

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenstrukturanalyse der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika und
Molecular Modeling von Substratkomplexen**

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an verschiedenen
19S-Untereinheiten des 26S-Proteasoms aus Hefe und Mensch**

Anja Dorowski

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Schmidbaur

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber

2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 10.07.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Chemie am 08.08.2000 angenommen.

Meiner Mutter und Volker

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Juli 2000 unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und sein fortwährendes Interesse am Fortschritt des Projektes danken. Seine wertvollen Anregungen und die große Freiheit bei der Arbeit haben zu einer sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Herrn Dr. Michael Groll danke ich für die Einarbeitung und seine Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit.

Bei Herrn Carlos Gorbea - University of Utah, Department of Biochemistry, School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA - möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung der Plasmide *pGEX-2T-S2*, *pET26b(+)-S4*, *pALTER-S7* und des Vektors *pALTER-EX2* bedanken. Zahlreiche Diskussionen bezüglich der gemeinsamen Projekte waren für mich von großem Wert.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Andrea Papendorf und Frau Barbara Grumbt für die konstruktive und harmonische Zusammenarbeit.

Der gesamten Abteilung Strukturforschung danke ich für das gute und hilfsbereite Arbeitsklima. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen Clemens Steegborn, Iris Fritze, Dr. Peter Sondermann, Stephan Ehlert, Dr. Oliver Einsle, Jens Kaiser und Dr. Manual Than, die mir stets mit fachkundigem Rat und vielen Anregungen zur Seite standen und somit zum Fortgang dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Dr. Marius Boicu danke ich für die vielen durchgeführten DNA-Sequenzierungen, sowie Herrn Josef Kellermann und Herrn Karl-Heinz Mann für die Proteinsequenzierungen durch Edman-Abbau.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Renate Rüller und Frau Gina Beckmann für ihre Unterstützung bei allen administrativen Dingen. Herrn Werner Dersch danke ich für die prompte Hilfe bei der Beseitigung vieler technischer Probleme.

Dr. Erich Fritsche danke ich für seinen Rückhalt, seine Geduld und seine moralische Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und Herrn Dr. Dr. Volker Fuchs für ihr Vertrauen, ihre fortwährende Unterstützung, den starken Rückhalt und die vielen aufbauenden Worte.

Teile dieser Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht in:

Bochtler, M., Ditzel, L., Hartmann, C., Dorowski, A., Huber, R. & Groll, M. (2000). Proteasome crystal structures. In: Proteasomes: The World of Regulation, edited by Wolfgang Hilt & Dieter H. Wolf (in press).

Hofmann, A., Proust, J., Dorowski, A., Schantz, R. & Huber, R. (2000). Annexin 24 from *Capsicum annuum*: X-ray structure and biochemical characterisation. *J. Mol. Biol.* **275**, 8072-8082.

Dorowski A., Hofmann A., Steegborn C., Boicu M. & Huber, R. (2000). Crystal structure of paprika ferredoxin-NADP⁺ reductase – implications for the electron transfer pathway. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1. TEIL I: FERREDOXIN-NADP ⁺ REDUKTASE AUS PAPRIKA	1
1.2. TEIL II: UNTEREINHEITEN DER 19S-KAPPE	3
2. EINLEITUNG	4
2.1. TEIL I: FERREDOXIN-NADP ⁺ REDUKTASE AUS PAPRIKA	4
2.1.1. Photosynthese	4
2.1.2. Das Enzym Ferredoxin-NADP ⁺ Reduktase	5
2.1.3. Die Proteinfamilie der Ferredoxin-NADP ⁺ Reduktasen	6
2.1.4. Der Redoxpartner [2Fe-2S]-Ferredoxin I	8
2.1.5. Die Elektronenübertragung zwischen FNR und [2Fe-2S]-Ferredoxin I	9
2.1.6. Aufgabenstellung	10
2.2. TEIL II: UNTEREINHEITEN DES 26S-PROTEASOMS	11
2.2.1. Der proteolytische Proteinabbau	11
2.2.2. Das 20S-Proteasom	12
2.2.3. Das 26S-Proteasom	12
2.2.4. Untereinheiten des Base-Komplexes des 26S-Proteasoms	14
2.2.4.1. Die ATPasen der AAA-Proteinfamilie	14
2.2.4.2. Das Protein S2 (Rpn1)	15
2.2.5. Aufgabenstellung	15
3. MATERIALIEN UND GERÄTE	16
3.1. OLIGONUKLEOTIDE	16
3.2. PLASMIDE	19
3.3. BAKTERIEN	19
3.4. HEFEN	21
3.5. ENZYME, ISOLIERUNGSKITS, SÄULENMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	21
3.6. SONSTIGE MATERIALIEN	21
3.7. GERÄTE	22
4. METHODEN	23
4.1. ARBEITEN MIT RNA	23
4.1.1. Isolierung von RNA aus Blättern der Paprikapflanze	23
4.1.1.1. Isolierung der zellulären Gesamt-RNA	23
4.1.1.2. Isolierung von mRNA	24
4.1.2. Charakterisierung von RNA	24
4.1.2.1. Formaldehyd-Gelelektrophorese	24
4.1.2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	25
4.1.3. cDNA Synthese	26
4.1.4. Charakterisierung von cDNA	27
4.1.4.1. Vertikale Agarose-Gelelektrophorese	27
4.1.4.2. Bestimmung der cDNA-Konzentration	28
4.2. ARBEITEN MIT DNA	28

4.2.1.	Reinigung und Charakterisierung von DNA	28
4.2.1.1.	Agarose-Gelelektrophorese	28
4.2.1.2.	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	29
4.2.1.3.	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
4.2.1.4.	DNA-Sequenzierung	29
4.2.2.	Vermehrung und Präparation von DNA und DNA-Fragmenten	30
4.2.2.1.	Polymerasekettenreaktion	30
4.2.2.2.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.2.3.	Enzymatische Reaktionen an DNA	31
4.2.3.1.	Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen	31
4.2.3.2.	Ligation von DNA-Fragmenten	32
4.3.	ARBEITEN MIT BAKTERIEN	32
4.3.1.	Anzucht von Bakterien	32
4.3.1.1.	Platten- und Glycerinkulturen	32
4.3.1.2.	Flüssigkulturen	33
4.3.1.3.	Fermentation von <i>E. coli</i>	33
4.3.2.	Arbeiten mit transformationskompetenten Zellen	36
4.3.2.1.	Herstellung transformationskompetenter Zellen	36
4.3.2.2.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	37
4.4.	ARBEITEN MIT HEFEN	38
4.4.1.	Anzucht von Hefen	38
4.4.1.1.	Platten- bzw. Flüssigkulturen	38
4.4.1.2.	Fermentation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.4.2.	Arbeiten mit transformationskompetenten Hefen	41
4.4.2.1.	Herstellung transformationskompetenter Hefezellen	41
4.4.2.2.	Transformation kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
4.5.	ARBEITEN MIT PROTEINEN	42
4.5.1.	Charakterisierung von Proteinen	42
4.5.1.1.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
4.5.1.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
4.5.1.3.	Western Blotting	44
4.5.1.4.	Proteinfärbung	44
4.5.1.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
4.5.1.6.	Molekulargewichtsbestimmung durch Gelpermeationschromatographie	46
4.5.1.7.	Massenspektrometrie	47
4.5.1.8.	N-terminale Proteinsequenzierung	47
4.5.1.9.	Aktivitätstest für die 19S-ATPasen	48
4.5.2.	Enzymatische Reaktionen an Proteinen	49
4.5.2.1.	Proteolyse von Fusionsproteinen	49
4.5.2.2.	Limitierte Proteolyse	49
4.5.3.	Konzentrierung von Proteinlösungen	50
4.5.4.	Renaturierung von Proteinen aus Einschlußkörperchen	50
4.5.5.	Proteinpräparation	52
4.5.5.1.	Reinigung der nativen und rekombinanten pFNR	52
4.5.5.2.	Reinigung des rekombinanten pFd	54
4.5.5.3.	Reinigung des rekombinanten GST-markierten S2 aus Mensch	55
4.6.	KRISTALLOGRAPHISCHE ARBEITEN	56
4.6.1.	Kristallisation	57
4.6.2.	Kristallaufbau	58

4.6.3.	Röntgenbeugung an Proteinkristallen	58
4.6.4.	Datensammlung und Datenreduktion	61
4.6.5.	Bestimmung der Anzahl der Proteinmoleküle in der Elementarzelle	62
4.6.6.	Berechnung von Selbstrotationsfunktionen	63
4.6.7.	Patterson Suchmethoden	63
4.6.8.	Modellbau und Verfeinerung	64
4.6.9.	Analyse von Atommodellen	65
4.6.10.	Molecular Modeling	65
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
5.1.	TEIL I: FERREDOXIN-NADP ⁺ REDUKTASE AUS PAPRIKA	66
5.1.1.	RNA Isolierung aus Paprika und cDNA Synthese	66
5.1.2.	Sequenzierungsergebnisse	68
5.1.2.1.	Sequenz der pFNR	68
5.1.2.2.	Sequenz des pFd	72
5.1.3.	Klonierungs- und Expressionsergebnisse	74
5.1.3.1.	Klonierung und Expression der pFNR	74
5.1.3.2.	Klonierung und Expression des pFd	75
5.1.4.	Proteinpräparation	76
5.1.4.1.	Päparation der pFNR	76
5.1.4.2.	Präparation des pFd	79
5.1.5.	Kristallisation	82
5.1.6.	Strukturlösung	83
5.1.7.	Strukturbeschreibung	87
5.1.8.	Vergleich mit der FNR aus Spinat und <i>Anabaena</i>	94
5.1.9.	Bindungsstellen der Substrate	96
5.1.9.1.	Bindungsstelle für [2Fe-2S]-Ferredoxin I	96
5.1.9.2.	Bindungsstelle für NADP ⁺	100
5.1.10.	Der Elektronentransferkomplex zwischen pFNR, sFd und NADP ⁺	102
5.1.11.	Der Elektronentransferweg zwischen Fd und FAD	106
5.2.	TEIL II: UNTEREINHEITEN DES 26S-PROTEASOMS	109
5.2.1.	Klonierungs- und Expressionsversuche	109
5.2.1.1.	Klonierung und Expression der 19S-ATPasen aus Hefe	109
5.2.1.2.	Klonierung und Expression des humanen S2	109
5.2.2.	Proteinpräparation	110
5.2.2.1.	Präparation der 19S-ATPasen aus Hefe	110
5.2.2.2.	Präparation des humanen S2 als Fusionsprotein GST-S2	111
5.2.3.	Proteincharakterisierung	115
5.2.3.1.	Charakterisierung der rekombinanten 19S-ATPasen aus Hefe	115
5.2.3.2.	Charakterisierung des rekombinanten Fusionsproteins GST-S2	117
5.2.4.	Kristallisationsversuche	120
5.2.4.1.	Kristallisationsversuche mit den rekombinanten 19S-ATPasen aus Hefe	120
5.2.4.2.	Kristallisationsversuche mit dem rekombinanten GST-S2	120
6.	LITERATURVERZEICHNIS	121
7.	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	127

1. Zusammenfassung

1.1. Teil I: Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika

Die Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase (FNR) spielt eine wichtige Rolle in der Photosynthese von Pflanzen und photosynthetischen Bakterien. Sie stellt das letzte Enzym der Elektronentransportkette der linearen Photosynthese dar und katalysiert die Reduktion von NADP⁺ zu NADPH. Um die dreidimensionale Struktur der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika (pFNR) aufzuklären und einen Einblick in den molekularen Reaktionsmechanismus der katalysierten Elektronenübertragung zu treffen, wurde zunächst das *pfnr*-Gen (codiert für pFNR) identifiziert und sequenziert. Aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* wurde die zelluläre Gesamt-RNA isoliert und komplementäre DNA (Paprika-cDNA) synthetisiert. Mittels PCR mit degenerierten Oligonukleotiden konnte das *pfnr*-Gen identifiziert und die codierende Region sequenziert werden. Das *pfnr*-Gen codiert für ein 362 Aminosäure langes Präprotein, das mit einem aminoterminalen Signalpeptid (aa1-aa54) synthetisiert wird. Dieses ermöglicht den Import des Proteins in das Mitochondrium und wird dort vom naszierenden Polypeptid spezifisch abgespalten. Dadurch entsteht die prozessierte aktive pFNR, die sich aus den Aminosäureresten 55 bis 362 zusammensetzt und ein Molekulargewicht von 33177 Da besitzt.

Zu Beginn der Arbeit wurde die pFNR nativ aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* gereinigt und kristallisiert. Das entwickelte Präparationsprotokoll umfaßte drei Chromatographieschritte (Affinitäts-, Anionenaustausch- und Hydrophobe Interaktionschromatographie) und lieferte 5 mg homogenes Protein pro Kilogramm Pflanzenmaterial. Da die Proteinausbeute der nativen Präparation nur gering und das Pflanzenmaterial nicht in ausreichender Menge vorhanden war, wurde die cDNA der prozessierten pFNR kloniert und rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die rekombinante pFNR wurde entsprechend dem bereits entwickelten Präparationsprotokoll gereinigt. Die Ausbeute an homogenem Protein betrug ca. 1,3 mg pro Liter Expressionskultur.

Die Struktur der pFNR konnte durch die Patterson-Suchmethode – mit einem Poly-Ala-Modell der Kristallstruktur der FNR aus Spinat als Suchmodell - bei einer Auflösung von 2,5 Å gelöst werden. Das pFNR-Strukturmodell wurde bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 19,8 % bzw. einem freien R-Faktor von 26,5 % verfeinert. pFNR setzt sich aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammen – der N-terminalen FAD-bindenden Domäne und der C-terminalen NADP⁺-

bindenden Domäne (*two domain* Motiv). Die Gesamtstruktur der pFNR ist ähnlich zu der anderer Mitglieder der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase Familie, weicht jedoch in einigen Regionen deutlich ab. Die Hauptunterschiede betreffen einige variable Loops an der Proteinoberfläche sowie den langen FAD-bindenden Loop (aa167-aa177), der einen Teil der Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe FAD bildet. Die neuartige Orientierung des FAD-bindenden Loops führt zu einer stärkeren Wechselwirkung zwischen pFNR und dem Adeninanteil der prosthetischen Gruppe FAD.

Um einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der pFNR-katalysierten Elektronenübertragung zu erhalten, sollte der Elektronentransferkomplex zwischen pFNR und seinem Redoxpartner [2Fe-2S]-Ferredoxin I aus Paprika (pFd) kristallisiert werden. Das *pdf*-Gen (codiert für pFd) wurde mittels PCR auf die präparierte Paprika-cDNA identifiziert und sequenziert. Es codiert für ein 144 Aminosäure langes Präprotein mit einem aminoterminalen Signalpeptid (aa1-aa47), das nach dem Import ins Mitochondrium von der naszierenden Polypeptidkette abgespalten wird. Die cDNA des prozessierten pFd (aa48-aa144) wurde kloniert, in *E. coli* exprimiert und das rekombinante pFd mittels Affinitäts-, Anionenaustausch- und Hydrophober Interaktionschromatographie gereinigt. Versuche, den Elektronentransferkomplex zwischen pFNR und pFd zu kristallisieren, blieben bislang erfolglos. Durch *Molecular Modeling* konnte jedoch das Strukturmodell des potentiellen Elektronentransferkomplexes zwischen pFNR und dem Redoxpartner [2Fe-2S]-Ferredoxin I aus *Spirulina platensis* (sFd) erzeugt werden. Die *Molecular Modeling* Experimente offenbarten die Bindungsstelle der pFNR für den Redoxpartner Fd und zeigen Protein-Protein-Wechselwirkungen im Komplexinterface zwischen pFNR und sFd auf. Anhand des Strukturmodells des gemodelten pFNR-sFd-Komplexes lassen sich mögliche Orientierungen für die Seitenkette des C-terminalen Restes Tyr362 ableiten, die in Folge produktiver Bindung des Substrates NADP⁺ durch dessen Nicotinamidring verdrängt wird. Desweiteren wurden durch *Molecular Modeling* Strukturmodelle verschiedener produktiver Gesamtelektronentransferkomplexe zwischen pFNR und den Substraten sFd sowie NADP⁺ erzeugt, wobei unterschiedliche Neuorientierungen der Seitenkette des C-terminalen Tyr362 berücksichtigt wurden. Basierend auf den *Molecular Modeling* Untersuchungen und vorliegenden biochemischen Ergebnissen wurde ein Modell für die Komplexbildung zwischen FNR und den Substraten Fd und NADP⁺ vorgeschlagen und ein Elektronenübertragungsweg für die Elektronenübertragung zwischen Fd und FNR abgeleitet.

1.2. Teil II: Untereinheiten der 19S-Kappe

Das 26S-Proteasom ist ein hochmolekularer Protease-Komplex, der aus dem 20S-Proteasom als zentraler Einheit und zwei 19S-Kappen besteht. Die 19S-Kappen setzen sich aus mindestens 18 verschiedenen Untereinheiten zusammen und dienen dem 26S-Proteasom als Regulatoreinheit. Sie sind für die Erkennung Ubiquitin-markierter Proteine, für deren Entfaltung und anschließendes Einschleusen ins proteolytisch aktive Zentrum verantwortlich. Verschiedene regulatorische Untereinheiten der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms wurden in dieser Arbeit kloniert, exprimiert und biochemisch charakterisiert. Die ATPase-Untereinheiten YTA1, YTA2, YTA3, YTA5 und SUG1 der 19S-Kappe aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden in verschiedene prokaryontische und eukaryontische Expressionsvektoren inkloniert und in *E. coli* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Die erstellten 19S-ATPase-Expressionssysteme führten zu einer Proteinexpression in Form von Einschlußkörperchen. Im Cytoplasma der Zellen konnte keine aktive Form der 19S-ATPasen festgestellt werden. Die denaturierten Proteine wurden aus den Einschlußkörperchen isoliert und Protokolle zur Proteinrückfaltung erstellt. Die rückgefalteten 19S-ATPasen wurden aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Die spezifische Aktivität der 19S-ATPasen wurde zu ca. $9 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bestimmt und ist ähnlich zur spezifischen Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase aus Schweineiere. In Lösung liegen die 19S-ATPasen in Form hexamerer Ringe vor. Kristallisationsexperimente, die mit den 19S-ATPasen durchgeführt wurden, ergaben bislang keine Proteinkristalle.

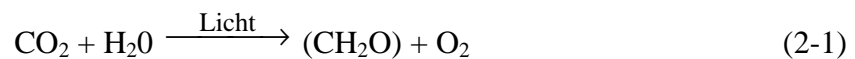
Die humane nicht-ATPase Untereinheit S2 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms wurde als Fusionsprotein mit aminoterminaler Glutathion-S-Transferase-Markierung kloniert und in *E. coli* exprimiert. Das Enzym wurde durch Affinitäts-, Ionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie gereinigt. Die Ausbeute an homogenem Protein lag bei etwa 1 mg pro Liter Expressionskultur. Das GST-markierte S2 wurde durch N-terminale Sequenzierung, Gelpermeationschromatographie und limitierte Proteolyse biochemisch charakterisiert. In Lösung lag das Enzym in monomerer als auch hexamerer Form vor. Beide Enzymformen stehen miteinander im Gleichgewicht und können durch den Einfluß bestimmter Faktoren - wie Protein- oder Salzkonzentration - stabilisiert werden. Kristallisationsexperimente mit dem GST-markierten S2 lieferten verschiedene Bedingungen, unter denen Mikrokristalle sehr geringer Größe erhalten wurde. Eine röntgenkristallographische Charakterisierung der Kristalle war aufgrund der kleinen Kristallgröße bislang nicht möglich.

2. Einleitung

2.1. Teil I: Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika

2.1.1. Photosynthese

Eine charakteristische Eigenschaft von Pflanzen und Cyanobakterien ist ihre Fähigkeit zur Photosynthese. Bei diesem lichtabhängigen Prozeß wird CO₂ in Kohlenhydraten fixiert (Gleichung 2-1).



Die Photosynthese findet bei Pflanzen in Organellen statt, die man als Chloroplasten bezeichnet. Sie besitzen eine Innen- und eine Außenmembran. Der Innenraum der Chloroplasten enthält eine konzentrierte Enzymlösung - das Stroma - in die ein drittes Membransystem eingebaut ist. Dieses wird als Thylakoidmembransystem bezeichnet und enthält das lichtabsorbierende Photosynthesepigment Chlorophyll (Voet D. & Voet J. G., 1994).

Die Photosynthese findet in zwei Schritten statt. In den sogenannten Lichtreaktionen wird Lichtenergie durch Chlorophyll eingefangen, um ATP und NADPH zu produzieren. Diese Produkte werden in den Dunkelreaktionen verwendet, um die Synthese von Kohlenhydraten und anderen biologischen Molekülen aus CO₂ und H₂O anzutreiben. Die Lichtreaktionen der

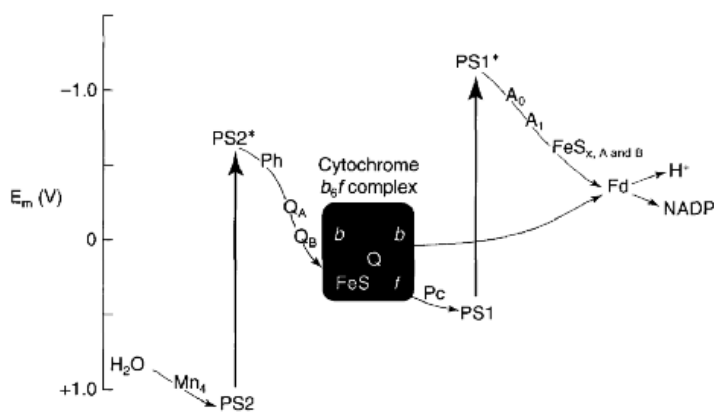


Abb. 2-1: Das Z-Schema der linearen Photosynthese. PS1 und PS2 stellen die Reaktionszentren der Thylakoidmembran dar. Durch Absorption von Lichtenergie werden sie in den angeregten Singletzustand überführt, der durch * repräsentiert wird. Weitere Abkürzungen: Ph, Pheophytin; QA und QB, die beiden Quinone des Photosystems; Pc, Plastocyanin; A₀ und A₁, zwei Elektronenakzeptoren des PS1; Fd, Ferredoxin (Prince R. C., 1996).

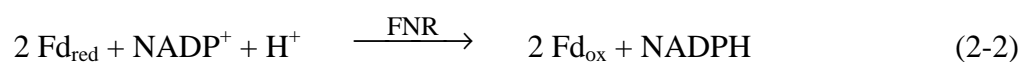
Photosynthese finden an zwei Reaktionszentren der Thylakoidmembran statt: Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII) (Clayton, 1980). Es sind Proteinkomplexe, die zahlreiche lichtabsorbierende Chlorophyll-Moleküle und weitere Pigmente enthalten. PSI und PSII treiben Elektronen von H₂O zu NADPH. Dies wird im sogenannten Z-Schema der Photosynthese veranschaulicht.

licht (Abb. 2-1). Beide Reaktionszentren sind elektrisch in Serie geschaltet, wodurch genügend elektromotorische Kraft entwickelt wird, um die Elektronen stufenweise von einem Redoxzentrum zum nächsten weiterzugeben. Es entsteht eine Elektronentransportkette, bei der dem Wasser unter Energieaufwand Elektronen entzogen und auf NADP⁺ übertragen werden. An den Reaktionszentren PSI und PSII wird der Elektronentransport durch Absorption von Lichtenergie angeregt (Ort D. R. & Yocum C. F., 1996). Die gesamte Elektronentransportkette der Lichtreaktionen besteht neben PSI und PSII noch aus weiteren Bestandteilen: Dem Cytochrom b/f-Komplex, einem Aggregat aus integralen Membranproteinen, welches die beiden Cytochrome b₅₆₃ und f enthält, sowie mehreren mobilen Elektronenüberträgern wie Plastochinon, Plastocyanin und Ferredoxin (Prince R. C., 1996).

Die photosynthetischen Dunkelreaktionen der Pflanzen und Cyanobakterien werden von Enzymen im Stoma katalysiert. CO₂ wird unter Verwendung des erzeugten NADPH (Endprodukt der Lichtreaktionen) durch die Reaktionen des Calvin-Zyklus fixiert. Aus einem Zyklus geht effektiv ein Molekül GAP (Glycerinaldehyd-3-Phosphat) als Produkt hervor, welches zur Synthese von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Fettsäuren verbraucht wird (Voet D. & Voet J. G., 1994).

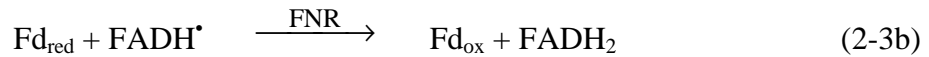
2.1.2. Das Enzym Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase

Das Enzym Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase (FNR) gehört zu einer Familie von Flavoproteinen, die in höheren Pflanzenarten, eukaryontischen Algen und photosynthetischen Bakterien vorgefunden wird (Carrillo N. & Vallejos R. H., 1987). Dieses Flavoprotein ist eine membrangebundene Komponente des photosynthetischen Elektronentransportsystems und stellt das letzte Enzym der Elektronentransportkette dar (Abb. 2-1). Es katalysiert die Reduktion von NADP⁺ zu NADPH entsprechend folgender Gesamtreaktionsgleichung (Gleichung 2-2):



Bei dieser Reaktion übertragen aufeinanderfolgend zwei Moleküle des Einelektronenüberträgers [2Fe-2S]-Ferredoxin I (Fd) jeweils ein Elektron auf ein Molekül NADP⁺. Zur Katalyse der Reaktion, die in zwei Teilreaktionen unterteilt werden kann, verwendet FNR die redoxaktive prosthetische Gruppe FAD (Flavin-adenin-dinukleotid, oxidierte Form).





Teilreaktion 1 setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Einelektronenübertragungsreaktionen zusammen (Gleichungen 2-3a und 2-3b). Zunächst überträgt das erste Molekül Fd ein Elektron auf das FNR-gebundene FAD, wobei die radikalische oder Semichinon-Form FADH[•] entsteht. Durch die Übertragung eines weiteren Elektrons durch das zweite Molekül Fd wird das entstandene FADH[•] zum FADH₂ reduziert. In Teilreaktion 2 (Gleichung 2-4) werden nun die beiden Elektronen des FADH₂ in einem Schritt auf NADP⁺ übertragen. Durch Hydridtransfer zwischen N5 des FADH₂ und C4 des NADP⁺ entsteht NADPH. Am Ende der durch FNR-katalysierten Reaktion liegt das gebundene FAD wieder in der oxidierten Form vor und steht für einen neuen katalytischen Zyklus zur Verfügung. Die Details der katalytischen Reaktionsmechanismen der einzelnen Elektronen-übertragungsreaktionen sind bisher weitestgehend unverstanden (Karplus P. A. & Bruns C. M., 1994).

Das Enzym Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase existiert nicht nur in den Chloroplasten von Pflanzen oder in Cyanobakterien. In verschiedenen Geweben und Organismen, die nicht zur Photosynthese fähig sind, ist die Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase in Stoffwechselwege - wie Stickstofffixierung oder Steroidhydroxylierung - involviert (Arakaki *et al.*, 1997).

2.1.3. Die Proteinfamilie der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasen

Die erste Kristallstruktur einer Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase wurde 1991 von Karplus und Mitarbeitern (Karplus *et al.*, 1991) aus dem Organismus Spinat bei 2,2 Å Auflösung aufgeklärt. Vier Jahre später konnte die Struktur der oxidierten und reduzierten Form der FNR aus Spinat bis zu einer Auflösung von 1,7 Å verfeinert und der Komplex mit dem kompetitiven Inhibitor 2'-Phospho-5'-AMP aufgeklärt werden (Bruns *et al.*, 1995).

Die Kristallstruktur der FNR aus Spinat setzt sich aus zwei Domänen zusammen, wobei eine für die Bindung der redoxaktiven prosthetischen Gruppe FAD und die andere für die NADP⁺-Bindung verantwortlich ist. Die FAD-bindende Domäne besteht aus einem sechssträngigen antiparallelen β-Barrel, das an einer der Öffnungen von einer α-Helix verschlossen ist. Die NADP⁺-bindende Domäne wird aus einem fünfsträngigen parallelen β-Faltblatt gebildet, welches auf beiden Seiten von mehreren α-Helices umgeben ist (Bruns *et al.*, 1995; Karplus *et al.*, 1997).

Dieses charakteristische Strukturmotiv der FNR wird als *two-domain* Motiv bezeichnet (Abb. 2-2). Es gilt als struktureller Prototyp für eine große Familie von Flavoproteinen (Correl *et al.*, 1993). Zu den strukturell charakterisierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie zählen die Phthalatdioxygenase Reduktase (PDR) (Correl *et al.*, 1992), das FAD-beinhaltende Fragment der NADPH-abhängigen Nitrat Reduktase (Lu *et al.*, 1994), die Cytochrom b₅ Reduktase (Nishida *et al.*, 1995), die NADP-Cytochrom P₄₅₀ Reduktase (Wang *et al.*, 1997) und die Flavodoxin Reduktase (Ingelman *et al.*, 1997). All diese Proteine weisen das charakteristische *two-domain* Strukturmotiv auf. Einige Mitglieder der Proteinfamilie, wie zum Beispiel die PDR, besitzen jedoch zusätzliche Domänen, um ihr katalytisches Spektrum zu erweitern (Correl *et al.*, 1992).

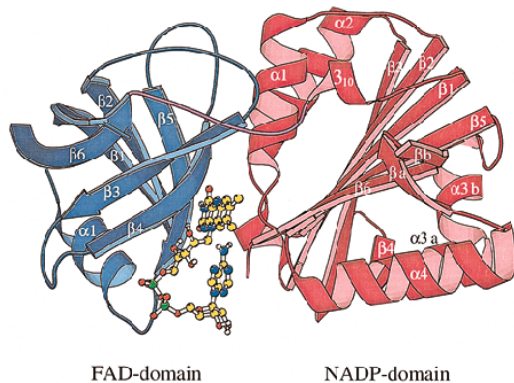


Abb. 2-2: Darstellung des charakteristischen *two domain* Motivs der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasen (Ingelman *et al.*, 1997).

1996 konnten Serre und Mitarbeiter die Kristallstruktur der FNR aus *Anabaena* PCC 7119 im Komplex mit dem nativen Redoxpartner NADP⁺ bestimmen (Serre *et al.*, 1996). Die Gesamtstruktur der *Anabaena* FNR weist das charakteristische Strukturmotiv der Proteinfamilie auf. Größere strukturelle Unterschiede – im Vergleich mit der Struktur der FNR aus Spinat – existieren nur in exponierten Bereichen an der Proteinoberfläche und in einigen variablen Loops. Der Redoxpartner NADP⁺ ist in der vorliegenden Kristallstruktur über den 2'-5'-Adeninanteil an das Protein gebunden. Der Nicotinamidanteil, welcher an der Hydridübertragung zwischen FAD und NADP⁺ beteiligt ist, weist nicht ins aktive Zentrum der FNR, sondern ragt in das umgebende Lösungsmittel (Serre *et al.*, 1996). In einem Komplex mit katalytisch aktiver Geometrie der Flavin-Nicotinamid-Wechselwirkung sollte hingegen der Nicotinamidanteil des NADP⁺ parallel zum Isoalloxazinring des FAD angeordnet sein, um den Hydridtransfer zwischen beiden Ringsystemen zu ermöglichen. Folglich spiegelt das vorliegende Strukturmodell lediglich die Bindungsverhältnisse des 2'-5'-Adeninanteils von NADP⁺ wieder, erlaubt jedoch keine mechanistischen Aussagen bezüglich des katalytischen Hydridtransfers.

1999 konnten Deng und Mitarbeiter die Struktur der FNR-Mutanten Y308S und Y308W aus dem Organismus Erbse im Komplex mit dem Redoxpartner NADP⁺ lösen (Deng *et al.*, 1999). Bei beiden untersuchten FNR-Mutanten war die C-terminale Aminosäure Tyrosin mutiert worden. Die Strukturmodelle weisen eine produktive Geometrie für die NADP⁺-Bindung auf (Abb. 2-3).



Abb. 2-3: Ribbon-Darstellung der Struktur der FNR-Mutante Y308S im Komplex mit NADP⁺. Die prosthetische Gruppe FAD ist in gelb dargestellt, das Substrat NADP⁺ in grün (Deng *et al.*, 1999).

Der Nicotinamidring des NADP⁺ ist in den untersuchten Komplexen nahezu parallel zum Isoalloxazinring des FAD angeordnet. Vergleiche mit den Strukturen der nativen FNRs aus Spinat und *Anabaena* PCC 7119 zeigen, daß der Nicotinamidanteil des NADP⁺ den gleichen Platz einnimmt, wie das C-terminale Tyrosin im nativen Enzym. Es ist daher wahrscheinlich, daß einer Nicotinamidbindung an das Wildtyp-Enzym die energetisch ungünstige Verdrängung des C-terminalen Tyrosinrestes vorausgehen muß (Deng *et al.*, 1999).

2.1.4. Der Redoxpartner [2Fe-2S]-Ferredoxin I

Ferredoxine sind eisenschwefelhaltige Metalloproteine mit einem relativ kleinen Molekulargewicht (ca. 6-14 kDa). Sie fungieren in einer Vielzahl von unterschiedlichen biologischen Redoxprozessen, wie Photosynthese, Nitratreduktion und Kohlenstoff- bzw. Schwefelmetabolismus, als mobile Elektronenüberträger. Typischerweise enthalten Ferredoxine ein oder mehrere redoxaktive Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe. Die Eisenatome des Clusters sind über anorganische Schwefelatome verbrückt und werden durch die Thiolatseitenketten von Cysteinresten des Proteins koordiniert. Bis heute konnten drei unterschiedliche Arten von Eisen-Schwefel-Clustern kristallographisch charakterisiert werden: [2Fe-2S]- (Tsukihara *et al.*, 1978), [3Fe-4S]- (Kissinger *et al.*, 1991) und [4Fe-4S]-Cluster (Freer *et al.*, 1975). Innerhalb dieser Klassen können die Ferredoxine abhängig von ihrer Aminosäuresequenz, ihres Reduktionspotentials, ihrer biologischen Herkunft und ihrer spektroskopischen Eigenschaften in Familien unterteilt werden.

In der Elektronentransportkette der Photosynthese fungieren [2Fe-2S]-Ferredoxine als mobile Elektronenüberträger. Sie lassen sich in drei Familien unterteilen: Pflanzen-, Vertebraten-, und Bakterien-Ferredoxine. In pflanzlichen [2Fe-2S]-Ferredoxinen (Abb. 2-4) sind die beiden Eisenatome des Clusters tetraedrisch koordiniert, wobei der [2Fe-2S]-Anteil nahezu planar ist. Die koordinierenden Cysteinreste des Proteins zeigen das charakteristische Cys-X₄-Cys-X₂-Cys-X₂₉-Cys-Sequenzmotiv (Holden *et al.*, 1994). Die pflanzlichen [2Fe-2S]-Ferredoxine sind

Einelektronenüberträger. Sie können nur ein Elektron übertragen bzw. aufnehmen. Bei der Reduktion des Di-Eisen(III)-Clusters (Abb. 2-4) wird das angenommene Elektron in einem der beiden Eisenzentren lokalisiert, wodurch ein [Fe(II)-Fe(III)]-Cluster mit gemischter Valenz entsteht (Holden *et al.*, 1994).

2.1.5. Die Elektronenübertragung zwischen Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase

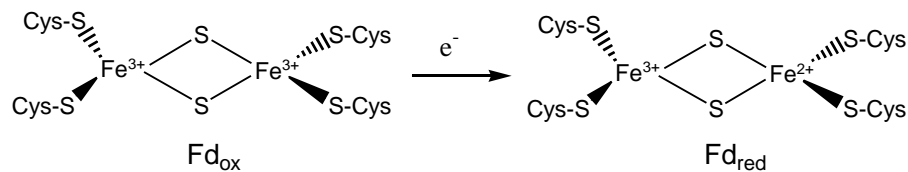


Abb. 2-4: Koordination des Eisen-Schwefel-Clusters in [2Fe-2S]-Ferredoxinen. S stellt die Sulphide (S²⁻) des Clusters dar und S-Cys die Schwefelatome der vier koordinierenden Cysteinseitenketten.

und [2Fe-2S]-Ferredoxin I

Intermolekulare Elektronenübertragungsreaktionen erfordern die Bildung eines Übergangskomplexes, bei dem die beiden Redoxzentren eine optimale Anordnung für die Elektronenübertragung einnehmen. Obwohl bisher noch nicht viel über den Reaktionskomplex der FNR-katalysierten Elektronenübertragung bekannt ist, konnten umfassende biochemische Studien (Foust *et al.*, 1969; Medina *et al.*, 1992; Jelesarow *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1998; Hurley *et al.*, 1999) zeigen, daß elektrostatische Wechselwirkungen an der Komplexbildung zwischen FNR und seinem Redoxpartner Fd beteiligt sind. Daraus wurde ein hypothetisches Modell für die FNR-Fd-Komplexbildung abgeleitet (De Pascalis *et al.*, 1993): In dem vorgeschlagenen Reaktionskomplex ist FNR entlang der Kontaktfläche der beiden Proteine überwiegend positiv und Fd überwiegend negativ geladen. Durch die Wechselwirkung der daraus entstehenden komplementären molekularen Dipolmomente werden die beiden Moleküle anfangs aufeinander zugelenkt. Durch anschließende Wechselwirkungen zwischen basischen Aminosäureresten an der Oberfläche der FNR und sauren Aminosäureresten an der Oberfläche des Fd wird eine optimale Orientierung der Reaktionspartner erzielt. Kräfte mit kurzer Reichweite, wie hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen, bewirken eine feine strukturelle Anpassung der Redoxpartner, um die intermolekulare Elektronenübertragung zu optimieren. Dieses hypothetische Modell beruht rein

auf biochemischen Forschungsergebnissen. Nur eine Kristallstrukturanalyse des Elektronenübertragungskomplexes kann letztlich detaillierte mechanistische Aussagen liefern.

2.1.6. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Enzym Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus dem Organismus *Capsicum annuum Yolo Wonder* (Paprika) untersucht und einen Einblick in den molekularen Reaktionsmechanismus erhalten werden.

Hierzu sollte zunächst das Gen, welches für die Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* (pFNR) codiert, identifiziert und sequenziert werden. Das Enzym sollte kloniert, in *E. coli* exprimiert, präpariert und kristallisiert werden. Die kristallographische Analyse der pFNR und der Vergleich mit den Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasen aus Spinat und *Anabaena* PCC 7119 sollte zum Verständnis dieser Enzyme hinsichtlich Struktur und Katalyse beitragen.

2.2. Teil II: Untereinheiten des 26S-Proteasoms

2.2.1. Der proteolytische Proteinabbau

Proteine, die z. B. als Biokatalysatoren, Signalübermittler, kontraktile Fasern oder Gerüstsubstanzen eine grundlegende Rolle für die Zellfunktion spielen, unterliegen innerhalb der Zelle einem ständigen Auf- und Abbau. Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, daß Proteolyse nicht nur für die Rückgewinnung von Aminosäurebestandteilen oder den Abbau abnormaler, d. h. durch Umwelteinflüsse, Strahlung oder Hitze geschädigte Proteine wichtig ist, sondern auch in essentielle Steuervorgänge der Zelle eingreift. Proteolyse ist beteiligt an der Regulation der Proteinexpression, der Steuerung metabolischer Wege und spielt eine zentrale Rolle in der Zellzykluskontrolle. Damit der intrazelluläre Proteinabbau keine Gefahr für die Zelle darstellt, muß er mit hoher Selektivität ablaufen. Dies wird von der Zelle in unterschiedlicher Weise erreicht (Baumeister *et al.*, 1998).

Zum einen wurden im Laufe der Evolution hochaktive, aber unspezifisch agierende Proteasen in ein spezielles Zellorganell - das Lysosom - eingeschlossen und somit durch eine Membran von den restlichen Bestandteilen der Zelle getrennt. Selektiver Proteinabbau kann durch Aufnahme der abzubauenen Proteine in dieses Kompartiment erreicht werden (Bainton, 1981). Andererseits wurden komplexe proteolytische Systeme entwickelt, die ihre Substratproteine nach Markierung spezifisch erkennen können. Diese Proteasen, die im Cytoplasma und Zellkern agieren, bauen reguliert unterschiedlichste Proteine ab und greifen so in essentielle Regulationsmechanismen der Zelle ein. Proteasomen stellen das wahrscheinlich wichtigste proteolytische System dieser Art dar (Baumeister *et al.*, 1998; Ciechanover *et al.*, 1998). Es sind Proteinkomplexe aus mehreren Untereinheiten, die eine zylinderförmige Architektur aufweisen. Im Innenraum des zylinderförmigen Proteinkomplexes befindet sich eine proteolytische Kammer mit unspezifischer Aktivität. Durch die Öffnungen an der Ober- und Unterseite des Proteasoms können bereits entfaltete Proteine in die proteolytische Kammer eingeschleust und dort unspezifisch verdaut werden. Man unterscheidet nach ihrer Größe zwei Komplexe, die entsprechend ihrer Sedimentationskonstanten als 20S- und 26S-Proteasomen bezeichnet werden (Hilt W. & Wolf D. H., 1995 und 1996).

2.2.2. Das 20S-Proteasom

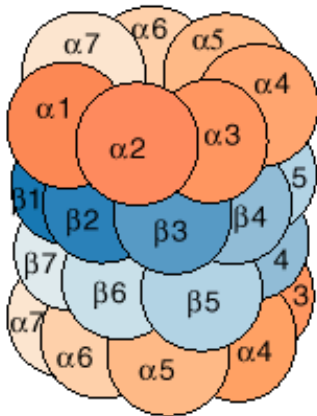


Abb. 2-5: Der Aufbau des 20S-Proteasoms (Ferrell *et al.*, 2000).

Beim 20S-Proteasom handelt es sich um ein zylindrisch geformtes Partikel mit einem Molekulargewicht von ca. 700 kDa, das im Cytoplasma und im Kern der Eukaryontenzelle zu finden ist (Arrigo *et al.*, 1987). Sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten besteht das 20S-Proteasom aus 28 Untereinheiten (Dahlmann *et al.*, 1989). Prokaryontische Proteasomen bestehen aus je 14 Kopien zweier unterschiedlicher, jedoch verwandter Polypeptide α und β (Grziwa *et al.*, 1991; Löwe *et al.*, 1995), während eukaryontische Proteasomen aus je zwei Kopien von 7

verschiedenen α - und 7 verschiedenen β -Untereinheiten bestehen (Zwickl *et al.*, 1992). Der zylinderförmige Proteinkomplex setzt sich aus vier Lagen übereinanderliegender Ringe zusammen, von denen jeder aus sieben Untereinheiten aufgebaut ist (Abb. 2-5). Die beiden äußeren Ringe bestehen aus den α -Untereinheiten und die beiden inneren aus den proteolytisch aktiven β -Untereinheiten ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). Im Innern des zylinderförmigen 20S-Proteasoms, an der Grenzfläche der beiden β -Ringe, befindet sich die katalytische Kammer. Der Zugang zur Kammer erfolgt durch die Öffnung der α -Ringe an der Ober- bzw. Unterseite des Zylinders. Im 20S-Proteasom werden die beiden Öffnungen durch Aminosäuren der N-Termini der sieben Untereinheiten der α -Ringe teilweise verschlossen. Dadurch wird gewährleistet, daß nur entfaltete Proteine ins katalytisch aktive Zentrum des 20S-Proteasoms gelangen und abgebaut werden (Groll *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998).

20S-Proteasome zeigen bis zu fünf unterscheidbare Peptid-spaltende Aktivitäten. Sie können artifizielle Peptidsubstrate an der Carboxyseite von hydrophoben (chymotryptische Aktivität), basischen (tryptische Aktivität) und sauren Aminosäuren (PGPH-Aktivität) spalten. Zwei weitere unabhängige Peptid-spaltende Aktivitäten schneiden an verzweigten bzw. kleinen hydrophoben Aminosäuren (Coux *et al.*, 1996).

2.2.3. Das 26S-Proteasom

Die fehlende proteolytische Substratspezifität des 20S-Proteasoms erfordert einen zusätzlichen Regulationsmechanismus, um selektiv nur markierte Proteine zu entfalten und in Fragmente zu

zerlegen. Die für den Abbau vorgesehenen Proteine werden von einem Erkennungssystem durch eine kovalente Verknüpfung mit dem Polypeptid Ubiquitin (76 Aminosäuren) markiert. Diese Ubiquitin-markierten Substrate können vom 26S-Proteasom erkannt und unter ATP-Verbrauch abgebaut werden (Hershko *et al.*, 1986; Coux *et al.*, 1996).

Das 26S-Proteasom ist ein hochmolekularer Protease-Komplex mit einer Masse von ca. 1700 kDa. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß das 20S-Proteasom als integraler Bestandteil des 26S-Proteasomkomplexes fungiert (Ikai *et al.*, 1991). Das 26S-Proteasom entsteht durch Anfügen von zwei sogenannten 19S-Kappen an beiden Enden des 20S-Zylinders (Abb. 2-6). Diese zeigen in grober Näherung eine V-förmige Struktur und sind um 180° gegeneinander verdreht assoziiert (Arrigo *et al.*, 1988; Voges *et al.*, 1999). Die 19S-Kappen setzen sich aus mindestens 18 verschiedenen Untereinheiten zusammen und dienen dem 26S-Proteasom als Regulatoreinheit. Sie sind für die Erkennung der Ubiquitin-markierten Proteine, für deren Entfaltung und anschließendes

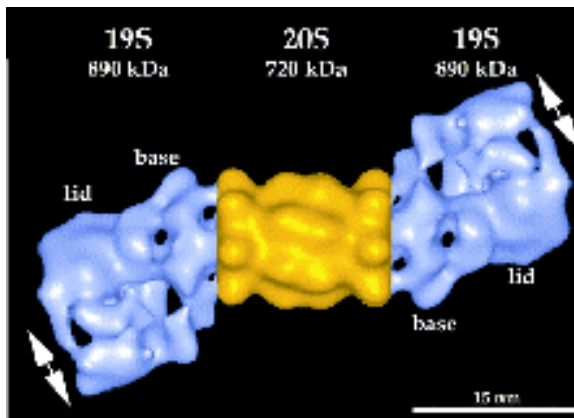


Abb. 2-6: Modell der dreidimensionalen Struktur des 26S-Proteasoms – basierend auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma* (Voges *et al.*, 1999).

Einschleusen ins proteolytisch aktive Zentrum verantwortlich (Tanaka K. & Tsurumi C., 1997). Über das Zusammenwirken und die einzelnen Aufgaben der Regulatorproteine der 19S-Kappe ist bislang jedoch wenig bekannt. Nur acht Untereinheiten konnten bisher ausreichend charakterisiert werden, darunter sechs ATPasen, die eine Untergruppe der AAA-Proteinfamilie (ATPases associated with a variety of cellular activities) bilden (Rubin *et al.*, 1997).

Die regulatorische 19S-Kappe ist aus zwei Unterkomplexen aufgebaut, dem sogenannten Base-Komplex und dem Lid-Komplex (Glickmann *et al.*, 1999; Gorbea *et al.*, 1999). Der Base-Komplex bildet den Teil der 19S-Kappe, der an die beiden α -Ringe des zylinderförmigen 20S-Proteasoms bindet. Er setzt sich aus den sechs ATPasen – SUG1, SUG2, YTA1, YTA2, YTA3 und YTA5 – und den zwei größten Untereinheiten der 19S-Kappe – S1 (Rpn2) und S2 (Rpn1) – sowie der Untereinheit Rpn10 zusammen. Der Base-Komplex ist für den ATP-abhängigen Abbau von nicht Ubiquitin-markierten Zielproteinen verantwortlich. Die Base-Untereinheiten sind demnach an der Proteinentfaltung und dem anschließenden Einschleusen der entfalteten Polypeptidkette in die katalytisch aktive Kammer des zentralen 20S-Proteasoms beteiligt. Der

Lid-Komplex bildet den Teil der 19S-Kappe, welcher auf dem Base-Komplex distal zum 20S-Proteasom angeordnet ist. Er setzt sich aus acht Untereinheiten zusammen – Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11 und Rpn12 - und ist für die Erkennung und den Abbau der Ubiquitinmarkierten Zielproteine verantwortlich. Base- und Lid-Komplex der 19S-Kappe sind über die Proteine Rpn12 und S1 bzw. Rpn11 und S2 miteinander verbunden (Gorbea *et al.*, 2000; Ferrell *et al.*, 2000).

2.2.4. Untereinheiten des Base-Komplexes des 26S-Proteasoms

2.2.4.1. Die ATPasen der AAA-Proteinfamilie

Die sechs ATPasen des Base-Komplexes - SUG1, SUG2, YTA1, YTA2, YTA3 und YTA5 – bilden eine Untergruppe der AAA-Proteinfamilie (ATPases associated with a variety of cellular activities). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen ein einzigartiges, gemeinsames Sequenzmerkmal auf, welches als AAA-Motiv bezeichnet wird (Confalonieri F. & Dugnet M., 1995). Es besteht aus einer hoch konservierten Sequenz von 230 bis 250 Aminosäuren und beinhaltet die Walker-Motive A und B der sogenannten P-Loop-ATPasen (Patel S. & Latterich M., 1998). AAA-Proteine besitzen entweder ein AAA-Motiv (Typ I) oder zwei AAA-Motive (Typ II). Aus der Anzahl der Motive läßt sich jedoch die zelluläre Funktion der Proteine nicht ableiten. Allerdings zählen viele der AAA-Proteine, die an der Organellenbiogenese beteiligt sind, zu den Typ II Proteinen, wohingegen alle ATPasen des 26S-Proteasoms nur ein Motiv aufweisen. Evolutionär verwandte AAA-Proteine, die an der Katalyse ähnlicher Stoffwechselwege beteiligt sind, zeigen gewöhnlich auch außerhalb des konservierten AAA-Motivs eine hohe Sequenzhomologie (Beyer A., 1997).

Das charakteristische AAA-Motiv der ATPasen des Base-Komplexes ist an der C-terminalen Seite der Polypeptidkette lokalisiert. Der N-terminale Bereich der Proteine ist weniger stark konserviert und beinhaltet ein *Coiled Coil* Strukturmotiv. Dieses ist für die Bindung von Substratproteinen durch das 26S-Proteasom verantwortlich und vermittelt die Wechselwirkung zwischen den einzelnen ATPasen (Rubin *et al.*, 1997).

Über die Funktion der einzelnen ATPasen des 26S-Proteasoms und deren Anordnung im Base-Komplex ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, daß die sechs ATPasen einen heterooligomeren Sechsring bilden, der oberhalb und unterhalb des zylinderförmigen 20S-Proteasoms mit den beiden α -Ringern wechselwirkt und so die Komplexbildung zwischen den 19S-Kappen und dem 20S-Proteasom zum 26S-Proteasom vermittelt. Verschiedene Funktionen

wurden für die ATPasen vorgeschlagen. Durch Hydrolyse von ATP stellen sie die Energie bereit, die für die Assemblierung des 26S-Proteasoms benötigt wird. Desweiteren sollen sie für das Öffnen des zylindrisch geformten 20S-Proteasoms verantwortlich sein, welches im freien Partikel an beiden Enden völlig verschlossen ist. Substratproteine könnten durch die ATPasen gebunden, entfaltet und ins katalytisch aktive Zentrum eingeschleust werden (Tanaka K. & Tsurumi C. , 1997).

2.2.4.2. Das Protein S2 (Rpn1)

Das Protein S2 ist die zweitgrößte Untereinheit der 19S-Kappe und eine Komponente des Base-Komplexes. Durch Wechselwirkung mit der ATPase YTA5 bindet es auf den hexameren ATPase-Ring und vermittelt die Wechselwirkung mit dem distal angeordneten Lid-Komplex (Gorbea *et al.*, 2000). Genaue Aussagen über die regulatorische Funktion des Proteins S2 können bislang nicht getroffen werden.

2.2.5. Aufgabenstellung

Mit den Kristallstrukturen aus *T. acidophilum* und *Saccharomyces cerevisiae* lagen bereits Strukturmodelle für ein prokaryontisches und ein eukaryontisches 20S-Proteasom vor. Versuche, die Kristallstruktur eines 26S-Proteasoms aufzuklären, scheiterten bisher, da die Beweglichkeit der V-förmigen 19S-Kappen offensichtlich zu groß ist und somit eine Kristallisation verhindert. Da bisher nur sehr wenig über die Funktion und die Struktur der einzelnen Untereinheiten der 19S-Kappe bekannt ist, war das Ziel dieser Arbeit die Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation ausgewählter 19S-Untereinheiten.

3. Materialien und Geräte

3.1. Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Klonierung der 19S-ATPasen aus Hefe

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Amplifizierung der cDNA der ATPase-Untereinheiten YTA1, YTA2, YTA3, YTA5 und SUG1 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Die eingebauten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

YTA1:

yta1_bamHI_5' 5'-CCGCCGCCG**GGATCC**ATGGCCACCTTGAAGAATTGGATGCTCAA-3'
 yta1_salI_3' 5'-CCGCCG**GTCGACT**TATTATGCATAAAAGGATACCGATTTTCGATTT-3'
 yta1(t)_ndeI_5' 5'-CCCCATCATCAT**CATATG**CATCACCATCACCATCACATGGCCACCTTGAAGAATTGGATGCTCAA-3'
 yta1_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCCG**CATATG**GCCACCTTGAAGAATTGGATGCTCAA-3'
 yta1_hindIII_3' 5'-CCGCCG**AAGCTT**TTATTATGCATAAAAGGATACCGATTTTCGATTT-3'

YTA2:

yta2(t)_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCCG**CATATG**CATCACCATCACCATCACATGGAGGAACTAGG-3'
 yta2_ndeI_5' 5'-CCACCACCACCA**CATATG**GAGGAACTAGGTATTGTGACACCTGTTCGAA-3'
 yta2_xhoI_3' 5'-CCACCACCA**CTCGAG**TTATCATTTGTAGAAGTCGAATTTATCGAC-3'

YTA3:

yta3_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCCG**CATATG**CCACCAAAAGAAGACTGGGAAAAATAC-3'
 yta3_xhoI_3' 5'-CCACCACCA**CTCGAG**TTATCAATTATATTGCATATAACGCGATGT-3'
 yta3_bamHI_5' 5'-CCGCCGCCGCCG**GGATCCC**ACCAAAAGAAGACTGGGAAAAATAC-3'
 yta3_ecorI_3' 5'-CCACCACCAG**GAATCC**TTATCAATTATATTGCATATAACGCGATGT-3'

YTA5:

yta5_bamHI_5' 5'-CCGCCGCCG**GGATCC**ATGGGACAAGGTGTATCATCTGGACAAGAC-3'
 yta5_salI_3' 5'-CCGCCG**GTCGACT**CATCACAAGTATAAACCTTCTAAATTTTCCTC-3'
 yta5_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCCG**CATATG**GGGACAAGGTGTATCATCTGGACAAGAC-3'
 yta5_xhoI_3' 5'-CCACCACCA**CTCGAG**TTATCACAAGTATAAACCTTCTAAATTTTC-3'

SUG1:

sug1_ecorI_5' 5'-CCGCCGCCG**GAATTC**ATGACAGCTGCTGTAACATCCTCC-3'
 sug1_bamHI_3' 5'-CCGCCGCCG**GGATCC**TATCACTTGAACAGCTTGGCGAC-3'
 sug1_ndeI_5' 5'-CCACCACCACCA**CATATG**ACAGCTGCTGTAACATCCTCCAATATAGTA-3'

sug1_xhoI_3' 5'-CCACCACCACTCGAGTTATCACTTGAACGACTTGGCGACAGAAAT-3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung der 19S-ATPasen aus Hefe

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Sequenzierung der in entsprechende Expressionsvektoren klonierten ATPase-Untereinheiten YTA1, YTA2, YTA3, YTA5 und SUG1 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

YTA1:

yta1_1_5' 5'-CTATGAAACGTGCAGATAAATTCA-3'

yta1_2_3' 5'-CTTTGAATTTATCTGCACGTTTCA-3'

YTA2:

yta2_1_5' 5'-ATCGGTATTGACCCTCCTAGGGGT-3'

yta2_2_3' 5'-CGTCTTACCGGTACCTGGTGGACC-3'

YTA3:

yta3_1_5' 5'-GCTACTCTTGGTATTGATCCACCA-3'

yta3_2_3' 5'-CCCATATAATAAGATACCCTTTGG-3'

YTA5:

yta5_1_5' 5'-CCCAAGGGTGTGAATCTTTATGGT-3'

yta5_2_3' 5'-CGGGTGCACCATAAAGAATCACAC-3'

SUG1:

sug1_1_5' 5'-GCTGTCGCACATCACACTGATTGT-3'

sug1_2_3' 5'-TTGTACCAGTTCCGCACCACTGAC-3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung des pfnr-Gens und des pfd-Gens

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Identifizierung und Sequenzierung des codierenden Bereichs des *pfnr*-Gens und des *pfd*-Gens verwendet. Die degenerierten Primer dienten zur Identifizierung des Gens mittels PCR auf präparierter Paprika-cDNA und zur Einleitung erster Sequenzierungsreaktionen. Die nicht-degenerierten Primer dienten zur vollständigen Sequenzierung des *pfnr*-Gens sowie des *pfd*-Gens und wurden von den bereits sequenzierten Regionen des Gens abgeleitet.

degenerierte pFNR-Primer:

fnr_1_5' 5'-ATGACNACNGCNGTNACNGCNGCNGTNTC-3'

fnr_2_5' 5'-ATGGCNGCNGCNGTNACNGCNGCNGTNTC-3'

fnr_3_3' 5'-TTARTAGACYTCMACGTKCCAYTG-3'

fnr_4_5' 5'-TGYCTYCTYAAACACMAARATYACYGGNGAYGAYGAYGC-3'

Erklärungen: R = A/G; Y = C/T; K = G/T, M = A/C, N = A/G/C/T

nicht-degenerierte pFNR-Primer:

fnr_5_5'	5'-ATGACCACCGCTGTCACCGCCGCTGTT-3'
fnr_6_3'	5'-AGCAATTCCAGTTCCAGTACCAAGCATTAT-3'
fnr_7_5'	5'-ATTGGTGTGATTGCTGATGGTGTGATGCC-3'
fnr_8_3'	5'-TTCCTCCTTGTAAGTAGGGAGCTGCTGGT-3'
fnr_9_5'	5'-AAAAGGCTTGTGTACACCAATGACAAAGGG-3'
fnr_10_5'	5'-ATGACTACTGCCGTTACTGCCGCCGTT-3'
fnr_11_5'	5'-ATGGCCGCCGCTGTTACTGCCGCCGTT-3'
fnr_12_5'	5'-ATGACCACCGCTGTGACCGCTGCTGTG-3'
fnr_13_5'	5'-ATGGCCGCTGCTGTGACCGCTGCTGTG-3'
fnr_14_3'	5'-TGTGCCAAGCTTCACCAGGTGCATCAT-3'
fnr_15_3'	5'-TTCAGTGCTAAAGACCATGTGCCAAGTTTC-3'
fnr_16_3'	5'-GTATAATCGAAGCTTGTGAGGCTTCCATT-3'
fnr_17_5'	5'-AACTCCGATTGGACTTTGCTGTGAGCAGA-3'
fnr_18_5'	5'-GAAGA ACTATGGACTTTGCTCAAGAAA-3'
fnr_19_3'	5'-GTGGACTTGGATGAAGGAA-3'
fnr_20_5'	5'-GAGGGAGAGATCCCTTACAGAGAAGGGCAATC-3'
fnr_21_3'	5'-GATTGCCCTTCTCTGTAAGGGATCTCTCCCTC-3'
fnr_22_3'	5'-TTAGTAGACTTCAACGTTCCATTG-3'
fnr_23_5'	5'-TCAAAGAAAATGGAGGAAGGCGTCACAGTGAACAAGTTTAAGCCTAAG-3'

degenerierte pFd-Primer:

fd_1_3'	5'-TTARGCRGTRAGMTCYTCYTCCTTGTGRGTCTCRAT-3'
fd_2_3'	5'-TTARGCRGTRAGMTCYTCYTCCTTGTG-3'
fd_3_5'	5'-ATGGCMGCAACCACCACAACA-3'
fd_4_5'	5'-ATGGCMACCACA-3'

Erklärungen: R = A/G; Y = C/T, M = A/C

nicht-degenerierte pFd-Primer:

fd_5_3'	5'-GCAGTAGGCTCCTCCTCCTTGTGAGTCTCAAT-3'
fd_6_5'	5'-GATCTTCCTTATTCGTGCAGGGCAGGTTCT-3'
fd_7_3'	5'-ATCAAGAATGTACACATCATCTGGGCA-3'
fd_8_5'	5'-GAGGGATGGGTGCTAACT-3'
fd_9_3'	5'-AGTTAGCACCCATCCCTC-3'
fd_10_5'	5'-TGCATGGCTTCATACAAAGTG-3'
fd_11_3'	5'-CACTTTGTATGAAGCCATGCA-3'
fd_12_5'	5'-CCAGATGATGTTTACAT-3'
fd_13_5'	5'-TCCAACACCGCCGCTCTTTGTTCGGA CTCAAG-3'

Oligonukleotide für die Klonierung der pFNR und der pFd

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Amplifizierung der cDNA der prozessierten FNR und des prozessierten Fd aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* (ohne *precursor*) verwendet. Die für das Klonierungsvorhaben in die Oligonukleotide eingebauten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

pFNR:

fnr_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCATATGCAAGTGACCACAGAGGCTCCTGCTAAAGT-3'

fnr_bamHI_3' 5'-CCGCCGCCGGGATCCTTATTAGTAGACTTCAACGTTCCATTGCTC-3'

pFd:

fd_ndeI_5' 5'-CCGCCGCCGCATATGGCTTCATACAAAGTGAACTTATCACACC-3'

fd_bamHI_3' 5'-CCGCCGCCGGGATCCTTATTAAGCAGTAAGCTCCTCCTCCTTGTG-3'

3.2. Plasmide

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden folgende Plasmide verwendet:

<i>pRSET6c</i> , <i>pRSET6d</i>	Invitrogen, Niederlande
<i>pMAL-c2</i>	New England Biolabs, Schwalbach
<i>pET22b(+)</i> , <i>pET26b(+)</i> , <i>pET28a(+)</i>	Novagen, Inc., Madison, WI, USA
<i>pQE9</i>	Qiagen, Hilden
<i>pGEX-2T</i> , <i>pGEX-5X-1</i> , <i>pGEX-4T-2</i> , <i>pGEX-6P-2</i>	amersham pharmacia biotech, Freiburg
<i>pALTER-1</i> , <i>pALTER-EX2</i>	Promega Corp., WI, USA

Für die Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae* wurde folgendes Plasmid verwendet:

<i>pYEX-4T-1</i>	CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA
------------------	---

3.3. Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden bei den molekularbiologischen Arbeiten und bei der Proteinexpression verwendet:

E. coli DH5 α

(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA)

Genotyp: F⁻, Φ 80, *lacZ* Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*(r_k⁻m_k⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*), U169

E. coli JM 109

(Invitrogen, Holland)

Genotyp: *endA1*, *recA1*, *hsdR17*($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *thi1*, *gyrA*, *relA1*, $\Delta(lac-proAB)$, F[']{*traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15}

E. coli BL21(DE3)

(Novagen, Inc., Madison, WI, USA)

Genotyp: F', *ompT*, *hsdS_B*, (*r_B*⁺), *gal*, *dcm*, (DE3)

3.4. Hefen

Der folgende Bakterienstamm wurde bei der Proteinexpression verwendet:

Saccharomyces cerevisiae DY150

(CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA, USA)

Genotyp: *MATa*, *ura3-52*, *leu2-3, 112*, *trp1-1*, *ade2-1*, *his3-11*, *can1-100*

3.5. Enzyme, Isolierungskits, Säulenmaterialien und Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Enzyme, Isolierungskits, Säulenmaterialien und Chemikalien von den Firmen amersham pharmacia biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Weiterstadt), Fluka (Neu-Ulm), Genomed (Bad Oeynhausen), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.6. sonstige Materialien

Amicon, Beverley, MA, USA:

Ultrafiltrationsmembranen, Centricon- und Centriprep-Ultrafiltrationsröhrchen

Biozym, Hessisch Oldendorf:

Eppendorf ReaktionsgefäÙe (Fassungsvermögen: 0,5 ml)

Charles Supper Co., Nattick, MA, USA:

MVD/24 Kristallisationsplatte

Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg:

Original Eppendorf ReaktionsgefäÙe 3810 (Fassungsvermögen: 1,5 ml und 2,0 ml)

Grainer und Söhne GmbH und Co. KG, Frickenhausen:

Petrischalen

Harvard-Dental-GmbH, Berlin:

Dentalwachs

ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA:

Linbro tissue culture plates

Millipore GmbH, Eschborn:

PVDF-Membran, Sterilfilter als Spritzenaufsätze, Millex-HA Sterilfilter

W. Müller, Berlin:

Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufgaben

Pall GmbH Filtrationstechnik, Dreieich:

Fluorotrans Transfermembran

Renner GmbH, Dannstadt:

Einwegspritzen und Einwegkanülen

Roth, Karlsruhe:

Spektropor Dialyseschläuche, Glaskugeln ($\varnothing=0,5$ mm), Silikonöl Rotitherm H250

Sarstedt, Nürnberg:

Halb-Mikro-Küvetten

Whatman Limited, Maidstone, GB:

1MM- und 3MM-Chromatographiepapiere

3.7. Geräte

amersham pharmacia biotech, Freiburg:

FPLC-Chromatographiesystem, SMART-Chromatographiesystem, ÄKTA-Chromatographiesystem, Flachbrett-schreiber REC 10

Amicon, Beverley, MA, USA:

Ultrafiltrationszelle

Abimed, Langenfeld:

Pipetten, diverse Schlauchpumpen

Beckmann, München:

Kühlzentrifuge J2-21 mit den Rotoren JA-10, JA-20 und HB-4, Ultrazentrifuge L7-55 mit den Rotoren 45-Ti und 55,2-Ti

Biomatik GmbH, München:

Desintegrator S

Bio-Rad Laboratories GmbH, München:

Spannungsquelle 1420A, Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell

Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg:

Zentrifuge 5415C

Evans & Sutherland, Salt Lake City, USA:

ESV-30 Workstation

Fa. G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd:

Branson Sonifier Modell 250

Heraeus Christ, Osterode:

Biofuge A

Infors AG, Bottmingen, Schweiz:

Schüttelinkubator RKF-125

MARresearch, Hamburg:

Imageplate Detektor

Perkin-Elmer, Weiterstadt:

Spektralphotometer Lambda 17 UV/VIS

Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark:

PHM 82 Standard pH-Meter

Rigaku RU200, Tokyo, Japan:

Drehanodengenerator

Sartorius AG, Göttingen:

Laborwaage LC 2200 S

Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode:

Kühlzentrifuge 2K15

Stratagene, Heidelberg:

Robocycler Gradient 96, Elektroporator 1000

4. Methoden

4.1. Arbeiten mit RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind extrem stabile und aktive Enzyme, die nur schwer inaktiviert werden können. Geringe Mengen an RNase sind bereits ausreichend, um RNA vollständig zu zerstören. Daher muß beim Umgang mit RNA sehr vorsichtig gearbeitet werden, um die Proben nicht unabsichtlich mit RNasen zu kontaminieren. Alle im Folgenden zur Isolierung der RNA verwendeten Geräte wurden bei 260°C für mehrere Stunden ausgebacken. Falls dies nicht möglich war, wurden diese wie auch die verwendeten Lösungen, mindestens 45 min bei 120°C autoklaviert, um eventuell vorhandene RNasen zu inaktivieren. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt und steril filtriert.

4.1.1. Isolierung von RNA aus Blättern der Paprikapflanze

4.1.1.1. Isolierung der zellulären Gesamt-RNA

Die RNA (rRNA, tRNA und mRNA) wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus frisch geernteten Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* isoliert. Die Pflanzenblätter wurden unmittelbar nach dem Ernten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. 3,5 g des gefrorenen Pflanzenmaterials wurde mit Mörser und Pistill unter permanenter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder verarbeitet, in 10 ml Puffer A überführt und mit einem Ultraturrax gründlich homogenisiert. Das Gemisch wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, mit 1 ml Puffer B versetzt und kräftig geschüttelt. Nun wurde zunächst 10 ml wassergesättigtes Phenol zugegeben, kräftig geschüttelt, mit 2 ml Chloroform versetzt und nochmals geschüttelt. Das Gemisch wurde in Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (Ausschwingrotor (HB-4); 10000 rpm, 30 min, 4°C). Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 1 Volumen Isopropanol vermischt und für 45 min auf -20°C abgekühlt. Nun wurde das Gemisch zentrifugiert (Ausschwingrotor (HB-4); 10000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 2 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml Chloroform wurde das Gemisch gründlich gevortext und zentrifugiert (Ausschwingrotor (HB-4); 10000 rpm, 15 min, 4°C). Die obere Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und die isolierte zelluläre Gesamt-RNA mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 6,0) und 3 Volumen Ethanol in einem Ethanol/Trockeneis-Bad gefällt.

Die gefällte RNA wurde abzentrifugiert (Ausschwingrotor (HB-4); 10000 rpm, 15 min, 4°C), das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl Wasser resuspendiert. Die Konzentration der zellulären Gesamt-RNA wurde durch Absorptionsmessungen bei $\lambda=260$ nm bestimmt (Kap. 4.1.2.2.) und die Reinheit durch Formaldehyd-Gelelektrophorese überprüft (Kap. 4.1.2.1.).

Puffer A:

4 M	Guanidiniumthiocyanat
25 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA (pH 8,0)
0,1 M	β -Mercaptoethanol
0,5 % (v/v)	N-Lauroylsarcosin

Puffer B:

2 M	Natriumacetat
	pH 4,2

4.1.1.2. Isolierung von mRNA

Viele der eukaryontischen mRNAs enden mit einem Poly-A Schwanz von 20-250 Adenosinnukleotiden, der im Zellkern nach der Transkription an die RNA angehängt wird. rRNAs und tRNAs, die über 95 % der zellulären RNA ausmachen, werden hingegen nicht polyadenyliert. Diese Tatsache wird bei der Isolierung und Reinigung der mRNA ausgenutzt. Durch Hybridisierung an Oligo(dT)-Cellulose kann die Poly(A)⁺-mRNA aus der zellulären Gesamt-RNA isoliert werden. rRNA und tRNA binden nicht und können leicht von der Matrix gewaschen werden. In dieser Arbeit wurde mRNA mit Hilfe des Oligotex mRNA Kits aus der präparierten zellulären Gesamt-RNA (Kap. 4.1.1.1.) isoliert. Die Präparation der mRNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers im BATCH-Verfahren. Die gereinigte mRNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer von der Oligo(dT)-Cellulose eluiert und die Reinheit durch Formaldehyd-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.2.1.) überprüft. Die Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm (Kap. 4.1.2.2.) bestimmt.

4.1.2. Charakterisierung von RNA

4.1.2.1. Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Reinheit von RNA-Proben wurde mittels Formaldehyd-Gelelektrophorese überprüft, die in Vertikalgelapparaturen durchgeführt wurde. Die vertikalen Gele der Größe 20 cm x 12 cm x 0,2 cm wurden unmittelbar vor dem Lauf gegossen, wobei darauf geachtet wurde, daß möglichst RNase-frei gearbeitet wurde. Unter Kochen wurde 1,2 % (w/v) Agarose in Natriumacetatpuffer gelöst und der durch Sieden entstandene Flüssigkeitsverlust ausgeglichen. Nachdem die

Agaroselösung auf etwa 70°C abgekühlt war, wurde Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 2,2 M zugegeben und das Gel so schnell wie möglich gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer versehen. Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt, 10 min bei 75°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Formaldehydgele wurden zunächst bei einer Spannung von 100 V betrieben, bis die Proben aus den Auftragstaschen vollständig in das Gel eingelaufen waren. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele zunächst für 15 min in Ethidiumbromidlösung und anschließend für 10 min in Laufpuffer geschwenkt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) konnte die Lage der Banden im Gel durch ihre Fluoreszenz aufgrund der in die RNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle festgestellt werden.

Natriumacetatpuffer:	40 mM Natriumacetat 2 mM EDTA (2,2 M Formaldehyd; wird erst nach dem Schmelzen der Agarose zugegeben) pH 4,8
Laufpuffer:	40 mM Natriumacetat 2 mM EDTA pH 4,8
Ladepuffer:	50 % (v/v) Formamid 20 % (v/v) Glycerin 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol 2,2 M Formaldehyd 40 mM Natriumacetat pH 4,8
Ethidiumbromidlösung:	0,5 µg/ml Ethidiumbromid in Laufpuffer

4.1.2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration kann durch Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm bestimmt werden. Die Absorption von 1 AU bei $\lambda=260$ nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Daraus läßt sich folgende Formel ableiten (Gleichung 4-1):

$$c_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = 40 \cdot A_{260} \quad (4-1)$$

Diese Beziehung kann nur angewandt werden, wenn die Konzentrationsbestimmung in Wasser durchgeführt wird. Außerdem sollten die gemessenen Absorptionswerte größer als 0,15 AU sein, um die Aussagekraft des Meßwertes zu gewährleisten.

4.1.3. cDNA Synthese

Bei der cDNA-Synthese werden die isolierten mRNAs durch Einsatz von reverser Transkriptase (RNA-gesteuerte DNA-Polymerase) in Stränge komplementärer DNA (cDNA) transkribiert. Das Enzym benutzt dabei eine RNA-Matrize, ähnelt aber ansonsten der DNA-Polymerase I. Die cDNA-Synthese wurde in dieser Arbeit mittels AMV-Reverser-Transcriptase durchgeführt. Als Primer wurden Oligo(dT)-Primer und sogenannte Random-Primer verwendet, die eine Erststrang-cDNA-Synthese der 3'-Enden der Transkripte erlauben. Oligo(dT)-Primer sind Oligonukleotide mit einer Nukleotidabfolge von 12-18 dTs, die spezifisch an den Poly(A)-Schwanz von eukaryon-tischer mRNA binden. Der Random-Primer setzt sich aus einem Hexanukleotidgemisch unterschiedlicher Sequenz zusammen. Sie binden "zufällig" an die RNA und führen zu einem Pool unterschiedlich langer cDNAs. Im Anschluß an die Erststrang-cDNA-Synthese wurde die RNA des entstandenen Hybrides mit RNase H verdaut. Die dadurch entstehenden RNA-Oligo-nukleotide dienen als Primer für die Gegenstrangsynthese durch DNA-Polymerase I. Die cDNA-Synthese aus Paprika-mRNA wurde typischerweise nach folgender Vorschrift durchgeführt:

Primer-Hybridisierung:	2,0 µg Poly(A) ⁺ -mRNA aus <i>Capsicum annuum Yolo Wonder</i> 1,0 µg Oligo(dT)-Primer 1,0 µg Random-Primer H ₂ O ad 13,5 µl → 2 min bei 68°C, danach 5 min bei RT
Erststrang-Synthese:	13,5 µl Primer-Hybridisierungsmix (siehe oben) 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) 4,0 µl First=Second Strand Buffer [150 mM TRIS, pH 8,0; 50 mM MgCl ₂ ; 25 mM DTT; 500 mM KCl] 1,0 µl dNTPs (10 mM) 1,0 µl AMV-Reverse-Transcriptase (25 U/µl) → 5 min auf Eis, danach 1 h bei 42°C
Zweitstrang-Synthese:	20,0 µl Erststrang-Synthesemix (siehe oben) 27,5 µl H ₂ O 8,0 µl First=Second Strand Buffer [150 mM TRIS, pH 8,0; 50 mM MgCl ₂ ; 25 mM DTT; 500 mM KCl] 2,0 µl dNTPs (10 mM) 1,2 µl RNase H (1 U/µl) 1,3 µl DNA-Polymerase I (5 U/µl) → 1 h bei 15°C, danach 1 h bei 22°C

Zur Reinigung der synthetisierten cDNA wurde der Zweitstrang-Synthesemix mit 90 µl Wasser verdünnt, zunächst mit 150 µl Phenol/Chloroform und schließlich mit 1 Volumen Chloroform

extrahiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die cDNA unter Zugabe von 10 µg Glycogen mit 0,1 Volumen 3M Natriumacetatlösung (pH 9,0) und 3 Volumen Ethanol im Ethanol/Trockeneis-Bad gefällt. Das cDNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 20 µl Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde mittels vertikaler Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.4.1.) überprüft und die Konzentration durch Absorptionsmessungen bei $\lambda=260$ nm (Kap. 4.1.4.2.) bestimmt.

4.1.4. Charakterisierung von cDNA

4.1.4.1. Vertikale Agarose-Gelelektrophorese

Durch vertikale Agarose-Gelelektrophorese können die DNA-Fragmente der synthetisierten cDNA (konstantes Masse-Ladungsverhältnis) nach ihrer Größe aufgetrennt und so die Qualität der cDNA abgeschätzt werden. Als Gelmatrix wurde ein 1,2 % (w/v) Agarose-Gel verwendet. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose in TBE aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf etwa 70°C wurden die vertikalen Gele der Größe 20 cm x 12 cm x 0,2 cm gegossen und am oberen Ende des Gels mit Hilfe eines Kammes Taschen für den Probenauftrag erzeugt. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine Vertikalgelapparatur eingesetzt und am oberen und unteren Ende mit TBE überschichtet. Die zu untersuchenden cDNA-Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen Probenauftragspuffer versetzt und in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt, bis die Proben vollständig in das Gel eingewandert waren. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad eingelegt und anschließend mit TBE gewaschen. Bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) konnte nun die Lage der Banden im Gel durch ihre Fluoreszenz aufgrund der in die DNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle festgestellt werden.

TBE:	90 mM TRIS/HCl
	90 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	pH 8,0
Probenauftragspuffer (6x):	30 % (v/v) Glycerin
	0,25 % (w/v) Xylencyanol
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Färbebad: 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE

4.1.4.2. Bestimmung der cDNA-Konzentration

Die Konzentration der cDNA kann entsprechend der in Kapitel 4.1.4.2. beschriebenen DNA-Konzentrationsbestimmung ermittelt werden.

4.2. Arbeiten mit DNA

Desoxyribonukleasen (DNasen) sind Enzyme, welche die Phosphodiesterbindungen der Polynukleotidstränge der DNA spalten. Bereits geringe Mengen des Enzyms sind ausreichend, um DNA-Stränge abzubauen. Daher sollte beim Umgang mit DNA vorsichtig gearbeitet werden. Alle verwendeten Geräte und Lösungen wurden 20 min bei 120°C autoklaviert, um eventuell vorhandene DNasen zu inaktivieren. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert.

4.2.1. Reinigung und Charakterisierung von DNA

4.2.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente (konstantes Masse-Ladungsverhältnis) können mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Gelmatrix wird dabei abhängig von der Größe der zu untersuchenden Fragmente ein 0,8 % (w/v) bis 1,2 % (w/v) Agarose-Gel verwendet. Durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge (Marker-DNA) kann eine Größenbestimmung durchgeführt werden. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Horizontalgelapparaturen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde eine entsprechende Menge Agarose in TAE aufgeköcht. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt, in die vorbereitete Gelapparatur gegossen und mit Hilfe eines Kammes Geltaschen für den Probenauftrag erzeugt. Das erstarrte Gel wurde mit TAE überschichtet, die DNA-Proben mit einer entsprechenden Menge Probenauftragspuffer (Kap. 4.1.4.1.) versetzt und in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 70 V durchgeführt. Bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm) konnte die Lage der Banden im Gel durch ihre Fluoreszenz aufgrund der in die DNA interkalierten Ethidiumbromidmoleküle festgestellt werden.

TAE:

- 40 mM TRIS/HCl
- 20 mM Essigsäure
- 1 mM EDTA
- pH 8,0

4.2.1.2. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des JETsorb-Kits aus Agarose-Gelen isoliert. Dazu wurde die DNA-Bande unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert. Die Qualität der isolierten DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.2.1.1.) überprüft.

TE-Puffer:

- 10 mM TRIS/HCl
- 1 mM EDTA
- pH 8.0

4.2.1.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA absorbiert im ultravioletten Spektralbereich mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda=260$ nm. Die Konzentration doppelsträngiger DNA läßt sich dabei nach folgender Formel (Gleichung 4-2) berechnen:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260\text{nm}} \cdot \frac{V}{20} \quad (4-2)$$

wobei c die gesuchte DNA-Konzentration, V den Verdünnungsfaktor der zu messenden Probe und $A_{260\text{nm}}$ die Anzahl der bei $\lambda=260$ nm gemessenen Absorptionseinheiten darstellt. Die Probe wurde in einer UV-durchlässigen Quarzküvette der Dicke 1 cm vermessen.

4.2.1.4. DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden mit der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Ein Sequenzieransatz hatte typischerweise folgende Zusammensetzung:

- 1,0 μl DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 1,0 μl Sequenzierprimer (10 pmol/ μl)
- 4,0 μl Big Dye Terminator-Mix
- 4,0 μl H₂O

Der Big Dye Terminator-Mix enthielt optimierte Konzentrationen an dNTPs und an den mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Dideoxynukleotiden, sowie eine

thermostabile DNA-Polymerase. Die Sequenzieransätze wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 30 µl Mineralöl überschichtet und in einem *Thermocycler* 30 Zyklen des folgenden PCR-Programms unterzogen: 96°C für 30 s, 50°C für 15 s und 60°C für 4 min. Die weitere Aufreinigung der Sequenzierproben, die Gelelektrophorese mit gekoppelter Detektion der Fluoreszenzsignale sowie die Auswertung der Fluoreszenzpeaks wurden durch Dr. Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

4.2.2. Vermehrung und Präparation von DNA und DNA-Fragmenten

4.2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA, cDNA oder Plasmiden und zur Mutagenese von Plasmid-DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Eine PCR wurde üblicherweise mit Deep Vent DNA-Polymerase durchgeführt und hatte folgende Zusammensetzung:

15,0 µl	Primer (5'-Ende, 2 pmol/µl)
15,0 µl	Primer (3'-Ende, 2 pmol/µl)
1,0 µl	DNA-Template (5 µg/µl)
1,0 µl	dNTPs (25 mM von jedem Nukleotid)
4,0 µl	MgSO ₄ (100 mM)
5,0 µl	Thermopolpuffer (10x)
1,5 µl	Deep Vent DNA-Polymerase (2000 U/µl)
7,5 µl	H ₂ O
30,0 µl	Mineralöl zum Überschichten des Reaktionsansatzes

Der Reaktionsansatz wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in einem *Thermocycler* folgendem PCR-Programm unterzogen:

- 1) 5 min bei 95°C
- 2) 30 Zyklen: a) 1 min bei 95°C (Schmelzen der DNA)
b) 1,5 min bei Tanneal (Annealing)
c) 3,0 min bei 72°C (Elongation)
- 3) 5 min bei 72°C
- 4) Reaktionsansatz bei 4°C halten
→ Tanneal berechnet sich über den A:T und G:C Gehalt der Primer

Die PCR-Ansätze wurden anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen, um überschüssige Deoxynukleotide, Primer und Polymerase abzutrennen und das gewünschte DNA-Fragment zu isolieren.

4.2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmide wurden mit Hilfe der Qiagen Plasmid Kits aus Bakterienzellen isoliert. Das Prinzip dieser Plasmidisolierung beruht auf alkalischer Lyse der Zellen und Anionenaustauschchromatographie, wobei die an das Säulenmaterial gebundene DNA durch hohe NaCl-Konzentrationen eluiert wird. Um das überschüssige Salz zu entfernen und die DNA zu konzentrieren, wurde diese zunächst mit Isopropanol im Ethanol/Trockeneis-Bad gefällt, das Pellet mit eiskühlem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in einem geringen Volumen TE-Puffer (Kap. 4.2.1.2.) aufgenommen. Abhängig von der Menge des zu isolierenden Plasmids wurden unterschiedliche Kits verwendet: Qiagen Plasmid Mini Kit (5 ml Übernachtskultur), Qiagen Plasmid Midi Kit (50 ml Übernachtskultur) und QIAprep Spin Miniprep Kit (2 ml Übernachtskultur). Die mit einer Einzelbakterienkolonie angeimpften Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C) und das Bakterienpellet nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA wurde wie in Kapitel 4.2.1.3. beschrieben photometrisch bestimmt und der Reinheitsgrad anhand des A_{260}/A_{280} -Absorptionsverhältnisses abgeschätzt.

4.2.3. Enzymatische Reaktionen an DNA

4.2.3.1. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA oder zur Konstruktion von Plasmiden wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Ein Restriktionsansatz wurde meist wie folgt pipettiert:

x µl Plasmid (1 µg bis 15 µg DNA)
1,5 µl Restriktionsenzym (\approx 1-3 U)
2,0 µl Restriktionspuffer (10x)
0,5 µl BSA (10 mg/ml)
ddH₂O ad 20 µl
→Inkubation bei 37°C für 1,5-3 h

Die verwendeten Enzyme wurden vom Hersteller mit den dazugehörigen Restriktionspuffern bezogen. Für analytische Zwecke wurden etwa 1 µg DNA, für präparative Zwecke bis zu 15 µg DNA verdaut. Zur Analyse des Restriktionsverdau wurde dieser mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.2.1.1.) elektrophoretisch aufgetrennt. Bei präparativen Verdau wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarose-Gel isoliert (Kap. 4.2.1.2.). Sollte ein Doppelverdau durchgeföhrt werden, wurden beide Restriktionsenzyme gleichzeitig in den Ansatz

pipettiert und ein geeigneter Restriktionspuffer für den Doppelverdau entsprechend den Angaben des Herstellers ausgewählt. Wiesen die beiden Enzyme komplett unterschiedliche Pufferanforderungen auf, wurde zunächst ein Einzelverdau mit einem Enzym durchgeführt, das Produkt über ein Agarose-Gel gereinigt, aus dem Gel isoliert und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym verdaut.

4.2.3.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA-Fragmente kovalent zu verbinden, müssen mit Hilfe des Enzyms Ligase aus dem Bakteriophagen T4 Phosphodiesterbindungen geknüpft werden. Dazu ist es nötig, daß mindestens ein DNA-Ende eine 5'-Phosphatgruppe trägt. Ein Ligationsansatz wurde in der Regel wie folgt pipettiert:

150-300 ng	linearisierte Vektor-DNA
x ng	Insert-DNA (molares Verhältnis Insert:Vektor = 4:1)
1,5 µl	T4-Ligase Puffer (10x)
1,5 µl	T4-Ligase
	ddH ₂ O ad 15 µl

Der Ansatz wurde wahlweise 3 h bei RT oder 16 h bei 16°C inkubiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde dann zum Transformieren kompetenter Bakterien verwendet (Kap. 4.3.2.2.).

4.3. Arbeiten mit Bakterien

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der Arbeitsgeräte und Medien und somit auf die Vermeidung von Kontaminationen durch andere Bakterienstämme, Phagen oder Pilze geachtet. Medien, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden 20 min bei 120°C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert.

4.3.1. Anzucht von Bakterien

4.3.1.1. Platten- und Glycerinkulturen

Zur Herstellung von Plattenkulturen wurde LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) mit 15 g/l Bacto-Agar versetzt und autoklaviert. Die Lösung wurde auf ca. 55°C abgekühlt, je nach Selektionsanforderung entweder mit 100 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin oder 25

$\mu\text{g/ml}$ Kanamycin versetzt und ca. 5 mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Agar-Platten offen für 20-30 min zum Trocknen in der Sterilbank gelassen und steril verpackt bei 4°C bis zu einem Monat gelagert. Zum Ausplattieren von Bakterien aus Flüssigkulturen wurde 10-500 μl der Bakterienkultur auf eine Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen. Zum Animpfen aus Glycerinkulturen wurde eine sterile Impföse verwendet. Die Platten wurden zum Austrocknen etwa 15 min bei RT gelagert und dann umgedreht für 10-16 h bei 37°C inkubiert. Die bakterienkolonietragenden Platten konnten bei 4°C gelagert noch für 4-6 Wochen verwendet werden.

Eine längerfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgte mittels Glycerinkulturen. Dazu wurde 1 ml einer stationären Flüssigkultur (Kap. 4.3.1.2.) in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, mit 0,5 ml Glycerin vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl
- ddH₂O ad 1 l

→ autoklavieren (20 min, 121°C)

4.3.1.2. Flüssigkulturen

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde LB-Medium in Ansätzen zu 100 ml, 250 ml, 500 ml und 1 l in Schüttelkolben mit Schikanen - zur besseren Sauerstoffaufnahme der Bakterien - autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das LB-Medium je nach Selektionsanforderung mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin oder 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) und mit Bakterien einer Platten- oder Glycerinkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden bei RT oder 37°C in einem Bakterien-schüttler bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 140 rpm inkubiert.

4.3.1.3. Fermentation von *E. coli*

a) Expression von pFNR in *E. coli*

Die cDNA der prozessierten pFNR wurde in den Expressionsvektor *pET-22b(+)* (rekombinantes Produkt: pFNR) kloniert. Transformationskompetente BL21(DE3)-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid *pET22b(+)-pFNR* transformiert. Zwei Schüttelkolben mit je 100 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) wurden mit dem Transformationsansatz

angeimpft und für 12-16 h bei 37°C geschüttelt. Für die Fermentation wurden zwölf Schüttelkolben mit je 1 l ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) vorbereitet, mit je 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei RT kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Nach 5 h Induktionszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4200 x g, 25 min, 4°C), in pFNR-Aufschlußpuffer aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

pFNR-Aufschlußpuffer:

25 mM	TRIS/HCl
150 mM	NaCl
10 mM	EDTA
2 mM	β-Mercaptoethanol
1 mM	PMSF
5 mM	Benzamidinhydrochlorid
	pH 8,0

b) Expression von pFd in *E. coli*

Für die Expression des prozessierten pFd in *E. coli* wurde die codierende cDNA in den Expressionsvektor *pET-22b(+)* (rekombinantes Produkt: pFd) kloniert. Transformationskompetente BL21(DE3)-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid *pET22b(+)-pFd* transformiert. Der Transformationsansatz wurde in einen Schüttelkolben mit 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt und bei 37°C kultiviert. Für die Fermentation wurden zwölf Kolben mit je 1 l ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) vorbereitet, mit je 10 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C kultiviert. Betrug die OD₆₀₀ der Bakterienkulturen etwa 2,5, wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0,2 mM) induziert. Die Zellen wurden nach 2 h Induktionszeit geerntet (4200 x g, 25 min, 4°C), in pFd-Aufschlußpuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

pFd-Aufschlußpuffer:

50 mM	Kaliumphosphat
1 mM	EDTA
1 mM	β-Mercaptoethanol
1 mM	PMSF
	pH 7,4

c) Expression der 19S-ATPasen YTA1, YTA2, YTA3, YTA5 und SUG1 in *E. coli*

Zunächst wurden die cDNAs der einzelnen ATPasen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (Tabelle 4-1). Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden transformationskompetente BL21(DE3)-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert (Kap. 4.3.2.2.).

Tabelle 4-1

Konstruierte prokaryontische 19S-ATPase-Expressionsplasmide und Kultivierungsbedingungen der *E. coli* BL21(DE3)-Expressionssysteme.

ATPase	Expressionsvektor	T[°C]	Induktion (OD ₆₀₀)	Induktionszeit [h]	rekomb. Produkt
YTA1:	<i>pRSET6c</i> -YTA1	37°C	0,5	6	YTA1
	<i>pRSET6c</i> -YTA1(6xHisTag)	37°C	0,5	6	6xHis-YTA1
	<i>pGEX-4T-2</i> -YTA1	37°C	0,8	14	GST-YTA1
	<i>pQE9</i> -YTA1	37°C	0,8	4,5	YTA1
YTA2:	<i>pRSET6c</i> -YTA2	37°C	0,6	16	YTA2
	<i>pRSET6c</i> -YTA2(6xHisTag)	37°C	0,8	6	6xHis-YTA2
YTA3:	<i>pRSET6c</i> -YTA3	37°C	0,8	6	YTA3
	<i>pET22b(+)</i> -YTA3	37°C	0,8	4,5	YTA3
YTA5:	<i>pRSET6c</i> -YTA5	37°C	0,8	6	YTA5
	<i>pGEX-4T-2</i> -YTA5	37°C	0,6	5	GST-YTA5
	<i>pQE9</i> -YTA5	37°C	0,6	4,5	YTA5
SUG1:	<i>pRSET6c</i> -SUG1	37°C	0,8	6	SUG1
	<i>pMAL-c2</i> -SUG1	37°C	0,8	4,5	MBP-SUG1

Ein Schüttelkolben mit 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) wurde mit dem Transformationsansatz angeimpft und die Vorkultur über Nacht bei 37°C geschüttelt. Für die Fermentation wurden zwölf Schüttelkolben mit je 1 l ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) vorbereitet, mit je 5 ml der Vorkultur angeimpft und unter den in Tabelle 4-1 beschriebenen Kultivierungsbedingungen bis zum Induktionszeitpunkt kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Nach der entsprechenden Induktionszeit wurden die Zellen abzentrifugiert (4200 x g, 25 min, 4°C) und das Bakterienpellet in einer entsprechenden Menge Aufschlußpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden, sofern sie nicht sofort im Anschluß aufgearbeitet wurden, bei -20°C gelagert.

Aufschlußpuffer:

- 20 mM TRIS/HCl
- 150 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 0,01 % (v/v) Triton X-100
- 1 µM PMSF
- 5 µM Benzamidin
- 1 mM DTT
- pH 7,5

d) Expression von S2 in *E. coli*

Zunächst wurde die cDNA der humanen 19S-Untereinheit S2 in die Expressionsvektoren *pGEX-2T* (rekombinantes Produkt: GST-S2) und *pGEX-5X-1* (rekombinante Produkt: GST-S2) kloniert. Für die Proteinexpression in *E. coli* wurden transformationskompetente BL21(DE3)-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert (Kap. 4.3.2.2.). Der Transformationsansatz wurde in einen Schüttelkolben mit 100 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) überführt und die Vorkultur 16-20 h bei 37°C inkubiert. Für die Fermentation wurden zwölf Schüttelkolben mit je 1 l antibiotikahaltigem LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) vorbereitet. Diese wurden mit je 2 ml der Vorkultur angeimpft, mit 0,5 µg/ml ATP versetzt und bei RT kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 2,0 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Zusätzlich wurde 100 µg/ml Ampicillin und 0,5 µg/ml ATP zugegeben. Die Zellen wurden nach 4 h Induktionszeit abzentrifugiert (4200 x g, 25 min, 4°C), in S2-Aufschlußpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

S2-Aufschlußpuffer:	25 mM	TRIS/HCl
	150 mM	NaCl
	1 % (v/v)	Triton X-100
	100 µM	PMSF
	2 Tabletten	Proteaseinhibitor-Cocktail
	1 Spatelspitze	Lysozym
	1 Spatelspitze	DNase
		pH 7,5

4.3.2. Arbeiten mit transformationskompetenten Zellen

4.3.2.1. Herstellung transformationskompetenter Zellen

a) Kompetente Zellen für die Hitzeschock-Methode

Zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterien für die Hitzeschock-Methode wurden 50 ml LB-Medium mit 500 µl einer entsprechenden Vorkultur (Kap. 4.3.1.2.) angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert, 5 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 20 ml eisgekühltem TFB I resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C). Nun wurde das Pellet in 2 ml TFB II resuspendiert und die Bakteriensuspension aliquotiert (Aliquot: 160 µl). Die Aliquots wurden 20 min auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

TFBI:	30 mM Kaliumacetat
	100 mM RbCl
	10 mM CaCl ₂
	50 mM MnCl ₂
	15 % (v/v) Glycerin
	pH 5,8
	→ Der pH 5,8 wurde mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei –20°C aufbewahrt.
TFBII:	10 mM PIPES
	10 mM RbCl
	75 mM CaCl ₂
	15 % (v/v) Glycerin
	pH 6,5
	→ Der pH 6,5 wurde mit 1 M KOH eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei –20°C aufbewahrt.

b) Kompetente Zellen für die Elektroporation

Die höchsten Transformationsraten werden mit elektrokompetenten Zellen erzielt. Zu ihrer Herstellung wurde 1 l SOB-Medium mit 1 ml einer entsprechenden Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min, 4°C), zweimal mit je 500 ml eiskaltem WB-Puffer gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem WB-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl-Aliquots unterteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

SOB-Medium:	20 g Bacto Trypton
	5 g Hefeextrakt
	0,584 g NaCl
	0,186 g KCl
	ddH ₂ O ad 1 l

WB-Puffer:	10 % (v/v) Glycerin (steril)
-------------------	------------------------------

4.3.2.2. Transformation kompetenter *E. coli*

a) Hitzeschock-Methode

Die transformationskompetenten *E. coli* Zellen (Kap. 4.3.2.1.) wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA oder 7,5 µl eines Ligationsansatzes (Kap. 4.2.3.2.) versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der Ansatz für 2 min bei 42°C erhitzt (Hitzeschock), kurz auf Eis abgekühlt, mit 400 µl LB-Medium versetzt und unter Schütteln bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten (Kap. 4.3.1.1.) ausplattiert, welche das zur Selektion erforderliche Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden für 14-20 Stunden bei 37°C inkubiert.

b) Elektroporation

Die für die Elektroporation vorbereiteten transformationskompetenten Zellen (Kap. 4.3.2.2.) wurden auf Eis aufgetaut. 40 µl der Zellen wurden mit 0,01-0,1 µg Plasmid-DNA oder 2 µl eines Ligationsansatzes (Kap. 4.2.3.2.) versetzt und auf den Boden einer Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) pipettiert. Um die Leitfähigkeit der zu transformierenden DNA herabzusetzen, wurden die DNA Proben zuvor auf Nitrozellulosemembranen gegen steriles, bidestilliertes Wasser dialysiert. Die Elektroporation wurde in einem Elektroporator bei einer Spannung von 1650 V durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium aufgenommen, bei 37°C unter Schütteln für 30 min inkubiert und ein Teil des Ansatzes (50 µl, 100 µl und 200 µl) auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten (Kap. 4.3.1.1.) ausplattiert. Die Platten wurden für 8-16 h bei 37°C inkubiert.

4.4. Arbeiten mit Hefen

4.4.1. Anzucht von Hefen

In der Hefegenetik werden Stämme verwendet, die die Fähigkeit zur Synthese einer bestimmten Aminosäure oder von Adenin bzw. Uracil verloren haben. In solchen Zellen besteht ein Selektionsdruck für Plasmide, die den Stoffwechseldefekt ausgleichen. Die verwendeten *Saccharomyces cerevisiae* DY150-Zellen weisen einen defekten Uracil-Stoffwechselweg auf. Daher müssen alle Kulturen auf synthetischen Medien gezogen werden, bei denen der Selektionsmarker Uracil fehlt. Die verwendeten Schüttelkolben wiesen zur besseren Sauerstoffzufuhr Schikanen auf und waren nur zu einem Viertel ihres Fassungsvermögens mit SC-ura-Medium befüllt. Das Medium wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

4.4.1.1. Platten- bzw. Flüssigkulturen

a) Medien ohne Selektionsdruck

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* DY150 (ohne transformiertes Expressionsplasmid) wurde YEPD-Medium verwendet. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C in einem Schüttler bei einer Geschwindigkeit von 200 rpm inkubiert. Zur Herstellung von Plattenkulturen wurde YEPD-Medium mit Bacto-Agar (34,3 g/l) versetzt und 20 min bei 121°C

autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurden 8 mm dicke Platten gegossen. Diese konnten bei 4°C für etwa einen Monat gelagert werden.

YEPD-Medium:

1 % (w/v)	Bacto Yeast Extract
2 % (w/v)	Bactopeptone

→ autoklavieren und vor Gebrauch folgende steril filtrierte Lösung zugeben:
2 % (w/v) Glucose (40 % (w/v) Glucose-Stammlösung)

YEPD-Platten:

350 ml	YEPD-Medium
12 g	Bacto-Agar

b) Medien mit Selektionsdruck

Zur Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae* DY150-Zellen wurde der eukaryontische Expressionsvektor *pYEX-4T-1* verwendet. Nach Transformation in kompetente DY150-Zellen wurden diese in SC-ura-Medium bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Zur längerfristigen Lagerung der plasmidtragenden Zellen wurden diese auf SC-ura-Platten ausgestrichen und konnten bei 4°C für etwa vier Wochen gelagert werden. Zur Herstellung von SC-ura-Platten wurde SC-ura-Medium mit 40 g/l Bacto-Agar versetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurden 8 mm dicke Platten gegossen.

SC-ura-Medium:

40,2 g	YNB (30,0 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 10,2 g YND)
12,0 g	DO-6AA
	ddH ₂ O ad 6 l

→ autoklavieren und vor Gebrauch folgende steril filtrierte Lösungen zugeben:

300 ml	40 % (w/v) Glucoselösung
90 ml	5,6 g/l Adeninlösung
38 ml	12,5 g/l Histidinlösung
62 ml	13,2 g/l Leucinlösung
28 ml	17,9 g/l Lysinlösung
40 ml	8,0 g/l Tryptophanlösung

SC-ura-Platten:

4,0 g	YNB (3,0 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1,02 g YND)
1,2 g	DO-6AA
12,0 g	Bacto-Agar
	ddH ₂ O ad 300 ml

→ autoklavieren und vor Gebrauch folgende steril filtrierte Lösungen zugeben:

30 ml	40 % (w/v) Glucoselösung
1,2 ml	5,6 g/l Adeninlösung
1,2 ml	12,5 g/l Histidinlösung
3,6 ml	13,2 g/l Leucinlösung
1,8 ml	17,9 g/l Lysinlösung
2,4 ml	8,0 g/l Tryptophanlösung

→ gut mischen und 8 Platten gießen

DO-6AA:	2,0 g L-Alanin	2,0 g L-Isoleucin
	2,0 g L-Arginin	2,0 g L-Phenylalanin
	2,0 g L-Asparagin	2,0 g L-Prolin
	2,0 g L-Asparaginsäure	2,0 g L-Serin
	2,0 g L-Cystein	2,0 g L-Threonin
	2,0 g L-Glutamin	2,0 g L-Tyrosin
	2,0 g L-Glutaminsäure	2,0 g L-Valin
	2,0 g L-Glycin	2,0 g myo-Inositol
	2,0 g L-Methionin	0,2 g PABA
	→ sehr gut mörsern und in Flasche aufbewahren	

4.4.1.2. Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Proteinexpression in Hefe wurde die YTA3-cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor *pYEX-4T-1* kloniert. Das Expressionsplasmid *pYEX-4T-1-YTA3* wurde in transformationskompetente DY150-Zellen transformiert (Kap. 4.3.2.2.), der Ansatz auf einer SC-ura-Platte ausgestrichen und 2-3 d bei 30°C inkubiert. Zwei Schüttelkolben mit je 50 ml SC-ura-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft, wobei die Zellen durch kurzes Vortexen der Schüttelkolben vereinzelt wurden. Die Vorkulturen wurden bei 30°C und kräftigem Schütteln für 24-36 h kultiviert. Für die Fermentation wurden zwölf Schüttelkolben mit je 500 ml SC-ura-Medium vorbereitet, mit je 5 ml der Vorkultur angeimpft und 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden kolbenweise abzentrifugiert (500 x g, 20 min, 4°C), das überstehende Medium fast vollständig verworfen und die pelletierten Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Zwölf frische Schüttelkolben mit je 500 ml SC-ura-Medium wurden vorbereitet. Mit den resuspendierten Zellen eines Kolbens wurde jeweils wieder ein neuer Schüttelkolben angeimpft und die Zellen 2 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nun erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von CuSO₄ (Endkonzentration: 0,5 mM). Nach einer Induktionszeit von 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (500 x g, 20 min, 4°C) geerntet, noch ein- bis zweimal in D₁-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

D₁-Puffer:	25 mM TRIS/HCl
	150 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂
	20 % (w/v) Glycerin
	100 µM ATP
	1 µM PMSF
	5 µM Benzamidin

4.4.2. Arbeiten mit transformationskompetenten Hefen

4.4.2.1. Herstellung transformationskompetenter Hefezellen

Zur Herstellung transformationskompetenter Hefezellen wurden 20 ml YEPD-Medium mit einer DY150 Kolonie angeimpft, die Zellen durch Vortexen des Schüttelkolbens vereinzelt und 16h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Ein Kolben mit 20 ml YEPD-Medium wurde nun mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,4 kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (500 x g, 15 min, 4°C), das Zellpellet in 2 ml LiAc-TE resuspendiert und erneut abzentrifugiert (500 x g, 15 min, 4°C). Nun wurde das Pellet in 1 ml LiAc-TE resuspendiert und wieder abzentrifugiert (500 x g, 15 min, 4°C). Das Zellpellet wurde schließlich in 1 ml Sorbitol/LiAc-TE resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1,5 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die transformationskompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -80°C gelagert werden.

LiAc-TE:

0,1 M	LiAc
10 mM	TRIS/HCl
1 mM	EDTA
	pH 7,5 (steril filtriert)

Sorbitol/LiAc-TE:

1 Volumeneinheit	3M Sorbit
2 Volumeneinheiten	LiAc-TE
	→ steril filtriert

4.4.2.2. Transformation kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*

Die transformationskompetenten YD150 Zellen wurden im Eisbad aufgetaut, abzentrifugiert (3500 rpm, 1 min, 4°C) und in 150 µl Transformationslösung resuspendiert. 3-5 µg Plasmid-DNA wurde zum Ansatz pipettiert und dieser bei 30°C für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PEG/LiAc-TE wurde 1 h bei 30°C sowie 5 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3500 rpm, 30 sec, 4°C), das Zellpellet mit 1 ml Sorbitol/YNB gewaschen, in 200 µl Sorbitol/YNB resuspendiert und auf SC-ura-Platten (Kap. 4.4.1.1.) ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden 2-3 d bei 30°C inkubiert und konnten bei 4°C bis zu sechs Wochen gelagert werden.

PEG/LiAc-TE:

40 % (w/v)	PEG 3000
0,1 M	LiAc
10 mM	TRIS/HCl
1 mM	EDTA
	pH 7,5

		→ steril filtriert
Sorbitol/YNB:	1 M Sorbit	
	0,5 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
	0,17 % (w/v) YNB	
	2 % (w/v) Glucose	
		→ steril filtriert
Transformationslösung:	70 μl LiAc-TE	
	30 μl 3M Sorbitol	
	50 μl denatured salmon testes DNA	

4.5. Arbeiten mit Proteinen

4.5.1. Charakterisierung von Proteinen

4.5.1.1. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sollte die Reinheit eines Proteinkomplexes bzw. dessen Molekulargewicht abgeschätzt werden, wurde eine native Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Polyacrylamid-Gel wurde aus einem 8 %igen Trenngel und einem 3 %igen Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung der Gellösungen für ein natives Gel sah folgendermaßen aus:

Trenngel:	8,0 ml H_2O
	2,8 ml 2 M TRIS/HCl (pH 8,8)
	4,0 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
	40,0 μl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H_2O)
	10,0 μl TEMED
Sammelgel:	3,8 ml H_2O
	0,625 ml 1 M TRIS/HCl (pH 6,8)
	0,5 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
	50,0 μl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H_2O)
	15,0 μl TEMED

Die Proteinproben wurden mit einem Volumenäquivalent Probenauftragspuffer vermischt und in die Probenauftragstaschen des mit Laufpuffer überschichteten Gels aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinlängenstandard auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue (Kap. 4.5.1.4.) oder Silbernitrat gefärbt (Kap. 4.5.1.4.).

Laufpuffer:	200 mM TRIS/HCl
--------------------	-----------------

	200 mM Glycin
Probenauftragspuffer (2x):	200 mM TRIS/HCl (pH 6,8)
	200 mM Tricin
	0,2 % (w/v) Bromphenolblau
	20 % (w/v) Glycerin

4.5.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Je nach Molekulargewichtsbereich der zu trennenden Proteine wurden Minigele bestehend aus 10-16 %igen Trenngelen und 5-3 %igen Sammelgelen in einer Apparatur zu je acht Gelen gegossen. Die Zusammensetzung der Gellösungen (12 % Trenngel, 5 % Sammelgel) für acht Gele sah folgendermaßen aus:

Trenngel (12 %):	17 ml 2 M TRIS/HCl (pH 8,8)
	36 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
	26 ml H ₂ O
	0,9 ml SDS-Lösung (10 % (w/v) SDS in H ₂ O)
	200 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H ₂ O)
	70 µl TEMED
Sammelgel (5 %):	5,6 ml 1 M TRIS/HCl (pH 6,8)
	7,5 ml Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
	31,2 ml H ₂ O
	0,45 ml SDS-Lösung (10 % (w/v) SDS in H ₂ O)
	200 µl Ammoniumperoxodisulfatlösung (10% (w/v) APS in H ₂ O)
	70 µl TEMED

Die Proteinproben wurden mit einem Volumenäquivalent Probenauftragspuffer vermischt, 3 min bei 96°C inkubiert und auf das mit Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue (Kap. 4.5.1.4.) oder Silbernitrat gefärbt (Kap.4.5.1.4.).

Laufpuffer:	25 mM TRIS/HCl
	250 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS

Probenauftragspuffer (2x):	100 mM TRIS/HCl (pH 6,8)
	200 mM DTT
	4 % (w/v) SDS

0,2 % (w/v) Bromphenolblau
20 % (w/v) Glycerin

4.5.1.3. Western Blotting

Zur immunspezifischen Charakterisierung oder zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen müssen diese aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine zugängliche Matrix überführt werden. Dieser Vorgang wird als Blotten bezeichnet. Wie bei der Gelelektrophorese wird auch hier die Bewegung negativ geladener Moleküle (Protein assembliert mit SDS-Molekülen) zur Anode in einem elektrischen Feld ausgenutzt. Der sog. Semi-Dry-Blot erlaubt einen sehr schnellen Transfer der Proteine bei sehr geringen Puffermengen. Der Blotvorgang findet in einer Blotkammer statt. Die PVDF-Blotmembran (Größe entspricht der Größe des zu blottenden Gelstückes) wurde vor Gebrauch zunächst kurz in Methanol und dann in Transferpuffer eingelegt. Ein Stapel 3MM-Papier wurde mit Transferpuffer durchtränkt und auf die Anode der Blotkammer gelegt. Darauf wurde die Blotmembran, das Polyacrylamid-Gel und abschließend ein zweiter Stapel aus pufferdurchtränkten 3MM-Papier angeordnet. Vorhandene Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Stapels wurden vor dem Start des Blotvorgangs mit Hilfe einer Walze oder eines Glasstabes entfernt. Der Blot wurde bei konstanter Stromstärke von 60 mA für 3 h durchgeführt. Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Membran mit Coomassie Brilliant Blue (Kap. 4.5.1.4.) gefärbt und an der Luft getrocknet.

Transferpuffer:
39 mM Glycin
0,0037 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Methanol
48 mM TRIS/HCl
pH 8,3

4.5.1.4. Proteinfärbung

a) Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Sollten sehr geringe Proteinmengen auf dem Polyacrylamid-Gel nachgewiesen werden, wurde eine Silberfärbung des Gels durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel 1 h in Fixierlösung sowie 1-12 h in Inkubationslösung inkubiert, dreimal je 10 min mit ddH₂O gewaschen und anschließend 30 min in Silbernitratlösung gefärbt. Die Entwicklung erfolgte mit Carbonatlösung, bis die gewünschte Farbintensität der Gelbanden erreicht war und wurde mit EDTA-Lösung (18,6 g/l) abgestoppt. Alle Inkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Fixierlösung:
300 ml Ethanol
150 ml Eisessig

ddH₂O ad 1000 ml

Inkubationslösung:
 41 g Natriumacetat
 2 g Natriumthiosulfat
 250 ml Ethanol
 5 ml Glutardialdehyd (25 %)
 ddH₂O ad 1000 ml

Silbernitratlösung:
 1 g Silbernitrat
 300 µl Formaldehydlösung
 ddH₂O ad 1000 ml

Carbonatlösung:
 25 g Natriumcarbonat
 300 µl Formaldehydlösung
 ddH₂O ad 1000 ml
 pH 11,5 (Natriumcarbonat/Natriumhydrogencarbonat)

b) Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Das Polyacrylamid-Gel wurde in Färbelösung eingelegt, kurz in der Mikrowelle erhitzt (auf ca. 90°C) und für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel einige Male mit H₂O gespült, in Entfärber eingelegt und unter Schütteln so lange inkubiert, bis der Gelhintergrund nahezu entfärbt war und die Proteinbanden gut sichtbar wurden.

Färbelösung:
 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
 250 ml Ethanol
 80 ml Eisessig
 ddH₂O ad 1000 ml
 → Färbelösung durch groben Cellulose-Filter filtrieren

Entfärber:
 250 ml Ethanol
 80 ml Eisessig
 670 ml H₂O

c) Coomassie-Färbung von Western Blots

Die PVDF-Membran wurde für 1 min in Färbelösung (Kap. 4.5.1.4.) eingelegt, anschließend gut mit H₂O gewaschen und so lange in Entfärber eingelegt, bis der Hintergrund der Membran nur noch schwach blau gefärbt war und die Proteinbanden gut sichtbar wurden.

4.5.1.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

a) Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung

Die Proteinkonzentration einer reinen und konzentrierten Proteinlösung läßt sich über ihre Absorption bei $\lambda=280$ nm bestimmen. Voraussetzung hierfür ist die genaue Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung des Proteins. Aus der Anzahl der bei $\lambda=280$ nm absorbierenden Amino-

säuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein läßt sich der theoretische molare Absorptionskoeffizient nach der Methode von Gill & Hippel (Gill & Hippel, 1989) berechnen (Gleichung 4-3):

$$\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Cys}} \cdot \epsilon_{\text{Cys}} \quad (4-3)$$

wobei n_x die Anzahl der jeweiligen Aminosäure im Protein und ϵ_x der molare Absorptionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bei $\lambda=280$ nm ist ($\epsilon_{\text{Trp}}=5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Tyr}}=1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Cys}}=120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Über das Lambert-Beersche-Gesetz kann nun die Konzentration der Proteinlösung nach Gleichung 4-4 berechnet werden:

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{A_{280} \cdot M_r}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (4-4)$$

wobei d die Schichtdicke der Küvette in cm ist. Exakte Werte können nur für vollständig gereinigte Proteine bestimmt werden.

b) Proteinbestimmung nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt wurde alternativ mit der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Dazu wurde 200 μl Bradfordreagenz mit 1-20 μl Proteinlösung versetzt und das Gemisch auf 1 ml mit ddH₂O aufgefüllt. Die Probe wurde 5 min bei RT inkubiert und ihre Extinktion bei $\lambda=595$ nm gegen eine Blindprobe gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Eichreihe mit BSA in den Konzentrationen von 0,1 bis 0,15 $\mu\text{g/ml}$ (Absorptionsbereich 0 bis 1,2) gemessen und daraus eine Eichgerade bestimmt.

4.5.1.6. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) können Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Analytische Messungen wurden an einer SMART-Chromatographiestation, präparative Messungen an einer FPLC- oder ÄKTA-Chromatographiestation durchgeführt. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurden Säulenmaterialien mit unterschiedlichen Trennbereichen verwendet: Superose 12 (Trennbereich: 1-300 kDa), Superose 6 (Trennbereich: 5-5000 kDa), Superdex 75 (Trennbereich: 3-70 kDa) und Superdex 200 (Trennbereich: 10-600 kDa). Der Laufpuffer wurde speziell auf die Anforderungen des zu untersuchenden Proteins abgestimmt, enthielt jedoch mindestens 150 mM NaCl, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmaterial zu verhindern. Für die

Bestimmung des Molekulargewichts des zu untersuchenden Proteins wurden GPC-Läufe mit Kalibrierungsproteinen bekannter Molekularmasse durchgeführt und deren Elutionszeit bestimmt. Eine Eichgerade wurde erstellt, indem der Logarithmus des Molekulargewichts der Kalibrierungsproteine gegen ihre Elutionszeit aufgetragen wurde. Als Kalibrierungsproteine wurden Blue Dextran ($M_r=2000$ kDa), Thyroglobulin ($M_r=669$ kDa), Apoferritin ($M_r=443$ kDa), β -Amylase ($M_r=200$ kDa), Alkoholdehydrogenase ($M_r=150$ kDa), BSA ($M_r=66$ kDa) und Carbonic Anhydrase ($M_r=29$ kDa) verwendet.

4.5.1.7. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Technik für die Charakterisierung von Peptiden und Proteinen und wird zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Techniken: Die Elektrospraymassenspektrometrie (ESI-MS, electrospray ionisation mass spectrometry) ist eine sehr genaue Methode (Meßfehler: ± 1 Da). Sie wird jedoch durch Salze und Detergenzien leicht gestört. Die zu untersuchenden Proben müssen daher gegen Wasser dialysiert oder durch einen HPLC-Lauf vom Salz befreit werden. Die Laserdesorptionsmassenspektrometrie (MALDI-MS, matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry) ist wesentlich ungenauer. Sie eignet sich jedoch gut zur Massenbestimmung großer Proteine und ist relativ unempfindlich gegenüber Salzen und Detergenzien. In dieser Arbeit wurde meist die ESI-MS zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen herangezogen. Dazu wurden 20 μ l Proteinlösung (1 mg/ml) gegen Wasser oder einen niedrig konzentrierten, möglichst salzfreien Puffer dialysiert. Die Analyse der Probe wurde von der Abteilung für Proteinanalytik des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

4.5.1.8. N-terminale Proteinsequenzierung

Proteine können über den automatisierten Edman-Abbau sequenziert werden. Die jeweils N-terminale Aminosäure wird dabei nach Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC) als Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH-Derivat) abgespalten und kann nach einer HPLC-Auftrennung durch den Vergleich mit einem Standard-Aminosäuregemisch identifiziert werden. Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde durch Dr. Karl-Heinz Mann und Josef Kellermann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried auf einem Applied Biosystems Sequenzierer 470A durchgeführt. Sollte ein bestimmtes Enzym in einem Gemisch von Proteinen ansequenziert werden, so wurde die Probe mittels SDS-PAGE (Kap. 4.5.1.2.) elektrophoretisch

aufgetrennt und durch Western Blotting (Kap. 4.5.1.3.) auf einer PVDF-Membran fixiert. Die zu sequenzierende Proteinbande wurde aus dem gefärbten Blot (Kap. 4.5.1.4.) ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert. Sollten homogene Proteinlösungen ansequenziert werden, so wurde die Proteinlösung (ca. 1 mg/ml) zuvor gegen einen Niedrigsalzpuffer dialysiert und ohne vorherige PVDF-Membranfixierung sequenziert.

4.5.1.9. Aktivitätstest für die 19S-ATPasen

Die AAA-ATPasen katalysieren die Umsetzung von ATP in AMP und P_i . Das durch diese Reaktion freigesetzte Phosphat kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden nachgewiesen und quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurde der Phosphat-Assay nach Ames (Ames, 1966) durchgeführt, um das während der Katalyse entstehende Phosphat zu bestimmen und die Aktivität der ATPasen zu berechnen. Das freigesetzte Phosphat wurde durch Bildung eines Molybdän-Phosphat-Komplexes fixiert, welcher durch Absorptionsmessungen bei $\lambda=820$ nm quantifiziert werden kann. Ein typischer Ansatz zur Bestimmung der ATPase Aktivität setzte sich folgendermaßen zusammen:

Sample:	12 μ l 50 mM $MgCl_2$ 10 μ l 1 M KCl 10 μ l 100 mM MES (pH 6,0) 10 μ g Protein ddH ₂ O ad 188 μ l → 5 min Inkubation bei RT
Start der Reaktion:	188 μ l Sample (siehe oben) 12 μ l 50 mM Na_2ATP → 60 min Inkubation bei RT
Abstoppen der Reaktion:	200 μ l Sample (siehe oben; 60 min nach Start der Reaktion) 0,6 ml Färbelösung (10 mM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ in 0,5 M H_2SO_4 , 500 mM Ascorbinsäure) → 30 min Inkubation bei RT → vermessen der Proben bei $\lambda=820$ nm

Nachdem das Protein zum Reaktionsansatz (*Sample*) pipettiert wurde, wurde 5 min bei RT inkubiert. Nun wurde die katalytische Reaktion durch Zugabe von Na_2ATP gestartet. Nach einer Inkubation von 60 min bei RT wurde die Katalyse durch Zugabe der Färbelösung abgestoppt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert, um die Ausbildung des Molybdän-Phosphat-Komplexes zu gewährleisten und bei $\lambda=820$ nm vermessen. Für die Bestimmung der Proteinaktivität wurde eine Kalibrierung des Assays durch Kaliumdihydrogenphosphat im

Konzentrationsbereich zwischen 0-100 μM durchgeführt. Eine Eichgerade wurde erstellt, indem die Absorption der Proben bei $\lambda=820\text{ nm}$ gegen deren molare Phosphatkonzentration aufgetragen wurden. Die spezifische ATPase-Aktivität wird in Stoffmenge des entstandenen Phosphats pro mg Enzym und Zeit angegeben.

4.5.2. Enzymatische Reaktionen an Proteinen

4.5.2.1. Proteolyse von Fusionsproteinen

Die Proteine S2, YTA1, YTA3 und YTA5 wurden als GST-markierte Fusionsproteine, das Protein SUG1 als MBP-markiertes Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Die verwendeten Expressionsvektoren enthielten auf der 5'-Seite des Polylinkers eine Sequenz, welche für die Erkennungssequenz einer spezifischen Protease wie Thrombin oder Faktor Xa codiert. Dadurch kann das Fusionsprotein nach erfolgreicher Aufreinigung durch spezifische Proteolyse gespalten werden. Zur analytischen Spaltung der beiden fusionierten Proteine wurde das Fusionsprotein gegen einen für die jeweilige Protease geeigneten Puffer (siehe Angabe des Herstellers) dialysiert, mit Protease im Verhältnis Protein:Protease von 10:1 versetzt und vergleichsweise bei 37°C, RT und 4°C inkubiert. Nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 10 h und 24 h wurden Proben von je 10 μl entnommen, mit SDS-Auftragspuffer (Kap. 4.5.1.2.) versetzt und 3 min bei 96°C inkubiert, um die Proteolyse vollständig abzustoppen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE untersucht. So konnten geeignete Proteolysebedingungen ermittelt werden, um eine präparative Spaltung des Fusionsproteins durchzuführen.

4.5.2.2. Limitierte Proteolyse

Proteine werden in Gegenwart von Proteasen mäßiger Spezifität weitgehend verdaut. Bei geringen Proteasekonzentrationen und kurzen Inkubationszeiten werden bevorzugt flexible, leichter zugängliche Bereiche auf der Oberfläche von Proteinen angegriffen, während das Proteincore oft wesentlich resistenter gegen die Protease ist. So können durch limitierte Proteolyse stabile Fragmente des Proteins identifiziert werden. Die GST-fusionierte S2 wurde durch Proteasen unterschiedlicher Spezifität verdaut. 100 μl Proteinlösung (1 mg/ml) wurden gegen einen für die jeweilige Protease geeigneten Puffer (siehe Angaben des Herstellers) dialysiert, mit 2 μl Protease (1 mg/ml) versetzt und vergleichsweise bei 37°C, RT und 4°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben von 10 μl entnommen, mit einem

Volumenäquivalent SDS-Probenauftragspuffer (Kap. 4.5.1.2.) versetzt und 3 min bei 95°C inkubiert, um die Proteolyse vollständig abzustoppen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 4.5.1.2.) analysiert.

4.5.3. Konzentrierung von Proteinlösungen

a) Konzentrierung von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

Proteinlösungen wurden mittels Ultrafiltration umgepuffert und ankonzentriert. Zum Ankonzentrieren größerer Volumina wurde eine Amicon Druckzelle mit Membranen geeigneter Ausschlußgrenze (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa und 100 kDa) verwendet. Ein Stickstoffdruck von etwa 2,5 bar wurde an die Zelle angelegt, wodurch der Puffer durch die Poren der Membran gepreßt wurde, während die Proteinmoleküle von der Membran zurückgehalten wurden. War das Volumen der Proteinlösung kleiner als 15 ml bzw. 3 ml, wurde durch Zentrifugation mit Centriprep- bzw. Centricon-Konzentratoren entsprechender Ausschlußgrenze (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa und 100 kDa) ankonzentriert.

b) Konzentrierung von Proteinlösungen durch Dialyse

Die Konzentrierung von Proteinlösungen durch Dialyse ist eine sehr schonende Methode. Sie wurde angewandt, wenn große Volumina (>1 l) ankonzentriert werden sollten oder wenn es bei der Konzentrierung durch Ultrafiltration zur Proteinaggregation an der Membranoberfläche kam. Zur Konzentrierung wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (Porengröße: 12-16 kDa) überführt und dieser vollständig mit PEG 40000 umhüllt. Durch die eintretende Osmose wurde ein Volumenverlust im Dialyseschlauch hervorgerufen, der ein Ankonzentrieren der Proteinlösung bewirkte.

4.5.4. Renaturierung von Proteinen aus Einschußkörperchen

Manche Proteine werden bei der Expression in *E. coli* nicht in aktiver Form ins Cytoplasma überexprimiert, sondern von der Zelle in denaturierter Form in sogenannten Einschußkörperchen (*inclusion bodies*) gelagert. Nach Zellernte und Aufschluß der Zellen können diese Einschußkörperchen als schwerste Bestandteile zusammen mit den Zelltrümmern abzentrifugiert werden. Sie bilden am Boden des Zentrifugenbeckers ein weißes Pellet. Zur Isolierung und Reinigung der Einschußkörperchen wurden diese so gut wie möglich von den ebenfalls

pelletierten Zelltrümmern abgetrennt, in 0,5 % (v/v) LDAO aufgenommen und durch Pottern resuspendiert. Die Einschlußkörperchen wurden abzentrifugiert (JA-10 Rotor; 10000 rpm, 10 min, 4°C), erneut in 0,5 % (v/v) LDAO aufgenommen und resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um alle Verunreinigungen restlos abzutrennen. Die isolierten Einschlußkörperchen wurden in Denaturierungspuffer aufgenommen, diese aufgelöst und die denaturierten Proteine freigesetzt wurden. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde auf 12 mg/ml eingestellt. Für eine erfolgreiche Renaturierung des isolierten Proteins mußten zunächst geeignete Rückfaltungsbedingungen erarbeitet werden. Je 5 mg Protein wurden bei 4°C unter vorsichtigem Rühren in kleine Volumina verschiedener Rückfaltungspuffer mit unterschiedlicher Zusammensetzung eingetropt (Tropfgeschwindigkeit: 40 µl/min). Nach vollständigem Eintropfen wurde der Ansatz für 16 h bei 4°C inkubiert und eventuell aggregiertes Protein abzentrifugiert. Die rückgefaltete Proteinlösung wurde eingeengt und mittels CD-Spektroskopie auf ihren Faltungsgrad untersucht (Abteilung Bioorganische Chemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried). Waren geeignete Rückfaltungsbedingungen gefunden worden, wurden für präparative Proteinrückfaltungen 50 mg Protein in 200 ml des entsprechenden Rückfaltungspuffers eingetropt (Tropfgeschwindigkeit: 40 µl/min). Der Ansatz wurde bei 4°C für 16 h unter vorsichtigem Rühren inkubiert, eventuell aggregiertes Protein abzentrifugiert und die renaturierte Proteinlösung ankonzentriert. Im folgenden sind die für die Renaturierung der einzelnen 19S-ATPasen entwickelten Rückfaltungspuffer aufgelistet:

Denaturierungspuffer:

20 mM	TRIS/HCl
6 M (bzw. 8 M)	GnHCl (bzw. Harnstoff)
2 mM	MgCl ₂
0,5 % (v/v)	LDAO
	pH 7,5

YTA1-Rückfaltungspuffer:

20 mM	TRIS/HCl
75 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
500 mM	L-Arginin
10 mM	β-Mercaptoethanol
100 µM	ATP
	pH 7,5

(pGEX-4T-2-YTA1/
pRSET6c-YTA1)

YTA2-Rückfaltungspuffer:

20 mM	TRIS/HCl
120 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
20 % (v/v)	Glycerin
500 mM	L-Arginin
100 µM	ATP
	pH 7,5

(pRSET6c-YTA2)

YTA3-Rückfaltungspuffer:
 (*pET22b(+)-YTA3*)

20 mM	TRIS/HCl
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
500 mM	L-Arginin
20 % (v/v)	Glycerin
10 mM	β-Mercaptoethanol
100 μM	ATP
1 μM	PMSF
5 μM	Benzamidin
	pH 7,5

YTA5-Rückfaltungspuffer:
 (*pGEX-4T-2-YTA5*)

20 mM	TRIS/HCl
75 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
500 mM	L-Arginin
10 mM	β-Mercaptoethanol
100 μM	ATP
	pH 7,5

SUG1-Rückfaltungspuffer:
 (*pMAL-c2-SUG1*)

20 mM	TRIS/HCl
75 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
500 mM	L-Arginin
10 mM	β-Mercaptoethanol
100 μM	ATP
	pH 7,5

4.5.5. Proteinpräparation

4.5.5.1. Reinigung der nativen und rekombinanten pFNR

a) Zellaufschluß aus Blättern der Paprikapflanze

Die frisch geernteten Blätter der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* wurden in kleinere Stücke zerteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für den Zellaufschluß wurden 1 kg der zerkleinerten und bei -20°C gelagerten Blätter mit 100 g Glasperlen und 600-1000 ml Puffer A in einem Warring Blender aufgeschlossen. Das homogenisierte Material wurde mit einer Spatelspitze DNase und RNase versetzt und durch eine dicke Schicht Glaswolle und ein Nylonnetz filtriert. Verbliebene feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (10000 x g, 60 min, 4°C) und der Überstand auf eine Reactive Red 120-Sepharose-Säule aufgetragen.

Puffer A:

25 mM	TRIS-HCl
150 mM	NaCl
10 mM	EDTA
2 mM	β-Mercaptoethanol
1 mM	PMSF
5 mM	Benzamidinhydrochlorid
	pH 8,0

b) Zellaufschluß aus *E. coli*

Die in pFNR-Aufschlußpuffer aufgenommen und bei -20°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit je einer Spatelspitze DNase und Lysozym versetzt und durch Ultraschallbehandlung (14 min, 4°C) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation ($35000 \times g$, 60 min, 4°C) abgetrennt.

c) Affinitätschromatographie

Die Reactive Red 120-Sepharose-Säule (100 ml; $\varnothing = 2,3$ cm, Länge= 12 cm) wurde mit Puffer B äquilibriert und mit dem Proteinrohextrakt beladen. Durch Waschen mit Puffer B wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt, bevor die Proteinelution mittels eines linearen NaCl-Gradienten (500 ml; 50-1000 mM NaCl) gestartet wurde. Die pFNR-enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE bzw. durch das für pFNR charakteristische A_{458}/A_{280} -Absorptionsverhältnis ermittelt. Die Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer B dialysiert.

Puffer B:
25 mM TRIS-HCl
50 mM NaCl
pH 8,0

d) Anionenaustauschchromatographie

Die pFNR-enthaltende Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule (100 ml; $\varnothing = 2,3$ cm, Länge= 12 cm) aufgetragen. Mit Puffer B wurde solange gewaschen, bis keine Proteinabsorption bei $\lambda = 280$ nm mehr detektiert werden konnte. Die Proteine wurden nun in einem linearen NaCl-Gradienten (500 ml; 50-1000 mM) von der Säule eluiert. Die pFNR-enthaltenden Fraktionen wurden identifiziert, vereinigt und gegen Puffer C dialysiert.

Puffer C:
25 mM TRIS-HCl
1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
pH 8,0

e) Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Phenyl-Sepharose-Säule (60 ml; $\varnothing = 2,3$ cm, Länge= 7,2 cm) wurde zunächst mit Puffer C äquilibriert und anschließend mit dem dialysierten, pFNR-enthaltenden Proteineluat der IEC beladen. Die Säule wurde durch Waschen mit Puffer C von unspezifisch gebundenem Protein befreit und die Elution mittels eines linearen, absteigenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten (500 ml; 1,5-0

M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gestartet. Die pFNR-enhaltenden Fraktionen wurden identifiziert, gepoolt, ankonzentriert und durch Dialyse gegen Puffer B vom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ befreit.

4.5.5.2. Reinigung des rekombinanten pFd

a) Zellaufschluß

Die nach der Zellernte bei -20°C gelagerten Zellen wurden im Eisbad aufgetaut, mit je einer Spatelspitze Lysozym und DNase versetzt und durch Ultraschallbehandlung (14 min, 4°C) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert ($40000 \times g$, 60 min, 4°C).

b) Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Proteinkonzentration des Rohextraktes wurde auf etwa 15 mg/ml eingestellt und eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Zunächst wurde Ammoniumsulfat unter Rühren schrittweise bis zu einem Sättigungsgrad von 50 % (ca. 2,05 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) zugegeben, 2h bei 4°C inkubiert und das präzipitierte Material durch Zentrifugation abgetrennt (10000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 70 % (ca. 3,56 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) eingestellt und das Präzipitat nach zweistündiger Inkubation bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand auf eine mit Phosphatpuffer äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (100 ml; $\varnothing = 2,3$ cm, Länge= 12 cm) aufgetragen und diese so lange mit Phosphatpuffer gewaschen, bis keine Proteinabsorption bei $\lambda = 280$ nm mehr detektiert werden konnte. Die Proteinelution erfolgte durch einen linearen, absteigenden Ammoniumsulfatgradienten (500 ml; 70-30 % (w/v) Ammoniumsulfatsättigung). Die pFd-enhaltenden Fraktionen, die sich durch ein höheres A_{420}/A_{280} -Absorptionsverhältnis auszeichneten, wurden gepoolt und gegen TRIS-Puffer-1 dialysiert.

Phosphatpuffer:
50 mM Kaliumphosphat
3,56 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
pH 7,4

c) Anionenaustauschchromatographie

Das dialysierte Protein wurde auf eine mit TRIS-Puffer-1 äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (50 ml; $\varnothing = 2,3$ cm, Länge= 6 cm) aufgetragen. Nach intensivem Waschen wurde ein linearer Gradient (500 ml) von 50-500 mM NaCl in TRIS-Puffer-1 angelegt. Die pFd-enhaltenden Fraktionen wurden identifiziert, vereinigt und auf ein Endvolumen von 4-5 ml eingengt.

TRIS-Puffer-1: 25 mM TRIS/HCl

50 mM NaCl
pH 7,4

d) Gelpermeationschromatographie

Als letzten Reinigungsschritt wurde eine GPC an Superdex-75 (120 ml; Ø= 1,6 cm, Länge= 30 cm) durchgeführt. Dabei wurde das ankonzentrierte Protein auf die mit TRIS-Puffer-2 äquilibrierte Superdex-75-Säule aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die pFd-enhaltenden Fraktionen wurden identifiziert und ankonzentriert.

TRIS-Puffer-2: 25 mM TRIS/HCl
 150 mM NaCl
 pH 7,4

4.5.5.3. Reinigung des rekombinanten GST-markierten S2 aus Mensch

a) Zellaufschluß

Die nach der Zellernte in S2-Aufschlußpuffer resuspendierten Zellen (Kap. 4.3.1.3.) wurden auf Eis aufgetaut. Pro 50 ml Zellsuspension wurde eine Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail, sowie je eine Spatelspitze Lysozym und DNase zugegeben. Der Zellaufschluß wurde durch Ultraschallbehandlung (14 min, 4°C) durchgeführt und die Zelltrümmer entfernt (35000 x g, 60 min, 4°C).

b) Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde mittels Glutathion-Sepharose 4b im BATCH-Verfahren durchgeführt. Das Chromatographiematerial wurde gegen Puffer A äquilibriert, mit dem Proteinrohextrakt vermischt und für 120 min unter leichtem Rühren inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt (Puffer A) und die Proteine durch Stoßelution mit Puffer B von der Chromatographiematrix eluiert. Das Eluat wurde gegen Puffer C dialysiert.

Puffer A: 25 mM TRIS/HCl
 150 mM NaCl
 0,1 % (w/v) Triton X-100
 pH 7,5

Puffer B: 25 mM TRIS/HCl
 100 mM NaCl
 30 mM reduziertes Glutathion
 pH 7,5

Puffer C: 25 mM TRIS/HCl
 150 mM NaCl

pH 7,5

c) Anionenaustauschchromatographie

Die IEC wurde an einer ÄKTA-Chromatographiestation durchgeführt. Die Mono Q-Säule (1 ml; Ø= 0,5 cm, Länge= 2,8 cm) wurde vor Auftrag des dialysierten Proteineluats mit Puffer C äquilibriert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden von der Säule gewaschen und ein linearer NaCl-Gradient von 100-300 mM NaCl angelegt. Die eigentliche Proteinelution erfolgte anschließend in einem linearem Gradienten zwischen 300 mM und 450 mM NaCl. Die GST-S2-enhaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und ankonzentriert.

d) Gelpermeationschromatographie

Die ankonzentrierte GST-S2-haltige Probe wurde auf eine mit Puffer C äquilibrierte Superose 6-Säule (24 ml; Ø= 1,0 cm, Länge= 15 cm) aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit variierte innerhalb der unterschiedlichen Läufe zwischen 0.3 und 0.6 ml/min. Die GST-S2-haltigen Fraktionen der GPC wurden identifiziert, gepoolt und ankonzentriert.

4.6. Kristallographische Arbeiten

Die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen und DNA hat die Biologie und Medizin revolutioniert. Während das erste Diffraktionsbild eines Proteins bereits im Jahre 1934 aufgenommen wurde, konnte die erste Struktur eines Proteins (Myoglobin) erst 1960 bestimmt werden. Seither wurden bis Ende 1990 600 und bis Mai 2000 12204 Strukturen in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt. Diese exponentielle Zunahme an gelösten Strukturen ist auf neue molekularbiologische Methoden sowie auf den technischen Fortschritt in Form immer leistungsfähigerer Rechner zurückzuführen. Die Röntgenstrukturanalyse erlaubt einen Einblick in den Aufbau von Molekülen und stellt damit die Basis für ein Verständnis der biologischen Vorgänge auf atomarem Niveau dar.

Die Röntgenstrukturanalyse erfordert im allgemeinen folgende Schritte:

1. Isolierung und Reinigung des zu untersuchenden Proteins
2. Kristallisation des homogenen Materials
3. Datensammlung
4. Bestimmung der Phasen der Reflexe

5. Berechnung der Elektronendichteverteilung
6. Erstellung eines Strukturmodells
7. Verfeinerung der Modellparameter

Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die wichtigsten Grundprinzipien der Röntgenstrukturanalyse gegeben werden. Für eine detaillierte Einführung in die Thematik wird auf die folgenden Lehrbücher verwiesen: Blundell & Johnson, (1976); Strout und Jensen, (1989); Drenth, (1994) und Glusker *et al.*, (1994).

4.6.1. Kristallisation

Grundvoraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse sind Proteineinkristalle. Es sind verschiedene Techniken zur Kristallisation von Proteinen bekannt (McPherson, 1990), wobei im allgemeinen der Dampfdiffusionsmethode die größte Bedeutung zukommt. Dazu wird die Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt und in einem abgeschlossenen System oberhalb einer Lösung höherer Fällungsmittelkonzentration angebracht. Durch Diffusion über die Gasphase kommt es zu einer langsamen Zunahme der Fällungsmittelkonzentration in der Proteinlösung bis in den Bereich der Übersättigung. Sind bestimmte Fällungsmittel- und Proteinkonzentrationen erreicht, erzwingen diese intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Idealfall die Anordnung zum Proteinkristall bewirken. Geeignete Fällungsmittel sind anorganische Salze, organische Lösungsmittel oder Polyethylenglykole unterschiedlicher Molekularmasse. Neben der Art des Fällungsmittels, seiner Konzentration und der Proteinkonzentration haben auch andere Faktoren wie die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke einen entscheidenden Einfluß auf die Kristallisation von Proteinen. Dadurch stellt die Kristallisation ein vieldimensionales Problem dar, das nicht analytisch gelöst werden kann. Für jedes Protein müssen die Kristallisationsbedingungen individuell ausgearbeitet werden. Zum Austesten einer größeren Anzahl von Bedingungen folgt man in der Regel den Prinzipien des *sparse matrix sampling* (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991). Sind anfängliche Bedingungen gefunden, können diese systematisch verfeinert werden.

In dieser Arbeit erfolgten die Kristallisationsansätze nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem oder sitzendem Tropfen (*hanging drop* Methode oder *sitting drop* Methode; McPherson, 1990). Bei der *sitting drop* Methode wurden 2-4 µl Proteinlösung und 2-4 µl Fällungspuffer in die Vertiefung des Stempels einer MVD/24 Kristallisationsplatte pipettiert, 500

μl Fällungspuffer in die Reservoirkammer gegeben und die Kammer mit durchsichtiger Klebefolie abgedichtet. Alternativ wurde bei der *hanging drop* Methode ein Tropfen aus 2-5 μl Proteinlösung und 2-5 μl Fällungspuffer auf die Unterseite eines Deckgläschens pipettiert und dieses auf den mit Silikonöl belegten Rand einer mit 500 μl Fällungspuffer gefüllten Reservoirkammer einer Linbro-Platte gelegt. Die Kristallisationsansätze wurden wahlweise bei 20°C und 4°C gelagert.

4.6.2. Kristallaufbau

Kristalle sind anisotrope, homogene Körper, die aus einer regelmäßigen dreidimensionalen Anordnung gleicher Bausteine bestehen. Die Bausteine des Kristalls lassen sich durch Translation um die Einheitsvektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} ineinander überführen. Die Einheitsvektoren spannen die Elementarzelle als kleinste Untereinheit des Kristallgitters auf. Die Achsen der Elementarzelle werden mit a, b und c, die Winkel mit α , β und γ bezeichnet. Zusätzlich zur Translation können Kristalle noch weitere Symmetrieelemente wie Spiegelebenen, Drehachsen, Inversionszentren, Gleitspiegelebenen und Schraubenachsen aufweisen. Die asymmetrische Einheit ist der kleinste Teil der Elementarzelle, aus dem durch Anwendung der Symmetrieoperationen Drehung, Spiegelung und Inversion die ganze Elementarzelle entsteht. Aus den möglichen Kombinationen der Symmetrieoperationen ergeben sich 32 Punktgruppen. Durch die zusätzliche Translationssymmetrie in Kristallen (14 Bravaisgitter) entstehen aus den 32 Punktgruppen die 230 kristallographischen Raumgruppen in 7 Kristallsystemen (triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch). Da Spiegelebenen und Inversionszentren in Biomakromolekülen aufgrund der Chiralität der Bausteine nicht möglich sind, reduziert sich die Anzahl der möglichen Raumgruppen für Proteinkristalle auf 65 "biologische" Raumgruppen.

4.6.3. Röntgenbeugung an Proteinkristallen

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der einzelnen Atomhüllen zu Schwingungen an, die in fester Phasenbeziehung zur anregenden Welle stehen. Als oszillierende Dipole emittieren die Elektronen eine Streustrahlung mit gleicher Frequenz wie die einfallende Strahlung, die aber um 180° phasenverschoben ist (elastische Streuung oder Thomson-Streuung). Die einzelnen Streustrahlen interferieren miteinander,

wodurch es in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz zu Auslöschung (destruktive Interferenz) oder Verstärkung (konstruktive Interferenz) einzelner Wellenzüge kommt. Trifft Röntgenstrahlung auf ein geordnetes, kristallines System, ergibt sich somit ein charakteristisches Interferenzbild. Das Reflexmuster wird dabei durch die Gittersymmetrie, die Intensität der einzelnen Reflexe durch die Anordnung der Streuzentren in der Elementarzelle bestimmt. Dadurch erhält man die Information über die Elektronendichteverteilung im Kristall und somit die Struktur.

Bragg zeigte 1913, daß die Streuung von Röntgenstrahlen an Kristallen als Reflektion an Netzebenen beschrieben werden kann: Ein unter dem Glanzwinkel θ einfallender Röntgenstrahl der Wellenlänge λ wird an Netzebenen im Abstand d zueinander gestreut. Erfüllt der Glanzwinkel θ die Bragg'sche Gleichung (Gleichung 4-5), so ist der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge. Es tritt konstruktive Interferenz auf, die als Reflex detektiert werden kann.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (4-5)$$

dabei ist n die Reflexordnung ($n=1, 2, 3, \dots$), λ die Wellenlänge, d der Netzebenenabstand in \AA und θ der Glanzwinkel. Die Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) überträgt die Bragg'schen Reflektionsbedingungen in den reziproken Raum (Abb. 4-1). Um den Kristall an der Stelle M wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gelegt. Auf den Durchstoßpunkt O des ungestreuten Röntgenstrahls durch die Ewald-Kugel wird der Nullpunkt des reziproken Gitters gesetzt. Die Reflexe des Kristallgitters bilden ein dreidimensionales Gitter. Dieses fiktive Gitter steht zu dem realen Kristallgitter in fester Orientierungsbeziehung und wird reziprokes Gitter genannt. Jedem

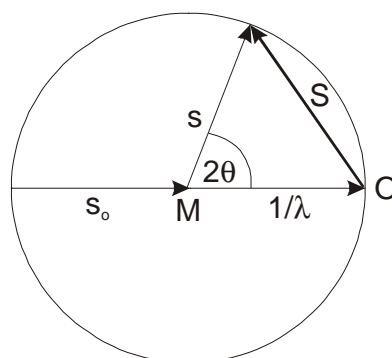


Abb. 4-1: Die Ewald-Konstruktion: Um den Kristall M wird ein Kreis mit dem Radius $1/\lambda$ gelegt. Im dreidimensionalen Raum wird dieser zu einer Kugel. Der Primärstrahl wird durch den Vektor s_0 , der unter dem Winkel 2θ gebeugte Strahl durch den Vektor s repräsentiert. Der Ursprung des reziproken Gitters liegt in O . Ein reziproker Gittervektor wird durch S bezeichnet.

periodischen Ebenenscharabstand im realen Gitter (Gitterabstände) entspricht ein senkrecht zur

Ebenenschar gerichteter Vektor im reziproken Gitter. Die Beträge des Abstands und dieses Vektors verhalten sich reziprok zueinander. Kommt ein Gitterpunkt des reziproken Gitters auf der Oberfläche der Ewald-Kugel zu liegen, so ist die Bragg'sche Reflexionsbedingung erfüllt und ein Reflex kann detektiert werden.

Die diskreten Reflexe werden mit den Millerschen Indizes h , k und l bezeichnet. Die Netzebenenschar mit den Millerschen Indizes hkl und dem Netzebenenabstand d_{hkl} wird im reziproken Raum durch den Gitterpunkt P_{hkl} repräsentiert. Jedem Gitterpunkt P_{hkl} ist ein Streuvektor \vec{S} zugeordnet. Mit den Basisvektoren des reziproken Raumes \vec{a}^* , \vec{b}^* und \vec{c}^* kann der Streuvektor nach Gleichung 4-6 beschrieben werden. Die Beziehung zwischen den Basisvektoren des reziproken Raumes und des realen Raumes wird durch die Gleichungen 4-7 ausgedrückt.

$$\vec{S} = h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^* \quad (4-6)$$

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{a(\vec{b} \times \vec{c})} \quad \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{b(\vec{c} \times \vec{a})} \quad \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{c(\vec{a} \times \vec{b})} \quad (4-7)$$

Ein Röntgenstrahl wird an der Elektronenwolke eines Atoms in Abhängigkeit von der Anzahl der Elektronen und ihrer Position in der Elektronenwolke gestreut. Die an einem Atom gestreute Gesamtwelle errechnet sich somit durch Aufsummieren aller individuellen Beträge innerhalb des Atomvolumens zum atomaren Formfaktor f (Gleichung 4-8):

$$f = \int_r \rho(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] d\vec{r} \quad (4-8)$$

wobei $\rho(\vec{r})$ die Elektronendichte am Ort r der Elektronenwolke ist. Die Größe der Elektronenwolke eines Atoms ist temperaturunabhängig - allerdings schwingen die Atome statistisch um eine Gleichgewichtsposition. Daher muß der atomare Formfaktor der Atome mit einem temperaturabhängigen Korrekturfaktor T_{iso} (Gleichung 4-9) multipliziert werden.

$$T_{iso} = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right] \quad (4-9)$$

Der Temperaturfaktor B (Gleichung 4-10) ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung der Atomschwingung verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \cdot \overline{u^2} \quad (4-10)$$

Die atomaren Formfaktoren f innerhalb einer Elementarzelle mit n Atomen auf den Positionen \vec{r}_j ($j= 1, 2, \dots, n$) bezüglich des Ursprungs der Einheitszelle summieren sich unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel zum Strukturfaktor $\vec{F}(\vec{S})$ (Gleichung 4-11) auf:

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{i=1}^n f_i \exp[2\pi i \vec{r}_i \cdot \vec{S}] \quad (4-11)$$

Um die Diffraktion eines Kristalls zu erhalten, müssen die Strukturfaktoren jeder einzelnen Einheitszelle des Kristalls bezüglich eines einzigen Ursprungs aufsummiert werden. Die Amplitude der gestreuten Gesamtwelle des Kristalls ist proportional zum Strukturfaktor $\vec{F}(\vec{S})$ und der Anzahl der Einheitszellen.

Die Elektronendichteverteilung in einem Kristall am Ort (x, y, z) lässt sich durch Fouriersumme berechnen (Gleichung 4-12):

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V_{\text{Zelle}}} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}] \quad (4-12)$$

Die Elektronendichte ist also die inverse ‘‘Fouriertransformierte’’ der Strukturfaktoren, während umgekehrt die Strukturfaktoren die ‘‘Fouriertransformierte’’ der Elektronendichte darstellen. Ist einmal ein Modell gebaut, werden meist Differenz-Elektronendichteverteilungen gerechnet, wobei die Fourierkoeffizienten $|F_{hkl}^{\text{obs}}| - |F_{hkl}^{\text{calc}}|$ oder $2|F_{hkl}^{\text{obs}}| - |F_{hkl}^{\text{calc}}|$ verwendet werden.

4.6.4. Datensammlung und Datenreduktion

Die zu untersuchenden Kristalle wurden direkt aus dem Kristallisationstropfen in eine silikonisierte Glaskapillare ($\varnothing=0,7$ mm bzw. $\varnothing=1,0$ mm) montiert und die den Kristall umgebende Mutterlauge vorsichtig entfernt. Um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern, wurde oberhalb und unterhalb des Kristalls etwas Kristallisationslösung in der Kapillare plaziert und diese von beiden Seiten mit Dentalwachs verschlossen. Der montierte Kristall wurde auf das Goniometersystem aufgebracht, zentriert und der Abstand zwischen Kristall und *Imageplate* je nach Auflösungsgrenze des Kristalls bestimmt. Die Datensätze wurden mit Graphit-gelilterter

Cu-K α -Strahlung (L \rightarrow K Übergang, $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) eines Drehanodengenerators (betrieben bei 50 kV und 100 mA) aufgenommen. Die Kristalle wurden in Winkelinkrementen von 1° bei Belichtungszeiten von 900-1800 s und einer Temperatur von 20°C vermessen. Die Beugungsbilder wurden mit einem *Imageplate* Detektor aufgenommen.

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Raumgruppe und der Elementarzellparameter erfolgte wahlweise mit den Programmen IMSTILLS und REFIX (Kabsch, 1988) oder mit dem Programm MOSFLM Version 5.50 (Leslie, 1991). Die Reflexintensitäten wurden mit MOSFLM integriert und die Datenreduktion mit den Programmen ROTAVATA, AGROVATA und TRUNCATE aus der CCP4 Programmsuite (Collaborative Computational Projekt Number 4, 1994) durchgeführt. Als Hauptkriterium für die Qualität eines Datensatzes gilt der R_{sym} (Gleichung 4-13):

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)} \quad (4-13)$$

dabei ist $I(h,i)$ die Intensität des Reflexes (hkl) einer einzelnen Messung und $\langle I(h) \rangle$ die mittlere Intensität eines Reflexes (hkl). R_{sym} -Werte kleiner als 10 % gelten allgemein als akzeptabel.

4.6.5. Bestimmung der Anzahl der Proteinmoleküle in der Elementarzelle

Nach Matthews (Matthews, 1968 & 1977) kann die Bestimmung der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit ohne Kenntnis der Kristalldichte vorgenommen werden. Dabei wird die statistische Beziehung zwischen der Molmasse eines Proteins und dem Elementarzellvolumen ausgenutzt. Der Packungsparameter V_M beschreibt das Kristallvolumen pro Proteinmasse (Gleichung 4-14) und liegt im allgemeinen zwischen Werten von $1.8 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ und $4.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Das Maximum der Verteilung liegt bei etwa $2.4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Proteine mit höherer Molmasse, sowie Membranproteine besitzen häufig aufgrund ihrer weniger dichten Packung einen größeren Packungsparameter.

$$V_M = \frac{V_{\text{EZ}}}{M_r \cdot z \cdot n} \quad (4-14)$$

dabei ist V_{EZ} das Elementarzellvolumen in \AA^3 , M_r die Molekularmasse in Da, z die Zahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit und n die Zähligkeit der allgemeinen Punktgruppe. Bei Kenntnis von V_M kann der Solvensgehalt nach Gleichung 4-15 berechnet werden:

$$\chi = \left(1 - \frac{1,23}{V_M}\right) \cdot 100 \quad (4-15)$$

dabei ist χ der Solvensgehalt in %. Typischerweise liegt der Solvensgehalt für Proteinkristalle zwischen 30 % und 70 %.

4.6.6. Berechnung von Selbstrotationsfunktionen

Befinden sich mehrere Kopien eines Moleküls in der asymmetrischen Einheit, können Symmetriebeziehungen (kristallographische und nichtkristallographische Symmetrie) zwischen den einzelnen Molekülen vorhanden sein. Die Symmetrie zwischen den Molekülen einer asymmetrischen Einheit wird durch eine Rotations- und eine Translationskomponente definiert. Die Rotationskomponente der nichtkristallographischen Symmetrie (NCS) kann aus der Selbstrotationsfunktion, einem Spezialfall der von Rossmann & Blow (1962) beschriebenen Rotationsfunktion, bestimmt werden. Selbstrotationsfunktionen wurden mit dem Programm GLRF (Tong und Rossmann, 1990) berechnet und ausgegeben.

4.6.7. Patterson Suchmethoden

Gibt es zu dem untersuchten Protein ein verwandtes Molekül mit bekannter dreidimensionaler Struktur, können die anfänglichen Phasen mit Hilfe der Pattersonfunktion (Patterson, 1934) bestimmt werden:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (4-16)$$

Dabei wird die bekannte Struktur in der Elementarzelle der unbekannt Struktur rotiert und translatiert (Hoppe, 1957; Rossmann und Blow, 1962; Huber, 1965) bis das Molekül in der Elementarzelle der unbekannt Struktur die richtige Orientierung und eine genaue Position eingenommen hat. Durch Fouriertransformation lassen sich nun die Phasen berechnen. Als Faustregel gilt, daß die Patterson Suchmethode (auch "Molekularer Ersatz" genannt) funktioniert,

wenn die Homologie der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine hoch ist und die *rms*-Abweichung der C α -Positionen der zwei Strukturen ≤ 1 Å ist.

Die Rotations- und Translationssuche wurde wahlweise mit den Programmen AMoRe (Navaza, 1994), MOLREP (Vargin *et al.*, 1997) und CNS Version 1.0 (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt.

4.6.8. Modellbau und Verfeinerung

Die atomaren Modelle wurden auf einer Graphikworkstation der Firma Evans & Sutherland ESV mit dem Programm FRODO Version 4.4 (Jones, 1978 – modifiziert durch P. Evans, MRC, Cambridge, UK) in die Elektronendichten eingepaßt. Die Verfeinerung der Modellparameter wurde wahlweise mit den Programmen X-PLOR Version 3.85 (Brünger, 1992) und CNS (Brünger *et al.*, 1998) nach der *conjugate gradient* Methode durchgeführt, wobei geometrische Parameter (Engh und Huber, 1991) berücksichtigt wurden. Dies lieferte ein verbessertes Strukturmodell, aus dem sich nach Fouriertransformation neue (bessere) Phasen berechnen ließen. Zusammen mit den Beträgen der Strukturfaktoren konnten daraus verbesserte Elektronendichten berechnet werden. Diese erlauben wiederum ein besseres Strukturmodell zu erstellen. Als Kriterium für die Qualität des Modells gilt der sogenannte kristallographische R-Faktor (Gleichung 4-17):

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|} \quad (4-17)$$

Darin ist *k* ein Skalierungsfaktor, der dazu dient, die gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitliche Skala zu bringen. Der R-Faktor liegt typischerweise für eine Proteinstruktur am Ende des Verfeinerungsprozesses unter 22 %. Als objektives Kriterium für den Erfolg des Verfeinerungsprozesses hat sich die Berechnung des freien R-Faktors durchgesetzt (Brünger, 1992). Dazu werden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als Testset nicht in die Verfeinerung miteinbezogen. Der aus ihnen berechnete freie R-Faktor und warnt vor einer Überanpassung der Daten und sollte nicht mehr als 6 % höher als der R-Faktor sein.

4.6.9. Analyse von Atommodellen

Die statistische Analyse der Bindungslängen und -winkel sowie der Temperaturfaktoren der atomaren Modelle wurde mit dem Programm X-PLOR Version 3.85 (Brünger, 1992) durchgeführt. Weitere Untersuchungen der Molekülgeometrien, insbesondere der Ausgabe von *Ramachandran-Plots* (Ramachandran und Sasisekharan, 1968), erfolgten mit dem Programm PROCHECK Version 2.0 (Laskowski *et al.*, 1993).

4.6.10. *Molecular Modeling*

Durch *Molecular Modeling* wurden in dieser Arbeit Strukturmodelle verschiedener pFNR-Substratkomplexe erstellt. Die atomaren Modelle dieser Komplexe wurden mit dem Programm FTDOCK (Jackson *et al.*, 1998) erzeugt. FTDOCK führt den geometrischen Oberflächenerkennungsalgorithmus von Katchalski-Katzir (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992) aus, um zwei Moleküle aufeinander zu *docken*. Mit Hilfe der *Fast Transfourier Transformate*-Methode und einer elektrostatischen Korrelationsfunktion wird der Translationsraum zweier zufällig rotierter Makromoleküle durchsucht und mögliche Proteinkomplexe erzeugt. Diese werden durch eine Rangliste klassifiziert, wobei Bewertungsfaktoren bezüglich elektrostatischer Wechselwirkungen und zueinander komplementären Oberflächen vergeben werden. Die erhaltenen Proteinkomplexe mit hohen Bewertungsfaktoren wurden am Grafikdisplay mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) analysiert. Mit dem Programm MULTIDOCK (Gabb *et al.*, 1997) wurde eine Verfeinerung des *Komplexinterface* der beiden Proteine durchgeführt. Dabei wurden mögliche Konformationswechsel der Seitenketten und *rigid body* Bewegungen der komplexierenden Proteine berücksichtigt. Alternativ wurde die Verfeinerung der *gemodelten* Proteinkomplexe mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Teil I: Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika

5.1.1. RNA Isolierung aus Paprika und cDNA Synthese

Für die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* wurden in der Regel pro Isolierungsschritt 3,5 g Pflanzenmaterial eingesetzt. Der Ablauf der RNA-Isolierung erfolgte wie in Kapitel 4.1.1.1. beschrieben, wobei darauf geachtet wurde, daß jegliche Kontamination durch RNasen vermieden wurde. Die Qualität und der Reinheitsgrad der isolierten und gereinigten zellulären Gesamt-RNA wurde durch Formaldehyd-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.2.1.) bestimmt. Abbildung 5-1 zeigt das Formaldehyd-Gel einer typischen RNA-Isolierung. Als RNA-Längenstandard wurde die zelluläre Gesamt-RNA aus Rattenleber aufgetragen, bei der die 18S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit und die 28S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit als ausgeprägte Banden auf dem Gel zu erkennen sind. Die aus den Blättern der Paprikapflanze isolierte Gesamt-RNA zeigt auf dem Formaldehyd-Gel hauptsächlich Banden im niedermolekularen RNA-Bereich. In Höhe der 28S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit ist keine ausgeprägte Bande zu erkennen. Die 18S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit kann hingegen auf dem Gel detektiert werden. Mit Hilfe des angewandten RNA-Isolierungsprotokolls konnte aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* nur zelluläre RNA geringer Größe isoliert werden. Scheinbar kam es während der RNA-Isolierung zu einer Fragmentierung der größeren zellulären RNA-Moleküle. Endziel der RNA-Isolierung war jedoch die Präparation der m-RNA, welche die Sequenzinformation des *pfnr*-Gens enthält und eine abgeschätzte Größe von etwa 1100 Basen besitzt. Ihre Isolierung aus den Pflanzenzellen sollte demnach gelungen sein. Desweiteren konnte festgestellt werden, daß die Ausbeute an isolierter zellulärer Gesamt-RNA sowie ihre Qualität von der Zeitspanne abhängt, die zwischen Ernte des Pflanzenmaterials und RNA-Isolierung liegt. Wurden die Blätter der Paprikapflanze nicht unmittelbar nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, so verringerte sich die Ausbeute an isolierter Gesamt-RNA drastisch. Lag eine Zeitspanne von ca. 20 min zwischen Ernte der Blätter und Friervorgang, so wurde bereits ein erheblicher Teil der RNA-Moleküle von der Zelle abgebaut und die RNA-Ausbeute minimierte sich um das Zehnfache.

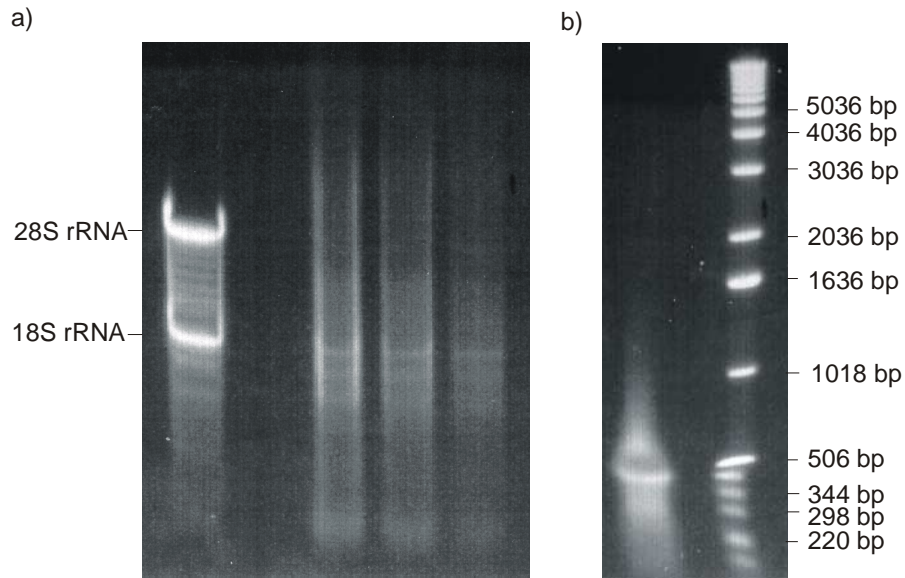


Abb. 5-1: a) Formaldehyd-Gel der isolierten zellulären Gesamt-RNA aus *Capsicum annuum Yolo Wonder*. Als RNA-Längenstandard diente zelluläre Gesamt-RNA aus Rattenleber. b) Agarose-Gel der synthetisierten Paprika-cDNA. Ein 1kb-DNA-Marker dient als Längenstandard.

Im Gegensatz zu den anderen zellulären RNA-Arten enden die eukaryontischen mRNAs mit einem Poly-A Schwanz, der im Zellkern nach der Transkription an die mRNA angehängt wird. Diese Tatsache wurde bei der Isolierung und Reinigung der mRNA aus der zellulären Gesamt-RNA ausgenutzt. Die mRNA-Isolierung wurde mit dem Oligotex mRNA Kit durchgeführt und erfolgte wie in Kapitel 4.1.1.2. beschrieben. Die Ausbeute an mRNA, die aus der präparierten zellulären Gesamt-RNA eines Isolierungsschritts präpariert wurde, war extrem gering. Daher wurde auf eine Qualitätsprüfung durch Formaldehyd-Gelelektrophorese verzichtet und die gesamte mRNA-Probe zur weiteren Herstellung der Paprika-cDNA verwendet.

Die cDNA-Synthese wurde wie in Kapitel 4.1.3. beschrieben mit AMV-Reverser-Transcriptase durchgeführt. Als Primer wurden Oligo(dT)-Primer (Oligonukleotide mit einer Nukleotidabfolge von 12-18 dTs, die spezifisch an den Poly(A)-Schwanz von eukaryontischer mRNA binden) und sogenannte Random-Primer (Hexanukleotidgemisch unterschiedlicher Sequenz, die zufällig an die RNA binden) verwendet, die eine Erststrang-cDNA-Synthese der 3'-Enden der Transkripte erlaubten. Im Anschluß an die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte die Gegenstrangsynthese durch DNA-Polymerase I. Die synthetisierte cDNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Um die Qualität der synthetisierten cDNA abzuschätzen, wurde eine Probe auf ein vertikales Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 5-1). Als DNA-Längenstandard wurde ein 1kb-DNA-Marker verwendet. Die synthetisierte Paprika-cDNA zeigt auf dem Agarose-Gel hauptsächlich Banden im niedermolekularen Bereich. Die größten cDNA-Fragmente weisen eine Länge von etwa 1600 bp auf. Da die Isolierung der zellulären Gesamt-

RNA aus den Blättern der Paprikapflanze nur RNA-Moleküle relativ kleiner Größe lieferte, muß die synthetisierte cDNA eine ähnliche Größenverteilung aufweisen. Ausgehend von der synthetisierten Paprika-cDNA sollte das *pfnr*-Gen (~1100 bp) und das *pfid*-Gen (~300 bp) identifiziert und sequenziert werden. Dies sollte trotz der mäßigen Qualität der synthetisierten Paprika-cDNA möglich sein.

5.1.2. Sequenzierungsergebnisse

5.1.2.1. Sequenz der pFNR

Das *pfnr*-Gen, welches für die FNR aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* codiert, konnte mittels PCR auf frisch präparierter Paprika-cDNA identifiziert werden. Zur Einleitung der DNA-Synthese wurden verschiedene degenerierte Primer verwendet, die speziell für die Synthese der 3'- bzw. 5'-Enden der codierenden Region des *pfnr*-Gens entwickelt wurden (Kap. 3.1.4.). Unterschiedliche PCR-Bedingungen wurden gescreent, um optimale Bedingungen für die Amplifikation des codierenden Bereiches des *pfnr*-Gens zu erhalten. Dabei wurden die degenerierten 3'- bzw. 5'-Primer in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert, die Annealingtemperaturen variiert und unterschiedlich lange Annealing- bzw. Elongationszeiten verwendet. Durch PCR mit den degenerierten Primern *fnr_2_5'* und *fnr_3_3'* und einer Annealingtemperatur von $T_{\text{anneal}}=42^{\circ}\text{C}$ konnte ein 1098 bp großes Produkt amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde isoliert und unter Verwendung der beiden degenerierten PCR-Primer N-terminal ansequenziert (Kap. 4.2.1.4.). Der Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit Nukleinsäuresequenzen anderer pflanzlicher FNRs zeigte, daß es sich bei dem amplifizierten DNA-Fragment um den codierenden Bereich der Präproteinform der pFNR handelte. Mit Hilfe der bisher sequenzierten Bereiche des *pfnr*-Gens wurden neue Sequenzierprimer entwickelt und die komplette Nukleotidsequenz der codierenden Genregion bestimmt (Abb. 5-2). Das *pfnr*-Gen codiert für ein Präprotein bestehend aus 362 Aminosäuren. Es besitzt eine molekulare Masse von 40407 Da und weist einen berechneten isoelektrischen Punkt von 8,57 auf. Die Präproteinform der pFNR besitzt ein aminoterminaleres Signalpeptid, welches aus den Aminosäuren 1 bis 54 besteht und den Proteinimport ins Mitochondrium ermöglicht. Die nach der Prozessierung vorliegende native Form der pFNR besteht aus den Aminosäuren 55 bis 362 und weist ein Molekulargewicht von 33177 Da auf. Der isoelektrische Punkt läßt sich zu 6,33 berechnen.

```

1  ATGGCTACTGCTGTTACTGCTGCTGTCTCTCTTCTCCTTCATCCAAGTCCACTTCTTTTCCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
60  TACCGATGACGACAATGACGACGACAGAGAGAAGGAAGTAGGTTTCCAGGTGAAGAAAAGGG
   M A T A V T A A V S L P S S K S T S F P

61  ACTAGAACATCCATCATCTCCCCTGAAAAAATCAACTTCAACAAGGTGCCTTTGTACTAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
120  TGATCTTGTAGGTAGTAGAGGGGACTTTTTTTAGTTGAAGTTGTTCCACGGAACATGATG
   T R T S I I S P E K I N F N K V P L Y Y

121  AGAAATGTGTCCGGTGGTAGTAAATTGGTTACCATTAGAGCCCAAGTGACCACAGAGGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
180  TCTTTACACAGGCCACCATCATTAAACCAATGGTAATCTCGGGTTCACTGGTGTCTCCGA
   R N V S G G S K L V T I R A Q V T T E A

181  CCTGCTAAAGTTGAGAAGATTTCAAAGAAACAGGACGAAGGTGTGGTTGTGAACAAGTTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
240  GGACGATTTCAACTCTTCTAAAGTTTCTTTGTCTTCCACACCAACACTTGTTC AAG
   P A K V E K I S K K Q D E G V V V N K F

241  AGGCCAAAGGAACCTTACATTGGTAGATGTCTACTCAACACTAAGATCACTGGTGATGAT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
300  TCCGGTTTTCTTGAATGTAACCATCTACAGATGAGTTGTGATTCTAGTGACCACTACTA
   R P K E P Y I G R C L L N T K I T G D D

301  GCACCTGGTGAAACTTGGCACATGGTCTTTAGCACTGAAGGGGAGATCCCATATAGAGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
360  CGTGGAACACTTTGAACCGTGTACCAGAAATCGTGACTTCCCCTCTAGGGTATATCTCTT
   A P G E T W H M V F S T E G E I P Y R E

361  GGCCAATCCATTGGTGTGATTGCTGATGGTGTGATGCCAATGGGAAGCCTCACAAGCTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
420  CCGGTTAGGTAAACCACACTAACCAGTACCACAACACTACGGTTACCCTTCGGAGTGTTCGAA
   G Q S I G V I A D G V D A N G K P H K L

421  CGATTATACTCCATTGCCAGCAGTGCCTTGGTGACTTTCGGCGACTCCAAAACCGTTTCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
480  GCTAATATGAGGTAACGGTCTGTACGGGAACCACTGAAGCCGCTGAGGTTTTGGCAAAGG
   R L Y S I A S S A L G D F G D S K T V S

481  CTGTGTGTCAAAAAGGCTTGTGTACACCAATGACAAAAGGGGAAGAAGTTAAAGGAGTTTGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
540  GACACACAGTTTTCCGAACACATGTGGTTACTGTTTCCCCTTCTCAATTTCTCAAACG
   L C V K R L V Y T N D K G E E V K G V C

541  TCAAACCTTCTTGTGTGACTTGAAGCCTGGAGCAGATGTCAAGATTACTGGACCCGTTGGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
600  AGTTTGAAGAACACACTGAACTTCGGACCTCGTCTACAGTTCTAATGACCTGGGCAACCG
   S N F L C D L K P G A D V K I T G P V G

601  AAAGAAATGCTCATGCCAAAAGATCCAAAACGCCACTGTTATAATGCTTGGTACTGGAAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
660  TTTCTTTACGAGTACGGTTTTCTAGGTTTTGCGGTGACAATATTACGAACCATGACCTTGA
   K E M L M P K D P N A T V I M L G T G T

661  GGAATTGCTCCTTTCCGATCATTCTTGTGAAAAATGTTCTTTGAGAAAACACGACGATTAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
720  CCTTAACGAGGAAAGGCTAGTAAGAACACCTTTTACAAGAACTCTTTGTGCTGCTAATG
   G I A P F R S F L W K M F F E K H D D Y

721  AAGTTCAATGGTTTGGCATGGCTTTTCTTGGGTGTTCCCACCAGCAGCTCCCTACTTTAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
780  TTCAAGTTACCAAACCGTACCGAAAAAACCACAAGGGTGGTCTCGAGGGATGAAATG
   K F N G L A W L F L G V P T S S S L L Y

```

```

781 AAGGAGGAATTTCGAGAAAATGAAGGAGAAGGCCCCAGAAAACCTCCGATTGGACTTTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TTCTCCTTAAGCTCTTTTACTTCCTCTTCCGGGTCTTTTGAAGGCTAACCTGAAACGA
K E E F E K M K E K A P E N F R L D F A

841 GTGAGCAGAGAGCAAACAAACGAAAAGGGTGAAAAGATGTACATCCAAACCAGAATGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CACTCGTCTCTCGTTTGTTGCTTTTCCCACTTTTCTACATGTAGGTTTGGTCTTACCGA
V S R E Q T N E K G E K M Y I Q T R M A

901 CAATATGCTGAAGAACTATGGACTTTGCTCAAGAAAGACAACACATTTGTGTACATGTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GTTATACGACTTCTTGATACCTGAAACGAGTTCTTTCTGTTGTGTAACACATGTACACA
Q Y A E E L W T L L K K D N T F V Y M C

961 GGACTCAAGGGCATGGAGCAAGGAATTGATGACATTATGTCTTCACTTGCTGCCAAAGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CCTGAGTTCCCGTACCTCGTTCCTTAACTACTGTAATACAGAAGTGAACGACGGTTTCTC
G L K G M E Q G I D D I M S S L A A K E

1021 GGTATTGACTGGGCAGACTACAAGAAGCAATTGAAGAAGGCAGAGCAATGGAACGTTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CCATAACTGACCCGTCTGATGTTCTTCGTTAACTTCTTCCGTCTCGTTACCTTGCAACTT
G I D W A D Y K K Q L K K A E Q W N V E

1081 GTCTACTAA
----- 1089
CAGATGATT
V Y

```

Abb. 5-2: cDNA Sequenz des codierenden Bereiches des *pfnr*-Gens. Die pFNR wird als Präprotein synthetisiert. Nach Proteinimport ins Mitochondrium wird das Signalpeptid abgetrennt.

Ein Sequenzvergleich zwischen der Aminosäuresequenz der pFNR und Aminosäuresequenzen von FNRs aus anderen pflanzlichen Organismen ist in Abbildung 5-3 gegeben. Die Aminosäuresequenz der pFNR zeigt hohe Homologie zu anderen Proteinen der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasefamilie. pFNR besitzt eine etwa 75 %ige Sequenzidentität zu den Präproteinformen der FNRs aus Spinat, *Ice Plant*, Erbse, Bohne und Tabak. Die Sequenzidentität zwischen den FAD-bindenden Domänen und den NADP⁺-bindenden Domänen der unterschiedlichen FNRs ist dabei besonders groß. Auffällig ist, daß die ersten N-terminalen Aminosäuren der FAD-bindenden Domäne der prozessierten FNRs im Vergleich zum Rest nur sehr wenig gemeinsame Merkmale aufweisen. In den Kristallstrukturen der pFNR und der FNR aus Spinat ist gerade dieser N-terminale Bereich der Proteine in der Elektronendichte nicht sichtbar, was eine hohe Flexibilität andeutet. Diese ersten N-terminalen Aminosäuren haben demnach eine geringe Bedeutung für die strukturelle und funktionelle Integrität der FNRs. Die hohe Homologie der *two domain* Motive der unterschiedlichen FNRs – sowohl auf Aminosäureebene als auch auf struktureller Ebene (Kap. 5.1.8.) - deutet an, daß beides, die

strukturelle Gesamtfaltung der Proteine und die gemeinsamen Aminosäuremerkmale, wichtige Faktoren für die Elektronenübertragung sind.

Verglichen mit der hohen Sequenzidentität der *two domain* Motive der unterschiedlichen FNRs ist die Sequenzidentität der Signalpeptide wesentlich geringer. Sie weisen viele Serin-, Threonin- und kleine hydrophobe Reste auf, besitzen jedoch nur sehr wenig geladene polare Aminosäuren. Im Gegensatz zu vielen anderen Signalpeptiden enthalten die Signalpeptide der FNRs nicht den klassisch hydrophoben Kern, flankiert von einigen hydrophoben Aminosäuren mit meist einer oder mehreren basischen Aminosäuren nahe dem Aminoende.

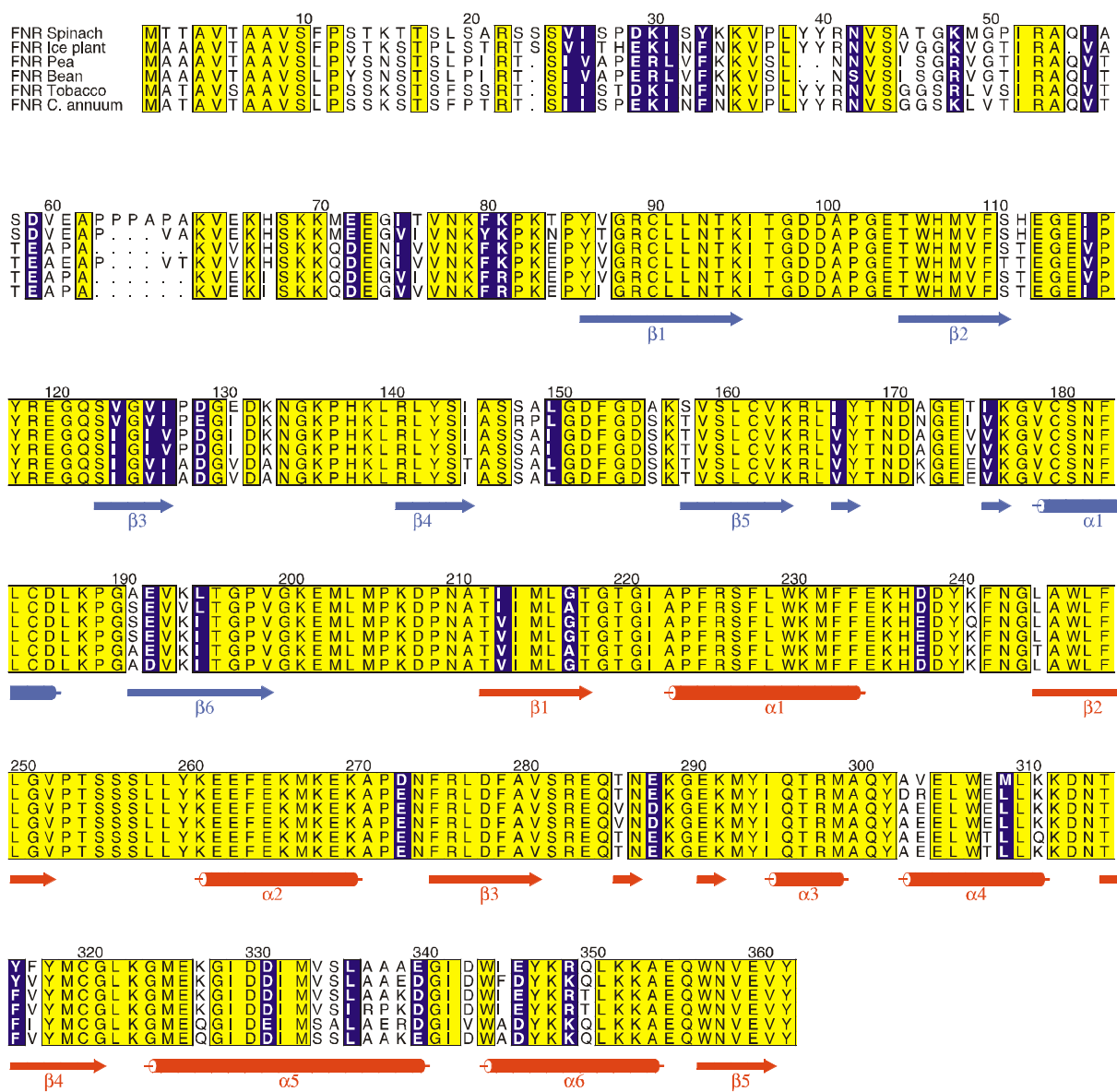


Abb. 5-3: Sequenzvergleich verschiedener pflanzlicher Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasen. Konservierte Aminosäurereste sind farblich unterlegt. Die Sekundärstrukturelemente der FAD-bindenden Domäne (blau) und der NADP⁺-bindenden Domäne (rot) der pFNR sind eingezeichnet.

5.1.2.2. Sequenz des pFd

Das *pdf*-Gen, welches für das Fd aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* codiert, konnte in dieser Arbeit mittels PCR auf frisch präparierter Paprika-cDNA identifiziert werden. Zur Einleitung der DNA-Synthese wurden verschiedene degenerierte Primer verwendet, die speziell für die Synthese der 3'- bzw. 5'-Enden der codierenden Region des *pdf*-Gens entwickelt wurden (Kap. 3.1.6.). Unterschiedliche PCR-Bedingungen wurden gescreent, um optimale Bedingungen für die Amplifikation des codierenden Bereiches des *pdf*-Gens zu erhalten. Dabei wurden die degenerierten 3'- bzw. 5'-Primer in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert, die Annealingtemperatur variiert und unterschiedlich lange Annealing- bzw. Elongationszeiten verwendet.

Durch PCR mit den degenerierten Primern fd_4_5' und fd_2_3' (Kap. 3.1.6.) und einer Annealingtemperatur von $T_{\text{anneal}}=44^{\circ}\text{C}$ konnte ein 435 bp großes Produkt amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde isoliert und unter Verwendung der beiden degenerierten Primer N-terminal ansequenziert (Kap. 4.2.1.4.). Der Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit Nukleinsäuresequenzen anderer pflanzlicher Fds zeigte, daß es sich bei dem amplifizierten DNA-Fragment um den codierenden Bereich des *pdf*-Gens handelte. Anhand der bisher sequenzierten Bereiche des *pdf*-Gens wurden neue Sequenzierprimer entwickelt und die komplette Nukleotidsequenz der codierenden Genregion bestimmt (Abb. 5-4). Das *pdf*-Gen codiert für ein Präprotein bestehend aus 144 Aminosäuren. Es besitzt eine molekulare Masse von 15079 Da und einen berechneten isoelektrischen Punkt von 4,16. Die Präproteinform des pFd besitzt ein aminoterminales Signalpeptid. Dieses setzt sich aus den Aminosäuren 1 bis 47 zusammen und hilft dem naszierenden Polypeptid nach der Translation am Ribosom die Mitochondrienmembran zu passieren. Nach Import ins Mitochondrium wird das Signalpeptid von der naszierenden Polypeptidkette abgespalten. Es entsteht das prozessierte native pFd, welches aus den Aminosäuren 48 bis 144 besteht und eine Molekularmasse von 10312 Da aufweist. Der isoelektrischen Punkt des Enzyms läßt sich zu 3,78 berechnen.

```

1  ATGGCTAGTATCTCAGCTACCATGATTAGTACCTCCTTCATGCCAAGAAAACCAGCTGTG  60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TACCGATCATAGAGTCGATGGTACTAATCATGGAGGAAGTACGGTTCTTTTGGTCGACAC
   M A S I S A T M I S T S F M P R K P A V
61  ACAAGCCTTAAACCCATCCCAAACGTTGGGGAAGCACTGTTTGGGCTTAAATCAGCAAAT  120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TGFTCGGAATTTGGGTAGGGTTTGAACCCCTTCGTGACAAACCCGAATTTAGTCGTTTA
   T S L K P I P N V G E A L F G L K S A N

```

```

GGTGGCAAAGTCACTTGCATGGCTTCATACAAAGTGAAACTTATCACACCTGACGGACCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CCACCGTTTCAGTGAACGTACCGAAGTATGTTTCACTTTGAATAGTGTGGACTGCCTGGT
      G G K V T C M A S Y K V K L I T P D G P
      ATAGAAATTTGATTGCCAGATGATGTGTACATTCTTGATCAAGCTGAGGAAGCAGGACAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TATCTTAAACTAACGGTCTACTACACATGTAAGAACTAGTTCGACTCCTTCGCTCCTGTA
      I E F D C P D D V Y I L D Q A E E A G H
      GATCTTCTTATTTCGTGCAGGGCAGGTTCTTGCTCATCTTGTGCTGGTAAAATTGCTGGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CTAGAAGGAATAAGCACGTCCCCTCAAGAACGAGTAGAACACGACCATTTTAACGACCA
      D L P Y S C R A G S C S S C A G K I A G
      GGAGCTGTTGATCAAACGATGGCAACTTTCTTGATGATGACCAATTAGAGGAGGGATGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCTCGACAACCTAGTTTGACTACCGTTGAAAGAACTACTACTGGTTAATCTCCTCCCTACC
      G A V D Q T D G N F L D D D Q L E E G W
      GTGCTAACTTGTGTGCTTATCCACAGTCTGATGTTACTATTGAGACTCACAAGGAGGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CACGATTGAACACAACGAATAGGTGTCAGACTACAATGATAACTCTGAGTGTTCCCTCCTC
      V L T C V A Y P Q S D V T I E T H K E E
      GAGCCTACTGCTTAA
421 -----+----- 435
CTCGGATGACGAATT
      E P T A
    
```

Abb. 5-4: cDNA-Sequenz des codierenden Bereiches des *pdf*-Gens. Das pFd wird als Präprotein synthetisiert. Nach Mitochondrienimport wird das Signalpeptid abgespalten.

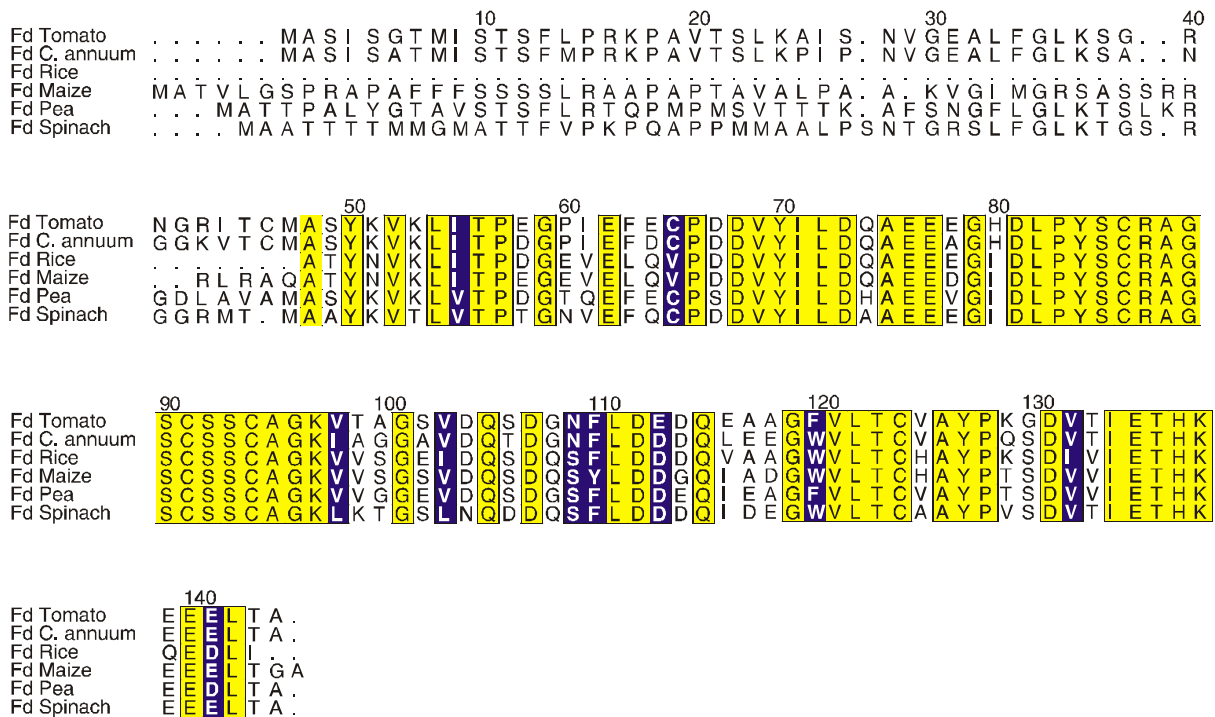


Abb. 5-5: Sequenzvergleich verschiedener pflanzlicher [2Fe-2S]-Ferredoxine I. Konservierte Reste sind farbig unterlegt.

Abbildung 5-5 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher Fds. Das nicht-prozessierte pFd besitzt eine etwa 80 %ige Sequenzidentität zu den nicht-prozessierten Fds aus Tomate, Reis, Mais, Erbse und Spinat. Die Signalpeptide der unterschiedlichen Fds setzen sich fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäureresten zusammen. Mit Ausnahme von einigen Serin- bzw. Threoninresten enthalten sie fast keine polaren Aminosäuren. Die Sequenzidentität der Signalpeptide ist verglichen mit der der prozessierten Polypeptide extrem niedrig. Die konservierte Aminosäuresequenz der Mitglieder der pflanzlichen [2Fe-2S]-Ferredoxinfamilie besitzt eine große Bedeutung für die strukturelle und funktionelle Integrität der Proteine. Die Charakteristik der Aminosäuresequenz der Fds und die daraus resultierende Gesamtfaltung der Proteine sind wichtige Faktoren für eine wirkungsvolle Elektronenübertragung.

5.1.3. Klonierungs- und Expressionsergebnisse

Die native Reinigung der pFNR sowie des pFd aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* erforderte große Mengen an Pflanzenmaterial und lieferte nur geringe Proteinausbeuten. Daher sollten beide Proteine kloniert und rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Außerdem kann die Reinigung der rekombinanten Proteine aus Bakterienzellen meist einfacher bewerkstelligt werden, da die Zahl der exprimierten Proteine in Bakterienzellen niedriger ist und deshalb weniger kontaminierende Proteine von dem gewünschten Protein abgetrennt werden müssen. Um eine induzierbare und rekombinante Expression der beiden Proteine in *E. coli* zu erreichen, wurden die entsprechenden Gene in ein T7 Polymerase/Promoter-System kloniert.

5.1.3.1. Klonierung und Expression der pFNR

In dieser Arbeit wurde das *pfnr*-Gen identifiziert und sequenziert. Ausgehend von der erhaltenen Sequenz wurden 5'-Primer sowie 3'-Primer zur Klonierung der prozessierten nativen Enzymform synthetisiert. Die codierende Region der prozessierten nativen pFNR wurde mittels PCR amplifiziert und das erhaltene 948 bp lange Fragment über die *NdeI*- und *BamHI*-Klonierungsstellen in den Vektor *pET22b(+)* inkloniert. Das erhaltene Expressionsplasmid *pET22b(+)-pFNR* wurde sequenziert, um zufällige Mutationen auszuschließen.

Die Expression der mit dem Plasmid *pET22b(+)-pFNR* transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kap. 4.3.1.3.). Das Protein wurde in aktiver Form ins Cytosol überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Expressionsrate

der rekombinanten pFNR in *E. coli* von der Kultivierungstemperatur und dem Induktionszeitpunkt anhängt. Mit abnehmender Kultivierungstemperatur stieg die pFNR-Expressionsrate der Zellen, die bei RT ihr Maximum erreichte. Zusätzlich konnte die pFNR-Expressionsrate gesteigert werden, indem die Zellen erst in der späten logarithmischen Phase statt in früheren Wachstumsphasen induziert wurden. Die erhöhte Zellbiomasse zum Zeitpunkt der Induktion ermöglichte eine größere Ausbeute an exprimierter pFNR.

5.1.3.2. Klonierung und Expression des pFd

In dieser Arbeit wurde das *pdf*-Gen identifiziert und sequenziert. Ausgehend von der erhaltenen Sequenz wurden 5'- sowie 3'-Primer zur Klonierung der prozessierten nativen Form des Enzyms synthetisiert. Der codierende Bereich des prozessierten pFd wurde durch PCR amplifiziert und über die *NdeI*- und *BamHI*-Klonierungsstellen in den Expressionsvektor *pET22b(+)* einkloniert. Das erhaltene Expressionsplasmid *pET22b(+)*-pFd wurde sequenziert, um zufällige Mutationen auszuschließen.

Die Expression der mit dem Plasmid *pET22b(+)*-pFd transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kap. 4.3.1.3.). Das Protein wurde in aktiver Form ins Cytoplasma exprimiert. Die Expression des pFd war bereits nach der Zellyse sichtbar, da es den Proteinrohextrakt bräunlich anfärbte. Obwohl andere pflanzliche Proteine, wie pFNR (Kap. 5.1.3.1.) oder FNR aus Spinat (Aliverti *et al.*, 1990), in größeren Mengen in *E. coli* überexprimiert werden, wenn die Kultivierungstemperatur der Zellen unterhalb 37°C liegt, ist die Expressionsrate des pFd unabhängig von der Kultivierungstemperatur. Allerdings läßt sich die Expressionsrate des pFd steigern, wenn die Zellen erst in der späten logarithmischen Phase statt in früheren Wachstumsphasen induziert werden. Durch die größere Zellbiomasse zum Induktionszeitpunkt kann eine größere Menge an pFd exprimiert werden. Desweiteren wurde eine Abhängigkeit der pFd-Expressionsrate von der Konzentration des Induktionsmittels festgestellt. Wurde die Proteinexpression mit 0,25 mM IPTG induziert, erreichte die Expressionsrate ihr Maximum.

5.1.4. Proteinpräparation

5.1.4.1. Präparation der pFNR

Für die native Reinigung der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus den Blättern der Paprikapflanze *Capsicum annuum Yolo Wonder* wurde in der Regel 1 kg Pflanzenmaterial eingesetzt. Die Homogenisierung des Pflanzenmaterials und der Zellaufschluß wurde mit Hilfe eines Labormixers wie in Kapitel 4.5.5.1. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden für 10 min bei maximaler Leistung des Mixers aufgeschlossen. Um eine Proteindenaturierung aufgrund möglicher auftretender Temperaturschwankungen zu verhindern, wurde der Zellaufschluß im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, daß sich das Gemisch während des Aufschlusses nicht auf Temperaturen größer 10°C erwärmt. War dies der Fall, wurde das Zellhomogenat in mehreren Intervallen zu je 3 min aufgeschlossen. Nach Zugabe von DNase und RNase wurde das Gemisch durch eine Schicht Glaswolle und ein Nylonnetz filtriert. Dadurch konnte ein Großteil der Zelltrümmer und der im Gemisch befindlichen Lipide abgetrennt werden. Die verbleibenden festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt.

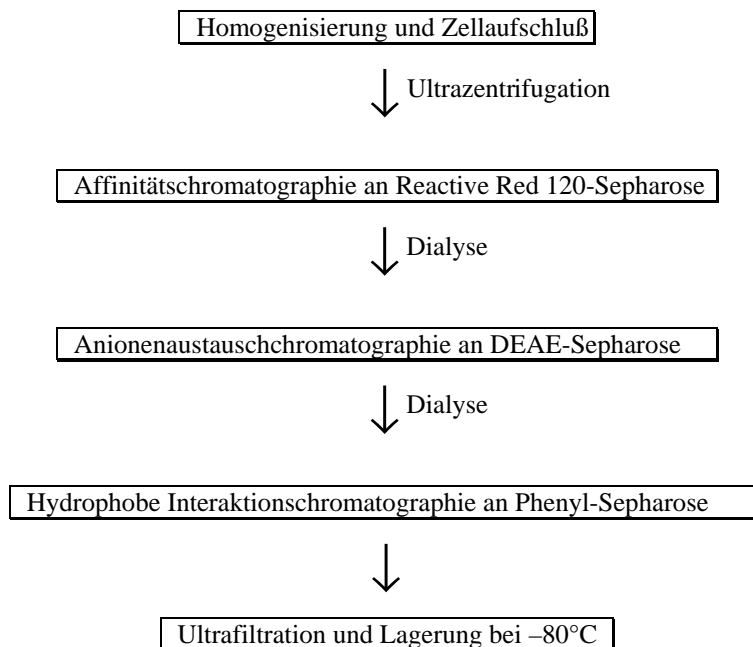


Abb. 5-6: Schematische Darstellung des Ablaufs der Präparation der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus Paprika.

Ein Präparationsprotokoll zur nativen Reinigung der pFNR aus den Blättern der Paprikapflanze wurde entwickelt. Alle Chromatographieschritte wurden bei 4°C durchgeführt, um eine

Proteindenaturierung zu verhindern. Abbildung 5-6 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufs der Proteinpräparation. Als ersten Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie an Reactive Red 120-Sepharose durchgeführt (Kapitel 4.5.5.1.). Das Chromatographiematerial weist eine hohe Bindungsaffinität für NADP⁺-abhängige Proteine auf. Abbildung 5-7 zeigt das Elutionsdiagramm der Affinitätschromatographie. Die Fraktionen wurden durch die

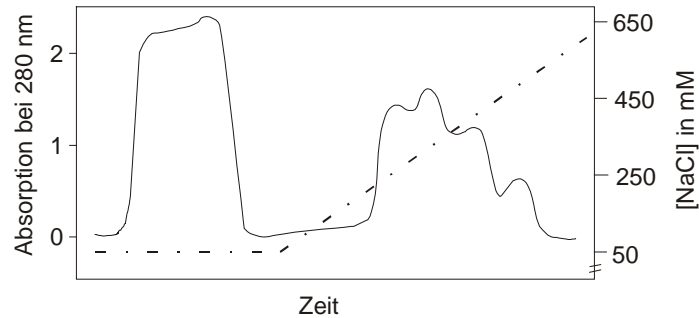


Abb. 5-7: Chromatogramm der Reactive Red 120-Sepharose-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die NaCl-Konzentration als gestrichelte Linie dargestellt.

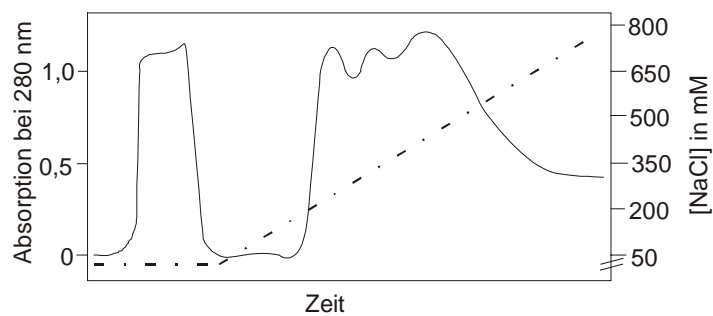


Abb. 5-8: Chromatogramm der DEAE-Sepharose-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die NaCl-Konzentration als gestrichelte Linie dargestellt.

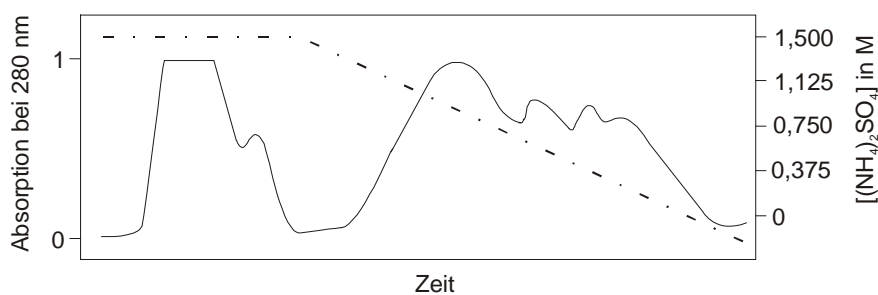


Abb. 5-9: Chromatogramm der Phenyl-Sepharose-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration als gestrichelte Linie dargestellt.

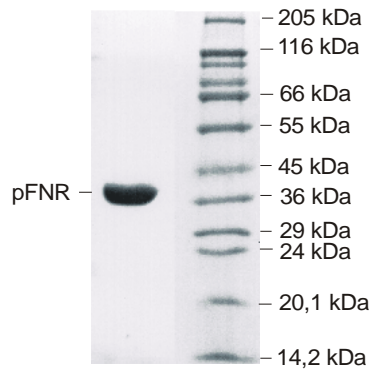


Abb. 5-10: SDS-Polyacrylamid-Gel der bis zur Homogenität gereinigten pFNR.

Aufnahme von Absorptionsspektren (220-500 nm) und durch SDS-PAGE auf pFNR-Gehalt untersucht. pFNR weist ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit Absorptionsmaxima bei $\lambda = 280$ nm (Proteinabsorption) und $\lambda = 315$ nm bzw. $\lambda = 458$ nm (Absorption des proteingebundenen FAD) auf, anhand dessen eine Identifizierung der pFNR-enthaltenden Fraktionen zuverlässig durchgeführt werden konnte. Die pFNR eluierte in einem linearen Salzgradienten im Bereich zwischen 200 und 260 mM NaCl. Im Durchlauf und der Waschfraktion konnte keine pFNR nachgewiesen werden. Nach der Chromatographie an Reactive Red 120-Sephrose lag die pFNR noch nicht in homogener Form vor.

Da der berechnete isoelektrische Punkt des prozessierten Enzyms zu 6,33 bestimmt wurde, wurde eine weitere Aufreinigung der pFNR durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose durchgeführt (Kap. 4.5.5.1.). Abbildung 5-8 zeigt das Chromatogramm der IEC. pFNR eluierte in einem linearen Salzgradienten zwischen 180 und 250 mM NaCl von der DEAE-Sephrose-Säule. Die pFNR-enthaltenden Fraktionen wurden identifiziert, vereinigt und der Reinheitsgrad des Proteins durch SDS-PAGE bestimmt.

Als dritten Reinigungsschritt wurde eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sephrose durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 4.5.5.1. beschrieben. Abbildung 5-9 zeigt das Chromatogramm der HIC. In einem linearen, absteigenden Salzgradienten eluierte die pFNR zwischen 350 und 300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die pFNR-enthaltenden Fraktionen wurden identifiziert, vereinigt, durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von 15 mg/ml eingestellt und durch Dialyse gegen Puffer B von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ befreit. Nach der HIC an Phenyl-Sephrose lag die pFNR in homogener Form vor und zeigte im SDS-Polyacrylamid-Gel nur noch eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 36 kDa (Abb. 5-10). Das berechnete Molekulargewicht der pFNR wurde zu 33177 Da bestimmt und ist etwa 8 % geringer als das durch SDS-PAGE bestimmte apparente Molekulargewicht. Der Bestimmung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE liegt die Annahme zugrunde, daß SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse und ähnliche Formen aufweisen. Die molekularen

Massen der meisten Proteine können daher durch SDS-PAGE nur auf 5 bis 10 % genau bestimmt werden. Die Ausbeute an homogenem Protein lag bei 5 mg pro kg eingesetztem Pflanzenmaterial. Die N-terminale Sequenzierung des präparierten Proteins zeigte, daß es sich dabei um die rekombinant exprimierte pFNR handelte.

Die Reinigung der rekombinanten pFNR aus *E. coli* BL21/DE3 Zellen wurde nach dem für das native Enzym entwickelten Präparationsprotokoll bei 4°C durchgeführt. Trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellysate der Pflanzen- bzw. Bakterienzellen war eine Anpassung des Reinigungsprotokolls nicht nötig. Die isolierte rekombinate pFNR zeigte im SDS-Polyacrylamid-Gel - wie das native Enzym - nur eine Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Die Ausbeute an homogenem rekombinantem Enzym betrug etwa 1,3 mg pro Liter Expressionskultur.

5.1.4.2. Präparation des pFd

Zunächst mußte ein Präparationsprotokoll für die Reinigung des rekombinanten pFd aus *E. coli* entwickelt werden. In Abbildung 5-11 ist der Ablauf der pFd-Präparation schematisch dargestellt. Alle Reinigungsschritte mit Ausnahme der Gelpermeationschromatographie wurden bei 4°C durchgeführt. Dadurch sollte eventuell auftretende Proteindenaturierung verhindert werden.

Die nach der Zellernte bei -20°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und wie in Kapitel 4.5.5.2. beschrieben durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Ferredoxine sind stark hydrophile und azide Proteine, die selbst bei hohen Ammoniumsulfatkonzentrationen löslich sind. Daher bot sich eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung als ersten Reinigungsschritt an, um einen Großteil der verunreinigenden Proteine abzutrennen. Der Proteinrohextrakt wurde zunächst durch Verdünnen mit Phosphatpuffer auf eine Konzentration von etwa 15 mg/ml eingestellt und die Ammoniumsulfatfällung wie in Kapitel 4.5.5.2. beschrieben durchgeführt. Um eine quantitative Fällung der kontaminierenden Proteine zu erreichen, wurde die Ammoniumsulfatfällung in zwei Schritten bis zu einer Ammoniumsulfatsättigung von 70 % (w/v) durchgeführt. So konnten etwa 75 % der verunreinigenden Proteine in einem einzigen Reinigungsschritt abgetrennt werden.

Als zweiten Reinigungsschritt wurde mit der verbleibenden Lösung der Ammoniumsulfatfällung eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose durchgeführt (Kap. 4.5.5.2.). Abbildung 5-12 zeigt das Chromatogramm der HIC. Die Fraktionen wurden durch die Aufnahme von Absorptionsspektren (220-500 nm) und durch SDS-PAGE auf pFd-Gehalt untersucht. pFd zeigt ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit Absorptionsmaxima bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda =$

420 nm, anhand dessen eine eindeutige Identifizierung der pFd-enthaltenden Fraktionen durchgeführt werden konnte. Das Chromatographiematerial wies eine deutliche Bindungsaffinität für pFd auf. Während des Proteinauftrags bildete sich am oberen Ende der Phenyl-Sepharose-Säule eine rotbraune pFd-Bande. pFd eluierte in einem linearen, absteigenden (NH₄)₂SO₄-Gradienten bei etwa 1,5 M (NH₄)₂SO₄. Nach der Chromatographie an Phenyl-Sepharose lag das pFd noch nicht in homogener Form vor.

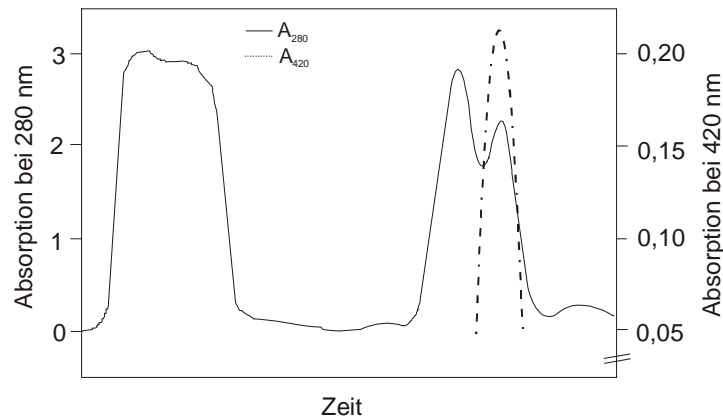


Abb. 5-12: Chromatogramm der Phenyl-Sepharose-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die Absorption bei $\lambda=420$ nm als gestrichelte Linie dargestellt.

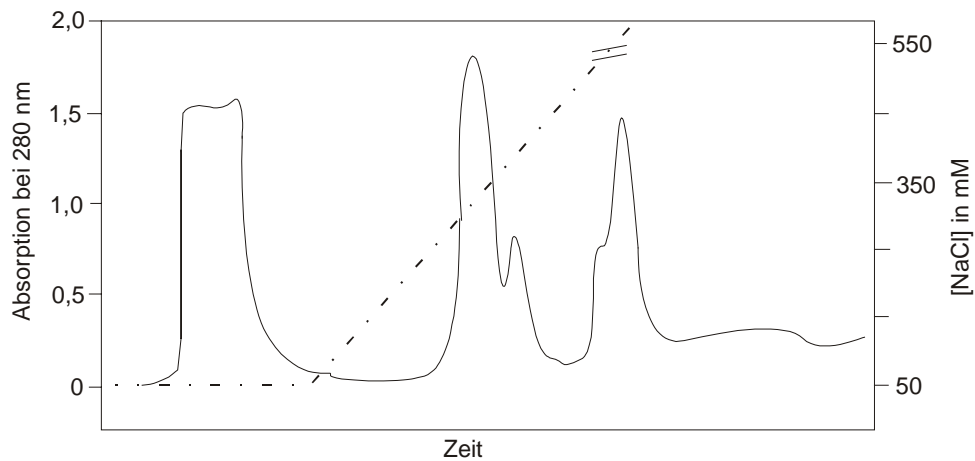


Abb. 5-13: Chromatogramm der Q-Sepharose-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist durch eine durchgezogene, die NaCl-Konzentration des Gradienten durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

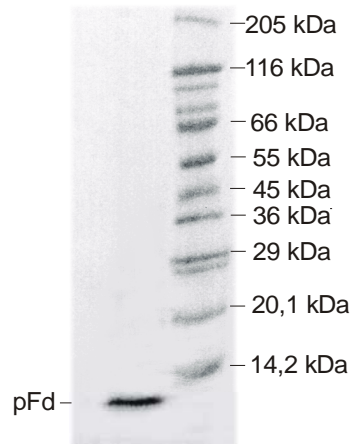


Abb. 5-14: SDS-Polyacrylamid-Gel des bis zur Homogenität gereinigten pFd. Als Proteinlängenstandard wurde *Wide Molecular Weight Marker* (SIGMA, München) verwendet.

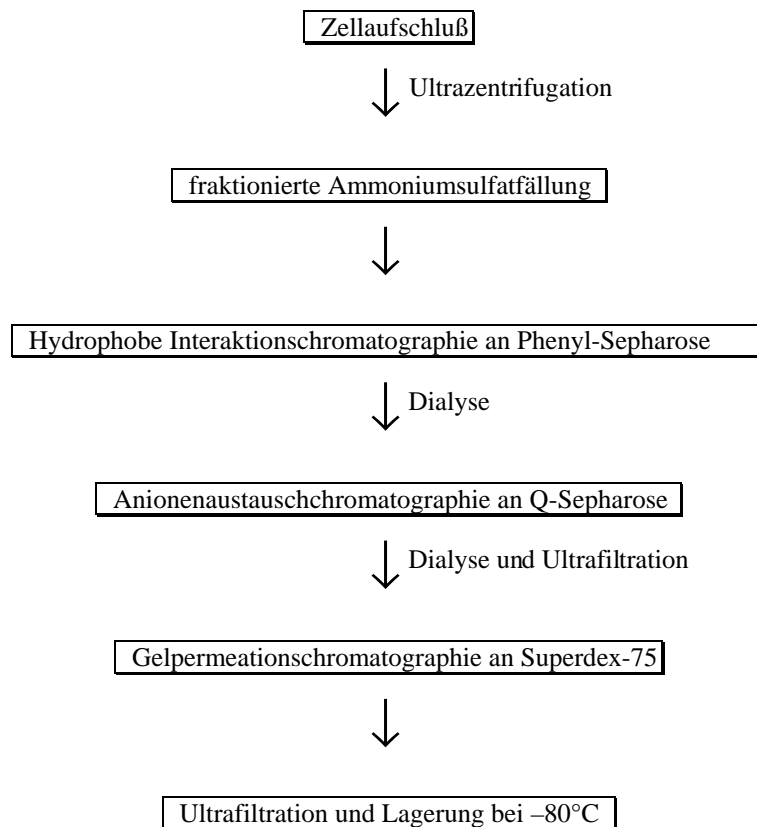


Abb. 5-11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Präparation des [2Fe-2S]-Ferredoxins I aus Paprika.

Da der isoelektrische Punkt des prozessierten pFd zu 3,78 berechnet wurde, wurde als nächster Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kap. 4.5.5.2.). Abbildung 5-13 zeigt das Chromatogramm der IEC. pFd eluierte in einem linearen Salzgradienten im Bereich zwischen 320 und 360 mM NaCl von

der Q-Sepharose-Säule. Die pFd-enthaltenden Fraktionen wurden identifiziert, vereinigt und durch Ultrafiltration auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt.

Um den Reinheitsgrad des isolierten Proteins weiter zu erhöhen, wurde als abschließender Präparationsschritt eine Gelpermeationschromatographie an Superdex 75 vorgenommen. Die Chromatographie erfolgte wie in Kapitel 4.5.5.2. beschrieben. Anhand des pFd-Elutionsvolumens wurde die apparenten Molekularmasse des Enzyms zu ca. 10000 Da bestimmt. pFd lag nach der GPC in homogener Form vor und zeigte im SDS-Polyacrylamid-Gel eine relativ unscharfe Bande (Abb. 5-14). Das apparente Molekulargewicht konnte aufgrund des eingesetzten Proteinlängenstandards nicht mittels SDS-PAGE bestimmt werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß Ferredoxine auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel in einer breiten, unscharfen Bande fokussiert werden. Diese Bande entspricht meist einem höheren apparenten Molekulargewicht, als das berechnete Molekulargewicht für das jeweilige Ferredoxin (Huisman *et al.*, 1978; Piubelli *et al.*, 1995). Die Ausbeute an homogenem rekombinantem Enzym betrug ca. 2,5 mg pro Liter Expressionskultur.

5.1.5. Kristallisation

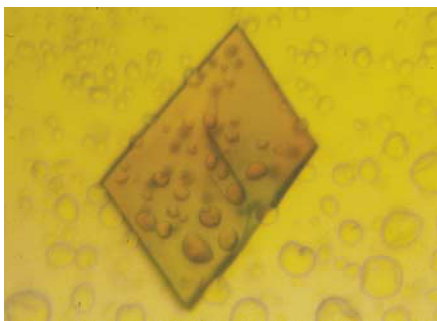


Abb. 5-15: Kristall der pFNR.

Ein ausgedehntes *screening*-Verfahren mit der *hanging drop* Methode (Kap. 4.6.1.) führte zu folgenden endgültigen Kristallisationsbedingungen: 4,5 µl Proteinlösung (15,0 mg/ml; in 20 mM TRIS/HCl, pH 8,0) und 4 µl der Reservoirlösung (0,1 M TRIS-HCl; 1,9 M (NH₄)₂SO₄; pH 8,5) wurden gemischt und als hängender Tropfen gegen 500 µl Reservoirlösung äquilibriert. Unter diesen Bedingungen bildeten sich nach etwa fünf Tagen rautenförmige pFNR-Kristalle, die eine maximale Größe von 0,3 x 0,3 x 0,25 mm³ aufwiesen (Abb. 5-15) und Röntgenstrahlung einer konventionellen Röntgenquelle bis zu einer Auflösung von 2,5 Å streuten. Die Kristalle gehörten der monoklinen Raumgruppe P2₁ an und besaßen Zellkonstanten von a=44,72 Å, b=108,98 Å, c=90,36 Å und α=γ=90,0°, β=95,57° (Tabelle 5-1). Nach der Methode von Matthews (Kap. 4.6.5.) wurde die Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit zu 2 bestimmt, was einem Solvensgehalt von 62 % (V_m=3,22 Å³/Da) entspricht.

5.1.6. Strukturlösung

Datensammlung und Datenreduktion

Die Beugungsbilder wurden auf einem *Image Plate* Detektor bei 20°C aufgenommen. Als Röntgenquelle wurde ein Rigaku RU200 Drehanodengenerator mit $\lambda = \text{CuK}\alpha = 1,542 \text{ \AA}$ verwendet. Der Datensatz wurde mit einem einzigen pFNR-Kristall in Winkelinkrementen von 1° bei einer Belichtungszeit von 1000 s gemessen. Die erhaltenen Diffraktionsbilder wurden mit dem Programm MOSFLM (Leslie, 1994) prozessiert und mit den Programmen ROTAVATA/AGROVATA/TRUNCATE (Collaborative computational project, 1994) skaliert und reduziert. Die Statistik der Datensammlung ist in Tabelle 5-1 wiedergegeben.

Tabelle 5-1
Statistik der Datensammlung und Verfeinerung von pFNR

Raumgruppe		P2 ₁
Elementarzellparameter		a=44,72 Å, b=129,45 Å, c=90,36 Å α=γ=90,0°, β=95,57°
Auflösungsgrenze (Å)		20-2,5
Reflexe	gemessene	61664
	unabhängige	26895
Vollständigkeit (%), (∞-2,5 Å)		83,9
Vollständigkeit (%), (2,58-2,5 Å)		83,5
R _{merge} ^a (%), (∞-2,5 Å)		9,4
R _{merge} ^a (%), (2,58-2,5 Å)		31,9
Auflösungsbereich (Å)		8,0–2,5
Verwendete Reflexe		24312
Anzahl der Aminosäurereste/au		592
Wassermoleküle		438
FAD Moleküle		2
Phosphationen		2
R-Faktor ^b (%)		19,8
R _{free} -Faktor ^c (%)		26,5
rms-Standardabweichung:	Bindungslängen (Å)	0,007
	Bindungswinkel (°)	1,6
	<i>dihedral</i> Winkel (°)	23,7
	<i>improper</i> Winkel (°)	1,2
	gebundene B-Faktoren (Å ²)	2,9
B-Faktoren (Å ²):	alle Atome	18,7
	Proteinatome	18,3
	Hauptkettenatome	16,7
	FAD Cofaktor	36,4

$${}^a R_{\text{merge}} = \frac{\sum (I - \langle I \rangle)}{\sum I}$$

$${}^b R = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

^cDer freie R-Faktor (R_{free}) wurde mit 5 % zufällig ausgewählter Reflexe berechnet.

Phasenbestimmung, Modellbau und Verfeinerung

Die Struktur von pFNR wurde durch Patterson-Suchtechniken mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) gelöst. Als Suchmodell wurde ein Poly-Ala-Modell der Kristallstruktur der FNR aus Spinat (Karplus *et al.*, 1991; Bruns *et al.*, 1995) herangezogen. Die prosthetische Gruppe FAD wurde aus dem Suchmodell ausgelassen.

Um die genaue Anzahl der pFNR-Moleküle pro asymmetrischer Einheit zu bestimmen, wurde zunächst mit Programmen der CCP4 *Suite* (Collaborative computational project, 1994) eine

native Patterson Karte berechnet. In der Harker Sektion bei $y=0,5$ konnte ein Pseudo-Ursprungspik beobachtet werden. Selbstrotationsfunktionen zur Bestimmung der nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS) wurden mit dem Programm GLRF (Tong *et al.*, 1990) berechnet. In den κ -Sektionen bei 180° , 120° und 90° konnten keine Peaks beobachtet werden. Diese Berechnungen deuteten an, daß die asymmetrische Einheit der pFNR-Kristalle zwei Monomere enthält, die durch eine Translation miteinander in Beziehung stehen. Die Patterson-Suchtechniken wurden folglich für zwei pFNR-Moleküle angewandt. Es wurden zwei abgehobene Lösungen in der Rotations- und Translationssuche gefunden, die den beiden pFNR-Molekülen der asymmetrischen Einheit entsprachen. Nach *rigid body fitting* betrug der Korrelationskoeffizient 56,4 % und der R-Faktor 37,3 %.

Die erste Verfeinerung der beiden Monomere A und B mit X-PLOR (Brünger, 1992) unter Verwendung der Parameter von Engh und Huber (1991) ergab eine interpretierbare Elektronendichtekarte. Durch zyklisches Mitteln mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) unter Verwendung der berechneten NCS-Operatoren (LSQMAN; Kleywegt und Jones, 1994) konnten die Elektronendichtekarten nicht verbessert werden. Die gesamte Proteinsequenz der pFNR wurde in die Elektronendichte eingepaßt und das Modell mit dem Programm ESV-FRODO (Jones, 1985) auf einer ESV-30 Workstation erstellt. Nach jedem Bauzyklus wurde das Modell unter Verwendung der Daten im Bereich zwischen $8,0 \text{ \AA}$ und $2,5 \text{ \AA}$ verfeinert. Nur während der ersten iterativen Modellbau- und Verfeinerungszyklen wurde das Monomer B über die Anwendung der NCS-Symmetrieoperatoren aus A generiert (LSQMAN, Kleywegt und Jones, 1994). Bei einem R-Faktor von 25 % wurden Wassermoleküle in die Elektronendichtekarte eingebaut. Die Verfeinerung der Daten (*rigid body*-, *powell*-, individuelle B-Faktor-Verfeinerung und *simulated annealing*) senkte den R-Faktor schließlich auf 19,8 % (der freie R-Faktor betrug 26,5 %) (Tabelle 5-1).

Qualität des endgültigen Modells

Das endgültige Modell umfaßt die beiden pFNR-Monomere A und B mit den Resten 67 bis 362, die beiden FAD-Cofaktoren (eines pro Monomer), zwei Phosphationen (eines pro Monomer) und 438 Wassermoleküle (Tabelle 5-1). Alle Reste sind in der Elektronendichte gut definiert - mit Ausnahme der Aminosäuren 171 bis 175, die in einem variablen Loop an der Oberfläche der FAD-Bindungsstelle des Proteins liegen und den ersten zwölf Aminosäuren des N-Terminus (aa 55-aa66). Die durchschnittliche Abweichung der Modellkoordinaten wurde durch Berechnung eines Luzatti *Plots* (Luzzatti, 1952) und durch Anwendung der σ_A Methode (Read, 1986) zu 0,27

Å bzw. 0,28 Å abgeschätzt. Die Stereochemie des Modells ist eindeutig definiert: die Abweichungen von den Idealwerten (Engh und Huber, 1991) betragen für die Bindungslängen 0,007 Å und für die Bindungswinkel 1,6° (Tabelle 5-1). Nur drei Aminosäurereste (Lys69, Lys70 und Asn170), welche in der Elektronendichte gut definiert sind, befinden sich in verbotenen Bereichen des Ramachandran-Plots (Abb. 5-16), während 86,7 % aller Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Regionen liegen (Ramachandran und Sasisekharan, 1968). Asn170 befindet sich in der Nähe der FAD-Bindungsstelle des Proteins und wechselwirkt durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Adeninanteil der prosthetischen Gruppe FAD. Die Ausbildung dieser starken Wasserstoffbrückenbindung kann die energetisch ungünstige Konformation von Asn170 begünstigen. Lys69 und Lys70 befinden sich hingegen an der Proteinoberfläche in einem Bereich mit hoher Flexibilität.

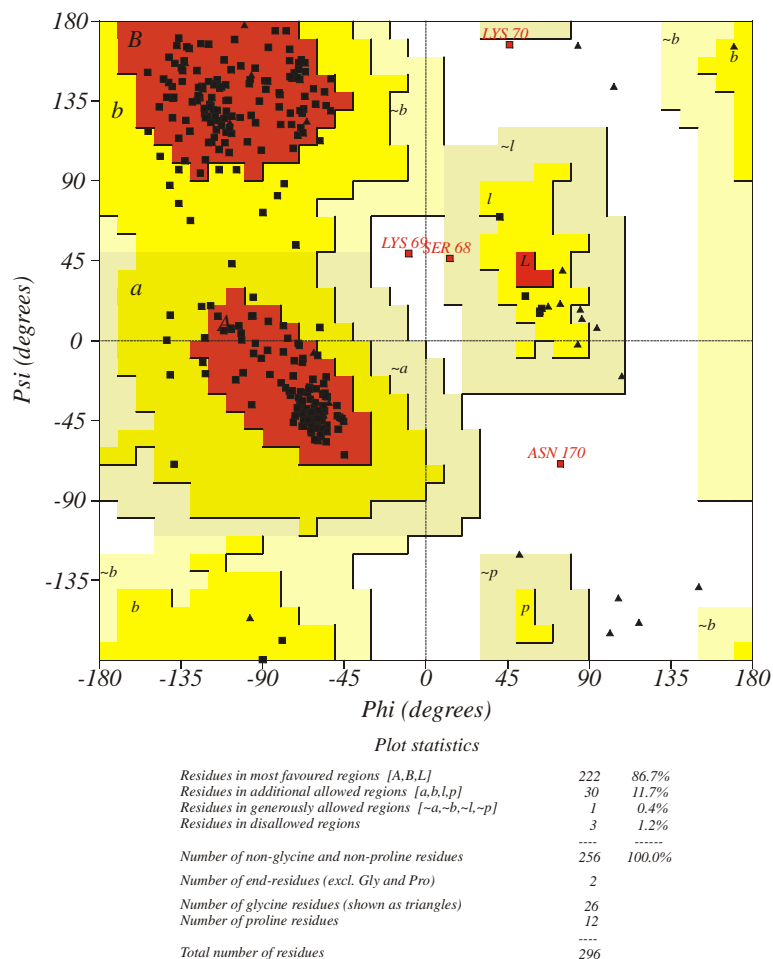


Abb. 5-16: Ramachandran-Diagramm des verfeinerten Modells von pFNR. Die Abbildung wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1992) erstellt.

5.1.7. Strukturbeschreibung

Gesamtstruktur der pFNR

In der Kristallstruktur der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* liegt das Enzym in monomerer Form vor, wie auch andere Mitglieder dieser Proteinfamilie (Karplus *et al.*, 1991; Bruns *et al.*, 1995; Serre *et al.*, 1996). Die pFNR setzt sich aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammen – der N-terminalen FAD-bindenden Domäne und der C-terminalen NADP⁺-bindenden Domäne (Abb. 5-17).

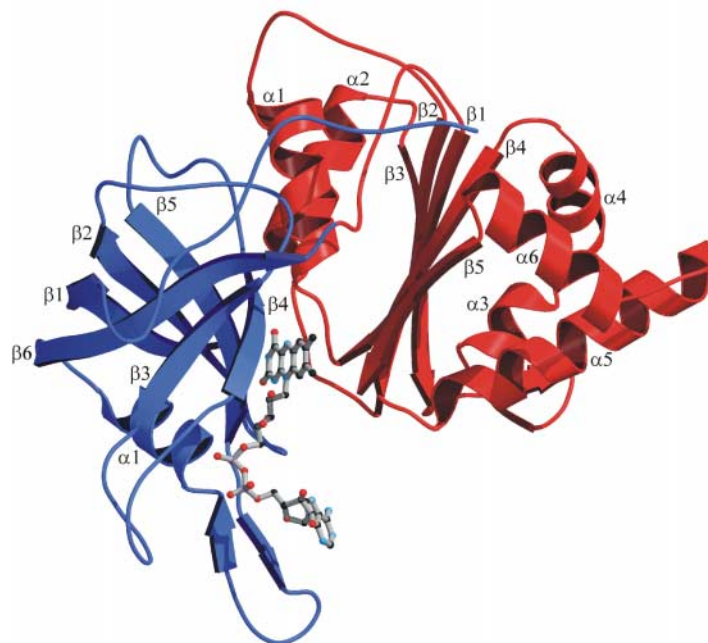


Abb. 5-17: Die Struktur der pFNR. Die N-terminale FAD-bindende Domäne ist in blau und die C-terminale NADP⁺-bindende Domäne in rot dargestellt. Der gebundenen Cofaktor FAD ist in der *ball and stick* Darstellung gezeigt. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt.

Die FAD-bindende Domäne umfaßt die Aminosäurereste 67 bis 201 und besteht aus einem β -*Barrel*. Das β -*Barrel* wird von sechs antiparallelen β -Strängen gebildet, die in zwei senkrecht zueinander angeordneten dreistängigen β -Faltblättern angeordnet sind (Faltblatt I und Faltblatt II; Tabelle 5-2). Die Unterseite des β -*Barrels* wird von einer kurzen α -Helix und einem langen Loop, der von zwei kurzen β -Strängen umgeben ist (FAD-bindender Loop), verschlossen. Beide Strukturelemente – die α -Helix und der Loop – sind entlang der FAD-Bindungsstelle des Proteins lokalisiert. Die FAD-bindende Domäne beinhaltet das einzige konservierte cis-Prolin des Moleküls – Pro198 – welches am Ende von β -Strang $\beta 6$ lokalisiert ist.

Tabelle 5-2

Sekundärstrukturelemente der FAD-bindenden Domäne und der NADP⁺-bindenden Domäne der pFNR.

<i>Sekundärstrukturelemente der FAD-bindenden Domäne:</i>	
Faltblatt I	β1: aa86-aa95, β2: aa105-aa111 und β5: aa158-aa164
Faltblatt II	β4: aa141-144, β3: aa123-aa127 und β6: aa191-aa199
α-Helix	α1: aa179-aa186
langer Loop	aa169-aa175 (mit zwei kurzen β-Strängen, aa167-aa168 und aa176-aa177)
<i>Sekundärstrukturelemente der NADP⁺-bindenden Domäne:</i>	
Faltblatt III	β1: aa212-aa218, β2: aa245-aa252, β3: aa275-aa281, β4: aa315-aa321 und β5: aa357-aa361
α-Helices	α1: aa223-aa234, α2: aa261-aa270, α3: aa295-aa299, α4: aa303-aa311, α5: aa324-aa340 und α6: aa344-aa354

Das *Core* der NADP⁺-bindenden Domäne besteht aus einem fünfsträngigen parallelen β-Faltblatt (Faltblatt III; Tabelle 5-2), welches von sechs α-Helices (Tabelle 5-2) umgeben ist. Die NADP⁺-bindende Domäne weist strukturelle Ähnlichkeit zum klassischen Rossmann-Fold Nukleotid-bindender Enzyme auf, der erstmals von Rossmann und Mitarbeitern (1975) beschrieben wurde. Der βαβαβ-Rossmann-Fold besteht aus zwei überlappenden βαβ-Einheiten, in der die β-Stränge ein paralleles Faltblatt mit rechtsgängigen α-helicalen Überbrückungen bilden (Rossmann M. G. & Argos, P., 1981). Neben dem klassischen βαβαβ-Rossmann-Fold (pFNR: β1α1β2α2β3; Abb. 5-3) weist die NADP⁺-bindende Domäne jedoch zusätzliche β-Stränge und α-Helices (α3, α4, β4, α5, α6, β5; Abb. 5-3) auf.

Bruns und Karplus schlugen vor, daß die C-terminale NADP⁺-bindende Domäne der FNR aus Spinat aus zwei Subdomänen aufgebaut ist (Bruns und Karplus, 1995). Die NADP⁺-bindende Domäne der pFNR zeigt einen ähnlichen Aufbau, der eine Unterteilung in zwei Subdomänen zuläßt (Abb. 5-17). Die erste Subdomäne setzt sich aus den β-Strängen β1, β2 und β3 sowie den

α -Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ zusammen und beinhaltet alle Reste, die für die Bindung des Substrates NADP⁺ verantwortlich sind. Die zweite Subdomäne besteht aus den β -Strängen $\beta 4$ und $\beta 5$ sowie den α -Helices $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ und enthält am äußeren Rand des parallelen β -Faltblatts eine große hydrophobe Tasche. Sie besitzt eine Größe von ca. 200 Å³ und enthält keine geordneten Wassermoleküle. Die Werte der 2F_o-F_c-Elektronendichte sind in diesem Bereich des Modells negativ. Da solch eine große hydrophobe Tasche an der Oberfläche eines natürlichen Proteins sehr ungewöhnlich ist, scheint sie eine eindeutige funktionelle Rolle zu besitzen. Verschiedene Untersuchungen (Matthijs *et al.*, 1986; Shin *et al.*, 1994) lassen vermuten, daß die FNR während der Katalyse des letzten Schrittes der linearen Photosynthese als Membran-assoziierte Komponente vorliegt. Die hydrophobe Tasche der zweiten Subdomäne könnte daher als Bindungsstelle für die Thylakoidmembran oder für ein entsprechendes Membran-assoziiertes *Docking*-Protein fungieren.

Neben der hydrophoben Tasche der NADP⁺-bindenden Domäne der pFNR befinden im Protein sich zwei weitere, verborgene hydrophobe Cluster (Cluster I und Cluster II). Diese sind für die dreidimensionale Faltung der pFNR wichtig. Cluster I beinhaltet die hydrophoben Aminosäurereste, die ins Innere des β -Barrels der FAD-bindenden Domäne zeigen, einige Seitenketten der Interdomänenbrücke und des ausgedehnten N-terminalen Segments. Dieser hydrophobe Cluster legt die Struktur für die Bindung des redoxaktiven Cofaktors FAD fest. Cluster II umfaßt die Interdomänenregion und ist für die Assoziation der beiden Domänen der pFNR verantwortlich.

Bindungsstelle für die prosthetische Gruppe FAD

Die Bindungsstelle des FAD liegt am Rande der FAD-bindenden Domäne im Bereich der Interdomänenregion (Abb. 5-17). An dieser Stelle besitzt das β -Barrel zwischen den β -Strängen $\beta 4$ und $\beta 5$ eine kleine Spalte, die genügend Raum für die Bindung des Isoalloxazinanteils und des Ribitylanteils des FAD bietet. Der Riboseanteil und der Adeninanteil des gebundenen FAD erstrecken sich entlang des verbrückenden Loops zwischen $\beta 5$ und $\alpha 1$. Dieser Loop – im folgenden FAD-bindender Loop genannt - ist von zwei kurzen β -Strängen umgeben und ragt unmittelbar ins umgebende Lösungsmittel. pFNR bindet seine redoxaktive prosthetische Gruppe FAD ausschließlich durch direkte und Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals Kontakte und aromatische π - π -Wechselwirkungen. Viele der Wechselwirkungen zwischen pFNR und FAD werden durch Hauptkettenatome von Aminosäureresten aus repetitiven

Sekundärstrukturelementen vermittelt. Eine Übersicht über die Wechselwirkungen zwischen pFNR und FAD ist in Abbildung 5-18 wiedergegeben.

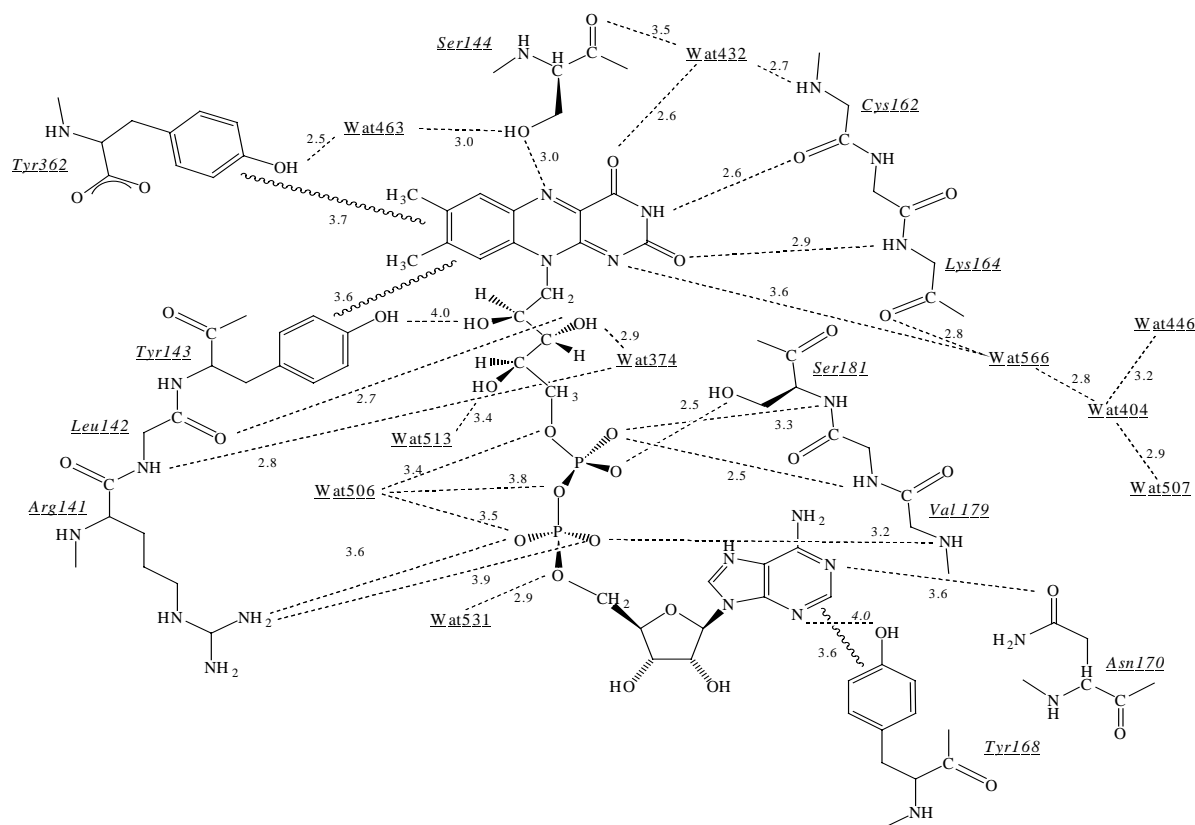


Abb. 5-18: Schematische Darstellung der Umgebung des pFNR-gebundenen Cofaktors FAD. Wasserstoffbrückenbindungen (gepunktete Linie) und aromatische π - π -Wechselwirkungen (wellige Linie) zwischen FAD und Aminosäureresten der pFNR sind eingezeichnet. Die Abstände zwischen den wechselwirkenden Atomen sind in Å angegeben.

Der Isoalloxazinring ist zwischen zwei Tyrosin Resten – Tyr143 auf der *pro-si*-Seite und Tyr362 auf der *pro-re*-Seite - fest an das Protein gebunden (Abb. 5-19a). Das aromatische Ringsystem von Tyr143 ist um etwa 75° gegen den aromatischen FAD-Isoalloxazinring verkippt, während die Seitenkette von Tyr362 nahezu parallel zum Ring angeordnet ist. Die Abstände zwischen den aromatischen Ringsystemen erlauben die Ausbildung von aromatischen π - π -Wechselwirkung. Die Hauptkettenatome der Aminosäuren Cys162 und Lys164 und ein Seitenkettenatom des Restes Ser144 bilden direkte Wasserstoffbrückenbindungen zum Isoalloxazinring aus. Die Aminosäuren Ser144 und Tyr362 sind an Wasser-vermittelten Wasserstoffbrückenbindungen zum Isoalloxazinring beteiligt (Abb. 5-18, Abb. 5-19a). Der Großteil des Isoalloxazinrings ist tief in der Spalte zwischen den Strängen β 4 und β 5 des β -Barrels verborgen. Lediglich der äußere Rand des Isoalloxazinrings - mit seinen Methylgruppen C7a und C8a - ragt aus der Proteintasche

heraus ins umgebende Solvent. Die dem Solvent ausgesetzte Fläche beträgt etwa 11 Å² für die Methylgruppe C7a und 40 Å² für C8a. Dieser Solvent-exponierte Bereich des Isoalloxazinrings, ist vermutlich der Ort, an dem der Eisen-Schwefel-Cluster sein Elektron auf den FNR-gebundenen Redoxcofaktor FAD überträgt. In der Kristallstruktur der Phthalate Dioxygenase Reduktase (PDR, Correll *et al.*, 1992) - ein Enzym der FNR-Proteinfamilie, welches eine zusätzliche Ferredoxin-ähnliche Eisen-Schwefel-Domäne besitzt, die kovalent mit den beiden pFNR-ähnlichen Domänen verknüpft ist – liegt der Eisen-Schwefel-Cluster der dritten Domäne tatsächlich in Verlängerung der Methylgruppen C7a und C8a des PDR-gebundenen Redoxcofaktors FMN.

Der Ribitylanteil und die beiden darauffolgenden Phosphatgruppen des FAD sind ähnlich wie der FAD-Isoalloxazinring fest an das Protein gebunden. Sie wechselwirken fast ausschließlich über direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureresten der pFNR. Die Seitenkette des Restes Tyr143 als auch die Hauptkette der Aminosäure Leu142 bilden eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu einer der Hydroxylgruppen des FAD-Ribitylanteils aus. Die Phosphatgruppen wechselwirken über direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten der Reste Ser181 und Arg141 und den Hauptketten der Reste Val179 und Ser181. Zusätzlich sind in diesem Bereich vier Wassermoleküle durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Cofaktor verbunden (Abb. 5-18, Abb. 5-19a).

Der FAD-bindende Loop zwischen den Strukturelementen β5 und α1 der FAD-bindenden Domäne ist für die Bindung des FAD-Adeninanteils verantwortlich. In der Kristallstruktur der pFNR ist der Adeninanteil des FAD fest mit dem Protein verankert. Die Seitenkette des Restes Tyr168 besitzt eine optimale Orientierung, um eine aromatische π-π-Wechselwirkung mit dem Adeninring des FAD einzugehen (Abb. 5-18, Abb. 5-19a). Asn170 ist in der Lage, eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom AN1 des FAD-Adeninrings zu bilden und Leu166 befindet sich in van-der-Waals Kontakt mit den Atomen AC5 und AN7 (Abb. 5-18, Abb. 5-19a). In den Kristallstrukturen der FNR aus Spinat (Karplus *et al.*, 1991; Bruns *et al.*, 1995) und aus *Anabaena* PCC 7119 (Serre *et al.*, 1996) ist der Adeninanteil des FAD hingegen nur sehr schwach an das Protein gebunden. Abbildung 5-19b zeigt eine Überlagerung der FAD-Bindungsstellen der pFNR und der FNR aus Spinat. Daraus geht eindeutig hervor, daß die charakteristische Orientierung des FAD-bindenden Loops in pFNR für die feste Bindung des gesamten Cofaktors verantwortlich ist.

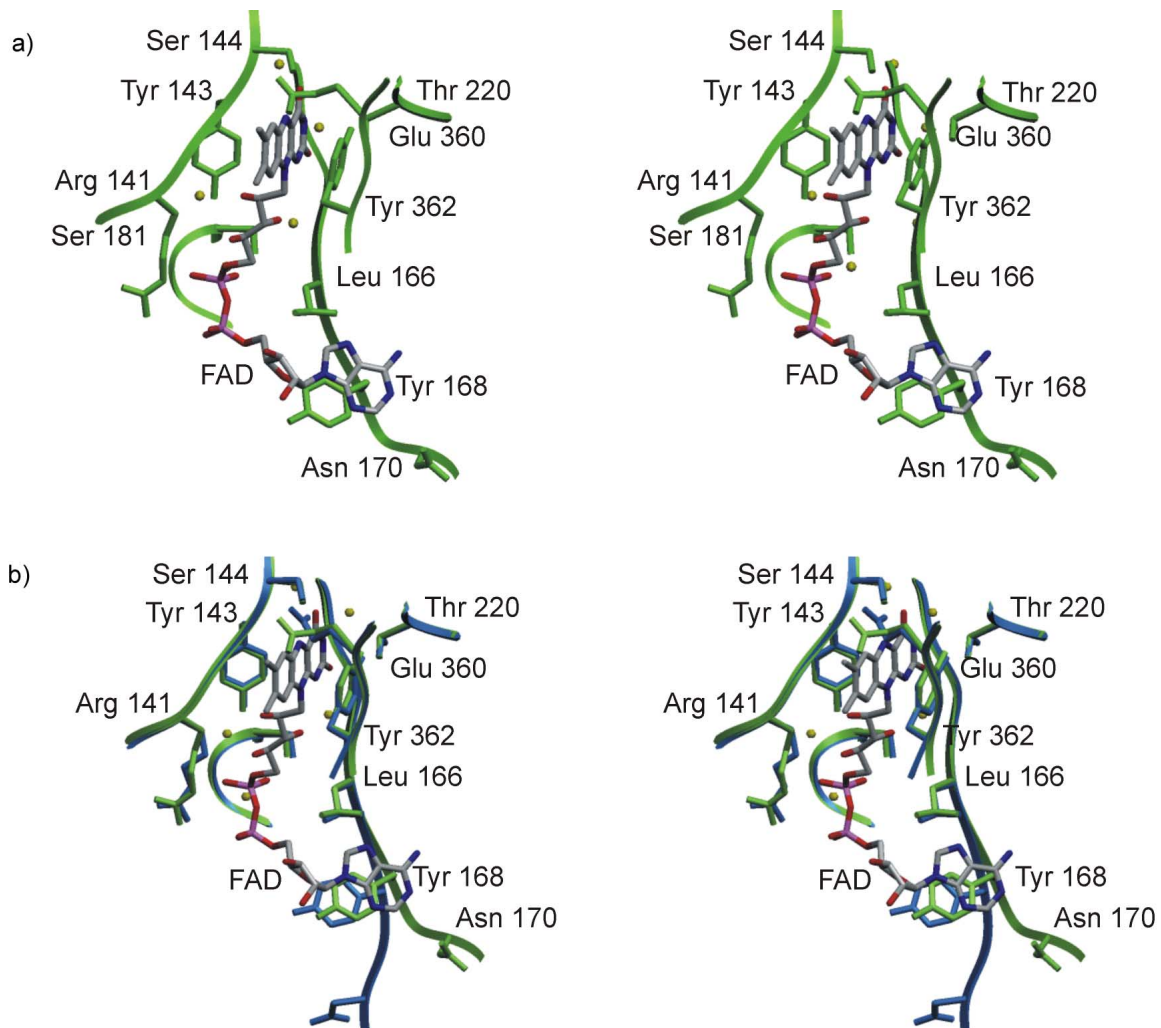


Abb. 5-19: Bindungsstelle der prosthetischen Gruppe FAD. a) Stereoabbildung der FAD-Bindungsstelle der pFNR. b) Stereoabbildung einer Überlagerung der FAD-Bindungsstellen der pFNR (grün) und der FNR aus Spinat (blau).

Vermeintliche [2Fe-2S]-Ferredoxin I Bindungsstelle

Der Redoxpartner der FNR - [2Fe-2S]-Ferredoxin I (Fd) – ist ein kleines, azides Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 11 kDa. Als prosthetische Gruppe enthält Fd einen [2Fe-2S]-Cluster, der über vier Cysteinreste des Proteins koordiniert wird. Fd ist in eine Vielzahl unterschiedlicher metabolischer Stoffwechselwege verwickelt (Knaff *et al.*, 1991). In der photosynthetischen Elektronentransportkette überträgt es sein Elektron auf den FNR-gebundenen Redoxcofaktor FAD. Schon früh stellte man fest, daß die Stabilität des Elektronentransferkomplexes zwischen FNR und Fd von der Ionenstärke abhängt (Foust *et al.*, 1969).

Elektrostatische Wechselwirkungen wurden für die Komplexbildung zwischen den beiden Redoxpartnern verantwortlich gemacht.

Die Kristallstruktur der pFNR zeigt an der Proteinoberfläche der Interdomänenregion eine große konkave Vertiefung, die dem Redoxpartner Fd als Bindungsstelle dienen könnte (Abb. 5-17). Die redoxaktive prosthetische Gruppe FAD befindet sich im Zentrum dieser Vertiefung. Ihr Dimethylbenzenring ist in Richtung der vermeintlichen Fd-Bindungsstelle gerichtet. An der Proteinoberfläche dieser Vertiefung befinden sich in unmittelbarer Nähe des Cofaktors FAD positiv geladene Aminosäurereste, die vier größeren Bereichen zugeordnet werden können. Der erste positiv geladene Oberflächenbereich (*Patch I*) - innerhalb der vermeintlichen Fd-Bindungsstelle - umfaßt die Reste Lys136, His138, Lys139 und Arg141. Ein zweiter Bereich positiver Ladung (*Patch II*) befindet sich in der näheren Umgebung des Restes Lys201. Der dritte und größte positiv geladene Oberflächenbereich (*Patch III*) umfaßt die Reste Lys348, Lys349, Lys352 und Lys353, während sich der vierte positiv geladene Bereich (*Patch IV*) um den Aminosäurerest Lys323 gruppiert. Durch chemische Modifikationsexperimente (Jelesarow, *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1992a; Medina *et al.*, 1992b; Zanetti *et al.*, 1984), chemische *Cross-linking* Experimente (Zanetti *et al.*, 1988) und Mutagenesestudien (Hurley *et al.*, 1999; Aliverti *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1998) mit FNRs und Fds aus unterschiedlichen Organismen konnten eine Reihe von sauren Aminosäureresten an der Proteinoberfläche des Fd und von basischen Aminosäureresten an der Proteinoberfläche der FNR identifiziert werden, die möglicherweise an der Komplexbildung der beiden Proteine beteiligt sind. Die meisten dieser FNR-Reste sind homolog zu den innerhalb der konkaven Vertiefung der pFNR identifizierten basischen Aminosäureresten (*Patch I-IV*).

Es ist wahrscheinlich, daß das von *Patch I-IV* ausgehende molekulare Dipolmoment der pFNR mit dem komplementär geladenen molekularen Dipolmoment des Fd in Wechselwirkung tritt. Die beiden Redoxpartner werden anfänglich aufeinander zugelenkt. Durch die Wechselwirkung zwischen den identifizierten basischen Aminosäuren auf der Oberfläche der pFNR und den sauren Aminosäuren auf der Oberfläche des Fd wird eine optimale Orientierung der beiden Redoxpartner erreicht. Kräfte kurzer Reichweite, wie zum Beispiel hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des *Komplexinterface*, optimieren die strukturelle Anordnung der beiden Moleküle im Komplex und gewährleisten so einen effektiven Elektronentransfer zwischen den beiden Redoxpartnern.

5.1.8. Vergleich mit der FNR aus Spinat und *Anabaena*

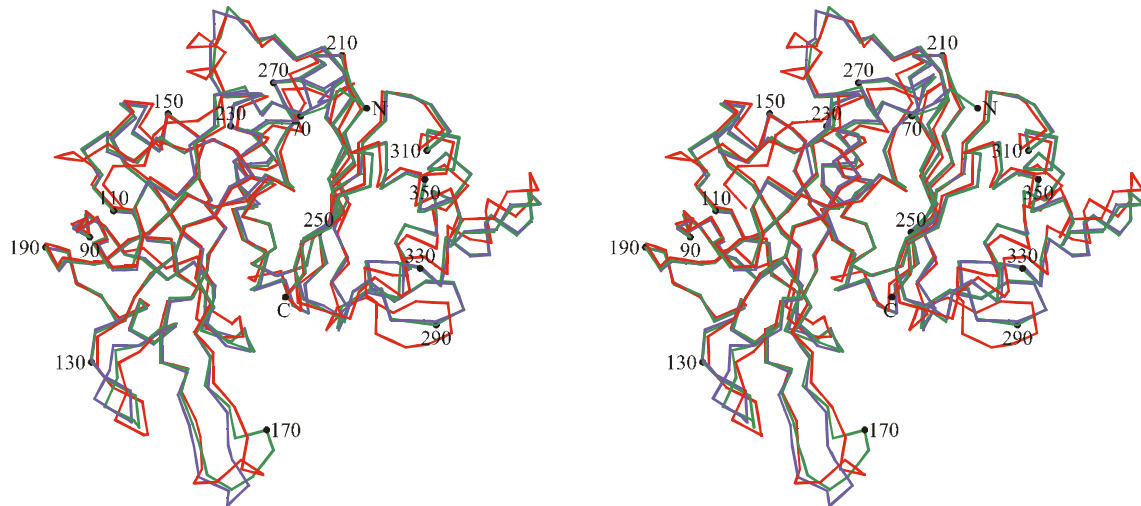


Abb. 5-20: Überlagerung der C_α-Modelle der pFNR (Grün), der FNR aus Spinat (Blau) und der FNR aus *Anabaena* PCC 7119. Die Numerierung der Aminosäurereste der pFNR beginnt am N-Terminus mit Rest 67 und endet am C-Terminus mit Rest 362. Die Überlagerung der Strukturen erfolgte mit dem Programm LSQMAN. Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt.

pFNR hat etwa 75 % Sequenzidentität zu anderen pflanzlichen Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasen (Abb. 5-3) und besitzt 50 % Sequenzidentität zur FNR aus *Anabaena* PCC 7119. Die Gesamtstruktur der pFNR ist ähnlich zu den bereits bekannten Strukturen der FNR aus Spinat und aus *Anabaena* PCC 7119 (Abb. 5-20). Das Proteincore der FNRs und somit das charakteristische *two domain* Motiv ist innerhalb der Proteinfamilie hoch konserviert. Die größten strukturellen Unterschiede der Proteine betreffen den FAD-bindenden Loop (aa169-aa175) und einige variable Bereiche an der Proteinoberfläche. Im Gegensatz zu den Strukturen der FNR aus Spinat und *Anabaena* PCC 7119, nimmt der FAD-bindende Loop der pFNR, welcher einen Teil der FAD-Bindungsstelle bildet, eine stark gekrümmte Konformation in Richtung des gebundenen Cofaktors FAD ein. Der Bindungsmodus des FAD-Isoalloxazinrings, des FAD-Ribitylanteils und der Phosphatgruppen ist in allen Mitgliedern der Proteinsuperfamilie ähnlich. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da der Isoalloxazinring des FAD den redoxaktiven Teil der FNR darstellt. Die Methylgruppen C7a und C8a des Dimethylbenzenrings, denen die wahrscheinlich wichtigste Rolle im Elektronentransfer mit Fd zugesprochen wird,

zeigen in allen drei Strukturen auf ganz ähnliche Weise in das Lösungsmittel-umgebende Medium. Der FAD-Isoalloxazinring ist zwischen zwei Tyrosinresten der Proteine lokalisiert und wird durch die Ausbildung aromatischer π - π -Wechselwirkung stabilisiert (Kap. 5.1.7.). Die Seitenkette des C-terminalen Tyrosins ist dabei in allen drei Strukturen nahezu parallel zum Isoalloxazinring ausgerichtet. Dieser invariante C-terminale Tyrosinrest besitzt eine wichtige Rolle in der Katalyse der Elektronenübertragung. Um einen Hydridtransfer zwischen dem Stickstoffatom N5 des FAD-Isoalloxazinrings und dem Kohlenstoffatom C4 des NADP⁺-Nicotinamidrings zu gewährleisten, müssen die beiden Redoxzentren mit relativ geringem Abstand und nahezu parallel zueinander angeordnet sein. Diese produktive Anordnung der beiden redoxaktiven Ringsysteme von FAD und NADP⁺ ist nur möglich, wenn der NADP⁺-Nicotinamidring die Position des C-terminalen Tyrosins einnimmt. Im NADP⁺-ungebundenen Zustand wird der FAD-Isoalloxazinring durch den C-terminalen Tyrosinrest stabilisiert und vor einer möglichen Oxidation durch Sauerstoff geschützt. Kommt es jedoch zur produktiven Bindung des Substrates NADP⁺, wird das C-terminale Tyrosin durch den Nicotinamidring des NADP⁺ verdrängt und ermöglicht so den Hydridtransfer zwischen den beiden nun parallel zueinander liegenden Redoxzentren. Während die Bindung des Isoalloxazinrings, des Ribitylanteils und der beiden Phosphatgruppen des Redoxcofaktors FAD in der Proteinfamilie der Reduktasen weitgehend konserviert ist, variiert die Bindung des Riboseanteils und des Adeninanteils des FAD in größerem Ausmaß. Üblicherweise ist jedoch der FAD-bindende Loop zwischen den Strukturelementen β 5 und α 1 der FAD-bindenden Domäne für die Bindung des FAD-Adeninanteils verantwortlich. Im Gegensatz zu den Kristallstrukturen der FNR aus Spinat und aus *Anabaena* PCC 7119, bei denen der Adeninanteil des FAD nur schwach an das Protein gebunden ist (van-der-Waals Kontakt zwischen Adeninanteil und dem Rest Tyr120' bzw. Tyr104"), ist der FAD-Adeninanteil in der Kristallstruktur der pFNR fest mit dem Protein verankert. Dies ist auf die stark gekrümmte Konformation des FAD-bindenden Loops der pFNR in Richtung des gebundenen Cofaktors FAD zurückzuführen (Abb. 5-20). Diese Konformation bringt die Seitenkette des Restes Tyr168 in eine optimale Orientierung, um eine aromatische π - π -Wechselwirkung mit dem Adeninring des FAD einzugehen. Asn170 ist in der Lage eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom AN1 des Adeninrings zu bilden und Leu166 ist in van-der-Waals Kontakt mit den Atomen AC5 und AN7 (Abb. 5-19). Die Orientierung des FAD-bindenden Loops ist ein charakteristisches Merkmal der FAD-Bindungsstelle der pFNR und ist für die feste Bindung des gesamten Cofaktors verantwortlich.

Die Konformation der Ribitylkette des pFNR-gebundenen FAD unterscheidet sich von der für die Kristallstruktur der FNR aus Spinat und aus *Anabaena* berichteten. Die Hydroxylgruppen an Position 3 und 4 zeigen in unterschiedliche Richtungen. Die Elektronendichte des Modells der pFNR ist in diesem Bereich jedoch eindeutig und gibt zudem die richtige Stereochemie des FAD-Moleküls wieder. Die starke Wechselwirkung zwischen pFNR und FAD-Adeninring könnte die „verdrehte“ Konformation des FAD-Ribitylanteils in pFNR erzwingen.

Ein weiteres gemeinsames Merkmal der drei Proteine ist die große hydrophobe Tasche an der Oberfläche der NADP⁺-bindenden Domäne (Kap. 5.1.7.). Diese hydrophobe Tasche ist innerhalb der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktasefamilie konserviert und scheint eine eindeutige funktionelle Rolle zu besitzen. Die Lage dieser konservierten hydrophoben Tasche an der Proteinoberfläche ist für natürliche Proteine äußerst ungewöhnlich. Da es sich bei der FNR um eine Membran-assoziierte Komponente der linearen Photosynthese handelt, wird vermutet, daß die hydrophobe Tasche die Wechselwirkung mit der Thylakoidmembran oder der Bindungsstelle eines Membran-assoziierten *Docking* Proteins vermittelt.

5.1.9. Bindungsstellen der Substrate

FNR verwendet für die Katalyse des letzten Schrittes der linearen Photosynthese die redoxaktive Gruppe FAD. Sie stellt den reaktiven Teil des Proteins dar und vermittelt die Elektronenübertragung zwischen den beiden redoxaktiven Substraten Fd und NADP⁺.

5.1.9.1. Bindungsstelle für [2Fe-2S]-Ferredoxin I

Molecular Modeling

Um den Elektronentransferkomplex zwischen pFNR und dem Substrat pFd röntgenkristallographisch zu untersuchen, wurde das Gen des nativen Redoxpartners [2Fe-2S]-Ferredoxin I aus *Capsicum annuum Yolo Wonder* (pFd) sequenziert, kloniert und in *E. coli* exprimiert. Versuche, pFNR im Komplex mit seinem nativen Redoxpartner pFd zu kristallisieren, blieben jedoch erfolglos. Um Aussagen über die Lage der pFd-Bindungsstelle in pFNR und die intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungen im Komplex zu machen, wurde durch *Molecular Modeling* das Strukturmodell eines potentiellen Elektronentransferkomplexes zwischen den beiden Proteinen erzeugt. Da die Kristallstruktur der pFd derzeit nicht bekannt ist, wurden die *Molecular Modeling* Studien mit der Struktur des [2Fe-2S]-Ferredoxin I aus *Spinacia oleracea* (sFd) (Binda

et al., 1998) durchgeführt. pFd hat eine 94,5 %ige Sequenzhomologie zu sFd und besitzt daher eine zum sFd ähnliche Gesamtstruktur. Die Struktur des Elektronentransferkomplexes zwischen pFNR und sFd wurde durch das *Molecular Docking* Programm FTDOCK (Gabb *et al.*, 1997) erzeugt. Das Programm nutzt einen geometrischen Oberflächenerkennungsalgorithmus (Katchalski-Katzir *et al.*, 1992) und eine elektrostatische Korrelationsfunktion, um die beiden Moleküle aufeinander zu *docken*. Während der Berechnungen repräsentierte die pFNR das fixe Molekül sowie das wesentlich kleinere sFd das mobile Molekül, wobei die relative Startorientierung der beiden Moleküle nicht im voraus festgelegt wurde. Die ersten zehn Lösungen zeigten abgehobene Werte für Oberflächenkomplementarität und günstige elektrostatische Wechselwirkungen. An einem Graphikdisplay wurde die relative Lage der beiden Proteine in diesen Komplexen überprüft. Nur eine der Lösungen wies eine vernünftige pFNR-sFd-Wechselwirkung entlang der vermeintlichen Fd-Bindungsstelle (Kap. 5.1.7.) auf. Dieser Komplex wurde mit dem Programm MULTIDOCK (Jackson *et al.*, 1998) verfeinert und energieminiert. Dabei wurden *rigid body* Bewegungen der komplexierenden Proteine und mögliche Konformationswechsel der Seitenketten im Komplexinterface berücksichtigt. Der finale Komplex minimierte in der Gesamtenergie von -200 kcal/mol zu -1047 kcal/mol, wobei die innere Energie der Seitenketten, die Energie der Seitenketten-Hauptketten-Wechselwirkungen, die Energie möglicher Seitenketten-Seitenketten-Wechselwirkungen, die Seitenketten-Gesamtenergie und die Wahrscheinlichkeit der Rotamerenbesetzung berücksichtigt wurde.

Strukturbeschreibung des pFNR/sFd Elektronentransferkomplexes

Die Gesamtstruktur des durch *Molecular Modeling* erzeugten pFNR-sFd-Elektronentransferkomplexes ist in Abbildung 5-21 gezeigt. Das redoxaktive Substrat sFd bindet innerhalb einer großen konkaven Vertiefung an der Oberfläche der Interdomänenregion der pFNR. Im Zentrum dieser Vertiefung liegt die redoxaktive prosthetische Gruppe FAD. Der [2Fe-2S]-Cluster des sFd befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Isoalloxazinring des FAD. Sein Zentrum liegt in direkter Verlängerung des FAD-Dimethylbenzenrings in der geometrischen Ebene, die durch den aromatischen Isoalloxazinring definiert wird. Der Abstand zwischen dem redoxaktiven Eisen-Schwefel-Cluster des sFd und dem Dimethylbenzenring des FAD - dem Teil des Cofaktors, an dem vermutlich die Elektronen von Fd auf FAD übertragen werden – beträgt 7,6 Å. Dieser Abstand scheint eine wirksame Elektronenübertragung zwischen den beiden elektronenaustauschenden Redoxzentren zu ermöglichen. In der Struktur der PDR (Correll *et al.*,

1992) – ein Enzym der FNR-Proteinfamilie, welches eine zusätzliche Ferredoxin-ähnliche Eisen-Schwefel-Domäne besitzt, die kovalent mit den beiden pFNR-ähnlichen Domänen verknüpft ist - befindet sich der [2Fe-2S]-Cluster etwa 7,4 Å vom Dimethylbenzenring der prosthetischen Gruppe FMN entfernt.

Der Aminosäurerest Tyr37* des sFd, der sich ganz in der Nähe des redoxaktiven Eisen-Schwefel-Clusters befindet, zeigt im *gemodelten* Elektronentransferkomplex unmittelbar ins aktive Zentrum der pFNR. Der aromatische Phenolring des Tyr37* ist nahezu parallel zum Isoalloxazinring des FAD ausgerichtet und zeigt in Richtung des C-terminalen pFNR-Restes Tyr362 (Abb. 5-22a). In dieser Position kann die Seitenkette des Restes Tyr37* eine schwache Wasserstoffbrückenbindung (OH-OER1; 3,8 Å) zu Glu360 der pFNR ausbilden und befindet sich in starkem van-der-Waals Kontakt zum Dimethylbenzenring des FAD. Tyr37* stellt den einzigen Rest des sFd dar, der unmittelbar mit Aminosäureresten des aktiven Zentrums der pFNR wechselwirkt. Im Protein-Protein-*Interface* des *gemodelten* Komplexes befinden sich hingegen zahlreiche Wechselwirkungen - hauptsächlich elektrostatischer und hydrophober Natur - zwischen Aminosäureresten beider Proteine. Die meisten der Protein-Protein-Wechselwirkungen

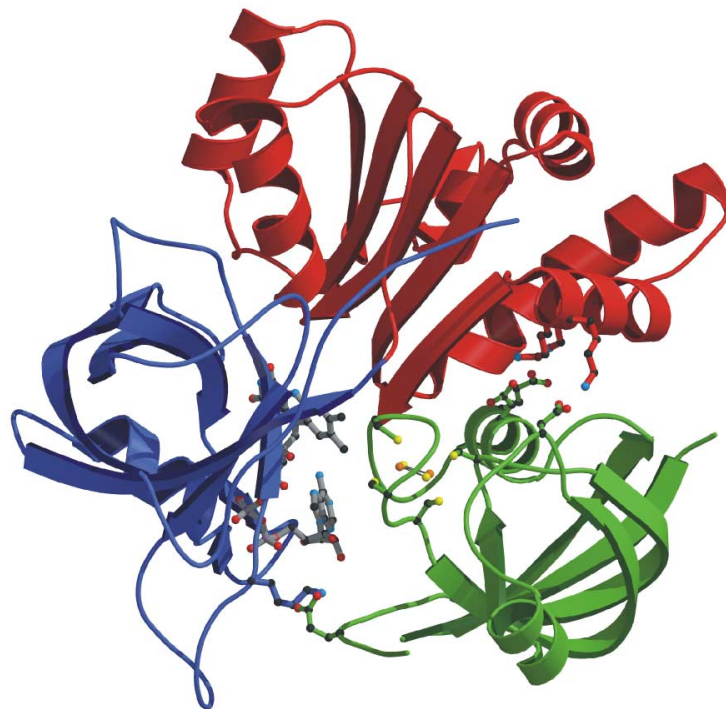


Abb. 5-21: Die Struktur des durch *Molecular Modeling* erzeugten pFNR-sFd-Komplexes. Die zwei Domänen der pFNR sind in blau (FAD-bindende Domäne) und rot (NADP⁺-bindende Domäne) dargestellt. Der pFNR-gebundene Cofaktor FAD ist in *ball und stick* Darstellung gezeigt. Das *gedockte* sFd ist in grün dargestellt, der [2Fe-2S]-Cluster und die koordinierenden Cysteinreste des sFd in der *ball and stick* Darstellung (S: gelb; Fe: orange). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur einige der Aminosäurereste eingezeichnet, die an der Komplexbildung beteiligt sind. Seitenketten sind eingezeichnet für folgende Reste: Lys139, Lys348, Lys352, Lys353, Glu93*, Glu30*, Asp26* und Asp60*. Die Abbildung wurde mit Molscrip (Kraulis, 1991) erstellt.

des Komplex*interfaces* werden zwischen Resten der NADP⁺-bindenden Domäne der pFNR und sFd ausgebildet. Nur wenige Aminosäurereste der FAD-bindenden Domäne sind in intermolekulare Wechselwirkungen zwischen pFNR und sFd verwickelt. Im folgenden konzentriert sich die Strukturbeschreibung des Komplex*interfaces* auf einige ausgewählte Protein-Protein-Wechselwirkungen. Lys139 der FAD-bindenden Domäne wechselwirkt mit dem Rest Glu93* (NZ-OE2; 2,6 Å), der sich am C-Terminus des sFd befindet. Die Reste Lys201, Lys348, Lys352 und Lys353 der NADP⁺-bindenden Domäne der pFNR gehen folgende Wechselwirkungen mit Resten des sFd ein: Lys201 wechselwirkt mit Ser43* (NZ-OG; 4,2 Å), Lys348 mit Glu30* (NZ-OE2; 2,4 Å), Lys352 mit Asp26* (NZ-OD1; 2,1 Å) und Lys353 mit Asp60* (NZ-OD2; 2,4 Å). Diese pFNR-Reste gehören den vier identifizierten, positiv geladenen Oberflächenbereichen der vermeintlichen Fd-Bindungsstelle an (Kap. 5.1.7.). Die sFd-Reste, die an Wechselwirkungen im Komplex*interface* beteiligt sind, lassen sich drei negativ geladenen Bereichen auf der Proteinoberfläche zuordnen. Zwei der negativ geladenen Bereiche (*Patch I**-*II**) befinden sich auf beiden Seiten des Eisen-Schwefel-Clusters. Sie wechselwirken mit Resten der NADP⁺-bindenden Domäne der pFNR. Der dritte Bereich (*Patch III**) befindet sich hingegen am C-Terminus des sFd und wechselwirkt mit Resten der FAD-bindenden Domäne der pFNR. Durch chemische Modifikationsexperimente (Jelesarow, *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1992a; Medina *et al.*, 1992b; Zanetti *et al.*, 1984), chemische *Cross-linking* Experimente (Zanetti *et al.*, 1988) und Mutagenesestudien (Hurley *et al.*, 1999; Aliverti *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1998) mit FNRs und Fds aus unterschiedlichen Organismen konnten eine Reihe von sauren Aminosäureresten an der Proteinoberfläche des Fd und von basischen Aminosäureresten an der Proteinoberfläche der FNR identifiziert werden, die möglicherweise an der Komplexbildung der beiden Proteine beteiligt sind. Diese identifizierten Aminosäurereste sind identisch mit den Resten der pFNR bzw. des sFd, die an den oben beschriebenen Protein-Protein-Wechselwirkungen im Komplex*interface* des gemodelten pFNR-sFd-Elektronentransferkomplexes beteiligt sind. Die Gesamtstruktur des pFNR-sFd-Komplexes ist demnach vollkommen übereinstimmend mit den Ergebnissen der biochemischen Studien, liefert hingegen detaillierte Aussagen über einzelne Protein-Protein-Wechselwirkungen im Komplex*interface*. Desweiteren bekräftigen die durchgeführten *Molecular Modeling* Studien den vorgeschlagenen FNR-Fd Bindungsmodus für die Komplexbildung zwischen FNR und Fd (Kap. 5.1.7.).

Die Gesamtstruktur des pFNR-sFd-Komplexes scheint augenscheinlich allen Anforderungen für einen effizienten Elektronentransfer zwischen den beiden Proteinen zu entsprechen. Eine Überlagerung der Strukturmodelle des gemodelten pFNR-sFd-Komplexes und der PDR (Correll

et al., 1992) zeigt keine größeren strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Domänen der pFNR und dem *two domain* Motiv der PDR. Die Orientierung des komplexierten sFd und der Ferredoxin-ähnlichen dritten Domäne der PDR sind hingegen nicht identisch, obwohl die Positionen ihrer beiden Eisen-Schwefel-Cluster sind nahezu gleich sind. Die Überlagerung der Strukturen zeigt, daß das komplexierte sFd im Vergleich zur Ferredoxin-ähnlichen Domäne der PDR um etwa 90° verdreht angeordnet ist (Drehung um eine Achse durch die Eisen-Schwefel-Zentren). Eine PDR-ähnliche Rotation des komplexierten sFd würde sich jedoch mit den Ergebnisse der biochemischen Experimente (Jelesarow, *et al.*, 1993; Medina *et al.*, 1992a; Medina *et al.*, 1992b; Zanetti *et al.*, 1984; Zanetti *et al.*, 1988; Hurley *et al.*, 1999; Aliverti *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1998) nicht mehr decken.

5.1.9.2. Bindungsstelle für NADP⁺

Die Kristallstrukturen der pFNR und der FNR aus Spinat (Bruns *et al.*, 1995) zeigten keine Bindung des Substrates NADP⁺. In der Struktur der FNR aus *Anabaena* PCC 7119 (Serre *et al.*, 1996) konnte der 2'-P-AMP-Anteil des NADP⁺ in der Dichte lokalisiert werden. Der für die Elektronenübertragung wichtige Nicotinamidanteil zeigte hingegen ins umgebende Solvent und wies nicht die für die Elektronenübertragung nötige aromatische π - π -Wechselwirkung mit dem Isoalloxazinring des FAD auf. Die Bindung des 2'-P-AMP-Anteils des NADP⁺ erfolgte über direkte bzw. Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals Kontakte und aromatische π - π -Wechselwirkungen. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der pFNR und der FNR aus *Anabaena* PCC 7119 konnten die Reste in pFNR identifiziert werden, die für die Bindung des 2'-P-AMP-Anteils des NADP⁺ verantwortlich sind. Daraus wurde ein Modell für die Bindung des 2'-P-AMP-Anteils des NADP⁺ an pFNR abgeleitet: Der Adeninring bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Rest Gln296 aus und geht eine aromatische π - π -Wechselwirkung mit der aromatischen Seitenkette des Restes Tyr294 ein. Die 2'-Phosphatgruppe wechselwirkt mit den Aminosäureresten Ser282, Arg283, Arg292, Tyr294, während die 5'-Phosphorylgruppe des Adenin eine Wasserstoffbrückenbindung zu Lys164 ausbildet.

Die Kristallstrukturen der FNR-Mutanten Y308S und Y308W aus dem Organismus Erbse im Komplex mit NADP⁺ und NADPH offenbarten im Jahre 1999 erstmals einen produktiven NADP⁺-Bindungsmodus (Deng *et al.*, 1999). Bei den untersuchten FNR-Mutanten war der hoch konservierte C-terminale Aminosäurerest Tyrosin durch Serin bzw. Tryptophan ersetzt worden. In beiden Kristallstrukturen ist der Nicotinamidring des redoxaktiven Substrates NADP⁺ in einem Winkel von ca. 30° gegen den Isoalloxazinring des FAD verkippt angeordnet und nimmt den

selben Platz ein, wie die aromatische Seitenkette des C-terminalen Tyrosinrestes im nativen Enzym. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen der pFNR und der FNR aus Erbse konnten wiederum die Reste in pFNR identifiziert werden, die für die Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ verantwortlich sind. Es konnte ein Modell für die Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ an pFNR abgeleitet werden: Der Nicotinamidring des NADP⁺ bindet mit seiner A-Seite direkt gegenüber der *pro-re*-Seite des zentralen Ringes des Isoalloxazins des FAD. Die beiden Ringsysteme sind in einem Winkel von ca. 30° zueinander verkippt angeordnet, wobei das an der Hydridübertragung beteiligte Kohlenstoffatom C4 des Nicotinamidrings dem Isoalloxazinring am nächsten kommt. Diese Anordnung der Ringsysteme ist für die Stereochemie der Hydridübertragung folgerichtig. Die Seitenketten der Reste Ser144 und Glu360 bilden Wasserstoffbrückenbindungen zur Carboxamidgruppe des Nicotinamidrings aus. Die Sulfhydrylgruppe des hoch konservierten Restes Cys320 ist auf der B-Seite des Nicotinamidrings in van-der-Waals Kontakt mit dem Atom C4 des NADP⁺. Die Phosphatgruppe des Nicotinamidanteils des NADP⁺ wechselwirkt mit den Resten Thr220 und Lys164, während die Ribose des Nicotinamidanteils keine direkten Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der pFNR eingeht. Die Bindung des 2'-P-AMP-Anteils des NADP⁺ ist konserviert und entspricht der von Serre und Mitarbeitern (Serre *et al.*, 1998; siehe oben) beschriebenen.

In den Kristallstrukturen der beiden FNR-Mutanten aus Erbse nehmen die Seitenketten der „neuen“ C-terminalen Aminosäurereste eine andere Orientierung ein, als die C-terminale Tyrosinseitenkette im nativen Enzym. Aufgrund der für die produktive Bindung des Substrates NADP⁺ notwendigen Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette, zeigten keine der vorhergehenden strukturellen Untersuchungen an FNRs aus verschiedenen Organismen (Karplus *et al.*, 1991; Bruns *et al.*, 1995; Serre *et al.*, 1996; pFNR) eine produktive NADP⁺-Bindung. Der Energieaufwand, der für die Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette benötigt wird, überwiegt offenbar den Energiegewinn, der durch die Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ entsteht. Das Substrat NADP⁺ scheint zunächst über seinen 2'-P-AMP-Anteil an die FNR zu binden, während der Nicotinamidanteil des NADP⁺ ins umgebende Solvent ragt. Erst nach erfolgter Verdrängung der Seitenkette des C-terminalen Tyrosins kann die produktive Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ erfolgen. Drei mögliche Mechanismen sind daher für eine produktive NADP⁺-Bindung vorstellbar: Der erste mögliche Mechanismus schließt die Bindung des redoxaktiven Substrates Fd mit ein. Durch die Komplexbildung zwischen FNR und Fd entsteht innerhalb des Komplex*interfaces* eine energetisch günstige Umgebung für die Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette. Der Verdrängung folgt die produktive

Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺. Die NADP⁺-Bindung erfolgt hierbei über einen geordneten sequentiellen Mechanismus, bei dem die Bindung des Redoxpartners Fd an FNR die Bindungs-affinität für NADP⁺ erhöht.

Dem zweiten vorstellbaren Mechanismus einer produktiven NADP⁺-Bindung geht eine Elektronenübertragung zwischen FNR und Fd voraus. Der Isoalloxazinring des dabei entstehenden reduzierten FADH₂ besitzt in der Umgebung des Stickstoffatoms N5 eine in Richtung des C-terminalen Tyrosinrestes gekippte Konformation. Der erhöhte Platzbedarf des reduzierten FADH₂ erzwingt die Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette, worauf eine produktive Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ erfolgen kann. Diesem zweiten vorgeschlagenen Mechanismus liegt ein klassischer Ping-Pong Mechanismus zugrunde.

Eine dritte vorstellbare Möglichkeit wäre, daß sowohl die Komplexbildung zwischen FNR und Fd, als auch die durch die Elektronenübertragung zwischen beiden Molekülen entstandene gekippte Konformation des reduzierten FADH₂ die produktive NADP⁺-Bindung ermöglichen. Die gekippte Konformation des Isoalloxazinrings erzwingt die Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette, die nun innerhalb des FNR-Fd-Komplex*interfaces* eine neue, energetisch günstige Umgebung erhält. Dieser dritte vorgeschlagene Bindungsmodus verläuft über einen geordneten sequentiellen Mechanismus, bei dem sowohl die FNR-Fd-Komplexbildung als auch der Redoxzustand der prosthetischen Gruppe FAD die Affinität der FNR für NADP⁺ erhöhen.

5.1.10. Der Elektronentransferkomplex zwischen pFNR, sFd und NADP⁺

Molecular Modeling

In dieser Arbeit wurde durch *Molecular Modeling* ein Strukturmodell des Gesamtelektronentransferkomplexes, bestehend aus der pFNR und den beiden Substraten Fd sowie NADP⁺, erzeugt. Der bereits *gemodelte* pFNR-sFd-Komplex diente als Ausgangspunkt der *Molecular Modeling* Studien. Um die Struktur und die Konformation des FNR-gebundenen NADP⁺ entsprechend des von Deng und Mitarbeitern beschriebenen Bindungsmodus zu erhalten, wurden die Kristallstrukturen der pFNR und des NADP⁺-(Y308S)FNR-Komplexes aus Erbse (Deng *et al.*, 1999) überlagert und das NADP⁺ ins aktive Zentrum des *gemodelten* pFNR-sFd-Komplexes positioniert. Da der Nicotinamidring nun – entsprechend dem produktiven Bindungsmodus - die Position der C-terminalen Tyrosinseitenkette einnahm, wurden mit Hilfe des Programmes O (Jones *et al.*, 1991) am Graphikdisplay neue mögliche Orientierungen für die Seitenkette des C-terminalen Restes Tyr362 gebaut. Vier sinnvolle Positionen sind für die Seitenkette von Tyr362

sterisch zugänglich. In Position I zeigt die Seitenkette nach ihrer Verdrängung in die Spalte zwischen dem Adeninanteil des gebundenen FAD-Cofaktors und dem komplexierten sFd. In dieser Orientierung ist der Phenolring von Tyr362 dem umgebenden Solvent vollständig ausgesetzt (Abb. 5-22a). In Position II ragt die aromatische Seitenkette von Tyr362 in eine überwiegend hydrophobe Tasche an der Proteinoberfläche des komplexierten sFd und wird von hydrophoben sFd-Resten stabilisiert. Die hydrophobe Tasche wird durch die Reste Leu35*, Ile33*, Gly32*, Ala28* und Val74* gebildet und befindet sich unterhalb des Restes Tyr37* (Abb. 5-22a). In Position III befindet sich die Seitenkette von Tyr362 zwischen dem Phenolring von Tyr37* und dem Isoalloxazinring des FAD und wird von beiden Ringsystemen durch die Ausbildung aromatischer π - π -Wechselwirkungen stabilisiert (Abb. 5-22a). In Position IV zeigt die Seitenkette des verdrängten Restes Tyr362 in die Spalte zwischen dem Ribitylanteil des gebundenen FAD und dem komplexierten sFd (Abb. 5-22a).

Die mit Hilfe des Programmes O (Jones *et al.*, 1991) am Graphikdisplay erzeugten vier pFNR-sFd-NADP⁺-Elektronentransferkomplexe (Tyr362-Position I-IV \Rightarrow ternärer Komplex I-IV) wurden mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert und energieminiert. Dabei wurden *rigid body* Bewegungen der komplexierenden Proteine und mögliche Konformationswechsel der Seitenketten im Komplexinterface berücksichtigt. Die vier ternären Komplexe minimierten in der Summe ihrer Gesamtenergie sehr ähnlich, begleitend traten kleine strukturelle Umordnungen innerhalb der Komplexe auf. Allen vier Strukturmodellen liegt die Annahme zugrunde, daß die produktive NADP⁺-Bindung einem geordneten sequentiellen Mechanismus folgt. Ausgehend von diesem Mechanismus wird zunächst der Komplex zwischen pFNR und dem Substrat sFd gebildet, bevor eine produktive Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ und die dafür nötige Verdrängung der C-terminalen Tyrosinseitenkette erfolgen kann.

Strukturbeschreibung

Durch *Molecular Modeling* wurden vier ternäre pFNR-sFd-NADP⁺-Komplexe (Komplexe I-IV) erzeugt, in denen die Seitenkette von Tyr362 nach ihrer Verdrängung durch NADP⁺ eine neue Orientierung einnimmt. In den *gemodelten* ternären Komplexen II (Abb. 5-22b) und IV (Abb. 5-22c) nimmt die Seitenkette von Tyr362 nach ihrer Verdrängung eine energetisch günstige Position ein, in der sie durch Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert wird. Im Gegensatz dazu befindet sich die Seitenkette von Tyr362 in den *gemodelten* ternären Komplexen I und III in einer energetisch ungünstigen Positionen.

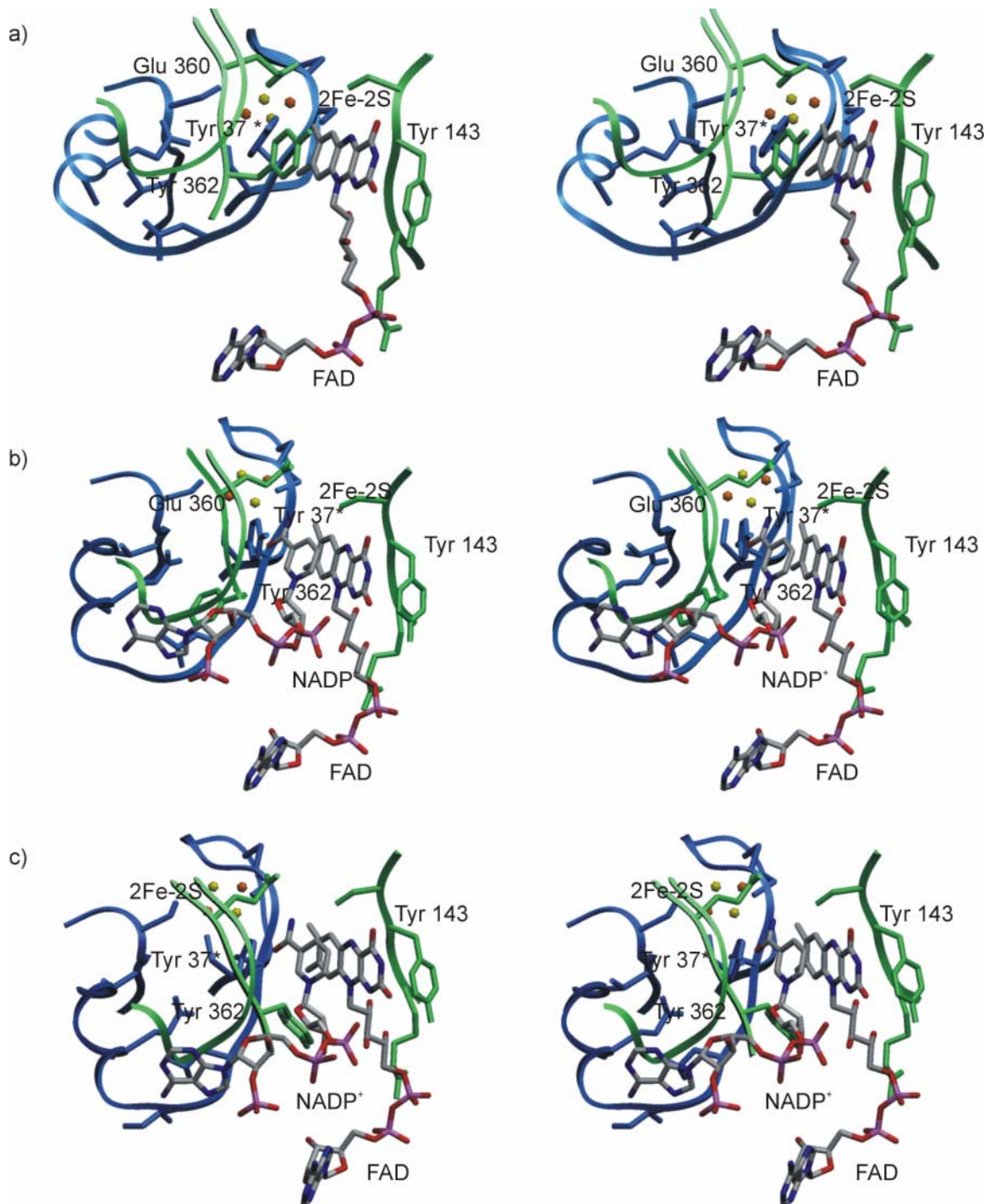


Abb. 5-22: Aktives Zentrum der *gemodelten* Elektronentransferkomplexe zwischen pFNR und sFd sowie pFNR, sFd und NADP⁺. Das Modell der pFNR ist in grün und das Modell des sFd in blau dargestellt. Der pFNR-gebundene Cofaktor FAD und der sFd-gebundene Cofaktor [2Fe-2S] sind in *ball and stick* Darstellung gezeigt. a) Stereoabbildung des aktiven Zentrums der Elektronenübertragung im *gemodelten* pFNR-sFd-Komplex. b) und c) Stereoabbildungen des aktiven Zentrums der pFNR-sFd-NADP⁺-Komplexe II und IV mit neuen, sterisch zugänglichen Orientierungen der Seitenkette des C-terminalen Restes Tyr362. Diese Abbildungen wurden mit SETOR (Evans, 1993) erstellt.

Im energetisch ungünstigen ternären Komplex III, bei dem die Ausgangsposition der Tyrosinseitenkette zwischen den Ringsystemen von Tyr37* und FAD lokalisiert war, wandert die Seitenkette während der Energieminimierung in die Spalte zwischen dem Ribitylanteil des FAD

und dem komplexierten sFd und nimmt nach der Energieminimierung die gleiche Position ein wie im *gemodelten*, energetisch günstigen Komplex IV (Abb. 5-22c). Im energetisch ungünstigen ternären Komplex I zeigt die Seitenkette nach ihrer Verdrängung in die Spalte zwischen dem Adeninanteil des FAD und dem komplexierten sFd und hat Kontakt zum umgebenden Solvent. In dieser Position kann die hauptsächlich hydrophobe Seitenkette von Tyr362 nur sehr schlecht stabilisiert werden.

Im Gegensatz dazu ist die Seitenkette des Restes Tyr362 im *gemodelten*, energetisch günstigen ternären Komplex II (Abb. 5-22b) tief in der hydrophoben Tasche an der Proteinoberfläche des komplexierten sFd verborgen. Die Seitenkette wird in dieser Orientierung durch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Tasche stabilisiert. Die Carboxylgruppe des C-terminalen Restes Tyr362 zeigt nach der Verdrängung in Richtung des Ribitylanteils des gebundenen Substrates NADP⁺. In dieser Position kann die Carboxylgruppe von Tyr362 eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer der Hydroxylgruppen des Ribitylanteils des NADP⁺ ausbilden (O-OH9; 3,1 Å). Zusätzlich wird das produktiv gebundene NADP⁺ durch den Rest Tyr37* des komplexierten sFd stabilisiert, der zwei starke Wechselwirkungen zur Nicotinamidgruppe des NADP⁺ ausbildet (OH-O; 2,6 Å und OH-NH2; 3,5 Å). Ähnliche stabilisierende Wechselwirkungen zwischen dem sFd-Rest Tyr37* und dem gebundenen NADP⁺ treten auch in dem *gemodelten* ternären Komplex IV (Abb. 5-22c) auf. Außerdem kann die C-terminale Carboxylgruppe von Tyr362 nach ihrer Verdrängung eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zu einer der Hydroxylgruppen des Ribitylanteils des gebundenen NADP⁺ ausbilden (O-OH; 3,5 Å). Die Seitenkette des Restes zeigt in die Spalte zwischen dem Ribitylanteil des gebundenen FAD und dem komplexierten sFd und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum sFd-Rest Asp34* (OH-OD1; 3,8 Å) aus.

Die Strukturmodelle der *gemodelten* energetisch günstigen ternären Komplexe II und IV unterstützen die Annahme eines geordneten sequentiellen Mechanismus für die produktive Bindung des Substrates NADP⁺. Ausgehend von den *Molecular Modeling* Studien wurde folgender möglicher Mechanismus für die produktive NADP⁺-Bindung vorgeschlagen (Abb. 5-23). Zunächst bindet das Substrat NADP⁺ über seinen 2'-P-AMP-Anteil an die unkomplexierte FNR, wobei der Nicotinamidanteil ins Solvent ragt. Im ersten Schritt dieser geordneten sequentiellen Reaktion bindet Fd entsprechend dem im Kapitel 5.1.7. beschriebenen Bindungsmodus an die FNR. Dadurch entsteht im Komplexinterface eine energetisch günstige Umgebung für die Verdrängung des Restes Tyr362 und die Affinität der FNR für die produktive Bindung des NADP⁺ wird erhöht. Im zweiten Schritt des Reaktionsmechanismus bindet nun der

Nicotinamidanteil des NADP⁺ an die FNR. Der Energiegewinn, der durch die Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺, durch die Bildung einer energetisch günstigen, neuen Umgebung für die C-terminale Tyrosinseitenkette im pFNR-sFd-Komplexinterface sowie durch die zusätzliche Stabilisierung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ durch Tyr37* des komplexierten sFd entsteht, reicht aus, um den Energieaufwand zu kompensieren, der durch die Verdrängung des C-terminalen Tyrosins benötigt wird. Ob es vor der produktiven Bindung des Nicotinamidanteils des NADP⁺ zur Elektronenübertragung zwischen dem [2Fe-2S]-Cluster des Fd und dem FAD kommt, kann anhand der Ergebnisse der *Molecular Modeling* Studien nicht entschieden werden. Die gekippte Ringkonformation des reduzierten FADH₂ würde die Verdrängung des C-terminalen Tyrosins jedoch zusätzlich begünstigen.

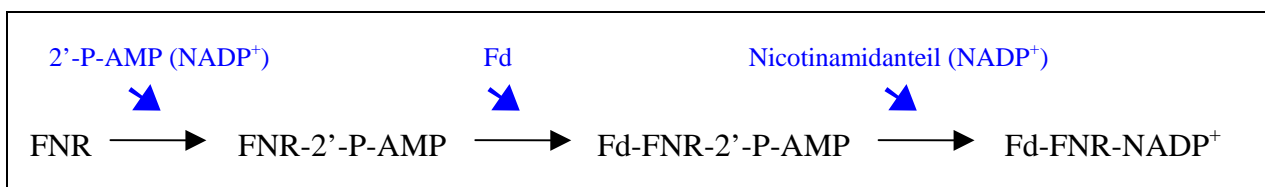


Abb. 5-23: Übersicht über den vorgeschlagenen sequentiellen Mechanismus der produktiven NADP⁺-Bindung.

5.1.11. Der Elektronentransferweg zwischen Fd und FAD

Die durchgeführten *Molecular Modeling* Studien offenbaren eine potentielle Orientierung der beiden Redoxpartner pFNR und sFd im Elektronentransferkomplex und deuten einen möglichen Elektronentransferweg für die Elektronenübertragung zwischen dem Eisen-Schwefel-Cluster des sFd und dem Isoalloxazinring des pFNR-gebundenen FAD an.

Die Elektronenübertragungsrates sowie der Weg der Elektronen innerhalb eines Proteinkomplexes wird durch den Abstand, die Lage und die Umgebung der Redoxkomponenten kontrolliert (Marcus *et al.*, 1985). Es ist generell akzeptiert, daß der Hauptweg einer Elektronenübertragung über längere Distanzen – wie dies zum Beispiel häufig in Proteinen oder Proteinkomplexen der Fall ist – entlang einer Kette kovalent gebundener Atome verläuft. Sind aromatische Aminosäurereste in geeigneter Position zu den beiden Redoxzentren angeordnet, können diese die Elektronenübertragung durch das Proteinmedium verstärken. Sie erreichen eine wirkungsvollere Kupplung durch ihre ausgedehnten π^* -Orbitale, da die Energiespalte zwischen

dem tunnelnden Elektron und dem π -Orbitalsystem bedeutend kleiner ist als die Energiespalte zwischen dem tunnelnden Elektron und den σ -Orbitalen (Marcus *et al.*, 1985).

Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Position von Tyr37* in dem *gemodelten* pFNR-sFd Elektronentransferkomplex (Kap 5.1.10.) die Wechselwirkung zwischen dem Eisen-Schwefel-Cluster des sFd und dem Isoalloxazinring des pFNR-gebundenen FAD verstärkt. Der Phenolring des Restes Tyr37* steht in starkem van-der-Waals Kontakt zum Dimethylbenzenring des FAD ($\sim 2,4-3,1$ Å). Die Orientierung der beiden aromatischen Ringsysteme erlaubt eine elektronische Überlappung ihrer π -Orbitale und ermöglicht das Tunneln des zu übertragenden Elektrons durch die aromatischen Ringsysteme von Tyr37* und FAD. Anhand der Struktur des *gemodelten* pFNR-sFd-Komplexes läßt sich nun folgender Elektronenübertragungsweg innerhalb des Proteinkomplexes ableiten (Abb. 5-24): Beginnend am Eisen-Schwefel-Cluster des sFd überträgt eines der beiden Fe³⁺-Atome sein Elektron auf das Schwefelatom der Seitenkette der koordinierenden Aminosäure Cys39*. Von dort aus tunnelt das Elektron durch die σ -

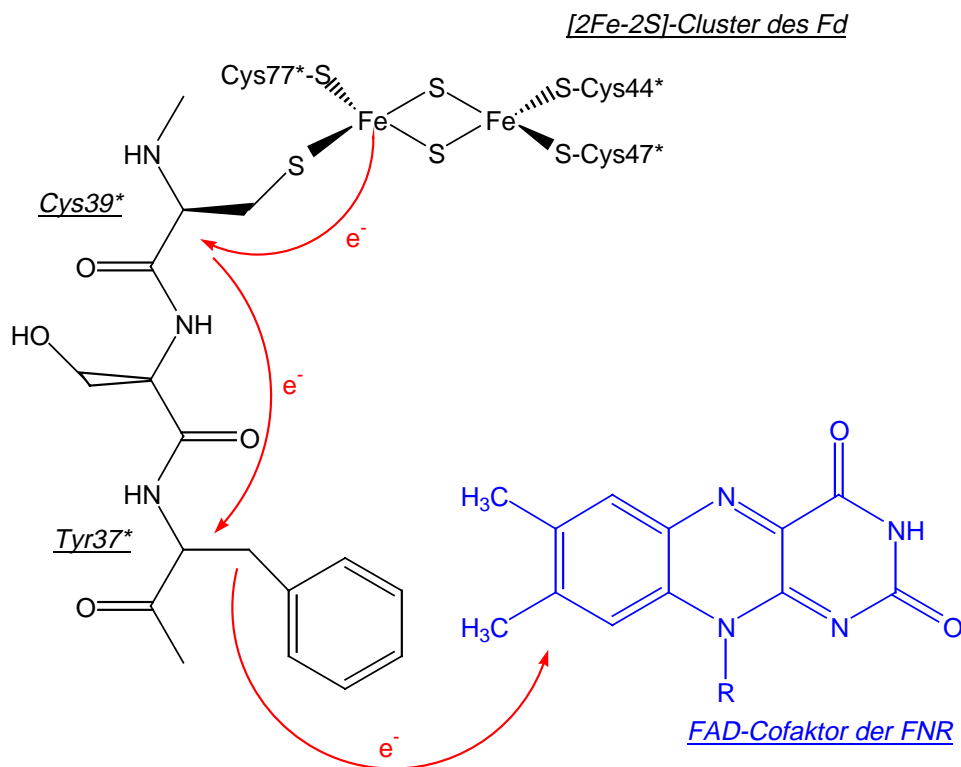


Abb. 5-24: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Elektronenübertragungsweges im pFNR-sFd-Komplex. Die Aminosäuren des sFd und dessen prosthetische Gruppe sind in schwarz, die des pFNR in blau dargestellt. Der Elektronenübertragungsweg ist in rot angezeigt.

Bindungsorbitale entlang der Peptidkette zum aromatischen π -System des Restes Tyr37*. Der

van-der-Waals Kontakt zwischen dem aromatischen Ringsystem von Tyr37* und dem Isoalloxazinring des FAD ermöglicht eine elektronische Überlappung der beiden π -Orbitalsysteme. Dadurch kann das zu übertragende Elektron vom aromatischen Phenolring des sFd-Restes Tyr37* direkt zum Isoalloxazinring – der Endstation der Elektronenübertragung zwischen dem Eisen-Schwefel-Cluster und dem pFNR-gebundenen FAD – tunneln. In anderen, von der Evolution zur effektiven Elektronenübertragung ausgewählten Systemen, wurden aromatische Aminosäurereste in ähnlichen Positionen gefunden. Beispiele hierfür sind die Tryptophan-vermittelte Reduktion des Quinon im photosynthetischen Reaktionszentrum (Deisenhofer *et al.*, 1985; Plato *et al.*, 1989) und das MADH/Amicyanin System, bei dem ein Tryptophanrest im *Interface* der beiden Proteine angeordnet ist (Chen *et al.*, 1994).

5.2. Teil II: Untereinheiten des 26S-Proteasoms

5.2.1. Klonierungs- und Expressionsversuche

5.2.1.1. Klonierung und Expression der 19S-ATPasen aus Hefe

Um eine induzierbare und stark rekombinante Expression der 19S-ATPasen YTA1, YTA2, YTA3, YTA5 und SUG1 sicherzustellen, wurden die entsprechenden cDNAs in unterschiedliche T7 Polymerase/Promoter-Systeme (*pRSET6c*, *pET22b(+)*, *pGEX-4T-2* und *pMAL-c2*) und in ein T5 Polymerase/Promoter-System (*pQE9*) einkloniert. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden sequenziert, um zufällige Mutationen auszuschließen. Eine Übersicht über die verwendeten 19S-ATPase-Expressionssysteme und die rekombinant erzeugten Proteine gibt Tabelle 3-1. Die Expression der mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformierten *E. coli* BL21/DE3 Zellen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kap. 4.3.1.3.). In allen Fällen führte die Proteinexpression bei einer Kultivierungstemperatur von 37°C zur Bildung von Einschlusskörperchen, in denen das exprimierte Protein in denaturierter Form gelagert wurde. Im Cytoplasma konnte nach Zellaufschluß keine merkliche ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. Ein SDS-Polyacrylamid-Gel der Cytoplasmafraktion zeigte zudem keine Proteinbande im Molekulargewichtsbereich der exprimierten ATPase. Eine Erniedrigung der Kultivierungstemperatur auf bis zu 20°C sowie veränderte Expressionsbedingungen (Variation des Induktionszeitpunktes, der IPTG-Konzentration und der Zusätze zum Medium) konnten die Menge an aktivem, ins Cytoplasma überexprimiertem Protein nicht steigern.

Um die Bildung von Einschlusskörperchen zu verhindern, wurde ein eukaryontisches Expressionssystem entwickelt. Dazu wurde die cDNA der ATPase YTA3 durch PCR amplifiziert und über die *BamHI*- und *EcoRI*-Klonierungsstellen in den Vektor *pYEX-4T-1* einkloniert. Die Expression der mit dem Plasmid *pYEX-4T-1-YTA3* transformierten *Saccharomyces cerevisiae* DY150-Zellen wurde wie in Kap 4.4.2.2. beschrieben durchgeführt. Trotz Variation der Expressionsbedingungen konnte nach Zellaufschluß kein überexprimiertes Fusionsprotein GST-YTA3 im Cytoplasma nachgewiesen werden.

5.2.1.2. Klonierung und Expression des humanen S2

Das Plasmid *pGEX-2T-S2* wurde von Carlos Gorbea (University of Utah, Department of Biochemistry, School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA) erhalten. Das humane *s2*-Gen

steht in diesem Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promoters und wird als Fusionsprotein mit N-terminaler GST-Markierung und anschließender Thrombin-Schnittstelle synthetisiert. Um ein GST-markiertes Fusionsprotein mit Faktor Xa-Schnittstelle zu erhalten, wurde das humane *s2*-Gen in den Expressionsvektor *pGEX-5X-1* umkloniert. Dazu wurde das Expressionsplasmid *pGEX-2T-S2* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* verdaut und über die *EcoRI*- und *BamHI*-Klonierungsstellen in den Vektor *pGEX-5X-1* einkloniert. Das erhaltene Expressionsplasmid *pGEX-5X-1-S2* wurde sequenziert, um eine erfolgreiche Klonierung sicherzustellen und zufällige Mutationen auszuschließen.

Die Expression der mit dem Plasmid *pGEX-2T-S2* bzw. *pGEX-5X-1-S2* transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt (Kap. 4.3.1.3.). Das Fusionsprotein GST-S2 wurde in aktiver Form ins Cytoplasma überexprimiert. Es wurde eine Abhängigkeit der Expressionsrate von der Kultivierungstemperatur festgestellt. Mit abnehmender Kultivierungstemperatur stieg die Expressionsrate der Zellen, die bei RT ihr Maximum erreichte. Zusätzlich konnte die Expressionsrate gesteigert werden, indem dem Medium zum Zeitpunkt des Animpfens und der Induktion 0,5 µg/ml ATP zugefügt und die Proteinexpression erst weit nach Abschluß der logarithmischen Phase induziert wurde. Die erhöhte Zellbiomasse zum Induktionszeitpunkt ermöglichte eine größere Ausbeute an exprimiertem GST-S2.

5.2.2. Proteinpräparation

5.2.2.1. Präparation der 19S-ATPasen aus Hefe

Die rekombinanten 19S-ATPasen wurde alle – ob als natives Protein (YTA1, YTA2, YTA3) oder Fusionsprotein (GST-YTA1, GST-YTA5, MBP-SUG1) – aus Einschlußkörperchen rückgefaltet und aufgereinigt. Die Isolierung der denaturierten Proteine aus den Einschlußkörperchen und deren Rückfaltung wurde wie in Kapitel 4.5.4. beschrieben durchgeführt. Es sollten Reinigungsprotokolle für die einzelnen rekombinanten, rückgefalteten Proteine entwickelt werden. Allerdings konnte durch die Anwendung unterschiedlicher Chromatographiemethoden keine weitere Aufreinigung der Proteine erreicht werden. Abb. 5-25 zeigt SDS-Polyacrylamid-Gele der rekombinanten Proteine YTA2, YTA3, GST-YTA1, GST-YTA5 und MBG-SUG1. Die rückgefalteten ATPasen sind weitestgehend homogen und zeigen im SDS-Polyacrylamid-Gel eine scharfe Bande.

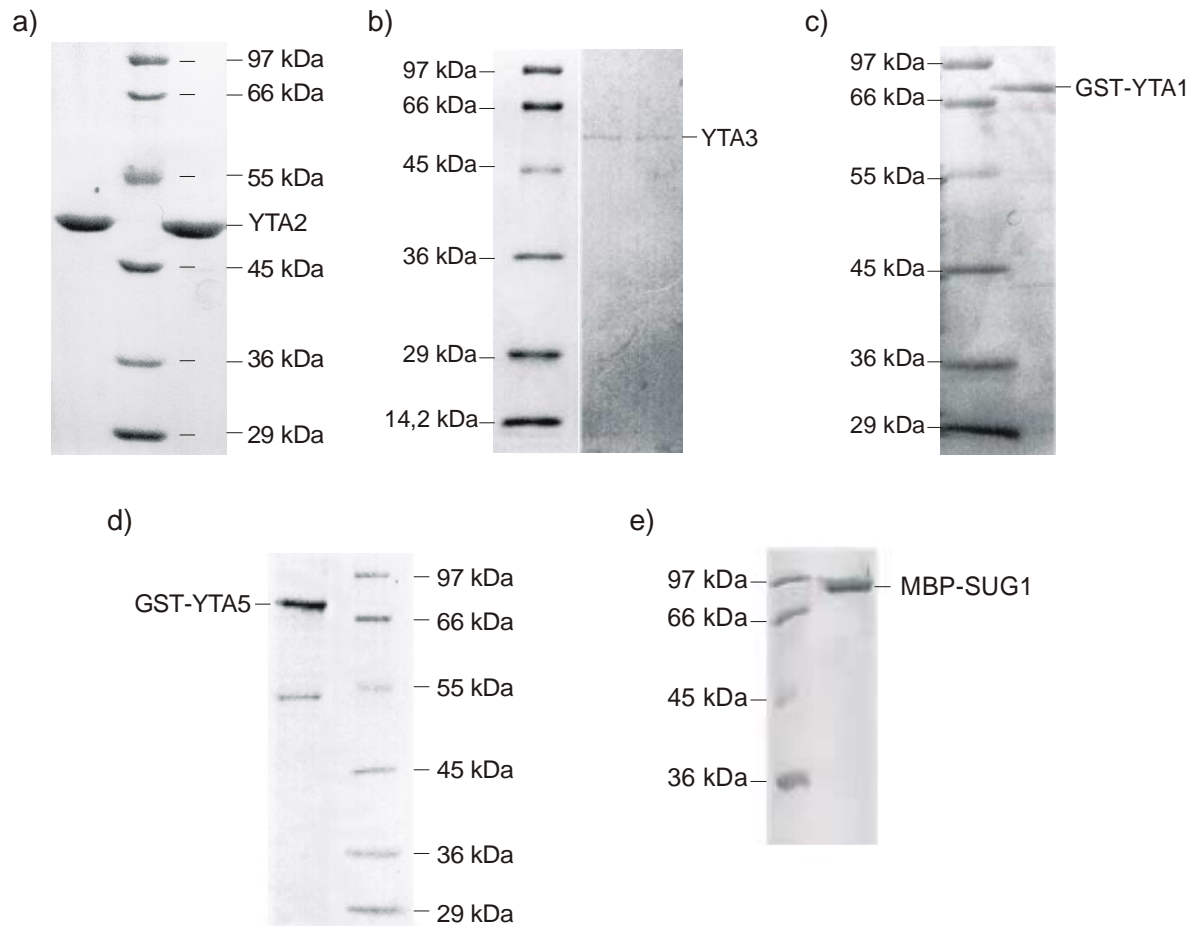


Abb. 5-25: SDS-Polyacrylamid-Gele der rückgefalteten 19S-ATPasen. a) Rückgefaltetes YTA2. b) Rückgefaltetes YTA3. c) Rückgefaltetes Fusionsprotein GST-YTA1. d) Rückgefaltetes Fusionsprotein GST-YTA5. e) Rückgefaltetes Fusionsprotein MBP-SUG1.

5.2.2.2. Präparation des humanen S2 als Fusionsprotein GST-S2

Das Protein S2 wurde in *E. coli* als GST-markiertes Fusionsprotein GST-S2 exprimiert. GST-S2 setzt sich aus dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (ca. 25,5 kDa) zusammen, welches durch einen kurzen Aminosäurelinker mit dem N-Terminus des humanen S2 (ca. 100 kDa) verknüpft ist. Innerhalb des Peptidlinkers befindet sich eine Thrombin- (*pGEX-2T-S2*) bzw. eine Faktor Xa-Schnittstelle (*pGEX-5X-1-S2*). Die nach der Proteinexpression geernteten und bei -20°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Der Bakterienaufschluß erfolgte wie in Kapitel 4.5.5.3. beschrieben durch Ultraschallbehandlung. Ein Präparationsprotokoll zur Reinigung des rekombinanten GST-S2 wurde entwickelt. Eine schematische Übersicht über den kompletten Verlauf der GST-S2 Präparation zeigt Abbildung 5-26. Als ersten Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4b wie im Methodenteil beschrieben (Kap. 4.5.5.3.) durchgeführt. Durch Stoßelution wurde das

GST-S2 bei einer Konzentration von 30 mM reduziertem Glutathion von der Chromatographiematrix eluiert. Die einzelnen Chromatographieschritte wurden mittels SDS-PAGE überwacht (Abb. 5-27). Durch die Affinitätschromatographie konnte ein Großteil der verunreinigenden Proteine abgetrennt werden. Das eluierte GST-S2 lag jedoch noch nicht in homogener Form vor. Da der pI des Fusionsproteins GST-S2 zu 5,15 berechnet wurde, wurde als nächster Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie an Mono Q durchgeführt. Die IEC wurde wie in Kapitel 4.5.5.3. beschrieben an einer ÄKTA-Chromatographiestation durchgeführt. Das Chromatogramm der IEC ist in Abbildung 5-28 gezeigt. Wurde das gesamte Protein einer

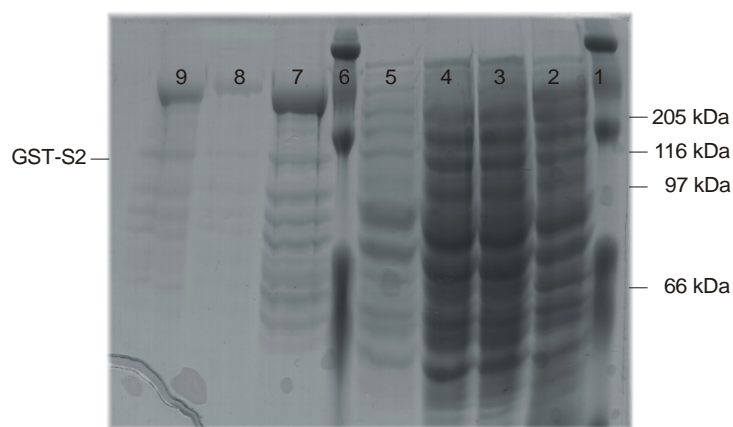


Abb. 5-27: SDS-Polyacrylamid-Gel der Glutathion-Sepharose 4B-Chromatographie. 1, 6: Proteinlängenstandard; 2: *E. coli* Zellen nach Zellernte; 3: Cytoplasmafraktion; 4: Durchlauf; 5: Waschfraktion; 7: Elutionsfraktion I, 8: Elutionsfraktion II; 9: Chromatographiematerial.

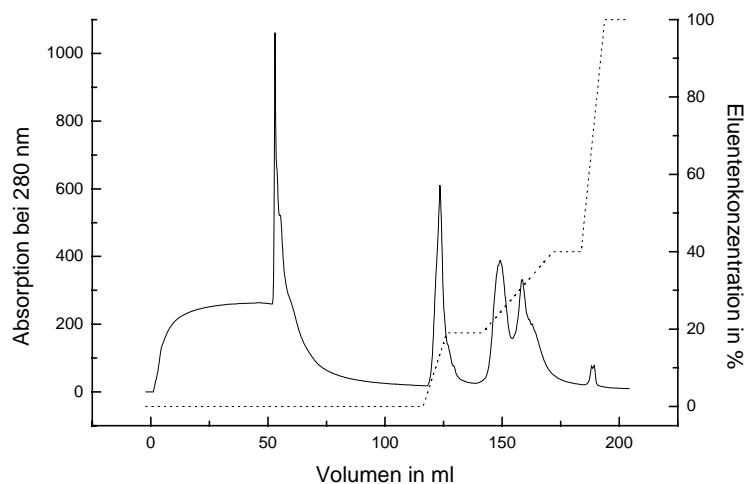


Abb. 5-28: Chromatogramm der Mono Q-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die Konzentration des Eluenten ist als gepunktete Linie dargestellt.

Präparation in einem Schritt auf die Mono Q-Säule aufgetragen, so konnten im Durchlauf und der Waschfraktion größere Mengen an GST-S2 detektiert werden. Um die Bindungskapazität der Mono Q-Säule nicht zu überschreiten, wurde die Proteinlösung einer Präparation in 2-3 Portionen unterteilt und getrennt einer IEC an Mono Q unterzogen. GST-S2 eluierte in einem linearen Salzgradienten zwischen 340 und 490 mM NaCl. Dieser breite Elutionsbereich des GST-S2 erstreckte sich über zwei getrennt Peaks: IEC-Peak I von 340-370 mM NaCl und IEC-Peak II von 370-490 mM NaCl (Abb. 5-28). Die GST-S2-enthaltenden Fraktionen der beiden Elutionspeaks wurden getrennt gepoolt und durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Je eine Probe der ankonzentrierten Proteinlösungen wurde mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. So konnte gezeigt werden, daß GST-S2 in den Fraktionen, die sich über IEC-Peak I erstrecken weitgehend als Monomer und in den Fraktionen die sich über IEC-Peak II erstrecken weitgehend als Oligomer vorliegt. GST-S2 lag nach der IEC an Mono Q noch nicht in homogener Form vor.

Um den Reinheitsgrad des Proteins weiter zu erhöhen, wurde eine Gelpermeationschromatographie an Superose 6 vorgenommen. Das Chromatographiematerial weist einen Trennbereich von 5-2000 kDa auf. Die Chromatographie erfolgte für beide untersuchten GST-S2-Lösungen - Monomer von IEC-Peak I und Oligomer von IEC-Peak II - wie in Kapitel 4.5.5.3. beschrieben. Die Chromatogramme beider GPC-Läufe sind in den Abbildungen 5-29 und 5-30 gezeigt. Das Elutionsprofil zeigte für beide untersuchten Proteinlösungen mindestens zwei Peaks (GPC-Peak I und GPC-Peak II), die unmittelbar aufeinander folgten. Die beiden Elutionsprofile unterschieden sich nur im Verhältnis der Peakfläche der beiden Elutionspeaks GPC-Peak I und GPC-Peak II voneinander. Die Fraktionen der GPC wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 5-31). GST-S2 ist über alle Fraktionen der GPC verteilt. Der GPC-Peak I besitzt ein Elutionsvolumen von 7,8 ml und entspricht einem apparenten Molekulargewicht von ca. 780 kDa. Dieser Peak enthielt das Protein GST-S2 in hexamerer Form. Der nachfolgende GPC-Peak II erstreckte sich über einen extrem breiten Bereich und weist ein gemittelttes Elutionsvolumen von 12,3 ml auf. Im Gegensatz zu GPC-Peak I handelt es sich bei GPC-Peak II nicht um einen gut aufgetrennten Einzelpeak. Neben dem GST-S2 Monomer eluieren im Bereich dieses Peaks auch sämtliche vorhandenen Oligomerisierungszwischenstufen, die mit dem GST-S2 Monomer und dem GST-S2 Hexamer im Gleichgewicht stehen. Durch GPC an Superose 6 lassen sich diese zwar gut von der hexameren Form des Proteins abtrennen. Jedoch ist die Trennkapazität der Säule nicht ausreichend, um die Oligomerisierungszwischenstufen von der monomeren Form des GST-S2 abzutrennen. Wurden die Fraktionen der beiden Elutionspeaks GPC-Peak I und GPC-Peak II getrennt gepoolt und das

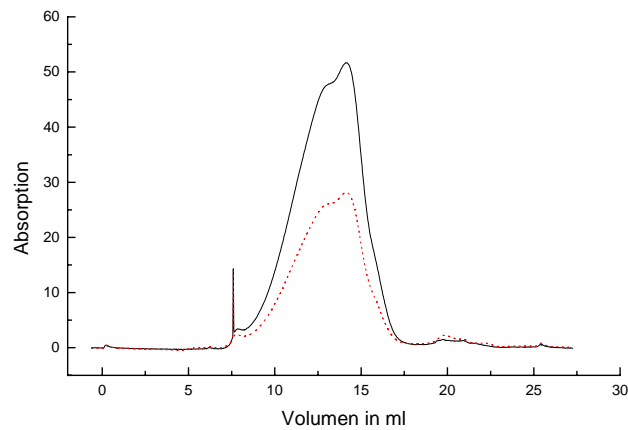


Abb. 5-31: Chromatogramm der Superose 6-Säule. Aufgetragen wurden die S2-enthaltenden Fraktionen von IEC-Peak I (GST-S2 Monomer) der Mono Q-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die Absorption bei $\lambda=260$ nm als gepunktete Linie dargestellt.

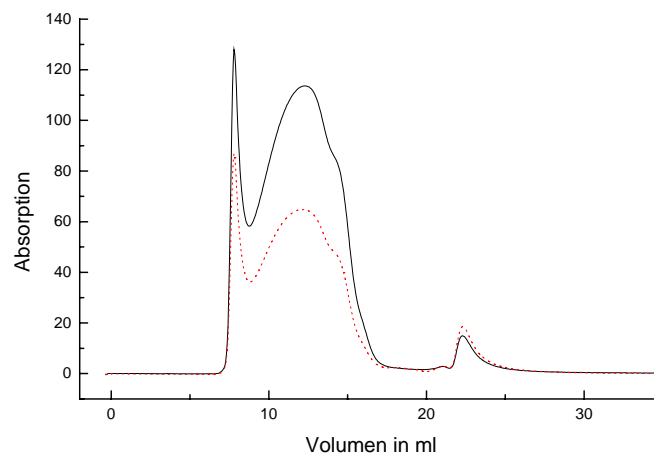


Abb. 5-30: Chromatogramm der Superose 6-Säule. Aufgetragen wurden die S2-enthaltenden Fraktionen von IEC-Peak II (GST-S2 Oligomer) der Mono Q-Säule. Die Absorption bei $\lambda=280$ nm ist als durchgezogene, die Absorption bei $\lambda=260$ nm als gepunktete Linie dargestellt.

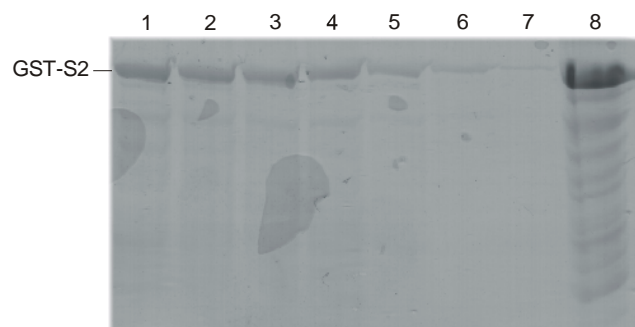


Abb. 5-31: SDS-Polyacrylamid-Gel der IEC an Mono Q und der GPC an Superose 6. 1-7: GST-S2-enthaltende Fraktionen der GPC; 8: GST-S2-enthaltende Fraktion der IEC.

Protein von GPC-Peak II nach mehreren Tagen Inkubation bei 4°C rechromatographiert, so erschienen im Elutionsprofil der GPC wieder beide Peaks. Die Fraktionen der GPC vereinigt, gegen 20 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 dialysiert und eine Proteinkonzentration von 6,0 mg/ml eingestellt. Wurde das Protein nicht unmittelbar für Kristallisationsversuche oder biochemische Charakterisierungen herangezogen, wurde es in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. S2 ist eine Komponente des Base-Komplexes der 19S-Kappe und wechselwirkt mit der ATPase YTA5 sowie mit der Untereinheit Rpn11 des Lid-Komplexes der 19S-Kappe. Um diese Protein-Protein-Wechselwirkungen zu ermöglichen, müssen an der Oberfläche des Proteins mehrere hydrophobe Bereiche vorhanden sein, die die Wechselwirkungen mit den Proteinen YTA5 und Rpn11 vermitteln. Durch Oligomerisierung des GST-S2 können diese hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche im Innern des Komplexes verborgen werden.

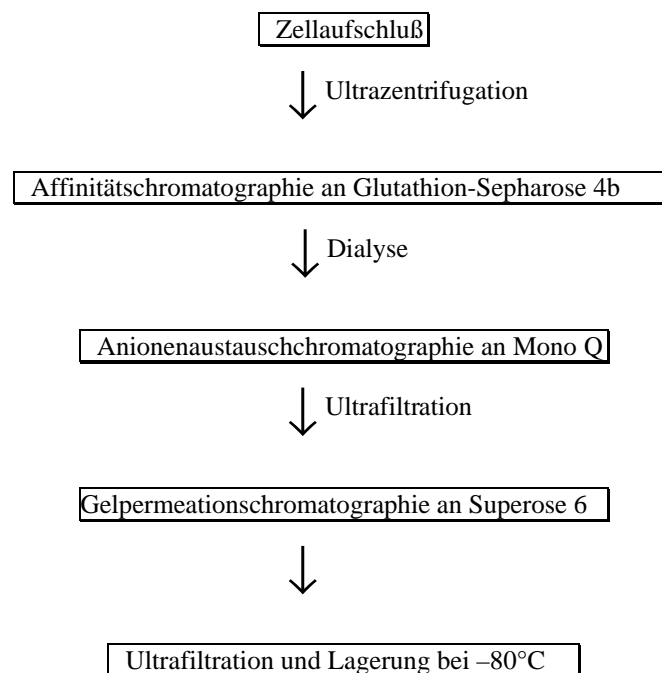


Abb. 5-26: Schematische Darstellung des Ablaufs der Proteinpräparation des rekombinanten GST-S2.

5.2.3. Proteincharakterisierung

5.2.3.1. Charakterisierung der rekombinanten 19S-ATPasen aus Hefe

a) N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung der rekombinanten Proteine YTA2, YTA3, GST-YTA1, GST-YTA5 und MBP-SUG1 lieferte Sequenzierungsergebnisse, die mit der Aminosäuresequenz

der entsprechenden ATPase bzw. des entsprechenden Fusionsproteins übereinstimmten. Bei den rückgefalteten Proteinen handelte es sich definitiv um die in *E. coli* rekombinant erzeugten ATPasen bzw. ATPase-Fusionsproteine.

b) Bestimmung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität der rekombinanten, rückgefalteten 19S-ATPasen wurde mit Hilfe des Phosphat-Assays nach Ames (1966) bestimmt. Der Assay wurde wie in Kapitel 4.5.1.9. beschrieben durchgeführt. Die spezifische Aktivität der ATPasen wird in Stoffmenge des entstandenen Phosphats pro mg Enzym und Zeit angegeben. Zu Vergleichszwecken wurde der Assay zusätzlich mit einer Probe rekombinanter Na^+/K^+ -ATPase aus Schweineniere (freundlicherweise von Michael Groll zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Die gemessenen spezifischen ATPase-Aktivitäten sind in Tabelle 5-3 zusammengefaßt. Die spezifische Aktivität der rückgefalteten 19S-ATPasen ist ähnlich zur spezifischen Aktivität der rekombinanten Na^+/K^+ -ATPase aus Schweineniere. Dies läßt vermuten, daß die rückgefalteten 19S-ATPasen in vollständig aktiver Form vorliegen.

Tabelle 5-3

Gemessene spezifische Aktivität verschiedener ATPasen

Protein	spezifische Aktivität
Na^+/K^+ -ATPase	14,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
YTA2	9,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
YTA3	9,91 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
GST-YTA1	8,92 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
GST-YTA5	9,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

c) Bestimmung des Oligomerisierungsgrades

Der Oligomerisierungsgrad der verschiedenen rekombinanten 19S-ATPasen YTA1, GST-YTA2, YTA3, GST-YTA5 und MBP-SUG1 wurde durch GPC ermittelt. Die Molekulargewichtsbestimmung wurde wie in Kapitel 4.5.1.6. beschrieben an einer SMART-Chromatographiestation mit einer Superose 6-Säule durchgeführt. Das Chromatographiematerial weist einen Trennbereich von 5-2000 kDa auf. Als Laufpuffer diente 25 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , pH 7,5. Die Chromatogramme (keine Abbildung) zeigten alle ausschließlich einen einzigen Peak, der

eine leichte Schulter aufwies. Aus den Retentionszeiten der jeweiligen Peaks wurde die apparente Molekularmasse bestimmt. Danach liegen sowohl die rekombinanten, rückgefalteten 19S-ATPasen YTA1 und YTA3 als auch die rekombinanten, rückgefalteten 19S-ATPase-Fusionsproteine GST-YTA2, GST-YTA5 und MBP-SUG1 als Hexamere vor. In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß mehrere Mitglieder der AAA-ATPase-Familie in Lösung als hexamere Ringsysteme vorliegen (Patel *et al.*, 1998).

5.2.3.2. Charakterisierung des rekombinanten Fusionsproteins GST-S2

a) N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung des gereinigten Fusionsproteins GST-S2 lieferte die Sequenz MSPILGYWKI. Die gefundene Sequenz stimmt mit der Sequenz des Proteins Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* überein. Das exprimierte und gereinigte Fusionsprotein GST-S2 besteht aus der GST aus *Schistosoma japonicum*, die C-terminal über einen kurzen Peptidlinker mit dem Protein S2 fusioniert ist. Demzufolge handelt es sich bei dem präparierten Protein um das exprimierte Fusionsprotein GST-S2.

b) Stabilisierung der monomeren bzw. hexameren Form des GST-S2

Durch GPC an Superose-6 wurde festgestellt, daß das rekombinante GST-S2 in Lösung sowohl in monomerer als auch hexamerer Form vorliegt (Kap. 5.2.2.2.). Durch Variation der Salzkonzentration in der GST-S2-Probe als auch durch Variation der Proteinkonzentration wurde versucht, das Gleichgewicht zwischen monomerer und hexamerer Form auf eine der beiden Seiten zu verschieben und somit eine der Proteinformen zu stabilisieren. Die GST-S2 Proben wurden mittels GPC an einer Superose 6-Säule auf ihren Oligomerisierungsgrad untersucht und charakterisiert. Zusammenfassend wurden folgende Resultate erzielt: Der Oligomerisierungsgrad des GST-S2 ist sowohl von der Salzkonzentration als auch von der Proteinkonzentration der untersuchten Probe abhängig. Wurde die Proteinkonzentration der GST-S2-Probe erhöht, verschob sich das Gleichgewicht zwischen monomerer und hexamerer Form deutlich zu Gunsten des Hexamers. Bei einer Proteinkonzentration von 1,4 mg/ml war das Verhältnis Monomer:Hexamer etwa 12:1 (Abb. 5-32a). Betrug die Proteinkonzentration der GST-S2-Probe hingegen 4,2 mg/ml, wurde ein Monomer:Hexamer Verhältnis von etwa 5:1 (Abb. 5-32b) bestimmt. Wurde die Salzkonzentration (NaCl) der untersuchten GST-S2-Probe erhöht, führte dies ebenfalls zu einer Stabilisierung der hexameren Proteinform. Bei einer Salzkonzentration

von 100 mM NaCl konnte durch GPC an Superose 6 ein Monomer:Oligomer Verhältnis von etwa 143:1 bestimmt werden (Abb. 5-32c). Erhöhte man hingegen die Salzkonzentration der untersuchten GST-S2 Probe auf 300 mM NaCl, wurde ein Monomer:Oligomer Verhältnis von 9:1 bestimmt (Abb. 5-32d). Lag in der untersuchten GST-S2 Probe eine hohe Proteinkonzentration sowie eine hohe NaCl-Konzentration vor, konnte die hexamere Proteinform deutlich zu Gunsten des monomeren GST-S2 stabilisiert werden. Eine vollständige Stabilisierung einer der beiden Proteinformen des GST-S2 ist hingegen nicht gelungen.

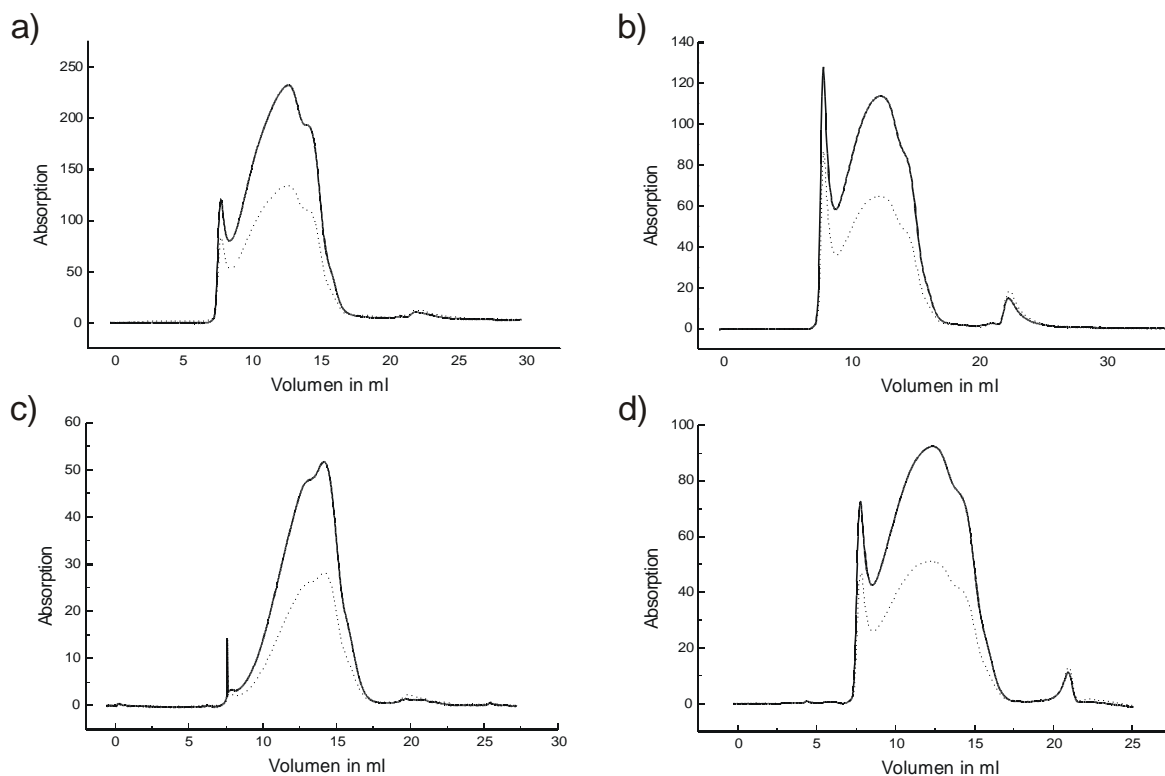


Abb. 5-32: Chromatogramme der GPC an Superose 6. Die untersuchten GST-S2-Proben variierten in der Proteinkonzentration und der Salzkonzentration: a) Probe: 1,4 mg/ml GST-S2 in 25 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5. b) Probe: 4,2 mg/ml GST-S2 in 25 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5. c) Probe: 1,2 mg/ml GST-S2 in 25 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5. d) Probe: 1,2 mg/ml GST-S2 in 25 mM TRIS-HCl, 300 mM NaCl, pH 7,5.

c) Limitierte Proteolyse an GST-S2

Das Protein S2 wurde durch Expression in *E. coli* als GST-markiertes Fusionsprotein GST-S2 erzeugt. Innerhalb des Peptidlinkers des Fusionsproteins befindet sich eine Thrombin- (*pGEX-2T-S2*) bzw. eine Faktor Xa-Schnittstelle (*pGEX-5X-1-S2*). Um das humane Protein S2 in nativer Form zu erhalten, mußte das fusionierte GST durch Proteolyse abgespalten werden. Die proteolytische Spaltung mit dem Enzym Thrombin wurde wie in Kapitel 4.5.2.2. beschrieben bei RT und 4°C durchgeführt und mittels SDS-PAGE analysiert. Thrombin ist eine extrem aktive

Protease mit geringer Spezifität. Bereits nach einer Inkubationszeit von 1 min war ein Großteil des eingesetzten Fusionsproteins GST-S2 bereits gespalten worden. Neben den erwarteten Hauptprodukten der proteolytischen Spaltung - GST und S2 – konnten auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel zwei weitere Banden bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 97000 Da bzw. 76000 Da detektiert werden. Die Protease Thrombin spaltete offenbar nicht nur an der zum Lösungsmittel exponierten Schnittstelle Arg-Gly im Peptidlinker, sondern zusätzlich innerhalb der Polypeptidsequenz des Proteins S2. Bereits vor der Proteolyse wurde die Polypeptidsequenz des S2 auf Thrombin-Schnittstellen untersucht. Es konnte keine Sequenzabfolge Arg-Gly gefunden werden. Allerdings existierten zwei Stellen mit der Aminosäureabfolge Arg-Ala. Alanin ist ähnlich wie Glycin eine sehr kleine hydrophobe Aminosäure und scheint den Rest Glycin in der Erkennungssequenz der Protease Thrombin ersetzen zu können. Berechnet man die Molekularmasse der entstehenden S2-Fragmente bei proteolytischer Spaltung an den Stellen mit der Aminosäureabfolge Arg-Ala, so entstehen zwei Fragmente mit den molekularen Massen 96914 Da bzw. 76262 Da. Diese Werte stimmen sehr gut mit den durch SDS-PAGE bestimmten apparenten Molekularmassen der entstandenen Nebenprodukte überein. Durch Variation der Proteolysebedingungen wurde versucht, eines der S2-Fragmente zu stabilisieren. Dies ist jedoch nicht gelungen. Eine Aufreinigung der entstehenden Spaltprodukte S2 (100198 Da), S2-Fragment I (96914 Da) und S2-Fragment II (76262 Da) nach vollständiger Proteolyse des Fusionsproteins GST-S2 konnte durch die Anwendung verschiedener Chromatographiemethoden wie HIC, IEC oder GPC nicht erreicht werden. Die drei Proteine besaßen trotz ihrer unterschiedlichen Größe ähnliche biochemische Eigenschaften und wiesen ein fast identisches Elutionsverhalten auf.

Die proteolytische Spaltung mit dem Enzym Faktor Xa wurde wie in Kapitel 4.5.2.2. beschrieben bei RT und 4°C durchgeführt und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Fusionsprotein GST-S2 wurde von der Protease Faktor Xa nicht gespalten. Faktor Xa erkennt eine ähnliche Schnittstelle wie Thrombin, besitzt jedoch eine wesentlich geringere proteolytische Aktivität. Weder die Arg-Gly Schnittstelle im Peptidlinker, noch die beiden Arg-Ala Schnittstellen in der Polypeptidsequenz des S2 wurden durch das Enzym erkannt und gespalten.

5.2.4. Kristallisationsversuche

5.2.4.1. Kristallisationsversuche mit den rekombinanten 19S-ATPasen aus Hefe

Kristallisationsversuche mit den rückgefalteten, homogenen 19S-ATPasen YTA1, GST-YTA2, YTA3, GST-YTA5 und MBP-SUG1 wurden mit unterschiedlichen Kristallisationsscreenings nach der Methode der Dampfdiffusion bei RT und 4°C durchgeführt (Kap. 4.6.1.). Die Proteine wurden dazu gegen 10 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 % (w/v) Glycerin, pH 7,5 dialysiert und eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. Bislang konnten trotz intensiv durchgeführter Kristallisationsversuche keine Proteinkristalle erhalten werden.

5.2.4.2. Kristallisationsversuche mit dem rekombinanten GST-S2

Ausgiebige Kristallisationsversuche mit dem Fusionsprotein GST-S2 wurden mit verschiedenen Kristallisationsscreenings nach der Methode der Dampfdiffusion bei RT und 4°C durchgeführt (Kap. 4.6.1.). Das Protein wurde dazu gegen 10 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 dialysiert und eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml eingestellt. Verschiedene Bedingungen lieferten kristallines Material, dessen Größe jedoch für erste röntgenkristallographische Untersuchungen viel zu klein ist. Eine eindeutige Entscheidung, ob es sich dabei um Proteinkristalle oder Salzkristalle handelt, konnte daher bisher nicht getroffen werden. Eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen durch Variation der Protein- bzw. Fällungsmittelkonzentration und Zugabe von Additiven erzielte bislang kein Kristallwachstum.

6. Literaturverzeichnis

- Aliverti, A., Jansen, T., Zanetti, G., Ronchi, S., Herrmann, R. G., und Curti, B. (1990). Expression in *Escherichia coli* of ferredoxin:NADP⁺ reductase from spinach. *Eur. J. Biochem.* **191**, 551-555.
- Aliverti, A., Corrado, M. E., und Zanetti, J. (1994). Involvement of lysine-88 of spinach ferredoxin-NADP⁺ reductase in the interaction with ferredoxin. *FEBS Lett.* **343**, 247-250.
- Ames, B. N. (1966). Assays of inorganic phosphate, total phosphate, and phosphatases. *Meth. Enzymol.* **8**, 115-118.
- Arakaki, A. K., Ceccarelli, E. A., und Carrillo, N. (1997). Plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases: a basal structural framework and a multiplicity of functions. *FASEB J.* **11**, 133-140.
- Arrigo, A. P., Simon, M., Darlix, J. L., und Spahr, P. F. (1987). A 20S particle ubiquitous from yeast to human. *J. Mol. Evol.* **25**, 141-150.
- Arrigo, A. P., Tanaka, K., Goldberg, A. L., und Welch, W. J. (1988). Identity of the 19S prosome particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**, 192-194.
- Bainton, D. (1981). The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**, 66-76.
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng.* **6**, 37-40.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., und Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Beyer, A. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* **6**, 2043-2058.
- Binda, C., Coda, A., Aliverti, A., Zanetti, G., und Mattevi, A. (1998). Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S]-ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **D54**, 1353-1358.
- Blundell, T. L., und Johnson, L. N. (1976). Protein Crystallography. Academic Press, London, UK.
- 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.
- Brünger, A. T. (1992). X-PLOR, a system for crystallography and NMR, Version 3.1. Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., und Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
- Bruns, C. M., und Karplus, P. A. (1995). Refined crystal structure of spinach ferredoxin reductase at 1,7 Å resolution: oxidized, reduced and 2'-phospho-5'-AMP bound state. *J. Mol. Biol.* **247**, 125-145.
- Carrillo, N., und Vallejos, R. H. (1987). Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase. *Topics in Photosynthesis* **8**, 527-560.
- Carter, C. W., Jr., und Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12218-12223.
- Chen, L., Durley, R. C. E., Mathews, F. S., und Davidson, V. L. (1994). Structure of an electron transfer complex: methyamine dehydrogenase, amicyanin, and cytochrome c551i. *Science* **264**, 86-90.

- Ciechanover, A., und Schwartz, A. L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad function of protein death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2727-2730.
- Clayton, R. K. (1980). Photosynthesis, Cambridge University Press, UK.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- Confalonieri F., und Duguet, M. (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays* **17**, 639-650.
- Correll, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., und Ludwig, M. L. (1992). Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. *Science* **258**, 1604-1610.
- Correll, C. C., Ludwig, M. L., Bruns, C. M., und Karplus, P. A. (1993). Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases: comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin. *Protein Sci.* **2**, 2112-2133.
- Coux, O., Tanaka, K., und Goldberg, A. L. (1996). Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R., und Baumeister, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett.* **251**, 125-131.
- De Pascalis, A. R., Jelesarow, I., Ackermann, F., Koppenol, W. H., Hirasawa, M., Knaff, D. B., und Bosshard H. R. (1993). Binding of ferredoxin to ferredoxin:NADP⁺ reductase: the role of the carboxyl groups, electrostatic surface potential, and molecular dipole moment. *Protein Sci.* **2**, 1126-1135.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., und Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* **318**, 618-624.
- Deng, Z., Aliverti, A., Zanetti, G., Arakaki, A. K., Ottado, J., Orellano, E. G., Calcaterra, N. B., Ceccarelli, E. A., Carrillo, N., und Karplus, P. A. (1999). A productive NADP⁺ binding mode of ferredoxin-NADP⁺ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nature Struct. Biol.* **6**, 847-853.
- Drenth, J. (1994). Principles of X-ray Crystallography. Springer-Verlag, New-York, USA.
- Engh, R. A., und Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr.* **A47**, 392-400.
- Evans, S. V. (1993). SETOR: Hardware lighted three-dimensional solid model representations of macromolecules. *J. Mol. Graphics* **11**, 134-138.
- Ewald, P. P. (1921). Das „reziproke Gitter“ in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.* **56**, 129-156.
- Ferrell, K., Wilkinson, C. R. M., Dubiel, W., und Gordon, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *TIBS* **25**, 83-88.
- Foust, G. P., Mayhew, S. G., und Massey, V. (1969). Complex formation between ferredoxin triphosphopyridine nucleotide reductase and electron transfer proteins. *J. Biol. Chem.* **244**, 964-979.
- Freer, S. T., Alden, R. A., Carter, C. W. J., und Kraut, J. (1975). Crystallographic structure refinement of chromatium high potential iron protein at two Angstroms resolution. *J. Biol. Chem.* **250**, 46-54.
- Gabb, H. A., Jackson, R. M., und Sternberg, M. J. E. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* **272**, 106-120.

- Genetic Computer Group (1997). Wisconsin Package Version 9.1. Madison, Wisconsin, USA.
- Gill, S. C., und Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V., und Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Molecular Biology Reports* **26**, 21-28.
- Glusker, J. P., Lewis, M., und Rossi, M. (1994). Crystal structure analysis for chemists and biologists. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Germany.
- Gómez-Moreno, C., Martínez-Júlez, M., Medina, M., Hurley, J. K., und Tollin, G. (1998). Protein-protein interaction in electron transfer reactions: the ferredoxin/ferredoxin:NADP⁺ reductase system from *Anabaena*. *Biochimie* **80**, 837-846.
- Gorbea, C., Taillandier, D., und Rechsteiner, M. (1999). Assembly of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Molecular Biology Reports* **26**, 15-19.
- Gorbea, C., Taillandier, D., und Rechsteiner, M. (2000). Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26S-proteasome. *J. Biol. Chem.* **275**, 875-882.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2,4 Å resolution. *Nature* **386**, 436-471.
- Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., und Kopp, F. (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* **290**, 186-190.
- Hershko, A., und Ciechanover, A. (1986). The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**, 19-56.
- Hilt, W., und Wolf, D. H. (1995). Proteasomen. *Naturwissenschaften* **82**, 257-268.
- Hilt, W., und Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a program. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltmolekülmethode: Eine Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Crystallogr.* **10**, 750-751.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr.* **19**, 353-356.
- Huisman, J. G., Moorman, A. F. M., und Verkley, F. N. (1978). In vitro synthesis of chloroplast ferredoxin as a high molecular weight precursor in a cell-free protein synthesizing system from wheat germs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 1121-1131.
- Hurley, J. K., Hazzard, J. T., Martínez-Júlvez, M., Medina, M., Gómez-Moreno, C., und Tollin, G. (1999). Electrostatic forces involved in orienting *Anabaena* ferredoxin during binding to *Anabaena* ferredoxin:NADP⁺ reductase: site-specific mutagenesis, transient measurements, and electrostatic surface potentials. *Protein Sci.* **8**, 1614-1622.
- Ikai, A., Nishigai, M., Tanaka, K., und Ichihara, A. (1991). Electron microscopy of 26S complex contain the 20S-proteasome. *FEBS Lett.* **292**, 21-24.
- Ingelman, M., Bianchi, V., und Eklund, H. (1997). The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1,7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **268**, 147-157.
- Jaenicke, R., und Rudolph, R. (1989). Folding proteins. In: Creighton, T. (Hersg.), Protein structure: a practical approach, 191-223, IRL Press, Eynsham, Oxford.

- Jancarik, J., und Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409-411.
- Jelesarow, W., DePascalis, A. R., Koppenol, W. H., Hirasawa, M., Knaff, D. B., und Bosshard, H. R. (1993). Ferredoxin binding site on ferredoxin:NADP⁺ reductase. *Eur. J. Biochem.* **216**, 57-66.
- Jackson, R. M., Gabb, H. A., und Sternberg, M. J. E. (1998). Rapid refinement of protein interfaces incorporating solvation: application to the docking problem. *J. Mol. Biol.* **276**, 265-285.
- Jones, T. A. (1985). Diffraction methods for biological macromolecules. Interactive computer graphics: FRODO. *Meth. Enzymol.* **115**, 157-171.
- Jones, T. A., und Kjeldgaard, M. (1991). *O-The manual*, Uppsala, Sweden.
- Kabsch, W. (1988). Automatic indexing of rotation diffraction pattern. *J. Appl. Crystallogr.* **21**, 67-71.
- Karplus, P. A., Daniels, M. J., und Herriott, J. R. (1991). Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* **251**, 60-66.
- Karplus, P. A., und Bruns, C. M. (1994). Structure-function relations for ferredoxin reductase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 89-99.
- Katchalski-Katzir, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Friesem, A. A., Aflalo, C., und Vakser, I. A. (1992). Molecular surface recognition: determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2195-2199.
- Kissinger, C. R., Sieker, L. C., Adam, E. T., und Jensen, L. H. (1991). Refined crystal structure of ferredoxin II from *Desulfovibrio gigas* at 1.7 Å. *J. Mol. Biol.* **219**, 693-715.
- Kleywegt, G. J., und Jones, T. A. (1994). A super position. *ESF/CCP4 Newsletter* **31**, 9-14.
- Kleywegt, G. J., und Jones, T. A. (1998). Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **D54**, 1119-1131.
- Knaff, D. B., und Hirasawa, M. (1991). Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 93-125.
- Kraulis, J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Krishtalik, L. J., und Cramer, W. A. (1996). Basic aspects of electron and proton transfer reactions with applications to photosynthesis. In: Ort, D. R., und Yocum, C. F. (Hersg.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., und Thornton, J. M. (1992). PROCHECK v.3.3: Programs to check the stereochemical quality of protein structures. Oxford Molecular Ltd., Oxford, England.
- Leslie, A. G. W. (1991). Recent Changes to the MOSFLM Package for Processing Film and Image Plate Data. SERC Laboratory, Daresbury, Warrington, UK.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickel, P., Baumeister, W., und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- Lu, G., Campbell, W. H., Schneider, G., und Lindqvist, Y. (1994). Crystal structure of the FAD-containing fragment of corn nitrate reductase at 2,5 Å resolution: relationship to other flavoprotein reductases. *Structure (London)* **2**, 809-821.

- Luzzatti, P. V. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Crystallogr.* **A5**, 802-810.
- Marcus, R. A., und Norman S. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 265-322.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- Matthijs, H. C. P., Coughlan, S. J., und Hind, G. (1986). Removal of ferredoxin-NADP⁺ reductase from thylakoid membranes, and identification of the binding site. *J. Biol. Chem.* **261**, 12154-12158.
- Mc Pherson, A. J. (1976). The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Meth. Biochem. Anal.* **23**, 249-345.
- Mc Pherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Mc Pherson, A. (1985). Crystallization of macromolecules: General principles. *Meth. Enzymol.* **114**, 112-120.
- Medina, M., Méndez, E., und Gómez-Moreno, C. (1992a). Lysine residues on ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* PCC 7119 involved in substrate binding. *FEBS Lett.* **298**, 25-28.
- Medina, M., Méndez, E., und Gómez-Moreno, C. (1992b). Identification of arginyl residues involved in the binding of ferredoxin-NADP⁺ reductase from *Anabaena* sp. PCC 7119 to its substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 281-286.
- Merritt, E. A., und Bacon, D. J. (1997). Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* **277**, 505-524.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163.
- Nishida, H., Inaka, K., Yamanaka, M., Kaida, S., Kobayashi, K., und Miki, K. (1995). Crystal structure of NADH-cytochrome b5 reductase from pig liver at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 2763-2767.
- Ort, D. R., und Yocum, C. F. (1996). Electron transfer and energy transduction in photosynthesis – an overview. *Advances in Photosynthesis* **4**, 1-9.
- Patel, S., und Lattereich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Cell Biology* **8**, 65-71.
- Patterson, A. L. (1934). A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals. *Phys. Rev.* **46**, 372-376.
- Plato, M., Michel-Beyerle, M. E., Bixon, M., und Jortner, J. (1989). On the role of tryptophan as a superexchange mediator for quinone reduction in photosynthetic reaction centers. *FEBS Lett.* **249**, 70-74.
- Prince, R. C. (1996). Photosynthesis: the Z-scheme revised. *TIBS* **21**, 121-122.
- Puibelli, L., Aliverti, A., Bellintani, F., und Zannetti, G. (1995). Spinach ferredoxin I: overproduction in *E. coli* and purification. *Protein expression and purification* **6**, 298-304.
- Ramachandran, G. N., und Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.* **23**, 283-437.
- Read, R. J. (1986). Improved fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr.* **A42**, 140-149.
- Rossmann, M. G., Liljas, A., Brändén, C.-I., und Banaszak, L. J. (1975). In: Boyer, P. E. (Hersg.), *The Enzymes*, Vol. 11 (3rd Ed.), 61-102, Academic Press.
- Rossmann, M. G., und Argos, P. (1981). Protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 497-532.

- Rubin, D. M., van Nocker, S., Glickman, M., Coux, O., Wefes, I., Sadis, S., Fu, H., Goldberg, A., Vierstra, R., und Finley, D. (1997). ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome. *Molecular Biology Reports* **24**, 17-26.
- Sanger F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmitz, S., Martínez-Júlvez, M., Gómez-Moreno, C., und Böhme, H. (1998). Interaction of positively charged amino acid residues of recombinant cyanobacterial ferredoxin:NADP⁺ reductase with ferredoxin probed by site directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 85-93.
- Serre, L., Vellieux, M. D., Medina, M., Gomez-Moreno, C., Fontecilla-Camps, J. C., und Frey, M. (1996). X-ray structure of the ferredoxin:NADP⁺ reductase from Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7119 at 1,8 Å resolution, and crystallographic studies of NADP⁺ binding at 2,25 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **263**, 20-39.
- Shin, M., Nishikawa, T., Sekido, T., und Sakihama, N. (1994). The bound forms of ferredoxin-NADP⁺ reductase in chloroplast thylakoids. In: Yagi, K. (Hersg.), *Flavins and Flavoproteins 1993*, 413-422, Walter de Gruyter und Co., Berlin.
- Stout, G. H., und Jensen, L. H. (1989). *X-ray structure determination*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Tanaka, K., und Tsurumi, C. (1997). The 26S proteasome: subunits and functions. *Molecular Biology Reports* **24**, 3-11.
- Tong, L. A., und Rossmann, M. G. (1990). The locked rotation function. *Acta Crystallogr.* **A46**, 783-792.
- Tsukihara, T., Fukuyama, K., Tahara, H., Katsube, Y., Matssura, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K., und Matsubara, H. (1978). X-ray analysis of ferredoxin from *Spirulina platensis*. *J. Biochem. (Tokyo)* **84**, 1645-1647.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulationen und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Doktorarbeit, Technische Universität, München.
- Vargin, A., und Teplykov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
- Voet D., und Voet J. D. (1990). *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Voges, D., Zwickl, P., und Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068.
- Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S., und Kim, J. J. P. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8411-8416.
- Zanetti, G., Aliverti, A., und Curti, B. (1984). A cross-linked complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *J. Biol. Chem.* **259**, 6153-6157.
- Zanetti, G., Morelli, D., Ronchi, S., Negri, A., Aliverti, A., und Curti, B. (1988). Structural studies on the interaction between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Biochemistry* **27**, 3753-3759.
- Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F., und Baumeister, W. (1992). Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* **31**, 964-972.

7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
'	kennzeichnet die Aminosäurereste der FNR aus Spinat
"	kennzeichnet die Aminosäurereste der FNR aus <i>Anabaena</i> PCC 7119
*	kennzeichnet die Aminosäurereste des Fd aus <i>Spirulina platensis</i>
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
A_x	Extinktion bei der Wellenlänge x nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorptionseinheit
au	<i>asymmetric unit</i> (asymmetrische Einheit)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>circular dichroism</i>
ddH ₂ O	H ₂ O bidest. (zweifach entionisiertes Wasser)
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
cDNA	<i>copy</i> -DNA oder komplementäre DNA
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Faktor Xa	aktivierter Blutgerinnungsfaktor X
Fd	[2Fe-2S]-Ferredoxin I
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ Reduktase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPC	Gelpermeationschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
GST-S2	Fusionsprotein bestehend aus den Proteinen GST und S2
GST-YTA1	Fusionsprotein bestehend aus den Proteinen GST und YTA1
GST-YTA5	Fusionsprotein bestehend aus den Proteinen GST und YTA5
h	Stunde
Hersg.	Herausgeber
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	(Histidin) ₆ -Markierung
IEC	<i>ion exchange chromatography</i> (Ionenaustauschchromatographie)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani

MBP	<i>Maltose-binding</i> Protein
MBP-SUG1	Fusionsprotein bestehend aus den Proteinen MBP und SUG1
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsregion)
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i>
min	Minute
M _r	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger</i> -RNA (Boten-RNA)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, red. Form
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, ox. Form
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
p. A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2'-P-AMP	Adenosin-2',5'-diphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pFd	Ferredoxin I aus <i>Capsicum annuum Yolo Wonder</i> (Paprika)
<i>pdf</i>	codierender Genbereich des <i>pdf</i> -Gens, welcher für das pFd-Präprotein codiert
pFNR	Ferredoxin-NADP ⁺ Reduktase aus <i>Capsicum annuum Yolo Wonder</i> (Paprika)
<i>pfnr</i>	codierender Genbereich des <i>pfnr</i> -Gens, welcher für das pFNR-Präprotein codiert
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rms	<i>root-mean-square</i> (quadratisch)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S2	<i>subunit</i> 2 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sFd	[2Fe-2S]-Ferredoxin I aus <i>Spirulina Platensis</i> (Spinat)
SUG1	<i>subunit</i> 8 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YTA1	yeast TATA-binding analog 1 - <i>subunit</i> 6a der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms
YTA2	yeast TATA-binding analog 2 - <i>subunit</i> 6b der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms
YTA3	yeast TATA-binding analog 3 - <i>subunit</i> 7 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms
YTA5	yeast TATA-binding analog 5 - <i>subunit</i> 4 der 19S-Kappe des 26S-Proteasoms