

**Kristallisation und NMR-spektroskopische  
Untersuchungen an dem Twisted Dwarf Protein  
aus *Arabidopsis thaliana***

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Eckhoff  
aus Köln

Jülich 2002

gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Georg Büldt  
Korreferent: Prof. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2002

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Arabidopsis als Modellsystem</b>                             | <b>1</b>  |
| <b>1.2. Das Twisted Dwarf (TWD)-Protein aus Arabidopsis thaliana</b> | <b>1</b>  |
| 1.2.1. Phänotyp der TWD--Pflanze                                     | 2         |
| 1.2.2. Aufbau des TWD-Proteins und bisher bekannte Interaktionen     | 4         |
| <b>1.3. FK506-bindende Proteine (FKBP)</b>                           | <b>6</b>  |
| 1.3.1. FKBP in Pflanzen  | 8         |
| 1.3.2. Die dreidimensionale Struktur von FKBP                        | 8         |
| <b>1.4. TPRs</b>   | <b>10</b> |
| <b>1.5. Zielsetzung der Arbeit</b>                                   | <b>12</b> |
| <br>   |           |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                      | <b>13</b> |
| <b>2.1. Geräte und Zubehör</b>                                       | <b>13</b> |
| <b>2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b>                    | <b>13</b> |
| <b>2.3. Puffer, Lösungen und Medien</b>                              | <b>14</b> |
| 2.3.1. Puffer und Lösungen   | 14        |
| 2.3.2. Medien  | 15        |
| 2.3.2.1. Medienzusätze:  | 16        |
| 2.3.2.2. Bakterienmedium:  | 16        |
| <b>2.4. Dokumentation der Ergebnisse</b>                             | <b>16</b> |
| <b>2.5. Organismen und Wachstumsbedingungen</b>                      | <b>16</b> |
| 2.5.1. Kulturbedingungen für E.coli                                  | 16        |
| 2.5.2. Bestimmung der Zelldichte von bakteriellen Flüssigkulturen    | 16        |
| 2.5.3. Organismen  | 17        |
| 2.5.4. Stammhaltung  | 17        |
| <b>2.6. Überexpression von Proteinen in E.coli</b>                   | <b>17</b> |
| 2.6.1. Expression von TWD in E.coli                                  | 17        |
| 2.6.2. Zellaufschlußmethode für E.coli                               | 18        |
| <b>2.7. Polymerase Kettenreaktion (PCR)</b>                          | <b>18</b> |
| 2.7.1. PCR-Primer  | 18        |
| 2.7.2. Allgemeine PCR Bedingungen                                    | 19        |
| 2.7.3. Reinigung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten               | 20        |
| <b>2.8. Molekularbiologische Standardmethoden</b>                    | <b>20</b> |
| 2.8.1. Plasmide  | 21        |
| 2.8.2. Sequenzierung von DNA   | 21        |
| <b>2.9. Proteinbiochemische Arbeiten</b>                             | <b>22</b> |
| 2.9.1. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                | 22        |
| 2.9.2. Westernblotanalyse  | 23        |
| 2.9.3. Immunochemische Detektion                                     | 23        |
| 2.9.4. Konzentrationbestimmung von Proteinen                         | 24        |
| 2.9.5. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen                  | 24        |
| <b>2.10. Chromatographische Reinigung von Proteinen</b>              | <b>24</b> |
| 2.10.1. Proteinreinigung mit dem Nickel-IMAC-System                  | 24        |
| 2.10.2. Proteinreinigung über Gelfiltrationschromatographie          | 25        |
| 2.10.3. Proteinreinigung über Ionenaustauschermaterial               | 25        |
| <b>2.11. CD-Spektroskopie</b>  | <b>25</b> |
| <b>2.12. FTIR-Spektroskopie</b>                                      | <b>26</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.13. Röntgenographische Methoden</b>  | <b>26</b> |
| 2.13.1. Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"  | 26        |
| 2.13.2. Dampfdiffusion  | 27        |
| 2.13.3. Färbung von Kristallen  | 28        |
| 2.13.4. Röntgendiffraktionsexperimente an TWD-Kristallen  | 28        |
| 2.13.5. Analyse von Proteinkristallen unter Kryobedingungen                                     | 28        |
| <b>2.14. Kernresonanzspektroskopie und Spektrenanalyse</b>                                      | <b>28</b> |
| 2.14.1. Herstellung der NMR-Probe   | 28        |
| 2.14.1.1. Expression und Zellaufschluß  | 28        |
| 2.14.1.2. Reinigung   | 29        |
| 2.14.2. Probenvorbereitung  | 29        |
| 2.14.3. Hard- und Software für Aufnahme, Prozessierung und Auswertung der Spektren              | 29        |
| 2.14.4. NMR Experimente   | 30        |
| 2.14.5. Experimente zur Resonanzzuordnung   | 30        |
| <b>2.15. Strukturvorhersage</b>   | <b>32</b> |
| 2.15.1. Sekundärstrukturvorhersage  | 32        |
| 2.15.2. Tertiärstrukturvorhersage   | 32        |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>33</b> |
| <b>3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung</b>   | <b>33</b> |
| 3.1.1. Klonierung des Expressionsvektors  | 33        |
| 3.1.2. Heterologe Expression von TWD in E.coli  | 34        |
| 3.1.3. Reinigung von TWD-His aus E.coli   | 36        |
| 3.1.3.1. Reinigung mittels IMAC   | 36        |
| 3.1.3.2. Reinigung mittels Gelfiltration  | 37        |
| 3.1.3.3. Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie                                       | 38        |
| 3.1.4. Proteinkonzentration und -lagerung   | 39        |
| <b>3.2. Strukturvorhersage</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.3. Untersuchungen zum Faltungszustand von TWD</b>  | <b>42</b> |
| 3.3.1. Sekundärstrukturabschätzung mittels CD-Spektroskopie                                     | 42        |
| 3.3.2. Sekundärstrukturabschätzung mittels FTIR-Spektroskopie                                   | 44        |
| 3.3.3. Bestimmung des Faltungszustands mittels 1D-Protonen-NMR                                  | 46        |
| 3.3.4. Der Faltungszustand von TWD-MA   | 48        |
| <b>3.4. Kristallisation von TWD-MA und TWD12D</b>   | <b>49</b> |
| 3.4.1. Übersicht über dreidimensionale Strukturen verwandter Proteine                           | 49        |
| 3.4.2. Kristallisation von TWD12D mit Polyethylenglykol und Ammoniumsulfat                      | 50        |
| 3.4.3. "Sparse Matrix Screen"   | 53        |
| 3.4.4. TWD-MA kristallisiert in 4 M Na-Formiat  | 53        |
| <b>3.5. Röntgendiffraktionsexperimente</b>  | <b>54</b> |
| 3.5.1. Röntgenaufnahmen bei 100 K   | 54        |
| 3.5.2. Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronstrahlung                    | 54        |
| 3.5.3. Das Problem der Phasenbestimmung   | 55        |
| <b>3.6. Kernresonanzspektroskopie</b>   | <b>56</b> |
| 3.6.1. Herstellung der markierten TWD12D-Probe  | 57        |
| 3.6.2. Eindimensionales Protonenspektrum von TWD12D (CN)  | 58        |
| 3.6.3. Resonanzzuordnung  | 59        |
| 3.6.3.1. 2D-HSQC Experiment   | 60        |
| 3.6.3.2. Heteronucleare 3D-Experimente und die Einteilung der gemessenen Signale in Spinsysteme | 63        |
| 3.6.3.3. Zuordnung sequentiell benachbarter Spinsysteme   | 65        |
| 3.6.3.4. Erstellung zweier Scripte zur Unterstützung der sequentiellen Anordnung                |           |

|   |            |
|---|------------|
| benachbarter Spinsysteme .....  | 67         |
| 3.6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse .....   | 68         |
| <b>3.7. Röntgendiffraktionsexperimente - Teil 2 .....</b>   | <b>69</b>  |
| 3.7.1. TWD-MA .....   | 69         |
| 3.7.1.1. TWD-MA kristallisiert in 4M Na-Formiat Puffer .....  | 69         |
| 3.7.1.2. Herstellung von Schweratomderivaten .....  | 70         |
| 3.7.1.3. Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronstrahlung .....                    | 70         |
| 3.7.1.4. Auswertung der Datensätze und Ermittlung der dreidimensionalen Struktur ....                   | 72         |
| 3.7.2. 12kDa FKBP Domäne von TWD ( TWD12D ) .....   | 72         |
| 3.7.2.1. TWD12D kristallisiert in Ammoniumsulfat und -phosphat .....                                    | 72         |
| <b>4. Diskussion .....</b>  | <b>75</b>  |
| <b>4.1. Herstellung und Reinigung der Probe .....</b>   | <b>76</b>  |
| <b>4.2. Faltungszustand und Aktivität von TWD-MA und TWD12D .....</b>                                   | <b>77</b>  |
| <b>4.3. Kristallisation und Röntgendiffraktion .....</b>  | <b>78</b>  |
| 4.3.1. Kristallisation und kristallographische Analyse der 12 kDa FKBP Domäne des<br>TWD Proteins ..... | 79         |
| 4.3.2. Kristallisation und kristallographische Analyse des TWD-Proteins ohne<br>Membrananker .....      | 80         |
| 4.3.3. Ausblick auf weitere kristallographische Studien .....   | 81         |
| <b>4.4. Kernresonanzspektroskopie .....</b>   | <b>82</b>  |
| 4.4.1. Stand der Auswertung .....   | 82         |
| 4.4.2. Ausblick auf weitere NMR-Studien .....   | 83         |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>   | <b>85</b>  |
| <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>7. Anhang .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>7.1. Zusammensetzung der “Crystal Screens I &amp; II” .....</b>                                      | <b>99</b>  |
| 7.1.1. Crystal Screen I .....   | 99         |
| 7.1.2. Crystal Screen II .....  | 100        |
| <b>7.2. Scriptprogramme getp und get2 .....</b>   | <b>101</b> |
| 7.2.1. getp .....   | 101        |
| 7.2.2. get2 .....   | 102        |
| <b>8. Abkürzungen .....</b>   | <b>107</b> |



# 1. Einleitung

## 1.1. Arabidopsis als Modellsystem

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold ist ein rosettenbildendes, einjähriges Wildkraut aus der Familie der Brassicaceae und ein besonders geeignetes Objekt für klassische, genetische und molekularbiologische Forschungen an höheren Pflanzen. Die Vorteile dieser Pflanze sind ihre geringe Größe von ca. 30 cm, die es erlaubt, große Populationen auf geringem Raum zu kultivieren sowie die kurze Generationszeit von nur ca. 6 Wochen. Da die Mutagenese von *Arabidopsis thaliana* relativ einfach durch Samenmutagenese mittels Chemikalien, Bestrahlung oder Insertion von Fremd-DNS erfolgt, ist die Tatsache, daß die selbstbefruchtende Pflanze innerhalb ihrer Generationszeit mehr als 10.000 Samen ansetzt, vorteilhaft. Diese Methoden der Mutagenese hatten zur Entdeckung und Charakterisierung einer Vielzahl von Mutanten geführt (Meyerowitz, 1987). Arabidopsis hat das kleinste bekannte Genom einer höheren Pflanze, wobei der größte Teil des Genoms als Einzelkopiesequenz oder in geringer Kopiezahl vorliegt. Repetitive, genomische Sequenzen sind nur zu ca. 8 % vorhanden. Das *Arabidopsis thaliana* Sequenzierungsprojekt ist abgeschlossen, so daß mittlerweile die vollständige Sequenz des Arabidopsisgenoms (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) zur Verfügung steht. Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms und das Vorliegen von verschiedenen Kartierungsarbeiten (Schmidt, 1998), gehört *Arabidopsis thaliana* zu den am besten untersuchten höheren Pflanzen.

## 1.2. Das Twisted Dwarf (TWD)-Protein aus *Arabidopsis thaliana*

Bei der Durchmusterung mutanter Arabidopsis-Linien, die durch Insertionsmutagenese (T-DNS aus *Agrobacterium tumefaciens*) hervorgerufen wurden, konnte eine Pflanze mit deutlichem Zwergwuchs und verändertem Habitus identifiziert werden. Aufgrund dieses Zwergwuchses und einer verdrehten Morphologie wurde sie Twisted Dwarf (TWD) genannt (*AtFKBP42*). Mit Hilfe der "plasmid rescue"-Technik konnte der mutierte, genomische Abschnitt in der DNS der TWD<sup>-</sup>-Mutante identifiziert werden. Das längste, offene Leseraster von 1095 bp kodiert für ein Protein von 365 Aminosäuren-Länge. Es konnte gezeigt werden, daß der isolierte, genomische Abschnitt für ein Gen mit 8 Exons kodiert, wobei in Exon 5 eine T-DNS-Insertion vorlag. Diese Mutante wurde Twd1-1<sup>-</sup> genannt (Saal, 1998).

### **1.2.1. Phänotyp der Twd<sup>-</sup>-Pflanze**

Es zeigte sich, daß eine Verkürzung der Zelllänge in Hypokotylen und Epidermiszellen auf ca. 40% der Wildtypgröße stattfand. Diese Reduktion der Zelllänge ist somit für die verringerte Gesamthöhe der Twd<sup>-</sup>-Pflanzen verantwortlich. So zeigt die Twd<sup>-</sup>-Mutante (Abb. 1.b) eine deutliche Größenreduktion auf etwa ein Drittel der Größe des Wildtyps (Abb. 1.a). Die Twd<sup>-</sup>-Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp einen verlangsamten Lebenszyklus auf.

Aber nicht nur die Höhe und die Entwicklungszeit der Twd<sup>-</sup>-Pflanzen unterscheiden sich vom Wildtyp, sondern auch die Form der Organe und ihre Reaktion auf Umweltbedingungen. Allgemein zeigen die Twd<sup>-</sup>-Pflanzen ein desorientiertes Wachstum sowohl in den Wurzeln als auch in den oberirdischen Organen. Die Blätter verhalten sich epinastisch (Abb. 1.f) und die schraubenförmige Verdrehung der Schoten (Abb. 1.d) beginnt bereits in der Entwicklung der Blüte (Abb. 1.e). Die Pflanze ist deutlich dunkler gefärbt und stabiler gebaut als der Wildtyp. Zusätzlich zum desorientierten Wachstum zeigt die Wurzel stellenweise eine schraubenförmige Verdrehung um die eigene Achse (Abb. 1.c). Das Auftreten dieser Verdrehung folgt jedoch keinem ersichtlichen Muster. Des Weiteren läßt sich eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenstresß erkennen.

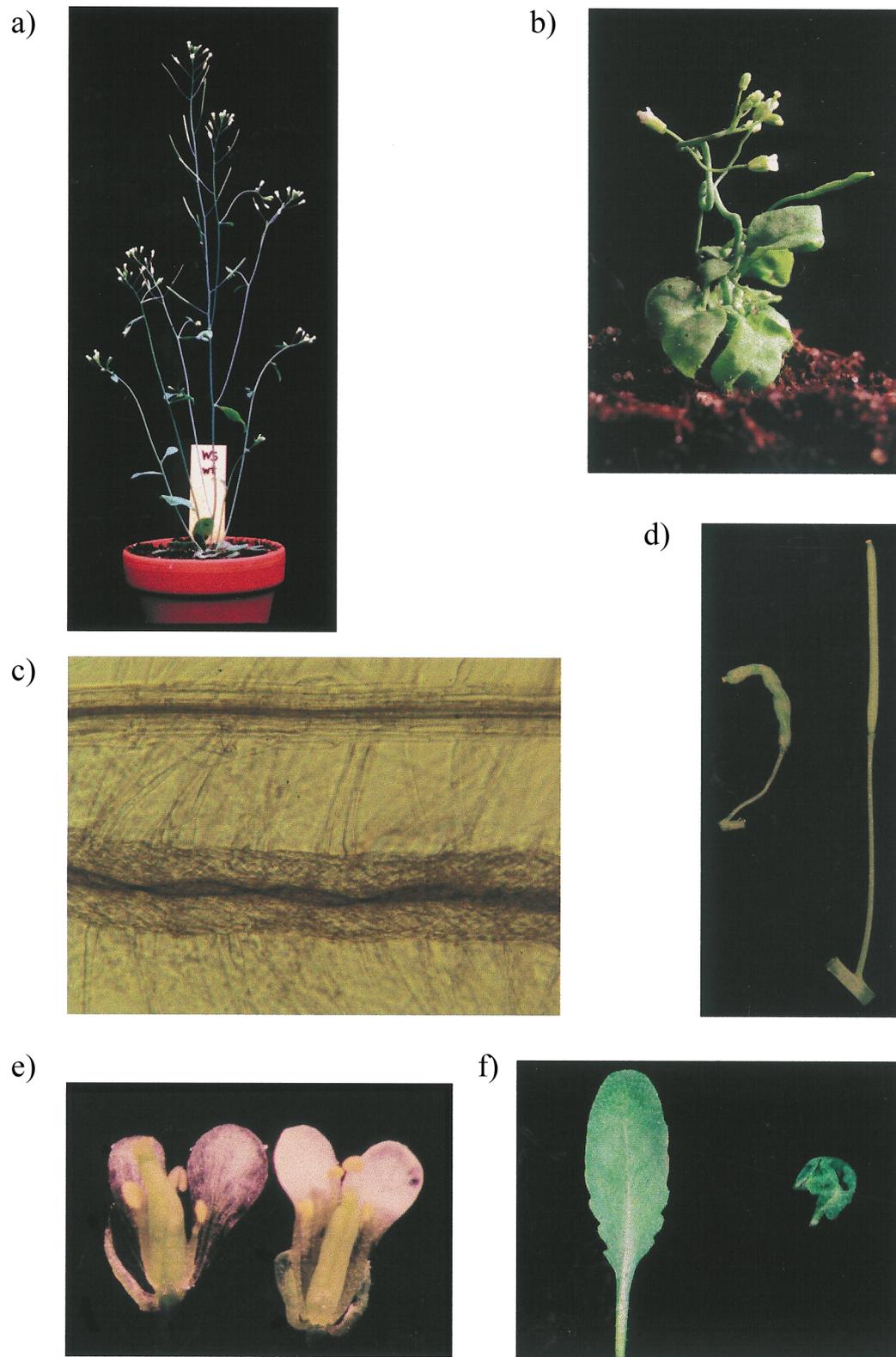


Abb. 1: Habitus- und Detailaufnahmen der  $Twd^-$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp. a) Habitus einer Wassilewskija-Pflanze, b) Habitus einer  $Twd^-$ -Mutante, c) Wurzel: oben Wildtyp, unten  $Twd^-$ , d) Schote: links  $Twd^-$ , rechts Wildtyp, e) Blüte: links  $Twd^-$ , rechts Wildtyp, f) Rosettenblatt: links Wildtyp, rechts  $Twd^-$

### 1.2.2. Aufbau des TWD-Proteins und bisher bekannte Interaktionen

Ein Vergleich der TWD-Gensequenz mit den Einträgen der Sequenzdatenbank GENBANK zeigte, daß die TWD-Sequenz signifikante Homologien zu FK506-bindenden Proteinen (FKBPs) aufweist (Abb. 2.a). Die Klasse der FKBPs gehören zu der Familie der Immunophilinen, die durch ihre immunsupprimierende Wirkung in Kooperation mit den Immunsuppressiva FK506; CyclosporinA und Rapamycin bekannt wurden.

Die N-terminal positionierte FKBP-Untereinheit (Abb. 2.b) von TWD besitzt auf Aminosäureebene 30% Identität und 52% Homologie zu dem humanen *hFKBP12*, an dem bisher die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden. Die für FKBP typische FK506 Bindung konnte für TWD nicht gezeigt werden. FKBPs sind neben ihrer immunsupprimierenden Wirkung für eine *cis/trans*-Isomerase (Rotamase) Tätigkeit bekannt. Allerdings weichen in TWD 10 der 14 bekannten Aminosäuren, die für die Rotamasefunktion relevant sind, voneinander ab. Für TWD konnte auch experimentell keine Rotamaseaktivität festgestellt werden (Kamphausen, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die FKBP-Domäne des TWD-Proteins an den ABC-Transporter *AtPGP1* bindet (Geisler *et al.*, 2002; Martinoia *et al.*, 2002).

Die zweite große Domäne des TWD-Proteins ist die Tetratricopeptide-Repeat (TPR)-Untereinheit (Abb. 2.a), die in mehreren FKBPs vorhanden ist. Diese TPR-Domäne besteht aus drei degenerierten 34 Aminosäuren umfassenden Wiederholungen, den sogenannten TPR-Motiven. Mit Hilfe der Isothermalen-Titrations-Kalorimetrie (ITC) konnte eine Bindung zu dem Hitzeschockprotein *hsp90* mit einer Stoichiometrie von zwei Molekülen *hsp90* zu einem Molekül TWD mit einer Dissoziationskonstante von 1,3  $\mu\text{M}$  gefunden werden. Anhand eines Citratsynthase-Assays konnte dieser Domäne auch eine Chaperonaktivität nachgewiesen werden (Kamphausen, 2002).

C-terminal zu der TPR-Untereinheit befindet sich eine putative Calmodulinbindestelle (Abb. 2.d). Quervernetzungs- und CoImmunopräzipitationsexperimente zeigten keine signifikante Bindung von Calmodulin (CaM) (Kamphausen, 2002). Somit beruht diese putative CaM-Bindestelle eher auf der Sequenzhomologie zu anderen CaM-Bindestellen als auf der tatsächlichen Bindung von CaM.

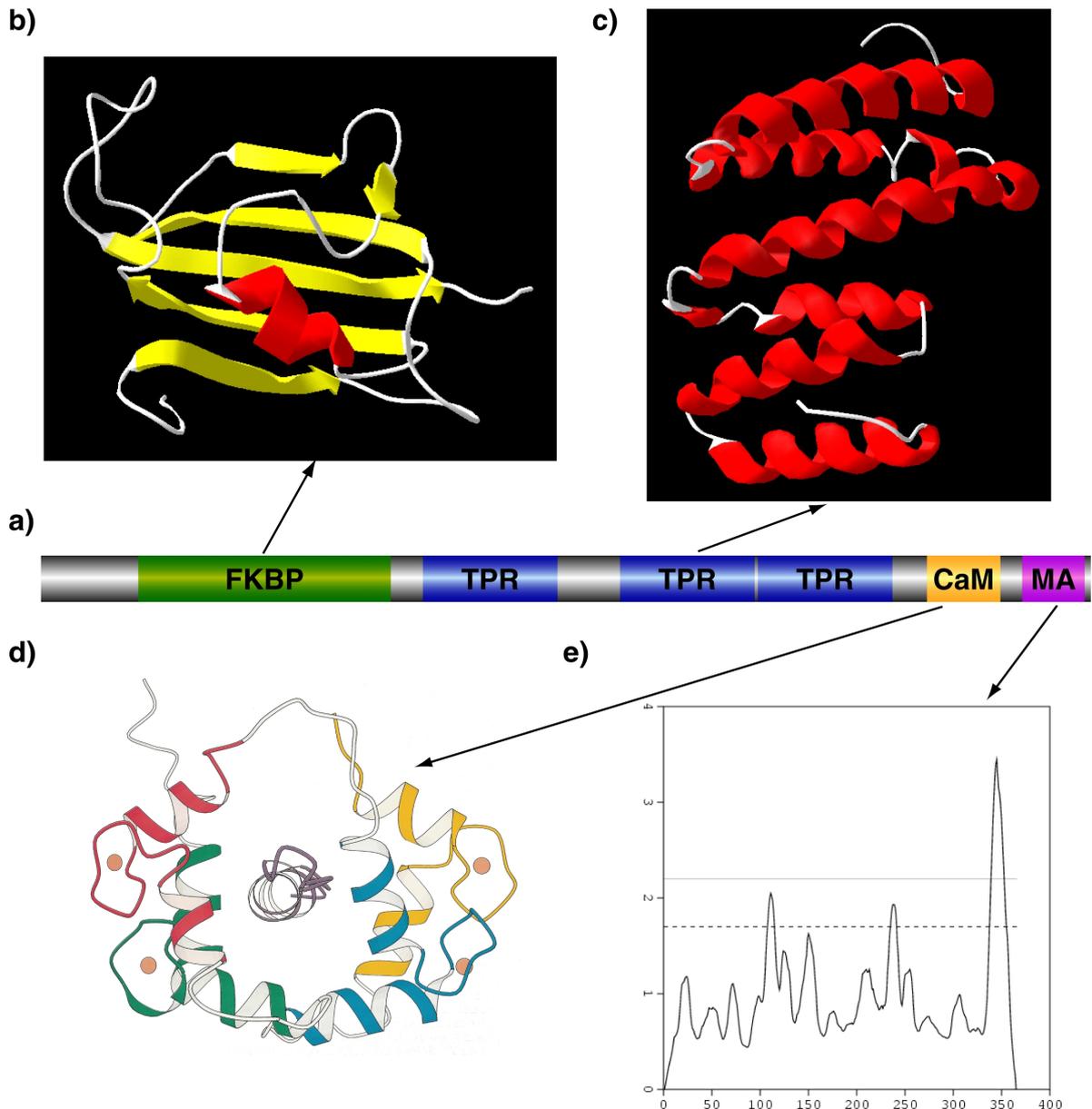


Abb. 2: **Domänenstruktur des TWD-Proteins** und Darstellung der möglichen Funktionen oder Interaktionen der einzelnen Domänen. a) schematische Darstellung der Domänenstruktur des TWD-Proteins. b) 3D-Darstellung der FKBP-Strukturvorhersage (Swiss-Model: "<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>") des TWD-Proteins (gelb =  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, rot =  $\alpha$ -Helix). c) 3D-Darstellung der TPR-Strukturvorhersage (Swiss-Model: "<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>") des TWD-Proteins (rot =  $\alpha$ -Helix). d) Mögliche Bindung des Calcium-gebundenen Calmodulins an das TWD-Protein (entnommen aus Stryer, Biochemie, 1996), orange = Calcium, rot, blau, gelb und grün = EF-Hand-Strukturen des Calmodulin, grau = Calmodulinbindedomäne des Zielproteins. e) Hydrophobizitätsplot (DAS -Transmembrane Prediction Serve "<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>", Cserzo, 1997) zur Darstellung des hydrophoben C-terminalen Bereichs, der den Membrananker für die Reste 339-357 andeutet.

C-terminal befindet sich ein Membrananker (Abb. 2.a). Theoretische Berechnungen weisen diesem Bereich eine starke Hydrophobizität zu. Sowohl Elektronenmikroskopie (mit Hilfe der Immunogold-Technik) als auch durch Westernblotdetektion in Membranfraktionen (Kamphausen *et al.*, 2002) zeigten, daß das TWD-Protein in der Plasmamembran und dem Tonoplasten lokalisiert ist.

Es konnten homologe Proteine aus dem Menschen (hFKBP38), der Fliege (*DmFKBP45*) und der Maus (muFKBP38) gefunden werden. Diese besitzen die gleiche Domänenabfolge wie das TWD-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (*AtFKBP42*).

### 1.3. FK506-bindende Proteine (FKBP)

Die Klasse der FKBP's gehört zu den Immunophilinen, zu denen auch die Cyclophiline und Parvuline gerechnet werden. Die Immunophiline stellen eine mehrere Familien umfassende Gruppe von Proteinen dar, deren Mitglieder in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tieren zu finden sind. Sie sind subzellulär in allen Kompartimenten vorhanden und in verschiedene Prozesse der Signalübertragung involviert (Kay, 1996). Funktionell zum ersten Mal beschrieben wurden die Immunophiline als intrazelluläre Rezeptoren für die immunsuppressiven Substanzen FK506 und CyclosporinA in tierischen und menschlichen Zellen (Handschumacher *et al.* 1984; Harding *et al.*, 1989).

Die Immunophiline lassen sich durch ihre Affinität zu Immunsuppressiva in drei Klassen unterteilen: Cyclophiline, die CyclosporinA binden, FK506 bindende Proteine, die FK506 oder Rapamycin binden und Parvuline, die keine Bindungseigenschaften gegenüber immunsupprimierenden Substanzen zeigen.

CyclosporinA, FK506 und Rapamycin sind Substanzen, die von bodenbewohnenden Mikroorganismen synthetisiert werden. Ihre Wirkung in der Säugerzelle ist die Unterdrückung von Immunantworten, was bei Organtransplantationen genutzt wird, um Abstoßungsreaktionen gegen körperfremde Organe zu verhindern. CyclosporinA und FK506 inhibieren nach Bindung an die Immunophiline, die Aktivität der calziumabhängigen Phosphatasen der Calcineurinfamilie. Über diesen Effekt wird der Signaltransduktionsweg zur T-Zellaktivierung unterbrochen und es kommt zu einer Unterdrückung der Immunantwort (Borel *et al.*, 1976; Cardenas *et al.*, 1994; Kay *et al.*, 1983).

Die Proteine der drei Immunophilin-Klassen besitzen alle die enzymatische Aktivität, durch die sie die cis-trans Isomerisierung von Peptidylprolylbindungen katalysieren (PPIase-Akti-

vität) (Fischer *et al.*, 1989), obwohl sie weder große Sequenzhomologien noch dreidimensionale Strukturähnlichkeiten besitzen. Es existieren für die PPIase-Enzymaktivität der Immunophilinen, die durch Immunsuppressiva hemmbar sind, *in vitro*-Testsysteme. Die zelluläre Funktion von Immunophilinen ist zu großen Teilen noch ungeklärt. Ein Einfluß auf Faltungskinetiken zellulärer Proteine und Chaperonwirkung konnte bisher lediglich *in vitro* aber nicht *in vivo* gezeigt werden.

Die FKBP's werden nach ihrer Größe eingeteilt. Sie können aus ein bis drei FKBP-Domänen bestehen (Kay, 1996). Das kleinste FKBP, FKBP12, ist ein relativ gut untersuchtes Immunophilin. Es vermittelt nach Bindung mit FK506 eine Komplexbildung mit Calcineurin, wodurch dieses inhibiert wird. Eine Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT in aktivierten T-Zellen (Tocci *et al.*, 1989) durch Calcineurin ist nun nicht mehr möglich. NF-AT kann jedoch nur dephosphoryliert in den Kern gelangen, um dort die Transkription zahlreicher Gene (u.a. Interleukin-2), die für die T-Zellproliferation nötig sind, hoch zu regulieren.

In Abwesenheit von immunsupprimierenden Substanzen interagiert FKBP12 mit Elementen anderer Signaltransduktionen, z.B. mit dem Rezeptor für den Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ -Rezeptor) und moduliert seine Funktion bei der Zellzykluskontrolle (Wang *et al.*, 1994). FKBP12 ist auch an der Regulation intrazellulärer Calciumkanäle beteiligt, wie beispielsweise des Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptors und des Ryanodinrezeptors (Brillantes *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1995).

Die Regulation von Calciumkanälen durch FKBP12 konnte anhand von Untersuchungen einer transgenen Mausmutante, in der das FKBP12-Gen durch homologe Rekombination deletiert wurde, bestätigt werden (Shou *et al.*, 1998).

Es wurden bisher nur wenige Mutanten mit Defekten in Immunophilinen gefunden. Neben der zuvor erwähnten Mausmutante ist in *Drosophila melanogaster* eine Mutante im Cyclophilin NinaA gefunden worden. Für dieses Protein wird eine Rolle bei der Faltung des Sehpigments Rhodopsin in den Sehzellen des Fliegenauges diskutiert. Es konnte durch "gene replacement"-Experimente in Hefe gezeigt werden, daß nach Ausschaltung aller Immunophilinogene in Hefe (8 FKBP's und 4 Cyclophiline) diese 12-fach Mutante in ihrer Lebensfähigkeit nicht eingeschränkt ist (Dolinski *et al.*, 1997). Keines der Immunophilinen ist für die Hefe essentiell.

### 1.3.1. FKBP in Pflanzen

In Pflanzen wurden FKBP mit mehreren PPIase-ähnlichen Domänen gefunden, die in ihrem Aufbau Ähnlichkeit zu FKBP59 aus Tieren zeigen. Aus *Vicia faba* sind FKBP über Affinitätsreinigung mit FK506-Agarosesäulen gereinigt und charakterisiert worden (Luan *et al.*, 1994; Luan *et al.*, 1996). Dabei wurde auch ein FKBP12 isoliert, das hohe Sequenzhomologie (47%-51% AS-Homologie) zu FKBP12 aus Hefen und Tieren zeigt. Das Protein ROF1 aus *Arabidopsis thaliana* enthält drei PPIase-ähnliche Domänen, eine TPR Domäne und eine Calmodulin-Bindungsdomäne (Vucich and Gasser, 1996). Ähnliche FKBP wurden aus Mais und Weizen isoliert, für die Hsp90-Bindung über die TPR-Motive und Calmodulinbindung gezeigt werden konnte (Hueros *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 1998). Diese FKBP zeigen *in vitro* eine FK506- und Rapamycin-hemmbar PPIase-Aktivität.

Die Funktionen von FKBP in Pflanzen sind nicht bekannt. Pflanzen mit Defekten in den FKBP-Genen könnten anhand ihres Phänotyps erste Hinweise auf deren Funktionen geben und weitere Analysen ermöglichen.

Neben TWD ist mit Pasticcino 1<sup>-</sup> (*pas1*) eine weitere FKBP-Mutante isoliert und als erste FKBP-Mutante in höheren Pflanzen beschrieben worden (Vittorioso *et al.*, 1998). Der Phänotyp der *Pas1*<sup>-</sup> - Mutante weist dramatische Veränderungen des Wachstums und der Entwicklung auf. Die Zellteilung in *Pas1*<sup>-</sup> - Mutanten ist insofern dereguliert, als es zu ektopischer Zellteilung kommt. Unter anderem sind dadurch auch vergrößerte Meristeme zu finden, die u.a. fusionierte Rosettenblätter verursachen. Die Mutation *pas1-1* ist durch T-DNA Insertion über Agrobakterientransformation erzeugt worden. Über inverse PCR konnte das *PAS1*-Gen aus dieser Pflanze isoliert werden. Die abgeleitete Proteinsequenz von *PAS1* weist drei PPIase-ähnliche Domänen und eine TPR-Domäne auf, die große Ähnlichkeit zu FKBP59 aus Tieren und zu ROF1 aus *Arabidopsis* haben (Vittorioso *et al.*, 1998). Der Phänotyp der *Pas1*<sup>-</sup> - Mutante weist, ähnlich wie *Twd*<sup>-</sup>, auf eine Beteiligung von *PAS1* bei der Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Pflanzen hin.

### 1.3.2. Die dreidimensionale Struktur von FKBP

Anhand der bisher sechs bekannten Strukturen unterschiedlicher FKBP ergibt sich ein strukturell einheitliches Bild. Sie bestehen aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die eine Schale ausbilden, in deren Mitte sich eine kurze  $\alpha$ -Helix befindet (Abb. 3.a). Cokristallisation

mit FK506, Rapamycin und weiteren Stoffen haben gezeigt, daß sich die Bindetasche in der Furche zwischen der  $\alpha$ -Helix und der  $\beta$ -Faltblattschale befindet (weißer Pfeil in Abb. 3.a). In Abb. 3.d sind die Seitenketten hervorgehoben, die an der Bindung zu FK506 beteiligt sind.

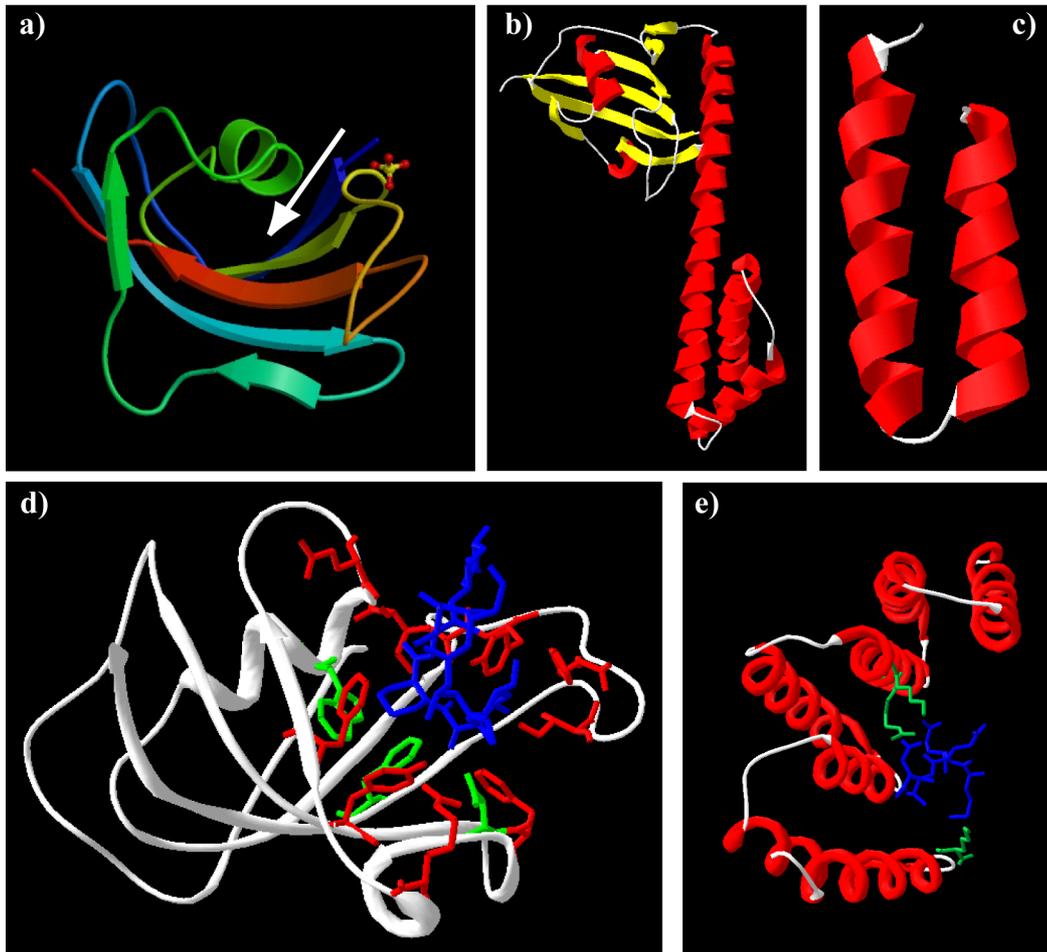


Abb. 3: Kristall- und NMR-Strukturen von FKBP12, Mip, TPR-Untereinheit von PP5. In den Abbildungen sind schematisch die Proteinrückgrate dargestellt; Seitengruppen sind partiell dargestellt. Die Abbildungen b-e) wurden mit dem Swiss-PDBViewer erstellt und beruhen auf den in Klammern angegebenen PDB-Datensatznummern.

a) FKBP12 (Abbildung ist dem PDB-Eintrag der Struktur 1FKK entnommen)

b) Mip aus *Legionella pneumophila* (1FD9)

c) TPR-Motif. Ausschnitt aus der Röntgenstruktur der Protein-Phosphatase 5 (1ELR)

d) FKBP12 (weiß) mit FK506 (blau) komplexiert. Für die Rotamaseaktivität essentielle Seitenketten sind in grün, weitere an der Bindung zu FK506 beteiligte in rot dargestellt (1FKF)

e) TPR-Domäne der Protein-Phosphatase 5 mit dem C-terminalen Peptid des HSP90 komplexiert. Essentielle Seitenketten für die Bindung an das EEDV Motiv sind in grün, das C-terminale Hsp90-Peptid in blau wiedergegeben (1ELR)

Eine besondere Bedeutung haben die Seitenketten der Aminosäuren Asp37, Trp59 und Phe99 (in Abb. 3.d grün gefärbt). Mutationsstudien zeigten, daß diese Positionen essentiell für die Ausbildung der Rotamasefunktion sind (DeCenzo *et al.*, 1996; Tradler *et al.*, 1997). Weitere in Abb. 3.d rot dargestellte Positionen sind zwar an der Bindung beteiligt und beeinflussen je nach Position die Substratspezifität, aber nicht die Funktion.

Ein Großteil der FKBP-Proteine bestehen aus mehreren Untereinheiten. Dies können weitere FKBP-Domänen sein (1-3 FKBP Untereinheiten pro Protein sind bekannt) oder andere Domänen, wie z.B. TPR-Domänen (siehe Kapitel 1.4.), Calmodulinbindestellen, Membrananker oder auch WW-Domänen. Das einzige mehrere Domänen umfassende FKBP, dessen dreidimensionale Struktur bisher gelöst wurde, ist das Mip-Protein (siehe Abb. 3.b) aus *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001).

### 1.4. Tetratrigo-Peptide-Repeats (TPRs)

TPR-Domänen bestehen aus konservierten 34-Aminosäuren umfassenden Sequenzmotiven, die sich 1-16 Mal pro Domäne wiederholen können. Sie wurden zuerst in Komponenten des Anaphase-Promoting-Komplexes identifiziert (Sikorski *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1990). Heute weiß man, daß TPR-Domänen in unterschiedlichen zellulären Zusammenhängen spezifische Protein-Protein Interaktionen hervorrufen (Goebel *et al.*, 1991; Lamb *et al.*, 1995; Blatch und Lässle, 1999). Zusätzlich zu einfachen Interaktionen können die TPR-Domänen der Chaperon-Co-Faktoren Hip und p60/Hop auch regulatorisch auf die ATPase Aktivität von Hsp70 und Hsp90 einwirken (Irmer und Höhfeld, 1997; Prodromou *et al.*, 1999). Die einheitliche Architektur der TPR-Strukturen wurde anhand von mehreren Röntgenstrukturen unterschiedlicher TPR Domänen gezeigt (Das *et al.*, 1998; Abé *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 2000; Gatto *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2001). Jedes 34-Aminosäurenmotiv formt ein Paar antiparalleler  $\alpha$ -Helices (Abb. 3.c). Diese Motive sind in einem Tandem arrangiert, die eine Superhelix ausbildet, welche eine zentrale Furche umschließt. Über diese zentrale Furche werden die Protein-Protein Interaktionen ausgeübt, was die mit der Hsp90-Bindedomäne kokristallisierte Struktur des HOP-Proteins vermuten läßt (Abb. 3.e). Mutationsstudien an der TPR-Domäne der Protein Phosphatase 5 (PP5) unterstützen diese Vermutung (Ramsey *et al.*, 2000). Es konnte hierbei gezeigt werden, daß Lys97, Arg101 und Lys32 (alle drei liegen in der zentralen Furche) der TPR-Untereinheit essenziell für die Bindung des EEVD-Motivs an die TPR-Untereinheit sind. Die Interaktion der TPR-Domäne mit Hsp90, bzw. Hsp70 findet über das C-terminale Sequen-

zmotiv EEVD-COOH statt (Russell *et al.*, 1999). Dieses Motiv ist in allen Hsp70/90 hoch konserviert.

Bisher wurden keine Proteine gefunden, die ausschließlich aus TPR-Motiven bestehen. Es ist jeweils mindestens eine weitere Domäne vorhanden. TPR-Proteine konnten hauptsächlich in Multi-Protein-Komplexen gefunden werden. Ein Beispiel hierfür ist die Ausbildung des Glucocorticoidrezeptors. Hier wird über die TPR-Domänen der

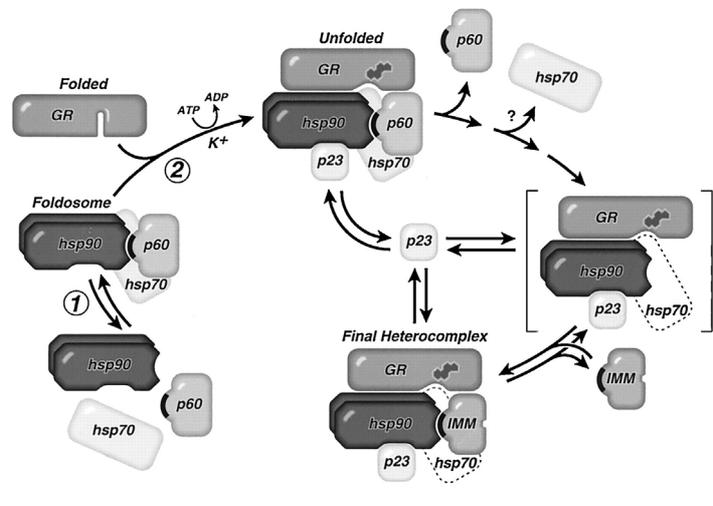


Abb. 4:

**Aufbau des Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplexes** (aus: Dittmar *et al.*, 1997). Der schwarze Balken sowohl im p60, als auch im IMM (Immunophilin) steht für eine TPR-Domäne über welche jeweils die Bindung zum hsp90-Homodimer stattfindet.

beiden Helferproteine HIP (Hitzechock-Interaktions-Protein, früher p60) und HOP (Hitzechock-Organisations-Protein) die beiden Hitzechockproteine hsp70 und hsp90 an den inaktiven Rezeptorkomplex gebunden. Nach Ablösung von hip, hop und dem hsp70 wird durch Bindung an die TPR-Domäne eines Immunophilins (FKBP51, FKBP52 oder Cyp40) der Komplex in seine aktive Form überführt und darin gehalten. Bindet ein Steroid, fällt das FKBP und somit auch die beiden hsp-Moleküle ab und der Rezeptor kann als Transkriptionsfaktor in den Kern gelangen (Dittmar *et al.*, 1997; Schiene-Fischer und Yu, 2001). Dieser Vorgang ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

Alle bisherigen Erkenntnisse über das TWD-Protein deuten darauf hin, daß es sich in mehreren unabhängigen Signaltransduktionswegen befindet und dort an der Ausbildung von Multiproteinkomplexen beteiligt ist. Nicht nur aus diesem Grund, sondern auch, da es bisher lediglich eine Struktur eines großen FKBP's gibt, ist die Lösung der dreidimensionalen Struktur dieses Proteins von großem Interesse. So können anhand der Strukturdaten Hinweise auf die Art der Beteiligung an den Komplexen und der fehlenden Rotamaseaktivität (in Einheit mit der Unfähigkeit zur Bindung von FK506 & Rapamycin) gefunden werden.

Ziel der Arbeit war es, die dreidimensionale Struktur des TWD-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* zu bestimmen. Hierzu sollte ein System etabliert werden, welches die heterologe Expression des TWD-Proteins in *Escherichia coli* und dessen Aufreinigung umfassen sollte. Durch verschiedene Modifikationen und sowohl mit affinitäts-, als auch gefiltrationschromatographischer Methoden galt es, große Mengen des rekombinanten Proteins in reiner Form zu gewinnen. Zur Kontrolle der strukturellen Integrität sollten biologische und biophysikalische Untersuchungsmethoden durchgeführt werden. Weiterhin sollten Bedingungen und Methoden zur Kristallisation des Proteins gefunden werden. Mit Hilfe der Proteinkristallographie sollte die Struktur des Proteins gelöst werden. Weiterhin war ein Ziel, die Voraussetzungen zur Strukturlösung mit Hilfe von kernresonanzspektroskopischen Methoden zu finden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte und Zubehör

Die Inkubation der *E. coli* Bakterien erfolgte in den Brutschränken Köttermann 2737 (Gossau, Schweiz), Memmert GTRO 0214 (Schwabach), den Inkubationsschüttlern und Fermentern der Firma Infors (Basel, Schweiz). Die Beschallung aufgeschlossener Zellen erfolgte mit einem Ultraschallgerät Labsonic L mit der Nadel 40 TL von Braun (Melsungen).

UV-Vis Spektren wurden mit dem Photometer UV-2110PC von Shimadzu (Duisburg) aufgezeichnet.

### 2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien stammen von den Firmen Aldrich (Heidenheim), BioRad (München), Biozym (Oldendorf), Boehringer (Mannheim), Difco (Kansas City, MO, USA), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) und haben die Qualität "p.a." oder "reinst". Alle Lösungen werden mit hochreinem Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Die Restriktionsenzyme werden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Gibco/BRL (Karlsruhe), Boehringer (Mannheim) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Weiterhin wurde Klenow-Fragment der DNS-Polymerase aus *E. coli* (Boehringer Mannheim), Taq Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim), Taq-DNS Polymerase (Promega, Mannheim) und T4-DNS-Ligase (Gibco/BRL, Karlsruhe) verwendet.

Die Sequenzierung wird mit dem Thermosequenase-Kit von Amersham (Buckinghamshire, England) durchgeführt. Zum Überschichten dient Chill-Out-Wax von Biozym (Oldendorf).

Als Molekulargewichtsstandards werden für DNA der 1 kb Marker von Gibco BRL (Neu Isenburg) und die Längenmarker VII bzw. 100 bp Ladder von Boehringer (Mannheim) benutzt.

Folgende Proteinmarker werden in der Arbeit benutzt: der Rainbow high molecular weight von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), der SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range von BioRad (München) und die Marker 10 kDa-Ladder; BenchMark<sup>+</sup>, Protein Ladder; BenchMark<sup>+</sup>, Prestained Protein Ladder von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Die Chemilumineszenzdetektion wird mit Super Signal oder Super Signal Ultra von Pierce (Rockford, USA) durchgeführt. Die Röntgenfilme XAR oder Biomax ML stammen von Kodak (Stuttgart).

Zur Reinigung und Isolierung von DNS werden folgende Qiagenprodukte (Hilden/Düsseldorf) benutzt: QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAquick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit.

Das Einengen von Proteinlösung wird mit verschiedenen Konzentratoren von Membrapure, Bodenheim (membra-spin-MINI 30 kd), oder Millipore, Bedford, USA (Centriplus YM-10/30 oder Centricon YM-10/30) durchgeführt.

## 2.3. Puffer, Lösungen und Medien

### 2.3.1. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Lösungen und Puffer in hochreinem Wasser angesetzt.

#### Agarosegelelektrophorese

|                      |  |
|----------------------|--|
| Ethidiumbromidlösung | 10 mg/ml Ethidiumbromid                        |
| TAE                  | 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0           |
| DNS-Probenpuffer     | 50 % Saccharose, 1x TAE, 0,25 % Bromphenolblau |

#### Sequenzierung

|               |  |
|---------------|--|
| 10x TBE       | 162 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 9,3 g EDTA Na <sub>2</sub> -Salz   |
| Sequenziergel | 21 g Harnstoff, 32 ml H <sub>2</sub> O, 5 ml 10x TBE-Puffer, 500 µl DMSO, 4,3 ml 40 % Acrylamid-Bis-Acrylamid Lsg.<br>nach dem Entgasen:<br>50 µl TEMED, 350 µl 10 % APS |

#### SDS-Page

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 2xSDS Probenpuffer       | 125 mM Tris/HCl, 4 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) β-Mercaptoethanol, 20 % (w/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau |
| 5x Harnstoffprobenpuffer | 8 M Harnstoff, 0,2 M Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT                          |
| Sammelgelpuffer          | 0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8   |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Trenngelpuffer        | 1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8   |
| Laufpuffer            | 192 mM Glyzin, 25 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS  |
| Coomassie-Färbelösung | 0,05 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Ethanol, 25 % Essigsäure                      |
| Sammelgel             | 3,8 % (w/v) Acrylamid, 0,1 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS   |
| Trenngel              | 12/15 % (w/v) Acrylamid, 0,4 % (w/v) Bisacrylamid, 0,1 % (v/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS |

**Western-Blot**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Blotpuffer            | 39 mM Glyzin, 48 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol         |
| Ponceau-S-Färbelösung | 0,2 % (w/v) Ponceau, 3 % (w/v) Trichloressigsäure     |
| TBS                   | 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,4                       |
| TBS-T                 | 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,4 |

**IMAC-Puffer**

|                    |   |
|--------------------|---|
| 8x Beladungspuffer | 400 mM NiSO <sub>4</sub>  |
| 8x Aufschlußpuffer | 40 mM Imidazol, 4 M NaCl, 160 mM Tris/HCl, pH 7,9; je 50 ml 1x Puffer wurde 1/2 Tablette complete (EDTA-free) <sup>TM</sup> zugegeben |
| 4x Strip-Puffer    | 400 mM EDTA, 2 M NaCl, 80 mM Tris/HCl, pH 7,9   |
| Waschpuffer 1      | 35 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5  |
| Waschpuffer 2      | 50 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5  |
| Waschpuffer 3      | 100 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5   |
| Elutionspuffer 1   | 300 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5   |
| Elutionspuffer 2   | 400 mM Imidazol, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5   |

**Zellaufschluß**

|                        |  |
|------------------------|--|
| Aufschlußpuffer        | 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5           |
| Solubilisierungspuffer | 20 mM OG, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5 |

### 2.3.2. Medien

Wenn nicht anders angegeben, werden die Medien autoklaviert (121 °C, 20 min). Medienzusätze werden sterilfiltriert und nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 40-50 °C zugesetzt.

#### 2.3.2.1. Medienzusätze:

|                       |                                 |
|-----------------------|---------------------------------|
| Ampicilin-Stammlösung | 100 mg/ml (in H <sub>2</sub> O) |
| Kanamycin-Stammlösung | 50 mg/ml (in H <sub>2</sub> O)  |
| IPTG-Stammlösung      | 1 M                             |

#### 2.3.2.2. Baketriemedium:

dYT 1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl

Für Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

## 2.4. Dokumentation der Ergebnisse

Agarosegele werden mit dem GelDoc1000 (BioRad) dokumentiert. Die Dokumentation von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen erfolgt unter Verwendung des UV-Weißlicht-Konvertierungsschirm ebenfalls mit dem GelDoc1000. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgt mit den Programmen Adobe Photoshop, Adobe Illustrator und Microsystems Origin. Kristallisationsansätze werden unter dem Polarisationsmikroskop (Olympus SZH10) mit einer Olympus Camedia-C3030-Zoom dokumentiert.

## 2.5. Organismen und Wachstumsbedingungen

### 2.5.1. Kulturbedingungen für *E.coli*

*E.coli* wird, wenn nicht anders angegeben, in dYT-Flüssigmedium für 12 bis 16h bei 37°C im Schüttelinkubator bei 120 Upm angezogen oder auf Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.5.2. Bestimmung der Zelldichte von bakteriellen Flüssigkulturen

Als relatives Maß für die Zelldichte wird die Optische Dichte der Kulturen im Photometer bei 600 nm bestimmt (OD<sub>600</sub>)

### 2.5.3. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 1 beschrieben.

**Tabelle 1: verwendete *Escherichia coli* Stämme und deren Eigenschaften**

| Stamm                    | relevante genetische Marker   | Referenz                    | Herkunft               |
|--------------------------|---|-----------------------------|------------------------|
| DH5 $\alpha$             | <i>F<sup>-</sup> endA1 hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>) supE44 thi-1 l-<br/>recA1 gyrA96 relA1 deoR [lacZYA-argF]-U169<br/>(j80dlacZDM15)</i>    | Hanahan, 1985               | ITC Biotechnology GmbH |
| Top10                    | <i>F<sup>-</sup> mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) deoR<br/><math>\phi</math>80dlacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-<br/>leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i> | Invitrogen                  | Invitrogen             |
| BL21 CodonPlus (DE3) RIL | <i>BF-ompT hsdS(r<sub>B-</sub> m<sub>B-</sub>) dcm-Tet<sup>r</sup> gal l (DE3)<br/>endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>                        | Weiner <i>et al.</i> , 1994 | Stratagene             |

### 2.5.4. Stammhaltung

Die kurz- bis mittelfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgt auf entsprechenden Agar-Platten. Für eine langfristige Archivierung von Stämmen und Bakterienklonen werden 500  $\mu$ l einer frischen ÜN-Kultur mit 500  $\mu$ l Kryoprotektant (dYT-Medium, 80 % (w/v) Glycerin) versetzt und bei -70 °C eingefroren.

## 2.6. Überexpression von Proteinen in E.coli

### 2.6.1. Expression von TWD in E.coli

Proteinexpression wurde in Kulturen von 250 ml bis 6 l durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in allen Stadien des Experimentes unter Selektionsbedingungen.

Aus einer ÜN-Kultur wurde die Expressionskultur in dYT Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,3 inokuliert und bei 37 °C und 120 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 0,1 bis 1 mM IPTG. Unter Induktionsbedingungen wurde die Kultur für weitere 2-6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 Upm 10 min pelletiert, in Pufferx resuspendiert und ggf. nach Aliquotierung bei -70 °C gelagert. Spezielle Expressionsbedingungen sind in Kapitel 3.1.2. dargestellt.

### 2.6.2. Zellaufschlußmethode für E.coli

Die Bakteriensuspension wurde bei 15000 Upm für 15 Minuten (4 °C) abzentrifugiert. Je 3 g Pellet wurden in 30 ml Aufschlußpuffer resuspendiert, 240 µl Lysozym-Stocklösung, eine halbe Tablette complete<sup>tm</sup>-EDTA-frei (Protease-Inhibitor) zugegeben und 30-40 Minuten im Eisbad geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 8 x 15 Sekunden mit je 15 Sekunden Pause im Eisbad mit Ultraschall behandelt. Der Erfolg des Zellausschlusses wurde anschließen unter einem Mikroskop überprüft. War der Aufschluß erfolgreich, so wurden die groben Zelltrümmer für 10 Minuten mit 8000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in der Ultrazentrifuge mit 39.000 rpm für 1 h bei 4 °C abzentrifugiert. Zum Entfernen des Lysozyms wurde das Pellet mehrmals vorsichtig mit dem Aufschlußpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet über Nacht bei 4 °C mit Solubilisierungspuffer auf einem Schüttler solubilisiert. Im Anschluß wurde das Material in der Ultrazentrifuge mit 39.000 Upm bei 10 °C für 45 Minuten abzentrifugiert. Im sich ergebenden Überstand befand sich nun das solubilisierte TWD-Protein.

## 2.7. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) stellt eine schnelle und effiziente Methode zur gezielten in vitro Vervielfältigung definierter DNS-Fragmente dar. Weiterhin kann sie zur Mutation, Fusion als Nachweis und in Abwandlung zur Sequenzverifizierung bestimmter DNS-Fragmente dienen.

### 2.7.1. PCR-Primer

Die Oligonukleotide werden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert. Nicht komplementäre Bereiche, welche zur Einführung von Streptavidin- oder Histidin-Resten dienen, sind fett hervorgehoben

**Tabelle 2: verwendete PCR-Primer**

| Primer       | Sequenz   |
|--------------|---|
| TWdf         | 5' - CGG GAT CCC ATA TGG ATG AAT CTC TGG AGC ATC AAA CTC - 3'   |
| HisTWdf      | 5' - CGGGAT CCC ATA TGC <b>ACC ATC ACC ATC ACC</b> ATG ATG AAT<br>CTC TGG AGC ATC AAA CTC - 3'                      |
| StrpTWdf     | 5' - CGG GAT CCC ATA TGG <b>CTA GCT GGA GCC ACC CGC AGT TCG<br/>AAA AAG</b> ATG AAT CTC TGG AGC ATC AAA CTC - 3'    |
| 6118         | 5' - GGG GGT AGA TCT TTC ACG TTG - 3'   |
| TWDHisR      | 5' - CGA GAT CTG TCG ACT TAA <b>TGG TGA TGG TGA TGG TGA</b> TCT<br>GCT TTA ACT CTG TGG CGT CG - 3'                  |
| TWDStrpR     | 5' - CGA GAT CTG TCG ACT TAT <b>TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC<br/>CAG CTA GCA</b> TCT GCT TTA ACT CTG TGG CGT CG - 3' |
| IRD800-RP-80 | 5' - GGC ACC CCA GGC TTT ACA - 3'   |
| IRD800-UP-90 | 5' - GGC CTC TTC GCT ATT ACG C - 3'   |

### 2.7.2. Allgemeine PCR Bedingungen

Durch überhängende Basen von Primern können die Enden von DNS-Fragmenten modifiziert werden. Über eine zweite PCR lassen sich diese Überhänge hybridisieren und in Verbindung mit den beiden äußeren Primern ist die Amplifizierung des Fusionsproduktes möglich. Weiterhin können die Überhänge so gewählt werden, daß Protein-"tags" oder Restriktionsstellen eingefügt werden.

Zur Herstellung der Genprodukte wird das Expand-High-Fidelity-Polymerase-Gemisch, welches sich durch eine geringe Fehlerrate auszeichnet, benutzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 3 und das Thermocyclerprogramm in Tabelle 4 wiedergegeben.

**Tabelle 3: Reaktionsansätze**

| Menge | Zutat  |
|-------|--|
| 5 µl  | 10xPuffer                                      |
| 5 µl  | dNTP Mix (je 2,5 mM dCTP, dATP, dTTP und dGTP) |
| 2 µl  | Sense Primer                                   |
| 2 µl  | Antisense Primer                               |
| 1 µl  | DNS  |
| 1 µl  | Polymerase                                     |
| 34 µl | H <sub>2</sub> O                               |

**Tabelle 4: Thermocyclerprogramm**

| Schritt       | Temperatur | Zeit        |
|---------------|------------|-------------|
| Deaturierung  | 95 °C      | 2 Minuten   |
| 25 Cyclen     | 95 °C      | 30 Sekunden |
|               | 58 °C      | 30 Sekunden |
|               | 72 °C      | 30 Sekunden |
| Endelongation | 72 °C      | 2 Minuten   |

### 2.7.3. Reinigung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte über ein Agarosegel und dem Ausschneiden der Produktbande aus dem Gel erfolgt die Reinigung mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

## 2.8. Molekularbiologische Standardmethoden

Die Durchführungen der eingesetzten Standardtechniken wie Restriktion, Klenow Reaktion und Ligation erfolgen gemäß Ausubel *et al.* (1989) oder nach Anweisungen des jeweiligen Enzymherstellers. Die Überprüfung der Klonierungsprodukte wird mit Restriktionsverdau und/oder Sequenzierung durchgeführt.

Die Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli*-Zellen erfolgt mit dem QIAprep Spin Mini-prep Kit nach den Angaben des Herstellers.

Für die Reinigung von DNS nach enzymatischen Reaktionen bzw. Umpufferung wird das QIAquick PCR Purification Kit verwendet.

Zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von DNS werden Agarosegele mit einer Konzentration von 0.75 - 2 % Agarose in TAE-Puffer benutzt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromidlösung) wird die DNS im UV sichtbar gemacht.

### 2.8.1. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 beschrieben.

**Tabelle 5: verwendete Plasmide**

| Plasmid   | Marker                              | Herkunft / Referenz                |
|-----------|-------------------------------------|------------------------------------|
| pCR-BLUNT | Kan <sup>r</sup> , Zeo <sup>r</sup> | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| pET11a    | Amp <sup>r</sup>                    | Töpfer <i>et al.</i> , 1987        |
| pTWD1     | Amp <sup>r</sup>                    | Berger, 1997                       |

### 2.8.2. Sequenzierung von DNA

DNS-Sequenzierungen werden mit dem LI-COR 4200 Automatic Sequencer der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Mit diesem System können DNS-Abschnitte von über 1200 bp mit einer Reaktion sequenziert werden.

Durchgeführt wird das "Cycle Sequencing" mit der Thermosequense. Die Markierung der DNS erfolgt durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden (dyed primer method). Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgt die Detektion der DNS-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion werden mit dem LI-COR 4200 Gene ReadIR durchgeführt. Die Reaktionen werden nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt und mit Chill-Out-Wax überschichtet. 5,7 µl Plasmid in Trispuffer (100 ng - 150 ng DNS pro 1000 Nukleotide) werden mit 0,7 µl 50 % DMSO und 0,6 µl Primer (2 pmol/µl) versetzt; dieser Ansatz auf 4 Reaktionsgefäße à 1,5 µl verteilt und weitere 1,5 µl des jeweiligen Reaktionsmix (G, A, T, C; 1 : 1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) zugegeben.

Die Sequenzierungsreaktionen werden in 0,2 ml Gefäßen im Thermocycler in der Regel mit den in Tabelle 6 aufgeführten Parametern durchgeführt.

**Tabelle 6: Thermocyclerprogramm**

| Schritt                | Zeit        | Temperatur |
|------------------------|-------------|------------|
| Denaturierung:         | 2 Minuten   | 94 °C      |
| 30 Zyklen:             | 40 Sekunden | 94 °C      |
|                        | 40 Sekunden | 50 °C      |
|                        | 60 Sekunden | 70 °C      |
| bis zum manuellen Stop |             | 4 °C       |

Nach Zugabe von 3 µl Stoppuffer wird die Probe für 2 Minuten bei 70 °C denaturiert.

Für das Giessen des Gels (4,6 %iges Acrylamidgel, 66 cm lang) wird die in Kapitel 2.3.1. beschriebene Sequenziergel-Lösung sterilfiltriert. Die Polymerisation ist nach einer Stunde abgeschlossen. Je 1,5 bis 2.5 µl der Reaktionen werden auf das Gel nach 30 Minuten Vorlaufzeit aufgetragen. Die Detektion erfolgt zeitgleich mit der Elektrophorese mittels eines Infrarotlasers bei 800 nm. Es wird mit der Software Base ImageIR 4.0 ausgewertet (nach Angaben des Herstellers).

## 2.9. Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.9.1. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient dazu, Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse des Proteins. Die Gelelektrophoresen werden in einem diskontinuierlichen Puffer in einer vertikal angeordneten Flachgel-Elektrophoresekammer nach Laemmli (1970) in der Modifizierung von Hasilik und Neufeld (1980) durchgeführt.

Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel liegt bei 12 %. Die eingesetzten SDS-Polyacrylamidgele sind 11 cm breit und 8 cm hoch.

Die in SDS-Probenpuffer vorliegenden Proteine werden 5 Minuten bei 95 °C denaturiert; anschließend zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

Die Trennung der Proben erfolgt bei 100 bis 220 V (konstante Spannung), bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht.

Das Anfärben der Gele erfolgt durch eine Coomassie-Färbelösung. Nach zirka 15 Minuten werden die Gele mit Entfärber (10 % (v/v) Essigsäure) behandelt, um unpezifische Färbung zu entfernen.

### **2.9.2. Westernblotanalyse**

Um die Proteine nach der SDS-PAGE qualitativ und quantitativ zu analysieren, wird das sogenannte Western-Blot-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen und anschließend ein immunochemischer Nachweis mit Antikörpern bzw. Konjugaten durchgeführt.

Auf die als Anode dienende Bodenplatte der Apparatur werden in dieser Reihenfolge vier Lagen Whatman Blotpapier, die Membran, das Gel und weitere vier Lagen Whatman Blotpapier aufgelegt sowie der Deckel respektive der Kathode aufgelegt. Der Deckel wird mit einem Gewicht beschwert. Die Membran und Blotpapier werden vor dem Aufbau in Blotpuffer inkubiert.

Der Transfer der Proteine erfolgt mit konstanter Stromstärke von  $1,0 \text{ mA/cm}^2$  für 2 Stunden. Anschließend wird das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie R 250 und die Membran mit Ponceau S Lösung gefärbt. Für die immunochemische Detektion wird die Membran mit TBS-Puffer wieder entfärbt.

### **2.9.3. Immunochemische Detektion**

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird die Membran anschließend mit 10 % (w/v) Milchpulver in TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Antikörper in 10 % Milchpulver erfolgt für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Der ungebundene Antikörper wird durch Waschen der Membran (je 10 Minuten) mit TBS-T (2x) und TBS entfernt.

Der verwendete  $\alpha\text{His}$ -Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt und kann somit mittels Chemolumineszenz detektiert werden. Der  $\alpha\text{TWD}$ -Antikörper ist nicht direkt an eine Peroxidase gekoppelt und muß daher vor der Detektion mit einem sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert werden. Ungebundene Antikörper werden wiederum durch Waschen mit TBS-T (2x) und TBS entfernt. Als Peroxidasesubstrat wird "Super-Signal" oder

"Super Signal Ultra" nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Nachweis der Chemolumineszenz erfolgt über Röntgenfilme, welche je nach Intensität zwischen 2 Sekunden und 2 Stunden exponiert werden.

### **2.9.4. Konzentrationbestimmung von Proteinen**

Ein erster Überblick über den Proteingehalt, beispielsweise einer Eluatfraktion, brachte eine estimative Bestimmung anhand von SDS-PAGE Gelen.

Nach der Methode von Bradford (1976) wurde mit Hilfe des BioRad-Microassay nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration einer Probe photometrisch bestimmt. Als Referenz diente eine Eichkurve, die mit einer BSA-Eichlösung (2 mg/ml, Pierce) erstellt wurde.

### **2.9.5. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen**

Um Proteine in einen neuen Puffer zu überführen, wurden Gelfiltrationssäulen verwendet (PD-10 Säulen, Pharmacia oder Econo-Pac 10 DG-Säulen, BioRad). Das zugrundeliegende Prinzip dieser Säulen besteht darin, daß die relativ großen Proteinmoleküle fast ungehindert durch die Säule laufen, während Salze und Puffersubstanzen in den Kanälen des Matrix-Materials (Sephacrose) retardiert werden. Die Säulen wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltrationseinheiten (0,22 µm Ultrafree-MC, Millipore, Bedford, USA). Volumen und Ausschlußgröße dieser Konzentratoren richtete sich nach dem Probenvolumen und dem zu konzentrierenden Protein. Durch Zugabe definierter Volumina neuer Lösungen ließ sich während des Konzentrierens gleichzeitig die Pufferzusammensetzung in bestimmten Maßen verändern.

## **2.10. Chromatographische Reinigung von Proteinen**

### **2.10.1. Proteinreinigung mit dem Nickel-IMAC-System**

In dieser Arbeit wurde mit Chelating Sepharose Fast Flow Media (Amersham) und NiSO<sub>4</sub> gearbeitet. Die Säule (1 bis 5 ml) wird mit dem Beladungspuffer beladen und mit Aufschlußpuffer äquilibriert. Das nach der Solubilisierung gelöste Protein wurde auf die vorbereitete Säule gegeben. Der erste Durchfluß wurde erneut der Säule zugegeben, um eventuell nicht gebundene Proteinmoleküle binden zu können. Im Anschluß wurde die Säule der Reihe nach mit 50 ml Waschpuffer 1, 4 ml Waschpuffer 2 und 3 ml Waschpuffer 3 gewaschen. Das

in den Waschlösungen und der Elutionslösung enthaltene Imidazol ähnelt chemisch dem Histidin und verdrängt kompetitiv unspezifisch gebundenes Protein. Der Durchfluß wurde getrennt gesammelt. Schließlich wurde das Protein mit 8 ml Elutionspuffer 1 und 8 ml Elutionspuffer 2 in Fraktionen á 2 ml von der Säule eluiert. Die Proteinmenge in den Fraktionen wurde über SDS-Gel und Bradford-Test bestimmt.

Die Metallionen wurden durch Zugabe von Strip-Puffer komplexiert und entfernt. Präzipitiertes Protein wurde durch 8 M Harnstoff aus der Säule gelöst, die nach Waschen mit H<sub>2</sub>O regeneriert war.

### **2.10.2. Proteinreinigung über Gelfiltrationschromatographie**

Die vereinigten Fraktionen der IMAC-Reinigung, die das TWD-Protein enthielten, wurden auf eine Sephadex-G25-Säule (Sigma/Aldrich) aufgetragen. Die Größentrennung erfolgte in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 50 mM NaCl. Die Fraktionen, die das gereinigte TWD-Protein enthielten, wurden vereinigt, konzentriert und bei -20 °C gelagert.

### **2.10.3. Proteinreinigung über Ionenaustauschermaterial**

Die vereinigten Fraktionen der Gelfiltration, die das TWD-Protein enthielten, wurden auf eine Fractogel EMD-SO<sup>3</sup><sup>-</sup>-650-(S)-Säule (Merck, Darmstadt) aufgetragen und mit 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 äquilibriert. Die Elution erfolgt über einen Salzgradienten zwischen 0,1 M und 1 M NaCl (in 10 mM Tris-HCl pH 7,5). Die Fraktionen, die das gereinigte TWD-Protein enthielten, wurden vereinigt, konzentriert und bei -20 °C gelagert.

## **2.11. CD-Spektroskopie**

UV Circular Dichroism (CD) Messungen wurden mit einem Jasco J-170 CD-Spektrometer durchgeführt. Die Temperatur wurde in dem Kuvettenhalter Cryostate RTE111 (Neslab Instruments) konstant gehalten.

Die Proteinlösungen wurden über Nacht bei 4 °C gegen 50 mM Phosphate Puffer (pH 7,5) dialysiert. Die Spektren wurden mit 1 µM Proteinlösungen mit einer Kuvette (Schichtdicke: 0,1 cm) von 195 nm bis 260 nm bei konstanter Temperatur (20 °C) aufgenommen. Das Spektrum des Puffers wurde von den Proteinspektren subtrahiert und die molare Eliptizität wurde berechnet. Die Bestimmung der Anteile an Sekundärstrukturelementen wurde mit dem Pro-

gramm CDNN ([http://bioinformatik.bio-chemtech.uni-halle.de/cd\\_spec/download.html](http://bioinformatik.bio-chemtech.uni-halle.de/cd_spec/download.html), Bohm *et al.*, 1992) durchgeführt.

## 2.12. FTIR-Spektroskopie

FT-IR-Spektren wurden mit dem Bruker IFS 66v (Bruker Optics, Ettlingen) aufgezeichnet. Der eingesetzte ATR Mikrokristall stammt von der Firma SensIR (Danbury, CT, USA). Die Messungen wurden an TWD-MA (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 in D<sub>2</sub>O) durchgeführt. Als Referenz diente der Puffer in D<sub>2</sub>O. Das Spektrum gibt die gemittelten Werte aus jeweils 50 Messdurchläufen an. Um eine definierte Eindringtiefe des Lasers zu erhalten wurde mit der ATR-Technik gearbeitet. So konnte sicher gestellt werden, daß jeweils gleiche Mengen Pufferreferenz und Probe in die Messungen einbezogen wurden. Zur Auswertung wurde von dem Probenspektrum das Pufferspektrum subtrahiert; weiterhin wurde eine Basislinie von dieser Differenz abgezogen. Zur Auswertung der Messungen wurde die Opus 3.0 Software von Bruker verwendet.

## 2.13. Röntgenographische Methoden

### 2.13.1. Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"

Zur Bestimmung der initialen Kristallisationsbedingungen wurde ein "Sparse-Matrix-Screen" (Jancarik & Kim, 1991; Cudney *et al.*, 1994) durchgeführt. Hierzu wurden Sets von je 50 verschiedenen Fällungsmittel-Puffern verwendet, die in ihrer Zusammensetzung verschiedenste, bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen repräsentieren. Die Liste der "Screening-Kits" (Hampton Research) befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.1. & 7.1.2.).

Kristallisationsversuche wurden mit TWD-MA und TWD12D (beide Proben befanden sich in 100 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl Puffer) durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Einsatz durch einen 0,22µm Ultrafree-MC-Filter (Millipore, Bedford, USA) zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen und mögliche Aggregate beim Ansatz der Kristallisationsexperimente ausschließen zu können. Das Protein wurde in Konzentrationen von ~20 mg/ml bzw. ~40 mg/ml bei den Versuchen verwendet.

Alle Kristallisationsansätze wurden in "24-well"-Titerplatten (Falcon) durchgeführt. Die Ansätze wurden mit mittelviskosem Silikonfett (Bayer) und Deckgläschen (18 mm, Hampton)

abgedichtet, die bei "Hanging drop"-Experimenten silikonisiert waren. Kristallisationsexperimente wurden bei RT angesetzt und bei 17 °C inkubiert.

### **2.13.2. Dampfdiffusion**

Bei dieser Methode wird eine Proteinlösung mit dem Fällungsmittel vermennt, welches dadurch verdünnt wird. Dieser Ansatz mit einem kleinen Volumen (2 bis 20 µl) steht in einem abgeschlossenen System über den Dampfdruck mit einem großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels in Verbindung (meist 1 ml). Die hygroskopische Äquilibration des Systems, d.h. der Zustand in dem kein weiterer Netto-Austausch über die Gasphase stattfindet, vollzieht sich in der Regel binnen 24 bis 48 Stunden. Diese Zeit kann durch eine "Isolationsschicht" über dem Reservoir, z.B. Silikonöl, verlängert werden. Nach Äquilibration sollte das Protein überkonzentriert vorliegen, damit sich in Abhängigkeit von der Keimbildungsrate Kristalle ausbilden können.

Bei Dampfdiffusionsexperimenten mit hängenden Tropfen ("hanging drop") wird eine Zellkulturschale benutzt, die 24 getrennte zylinderförmige Kammern besitzt. Jeweils 1 ml Reservoirlösung wurde in die Kammern pipettiert und der obere Rand der Kammern mit Silikonfett eingefettet. 2 µl Reservoirlösung aus einer Kammer und 2 µl Proteinlösung wurden in die Mitte eines silikonisierten Deckglases pipettiert, vermischt und das Deckglas umgedreht auf die entsprechende Kammer gelegt. Zur Abdichtung wurde das Deckglas vorsichtig angedrückt, so daß ein durchgehender Silikonfettfilm ausgebildet wurde. Vor dem Schließen der Schalen wurde eine Lage Zellstoff auf die Platten gelegt, um zu verhindern, daß die Deckgläser mit überschüssigem Silikonfett am Deckel festkleben

Das Experiment mit sitzenden Tropfen ("sitting drop") wird in der gleichen Schalenart durchgeführt, bei der aber zusätzlich in jede Kammer eine Brücke mit einer Aussparung an der Oberseite eingesetzt wurde. Statt auf ein Deckglas wurde der Proteintropfen in diese Aussparung pipettiert, sonst wurde wie bei der "hanging drop" Methode verfahren. Alle Experimente wurden in einem Raum mit kontrollierter Temperatur (konstant: 17 °C) durchgeführt und anschließend dort aufbewahrt.

### **2.13.3. Färbung von Kristallen**

Zur Verifizierung einer potentiellen Proteinkristallisation, wurden Kristalle mit verschiedenen Farbstoffen behandelt, die spezifisch an Protein binden. Hierzu wurde 0,5 µl des Farbstoffs zu dem Ansatz gegeben. Als Farbstoff diente Coomassie (blau) (Iz It, Fa. Hampton).

### **2.13.4. Röntgendifraktionsexperimente an TWD-Kristallen**

Alle kristallographischen Untersuchungen an TWD-MA- und TWD12D-Kristallen erfolgten unter Kryobedingungen ( $T = 100$  K) mit einem Drehanoden-Röntngenerator (FR591, Bruker-Nonius, Delft, NL). Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung liegt bei 1,5418 Å ( $\text{Cu } K_{\alpha}$ ). Zur Detektion wurde ein "Image-Plate Detektor" (MAR Research, Norderstedt) verwendet. Kryobedingungen wurden durch Einsatz eines Laminar-Kaltluftgebläses (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) eingestellt.

### **2.13.5. Analyse von Proteinkristallen unter Kryobedingungen**

Für die Analyse von Kristallen unter Kryobedingungen ( $T = 100$  K) müssen die Kristalle vor Schäden geschützt werden, die durch die Bildung von Eiskristallen während des Abkühlens auf 100 K entstehen können. Hierzu wird der Kristall mit Hilfe eines "Cryo-loops" aus dem Ansatz "gefischt" (Teng, 1990) und in ein entsprechendes kryoprotektathaltiges Medium umgesetzt. Nach 4-5 min wird der Kristall erneut mit dem "Cryo-Loop" entnommen und in einem Stickstoff-Gasstrom von  $T = 100$  K abgekühlt. Alternativ wurden Kristalle auch direkt in flüssigen Stickstoff getaucht und später in den Kryostrom gebracht. Als Kryoprotektant diente hier Glycerin (5-15 %). Die Lagerung von eingefrorenen Kristallen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

## **2.14. Kernresonanzspektroskopie und Spektrenanalyse**

### **2.14.1. Herstellung der NMR-Probe**

#### **2.14.1.1. Expression und Zellaufschluß**

In Zusammenarbeit mit T.Kamphausen (MPI Enzymkinetik, Halle) wurde die FKBP-Domäne (Aminosäure 1-180) des TWD (TWD12D) Proteins in  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiertem Medium exprimiert und aufgereinigt. Es wurden 4 x 1 l des markierten Mediums mit je 50 ml einer ü.N.-Kultur angeimpft. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 wurde die Expression mit 1 mM IPTG

gestartet und bei einer  $OD_{600}$  von 0,56 geerntet. Es konnten aus den 4 l Medium 5,1 g Pellet erhalten werden. Nach Resuspension des Zellpellets in 10 mM Hepes, pH 7 wurden die Zellen bei 4 °C mit Hilfe einer Frenchpress aufgeschlossen.

#### 2.14.1.2. Reinigung

Der aufgeschlossene Überstand wurde auf eine Fractogel EMD-DEAE-650(M)Säule aufgetragen. Die Elution von der Säule erfolgte über einen 0-1 M KCl-Gradienten. Die erhaltenen Fraktionen wurden anhand eines SDS-Gels analysiert und diejenigen, die das TWD12D Protein beinhalteten wurden vereinigt.

Im Anschluß erfolgte eine Aufreinigung über eine Fractogel TSK-AF-Blue Säule. Die TWD12D beinhalteten Fraktionen wurden vereinigt und schließlich über eine HiLoad Superdex 75 HR 16/60 Säule aufgereinigt. Nach diesem letzten Aufreinigungsschritt befand sich das Protein in einem 10 mM Hepes Puffer (pH 7,5) mit 150 mM NaCl.

#### 2.14.2. Probenvorbereitung

Das aufgereinigte Protein wurde anschließend gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8 dialysiert und aufkonzentriert. In den Kernresonanzexperimenten wurde das TWD12D(CN) Protein in einer Konzentration von 1,4 mM eingesetzt. Die verwendete Probe wurde mit 5%  $D_2O$  (v/v) und 0,02 % (w/v) Natriumazid versetzt und in Aliquots von jeweils 300  $\mu$ l in NMR-Proberöhrchen (BMS-005B, Shigemi, Tokyo) eingefüllt. Zur Verwendung in den HCCH-TOCSY und dem NOESY Experimenten wurde die Proteinlösung lyophilisiert und in  $D_2O$  wieder gelöst. Diese wasserfreie Probe konnte anschließend in die Experimente eingesetzt werden.

#### 2.14.3. Hard- und Software für Aufnahme, Prozessierung und Auswertung der Spektren

Die im Folgenden beschriebenen Spektren wurden auf einem Bruker DMX-600 Spektrometer aufgenommen. Es wurde ein XYZ-PFG- $^1H\{^{13}C,^{15}N\}$ -Probenkopf verwendet. Die Referenzierung der Protonenfrequenz erfolgte intern in einer TWD12D(CN)-Referenzprobe auf die  $^1H$ -Methylfrequenz von DSS ( $\delta_{DSS} = 0$  ppm).  $^{13}C$ ,- und  $^{15}N$ -chemische Verschiebungen wurden indirekt auf die  $^1H$ -Methylfrequenz von DSS referenziert, unter Verwendung der Frequenzverhältnisse  $^{13}C,^1H$  (0,251449530) und  $^{15}N/^1H$  (0,101329118) (Markley *et al.*, 1998).

Frequenzdiskriminierung in den indirekten Spektraldimensionen wurde durch die States-TPPI-Methode (Marion *et al.*, 1989) erreicht.

Zur Prozessierung der Spektren wurde die Software NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) benutzt. Zur Visualisierung und Auswertung wurde das Programm XEASY (Bartels *et al.*, 1995) verwendet. Aufnahme und Prozessierungsparameter der Spektren sind in Tabelle 7 dargestellt

#### **2.14.4. NMR Experimente**

Breitbandige  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Entkopplungen während der direkten Detektionszeit wurde durch GARP-Sequenzen realisiert (Shaka and Keeler, 1987). Als Mischsequenz während TOCSY-Spinlockperioden fand das DIPSI-2-Schema (Shaka *et al.*, 1988) Anwendung.  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung wurde durch die WALTZ-16-Sequenz erreicht (Shaka *et al.*, 1983). Als Ausgangsspektren für die Zuordnung wurde ein ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-2D-Einbindungskorrelations-(HSQC)-Spektrum aufgenommen.

#### **2.14.5. Experimente zur Resonanzzuordnung**

Für die sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats wurden folgende 3D Tripelresonanzspektren aufgenommen: HNC0 (Ikura *et al.*, 1990), HNCA ([2] Grzesiek and Bax, 1992), CBCANH ([3] Grzesiek and Bax, 1992), CBCA(CO)NH ([1] Grzesiek and Bax, 1992), C(CO)NH (Bax *et al.*, 1993), H(CCO)NH (Bax *et al.*, 1993) und HBHA(CBCACO)NH (Grzesiek and Bax, 1993).

Des Weiteren wurden für die Zuordnung der Seitenketten und Erleichterung der Rückgratzuordnung ein HCCH-TOCSY (Bax *et al.*, 1990) aufgenommen.

Zur weiteren Vervollständigung der Zuordnung und zur Gewinnung struktureller Informationen in Form von NOEs wurde ein  $^{15}\text{N}$ -editiertes NOESY-HSQC (Zuiderweg and Fesik, 1989) durchgeführt.

**Tabelle 7: Akquisitions- und Prozessierungsparameter für NMR-Experimente an TWD12D(CN)**

|                              |      |                              |          | Dimension | sw <sup>a</sup> | t <sup>b</sup> |
|------------------------------|------|------------------------------|----------|-----------|-----------------|----------------|
| HSQC                         |      |                              |          | F1        | 9259,259        | 1024           |
| nt <sup>c</sup>              | 16   | <sup>15</sup> N <sup>d</sup> | 117,942  | F2        | 1666,67         | 200            |
| d1 <sup>e</sup>              | 1000 | <sup>13</sup> C <sup>f</sup> | -        | F3        | -               | -              |
| HNCO                         |      |                              |          | F1        | 9259,259        | 1024           |
| nt                           | 12   | <sup>15</sup> N              | 117,939  | F2        | 1666,67         | 120            |
| d1                           | 850  | <sup>13</sup> C              | 177      | F3        | 1736,11         | 94             |
| HNCA                         |      |                              |          | F1        | 9259,259        | 1024           |
| nt                           | 24   | <sup>15</sup> N              | 117,939  | F2        | 4166,67         | 92             |
| d1                           | 1000 | <sup>13</sup> C              | 55,976   | F3        | 1736,11         | 82             |
| CBCANH                       |      |                              |          | F1        | 8389,2917       | 1024           |
| nt                           | 48   | <sup>15</sup> N              | 117,9373 | F2        | 8445,95         | 114            |
| d1                           | 1100 | <sup>13</sup> C              | 45,9741  | F3        | 1457,73         | 66             |
| CBCA(CO)NH                   |      |                              |          | F1        | 8389,2917       | 1024           |
| nt                           | 32   | <sup>15</sup> N              | 116,48   | F2        | 8445,95         | 114            |
| d1                           | 900  | <sup>13</sup> C              | 46       | F3        | 1457,73         | 76             |
| C(CO)NH                      |      |                              |          | F1        | 8389,2917       | 1024           |
| nt                           | 40   | <sup>15</sup> N              | 117,9373 | F2        | 10638,3         | 146            |
| d1                           | 900  | <sup>13</sup> C              | 45,9741  | F3        | 1457,73         | 76             |
| H(CCO)NH                     |      |                              |          | F1        | 8389,2917       | 1024           |
| nt                           | 40   | <sup>15</sup> N              | 117,941  | F2        | 6729,475        | 140            |
| d1                           | 840  | <sup>13</sup> C              | -        | F3        | 1457,73         | 76             |
| HBHA(CBCACO)NH               |      |                              |          | F1        | 8389,2917       | 1024           |
| nt                           | 20   | <sup>15</sup> N              | 116,832  | F2        | 3333,33         | 140            |
| d1                           | 900  | <sup>13</sup> C              | -        | F3        | 1457,73         | 72             |
| <sup>15</sup> N-edited Noesy |      |                              |          | F1        | 9259,259        | 1024           |
| nt                           | 8    | <sup>15</sup> N              | 116,901  | F2        | 7142,847        | 256            |
| d1                           | 2000 | <sup>13</sup> C              | -        | F3        | 1666,67         | 80             |
| HCCH-TOCSY                   |      |                              |          | F1        | 7788,162        | 768            |
| nt                           | 4    | <sup>15</sup> N              | -        | F2        | 6289,308        | 112            |
| d1                           | 800  | <sup>13</sup> C              | 42,932   | F3        | 12578,616       | 112            |

a. aufgenommene spektrale Weite in Hertz in der jeweiligen Dimension

b. aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension

c. Anzahl der Wiederholungsexperimente je Zeitinkrement

d. <sup>15</sup>N Trägerfrequenz in ppm

e. Wartezeit in Sekunden zwischen zwei Einzelsperimenten

f. <sup>13</sup>C Trägerfrequenz in ppm

## **2.15. Strukturvorhersage**

### **2.15.1. Sekundärstrukturvorhersage**

Für die Sekundärstrukturvorhersage wurden 5 verschiedene Programmpakete verwendet. Es handelt sich hierbei um SSPro (Baldi, P. et.al.; 1999), PSIPred (McGuffin, L.J. et.al.; 1999), PROFsec (Rost, B. & Sander, C.; 1993), NNPredict (McClelland, J.L. & Rumelhart, D.E.; 1988) und die Sekundärstrukturbestimmung anhand der mit Swiss-Model (Peitsch, M.C.; 1995) modellierten 3D-Struktur des TWD-MA Proteins (siehe Kapitel 3.7.2.).

### **2.15.2. Tertiärstrukturvorhersage**

Zur Vorhersage der Tertiärstruktur wurde das online-Programm Swiss-Model (Peitsch, M.C.; 1995) verwendet. Dabei dienten die folgenden bekannten Strukturen zur Vorhersage der FKBP-Untereinheit als Vorlage: N-terminale Domäne des FKBP59-I (1ROU, 1ROT), humanes FKBP12 komplexiert mit L-685,818 (2FKE, 1FKD) und humanes FKBP12 komplexiert mit L-707,5 (1QPL). Zur Vorhersage der TPR-Untereinheit diente als Vorlage die TPR-Domäne der Cyp40-Struktur (1IHG).

### 3. Ergebnisse

Das Ziel der folgenden Experimente war es, das TWD-Protein in *E.coli* heterolog zu exprimieren, zu reinigen und zu kristallisieren. Zu diesem Zweck galt es, ein Reinigungssystem zu etablieren, den Faltungszustand des Proteins zu überprüfen und Bedingungen für die Kristallisation zu finden. Des Weiteren wurde TWD12D (N-terminale Domäne des TWD Proteins) <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markiert, um im Anschluß Kernresonanz-spektroskopische Experimente zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur durchzuführen.

#### 3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung

##### 3.1.1. Klonierung des Expressionsvektors

Als Ausgangsmaterial der Klonierung des Expressionsvektors diente das Plasmid pTWD1 (Berger, 1997), welches die kodierende Sequenz des TWD-Gens enthält. Um verschiedene Reinigungsmöglichkeiten im Laufe der Arbeit zur Verfügung zu haben, wurden PCR-Primer entwickelt, die entweder homolog zum N-Terminus oder C-Terminus der TWD Sequenz waren und optional durch Sequenzen für einen 6xHis-Tag, bzw. einen StrepII-Tag modifiziert wurden. .

**Tabelle 8: Primerkombinationen**

| Name des erstellten Proteins | N-term. Primer | C-term. Primer | Name des in der Stammsammlung hinterlegten Plasmids |
|------------------------------|----------------|----------------|---|
| TWD                          | TWDf           | 6118           | pTWD  |
| His-TWD                      | HisTWDf        | 6118           | pHisTWD   |
| TWD-His                      | TWDf           | TWDHisR        | pTWDHis <sup>a</sup>                                |
| Strp-TWD                     | StrpTWDf       | 6118           | pStrpTWD  |
| TWD-Strp                     | TWDf           | TWDStrpR       | pTWDStrp  |
| Strp-TWD-His                 | StrpTWDf       | TWDHisR        | pStrpTWDHis   |
| His-TWD-Strp                 | HisTWDf        | TWDStrpR       | pHisTWDStrp   |

a. dieses Plasmid wurde sequenziert

Über PCR-Reaktionen wurde das TWD-Gen mit entsprechenden Primern (die Primerkombinationen sind der Tabelle 8 zu entnehmen) amplifiziert. Die Amplifikate wurden gereinigt und in

den PCRBlunt-Vektor ligiert. Nach der Transformation der Ligationsansätze aller Konstrukte in den *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurden ampicillinresistente Kolonien auf das Vorhandensein von Vektoren mit integrierten Fragmenten der erwarteten Größe getestet. Je Konstrukt wurden vier Klone mit dem Restriktionsenzym NsiI verdaut, dessen Schnittstelle im Vektor das Insert flankiert. Die Bestimmung der Fragmentlängen ergab mindestens zwei korrekt ligierte Amplifikationsprodukte pro Konstrukt.

Die jeweiligen Expressionskassetten wurden mit den Enzymen BamHI und NdeI über Restriktionsverdau aus dem Plasmid herausgeschnitten. Der Expressionsvektor pET11a wurde ebenfalls mit diesen Enzymen behandelt und anschließend mit dem herausgeschnittenen TWD-Fragment ligiert. Nach der Transformation der Ligationsansätze aller Konstrukte in den *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurden ampicillinresistente Kolonien auf das Vorhandensein von Vektoren mit inserierten Fragmenten der erwarteten Größe getestet. Es wurden vier Klone mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Die Bestimmung der Fragmentlängen ergab für jedes Konstrukt Klone mit Fragmenten der erwarteten Größe. Die Plasmide aus den positiven Klonen wurden gereinigt und in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 CodonPlus RIL transformiert. Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, daß die Sequenz des TWD-His Konstruktes mit der Ausgangssequenz identisch ist. Es konnten keine Klonierungsartefakte festgestellt werden.

### **3.1.2. Heterologe Expression von TWD in *E.coli***

Zur Expression des TWD-Proteins wurden Transformanten des *E.coli* Stammes BL21 CodonPlus RIL unter Ampicilin-Selektionsdruck in Schüttelkolben angezogen. Diese ersten Expressionsstudien zeigten, daß jedes Konstrukt in voller Länge und ausreichenden Mengen exprimiert wurde (siehe Abb. 5.a am Beispiel des TWD-His Konstruktes). In den weiteren Schritten wurde mit dem Konstrukt TWD-His weitergearbeitet. Der Nachweis der erfolgreichen Expressions konnte durch Westernblotanalyse von Zellysaten einer 25ml-Expressionkultur erbracht werden. Es wurden sowohl Antikörper gegen den 6His-Tag, als auch polyklonale Antikörper gegen das TWD-Protein verwendet. Westernblots mit beiden Antikörpern belegen die Expression des TWD-Proteins (siehe Abb. 5b).

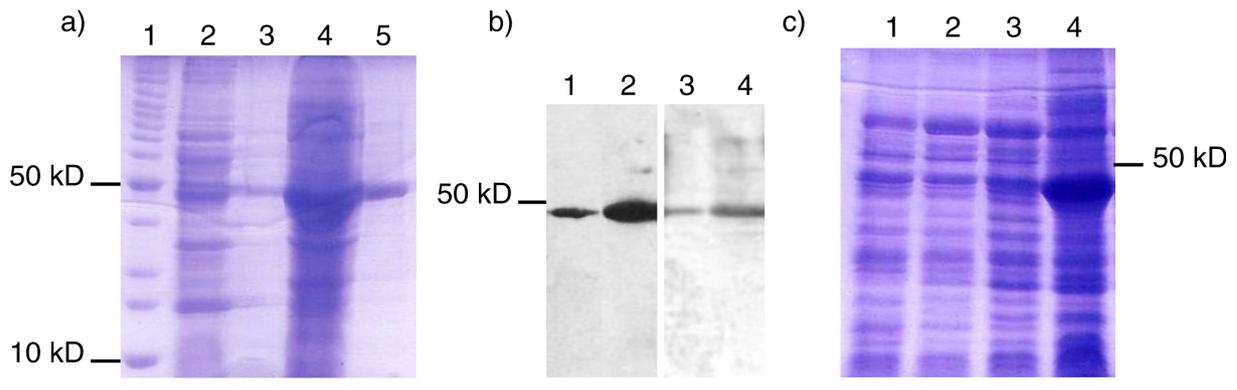


Abb. 5: **Expression von TWD-6His in *E.coli***. SDS-PAGE von Gesamtzellextrakten und IMAC-Batch-Aufreinigung und Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten aus 50 ml Expressionskultur. Das Totallysate wurde durch Zentrifugation (8000 Upm, 15 min) in Überstand und Pellet getrennt. a) SDS-PAGE Spur 1: 10 kDa Marker. Spur 2: 20  $\mu$ l aus 5 ml Überstand. Spur 3: 20  $\mu$ l aus 1 ml IMAC-Batch-Aufreinigung des Überstandes. Spur 4: 20  $\mu$ l aus 5 ml Pellet. Spur 5: 20  $\mu$ l aus 1 ml IMAC-Batch-Aufreinigung des Pellets. b) zwei 12%ige SDS-Gele wurden "geblotet" und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (Spuren 1&2 mit  $\alpha$ -HIS; Spuren 3&4 mit  $\alpha$ -TWD). Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz. Spur 1: Überstand. Spur 2: Pellet. Spur 3: Überstand. Spur 4: Pellet. c) SDS-PAGE von Zellextrakten unter verschiedenen Expressionsbedingungen. Das Totallysate wurde durch Ultrazentrifugation in lösliche und unlösliche Bestandteile getrennt. Gezeigt werden die Fraktionen unlöslicher Bestandteile (je 20  $\mu$ l aus 5 ml) Spur 1: ohne Zugabe von IPTG. Spur 2: Zugabe von 0,1 mM IPTG bei  $OD_{600}$  von 0,8. Spur 3: Zugabe von 1 mM IPTG bei  $OD_{600}$  von 0,8. Spur 4: Zugabe von 1 mM IPTG bei  $OD_{600}$  von 0,5.

Zur Expressionsoptimierung wurden verschiedene IPTG-Konzentrationen und Zugabezeiten getestet. Diese ergaben als optimale Zugabemenge 1 mM IPTG bei einer Zelldichte von OD 0,5 (siehe Abb. 5.c). Da es sich bei TWD um ein membranständiges Protein handelt, befindet sich nach einem Zellaufschluß der Großteil des Proteins im Membranpellet. Um das Protein in Lösung zu bekommen, mußte das Pellet mit Detergenzien behandelt werden. Die Detergenzmoleküle lösen die Proteine aus den Membranbruchstücken und umschließen deren hydrophoben Bereiche. Das von der Detergenzhülle umschlossene Protein befindet sich daraufhin im löslichen Überstand. Um eine möglichst schonende und gleichzeitig effektive Solubilisierung des Proteins zu ermöglichen, wurden verschiedene Detergenzien zuvor auf deren Eignung bewertet. Grundsätzlich sind zur Solubilisierung von membranständigen Proteinen nicht-ionische Detergenzien aufgrund ihrer guten Eigenschaft Lipid-Lipid und Lipid-Protein-Interaktionen aufzubrechen, zu bevorzugen; sie sind nicht-denaturierend, ungeladen und kaum von der Salzkonzentration im Puffer abhängig. Zwitter-ionische Detergenzien können zusätzlich Protein-Protein Wechselwirkungen aufheben, was zu einer Störung der Tertiärstruktur führen kann. Da im Folgenden Dialyse zum Puffertausch verwendet werden sollte, war ein Detergenz mit einer möglichst hohen CMC (Critical-Micelle-Concentration) zu

wählen. Die CMC gibt die maximale Konzentration an, bevor sich alle Detergenzmonomere in Micellen anordnen. Je höher die CMC desto einfacher läßt sich überschüssiges Detergenz durch Dialyse entfernen. Detergenzien, die aromatische Ringsysteme beinhalten, sollten ebenfalls nicht verwendet werden, da dies zu Fehlern bei UV-Messungen (260/280nm) führen kann. Somit schieden TritonX-100, aufgrund des aromatischen Ringsystems, Tween20 und DDM (*n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid) aufgrund der sehr geringen CMC von 0,059 mM, bzw. 0.13 mM, von vornherein aus. Erste Solubilisierungsexperimente ergaben, daß sowohl LDAO (Lauryldimethylamin-Oxid) als auch OG (*n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) ähnlich gute Solubilisierungseigenschaften besitzen. Letztendlich wurde OG ausgewählt, da es im Gegensatz zu LDAO ein nicht-ionisches Detergenz ist ( $\Rightarrow$  es wirkt nicht denaturierend) und eine höhere CMC besitzt ( $\Rightarrow$  Eignung zur Dialyse).

### **3.1.3. Reinigung von TWD-His aus *E.coli***

#### **3.1.3.1. Reinigung mittels IMAC**

Die "Immobilized Metal Affinity Chromatography" (IMAC) beruht auf der Formation schwacher Bindungen zwischen Metallionen, die auf einer Säule immobilisiert wurden und einfacher Proteingruppen die hauptsächlich aus Histidinen bestehen. Zu diesem Zweck wird das Absorbionsmaterial über einen geeigneten Abstandshalter samt einem simplen Metallchelator an die Säulenmatrix gebunden. Dieser Chelator besteht zumeist aus einer Imino-Diazetat Struktur. Im vorliegenden Protokoll wurde mit Nickel komplexiertes NTA (Nitrilo Triacetic Acid) verwendet. Ist das Metallion auf diese Weise komplexiert, besitzt es noch unbesetzte Koordinationstellen. Diese werden zunächst von umgebendem Wasser oder Puffersubstanzen über eine schwache Bindung besetzt. Weiterhin bedingt die Menge an vorhandenen Histidinresten die Stärke der Bindung an das Ni-NTA Säulenmaterial. Um diesen Effekt auszunutzen, wurde dem TWD Protein eine C-terminale Erweiterung angefügt, die aus 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten besteht. Somit wird eine ausreichend große Affinität des Proteins an das Ni-NTA-Säulenmaterial erzeugt, so daß es von Proteinen, die schwächere Bindung an das Material aufgrund von natürlichen Histidinresten aufweisen, über eine graduelle Elution getrennt werden kann. Zu diesem Zweck werden stärkere Komplexbildungsagentien, wie Imidazol oder EDTA, verwendet, die die Proteine aus dem gebildeten Komplex verdrängen. Alternativ kann auch ein pH Gradient eingesetzt werden, so daß die Histidinreste

protoniert werden und keine koordinierte Bindung mit dem Säulenmaterial mehr eingehen können.

Nach Ermittlung der Expressionsbedingungen an geringen Mengen des TWD-Proteins die Reinigung mittels IMAC im Batch-Verfahren getestet. Es wurde die im Kapitel 2.6.2. beschriebene Aufschlußmethode verwendet. Bereits diese ersten Reinigungen mit wenig Proteinmaterial zeigten im SDS-PAGE eine hohe Reinheit (Abb. 5.a).

Im Anschluß an diese ersten Tests wurde die Expression der Kulturen, deren Aufschluß und Solubilisierung nach den zuvor ermittelten, optimierten Bedingungen in größerem Maßstab durchgeführt (6 l Medium). Das solubilierte Protein wurde über IMAC aufgereinigt und mit SDS-

PAGE auf erfolgreiche Reinigung überprüft (siehe Abb. 6). Um proteolytischer Spaltung des TWD-His Proteins vorzubeugen, wurden alle Puffer während der Reinigung mit insgesamt 2 Tabletten Complete™-EDTA free, einem Protease-Inhibitor-Mix, versetzt.

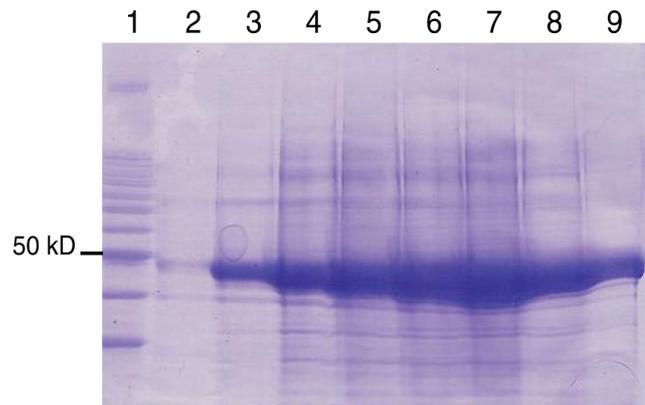


Abb. 6:

**IMAC-Reinigung des TWD-6His Proteins (SDS-PAGE).** 25 ml der solubilierten Proteinlösung aus 3 l Expressionskultur werden pro Reinigung eingesetzt. Der erste Durchlauf wird erneut auf die Säule aufgetragen, mit 50 ml Waschpuffer I (35 mM Imidazol), 4 ml Waschpuffer II (50 mM Imidazol) und 3 ml Waschpuffer III (100 mM Imidazol) gewaschen (nicht gezeigt). Elution erfolgte mit 8 ml Elutionspuffer (300 mM Imidazol). Spur 1: 10 kDa-Marker; Spuren 2-9: Elutionsfraktionen 1-8 (je 20 µl aus 1 ml)

### 3.1.3.2. Reinigung mittels Gelfiltration

Die Technik der Gelfiltration beruht auf der Trennung von Makromolekülen aufgrund ihrer Größe. Ursprünglich wurde ein auf Dextran basiertes Material verwendet. Heutzutage gibt es verschiedene Gelfiltrationsmaterialien: quervernetztes Dextran, Agarose oder Acrylamid. Diese quervernetzten Substanzen bilden Kügelchen aus, die mit Poren unterschiedlichen Durchmessers durchsetzt sind. Das Trennprinzip besteht darin, daß kleine Moleküle durch die Poren diffundieren, während große Moleküle zurückgehalten werden. Dies führt dazu, daß größere Moleküle an den Kügelchen vorbeifließen, während kleine Moleküle durch die Kügelchen fließen und dadurch aufgehalten werden. In Abhängigkeit von der mittleren Poren-

größe dieser Kügelchen können Gemische unterschiedlicher Molekülgrößen der Größe nach aufgetrennt und somit separiert werden.

Zum einen galt es das Imidazol, welches bei der Elution von der Ni-NTA-Säule in die Proteinlösung gelang, quantitativ zu entfernen und zum anderen zeigte die IMAC-Reinigung größerer Mengen an TWD-Protein, daß die gereinigten Fraktionen noch durch andere Proteine verunreinigt waren. Diese Verunreinigung konnte in den Vorversuchen nicht festgestellt werden, da die Gesamtkonzentration an Protein aus dem Zellextrakt deutlich geringer war, als in den präparativen Experimenten. Somit konnten die Verunreinigungen aufgrund der ebenfalls geringeren Konzentration in den vorangegangenen Experimenten nicht festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde im Anschluß an die IMAC-Reinigung die Fraktionen mit hohem TWD-Anteil vereinigt und konzentriert. Mit dieser konzentrierten Probe wurde nachfolgend eine G25-Säulenchromatographie durchgeführt. Die Fraktionen dieser Größenauftrennung, die TWD-Protein beinhalten, wurden mit Hilfe von SDS-PAGE untersucht (siehe Abb. 7.a).

### **3.1.3.3. Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie**

Da für Kristallisationsexperimente ein möglichst hoher Reinheitsgrad wünschenswert ist, wurde als weiterer Schritt eine Reinigung mit Hilfe einer Fractogel EMD  $\text{SO}^{3-}$  650 (S) Ionenaustauscher-Säule durchgeführt.

Die Separation von Molekülen durch Ionenaustauscher wird durch die Ladungen der gelösten Moleküle bestimmt. Es gibt zwei Arten von ionenaustauschenden Gruppen: Anionenaustauscher (z.B. Diethylaminoethyl DEAE) und Kationenaustauscher (z.B. Carboxymethyl CM). Diese ionenaustauschenden Gruppen sind an eine nicht lösliche Matrix gebunden, zumeist Sephadex, Sepharose oder Sephacel. Nach Adsorption des Proteins an den Ionenaustauscher, kann dieser selektiv durch einen steigenden Gradienten ionischer Stärke (Kompetition um die Austauschergruppen) oder durch Änderung des pH-Wertes (die reaktiven Gruppen des Proteins verlieren ihre Ladung) eluiert werden.

Für die Reinigung von Immunophilinen erwies sich das  $\text{SO}^{3-}$ -Material als geeignet (T.Kamphausen, persönliche Mitteilung). Die vereinten und konzentrierten Fraktionen der G25-Aufreinigung wurden auf die  $\text{SO}^{3-}$ -Säule aufgebracht und bei einer Salzkonzentration zwischen 350 mM und 500 mM NaCl von der Säule eluiert (siehe Abb. 7.b). Gewaschen wurde mit Tris-Puffer pH 7,5 und einer Salzkonzentration von 10 mM.

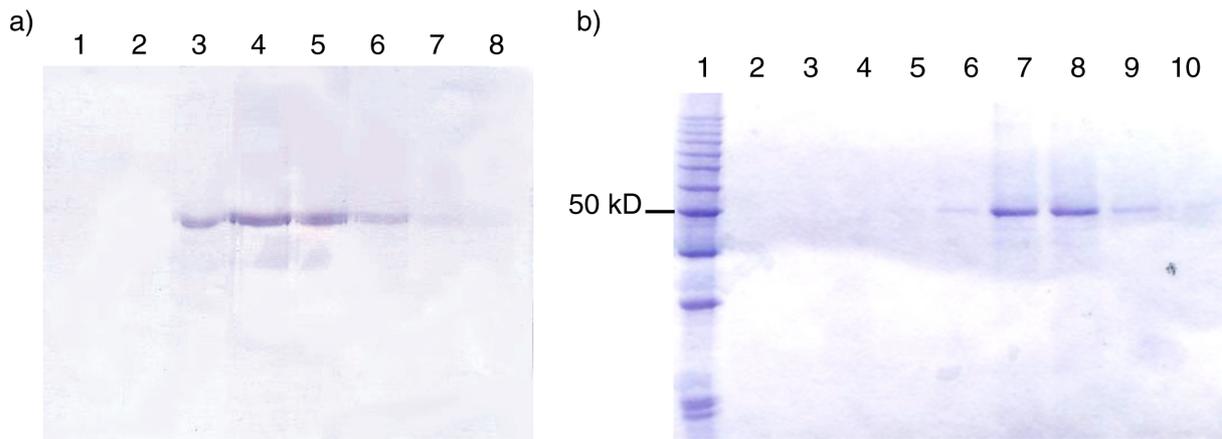


Abb. 7: **Sequentielle Reinigung von TWD-6His über Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie.**  
 a) 20 ml des konzentrierten IMAC-Eluats auf eine G-25 Säule aufgetragen, mit 50 ml Tris-Puffer (100mM Tris pH 7,5; 50mM NaCl) wird das Protein eluiert. Spur 1-8: Elutionsfraktionen 1-8 (je 20  $\mu$ l aus 1 ml) b) 20 ml des aufkonzentrierten G25-Eluats auf eine Fractogel EMD SO<sup>3-</sup> 650 (S) Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt über einen Salzgradienten zwischen 0,1 M und 1 M NaCl. Spur 1: 10 kDa Marker. Spur 2: 100 mM NaCl. Spur 3: 150 mM NaCl. Spur 4: 200 mM NaCl. Spur 5: 250 mM NaCl. Spur 6: 300 mM NaCl. Spur 7: 400 mM NaCl. Spur 8: 500 mM NaCl. Spur 9: 750 mM NaCl. Spur 10: 1 M NaCl.

### 3.1.4. Proteinkonzentration und -lagerung

TWD-His ließ sich anschließend problemlos bis 2 mg/ml konzentrieren. Sobald dieser Wert überschritten wurde, präzipitierte das Protein vollständig. Auch eine Konzentration von  $\sim$ 2 mg/ml erwies sich als sehr instabil, da sowohl eine Lagerung bei 4 °C als auch eine Lagerung bei Raumtemperatur über längere Zeit ( $>$ 1,5 Tage) ebenso zu Präzipitation des Proteins führten. Als Ursache für diese geringe Konzentrationsfähigkeit des TWD-Proteins kann mit aller Wahrscheinlichkeit der Membrananker (Aminosäure 339 bis 357) genannt werden, dessen mittlere Hydrophobizität bei -1,19 kcal/mol liegt (Die Zahlen beruhen auf den errechneten Hydrophobizitäten nach M.A.Roseman, 1988). Dieser stark hydrophobe Effekt des Membranankers kann auch nicht durch Abschirmung mit Detergenzien unterbunden werden, ohne daß die Integrität der Struktur gefährdet wird und führt somit zu dieser hohen Präzipitationsneigung. Auch ein Austausch des Detergenz OG gegen LDAO zeigte keine Besserung, obwohl zwitter-ionische Detergenzien dafür bekannt sind, Protein-Protein Interaktionen aufbrechen bzw. verhindern zu können. Da aber eine zu hohe Konzentration des Detergenz zu Denaturierung führen kann, ist der Spielraum des Einsatzes von LDAO nur begrenzt und reichte nicht aus, die Aggregation aufhalten zu können. Eine Proteinkonzentration von  $\sim$ 2 mg/ml ist nicht für Kristallisationsexperimente geeignet. Mit mindestens 5 mg/ml als Ausgangs-

konzentration (J.Labahn, persönliche Kommunikation) sollten Kristallisationsexperimente durchgeführt werden. Daher mußte mit TWD ohne Membrananker (TWD-MA) weitergearbeitet werden.

Parallel zu den Arbeiten an dem vollständigen TWD Protein arbeitete Thilo Kamphausen (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) an der Klonierung des TWD-Proteins ohne Membrananker (TWD-MA). Dieses TWD-MA ließ sich ohne Probleme bis zu 56 mg/ml konzentrieren. Da nun Konzentrationen oberhalb von 5 mg/ml möglich waren, wurde hauptsächlich mit dem gereinigten und konzentrierten TWD-MA weitergearbeitet, welches von Thilo Kamphausen zur Verfügung gestellt wurde.

### 3.2. Strukturvorhersage

Zur Abschätzung der Sekundärstrukturelemente wurde die TWD-MA Sequenz mit verschiedenen Strukturvorhersageprogrammen auf deren Strukturanteile hin untersucht.

Die Ergebnisse der verschiedenen Programmpakete geben ein recht einheitliches Bild wieder, abgesehen von dem Anfang der FKBP-Domäne, der anscheinend außer einem kurzen, nicht klar definierten  $\alpha$ -helicalen Bereich kaum strukturierte Bereiche besitzt. Der Rest der FKBP-Domäne scheint wie erwartete aus 5-6  $\beta$ -Faltblattelementen zu bestehen, in deren Mitte sich eine  $\alpha$ -Helix befindet. Die TPR-Untereinheit besteht zum Großteil aus  $\alpha$ -Helices, die lediglich durch kurze Schleifen unterbrochen sind. Die Ausgaben der unterschiedlichen Programme geben dieses wieder. Die Ergebnisse des NNpredict Programms weichen am stärksten von den restlichen Vorhersagen ab. Da es sich bei Swiss-Modell um ein 3D-Strukturvorhersageprogramm handelt, welches eine neue Struktur aufgrund von Homologien zu vorhandenen Strukturen berechnet, ist die Sequenz dieses Ergebnisses nicht ganz vollständig. Der Beginn der FKBP-Untereinheit und der Bereich der Calmodulinbindestelle waren in den verwendeten Vorlagen nicht vorhanden und konnten daher auch nicht dargestellt werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die FKBP-Untereinheit des TWD-MA die strukturellen Merkmale bekannter FKBP-Strukturen besitzt. Die TPR-Untereinheit besteht, wie es von anderen TPR-Untereinheiten bekannt ist, hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices. Der *n*-terminale Bereich des Proteins scheint laut Vorhersage kaum strukturiert zu sein; zumindest zeigen die verschiedenen Programme kein einheitliches Bild auf. Wenn man die Ergebnisse des NNpredict Programms nicht mit einbezieht, kommt man im Mittel auf folgende Strukturanteile: 41% RandomCoil, 46%  $\alpha$ -Helix und 13%  $\beta$ -Faltblatt.



### 3.3. Untersuchungen zum Faltungszustand von TWD

Um den Faltungszustand des TWD-Proteins zu überprüfen, wurden biophysikalische Experimente (CD-, FTIR- und NMR-Spektroskopie) durchgeführt. Der funktionelle Faltungszustand aufgrund von Bindungsstudien konnte in den Arbeiten von T.Kamphausen et al. (2002) und M.Geisler (Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Neuchâtel, persönliche Kommunikation) nachgewiesen werden.

#### 3.3.1. Sekundärstrukturabschätzung mittels CD-Spektroskopie

Mit Hilfe der Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist es möglich, Sekundärstrukturelemente von Proteinen in Lösung sowohl qualitativ als auch quantitativ abzuschätzen. Das Prinzip der CD-spektroskopischen Messungen besteht darin, daß optisch aktive Substanzen unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht besitzen. CD ist definiert als die Absorptionsdifferenz von links- und rechtspolarisiertem Licht.

Über einen empirischen Ansatz kann die CD-Spektroskopie Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins liefern. So dienen theoretische Spektren reiner Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta$ -Turn und RandomCoil) als Ausgangspunkt zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile im zu untersuchenden Protein. Gemessen wird im "fernen" UV-Bereich ( $\lambda < 250$  nm). Das CD-Spektrum des Proteins wird als gewichtete Überlagerung der einzelnen Sekundärstrukturkomponenten aufgefasst. Ungenauigkeiten können durch Anteile an Proteinseitenkettensignalen im Messbereich auftreten. Je geringer der Anteil an  $\alpha$ -helicalen Strukturelementen, desto größer der mögliche Fehler durch die Signale der Proteinseitenketten.

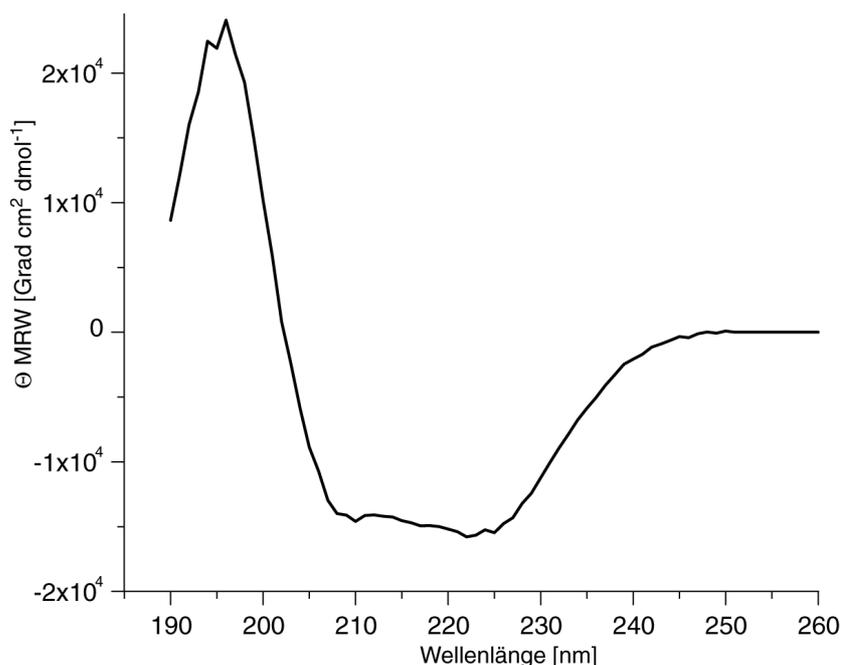


Abb. 9: **CD-Spektrum von TWD-MA.** “Fernes”-UV-Spektrum von TWD-MA aufgenommen von 190 nm bis 260 nm bei 20 °C. Das Spektrum zeigt zwei Minima bei 222 nm und 209 nm. Die Untersuchungen an TWD-MA aus *E.coli* (150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7,5) wurden in Zusammenarbeit mit T.Kamphausen am MPI für Enzymkinetik in Halle durchgeführt. Die Proteinprobe wurde über Nacht gegen 50 mM KH<sub>2</sub>Phosphat pH8,0 dialysiert, um eventuellen Messartefakten durch den organischen Puffer Hepes vorzubeugen. Es wurden “ferne”-UV-Spektren (195-250 nm) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm bei einer konstanten Temperatur von 20° C aufgenommen. Zur Auswertung wurden gemittelte Werte aus 8 Messungen verwendet.

Das CD-Spektrum des TWD-MA zeigt ein Doppelminimum bei 222 nm und 209 nm (siehe Abb. 9). Dieses Doppelminimum weist auf einen erhöhten  $\alpha$ -helikalen Anteil hin, der von der TPR-Untereinheit herrührt, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht (Blatch and Lässle 1999; Taylor et al., 2001). Anhand der gemessenen Daten wurden die Anteile der Sekundärstrukturelemente mit Hilfe des CDNN Programmes (Bohm et al., 1992) berechnet. Die errechneten Anteile an Sekundärstrukturelementen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Sekundärstrukturanteile TWD und TWD-MA**

| Sekundärstrukturelemente | TWD-MA (190-260nm) |
|--------------------------|--------------------|
| Helix                    | 41,9 %             |
| Antiparallel             | 3,6 %%             |
| Parallel                 | 7,3 %              |
| Beta-Turn                | 15,3 %             |
| Random Coil              | 29,2 %             |
| Summe                    | 97,3 %             |

CD-Spektren von TWD-MA in einem Temperaturbereich von 20-40 °C verhalten sich stabil. Oberhalb von 40 °C verändert sich das CD-Spektrum deutlich (Kamphausen et al., 2002).

### 3.3.2. Sekundärstrukturabschätzung mittels FTIR-Spektroskopie

Bei der Infrarot-Spektroskopie werden Atomkernschwingungen eines Moleküls anhand von Absorptionsbanden im Infrarotbereich untersucht. Die Frequenzen dieser Schwingungen hängen sowohl vom Bindungsabstand und der chemischen Natur der Bindung als auch von der Umgebung der Bindung ab. Die Absorption des eingestrahlteten Lichtes findet bei Resonanz der Frequenz des Lichtes und der Bindungsschwingung statt (Galla, 1988). Bei der Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen werden primär die Streckschwingungen der Amid-C=O-Bindung (Amid-I Bande) und die Beugungsschwingung der Amid-N-H-Bindung (Amid-II Bande) berücksichtigt, da diese an den Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen beteiligt sind. Die Frequenzänderung der Absorptionsbande im IR-Spektrum durch diese Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht somit eine globale Sekundärstrukturabschätzung.

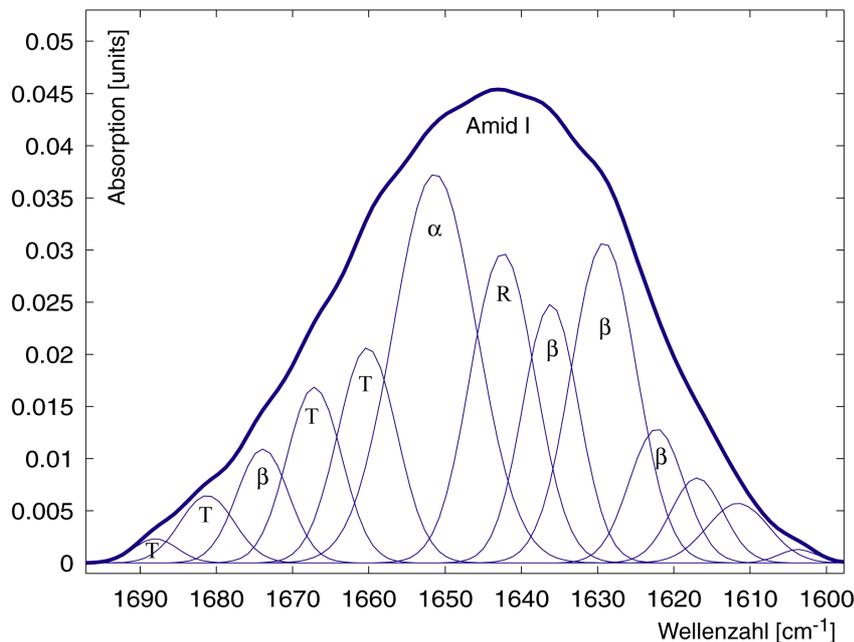


Abb. 10: FTIR-Spektrum im Bereich der Amid-I Bande und Sekundärstrukturanalyse von TWD-MA: Die Messungen wurden an TWD-MA in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7 durchgeführt. Bei der hervorgehobenen Kurve handelt es sich um die Amid I Bande. Diese Kurve entspricht der Differenz der Spektren der Proteinprobe und des Puffers; weiterhin wurde eine Basislinie von dieser Differenz abgezogen. Die Anpassung des Differenzspektrums erfolgte mit dreizehn Gaußkurven nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus.

Die Amid-I Bande ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) ist eine Überlagerung mehrerer Amid-I Peaks, welche die verschiedenen Sekundärstrukturelemente wiedergeben, in denen sich die entsprechende Amidgruppe im Protein befindet. Durch Anpassung der Absorptionsbande mit mehreren Gauß-Funktionen können diese Einzelpeaks aufgelöst werden. Aus dem Maximum der jeweiligen Gauß-Kurve und deren Integral lassen sich die einzelnen Sekundärstrukturelemente qualitativ und quantitativ abschätzen.

Um eine Überlagerung der Amid-I Bande durch Wasser zu verhindern, wurden die Proben in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer überführt.

Faßt man die korrespondierenden Bereiche aus Tabelle 10 zusammen, so erhält man folgende Strukturanteile: 24 %  $\alpha$ -Helix, 35 %  $\beta$ -Faltblatt und 41 % ungeordnet bzw. "Turns and Bends".

**Tabelle 10: Bestimmung von Sekundärstrukturelementen von TWD-MA durch FTIR**

| Gauss-Funktion | Position des Maximums | Integral | Strukturelement<br>(Wellenzahlbereich [ $\text{cm}^{-1}$ ] entnommen aus: Stuart, 1997) | Strukturanteile |
|----------------|-----------------------|----------|---|-----------------|
| 1              | 1603,75               | 0,0081   | ---   | 0,38 %          |
| 2              | 1611,59               | 0,0580   | ---   | 2,7 %           |
| 3              | 1616,98               | 0,0699   | ---   | 3,25 %          |
| 4              | 1622,26               | 0,1156   | $\beta$ -Faltblatt (1621-1627)  | 5,37 %          |
| 5              | 1629,17               | 0,3285   | $\beta$ -Faltblatt (1628-1634)  | 15,27 %         |
| 6              | 1636,15               | 0,2283   | $\beta$ -Faltblatt (1635-1640)  | 10,61 %         |
| 7              | 1642,45               | 0,3163   | Zufallsknäuel (1641-1647)   | 14,70 %         |
| 8              | 1651,35               | 0,5072   | $\alpha$ -Helix (1651-1657)   | 23,57 %         |
| 9              | 1660,19               | 0,2009   | "Turns and Bends" (1658-1666)   | 9,34 %          |
| 10             | 1667,16               | 0,1515   | "Turns and Bends" (1668-1671)   | 7,04 %          |
| 11             | 1673,91               | 0,0932   | $\beta$ -Faltblatt (1671-1679)  | 4,33 %          |
| 12             | 1681,20               | 0,0575   | "Turns and Bends" (1681-1685)   | 2,67 %          |
| 13             | 1688,00               | 0,0167   | "Turns and Bends" (1687-1690)   | 0,78 %          |

### 3.3.3. Bestimmung des Faltungszustands mittels 1D-Protonen-NMR

Die Protonen-NMR ermöglicht Aussagen über den Faltungszustand eines Proteins. Die chemische Verschiebung eines Kernspins wird bestimmt durch die lokale Umgebung des Kernes und wird unter anderem durch die molekulare Konformation des Makromoleküls und der Zusammensetzung der Probe beeinflusst. So verändern lokale Elektronenverteilungen Hybridisierungszustände von Bindungen, Nachbarschaft zu polaren Gruppen, aromatischen Ringsystemen und magnetische Anisotropien die chemische Verschiebung. Sekundärstrukturelemente haben ebenfalls Einfluß auf die chemische Verschiebung. Betrachtet man die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen des Proteinerückgrats in einem unstrukturierten Bereich des Proteins, so fallen diese in einen Bereich um 8 ppm. Im Schnitt erfahren alle Amidprotonenresonanzen, die sich in einer helicalen Konfiguration befinden, eine Verschiebung zu niedrigen ppm-Werten, während im Schnitt alle Amidprotonenresonanzen, die sich in einer  $\beta$ -Faltblatt Konfiguration befinden, eine Verschiebung zu höheren ppm-Werten erfahren. Die Hauptursache der Änderung der chemischen Verschiebungen von Amidprotonen ist auf deren Beteiligung an Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen (Wishart et al., 1991). Die chemischen Verschiebungen der Seitengruppenmethyle enthalten ebenfalls Informationen über den Faltungszustand eines Proteins. In einem unstrukturierten Bereich des Proteins fallen die chemischen Verschiebungen der Seitenketten-Methylprotonen in einen engen Bereich um 1 ppm. Befinden sich diese Methylprotonen z.B. in räumlicher Nähe zu Aromaten, so verschiebt der Ringstromeffekt deren Signale in den Bereich zwischen 0 ppm und -2 ppm. Diese Art der Verschiebung ist nur für ein Protein mit definierter Tertiärstruktur zu erwarten. Daher beobachtet man im Fall eines gefalteten Proteins eine deutliche Signaldispersion im Bereich der Amidprotonen des Proteinerückgrats sowie die Verschiebung einiger Methylprotonensignale in den Bereich zwischen 0 ppm und -2 ppm.

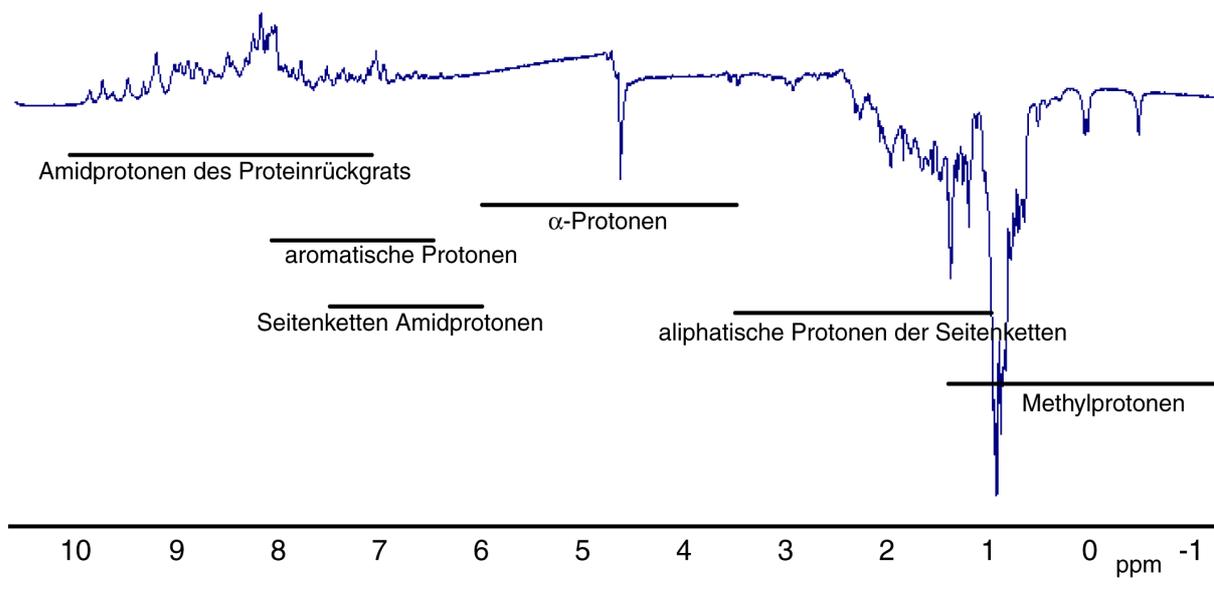


Abb. 11: **eindimensionale NMR-Spektren von nicht isotopenmarkiertem TWD12D in Lösung.** Das Spektrum wurde bei 298 K mit einem DMX 600 Spektrometer aufgenommen. Abgebildet ist das gesamte Protonenspektrum von TWD12D (20 mg/ml in 10 mM Hepes pH 7,5, 50mM NaCl). Die schwarzen Balken geben den ungefähren Bereich der angegebenen Protonensignale an.

In Zusammenarbeit mit B.König und A.Dingley aus unserem Institut wurden NMR-Protonenspektren von TWD12D aufgenommen (Abb. 12). Die Messungen erfolgten bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T, was einer Resonanzfrequenz für Protonen von 600 Mhz entspricht. Die Amidprotonensignale des Proteinerückgrats erstrecken sich über einen Bereich von 7 ppm bis 10 ppm. Weiterhin sind deutliche Methylsignale unterhalb 0 ppm zu erkennen.

Mit Hilfe der 1-1-Echo Sequenz ist es möglich, die mittlere transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ), auch Spin-Spin-Relaxation genannt, der Amid-Protonen abzuschätzen. Dazu nimmt man zwei eindimensionale Protonenspektren auf; eines unmittelbar nach Anregung und ein zweites nach einer Verzögerungszeit, während der die Protonen teilweise relaxieren können. Die Hauptursache für diese Relaxation sind Dipol-Dipol Wechselwirkungen räumlich benachbarter Spins, welche durch die Rotationsdiffusion des Proteins zeitlich moduliert werden. Die Größe und Form eines Moleküls, wie auch die Viskosität des Mediums, beeinflussen die Rotationsdiffusion von gelösten Molekülen und damit  $T_2$ .

Der abgeschätzte  $T_2$ -Wert von 14,8 ms für TWD12D läßt auf ein Gewicht der beobachteten Einheiten, unter der Annahme vorliegender Kugelsymmetrie von  $\sim 20$  kDa schließen. Bei einem Molekulargewicht des TWD12D-Proteins von 21 kDa weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die in der Lösung vorliegenden Proteinmonomere monodispers vorliegen.

### 3.3.4. Der Faltungszustand von TWD-MA

In Tabelle 11 sind die resultierenden Sekundärstrukturanteile der Vorhersagen, CD-Spektroskopie und der FTIR-Spektroskopie zusammengefasst.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der Sekundärstrukturanteile anhand der Vorhersage, Cd-Spektroskopie und der FTIR-Spektroskopie.**

|                    | Vorhersage | CD   | FTIR  |
|--------------------|------------|------|-------|
| $\alpha$ -Helix    | 46,4       | 41,9 | 23,57 |
| $\beta$ -Faltblatt | 12,9       | 10,9 | 35,58 |
| andere Elemente    | 40,6       | 44,5 | 40,85 |

Während die Daten der Vorhersage und der CD-Spektroskopie mit einem Fehler von 10 % recht gut übereinstimmen, weicht das Ergebnis der FTIR-Spektroskopie recht stark von diesen ab. Während im ersten Fall 40-45 % des Proteins  $\alpha$ -helical ist und nur etwa 10-12 % aus  $\beta$ -Faltblatt bestehen, so zeigt die FTIR ein eher entgegengesetztes Bild. Hier besteht das Protein aus mehr  $\beta$ -Faltblattbereichen als aus  $\alpha$ -helicalen.

## 3.4. Kristallisation von TWD-MA und TWD12D

### 3.4.1. Übersicht über dreidimensionale Strukturen verwandter Proteine

Die PDB (Protein-Data-Bank, Berman *et al.*, 2000) enthält 36 dreidimensionale FKBP-Strukturen (siehe Tabelle 12). Die FKBP's sind in zwei Klassen unterteilt. Dies sind die kleineren FKBP's, die aus einer FKBP-Domäne bestehen, und die größeren FKBP's, die aus 1-3 FKBP-Domänen plus weiteren Domänen, wie TPR-Motiven, WW-Domänen, CaM-Bindestellen oder Membrananker, zusammengesetzt sind. Von den großen FKBP's wurde bisher die dreidimensionale Struktur des Mip-Proteins gelöst und die erste FKBP-Domäne des humanen FKBP59. Alle weiteren Strukturen sind von kleinen FKBP's. Von diesen 36 Strukturen wurden 30 mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und 6 mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst. Die zweite große Domäne des TWD-Proteins ist die TPR-Domäne (Tetratricopeptide-Repeat). In Tabelle 13 sind die dreidimensionalen Strukturen der TPR-Proteine aufgelistet. Im Fall der TPR's wurden alle Strukturen über Röntgenstrukturanalyse gelöst. Bisher wurde keine Struktur eines FKBP oder TPR-Proteins aus pflanzlichen Organismen gelöst.

**Tabelle 12: dreidimensionale Strukturen unterschiedlicher FKBP's aus der PDB**

| Name   | Organismus                     | Anzahl der Strukturen |
|--------|--------------------------------|-----------------------|
| FKBP12 | <i>Homo sapiens</i>            | 28                    |
| FKBP12 | <i>Bos taurus</i>              | 3                     |
| FKBP12 | <i>Saccharomyces cerevisia</i> | 1                     |
| FKBP25 | <i>Homo sapiens</i>            | 1                     |
| FKBP59 | <i>Oryctolagus cuniculus</i>   | 2                     |
| Mip    | <i>Legionella pneumophila</i>  | 1                     |

**Tabelle 13: dreidimensionale Strukturen unterschiedlicher TPR-Proteine aus der PDB**

| Name                  | Organismus          | Anzahl enthaltener TPR-Motive | Referenz                       |
|-----------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Protein-Phosphatase-5 | <i>homo sapiens</i> | 3                             | Das <i>et al.</i> , 1998       |
| Pex5                  | <i>homo sapiens</i> | 7                             | Gatto <i>et al.</i> , 2000     |
| Hop-TPR1              | <i>homo sapiens</i> | 3                             | Scheufler <i>et al.</i> , 2000 |
| Hop-TPR2A             | <i>homo sapiens</i> | 3                             | Scheufler <i>et al.</i> , 2000 |
| Cyclophilin40         | <i>bos taurus</i>   | 3                             | Taylor <i>et al.</i> , 2001    |

### 3.4.2. Kristallisation von TWD12D mit Polyethylenglykol und Ammoniumsulfat

Die ersten Kristallisationsversuche wurden in Anlehnung an Bedingungen durchgeführt, die bereits bei der Kristallisation anderer FKBP's oder TPR-Proteine verwendet wurden (siehe Tabelle 14). Für die ersten Reihenversuche wurde TWD12D in einer Konzentration von 40 mg/ml eingesetzt. Ausgehend von den Bedingungen in Tabelle 14 wurden Lösungsreihen erstellt, die sich entsprechend Tabelle 15 zusammensetzten. Zusätzlich zu den erwähnten PEG 4000 und PEG 8000 wurden auch PEG 2000 und PEG 400 verwendet.

**Tabelle 14: Kristallisationsbedingungen verschiedener FKBP und TPR Proteine**

| FKBP                                      | Pufferbedingungen im Reservoir  | Referenz   |
|---|---|--|
| FKBP12 - Rapamycin - FRB Komplex          | 15-20 % PEG 8000, 5-10 % MPD, 100 mM Tris-HCl pH 8,5                        | Liang <i>et al.</i> , 1999;<br>Choi <i>et al.</i> , 1996 |
| FKBP12.6 - Rapamycin Komplex              | 40 % PEG 4000, 200 mM Lithiumsulfat, 100 mM Hepes pH 7,4                    | Deivanayagam <i>et al.</i> , 2000                        |
| “small ligand” - FKBP Komplex             | 560 µl Ammoniumsulfat, 50 µl DMSO, 100 µl 1M Tris-HCl pH 8,0, 290 µl Wasser | Burkhard <i>et al.</i> , 2000                            |
| TPR-Domäne der Proteinphosphatase 5       | 1,8 M Ammoniumsulfat, 4 % MPD, 2 mM DTT, 100 mM Hepes pH 7,5                | Das <i>et al.</i> , 1998                                 |
| durch Liganden hervorgerufene FKBP-Dimere | 1,2 M Ammoniumsulfat, 20 mM DTT 0,1 MNatriumphosphat pH 6,0                 | Clackson <i>et al.</i> , 1998                            |

**Tabelle 15: Zusammensetzung der ersten Reihenversuche**

| Nr. | Konzentration | Präzipitationsmittel | pH-Bereich | Puffer                     |
|-----|---------------|----------------------|------------|----------------------------|
| 1   | 0,8 M - 3,2 M | Ammoniumsulfat       | 4-9        | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 2   | 5 % - 50 %    | PEG 400              | 4-9        | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 3   | 5 % - 25 %    | PEG 2000             | 7 - 8      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 4   | 5 % - 20 %    | PEG 4000             | 7 - 8      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 5   | 5 % - 20 %    | PEG 8000             | 7 - 8      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |

Nach 1 h, 24 h, 2 Wochen und 1 Jahr wurden die Ansätze mikroskopiert. Eine hohe Konzentration an PEG (>15 %), unabhängig von der PEG-Länge, führte zur Präzipitation des Proteins. Bei höheren Konzentration von Ammoniumsulfat (> 1,5 M) und pH > 6 schied sich entweder nach 24 h eine flüssige Proteinphase ab (entsprechend Abb. 12.a) oder es entstanden innerhalb von 2 Wochen Mikrokristalle (entsprechend Abb. 12.f).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein zweiter Reihenversuch angesetzt. Die Bedingungen sind in Tabelle 16 aufgelistet. Den Ammoniumsulfat- und PEG 8000 Ansätzen wurden 0-500 mM NaCl zugegeben. Die Versuche mit PEG blieben entweder klar oder das Protein präzipitierte. PEG ist somit zur Kristallisation von TWD12D nicht geeignet.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der zweiten Reihenversuche**

| Nr. | Konzentration | Präzipitationsmittel | pH-Bereich | Puffer                     |
|-----|---------------|----------------------|------------|----------------------------|
| 1   | 2 M - 3 M     | Ammoniumsulfat       | 6 - 9      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 2   | 5 % - 15 %    | PEG 400              | 6 - 9      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 3   | 5 % - 10 %    | PEG 2000             | 6 - 9      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 4   | 5 % -10 %     | PEG 4000             | 6 - 9      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 5   | 5 % -10 %     | PEG 8000             | 6 - 9      | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |
| 6   | 30 % - 60 %   | MPD                  | 7-9        | 100 mM Hepes oder Tris-HCl |

Die Hälfte der Ansätze mit Ammoniumsulfat bildeten nach 2 Tagen flüssige Proteinphasen aus (entsprechend Abb. 12.a). Innerhalb des Beobachtungszeitraums bildeten sich aus den flüssigen Proteinphasen verwachsene Kristalle (Abb. 12.c), Kristallbüschel (Abb. 12.g), Kristalle mit stufenartigen Aufwachsungen (Abb. 12.h), der Tropfen kristallisierte aus (Abb. 12.e) oder es bildeten sich kleine Kristallnadeln an der Oberfläche der Tropfen (Abb. 12.d). Bei einem pH-Wert von 6,5 konnte die Bildung von Mikrokristallen anstelle der Phasentrennung beobachtet werden (Abb. 12.f). In einem Ansatz mit 60% MPD (Abb. 12.i) bildeten sich zwei miteinander verwachsene Kristallplättchen, die sich nicht reproduzieren liessen. Die Umwandlung der Proteinphasetropfen in Kristalle fand in der Zeit zwischen 2 Wochen nach dem Ansetzen des Experimentes und 1 Jahr statt. Dies macht die Feststellung von Tendenzen der Kristallbildung, bezogen auf die Pufferzusammensetzung und den pH-Wert, schwierig.

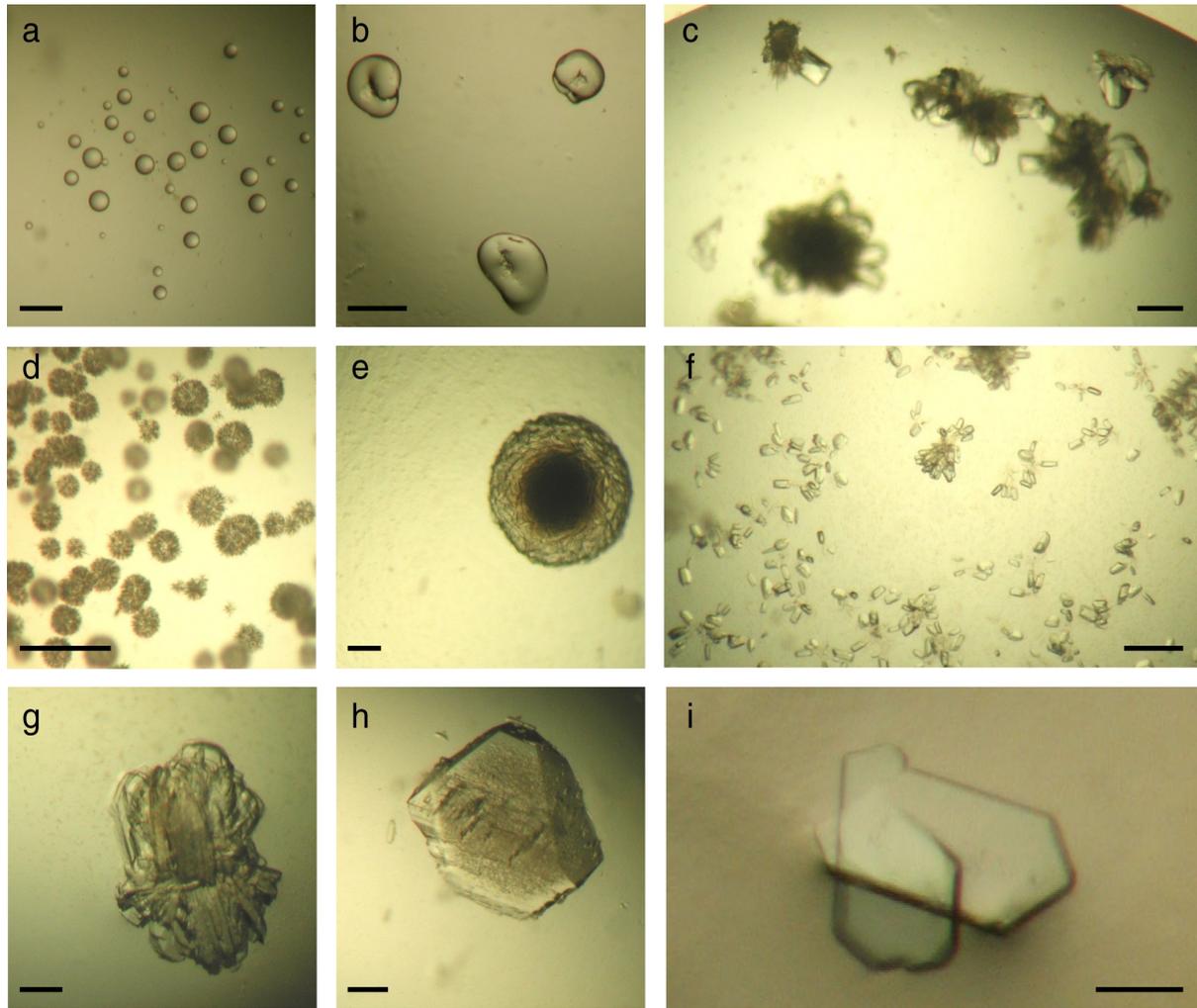


Abb. 12: **Kristalline Proteinstrukturen von TWD12D.** jeder Ansatz wurde jeweils mit 2  $\mu$ l Reserviörlösung und 2  $\mu$ l Proteinlösung (20 mg/ml, 100mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl) angesetzt. Die Länge der schwarzen Balken entspricht in allen Bildern 100  $\mu$ m, außer in d) 50  $\mu$ m. Es wird jeweils die Zusammensetzung der Reserviörlösung angegeben a) flüssige Proteinphase in 2,0 M Ammoniumsulfat, 10 mM Hepes pH 7,0. b) gelartige Proteinphase in 2,5 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl. c) Kristalle aus festem Prizipitat in 2,5 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl. d) Nadeln aus Proteintropfen in 1,5 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 7, 100 mM NaCl. e) heterogen auskristallisierter Proteintropfen 2 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 6,5, 50 mM NaCl. f) Mikrokristalle in 2,5 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 6,5, 100 mM NaCl. g) Kristallbündel aus Proteintropfen in 1,9 M Ammoniumsulfat, 10 mM Hepes pH 7. h) Kristall mit stufenartigen Aufwachsungen und Rissen in 2 M Ammoniumsulfat, 100 mM Hepes pH 8, 500 mM NaCl. i) zwei ineinander verwachsene Kristallplatten in 60 % MPD, 10 mM Tris pH 7,5.

### 3.4.3. “Sparse Matrix Screen”

Gleichzeitig zu den zuvor in Kapitel 3.4.2. beschriebenen Experimenten wurde ein “Sparse Matrix Screen” mit den Puffer-Sets “CrystalScreen I” (Kapitel 7.1.1.) und “CrystalScreen II” (Kapitel 7.1.2.) durchgeführt. Nach 1 h, 24 h, 1 Woche, 4 Monaten und 1 Jahr wurden die

Ansätze mikroskopiert. Beide “Crystal Screens” wurden mit TWD-MA in drei unterschiedlichen Konzentrationen (10 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Innerhalb der ersten 3 Monate nach Ansatz der Experimente konnte keine Ausbildung von Kristallen beobachtet werden.

Im Fall der Experimente mit TWD12D konnten im Beobachtungszeitraum von 3 Monaten keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Kristallisationseigenschaften gewonnen werden. Es bestätigten sich in einigen Fällen die Beobachtungen aus Kapitel 3.4.2.

**Tabelle 17: Kristallisation von TWD-MA mit “Crystal Screen I & II”.**

(Die Beobachtungen geben grobe Tendenzen an und stellen keine absoluten Regelmäßigkeiten dar.)

| Eigenschaft                  | Beobachtung   |
|------------------------------|---|
| ~2 M Ammoniumsulfat & pH < 7 | das Proteins präzipitiert   |
| ~2 M Ammoniumsulfat & pH > 7 | Ausbildung einer flüssigen Proteinphase                                 |
| PEG mit MW > 3000            | das Protein präzipitiert in den meisten Fällen                          |
| PEG mit MW < 4000            | das Protein präzipitiert oder es bildet sich eine flüssige Proteinphase |
| K-/Na-Tartrat oder Na-Acetat | der Ansatz bleibt klar  |
| allgemein pH ≤ 7             | das Protein präzipitiert in den meisten Fällen                          |
| allgemein pH > 7             | keine einheitlichen Beobachtungen                                       |

#### 3.4.4. TWD-MA kristallisiert in 4 M Na-Formiat

Nach 3 Monaten entstanden in einem Ansatz mit TWD-MA (40 mg/ml) und 4 M Na-Formiat einige Kristalle. Folgeexperimente unter gleichen und variierten Bedingungen ergaben zunächst keine weiteren Kristalle. Die Kristalle aus dem oben genannten Ansatz wurden für Röntgendiffraktionsaufnahmen verwendet (siehe folgendes Kapitel 3.5.).

### 3.5. Röntgendiffraktionsexperimente

#### 3.5.1. Röntgenaufnahmen bei 100 K

Die Kryoröntgenkristallographie bietet den Vorteil, daß Strahlenschäden im Kristall reduziert werden, da Beschädigungen des Kristallgitters durch Radikale und Erwärmungseffekte (u.a. Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen) minimiert werden (Blundell & Johnson, 1993). Durch Inkubation der Kristalle in Kryoprotektaten wird die Ausbildung von Eiskristallen verhindert. Im Fall von TWD wurden die Kristalle in dem mit 5% Ethylenglykol

versetzen 4 M Formiat-Ausgangspuffer für 5 min inkubiert und anschließend in einem Kryoloop auf eine Temperatur von 100 K abgekühlt.

Es wurden vier Kristalle aus dem Ansatz gefischt, die nach mikroskopischer Beurteilung zur Röntgenbeugung geeignet schienen. Diese Vorauswahl ist stark von der Vergrößerung des Mikroskops (140x) abhängig. Bei dieser Vergrößerung können sehr kleine Fehler im Kristall nur schwer erkannt werden. Von einem Kristall wurde an dem Röntgendrehanodengenerator FR591 (Bruker-Nonius) eine Beugungsaufnahme gemacht. Die Auflösung betrug etwa  $\sim 4 \text{ \AA}$ .

### 3.5.2. Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronstrahlung

Es konnte ein Datensatz mittels Synchrotronstrahlung am ESRF in Grenoble aufgenommen werden. Von den vier ausgewählten Kristallen erwiesen sich drei als ungeeignet, da sie Verwachsungen aufwiesen. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

**Tabelle 18: kristallographische Daten** (ESRF, ID14-1 (Grenoble),  $\lambda = 0,934 \text{ \AA}$ )

|   | nativer Datensatz (TWD-MA Kristall) |
|---|-------------------------------------|
| Raumgruppe                              | C222 <sub>1</sub>                   |
| Gitterkonstanten [ $\text{\AA}$ ]       | a=69,03; b=122,85; c=87,3           |
| Auflösung                               | 3,3 $\text{\AA}$                    |
| gemessene Reflexe (unabhängige Reflexe) | 19886 ( 5705 )                      |
| Vollständigkeit der Daten               | 98,3 %                              |
| $R_{\text{merge}}^a$                    | 11,5 %                              |

a.  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$  mit  $\langle I(h) \rangle$  als Mittelwert aller Messungen von  $I(h)$

### 3.5.3. Das Problem der Phasenbestimmung

Kennt man die Amplituden, wie auch die zugehörigen Phasenwinkel, so läßt sich die Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle und somit die dreidimensionale Struktur des Moleküls berechnen. Aufgrund des Diffraktionsmusters kann man die Intensitäten und somit die Amplituden bestimmen. Die Information über die Phase ist darin nicht enthalten. Die Bestimmung der Phasen ist die grundlegende Problematik der Röntgenkristallographie.

Eine Möglichkeit, die Phaseninformation zu ermitteln, besteht darin, daß man sich der Methode des isomorphen Ersatzes bedient. Die Phasen werden in erster Näherung aus den

Schweratompositionen, die durch Differenz-Patterson oder Differenz-Direktmethoden bestimmt werden, berechnet.

Für diese Methode werden Schweratomderivate benötigt, die entweder durch Inkubation eines Kristalls in einer Lösung mit Schweratomen oder durch Kristallisation in einem Puffer, der Schweratome enthält, hergestellt werden.

Eine zweite Methode zur Phasenbestimmung ist der molekulare Ersatz. Bei dieser Methode versucht man, unter der Voraussetzung, daß eine existierende, bekannte Struktur möglichst ähnlich der erwarteten neuen Struktur ist, Strukturinformationen bereits bekannter Proteine zur Phasenbestimmung des neuen Proteins zu verwenden. Je ähnlicher sich die Strukturen des bekannten und des unbekanntes Proteins sind, desto einfacher ist die Phasenbestimmung mittels molekularen Ersatzes.

Da zu diesem Zeitpunkt ein nativer Datensatz und keine weiteren Kristalle zur Verfügung standen, wurde die Methode des molekularen Ersatzes zur Lösung des Phasenproblems gewählt.

Das TWD-MA Protein besteht aus zwei gleich großen Domänen, die CaM-Bindestelle nicht miteinbezogen (siehe Kapitel 1.2.2.). Da es bisher keine Struktur eines zu TWD homologen Proteins gibt, welches beide Domärentypen beinhaltet, mußten unabhängige Strukturen von FKBP- und TPR-Domänen ausgewählt werden. Die zur FKBP-Domäne des TWD Proteins homologe Domäne des humanen FKBP12 wurde als FKBP-Startmodell einbezogen. Für die TPR-Domäne konnte kein geeignetes Modell gefunden werden. Mit dem Startmodell der FKBP-Domäne allein war das Phasenproblem nicht eindeutig lösbar (J.Labahn, persönliche Mitteilung).

Somit ergaben sich folgende Konsequenzen:

Da mit Hilfe des molekularen Ersatzes das Phasenproblem nicht lösbar war, muß mit dem isomorphen Ersatzes gearbeitet werden. Zur Generierung neuer Kristalle wurden daher weitere Ansätze mit 4 M Na-Formiat (im Fall des TWD-MA) und Ammoniumsulfat mit NaCl (im Fall des TWD12D) zusammengestellt. (siehe Kapitel 3.7.).

Für den Fall, daß eine weitere Kristallisation des Proteins nicht erfolgreich verläuft, wurde die zweite Technik, die atomare Strukturen von Makromolekülen ermöglicht, in Betracht gezogen: die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie). Erste NMR-Spektroskopie-Experimente wurden mit dem TWD12D-Protein durchgeführt (siehe folgendes Kapitel 3.6.).

### 3.6. Kernresonanzspektroskopie

Die Strukturbestimmung mittels Kernresonanzspektroskopie beruht auf der Übertragung von Magnetisierung zwischen Atomkernen. Die Messung der Kernmagnetisierung ist nur möglich, wenn die Anzahl der Protonen und der Neutronen nicht zugleich gerade sind. In diesem Fall besitzt ein Kern einen Spin von Null, welcher nicht gemessen werden kann. Für die NMR-Spektroskopie an biologischen Makromolekülen sind in der Hauptsache Kerne von Wasserstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffatomen von Interesse. Da aber  $^{12}\text{C}$  nicht meßbar,  $^{14}\text{N}$  für strukturbiochemische NMR-Experimente nicht geeignet und die NMR-Experimente bei natürlichen Isotopenhäufigkeiten von  $^{13}\text{C}$  (1.11%) und  $^{15}\text{N}$  (0.36%) nicht empfindlich genug sind, muß man mit isotope-markierten Proben arbeiten. Somit ist es eine Grundvoraussetzung, daß  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein für die Messungen zur Verfügung steht. Weitere Voraussetzung ist eine Proteinkonzentration von möglichst mehr als 1 mM. Das Protein darf nicht aggregieren. Das Molekulargewicht des Proteins spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle, da es eine technische Obergrenze für die Strukturlösung mittels Kernresonanzspektroskopie gibt. Eine weitere Rolle spielt die Stabilität, sowohl bezogen auf die Temperatur als auch bezogen auf die Pufferzusammensetzung.

Mit einer geeigneten Probe stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, Strukturinformationen zu erhalten. Bei bis zu 100 Aminosäuren ist es möglich, mit 2D-Experimenten Strukturen zu erhalten, die einer kristallographischen Auflösung von 2 bis 2,5 Å entsprechen. Ist das Protein größer, so reicht die Auflösung der Spektren nicht mehr aus. Mit der Größe des Proteins vergrößert sich auch die Linienbreite der Signale und führt zu einer Verschlechterung der Auflösung und Sensitivität. Als Ausweg bieten sich 3D/4D-Experimenten an. Mit Hilfe dieser Experimente läßt sich die Auflösung der Signale deutlich steigern, und man kann Strukturen von Proteinen bis 200 Aminosäuren ermitteln. Die Sensitivität wird durch die Anzahl der akkumulierten Experimente, die Effizienz des Kohärenztransfers und das Relaxationsverhalten bestimmt. Unter Zuhilfenahme von 4D-Experimenten ist es schließlich möglich, Strukturen von Proteinen bis zu 60 kDa zu erhalten. Bei der Strukturbestimmung von Proteinen dieser Größe stößt man an die derzeitige Grenze dieser Technik.

### 3.6.1. Herstellung der markierten TWD12D-Probe

Grundlage zur Durchführung von 3D-heteronuklearen Experimenten ist eine Proteinprobe, die eine Konzentration von mindestens 1 mM besitzt und sowohl mit  $^{13}\text{C}$  als auch  $^{15}\text{N}$  uniform markiert ist. Die Herstellung der isotope-markierten TWD12D Probe wurde in Zusammenarbeit mit T.Kamphausen an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle/Saale durchgeführt. Die Expression und Reinigung des Proteins wurde, wie in Kamphausen *et al.* (2002) beschrieben, durchgeführt. Zur  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  -Isotopenmarkierung wurde das Expressionsmedium “E.coli OD1CN” (Silantes, München) verwendet. Expressionstests mit dem isotope-markierten Medium zeigten eine ausreichende Expression des TWD12D Proteins (Abb. 13a, Spur 1). Nach erfolgreicher Expression in 6 l Medium wurde das Protein sequentiell über EMD-DEAE-650(M) (Abb. 13.b), Fractogel TSK-AF-Blue und Hiload Superdex 75 HR 16/60 (Abb. 13.c) gereinigt. Die Fraktionen der Gelfiltration, die die größte Reinheit zeigten (Abb. 13.c. Spur 2-4), wurden vereinigt. Das gereinigte Protein wurde auf 1,4 mM konzentriert und es wurde 5 %  $\text{D}_2\text{O}$  zugegeben. Diese isotope-markierte, gereinigte und konzentrierte Probe der 12 kDa grossen FKBP-Domäne des TWD-Proteins wurde TWD12D(CN) genannt.

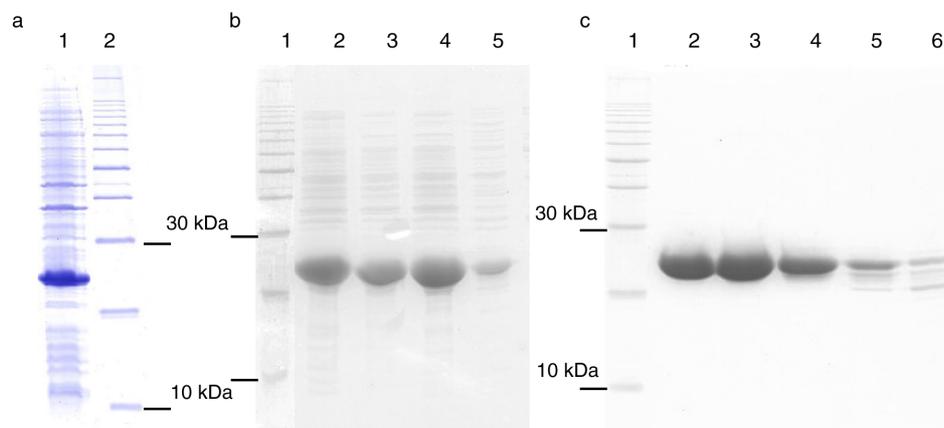


Abb. 13: **Expression mit isotope-markiertem Medium in *E.coli* und sequentielle Reinigung von TWD12D (CN)**: Durchführung der Experimente entsprechend Kamphausen *et al.*, 2002.

a) Spur 1: Expressionstest in Silantes Medium OD1CN; Spur 2: 10 kDa-Marker

b) Eluate der Reinigung über EMD-DEAE-650 (M). Spur 1: 10 kDa-Marker; Spur 2: Eluat 5; Spur 3: Eluat 6; Spur 4: Eluat 7; Spur 5: Eluat 8

c) Eluate der Reinigung über Hiload Superdex 75 HR 16/60. Spur 1: Eluat 39; Spur 2: Eluat 41; Spur 3: Eluat 43; Spur 4: Eluat 45; Spur 5: Eluat 47; Spur 6: 10 kDa-Marker.

### 3.6.2. Eindimensionales Protonenspektrum von TWD12D (CN)

Analog zu dem Experiment in 3.3.2. wurde ein eindimensionales Protonenspektrum aufgenommen. Das erhaltene Spektrum (siehe Abb. 14) entspricht im Wesentlichen dem des bereits zuvor aufgenommenen nicht isotopenmarkierten TWD12D-Proteins. Im Bereich der Proteinrückgrat-Amidprotonen sieht man eine hohe Dispersion der Signale, und die Signale einiger Methylprotonen wurden zu niedrigeren ppm-Werten (Hochfeld), deutlich unter 0,8 ppm, verschoben. Insgesamt ist das Signal-Rausch-Verhältnis höher, was auf die höhere Konzentration zurückzuführen ist. Anhand des gemessenen Spektrums kann davon ausgegangen werden, daß sich das vorliegende TWD12D (CN) in einem gefalteten Zustand befindet.

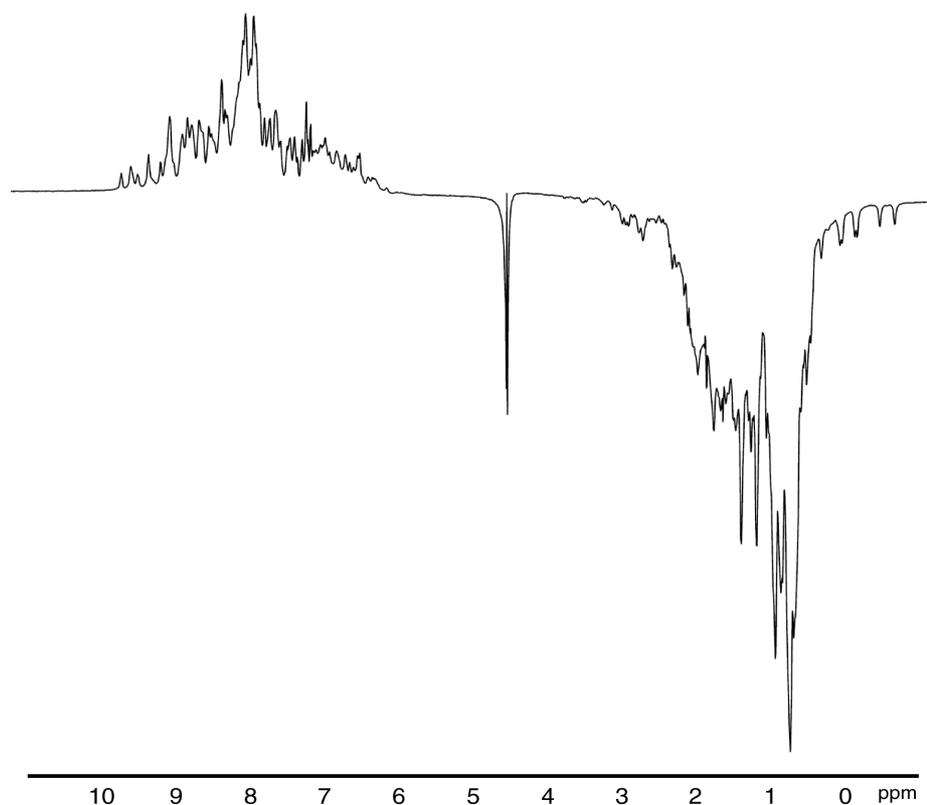


Abb. 14. Eindimensionales NMR-Spektrum von  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem TWD12D (CN) in Lösung. Das Spektrum wurde bei 298 K mit einem DMX 600 Spektrometer aufgenommen. Abgebildet ist das gesamte Spektrum von TWD12D (CN).

### 3.6.3. Resonanzzuordnung

Der erste Schritt auf dem Weg zur Strukturbestimmung mittels Kernresonanzspektroskopie ist die Aufnahme verschiedener Spektren zur Zuordnung der gemessenen Resonanzen zu den

spezifischen Kernen des Proteins (sequenzspezifische Resonanzzuordnung). Die Grundlage dieser Resonanzzuordnung ist ein zweidimensionales ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC-Experiment (Bodenhausen and Ruben, 1980; Kay *et al.*, 1990). Bei diesem Experiment werden die  $^1\text{HN}$  und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen miteinander korreliert. Jede Amidgruppe der Polypeptidkette erzeugt ein Signal im Spektrum. Zusätzlich kann man Signale der Seitenkettenamide (Abb. 15, grüne Markierungen), die im Laufe der Auswertung von den Amidgruppen des Rückgrades unterschieden werden können, beobachten. Es folgen dreidimensionale Experimente, bei denen die beiden Amidresonanzen ( $^1\text{HN}$  und  $^{15}\text{N}$ ) mit weiteren Resonanzen durch skalare Kopplung korreliert werden: HNC(O), HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH, C(CO)NH, H(CCO)NH und HBHA(CBCACO)NH.

Aus diesen Spektren werden Datenstrukturen (Spinsysteme) generiert. Diese Spinsysteme werden charakterisiert durch die  $^1\text{HN}(i)$ - und  $^{15}\text{N}(i)$ -Resonanzen als Basisfrequenzen und erhalten die Verschiebungen der CO, aliphatischen C, aliphatischen H(i-1) und  $\text{C}\alpha, \text{C}\beta, \text{H}\alpha(i)$  Spins als weitere Einträge. Aufbauend auf diesen Daten können die Resonanzen der HCCH-TOCSY Experimente in die Zuordnung einbezogen werden. Mit diesen Informationen können im Anschluß sequentiell benachbarte Spinsysteme einander zugeordnet werden. Somit erhält man im günstigsten Fall eine vollständige Zuordnung der gemessenen Resonanzen zu den spezifischen Kernen des Proteins. Mit Hilfe dieser Zuordnung ist es im Anschluß möglich, Rauminformationen (aus z.B.  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{15}\text{N}$ -editierten NOE-Experimenten) auszuwerten, die zu einer dreidimensionalen Struktur führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei- und dreidimensionale Experimente (Kapitel 3.6.3.1. & 3.6.3.2.) durchgeführt, die für die Resonanzzuordnung notwendig sind und solche, die Rauminformationen liefern. Die gemessenen Signale wurden Spinsystemen zugeordnet (Kapitel 3.6.3.2.) und die sequentielle Zuordnung der Spinsysteme (Kapitel 3.6.3.3.) wurde begonnen.

### 3.6.3.1. 2D-HSQC Experiment

In Abb. 15 ist ein ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC-Spektrum von TWD12D(CN) abgebildet. Das Spektrum zeigt eine ausreichende spektrale Dispersion, um die gemessenen Resonanzen mit Hilfe von 3D-NMR-Experimenten zuordnen zu können. Allerdings zeigt der Bereich um 8 ppm der Protonendimension einige überlappende Signale (in Abb. 15 gelb hervorgehoben). Amidsignale in diesem Bereich befinden sich mit großer Wahrscheinlichkeit in einem unstrukturierten Bereich des Proteins, wie z.B. Schleifen oder frei beweglichen C- oder N-terminalen Enden. Analog zum eindimensionalen Protonenspektrum gilt auch hier die Aussage, daß die Dispersion der Signale mit höherer struktureller Ordnung des Proteins zunimmt.

Ausgehend von der Aminosäuresequenz von TWD12D sind für TWD12D(CN) 196 Korrelationssignale im ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC Spektrum zu erwarten. Diese setzen sich aus 181 Aminosäureresten von TWD12D plus zwölfmal je zwei Resonanzen für die Seitenkettenamidgruppen der Asparagin- und Glutamin-Aminosäurereste und abzüglich des aminoterminalen Aminosäurerestes und der 8 Prolinreste zusammen.

Im ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC Spektrum wurden 192 Signale beobachtet (Abb. 15). Von diesen zeigten einige Korrelationssignale eine deutliche Aufspaltung der Resonanzen (siehe Abb. 17.b), die nicht mehrfach gezählt wurden. Aufgespaltene Resonanzen, wie auch fehlende Signale sind Anzeichen für Austauschphänomene zwischen verschiedenen Konformationen des Proteins.

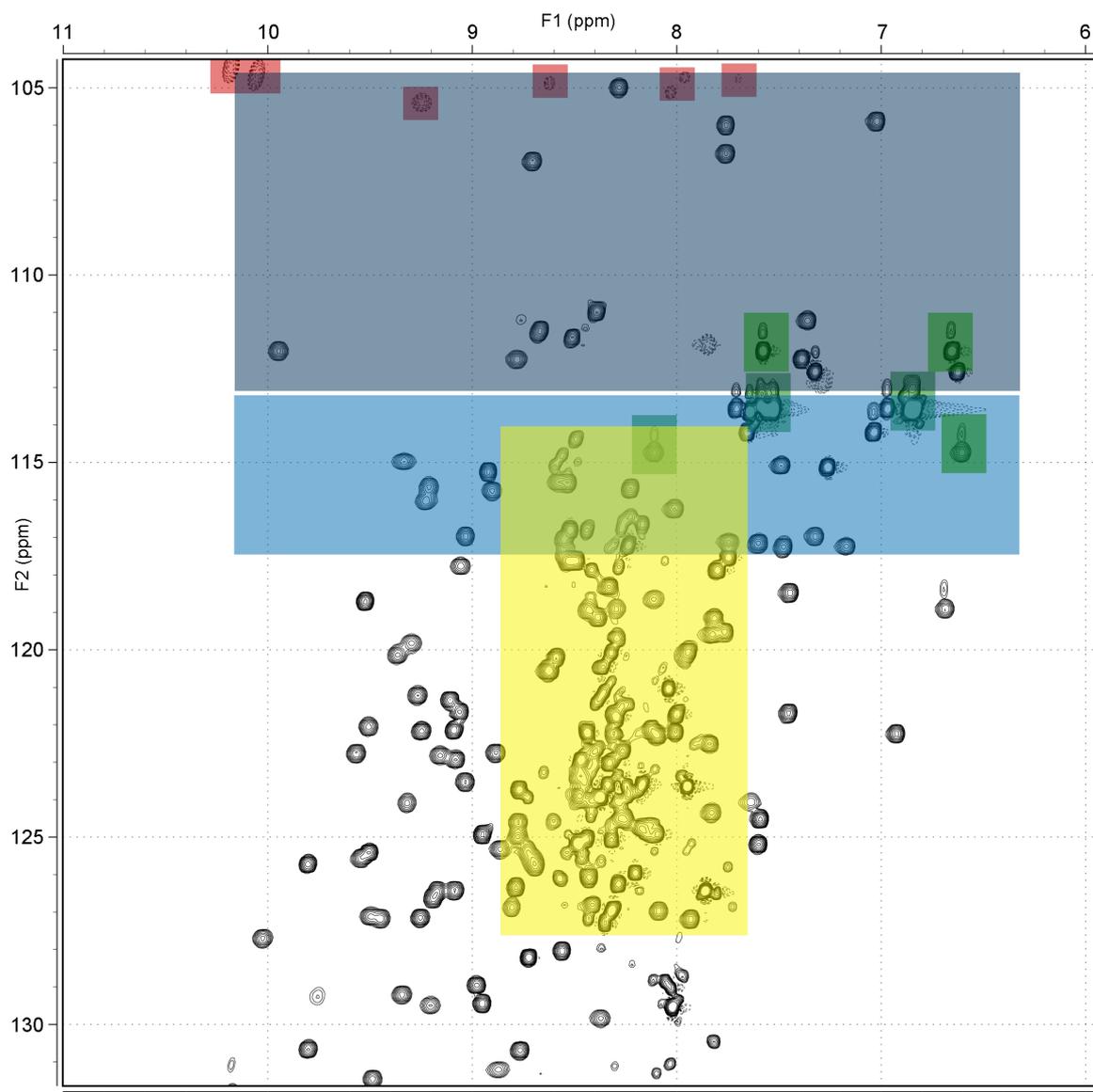


Abb. 15: **2D-HSQC-Konturplot der TWD12D-Probe.** Die F2-Achse gibt die chemische Verschiebungen der Amidstickstoffresonanzen in ppm an. Die F1-Achse gibt die chemische Verschiebung der Amidprotonen in ppm an. Die rot hervorgehobenen Bereiche markieren gefaltete Signale, die grünen Bereiche markieren exemplarisch einige Seitenkettenamide, die graublau Fläche markiert den Bereich in dem die meisten Glycinsignale zu finden sind und die blaue Fläche markiert den Bereich in dem die meisten Serin- und Threoninsignale zu finden sind. Die gelbe Fläche beinhaltet zum großen Teil die Signale von Amidn in unstrukturierten Bereichen des Proteins.

Zwei ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC Spektren, die in einem Abstand von zwei Wochen durchgeführt wurden, zeigten, daß die Probe nicht stabil war. Die Anzahl der gemessenen Signale ging nach zwei Wochen deutlich zurück. Hauptsächlich im Bereich um 8 ppm in der Protonendimension konnten deutlich weniger Signale gemessen werden. Insgesamt fehlten 46 Signale. Um festzustellen, ob es sich um einen möglichen Abbau des Proteins handelt, wurde die

TWD12D(CN)-Probe mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Die Messung wurde von S. Schaffer (IBT-1, FZ-Jülich) durchgeführt. Die Masseverteilung der degenerierten TWD12D(CN)-Probe zeigt mehrere deutliche Signale bei den Massen 15.584 Da, 16.255 Da, 16.322 Da, 16.475 Da, 16.708 Da, 16.849 Da und 17.047 Da (Abb. 16). Dies deutet auf einen unspezifischen Abbau der ursprünglich 20.050 Da TWD12D(CN) Probe hin. Da außerdem eine Trübung der Probe auf eine Verunreinigung durch Mikroorganismen schließen ließ, wurde weiteren Proben 0,02 % Na-Azid zugegeben, welches das Wachstum von Mikroorganismen unterbinden sollte. In regelmäßig aufgenommenen ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ )-HSQC Spektren wurden nachfolgend keine Unterschiede mehr festgestellt.

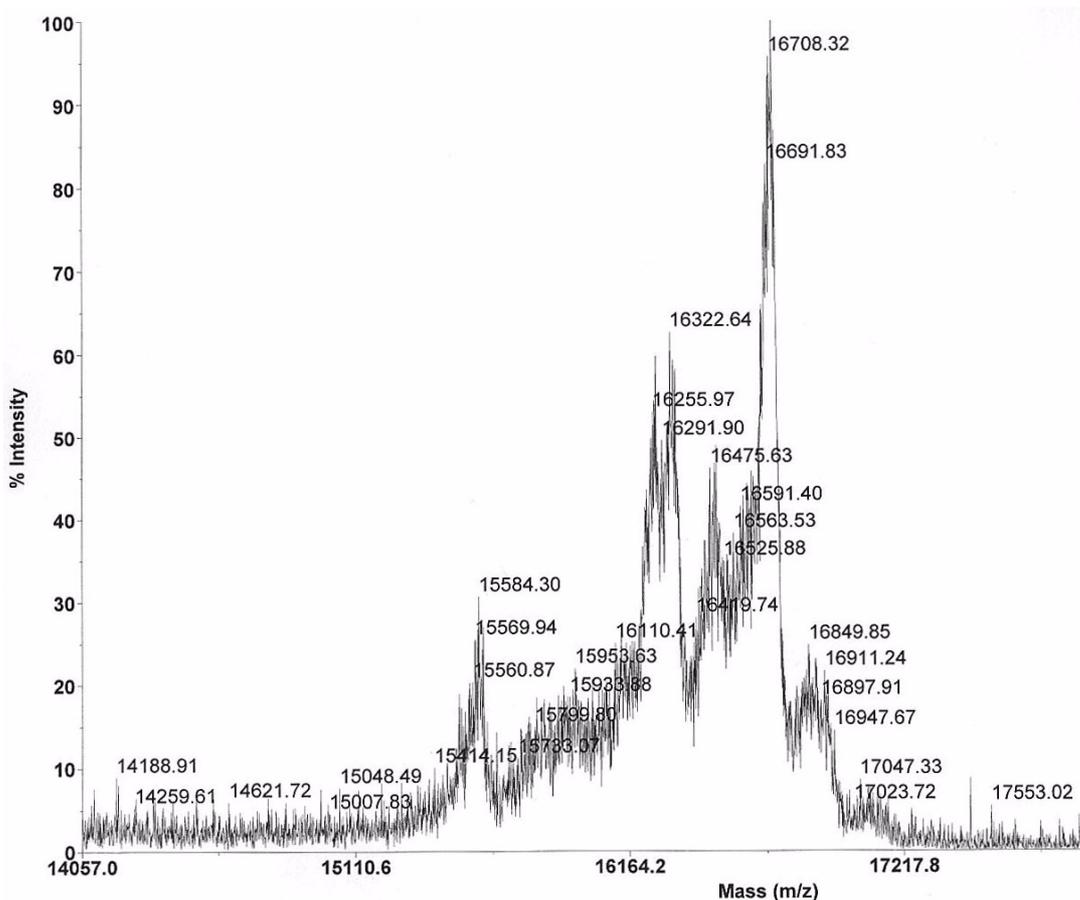


Abb. 16: Bestimmung des Molekulargewichts der degenerierten TWD12D (CN) Probe durch MALDI-TOF Massenspektrometrie (S.Schaffer, persönliche Kommunikation).

### 3.6.3.2. Heteronucleare 3D-Experimente und die Einteilung der gemessenen Signale in Spinsysteme

Ein Großteil der NMR-Experimente zur Zuordnung der Proteinrückgratresonanzen von  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen sind Experimente, bei denen die beiden Resonanzen der Amidprotonen und des Amid- $^{15}\text{N}$  mit weiteren  $^1\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen korreliert werden. Eine Auflistung der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 19 zu finden.

**Tabelle 19: Auflistung der durchgeführten 3D-Experimente und die Korrelation der gemessenen Resonanzen zu den spezifischen Atomkernen eines Proteins**

| Name des 3D-Experimentes         | Resonanzen der 1. Dimension | Resonanzen der 2. Dimension | Resonanzen der 3. Dimension  | Referenz                   |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|
| HNCO                             | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^{13}\text{CO}(i-1)$  | Ikura <i>et al.</i> , 1990 |
| HNCA                             | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^{13}\text{C}\alpha(i)$ , $^{13}\text{C}\alpha(i-1)$  | [2] Grzesiek and Bax, 1992 |
| CBCANH                           | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^{13}\text{C}\alpha(i)$ , $^{13}\text{C}\alpha(i-1)$ ,<br>$^{13}\text{C}\beta(i)$ , $^{13}\text{C}\beta(i-1)$ | [3] Grzesiek and Bax, 1992 |
| CBCA(CO)NH                       | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^{13}\text{C}\alpha(i-1)$ , $^{13}\text{C}\beta(i-1)$   | [1] Grzesiek and Bax, 1992 |
| C(CO)NH                          | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^{13}\text{C}$ aliph. (i-1)   | Bax <i>et al.</i> , 1993   |
| H(CCO)NH                         | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^1\text{H}$ aliph. (i-1)  | Bax <i>et al.</i> , 1993   |
| HBHA(CBCACO)NH                   | $^1\text{HN}(i)$            | $^{15}\text{N}(i)$          | $^1\text{H}\alpha$ (i-1), $^1\text{H}\beta$ (i-1)  | Grzesiek and Bax, 1993     |
| HCCH-TOCSY                       | $^1\text{H}$ aliph. (i)     | $^{13}\text{C}$ aliph. (i)  | $^1\text{H}$ aliph. (i)  | Bax <i>et al.</i> , 1990   |
| $^{15}\text{N}$ editiertes NOESY | $^1\text{HN}(i)$            | $^1\text{H}$ gesamt         | $^{15}\text{N}(i)$   | Zuiderweg and Fesik, 1989  |

Abb. 17.a zeigt beispielhaft für die gegebene Amidresonanz der Aminosäure E136 des TWD12D(CN) die korrespondierenden Ausschnitte aus den gemessenen Spektren.

Insgesamt konnten 80% der gemessenen Signale Spinsystemen zugeordnet werden. Signale, deren Amidprotonensignal in den Bereich um 8 ppm fiel, überschneiden sich häufig und konnten auch durch die Erweiterung in die dritte Dimension nicht auseinandergelassen werden. Diese Überschneidung erschwert die Zuordnung und somit die Bestimmung der sequentiellen Abfolge der Spinsysteme (siehe Kapitel 3.6.3.3.). Besonders bei der Auswertung des CBCANH-Experimentes erwies sich dessen geringe Auflösung in den Bereichen starker Überschneidung als sehr hinderlich.

Anhand der chemischen Verschiebungen und der Anzahl der gemessenen aliphatischen  $^{13}\text{C}$ - oder  $^1\text{H}$ -Signale kann, je nach Qualität der Daten, einem Spinsystem ein Aminosäuretyp zugeordnet werden. Sieht man beispielsweise in einem CBCA(CO)NH-Spektrum nur ein  $^{13}\text{C}\alpha$ -Signal und befindet sich dessen chemische Verschiebung im Bereich von 45 ppm der Kohlenstoffdimension, so handelt es sich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um ein Glycinrest. Ebenso kann man aufgrund der eindeutigen chemischen Verschiebungen sehr einfach Spinsysteme den Aminosäuren Alanin (die  $^{13}\text{C}\beta$  Resonanz ist stark hochfeldverschoben), Serin oder Threonin (die  $^{13}\text{C}\beta$  Resonanzen beider Aminosäuren sind stark tieffeldverschoben) zuordnen. Sind die Signale des C(CO)NH-Experimentes ebenfalls einem Spinsystem zugeordnet, so kann man anhand der Anzahl der aliphatischen  $^{13}\text{C}$ -Signale der Seitenkette das vorliegende Spinsystem einer eng umgrenzten Gruppe von Aminosäuren zuordnen. Findet man beispielsweise fünf aliphatische  $^{13}\text{C}$ -Signale, so kann dieses Spinsystem nur einem Lysin, Leucin oder Isoleucin zugeordnet werden. Anhand der chemischen Verschiebung dieser Signale ist zusätzlich eine weitere Eingrenzung auf einen spezifischen Aminosäuretyp möglich. Es konnte eine Signalaufspaltung in drei Spinsystemen festgestellt werden (Abb. 17.b), die als Anzeichen für Austauschphänomene zwischen verschiedenen Konformationen des Proteins anzusehen sind. Die ebenfalls beobachtete hohe Intensität der Signale deutet auf eine hohe Beweglichkeit der entsprechenden Aminosäure hin.

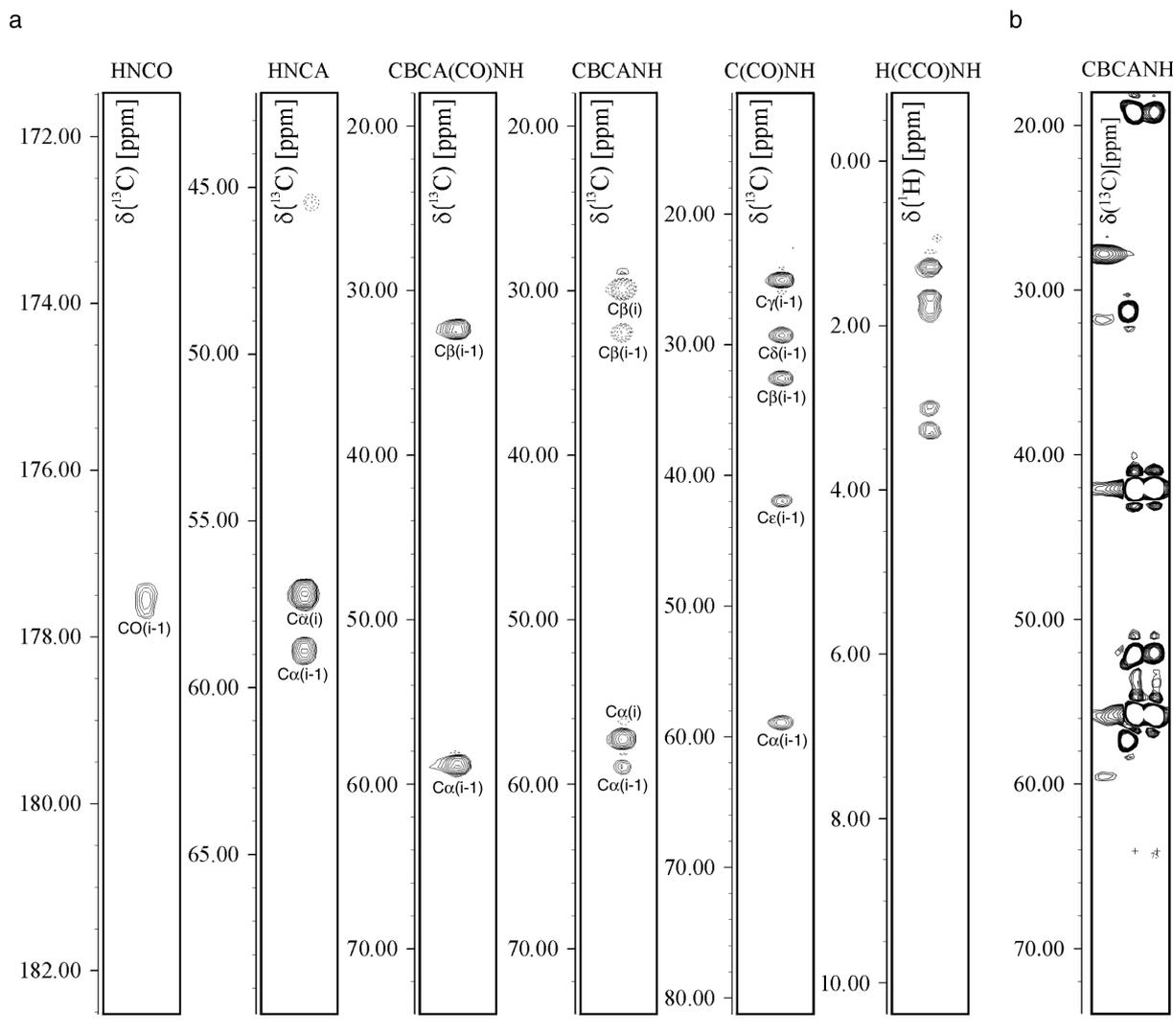


Abb. 17: **Informationsgehalt der 3D NMR Experimente und Signalaufspaltung eines Spinsystems.** a) Für die Amidresonanz des E136 von TWD12D ( $\delta(^1\text{HN}) = 8,925$  ppm;  $\delta(^{15}\text{N}) = 115,133$  ppm) sind nebeneinander die entsprechenden Streifen (0,15 ppm Breite) aus den  $^1\text{HN}$ , X Ebenen der 3D Spektren bei der  $^{15}\text{N}$  Verschiebung mit den Zuordnungen der Kreuzresonanzen gezeigt. b) aufgesplante Signale eines noch nicht zugeordneten Spinsystems bei  $\delta(^1\text{HN}) = 8,595$  ppm und  $\delta(^{15}\text{N}) = 115,116$  ppm.

### 3.6.3.3. Zuordnung sequentiell benachbarter Spinsysteme

Die sequenzspezifische Zuordnung der zuvor ermittelten Spinsysteme erfolgte mit Hilfe zweier Tripelresonanzspektren, dem HNCA, CBCANH und ergänzend dem CBCA(CO)NH. Bei den beiden erstgenannten Experimenten erkennt man jeweils Signale zweier benachbarter Spinsysteme (sowohl inter- als auch intraresiduale Korrelationen). Auf diese Weise kann man sequentiell die einzelnen Spinsysteme zuordnen. Zusammen mit der Information, zu welchem Aminosäuretyp ein Spinsystem gehört, kann man es innerhalb der Aminosäuresequenz des

untersuchten Proteins zuordnen. Zur Unterstützung der sequentiellen Zuordnung der Spinsysteme wurden zwei selbst entwickelte Scripte angewendet (siehe Kapitel 3.6.3.4.).

Anhand des Ausschnittes in Abb. 18 kann man die schrittweise Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren nachverfolgen. In dieser Abbildung ist die Zurodnung der Signale des CBCANH-Spektrums zu den Aminosäuren 106 bis 117 des TWD12D-Proteins zu sehen. Durch die Verknüpfung sowohl der  $^{13}\text{C}\alpha(i)$  und der  $^{13}\text{C}\alpha(i-1)$ , als auch der  $^{13}\text{C}\beta(i)$  und der  $^{13}\text{C}\beta(i-1)$  kann man Schritt für Schritt die Resonanzen sequentiell zuordnen. Da die  $\text{C}\alpha$ - und  $\text{C}\beta$ -Resonanzen in ihrer Phase um  $180^\circ$  verschieden sind, lassen sie sich leicht auseinander halten. Zu beachten ist, daß  $\text{C}\alpha$ -Resonanzen von Glycinresten in dem CBCANH-Spektrum ebenfalls um  $180^\circ$  verschieden sind. Anhand der schwächeren Signalintensitäten der interresidualen Korrelationen oder durch Einbeziehung des CBCA(CO)NH-Spektrums, welches allein die interresidualen Signale wiedergibt, konnten die interresidualen und die intraresidualen Signale unterschieden werden. Prinzipiell ist mit diesen beiden Spektren eine komplette Zuordnung der sequentiell benachbarten Spinsysteme möglich. Da aber die Auflösung des CBCANH-Spektrums vor allem im Bereich um 8 ppm der Protonenresonanz nicht ausreicht, mußte das höher aufgelöste HNCA-Spektrum hinzugezogen werden. Dieses Experiment korreliert die Amidresonanzen mit den  $^{13}\text{C}\alpha$ -Resonanzen der eigenen und der vorhergehenden Aminosäure.

Anhand von Leu110 (5. Streifen von links in Abb. 18) kann man eine der Schwierigkeiten der Zuordnung erkennen. An dieser Stelle im Spektrum sind mehrere Signale zu sehen, die nur schwer einem Spinsystem zuzuordnen sind. An dieser Stelle sind Signale von mindestens 3 verschiedenen Aminosäuren vorhanden. Der Stand der Zuordnung ist in Kapitel 3.6.4. dargestellt.

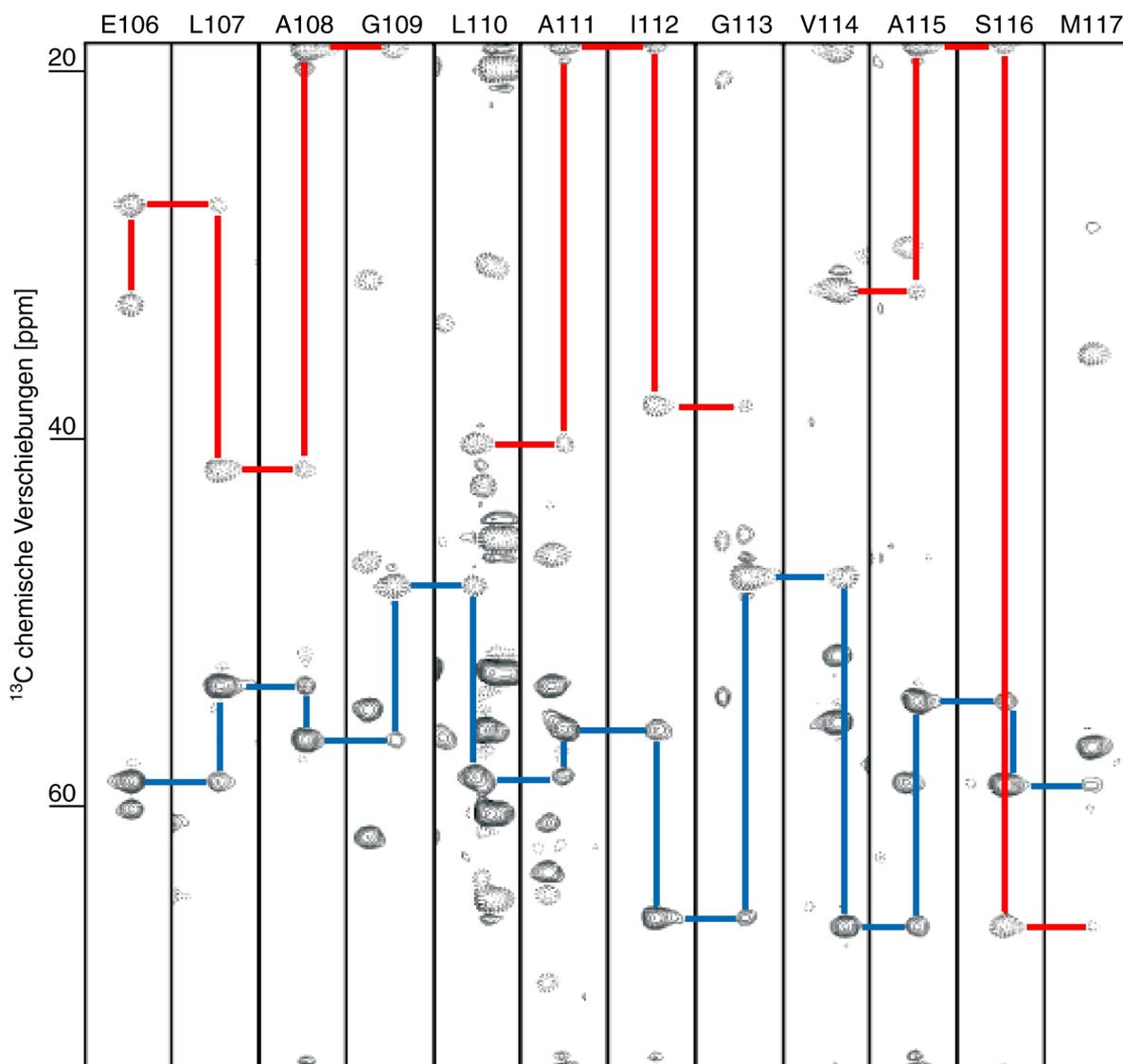


Abb. 18. Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats für das Segment Glu106 bis Met117 in einem 3D CBCANH-Spektrum.  $^{13}\text{C}(\text{F}1)\text{-}^1\text{H}(\text{F}3)$ -Streifen sind bei entsprechenden N- und HN-chemischen Verschiebungen in den Dimensionen F2 und F3 entnommen und sequentiell angeordnet worden. Verbindungen anhand der  $\text{C}\alpha$ - und  $\text{C}\beta$ -chemischen Verschiebungen wurden mit blauen bzw. roten Linien eingezeichnet.

### 3.6.3.4. Erstellung zweier Scripte zur Unterstützung der sequentiellen Anordnung benachbarter Spinsysteme

Mit Hilfe des XEASY (Bartels *et al.*, 1995) Programms wurden die Signale der Spektren annotiert. Anhand der  $^1\text{HN}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Amidresonanzen konnten diese Signale in der Regel einem Spinsystem zugeordnet werden. In Bereichen eng beieinander liegender Signale (siehe fünfter Streifen von links in Abb. 18) konnte diese Zuordnung nicht automatisch durchgeführt

werden, sondern mußte visuell beurteilt werden. Bei der Suche nach benachbarten Spinsystemen gibt es daher in solchen Bereichen große Schwierigkeiten.

Um eine sinnvolle Vorauswahl in Frage kommender Spinsysteme aus CBCANH- und HNCA-Spektren zu erhalten, wurden zwei Scripte entwickelt. Die Quelltexte zu den beiden Scripten "getp" und "get2" sind im Anhang abgedruckt (Kap. 7.2.1. & 7.2.2.). Aufgrund der vorhandenen Vorkenntnis, der Plattformunabhängigkeit und der großen Auswahl an Funktionen zur Stringbehandlung wurde als Programmiersprache PHP gewählt. Diese Scripte arbeiten auf der Datenbasis von Signallisten (Peaklisten), die mit dem XEASY-Programm erstellt wurden.

Mit Hilfe des "getp"-Scriptes können alle Signale einer Signalliste ermittelt werden, deren  $^{13}\text{C}$ -Resonanz in einem bestimmten Fehlerbereich [ppm] mit der vorgegebenen Resonanz übereinstimmen. Die Wahl des Fehlerbereiches ist in drei Stufen aufgeteilt: 0,15 ppm, 0,3 ppm und 0,5 ppm. Dieses Script half in der Hauptsache bei der Suche nach übereinstimmenden  $^{13}\text{C}\alpha$ -Resonanzen von Glycinresten.

Mit Hilfe des "get2"-Scriptes können übereinstimmende Signalpaare gefunden werden. In diesem Fall werden die  $^{13}\text{C}\alpha$ - und  $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen eines Spinsystems vorgegeben. Das Script ermittelt nun aus der gegebenen Signalliste die Signale, die zum einen mit den vorgegeben Signalen (in einem bestimmten Fehlerbereich) übereinstimmen und die zum anderen untereinander die gleichen Amidresonanzen (in einem bestimmten Fehlerbereich) besitzen müssen. Dieses Script dient somit der Auswertung des CBCANH-Experimentes, da jeweils Paare von  $^{13}\text{C}\alpha$ - und  $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen gefunden werden. Die Fehlerbereich kann analog zum "getp"-Script gewählt werden.

In beiden Scripten stellte sich die Auswahlmöglichkeit des Fehlerbereiches als sehr hilfreich dar. Auf diese Weise konnten auch in signalreichen Regionen korrespondierende Signalpaare spinsystembezogen gefunden werden. Die gefundenen Signale wurden grundsätzlich visuell anhand der Spektren kontrolliert.

#### **3.6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der aktuelle Stand der Zuordnung ist in Abb. 19 dargestellt; Eine komplette Zuordnung der Proteinrückgradresonanzen war im Laufe der Arbeit nicht möglich. Der derzeitige Stand stellt den Beginn der Auswertungen dar.

MDESLEHQTTQ THDQESEIVT EGSAVVHSEP SQEGNVPPKV DSEAEVLDEK VSKQIIKEGH GSKPSKYSTC  
 FLHYRAWTKN SQHKFEDTWH EQQPIELVLG KEKKELAGLA IGVASKMSGE RALVHVGWEL AYGKEGNFSF  
 PNVPPMADLL YEVEVIGFDE TKEGKARSDM TVEERIGAAD

Abb. 19: Aminosäuresequenz von TWD12D. zugeordnete Bereiche sind in blau hervorgehoben. Proline, die Lücken in der sequentiellen Zuordnung erzeugen, sind rot gefärbt.

## 3.7. Röntgendiffraktionsexperimente - Teil 2

### 3.7.1. TWD-MA

#### 3.7.1.1. TWD-MA kristallisiert in 4M Na-Formiat Puffer

Während der Durchführung der NMR-Experimente wurden die Kristallisationsansätze weiterhin mikroskopiert. Nach 15 Monaten konnten in einem Ansatz mit 4 M Na-Formiat (CSI.33) zehn TWD-MA Kristalle ausgemacht werden. Der Ansatz zeigte kurz nach dem Pipetieren tropfenförmige Abscheidungen flüssiger Proteinphase, entsprechend Abb. 12.a. Im Laufe der Zeit haben diese Tropfen Einkristalle gebildet. Dies erklärt auch die abgerundete Oberfläche der Kristalle (Pfeil in Abb. 20.b).

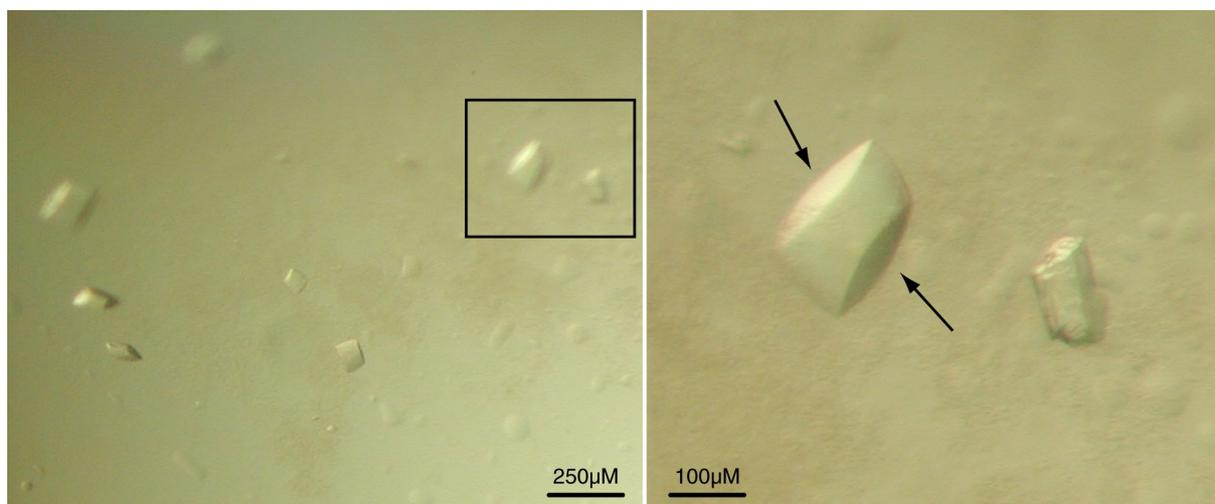


Abb. 20: TWD-MA Kristalle in 4 M Na-Formiat. Die gezeigten Kristalle entstanden im "hanging drop"-Verfahren. Es wurden 2  $\mu$ l Proteinlösung (40 mg/ml) mit 2  $\mu$ l Reservoirlösung (4 M Na-Formiat) vermischt. Die Kristalle entstanden im Lauf von 15 Monaten. Die Pfeile deuten auf die abgerundeten Kanten der Kristalle. Die rechte Abbildung ist eine vergrößerte und fokussierte Darstellung des schwarz umrandeten Bereichs der linken Abbildung.

### **3.7.1.2. Herstellung von Schweratomderivaten**

Schwermetallderivate werden benötigt, um das Phasenproblem bei der Strukturbestimmung zu lösen (siehe Kapitel 3.5.3.). Derivate bestehender Kristalle können durch Inkubation für mindestens 30 min in einen entsprechenden Puffer, der ein Schwermetallsalz enthält, hergestellt werden. Durch Solvenzkanäle können die Metallionen in den Kristall diffundieren und sich am Protein positionieren. Es wurden folgende drei Salze verwendet: Mercurochrom (Hg), Platin-II-bis(ethylendiamin)chlorid (Pt) und Uranylнитrat (Ur). Je ein Kristall wurde für 12 h in einer 1 mM Lösung des entsprechenden Salzes inkubiert. Im Anschluß wurden die Kristalle für die späteren Röntgenexperimente am Synchrotron in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.7.1.3. Aufnahme kristallographischer Datensätze mittels Synchrotronstrahlung**

Es wurden fünf Datensätze von verschiedenen TWD-MA-Kristallen (2 native und 3 mit Schwermetallatomen derivatisiert) an der ESRF in Grenoble aufgenommen (J.Granzin und O.Weiergräber, persönliche Kommunikation). In Tabelle 20 werden die kristallographischen Daten aufgelistet. Anhand der Gitterkonstanten der verschiedenen Kristalle zeigt sich, daß die Schweratomderivate keinen Einfluß auf die Molekülpackung haben, was lokale Konformationsänderungen von Aminosäureseitenketten nicht ausschließt.

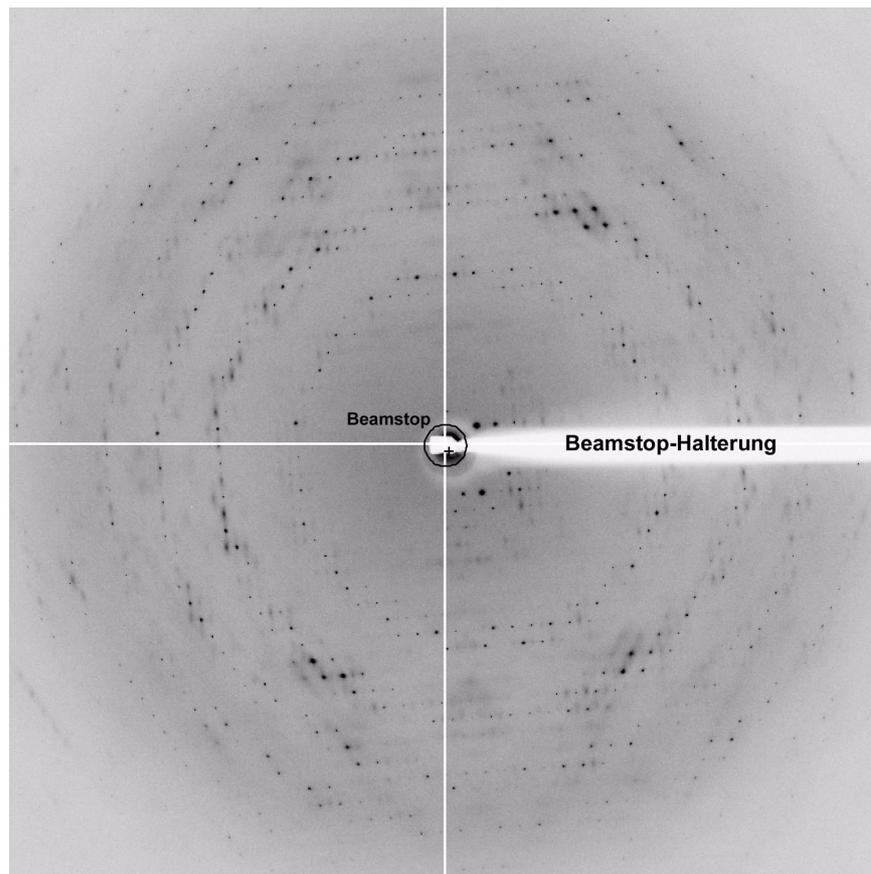


Abb. 21: **Diffractionsaufnahme eines nativen TWD-MA Kristalls mit Synchrotronstrahlung.** Gezeigt ist eine Aufnahme aus dem Datensatz "twd\_nativ1". Die Messung erfolgte an der ESRF in Grenoble an der Beamline ID-14-1. Die Wellenlänge der Synchrotronstrahlung betrug  $0,934 \text{ \AA}$ . Die Aufnahme erfolgte mit einem Quantum ADSC Q4R Detektor.

In der Abb. 21 ist eine diffuse Hintergrundstreuung zu sehen. Dies deutet auf eine erhöhte Mosaizität hin. Es könnte Abschnitte im Protein geben, die unstrukturiert sind und daher einen zusätzlichen Streubeitrag leisten.

**Tabelle 20: kristallographische Daten** (ESRF, ID14-1 (Grenoble),  $\lambda = 0,934 \text{ \AA}$ )

|  | nativ1            | nativ2            | Hg                | Pt                | Ur                |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Raumgruppe                                 | C222 <sub>1</sub> |
| Gitterkonstante a [ $\text{\AA}$ ]         | 68,64             | 68,77             | 68,85             | 68,59             | 68,95             |
| Gitterkonstante b [ $\text{\AA}$ ]         | 122,94            | 122,93            | 123,34            | 122,81            | 123,14            |
| Gitterkonstante c [ $\text{\AA}$ ]         | 87,16             | 87,18             | 86,81             | 87,00             | 87,54             |
| Auflösung                                  | 2,7 $\text{\AA}$  | 2,3 $\text{\AA}$  | 2,9 $\text{\AA}$  | 2,9 $\text{\AA}$  | 3,3 $\text{\AA}$  |
| gemessene Reflexe<br>(unabhängige reflexe) | 61210 (10484)     | 117638 (16809)    | 60783 (8517)      | 55527 (8470)      | 35577 (4961)      |
| Vollständigkeit                            | 98,4 %            | 99,8 %            | 99,1 %            | 98 %              | 98,4 %            |
| R <sub>merge</sub> <sup>a</sup>            | 3,6 %             | 4,5 %             | 4,9 %             | 4,5 %             | 7,6 %             |

a.  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$  mit  $\langle I(h) \rangle$  als Mittelwert aller Messungen von  $I(h)$

### 3.7.1.4. Auswertung der Datensätze und Ermittlung der dreidimensionalen Struktur

Die weiteren Arbeiten zur Strukturbestimmung des TWD-MA-Moleküls werden von O.H. Weiergräber in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Ansätze zur Lösung der Struktur liegen sowohl im “molekularen Ersatz” mit Hilfe der FKBP12-Struktur als auch in der Verwendung der Schweratomderivate über die Methode des “isomorphen Ersatzes”.

### 3.7.2. 12kDa FKBP Domäne von TWD ( TWD12D )

#### 3.7.2.1. TWD12D kristallisiert in Ammoniumsulfat und -phosphat

In einem 18 Monate altem Ansatz (2,5 M Ammoniumsulfat, 100mM NaCl und 100mM Hepes pH 8) waren drei kubische TWD12D Kristalle der 12kDa FKBP-Domäne des TWD Proteins (TWD12D) mit einer Kantenlänge zwischen 80  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  entstanden (Abb 22.b). In diesem Ansatz befand sich bereits zuvor ein Kristallbündel (entsprechend Abb. 13.g), welches nach 3 Monaten entstanden war. Beim Umsetzen eines Kristalls von Mutterlauge mit 10% Glycerol in eine 15%ige Glycerol-Lösung löste sich der Kristall auf, da das System bei diesen Bedingungen in die ungesättigte Phase überführt wurde. Zwei andere Kristalle waren am

Deckglas des “hanging drop”-Ansatzes festgewachsen. Die Kristalle konnte ohne Zerstörung nicht abgelöst werden.

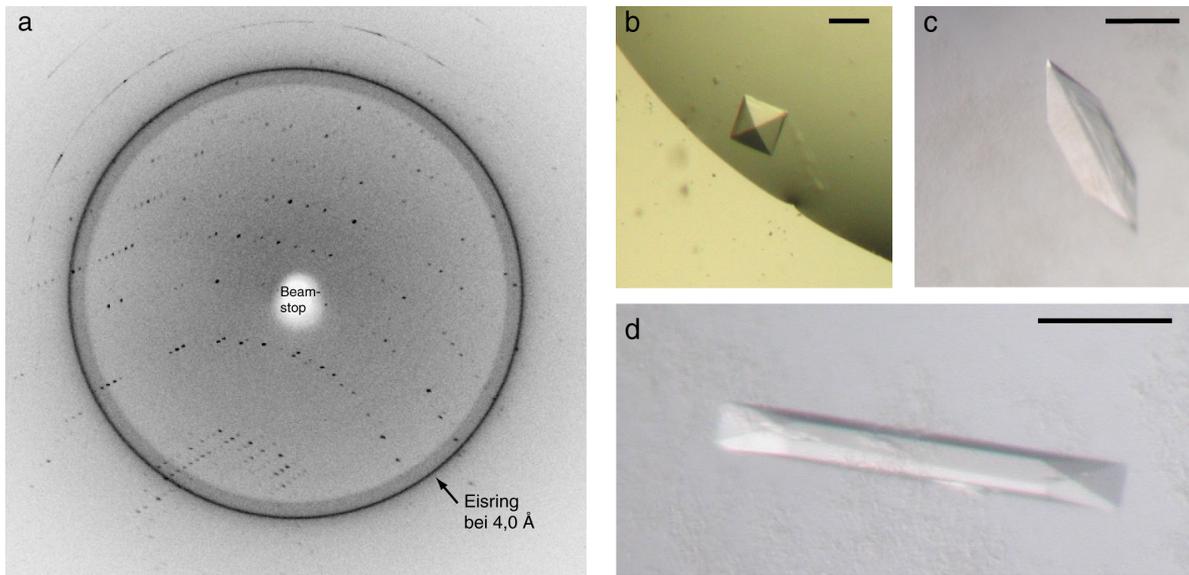


Abb. 22. **Diffractionsaufnahme eines TWD12D Kristalls und Kristalle von TWD12D.** a) Gezeigt ist eine Diffractionsaufnahme des Kristalls in d). Die Messung erfolgte an dem Röntgendrehanodengenerator FR591 (Bruker-Nonius). Das Beugungsbild wurde bei einem Detektorabstand von 180 mm aufgenommen. Rechte Seite: Abbildungen von TWD12D Kristallen. Die Ansätze, in denen die Kristalle gewachsen waren, wurden jeweils mit 2 µl Puffer und 2 µl Proteinlösung (20 µg/20 µl, 100mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl) angesetzt. Die Länge der schwarzen Balken entspricht in allen Bildern 100 µm b) Kristall in 2,0 M Ammoniumsulfat, 100 mM NaCl, 100 mM Hepes pH 8,0. c) & d) Kristall in 2,0 M Ammoniumphosphat, 100mM Tris-HCl pH 8,5 (CSI.48).

In dem Ansatz “CSI.48” (2 M Ammoniumphosphat, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) sind zwei weitere Kristalle (Abb. 22.c & d) entstanden. Diese bildeten sich ebenfalls im Laufe von ~18 Monaten in leichtem Präzipitat. Aufgrund der Größe, der Form und der starken Lichtbrechung an den Rändern wurde zuerst vermutet, daß es sich um Salzkristalle handelt. Beim Aufnehmen der Kristalle in Kryoloops erwiesen sie sich als mechanisch sehr instabil. Es konnte nur ein Kristall (Abb. 22.d) unbeschadet in einen Kryoloop überführt werden. Abb. 22.a zeigt die Röntgendiffractionsaufnahme des unbeschädigten Kristalls (max. Auflösung ~2,8 Å). Aufnahmen beider Kristalle zeigten, daß es sich um Proteinkristalle handelt.



## 4. Diskussion

Das Twisted Dwarf Protein aus *Arabidopsis thaliana* spielt eine zentrale Rolle in der Pflanzentwicklung. TWD<sup>-</sup>-Pflanzen zeigen einen pleiotropen Phänotyp, der sowohl die Morphologie (siehe Abb. 1) als auch den Entwicklungszyklus der Pflanze betrifft. Bindungsstudien haben gezeigt, daß Hsp90 (Kamphausen *et al.*, 2002) sowie zwei verschiedene ABC-Transporter (B.Schulz, persönliche Kommunikation) an TWD binden. Es gibt ebenso Hinweise auf weitere Bindungspartner, die noch bestätigt werden müssen. Kreuzungsexperimente von TWD<sup>-</sup>-Pflanzen mit *dwf*-Mutanten, die im Brassinolid-Syntheseweg geschädigt sind, zeigen, daß das TWD-Protein an der Brassinolid-Signaltransduktion beteiligt ist (Wanke, 1999). Weiterhin gibt es Hinweise, daß TWD ebenfalls am Signaltransduktionsweg von Ethylen in der Wurzel beteiligt ist (Saal, 1998).

Für die zuvor genannten Effekte und Bindungen dürften hauptsächlich die FKBP- und TPR-Domänen von TWD verantwortlich sein. Beide Domänen sind als Mediatoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannt (Snyder *et al.*, 1998; Dittmar *et al.*, 1997; Galigniana *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Bezieht man den ebenfalls vorhandenen Membrananker in das Bild ein, kann man sich vorstellen, daß TWD verschiedene Multiproteinkomplexe zusammenhält und diese in räumlicher Nähe zur Zellmembran oder dem Tonoplasten hält.

Des Weiteren ist bemerkenswert, daß die FKBP-Untereinheit des TWD-Proteins keine der typischen Eigenschaften einer FKBP-Untereinheit besitzt. So konnte weder eine signifikante Bindung an FK506 noch eine vorhandene PPIase-Aktivität festgestellt werden (Kamphausen *et al.*, 2002).

Neben dem hohen Einfluß des TWD-Proteins auf die Entwicklung der Pflanze und der hohen Homologie zu FKBP-Proteinen, ohne deren typische Eigenschaften zu besitzen, ist eine Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Proteins auch deshalb von großem Interesse, da es bisher noch nicht gelungen ist, die Struktur eines pflanzlichen FKBP- oder TPR-Proteins zu bestimmen. Auch die Strukturbestimmung eines FKBP's inklusive einer TPR-Untereinheit ist bisher noch nicht gelungen (neben TWD besitzen einige weitere FKBP's ebenfalls eine TPR-Untereinheit, z.B. ROF1, ROF2, wFKBP73, wFKBP77, u.v.m.; Harrar *et al.*, 2001).

Bisher sind keine Methoden beschrieben, mit denen TWD in großen Mengen (Milligrammmaßstab) isoliert werden kann. TWD wurde entweder *in vivo* in der Pflanze oder TWD ohne

Membrananker (TWD-MA) oder nur die 12 kD FKBP Domäne von TWD (TWD12D) *in vitro* exprimiert.

Ziel der beschriebenen Arbeiten war daher, TWD zunächst in großem Maßstab herzustellen und zu isolieren. Im Anschluß wurden Experimente zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von TWD durchgeführt werden.

### 4.1. Herstellung und Reinigung der Probe

Zur Herstellung ausreichender Mengen TWD-Proteins für die Kristallisation wurde die heterologe Expression in *E.coli* sowie eine sequentielle Reinigung des rekombinanten Proteins über verschiedene säulenchromatographische Methoden gewählt. Durch Fusion sogenannter Affinitätstags an TWD mittels molekularbiologischer Methoden wird eine schnelle und effiziente Isolierung des Proteins ermöglicht. Da bei der Klonierung der Expressionsvektoren ohne großen Aufwand mehrere Konstrukte parallel hergestellt werden können, bot es sich an, verschiedene Affinitätstags mit TWD zu fusionieren. Auf diese Weise stehen unterschiedliche Reinigungsstrategien zur Verfügung. Als optimale Expressionsbedingungen stellte sich die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5$  heraus. Da es sich bei TWD um ein membranassoziertes Protein handelt, mußte es vor der Reinigung mittels Detergenzien aus dem Membranpellet solubilisiert werden. Die Wahl des Detergenz fiel auf OG, das für die weiteren Reinigungsschritte die besten Voraussetzungen hatte: es ist ein nicht-ionisches Detergenz, d.h., es wirkt nicht denaturierend und es besitzt eine (im Vergleich zu anderen in Frage kommenden Detergenzien) höhere CMC, was es der Dialyse zugänglich macht (siehe Kapitel 3.1.2.).

Nach der Solubilisierung wurde sequentiell eine Reinigung über IMAC-, Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie (siehe Kapitel 3.1.3.) durchgeführt. Die resultierende Reinheit der Probe war mehr als ausreichend für eventuell folgende Kristallisationsexperimente.

Die Startkonzentration der Proteinlösung für die Durchführung von Kristallisationsexperimenten sollte mindestens 5 mg/ml (Labahn, persönliche Mitteilung) und laut McPherson Jr. (1976) sogar 10 mg/ml betragen. Das gereinigte TWD ließ sich nur bis 2 mg/ml konzentrieren. Sowohl eine weitere Konzentration als auch eine längere Lagerung führte zu einer vollständigen Präzipitation des Proteins.

Auch die Verwendung von LDAO zur Solubilisierung von TWD konnte die Präzipitation nicht verhindern, obwohl zwitter-ionische Detergenzien dafür bekannt sind, Protein-Protein Interak-

tionen aufbrechen bzw. verhindern zu können. Betrachtet man die hohe gemittelte Hydrophobizität des Membranankers (Aminosäure 339 bis 357) von  $-1,19$  kcal/mol, kann man davon ausgehen, daß dieser für die Aggregation des Proteins verantwortlich ist. Die Tatsache, daß das TWD Protein sowohl in *E.coli* (Membranpellets) als auch in der Pflanze ausschließlich in der Membran lokalisiert ist, unterstützt diese Vermutung. Dieser hydrophobe Effekt könnte durch eine höhere Detergenzkonzentration aufgehoben werden. In den benötigten Detergenzkonzentrationen dürfte dies zur Denaturierung des Proteins führen.

Das Ziel, ausreichende Mengen an TWD-Protein für die Kristallisation herstellen und reinigen zu können, wurde erreicht. Aber eine Konzentration des Proteins von mindestens 5 mg/ml für den Einsatz in Kristallisationsexperimenten konnte nicht erreicht werden.

Thilo Kamphausen (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) arbeitete zur gleichen Zeit an TWD ohne Membrananker (TWD-MA) und der 12 kDa FKBP Untereinheit von TWD (TWD12D). Er konnte beide Proteinfragmente exprimieren, reinigen und konzentrieren (Kamphausen *et al.* 2002), so daß TWD-MA in einer Konzentration von 56 mg/ml und TWD12D in einer Konzentration von 40 mg/ml zur Verfügung stand. Die Proben waren hochrein und konnten für weitere Experimente eingesetzt werden. Da das TWD-MA, welchem im Vergleich zu TWD die letzten 26 Aminosäuren fehlen, bis zu mindestens 56 mg/ml konzentrierbar ist und bei dieser Konzentration auch nicht präzipitiert, zeigt, daß der Membrananker einen sehr großen Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins besitzt. In weiteren Experimenten wurde mit TWD-MA und TWD12D gearbeitet.

## 4.2. Faltungszustand und Aktivität von TWD-MA und TWD12D

Zur Untersuchung des Faltungszustands von TWD-MA und TWD12D wurden verschiedene biophysikalische Methoden angewendet (siehe Kapitel 3.3.) und die Ergebnisse wurden anschließend untereinander und mit den Ausgaben verschiedener Sekundärstrukturvorhersagen (siehe Kapitel 3.3.4.) verglichen.

Im Fall von TWD-MA wurden CD-, FTIR-Spektroskopie und verschiedene Strukturvorhersagen durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse dieser drei Methoden in Bezug auf Sekundärstrukturanteile, so ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Während Vorhersage und CD-Spektroskopie mehr  $\alpha$ -helicale als  $\beta$ -Faltblattbereiche angeben, zeigt die FTIR-Spektroskopie ein entgegengesetztes Bild. Dieses Ergebnis weist auf einige der Probleme hin, die es bei der Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen mittels CD- und FTIR-Spektroskopie gibt.

In FTIR-spektroskopischen Untersuchungen werden etwa 20 % der Protein-Absorption in der Amid-I Region durch Seitenketten hervorgerufen (Rahmelow *et al.*, 1998) und dadurch das Ergebnis der Strukturabschätzung beeinflusst. Es ist weiterhin bekannt, daß die Absorption von  $\beta$ -Faltblattbereichen 1,4-1,6 mal größer ist, als die von  $\alpha$ -helicalen Bereichen (de Jongh *et al.*, 1996). Wilder *et al.* (1992) kommen zu der Aussage, daß die Infrarotspektroskopie allein nicht ausreicht, verlässlich Sekundärstrukturanteile bestimmen zu können. Diese Aussage wird durch die Arbeit von Surewicz *et al.* (1993) unterstützt, die zu dem Schluß kommen, daß sowohl CD- als auch FTIR-Spektroskopie so fehleranfällig sind, daß man, wenn überhaupt, nur beide zusammen und nie einzeln betrachten sollte. Die Auswertung von CD-Spektren können ihrerseits stark durch aromatische Ringsysteme in den Seitenketten beeinflusst werden und dadurch das Ergebnis verfälschen. Allgemein gilt, daß die CD-Spektroskopie eher  $\alpha$ -helicale Bereiche hervorhebt, während die FTIR-Spektroskopie eher  $\beta$ -Faltblattbereiche bevorzugt. Weiterhin kann festgehalten werden, daß diese Techniken sich eher dafür eignen, Änderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung anzuzeigen, als die tatsächlichen Anteile angeben zu können. Betrachtet man die Strukturen bereits bekannter FKBP- und TPR-Proteine, so sollte eine Sekundärstrukturzusammensetzung herauskommen, welche näher an dem Ergebnis der CD-Spektroskopie liegt. Die wahre Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente wird letztlich die dreidimensionale Struktur ergeben.

Eindeutige Hinweise auf vorhandene Faltung des TWD12D lieferten die Ergebnisse der 1D-Protonen-NMR; eine hohe Dispersion im Bereich der Proteinrückgratamidprotonen und die Hochfeldverschiebung einiger Methylprotonensignale. Es kann davon ausgegangen werden, daß sich TWD12D in einer definierten Konformation befindet.

### 4.3. Kristallisation und Röntgendiffraktion

Die Übersicht bisher bestimmter dreidimensionaler Strukturen von FKBP- und TPR-Proteinen (Kapitel 3.4.1.) sollte Hinweise für die Strukturbestimmung des TWD-Proteins liefern. Da die Familie der FKBP in größere und kleinere FKBP eingeteilt wird, ist hervorzuheben, daß von den 36 bestimmten FKBP-Strukturen 35 nur die 12 kDa-FKBP-Domäne (und somit die Klasse der kleineren FKBP) umfassen und nur eine Struktur (Mip aus *Legionella pneumophila*) aus der Klasse der größeren FKBP zuzuordnen ist.

Daher bietet es sich an, für TWD12D die Kristallisationsbedingungen der anderen 12 kDa FKBP-Domänen als Grundlage zu nehmen und darauf aufbauend Kristallisationsreihenver-

suche anzusetzen. Leider bieten sich die Kristallisationsbedingungen des Mip-Proteins nicht an als Vorlage für TWD-MA zu dienen. Zum einen handelt es sich bei der zweiten Domäne des Mip-Proteins nicht um eine TPR-Domäne und zum anderen waren die Bedingungen, die zur Kristallisation des Proteins führten, sehr speziell (R.Hilgenfeld, persönliche Kommunikation).

#### **4.3.1. Kristallisation und kristallographische Analyse der 12 kDa-FKBP Domäne des TWD Proteins**

Zur Kristallisation von TWD12D wurde mit Reihenversuchen begonnen, die als Fällungsmittel PEG (verschiedene Längen) oder Ammoniumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen beinhalteten. Zusätzlich wurde auch ein "Sparse Matrix Screen" mit den "Crystal Screen I & II"-Puffern durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß PEG als Fällungsmittel ungeeignet war. Die Verwendung von höheren Konzentrationen ( $> 1,5$  M) an Ammoniumsulfat zeigten bei  $\text{pH} > 6$  eine flüssig-flüssig Phasentrennung und bei einem  $\text{pH}$  unter 6 die Ausbildung von Mikrokristallen. In weiteren Experimenten zeigte sich, daß einige dieser Proteinphasentröpfchen im Laufe der Zeit auf verschiedene Arten auskristallisierten (siehe Abb. 12). Keiner dieser Ansätze erbrachte aber zunächst die benötigten Einkristalle. Erst in einem Zeitraum zwischen 3 Monaten und einem Jahr sind in zwei Ansätzen Einkristalle gewachsen (siehe Abb. 22). Drei bipyramidale Einkristalle (Abb. 22.b) mit einer Kantenlänge von 80-100  $\mu\text{m}$  sind in einem Ansatz (2,5 M Ammoniumsulfat, 100 mM NaCl und 100 mM Hepes  $\text{pH}$  8) entstanden, in dem bereits zuvor Kristallbüschel entsprechend Abb. 12.g gewachsen waren. In dem Ansatz CSI.48 des "Sparse matrix Screen" (2 M Ammoniumphosphat, 100 mM Tris-HCl  $\text{pH}$  8,5) sind im gleichen Zeitraum ebenfalls zwei Kristalle gewachsen. Aufgrund dieser sehr langen Zeiträume vom Ansatz der Experimente bis zur Entstehung der Einkristalle konnten die Ergebnisse bisher nicht reproduziert werden.

Zwei der bipyramidalen Kristalle waren am Deckglas des "hanging drop"-Ansatzes festgewachsen und konnten nicht ohne stärkere Beschädigungen gelöst werden. Der dritte konnte problemlos mit einem Kryoloop entnommen werden. Um der Bildung von Eiskristallen beim Abkühlen auf 100 K vorzubeugen, wurde der Kristall jeweils 5 Minuten in mehreren Puffern mit aufsteigender Konzentration an Glycerin inkubiert. Beim Umsetzen des Kristalls von 10 % nach 15 % Glycerin löste dieser sich allerdings auf. Das Puffersystem mit 15 % Glycerin befand sich in der ungesättigten Phase, so daß sich die Proteinmoleküle aus dem Kristallgitter

lösten. Somit können keine weiteren Aussagen über die Qualität der bipyramidalen Kristalle gemacht werden.

Die Handhabung der beiden Kristalle aus dem Ansatz CSI.48 erwies sich ebenfalls als schwierig. Aufgrund der Erfahrung bei den bipyramidalen Kristallen sollten diese nur kurz in 10 % Glycerin inkubiert und dann direkt abgekühlt werden. Beim Fischen der Kristalle zeigte sich jedoch, daß sie mechanisch sehr instabil sind. Der Kristall aus Abb. 22.c zerfiel bei diesem Versuch in mehrere Teile. Das große Fragment konnte mit einem Kryoloop entnommen werden und zeigte noch Diffraction (Daten nicht gezeigt). Der Kristall aus Abb. 22.d konnte unversehrt entnommen werden. Es wurde eine Röntgendiffraktionaufnahme angefertigt, die eine maximale Auflösung von  $\sim 2,8 \text{ \AA}$  zeigt. Da diese Aufnahme an einem Röntgendrehanodengenerator durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß der Kristall mit Synchrotronstrahlung eine Auflösung von etwa  $2 \text{ \AA}$  haben wird.

Da es sich hierbei um die 12 kDa-FKBP-Domäne des TWD-Proteins handelt, sollte die Phasenbestimmung zur Lösung der dreidimensionalen Struktur mit Hilfe des molekularen Ersatzes machbar sein. Wie bereits erwähnt, gibt es für diese Domäne eine Anzahl von gelösten dreidimensionalen Strukturen, sodaß mit großer Wahrscheinlichkeit ein geeignetes Startmodell gefunden werden kann. Aufgrund der langen Kristallisationszeit ist es ebenfalls wahrscheinlich, daß in jüngeren Ansätzen im Laufe der Zeit noch weitere Kristalle entstehen können, so daß auch die Methode des isomorphen Ersatzes angewendet werden könnte.

#### **4.3.2. Kristallisation und kristallographische Analyse des TWD-Proteins ohne Membrananker**

Zur Bestimmung der Kristallisationsbedingungen von TWD-MA wurde ein "Sparse Matrix Screen" durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß das Protein in Ansätzen mit einem pH unter 7 in den meisten Fällen präzipitiert. Dies gilt auch für Ansätze mit PEG, die ein Molekulargewicht unter 4000 g/M besitzen. Weitere, generelle Beobachtungen sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Nach etwa 3 Monaten entstanden in dem Ansatz CSI.33 (4 M Na-Formiat) einige Kristalle. Von diesen wurden 4 ausgewählt, in dem mit 5% Ethylenglykol versetzten 4 M Formiat-Ausgangspuffer für 5 min inkubiert und anschließend in einem Kryoloop auf eine Temperatur von 100 K abgekühlt. Von einem Kristall wurde an dem Röntgendrehanodengenerator eine Beugungsaufnahme gemacht. Die Auflösung betrug etwa  $4 \text{ \AA}$ .

Wie in Kapitel 3.5.2. beschrieben, konnte mit Synchrotronstrahlung ein kristallographischer Datensatz bis  $3,3 \text{ \AA}$  aufgenommen werden. Von den vier Kristallen war nur ein Kristall für Röntgenbeugungsaufnahmen geeignet. Da keine Schweratomderivate vorhanden waren, konnte nur die Methode des molekularen Ersatzes gewählt werden, um die Phasen ermitteln zu können. Für diese Methode wird ein Startmodell benötigt, das aus einer bekannten Proteinstruktur erstellt wird. Für den Fall der FKBP-Domäne konnte ein Startmodell gefunden werden (aufbauend auf der Struktur des *hFKBP12*). Dies war für die TPR-Domäne nicht möglich. Die Phaseninformation der FKBP-Domäne erwies sich allein als nicht ausreichend (J.Labahn, persönliche Kommunikation).

Nach 15 Monate waren erneut Kristalle in einem CSI.33 Ansatz (4 M Na-Formiat) entstanden (Abb. 20). Somit sind die Bedingungen zur Kristallisation von TWD-MA reproduzierbar. Die Kristalle bildeten sich aus den Proteinphasetröpfchen, worauf die abgerundete Oberfläche der einzelnen Kristalle hindeutet (Pfeile in Abb. 20.b). Nach mikroskopischer Vorauswahl eigneten sich fünf Kristalle für röntgenkristallographische Untersuchungen. Um die Möglichkeit der Phasenbestimmung durch isomorphen Ersatz zur Verfügung zu haben, wurden drei Kristalle in schweratomhaltigen Lösungen inkubiert. Anhand der kristallographischen Daten sieht man, daß die zwölfstündige Inkubation in den schweratomhaltigen Lösungen den Kristallen geschadet hat, da die Diffraktionsqualität der Schweratomderivate schlechter ist als die der beiden nativen Kristalle.

Die Beugungsaufnahmen der TWD-MA Kristalle zeigen eine diffuse Hintergrundstreuung sowie eine hohe Mosaizität. Dies sind möglicherweise Hinweise auf unstrukturierte Bereiche im TWD-Protein. Einen Hinweis darauf, daß es sich hierbei um den N-terminalen Bereich des TWD-Proteins handelt, liefern die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen (Kapitel 4.4.).

Sowohl von TWD-MA als auch von TWD12D konnten Einkristalle gezüchtet werden, die bis zu einer Auflösung von  $2,3 \text{ \AA}$  ausgewertet werden konnten. Aufgrund der sehr langen Kristallisationszeiten ist die Kristallisation nur im Fall von TWD-MA reproduzierbar.

#### **4.3.3. Ausblick auf weitere kristallographische Studien**

Die weitere Auswertung der kristallographischen Daten und die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur wird von O.Weiergräber in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die Kristallisationsbedingungen werden zur Zeit weiter optimiert.

Kamphausen *et al.* (2002) konnten bereits zeigen, daß das Hitzeschockprotein Hsp90 in einem Verhältnis von 2 : 1 an die TPR-Domäne von TWD bindet. Dies gilt auch für andere TPR-Domänen (Scheufler *et al.*, 2000; Ramsey and Chinkers, 2002; Ward *et al.*, 2002). Weiterhin sind z.B. von Hop (Scheufler *et al.*, 2000) und Cyp40 (Ward *et al.*, 2002) bereits Cokristallisationen der TPR-Domäne mit dem EEDV-Bindemotiv des Hsp90 durchgeführt und deren dreidimensionale Struktur veröffentlicht worden. Anhand einer Cokristallisation von TWD-MA mit Hsp90 wäre festzustellen, ob im Fall des TWD-Proteins, die Bindung von Hsp90 ebenfalls in der zentralen Furche der TPR-Untereinheit stattfindet.

#### 4.4. Kernresonanzspektroskopie

Anders als die Strukturbestimmung mittels Röntgendiffraktion an Proteinkristallen, erlaubt die Kernresonanzspektroskopie die Lösung von dreidimensionalen Molekülstrukturen in Lösung. Da das vollständige TWD-Protein mit 42 kDa am oberen Ende des mit NMR lösbaren steht, wurde die FKBP-Domäne einschließlich des N-terminalen Endes zur Strukturbestimmung mittels NMR ausgewählt. Für die Herstellung von Proben für die NMR-Spektroskopie ist isotopenmarkiertes-TWD12D aus *E.coli* gereinigt worden. Expression und Reinigung wurden bis auf den Einsatz von isotopenmarkiertem Medium, wie in Kamphausen *et al.* (2002) beschrieben, durchgeführt. Somit stand gereinigtes TWD12D(CN) in einer Konzentration von 1,4 mM für die folgenden NMR-Experimente zur Verfügung.

Es kamen moderne, mittlerweile Standard gewordene mehrdimensionale, heteronukleare NMR-spektroskopische Methoden in Lösung (Kay, 1997) zur Anwendung.

##### 4.4.1. Stand der Auswertung

Es ist bereits in kurzer Zeit gelungen, von 172 möglichen Proteinerückgrat-( $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ )-Amidresonanzen (180 minus 8 Proline) 68 Reste sequenzspezifisch zuzuordnen (40 %).

Bereits zu dem jetzigen Zeitpunkt der Auswertung können mehrere Feststellungen gemacht werden:

1. Ein Teil der Struktur scheint in mehreren Konformationen vorzukommen, da mehrere aufgespaltene Signale beobachtet werden können (Abb. 17.b). Auch fehlende Signale können auf dieses Phänomen hindeuten. Da nur 192 der 196 erwarteten ( $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ )-Amidresonanzen gefunden wurden, kann man vermuten, daß entweder ein paar Signale fehlen, aufgrund der

geringen Signalstärke im Hintergrund verschwinden oder mit anderen Signalen stark überlappen.

2. Ein Teil der Struktur scheint ungeordnet zu sein, da einige der Signale in den Bereich um 8 ppm der Protonendimension fällt. Diese Signale überschneiden sich sehr stark und erschweren somit die Auswertung.

3. Anhand des Spektrums der degenerierten Probe (Kapitel 3.6.3.1.) konnte beobachtet werden, daß die überlappenden Signale in dem Bereich um 8 ppm der Protonendimension verschwanden. Diese Ergebnisse deuten auf einen Abbau der Probe hin. Daher muß man davon ausgehen, daß das degenerierte Protein N- und/oder C-terminal verkürzt vorlag. Diese Beobachtung erlaubt den gleichen Schluß wie die bereits erwähnte Beobachtung der diffusen Hintergrundstreuung bei den Beugungsaufnahmen.

#### **4.4.2. Ausblick auf weitere NMR-Studien**

Absehbar ist, daß die überlappenden Signale größere Probleme bei der Zuordnung der Resonanzen bereiten können. Daher ist zu überlegen, ob ein verkürztes Konstrukt hergestellt werden sollte. Dieses könnte die Aminosäuren 40-165 umfassen und sich somit ausschließlich auf die FKBP-Domäne des TWD-Proteins beziehen (ohne den unbekanntes N-terminalen Bereich und ohne den Beginn der TPR-Domäne). Wie anhand des Spektrums der degenerierten Probe zu vermuten ist, dürfte ein solches Konstrukt keine überlappenden Signale mehr erzeugen.

Neben der Strukturbestimmung der FKBP-Domäne ist ebenfalls die Strukturbestimmung der TPR-Domäne von Interesse. Hierfür würde sich ein Konstrukt anbieten, welches die Aminosäuren 165 bis 339 des TWD Protein umfaßt. Dies schließt die TPR-Domäne mit der putativen Calmodulinbindestelle ein.

Sind die Resonanzen den spezifischen Atomen der Domänen zugeordnet, ergeben sich neben der Strukturbestimmung eine Reihe weiterer möglicher Experimente. So kann man Hinweise auf die Dynamik des Moleküls erhalten oder Bindungsstudien mit kleinen Molekülen oder Peptiden durchführen. Anbieten würde sich im Fall von TWD primär die Untersuchung der Bindeeigenschaften von FK506 und von Hsp90. Ebenso kann die Bindung des ABC-Transporters PGP1 getestet werden. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, TWD auf eine mögliche Bindung an Brassinolid zu testen, um zu zeigen, ob TWD direkt an der Perzeption von Brassinolid beteiligt ist oder erst auf die Signalweiterleitung Einfluß nimmt.

Mit Hilfe von “Residual Dipolar Couplings” können Aussagen über die Anordnung der Domänen untereinander gemacht werden. Diese Information kann auch als Ergänzung zu den kristallographischen Untersuchungen dienen (Prestegard, 1998; Clore, 2000), da ein möglicher Einfluß der Kristallpackung auf die Ausrichtung der Domänen keine Rolle spielt. Zusätzlich können diese Experimente die ermittelten Strukturen verfeinern (Prestegard *et al.*, 2000).

Eine weitere neue im Fall von TWD interessante Technik ist die Domänen-Isotopenmarkierung mittels Intein-Splicing (Otomo *et al.*, 1999). Es ist hierbei möglich, gezielt nur einzelne Domänen mit Isotopen zu markieren. Dies bietet mehrere Vorteile. Man die Struktur der Domänen innerhalb größerer Proteine einfacher bestimmen. Dies ermöglicht es auch Bindestudien durchzuführen, für die möglicherweise beide Domänen benötigt werden. Mit dieser Technik kann man Signalüberlappungen verhindern, indem jeweils nur die Signale der entsprechend markierten Domäne beobachtbar sind.

## 5. Zusammenfassung

Das Twisted-Dwarf (TWD) - Protein aus *Arabidopsis thaliana* gehört zu der Klasse der FK506 bindenden Proteine (FKBP). Proteine dieser Klasse werden häufig in Multiproteinkomplexen gefunden.

TWD<sup>-</sup>-Pflanzen zeigen einen pleiotropen Phänotyp, der sowohl in starkem Maße die Morphologie als auch den Entwicklungszyklus der Pflanze betrifft. In Kombination mit Interaktionsstudien zellulärer Partner kann die Struktur des TWD-Proteins wichtige Informationen über die Prozesse liefern, die für die Pflanzenarchitektur wichtig sind.

In dieser Arbeit wurden zunächst Protokolle zur heterologen Expression des TWD-Proteins in *E.coli* und zur Reinigung des rekombinanten Proteins entwickelt. Durch molekularbiologische Methoden wurde dem TWD C-terminal ein Affinitätstag angefügt. Die Reinigung erfolgte sequentiell über IMAC, Gelfiltrations- und Ionenaustauschchromatographie. Sowohl Reinheit als auch Menge an rekombinantem Protein reichten für eine eventuelle Kristallisation aus. Allerdings war es nicht möglich, das Protein auf mehr als 2 mg/ml zu konzentrieren. Aus diesem Grund wurde mit zwei verkürzten Konstrukten des TWD-Proteins, die von T. Kamphausen zur Verfügung gestellt wurden, weitergearbeitet: TWD ohne Membrananker (TWD-MA) und der N-terminalen FKBP-Domäne (TWD12D).

Unter Verwendung von Na-Formiat konnte TWD-MA und von Ammoniumsulfat und Ammoniumphosphat als Fällungsmittel konnte TWD12D kristallisiert werden. Zu bemerken ist die sehr lange Kristallisationszeit von bis zu einem Jahr. Im Fall des TWD-MA konnten Synchrotron Datensätze dreier nativer und dreier mit Schweratomen derivatisierter Kristalle aufgenommen werden. Mit diesen Datensätzen wird derzeit mit Hilfe des isomorphen Ersatzes die Molekülstruktur des TWD-MA bestimmt.

Erste Röntgenbeugungsaufnahmen eines TWD12D Kristalles zeigen eine sehr gute Diffraktion, die bei Synchrotronstrahlung eine Auflösung von etwa 2 Å haben wird.

Ziel der weiteren Arbeiten wird sein, die Struktur des TWD-MA zu bestimmen, Datensätze der TWD12D Kristalle aufzunehmen und ebenfalls deren Struktur zu bestimmen. Des Weiteren gilt es die Kristallisationsbedingungen weiter zu verbessern, um die Kristallisationszeit herabzusetzen.

Neben den röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden auch NMR-spektroskopische Experimente zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das TWD12D mit Isotopen markiert. Alle notwendigen Experimente zur Resonanzzuordnung wurden durchgeführt und die Zuordnung begonnen.

Erste Ergebnisse beider Techniken deuten darauf hin, daß N-terminal die ersten 40 Aminosäuren unstrukturiert sind. Daher ist sowohl für die Qualität der Kristalle als auch für die Auswertung der NMR-Experimente zu überlegen, mit einem um diese Aminosäuren verkürzten Protein zu arbeiten.



## 6. Literaturverzeichnis

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20, *Cell* 100, 551-560

Arabidopsis Genome Initiative (2000) analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.

Ausubel, F.M., Brent, A., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol 1-Vol 4 Wiley & Sons, New York

Baldi, P., Brunak, S., Frasconi, P., Pollastri, G., Soda, G. (1999) Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 15, 937-946.

Bartels, C., Xia, T.-H., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) the program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J.Biomol-NMR* 5, 1-10

Bax, A., Clore, G., Driscoll, P., Gronenborn, A., Ikura, M., and Kay, L. (1990). practical aspects of proton-carbon-carbon-proton three-dimensional correlation spectroscopy of <sup>13</sup>C-labeled proteins. *J.Magn.Res.* 87, 620-627

Berger, J.(1997) Heterologe Expression und Charakterisierung des TWD Proteins aus *Arabidopsis thaliana* in *E.coli*, Universität zu Köln, Diplomarbeit

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research* 28, 235-242

Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999) The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21, 932-939

Blundell, T.L. and Johnson, L.N. (1993, dritte Ausgabe) Protein Crystallography, Academic Press Inc (London) Ltd. (Erstausgabe 1973).

Bodenhauser, G., and Ruben, D. (1980) natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. Chem.Phys.Lett. 69, 185.

Bohm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, Protein Eng. 5, 191-195

Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., and Steahlin, H. (1976) Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. Agents Actions Suppl. 6, 468-475

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72, 248-254

Brillantes, A.M., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., and Marks, A. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell 77, 513-523

Burkhard, P., Taylor, P., and Walkinshaw, M.D. (2000) x-ray structures of small ligand-FKBP complexes provide an estimate for hydrophobic interaction energies. J.Mol.Biol. 295, 953-962

Cameron, A.M., Steiner, J.P., Sabatini, D.M., Kaplin, A.I., Walensky, L.D., Snyder, S.H. (1995) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-triphosphate receptor modulates calcium flux. Proc.Natl.Sci. USA 92, 1784-1788

Cardenas, M.E., Hemenway, C., Muir, R.S., Ye, R., Fiorentino, D., and Heitman, J. (1994) Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. Embo 13, 5944-5957

Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1996) Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. Science 273, 239-242

Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L.W., Hatada, M., Amara, J.F., Rollins, C.T., Stevenson, L.F., Magari, S.R., Wood, S.A., Courage, N.L., Lu, X., Cerasoli, F., Gilman, M., and Holt, D.A. (1998) redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Biochemistry* 95, 10437-10442

Clore, G.M. (2000) accurate and rapid docking of protein-protein complexes on the basis of intermolecular nuclear Overhauser enhancement data and dipolar couplings by rigid body minimization. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 97, 9021-9025

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; *Prot.Eng.* 10, 673-676

Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPherson, A. (1994) *Acta Cryst.* D50, 414-423

Das, A.K., Cohen, P.T.W., and Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17, 1192-1199

DeCenzo, M.T., Park, S.T., Jarrett, B.P., Aldape, R.A., Futer, O., Murcko, M.A., and Livingston, D.J. (1996) FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes., *Protein Engineering* 9, 173-180

Deivanayagam, C.C.S., Carson, M., Thotakura, A., Narayana, S.V.L., and Chodavarapu, R.S. (2000) structure of FKBP12.6 in complex with rapamycin. *Acta Crystallographica Section D* 56, 266-271

de Jongh, H.H.J., Goormaghtigh, E., and Ruyschaert, J.-M. (1996). The different molar absorptivities of the secondary structure types in the amide I region: an attenuated total reflection infrared study on globular proteins. *Analytical Biochemistry* 242, 95-103.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J.Biomol.NMR* 6(3), 277-293.

Dittmar, K.D., Demady, D.R., Stancato, L.F., Krishna, P., and Pratt, W.B. (1997) Folding of the Glucocorticoid Receptor by the Heat Shock Protein (hsp) 90-based Chaperone Machinery, *J.Biol.Chem.* 272, 21213-21220

Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., and Heitman, J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensible for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Sci. USA* 94, 13093-13098

Eckhoff, A. (1999) Funktionelle Untersuchung der Domänenstruktur des TWD-Gens in *Arabidopsis thaliana*, Universität zu Köln, Diplomarbeit

Feldmann, K.A. (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal* 1, 71-82

Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-478

Galigniana, M.D., Radanyi, C., Renoir, J.-M., Housley, P.R., and Pratt, W.B. (2001) evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J.Biol.VChem.* 276(18), 14884-14889

Galla, H.J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme Verlag, New York

Gatto, G.J., Jr., Geisbrecht, B.V., Gould, S.J., and Berg, J.M. (2000) Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5, *Nat. Struct. Biol.* 7, 1091-1095

Geisler, M., Kolukisaoglu, H.Ü., Billion, K., Berger, J., Saal, B., Bouchard, R., Fragne, N., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Dudler, R., Martinoia, E., and Schulz, B. (2002) Twisted Dwarf1, a unique membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1. *JBC*, in press

Goebel, M., and Yanagida, M. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 173-177

[1] Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J.Am.Chem.Soc.* 114, 6291-6293

[2] Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31kDa protein. *J.Magn.Res.* 96, 432-440

[3] Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) an efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *J.Magn.Res.* 99, 201-207

Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J.Biomol.NMR.* 3(2), 185-204

Grzesiek, S., Anglister, J., and Bax, A. (1993) correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonances in  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of  $^{13}\text{C}$  magnetization. *J.Magn.Res.* 101, 114-119

Hanahan, D. (1985) Techniques for Transformation of *E.coli* (In: Rickwood, D., Hames, B.D. *DNA Cloning, a practical approach.* IRL Press, 1, 109-135)

Handschuhmacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., and Speicher, D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 266, 544-547

Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., Schreiber, S.L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760

Harrar, Y., Bellini, C., and Faure, J.-D. (2001) FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in plant science* 6(9), 426-431

Hasilik, A. and Neufeld, E.F. (1980) Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts, synthesis as precursors with higher molecular weight. *J.Biol.Chem.* 255, 4937-4945

Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K., and Yanagida, M. (1990) Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein *nuc2+*, *Cell* 60, 319-328

Hueros, G., Rahfeld, J., Salamini, F., and Thompson, R. (1998) A maize FK506-sensitive immunophilin, *mzFKBP-66*, is a peptidylprolyl cis-trans-isomerase that interacts with calmodulin and a 36-kDa cytoplasmatic protein. *Planta* 205, 121-131

Ikura, M., Kay, L.E., and Bax, A. (1990) a novel approach for sequential assignment of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. application to calmodulin. *Biochemistry* 29(19), 4659-4667

Irmer, H., and Höhfeld, J. (1997) Characterization of functional domains of the eukaryotic co-chaperone *Hsp*, *J. Biol. Chem.* 272, 2230-2235

Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991) *J.Appl.Cryst.* 24, 409-411

Kamphausen, T., Fanghänel, J., Neumann, D., Schulz, B., and Rahfeld, J.-U. (2002) Characterisation of *Arabidopsis thaliana* *AtFKBP42* that is membrane bound and interacts with *hsp90*, in press

Kay, J.E. (1997) NMR methods for the study of protein structure and dynamics. *Biochem.Cell.Biol.* 75(1), 1-15

- Kay, J.E. (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochemical Journal* 314, 361-385
- Kay, J.E., Benzie, C.R., and Borghetti, A.F. (1983) Effects of cyclosporin A on lymphocyte activation by the calcium ionophore A23187. *Immunology* 50, 441-446
- Kay, L., Keifer, P., and Saarinen, T. (1992) pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J.Am.Chem.Soc.* 114, 10663-10665.
- Khyse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?, *Trends Biochem. Sci* 20, 257-259
- Liang, J., Choi, J., and Clardy, J. (1999) refined structure of the FKBP12-rapamycin-FRB ternary complex at 2.2Å resolution. *Acta Crystallographica Section D* 55, 736-744
- Luan, S., Albers, M.W., and Schreiber, S.L. (1994) Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proc.Natl.Sci. USA* 91, 984-988
- Luan, S., Kudla, J., Grissem, W., and Schreiber, S.L. (1996) Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants. *Proc.Natl.Sci. USA* 93, 6964-6969
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J.Magn.Reson.* 85, 393-399.

Markley, J.L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C.W., Kaptein, R., Sykes, B.D., Wright, P.E., and Wuthrich, K. (1998) recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union task group on the standardization of Data bases of Protein and Nucleic Acid Structures determined by NMR spectroscopy. *J.Biomol. NMR* 12(1), 1-23.

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Röber, B., and Schulz, B. (2002) multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355.

McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. 16, 404-405.

McClelland, J.L., and Rumelhart, D.E. (1988) *Explorations in Parallel Distributed Processing*. vol 3. pp 318-362. MIT Press, Cambridge MA.

McPherson Jr., A. (1976) The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Methods Biochem Anal.* 1976;23(0):249-345

Meyerowitz, E.M.(1987) *Arabidopsis thaliana*, *Annu.Rev.Genet.* 21, 93-114

Otomo, T., Ito, N., Kyogoku, Y., and Yamazaki, T. (1999) NMR observation of selected elements in a larger protein: central-segment isotope labeling through intein-mediated ligation. *Biochemistry* 38, 16040-16044

Peitsch, M.C. (1995) protein modeling by , *bio/technology* V.13, 658, ISSN 0733-222X

Prestegard, J.H. (1998) new techniques in structural NMR - anisotropic interactions. *Nat. Struct.Biol.* 5, 517-522

- Prestegard, J.H., Al-Hashimi, H.M., and Tolman, J.R. (2000) NMR structures of biomolecules using field oriented media and residual polar couplings. *Q.Rev.Biophys.* 33,371-424
- Promodrou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones, *EMBO J.* 18, 745-762
- Rahmelow, K., Hübner, W., and Ackermann, T. (1998). Infrared absorbances of protein side chains. *Analytical Biochemistry* 257, 1-11
- Ramsey, A.J., and Chinkers, M. (2002) identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry* 41, 5625-5632.
- Ramsey, A.J., Russell, L.C., Whitt, S.R., and Chinkers M. (2000) Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90, *J Biol Chem* 275, 17857-62
- Reddy, R.K., Kurek, I., Silverstein, A.M., Chinkers, M., Breimann, A., Krishna, P. (1998) High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiol.* 118, 1395-1401
- Riboldi-Tunnicliffe A, König B, Jessen S, Weiss MS, Rahfeld J, Hacker J, Fischer G, and Hilgenfeld R. (2001) Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from *Legionella pneumophila*, *Nat Struct Biol* 8, 779-83
- Roseman, M.A. (1988) Hydrophilicity of polar amino acid side-chains is markedly reduced by flanking peptide bonds, *J.Mol.Biol.* 200, 513-522
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy, *J Mol Biol*, 232:584-599

Russell, L.C., Whitt, S.R., Chen, M.S., Chinkers, M. (1999) Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90, *J Biol Chem* 274, 20060-3

Saal, B. (1998) Charakterisierung und Expressionsanalyse des TWISTED DWARF Gens aus *Arabidopsis thaliana*. Universität zu Köln, Dissertation

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., and Moarefi, I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine, *Cell* 101, 199-210

Schiene-Fischer, C., and Yu, C. (2001) Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases, *FEBS Letters* 495, 1-6

Schmidt, R. (1998) Physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 1-8

Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.-J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., and Matzuk, M. (1999) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391, 489-492

Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M., and Hieter, P. (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis, *Cell* 60, 307-317

Sklenar, V., and Bax, A. (1987) *J. Magn. Reson.* 74, 469-479

Snyder, S.H., Lai, M.M., and Burnett, P.E. (1998) immunophilins in the nervous system. *Neuron* 21, 283-294

Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., and Chapman, D. (1993) determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394

Taylor, P., Dornan, J., Carello, A., Minchin, R.F., Ratajczak, T., and Walkinshaw, M.D. (2001) two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure* 9, 431-438

Teng, T.Y. (1990) Mounting of crystals for macromolecular crystallography in a free-standing thin film. *J. Appl. Cryst.* 23, 387

Tocci, M.J., Matkovich, D.A., Collier, K.A., Kwok, P., Dumont, F., Lin, S., Degudicibus, S., Siekierka, J.J., Chin, J., and Hutchinson, N.I. (1989) The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *Journal of Immunology* 143, 718-726

Tradler, T., Stoller, G., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A., Rahfeld, J.-U., and Fischer, G. (1997) comparative mutational analysis of peptidyl prolyl cis/trans isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12, *FEBS Letters* 407, 184-190

Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J.D., Caboche, M., and Bellini, C. (1998) Mutation in the *Arabidopsis* PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding proteinlike protein, has a dramatic effect on plant development. *Molecular & Cellular Biology* 18, 3034-3043

Vucich, V.A., and Gasser, C.S. (1996) Novel structure of a higher molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular General Genetics* 252, 510-517

Wang, T.W., Danohoe, P.K., and Zervos, A.S. (1994) Specific interaction of Type I receptors of the TGF- $\beta$  family with the immunophilin FKBP12. *Science* 265, 674-676

Wanke, D. (1999) Morphologische und physiologische Untersuchung der twisted dwarf-Mutanten aus *Arabidopsis thaliana*, Universität zu Köln, Diplomarbeit

Ward, B.K., Allan, R.K., Mok, D., Temple, S.E., Taylor, P., Dornan, J., Mark, P.J., Shaw, D.J., Kumar, P., Walkinshaw, M.D., and Ratajczak, T. (2002) a structure-based mutational analysis of cyclophilin 40 identifies key residues in the core tetratricopeptide repeat domain that mediate binding to hsp90. *J.Biol.Chem.* Jul.26 [epub ahead of print]

Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., and Vaillancout, P. (1994) *Strategies* 7, 41-43.

Wilder, C.L., Friedrich, A.D., Potts, A.O., Daumy, G.O., and Francoeur, M.L. (1992) Secondary Structural Analysis of two recombinant murine proteins, interleukins 1a and 1b: is infrared spectroscopy sufficient to assign structure ? *Biochemistry* 31, 27-31

Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1991) relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J.Mol.Biol.* 222, 311-333

Wu, S.-J., Liu, F.-H., Hu, S.-M., and Wang, C. (2001) different combinations of the heat shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins. *Biochem.J.* 359, 419-426

Zuiderweg, E.R., and Fesik, S.W. (1989) heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry* 28(6), 2387-2391

## 7. Anhang

### 7.1. Zusammensetzung der “Crystal Screens I & II”

#### 7.1.1. Crytsal Screen I

1. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.02 M Calcium Chloride
2. 0.4 M K, Na Tartrate
3. 0.4 M Ammonium Phosphate
4. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
5. 30% MPD, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate
6. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Magnesium Chloride
7. 1.4 M Sodium Acetate, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5
8. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Sodium Citrate
9. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate
10. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Acetate
11. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
12. 30% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride
13. 30% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Citrate
14. 28% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Calcium Chloride
15. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ammonium Sulfate
16. 1.5 M Lithium Sulfate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
17. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Lithium Sulfate
18. 20% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate
19. 30% iso-Propanol, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium Acetate
20. 25% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate
21. 30% MPD, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Magnesium Acetate
22. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Sodium Acetate
23. 30% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride
24. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Calcium Chloride
25. 1.0 M Sodium Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5
26. 30% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate
27. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Sodium Citrate
28. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Sodium Acetate
29. 0.8 M K, Na Tartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
30. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate
31. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate
32. 2.0 M Ammonium Sulfate
33. 4.0 M Sodium Formate
34. 2.0 M Sodium Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
35. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
36. 8% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
37. 8% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
38. 1.4 M Sodium Citrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
39. 2% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 2.0 M Ammonium Sulfate
40. 20% iso-Propanol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 20% PEG 4000
41. 10% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 20% PEG 4000
42. 20% PEG 8000, 0.05 M Potassium Phosphate
43. 30% PEG 1500
44. 0.2 M Magnesium Formate

## ZUSAMMENSETZUNG DER “CRYSTAL SCREENS I & II”

45. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Zinc Acetate
46. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Calcium Acetate
47. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Sodium Acetate pH 4.6
48. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
49. 2% PEG 8000, 1.0 M Lithium Sulfate
50. 15% PEG 8000, 0.5 M Lithium Sulfate

### 7.1.2. Crystal Screen II

1. 10% PEG 6000, 2.0 M Sodium Chloride
2. 0.5 M Sodium Chloride, 0.01 M CTAB, 0.01 M Magnesium Chloride
3. 25% Ethylene Glycol
4. 35% Dioxane
5. 5% iso-Propanol, 2.0 M Ammonium Sulfate
6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. 10% PEG 1000, 10% PEG 8000
8. 10% Ethanol, 1.5 M Sodium Chloride
9. 2.0 M Sodium Chloride, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
10. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Sodium Chloride
11. 1.0 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.01 M Cobalt Chloride
12. 30% PEG 400, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Cadmium Chloride
13. 30% PEG MME 2000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate
14. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M K/Na Tartrate
15. 1.0 M Lithium Sulfate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Ammonium Sulfate
16. 2% Polyethyleneimine, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Sodium Chloride
17. 35% tert-Butanol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
18. 10% Jeffamine M-600, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.01 M Ferric Chloride
19. 2.5 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
20. 1.6 M Magnesium Sulfate, 0.1 M MES pH 6.5
21. 2.0 M Sodium Chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Na/K Phosphate
22. 12% PEG 20,000, 0.1 M MES pH 6.5
23. 10% Dioxane, 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Ammonium Sulfate
24. 30% Jeffamine M-600, 0.1 M MES pH 6.5, 0.05 M Cesium Chloride
25. 1.8 M Ammonium Sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Cobalt Chloride
26. 30% PEG MME 5000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Ammonium Sulfate
27. 25% PEG MME 550, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Zinc Sulfate
28. 1.6 M Sodium Citrate pH 6.5
29. 30% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.5 M Ammonium Sulfate
30. 10% PEG 6000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 5% MPD
31. 20% Jeffamine M-600, 0.1 M Hepes pH 7.5
32. 1.6 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.1 M Sodium Chloride
33. 2.0 M Ammonium Formate, 0.1 M Hepes pH 7.5
34. 1.0 M Sodium Acetate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.05 M Cadmium Sulfate
35. 70% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5
36. 4.3 M Sodium Chloride, 0.1 M Hepes pH 7.5
37. 10% PEG 8000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 8% Ethylene Glycol
38. 20% PEG 10,000, 0.1 M Hepes pH 7.5
39. 3.4 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Magnesium Chloride
40. 25% tert-Butanol, 0.1 M Tris pH 8.5
41. 1.0 M Lithium Sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Nickel (II) Chloride
42. 12% Glycerol, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.5 M Ammonium Sulfate

43. 50% MPD, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Ammonium Phosphate
44. 20% Ethanol, 0.1 M Tris pH 8.5
45. 20% PEG MME 2000, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Nickel (II) Chloride
46. 20% PEG MME 550, 0.1 M Bicine pH 9.0, 0.1 M Sodium Chloride
47. 2.0 M Magnesium Chloride, 0.1 M Bicine pH 9.0
48. 10% PEG 20,000, 0.1 M Bicine pH 9.0, 2% Dioxane

## 7.2. Scriptprogramme *getp* und *get2*

### 7.2.1. *getp*

```
#!/home/osiris/eckhoff/freeware/php/php -q
<?php
function getpeaks($nr)
{
    global $file;
    $fd = @fopen ($file, "r");
    if ($fd)
    {
        while (!feof($fd))
        {
            $buffer = fgets($fd, 4096);
            $zahl = str_replace(" ", "", substr($buffer,1,5));
            if ($zahl == $nr)
            {
                $data['NR'] = $nr;
                $data['C'] = str_replace(" ", "", substr($buffer,5,7));
                print(substr($buffer,0,28)."\n-----\n");
                fclose ($fd);
                return $data;
            }
        }
        fclose ($fd);
    }
    exit("Peak konnte nicht gefunden werden !");
}

function showcorr($data)
{
    global $clim, $file;

    $fd = @fopen ($file, "r");
    while (!feof($fd))
    {
        $buffer = fgets($fd, 4096);
        $nr      = str_replace(" ", "", substr($buffer,0,5));
        $cshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,5,7));

        if (($data['C']>($cshift-$clim) && $data['C']<($cshift+$clim)) && ($nr !=
$data['NR']))
        {
            if ($data)
            {
                print(substr($buffer,0,28)."\n");
                //print($data."\n");
            }
        }
    }
}
```

## SCRIPTPROGRAMME GETP UND GET2

```
        fclose ($fd);
    }

    if ($argv[2] == "e")
    {
        $clim = 0.3;
    }
    elseif ($argv[2] == "v")
    {
        $clim = 0.1;
    }
    else
    {
        $clim = 0.0;
    }

    $file = "./CBCANH_comments.peaks";
    $data1 = getpeaks($argv[1]);
    //print_r($data1);
    showcorr($data1);
```

?>

### 7.2.2. get2

```
#!/home/osiris/eckhoff/freeware/php/php -q
```

```
<?php
```

```
function showPairs($file, $data1, $data2)
{
    global $clim;
    //$clim = 0.2;
    $hlim = 0.05;
    $nlim = 0.05;

    $fd = @fopen ($file, "r");
    while (!feof($fd))
    {
        $buffer = fgets($fd, 4096);
        $nr      = str_replace(" ", "", substr($buffer,0,5));
        $hshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,14,6));
        $nshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,21,7));
        $cshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,5,7));

        if (($data1['C']>($cshift-$clim) && $data1['C']<($cshift+$clim)) && ($nr
!= $data1['NR'] && $nr != $data2['NR']))
        {
            $dummy = getpeaks($file, $nr);
```

```

        $data = getsimilar($file, $dummy, $data2['C'], $data1['NR'],
$data2['NR']);
    if ($data)
    {
        print(substr($buffer,0,28)."\n");
        print($data."\n");
    }
}
fclose ($fd);
}

function getsimilar($file, $dummy, $suche, $stop1, $stop2)
{
    global $clim;
    //$clim = 0.2;
    $hlim = 0.05;
    $nlim = 0.05;

    $fd = @fopen ($file, "r");
    while (!feof($fd))
    {
        $buffer = fgets($fd, 4096);
        $nr = str_replace(" ", "", substr($buffer,0,5));
        $hshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,14,6));
        $nshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,21,7));
        $cshift = str_replace(" ", "", substr($buffer,5,7));

        if (($suche>($cshift-$clim) && $suche<($cshift+$clim)) && ($nr != $stop1
&& $nr != $stop2))
        {
            if ( ($hshift<($dummy['H']+$hlim) && $hshift>($dummy['H']-$hlim) ) &&
($nshift<($dummy['N']+$nlim) && $nshift>($dummy['N']-$nlim) ) )
            {
                fclose ($fd);
                return substr($buffer,0,28)."\n";
            }
        }
    }
    fclose ($fd);
    return FALSE;
}

```

## SCRIPTPROGRAMME GETP UND GET2

```
}

function getpeaks($file, $nr)
{
    $fd = @fopen ($file, "r");
    if ($fd)
    {
        while (!feof($fd))
        {
            $buffer = fgets($fd, 4096);
            $zahl = str_replace(" ", "", substr($buffer,1,5));
            if ($zahl == $nr)
            {
                $data['NR'] = $nr;
                $data['C'] = str_replace(" ", "", substr($buffer,5,7));
                $data['H'] = str_replace(" ", "", substr($buffer,14,6));
                $data['N'] = str_replace(" ", "", substr($buffer,21,7));
            }
        }
        fclose ($fd);
    }
    return $data;
}

if ($argv[3] == "e")
{
    $clim = 0.5;
}
elseif ($argv[3] == "v")
{
    $clim = 0.3;
}
else
{
    $clim = 0.15;
}
$file = "./CBCANH_comments.peaks";
$data1 = getpeaks($file, $argv[1]);
$data2 = getpeaks($file, $argv[2]);
showPairs($file, $data1, $data2);
?>
```





## 8. Abkürzungen

|                 |  |
|-----------------|--|
| 1D              | eindimensional                                     |
| 2D              | zweidimensional                                    |
| 3D              | dreidimensional                                    |
| [ $\Theta$ ]MRW | Molare Elliptizität pro Aminosäurerest             |
| $\mu$ l         | Mikroliter   |
| $\mu$ m         | Mikrometer   |
| A               | Adenosin, Ampere                                   |
| Abb.            | Abbildung  |
| AS              | Aminosäure   |
| ATR             | Attenuated Total Reflection                        |
| bp              | Basenpaare   |
| BSA             | Bovine Serum Albumin                               |
| bzw.            | beziehungsweise                                    |
| C               | Cytosin  |
| C-              | Carboxy-   |
| $^{\circ}$ C    | Grad Celsius                                       |
| ca              | circa  |
| CaM             | Calmodulin   |
| CD              | Circular Dichroism                                 |
| CHAPS           | 3-[(3-Cholamidpropyl)-dimethylammonio]propansulfat |
| cm              | Zentimeter   |
| CMC             | Critical Micelle Concentration                     |
| CSI             | Crystal Screen I                                   |
| CSII            | Crystal Screen II                                  |
| Cyp40           | Cyclophilin-40                                     |
| DDM             | <i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid             |
| DEAE            | Diethylaminoethyl                                  |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                   |
| DNS             | Desoxyribonukleinsäure                             |
| DTT             | Dithiothreitol                                     |
| dNTPs           | Desoxy-Nukleosid Triphosphat                       |
| EDTA            | N,N-Ethylendiaminotetraessigsäure                  |
| FKBP            | FK506 bindendes Protein                            |
| FTIR            | Fourier-Transform Infrarot Spectroskopie           |
| g               | Gramm, Erdbeschleunigung                           |
| G               | Guanosin   |
| h               | Stunde   |
| HEPES           | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure    |
| Hip             | Hitzeschock-Interaktions-Protein                   |

|                 |   |
|-----------------|---|
| Hop             | Hitzeschock-Organisations-Protein                                   |
| Hsp             | Hitzeschock-Protein   |
| HSQC            | Heteronuclear Single Quantum Coherence                              |
| IMAC            | Immobilised Metal Affinity Chromatography                           |
| IPTG            | Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalaktosid                                 |
| IR              | Infrarot  |
| ITC             | Isothermale-Titrations-Kalorimetrie                                 |
| K               | Kelvin  |
| kb              | Kilobasen   |
| kcal            | Kilokalorie   |
| kDa             | Kilodalton  |
| l               | Liter   |
| LDAO            | Lauryldimethylamin-Oxid   |
| M               | Molar   |
| mA              | Milli-Ampere  |
| MA              | Membrananker  |
| MALDI           | Matrix Assisted Lased Desorption Ionisation                         |
| mg              | Milligramm  |
| Mhz             | Megahertz   |
| ml              | Milliliter  |
| mM              | Millimolar  |
| min             | Minute  |
| MW              | Molekulargewicht  |
| N-              | Amino-  |
| nm              | Nanometer   |
| NMR             | Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy                             |
| NOE             | Nuclear Overhauser Effect   |
| NOESY           | Nuclear Overhauser Effect Spektroskopie                             |
| NTA             | Nitrilo Triacetic Acid  |
| OD <sub>x</sub> | Optische Dichte bei x Nanometer                                     |
| OG              | <i>n</i> -Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid                          |
| PAGE            | Polyacrylamid Gelelektrophorese                                     |
| PCR             | Polymerase Kettenreaktion   |
| PDB             | Protein Database  |
| PEG             | Polyethylenglykol   |
| PGP             | P-glycoprotein  |
| pH              | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| pI              | pH-Wert an dem ein Protein keine Ladung tragt                      |
| PP5             | Proteinphosphatase 5  |
| PPIase          | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase                        |
| ppm             | parts per million   |
| PVDF            | Polyvinylidenfluorid  |

|                |  |
|----------------|--|
| Upm            | Umdrehungen pro minute                                 |
| RT             | Raumtemperatur   |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat                                   |
| sek            | Sekunde  |
| T              | Tesla  |
| T <sub>2</sub> | transversale Relaxationszeit                           |
| Tab.           | Tabelle  |
| TBS            | Tris gepuffere Saline                                  |
| T-DNS          | transfer-DNS   |
| TEMED          | N,N,N',N',Tetramethylethyldiamin                       |
| TGF            | Transforming Growth Factor                             |
| TOCSY          | total correlated spectroscopy                          |
| TPR            | Tetratrico-Peptide-Repeat                              |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan                        |
| TWD            | Twisted Dwarf Protein                                  |
| TWD12D         | 12 kDa FKBP Domäne des TWD-Proteins (Aminosäure 1-180) |
| TWD12D(CN)     | <sup>13</sup> C/ <sup>15</sup> N markierte TWD12D      |
| TWD-MA         | TWD Protein ohne Membrananker (Aminosäure 1-339)       |
| Tween20        | Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat                  |
| U              | Unit   |
| u.a.           | unter anderem  |
| ÜN             | über Nacht   |
| UV             | Ultraviolett   |
| V              | Volt   |
| VIS            | Visible (sichtbares Licht)                             |
| v/v            | Volumenanteil  |
| wt             | wildtypisch  |
| w/v            | Masse pro Volumen                                      |
| x              | mal#   |
| z.B.           | zum Beispiel   |

Die Aminosäuresequenzen wurden im Ein- und Dreibuchstabencode nach den Regeln der "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" angegeben (Eur.J.Biochem. 5 [1968], 151-153).