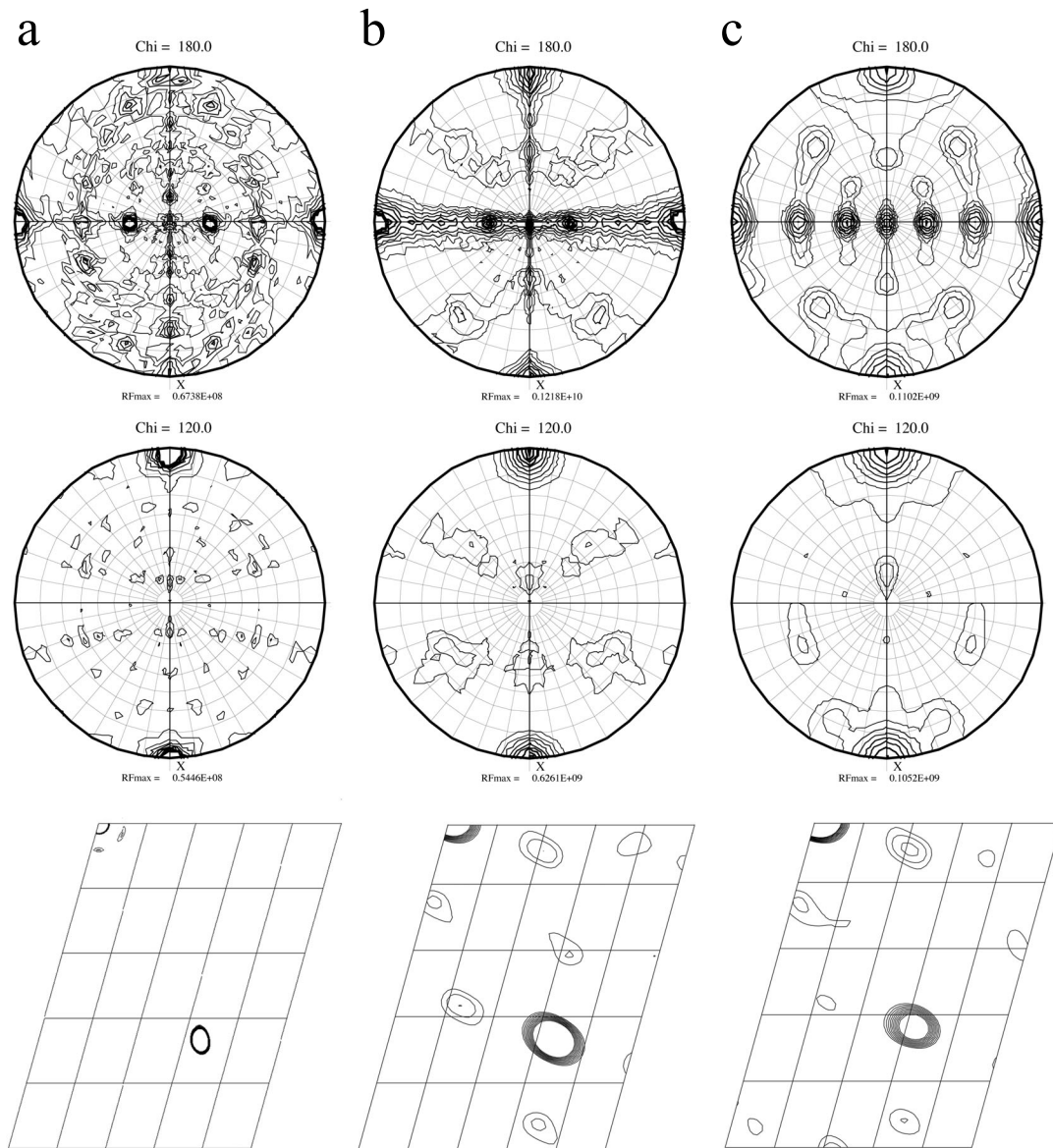


Abb. 4.8 Vergleich der Selbstrotationsfunktion und Pattersonmap der beiden Modelle zu den realen Daten. Die Pattersonmap der realen Daten wurde übersichtshalber mit 5σ beginnend konturiert, für die Modelle wurde ein 3σ -Konturierungslevel mit 1σ Konturierungsstufen verwendet. a) reale Daten. b) Modell mit 1.5 Hexameren pro asymmetrischer Einheit. c) Modell mit einem Hexamer pro asymmetrischer Einheit.

Aufgrund der 32 Symmetrie des Tricorn-Partikels läßt sich eine um 60° um die dreizählige Achse rotierte, äquivalente Lösung mit $1\frac{1}{2}$ Hexameren (Nonamer) nicht a priori ausschließen. Auch eine Kombination ist denkbar, das würde heißen Partikel T (von Trimer, im Ursprung gelegen) ist relativ zu Partikel H (von Hexamer, um ca. $\frac{1}{3}$ $0\frac{1}{3}$ verschoben) um 60° verdreht, womit sich die Anzahl der theoretisch möglichen Lösungen auf vier erhöht (Abbildung 4.9).

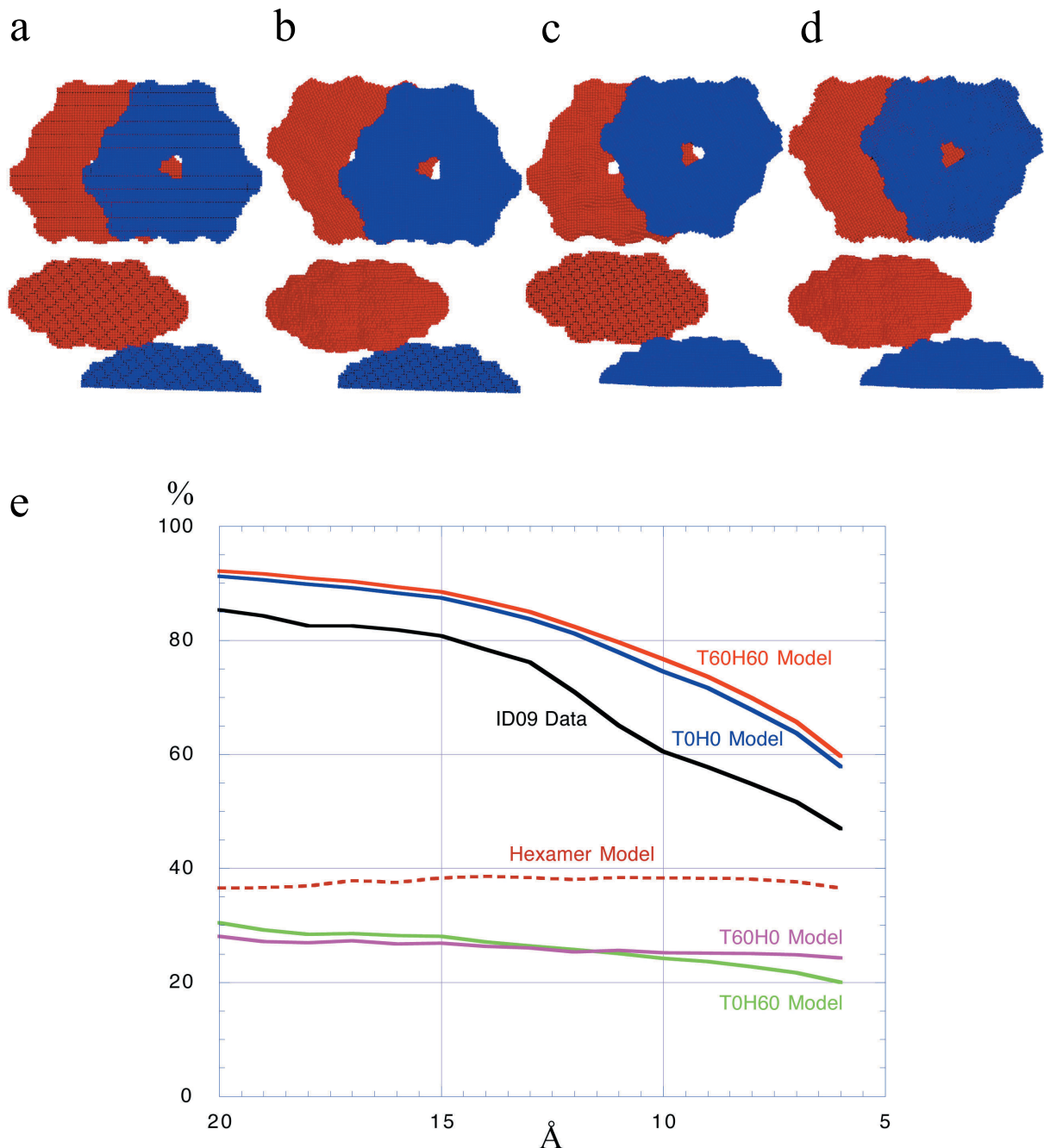


Abb. 4.9: Schematische Repräsentation der vier möglichen Modelle in der Aufsicht, entlang der dreizähligen Achse und in der Seitenansicht. Jeweils in blau dargestellt ist das in der Nähe des kristallographischen Ursprungs befindliche Trimer, in rot hingegen das um $(1/3 \ 0 \ 1/3)$ vom Ursprung verschobene Hexamer. a) T0H0 Modell. b) T0H60 Modell. c) T60H0 Modell. d) T60H60 Modell. e) Vergleich der Pseudo-Ursprungspeakhöhen der einzelnen Modelle zu den realen Daten von ID09 (schwarz dargestellt).

Eine weitere Diskriminierung zwischen dem T0H0- und dem T60H60-Modell ist mit diesen Methoden nicht möglich. Demzufolge wurden beide Lösungen zunächst als äquivalent betrachtet und mit ihnen weiter parallel verfahren, um gegebenenfalls mit einem weiteren Unterscheidungskriterium beide möglichen Kristallpackungen voneinander unterscheiden zu können.

4.1.4 NCS-Mittelung - Einstufung der Tricorn-Protease

Die molekulare Mittelung zwischen Untereinheiten stellt eine der effektivsten Dichtemodifikations-techniken in der Proteinkristallographie dar. Die zugrundeliegende Theorie ist weitestgehend bekannt, und ihre Anwendung wurde in vielen Beispielen erfolgreich bestätigt. Vorausgesetzt wird dabei, daß chemisch identische Moleküle in physikalisch unabhängigen Umgebungen entweder innerhalb eines Kristalls oder innerhalb unterschiedlicher Kristallformen ihre Konformation beibehalten. Somit ist es möglich, durch Überlagerung der Elektronendichten der einzelnen Moleküle eine Verbesserung des Signal- zu-Rausch Verhältnisses zu erreichen und zwar um den Faktor \sqrt{N} , mit N der Anzahl der Kopien des Moleküls, zu erreichen (Kleywegt and Read, 1997). Das Signal-zu-Rausch Verhältnis wird dabei stark verbessert, so daß auch aus unvollständigen Datensätzen durch Einsetzen extrapolierter Reflexe Erfolge erzielt werden können. Ein besonders extremes Beispiel stellt die Strukturlösung der Glycerinaldehyd-phosphatdehydrogenase aus *Trypanosoma brucei* dar. Hier wurden durch Sechsfachmittelung 63 % der fehlenden Reflexe extrapoliert, die Startphasen wurden in diesem Falle jedoch über molekularen Ersatz mit einem homologen Protein erhalten (Vellieux et al., 1993). Eine kurze Übersicht gelöster Strukturen in Kombination mit NCS-Mittelung gibt Tabelle 4.2, auf die einzelnen Beispiele geht der folgende Text kurz ein.

Protein	kDa	Startphasen	NCS	Å	Jahr	Referenz
GAP-Dehydrogenase	212.4	MR	6	2.4	1993	Vellieux et al., 1993
ΦX174	~6200	CpMV 12 Å MR, EM	60	3.4	1992	McKenna et al., 1992 Rossmann, 1995
50 S Ribosom Hefe	~1700	EM, Cluster			1996	Thygesen et al., 1996
BTV blue tongue virus	~4100	Cryo-EM, Pseudoatommodell	30	3.5	1997	Grimes et al., 1997
ClpP	301	EM, HA	7/14	2.3	1998	Wang et al., 1998
Hefe Polymerase II	555	Cluster		5	1999	Fu et al., 1999
70 S Ribosom	~2500	Cryo-EM/MR		7.8	1999	Cate et al., 1999
RDV rice dwarf virus	~6520	<i>ab initio</i> , Pseudoatommodell	15	20	1999	Naitow et al., 1999
50 S Ribosom <i>Haloarcula marismortui</i>	~1700	EM, HA, MR	MCA	2.4	2000	Ban et al., 2000
Tricorn-Protease	720	Cryo-EM/MR	3-9	2.2	2001	Bosch et al., 2001
Tricorn-Protease	720	Cluster	6	2.0	2001	Brandstetter et al., 2001
Poliovirus	~8500	<i>ab initio</i>	30	3	2001	Miller et al., 2001

Tabelle 4.2: Strukturen, die unter anderem durch den Einsatz von elektronenmikroskopischen Daten und NCS-Mittelung gelöst werden konnten. Die Einteilung erfolgte nach den Ausgangsbedingungen der Startphasen. MR - molecular replacement, Cluster - Schwermetallcluster, HA - Heavy Atom, EM - Elektronenmikroskopische Informationen, MCA - multi crystal averaging

Molekulare Mittelung ist keine neue Methode in der Kristallographie (Rossmann and Blow, 1962), sie wird jedoch in der Regel für hochsymmetrische Moleküle wie beispielsweise icosaedrischen Viren eingesetzt wie z.B. Φ X174 (McKenna et al., 1992; Rossmann, 1995; Miller et al., 2001), BTV blue-tongue virus, (Diprose et al., 1999; Grimes et al., 1997; Grimes et al., 1999), RDV rice-dwarf virus (Naitow et al., 1999). Eine aktuelle Übersicht über icosaedrische Viren gibt (Reddy et al., 2001) *Virus Particle Explorer - VIPER*, <http://mmts.scripps.edu/viper/>.

Die Polymerase II aus Hefe wurde ebenfalls durch eine Kombination von Elektronenmikroskopie, Röntgenkristallographie und mehreren Schwermetallclustern durch Phasenextension erfolgreich gelöst (Fu et al., 1999). Hierbei wurden die Schwermetallcluster zunächst als punktförmige Riesenatome in einer Orientierung behandelt, um Startphasen aus einem MAD-Experiment zu erhalten. Durch Modifikation der modellierten Schwermetallatome als sphärisches Modell mit einem gemeinsamen Schwerpunkt und den Atomen in verschiedenen Orientierungen konnten Phaseninformationen bis zu 5 Å erhalten werden. Eine genauere Übersicht über die Benutzung solcher Schwermetallcluster wird bei Thygesen et al. (1996) und Knablein et al. (1997) gegeben.

Für makromolekulare Komplexe, deren Einheiten sich meist nur geringfügig unterscheiden, wurde diese Technik bereits mit Erfolg in der Strukturbestimmung der ClpP-Protease aus *E.coli* angewandt (Wang et al., 1998). Hierbei wurde zunächst ein Zylinder - entsprechend der aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhaltenen Ausmaße - als Modell verwendet. Die Positionierung des Partikels in der Einheitszelle wurde durch die Lage der siebenzähligen Symmetrieachse eindeutig bestimmt. Eine 14-fach-Mittelung war erst nach anfänglicher Siebenfachmittelung möglich. Dadurch konnte die zweizählige Achse des Moleküls eindeutig bestimmt und eine Mittelung bis zur Auflösungsgrenze der gesammelten Daten durchgeführt werden.

Die Kombination von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Röntgenkristallographie führte auch im Fall der 50S und 70S Ribosomen-Struktur zum Erfolg (Thygesen et al., 1996; Ban et al., 2000; Cate et al., 1999; Cate and Doudna, 2000; Cate, 2001). Anhand cryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden Masken erstellt und diese in pseudoatomare Modelle im PDB Format umgewandelt. Dadurch vereinfachte sich die Handhabung der elektronenmikroskopischen Daten wesentlich. Die Strukturlösung konnte analog einem molekularen Ersatz mit dem pseudoatomaren Modell durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Umhüllende eines makromolekularen Komplexes zu erhalten, besteht in der Anwendung von Kleinwinkelstreuung, wobei hier die Informationen direkt aus der Proteinlösung gesammelt werden (Rees, 1990; Hao et al., 1999; Ockwell et al., 2000). Anschließend kann diese Hülle für einen molekularen Ersatz, beispielsweise mit MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) oder FSEARCH (Hao, 2001), eingesetzt werden.

Im Fall der Tricorn-Protease konnte aufgrund der Packungsanalyse (siehe Ergebnisse 4.1.3) eine Mittelung mit den abgeleiteten NCS-Operatoren durchgeführt werden (Bosch et al., 2001), obwohl durch die Translationsymmetrie keine echte neunfache Mittelung möglich war, da translationsverwandte Reflexe nicht unabhängig voneinander sind (Rossmann, 1995; Kleywegt, 1996; Kleywegt and Read, 1997; Rossmann et al., 2001).

Abbildung 4.10 zeigt die Zunahme des Signal-zu-Rausch Verhältnis in Abhängigkeit von der Anzahl der unabhängiger Kopien sowie den Bereich, in dem die Tricorn-Protease und die bereits erwähnten Beispiele einzuordnen sind.

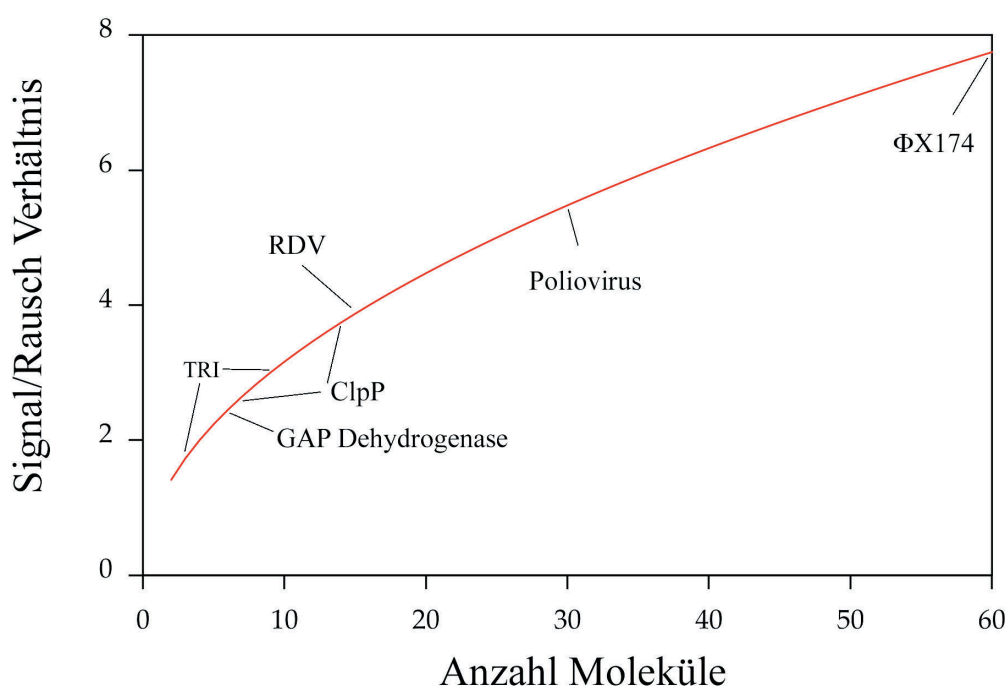


Abb. 4.10: Zunahme des Signal-zu-Rausch Verhältnis durch Mittelung in Abhängigkeit von der Anzahl der unabhängigen Kopien eines Moleküls pro asymmetrischer Einheit.

4.1.5 *Ab initio* Mittelung durch Phasenextension mit einer umhüllenden Maske

Aus cryo-elektronentomographischen Aufnahmen des Tricorn-Capsids (Walz et al., 1997; Walz et al., 1999) wurde durch 3D-Rekonstruktion und Mittelung eine Hexamer-Maske mit einer nominellen Auflösung von 13 Å generiert (siehe Abbildung 4.11 a-c). Aufgrund der Verwendung eines inkorrekten Vergrößerungsfaktors für die zur 3D-Rekonstruktion benutzten EM-Aufnahmen, mußte das Hexamer-Partikel zunächst isotrop um 8 % geschrumpft werden, bevor es als umhüllende Maske für die kristallographischen Daten eingesetzt werden konnte. Aus der geschrumpften Hexamer-Maske wurde gemäß der 32-Punktsymmetrie eine Monomer-Maske mittels eines einfachen Perl-Skripts erzeugt (siehe Abbildung 4.11 d). Die elektronenmikroskopischen Daten wurden mit dem EM program package (Hegerl, 1996) für den weiteren Einsatz in ein CCP4 Format umgewandelt.

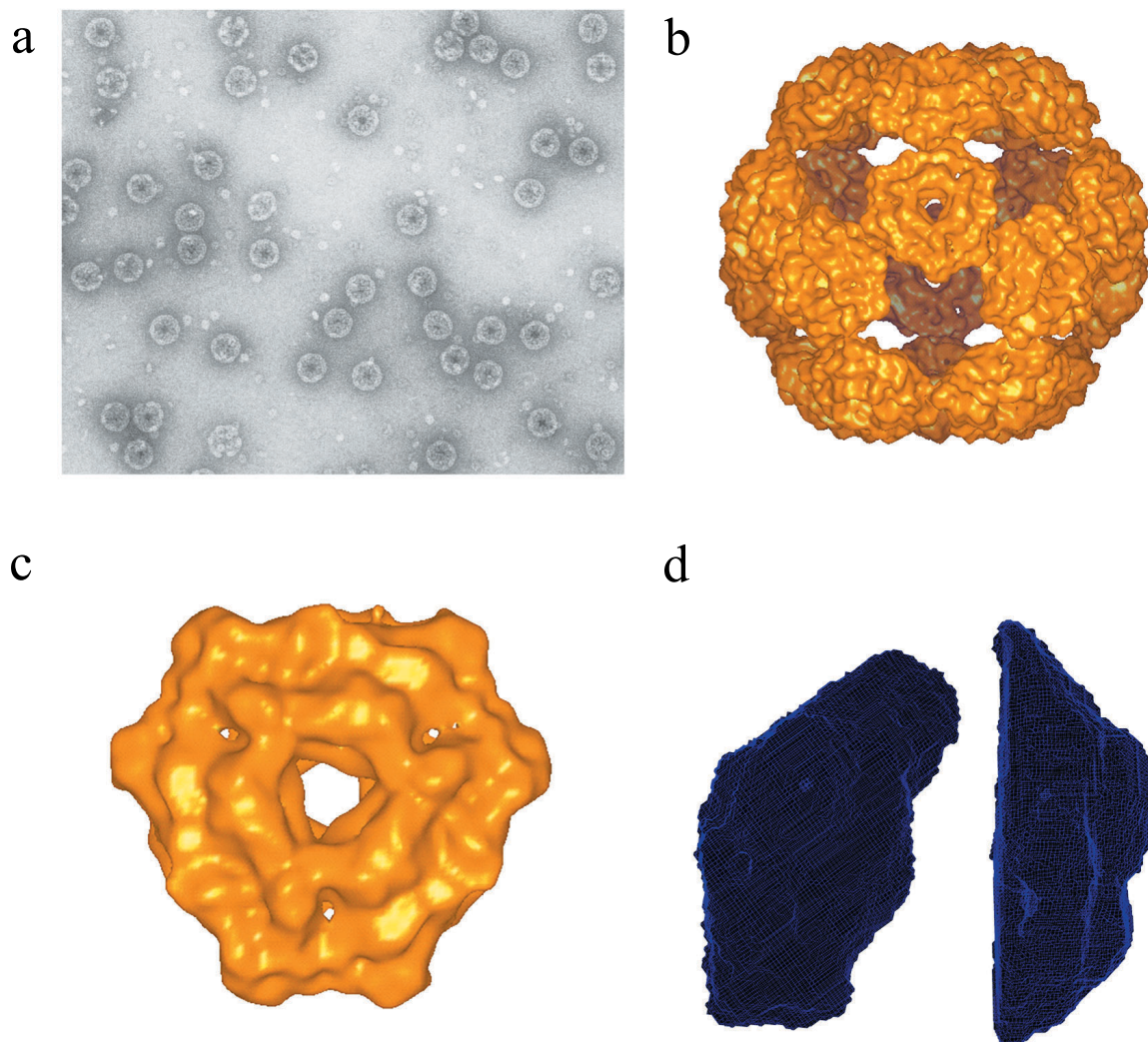


Abb. 4.11: a) Tricorn-Capsid EM Aufnahme. b) 3D-Rekonstruktion des Capsids. c) Ausgeschnittenes Hexamer aufgrund der icosahedrischen Symmetrie. d) Durch 32-Punktsymmetrie erzeugte Monomer-Maske in Aufsicht und Seitenansicht. Die so erzeugte Monomer-Maske wurde für *ab initio* Mittelung bei niedriger Auflösung als Startmaske zur Unterscheidung zwischen Protein und Solvens eingesetzt und kontinuierlich mit steigender Auflösung weiter verfeinert.

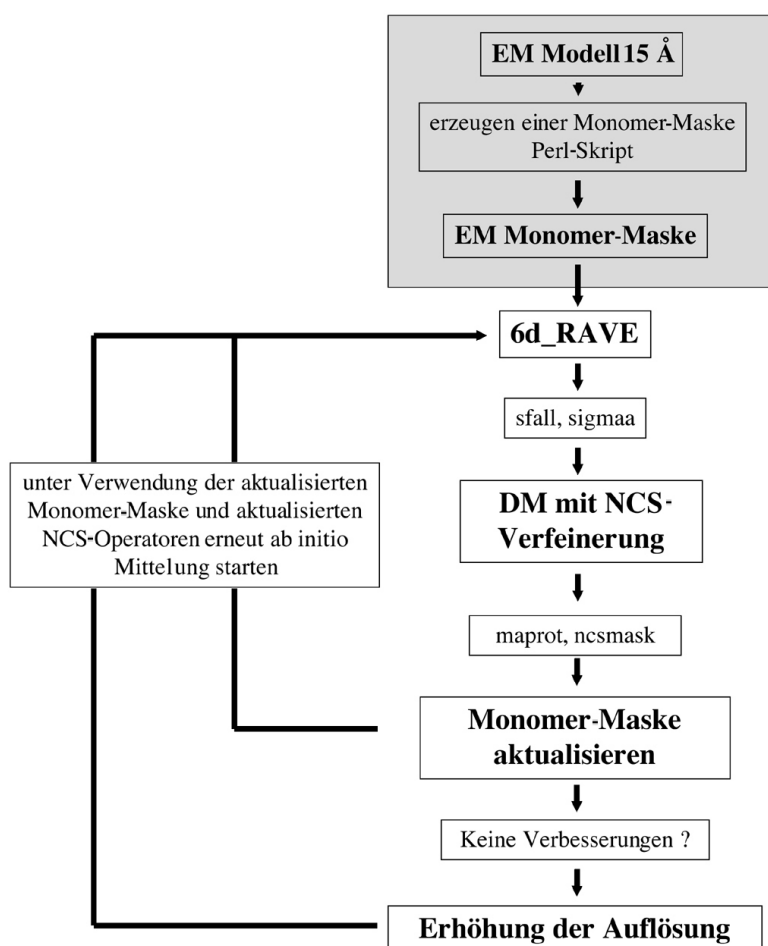


Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Mittelung und die dazu verwendeten Programme. Der grau schattierte Kasten repräsentiert die Ausgangsinformationen, die durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gewonnen wurden. Mit dem Programm 6d-RAVE (Kleywegt et al., 1992) wurden die bereits vorhandenen elektronenmikroskopischen Informationen in Form eines Maskenmodells mit den röntgenkristallographisch erhaltenen Daten vereinigt und eine nichtkristallographische Mittelung der Daten durchgeführt. Mit dem Programm DM (CCP4, 1994) wurden die Start NCS-Operatoren kontinuierlich mit Zunahme der hinzugefügten Reflexe höherer Ordnung verfeinert. Nach Aktualisierung der Monomer-Maske und der NCS-Operatoren wurde ein neuer Mittelungszyklus mit 6d-RAVE (Kleywegt et al., 1992) gestartet. Wenn es zu keiner signifikanten Verbesserung in Bezug auf die Korrelation zwischen gemessenem und berechneten Strukturfaktor bzw. einer Erhöhung der NCS-Korrelation kam, wurde ein neuer Mittelungszyklus unter Hinzunahme von weiteren Reflexen höherer Ordnung gestartet.

Abbildung 4.12 faßt die verfolgte Strategie für die *ab initio* Mittelung in einem Schema zusammen. Die NCS-Operatoren wurden aufgrund der 32 Punktsymmetrie und des Translationsvektors für die zwei möglichen Packungsmodelle errechnet und sukzessive mit steigender Auflösung verfeinert. Als Qualitätskriterium diente der R_{Faktor} und die Konnektivität der berechneten Elektronendichten. Zudem wurde die Korrelation zwischen elektronenmikroskopischer Dichte und gemittelter Dichte visuell auf Übereinstimmungen überprüft.

Mit Zunahme der Auflösung wurden mehr Details im Inneren des Hexamers sichtbar, die auch in der EM-Struktur bereits zu erkennen waren und nicht durch Einsatz der Monomer-Maske eingeführt wurden, so daß sich eine Lösung als richtig erwies.

Abbildung 4.13 zeigt den Verlauf der Mittelung anhand der R-Faktoren bzw. der Korrelationsstatistiken der beiden möglichen Packungsmodelle (T0H0, T60H60) in Abhängigkeit von der verwendeten Auflösung. Ebenfalls in diese Abbildung integriert ist die Anzahl der verwendeten Reflexe für die entsprechende Auflösungsgrenzen.

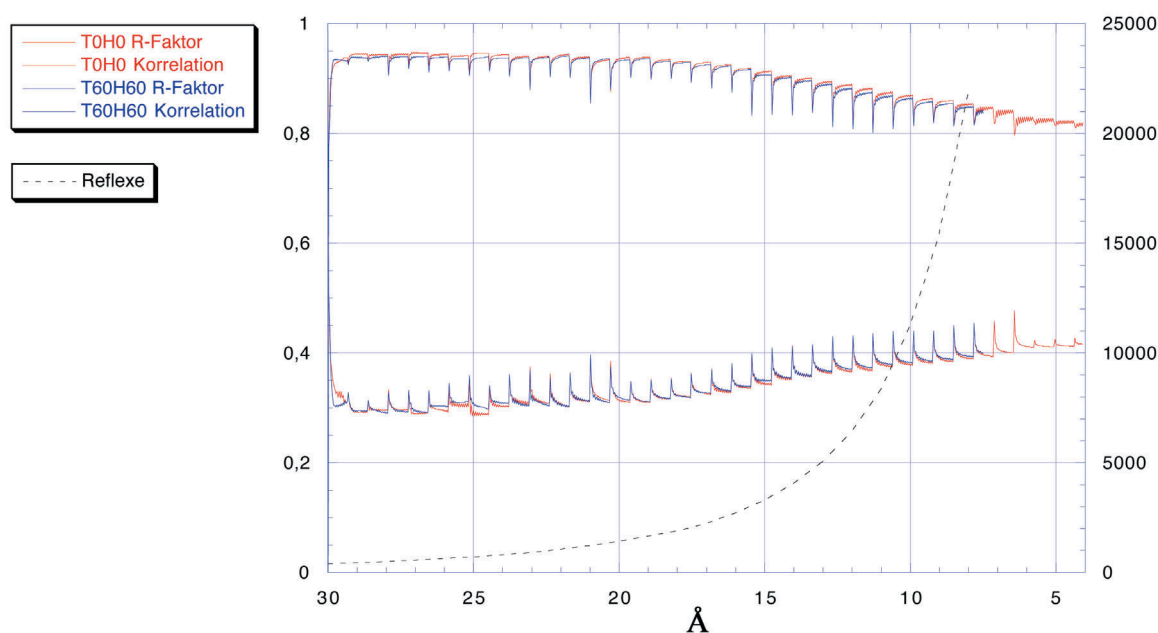


Abb. 4.13: Vergleich der R-Faktor und Korrelations-Statistiken der beiden möglichen Packungsmodelle T0H0 und T60H60 in Abhängigkeit von der Auflösung (in Å) nach *ab initio* Mittelung mit einer umhüllenden Monomer-Maske. Die Mittelung erfolgte zunächst in 1 Å Schritten mit einer Anfangsaufklärung von 45 - 30 Å in jeweils 10 Mittelungszyklen pro Auflösungsschale. Ab einer nominellen Auflösung von 10 Å erfolgte die Phasenextension in 0.5 Å Schritten, ebenfalls mit 10 Mittelungszyklen. Der exponentielle Anstieg der Anzahl der verwendeten Reflexe in Abhängigkeit von der Auflösung (in Å) ist ebenfalls dargestellt.

Der kurzfristig sprunghafte Anstieg des R-Faktors bei einem neuen Mittelungszyklus unter Einbeziehung noch nicht gemittelter Reflexe höherer Ordnung ist charakteristisch für dieses Verfahren. Jedem neu hinzugefügtem Reflex wird zunächst eine willkürliche Phase zugeordnet. Erst durch die anschließende Mittelung und Phasenextension stabilisiert sich die Phaseninformation in Abhängigkeit von der bereits vorhandenen Phaseninformationen der niederen Ortsfrequenzen für jeden hinzugefügten Reflex. Aus diesem Grunde ist es wichtig, eine möglichst genaue Kenntnis der Kristallpackung und kristallographische Daten bei niedrigen Ortsfrequenzen zu haben.

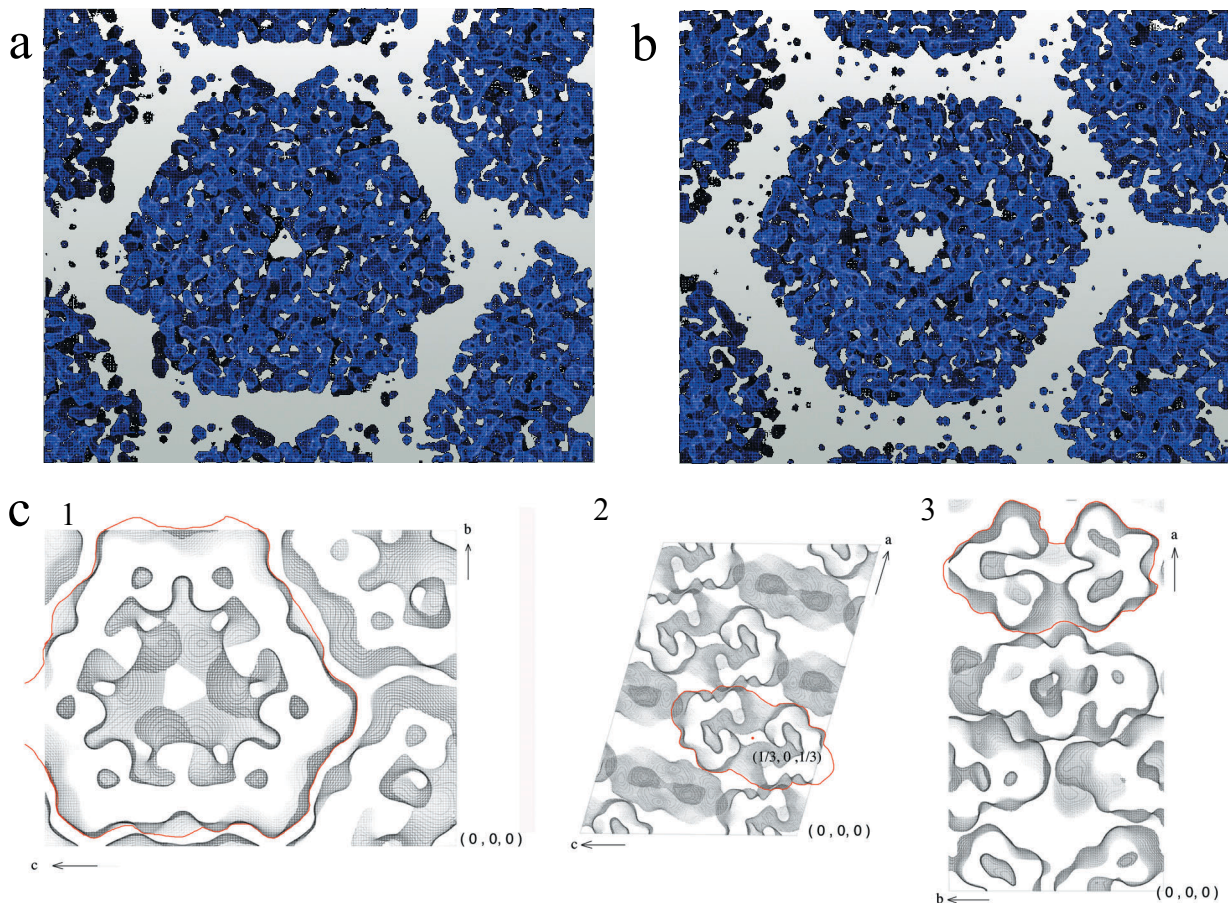


Abb. 4.14: a) Schnitt durch eine Elektronendichte Darstellung des T0H0 Modells bei einer nominellen Auflösung von 6 Å entlang der dreizähligen Symmetrieachse. b) Schnitt durch eine Elektronendichte Darstellung des T60H60 Modells bei einer nominellen Auflösung von 6 Å entlang der dreizähligen Symmetrieachse. Beide Elektronendichten wurden normiert und sind bei einem Konturierungslevel von 1.5σ dargestellt. c) Schematische Darstellung der Einheitszelle als Packungsmodell entlang der dreizähligen Symmetrieachse (1) und in Seitenansicht (2-3). Das Packungsmodell wurde durch Positionieren der elektronenmikroskopischen Dichte und unter Anwendung der C2 Symmetrie erstellt.

Eine Diskriminierung der beiden Packungsmodelle voneinander ist aufgrund der gezeigten Statistiken nicht möglich. Durch den direkten Vergleich der beiden Elektronendichten kann jedoch das T0H0 Modell aufgrund der etwas höheren Konnektivität favorisiert werden (Abbildungen 4.14 a+b). Abbildung 4.14 c zeigt zur Verdeutlichung den Aufbau einer Einheitszelle in verschiedenen Perspektiven.

Rot skizziert ist jeweils in den drei Ansichten ein Homohexamer der Tricorn-Protease. Anhand des Packungsmodells konnte der korrekte Vergrößerungsfehler der 3D EM-Rekonstruktion ermittelt werden, da eine nicht isotrop um 8 % geschrumpfte Dichte zu großflächigen Überlappungen der einzelnen Hexamere geführt hätte.

Da die Konnektivität der gemittelten Dichte nicht weiter verbessert werden konnte, wurde der Versuch unternommen, eine Multi-Domänen-Mittelung (MDA - multi domain averaging) durchzuführen. Unter Multi-Domänen-Mittelung versteht man die getrennte Mittelung des Trimers (nahe dem Ursprung) und des translatierten Hexamers ($1/3 \ 0 \ 1/3$) mit jeweils einer eigenen Maske. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, zumindest für das Trimer gute Resultate zu erhalten. Zum anderen kann die Ungenauigkeit des Translationsvektors, der ausschließlich über Pattersonmethoden bestimmt wurde, durch zyklische NCS-Optimierung des translatierten Hexamers minimiert werden.

Abbildung 4.15 zeigt einen statistischen Vergleich der bisherigen Neunfachmittelung und der Multi-Domänen-Mittelung in Abhängigkeit von der Auflösung. Ein deutlicher Unterschied wird vor allem im Verlauf des R-Faktors sichtbar. Bis zu einer nominellen Auflösung von 7.5 \AA ist kein wesentlicher Anstieg des R-Faktors zu erkennen, bei der Neunfachmittelung beträgt der Anstieg 10 %.

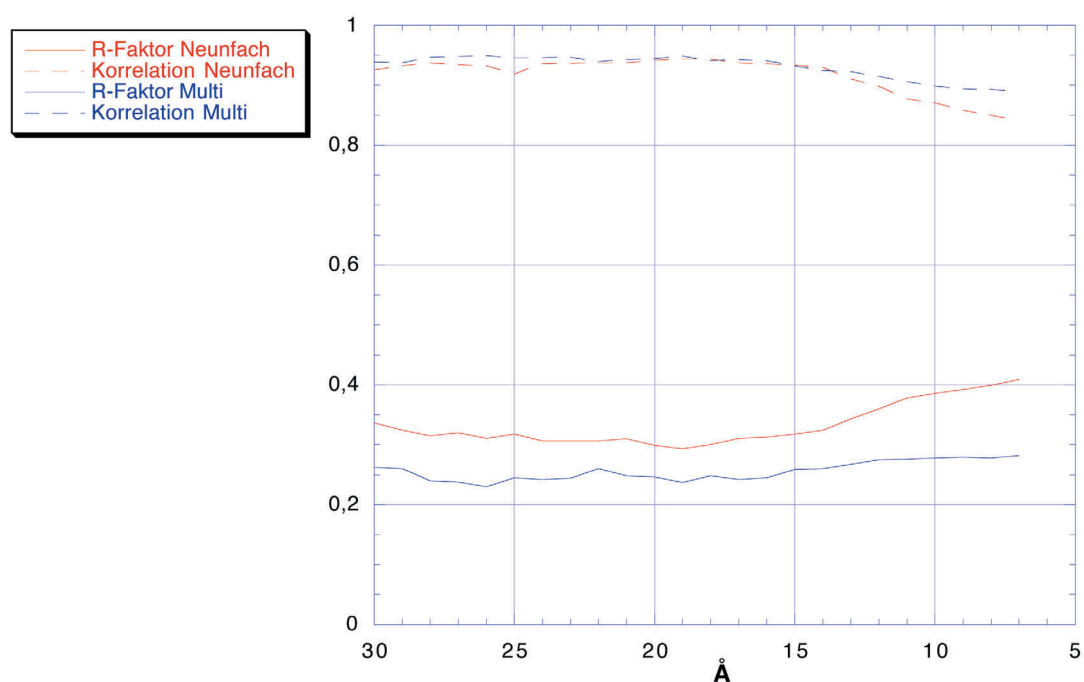


Abb. 4.15: Vergleich von Korrelation und R-Faktoren zwischen Neunfachmittelung und Multi-Domänen-Mittelung in Abhängigkeit von der Auflösung in \AA . Für die Multi-Domänen-Mittelung werden zwei Monomer-Masken benötigt, eine für das Trimer und eine für das translatierte Hexamer. Anschließend erfolgt die Mittelung dieser beiden Bereiche unabhängig voneinander. Aufgetragen wurde jeweils nur der letzte Mittelungszyklus pro Auflösungs-schritt, insgesamt erfolgte auch hier die Mittelung über 400 Einzelzyklen.

Um die Qualität der Elektronendichte besser beurteilen zu können, wurde anhand einer durch molekularen Ersatz (MR - engl. molecular replacement) erhaltenen Lösung mit den Koordinaten 1K32 (Brandstetter et al. 2001) ein Stück einer α -Helix (Asp855 - Gly877) exemplarisch in Abbildung 4.16 hervorgehoben.

Der Verlauf einer α -Helix ist bei geringen Phasenfehlern bereits in Elektronendichten mit einer nominellen Auflösung von ca. 6 Å erkennbar. Die Abbildungen 4.16 a-c zeigen die Elektronendichten nach neunfacher *ab initio* Mittelung. Wie aus der Abbildung 4.16 b ersichtlich ist, kann die C_{α} -Hauptkette in der 8 Å Darstellung der Elektronendichte nach Neunfachmittelung weitgehend nachvollzogen werden. Allerdings ist eine Zuordnung der Seitenketten auch bei höherer Auflösung von 5 Å noch nicht möglich.

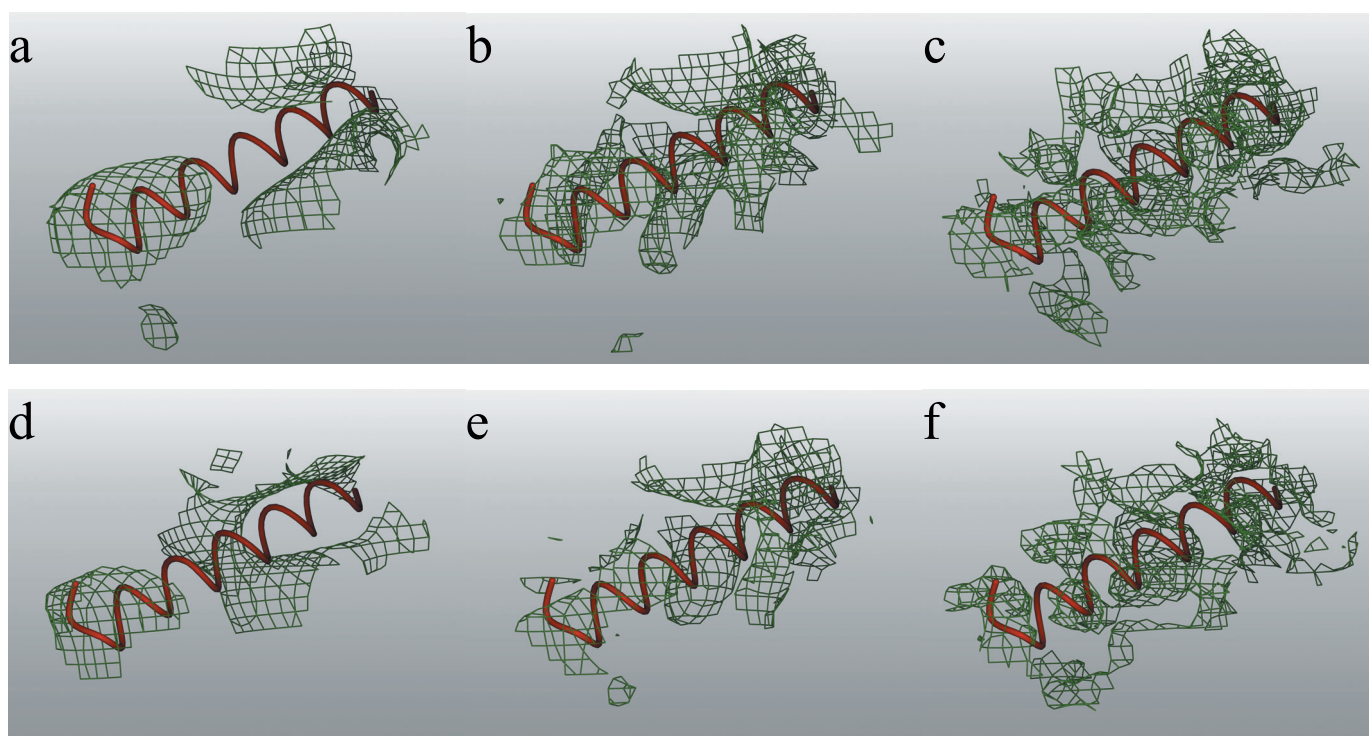
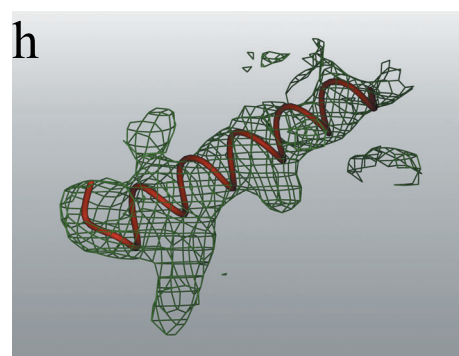
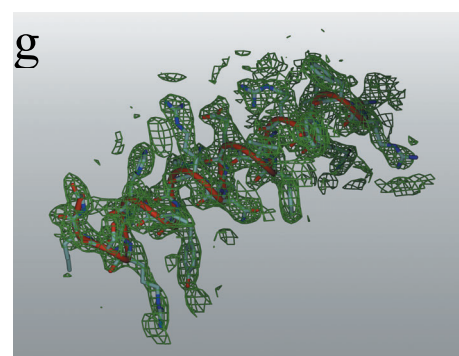


Abb. 4.16: Gegenüberstellung einer α -helikalen Region bei unterschiedlichen Auflösungen nach *ab initio* Neunfachmittelung (a-c) bzw. Multi-Domänen Mittelung (d-f) im Vergleich zur MR-Lösung (g+h). In Rot ist der α -helikale Bereich von Asp855 bis Gly877 hervorgehoben. Die Elektronendichte ab 1σ im Radius von 6 Å um die C_{α} -Hauptkette ist in den Bildern a bis h in grün als Gittermodell dargestellt.

a) 12 Å Elektronendichte nach Neunfachmittelung. b) 8 Å Elektronendichte nach Neunfachmittelung. c) 5 Å Elektronendichte nach Neunfachmittelung. d) 12 Å Elektronendichte der MDA. e) 8 Å Elektronendichte der MDA. Hier ist bereits der Verlauf der C_{α} -Hauptkette erkennbar. f) 5 Å Elektronendichte der MDA. Die C_{α} -Hauptkette ist noch weitgehend erkennbar, eine Zuordnung der Seitenketten ist jedoch nicht möglich. g) 2.2 Å Elektronendichte der MR-Lösung, die Elektronendichten der Seitenketten sind gut definiert h) 6 Å Elektronendichte der MR-Lösung. Aufgrund des geringeren Phasenfehlers ist selbst bei einer nominellen Auflösung von 6 Å der Hauptkettenverlauf gut zu erkennen.



Die Abbildungen 4.16 d-f zeigen die Elektronendichten nach Multi-Domänen-Mittelung bei den gleichen nominellen Auflösung wie in Abbildung 4.16 a-c. Eine bessere Interpretierbarkeit der Elektronendichte im Vergleich zur Neunfachmittelung ist erkennbar. Jedoch ist auch hier keine Seitenkettenuordnung möglich. Die Elektronendichten in Abbildung 4.16 g+h wurden anhand der MR-Lösung bei 2.2 Å respektive 6 Å berechnet. Da im Falle einer MR-Lösung der Phasenfehler geringer ausfällt als bei der *ab initio* Mittelung, ist selbst bei 6 Å die Hauptkette der α -Helix deutlich zu erkennen.

Die folgende Abbildung 4.17 zeigt anhand der einzelnen Aminosäurereste eines Monomers, wie gut die Übereinstimmung zwischen den Koordinaten 1K32 und den gemessenen Daten in der Raumgruppe C2 ist. Die mittlere Korrelation zwischen den verwendeten Koordinaten und der berechneten Elektronendichte beträgt 0.927, der mittlere R-Faktor 0.072. Bis auf geringe Abweichungen der Seitenketten ist der Verlauf der C_{α} -Hauptkette nahezu identisch.

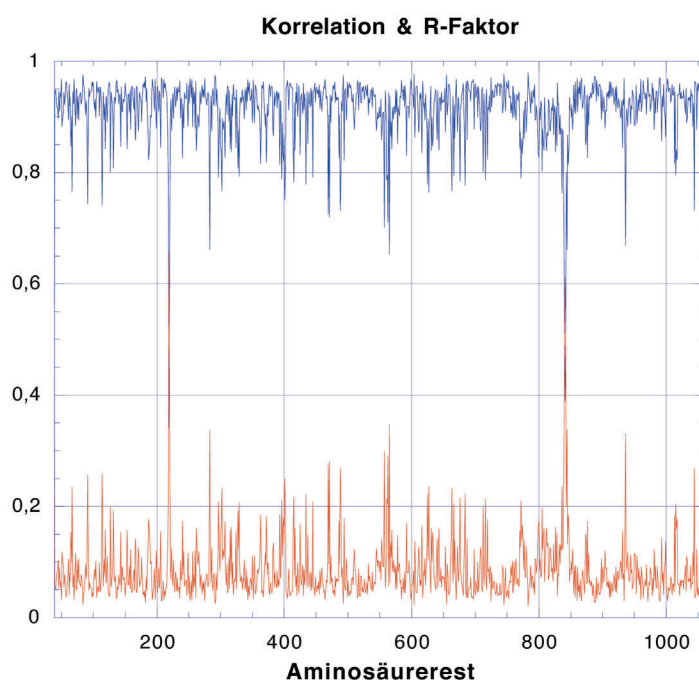


Abb. 4.17: Korrelation und R-Faktor der einzelnen Aminosäurereste (39-1061) der MR-Lösung mit 1K32 zur Elektronendichte der Tricorn-Kristalle in Raumgruppe C2. Eine gute Übereinstimmung ist anhand des Graphen zu erkennen.

Die MR-Lösung bestätigt somit das T0H0 Packungsmodell und die 1 1/2 Hexamere in der asymmetrischen Einheit, mit einem gravierenden Unterschied - dem Translationsvektor des versetzten Hexamers.

Der Translationsvektor wurde aufgrund des Pseudo-Ursprungspeaks mit Hilfe des Programms MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) mit (0.339 0.000 0.339) bestimmt. Aus der MR-Lösung ging jedoch ein Translationsvektor von (0.331 0.000 0.331) hervor, dies entspricht einer Abweichung um 2.2 Å, 0 Å, 1.9 Å von der tatsächlichen Position.

Die verfeinerte Position des translatierten Hexamers nach Multi-Domänen-Mittelung betrug in fraktionellen Einheiten (0.3348 0.000 0.3324) bei einer nominellen Auflösung von 3 Å. Abbildung 4.18 zeigt, wie sich die Position des Hexamers in Abhängigkeit von der Auflösung verändert und zu einer Position konvergiert (schwarzer Kreis). Der grüne Kreis stellt die Position der durch molekularen Ersatz ermittelten Position des Hexamers dar. Ausgehend von den korrekten NCS-Operatoren wurde das Mittelungsprotokoll erneut zu Testzwecken gestartet. Bei einer nominellen Auflösung von 3 Å wird dabei eine zum molekularen Ersatz nahezu identische Position erreicht (blauer Kreis).

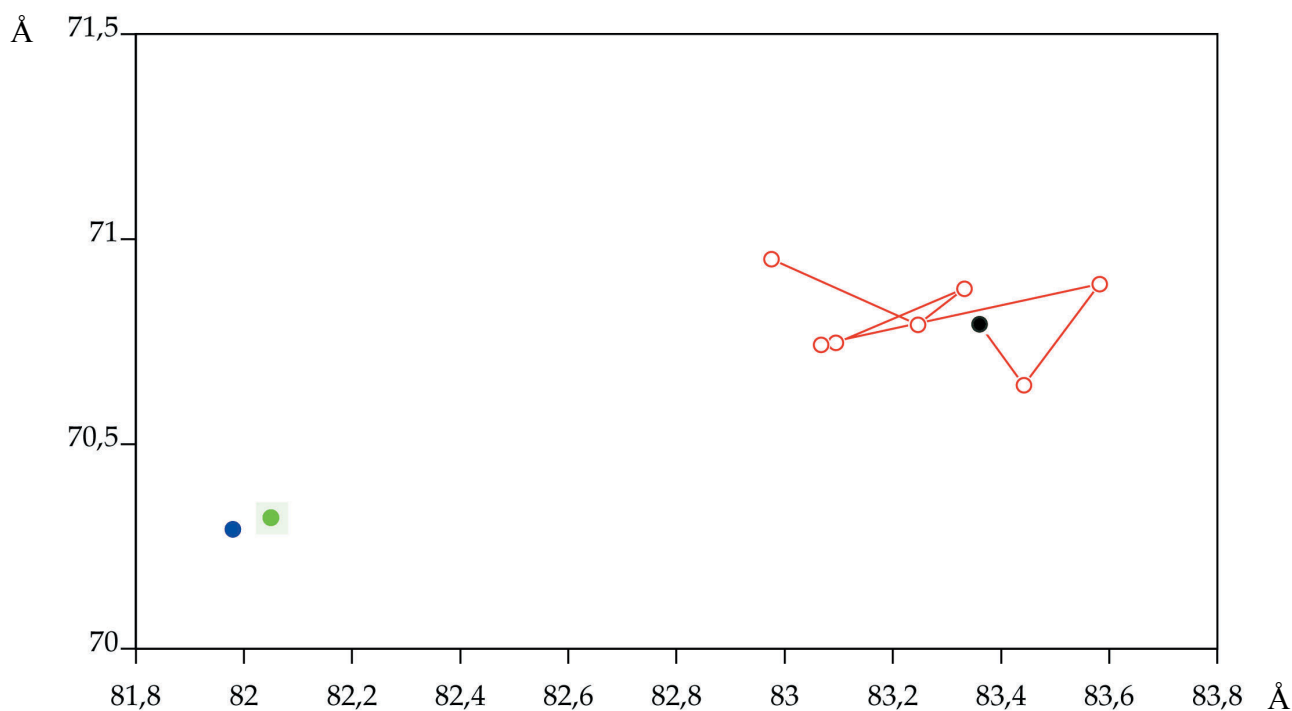


Abb. 4.18: Darstellung der absoluten Position (in Å) des translatierten Hexamers. In rot dargestellt und mit Strichen verbunden sind die einzelnen Positionen in Abhängigkeit von der verwendeten Auflösung (10 Å bis 3 Å). Der schwarze Kreis zeigt die Position des Hexamers nach der Mittelung bei einer Auflösung von 3 Å, der grüne Kreis die tatsächliche Position des Hexamers, bestimmt durch molekularen Ersatz. Blau repräsentiert die Position des Hexamers nach einer Testrechnung mit den korrekten NCS-Operatoren bei 3 Å.

4.1.6 NCS-Mittelung - Problematik Tricorn-Protease

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde die Maske eines Tricorn-Partikels aus elektronenmikroskopischen 3D-Rekonstruktionen erhalten (Walz et al., 1997; Walz et al., 1999). Eine Monomermaske wurde durch Anwendung der 32 Punktsymmetrie generiert, und um einen Vergrößerungsfehler zu kompensieren, isotrop um 8 % geschrumpft (Bosch et al., 2001). Die Kalibrierung der Vergrößerung elektronenmikroskopischer Aufnahmen ist, bezogen auf atomare Auflösung, nicht sehr verlässlich weil dabei Abweichungen von bis zu 5 % auftreten können (Rossmann et al., 2001).

Ein pseudoatomares Modell wurde entsprechend der erwarteten Menge an Atomen aus der Elektronendichte des Hexamers generiert und für den molekularen Ersatz eingesetzt. Zum damaligen Zeitpunkt waren diese Optionen für niedrig aufgelöste Modelle noch nicht in dem Programm MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) implementiert. FSEARCH (Hao, 2001) befand sich noch in der Entwicklung. Das Programmpaket CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) ist nicht in der Lage mit einem pseudoatomaren Modell zu arbeiten. Ein molekularer Ersatz mit diesem pseudoatomaren Modell konnte nicht zur Phasierung der Struktur verwendet werden.

Generell mußten die meisten Software-Pakete an die Dimensionen der Tricorn-Protease angepaßt werden, da diese in der Regel nicht für Strukturen mit ca. 100000 Atomen ausgerichtet waren. Auch eine Limitierung des Arbeitsspeichers von 1 Gigabyte führte im Falle der RAVE-Mittelung zu einer Beschränkung des verwendeten Gridintervalls auf 1 Å in allen Achsen für die Elektronendichtekarten. Empfohlen wird jedoch 1/3 bis 1/4 der maximalen Auflösung. Bei einer Auflösung von 2.2 Å entspräche dies einem Gridintervall von 0.7 - 0.5 Å bzw. einem Arbeitsspeicherbedarf von ca. 2.5 Gigabyte.

Die Datensammlung an ID09 führte zu einen hochredundanten Datensatz, der bis auf 75 Reflexe im Auflösungsbereich von 223 - 45 Å vollständig war, die Anzahl der einzigartigen Reflexe bis zu einer Auflösung von 2.2 Å betrug 525533. Abbildung 4.19 zeigt die Vollständigkeit des Datensatzes in Bezug auf die Auflösung, der rote Balken markiert die Auflösungsschale im Bereich von 45 - 5.97 Å, in der die oben genannten 75 Reflexe nicht gemessen werden konnten. Anhand der Tabelle sind die exakten Werte für die einzelnen Auflösungsbereiche und deren Redundanz abzulesen. Wie bereits in Kleywegt (1996) angesprochen und in Wang et al. (1998) und Cate (2001) hervorgehoben wurde, ist es wichtig, einen möglichst hochredundanten und vollständigen Datensatz für die Mittelung einzusetzen, da es ansonsten zu fragmenthaften Dichten in den Randbereichen zwischen Solvens und Protein kommt.

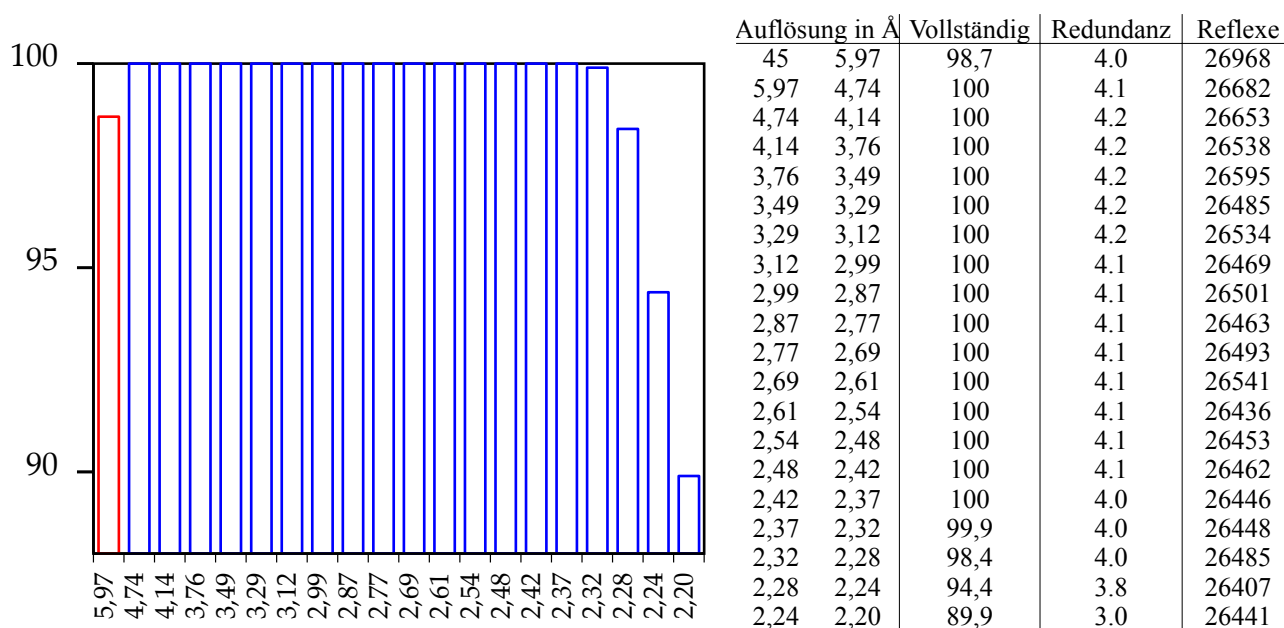


Abb. 4.19: Darstellung der Vollständigkeit in Prozent des nativen ID09 Datensatzes in Abhängigkeit von der Auflösung in Å. Neben der grafischen Darstellung sind in der Tabelle die exakten Werte inklusive der gemessenen Redundanzen pro Auflösungsschale aufgeführt.

Reflexe niedriger Ortsfrequenzen bestimmen vorwiegend den Trennbereich zwischen Solvens und Protein und sind somit für eine Abgrenzung äußerst wichtig. Es ergeben sich jedoch mehrere Probleme bei der Datensammlung dieser Reflexe.

Bedingt durch den gegebenen Aufbau einer Meßstation kann eine Messung der niederen Ortsfrequenzen unmöglich sein, da beispielsweise der Detektorabstand nicht zu noch längeren Distanzen hin variiert werden kann. Hinzu kommt die Problematik der Absorption der Röntgenstrahlen durch Luft im Bereich zwischen Kristall und Detektor und dadurch zu einer Verfälschung der Intensitäten. Dieser Effekt kann durch ein mit gasförmigen Helium gefluteten Strahlengang minimiert werden.

An manchen Meßstationen ist die Distanz zwischen Kollimator und Beamstop limitiert. Idealerweise sollte man einen punktförmigen Beamstop direkt auf die Beryllium-Platte des CCD-Detektors anbringen, um möglichst alle niederen Ortsfrequenzen bis auf den F (0, 0, 0) Reflex zu messen. Da die Intensitäten mit geringerer Auflösung zunehmen, ist es notwendig, entweder den Primärstrahl der Röntgenquelle zu attenuieren oder die Belichtungsdauer so weit zu minimieren, daß es zu keinen übersättigten Reflexen kommt. Zudem ist es wichtig, den Röntgenstrahl auf den Detektor direkt nicht aber auf den aufgesetzten Kristall zu fokussieren, um eine möglichst kleine Fläche pro Reflex in Bezug auf die zur Verfügung stehende Detektorfläche zu erhalten (Cate, 2001).

Die Datensätze werden in zwei Läufen gesammelt, zunächst ein hochaufgelöster, anschließend ein niedrig aufgelöster Datensatz. Eine gute Übersicht über Meßstrategien wird bei Dauter (1999) gegeben. Da meist jedoch die Zeit an einer Meßstation limitiert ist, muß in der Regel ein Kompromiß zwischen nahezu perfekten und brauchbaren Daten gefunden werden.

Anhand einer berechneten Selbstrotationsfunktion mit dem Programm MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) und der Interpretation einer nativen Pattersonmap konnte das Tricorn-Hexamer-Partikel in der asymmetrischen Einheit positioniert werden. Fünf mögliche Packungsmodelle wurden auf ihre Konsistenz mit den beobachteten Daten verglichen, jedoch durch Untersuchungen der Höhe des Pseudo-Ursprungspeaks konnten die Packungsmodelle auf nur zwei Möglichkeiten reduziert werden. Eine makroskopische Packungsanalyse, wie sie beispielsweise in Bachmann et al. (1989), Bacher et al. (1992) oder Meining et al. (1995) mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Gefrier-Ätz-Präparaten durchgeführt wurde, war im Fall der Tricorn-Protease nicht notwendig, da sie nicht zu einer Unterscheidung der beiden Möglichkeiten hätte beitragen können.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war das Ziel dieser Arbeit unter anderem durch Kombination elektronenmikroskopischer mit röntgenkristallographischen Daten eine Phasierung zu atomarer Auflösung zu ermöglichen. Versuche, geeignete Schwermetallderivate zu erhalten, schlugen fehl. Eine Tabelle der gemessenen Schwermetallderivate ist im Anhang 8.1 aufgeführt. Da somit für die Phasierung der Struktur keinerlei Phaseninformation aus Schwermetallderivaten eingesetzt werden konnte, wurde der Versuch unternommen, die Struktur ausschließlich durch Phasenextension unter Einsatz einer aus elektronenmikroskopischen 3D-Rekonstruktionen erhaltenen Maske zu lösen (Lunin et al., 2000; Roversi et al., 2000).

4.1.7 NCS-Mittlung - Schlußfolgerung

Die aus der Mittelung hervorgegangenen Dichten wurden nachträglich mit der Dichte verglichen, welche sich aus dem molekularen Ersatz ergab. Daraus ließen sich rückwirkend Schlüsse für weitere *ab initio* Mittelungsexperimente ziehen.

Zunächst wurde die in Abbildung 4.12 vorgestellte Mittelungsprozedur anhand von Tricorn-Testdaten verifiziert. Ausgehend von den idealen NCS-Operatoren und der aus dem molekularen Ersatz erhaltenen Position des Hexamers wurden Mittelungsversuche mit Monomer-Masken bei verschiedenen Auflösungen gestartet. Die Monomer-Masken entsprachen dabei nicht den tatsächlichen Monomeren der Tricorn-Protease, sondern wurden gemäß der 32 Punktsymmetrie willkürlich erzeugt. Als Datensatz dienten einerseits echte Daten (ID09), andererseits ein aus den Koordinaten generierter Datensatz ohne Rauschen sowie ein um die fehlenden 75 Reflexe aufgefüllter Datensatz. Abbildung 4.20 zeigt den Verlauf des R-Faktors in Abhängigkeit von der Auflösungsgrenze, zu der gemittelt wurde.

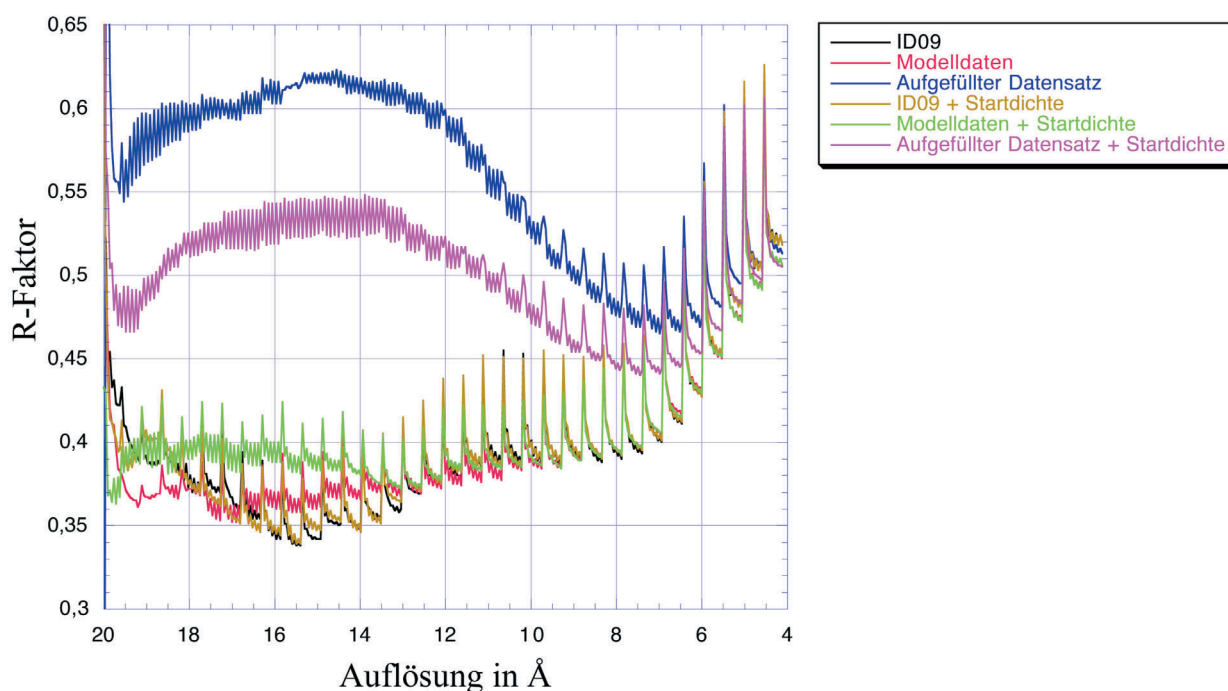


Abb. 4.20: Verlauf des R-Faktors in Abhängigkeit der Auflösungsgrenze unter unterschiedlichen Startbedingungen. Die Mittelung wurde jeweils ab einer Auflösungsgrenze von 20 Å gestartet. Als Startdichte wurde eine 30 Å Elektronendichte verwendet. Diese Elektronendichte wurde anhand der Lösung aus dem molekularen Ersatz berechnet.

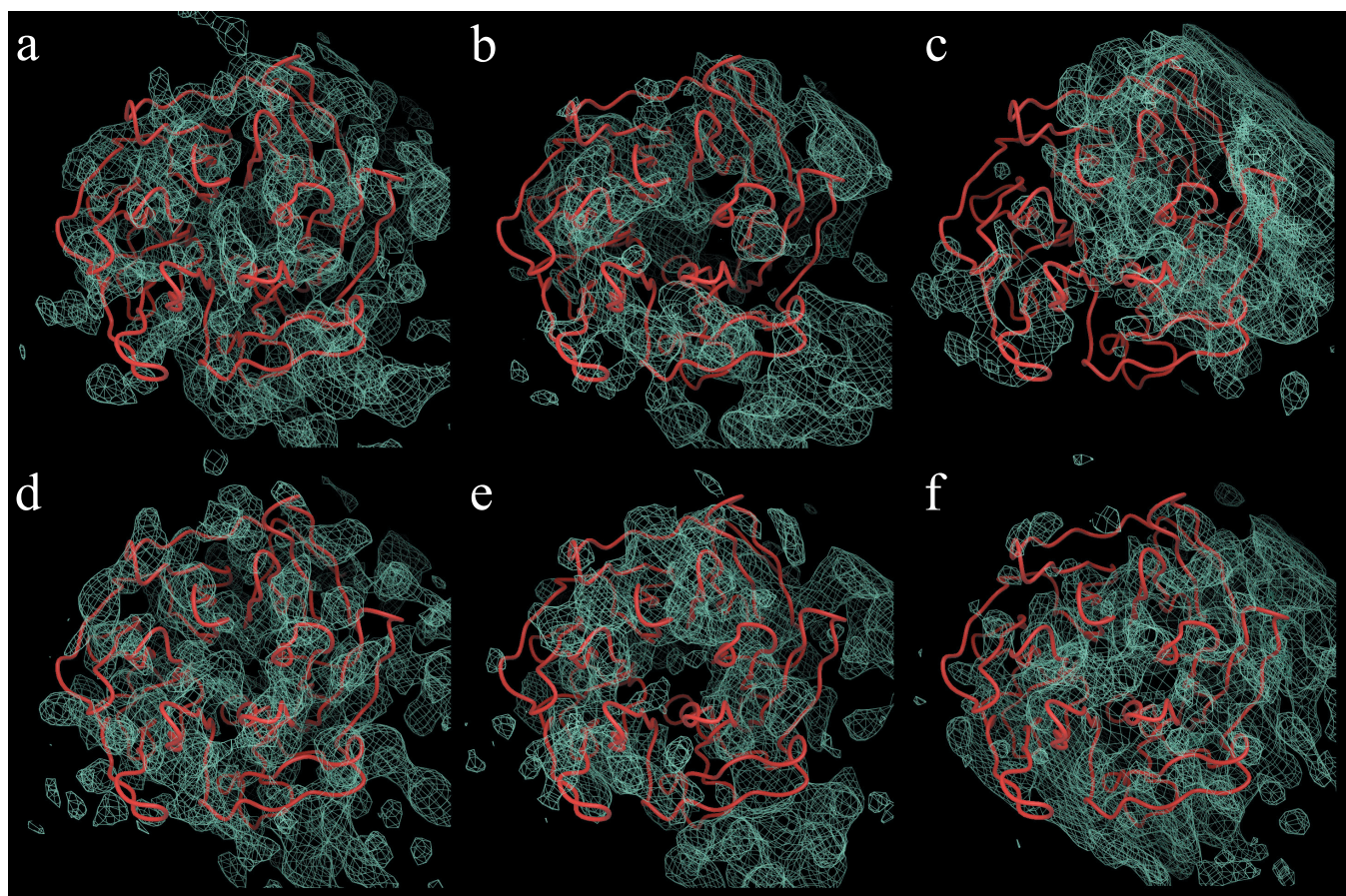


Abb. 4.21: Elektronendichtekarten der verschiedenen Modellrechnungen bei einer Auflösung von 6 Å. Exemplarisch wird nur ein kleiner Teil der Elektronendichte gezeigt. Der β_6 -Propeller von Met39 bis Asp310 ist rot hervorgehoben. a) Ergebnisse der Mittelung mit realen Daten. b) Ergebnisse der Mittelung mit reinen Modell-Daten. c) Ergebnisse der Mittelung mit einem vervollständigten Datensatz. Bei diesen Mittelungen wurde jeweils ohne eine Anfangsdichte gemittelt, d-f zeigen die Ergebnisse nach Mittelung ausgehend von einer Startdichte, die einer 30 Å Elektronendichte entspricht. d) Ergebnisse der Mittelung mit realen Daten. e) Ergebnisse der Mittelung mit reinen Modell-Daten. f) Ergebnisse der Mittelung mit einem vervollständigten Datensatz. Der Vergleich der Elektronendichten der ersten Reihe (a-c) mit denen der zweiten Reihe (d-f) zeigt deutlich einen qualitativen Unterschied. Wenn eine Startdichte bei geringer Auflösung an der richtigen Position bereits vorgegeben wird, werden die Phasendatensätze scheinbar stabilisiert. Zwar ist in c ebenfalls ein Propeller zu erkennen, allerdings verzerrt und verschoben. Ein möglicher Grund könnte bei Skalierungsfehlern zwischen niedrig aufgelösten EM-Strukturfaktoren und röntgenkristallographisch ermittelten Strukturfaktoren liegen.

Eine zuverlässige Skalierung der elektronenmikroskopischen Daten wäre wünschenswert, ist aber nicht notwendigerweise erforderlich, da zunächst verschieden skalierte Masken, Elektronendichten oder pseudoatomare Modelle in einem *brute force approach* auf ihre Verwendbarkeit hin überprüft werden könnten. Voraussetzungen dafür wären allerdings ausreichende Computerressourcen und eine parallelisierte Software, die in der Lage ist mit verschiedenen Masken, Elektronendichten oder pseudoatomaren Modellen zunächst einen molekularen Ersatz durchzuführen, diese Ergebnisse miteinander zu vergleichen und anschließend zu gewichten. Anhand der Gewichtung könnten ein oder mehrere erfolgsversprechende Modelle für eine anschließende *ab initio* Mittelung eingesetzt werden.

Um zuverlässige Ergebnisse erzielen zu können, müßte auch die Datensammlung der niederen Ortsfrequenzen optimiert werden, um möglichst (bis auf den F (0, 0, 0)-Reflex) vollständige kristallographische Datensätze zur Verfügung zu haben.

Es konnte somit prinzipiell gezeigt werden, daß diese Vorgehensweise für weitere Projekte von Nutzen sein könnte, falls beispielsweise molekularer Ersatz mit homologen Proteinen oder Derivatisierung des Proteins nicht möglich wären. Es muß jedoch eine grobe Vorstellung der Proteinhülle bei einer Auflösung von ca. 40 - 20 Å vorhanden sein.

Denkbar wäre auch die Konstruktion eines pseudoatomaren Modells aus verschiedenen „Grundtopologien“ unter Berücksichtigung von Symmetrie und Größe des Moleküls, wie in Abbildung 4.22 schematisch zu sehen ist. Eine kritische Analyse der Randbereiche nach wenigen Mittelungszyklen zu höherer Auflösung könnte Aufschlüsse über den tatsächlichen Verlauf der Maske geben und gegebenenfalls durch Modifikation der Startmaske zum Erfolg führen.

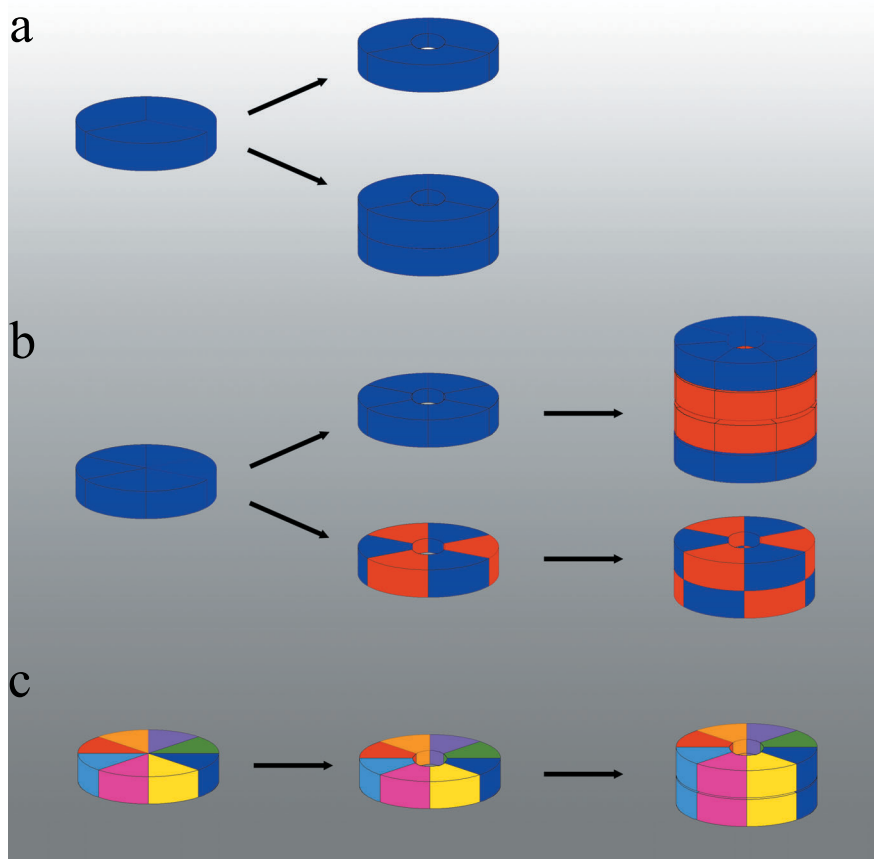


Abb. 4.22: Schematische Darstellung möglicher Grundtopologien makromolekularen Komplexe. a) Homotrimer ohne zentrale Pore; mit einer zentralen Pore (Trilobed-Protease) und als Homohexamer (Tricorn-Protease). b) Homohexamer ohne zentrale Pore; Homohexamer mit zentrale Pore; Hexamer bestehend aus zwei Untereinheiten; Hexamerringe aus zwei Untereinheiten; gemischte Hexamerringe aus zwei Untereinheiten (Thermosom). c) Heptamer ohne zentrale Pore; Heptamer mit zentrale Pore; Heptamerringe (GroEL)

4.1.8 Strukturlösung der C2-Kristallform durch molekularen Ersatz mit 1K32

Anhand der Koordinaten der Tricorn-Protease 1K32 in einer anderen Kristallform (Brandstetter et al., 2001) konnte die C2-Kristallform der Tricorn-Protease durch molekularen Ersatz mit dem Programm MOLREP (Vagin and Teplyakov, 1997) gelöst werden. Anschließende Verfeinerung der Struktur mit dem Programm CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) erbrachte einen $R_{\text{Work}} = 26.2\%$ und einem $R_{\text{Free}} = 27.2\%$. Durch TLS-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC 5.1.24 (CCP4, 1994) konnte der $R_{\text{Work}} = 24.3\%$ bzw. $R_{\text{Free}} = 25.6\%$ weiter gesenkt werden. Eine ausführliche Analyse der Struktur mit PROCHECK (CCP4, 1994) ist im Anhang 8.2 zu finden. Bis auf rotamere Anordnungen einzelner Seitenketten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Koordinaten von 1K32 und der C2-Kristallform.

Abbildung 4.23 a zeigt die Anordnung der einzelnen Moleküle zueinander innerhalb der asymmetrischen Einheit, die einzelnen Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt. In Abbildung 4.23 b ist exemplarisch ein Monomer hervorgehoben. Das Monomer ist in fünf Domänen gegliedert, einen β 6-Propeller (gelb, M39-D310), einen β 7-Propeller (blau, A326-K675), eine α/β Domäne (violett, S681-G752), eine PDZ-Domäne (rot, R761-D855) und einer katalytischen Domäne (grün, 856-N1061). Die katalytischen Reste (H746, S965, D966) sind als Kalottenmodell dargestellt.

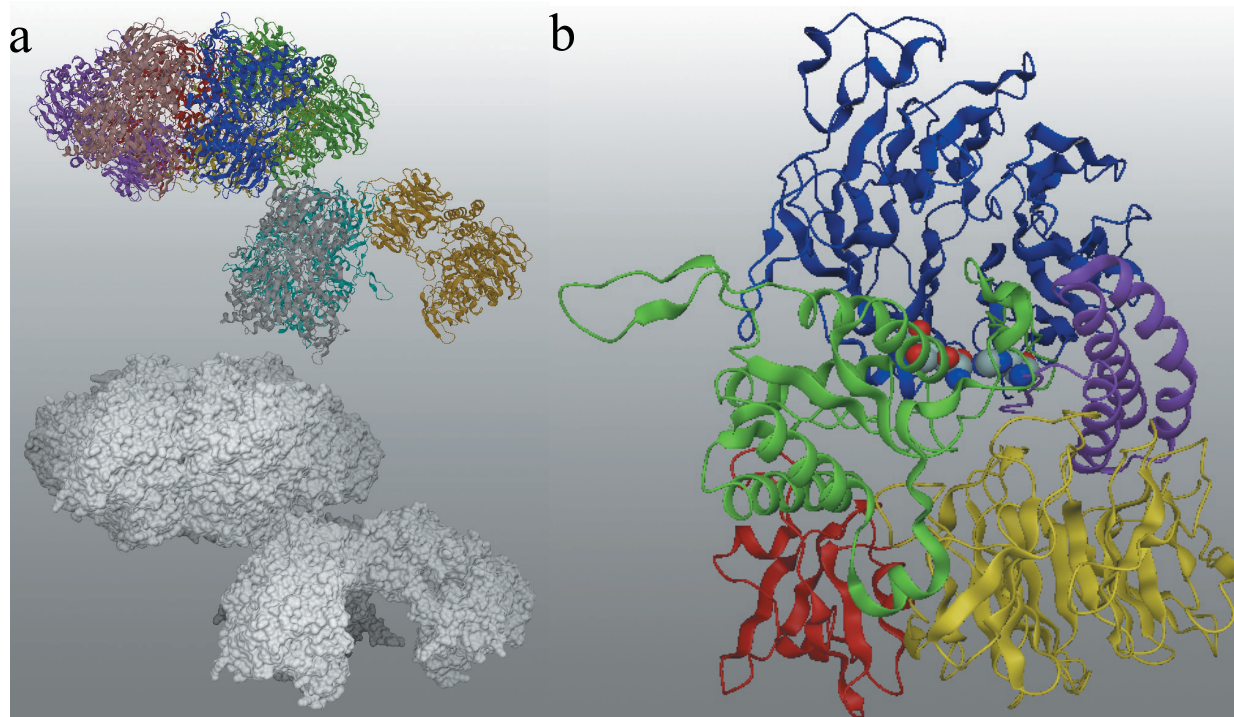


Abb. 4.23: a) Anordnung der neun Monomere in der asymmetrischen Einheit nach molekularem Ersatz; die einzelnen Monomere sind in jeweils unterschiedlichen Farben als Bändermodell und Oberflächenmodell dargestellt. b) Darstellung der einzelnen Domänen der Tricorn-Protease β 6-Propeller (gelb), β 7-Propeller (blau), α/β Domäne (violett), PDZ-Domäne (rot), katalytische Domäne (grün). Als Kalottenmodell sind die katalytischen Reste hervorgehoben.

Abbildungen 4.24 a + b zeigen die einzelnen Monomere des Homohexamers in Auf- und Seitenansicht, um eine vereinfachte Zuordnung der einzelnen Ketten zu ermöglichen. Ein Monomer ist als Bändermodell hervorgehoben, die Farbcodierung entspricht der vorhergehenden Abbildung 4.23 b. Deutlich zu erkennen ist das Ineinandergreifen der einzelnen Monomere. Abbildung 4.24 c zeigt erneut eine Übersicht der Tricorn-Protease, die Domänen sind hier farbcodiert.

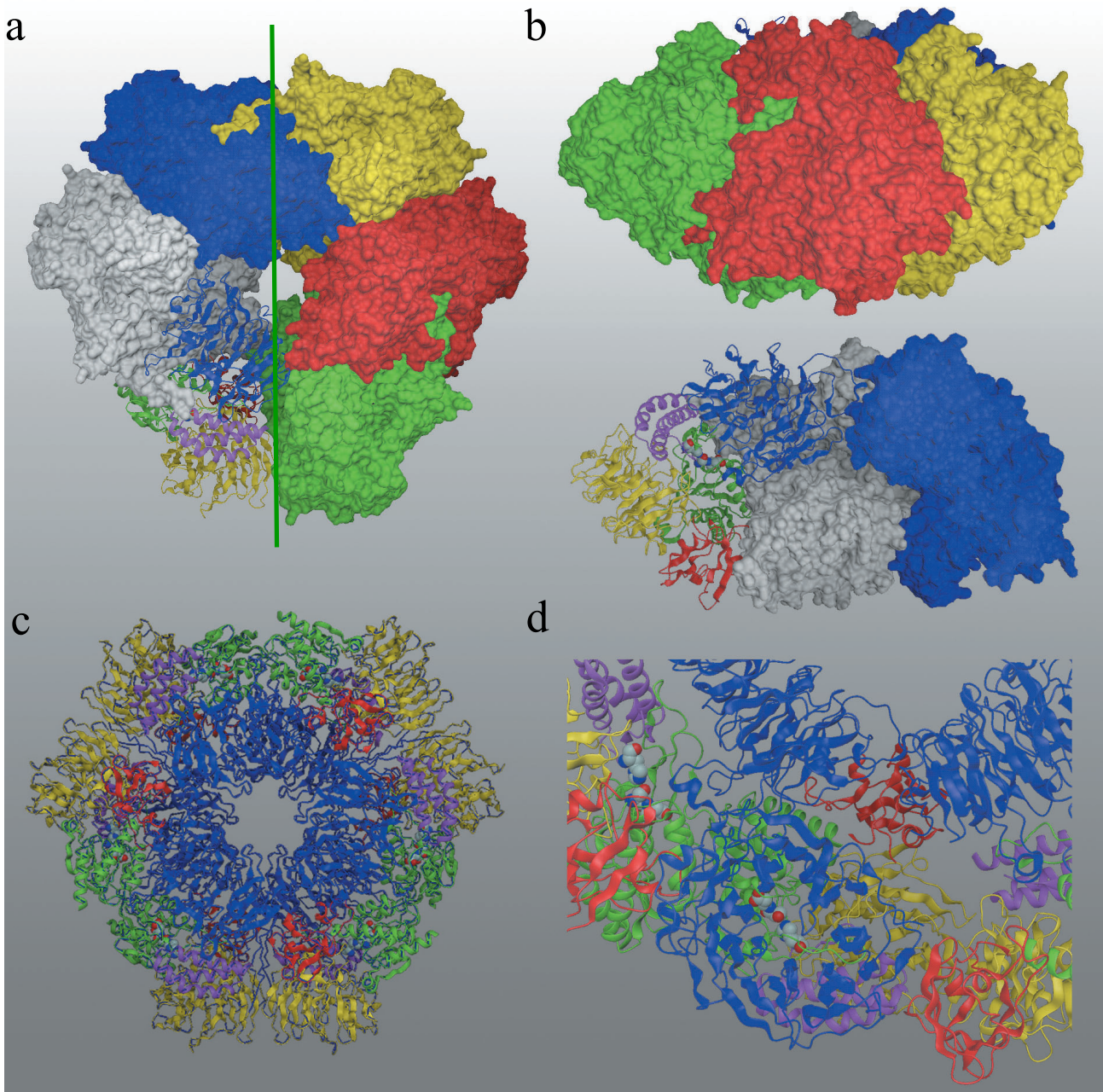


Abb. 4.24: a) Aufsicht entlang der dreizähligen Achse auf ein Homohexamer der Tricorn-Protease. Monomere Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben als Oberflächen dargestellt. Ein Monomer ist als Bändermodell mit den einzelnen Domänen in verschiedenen Farben hervorgehoben. b) Zwei Seitenansichten des Homohexamers. c) Übersicht der Domänen innerhalb des Homohexamers. Deutlich erkennbar ist die Ausbildung eines Ringes um die zentrale Pore durch die $\beta 7$ -Propeller (blau). d) Blick durch den $\beta 7$ -Propeller (blau) ausgehend von der zentralen Pore auf ein aktives Zentrum, repräsentiert als Kalottenmodell der beteiligten Aminosäurereste.

Der $\beta 7$ -Propeller bildet einen Ring um die zentrale Pore und trägt somit entscheidend zur Ausbildung und Stabilisierung des Homohexamers bei. Durch Vergleich mit Abbildung 4.11 b kann gefolgert werden, daß jeweils drei $\beta 6$ -Propeller Domänen pro Homohexamer an der Bildung von Kontakten zu anderen $\beta 6$ -Propellern benachbarter Homohexamere beteiligt sind, um die supramolekulare Struktur eines Capsids zu ermöglichen. Abbildung 4.24 d zeigt einen potentiellen Weg durch den $\beta 7$ -Propeller, den ein Substrat zum aktiven Zentrum laut Brandstetter et al. (2001) gehen könnte.

Anhand Abbildung 4.25 a kann man eine höhere Konzentration geladener Aminosäurereste im Randbereich der zentralen Pore feststellen. Ausgehend von der zentrale Pore werden zudem noch verzweigte hydrophobe Kavitäten ausgebildet (vgl. Abbildung 4.25 c). Diese Kavitäten waren bereits in den 3D-Rekonstruktionen der elektronenmikroskopischen Daten deutlich sichtbar (Tamura et al., 1996; Walz et al., 1997; Walz et al., 1999).

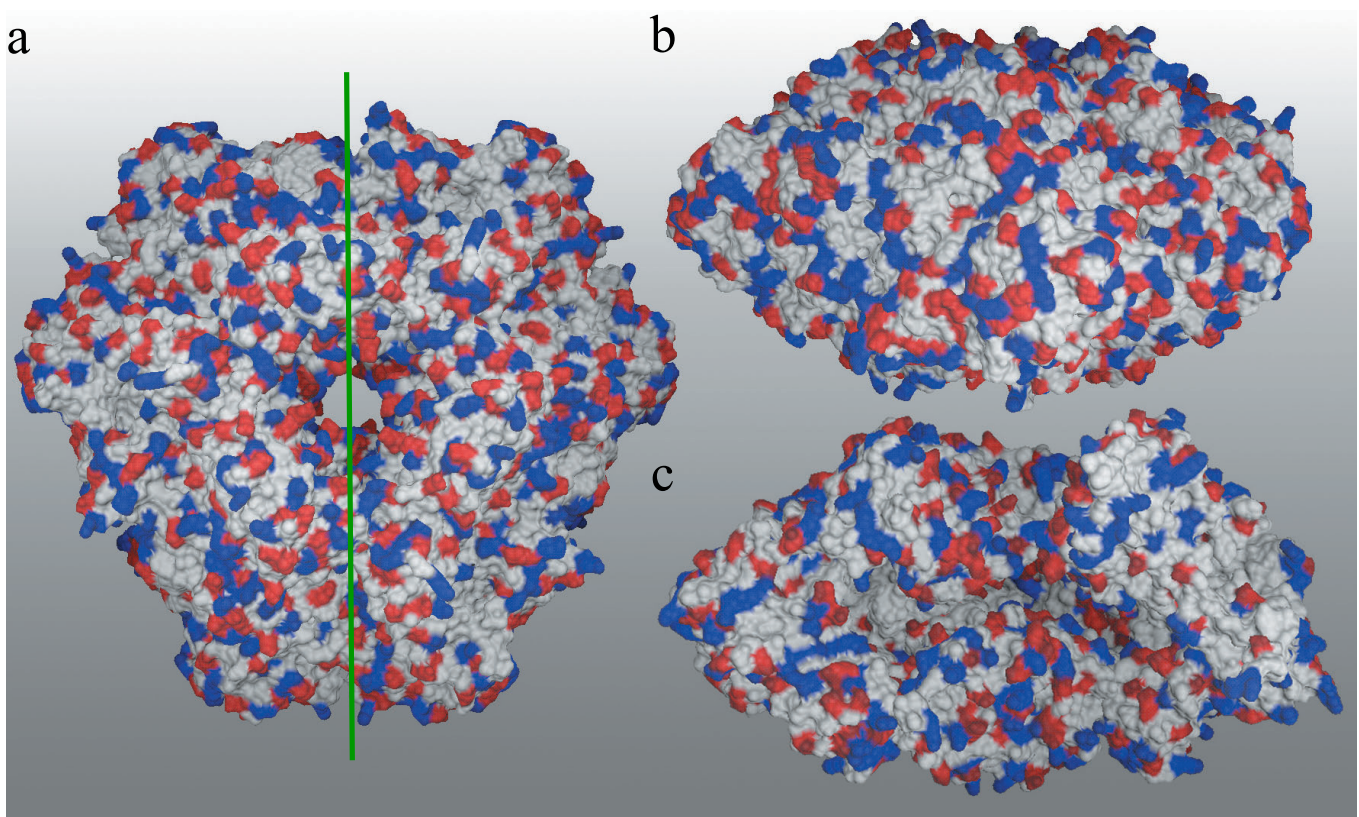


Abb. 4.25: Verteilung der sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Aminosäurereste. a) Aufsicht entlang der dreizähligen Achse, die zentrale Pore ist verhältnismäßig stark von geladenen Aminosäuren umgeben. b) Seitenansicht der Tricorn-Protease. c) Medianschnitt entlang der grünen Achse in Ausschnitt a.

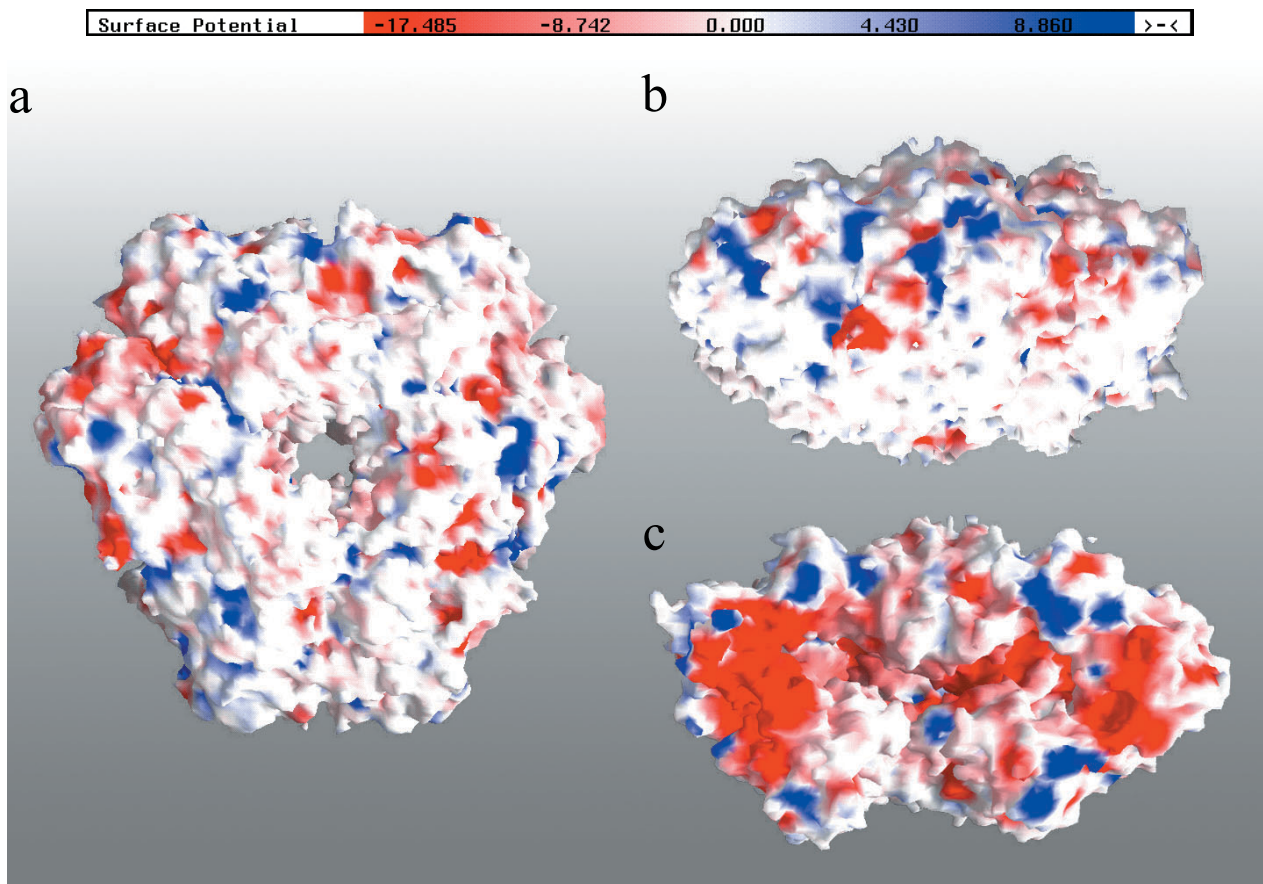


Abb. 4.26: Verschiedene Ansichten der elektrostatischen Ladungsverteilung der Tricorn-Protease berechnet mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) bei einer Salzkonzentration von 200 mM. a) Aufsicht entlang der dreizähligen Achse. b) Seitenansicht. c) Ansicht entlang eines Medianschnitts entsprechend der vorherigen Abbildung.

Abbildungen 4.26 a+b zeigt die elektrostatische Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Hexamers bei einer Salzkonzentration von 200 mM. In der aufgeschnittenen Seitenansicht sind großflächige negativ geladene Bereiche (rot) zu erkennen.

4.2 Trilobed-Protease β -Propellerdomäne

4.2.1 Expression und Proteinreinigung

Die Expression erfolgte wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben (vgl. Punkt 3.2.5.3). Das Protein wurde in großen Mengen exprimiert, pro Liter TB-Medium betrug die Ausbeute an gereinigtem Protein ca. 200 mg. Ein Aktivitätstest zur Überprüfung der Funktionalität des Proteins war nicht möglich, da es sich um die nichtkatalytische Domäne handelt. Da die Domäne mit einem C-terminalen His₆-tag versehen war, konnte als erster Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA eingesetzt werden, siehe Abbildung 4.27.

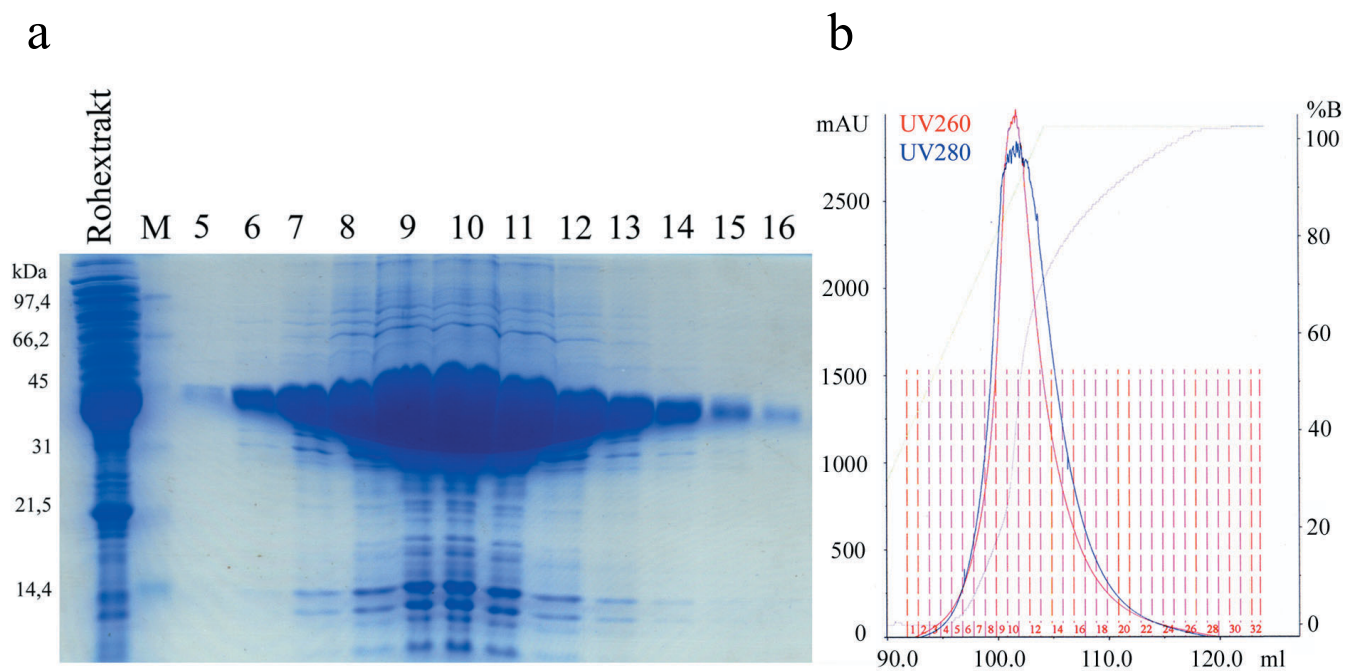


Abb. 4.27: a) 12.5% SDS-Gel der NiNTA Fraktionen und dazugehörigem Chromatogramm (b). 1 μ l Rohextrakt wurde nach Pelletieren des Zelldebris aufgehoben. Deutlich zu erkennen ist die Überexpression der Propellerdomäne bereits im Rohextrakt. Jeweils 3 μ l der gesammelten 1000 μ l Fraktionen wurden auf die verbleibenden Spuren des SDS Gels aufgetragen.

Die Fraktionen 5-16 wurden vereinigt und anschließend über eine HiPrep 26/10 Desalting-Säule in den Laufpuffer für den Anionenaustauscher umgepuffert. Um die Kapazität des Anionenaustauschers durch die Proteinmenge nicht zu überschreiten, wurden mehrere identische Reinigungen nacheinander durchgeführt, exemplarisch ist eine Reinigung in Abbildung 4.28 zu sehen.

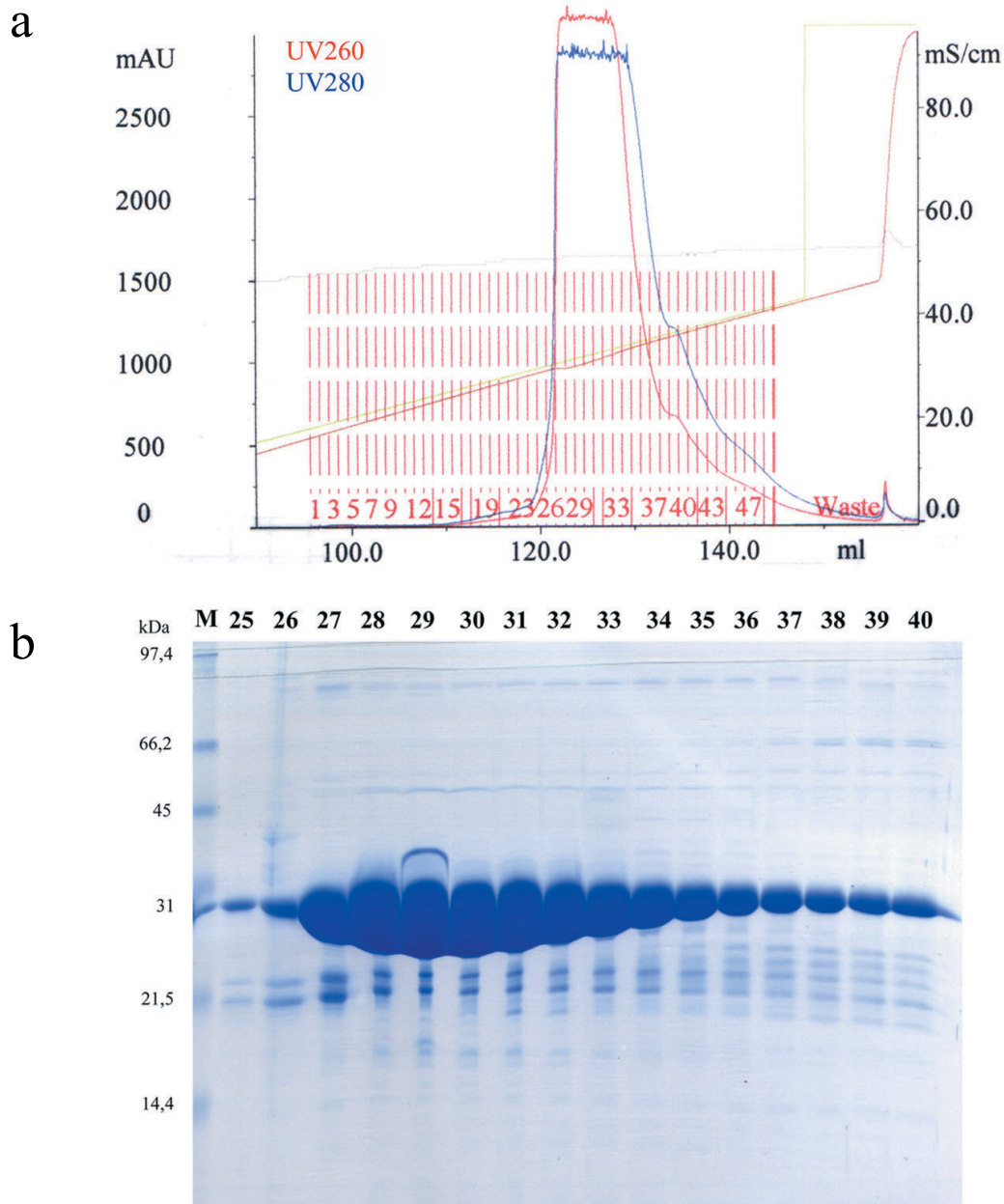


Abb. 4.28: a) Chromatogramm nach der Anionenaustauschchromatographie und entsprechendes 12.5 % SDS-Gel (b). Aufgetragen wurden jeweils 1 μ l von 1000 μ l pro gesammelter Fraktionen. Da die Gesamtproteinmenge aus 1 Liter TB Medium nach der Ni-NTA-Reinigung etwa 250 mg betrug, wurde die Anionenaustausch-chromatographie unter identischen Bedingungen mehrfach wiederholt, um die maximale Bindungskapazität des Säulenmaterials von ca. 50 mg/ml nicht zu überschreiten.

Die vereinigten Fraktionen wurden zum Abschluß noch über eine Superdex 75-Gelfiltrationssäule gereinigt (siehe Abbildung 4.29) und auf 30 mg/ml in Konzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa aufkonzentriert. Ein Teil des Proteins wurde in 500 μ l Aliquots bei -180 °C in flüssigem Stickstoff für spätere Verwendung gelagert.

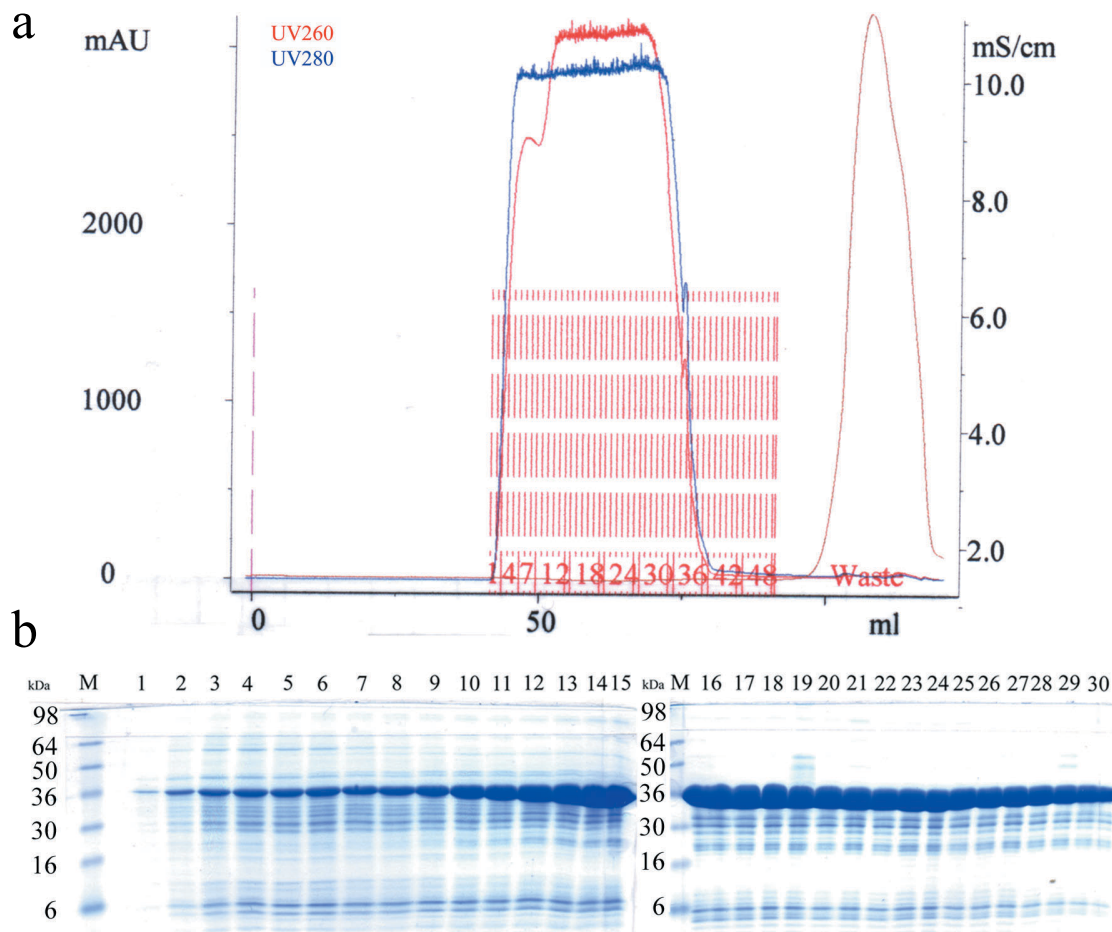


Abb. 4.29: a) Chromatogramm nach dem Gelfiltrationslauf und entsprechendes 12.5 % SDS-Gel (b). Aufgetragen ist jeweils 1 μ l der 1000 μ l pro Fraktion. Wie durch den Vergleich der Abb. 4.27 und 4.28 zu ersehen ist, zerfällt ein Teil der Domäne während der Reinigung.

4.2.2 Kristallisation der β -Propellerdomäne

Erste Kristallisationsansätze wurden im Hanging-Drop-Verfahren bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 20 °C, 30 °C) mit identischer Proteinkonzentration, aber unterschiedlichen Mengen an Glycerin in der Proteinlösung (0 %, 10 %, 20 %) in Sparse Matrix Screens angesetzt.

In mehreren Bedingungen konnten Mikrokristalle identifiziert werden. Bei 100 mM Natriumcitrat pH 6.5, 20% v/v 2-Propanol, 20% w/v PEG 4000 wuchsen lange dünne Nadeln, und unter 100 mM Natriumacetat pH 4.6, 8% w/v PEG 4000 wuchsen dagegen große Einkristalle, siehe Abbildung 4.30. Diese Bedingung wurde weiter auf pH-Optimum und Fällungsmittelkonzentration verfeinert, bis reproduzierbare Einkristalle mit einer Größe von 0.4 x 0.4 x 0.25 mm³ in großen Mengen hergestellt werden konnten.

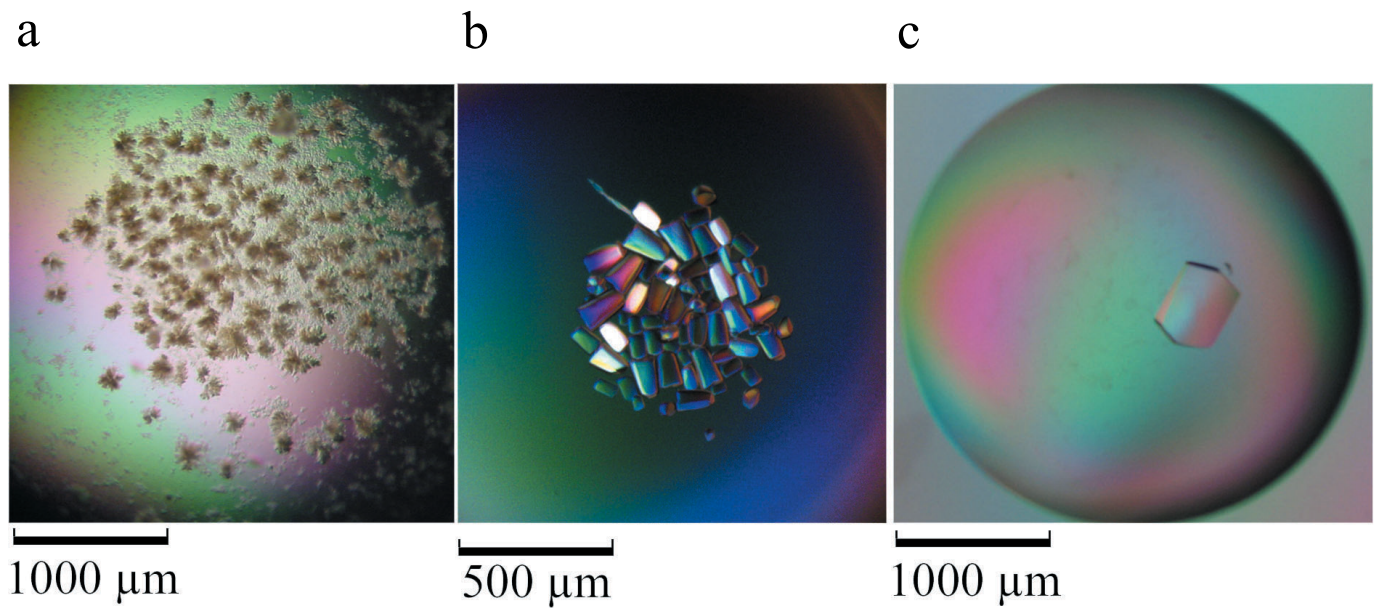


Abb. 4.30: Bilder von Kristallen der β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease. a) Nadelbündel aus Hampton Crystal Screen I Bedingung 40 (100 mM Natriumcitrat pH 6.5, 20% v/v 2-Propanol, 20% w/v PEG 4000). b) Kristalle aus Hampton Crystal Screen I Bedingung 37 (100 mM Natriumacetat pH 4.6, 8% w/v PEG 4000). c) Einkristall unter optimierten Bedingungen gewachsen (100 mM Natriumacetat pH 4.4, 20 mM $MgCl_2$, 300 mM 1,6-Hexanediol, 10% w/v PEG 4000). Die Aufnahmen B und C wurden unter polarisiertem Licht aufgenommen, die Kristalle sind ansonsten farblos.

Beim Austesten der Kristalle an der Drehanode zeigte sich, daß die Kristallisationsbedingung nicht optimal für Messungen unter Cryobedingungen war, da sich beim Schockfrieren Eiskristalle bildeten. Dennoch streuten die Kristalle bereits zu einer Auflösung von 2.7 Å. Durch die einwirkenden Scherkräfte aufgrund der unterschiedlichen Ausdehnung des Wassers war es dem Zufall überlassen, ob ein Kristall eine hohe oder eine niedrige Mosaizität aufwies.

Eine Optimierung der Kristallisationslösung durch Zusatz von steigenden Mengen an Glycerin und kurzfristiges Überführen der Kristalle in diese Lösungen führte dazu, daß sich kaum mehr Eiskristalle beim Schockfrieren des Kristalls bilden konnten (siehe dazu die folgenden Abbildungen 4.31 a und 4.31 b). Weiterhin konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Zunahme der Mosaizität und der Abnahme der Natriumacetat-Konzentration und somit einer Verschiebung des pH-Wertes zu neutralem pH des Tropfens beobachtet werden.

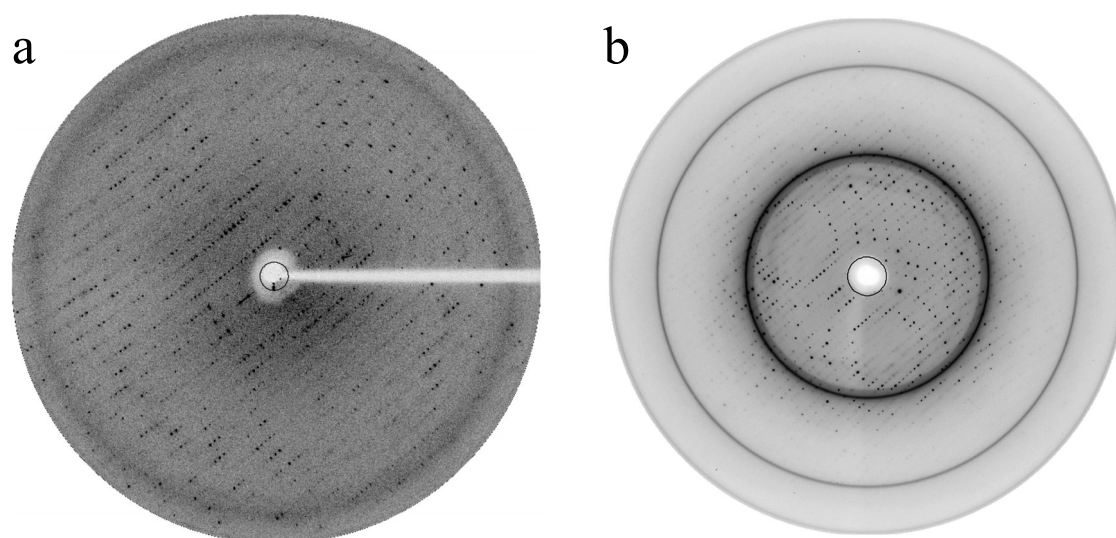


Abb. 4.31: Diffraktionsbilder mit charakteristischen Eisringen, a) aufgenommen an einer Drehanode, eine hohe Mosaizität wird durch nicht optimale Einfrierbedingungen hervorgerufen. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 3.5 \AA , $\Delta\omega = 1^\circ$, $t = 1200 \text{ s}$. b) Diffraktionsbild aufgenommen an der Beamline BW6; die Einfrierbedingungen konnten soweit optimiert werden, daß die Mosaizität durch das Einfrieren des Kristalls nicht weiter erhöht wurde. Die Kristalle konnten allerdings nicht völlig eisfrei eingefroren werden. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 2.0 \AA , $\Delta\omega = 0.5^\circ$, $t = 15 \text{ s}$.

4.2.3 Auswertung der Daten

Datenreduktion und Skalierung der Datensätze erfolgte mit den Programmen MOSFLM v6.1 (CCP4, 1994) und SCALA (CCP4, 1994). Mit dem Programm TRUNCATE (CCP4, 1994) wurden die Intensitäten in Strukturfaktoren umgewandelt. Als Raumgruppe wurde $P2_12_12_1$ anhand der ausgelöschten Reflexe mit HKLVIEW (CCP4, 1994) identifiziert. Um jeweils einen vollständigen Datensatz zu sammeln, wurde anhand einer Einzelexposition die Orientierung des Kristalls mit der Option STRATEGY und TESTGEN in MOSFLM (CCP4, 1994) im Röntgenstrahl bestimmt. Potentielle Schwermetallderivate wurden zusätzlich mit der Option ANOMALOUS versehen, um die korrekte Datensammlungstrategie für eine maximale Ausbeute an anomalen Daten zu ermitteln.

Tabelle 4.3 zeigt eine ausführliche Statistik des hochauflösenden, nativen Datensatzes bis 2.0 \AA . Sofern es möglich war, wurden die potentiellen Schwermetallderivate an der Absorptionskante des jeweiligen Schwermetalls gemessen und per Fluoreszenzspektrum verifiziert, daß sich Schwermetallatome im Kristallverbund befanden. Eine Zusammenfassung der gemessenen Schwermetallderivate ist in Tabelle 4.4 gegeben.

Datensammlung	Trilobed β -Propellerdomäne, nativ
X-ray Beamline, Wellenlänge	BW6, 1.0713 Å
Detektor	MAR CCD 130 mm
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle in Å	54.93, 88.22, 154.03
Auflösung	19.96 – 2.0 Å
Anzahl gesammelter Reflexe	856280
Anzahl einzigartiger Reflexe	45304
Mosaizität	0.49°
Wilson B-Faktor	50 Å ²
I/ σ (I)	44.7 (4.5)
R _{merge}	0.029 (0.354)
Vollständigkeit	88 (95.6)

Tab. 4.3: Statistik des nativen Datensatzes der Trilobed β -Propellerdomäne gemessen an BW6 DESY, Hamburg. Die Zahlen in Klammern beschreiben die höchste Auflösungsschale von 2.07-2.00 Å.

Schwermetall	Ir ₃	PtBr ₄	PtCl ₆	ReCl	ReO	UAc
Beamline	BW6	BW6	BW6	BW6	BW6	ID14-1
Wellenlänge	1.1051 Å	1.0713 Å	1.0713 Å	1.1762 Å	1.1762 Å	0.933 Å
Einheitszelle in Å						
a	54.87	54.82	54.92	54.87	55.07	55.33
b	88.09	88.50	88.18	87.63	88.72	88.44
c	153.99	153.89	153.93	154.09	153.96	153.99
Auflösung	20 -2.9 Å	20 - 2.5 Å	20 - 2.5 Å	20 - 2.9 Å	20 -2.9 Å	20 -2 Å
Mosaizität	549	485	446	881	756	512
I/s(I)	21.5 (6.8)	18.6 (2.8)	27.6 (4.6)	18.9 (4.8)	15.9 (7.0)	6.4 (2.0)
R _{merge}	0.033 (0.131)	0.044 (0.318)	0.024 (0.162)	0.029 (0.129)	0.043 (0.107)	0.082 (0.349)
Vollständigkeit	99.8 (99.7)	99.5 (98.6)	92.9 (98.3)	94.3 (85.5)	97.2 (75.6)	83.5 (64.3)
Phasing Power	0.29	0.67	0.78	0.83	-	1.10
Bindungsstellen	6	9	6	5	-	10

Tab. 4.4: Statistik der gesammelten Schwermetallderivate BW6 DESY, Hamburg beziehungsweise ID14-1 ESRF, Grenoble. Die Schwermetallderivate wurden jeweils an ihrer spezifischen Absorptionskantenwellenlänge gemessen, um ein vorhandenes anomales Signal zu maximieren.

4.2.4 Phasierung und Strukturlösung

Erste Schwermetallpositionen wurden automatisch bis zu einer Auflösung von 2.5 Å mit Hilfe des Programmes SOLVE (Terwilliger et al., 1999) in wenigen Stunden gefunden. Aus der daraus resultierenden Dichte konnte bereits die typische β -Propeller-Struktur erkannt werden. Desweiteren war eindeutig zu erkennen, daß sich zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit befanden. In den folgenden Abbildungen wird der Übersicht halber jeweils nur ein Monomer (Molekül A) der asymmetrischen Einheit dargestellt.

Eine Verfeinerung der Schwermetallpositionen und Überprüfung der Händigkeit erfolgte mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994). Dichtemodifikation und Verbesserung der Phasen mit Phasenextension bis 2 Å erfolgte mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 1999). Die daraus resultierende, normierte Dichte wurde zur automatischen Dichteinterpretation mit dem Programm MAID (Levitt, 2001) und der bekannten Aminosäuresequenz eingesetzt. Das daraus resultierende Modell war bereits zu etwa 50 % vollständig und in der Aminosäuresequenz korrekt zugeordnet. Schleifenregionen wurden von MAID (Levitt, 2001) nicht interpretiert, da diese in der Dichte zu schwach definiert waren.

Ausgehend von diesem ersten Strukturmodell wurden die fehlenden Regionen manuell mit dem Programm O (Jones, 1991) hinzugefügt und mit CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) durch Modifikationen solange verfeinert, bis keine weitere Verbesserung des freien R-Faktors mehr erbracht wurde ($R_{\text{Work}} = 25.9\%$ $R_{\text{Free}} = 31.5\%$). 20 Zyklen TLS-Verfeinerung und weitere 30 Zyklen Positions-Verfeinerung der einzelnen Atome mit dem Programm REFMAC 5.1.24 (CCP4, 1994) führte zu einer wesentlichen Verbesserung des freien R-Faktors ($R_{\text{Work}} = 23.1\%$ $R_{\text{Free}} = 27.6\%$). Hierbei wurde jedes einzelne Blatt eines Propellers als TLS-Gruppe definiert.

Eine ausführliche Analyse der Struktur mit dem Programm PROCHECK (CCP4, 1994) befindet sich im Anhang 8.3.

4.2.5 Struktur der Trilobed β -Propellerdomäne

Wie aus Abbildung 4.32 zu ersehen ist, handelt es sich bei der Trilobed β -Propellerdomäne um eine siebenblättrige β -Propeller-Struktur. Jedes Blatt ist wiederum aus vier antiparallel verlaufenden β -Faltblättern mit unterschiedlich langen Schleifenregionen aufgebaut. Die einzelnen β -Faltblattstränge sind zueinander verkippt, wodurch sich eine Ähnlichkeit mit einem Flugzeugpropeller ergibt. Dieser modulare Grundbaustein ist in Archaea, Bacteria und Eukarya in unterschiedlichsten Proteinen mit einer Vielzahl von Funktionen wie beispielsweise Signalgebung, Protein-Protein-Interaktion, Ligandenbindung oder diverse enzymatische Funktionen vertreten (Paoli, 2001). Trotz einer geringen Sequenzhomologie zwischen den strukturell bereits bekannten Propellerdomänen bleibt die Gesamttopologie mit Variationen in den Schleifenbereichen und der Anzahl der Propellerblätter zwischen vier und acht erhalten.

Anzumerken ist, daß der Bereich von Aminosäure 125 bis 150 in Molekül A und B in der bisherigen Elektronendichte der Trilobed β -Propellerdomäne nicht zu erkennen ist. Lediglich das Tripeptid PAW (Aminosäure 138-140) wird durch hydrophobe Wechselwirkung mit dem Schleifenbereich in Molekül B (Aminosäure 194-197) im Kristallverbund arretiert (Vergleich Abbildung 4.43). Ebenfalls nicht interpretierbar ist der N-terminale Bereich von Aminosäure 1 bis 10 und der C-terminale Bereich von Aminosäure 348 bis 356.

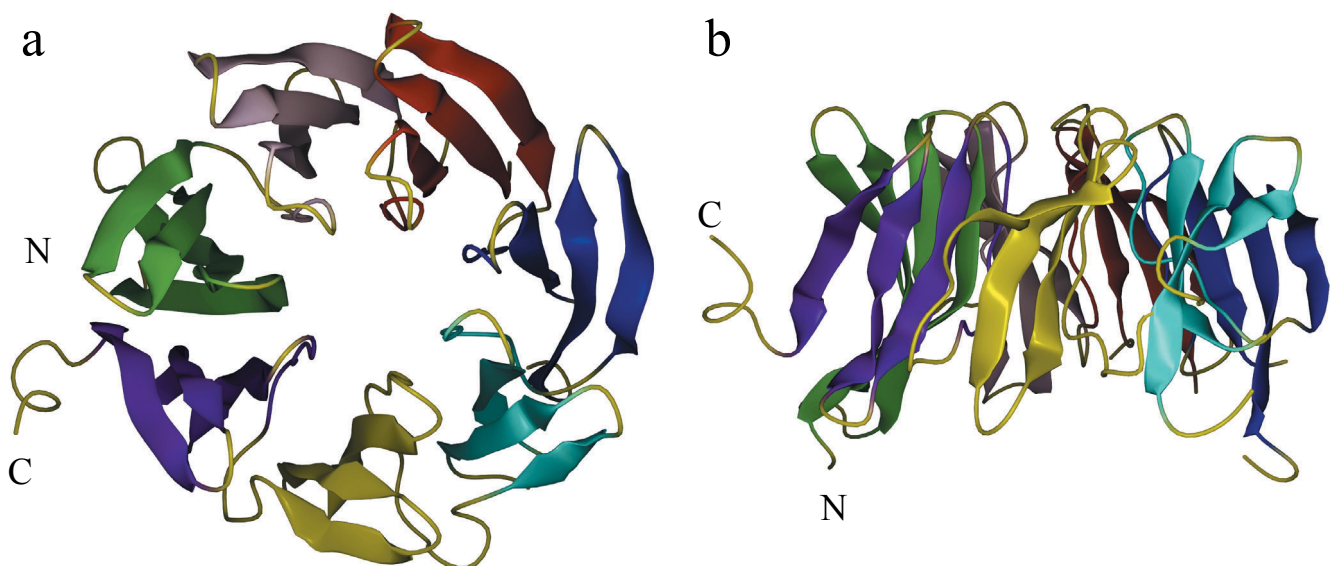


Abb. 4.32: a) Aufsicht auf die β -Propellerdomäne. b) Seitenansicht der β -Propellerdomäne. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen Blätter sind diese in verschiedenen Farben dargestellt und in Klammern die damit assoziierten Aminosäurereste, im Uhrzeigersinn vom N-Terminus beginnend: Blatt 1 grün (11-59), Blatt 2 pink (63-103), Blatt 3 rot (107-170), Blatt 4 blau (174-216), Blatt 5 cyan (219-256), Blatt 6 gelb (266-297) und Blatt 7 (304-347) violett.

Im Gegensatz zu den meisten Propellerdomänen, beispielsweise von G-Proteinen oder Integrinen, zeigt die β -Propellerdomäne der Trilobed-Protease keinen auf den „Velcro“-Mechanismus beruhenden Ringschluß des Propellers. Als „Velcro“ oder Klettverschluss wird die Ausbildung des letzten Propellerblattes bezeichnet, wenn dieses sowohl aus N-terminalen wie auch aus C-terminalen β -Faltblattsträngen besteht. Am häufigsten ist das 1:3 Motiv zu finden.

Der Ringschluß erfolgt bei der Trilobed β -Propellerdomäne wie auch bei der β -Propellerdomäne der Prolyl-Oligopeptidase (POPase) aus Schwein (Fülöp et al., 1998) nur durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Propellerblättern eins und sieben. Eine schematische Darstellung ohne Berücksichtigung der tatsächlichen Längenverhältnisse der einzelnen β -Faltblattstränge bzw. Schleifenregionen ist in Abbildung 4.33 a gegeben. Die Farbgebung der einzelnen Propellerblätter entspricht der aus Abbildung 4.32, die Nummerierung der einzelnen β -Faltblattstränge eines Propellerblattes erfolgt vom Zentrum der Struktur nach außen hin. Die jeweiligen Propellerblätter sind mit eingefärbten Zahlen kenntlich gemacht. Abbildung 4.33 b zeigt schematisch die häufigsten Klettverschlußmechanismen für die Ausbildung einer β -Propellerdomäne mit vier anti-parallel verlaufenden β -Faltblattsträngen.

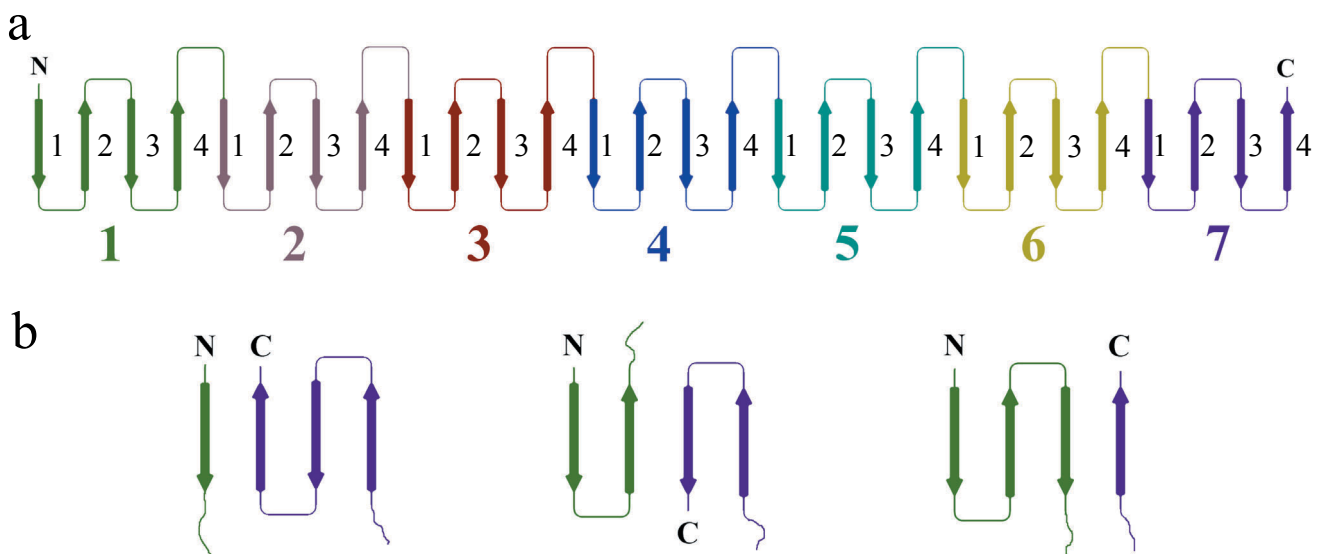


Abb. 4.33: a) Topologiediagramm der TLP β -Propellerdomäne. Vom N-Terminus beginnend sind die einzelnen Propellerblätter wie in Abb. 4.32 coloriert und nummeriert. Die jeweiligen β -Faltblätter sind vom Zentrum der Struktur ausgehend nach außen nummeriert. Der Ringschluß der Propellerstruktur erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Propellerblättern eins und sieben. b) Der häufigste Ringschluß einer Propellerdomäne erfolgt über einen sogenannten Klettmechanismus. Dabei wird das letzte Propellerblatt sowohl von N-terminalen wie auch C-terminalen β -Faltblattsträngen gebildet. Exemplarisch sind nur Möglichkeiten mit vier anti-parallel verlaufenden β -Faltblattsträngen gezeigt wie sie beispielsweise in Sialidase (Crennell et al., 1996, 1SIL, 1:3 Motiv), RCC1 (Renault et al., 1998, 1A12, 2:2 Motiv) und Nitritreduktase (Chen et al., 1998, 2BBK, 3:1 Motiv) vorkommen.

Eine weitere Variation des Klettverschlußmechanismus wird durch die Ausbildung eines Propellerblatts aus fünf β -Faltblattsträngen oder unter Einbeziehung einer α -Helix erzielt. Nur bei den vierblättrigen β -Propellerdomänen wird eine Stabilisierung der Gesamtstruktur durch Ausbildung von Disulfid-Brücken erreicht.

Eine Darstellung der Bindungsstellen der Schwermetallatome ist in Abbildung 4.34 zu sehen. Zur Vereinfachung wurden nur Bindungsstellen in Molekül A berücksichtigt. Die Positionen der einzelnen Schwermetallatome wurde durch Differenzdichteberechnungen zwischen nativem und derivatisiertem Datensatz und anschließendem automatischen Herausgreifen der höchsten Dichten mit dem Programm Peakmax (CCP4, 1994) ermittelt. Durch die Kombination mehrerer Schwermetalldatensätze konnten gute Anfangsphasen mit dem Programm SOLVE (Terwilliger et al., 1999) ermittelt werden. Eine statistische Auswertung der Daten wurde bereits in Tabelle 4.4 gegeben.

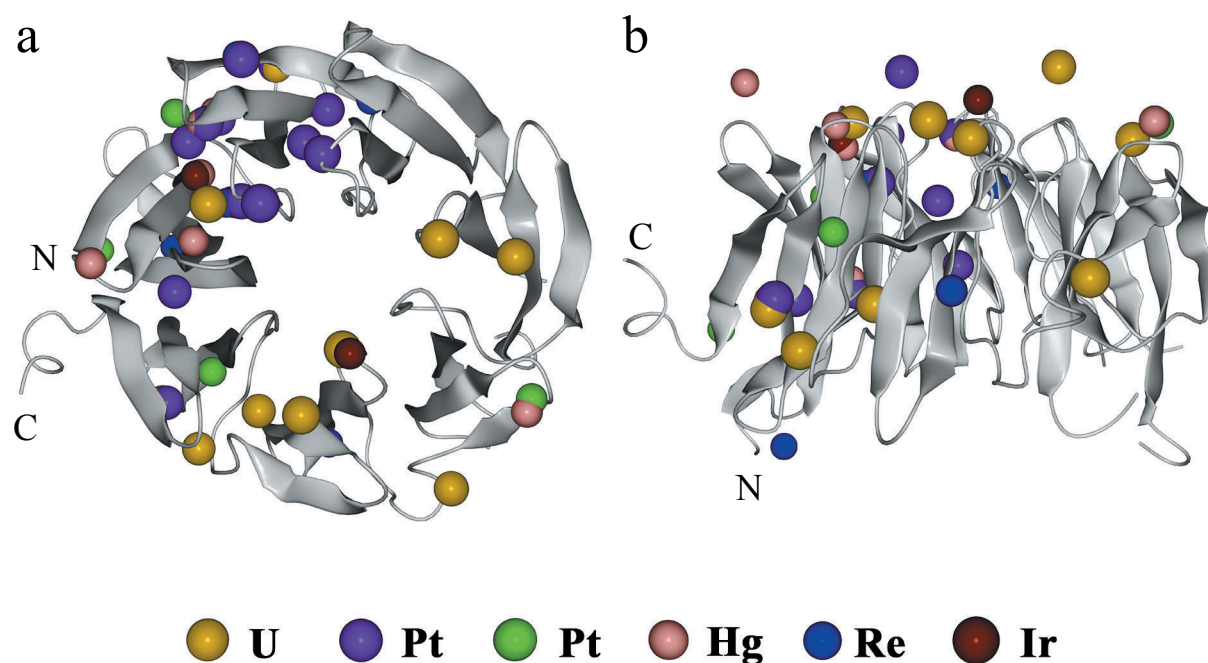


Abb. 4.34: a) Schwermetallbindungsstellen in Molekül A in der Aufsicht und b) in der Seitenansicht. Die Bindungsstellen wurden durch Differenzdichteberechnungen zwischen dem nativen Datensatz und den jeweiligen Schwermetall-Datensätzen bestimmt. Da zwei verschiedene Platinsalze für die Derivatisierung eingesetzt wurden, sind diese hier in unterschiedlichen Farben dargestellt (violett PtBr_4 , grün PtCl_6).

Wie eingangs erwähnt befinden sich zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Nach Verfeinerung der Struktur mit CNS 1.1 (Brünger et al., 1998) zeigen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Verteilung der B-Faktoren in beiden Molekülen, wie aus Abbildung 4.35 zu sehen ist. Blau gezeigte Bereiche weisen dabei einen niedrigen B-Faktor auf, rote oder gelbe Bereiche einen hohen. In Molekül A liegt der durchschnittliche B-Faktor bei 34 \AA^2 , in Molekül B dagegen bei durchschnittlich 54 \AA^2 .

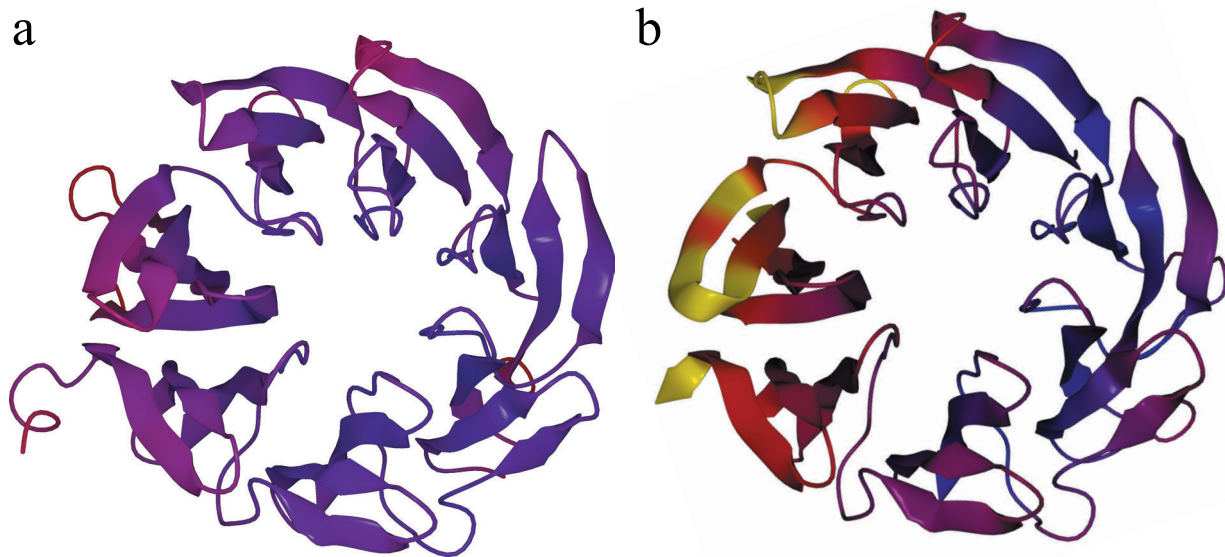
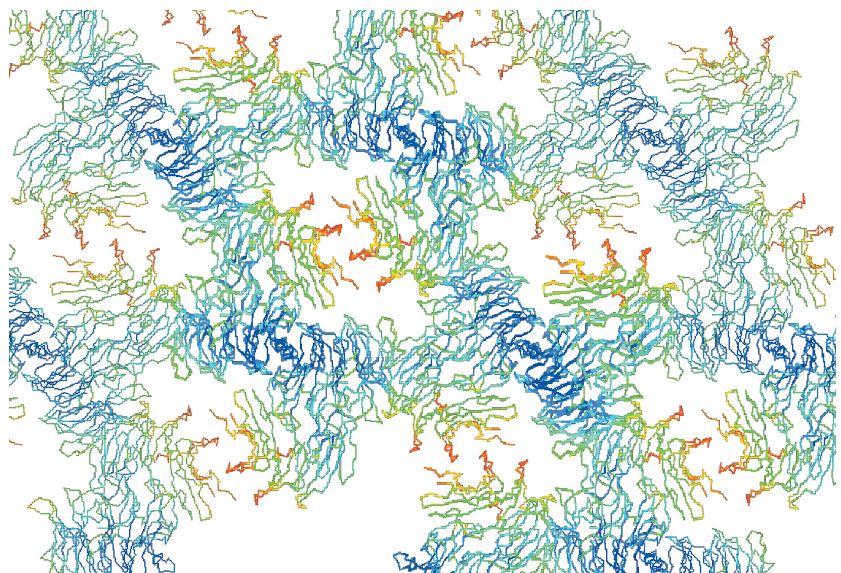


Abb. 4.35: Verteilung der B-Faktoren in beiden Molekülen, blau niedriger B-Faktor, rot hoher B-Faktor. Der Gradient verläuft zwischen 15 und 80 Å². Die gelben Bereiche stellen B-Faktoren >80 Å² dar. Bei genauer Betrachtung sind weitere Unterschiede zu erkennen, da manche Bereiche in Molekül A (a) zugeordnet werden konnten, nicht aber in Molekül B (b) und umgekehrt.

Die Unterschiede in den durchschnittlichen B-Faktoren lassen sich anhand der Kristallpackung erklären (siehe Abbildung 4.36). Molekül A bildet Kristallkontakte zu drei benachbarten Molekülen aus, Molekül B nur zu zwei benachbarten Molekülen. Die Bereiche mit hohen B-Faktoren (Blätter 1, 2 und 7 in Molekül B) weisen eine hohe Flexibilität und damit verbunden auch eine schlecht definierte Elektronendichte in diesen Regionen auf. Häufig ist hier keine vollständige Zuordnung der Seitenketten möglich, teilweise ist auch die C_α-Hauptkette lediglich fragmentiert vorhanden.

Abb. 4.36: Ausschnittsansicht des Kristallgitters der Trilobed β-Propellerdomäne erstellt mit RASMOL (Sayle et al., 1995). Niedrige B-Faktoren sind blau, rot hohe B-Faktoren dargestellt. Gut zu erkennen sind die flexiblen Schleifenbereiche des Moleküls B mit entsprechend hohen B-Faktoren.



Nach Superposition der beiden Moleküle sind die Unterschiede in den Schleifenbereichen deutlich zu erkennen, in blau ist Molekül A und in rot Molekül B dargestellt (siehe Abbildung 4.37). Die Bereiche mit besonders großen Unterschieden in der C_{α} -Kette sind anhand der Aminosäurereste kenntlich gemacht.

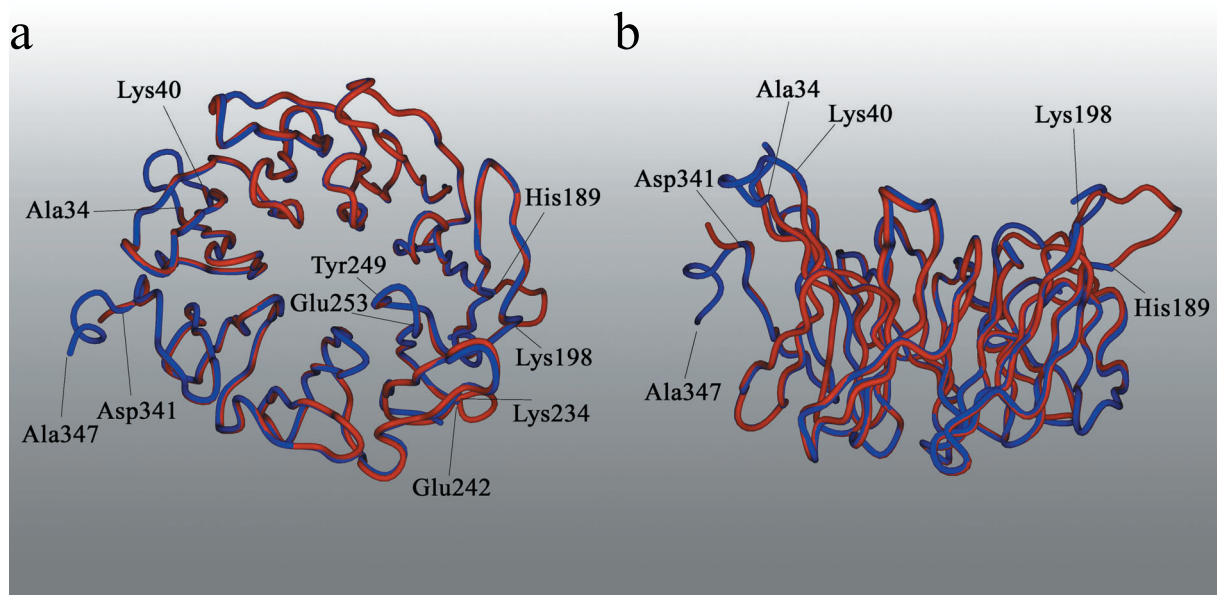


Abb. 4.37: Superposition der C_{α} -Hauptketten von Molekül A (blau) und B (rot) der Trilobed β -Propellerdomäne in Auf- und Seitenansicht. Unterschiedliche Abschnitte wurden durch Beschriftung der Start- und Endpunkte der jeweiligen Aminosäurereste hervorgehoben. In Molekül A (blau) sind folgende Aminosäurereste nicht in der Elektronendichte zuzuordnen: His189-Lys198 und in Molekül B (rot) Ala34-Lys40 sowie Asp341-Ala347. Die Bereiche von Lys234-Glu242 und Tyr249-Glu253 weisen einen unterschiedlichen Kettenverlauf der C_{α} -Positionen auf.

Aufgrund der pseudo-siebenfache Symmetrie der einzelnen Propellerblätter lassen diese sich ebenfalls übereinander legen und auf Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede hin untersuchen. Die einzelnen Blätter unterscheiden sich allerdings in ihrer Gesamttopologie nur geringfügig (siehe Abbildung 4.38 a). Abbildung 4.38 b verdeutlicht anhand eines Propellerblattes die Torsion der einzelnen β -Faltblattstränge zueinander, so daß es fast zu einer 90° -Verkipfung zwischen dem ersten und vierten Strang kommt.

Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich ist, weisen die einzelnen Propellerblätter nur eine geringe Sequenzidentität für die zur Deckung gebrachten Reste auf. Die entsprechenden C_{α} -Atome der jeweiligen Blätter lassen sich dennoch mit geringfügigen Abweichungen übereinander legen (vgl. Abbildung 4.38 a).

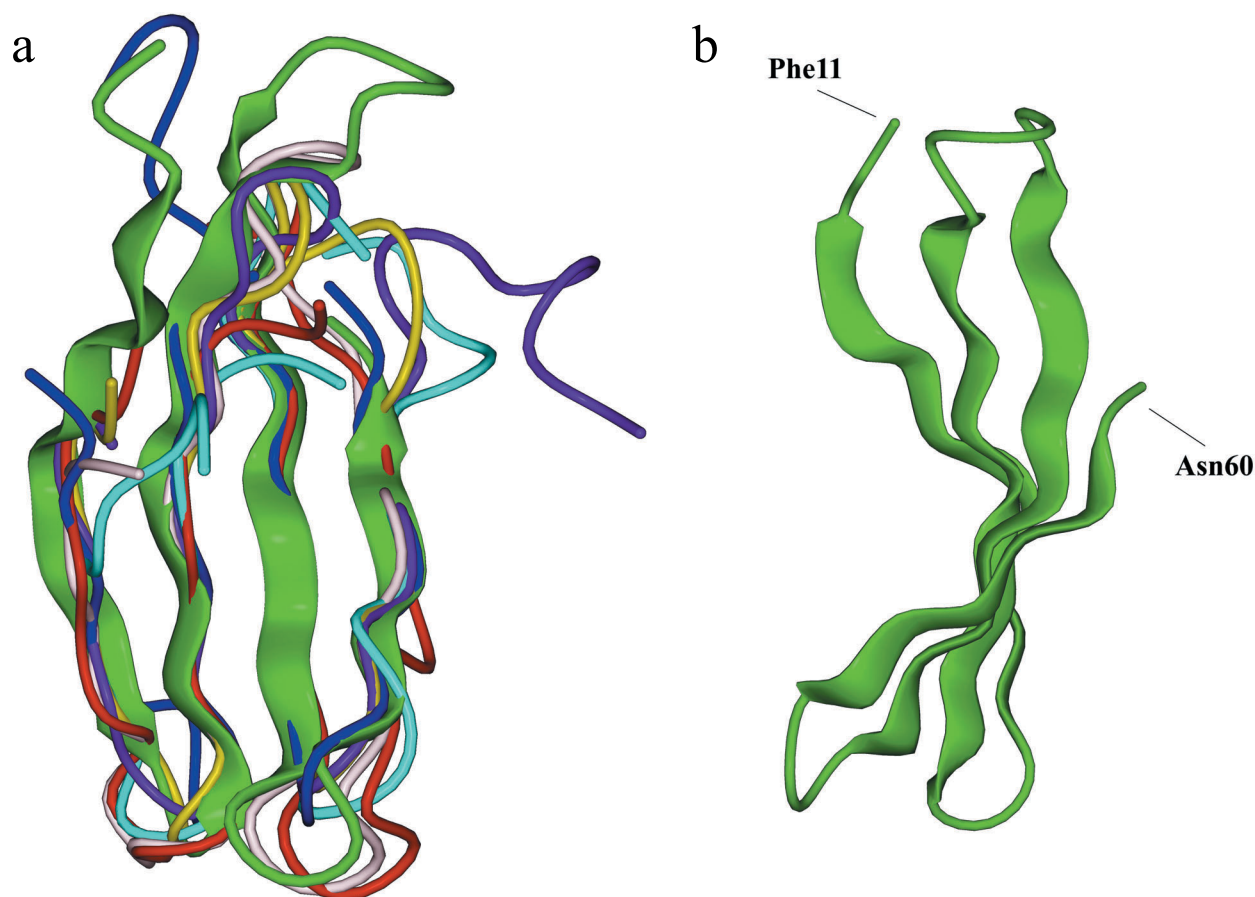


Abb. 4.38: a) Superposition der einzelnen Propellerblätter der TLP- β Domäne. Blatt 1 ist als Bändermodell hervorgehoben, die anderen Blätter des Propellers sind aus Übersichtsgründen als Fadenmodell dargestellt. Die Farbgebung der einzelnen Propellerblätter erfolgte in Anlehnung an Abbildung 4.32. b) Seitenansicht des ersten Propellerblattes vom Zentrum der Struktur ausgehend betrachtet. Die einzelnen β -Faltblattstränge sind zueinander leicht verkippt, so daß zwischen dem innersten und dem äußersten Strang ein deutlicher Torsionswinkel von nahezu 90° zu erkennen ist.

Blatt #	Anzahl Reste	Übereinstimmung in C_α -Atomen	Identische Reste	r.m.s.d. in Å	Strukturelle Diversität
1	50	18	16.7 %	0.96	5.45
2	44	24	16.7 %	0.83	2.68
3	44	21	19.0 %	1.52	6.38
4	40	19	15.8 %	0.87	4.46
6	40	25	28,0 %	0.99	2.93
7	44	25	32.0 %	1.05	3.10

Tab. 4.5: Auswertung der durch Superposition mit dem Programm TOP (Lu, 2000) erhaltenen statistischen Werte. Gezeigt sind die Anzahl der Reste der Propellerblätter und ihre jeweiligen Übereinstimmungen der C_α -Atom-Positionen mit Blatt 5. Von den Übereinstimmungen ausgehend wurden die identischen Reste prozentual wiedergegeben. Anhand des r.m.s.d.-Wertes ist die Abweichung der C_α -Atome abzulesen. Aufgrund der strukturellen Diversität zwischen zwei Propellerblättern können phylogenetische Beziehungen zueinander aufgezeigt werden.

4.2.6 Strukturbasiertes Sequenz-Alignierung der β -Propellerblätter

Anhand der mit dem Programm TOP (Lu, 2000) superpositionierten Propellerblätter wurden funktionell identische bzw. konservierte Reste identifiziert und mit den Programmen JOY (Mizuguchi et al., 1998) und ClustalX (Thompson et al., 1997) aligniert. Abbildung 4.39 a zeigt die strukturbasierte Alignierung der Aminosäuresequenzen in Bezug auf die einzelnen Propellerblätter. In der topologischen Repräsentation kann an der Höhe der Balken der Konservierungsgrad einzelner Reste abgelesen werden. Abbildung 4.39 b zeigt eine mögliche evolutionäre Entwicklung der einzelnen Propellerblätter, berechnet mit ClustalX (Thompson et al., 1997) aufgrund ihrer Sequenzhomologien zueinander und unter Ausschluß von Genaustausch zwischen den Spezies. Demnach sind die Blätter 6 und 7 die ursprünglichsten, die weiteren Blätter könnten durch Genduplikation und Insertionen bzw. Mutationen in den Schleifenbereichen aus ihnen hervorgegangen sein.

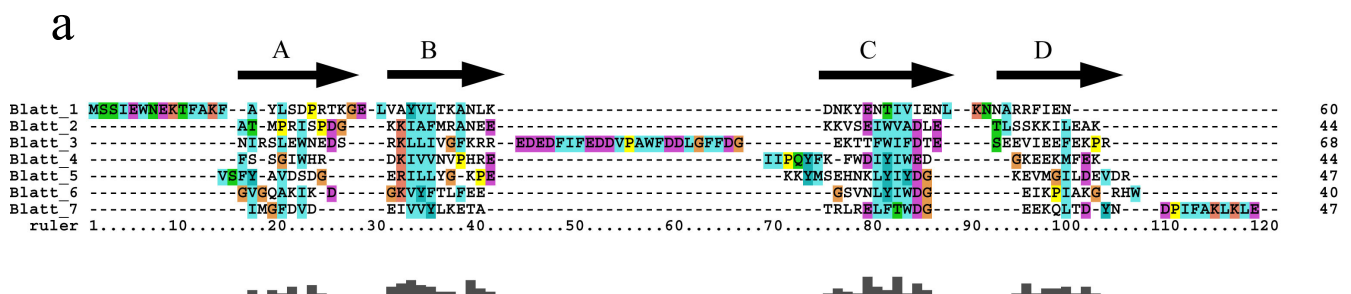
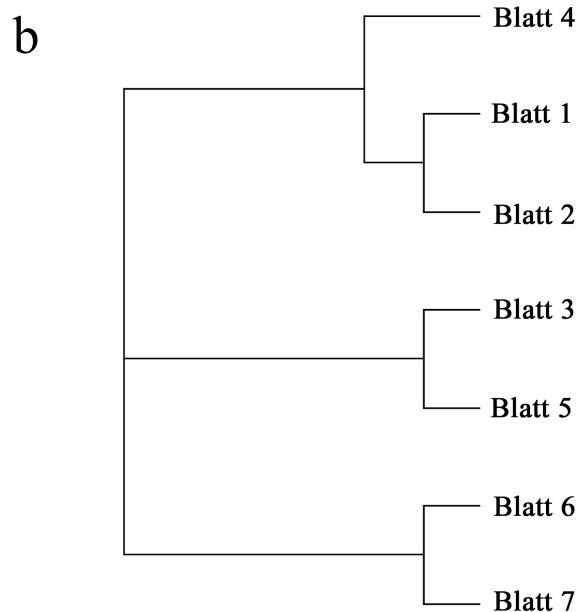


Abb. 4.39: a) Strukturbasierte Sequenz-Alignierung der sieben Blätter der β -Propellerdomäne berechnet mit Clustal X (Thompson et al., 1997). Die topologische Darstellung stellt die konservierten Aminosäurepositionen dar.

b) Phylogenetische Repräsentation der Verwandtschaft zwischen den einzelnen Blättern der Struktur. Die Blätter 6 und 7 sind die ursprünglichsten aus denen die weiteren Blätter durch konservative Substitution beziehungsweise Insertion von Schleifenbereichen hervorgegangen sein könnten.



4.2.7 Oberflächeneigenschaften der Trilobed β -Propellerdomäne

In der folgenden Abbildung 4.40 sind die Oberflächeneigenschaften der TLP- β Propellerdomäne aufgrund der Lage von geladenen und hydrophoben Aminosäureresten dargestellt. Deutlich sichtbar ist die Anhäufung saurer Reste im Bereich der Pore. An der dem Cytosol zugewandten Seite zeigt sich eine Gesamtverteilung der geladenen Reste, die an den siebenblättrigen β -Propeller erinnert (Abbildung 4.40 a). Die Unterseite der Domäne, die in der Gesamtstruktur dem aktivem Zentrum zugewandt sein könnte, ist dagegen von großflächigen hydrophoben Bereichen überzogen (Abbildung 4.40 b). Ebenfalls gut zu erkennen ist die trichterförmige Anordnung der Domäne, die sich im Gesamtkomplex in Richtung auf das aktive Zentrum der katalytischen Domäne erweitert (Abbildungen 4.40 c+d). Abbildung 4.41 zeigt alle Asparaginsäurereste eines Moleküls. An der Porenöffnung entsteht durch eine Häufung von 9 sauren Resten ein geladener Ring.

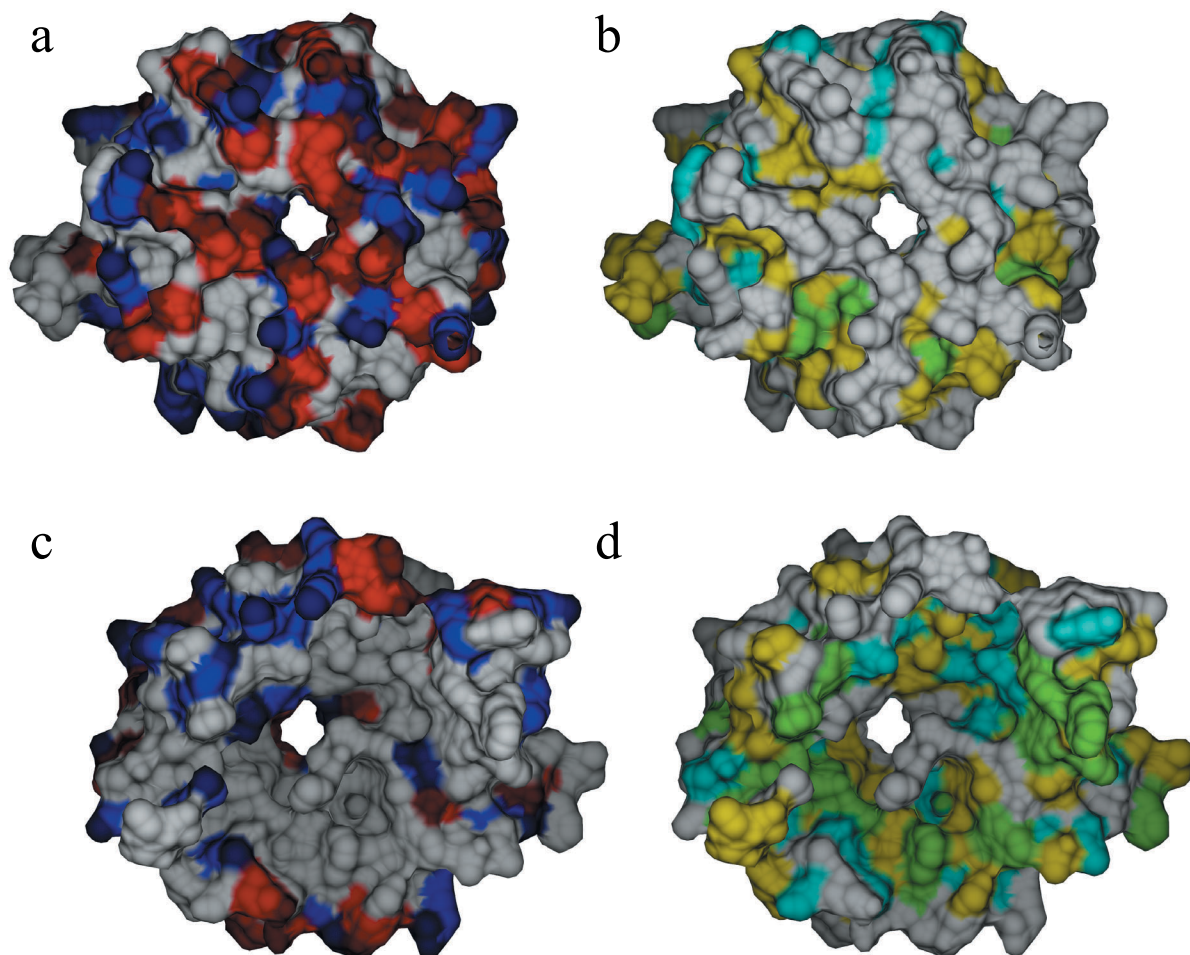


Abb. 4.40: a) Aufsicht und Verteilung der sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Aminosäurereste. b) Aufsicht und Verteilung der polaren (cyan, Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asn, Gln), aromatischen (grün, Phe, Tyr, Trp) und aliphatischen (gelb, Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) Reste. c) Bodenansicht der sauren und basischen Reste. d) Bodenansicht der polaren, aromatischen und aliphatischen Reste.

Abb. 4.41: Aufsicht entlang der pseudo-siebenfachen Achse der TLP- β Propellerdomäne. Als Stäbchenmodell sind sämtliche Asparaginsäurereste hervorgehoben.

Nur die Reste, die sich unmittelbar in der Nähe der Porenöffnung befinden, sind entsprechend ihrer Position gekennzeichnet. Sie sind an der Ausbildung eines sauren Ringes beteiligt.

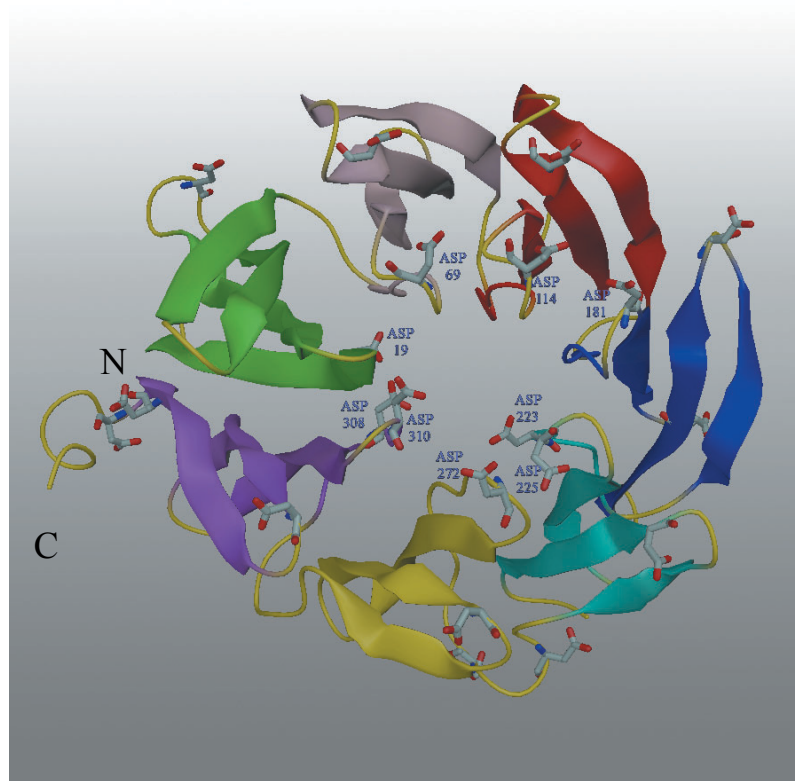


Abbildung 4.42 zeigt die elektrostatische Ladungsverteilung an der Oberfläche der TLP- β Propellerdomäne unter physiologischen Bedingungen, berechnet mit dem Programm GRASP (Nicholls et al.,1991). In den beiden Schnitten ist die Ladungsverteilung innerhalb der Pore gut zu erkennen (Abbildung 4.42 c). Der saure Ring ist im oberen Teil der Pore annähernd geschlossen.

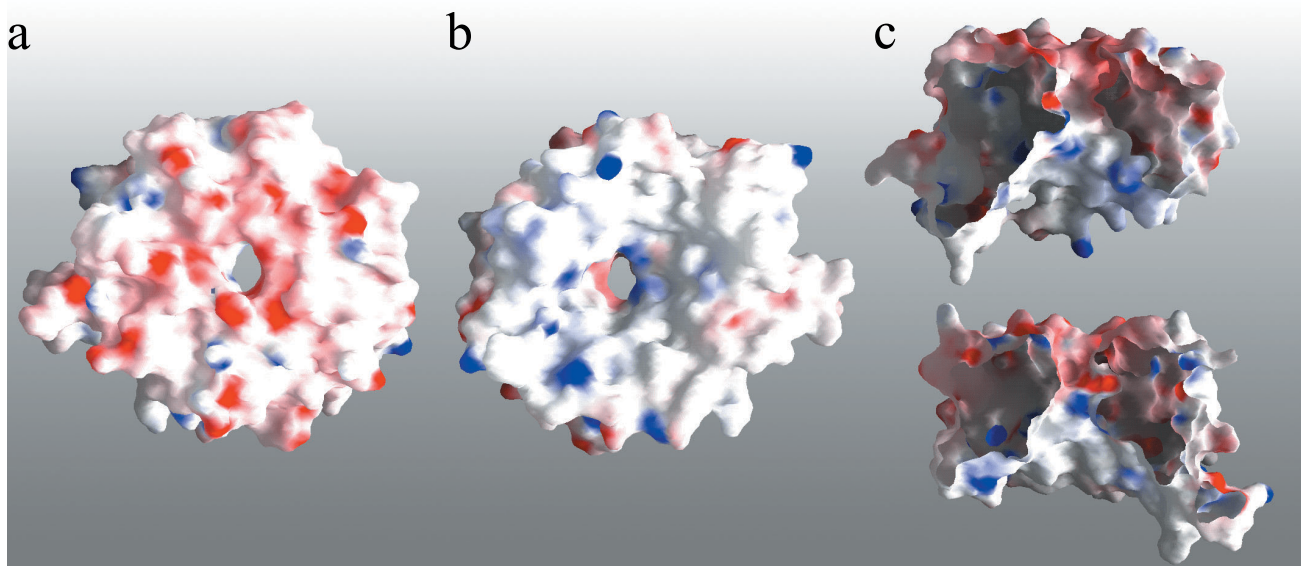


Abb. 4.42: Elektrostatische Ladungsverteilung berechnet mit dem Programm GRASP (Nicholls et al.,1991) bei einer Salzkonzentration von 200 mM; die Anordnung des Moleküls entspricht der vorherigen Abbildung. a) Aufsicht. b) Bodenansicht. c) Seitlicher Medianschnitt, um die Ladungsverteilung innerhalb der Öffnung sichtbar zu machen.

4.2.8 Tripeptid PAW gebunden an Trilobed β -Propellerdomäne

Während der Verfeinerungsprozedur konnte eine deutlich sichtbare Dichte zwischen beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit eindeutig der Aminosäuresequenz PAW zugeordnet werden. Dieses Tripeptid entspricht einem Teil des fehlenden Schleifenbereiches zwischen Aminosäure 125 - 150, genauer gesagt handelt es sich um die Aminosäurereste 138 - 140. Abbildung 4.43 zeigt die beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit nach B-Faktoren eingefärbt. Das Tripeptid ist als Stäbchenmodell hervorgehoben und mit der entsprechenden Elektronendichte bei einem Konturierungsgrad von 1.5σ umgeben. Eine vergrößerte Darstellung der Region, an die das Peptid gebunden ist, ist in Abbildung 4.43 b zu sehen.

Durch diese Interaktion wird der Schleifenbereich von Molekül B in der Region von His189 bis Phe199 in seiner Flexibilität eingeschränkt und kann in die vorhandene Elektronendichte modelliert werden. In Molekül A konnte dieser Bereich nicht zugeordnet werden, da selbst bei einem Konturierungsgrad von 0.5σ nur Fragmente des C_{α} -Rückgrats des Schleifenbereiches erkennbar waren.

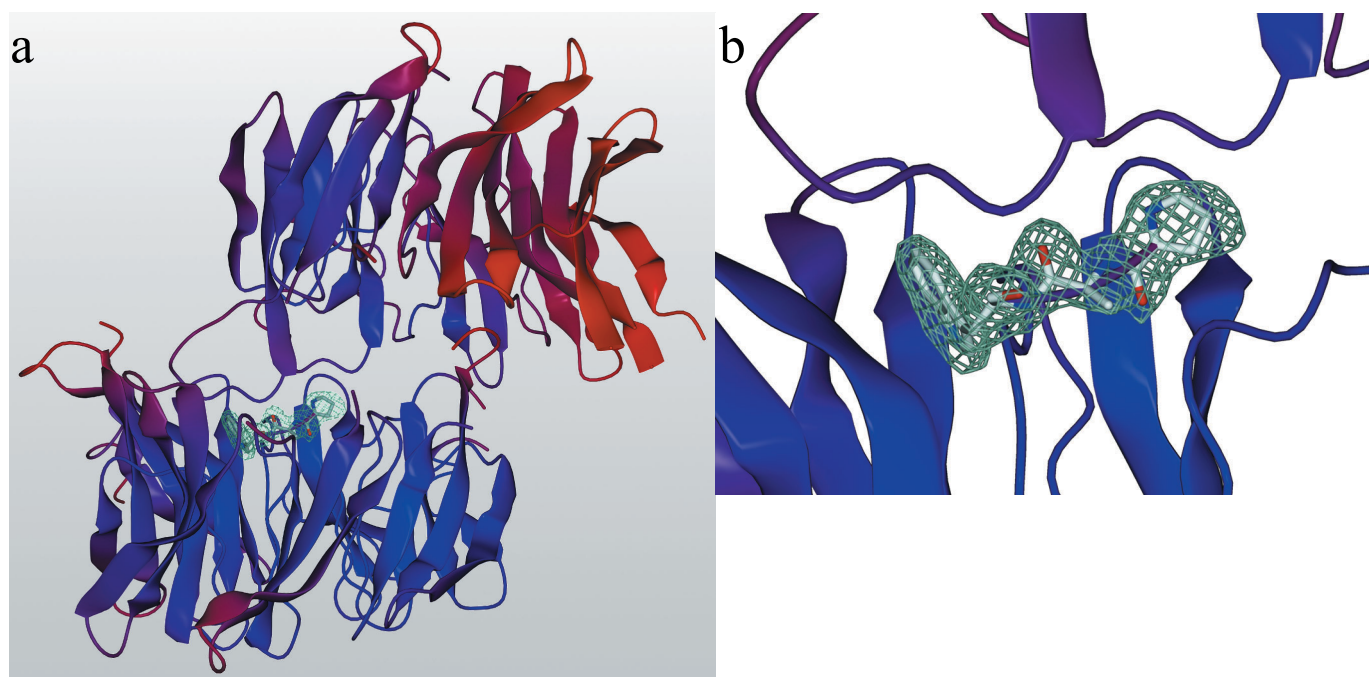


Abb. 4.43: PAW-Tripeptid gebunden von einem Schleifenbereich (Pro194, Gln195, Tyr196, Phe197) in Propellerblatt Nr. 4 von Molekül B. Beide Moleküle sind entsprechend ihrer B-Faktoren eingefärbt. a) Übersicht einer asymmetrischen Einheit, die Elektronendichte um das Tripeptid ist mit einem Konturierungsgrad von 1.5σ in cyan dargestellt. b) Ausschnittsvergrößerung der Peptidbindungsregion.

Abbildung 4.44 a zeigt anhand einer Oberflächenrepräsentation den Interaktionsbereich des Tripeptid PAW eingefärbt nach hydrophoben und hydrophilen Aminosäureresten. Das Tripeptid ist als Stäbchenmodell hervorgehoben und mit der entsprechenden Elektronendichte bei einem Konturierungsgrad von 1.5σ in blau umgeben. Abbildung 4.44 b zeigt eine elektrostatische Übersicht der beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit als halbaufgeschnittene GRASP (Nicholls et al.,1991) Darstellung. Der grüne Pfeil deutet die Peptidbindungsstelle zwischen den beiden Molekülen an. Möglicherweise dient der in die Peptidbindung involvierte Schleifenbereich (His189 - Phe199) der Substraterkennung und -zuführung zum aktiven Zentrum der Trilobed-Protease. Weitere röntgenkristallographische Untersuchungen könnten eine Antwort auf diese Frage geben.

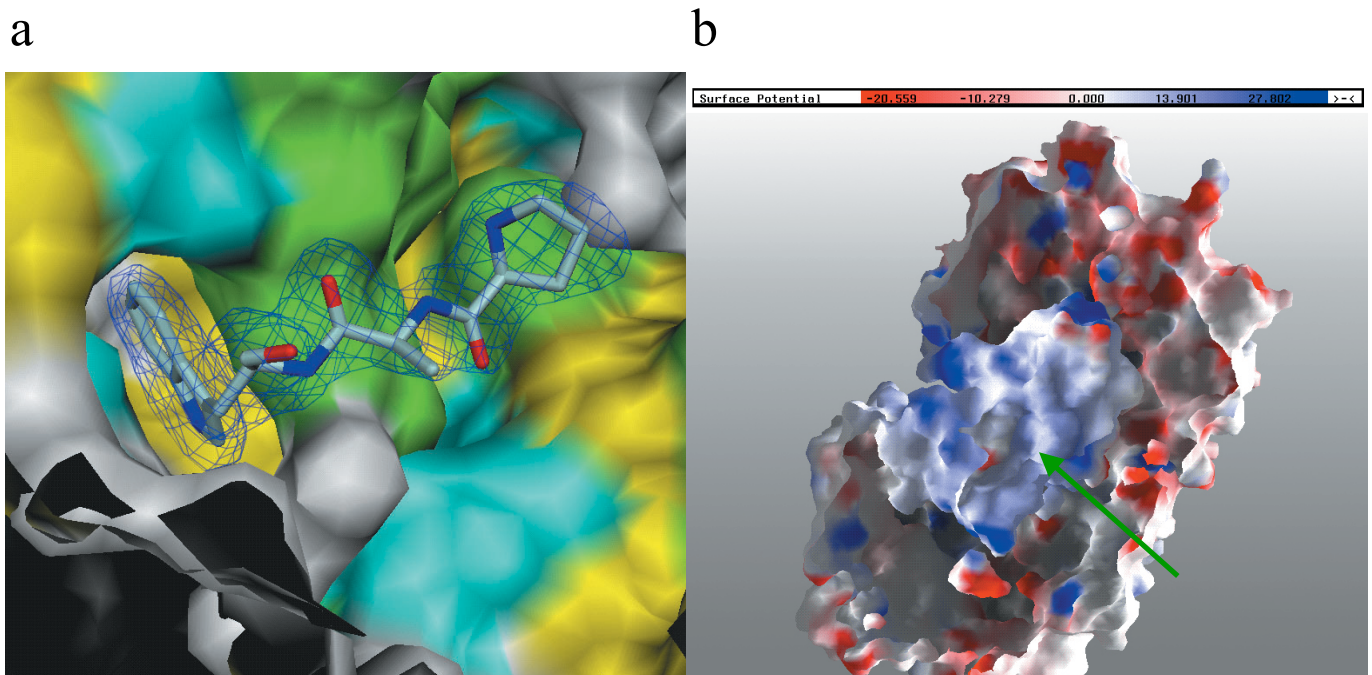


Abb. 4.44: a) Verteilung der polaren (cyan, Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asn, Gln), aromatischen (grün, Phe, Tyr, Trp) und aliphatischen (gelb, Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) Reste im Bereich der Peptidbindung. b) Elektrostatische Ladungsverteilung unter physiologischen Bedingungen in dieser Region. Das Peptid wurde in dieser Abbildung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt, der grüne Pfeil deutet die Peptidbindungsstelle an.

4.3 Trilobed-Protease

4.3.1 Expression und Proteinreinigung der Trilobed-Protease

Die Expression erfolgte wie im Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit beschrieben (vgl. Punkt 3.2.5.2). Das Protein konnte in großen Mengen von 30 mg pro Liter TB-Medium isoliert werden. Anhand eines Aktivitätstest (siehe Punkt 3.2.6.5) wurden die aktiven Fraktionen nach den jeweiligen Reinigungsstufen ermittelt und vereinigt.

Das intakte Protein wird als Trimer mit einer Gesamtmasse von ca. 220 kDa gereinigt, um im SDS-PAGE Gel eine Monomer-Bande mit 72 kDa zu erhalten, mußte der SDS-Auftragspuffer zusätzlich mit 0.1% TCA Endkonzentration versetzt werden. Abbildung 4.45 zeigt zwei SDS-PAGE Gele nach einer hydrophoben Interaktionschromatographie des hitzegefällten Rohlysats. Die Fraktionen 4-108 wurden vereinigt und über Nacht im Auftragspuffer der Anionenaustauschchromatographie dialysiert.

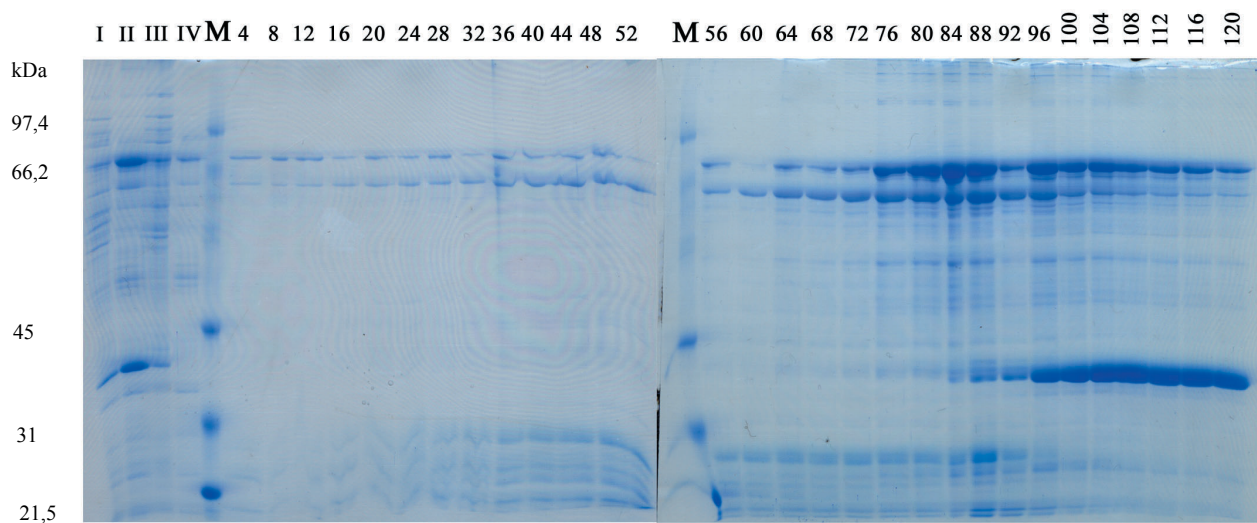


Abb. 4.45: 12.5% SDS-PAGE der Fraktionen nach hydrophober Interaktionschromatographie. Spur I enthält 1 µl Rohextrakt nach Aufschluß der Zellen; Spur II 1 µl des hitzegefällten, abzentrifugierten Überstandes. In den Spuren III + IV sind das hitzegefällte, resuspendierte Pellet bzw. 1 µl des Durchflusses der hydrophoben Interaktionssäule zu sehen. Die weiteren Spuren sind entsprechend der gesammelten Fraktionsnummern benannt, es wurden jeweils 3 µl von 1000 µl aufgetragen.

Abbildung 4.46 zeigt ein SDS-PAGE Gel nach Anionenaustauschchromatographie. Deutlich erkennbar ist die Zunahme der Homogenität des Proteins im Vergleich zum ersten Reinigungsschritt. Die Fraktionen 2-12 wurden vereinigt und anschließend auf eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml eingengt.

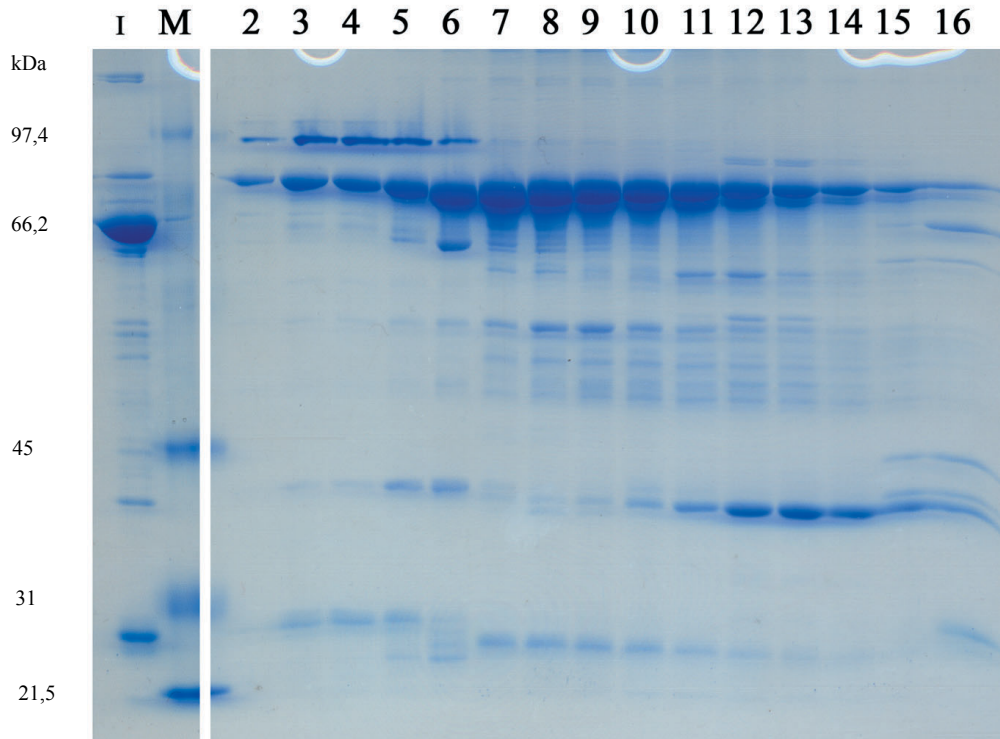


Abb. 4.46: SDS-Gel nach Anionenaustauschchromatographie. In Spur I wurde 1 μ l der vereinigten Fraktionen des 60-100% Waschschrilles aufgetragen. Deutlich zu sehen ist die Abtrennung von Verunreinigungen, die stärker an die Säulenmatrix binden als die Trilobed-Protease. Die Spuren 2-16 enthalten jeweils 3 μ l von 1000 μ l der gesammelten Fraktionen.

4.3.1 Kristallisation der Trilobed-Protease

Abbildung 4.47 a zeigt 1 μl des konzentrierten Proteins auf einem 12.5% SDS-Gel. Erste Kristallisationsansätze bei 20 °C im Hanging-Drop-Experiment eines Sparse-Matrix-Screens (Jancarik et al., 1991; Cudney et al., 1994) führte zu vielversprechenden Kristallen, wobei sich unter identischen Bedingungen möglicherweise zwei unterschiedliche Kristallformen ausbilden, wie in Abbildung 4.47 b und c zu sehen ist.

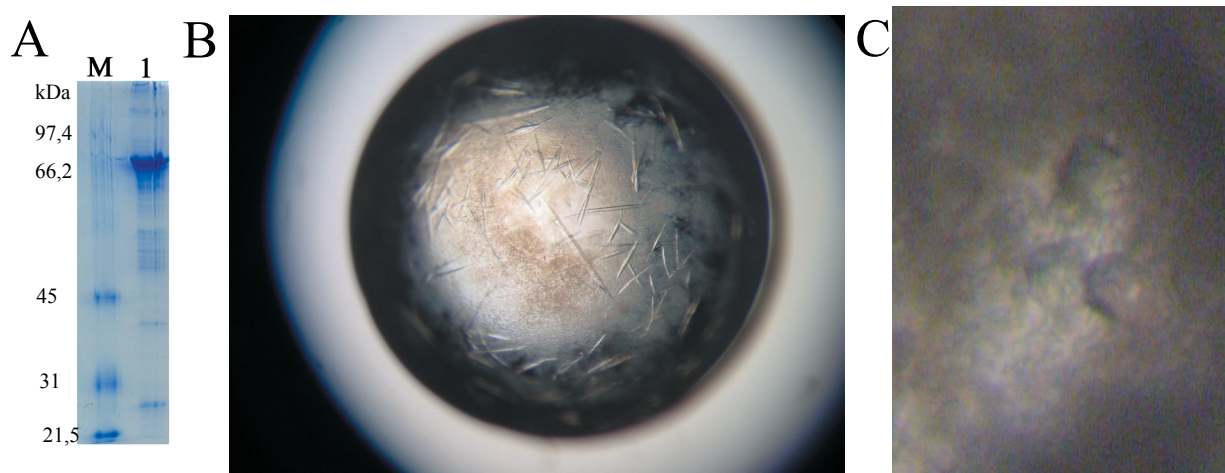


Abb. 4.47: a) 12.5% SDS-PAGE der konzentrierten Proteinpräparation. b) Nadelförmige Kristalle der Trilobed-Protease mit einer maximalen Größe von ca. $800 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ (20 °C, 18% PEG 8000, 2% MPD, 200 mM MgCl_2 , 100 mM MES pH 6.5). c) Oktaedrische Kristalle der Trilobed-Protease mit einer maximalen Größe von $40 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$ (20 °C, 18% PEG 8000, 6% MPD, 200 mM MgCl_2 , 100 mM MES pH 6.5). In beiden Fällen wachsen die Kristalle aus präzipitiertem Protein, dadurch wird eine Fokussierung mit einer Digitalkamera erschwert.

Die nadelförmigen Kristalle sind bereits nach 48 h sichtbar und wachsen weitere 2-3 Wochen zu einer maximalen Größe von ca. $800 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$. Während der Wachstumsphase löst sich das Präzipitat nahezu vollständig auf. Die oktaedrische Kristallform erscheint nach ca. 4-6 Tagen, teilweise unter identischen Bedingungen wie die nadelförmigen Kristalle. Ein signifikantes Wachstum ist nicht erkennbar und das Präzipitat löst sich nicht auf, die Dimensionen dieser Kristalle beträgt ca. $40 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$.

Eine Strukturlösung der Trilobed-Protease sollte durch einen molekularen Ersatz anhand der Trilobed β -Propeller Struktur möglich sein. Für den Fall, daß die β -Propeller Struktur in der Gesamtstruktur eine deutlich andere Konformation als in der TLP- β Propellerdomäne einnimmt, sollten die bereits für die β -Propellerdomäne gefundenen Schwermetallerivate auch für die Gesamtstruktur eingesetzt werden können.

5. Analyse und Diskussion

5.1 Tricorn-Protease

5.1.1 Funktion und Domänenaufbau der Tricorn-Protease

Die Tricorn-Protease ist in fünf Domänen unterteilt, sie enthält zwei N-terminale β -Propellerdomänen ($\beta 6$:M39-D310; $\beta 7$:A326-K675), gefolgt von zwei α/β Domänen (C1:S681-G752; C2:R856-N1061), die wiederum durch eine PDZ-ähnliche Domäne (PDZ:R761-D855) voneinander getrennt sind. Die Lage der PDZ-Domäne wurde bereits von Ponting et al. (1999) korrekt vorhergesagt. Abbildung 5.1 gibt sowohl einen schematischen wie auch einen räumlichen Aufbau der Tricorn Domänen wieder, die katalytischen Reste (H746, S965, D966) sind als Kalottenmodell hervorgehoben.

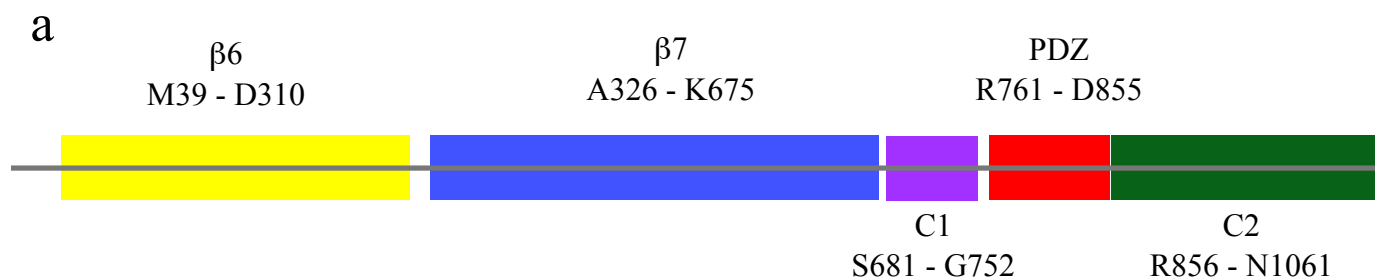
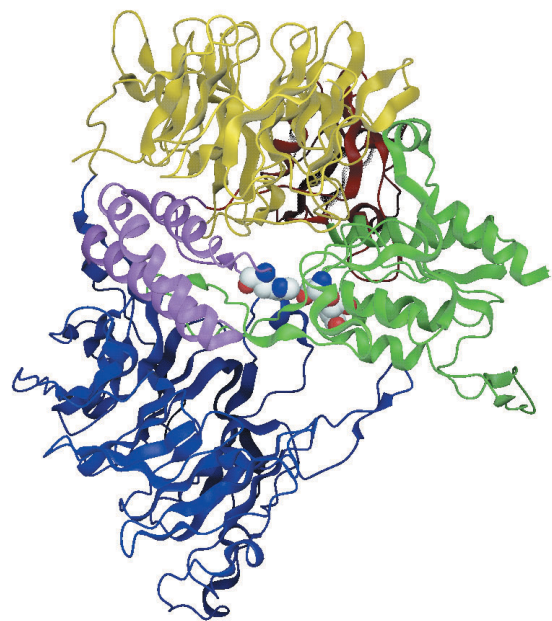


Abb. 5.1: a) Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Tricorn-Protease pro Untereinheit. Die beteiligten Reste der Domänen sind mit Start- und Endpunkten angegeben. b) Bändermodell einer Untereinheit, die Farben wurden entsprechend der Domänenorganisation gewählt, die an dem aktiven Zentrum beteiligten Reste sind als Kalottenmodell hervorgehoben. Der $\beta 6$ -Propeller (gelb) liegt im peripheren Bereich eines Tricorn Homohexamers, der $\beta 7$ -Propeller (blau) bildet dagegen die zentrale Pore des Homohexamers aus.



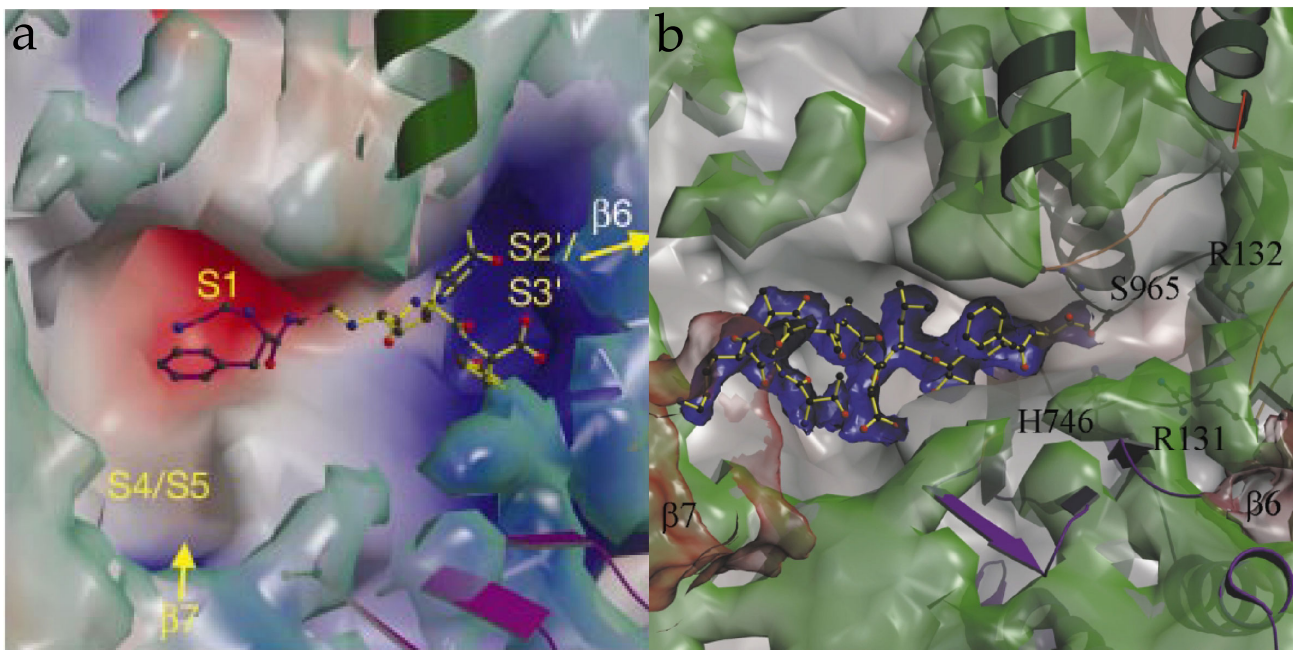


Abb. 5.2: a) Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums der Tricorn-Protease nach elektrostatischem Potential eingefärbt. Die S1-Bindungsstelle ist sauer (rot), S2/S3 sind stark basisch und S4/S5 leicht positiv geladen (Brandstetter et al. 2001). b) In blau ist die Elektronendichte eines kovalent an S965 gebundenen Trideka-Peptid-Inhibitors zu erkennen (Kim et al. 2002).

Abbildung 5.2 zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des aktiven Zentrums der Tricorn-Protease in einer aufgeschnittenen Oberflächendarstellung. Die beiden Reste H746 und S965 wurden sowohl durch Mutationsstudien als auch durch kovalente Bindung von Inhibitoren bestätigt, jedoch konnte bisher in keiner der veröffentlichten Strukturen eine derartig inhibitorische Bindung zu D966 nachgewiesen werden. Die Tricorn-Protease zählt somit zu der Familie der Serin-Proteasen, wie bereits eingangs erwähnt wurde.

Der katalytische Mechanismus des aktiven Zentrums sowie die Substraterkennung der Tricorn-Protease wurde bereits in Brandstetter et al. (2001) und Kim et al. (2002) besprochen. Die Funktion der beiden β -Propellerdomänen bleibt jedoch unklar, wie im folgenden erläutert werden soll.

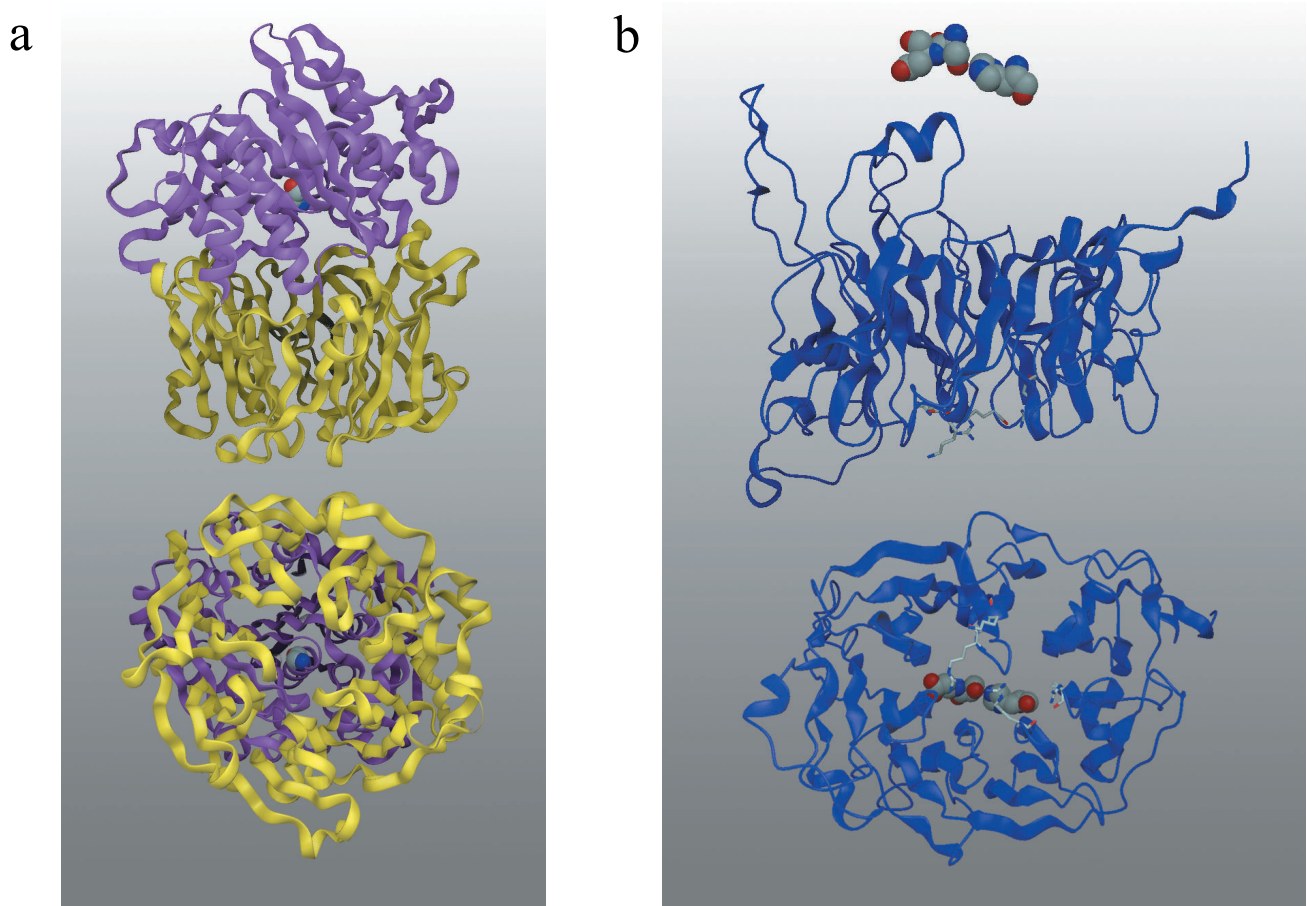


Abb. 5.3: a) Struktur der Prolyl-Oligopeptidase in Seitenansicht und entlang der β -Propellerdomäne. Das aktive Zentrum ist in beiden Ansichten als Kalottenmodell hervorgehoben. b) Seitenansicht und Sicht entlang des β 7-Propellers einer Untereinheit der Tricorn-Protease. Das aktive Zentrum ist ebenfalls als Kalottenmodell hervorgehoben. Die Reste R369, R414, R645 und K646 sind als Stäbchenmodell hervorgehoben, sie bilden einen Verschluss zur Pore des β 7-Propellers aus.

Brandstetter et al. (2001) folgern aus der Struktur der Prolyl-Oligopeptidase (Fülöp et al., 1998) eine ähnliche Funktion für den β 7-Propeller der Tricorn-Protease (TRI- β 7), siehe Abbildung 5.3 a. In diesem Falle würde durch den β 7-Propeller das Substrat zum räumlich direkt darunterliegenden aktiven Zentrum geleitet werden. Zuvor müsste jedoch der Verschluss bestehend aus den Resten R369, R414, R645 und K646 geöffnet werden.

Abbildung 5.4 a zeigt eine Tricorn β 7-Untereinheit als Oberflächendarstellung saure und basische Reste erscheinen rot bzw. blau gefärbt, mit Blick entlang dem TRI- β 7-Propeller Kanal. Der Verschluss, angedeutet durch einen grünen Pfeil, versperrt den Eingang des β 7-Propellers zum darunterliegenden aktiven Zentrum. Abbildung 5.4 b zeigt eine GRASP (Nicholls et al., 1991) Darstellung des halbaufgeschnittenen TRI- β 7-Propeller Kanals, in der Seitenansicht ist der Verschluss nochmals sehr deutlich zu erkennen. Der weite TRI- β 7-Propeller Kanal wird durch den blauen Pfeil angedeutet.

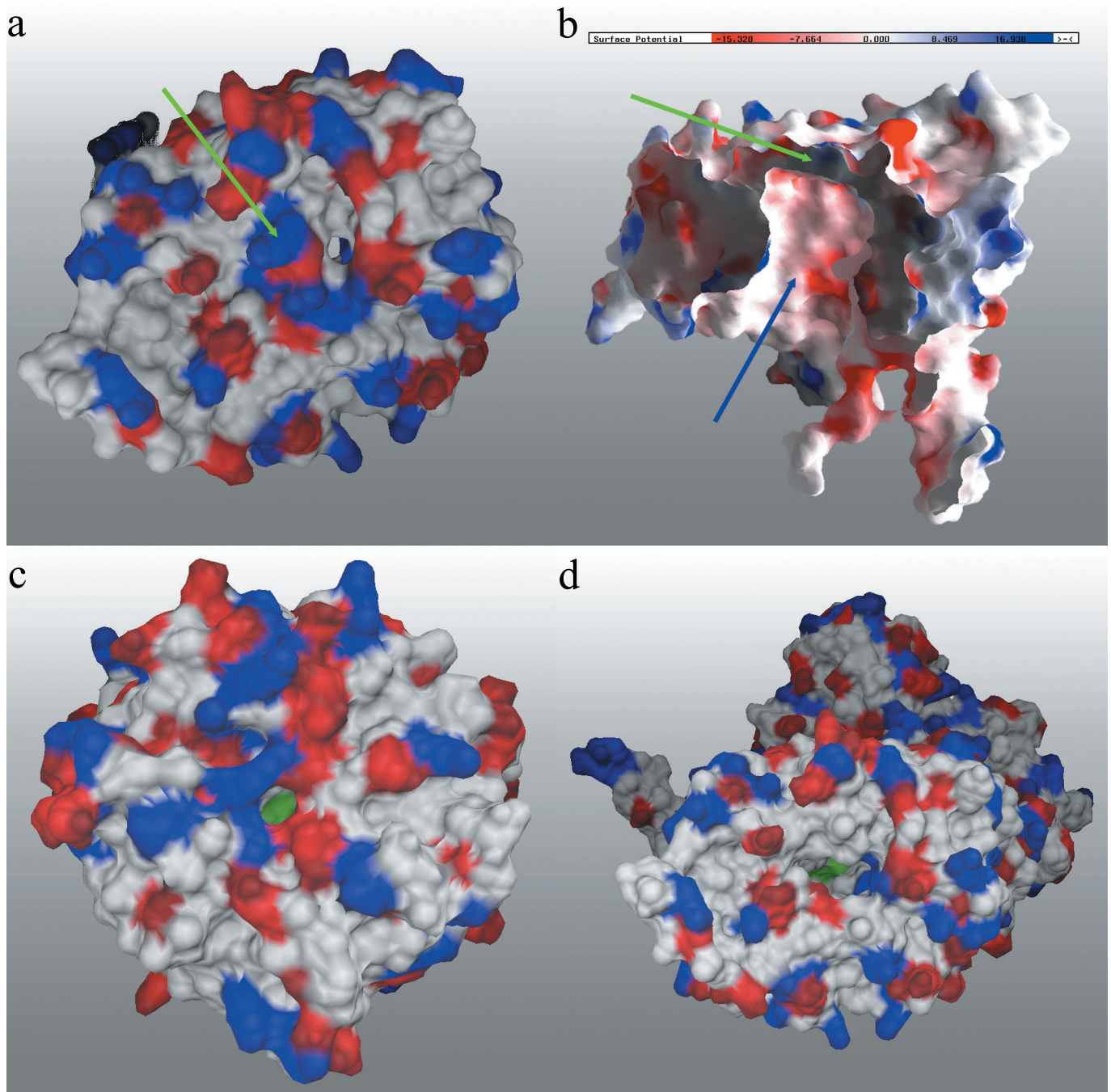


Abb. 5.4: a) Oberflächendarstellung einer Tricorn $\beta 7$ -Untereinheit nach sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Resten eingefärbt. Der grüne Pfeil deutet den Verschluss zum aktiven Zentrum an, der durch die Reste R369, R414, R645 und K646 versperrt ist. b) Elektrostatische Ladungsverteilung im inneren des TRI- $\beta 7$ -Propeller Kanals (blauer Pfeil). Deutlich zu erkennen ist auch hier der Verschluss des Propeller Kanals (grüner Pfeil). c) Oberflächendarstellung der POPase entlang des Propeller Kanals nach sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Resten eingefärbt. In grün sind die Reste des aktiven Zentrums hervorgehoben. d) Hypothetische Oberflächendarstellung einer Tricorn Mehrfach-Mutante (R414A/D465A/K646A/ Δ 643-645) mit freiem Zugang durch den $\beta 7$ -Propeller Kanal auf die in grün hervorgehobenen Reste des aktiven Zentrums.

Im direkten Vergleich dazu ist in Abbildung 5.4 c eine Oberflächendarstellung der POPase entlang des β -Propeller Kanals zu sehen. Hier ist ein deutlicher, frei zugänglicher Kanal zum darunterliegenden aktiven Zentrum, dessen Reste in grün hervorgehoben sind, zu erkennen. Abbildung 5.4 d zeigt ein hypothetisches Modell ebenfalls als Oberflächendarstellung einer Tricornuntereinheit Mehrfach-Mutante, mit den Mutationen R414A/D465A/K646A/ Δ 643-645. Wie unschwer zu erkennen ist, wird der Kanal freigegeben, und das Substrat könnte ungehindert zum aktiven Zentrum gelangen.

Erste biochemische Charakterisierungen dieser Mutante zeigen keine erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp (Tamura, persönliche Korrespondenz). Diese Ergebnisse lassen zwei Schlußfolgerungen zu: Erstens der β 7-Propeller besitzt keine substratzuführende Funktion zum aktiven Zentrum sondern dient nur der Stabilität des Homohexameren Komplexes und zweitens, es existiert ein alternativer Weg für das Substrat zum aktiven Zentrum.

5.1.2 Alternativer Weg des Substrats zum aktiven Zentrum der Tricorn-Protease

Abbildung 5.5 a zeigt einen alternativen, frei zugänglichen Weg zum aktiven Zentrum (grün). Dargestellt ist die Oberfläche des Moleküls nach sauren und basischen Resten. Im Vergleich zu Abbildung 5.4 d wurde die Tricorn Untereinheit um ca. 45° nach links und etwas nach unten verkippt. Die Lage des TRI- β 7-Propellers ist mit einem blauen Pfeil angedeutet. Benachbarte Untereinheiten blockieren den Zugang zum aktiven Zentrum nicht, der Übersicht wegen wurde aber auf diese Abbildung hier verzichtet.

Abbildung 5.5 b zeigt die Ladungsverteilung an der Oberfläche in diesem Bereich. Es besteht demzufolge gar nicht die Notwendigkeit für das Substrat, durch den β 7-Propeller zum aktiven Zentrum geführt zu werden. Ein Vergleich der Porendurchmesser an der engsten Stelle zwischen dem β 7-Propeller und dem alternativen Weg zeigt auch, daß der alternative Weg weiter geöffnet ist als der β 7-Propeller.

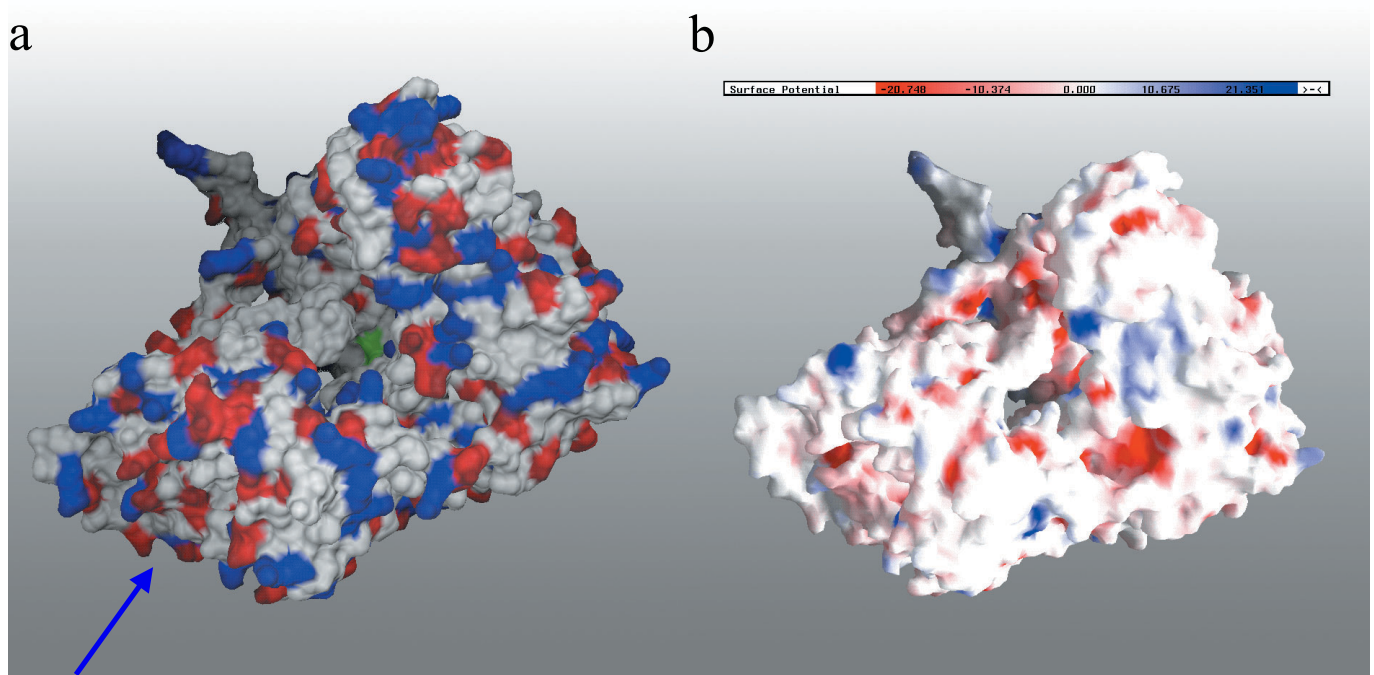


Abb. 5.5: Alternativer Weg zum aktiven Zentrum (grün) einer Tricorn Untereinheit. a) Mit einem blauen Pfeil ist die Lage des TRI- β 7-Propellers angedeutet, der Zugang über den alternativen Weg zum aktiven Zentrum (grün) wird nicht durch benachbarte Untereinheiten im Tricorn-Hexamere oder Tricorn-Capsid eingeschränkt. b) Elektrostatische Ladungsverteilung berechnet mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) bei einer Ionenkonzentration von 200 mM im Bereich des aktiven Zentrums.

Um die potentielle substratzuführende Funktion des $\beta 7$ -Propellers zu unterbinden, wurde eine weitere Mutante anhand der Strukturdaten entwickelt. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke innerhalb der Pore des $\beta 7$ -Propellers zwischen den mutierten Resten (Arg414Cys, Ala643Cys) sollte der Zugang für ein Substrat vollständig versperrt werden. Abbildung 5.6 zeigt ein hypothetisches Modell einer TRI- $\beta 7$ -Propellerdomäne der Cysteindoppelmutante. Weitere biochemische wie auch röntgenkristallographische Charakterisierungen werden nötig sein, um eine eindeutige Klärung herbeizuführen.

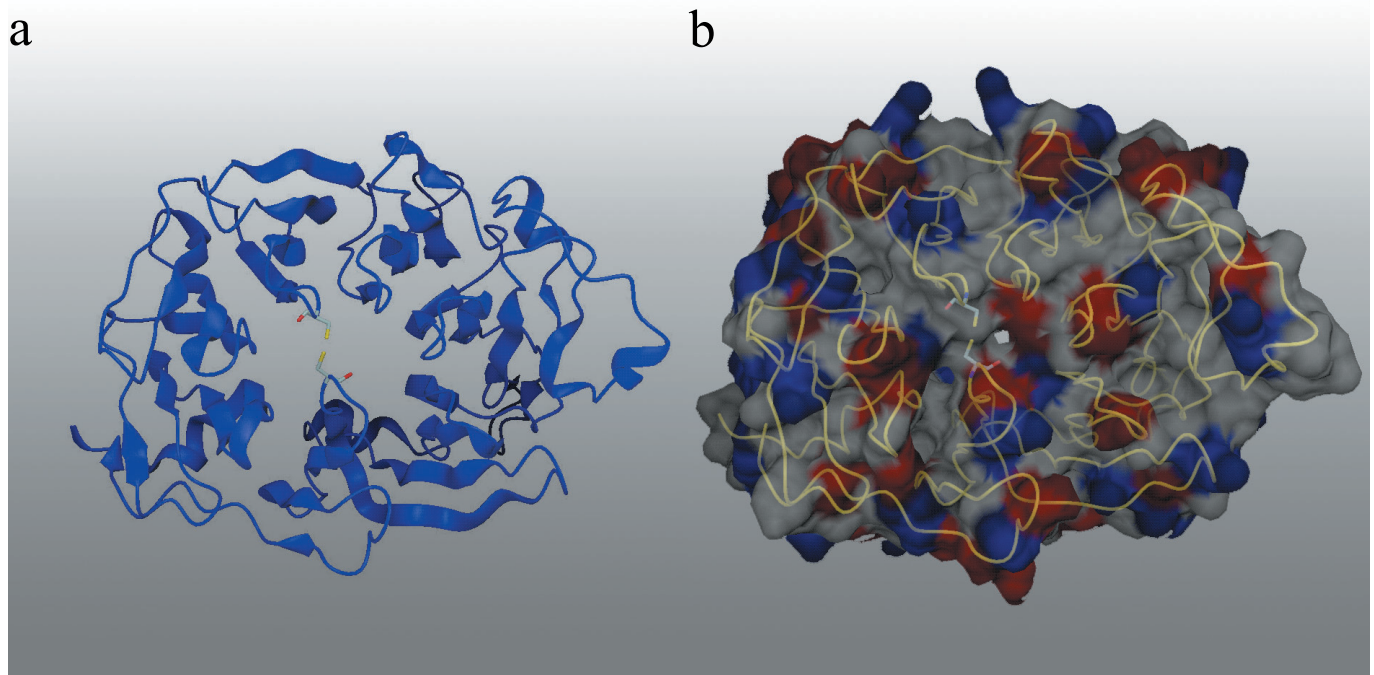


Abb. 5.6: Hypothetisches Modell einer Tricorn-Cysteindoppelmutante (R414C, A643C) im Eingangsbereich des TRI- $\beta 7$ -Propeller Kanals. a) Bändermodell des TRI- $\beta 7$ -Propellers, die beiden mutierten Reste sind als Stäbchenmodell hervorgehoben und bilden eine Disulfid-Brücke aus. b) Oberflächendarstellung des TRI- $\beta 7$ -Propellers nach sauren und basischen Resten eingefärbt. Ein Fadenmodell des TRI- $\beta 7$ -Propellers mit den beiden hervorgehoben Cysteinresten ist unter der Oberfläche zu erkennen.

Sollte sich nach Nachweis einer vorhandenen Disulfidbrücke durch röntgenkristallographische Untersuchungen, eine dem Wildtyp ähnliche spezifische Aktivität zeigen, wäre dies ein Beweis für die Substratzuführung zum aktiven Zentrum über den alternativen Weg. Dies würde nicht im Einklang mit den von Brandstetter et. al, (2001) veröffentlichten Ergebnissen stehen.

5.1.3 Ausbildung des supramolekularen Tricorn-Capsids

Wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen bereits ersichtlich (Walz et al., 1997; Walz et al., 1999), werden in *Thermoplasma acidophilum* Tricorn-Capside *in vivo* wie auch rekombinant *in vitro* ausgebildet. Den Tricorn-Capsiden wurde unter anderem die Funktion eines Gerüsts zugeschrieben, an dem weitere Aminopeptidasen temporär binden bzw. mit der Tricorn-Protease interagieren, um die von der Tricorn-Protease freigesetzten Peptidfragmente weiter in ihre Bestandteile - die einzelnen Aminosäuren - abzubauen und sie somit den Prozessen in der Zelle wieder zur Verfügung zu stellen.

Abbildung 5.7 zeigt ein an die Elektronendichte des Capsids angepaßtes Tricorn-Hexamer in einer Oberflächendarstellung. Eine Untereinheit des Hexamers ist hier als Bändermodell hervorgehoben und entsprechend der Domänengrenzen (vgl. Abbildung 5.1 b) eingefärbt. Gut zu erkennen ist die Ausbildung von Kontakten zu benachbarten Tricorn-Hexameren, jeweils drei Untereinheiten sind an der Kontaktbildung beteiligt (durch rote Markierungen angedeutet). Eine genauere Betrachtung der Kontakte zwischen den einzelnen Tricorn-Hexameren wird in der folgenden Abbildung 5.8 gegeben.

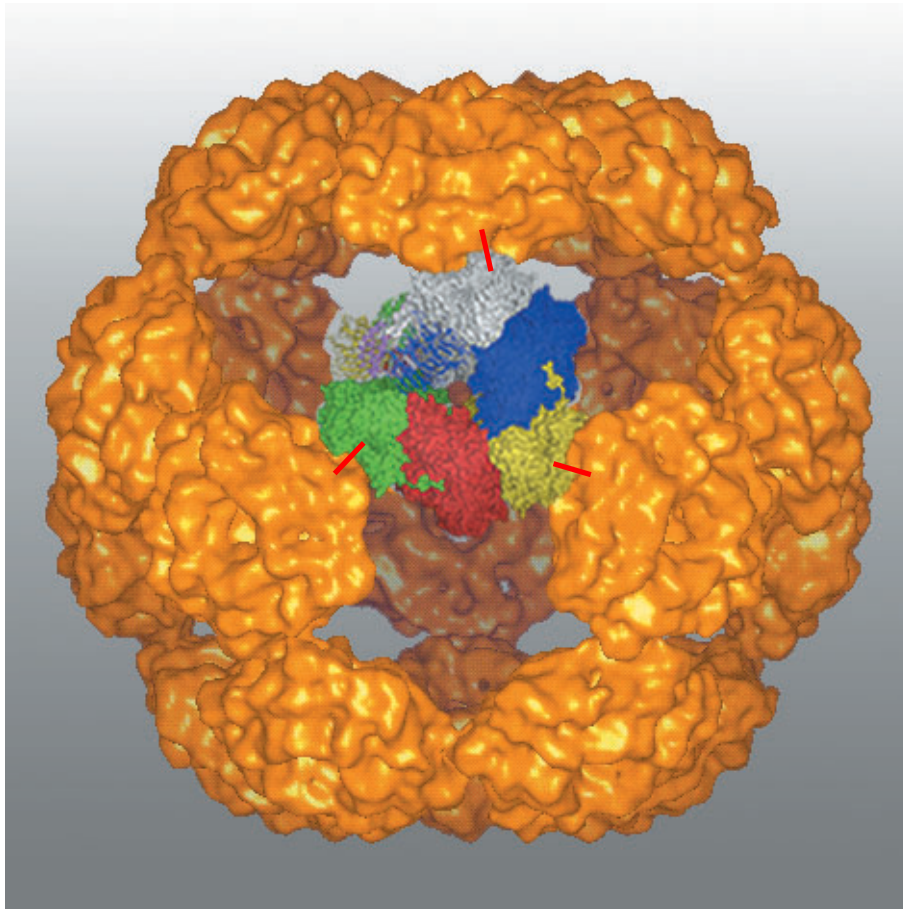


Abb. 5.7: Räumliche Anordnung eines Tricorn-Hexamers in die Elektronendichte eines Tricorn-Capsids. Die Kontaktstellen zu benachbarten Tricorn-Hexamere sind durch rote Markierungen gekennzeichnet

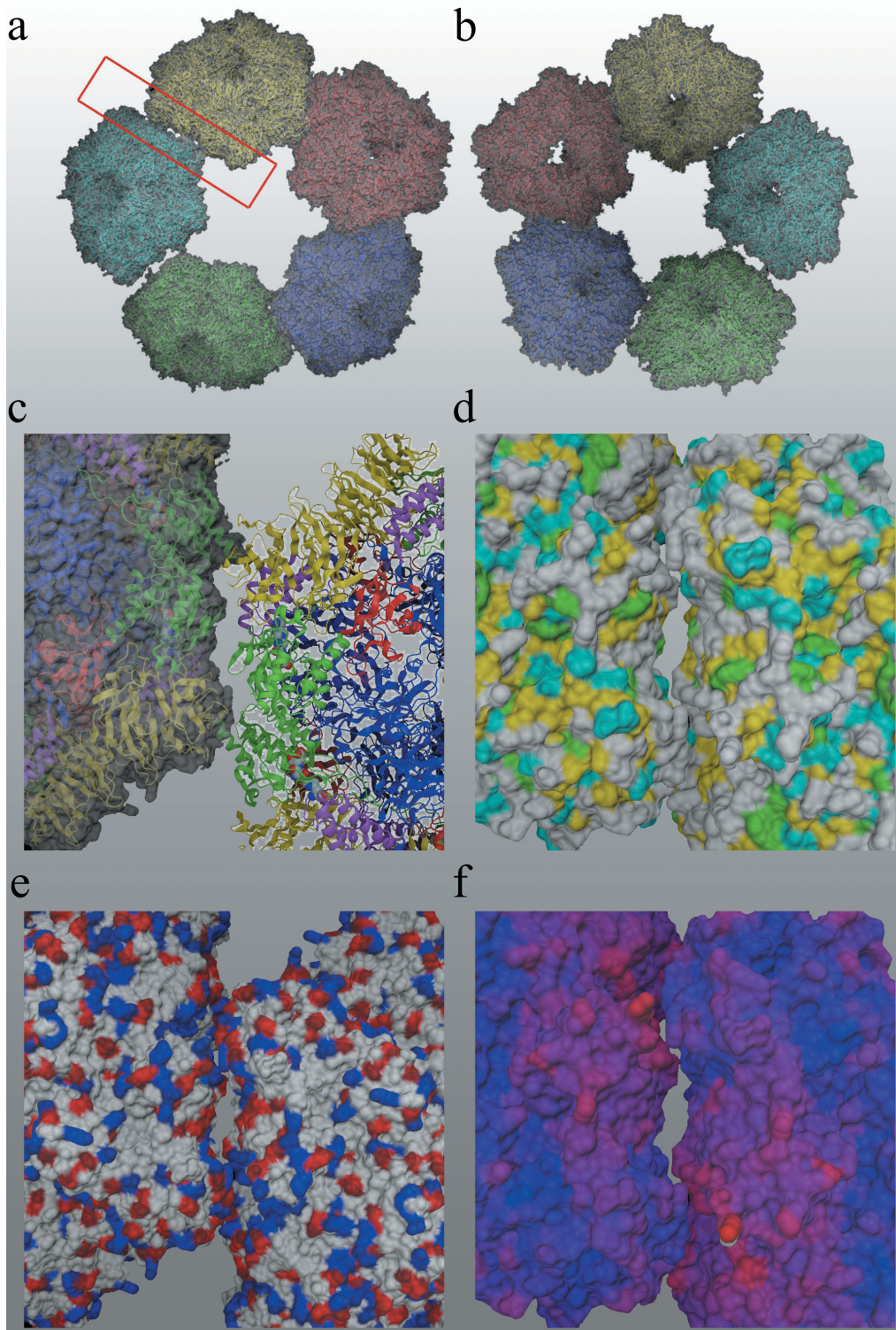


Abb. 5.8: Transparente Oberflächendarstellung benachbarter Tricorn-Hexamere entlang der fünfzähligen Symmetrie eines Capsids von außen (a) und innen (b) betrachtet. Die beteiligten Tricorn-Hexamere sind als Bändermodell in unterschiedlichen Farben hervorgehoben. Die folgenden Abbildungen c-f zeigen jeweils links die Kontaktflächen des ersten Hexamers und rechts im Bild die des zweiten Hexamers aus dem in a rot angedeuteten Ausschnitt. c) Bändermodell und Oberflächendarstellung der Tricorn-Hexamere entlang einer zweizähligen Symmetrieachse. Die Reste des aktiven Zentrums sind als Kalottenmodell hervorgehoben. d) Verteilung der polaren (cyan, Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asn, Gln), aromatischen (grün, Phe, Tyr, Trp) und aliphatischen (gelb, Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) Reste. e) Verteilung der sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Reste. f) Verteilung der B-Faktoren als Oberflächendarstellung mit einem Gradienten zwischen 2 \AA^2 (blau) und 45 \AA^2 (rot).

Abbildungen 5.8 a+b zeigen zunächst in einer Übersichtsdarstellung die Anordnung der Tricorn-Hexamere innerhalb eines Capsids entlang der fünfzähligen Symmetrieachse. Anhand der Oberflächeneigenschaften der Moleküle können mögliche Regionen für Interaktionen bei der Ausbildung eines Capsids näher untersucht werden. In Abbildung 5.8 c kann anhand der unterschiedlich gefärbten Domänen der Untereinheiten leicht die zweizählige Symmetrieachse zwischen den beiden Hexameren erkannt werden. Die weiteren Abbildungen d-f stellen die Oberflächen für beide Hexamere mit unterschiedlichen Eigenschaften dar. Aus diesen Abbildungen läßt sich vermuten, daß beide Untereinheiten eng miteinander interagieren können, da sie komplementär aufeinander abgestimmt sind. Auffällig ist die C-terminale α -Helix (Reste 1045-1060) wie in Abbildung 5.9 a mit grünen Pfeilen angedeutet ist.

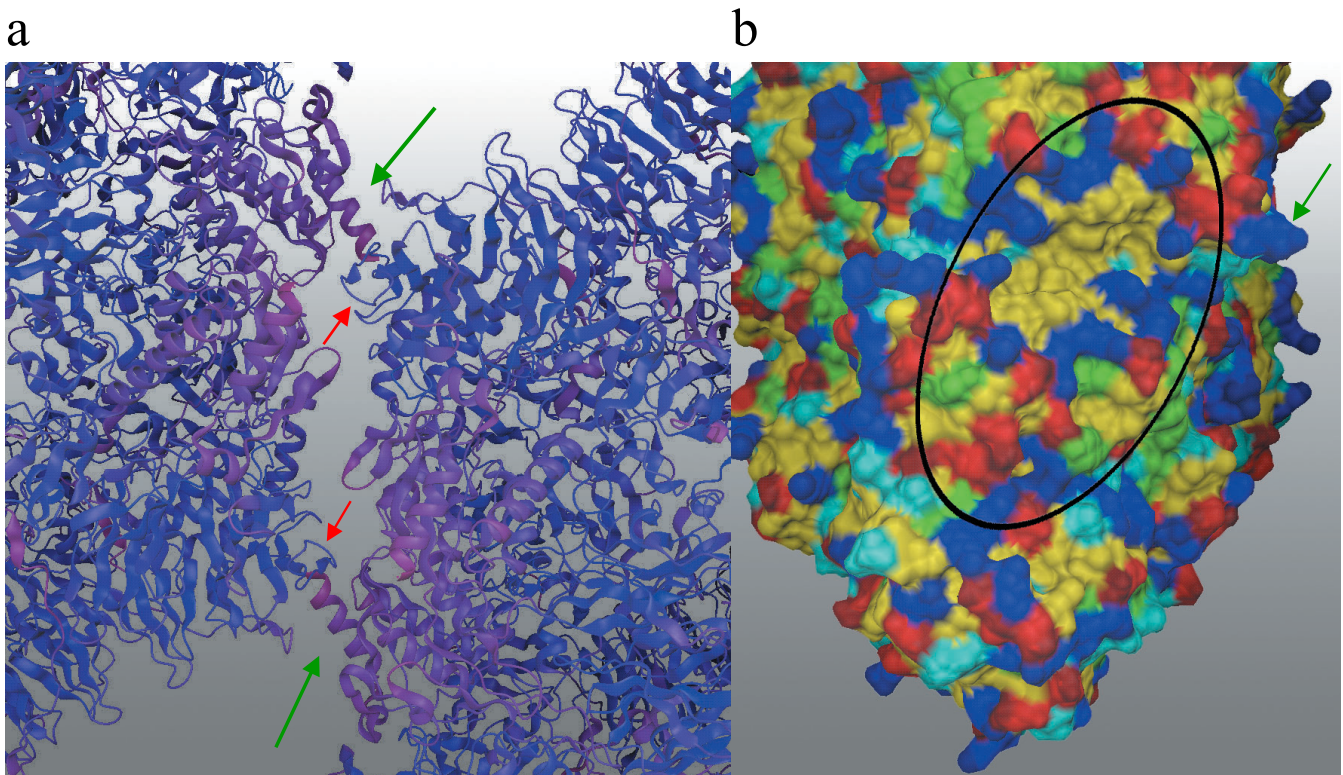


Abb. 5.9: a) Nach B-Faktoren eingefärbtes Bändermodell zweier benachbarter Tricorn-Hexamere innerhalb eines Capsids. Die zur c2-Domäne gehörende C-terminale α -Helix (grüne Pfeile, Asp1045-Arg1060) könnte mit den Resten (rote Pfeile, DGKDLR, 260-265) der β 6-Propeller-Domäne interagieren und zur Ausbildung der Capsid-Struktur beitragen. Zudem könnten die 11 C-terminal fehlenden Aminosäurereste (NWNEELPQRPS, 1061-1071), die in der vorhandenen Kristallstruktur nicht zu erkennen waren, ebenfalls an der Wechselwirkung zum benachbarten Hexamer beteiligt sein. b) Seitliche Oberflächendarstellung der Kontaktregion zwischen zwei benachbarten Hexamere (polar = cyan, aromatischen = grün, aliphatischen = gelb, sauer = rot und basisch = blau). In der unmittelbaren Kontaktregion ist ein hydrophober Bereich von geladenen Resten umgeben (schwarzes Oval). Bei der Ausbildung der Capsid-Struktur wird dieser hydrophobe Bereich an drei Kontaktregionen pro Tricorn-Hexamer weitestgehend vom hydrophilen Cytosol abgeschirmt. Die geladene C-terminale α -Helix ist mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet.

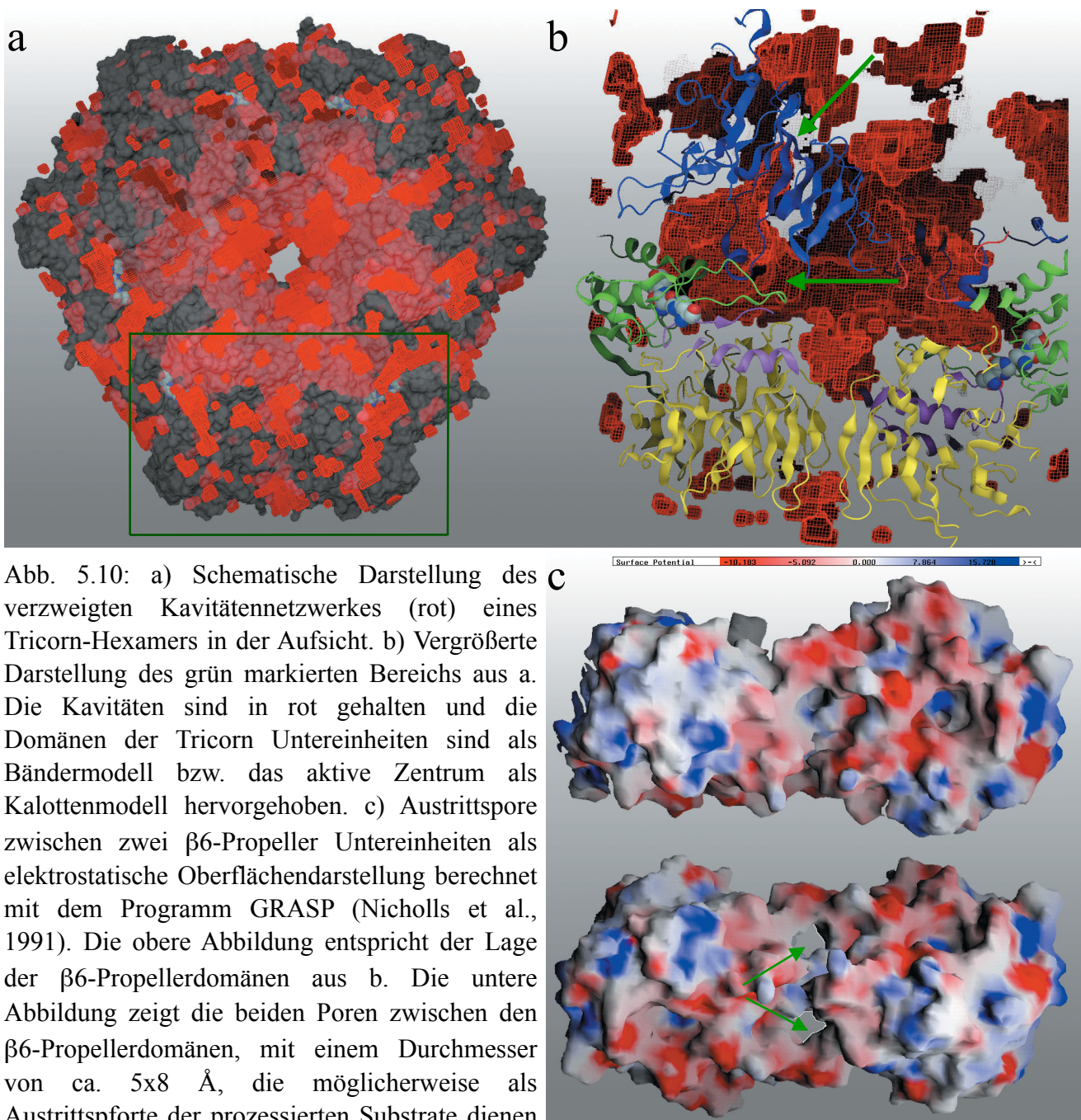
Die fehlenden 11 C-terminalen Reste (1061-1071) der Tricorn-Untereinheit waren nicht in der Elektronendichte zu erkennen und könnten ungeordnet und flexibel sein. Solche flexiblen Bereiche sind nicht ungewöhnlich in viralen Strukturen, wenn diese isoliert kristallisiert wurden. Im Gesamtverbund kristallisiert dienen sie meist zur Verknüpfung und Stabilisierung ein oder mehrerer Untereinheiten (San Martín et al., 2001).

Eine Wechselwirkung der verlängerten α -Helix (1045-1060) mit den Resten (260-265) der β 6-Propellerdomäne könnte aufgrund der entgegengesetzt geladenen Reste zu einer starken Bindung führen (rote Pfeile). Da an der Ausbildung der Kontakte für die Bildung eines Capsids jeweils drei β 6-Propeller pro Tricorn-Hexamere zumindest teilweise benötigt werden, ist es fraglich, ob diese als Ausgang für die prozessierten Peptidfragmente dienen können, wie Brandstetter et al. (2001) folgern.

Wie in der seitlichen Oberflächendarstellung in Abbildung 5.9b zu sehen ist, wird eine große hydrophobe Fläche von geladenen Resten umgeben. Durch den Kontakt zweier benachbarter Hexamere werden diese hydrophoben Bereiche von der hydrophilen cytosolischen Umgebung abgeschirmt und unterstützen somit ebenfalls die Ausbildung einer Capsid-Struktur.

Auch unter Berücksichtigung der vorhandenen Kavitäten innerhalb eines Tricorn-Hexamers erscheint es eher wahrscheinlich, daß die prozessierten Peptide entweder durch Diffusion wieder in die zentrale Pore des Tricorn-Hexamers gelangen oder über eine weit geöffnete Pore zwischen den β 6-Propellern zweier benachbarter Untereinheiten entlassen werden. Abbildung 5.10 a zeigt schemenhaft die Umriss eines Tricorn-Hexamers und in rot hervorgehoben das verzweigte Netzwerk der Kavitäten. Die Berechnung der Kavitäten erfolgte mit dem Programm MAMA (Kleywegt, 1992) nach dem Delaney-Algorithmus (Delaney et al., 1992; Kleywegt and Jones, 1994). Als Kalottenmodell sind die Reste der aktiven Zentren dargestellt. Abbildung 5.10 b gibt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abbildung 5.10 a räumlich und als Bändermodell wieder. Deutlich sichtbar ist der Unterschied im Durchmesser der beiden möglichen Substratwege zum aktiven Zentrum (grüne Pfeile). Der β 7-Propellerkanal ist abgesehen vom Verschluss, zwischen $5 \times 10 \text{ \AA}$ und $20 \times 25 \text{ \AA}$ weit, der Kanal des alternativen Weges dagegen ist am Eingang etwa $20 \times 25 \text{ \AA}$ geweitet und verjüngt sich zum aktiven Zentrum auf ca. $5 \times 5 \text{ \AA}$.

Abbildung 5.10 c zeigt die elektrostatische Ladungsverteilungen an der Oberfläche, berechnet mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) und einer Ionenkonzentration von 200 mM, von zwei benachbarten β 6-Propeller eines Tricorn-Hexamers. Die obere der beiden Abbildungen entspricht der Lage der TRI- β 6 wie sie in Abbildung 5.9 b zu sehen ist. Durch eine Drehung um etwa 45° werden zwei Poren zwischen den beiden β 6-Propellerdomänen deutlich sichtbar. Sie haben einen Durchmesser von $5 \times 8 \text{ \AA}$ und stehen in direkter Verbindung mit dem zentralen Kavitätennetzwerk. Sie wären somit als potentielle Ausgänge für prozessierte Peptide denkbar.



5.1.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden der *ab initio* Mittelung führten zwar nicht zur gewünschten atomaren Struktur der Tricorn-Protease, es konnte jedoch gezeigt werden, daß ein großes Potential in dieser Methodik steckt und eine Weiterentwicklung sinnvoll erscheint. Im Fall der Tricorn-Protease scheiterte der Versuch der *ab initio* Strukturlösung hauptsächlich an der Ungenauigkeit der Positionsbestimmung hervorgerufen durch die Pseudosymmetrie. Andere erfolgreiche Beispiele der *ab initio* Mittelung sind in der Literatur vor allem bei Virusstrukturen zu finden.

Vor allem große makromolekulare Komplexe, die bereits in der Vergangenheit elektronenmikroskopisch untersucht wurden, könnten die notwendige Phaseninformationen für eine *ab initio* Mittelung zu höheren Auflösungen liefern. Meist ist hier eine Phasenbestimmung über Schwermetallderivate schwierig oder unmöglich, obwohl geeignete Kristalle für röntgenkristallographische Untersuchungen zur Verfügung stehen. Selbst wenn keine tomographischen Daten vorhanden sind, könnten aus 1D EM-Daten Pseudoatommodelle konstruiert und diese für eine *ab initio* Mittelung eingesetzt werden.

Durch die Kombination der beiden Fachgebiete Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie könnten biologische Funktionsweisen sowie Interaktionen zwischen Proteinen und Untereinheiten auf einer makroskopischen Skala betrachtet werden. In diesem Zusammenhang werden besonders die Tomographie von ganzen Zellen und die verschiedenen, weltweiten laufenden *Structural Genomics*-Projekte interessant. Erste Ziele solcher Projekte werden Proteine mit hohem, medizinisch oder biologisch relevantem Interesse sein. Makromolekulare Komplexe werden zunächst aufgrund ihrer höheren Komplexität nur einzeln unter hohem Zeitaufwand bearbeitet werden können. Hier könnte die Methode der *ab initio* Mittelung eingesetzt werden können und zu einer Zeitersparnis sowohl im Bezug auf der Suche nach geeigneten Schwermetallderivaten wie auch in der Strukturlösung beitragen. Mit aus einer *ab initio* Mittelung gewonnenen Anfangsphasen zu mittlerer Auflösung von etwa 6 Å könnten dann im späteren Verlauf Schwermetallpositionen sichtbar gemacht werden, die zuvor aufgrund der geringen Streukraft einzelner Schwermetallatome nicht erkannt werden konnten.

Weitere Mutationsstudien, insbesondere solche die den TRI-β7 Kanal selektiv blockieren, werden für die eindeutige Identifizierung des Substratweges von großem Nutzen sein und müssen röntgenkristallographisch weiter untersucht werden.

5.2 Trilobed-Protease

5.2.1 Funktion und Domänenbau der Trilobed-Protease

Die Trilobed-Protease ist in zwei Domänen eingeteilt, einem N-terminalen siebenblättrigen β -Propeller (M1-K348) und einer C-terminalen katalytischen Domäne (T349-E620), die der Familie der α/β -Hydrolase zugeteilt wurde. Abbildung 5.11 a gibt eine schematische Übersicht der Trilobed-Protease wieder, in Abbildung 5.11 b ist eine Sequenz-Alignierung der katalytischen Domäne eines Teils der S9C Familie dargestellt (Rawlings et al., 2002). Der Übersicht wegen wurden nur die Sequenzen der POPase und Tricorn-Protease mit der Sequenz der Trilobed-Protease verglichen. Die Reste des aktiven Zentrums sind durchgehend konserviert erhalten und in rot markiert.

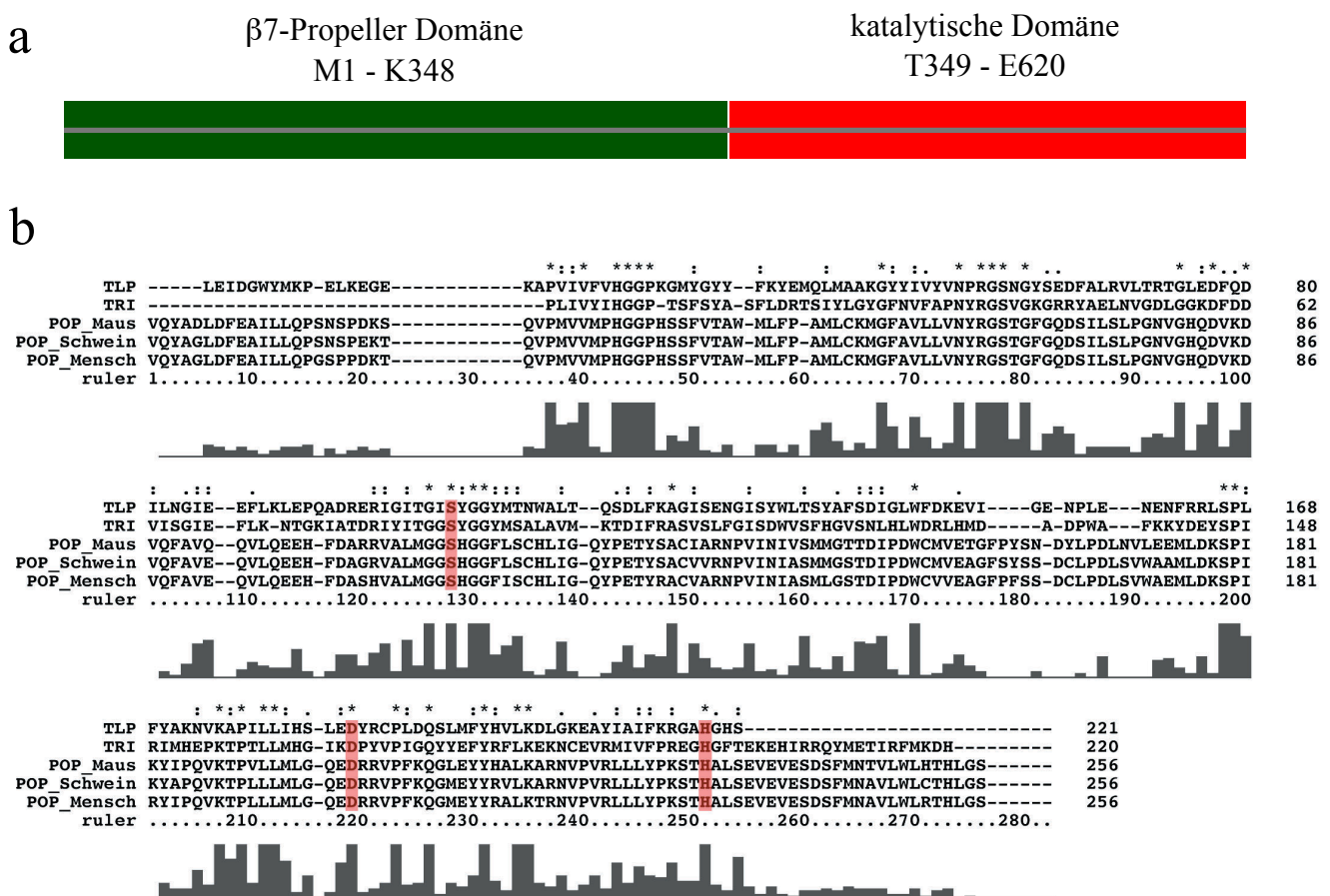
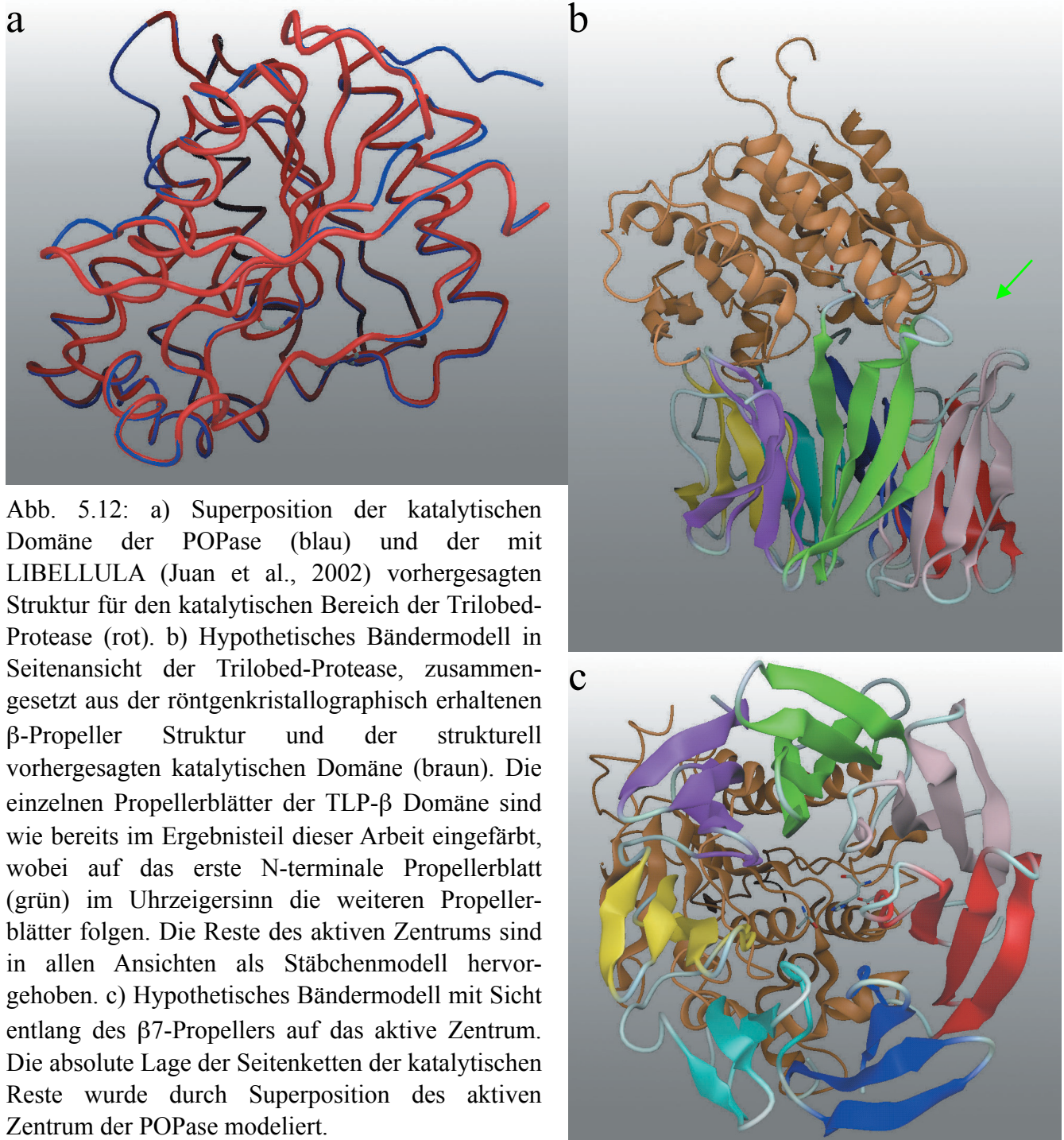


Abb. 5.11: a) Schematischer Überblick der Domänenorganisation der Trilobed-Protease. Der N-terminale Teil von Aminosäure 1-348 wurde in dieser Arbeit mit röntgenkristallographischen Methoden untersucht. Der sich anschließende katalytische Teil der Protease ist als α/β -Hydrolase Domäne durch sequenzhomologien bestätigt worden. b) Sequenz-Alignierung der katalytischen Domäne der Trilobed-Protease (TLP), Tricorn-Protease (TRI), POPase aus Schwein, Maus und Mensch erstellt mit dem Programm Clustal-X (Thompson et al., 1997). Die katalytischen Reste sind jeweils in rot hervorgehoben.

Durch eine Superposition der TLP- β Propellerdomäne mit Prolyl-Oligopeptidase (POPase) wurde eine Chimäre bestehend aus der katalytischen Domäne der POPase und der Trilobed β -Propellerdomäne erzeugt. Diese Chimäre diente als Zielmodell für eine Superposition mit einer mit dem Programm LIBELLULA (Juan et al., 2002) vorhergesagten Struktur der C_{α} -Positionen für die katalytische Domäne der Trilobed-Protease. Abbildung 5.12 a zeigt die katalytische Domäne der POPase (blau) und die vorhergesagte katalytische Domäne der Trilobed-Protase (rot). Eine gute Übereinstimmung der beiden Strukturen bei einer Sequenzidentität von 19.3 % spiegelt sich ebenfalls in einem niedrigen r.m.s.d. Wert zwischen den katalytischen Domänen wieder, der für 259 C_{α} -Positionen nur 0.67 Å beträgt. Die Reste des aktiven Zentrums der POPase sind als Stäbchenmodell hervorgehoben, weitere Details zur dreidimensionalen Strukturvorhersage sind im Anhang 8.4 zu finden.

Die über Sequenzhomologien und biochemisch bestätigten Reste (Tamura, persönliche Korrespondenz) des aktiven Zentrums (Ser467, Asp547 und His581) sind in der vorhergesagten Struktur als Stäbchenmodell hervorgehoben. Die Propellerblätter sind vom N- zum C-Terminus im Uhrzeigersinn angeordnet und wie bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit eingefärbt. Die vorhergesagten C_{α} -Positionen der katalytischen α/β -Hydrolase Domäne sind in braun dargestellt.

In der Seitenansicht (vgl. Abbildung 5.12 b) ist zwischen den beiden Domänen ein Spalt zu erkennen, der mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet ist. Da es sich hierbei nur um eine strukturelle Vorhersage handelt, könnte dieser Spalt möglicherweise in der Gesamtstruktur nicht vorhanden sein. Sollte sich jedoch durch röntgenkristallographische Untersuchungen erweisen, daß dieser Spalt vorhanden ist, könnte dies als Ausgang für die Substrate oder auch als Zugang für größere Substrate dienen, wie es auch Harris et al., 2001 für POPase aus *Pyrococcus furiosus* durch einen Klappmechanismus zwischen den beiden Domänen postulieren. Die Flexibilität der Domänen zueinander wäre allerdings nur in der Monomerform möglich, als Trimer wäre ein solcher Klappmechanismus mit der hier hypothetischen Anordnung des Trimers nur schwer vorstellbar (vgl. Abbildung 5.14 b).



In der Aufsichtsdarstellung (vgl. Abbildung 5.12 c) ist erneut das Grundprinzip der räumlichen Anordnung des aktiven Zentrums unterhalb des β -Propeller Kanals zu erkennen. Noch deutlicher wird dies in der Oberflächendarstellung mit Blick entlang des β -Propeller Kanals der Trilobed-Protease sichtbar (vgl. Abbildung 5.13 a). Wie in anderen Abbildungen zuvor sind hier die am aktiven Zentrum beteiligten Reste in grün hervorgehoben, die Oberfläche ist nach sauren (rot) und basischen (blau) Resten eingefärbt.

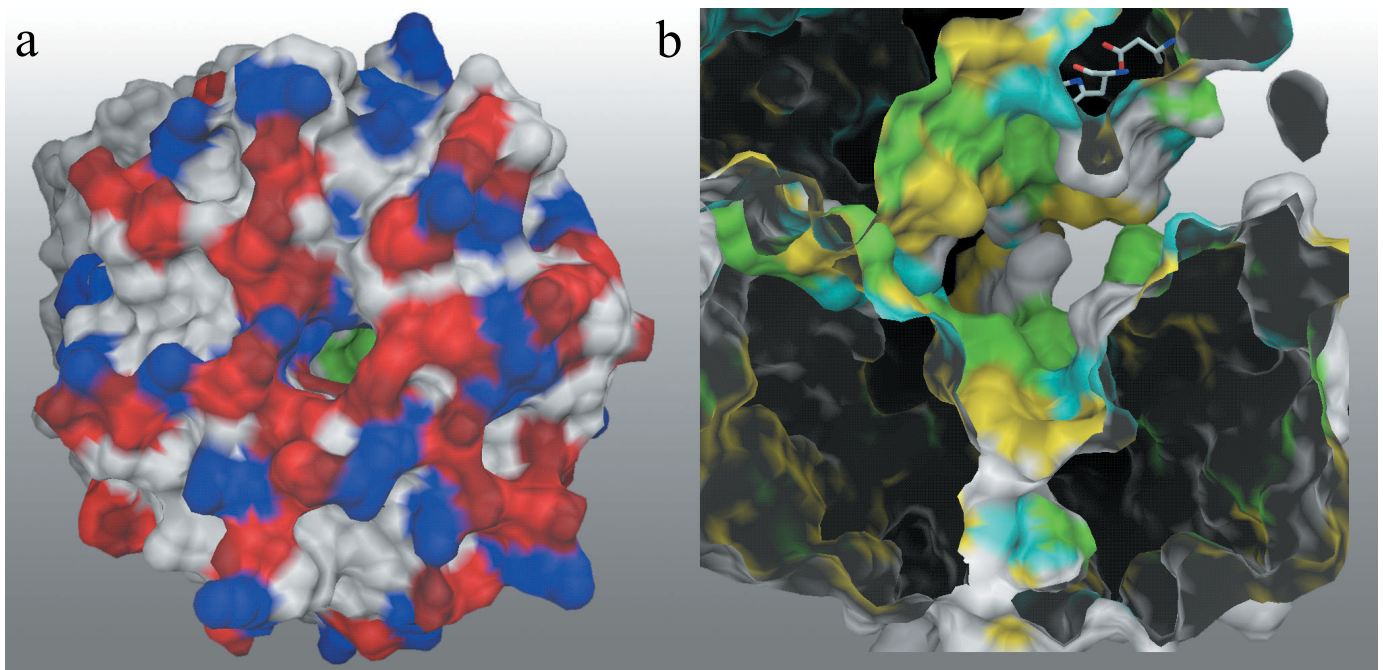


Abb. 5.13: a) Oberflächendarstellung des hypothetischen Modells der Trilobed-Protease mit Blick entlang des β 7-Propellers auf das aktive Zentrum (grün) nach sauren (rot, Asp, Glu) und basischen (blau, Arg, Lys) Resten eingefärbt. b) Verteilung der polaren (cyan, Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asn, Gln), aromatischen (grün, Phe, Tyr, Trp) und aliphatischen (gelb, Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) Reste in einem seitlichem Medianschnitt der Trilobed-Protease. Die Reste des aktiven Zentrums sind als Stäbchenmodell hervorgehoben und teilweise sichtbar. Die Reste der katalytischen Domäne wurden basierend auf der vorhergesagten Struktur eingefärbt. Die trichterförmige Öffnung der β -Propellerdomäne zum aktiven Zentrum ist gut sichtbar.

In der aufgeschnittenen Seitenansicht ist der trichterförmige Verlauf des β 7-Propeller Kanals mit der erweiterten Öffnung in Richtung des aktiven Zentrums deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 5.13 b). Die überwiegend hydrophoben Oberflächen des erweiterten Kanals wurden als Hinweis für eine dem Cytosol abgewandte Seite angenommen und darauf basierend ein hypothetisches Gesamtmodell der Protease konstruiert. Die Reste des aktiven Zentrums sind in der halbaufgeschnittenen Darstellung als Stäbchenmodell dargestellt. Der Reaktionsraum ist überwiegend mit hydrophoben Resten ausgekleidet und könnte einem globulären Protein von ca. 7 kDa Platz bieten.

5.2.2 Hypothetische Anordnung der Trilobed-Protease als Trimer

Die Reinigung der Trilobed-Protease erfolgt als intaktes Trimer, als solches ist es auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar. Abbildung 5.14 zeigt eine 3D-Rekonstruktion des Trilobed-Trimers mit einer nominellen Auflösung von 40 Å (Tamura et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund der geringen Auflösung wurde das hypothetische Modell einer Trilobed Untereinheit manuell in die Elektronendichte angepaßt. Abbildung 5.14 b zeigt die hypothetische Anordnung als Trimer. Auf eine räumlich exaktere Beziehung der einzelnen Monomere zueinander kann aufgrund der fehlenden röntgenkristallographischen Erkenntnisse der katalytischen Domäne nur spekulativ eingegangen werden. Die Kontaktregion (grüner Pfeil) zwischen zwei Monomeren scheint komplementär aufeinander abgestimmt zu sein. Weitere röntgenkristallographische Untersuchungen sind nötig um eine exaktere Aussage treffen zu können.

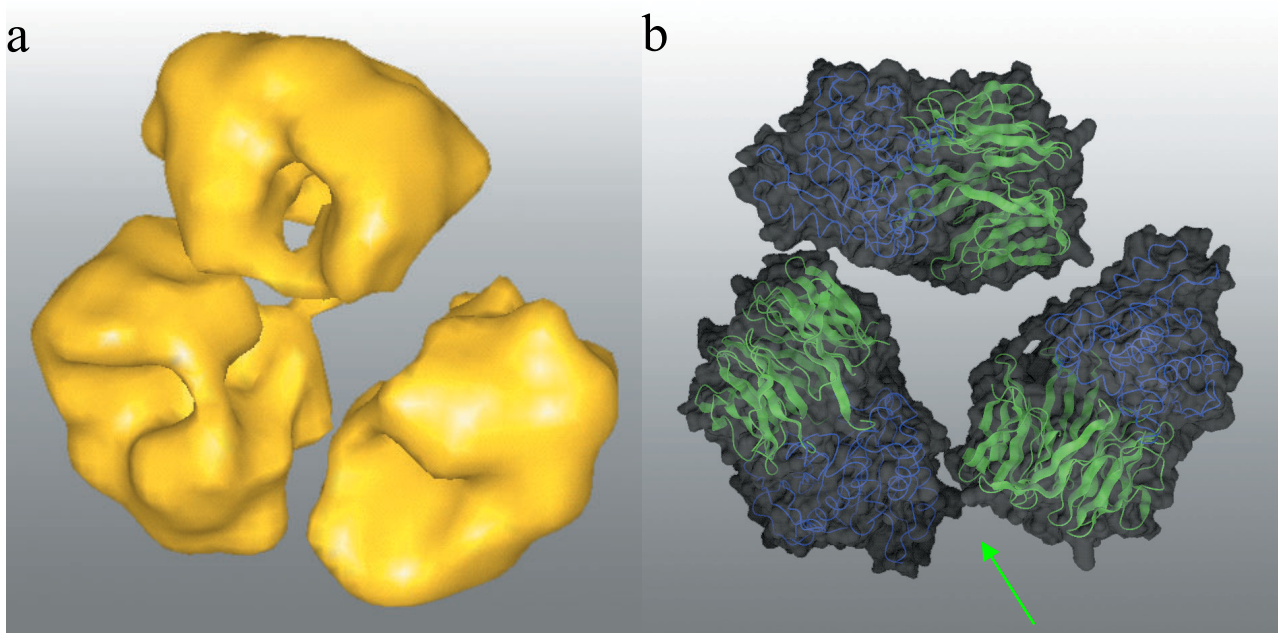


Abb. 5.14: a) 3D-Rekonstruktion der Trilobed-Protease bei einer Auflösung von ca. 40 Å. b) Trimer-Modell nach einer manuellen Anpassung des hypothetischen Trilobed-Modells in die 40 Å Elektronendichte. Die TLP-β Propellerdomäne ist in grün hervorgehoben, die bislang unbekannte und nur auf Strukturvorhersagen basierende katalytische Domäne hingegen in blau. In grau ist die Oberfläche der Struktur dargestellt, der Übersicht halber wurde auf eine überlagerte Darstellung der Elektronenmikroskopischen Dichte verzichtet.

5.2.3 Funktion der β -Propellerdomäne in der Trilobed-Protease

Durch einen Vergleich mit anderen Proteasen, die einen β -Propeller in ihrer Struktur enthalten, lassen sich mögliche Funktionen der β -Propellerdomäne für die Trilobed-Protease ableiten. Im folgenden werden die drei bislang bekannten Strukturen mit einer offenen „Velcro“ Topologie näher miteinander verglichen.

Einerseits wird durch den geringen Porendurchmesser des β -Propeller Kanals dem Substrat aufgrund des Größenausschlußprinzip Mechanismus der freie Zugang zum aktiven Zentrum versperrt (Fülöp et al., 2000; Polgar, 2002). Andererseits werden aber auch die Proteine in der Zelle vor unkontrolliertem Abbau durch die β -Propellerdomäne vor der katalytischen Domäne geschützt. Durch diese Kompartimentierung können die katalytischen Funktionen der Protease in einer kontrollierten Umgebung spezifisch stattfinden (Lupas et al., 1997).

Eine Substraterkennung oder Vorselektion der Substrate könnte möglicherweise anhand der Oberflächeneigenschaften der β -Propellerdomäne stattfinden, bevor die geeigneten Substrate dem aktiven Zentrum durch den β -Propellerkanal zugeführt werden. Denkbar ist auch eine Flexibilität des β -Propellers, da im Falle der Trilobed-Protease der Ringschluß nicht auf dem „Velcro“-Mechanismus beruht. Dadurch könnte der Porendurchmesser wie in einem Atmungsprozess geöffnet und geschlossen werden (Andrade et al., 2001). Möglicherweise stellt die Modellstruktur der Trilobed β -Propellerdomäne den geöffneten Zustand des Propellers dar, da nur die nichtkatalytische Domäne kristallisiert wurde.

Ein Vergleich zwischen den β -Propellerdomänen der Trilobed-Protease (a), POPase (b) und TRI- β 7 (c) wird in Abbildung 5.15 gegeben. In rot ist ein Fadenmodell unter der transparenten Oberfläche der jeweiligen Domäne zu sehen. Die Strukturen wurden mit Hilfe des Programms TOP (Lu, 2000) in den C_{α} -Positionen superpositioniert und der Übersicht halber nebeneinander dargestellt. Eine Seitenansicht der drei Strukturen ist jeweils unter der Aufsicht zu sehen. In der dritten Zeile der Abbildung ist jeweils die dem aktiven Zentrum zugewandte Seite der Propellerdomänen gezeigt, dabei sind die polaren (cyan), aromatischen (grün) und aliphatischen (gelb) Reste hervorgehoben.

Der Porendurchmesser im Eintrittsbereich der TLP- β Propellerdomäne ist deutlich sichtbar weiter geöffnet ($\text{\AA} 5 \times 10$) als es in der Struktur der POPase ($\text{\AA} 5 \times 5$) zu beobachten ist. Wie bereits zuvor besprochen, wird dem Substrat im Fall der TRI- β 7 Domäne durch die Reste R369, R414, R645 und K646 der direkte

Weg zum aktiven Zentrum versperrt, so daß keine freizugängliche Pore sichtbar ist. Vergleicht man den Durchmesser der drei Strukturen im Reaktionsraum zeigt sich, daß der TRI- β 7 Propeller der engste mit etwa $8 \times 15 \text{ \AA}$ ist, hier verläuft der Kanal eher tunnelartig ohne Größenänderungen. POP- β 7 und TLP- β 7 haben ähnlich weite Reaktionsräume mit einem Durchmesser von $20 \times 20 \text{ \AA}$ bzw. $20 \times 25 \text{ \AA}$, wodurch sich ein charakteristischer trichterförmige Kanal ergibt.

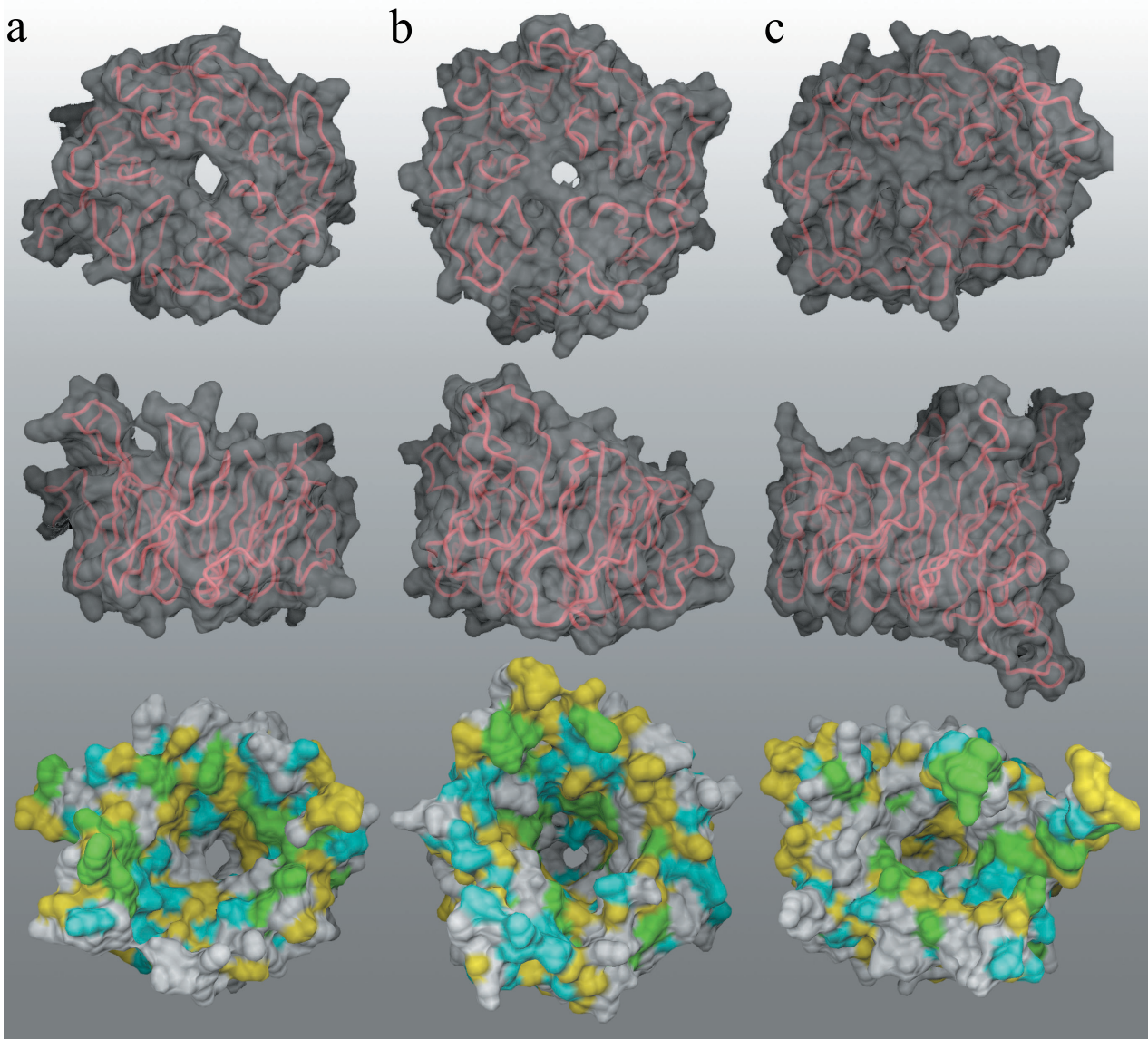


Abb. 5.15: Vergleich der β -Propellerdomänen in Auf- und Seitenansicht der Trilobed-Protease (a), Prolyl-Oligopeptidase (b) und TRI- β 7 Domäne (c). Die einzelnen Strukturen wurden mit dem Programm TOP (Lu, 2000) superpositioniert. Unter der transparenten Oberfläche ist jeweils in rot ein Fadenmodell der entsprechenden Domäne zu sehen. Der deutlich weiter geöffnete zentrale Kanal der TLP- β gegenüber der POPase ist gut sichtbar, wohin gegen kein Kanal bei der TRI- β 7 Domäne zu erkennen ist. Auffällig ist das fast kreisrunde Oberflächenprofil der TLP- β gegenüber den beiden anderen Strukturen, die eher oval und gestaucht wirken. Der Vergleich der Innenseiten der Propellerdomänen eingefärbt nach Verteilung der polaren (cyan, Ser, Thr, Tyr, His, Cys, Asn, Gln), aromatischen (grün, Phe, Tyr, Trp) und aliphatischen (gelb, Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val) Reste zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Strukturen auf.

Der Vergleich der Oberflächen zeigt, daß die TLP- β Propellerdomäne fast einen Kreis bildet, während bei den anderen Strukturen eher ein ovaler Charakter überwiegt und die einzelnen Propellerblätter sich nicht regelmäßig etwa alle 50° übereinander legen lassen. Dies könnte ein Hinweis auf eine „entspannte“ Variante der Propellerdomäne der Trilobed-Protease sein. Die TRI- β 7 Domäne wirkt dagegen stark gestaucht in der Aufsicht entlang des Kanals.

Vergleicht man die Innenseiten der Propellerdomänen miteinander, so fällt einem sofort die überwiegende Anzahl an hydrophoben Resten in der TLP- β gegenüber den anderen Strukturen auf. Dies könnte möglicherweise auf die höhere Umgebungstemperatur von *Pyrococcus furiosus* und damit verbunden die Notwendigkeit vermehrt durch hydrophobe Wechselwirkungen die Struktur zu stabilisieren zurückzuführen sein.

Nur die Strukturlösung des Gesamtproteins wird darüber Aufschluß geben können, ob es eine „entspannte“ (offene) und eine geschlossene Konformation der Trilobed-Protease gibt. Dann wird es auch mit Modellrechnungen möglich sein, eine eventuelle Substratzufuhr kleinerer globulärer Proteine durch einen Klappmechanismus zwischen den beiden Domänen näher zu betrachten.

Eine schematische Übersicht über die hier vorgestellten Varianten der Substratzufuhr der Trilobed-Protease ist in Abbildung 5.16 wiedergegeben, dabei symbolisieren grüne Pfeile mögliche Wege des Substrats zum aktiven Zentrum.

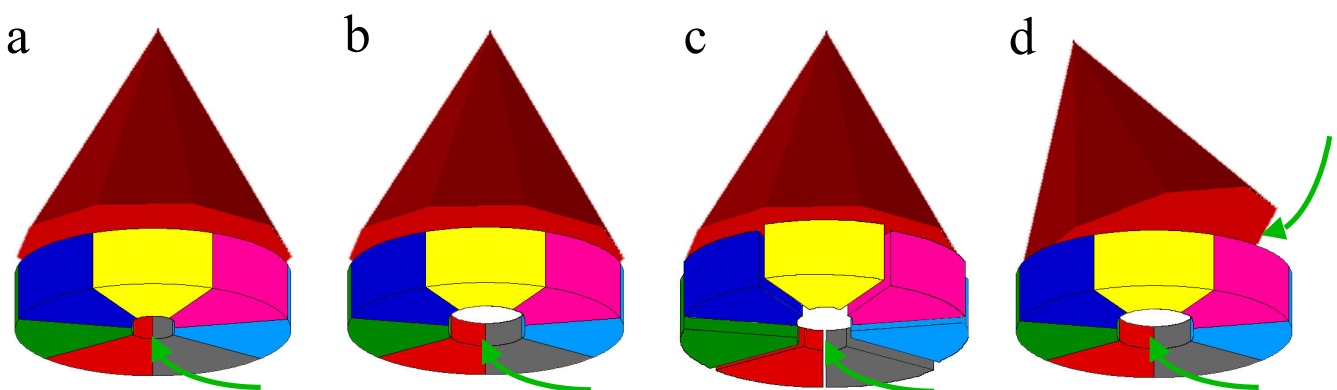


Abb. 5.16: Schemazeichnung der vier Substratzufuhr-Möglichkeiten am Beispiel der Trilobed-Protease. Die Substrataufnahme könnte a) über eine sehr enge Pore, b) über eine geweitete Pore mit einem geeigneten Filtermechanismus durch Substratvorselektion, z.B. Ladung, c) durch aktive Erweiterung der Pore wie in einem Atmungsprozess oder d) durch einen Klappmechanismus zwischen zwei Domänen erfolgen. Hierbei kann das Substrat sowohl durch die Pore wie auch durch den Spalt zwischen den Domänen zum aktiven Zentrum gelangen. Die Substratzufuhr ist jeweils durch grüne Pfeile gekennzeichnet.

5.2.4 Ausblick

Die Strukturlösung der Trilobed-Protease könnte möglicherweise als weiteres Testmodell für eine *ab initio* Mittelung dienen, wobei für diesen Testfall bereits Modellphasen bis 2.2 Å für die TLP-β7 Propellerdomäne existieren. Eine Verfeinerung der *ab initio* Technik könnte durch Vergleiche zwischen den verschiedenen Modellphasen aus *ab initio* Mittelung mit einer 40 Å Elektronendichte, Pseudoatommodellen und einer *Molecular Replacement* Lösung zu einer allgemein einsetzbaren Strategie für weitere Projekte führen.

Anhand der Gesamtstruktur der Trilobed-Protease könnte die „offene“ und „geschlossene“ Konformation der β-Propellerdomäne und damit eine Art Atmungsmechanismus für die Substrataufnahme genauer untersucht werden. Co-Kristallisations Experimente mit längeren Peptiden könnten zur Klärung der Substratzuführung beitragen und somit einen Klappmechanismus zwischen den beiden Untereinheiten für die Substrataufnahme als unwahrscheinlich erscheinen lassen. Durch Mutationsstudien könnte die Substratspezifität weiter untersucht werden, in diesem Zusammenhang wäre auch eine Untersuchung der Thermostabilität der Protease von Interesse.

6. Literaturverzeichnis

- Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., and Ponting, C. P.** (2001). Protein repeats: Structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology* **134**, 117-131.
- Bacher, A., Weinkauff, S., Bachmann, L., Ritsert, K., Baumeister, W., Huber, R., and Ladenstein, R.** (1992). Electron Microscopy of Decorated Crystals for the Determination of Crystallographic Rotation and Translation Parameters in Large Protein Complexes. *Journal of Molecular Biology* **225**, 1065-1073.
- Bachmann, L., Weinkauff, S., Baumeister, W., Wildhaber, I., and Bacher, A.** (1989). Electron Microscopy of Subnanometer Surface Features on Metal-decorated Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology* **207**, 575-584.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A.** (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 angstrom resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Beisel, H. G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R., and Bode, W.** (1999). Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *EMBO Journal* **18**, 2313-2322.
- Bosch, J.** (1998). Expression und Kristallisation der Tricorn-Protease. Diplomarbeit.
- Bosch, J., Tamura, T., Baumeister, W., and Essen, L. O.** (2003). 2.0 Å Crystal structure of the Trilobed β -Propeller Domain from *Pyrococcus furiosus*. Manuskript in Vorbereitung.
- Bosch, J., Tamura, T., Bourenkov, G., Baumeister, W., and Essen, L. O.** (2001). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of the tricorn protease hexamer from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Structural Biology* **134**, 83-87.
- Bosch, J., Tamura, T., Essen, L. O., and Baumeister, W.** (2003). Alternative substrate pathway reveals disagreement with previous Tricorn results. Manuskript in Vorbereitung.

Bragg, L., and Perutz, M. F. (1954). The Structure of Haemoglobin .6. Fourier Projections On the 010-Plane. Proceedings of the Royal Society of London Series a- Mathematical and Physical Sciences **225**, 315-329.

Brandstetter, H., Kim, J. S., Groll, M., and Huber, R. (2001). Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line. Nature **414**, 466-470.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grossekunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR System - a New Software Suite For Macromolecular Structure Determination. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography **54**, 905-921.

Cate, J. H., and Doudna, J. A. (2000). Solving large RNA structures by X-ray crystallography. RNA Ligand Interactions Pt A : Structural Biology Methods **317**, 169-180.

Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. Science **285**, 2095-2104.

Cate, J. H. D. (2001). Construction of low-resolution X-ray crystallographic electron density maps of the ribosome. Methods **25**, 303-308.

CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography **50**, 760-763.

Chen, L. Y., Doi, N., Durley, R. C. E., Chistoserdov, A. Y., Lidstrom, M. E., Davidson, V. L., and Mathews, F. S. (1998). Refined Crystal Structure of Methylamine Dehydrogenase From *Paracoccus Denitrificans* At 1.75 Angstrom Resolution. Journal of Molecular Biology **276**, 131-149.

Crennell, S. J., Garman, E. F., Philippon, C., Vasella, A., Laver, W. G., Vimr, E. R., and Taylor, G. L. (1996). The Structures of *Salmonella typhimurium* Lt2 Neuraminidase and Its Complexes With Three Inhibitors At High Resolution. Journal of Molecular Biology **259**, 264-280.

- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPherson, A.** (1994). Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **50**, 414-423.
- Dauter, Z.** (1999). Data-collection strategies. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 1703-1717.
- Delaney, J. S.** (1992). Finding and filling protein cavities using cellular logic operations. *Journal of Molecular Graphics* **10**, 174-177.
- Diprose, J. M., Grimes, J. M., Gouet, P., Malby, R., Burroughs, J. N., Lescar, J., Rassmussen, B., Mertens, P. P. C., and Stuart, D. I.** (1999). Bluetongue virus: the role of synchrotron radiation. *Journal of Synchrotron Radiation* **6**, 865-874.
- Faber, H. R., Groom, C. R., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A., and Baker, E. N.** (1995). 1.8-Angstrom Crystal-Structure of the C-Terminal Domain of Rabbit Serum Hemopexin. *Structure* **3**, 551-559.
- Fu, J. H., Gnatt, A. L., Bushnell, D. A., Jensen, G. J., Thompson, N. E., Burgess, R. R., David, P. R., and Kornberg, R. D.** (1999). Yeast RNA polymerase II at 5 angstrom resolution. *Cell* **98**, 799-810.
- Fülöp, V., Bocskei, Z., and Polgar, L.** (1998). Prolyl Oligopeptidase - an Unusual Beta-Propeller Domain Regulates Proteolysis. *Cell*. **94**, 161-170.
- Fülöp, V., and Jones, D. T.** (1999). beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 715-721.
- Fülöp, V., Szeltner, Z., and Polgar, L.** (2000). Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. *EMBO Reports* **1**, 277-281.
- Green, D. W., Ingram, V. M., and Perutz, M. F.** (1954). The Structure of Haemoglobin IV. Sign Determination by the Isomorphous Replacement Method. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A* **225**, 287-307.

- Grimes, J. M., Fuller, S. D., and Stuart, D. I.** (1999). Complementing crystallography: the role of cryo-electron microscopy in structural biology. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 1742-1749.
- Grimes, J. M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A. K., Roy, P., Chiu, W., Stuart, D. I., and Prasad, B. V. V.** (1997). An Atomic Model of the Outer Layer of the Bluetongue Virus Core Derived From X-Ray Crystallography and Electron Cryomicroscopy. *Structure* **5**, 885-893.
- Hao, Q.** (2001). Phasing from an envelope. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **57**, 1410-1414.
- Hao, Q., Dodd, F. E., Grossman, J. G., and Hasnain, S. S.** (1999). *Ab initio* phasing using molecular envelope from solution X-ray scattering. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 243-246.
- Harris, M. N., Madura, J. D., Ming, L. J., and Harwood, V. J.** (2001). Kinetic and mechanistic studies of prolyl oligopeptidase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 19310-19317.
- Hegerl, R.** (1996). The EM program package - a platform for image processing in biological electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. **116**, 30-34.
- Hendrickson, W. A.** (1985). Analysis of Protein Structure From Diffraction Measurements at Multiple Wavelengths. *Transactions of the American Crystallographic Association* **21**, 11-21.
- Hendrickson, W. A.** (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science* **254**, 51-58.
- Hendrickson, W. A., Pahler, A., Smith, J. L., Satow, Y., Merritt, E. A., and Phizackerley, R. P.** (1989). Crystal-Structure of Core Streptavidin Determined From Multiwavelength Anomalous Diffraction of Synchrotron Radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2190-2194.

- Jancarik, J., and Kim, S. K.** (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* **24**, 409-411.
- Jawad, Z., and Paoli, M.** (2002). Novel sequences propel familiar folds. *Structure* **10**, 447-454.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M.** (1991). Improved Methods For Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119.
- Juan, D., Graña, O., Pazos, F., Fariselli, P., Casadio, R., and Valencia, A.** (2002). LIBELLULA: a neural network approach to evaluate fold recognition results. <http://www.pdg.cnb.uam.es:8081/libellula.html>.
- Kim, J. S., Groll, M., Musiol, H. A., Behrendt, R., Kaiser, M., Moroder, L., Huber, R., Brandstetter, H.** (2002). Navigation inside a protease: Substrate selection and product exit in the tricorn protease from *Thermoplasma acidophilum*. *Journal of Molecular Biology* **324**, 1041-1050
- Kleywegt, G. J.** (1996). Use of Non-Crystallographic Symmetry in Protein Structure Refinement. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **52**, 842-857.
- Kleywegt, G. J.** (1992). USF: Software and Resources for Molecular Crystallography and Structural Biology. http://alpha2.bmc.uu.se/~gerard/manuals/gerard_manuals.html.
- Kleywegt, G. J., and Jones, T. A.** (1994). Detection, Delineation, Measurement and Display of Cavities in Macromolecular Structures. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 178-185.
- Kleywegt, G. J., and Read, R. J.** (1997). Not Your Average Density. *Structure* **5**, 1557-1569.
- Knablein, J., Neufeind, T., Schneider, F., Bergner, A., Messerschmidt, A., Lowe, J., Steipe, B., and Huber, R.** (1997). Ta6br12(2+), a Tool For Phase Determination of Large Biological Assemblies By X-Ray Crystallography. *Journal of Molecular Biology* **270**, 1-7.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Levitt, D. G.** (2001). A new software routine that automates the fitting of protein X-ray crystallographic electron-density maps. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **57**, 1013-1019.
- Lu, G.** (2000). TOP: A new method for Protein Structure Comparisons and Similarity Searches. *Journal of Applied Crystallography* **33**, 176-183.
- Lunin, V. Y., Lunina, N. L., Petrova, T. E., Skovoroda, T. P., Urzhumtsev, A. G., and Podjarny, A. D.** (2000). Low-resolution *ab initio* phasing: problems and advances. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **56**, 1223-1232.
- Lupas, A., Flanagan, J. M., Tamura, T., and Baumeister, W.** (1997). Self-compartmentalizing proteases. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 399-404.
- Matthews, B. W.** (1968). Solvent Content in Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology* **33**, 491-497.
- McKenna, R., Xia, D., Willingmann, P., Ilag, L. L., Krishnaswamy, S., Rossmann, M. G., Olson, N. H., Baker, T. S., and Incardona, N. L.** (1992). Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage Φ X174 and its functional implications. *Nature* **355**, 137-143.
- Meining, W., Bacher, A., Bachmann, L., Schmid, C., Weinkauff, S., Huber, R., and Nar, H.** (1995). Elucidation of Crystal Packing By X-Ray Diffraction and Freeze-Etching Electron Microscopy - Studies On Gtp Cyclohydrolase I of *Escherichia Coli*. *Journal of Molecular Biology* **253**, 208-218.
- Miller, S. T., Hogle, J. M., and Filman, D. J.** (2001). *Ab initio* phasing of high-symmetry macromolecular complexes: Successful phasing of authentic poliovirus data to 3.0 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* **307**, 499-512.
- Mizuguchi, K., Deane, C. M., Blundell, T. L., Johnson, M. S., and Overington, J. P.** (1998). Joy - Protein Sequence-Structure Representation and Analysis. *Bioinformatics* **14**, 617-623.
- Murzin, A. G.** (1992). Structural Principles For the Propeller Assembly of Beta-Sheets - the Preference For 7-Fold Symmetry. *Proteins-Structure Function and Genetics* **14**, 191-201.

- Naitow, H., Morimoto, Y., Mizuno, H., Kano, H., Omura, T., Koizumi, M., and Tsukihara, T.** (1999). A low-resolution structure of rice dwarf virus determined by *ab initio* phasing. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 77-84.
- Neuhoff, V., and Arnold, N.** (1988). Improved staining of proteins in Polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nicholls, A., Sharp, K., and Honig, B.** (1991). GRASP: Graphical Representation and Analysis of Surface Properties. *Proteins, Structure Function and Genetics* **11**, 281.
- Ockwell, D. M., Hough, M. A., Grossmann, J. G., Hasnain, S. S., and Hao, Q.** (2000). Implementation of cluster analysis for *ab initio* phasing using the molecular envelope from solution X-ray scattering. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **56**, 1002-1006.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T.** (1995). How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of a Protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423.
- Paoli, M.** (2001). Protein folds propelled by diversity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **76**, 103-130.
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S.** (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Structural Biology* **6**, 458-463.
- Perrakis, A., Sixma, T. K., K.S., W., and V.S., a. L.** (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **53**, 448-455.
- Perutz, M. F.** (1956). Isomorphous Replacement and Phase Determination in Non- Centrosymmetric Space Groups. *Acta Crystallographica* **9**, 867-873.
- Philippsen, A.** (2002). DINO: Visualizing Structural Biology. <http://www.dino3d.org>.

- Polgar, L.** (2002). The prolyl oligopeptidase family. *Cellular & Molecular Life Sciences* **59**, 349-362.
- Ponting, C. P., and Pallen, M. J.** (1999). beta-Propeller repeats and a PDZ domain in the Tricorn protease: predicted self-compartmentalisation and C-terminal polypeptide-binding strategies of substrate selection. *FEMS Microbiology Letters*. **179**, 447-451.
- POV-Ray** (2002). Persistence of Vision™ Ray Tracer (POV-Ray™). <http://www.povray.org>.
- Quanta** (2002). X-AUTOFIT. <http://www.accelrys.com/quanta/xautofit.html>.
- Rawlings, N. D., O'Brien, E., and Barrett, A. J.** (2002). MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Research* **30**, 343-346.
- Reddy, V. S., Natarajan, P., Okerberg, B., Li, K., Damodaran, V., Morton, R. T., Brooks, C. L., and Johnson, J. E.** (2001). Virus Particle Explorer (VIPER), a Website for Virus Capsid Structures and Their Computational Analyses. *Journal of Virology* **75**, 11943-11947.
- Rees, D. C.** (1990). An Envelope-Based Approach for Direct Phase Determination of Macromolecular Structures. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **46**, 915-922.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer, A.** (1998). The 1.7-Angstrom Crystal Structure of the Regulator of Chromosome Condensation (Rcc1) Reveals a Seven-Bladed Propeller. *Nature* **392**, 97-101.
- Rossmann, M. G.** (1995). *Ab Initio* Phase Determination and Phase Extension Using Non-Crystallographic Symmetry. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 650-655.
- Rossmann, M. G., Bernal, R., and Pletnev, S. V.** (2001). Combining electron microscopic with X-ray crystallographic structures. *Journal of Structural Biology* **136**, 190-200.
- Rossmann, M. G., and Blow, D. M.** (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **15**, 24-31.

- Roversi, P., Blanc, E., Vornrhein, C., Evans, G., and Bricogne, G.** (2000). Low-resolution *ab initio* phasing: problems and advances. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **56**, 1223-1232.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- San Martin, C., Burnett, R. M., de Haas, F., Heinkel, R., Rutten, T., Fuller, S. D., Butcher, S. J., and Bamford, D. H.** (2001). Combined EM/X-ray imaging yields a quasi-atomic model of the adenovirus-related bacteriophage PRD1 and shows key capsid and membrane interactions. *Structure* **9**, 917-930.
- Sanner, M. F., Olson, A. J., and Spehner, J. C.** (1996). Reduced Surface - an Efficient Way to Compute Molecular Surfaces. *Biopolymers* **38**, 305-320.
- Sayle, R. A., and Milnerwhite, E. J.** (1995). Rasmol - Biomolecular Graphics For All. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 374-376.
- Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., and Tamura, T.** (1998). The role of Tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* **95**, 637-648.
- Tamura, N., Pfeiffer, G., Baumeister, W., and Tamura, T.** (2001). Tricorn protease in bacteria: characterization of the enzyme from *Streptomyces coelicolor*. *Biological Chemistry*, in press.
- Tamura, T.** (2002). Persönliche Korrespondenz.
- Tamura, T., Tamura, N., Cejka, Z., Hegerl, R., Lottspeich, F., and Baumeister, W.** (1996). Tricorn protease - the core of a modular proteolytic system. *Science*. **274**, 1385-1389.
- Tamura, T., Tamura, N., Lottspeich, F., and Baumeister, W.** (1996). Tricorn protease (TRI) interacting factor 1 from *Thermoplasma acidophilum* is a proline iminopeptidase. *FEBS Letters* **398**, 101-105.
- Tamura, T., Tamura, N., Lupas, A., Frangakis, A., Pfeifer, G., Engelhardt, H., Lottspeich, F., and Baumeister, W.** (2003). Trilobed protease (TLP) - a functional homologue of the tricorn protease has a β -propeller in its N-terminal that is conserved in all S9 peptidases. Manuscript in preparation.

- Terwilliger, T. C.** (1999). Reciprocal-space solvent flattening. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 1863-1871.
- Terwilliger, T. C., and Berendzen, J.** (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **55**, 849-861.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G.** (1997). The Clustal-X Windows Interface - Flexible Strategies For Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
- Thygesen, J., Krumbholz, S., Levin, I., Zaytzevbashan, A., Harms, J., Bartels, H., Schlunzen, F., Hansen, H. A. S., Bennett, W. S., Volkman, N., Agmon, I., Eisenstein, M., Dribin, A., Maltz, E., Sagi, I., Morlang, S., Fua, M., Franceschi, F., Weinstein, S., Boddeker, N., Sharon, R., Anagnostopoulos, K., Peretz, M., Geva, M., Berkovitchyellin, Z., and Yonath, A.** (1996). Ribosomal Crystallography - From Crystal Growth to Initial Phasing. *Journal of Crystal Growth* **168**, 308-323.
- Thygesen, J., Weinstein, S., Franceschi, F., and Yonath, A.** (1996). The Suitability of Multi-Metal Clusters For Phasing in Crystallography of Large Macromolecular Assemblies. *Structure* **4**, 513-518.
- Turk, D.** (1996). An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Computing School.
- Vagin, A., and Teplyakov, A.** (1997). Molrep - an Automated Program For Molecular Replacement. *Journal of Applied Crystallography* **30**, 1022-1025.
- Varghese, J. N., Laver, W. G., and Colman, P. M.** (1983). Structure of the Influenza-Virus Glycoprotein Antigen Neuraminidase At 2.9-Å-Resolution. *Nature* **303**, 35-40.
- Vellieux, F. M., Hajdu, J., Verlinde, C. L., Groendijk, H., Read, R. J., Greenhough, T. J., Campbell, J. W., Kalk, K. H., Littlechild, J. A., Watson, H. C., and Hol, W. G. J.** (1993). Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2355-9.

- Vellieux, F. M., Huitema, F., Groendijk, H., Kalk, K. H., Jzn, J. F., Jongejan, J. A., Duine, J. A., Petratos, K., Drenth, J., and Hol, W. G.** (1989). Structure of quinoprotein methylamine dehydrogenase at 2.25 Å resolution. *EMBO Journal* **8**, 2171-2178.
- Walz, J., Koster, A. J., Tamura, T., and Baumeister, W.** (1999). Capsids of Tricorn protease studied by electron cryomicroscopy. *Journal of Structural Biology* **128**, 65-68.
- Walz, J., Tamura, T., Tamura, N., Grimm, R., Baumeister, W., and Koster, A. J.** (1997). Tricorn protease exist as an icosahedral supermolecule *in vivo*. *Molecular Cell* **1**, 59-65.
- Wang, J. M., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M.** (1998). Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *Journal of Structural Biology*. **124**, 151-163.
- Weeks, C. M., and Miller, R.** (1999). The design and implementation of SnB version 2.0. *Journal of Applied Crystallography* **32**, 120-124.
- Xia, Z. X., Dai, W. W., Xiong, J. P., Hao, Z. P., Davidson, V. L., White, S., and Mathews, F. S.** (1992). The 3-Dimensional Structures of Methanol Dehydrogenase From 2 Methylophilic Bacteria At 2.6-Ångstrom Resolution. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 22289-22297.

7. Abkürzungen

(v/v)	Volumenanteil in Prozent
(w/v)	Masse pro Volumen in Prozent
3D	Dreidimensional
Å	Angström (= 0.1 nm)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADSC	Area Detector Systems Corporation
AMC	7-Amido-4-methyl-coumarin
AP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	Charged Coupled Device
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron, Hamburg
DME	Dimethylether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
engl.	englisch
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble
EtOH	Ethanol

FOM	engl. figure of merit
FPLC	engl. fast performance liquid chromatography
g	Gramm oder Beschleunigungskraft
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
mA	Milliampere
MAD	engl. multiple anomalous dispersion
MCA	engl. multi crystal averaging
MDA	engl. multi domain averaging
MDa	Megadalton
MES	Morpholinoethansulfonat
mg	Milligramm
min	Minute
MIR	engl. multiple isomorphous replacement
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

MPa	Megapascal
MPI	Max-Planck-Institut
MR	engl. molecular replacement
n.b.	nicht bestimmt
NCS	engl. non-crystallographic symmetry
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure
nm	Nanometer ($=10^{-9}$ m)
NSLS	National Synchrotron Light Source, Brookhaven
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	engl. Protein Data Base
PEG	Polyethylenglykol
POPase	Prolyl Oligopeptidase
r.m.s.d.	engl. root mean square deviation
rpm	engl. rounds per minute
S	Svedberg (10^{-13} s)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

TLP	Trilobed-Protease
TLP-β	Trilobed-Protease β-Propellerdomäne
TLS	engl. translation, liberation, screw-rotation
TRI	Tricorn-Protease
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro (10^{-6})

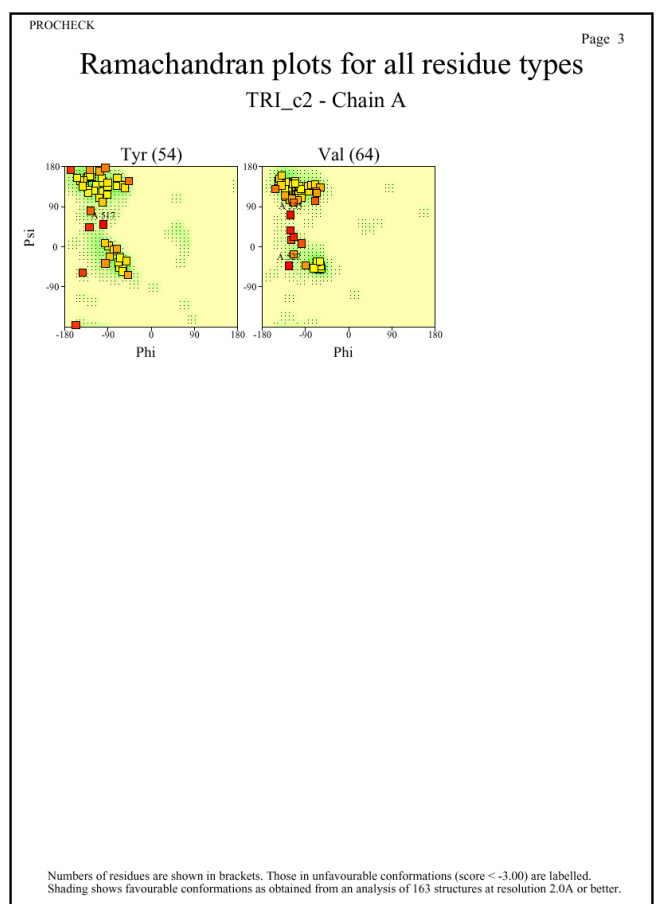
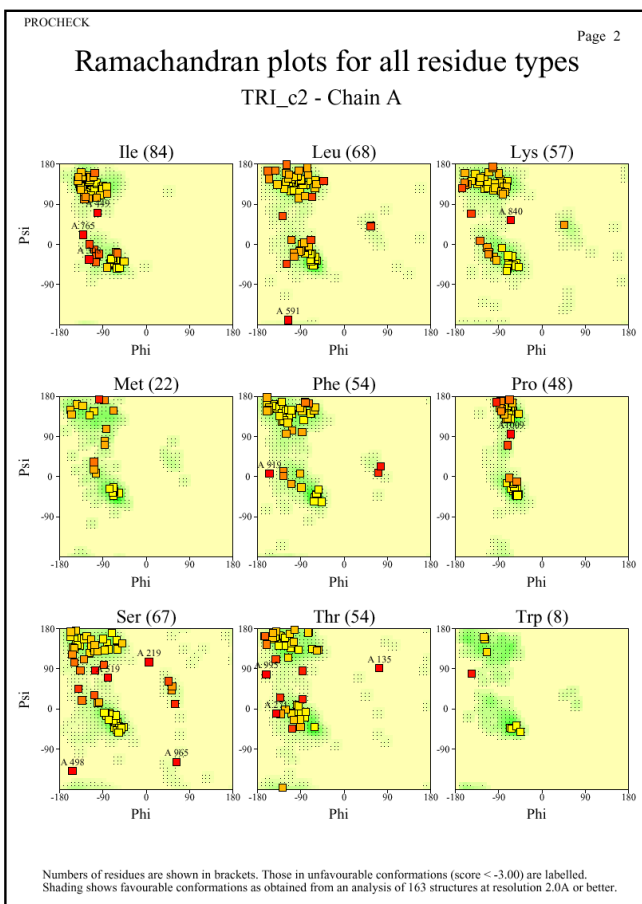
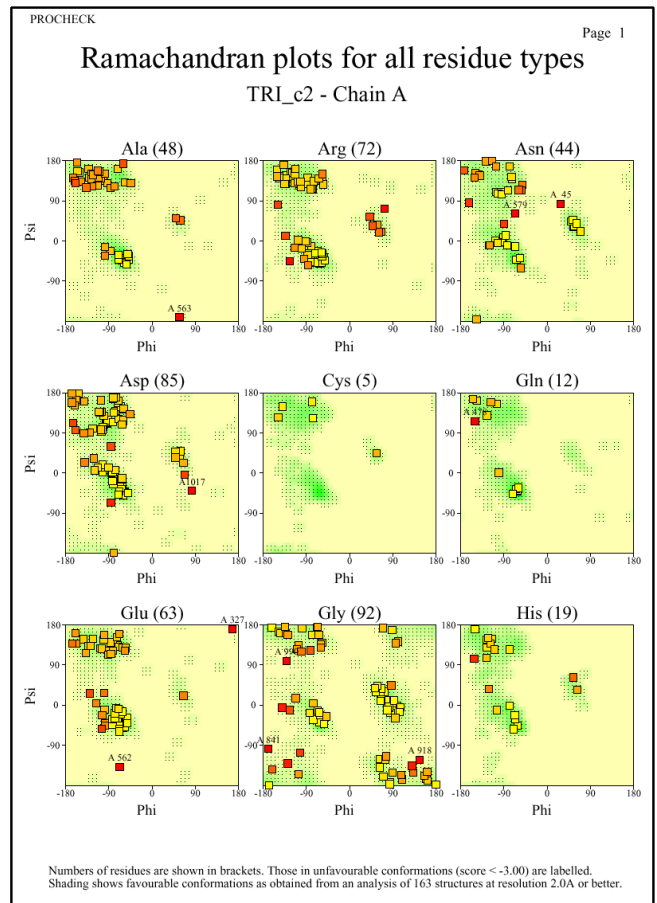
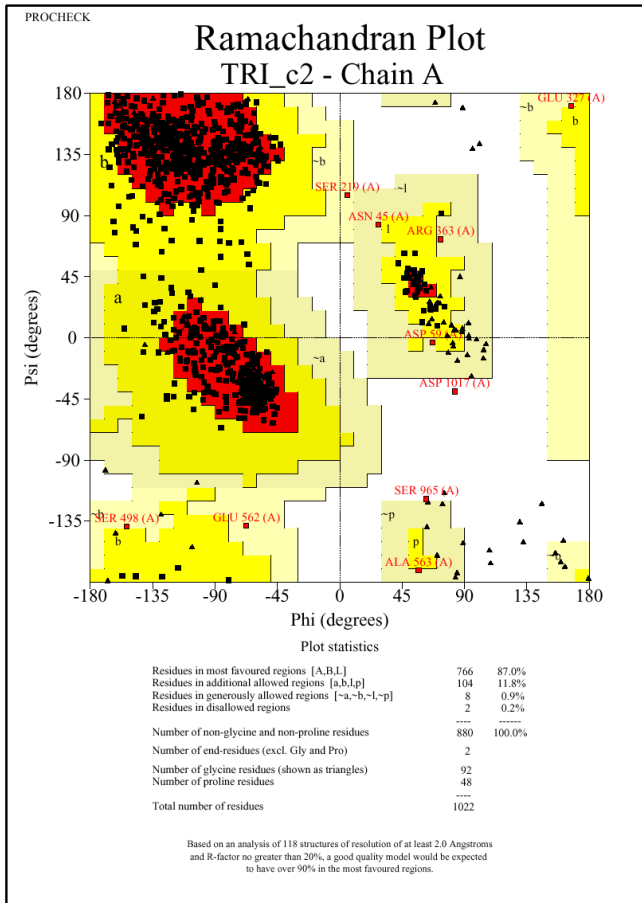
Aminosäuren wurden gemäß der IUPAC-IUB *Comission on Biochemical Nomenclature* im Einbuchstabencode angegeben.

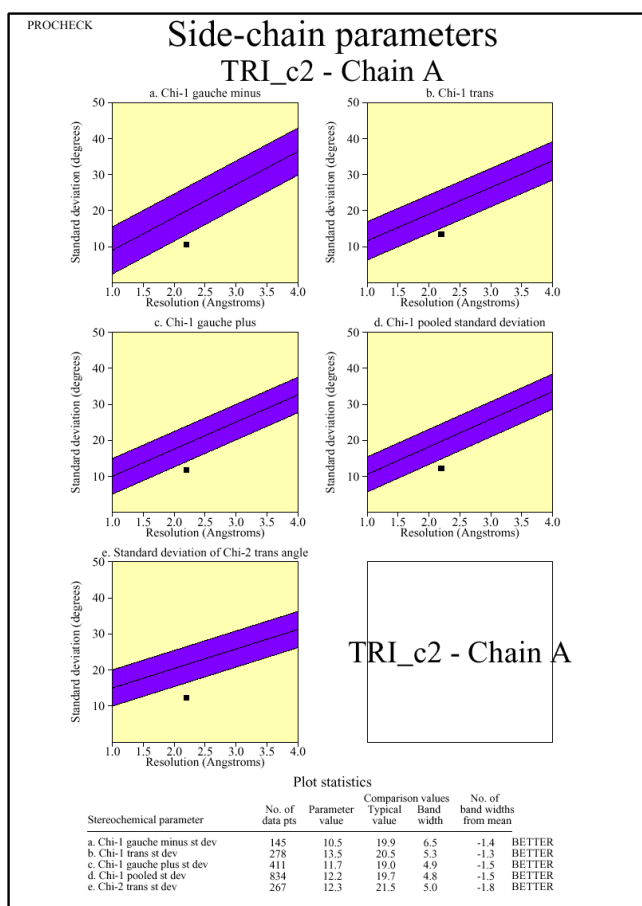
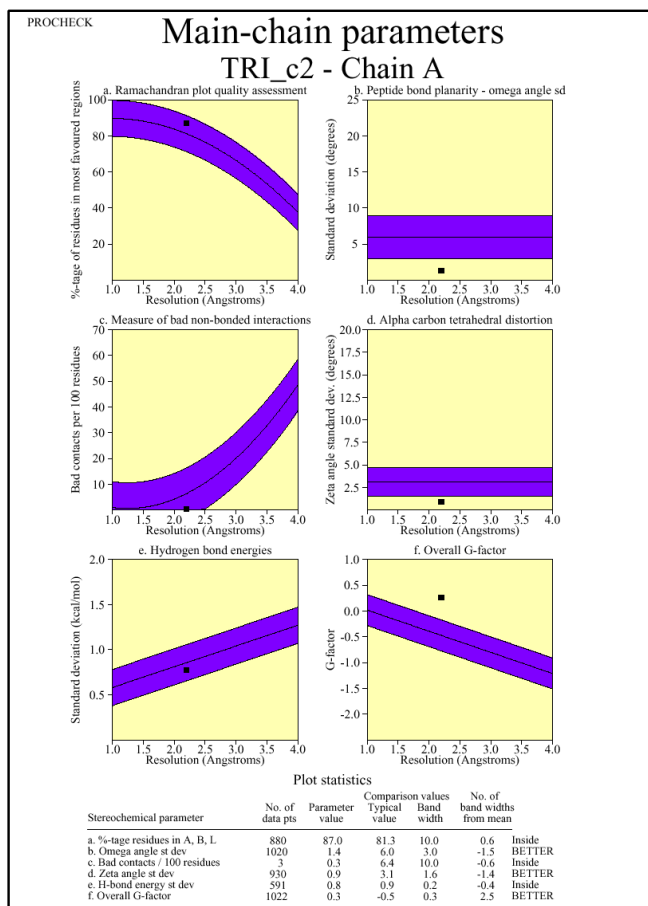
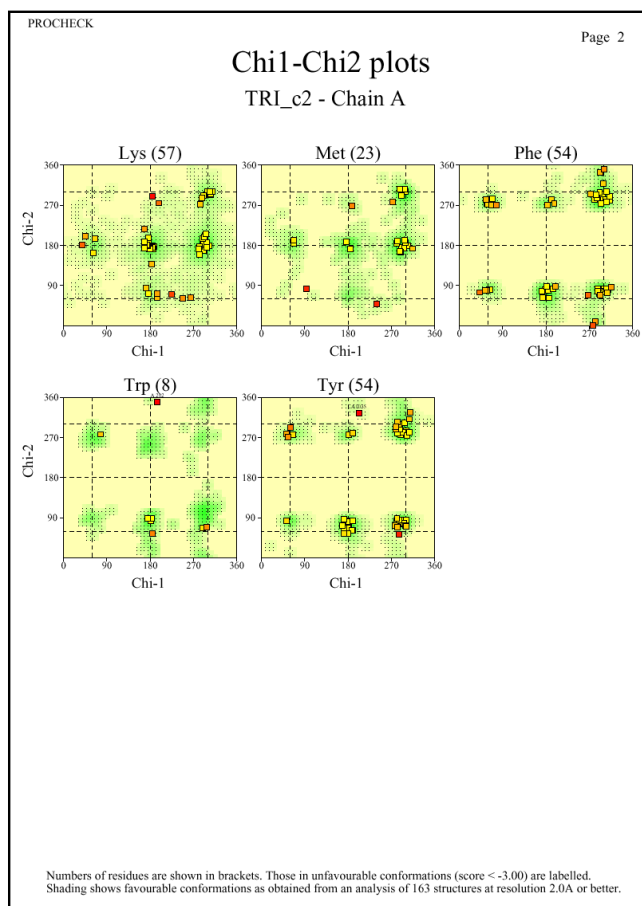
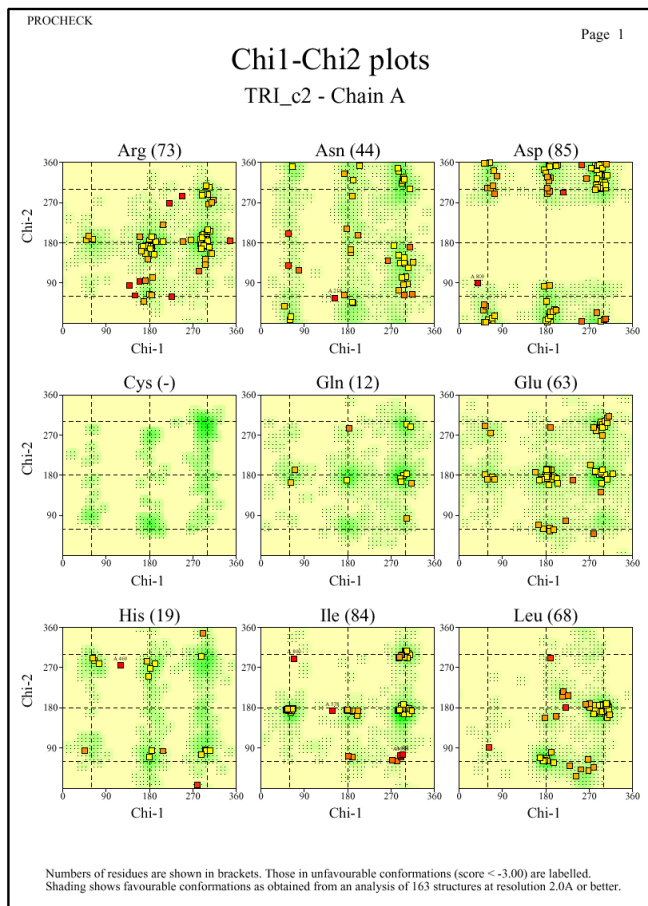
8. Anhang

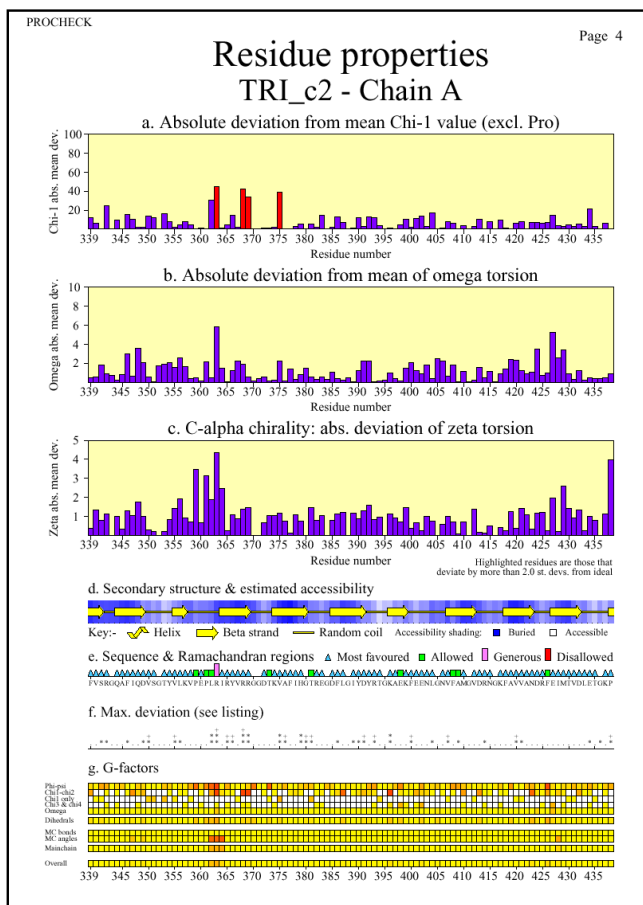
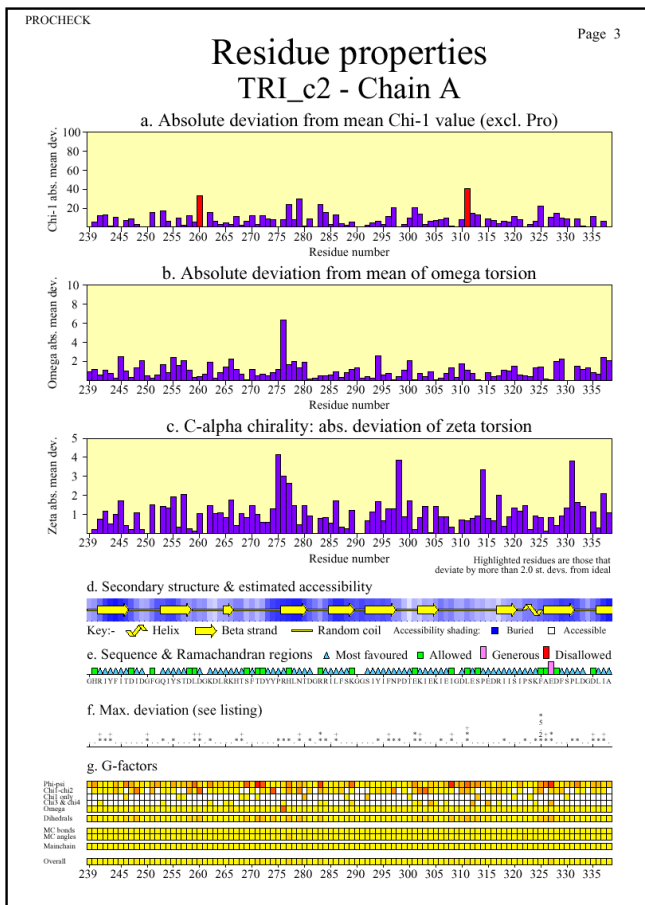
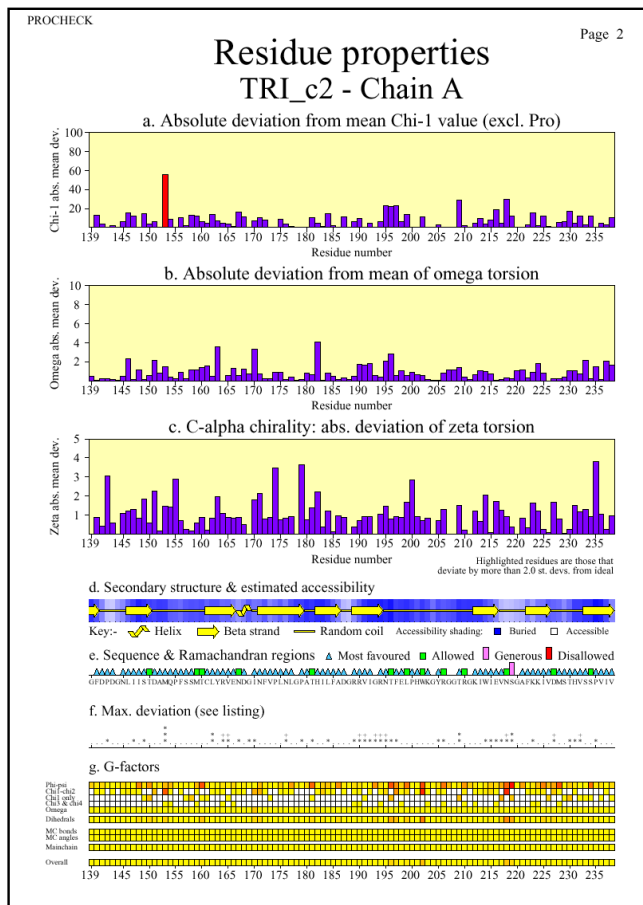
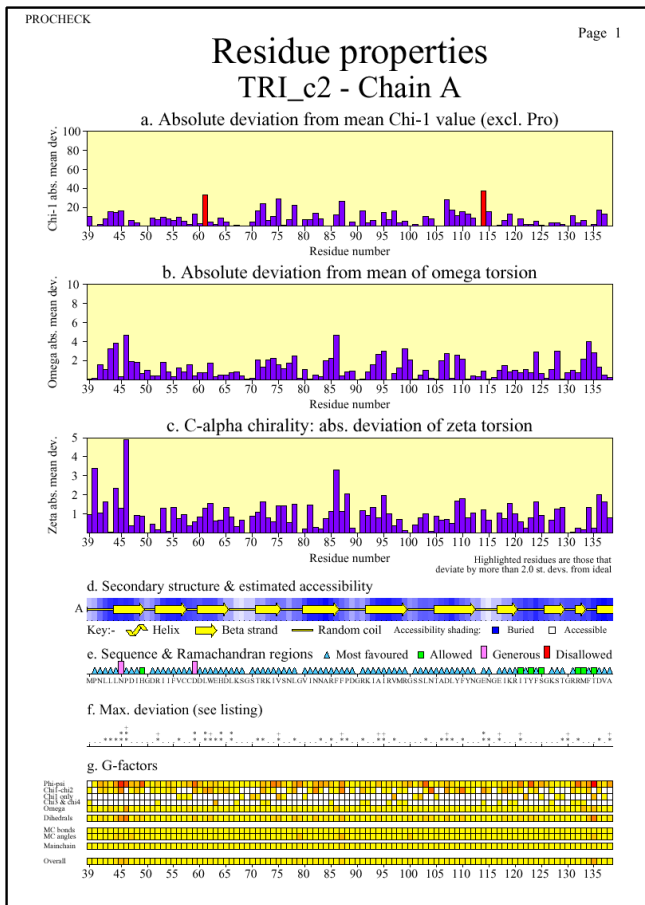
8.1 Tricorn - gemessene Schwermetallderivate

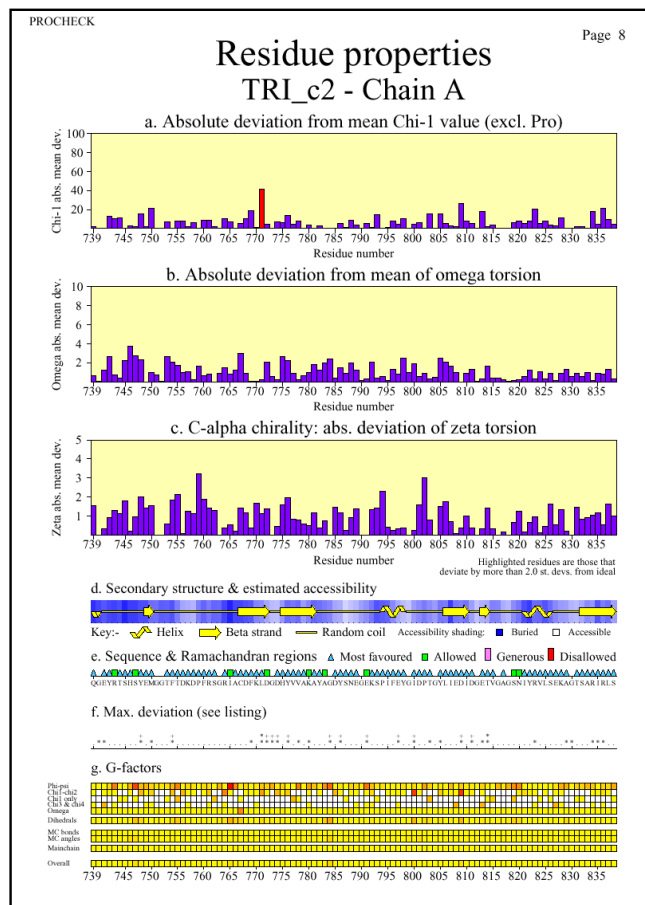
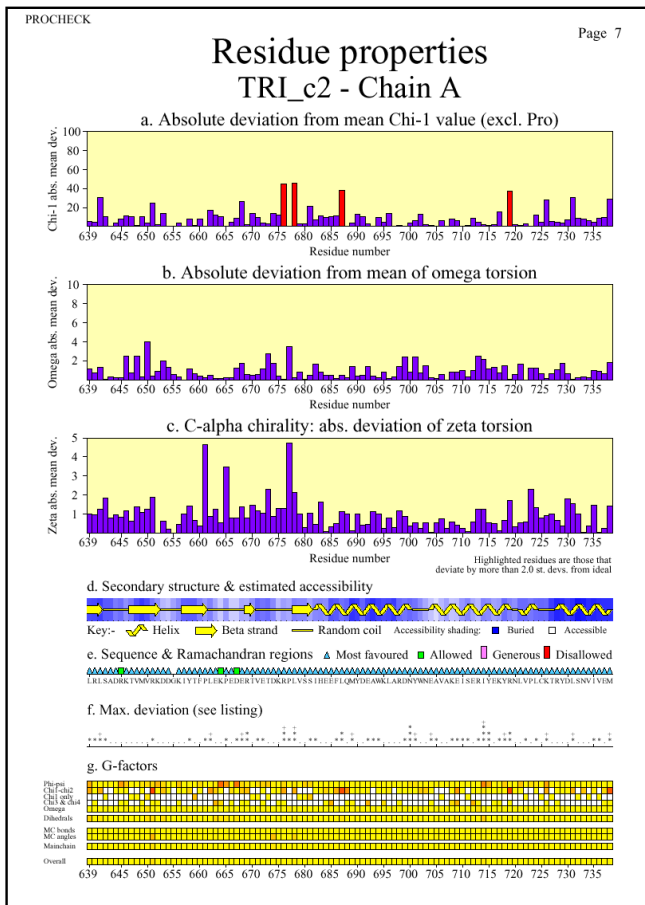
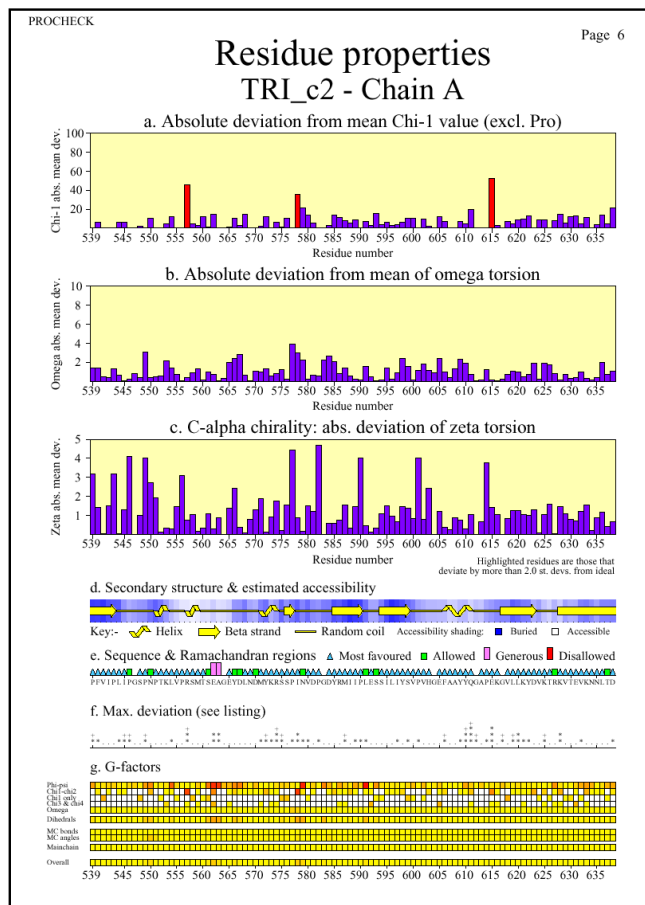
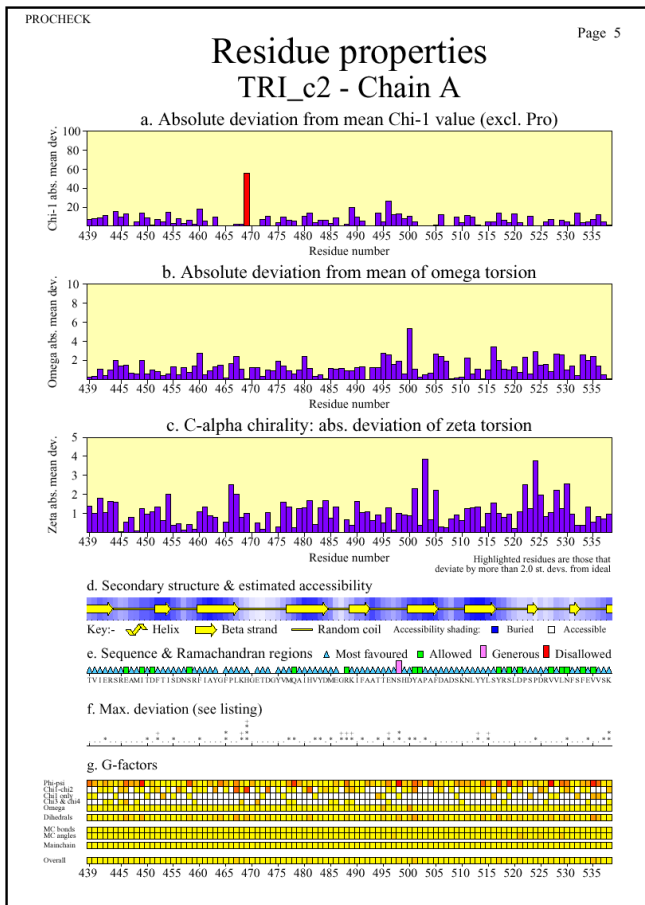
Schwermetall	Auflösung	λ	Zellparameter
EtHgCl ₂	50 – 5 Å	0.9402	310.60, 161.41, 220.10, $\beta = 105.75^\circ$
Ta ₆ Cl ₁₂	50 – 8 Å	0.949	309.45, 163.46, 221.53, $\beta = 105.67^\circ$
Ta ₆ Br ₁₂	45 – 6 Å	0.949	306.91, 163.10, 221.68, $\beta = 105.86^\circ$
HgBr	35 - 6 Å	0.949	305.60, 162.34, 219.62, $\beta = 105.51^\circ$
K ₂ PtCl ₆	45 - 4 Å	0.949	306.62, 162.43, 219.99, $\beta = 105.76^\circ$
[W ₃ O ₂ (OA ₆) ₆ (H ₂ O) ₃](CF ₃ SO ₃) ₂	100 – 7 Å	0.9310	307.07, 163.36, 221.83, $\beta = 105.38^\circ$
K ₆ HSiW ₉ V ₃ O ₄₀ ·3H ₂ O (MAD1)	100 – 4.6 Å	1.2134	304.22, 162.72, 220.12, $\beta = 105.20^\circ$
K ₆ HSiW ₉ V ₃ O ₄₀ ·3H ₂ O (MAD2)	100 – 4.6 Å	1.2140	304.67, 163.06, 220.61, $\beta = 105.13^\circ$
K ₆ HSiW ₉ V ₃ O ₄₀ ·3H ₂ O (MAD3)	85 – 4.3 Å	1.1160	305.21, 163.20, 220.70, $\beta = 105.06^\circ$
K ₅ H ₄ [(PhSn) ₃ (P ₂ W ₅ O ₅₉)] · 6 H ₂ O	90 – 4.6 Å	1.2134	308.73, 162.71, 221.20, $\beta = 105.33^\circ$
K ₁₄ [NaP ₅ W ₃₀ O ₁₁₀]·n H ₂ O	67 – 4.7 Å	0.8441	308.18, 163.04, 221.15, $\beta = 105.35^\circ$
K ₇ [(BuSn)(P ₂ W ₁₇ O ₆₁)]·10 H ₂ O	50 – 5 Å	0.9072	307.30, 162.90, 220.90, $\beta = 105.58^\circ$
Se (MAD1)	30 – 2.8 Å	0.9797	308.41, 163.22, 221.57, $\beta = 105.65^\circ$
Se (MAD2)	30 -2.9 Å	0.9795	308.36, 163.88, 221.65, $\beta = 105.40^\circ$
Se (MAD3)	30 – 3.2 Å	0.9464	311.54, 164.91, 225.73, $\beta = 105.52^\circ$
PIP	30 - 3.8 Å	0.934	309.03, 163.59, 221.41, $\beta = 105.64^\circ$
TAMM	39 - 4.5 Å	0.934	309.28, 162.88, 220.93, $\beta = 105.91^\circ$
NdCl ₃	25 - 3.7 Å	0.934	311.05, 163.82, 222.56, $\beta = 105.99^\circ$
AuCl ₄	40 - 3.5 Å	0.934	307.26, 163.51, 220.91, $\beta = 105.75^\circ$
PtCl ₄	49 - 3.3 Å	0.934	307.76, 163.15, 220.33, $\beta = 105.26^\circ$
Ir(IV)	50 - 6 Å	0.934	306.77, 162.79, 220.27, $\beta = 105.71^\circ$
Ir(III)	48 - 3.5 Å	0.934	309.40, 163.14, 220.90, $\beta = 105.76^\circ$
PCMB	40 - 3.5 Å	0.934	305.48, 163.22, 220.84, $\beta = 105.84^\circ$
K ₂ PtCl ₆	48 - 4 Å	1.0713	306.26, 163.24, 221.06, $\beta = 105.88^\circ$
K ₂ PtBr ₄	48 - 4 Å	1.0713	307.05, 163.26, 220.67, $\beta = 105.74^\circ$
AuCl ₄	40 - 3.1 Å	1.0392	310.50, 163.24, 221.53, $\beta = 105.55^\circ$
K ₂ ReCl ₆	40 - 4 Å	1.1763	307.58, 163.02, 221.14, $\beta = 105.74^\circ$
Ir(III)	48 - 4 Å	1.105	306.60, 162.40, 219.96, $\beta = 105.75^\circ$
K ₂ ReO ₄	40 - 3.5 Å	1.1763	308.72, 162.84, 220.53, $\beta = 105.70^\circ$
Xe	39 - 4 Å	0.979	309.27, 163.43, 221.04, $\beta = 105.34^\circ$

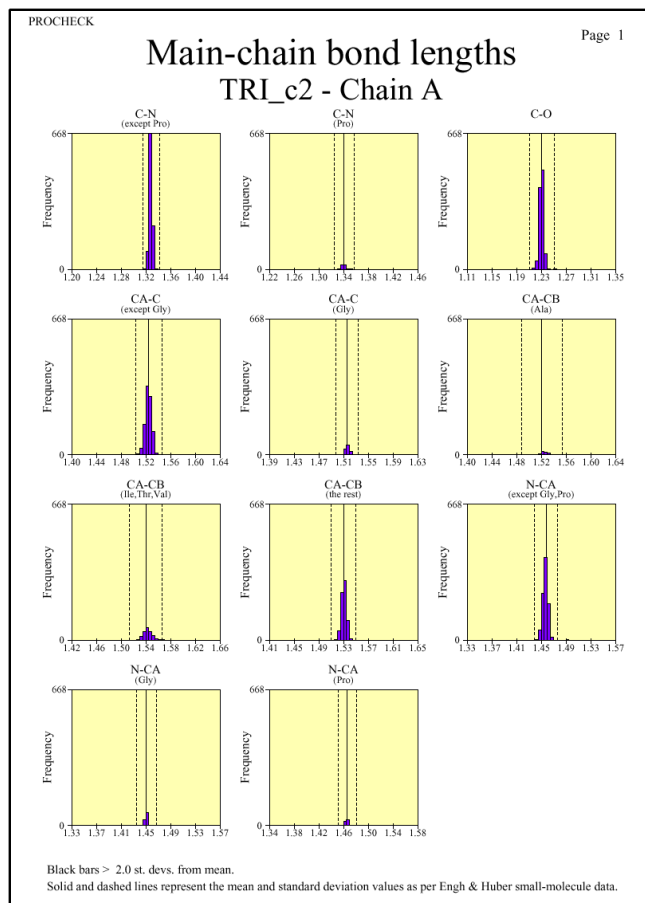
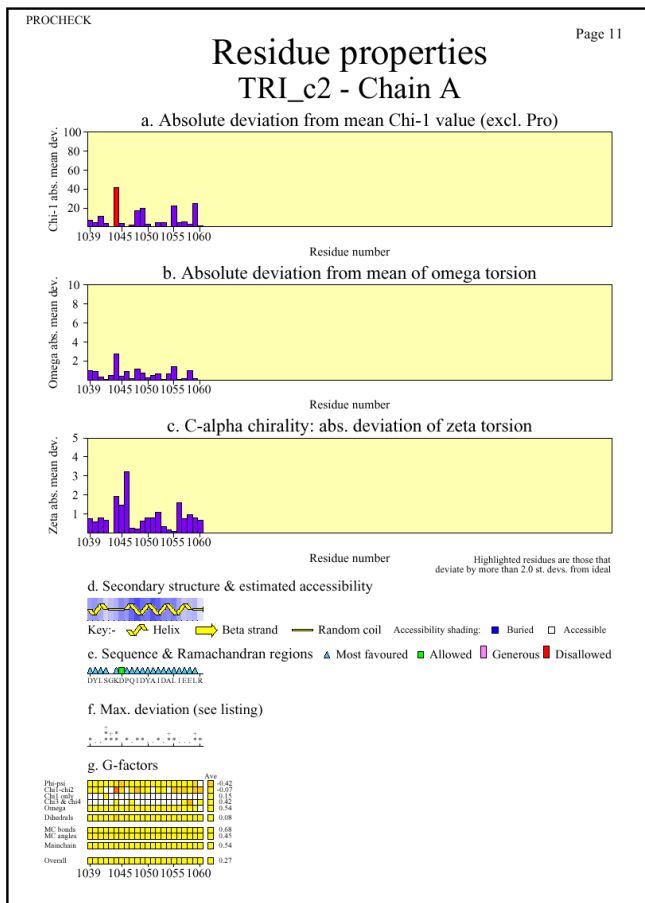
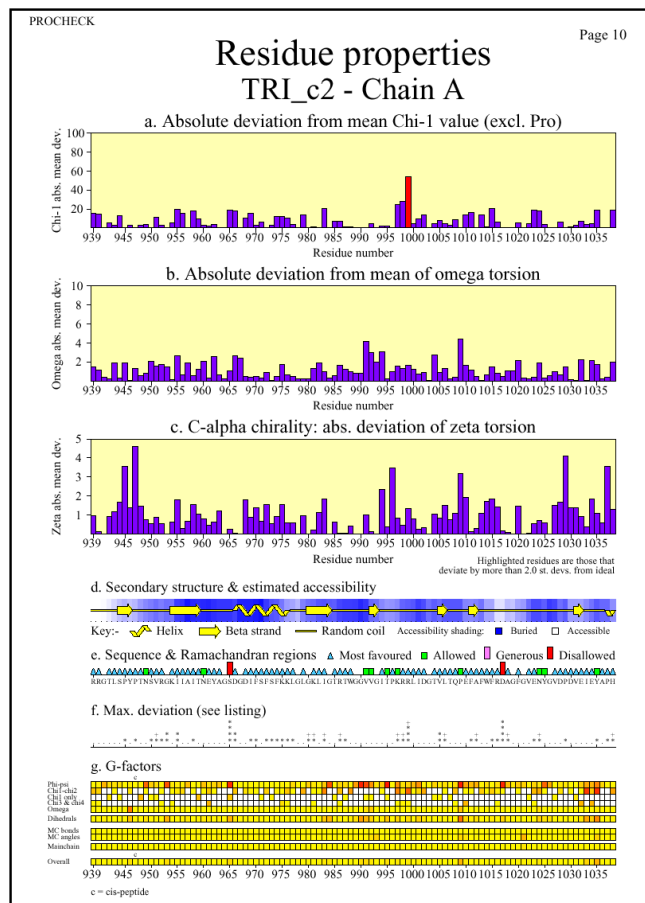
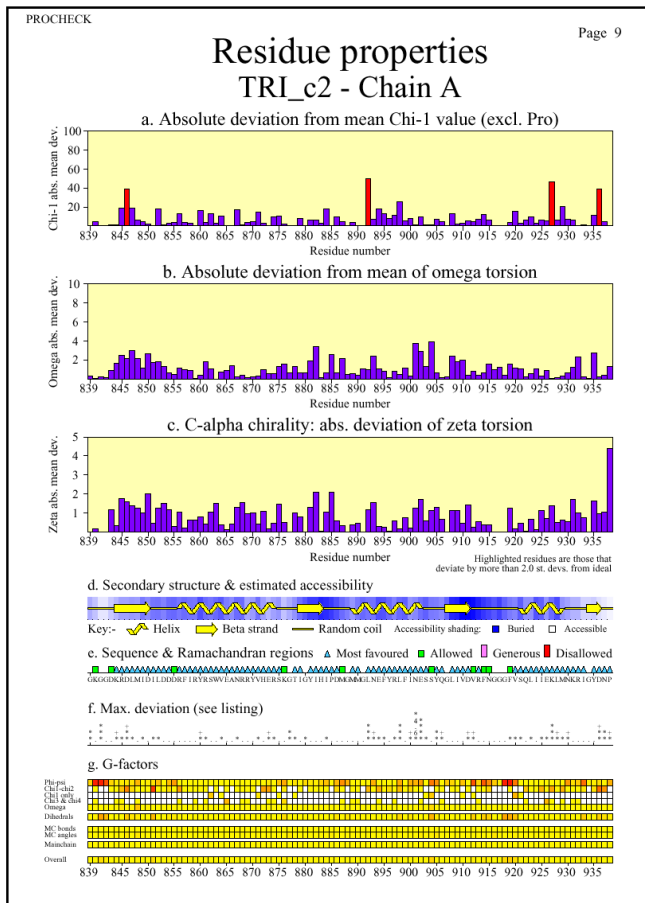
8.2 Tricorn - Procheck Ergebnisse

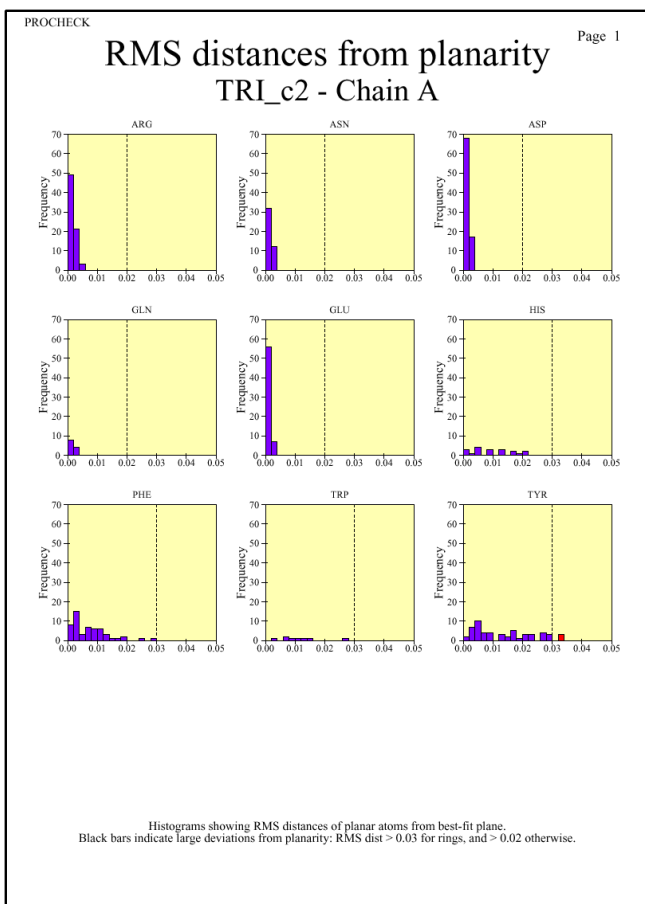
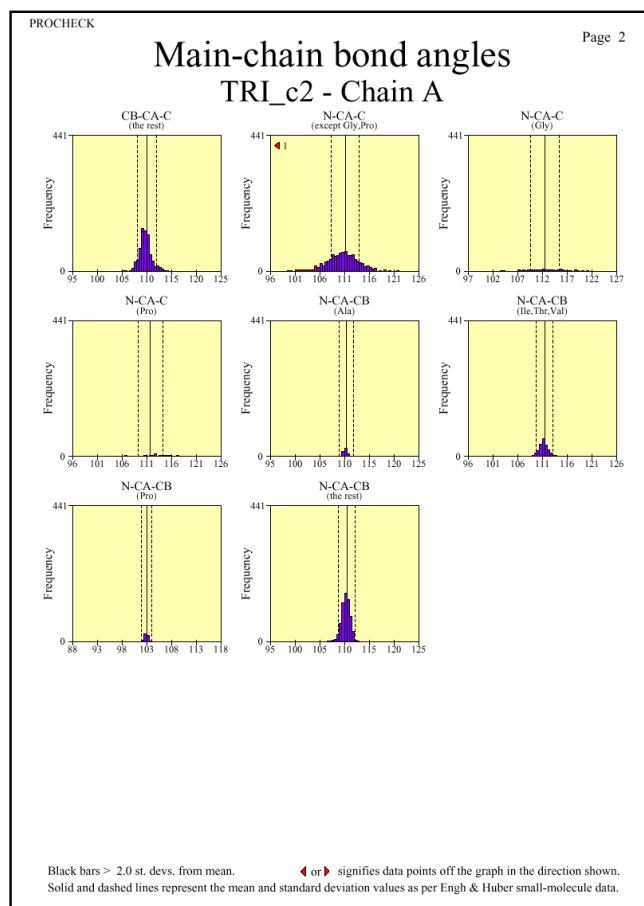
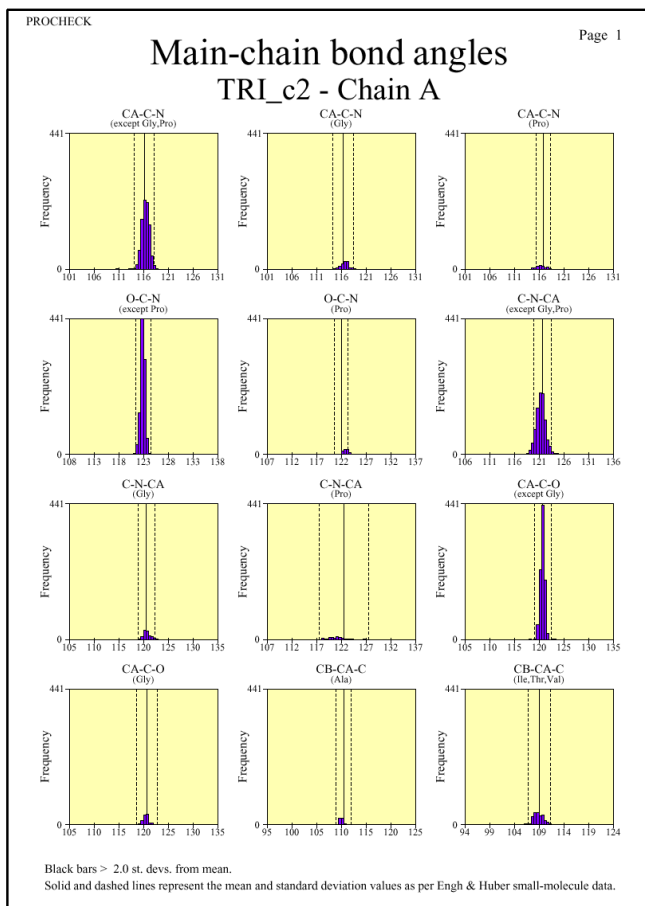




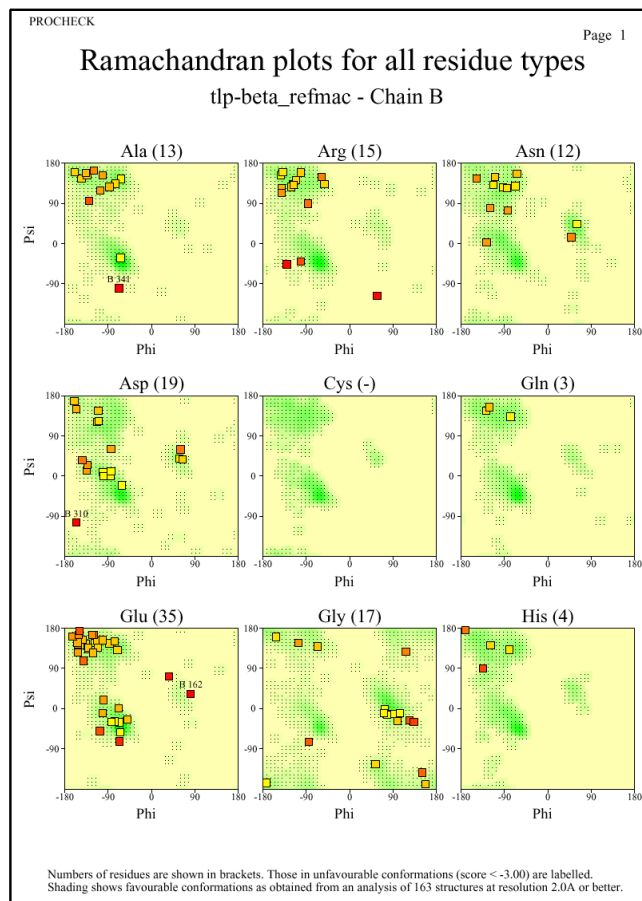
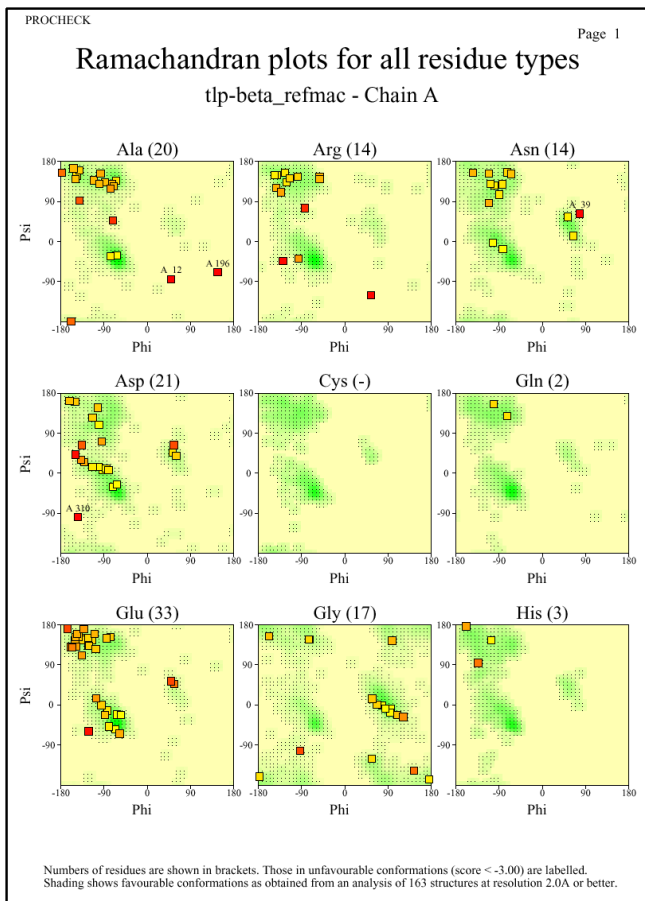
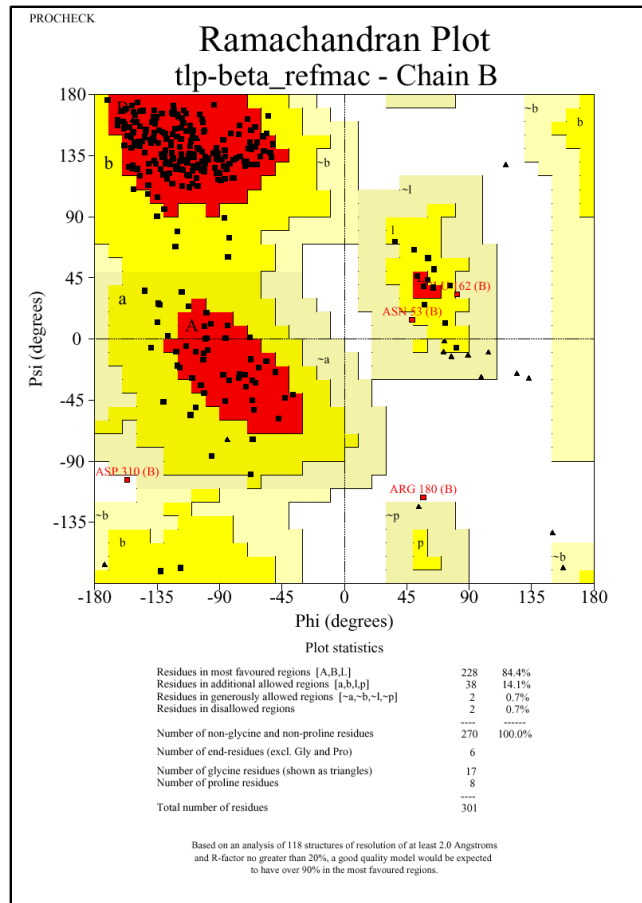
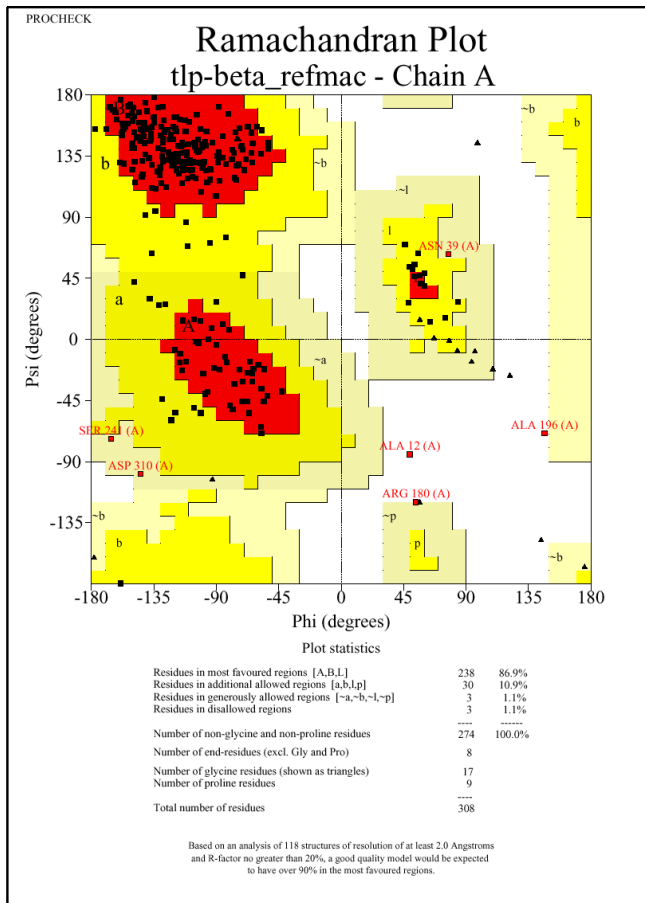


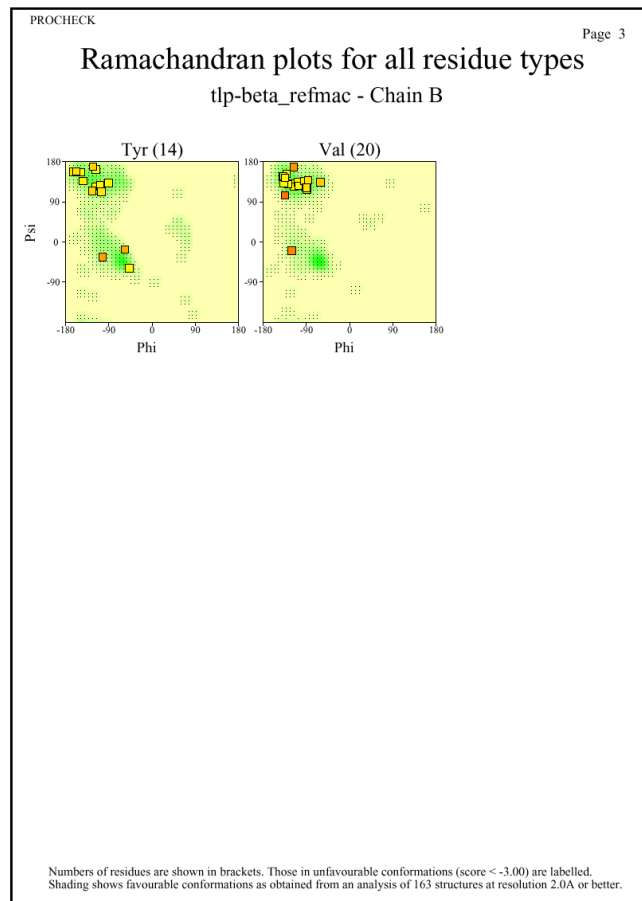
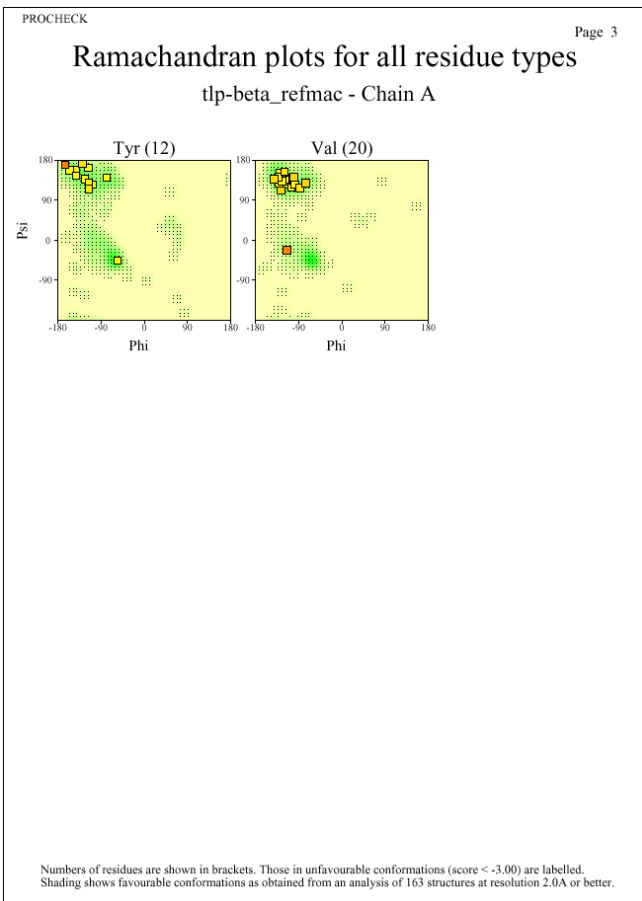
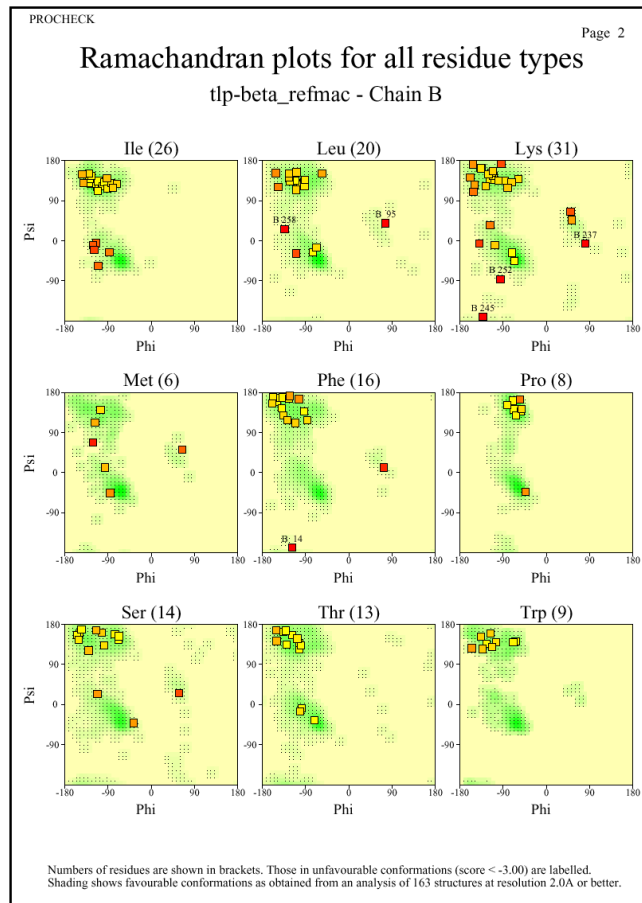
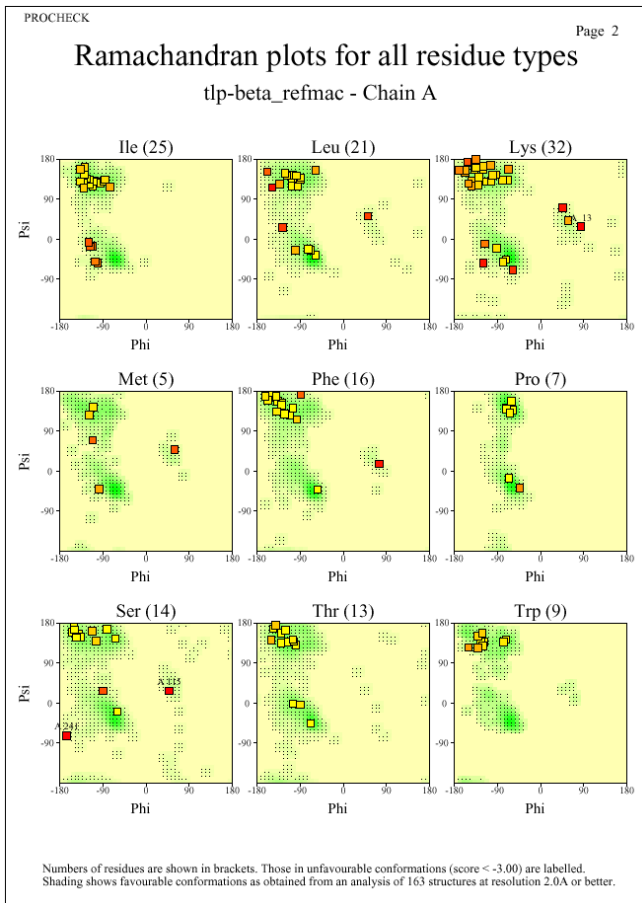


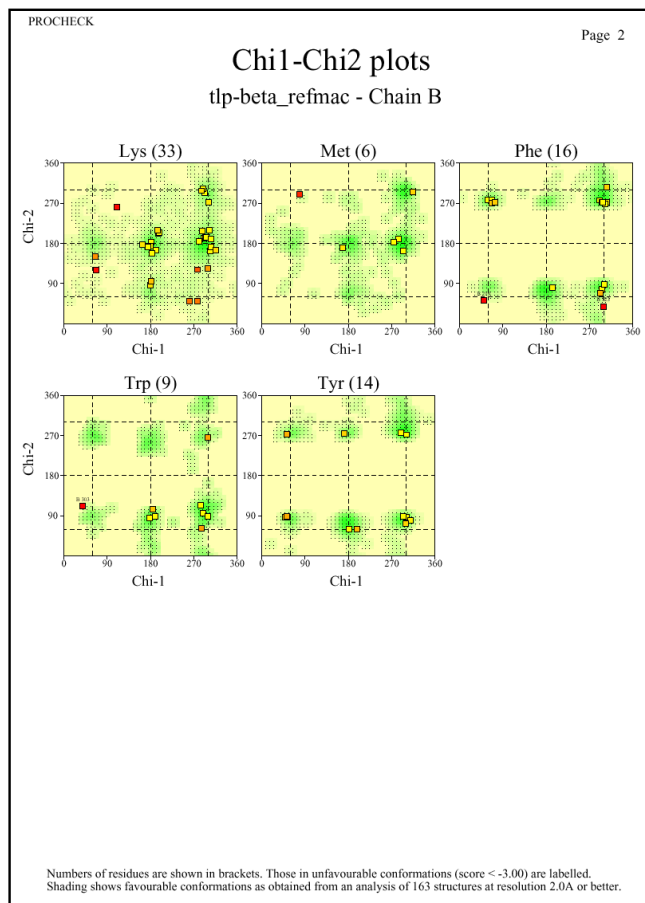
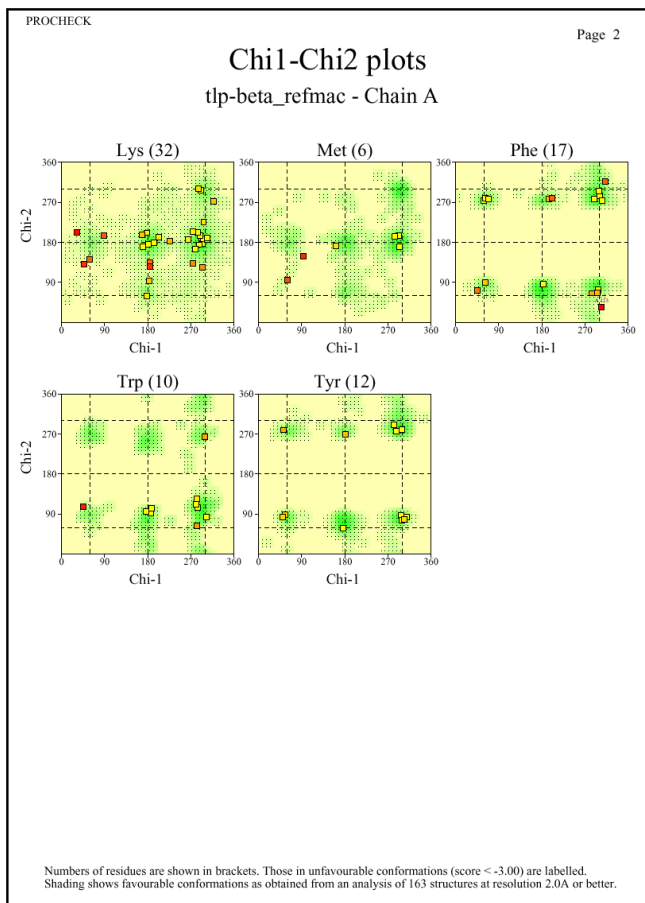
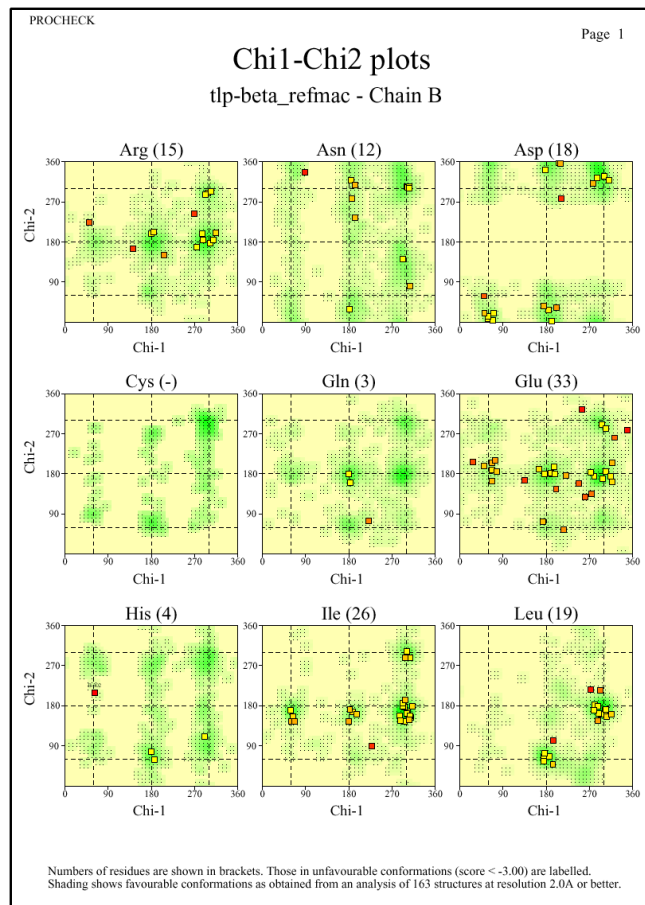
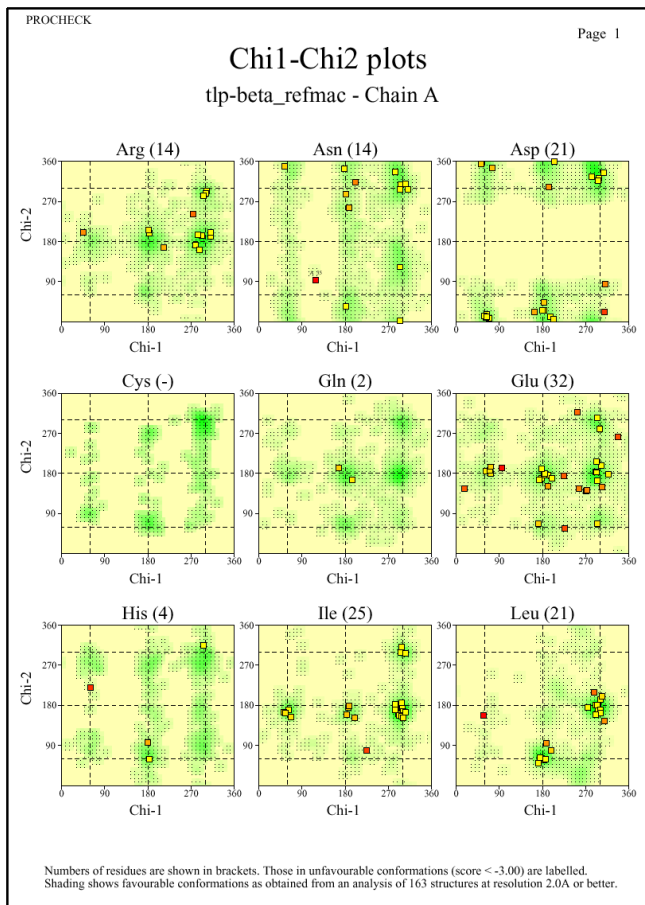


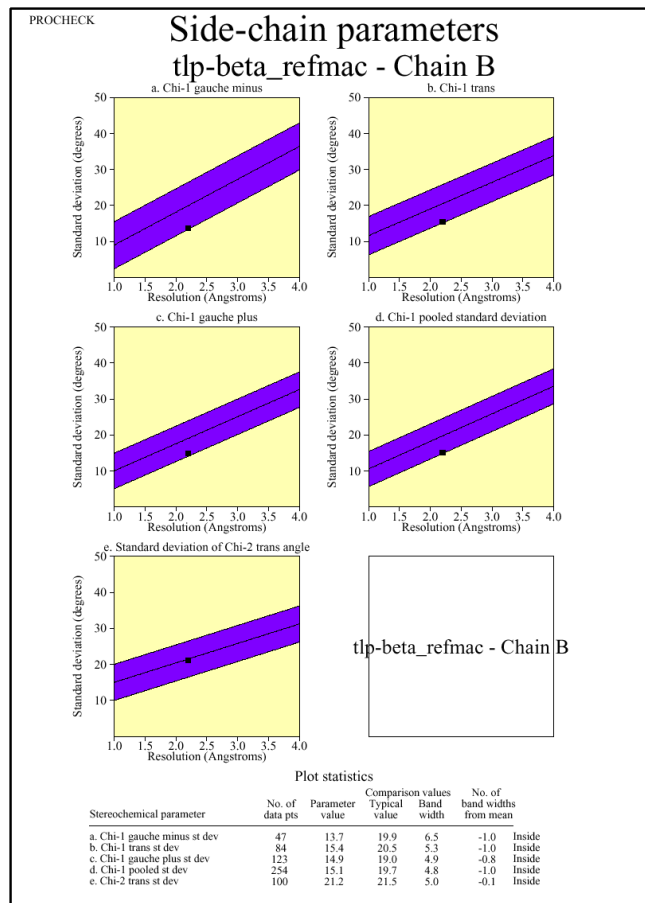
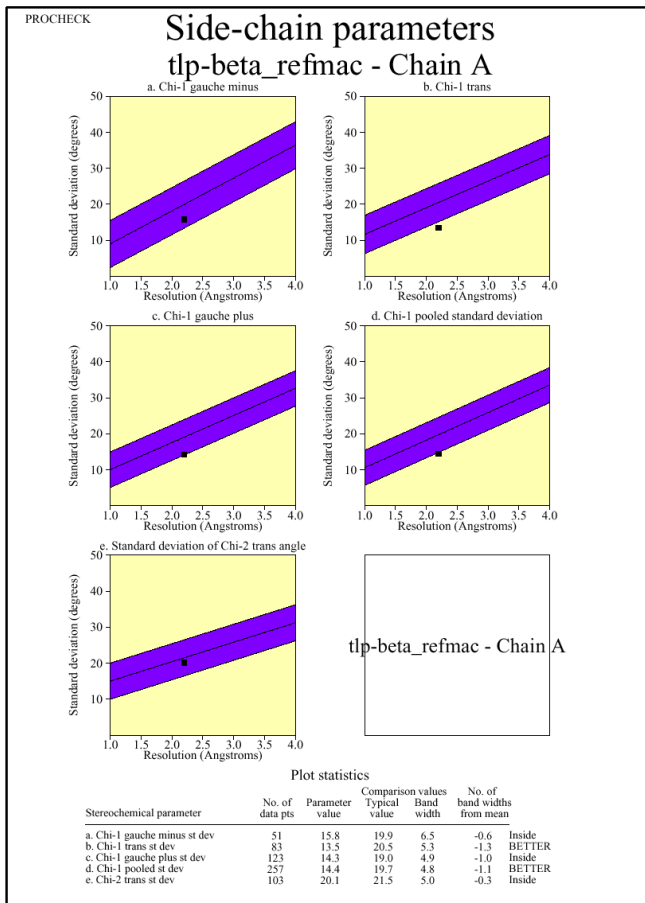
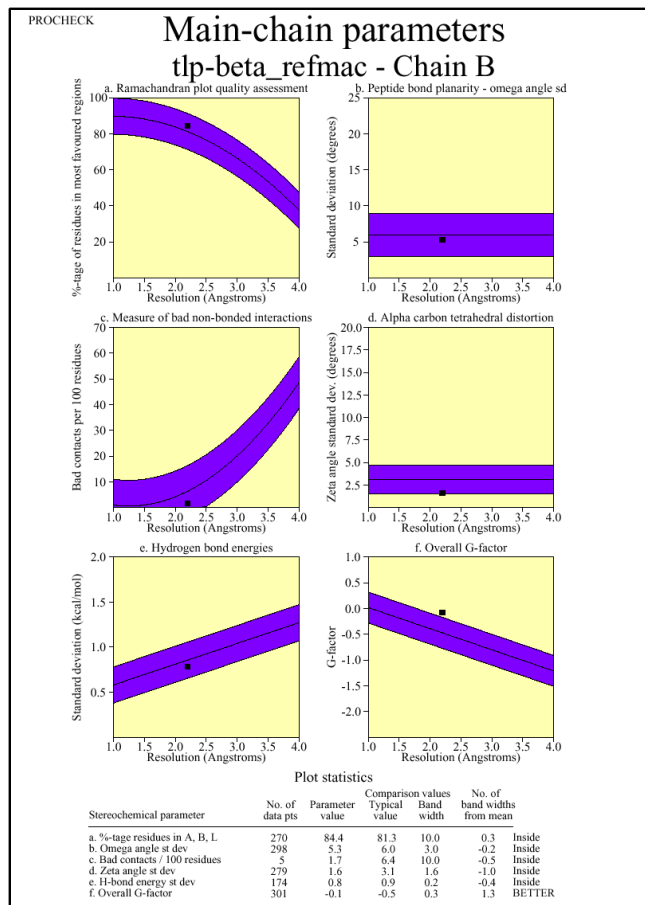
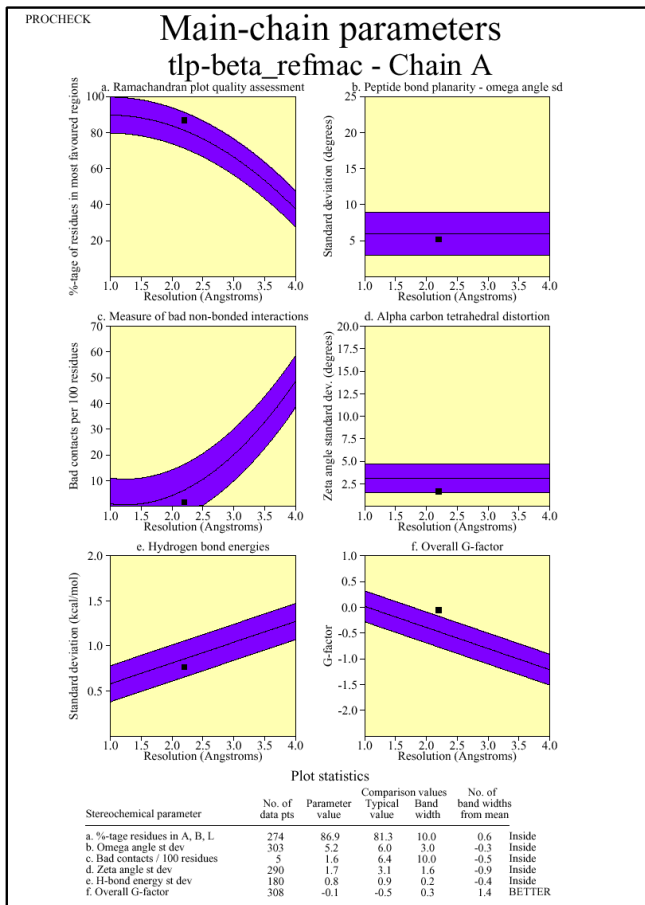


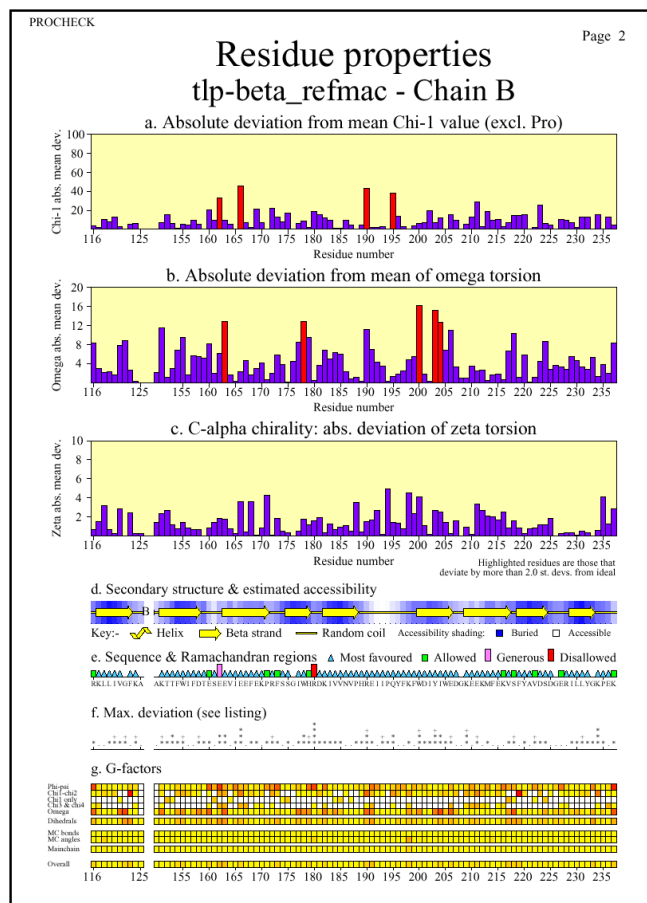
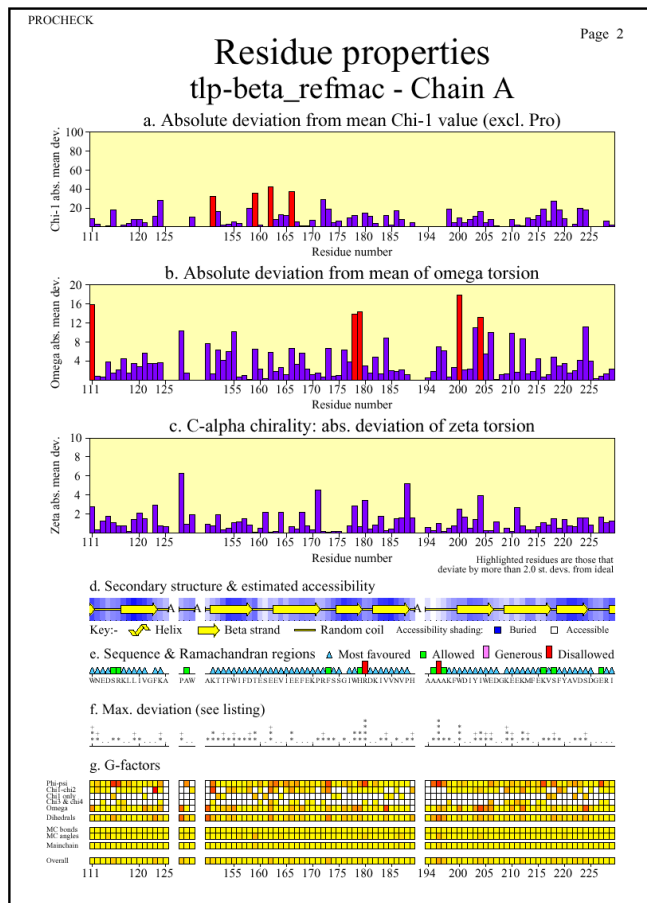
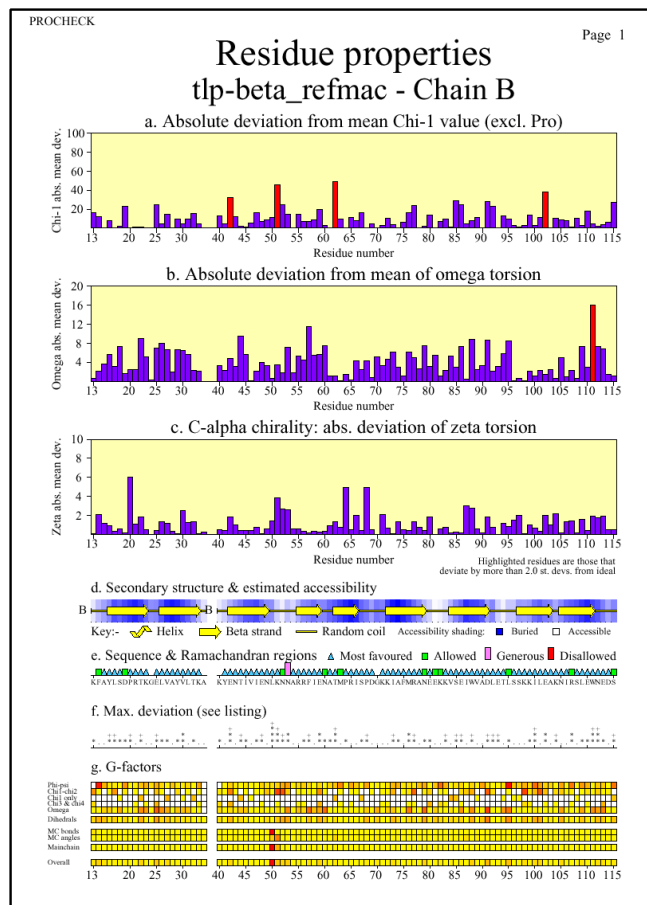
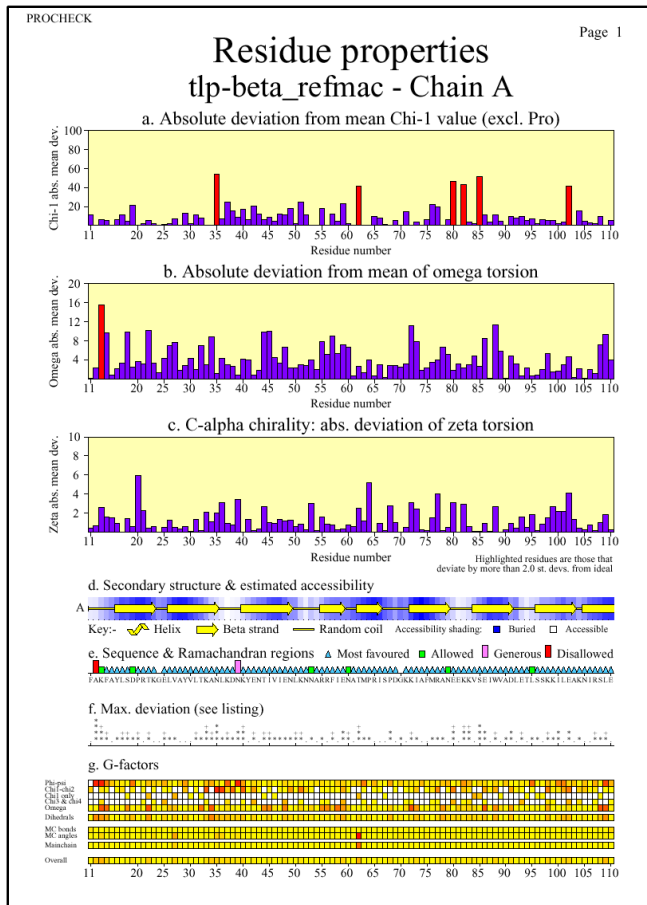
8.3 Trilobed β -Propellerdomäne - Procheck Ergebnisse

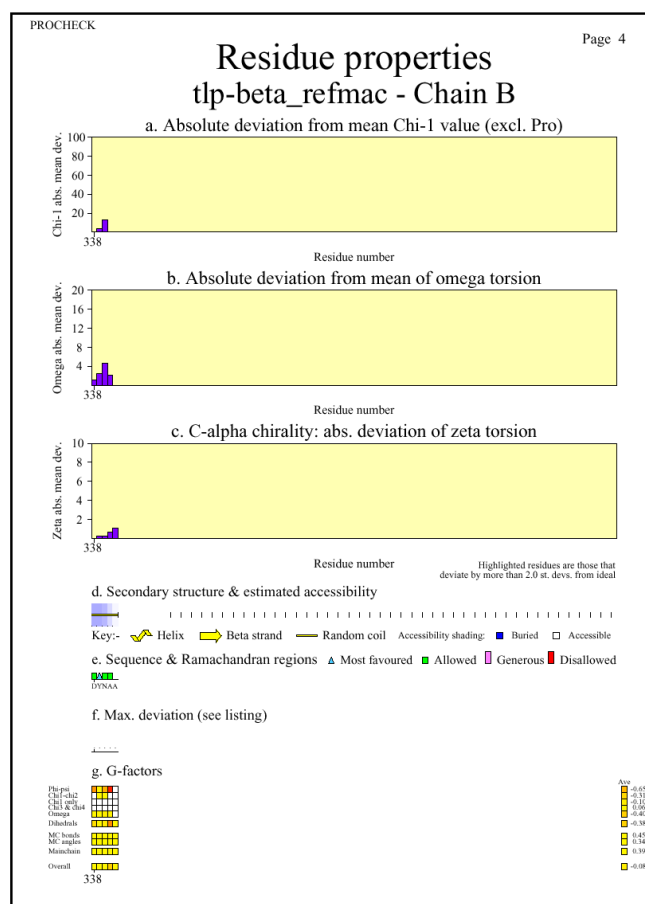
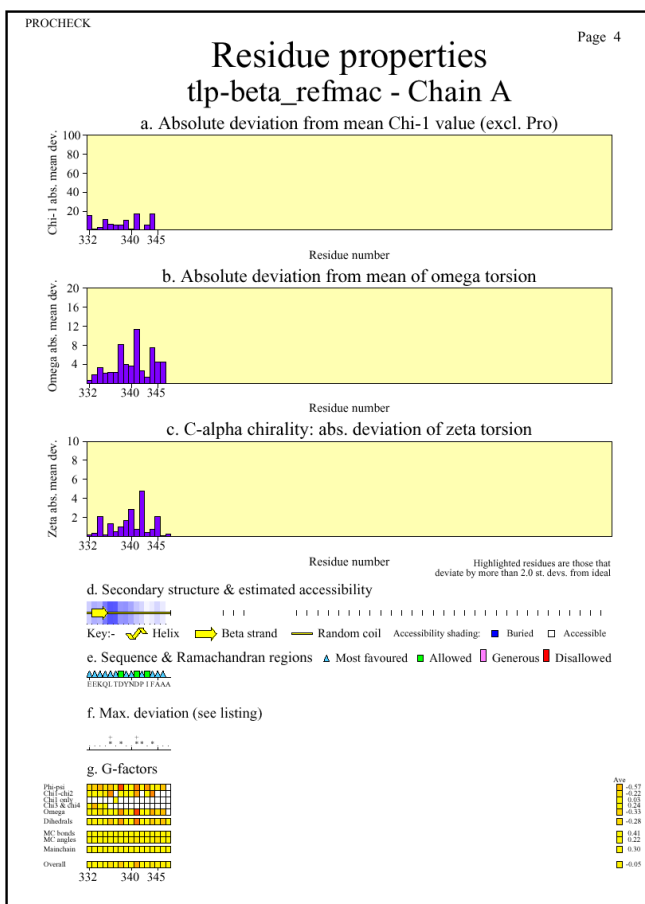
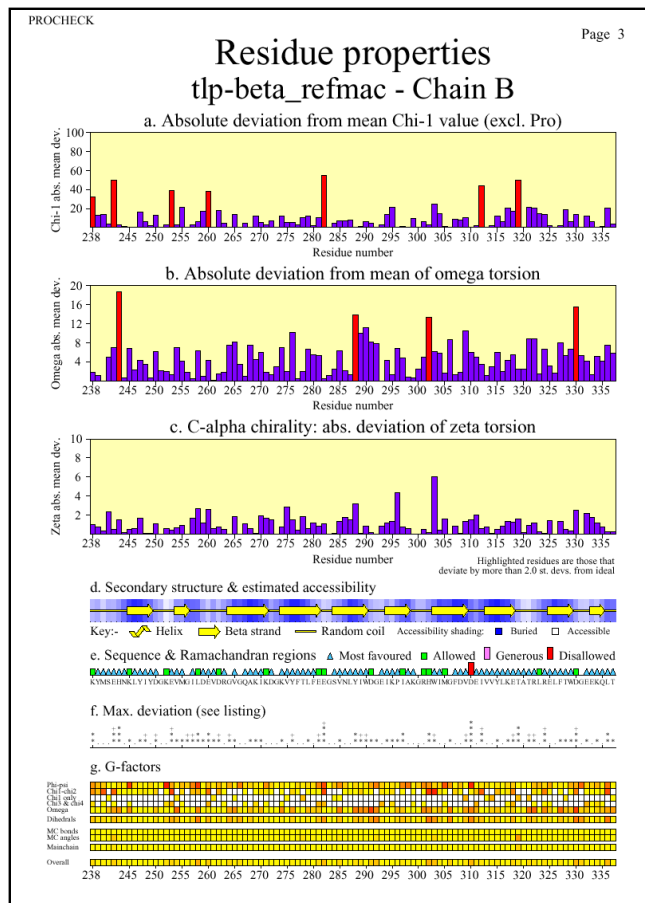
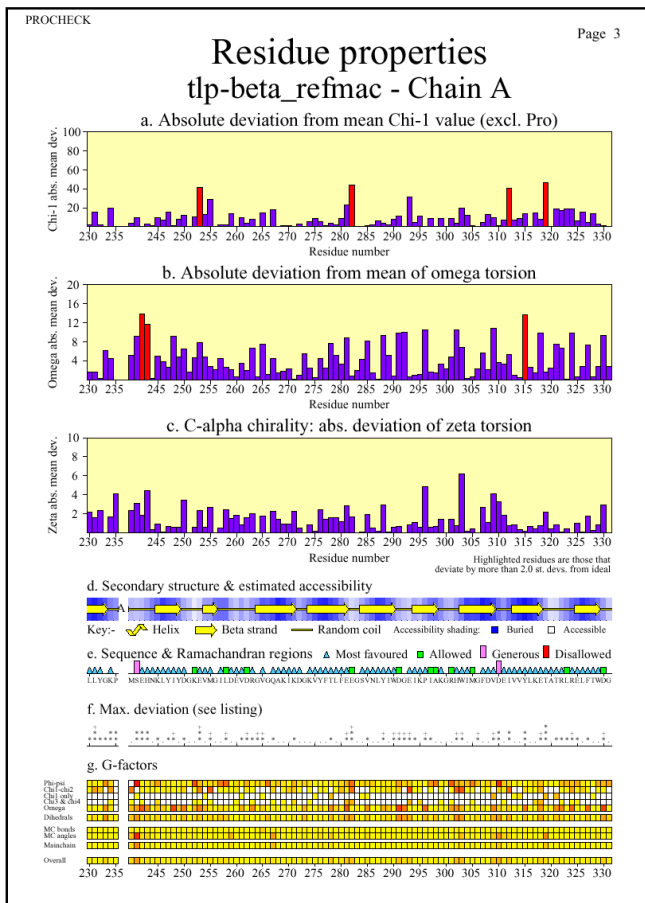


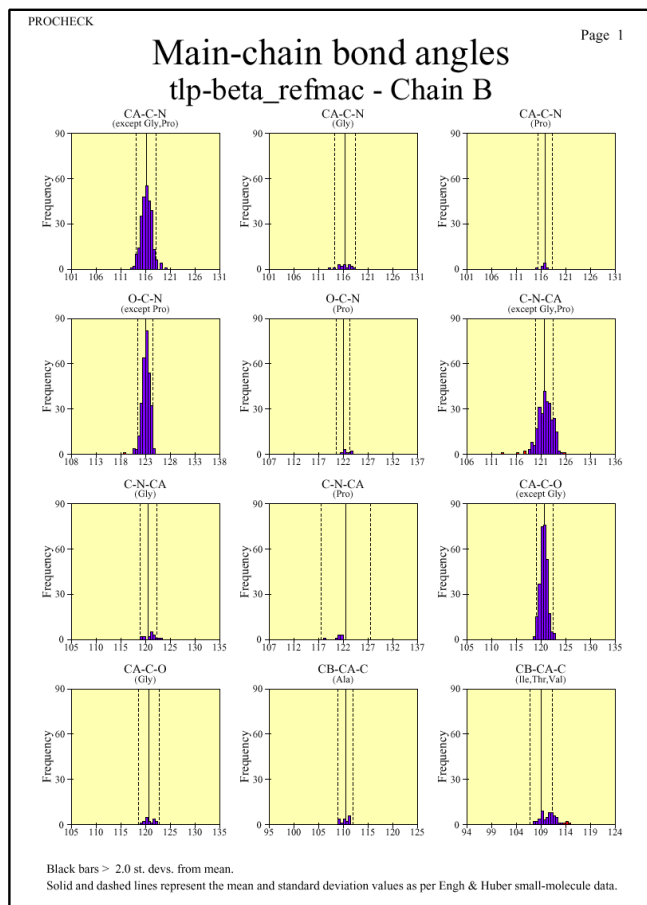
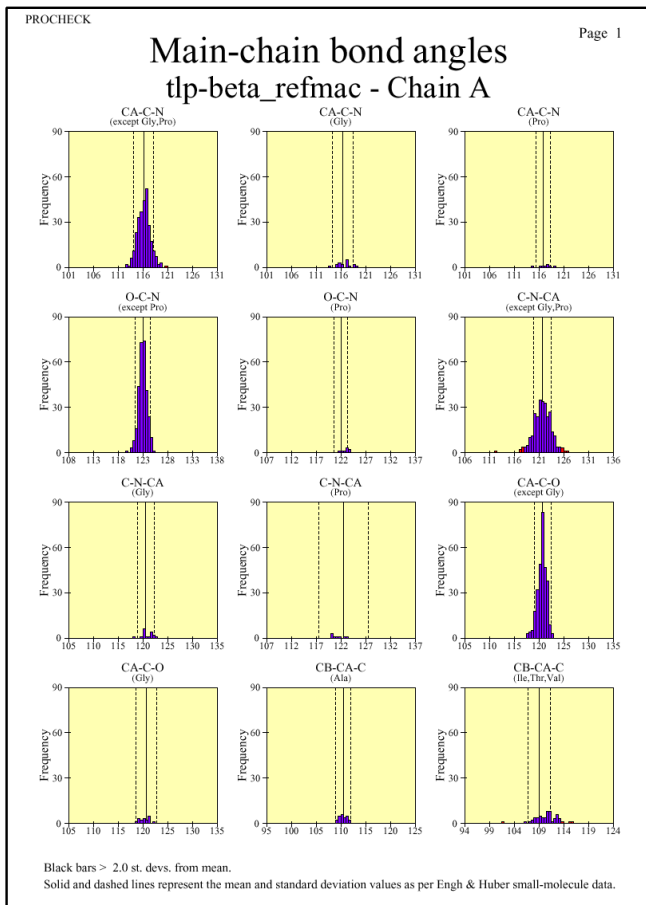
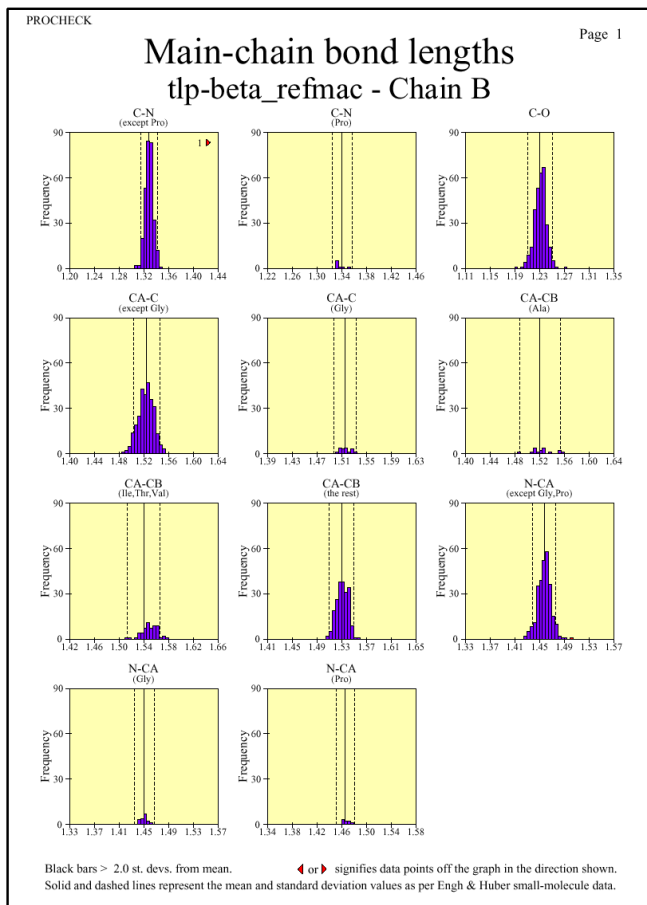
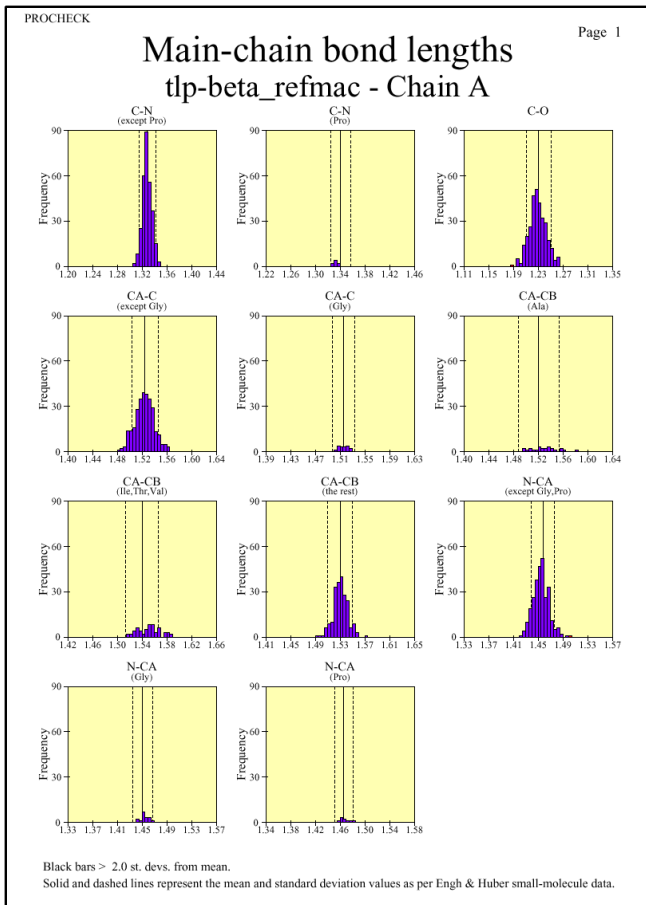


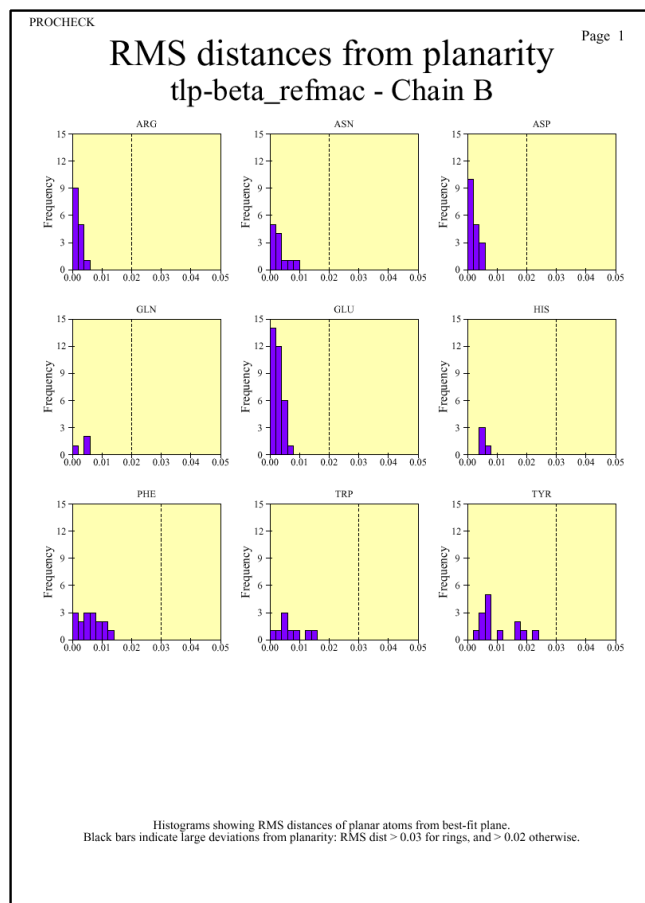
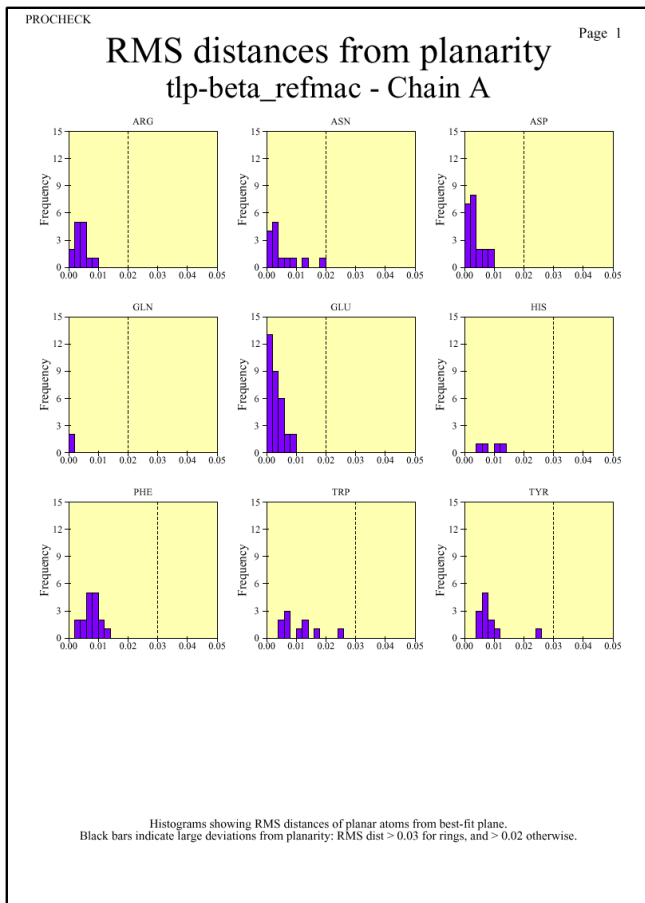
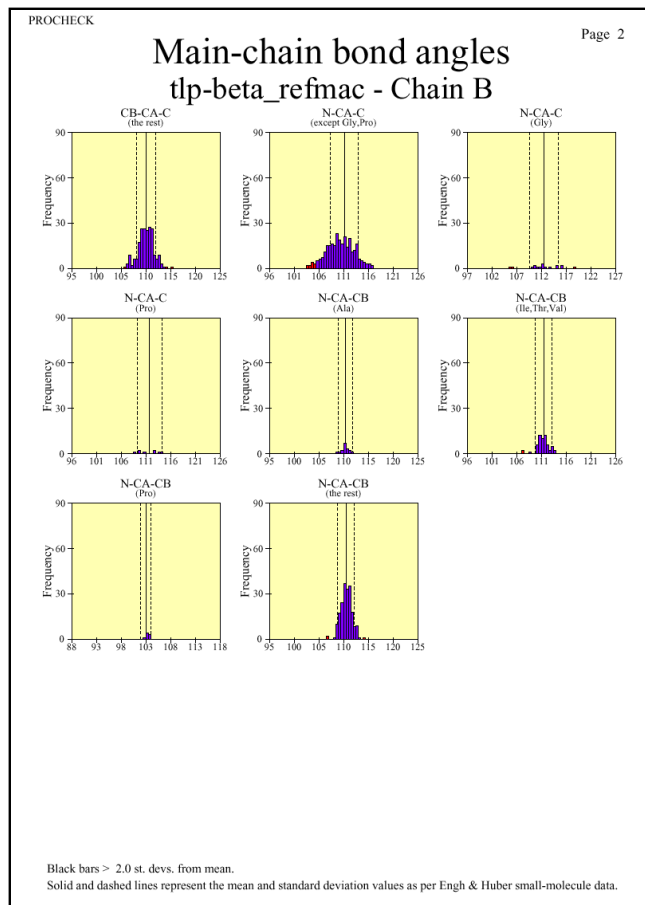
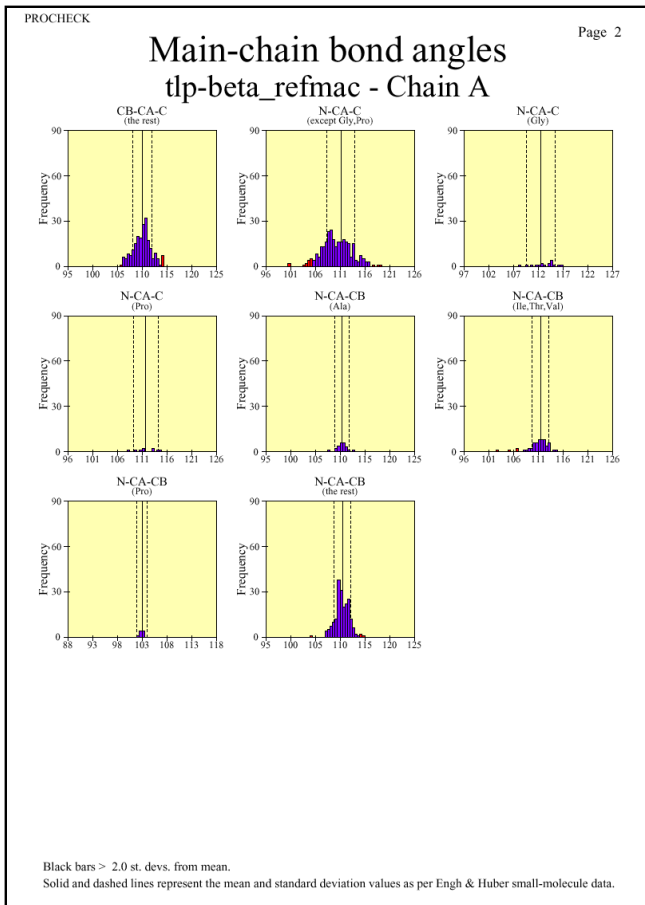




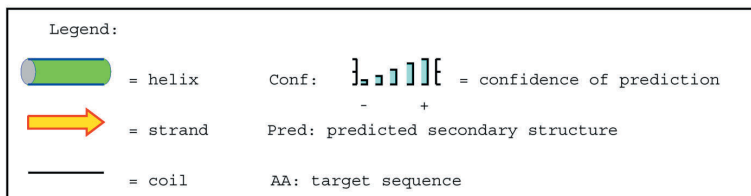
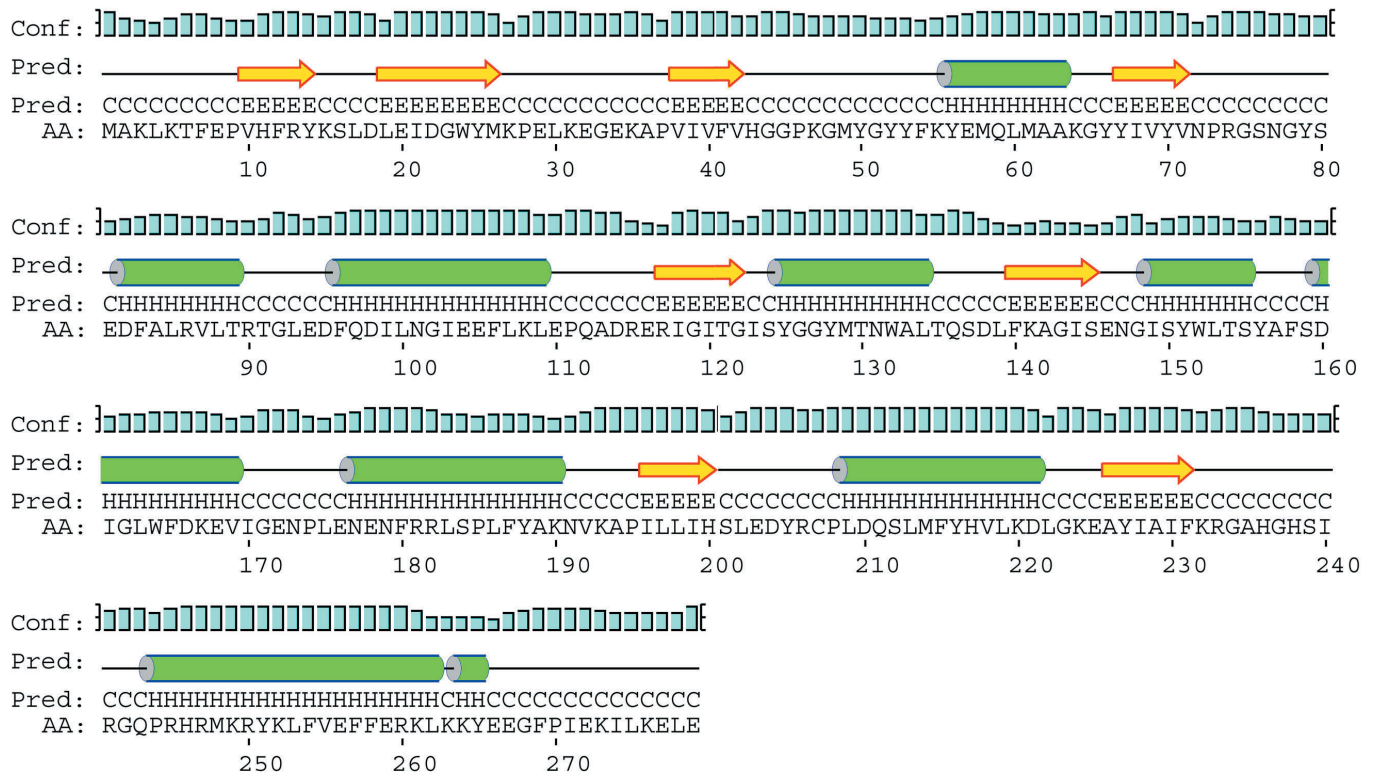








8.4 Strukturvorhersage der katalytischen Domäne der Trilobed-Protease



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis Februar 2003 am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Baumeister angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank, vor allem für die uneingeschränkte Unterstützung durch finanzielle Mittel, die ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sowie für die außerordentlich große wissenschaftliche Freiheit beim Bearbeiten der Projekte.

Bei Herrn Dr. I. Moarefi und Dr. C. Scheufler bedanke ich mich für die Einführung in die Kristallisation und Datensammlung. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. F.-U. Hartl und Frau Dr. M. Hayer-Hartl für die Mitbenutzung der wissenschaftlichen Geräte in der Abteilung für Zelluläre Biochemie und besonders der Espresso-Maschine.

Mein persönlicher Dank gilt Prof. Dr. L.O. Essen für die intensive wissenschaftliche Auseinandersetzung mit meinem Thema und den zahlreichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Dr. T. Tamura und Dr. N. Tamura möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit und die gewissenhafte Einführung in die molekularbiologische und biochemische Arbeiten mit der Tricorn- und Trilobed-Protease. Viele Ideen für zukünftige Projekte haben sich aus den zahlreichen Diskussionen mit ihnen entwickelt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. M.C. Bewley und Dr. J.M. Flanagan für ihre Unterstützung des Projekts, die hilfreichen Diskussionen und ihre „Rundumbetreuung“ während meines New York-Aufenthaltes.

Herrn Dr. G. Bourenkov und Herrn Dr. H.-D. Bartunik sei an dieser Stelle für die gute Betreuung während der Meßzeiten am DESY Hamburg gedankt.

Herrn Dr. M. Capel, Dr. R. Sweet und Dr. H. Lewis möchte ich danken für ihre zuverlässige und gute Betreuung an den Meßstationen X12b, X12C und X25 der Brookhaven National Lightsource.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. M. Wulff und Dr. S. Arzt für die Betreuung an den Meßstationen ID09 und ID14-3 und die Bereitstellung der Xenon-Kammer des ESRF.

Bei Dr. Beate Rockel, Dr. Daniela Nicastro, Dr. Jürgen Pitzko und Dr. Jürgen Peters möchte ich mich für die Erstkorrektur der Arbeit und für die dezenten Hinweise bedanken.

Dr. R. Hegerl danke ich für die Zusammenarbeit in Bezug auf die grenzüberschreitenden Arbeiten zwischen Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie.

Bei Rudi Gatz Thomas Mathes und Erwin Imself möchte ich mich für die vielen Kleinigkeiten bedanken, die sie für meine Arbeit im Laufe der Zeit angefertigt haben.

Jan Lubiniecki gilt mein Dank für die Arbeiten am Fermenter und seine Hilfe beim Solubilisieren größerer Mengen an *E. coli*.

Toni Hillenbrandt gilt mein Dank für die stete Pflege der Macs und der zugehörigen Software, die ein zuverlässiges und sicheres Arbeiten erlaubten.

Bei Horst Worsch, Günther Franz, Bernhard Busch und Harry Lehnert möchte ich mich für die Instandhaltung des zentralen Rechenzentrums bedanken. Für die stete Hilfsbereitschaft, die neuesten Software Pakete auf dem Linux-Cluster bereitzustellen, möchte ich mich noch besonders bei Bernhard Busch bedanken.

Den übrigen Mitgliedern der Abteilung Baumeister danke ich für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Wolfgang Bauer möchte ich für den hervorragenden Druck der Dissertation danken.

Abschließend möchte ich ganz besonders meiner Frau danken für Ihre grenzenlose Unterstützung über viele Jahre hinweg.