

**Entwicklung eines Fluoreszenzspektrometers zur
Untersuchung von intermediären Zuständen in der
Röntgenkristallographie**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften**

-Dr. rer. nat.-

des Fachbereichs Chemie an der Universität Dortmund

angefertigt am

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

und

an der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Björn Udo Klink

Homburg, Juli 2006

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des BMB+F-Forschungsvorhabens 05 KS1EDA/3 in der Zeit von April 2001 bis Juli 2006 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody und an der Universität des Saarlandes im Fachbereich Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. Axel J. Scheidig durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Homburg, 25. Juli 2006

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel J. Scheidig für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für seine hervorragende Betreuung, für die geduldige Einführung in molekularbiologische Arbeitsweisen und in die Proteinkristallographie, und für das große Vertrauen, wenn es um die kurzfristige Anschaffung von teuren Gerätschaften ging.

Prof. Dr. Roger S. Goody danke ich für die Möglichkeit, einen großen Teil meiner Arbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zu absolvieren und für hilfreiche Anmerkungen zu dieser Arbeit und den daraus entstandenen Veröffentlichungen. Besonders danke ich dafür, dass er sich bereit erklärte, meine Arbeit als Erstgutachter zu bewerten.

Prof. Dr. Roland Winter danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Bei meinen Kollegen am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund und an der Universität des Saarlandes in Homburg bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die Unterstützung und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. Astrid U. Krämer für die Bereitstellung der Y32C, C118S-Mutante von H-Ras p21, Sascha Gentz für die Bereitstellung von gereinigtem GDP und GppNHp, Prof. Dr. Ilme Schlichting für die großzügige Leihgabe von Gerätschaften, sowie Dr. Igor Chizhov und Georg Holtermann für technische Unterstützung und zahlreiche fruchtbare Diskussionen. Weiterhin danke ich Dr. Tresfore Dambe, der mich von allen Kollegen am längsten ertragen musste, für moralische Unterstützung und administrative Hilfestellungen, wenn es wieder einmal ein Rechteproblem mit Linux gab.

Den Mitarbeitern der zentralen Einrichtungen des Max-Planck-Instituts in Dortmund und den betreuenden Wissenschaftlern der Synchrotron-Messstationen ID14 und ID29 am ESRF (Grenoble, Frankreich) und PXI am SLS (PSI Villigen, Schweiz) danke ich für die zahlreichen Dienstleistungen und für technische Unterstützung. Außerdem danke ich Dr. John E.T. Corrie (MRC, London, Mill Hill) für die Bereitstellung von isomerenreinem *R-caged* GTP und *S-caged* GTP.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom BMB+F geförderten Forschungsprojektes „Kombination von Röntgendiffraktion und Photospektroskopie an Proteinkristallen zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von biologischen Makromolekülen“ (Kennzeichen 05 KS1EDA/3) durchgeführt.

Ein besonders liebevoller Dank gilt meiner Lebensgefährtin Tammy Woo und meinem Bruder Stefan Klink, die immer für mich da waren und sind, und die mir bei der Erstellung dieser Arbeit durch inspirierende Diskussionen und wertvolle Kommentare hilfreich zur Seite standen.

Ich möchte diese Arbeit meiner verstorbenen Mutter widmen, die mehr an ihre Kinder geglaubt hat als an sich selbst, und deren letzten Ratschlag ich stets befolgen werde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kinetische Kristallographie	1
1.2	Kombination von Fluoreszenzspektroskopie und kinetischer Kristallographie	3
1.3	H-Ras p21	5
1.4	Zielsetzung	6
2	Theorie	8
2.1	Fluoreszenzspektroskopie	8
2.1.1	Allgemeine Grundlagen	8
2.1.2	Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.....	10
2.1.3	Fluoreszenzmarkierung und Fluoreszenzspektroskopie an biologischen Makromolekülen	13
2.2	Proteinkristallisation	15
2.3	Röntgenographische Methoden.....	17
2.3.1	Theorie der Röntgendiffraktion	17
2.3.1.1	<i>Symmetrie von Kristallen</i>	17
2.3.1.2	<i>Diffraction</i>	18
2.3.1.3	<i>Miller'sche Indizes</i>	19
2.3.1.4	<i>Reziprokes Gitter und Ewald-Konstruktion</i>	20
2.3.1.5	<i>Fourier-Transformation</i>	22
2.3.1.6	<i>Das Phasenproblem</i>	23
2.3.1.7	<i>Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz (MR)</i>	24
2.3.2	Verfeinerung eines Protein-Strukturmodells	25
2.3.2.1	<i>Berechnung von Elektronendichtekarten</i>	28
2.3.2.2	<i>Temperaturfaktor und anisotrope Verfeinerung</i>	29
2.3.2.3	<i>Alternative Konformationen</i>	30
2.3.2.4	<i>Modellierung von Liganden durch ab initio Computersimulation</i>	31
2.3.3	Röntgenfluoreszenz.....	32

2.3.4	Datensammlung	33
2.3.4.1	<i>Mögliche Strahlquellen für die Röntgendiffraktion</i>	33
2.3.4.2	<i>Diffractionsexperimente nach der Laue-Methode</i>	35
2.3.4.3	<i>Detektoren</i>	36
2.4	Biologie und Biochemie der kleinen GTPase H-Ras p21	38
2.4.1	Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBPs)	38
2.4.2	GNBPs, die nicht der Ras-Superfamilie angehören.....	38
2.4.3	GNBPs der Ras-Superfamilie	40
2.4.3.1	<i>Allgemeine Eigenschaften</i>	40
2.4.3.2	<i>Unterteilung der Ras-Superfamilie</i>	42
2.4.4	Ras	44
2.4.4.1	<i>Die biologische Funktion von Ras</i>	44
2.4.4.2	<i>Architektur der Guaninnukleotid-Bindungstasche</i>	47
2.4.4.3	<i>Mechanismus der GTP-Hydrolyse</i>	48
2.4.5	Röntgenographische Untersuchungen an H-Ras p21	51
2.4.6	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an H-Ras p21	53
3	Materialien.....	55
3.1	Proteine und Chemikalien	55
3.1.1	Verwendetes Proteinkonstrukt	55
3.1.2	Chemikalien	55
3.1.3	Enzyme und Proteinstandards	57
3.1.4	Nukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe	57
3.1.5	Medien und Antibiotika	58
3.1.6	Puffer	58
3.2	Säulen und Säulenmaterialien	59
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	60
3.4	Geräte und Zubehör	60
3.5	Komponenten des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers	61
3.6	Röntgenquellen und Zubehör	62
3.7	Computerprogramme.....	62

4 Methoden	64
4.1 Molekularbiologische Methoden	64
4.1.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	64
4.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	64
4.1.3 Proteinexpression	64
4.1.4 Test auf Einschlusskörper (<i>inclusion bodies</i>)	65
4.2 Proteinchemische Methoden	65
4.2.1 Zellaufschluss	65
4.2.2 Proteinreinigung aus dem Zell-Lysat.....	66
4.2.3 Konzentrierung durch Ammoniumsulfat-Fällung.....	66
4.2.4 Konzentrierung und Pufferaustausch durch Membranfiltration	67
4.2.5 Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE	67
4.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	68
4.2.7 Kopplung von NBD-Fluorophoren an exponierte Cysteine	68
4.2.8 Nukleotidaustausch	69
4.2.9 Proteinfragmentierung durch NTCB.....	70
4.3 Biophysikalische Methoden	72
4.3.1 Massenspektroskopie	72
4.3.1.1 <i>ESI-MS</i>	72
4.3.1.2 <i>MALDI-MS</i>	72
4.3.2 Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie	73
4.3.3 Bestimmung des Nukleotid-Gehalts mittels HPLC	73
4.4 Herstellung und Handhabung von Proteinkristallen	74
4.4.1 Kristallisation.....	74
4.4.2 Handhabung von Proteinkristallen.....	76
4.4.3 Reaktionsinitiierung und Erzeugung intermediärer Zustände im Proteinkristall	77

4.5 Röntgenographische Methoden.....	77
4.5.1 Datensammlung	77
4.5.2 Datenprozessierung.....	78
4.5.3 Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz.....	79
4.5.4 Strukturverfeinerung.....	80
4.5.4.1 Erstellen von Topologie- und Parameterdateien.....	81
5 Ergebnisse und Diskussion.....	82
5.1 Entwicklung des biologischen Modellsystems.....	82
5.1.1 Anforderungen an das biologische Modellsystem.....	82
5.1.2 Auswahl des biologischen Modellsystems	83
5.1.3 Proteinexpression und Reinigung	85
5.1.4 Herstellung von fluoreszentelem H-Ras p21	86
5.1.5 Nukleotidaustausch.....	88
5.1.6 Eigenschaften von p21(mod)•R-caged GTP.....	90
5.1.6.1 Qualitätsanalyse durch ESI-MS.....	90
5.1.6.2 Bestimmung der Fluorophor-Bindungsstelle.....	91
5.1.6.3 Analyse der GTPase-Aktivität von p21(mod) durch HPLC.....	93
5.1.6.4 Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften	94
5.1.7 Kristallisation und Stabilisierung intermediärer Kristall-Zustände	97
5.2 Entwicklung des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers.....	101
5.2.1 Anforderungen an das Spektrometer	101
5.2.2 Gesamtaufbau des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers.....	101
5.2.3 Lichtquellen	103
5.2.3.1 Auswahl des He-Cd-Lasers als Lichtquelle.....	104
5.2.4 Lichtleiterfasern, optische Filter und Referenzmessungen.....	106
5.2.5 Objektiv und Halterung	109
5.2.6 Fluoreszenzdetektion in 0°-Geometrie	110
5.2.7 Geometrie der Lichtwege.....	110
5.2.8 Feuchtluftgenerator für Kristallmanipulation bei Raumtemperatur	112

5.2.9	Detektor und Analyse-Software.....	113
5.2.10	Verschiedene Einsatzmöglichkeiten des Spektrometers.....	114
5.2.10.1	<i>Fluoreszenz-Spektroskopie und Reaktionsinitiiierung an Kristallen im hängenden Tropfen.....</i>	<i>114</i>
5.2.10.2	<i>Kombination des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers mit einem Labor-Röntgendiffraktometer</i>	<i>116</i>
5.2.10.3	<i>Kombination des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers mit einer Synchrotron-Strahlquelle.....</i>	<i>117</i>
5.2.11	Spezifikationen des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers.....	118
5.3	FLUMIX-Analysen an p21(mod)	123
5.3.1	FLUMIX-Experimente an p21(mod) in wässriger Lösung	123
5.3.2	Eigenschaften von kristallinem p21(mod)	124
5.3.2.1	<i>Photolyse von caged GTP und GTP-Hydrolyse im kristallinen Zustand.....</i>	<i>124</i>
5.3.2.2	<i>Kristall-Analysen durch FLUMIX-Experimente und HPLC.....</i>	<i>125</i>
5.3.2.3	<i>FLUMIX-Spektroskopie zur Qualitätskontrolle bei der Herstellung intermediärer Kristall-Zustände</i>	<i>126</i>
5.3.2.4	<i>Herkunft der Fluoreszenzänderungen nach Photolyse von p21(mod)•R-caged GTP-Kristallen</i>	<i>128</i>
5.3.3	Einfluss von Synchrotron-Röntgenstrahlung auf Kristalle des fluoreszenten H-Ras p21	130
5.3.3.1	<i>Röntgen-induzierte Veränderungen in p21(mod)-Kristallen bei Raumtemperatur</i>	<i>131</i>
5.3.3.2	<i>Röntgen-induzierte Veränderungen in p21(mod)-Kristallen unter Kryobedingungen</i>	<i>134</i>
5.4	Computersimulation des kovalent mit Cys-32 verknüpften Fluorophors IANBD Amid.....	136

5.5	Röntgenstrukturanalysen an p21(mod).....	138
5.5.1	Allgemeine Struktur.....	140
5.5.2	Alternative Hauptkettenkonformationen	141
5.5.3	Vergleich von p21(mod)•R-caged GTP mit p21(wt)•R-caged GTP	143
5.5.4	Vergleich von p21(mod)•S-caged GTP mit p21(mod)•R-caged GTP	148
5.5.5	p21(mod)•GDP und p21(mod)•R-caged GTP→GDP	151
5.5.6	p21(mod)•R-caged GTP→GTP	154
5.5.7	p21(mod)•GppNHp.....	155
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	158
6.1	Kinetische Fluoreszenzspektroskopie mit dem FLUMIX- Fluoreszenzspektrometer	158
6.2	Kristallstrukturanalyse an p21(mod)	161

Abkürzungen

2-NPE	2-Nitrophenylethyl
AO	Atom-Orbital
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asr	Aminosäurerest
B _r	Remanente Flussdichte
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
<i>caged</i> GTP	Guanosin-5'-triphosphat- <i>P</i> ³ -[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester]
<i>caged</i> P _i	2-Nitrophenylethyl-phosphat
CCD	<i>charge coupled device</i>
CHCA	α-Cyano-4-hydroxymizsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS	<i>electro spray ionisation mass spectroscopy</i>
FLUMIX	Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von intermediären Zuständen in der Röntgenkristallographie (<i>FLU</i> orescence spectroscopy to <u>M</u> onitor <u>I</u> ntermediates in <u>X</u> -ray crystallography)
FTIR-Spektroskopie	Fouriertransform-Infrarot-Spektroskopie
GAP	GTPase-aktivierende Proteine (<i>GTPase accelerating proteins</i>)
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GMP	Guanosinmonophosphat
GNBP	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
GppCH ₂ p	Guanosin-5'-(β,γ-methylene)-triphosphat
GppNHp	Guanosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat
GTO	<i>gaussian type orbital</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HF-SCF	<i>Hartree-Fock self consistent field</i>

IANBD Amid	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>N</i> -(iodoacetyl)- <i>N</i> -(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-ethylendiamin
IANBD Ester	<i>N</i> -((2-(Iodoacetoxy)-ethyl)- <i>N</i> -methyl)-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
ID	Innendurchmesser
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
MAD	multiple anomale Dispersion (<i>multiple anomalous dispersion</i>)
MALDI-MS	<i>matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectroscopy</i>
mant dGppNHp	3'- <i>O</i> -(<i>N</i> -Methyl-anthraniloyl)-2'-desoxy-guanosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat
mant GTP	3'- <i>O</i> -(<i>N</i> -Methyl-anthraniloyl)-guanosin-5'-triphosphat
MIR	multipler isomorpher Ersatz (<i>multiple isomorphous replacement</i>)
MO	Molekül-Orbital
MR	molekularer Ersatz (<i>molecular replacement</i>)
NBDCI	4-Chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol
NTCB	2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Lichtwellenlänge von 600 nm
OPO	Optischer parametrischer Oszillator (<i>optical parametric oscillator</i>)
p21(mod)	H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S, C32-IANBD-amid)•Mg ²⁺
p21(mod)•R-caged GTP→GDP	H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S, C32-IANBD-amid)•Mg ²⁺ •GDP (Hierbei wurde das im Komplex gebundene GDP im Kristall durch Photolyse und anschließende Hydrolyse aus dem Ausgangsnukleotid R-caged GTP erzeugt.)
p21(wt)	H-Ras p21 (Asr 1-166)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QM/MM-Untersuchungen	quantenmechanische/molekularmechanische Untersuchungen
R/S-caged GTP	Guanosin-5'-triphosphat- <i>P</i> ³ -[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester] (Gemisch aus R- und S-Diastereomeren)
R-caged GTP	Guanosin-5'-triphosphat- <i>P</i> ³ -[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester] (R-Diastereomer)
rms	<i>root mean square</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SAD	einfache anomale Dispersion (<i>single anomalous dispersion</i>)

S-caged GTP	Guanosin-5'-triphosphat- P^3 -[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester] (S-Diastereomer)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIR	einfacher isomorpher Ersatz (<i>single isomorphous replacement</i>)
SR	<i>signal recognition particle receptor</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
STO	<i>slater type orbital</i>
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
VIS	sichtbarer Spektralbereich
XAS	<i>x-ray absorption spectroscopy</i>

1 Einleitung

1.1 Kinetische Kristallographie

Eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen ist die Röntgenkristallographie. Dabei wird ein Kristall des zu untersuchenden Makromoleküls hergestellt und die dreidimensionale Struktur des Moleküls anhand der Diffraktion (Beugung) von Röntgenstrahlung ($\sim 1 \text{ \AA}$ Wellenlänge) am Kristall bestimmt. Im Gegensatz zu anorganischen Kristallen können Kristalle biologischer Makromoleküle nicht als völlig starre, unbewegliche Gebilde angesehen werden. So bestehen die meisten Proteinkristalle zu mehr als 50 % aus Wasser und beinhalten große Kanäle, durch die ein Austausch von kleinen Molekülen stattfinden kann. Einige Enzyme sind selbst in kristallinem Zustand aktiv, können also ihre biologische Funktion, wie beispielsweise die Katalyse einer Reaktion, auch im kristallinen Zustand ausführen. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Röntgendiffraktion auch für kinetische Untersuchungen an Proteinkristallen einzusetzen. Im Idealfall kann so der vollständige Reaktionsweg eines Proteins mit atomarer Auflösung bestimmt werden (Hajdu *et al.*, 2000; Mozzarelli und Rossi, 1996; Ren *et al.*, 2001; Scheidig *et al.*, 1999; Schlichting, 2000; Stoddard, 1998). In den letzten Jahren hat sich eine Vielzahl neuer Methoden entwickelt, um makromolekulare Kristalle bei Raumtemperatur zu handhaben (Kiefersauer *et al.*, 2000; Sjogren *et al.*, 2002; Stoddard und Farber, 1995), Reaktionen in einem Kristall zu initiieren und intermediäre Zustände anzureichern (O'Hara *et al.*, 1995; Scheidig *et al.*, 1998; Specht *et al.*, 2001; Stoddard, 2001; Ursby *et al.*, 2002), eine schnelle Datensammlung zu bewerkstelligen um kurzlebige intermediäre Zustände beobachten zu können (Berglund *et al.*, 2002; Duke *et al.*, 1994; Goody *et al.*, 1992; Schlichting *et al.*, 1990) und um herauszufinden, an welchem Punkt eines Reaktionsweges sich ein Kristall gerade befindet (Bourgeois *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1994; Hadfield und Hajdu, 1993; O'Hara *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 2002; Weik *et al.*, 2004).

In der kinetischen Röntgenkristallographie muss zunächst eine Reaktion in dem zu untersuchenden Kristall initiiert werden. Anschließend werden zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsinitiierung röntgenographische Datensätze vom Kristall aufgezeichnet. Durch Röntgen-Diffraktionsexperimente sind jedoch nur Momentaufnahmen der Kristallstruktur möglich, und die Diffraktionsfähigkeit eines Kristalls nimmt meist bereits

nach der Messung von einem oder wenigen vollständigen Datensätzen stark ab. Es ist deshalb unerlässlich, den gemessenen Momentaufnahmen einen Punkt entlang eines Reaktionsweges zuordnen zu können, um durch Kombination von vielen Momentaufnahmen die vollständige Dynamik des untersuchten biologischen Makromoleküls rekonstruieren zu können. Häufig erfolgt diese Zuordnung über destruktive Analyse-Methoden wie beispielsweise HPLC, bei denen der Kristall nach einem Röntgen-Diffraktionsexperiment zerstört werden muss, um Informationen über den Kristall-Zustand zu erhalten. Diese Methode hat den Nachteil, dass der Kristall nach der Analyse nicht mehr für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht, was das Diffraktionsexperiment letztlich auf einen Messpunkt pro Kristall reduziert. Außerdem ist nicht sichergestellt, dass der Kristall auch vor dem Röntgen-Experiment schon diesen Zustand eingenommen hatte, es kann also nicht kontrolliert werden, ob die Röntgenbestrahlung selbst eine Veränderung im Kristall hervorgerufen hat. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von Redox-Reaktionen relevant, da Röntgenstrahlung einen stark reduzierenden Einfluss auf makromolekulare Kristalle hat, was in einigen Untersuchungen sogar direkt zur Herbeiführung eines reduzierten Kristall-Zustands ausgenutzt wurde (Schlichting *et al.*, 2000).

Andere Methoden, wie Video-Absorptions-Spektroskopie (O'Hara *et al.*, 1995), Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie arbeiten zerstörungsfrei und können dadurch auch für eine Untersuchung des Kristalls vor dem Röntgen-Diffraktionsexperiment bzw. für einen Vergleich des Kristallzustands vor und nach dem Experiment eingesetzt werden (Bourgeois *et al.*, 2002; Hadfield und Hajdu, 1993; Sakai *et al.*, 2002; Weik *et al.*, 2004). Aber auch wenn eine Methode zerstörungsfrei eingesetzt werden kann, kann der Kristallzustand im Allgemeinen nur vor und/oder nach einem Diffraktionsexperiment bestimmt werden. Nur in wenigen Fällen ist eine kontinuierliche Verfolgung des Zustands eines Kristalls während eines Röntgen-Diffraktionsexperiments möglich.

1.2 Kombination von Fluoreszenzspektroskopie und kinetischer Kristallographie

Ein großes Problem bei der Kombination von zusätzlichen Analysemethoden mit einem Röntgen-Diffraktionsexperiment ist der stark limitierte Platz um den zu untersuchenden Kristall (s. Abbildung 1).

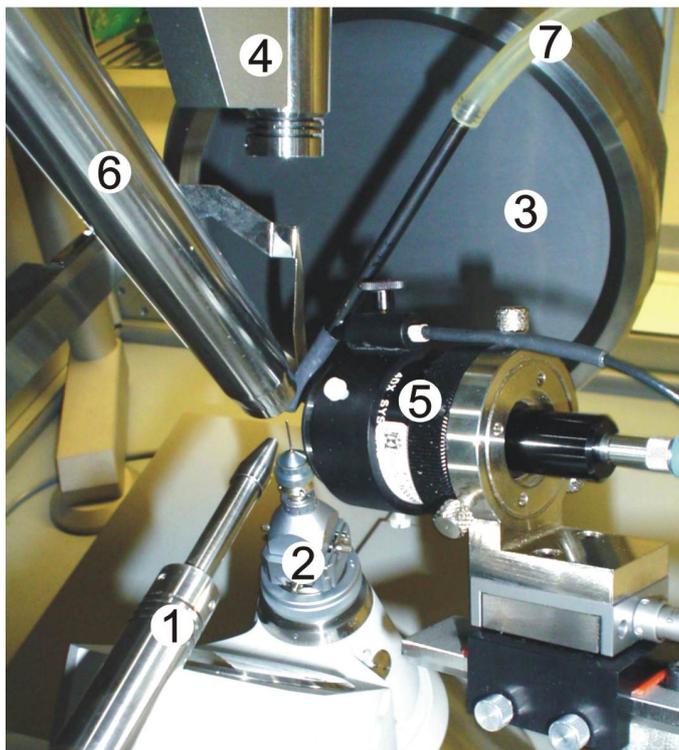


Abbildung 1: Platzausnutzung um den Kristall in einem Röntgen-Diffraktionsexperiment an einer Xcalibur PX Ultra Labor-Röntgenquelle. 1: Röntgen-Kollimator; 2: Goniometerkopf mit in einer Nylon-Schleife montiertem Kristall; 3: CCD-Röntgen-Detektor; 4: Kamera zur optischen Begutachtung des Kristalls; 5: Spiegelobjektiv für FLUMIX-Fluoreszenzexperimente (s. Kapitel 5.2.5); 6: Zuführung eines kalten Stickstoff-Stroms; 7: Zuführung eines feuchten Gas-Stroms

In einem kinetischen Röntgen-Diffraktionsexperiment müssen viele unterschiedliche Gerätschaften in der Nähe des Kristalls positioniert werden. Dies sind der Kollimator, aus welchem der Röntgenstrahl austritt, der Goniometerkopf, worauf der Kristall montiert wird, der Detektor, mit dem die Datensammlung erfolgt, eine Kamera zur optischen Kontrolle der Kristall-Orientierung sowie die Zuführung eines Gasstroms, um den Kristall stabil zu halten. Für letzteres kommt entweder ein kalter Stickstoff- oder Helium-Strom in Frage, der den Kristall im eingefrorenen Zustand stabil hält oder ein feuchter Gas-Strom, der den Kristall bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes vor dem Austrocknen schützt. Zusätzlich

kommt oft noch ein Detektor für Röntgenfluoreszenz-Messungen (s. Kapitel 2.3.3) hinzu. Um neben all diesen Gerätschaften noch einen zweiten Aufbau für ein weiteres, von dem Diffraktionsexperiment unabhängiges Experiment in der Nähe des Kristalls unterzubringen, muss der zweite Aufbau sehr kompakt sein.

Als Beispiel für eine kombinierte UV-VIS-Absorptionsmessung mit einem Röntgenexperiment sei die Arbeit von Karlsson *et al.* (2000) genannt, bei welcher die Röntgen-induzierte Reduktion von Eisen-Schwefel-Clustern untersucht wurde. Diese Arbeit wurde in Kombination mit einer Rigaku RU100 (Labor)- Röntgenquelle durchgeführt. UV/VIS Absorptionsmessungen an makromolekularen Kristallen sind mit vielen Problemen verbunden. Zum einen muss sichergestellt werden, dass kein Anregungslicht durch Reflektionen, Streuung oder einfach aufgrund einer ungenauen Fokussierung der Strahlengänge direkt in den Detektor gelangen kann, ohne vorher den Kristall durchstrahlt zu haben. Da makromolekulare Kristalle für gewöhnlich einen Durchmesser von etwa 50-300 μm aufweisen, ist diese Bedingung technisch nicht leicht umzusetzen. Zum anderen sollte das Anregungslicht optimalerweise eine konstante Schichtdicke des Kristalls durchstrahlen, um auswertbare Spektren zu erhalten. Die durchstrahlte Schichtdicke darf aufgrund der hohen optischen Dichte von biologischen Kristallen nicht zu hoch sein, da sonst das Anregungslicht vollständig vom Kristall absorbiert wird. Schon bei einer Schichtdicke von 50 μm liegt die optische Dichte eines Proteinkristalls meist in der Größenordnung von $OD \sim 1-5$ am Absorptionsmaximum.

Für die genannten Anforderungen wären also Kristalle in Form von ausgedehnten, dünnen Plättchen ideal. Leider ist eine solche Kristallform für Röntgen-Diffraktionsexperimente denkbar ungeeignet. Für die Röntgenkristallographie sind voluminöse, kompakte Kristalle zu bevorzugen, da diese eine bessere mechanische Stabilität aufweisen und für Diffraktionsexperimente ein möglichst großes Streuvolumen benötigt wird. Man erkennt, dass für eine Kombination von UV-VIS-Absorptionsmessungen mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten in jedem Fall ein Kompromiss zwischen den beiden Extremen der Kristallform eingegangen werden muss. Da die Form eines Kristalls nur selten gezielt beeinflusst werden kann, sind solche kombinierten Untersuchungen nur an wenigen Systemen leicht anwendbar. Oft führt eine ungeeignete Kristallform bei Absorptionsmessungen zu Artefakten aufgrund einer inhomogenen Schichtdicke und/oder aufgrund von Anregungslicht, das direkt in den Detektor gelangt, ohne den Kristall zu durchstrahlen.

Für Untersuchungen an Kristallen biologischer Makromoleküle hat die Fluoreszenzspektroskopie gegenüber der Absorptionsspektroskopie einige entscheidende Vorteile. Zum einen ist das emittierte Fluoreszenzlicht gegenüber dem Anregungslicht zu höheren Wellenlängen hin verschoben (*Stokes-Verschiebung*, s. Kapitel 2.1.1). Durch geeignete optische Filter kann deshalb das Anregungslicht leicht vom Fluoreszenzspektrum getrennt werden, wodurch Artefakte effektiv verhindert werden können. Da Fluoreszenz ein ungerichtetes Phänomen ist, ist der Winkel zwischen Anregungslicht und Detektor frei variabel, was die Integration des Spektrometers in den komplexen Aufbau eines Röntgen-Diffraktometers stark vereinfacht. Es ist sogar möglich, Fluoreszenzanregung und Detektion des Fluoreszenzspektrums durch dasselbe Objektiv zu bewerkstelligen (s. Kapitel 5.2.6). Die Form des Kristalls ist für die Fluoreszenz-Spektroskopie nur von untergeordneter Bedeutung, da durch „*Front-Face*“-Fluoreszenzmessungen (s. Kapitel 2.1.2) auch Untersuchungen an Kristallen mit hoher optischer Dichte und an praktisch jeder denkbaren Kristallform möglich sind. Hinzu kommt, dass die Fluoreszenz-Eigenschaften eines biologischen Makromoleküls im Allgemeinen auf eine oder wenige funktionelle Gruppen zurückzuführen sind, wodurch Fluoreszenz-Spektren tendenziell leichter zu interpretieren sind als UV/VIS-Absorptionsspektren. Des Weiteren zeigen viele Fluorophore schon bei geringen Veränderungen ihrer chemischen Umgebung sehr starke Veränderungen in ihren Fluoreszenzeigenschaften, was für kinetische Untersuchungen sehr von Vorteil ist. Bourgeois *et al.* (2002) und Weik *et al.* (2004) entwickelten zeitgleich mit der Entstehung dieser Arbeit ein Mikrospektrophotometer für kinetische UV/VIS-Absorptionsexperimente und Fluoreszenzmessungen an Kristallen biologischer Makromoleküle, welches allerdings nicht für die Kombination mit einem Röntgen-Diffraktometer konzipiert wurde.

1.3 H-Ras p21

H-Ras p21 ist ein kleines, Guanosin-Nukleotid bindendes Protein mit einer im Vergleich zu anderen GTPasen relativ geringen GTPase-Aktivität ($t_{1/2} = 18,7$ min bei 37 °C; (John *et al.*, 1989)). Es kann von einer aktiven, GTP-gebundenen Form zu einer inaktiven, GDP-gebundenen Form hin- und herwechseln, und kann insofern als molekularer Schalter verstanden werden. H-Ras p21 ist an einer Vielzahl von intrazellulären Signal-Transduktionswegen beteiligt, wobei es in seiner aktiven Form verschiedene Effektor-Moleküle wie Raf, RalGDS und PI3K binden kann (Herrmann, 2003). Beim Übergang

zwischen der aktiven und inaktiven Form verändert sich die Konformation des Proteins hauptsächlich in zwei Regionen, den Schalter-Regionen I und II. Wie von Schlichting *et al.* (1989) gezeigt wurde, kann die GTP-Hydrolyse in H-Ras p21 selbst im kristallinen Protein stattfinden. Um die Hydrolyse-Reaktion in kristallinem p21 zu untersuchen, kann das Protein mit dem hydrolysestabilen, lichtempfindlichen GTP-Analogen Guanosin-5'-triphosphat- P^3 -[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester] (*caged* GTP) kokristallisiert werden. Durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda \sim 350$ nm kann anschließend durch photolytische Spaltung von *caged* GTP im Kristall GTP freigesetzt und damit die GTP-Hydrolysereaktion gestartet werden (Scheidig *et al.*, 1998).

1.4 Zielsetzung

Die Röntgenkristallographie entwickelt sich in jüngster Zeit zunehmend von einer rein statischen Methode zu einer Möglichkeit, kinetische Untersuchungen an biologischen Makromolekülen bei atomarer Auflösung durchzuführen. Um einem röntgenographischen Datensatz einen Punkt entlang eines Reaktionsweges zuordnen zu können, ist eine unabhängige Analysemethode wichtig, mit der während eines Röntgen-Diffraktionsexperiments kontinuierlich der Kristallzustand verfolgt werden kann. Bis zum heutigen Zeitpunkt stehen nur sehr wenige Methoden zur Verfügung, die eine solche korrelierte Messung ermöglichen. Insbesondere eine Kombination mit dem meist recht komplexen Aufbau eines Synchrotron-Röntgendiffraktometers ist aufgrund des benötigten Platzbedarfs nur in Ausnahmefällen möglich. Ziel dieser Arbeit war es, ein Fluoreszenzspektrometer zu entwickeln, das für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen in Kombination mit Diffraktionsexperimenten an einer Synchrotron-Röntgenquelle geeignet ist. Dazu war ein hoher Miniaturisierungsgrad und ein flexibler Aufbau des Spektrometers notwendig, um die Kombination mit verschiedenen Diffraktometer-Konfigurationen zu ermöglichen.

Als biologisches Modellsystem wurde eine modifizierte Form von H-Ras p21 verwendet. Anhand des Modellsystems sollte gezeigt werden, dass kinetische Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinkristallen sich nicht auf einige Spezialfälle beschränken, sondern sich unter gewissen Voraussetzungen auch an Systemen anwenden lassen, die wie H-Ras p21 im unmodifizierten Zustand weder über eine intrinsische Fluoreszenz noch über eine Möglichkeit zur Reaktionsinitiierung im kristallinen Zustand

verfügen. H-Ras p21 sollte in einer geeigneten Art und Weise modifiziert werden, um am kristallinen Protein kinetische Fluoreszenzuntersuchungen in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten an einer Synchrotron-Strahlquelle durchführen zu können. Um die erhaltenen Daten richtig interpretieren zu können, sollte des weiteren die Kristallstruktur des modifizierten Proteins im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden bestimmt und auf etwaige Unterschiede zum Wildtyp-Protein hin untersucht werden.

2 Theorie

2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie ist eine der meistverwendeten spektroskopischen Methoden im Bereich der Biochemie und molekularen Biophysik. Die hohe erreichbare Empfindlichkeit und ein meist relativ unkomplizierter Versuchsaufbau ermöglichen eine Vielzahl von Anwendungen, die von einfachen Messungen der Gleichgewichts-Emissionsintensität bis hin zu komplexen zeitaufgelösten Untersuchungen reichen. Viele Fluorophore zeigen eine hohe Sensitivität in Bezug auf Umgebungsänderungen, was man sich bei der Untersuchung von strukturellen und dynamischen Eigenschaften von fluoreszenten Biomolekülen oder biomolekularen Komplexen zunutze machen kann.

2.1.1 Allgemeine Grundlagen

Fluoreszenzspektroskopie beruht auf dem Rückfall eines Moleküls von einem elektronisch angeregten Singulett-Zustand $S_{1...n}$ zum elektronischen Grundzustand S_0 , bei dem Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Die relevanten Energieübergänge werden oft vereinfacht in einem *Jablonski*-Diagramm dargestellt (s. Abbildung 2).

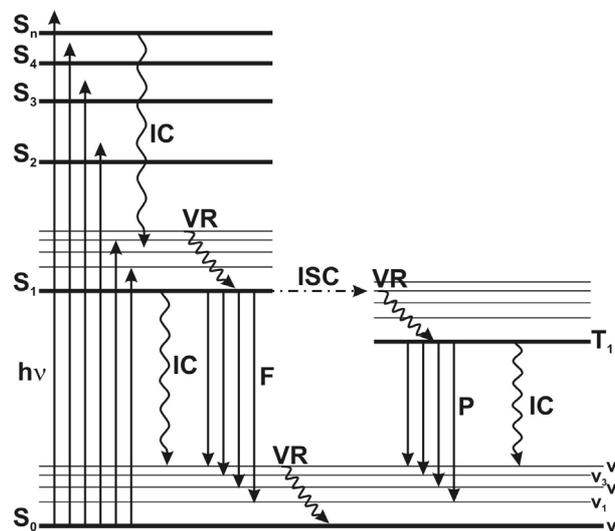


Abbildung 2: Vereinfachtes Energieniveau-Schema („Jablonski-Diagramm“) zur Darstellung der wichtigsten energetischen Übergänge, die zu Fluoreszenz (F) oder Phosphoreszenz (P) führen. IC: *internal conversion* (strahlungslose Deaktivierung); ISC: *intersystem crossing* (Interkombination); VR: *vibrational relaxation* (Schwingungsrelaxation); $S_{0...n}$: Singulett-Zustände; $T_{1...n}$: Triplett-Zustände. Die dünnen waagerechten Linien sind verschiedene Schwingungsniveaus $v_{0...n}$ der entsprechenden elektronischen Zustände (dicke waagerechte Linien). Rotationsniveaus sind zur Vereinfachung nicht dargestellt.

Fluoreszenz-Anregung eines Moleküls erfolgt nach dem *Franck-Condon*-Prinzip (Atkins, 1990) von besetzten (niedrigen) Schwingungszuständen des elektronischen Grundzustands S_0 in höhere Schwingungszustände eines elektronisch angeregten Zustands $S_{1...n}$. Diese Übergänge finden in einem Zeitbereich von etwa 10^{-15} s statt und sind auch verantwortlich für die Struktur des Absorptionsspektrums im UV- und sichtbaren Bereich. In Lösung relaxieren angeregte Moleküle nach der *Kasha*-Regel (Kasha, 1950) sehr schnell ($\sim 10^{-12}$ s) in eine *Boltzmann*-Verteilung der Schwingungszustände des ersten angeregten Singulett-Zustands S_1 zurück. Diese Relaxation verläuft strahlungsfrei unter Abgabe von Schwingungsenergie an benachbarte Lösungsmittelmoleküle. Der als *Stokes*-Verschiebung oder *Stokes-Shift* bekannte Unterschied zwischen den Maxima der Absorptions- und Emissions-Wellenlängen eines Fluorophors beruht unter anderem auf dem bei der Schwingungsrelaxation auftretenden Energieverlust. Ein weiterer Faktor, der mit für die *Stokes*-Verschiebung verantwortlich ist, ist eine energetische Absenkung des angeregten Zustands durch Umorientierung von Lösungsmittelmolekülen innerhalb von etwa 10^{-11} s (Solvatochromie).

Während für den Rückfall von $S_{2...n}$ nach S_1 die strahlungslose Deaktivierung der weitaus wahrscheinlichste Mechanismus ist, kann ein Rückfall von S_1 nach S_0 sowohl strahlungslos als auch unter Emission eines Fluoreszenz-Photons erfolgen. Das Verhältnis zwischen beiden Vorgängen bestimmt dabei die Quantenausbeute des Fluorophors. Substanzen, die nahezu ausschließlich durch strahlungslose Deaktivierung in den Grundzustand zurückkehren, bezeichnet man als nicht fluoreszent, während Fluorophore mit einer Quantenausbeute von eins zu 100 % unter Emission eines Photons nach S_0 zurückkehren.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ repräsentiert die mittlere Verweilzeit ($\langle \tau \rangle$) eines Fluorophors im angeregten Zustand und liegt meist bei etwa $\tau = 10^{-8}$ s. Der größtmögliche Wert, den τ unter Abwesenheit aller strahlungslosen Prozesse annehmen kann, wird als „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer τ_F bezeichnet. Verschiedene molekulare Prozesse wie Stoßlöschung, chemische Reaktionen aus dem S_1 -Zustand oder Komplexbildung im Grund- und angeregten Zustand können eine Fluoreszenzlöschung (*quenching*) hervorrufen. Dabei wird durch strahlungslose Deaktivierung die Fluoreszenzlebensdauer und damit auch die Quantenausbeute eines Fluorophors herabgesetzt.

Eine Sonderform der Fluoreszenzlöschung stellt der resonante Energietransfer (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer, FRET) dar. Dabei regt ein Donor-Fluorophor bei der Relaxation von S_1 nach S_0 strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen einen Akzeptor-Fluorophor an, der seinerseits dann durch Fluoreszenz in den Grundzustand zurückfallen kann. Da dieser Energieübertrag stark vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängt, lassen sich durch FRET-Analysen molekulare Distanzen ($\sim 10\text{-}100 \text{ \AA}$) messen, was in den letzten Jahrzehnten zu einer wachsenden Bedeutung dieser Methode im Bereich der Biochemie und molekularen Biophysik geführt hat.

Eine weitere Möglichkeit der Relaxation des angeregten Zustands S_1 in den Grundzustand ist die Phosphoreszenz. Dabei geht zunächst ein Molekül vom S_1 -Zustand unter Spinumkehr in einen Triplett-Zustand T_1 über. Dieser Interkombinationsübergang erfolgt isoenergetisch in ein schwingungsangeregtes Niveau von T_1 . Durch Schwingungsrelaxation wird schnell eine *Boltzmann*-Verteilung der Schwingungszustände erreicht, was also eine weitere Rotverschiebung der Phosphoreszenz gegenüber der direkten Emission eines Fluoreszenz-Photons aus S_1 bedeutet. Da die Emission eines Phosphoreszenz-Photons bei der Relaxation von T_1 in den Grundzustand S_0 ein spinverbotener Interkombinationsübergang ist, ist der T_1 -Zustand sehr langlebig ($\tau > 10^{-4} \text{ s}$, bis hin zu mehreren Minuten).

2.1.2 Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Im einfachsten Fall besteht ein Fluoreszenzspektrometer aus einer Anregungslichtquelle, der Fluoreszenzküvette, einem Detektor und geeigneten Monochromatoren und/oder optischen Filtern zur Wellenlängenselektion vor und nach der Fluoreszenzküvette. Diese grundlegenden Einheiten sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

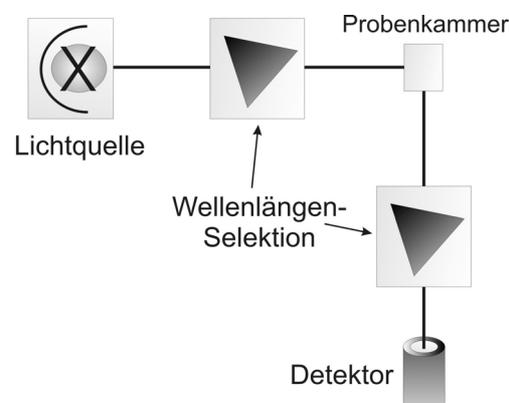


Abbildung 3: Die wichtigsten Komponenten eines Fluoreszenzspektrometers

Anders als bei einem Absorptionsspektrometer wird in der Fluoreszenzspektroskopie in der Regel monochromatisches Licht für die Anregung genutzt. Bei der Verwendung einer weißen Lichtquelle ist deshalb eine Wellenlängenselektion vor der Probenkammer notwendig, welche nur den benötigten Spektralbereich des Anregungslichts zur Fluoreszenzküvette durchlässt. Zu diesem Zweck werden oft Gitter-Monochromatoren oder in älteren Spektrometern Prismen eingesetzt. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung eines optischen Filters. Optische Filter haben den Vorteil eines sehr geringen Platzbedarfs und Preises, allerdings kann die Anregungswellenlänge nicht variiert werden, so dass für eine gewisse Flexibilität des Versuchsaufbaus im Allgemeinen ein Satz aus verschiedenen Filtern notwendig ist. Für die Fluoreszenzspektroskopie ist meist eine hohe Intensität des Anregungslichts vorteilhaft. Eine hohe Lichtintensität bei einer scharfen Wellenlängeneingrenzung des emittierten Spektrums einer weißen Lichtquelle ist technisch nicht leicht umzusetzen. Deshalb werden oft Linienstrahler wie eine Quecksilber-Dampfentladungslampe verwendet, welche eine hohe Intensität bei wenigen charakteristischen Wellenlängen emittiert. Noch besser geeignet sind in dieser Beziehung Laser- oder LED-Lichtquellen, die von Ihrer Natur her nur Licht einer oder weniger Wellenlängen emittieren.

Für die Fluoreszenzdetektion kann ein Punktzähler wie z.B. ein Photomultiplier mit vorgeschaltetem Monochromator verwendet werden. Derartige Detektoren sind im Allgemeinen etwas empfindlicher als Linienzähler, haben aber den Nachteil, dass die zu messenden Spektren Punkt für Punkt aufgenommen werden müssen, was die mögliche Auslesezeit eines Spektrums stark limitiert. Linienzähler wie z.B. ein CCD-Detektor bestehen im Gegensatz dazu aus einer Anordnung von vielen einzelnen Detektor-Einheiten (Pixeln) und können dadurch ein vollständiges Fluoreszenz-Spektrum innerhalb weniger Millisekunden aufnehmen. Deshalb sind solche Linien-Detektoren insbesondere für kinetische Untersuchungen bei mehreren Wellenlängen zu bevorzugen.

In fast allen kommerziell erhältlichen Fluoreszenzspektrometern erfolgt die Fluoreszenzdetektion im 90° -Winkel zum Anregungslicht. Diese Geometrie hat den Vorteil, dass nur ein Minimum des Anregungslichts in Richtung des Fluoreszenz-Detektors gestreut oder reflektiert wird und somit nicht nachträglich aus dem zu messenden Fluoreszenz-Spektrum herausgefiltert werden muss. Eine solche Anordnung ist aber nicht zwingend notwendig, da Fluoreszenz ein ungerichtetes Phänomen ist, also in alle Raumrichtungen dieselbe Fluoreszenz-Intensität abgestrahlt wird. Die Fluoreszenzdetektion ist deshalb

prinzipiell in einem beliebigen Winkel zum Anregungslicht möglich. In einer herkömmlichen Küvette, die für eine gleichmäßige Anregung des ganzen Probenvolumens konzipiert ist, ist die Analyse von optisch sehr dichten Medien wie z.B. Blut oft problematisch. In solchen Fällen kann in einer geeigneten Versuchsanordnung nur die Fluoreszenz der Proben-Oberfläche gemessen werden. Die dafür notwendige „*Front-Face*“-Geometrie (Eisinger und Flores, 1979) ist in Abbildung 4 dargestellt.

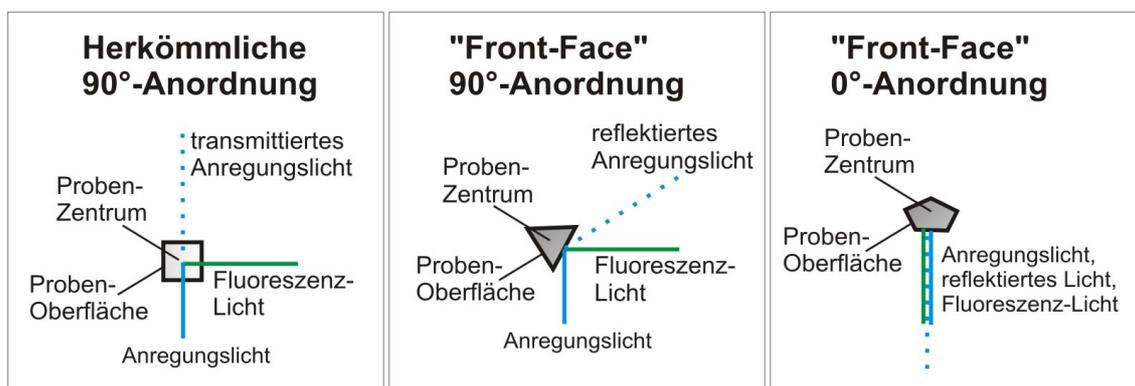


Abbildung 4: Verschiedene Geometrien zur Fluoreszenzdetektion

Die Probenoberfläche wird in der „*Front-Face*“-Fluorometrie so ausgerichtet, dass sie sowohl zum Anregungslicht als auch zum Detektor einen günstigen Winkel einnimmt. Für konventionelle Fluoreszenzspektrometer mit einem 90° -Winkel zwischen Anregungslicht und Detektor sind spezielle Dreiecks-Küvetten erhältlich, durch die ein Winkel von 34° bzw. 56° zwischen der Probenoberfläche und dem Anregungslicht eingestellt wird (Eisinger und Flores, 1979). Dadurch wird eine direkte Reflektion des Anregungslichts in den Detektor vermieden (s. Abbildung 4). Aber auch bei einer 0° -Anordnung, in der eine geometrische Trennung des Fluoreszenzlichts vom reflektierten Anregungslicht nicht möglich ist, kann bei ausreichend großer *Stokes*-Verschiebung des zu untersuchenden Fluorophors das Anregungslicht leicht z.B. durch optische Filter entfernt werden. Eine solche 0° -Orientierung wurde in dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer realisiert (s. Kapitel 5.2.6).

2.1.3 Fluoreszenzmarkierung und Fluoreszenzspektroskopie an biologischen Makromolekülen

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine häufig eingesetzte Methode zur Analyse der Lokalisation, Funktion und Wechselwirkung von biologischen Makromolekülen. Gegenüber der Absorptionsspektroskopie hat die Fluoreszenzspektroskopie den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität und Selektivität. Nur wenige biologische Makromoleküle zeigen eine ausgeprägte intrinsische Fluoreszenz, so dass auch in komplexen Systemen wie einer lebenden Zelle Analysen mit sehr geringem Hintergrund-Signal möglich sind. Da es sich um eine nicht-invasive Methode handelt, sind auch kinetische Fluoreszenzuntersuchungen *in vivo* möglich.

Um Fluoreszenzuntersuchungen auch an Molekülen ohne Primär-Fluoreszenz durchführen zu können, können durch verschiedene Methoden Fluorophore an die zu untersuchenden Moleküle gebunden werden. Zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen werden häufig Fusionsproteine aus dem zu untersuchenden Protein und z.B. grün-fluoreszierendem Protein (GFP) verwendet. GFP bildet in einem autokatalytischen Prozess sein fluorophores Zentrum bereits während der Expression aus, so dass keine weitere Nachbehandlung des Fusionsproteins notwendig ist. Allerdings wird durch GFP mit seinen über 200 Aminosäureresten die Größe des Proteins erheblich verändert, was bei einigen Experimenten zu Problemen führen kann. Eine andere Methode ist die Kopplung eines kleinen fluoreszenten Moleküls, das nur einen unerheblichen Anteil an der Gesamtmasse des Proteins ausmacht.

Für viele Untersuchungen von Protein-Interaktionen, z.B. bei Fluoreszenz-Polarisationsexperimenten, ist die genaue Lage des Fluorophors nicht relevant, solange die Interaktion mit dem Bindungspartner nicht beeinflusst wird. Es ist somit oft ausreichend, einen wenig spezifisch bindenden Fluorophor zur Kopplung zu verwenden. So binden beispielsweise Amin-reaktive Fluorophore bei pH -Werten von $pH \sim 9$ hauptsächlich an Lysin-Reste, die in praktisch jedem Protein in ausreichender Menge vorhanden sind.

Viele Fluorophore zeigen eine starke Sensitivität auf Veränderungen in ihrer chemischen Umgebung. Diese Eigenschaft kann für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen oder zur Untersuchung der dynamischen Eigenschaften eines Proteins genutzt werden. Dazu wird ein geeigneter Fluorophor an eine Region des zu untersuchenden Makromoleküls gekoppelt, in dessen Nähe starke Änderungen während des zu untersuchenden Ereignisses zu erwarten

sind. Anhand von Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors können daraufhin Rückschlüsse auf die Natur und die Kinetik des untersuchten Ereignisses getroffen werden.

Nur in wenigen Systemen ist in der zu untersuchenden Protein-Region eine geeignete Fluorophor-Bindungsstelle bereits vorhanden. So können beispielsweise in Nukleotid-bindenden Proteinen fluoreszente Nukleotid-Analoga wie 3'-*O*-(*N*-Methyl-anthraniloyl)-2'-desoxy-guanosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat (mant dGppNHp) (Goody *et al.*, 1992) eingesetzt werden. Diese Methode hat sich für eine Vielzahl von Untersuchungen bewährt, jedoch gibt es einige Beispiele, in denen die Interaktion von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (GNBPs) mit Bindungspartnern nur eine geringe oder überhaupt keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften hervorruft. Wenn im nativen Protein keine geeignete Möglichkeit der Einbringung eines Fluorophors existiert, kann das Protein z.B. durch Punktmutationen in einer Art und Weise modifiziert werden, die eine selektive Kopplung des gewünschten Fluorophors ermöglicht. Die Kopplung von Thiol-reaktiven Fluorophoren an ein künstlich eingeführtes Cystein stellt hierbei eine besonders attraktive Methode dar, da die meisten Proteine nur wenige für eine Kopplung zugängliche Cysteine aufweisen und somit nur geringe Modifikationen am zu untersuchenden Protein vorgenommen werden müssen. Da die gezielte Proteinmodifikation und die Etablierung einer selektiven, irreversiblen und im Idealfall stöchiometrischen Fluoreszenzmarkierung in der gewünschten Proteinregion eine genaue Kenntnis der Struktur und Interaktionsflächen des zu untersuchenden Proteins voraussetzt, werden derartige Experimente nur selten durchgeführt. Es handelt sich aber dennoch um eine effiziente Methode, durch welche sehr detaillierte Informationen über die Dynamik und die Interaktionsmöglichkeiten eines Proteins erhalten werden können.

2.2 Proteinkristallisation

Unter bestimmten Bedingungen ordnen sich viele molekulare Substanzen zu einer geordneten, periodischen Struktur an, die man als Kristall bezeichnet. Selbst große biologische Makromoleküle wie Proteine und sogar ganze Viren können kristalline Strukturen ausbilden. So liegt beispielsweise das Protein Bakteriorhodopsin bereits in der Purpurmembran des Bakteriums *Halobacterium salinarium* in Form eines zweidimensionalen Kristalls vor (Unwin und Henderson, 1975). Kristalle können verwendet werden, um durch Diffraktionsexperimente die dreidimensionale Struktur der kristallinen Substanz mit im Idealfall atomarer Auflösung zu bestimmen. Da es nur sehr selten vorkommt, dass ein biologisches Makromolekül bereits in der Natur in kristalliner Form vorliegt, müssen im Allgemeinen erst geeignete Bedingungen gefunden werden, unter denen das zu untersuchende Makromolekül kristallisiert.

In der Proteinkristallisation wird versucht, ein in wässriger Lösung befindliches Protein durch eine langsame, kontrollierte Veränderung der Lösungsmittel-Zusammensetzung in den kristallinen Zustand zu überführen. Die Löslichkeit eines Proteins hängt von der Wechselwirkung von polaren oder ionischen Gruppen auf der Proteinoberfläche mit Wasser- oder Puffermolekülen aus dem Lösungsmittel ab. Eine hohe Konzentration von Salzen oder polaren Substanzen im Lösungsmittel führt zu einer Konkurrenz-Situation um die vorhandenen Wassermoleküle, was die Löslichkeit des Proteins reduziert („Aussalzen“). Organische Lösungsmittel können auch die Löslichkeit eines Proteins herabsetzen, allerdings haben diese oft auch einen unerwünschten denaturierenden Einfluss auf das Protein. Das wasserlösliche Polymer PEG ist ein häufig verwendetes Fällungsmittel mit sehr geringer denaturierender Wirkung. Neben der Konzentration und Art des verwendeten Fällungsmittels sind die Proteinkonzentration, der pH-Wert und die Temperatur wichtige Parameter für eine erfolgreiche Kristallisation. Oftmals ist auch die Zugabe kleiner Mengen von speziellen Chemikalien („Additiven“) sinnvoll, die spezifisch mit dem Protein interagieren und dadurch eine Veränderung der Oberflächenwechselwirkungen hervorrufen, was einen günstigen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten haben kann.

Einige der am häufigsten für die Proteinkristallisation verwendeten Kristallisationstechniken sind in Abbildung 5 dargestellt.

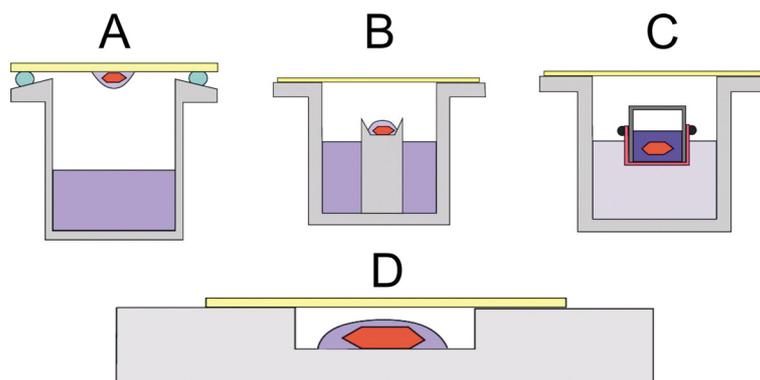


Abbildung 5: Verschiedene Kristallisationstechniken. A: Methode des hängenden Tropfens; B: Methode des sitzenden Tropfens; C: Methode der direkten Diffusion (Dialyse); D: „Eintopf-Verfahren“ ohne Konzentrationsausgleich (*batch*-Methode).

Die am häufigsten verwendeten Techniken der Proteinkristallisation beruhen auf dem Prinzip der Dampfdiffusion. Bei der Methode des hängenden Tropfens (Abbildung 5, A) werden gleiche Volumina Proteinlösung und Kristallisationslösung auf einem Glasplättchen vermischt und dieses dann über einem Reservoir aus reiner Kristallisationslösung platziert. Da die Konzentration an Fällungsmitteln im Gemisch aus Kristallisations- und Proteinlösung geringer ist als in der reinen Kristallisationslösung, wird sich der Tropfen langsam durch Dampfdiffusion aufkonzentrieren, bis ein dynamisches Gleichgewicht mit der Kristallisationslösung erreicht ist. Das Protein wird dabei von einem Bereich, in dem es gerade noch löslich ist, in eine übersättigte Lösungssituation überführt und geht dabei im Idealfall in kristalliner Form in den festen Zustand über. Die Methode des sitzenden Tropfens (*sitting drop*, s. Abbildung 5, B) basiert auf denselben Prinzipien und wird bevorzugt für größere Tropfen-Volumina angewandt. Im Gegensatz dazu wird bei der *batch*-Methode (Abbildung 5, D) von vorneherein eine leicht übersättigte Protein-Lösung angesetzt, aus der im Allgemeinen zunächst etwas Protein ausfällt, sich dann aber oft zugunsten von großen Kristallen wieder auflöst. Bei der direkten Diffusion (Abbildung 5, C) kann nicht nur ein langsamer Konzentrationsanstieg der Protein-Lösung eingestellt werden, sondern es können auch beliebige andere Gradienten gezielt realisiert werden, wie beispielsweise ein pH-Gradient oder eine abnehmende Konzentration von Substanzen, welche die Löslichkeit des Proteins erhöhen.

2.3 Röntgenographische Methoden

Eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen ist die Röntgendiffraktion. Dabei wird Röntgenlicht an einem Kristall des zu untersuchenden Makromoleküls gebeugt, und anhand der entstehenden Diffraktionsbilder bei verschiedenen Kristall-Orientierungen kann auf die beugende Struktur zurückgeschlossen werden. Je nach Qualität des verwendeten Kristalls können im Idealfall räumliche Abstände von weniger als 1 Å aufgelöst werden, was die Röntgenkristallographie zu der höchstauflösenden Methode zur Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen macht, die derzeit zur Verfügung steht. Eine noch höhere Auflösung könnte zwar theoretisch z.B. durch die Elektronenbeugung realisiert werden, aber aufgrund technischer Limitierungen werden mit dieser Methode zurzeit nur in Ausnahmefällen atomare Auflösungen erreicht. Strahlung wird nur an Objekten gebeugt, deren Dimension in der Größenordnung der Wellenlänge der verwendeten Strahlung liegt. Da interatomare Abstände in biologischen Makromolekülen in der Größenordnung von etwa 1-3 Å liegen, wird in der Röntgendiffraktion Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda \sim 1 \text{ \AA}$ eingesetzt.

2.3.1 Theorie der Röntgendiffraktion

2.3.1.1 Symmetrie von Kristallen

Ein dreidimensionaler Kristall ist ein in alle drei Raumrichtungen regelmäßig angeordneter, periodischer Körper. Aufgrund der Periodizität genügt für eine vollständige Beschreibung des Kristalls die Kenntnis der kleinsten Baueinheit, aus der sich durch verschiedene Symmetrioperationen der gesamte Kristall aufbauen lässt. Diese kleinste Baueinheit, die in sich keine weitere kristallographische Symmetrie aufweist, nennt man asymmetrische Einheit. Durch Rotation, Inversion, Spiegelung, Translation und Kombinationen dieser Symmetrioperationen kann der gesamte Kristall aus der asymmetrischen Einheit erzeugt werden. Die kleinste Einheit, aus der ausschließlich durch die Symmetrioperation Translation der gesamte Kristall aufgebaut werden kann, nennt man Einheitszelle. Eine Einheitszelle beinhaltet eine oder mehrere asymmetrische Einheiten. Die Einheitszelle wird wiederum durch ihre Zellparameter beschrieben. Dies sind die 3 Kantenlängen a , b und c und die drei Winkel α , β und γ . Anhand der Eigenschaften der Zellparameter lassen sich alle

Kristalle in insgesamt 7 Kristallsysteme unterteilen, die sich wiederum in insgesamt 14 *Bravais*-Gitter aufteilen. Durch Kombination der Gitter-Eigenschaften des Kristalls mit den Symmetrie-Eigenschaften lassen sich Kristalle in insgesamt 230 Raumgruppen unterteilen. Da die meisten biologischen Makromoleküle chirale Gruppen enthalten, können die Symmetrieeoperationen Spiegelung und Inversion im Kristall eines biologischen Makromoleküls nicht auftreten, was die Anzahl der möglichen Raumgruppen auf 65 reduziert.

2.3.1.2 Diffraktion

Ein Lichtstrahl kann näherungsweise als eine ebene, sich linear ausbreitende Wellenfront beschrieben werden. Nach dem *Huygens*'schen Prinzip kann jeder Punkt der Wellenfront als Ausgangspunkt einer sich kugelförmig ausbreitenden *Huygens*'schen Elementarwelle angesehen werden. Die Kugelwellen interagieren miteinander durch konstruktive und destruktive Interferenz, wobei sich alle Wellenanteile, die nicht in der Fortpflanzungsrichtung des Lichts liegen, in der Summe gegenseitig auslöschen. Wenn ein Lichtstrahl nun auf ein Hindernis trifft, das die Wellenfront auf eine Dimension begrenzt die in der Größenordnung der Lichtwellenlänge liegt, so werden nicht mehr alle „schrägen“ Wellenanteile ausgelöscht, und ein Teil des Lichts breitet sich in einem Winkel zur ursprünglichen Fortpflanzungsrichtung des Lichtstrahls aus. Dieses Phänomen wird als Diffraktion oder Beugung bezeichnet.

Die Atom-Abstände im Kristall eines biologischen Makromoleküls liegen in der Größenordnung der Wellenlänge von weicher Röntgenstrahlung. Trifft also weiche Röntgenstrahlung ($\sim 1 \text{ \AA}$ Wellenlänge) auf einen biologischen Kristall, so wird ein Teil der Strahlung seine Fortpflanzungsrichtung ändern. Nur unter ganz bestimmten Winkeln kann konstruktive Interferenz der gebeugten Strahlung stattfinden, so dass auf einem röntgensensitiven Detektor hinter dem Kristall ein Muster aus Punkten mit hoher Röntgenintensität erzeugt wird. Diese einzelnen Punkte werden als Reflektionen bezeichnet, da sie bei Winkeln auftreten, die einer Reflektion des Röntgenstrahls an einer Schar äquivalenter, paralleler Atom-Ebenen im Kristall entsprechen. Die Beugung an zwei solchen Ebenen, welche man auch als Gitterebenen bezeichnet, ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

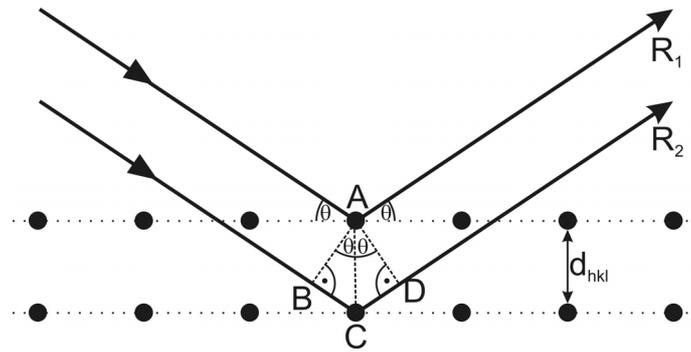


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Beugung an zwei parallelen Gitterebenen. Werden zwei Röntgenstrahlen R_1 und R_2 von benachbarten Gitterebenen mit dem Abstand d_{hkl} gebeugt, so ergibt sich ein Gangunterschied $BC+CD=2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin\theta$.

Der Gangunterschied zwischen zwei kohärenten, parallelen Röntgenstrahlen R_1 und R_2 , die an benachbarten Gitterebenen mit einem Gitterabstand d_{hkl} gebeugt werden, entspricht der Summe der Strecken $\overline{BC} + \overline{CD}$. Wenn dieser Gangunterschied ein Vielfaches der Wellenlänge λ der Strahlen ist, so interferieren die Strahlen konstruktiv. Durch einfache trigonometrische Beziehungen ergibt sich das *Bragg'sche Gesetz* (Gleichung 1), mit welchem sich somit die Winkel θ zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene bestimmen lassen, bei denen Punkte hoher Röntgenintensität auftreten:

$$2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin(\theta) = n \cdot \lambda \quad (1)$$

2.3.1.3 Miller'sche Indizes

Da jeder Reflektion genau eine Gitterebenenchar zugeordnet ist und umgekehrt jede Gitterebenenchar genau eine Reflektion erzeugen kann, ist es sinnvoll, die Reflektionen anhand der Lage ihrer zugehörigen Gitterebenen zu kennzeichnen. Dazu werden die *Miller'schen Indizes* verwendet. Wenn eine Gitterebene die Achsen der Einheitszelle eines Kristalls in den Punkten

a-Achse: $(m,0,0)$

b-Achse: $(0,n,0)$

c-Achse: $(0,0,p)$

schneidet, so sind die *Miller'schen* Indizes (h,k,l) als das kleinste ganzzahlige Vielfache der reziproken Achsenabschnitte definiert:

a-Achse: $h \sim 1 / m$

b-Achse: $k \sim 1 / n$

c-Achse: $l \sim 1 / p$

Hierbei sind m , n und p auf die Länge der jeweiligen Elementarzell-Achsen (a , b , bzw. c) normiert, nehmen also für die Größe einer Elementarzell-Einheit der entsprechenden Achse einen Wert von eins an. Eine Reflektion mit den *Miller'schen* Indizes (oder auch „hkl-Werten“) $(3,6,2)$ gehört also zur Gitterebenschar, die parallel zur Gitterebene verläuft, welche die Achsen der Einheitszelle in den Punkten $m=1$, $n=1/2$ und $p=3/2$ schneidet.

2.3.1.4 Reziprokes Gitter und *Ewald-Konstruktion*

Die Einheitszelle beschreibt ein definiertes Gitter in einem Kristall, welchem die Einheitsvektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} im realen Raum zugeordnet werden können. Bei der Röntgendiffraktion wird das reale Gitter durch eine *Fourier-Transformation* (s. Kapitel 2.3.1.5) in ein reziprokes Gitter mit den Vektoren \vec{a}^* , \vec{b}^* und \vec{c}^* überführt. Diese Einheitsvektoren des reziproken Gitters sind folgendermaßen mit den Vektoren des realen Gitters \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} verknüpft:

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{\vec{a} \cdot (\vec{b} \times \vec{c})}; \quad \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{\vec{b} \cdot (\vec{c} \times \vec{a})}; \quad \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{\vec{c} \cdot (\vec{a} \times \vec{b})} \quad (2)$$

Durch die Beugung von Röntgenstrahlung an der Gitterebenschar (h,k,l) eines Kristalls wird im reziproken Raum ein Streuvektor \vec{s} der Länge $1 / d_{hkl}$ erzeugt, der senkrecht auf der Ebenenschar steht. Der Streuvektor ist über die *Laue-Beziehung* (Gleichung 3) mit den *Miller'schen* Indizes h , k und l der Gitterebenschar und den Einheitsvektoren \vec{a}^* , \vec{b}^* und \vec{c}^* des reziproken Raums verknüpft (Drenth, 1994):

$$\vec{s} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*; \quad |\vec{s}| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{1}{d_{hkl}} \quad (3)$$

Das reziproke Gitter und der reziproke Raum sind imaginäre Konstrukte, die in der Realität nicht existieren. Sie sind aber sehr hilfreich, um einige Prinzipien der Röntgendiffraktion zu veranschaulichen. So kann ein Diffraktions-Muster leicht durch die sogenannte *Ewald*-Konstruktion vorhergesagt werden. Die *Ewald*-Konstruktion (Abbildung 7) kombiniert die *Bragg*'sche Gleichung (Gleichung 1) mit der *Laue*-Beziehung (Gleichung 3) und verdeutlicht grafisch den Zusammenhang zwischen realem und reziprokem Gitter.

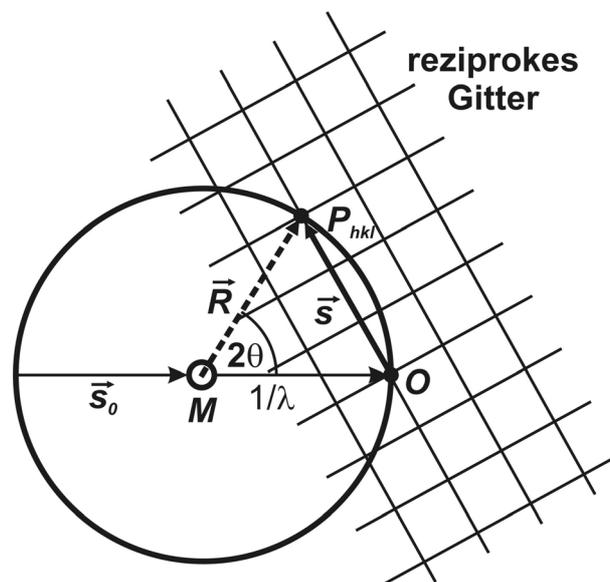


Abbildung 7: Die *Ewald*-Kugel als Hilfsmittel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahls. Die Kugel hat den Radius $1/\lambda$. Das Zentrum des reziproken Gitters liegt bei O . Die Richtung des eintreffenden Strahls wird durch \vec{s}_0 angezeigt und \vec{R} beschreibt die Richtung des gestreuten Strahls.

Der eintreffende Röntgenstrahl \vec{s}_0 zeigt dabei in Richtung des Ursprungs O des reziproken Gitters. Eine Kugel mit dem Ursprung O und dem Radius $1/\lambda$ wird so konstruiert, dass der Kugelmittelpunkt M auf \vec{s}_0 liegt. Wenn nun ein Gitterpunkt P_{hkl} des reziproken Gitters auf dieser sogenannten *Ewald*-Kugel zu liegen kommt, so ist für diesen Punkt die *Bragg*'sche Gleichung erfüllt, und der zugehörige Röntgenreflex breitet sich vom Kristall in Richtung \vec{R} aus. Anhand dieser Konstruktion wird sofort deutlich, dass der Kristall (und mit ihm das reziproke Gitter) rotiert werden muss, um alle Gitterpunkte des reziproken Gitters nacheinander auf die *Ewald*-Kugel zu bringen. Dies ist notwendig, da für eine

Strukturaufklärung eine möglichst vollständige Bestimmung aller möglichen Röntgenreflexe erforderlich ist (s. Kapitel 2.3.1.6).

2.3.1.5 *Fourier-Transformation*

Zu jeder Funktion $f(x)$ existiert eine andere Funktion $F(h)$, für die gilt:

$$F(h) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) \cdot e^{2\pi i(hx)} dx \quad (4)$$

$F(h)$ ist dabei die *Fourier-Transformation* von $f(x)$, und die Einheiten der Variablen h sind reziprok zu den Einheiten der Variablen x . *Fourier-Transformationen* können beispielsweise verwendet werden, um eine zeitabhängige Funktion (Einheit: s) in die zugrundeliegenden Frequenzanteile (Einheit: s^{-1}) zu überführen, was z.B. in der Infrarot-Spektroskopie eine wichtige Anwendung ist. Da die *Fourier-Transformation* eine reversible Operation ist, kann durch eine zu Gleichung 4 analoge Transformation aus $F(h)$ auch wieder $f(x)$ erzeugt werden. Wenn die Einheit von x eine Länge (Einheit: Å) ist, so wird durch eine *Fourier-Transformation* eine reziproke Länge (Einheit: Å⁻¹) erzeugt. Man erkennt, dass die *Fourier-Transformation* gut geeignet ist, um in der Röntgendiffraktion zwischen realem und reziprokem Raum hin- und herzuwechseln.

In der Röntgenkristallographie wird zunächst ein Diffraktionsbild des zu untersuchenden Kristalls erzeugt. Dies ist mathematisch betrachtet nichts anderes als eine *Fourier-Transformation* des realen Kristalls, das Diffraktionsbild muss also mit Hilfe einer zweiten *Fourier-Transformation* rücktransformiert werden, um wieder ein reales Bild zu erhalten. In einem herkömmlichen Lichtmikroskop erfolgt die Rücktransformation mit Hilfe einer Linse, die das gebeugte Licht wieder zu einem realen Bild zusammenfügt. In der Röntgendiffraktion besteht jedoch das Problem, dass derzeit keine geeigneten Linsensysteme für Röntgenlicht existieren. Die Rücktransformation muss deshalb mathematisch mit Hilfe eines Computers erfolgen.

Jeder gebeugte Röntgenstrahl kann als Summe von Anteilen aller beugenden Strukturen im Kristall beschrieben werden. Die Summe, die den Röntgenstrahl beschreibt, bezeichnet man als Struktur-Faktor F_{hkl} . Das bedeutet, dass jeder Röntgenreflex Informationen über alle im

Kristall enthaltenen Atome beinhaltet. Im Umkehrschluss muss man die Gesamtheit aller Röntgenreflexe heranziehen, um die Struktur eines Kristalls zu bestimmen. Die das Röntgenlicht beugenden Strukturen in einem Kristall sind die Elektronenwolken, die jedes Atom umgeben. Um die Elektronendichteverteilung $\rho(x,y,z)$ im Kristall zu erhalten, wird gemäß Gleichung 5 eine *Fourier*-(Rück-)Transformation der Strukturfaktoren F_{hkl} durchgeführt:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (5)$$

Hierbei ist V das Volumen der Einheitszelle. Da nach der *Laue*-Beziehung (Gleichung 3) Beugung nur in ganz konkrete Richtungen erfolgen kann, konnte die Integration hier durch eine Summation ersetzt werden. Die Elektronendichteverteilung $\rho(x,y,z)$ ist die gesuchte Größe eines Röntgen-Diffraktionsexperiments. Die Berechnung der Elektronendichte wird jedoch durch die Tatsache verkompliziert, dass die Strukturfaktoren nicht auf direktem Wege gemessen werden können.

2.3.1.6 Das Phasenproblem

Wie im Kapitel 2.3.1.5 gezeigt wurde, kann die Elektronendichteverteilung $\rho(x,y,z)$ berechnet werden, wenn die Strukturfaktoren aller Röntgenreflexe bekannt sind. Die Strukturfaktoren sind periodische Funktionen und bestehen deshalb aus Amplitude, Wellenlänge und Phase. Da es sich um gebeugte Röntgenstrahlen handelt, ist die Wellenlänge mit der Wellenlänge des verwendeten Röntgenlichts identisch und somit bekannt. Die Amplitude ist proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität der Röntgenreflexe und kann somit in einem Diffraktionsexperiment bestimmt werden. Die Phasen der Strukturfaktoren können jedoch nicht ohne Umwege experimentell bestimmt werden, da kein ausreichend schneller Detektor zur Verfügung steht, welcher die zeitliche Veränderung der Amplituden verfolgen könnte. Dies bezeichnet man in der Röntgenkristallographie als das „Phasenproblem“.

Es gibt verschiedene Methoden, um über Umwege die Phasen der Strukturfaktoren zu bestimmen. Die wichtigsten sind der molekulare Ersatz (*molecular replacement*, MR, s. Kapitel 2.3.1.7), die anomale Dispersion (*multiple anomalous dispersion* (MAD) bzw. *single anomalous dispersion* (SAD)) und der isomorphe Ersatz (*multiple isomorphous replacement* (MIR) bzw. *single isomorphous replacement* (SIR)). Es soll im Folgenden nur auf die Methode des molekularen Ersatzes näher eingegangen werden, da alle im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Proteinstrukturen unter Anwendung dieser Methode aufgeklärt wurden. Weiterführende Informationen zu den anderen Methoden zur Lösung des Phasenproblems können in geeigneter Literatur nachgelesen werden (Drenth, 1994; McRee, 1999; Rhodes, 2000).

2.3.1.7 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz (MR)

Der molekulare Ersatz ist eine Methode, die Phasen α der Strukturfaktoren auf indirektem Wege zu bestimmen. Dazu ist ein Proteinmodell mit bekannten Atom-Koordinaten notwendig, das der zu lösenden Struktur sehr ähnlich ist. Die Strukturfaktoren F_{hkl} kann man aufteilen in einen Amplituden-Teil und einen Phasenteil:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} \quad (6)$$

Beim molekularen Ersatz wird nun nur der Amplitudenanteil $|F_{hkl,obs}|$ der Strukturfaktoren experimentell gemessen und der Phasenteil anhand der Koordinaten einer ähnlichen Proteinstruktur berechnet ($\alpha_{hkl,calc}$). Damit kann Gleichung 5 umgeformt werden in:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl,obs}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl,calc}} \quad (7)$$

Da das Referenzprotein nicht zwangsläufig in derselben Raumgruppe kristallisiert wurde wie das zu analysierende Protein, muss zunächst meist das Referenzmodell durch Translation und Rotation in die richtige Orientierung gebracht werden. Da eine 6-dimensionale Suche (3 Dimensionen für die Translation und 3 Dimensionen für die Rotation) einen nicht praktikablen Rechenaufwand bedeuten würden, werden Rotations-

und Translationssuche nacheinander durchgeführt. Der Rechenaufwand wird dabei auf drei Dimensionen reduziert. Dazu wird zunächst eine *Patterson*-Funktion $P(u, v, w)$ berechnet, was im Prinzip eine *Fourier*-Transformation ohne Phasenanteil und mit Intensitäten $|F_{hkl}^2|$ statt der Amplituden $|F_{hkl}|$ ist:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}^2| \cos(2\pi(hu + kv + lw)) \quad (8)$$

Bei der Berechnung der *Patterson*-Funktion geht die Information über die absolute Position der einzelnen Atome im Protein verloren, und es können nur noch die relativen Abstände zwischen den Atomen bestimmt werden. Die *Patterson*-Funktion hat dafür den Vorteil, dass sie ausschließlich aus den (experimentell bestimmbaren) Intensitäten der Röntgenreflexe berechnet werden kann. Da die *Patterson*-Funktion ortsunabhängig ist, kann die Rotationssuche durch Vergleich der *Patterson*-Funktionen der zu lösenden Struktur und des Referenzmodells unabhängig von der Translationssuche durchgeführt werden. Nachdem das Modell in der richtigen Art und Weise gedreht wurde, kann es dann in einer anschließenden Translationssuche richtig positioniert werden. Eine detailliertere Beschreibung der Theorie kann an anderer Stelle gefunden werden (Drenth, 1994; McRee, 1999; Rhodes, 2000).

2.3.2 Verfeinerung eines Protein-Strukturmodells

Da das für die Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz verwendete Referenzmolekül im Allgemeinen nicht exakt mit der realen Struktur übereinstimmt, sind die daraus errechneten Phasenwerte fehlerbehaftet. Das Modell muss deshalb weiter verbessert werden, bis eine möglichst hohe Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Diffraktionsdaten gewährleistet ist. Zur Abschätzung der Qualität des Modells kann der kristallographische R-Faktor R_{cryst} berechnet werden, welcher ein Maß für die Übereinstimmung der experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ mit den aus dem Strukturmodell berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ darstellt:

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} \|F_{obs}(hkl) - k_{scal} |F_{calc}(hkl)|\|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad (k_{scal}: \text{Skalierungsfaktor}) \quad (9)$$

Viele Computerprogramme benutzen R_{cryst} als wichtigen Parameter zur Kontrolle, ob ein Verfeinerungsschritt erfolgreich verlaufen ist. Dies kann insbesondere bei Datensätzen mit niedriger Auflösung zu einer Überinterpretation der gemessenen Daten führen. Es kann im Extremfall ein Strukturmodell mit einem sehr niedrigen R_{cryst} -Faktor aber ohne jede physikalische Relevanz erzeugt werden. Um das zu vermeiden, müssen weitere Kriterien zur Überprüfung der Qualität des Modells herangezogen werden. Eine wichtige Strategie ist der Ausschluss von etwa 5 % aller experimentellen Daten aus der Berechnung des R_{cryst} -Faktors. Gegen diese 5 % der Daten wird niemals verfeinert, so dass anhand des mit diesen Daten gemäß Gleichung 9 berechneten „freien“ R-Faktors R_{free} eine bessere Aussage über die Qualität des Modells getroffen werden kann. Der freie R-Faktor liegt typischerweise etwa 2-5 % über dem kristallographischen R-Faktor.

Neben R_{cryst} und R_{free} gibt es noch weitere Kriterien, anhand derer die Qualität des Strukturmodells bestimmt werden kann. Da im Allgemeinen zusätzliche Informationen über die Art und die Eigenschaften der untersuchten Substanz vorliegen, können diese als Randbedingungen für die Strukturverfeinerung herangezogen werden. Für Proteine kann anhand des *Ramachandran*-Diagramms überprüft werden, ob die Peptidkette in einer physikalisch sinnvollen Konformation vorliegt. Ramachandran und Sasisekharan (1968) erstellten aufgrund theoretischer Überlegungen eine Auftragung der erlaubten und nicht erlaubten ϕ - und ψ -Winkel benachbarter C_α -N und C_α -C-Einfachbindungen in einem Polypeptid (s. Abbildung 8).

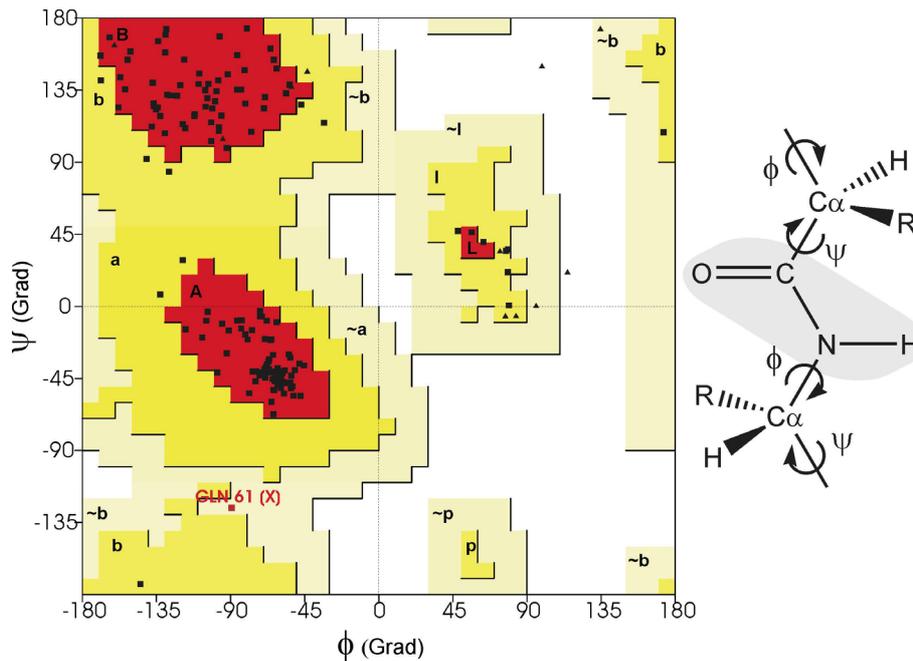


Abbildung 8: Ramachandran-Diagramm einer der beiden alternativen Konformationen der Struktur von p21(mod)•GDP (Kristall C2; s. Kapitel 5.1.7, Tabelle 1). Die sterisch günstigsten Kombinationen der Winkel ϕ und ψ des Proteinrückgrats sind für rechtsgängige α -Helices (A), β -Faltblätter (B) und linksgängige α -Helices (L) rot markiert. Die umgrenzenden Bereiche beschreiben Regionen, die ebenfalls erlaubt (gelb) bzw. noch zulässig (beige) sind. Weiße Bereiche sind sterisch verboten und können im Normalfall nur von Glycin-Resten (markiert als Dreiecke) eingenommen werden. Alle anderen Aminosäurereste mit Ausnahme von Prolin sind durch Vierecke markiert. Das Ramachandran-Diagramm wurde mit dem Programm PROCHECK erstellt (Laskowski *et al.*, 1993). Im rechten Teil des Bildes ist ein Ausschnitt einer Peptidsequenz mit der Zuordnung der Winkel ϕ und ψ dargestellt.

Die Zonen der erlaubten Konformationen für α -Helices und β -Faltblätter sind im Ramachandran-Diagramm klar getrennt. Anhand der Anzahl der außerhalb der erlaubten Bereiche liegenden Aminosäurereste kann eine Aussage über die Qualität des Strukturmodells getroffen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass in einer realen Struktur einige Abweichungen von den theoretischen Werten aufgrund ungewöhnlicher Faltungsmuster nicht auszuschließen sind.

Die Verbesserung des Protein-Strukturmodells erfolgt sowohl durch visuelle Kontrolle und manuelle Anpassung, als auch durch die Verwendung von Computerprogrammen. Anhand der gemessenen Intensitäten der Röntgenreflexe und den aus dem Strukturmodell errechneten Phasenwerten kann eine erste Elektronendichtekarte berechnet werden, wie eingehender in Kapitel 2.3.2.1 erläutert werden soll. Durch visuellen Vergleich der Elektronendichtekarte mit dem Strukturmodell können Bereiche identifiziert werden, in denen das Modell stark fehlerbehaftet ist. Falsch orientierte Bereiche des Strukturmodells

werden manuell angepasst und fehlende Bereiche ergänzt. Mit Hilfe von geeigneten Computerprogrammen wird anschließend eine Energieminimierung des modifizierten Strukturmodells durchgeführt, wobei versucht wird, verschiedene Parameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel, Konformationsenergien, nicht kovalente Wechselwirkungen und andere Parameter einem Idealwert anzunähern. Die Idealwerte dieser Parameter sind entweder anhand empirisch gewonnener Daten aus Kleinmolekül-Untersuchungen bekannt (Engh und Huber, 1991) oder müssen bei der Verwendung von unbekanntem Liganden durch Computersimulation approximiert werden (s. Kapitel 2.3.2.4). Zusätzlich werden auch kristallographische Terme wie die Abweichung von experimentellen und berechneten Strukturamplituden in der Energieminimierung berücksichtigt, indem den kristallographischen Termen bei einer Abweichung vom Idealwert eine Straf-Energie zugeordnet wird. Mit dem verbesserten Modell kann nun erneut eine Elektronendichtekarte berechnet werden, welche aufgrund der verbesserten (aus dem neuen Strukturmodell errechneten) Phasen besser mit der untersuchten Struktur übereinstimmt. Das Verfahren wird iterativ so lange durchgeführt, bis das Strukturmodell eine ausreichend hohe Übereinstimmung mit den experimentellen Daten aufweist.

2.3.2.1 Berechnung von Elektronendichtekarten

Bei der Verfeinerung und zur Kontrolle des Protein-Strukturmodells wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Elektronendichtekarten eingesetzt. Eine F_o-F_c Elektronendichtekarte kann durch Subtraktion der aus dem Strukturmodell berechneten Strukturamplituden $|F_{calc}|$ von den experimentell bestimmten Strukturamplituden $|F_{obs}|$ unter Verwendung der aus dem Modell berechneten Phasen analog zu Gleichung 7 berechnet werden. Es handelt sich um eine Differenzkarte, die verwendet wird um Abweichungen vom Strukturmodell zu den experimentellen Daten zu analysieren. Eine $2F_o-F_c$ Elektronendichtekarte stellt eine Kombination aus einer einfachen F_o -Elektronendichtekarte und einer F_o-F_c Elektronendichtekarte dar. Im Gegensatz zu einer einfachen F_o -Elektronendichtekarte, die nur aus den Strukturamplituden $|F_{obs}|$ und den aus dem Modell berechneten Phasen berechnet wird, zeigt eine $2F_o-F_c$ Karte einen verringerten Einfluss des Strukturmodells (Drenth, 1994). Fehler im Strukturmodell werden in einer $2F_o-F_c$ Karte also abgeschwächt, und die berechnete Elektronendichtekarte entspricht besser der realen Elektronendichte im Kristall.

Um eine Messungengenauigkeit bei den experimentell bestimmten Intensitäten zu berücksichtigen, wurde für die Berechnung der Elektronendichtekarten eine sogenannte σ_A -Gewichtung eingeführt (Read, 1986; Srinivasan, 1966). Die Berechnung der Elektronendichtekarten erfolgt entsprechend der folgenden Beziehung:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |XmF_{hkl,obs} - DF_{hkl,calc}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha_{hkl,calc}}; X = 1,2 \quad (10)$$

Hierbei sind m und D Gewichtungsfaktoren, und es gilt $X=1$ für eine F_o-F_c Elektronendichtekarte, bzw. $X=2$ für eine $2F_o-F_c$ Elektronendichtekarte.

2.3.2.2 Temperaturfaktor und anisotrope Verfeinerung

Die Position jedes Atoms eines Strukturmodells wird durch seine Koordinaten x , y und z im dreidimensionalen Raum beschrieben. Aus verschiedenen Gründen, wie z.B. thermischen Bewegungen, einer nicht perfekten Kristall-Packung oder der Anwesenheit verschiedener Protein-Konformationen im Kristall, sind jedoch nicht alle symmetrieverwandten Atome exakt identisch in der asymmetrischen Einheit des Kristalls positioniert. Jedes Atom besitzt eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit in einem räumlich ausgedehnten Bereich, welche an den das Atom beschreibenden x,y,z -Koordinaten ihren höchsten Wert erreicht. Die räumliche Ausdehnung wird durch den Temperaturfaktor (B -Faktor) beschrieben, wobei ein hoher B -Faktor eine hohe Beweglichkeit eines Atoms andeutet. Bei der Verwendung von isotropen B -Faktoren wird von einer kugelförmigen Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Atoms um seine Atomkoordinaten ausgegangen. Für jedes Atom wird hier ein einzelner Parameter für die Beschreibung seiner räumlichen Verteilung eingeführt. Dieses Modell reicht aber für eine exakte Beschreibung hochauflöser Strukturen (ab etwa 1,5 Å Auflösung) oft nicht mehr aus. Atome, die eine hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit in einem elliptisch um ihre Atomkoordinaten angeordneten Bereich zeigen, können durch anisotrope B -Faktoren beschrieben werden. In diesem Fall benötigt man für jedes Atom sechs Parameter, um die räumliche Ausdehnung zu beschreiben. Eine anisotrope B -Faktor-Verfeinerung ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn der hohen Anzahl an zu verfeinernden Variablen eine höhere Menge an Observablen gegenübersteht, was nur bei Datensätzen mit ausreichend hoher Qualität (Auflösung) der

Fall ist. Man benötigt zusammen mit den Atomkoordinaten 4 Parameter, um ein Atom isotrop zu beschreiben und 9 Parameter für eine anisotrope Beschreibung.

Da die Atome eines Moleküls in einem Proteinkristall kovalent miteinander verbunden sind, sind ihre Schwingungen nicht voneinander unabhängig. Oft kann ein Teil der anisotropen Atomschwingungen als Schwingung ganzer Untereinheiten oder Moleküle beschrieben werden, was die Anzahl der benötigten Parameter erheblich verringert. Bei der TLS-Verfeinerung (Winn *et al.*, 2001) werden Strukturbereiche zusammengefasst, welche einen miteinander gekoppelten anisotropen Schwingungsanteil aufweisen. Jede Gruppe wird für die TLS-Verfeinerung als starrer Körper angesehen, der als Ganzes eine anisotrope Schwingung ausführt. Man benötigt nur 20 zusätzliche Parameter, um die anisotrope Schwingung einer TLS-Gruppe zu beschreiben, also erheblich weniger als bei einer unabhängigen anisotropen Beschreibung jedes einzelnen Atoms nötig wären. Schon bei der Verwendung einer einzelnen TLS-Gruppe pro Protein-Untereinheit kann die Protein-Struktur in vielen Fällen deutlich besser beschrieben werden als durch eine rein isotrope *B*-Faktor-Verfeinerung, was sich oft in einer Verringerung des freien *R*-Faktors R_{free} (s. Kapitel 2.3.2) um mehrere Prozentpunkte auswirkt.

2.3.2.3 Alternative Konformationen

Viele Proteine zeigen im Kristallgitter für einige Seitenketten oder auch größere Bereiche mehr als eine mögliche Orientierung. Ein Grund dafür können zwei unterschiedliche, jedoch energetisch fast gleichwertige Konformationen sein, zwischen denen sich im Kristall ein Gleichgewicht einstellt. Da die aus der Kristallstrukturanalyse errechnete Elektronendichteverteilung nur einen Mittelwert über alle Moleküle zeigt, wird bei der Anwesenheit von vielen unterschiedlichen Konformationen die zugehörige Elektronendichte nur schwer interpretierbar sein. Sind jedoch nur zwei klar voneinander separierte Konformationen vorhanden, ist es oft möglich den Verlauf beider Konformationen in der Elektronendichtekarte zu erkennen. In diesem Fall genügt es nicht, die Position der in verschiedenen Konformationen vorliegenden Atome mit nur einem Koordinatensatz (x,y,z) und einem entsprechend hohen Temperaturfaktor (*B*-Faktor, s. Kapitel 2.3.2.2), zu beschreiben. Stattdessen werden die Atome durch zwei Koordinatensätze (x_1,y_1,z_1) und (x_2,y_2,z_2) beschrieben, welche jeweils eine Besetzung von weniger als 100 %, und in der Summe maximal 100 %, aufweisen. Der Temperaturfaktor für beide Atompositionen kann

bei dieser Beschreibung auf einem ähnlich niedrigen Niveau liegen wie der von anderen Atomen, die in nur einer Konformation vorliegen.

In sehr vielen hochaufgelösten Proteinstrukturen sind einige in alternativen Konformationen vorliegende Atome zu finden, jedoch sind meist nur einzelne Seitenketten betroffen. H-Ras p21 stellt einen Sonderfall dar, da dieses Protein für seine biologische Funktion als Schalter-Molekül starke Konformationsänderungen eingehen muss, welche sich über einen großen Bereich des Proteins erstrecken. Da solche Veränderungen eine relativ geringe Energiebarriere zwischen den verschiedenen involvierten Zuständen erfordern, weisen die Schalter-Regionen eine hohe Flexibilität auf und können im Kristallgitter in verschiedenen Subkonformationen vorliegen. Solche großen Konformationsunterschiede können sich zu einem gewissen Grad auch auf die Anordnung der nicht direkt an dem Schalter-Vorgang beteiligten Regionen des Proteins auswirken, weshalb ein hoher Prozentsatz der Aminosäurereste von H-Ras p21 im Proteinkristall mehr als eine Konformation einnehmen kann.

2.3.2.4 Modellierung von Liganden durch *ab initio* Computersimulation

Um während der Strukturverfeinerung eine Energieminimierung durchführen zu können, müssen zunächst für alle im Protein vorhandenen Gruppen die energetisch günstigsten Konformationen bekannt sein. Für Gruppen, zu denen diese Informationen nicht bereits aus früheren Arbeiten zur Verfügung stehen, muß zunächst die Idealkonformation berechnet und den verwendeten Computerprogrammen in Form von „Topologie- und Parameterdateien“ zur Verfügung gestellt werden. Wenn eine einfache molekulardynamische Simulation nicht ausreicht, um die Konformation eines Liganden zufriedenstellend zu berechnen, kann eine detailliertere Berechnung durch eine *ab initio*-Computersimulation durchgeführt werden.

Als *ab initio*-Methoden bezeichnet man quantenchemische Methoden, die keinerlei empirisch gewonnenen Parameter außer einigen Naturkonstanten bei der Simulation eines Moleküls einbeziehen. Das hier angewandte Verfahren beruht auf dem *Hartree-Fock*-Ansatz und dem Prinzip des selbstkonsistenten Feldes (*Hartree-Fock self consistent field*, HF-SCF; (Szabo und Ostlund, 1989)). Die Molekülwellenfunktion (MO) wird dabei als Linearkombination von Atom-Wellenfunktionen (AOs) betrachtet. Man geht dabei so vor, dass man auf jedes einzelne Elektron das gemittelte Potential aller anderen Elektronen

einwirken lässt, wodurch man eine verbesserte Wellenfunktion für dieses Elektron erhält. Dies wird für alle Elektronen durchgeführt. Die Methode wird iterativ so lange wiederholt, bis die Wellenfunktionen selbstkonsistent sind, sich also bei einem weiteren Schritt nicht mehr verändern.

Atomorbitale lassen sich gut durch Funktionen beschreiben, die als STOs (*slater type orbitals*) bezeichnet werden. Da solche STOs sich aber für eine mathematische Berechnung nicht gut einsetzen lassen, werden sie durch mehrere GTOs (*gaussian type orbitals*) approximiert. Es werden mindestens drei GTOs benötigt, um ein STO anzunähern. Man benutzt also in der Simulation einen Satz aus GTOs, den man auch als Basissatz bezeichnet, um die Atom-Wellenfunktionen zu beschreiben. Je nach verwendeter Menge und Art an GTOs kann man die reale Situation im Molekül mehr oder weniger gut beschreiben. Ein hoher Basissatz hat den Vorteil einer präzisen Beschreibung des simulierten Moleküls, aber den Nachteil eines sehr hohen Rechenaufwandes. Der Basissatz 6-31G* ist gut geeignet, um die elektronische Situation in einem Liganden-Molekül wie dem verwendeten NBD-Fluorophor mit einer für die Anforderungen in dieser Arbeit ausreichenden Genauigkeit zu beschreiben.

2.3.3 Röntgenfluoreszenz

Röntgenfluoreszenz-Experimente werden häufig verwendet, um für MAD- oder SAD-Experimente die Anwesenheit und die Lage der Absorptionskante von Atomen mit anomalem Streubeitrag zu bestimmen. Dazu wird ein Kristall mit Röntgenstrahlung variabler Wellenlänge bestrahlt und die Röntgenfluoreszenz durch einen Szintillationszähler in einem Winkel zum einfallenden Röntgenstrahl gemessen (*x-ray absorption spectroscopy*, XAS). Nachdem die Absorptionskante präzise bestimmt wurde, können Röntgen-Diffraktionsexperimente bei verschiedenen Wellenlängen um diese Kante durchgeführt werden. Da sich die Streubeiträge von Atomen in der Nähe ihrer Absorptionskante verändern (anomale Streuung), kann durch Messung bei verschiedenen Röntgenwellenlängen das Beugungsmuster der Röntgenstrahlung am Kristall verändert werden. Aus den Veränderungen der Beugungsmuster kann auf die Lage (x,y,z) der Atome mit anomalem Streubeitrag in der Elementarzelle zurückgeschlossen werden. Diese bekannten Positionen können anschließend zur Berechnung eines ersten Phasen-Datensatzes herangezogen werden. Das Phasenproblem (s. Kapitel 2.3.1.6) wird bei dieser Methode also

auf experimentellem Wege gelöst. Voraussetzung ist die Anwesenheit von Atomen mit einer Absorptionskante im Bereich der zur Verfügung stehenden Röntgenwellenlängen, sowie die Verfügbarkeit einer Röntgenquelle mit variabler Wellenlänge, was i.a. nur bei Synchrotron-Strahlquellen möglich ist.

Es soll hier nicht weiter auf die Theorie der Röntgenfluoreszenz eingegangen werden, da solche Experimente in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden (für weiterführende Literatur zu diesem Thema siehe beispielsweise McRee (1999)). Es muss jedoch herausgestellt werden, dass die durchgeführten Fluoreszenz-Experimente in Kombination mit Röntgendiffraktionsexperimenten (s. Kapitel 5.2.10) auf Fluoreszenzanregung mit sichtbarem Licht bzw. mit UV-Licht beruhen und nicht auf Fluoreszenzanregung durch Röntgenstrahlung. Die zugrundeliegenden Prinzipien und auch die erhaltenen Informationen unterscheiden sich deshalb grundlegend von Röntgenfluoreszenz-Experimenten, und die beiden Methoden sollten nicht miteinander verwechselt werden.

2.3.4 Datensammlung

2.3.4.1 Mögliche Strahlquellen für die Röntgendiffraktion

Mit entscheidend für den Erfolg eines Röntgen-Diffraktionsexperiments ist neben der Kristallqualität auch die Qualität der verwendeten Röntgenstrahlung. Strahlquellen für Röntgenlicht lassen sich anhand verschiedener Parameter charakterisieren, von denen die Intensität bzw. Brillanz der erzeugten Strahlung vermutlich die wichtigsten sind. Die Strahlintensität gibt an, welche Anzahl von nutzbaren Photonen pro Zeiteinheit erzeugt werden (Einheit: Photonen / s). Ein hoher Photonenfluss durch den Kristall bedeutet eine geringe Wartezeit bei der Datensammlung und ist somit zu bevorzugen, wenn dadurch keine anderen Nachteile in Kauf genommen werden müssen. Eine hohe Strahlintensität ist allerdings nutzlos, wenn der Röntgenstrahl nicht ausreichend fokussiert oder monochromatisiert ist. Wenn der Strahldurchmesser größer ist als der zu vermessende Kristall, kann nur ein Teil der erzeugten Strahlung für das Diffraktionsexperiment genutzt werden. Die überschüssige Strahlung führt außerdem zu einer erhöhten Hintergrundstrahlung und mindert somit die Datenqualität. Eine hohe Strahldivergenz (großer Öffnungswinkel der Strahlung) verringert die Schärfe der erzeugten Röntgenreflexe, und auch eine schlecht definierte Wellenlänge des Röntgenlichts mindert die Qualität der

erhaltenen Diffraktionsdaten. All diese Parameter werden in der Brillianz zusammengefasst. Die Brillianz ist die Strahlintensität dividiert durch den Strahldurchmesser, die Strahldivergenz und die Bandweite BW der Strahlung (Einheit: Photonen / ($s \cdot \text{mm}^2 \cdot \text{mrad}^2 \cdot 0,1 \% BW$)).

Eine klassische Röntgenquelle ist die „*sealed tube*“-Röntgenröhre. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

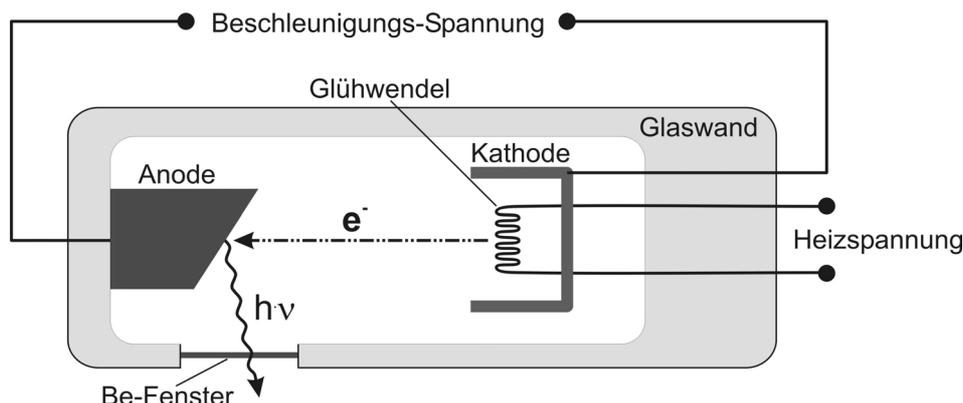


Abbildung 9: schematische Darstellung einer „*sealed tube*“-Röntgenröhre. Elektronen werden in einer geheizten Glühwendel freigesetzt und durch eine Beschleunigungsspannung zur Anode hin beschleunigt. Durch Wechselwirkung mit dem Anodenmaterial wird Röntgenstrahlung erzeugt, welche durch ein Beryllium-Fenster aus der Röntgenröhre austreten kann.

In der Röntgenröhre werden aus einer Glühwendel durch eine Heizspannung Elektronen herausgelöst und dann durch eine hohe Beschleunigungsspannung in Richtung einer Metall-Anode beschleunigt. Als Anodenmaterial wird meist Kupfer oder Molybdän verwendet. Die Elektronen werden in der Anode abgebremst und erzeugen durch elastische und inelastische Wechselwirkungen mit dem Anodenmaterial Röntgenstrahlung, die dann seitlich durch ein Beryllium-Fenster austreten kann. Bei der inelastischen Streuung werden Elektronen aus der K-Schale der Atome des Anodenmaterials herausgelöst. Beim Wiederauffüllen der K-Schale entsteht ein für jedes Material charakteristisches Spektrum diskreter Röntgenlinien. Da diese Linien im Vergleich zur durch elastische Streuung erzeugten Bremsstrahlung eine sehr hohe Intensität aufweisen, ist man besonders am Röntgenlicht aus diesen charakteristischen Linien interessiert.

In einer „*sealed tube*“-Röntgenröhre ist der maximalen Strahlintensität durch die Aufheizung des Anodenmaterials durch den auftreffenden Elektronenstrahl eine natürliche Grenze gesetzt. Diese Grenze kann durch eine rotierende Anode durchbrochen werden, da hier die vom Elektronenstrahl getroffene Oberfläche ständig erneuert wird. In solchen „*rotating anode*“ Röntgenröhren ist es möglich, eine höhere Strahlintensität und/oder eine höhere Strahlbrillanz zu erzeugen. Allerdings sind diese Röhren auch deutlich teurer und wartungsintensiver als „*sealed tube*“-Röntgenröhren.

In Synchrotron-Strahlquellen werden Elektronen oder Positronen in einer ringförmigen Röhre mit oft mehreren 100 Metern Durchmesser beschleunigt. Um den Elektronen eine kreisförmige Bewegung aufzuzwingen, müssen sie ständig durch Magnete radial abgelenkt werden. Wie jede beschleunigte Ladung verlieren die Elektronen dabei Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung. Diese Strahlung, die unter anderem auch im Röntgenbereich abgegeben wird, besitzt einzigartige Eigenschaften. Durch Synchrotron-Strahlquellen lässt sich eine um mehr als 10^{12} -fach höhere Strahlbrillanz erzeugen als durch eine rotierende Anode, was Synchrotron-Strahlquellen zu den wichtigsten Röntgenquellen für hochauflösende Röntgen-Diffraktionsexperimente macht. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, durch variable Magnet-Anordnungen die Wellenlänge der erzeugten Röntgenstrahlung zu variieren bzw. durch Veränderung der Röntgenoptik einen geeigneten Wellenlängenbereich zu selektieren, was insbesondere für SAD- und MAD-Experimente wichtig ist (s. Kapitel 2.3.1.6).

2.3.4.2 Diffraktionsexperimente nach der *Laue*-Methode

Diffraktionsexperimente nach der *Laue*-Methode sind die vielleicht älteste Form von Röntgen-Diffraktionsexperimenten, aber auch eine Methode die in vielerlei Hinsicht Vorteile gegenüber den heute üblicheren Diffraktionsexperimenten unter Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung aufweist. In Laue-Experimenten wird der Kristall nicht mit monochromatischer Röntgenstrahlung vermessen, sondern es wird ein polychromatischer Röntgenstrahl verwendet, wobei etwa ein Faktor von zwei bis drei zwischen der niedrigsten und höchsten Wellenlänge eingehalten wird (beispielsweise Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 0,5 - 1,5 Å). Analog zu Abbildung 7 in Kapitel 2.3.1.4 erfüllen nun alle Punkte des reziproken Gitters die *Bragg*'sche Gleichung (1), welche im Bereich zwischen den jeweiligen Ewald-Kugeln mit Radius $1 / 0,5 \text{ Å}$ und

1 / 1,5 Å liegen. Dadurch ergibt sich also eine viel größere Menge an Röntgenreflexen als bei einem vergleichbaren Diffraktionsexperiment unter Verwendung monochromatischer Strahlung. Röntgenbilder aus einem *Laue*-Experiment sind deshalb sehr komplex, was die Auswertung der Daten stark erschwert. Des Weiteren werden Kristalle mit sehr hoher Qualität benötigt, um einen auswertbaren *Laue*-Datensatz zu erhalten. Der Vorteil der *Laue*-Methode liegt darin, dass im Optimalfall, bei ausreichend hoher Kristallqualität und Kristallsymmetrie und bei der richtigen Kristallorientierung, theoretisch mit einem einzigen kurzen Röntgenpuls ein vollständiger Datensatz erhalten werden kann. Auch wenn in der Praxis meist mehrere Diffraktionsbilder nach der *Laue*-Methode aufgezeichnet werden müssen, um einen vollständigen Datensatz mit akzeptabler Qualität und Redundanz zu erhalten, wurden *Laue*-Experimente schon erfolgreich mit weniger als 200 ps langen Röntgenpulsen durchgeführt (Rhodes, 2000; Srajer *et al.*, 1996). Die *Laue*-Methode hat somit ein hohes Potential für zeitaufgelöste röntgenkristallographische Untersuchungen, ist jedoch aufgrund praktischer Limitierungen nur schwer anwendbar.

2.3.4.3 Detektoren

Für die Detektion von Röntgenstrahlung existiert eine Vielzahl an verschiedenen Detektor-Systemen. Jeder Detektor hat spezifische Vor- und Nachteile. Die meisten Detektoren sind in Form eines Flächenzählers aufgebaut, aber auch punktförmige Detektoren wie Szintillationszähler können aufgrund ihres hohen Dynamik-Bereichs (Verhältnis zwischen kleinstem und größtem detektierbarem Signal) und aufgrund einer Absorptions-Effizienz von fast 100 % für einige Anwendungen von Vorteil sein. Selbst eine so „veraltete“ Technik wie die Datensammlung auf Röntgenfilmen kann in Spezialbereichen wie der Virus-Kristallographie noch immer die Methode der Wahl sein, da die mögliche räumliche Auflösung nach wie vor von keiner anderen Methode erreicht wird und der Detektor-Größe praktisch keine Grenzen gesetzt sind. „*Multiwire*“-Detektoren haben den Vorteil, dass nicht nur die Position sondern auch die Energie von eintreffenden Röntgen-Photonen bestimmt werden kann. Die mit Abstand am häufigsten im Bereich der Röntgendiffraktion an biologischen Makromolekülen verwendeten Detektoren sind derzeit jedoch die Bildspeicherplatten (*image plate*)- und CCD-Detektoren, wobei erstere zunehmend durch CCD-Detektoren verdrängt werden.

CCD-Detektoren (*charge coupled device*) zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität, einen hohen Dynamik-Bereich und eine sehr hohe Auslesegeschwindigkeit aus. Die Konstruktion von großen CCD-Detektoren ist technisch jedoch sehr aufwendig und wird oft in Form einer 2x2- oder 3x3-Matrix aus 4 bzw. 9 kleineren Detektor-Einheiten realisiert. Solche Detektoren werden aufgrund ihres hohen Preises hauptsächlich an Synchrotron-Strahlquellen eingesetzt. CCD-Detektoren sind zwar prinzipiell in der Lage Röntgenlicht direkt zu detektieren, allerdings wird aufgrund von technischen Notwendigkeiten meist erst das Röntgenlicht in ein Signal aus sichtbarem Licht umgesetzt, welches dann vom CCD-Detektor erfasst und in Form eines elektrischen Signals an einen Computer weitergegeben wird. CCD-Detektoren eignen sich insofern auch hervorragend für den direkten Einsatz als Detektoren für Licht im sichtbaren Wellenlängen-Bereich (s. Kapitel 5.2.9).

2.4 Biologie und Biochemie der kleinen GTPase H-Ras p21

2.4.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBPs)

Die kleine GTPase H-Ras p21 gehört zur Familie der Guaninnukleotid-bindenden Proteine (GNBPs). Allen GNBPs gemein ist eine etwa 20 kDa große Guaninnukleotid-bindende Domäne (G-Domäne), die eine stark konservierte Struktur und molekulare Funktionsweise aufweist. GNBPs können von einer aktiven, GTP-gebundenen Form zu einer inaktiven, GDP-gebundenen Form hin- und herwechseln, wobei die Aktivierung und Inaktivierung durch verschiedene Regulatoren beschleunigt oder verlangsamt werden kann. Zu den GNBPs gehören die Proteine der Ras-Superfamilie, die G_{α} -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine, Initiations-, Elongations- und Freisetzungsfaktoren, das Signalerkennungspartikel und sein Rezeptor, die Proteine der Dynamin-Superfamilie, sowie einige weitere Proteine mit einer G-Domäne, die keiner dieser Klassen zugeordnet werden können (z.B. die Septine).

2.4.2 GNBPs, die nicht der Ras-Superfamilie angehören

GNBPs spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von zellulären Regulationsprozessen. **Heterotrimere G-Proteine** sind an verschiedenen Signal-Transduktionswegen beteiligt. Sie bestehen aus den drei Untereinheiten G_{α} , G_{β} und G_{γ} . Im inaktiven Zustand bindet die G_{α} -Untereinheit GDP und bildet einen festen Komplex mit dem Heterodimer $G_{\beta\gamma}$. $G_{\beta\gamma}$ wirkt dabei als Inhibitor für die Dissoziation von GDP (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*, GDI) und bewirkt eine Koordination des heterotrimeren Komplexes $G_{\alpha\beta\gamma}$ an G-Protein-gebundene Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs). Wenn nun ein GPCR mit einem Liganden wie z.B. einem Hormon interagiert, so löst der gebildete Hormon-GPCR-Komplex eine Konformationsänderung in der G_{α} -Untereinheit eines assoziierten heterotrimeren G-Proteins aus. Dies führt zu einer verstärkten Dissoziation des gebundenen Nukleotids, der Hormon-Rezeptor-Komplex wirkt also als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF). Da in der Zelle die Konzentration an GTP etwa zehnmal höher ist als die Konzentration von GDP, wird dadurch das an G_{α} gebundene GDP größtenteils gegen GTP ausgetauscht. Das GTP-gebundene G_{α} ($G_{\alpha}\cdot\text{GTP}$) hat keine hohe Affinität zum Heterodimer $G_{\beta\gamma}$, so dass der Komplex in G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ dissoziiert. Beide Einheiten können nun mit spezifischen Effektoren

interagieren und dadurch ihren Beitrag zur Signalkaskade leisten. G_α weist nur eine geringe intrinsische GTPase-Aktivität auf, die durch spezifische GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase accelerating proteins*, GAPs) stark beschleunigt werden kann. Durch die GTP-Hydrolyse fällt ein aktiviertes $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ wieder in den inaktiven Zustand $G_\alpha \cdot \text{GDP}$ zurück und kann erneut einen heterotrimeren Komplex mit $G_{\beta\gamma}$ bilden (McCudden *et al.*, 2005).

G-Proteine, welche als **Initiations-, Elongations- und Freisetzungsfaktoren** in der Protein-Biosynthese fungieren, sind beispielsweise IF-2, EF-TU, EF-G und RF-3. IF-2 ist an der Initiation der Proteinsynthese beteiligt, indem es ein Methionin-beladenes Transfer-RNA-Molekül (*transfer ribonucleic acid*, tRNA) an die kleine Untereinheit des Ribosoms dirigiert. Eine Domäne der großen Untereinheit des Ribosoms wirkt als GAP für IF-2. Durch die Hydrolyse von IF-2•GTP zu IF-2•GDP dissoziieren IF-2 und weitere Initiationsfaktoren vom Ribosom. Bei der anschließenden Protein-Synthese ist EF-TU an der Zuführung von beladenen Aminoacyl-tRNA-Molekülen zum Ribosom beteiligt und bewirkt weiterhin eine Erhöhung der Translationsgenauigkeit der Proteinbiosynthese. EF-G bindet in der Nähe der A-Bindungsstelle des Ribosoms. Durch Ribosom-stimulierte GTP-Hydrolyse von EF-G•GTP zu EF-G•GDP werden Konformationsänderungen ausgelöst, die eine Weiterbewegung der gebundenen tRNA mit naszierender Protein-Kette zur P-Bindestelle des Ribosoms zur Folge haben. Beim Erreichen eines STOP-Codons auf der mRNA sorgt das G-Protein RF-3 zusammen mit anderen Freisetzungsfaktoren schließlich für das Beenden der Protein-Translation (Alberts *et al.*, 2004).

Einige Proteine verfügen über bestimmte N-terminale Aminosäuresequenzen (sogenannte Signalsequenzen), die für einen Transport der Proteine von der Cytosolseite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ins Lumen des ER sorgen. Das **Signalerkennungspartikel** (*signal recognition particle*, SRP) erkennt diese Sequenzen, noch während das Protein im Ribosom synthetisiert wird. Das SRP bindet an den Komplex aus Ribosom und naszierendem Protein und bringt diesen zur ER-Membran. Dies wird durch eine Bindung des SRP an seinen auf der ER-Membran lokalisierten Rezeptor (*signal recognition particle receptor*, SR) bewerkstelligt. Das Signalerkennungspartikel interagiert dabei mit seinem Rezeptor über eine für GNBPs ungewöhnliche, hochgradig kooperative Interaktionsfläche. Die GTP-bindenden Domänen der beiden Moleküle bilden ein gemeinsames aktives Zentrum und erhöhen dabei gegenseitig ihre GTPase-Aktivität. An der Membran wird der Komplex aus Ribosom und naszierendem Protein an die Transportmaschinerie (*translokon*) übergeben, die für einen Transport des entstehenden

Proteins durch die ER-Membran verantwortlich ist. Nachdem der Komplex aus Ribosom und naszierendem Protein weitergegeben wurde, dissoziiert der Komplex aus SRP und SR, und das SRP kann eine neue Signalerkennungssequenz binden.

Proteine der Dynamin-Superfamilie sind an verschiedenen Prozessen wie der Abschnürung von Transportvesikeln und der Abwehr von viralen oder mikrobiellen Pathogenen beteiligt. Die Rolle von Dynamin wird dabei hauptsächlich als die eines mechanochemischen Enzyms angenommen. Während des Wachstums eines Vesikels lagern sich Dynamin-Moleküle in Form einer Helix um den Vesikel-Hals und verengen diesen, wobei Dynamin noch weitere Proteine zur Unterstützung an die Membran zieht. Die Aneinanderlagerung einer kritischen Menge von Dynamin-Molekülen führt zu einer kooperativen Erhöhung der GTPase-Aktivität, wobei Dynamin als sein eigenes GAP fungiert. Durch eine Konformationsänderung während der GTP-Hydrolyse verlängert sich der Helix-Windungsversatz (*helix pitch*) der Dynamin-Helix. Dadurch wird der Vesikel-Hals gestreckt, und die Verbindung zwischen Vesikel und Muttermembran reißt ab (Praefcke und McMahon, 2004). Die genaue Funktion von Dynamin wird derzeit noch kontrovers diskutiert, so ist beispielsweise neben dem mechanochemischen Modell auch eine hauptsächlich regulatorische Funktion der Dynamin-Proteine bei der Vesikel-Abschnürung denkbar (Praefcke und McMahon, 2004).

2.4.3 GNBPs der Ras-Superfamilie

2.4.3.1 Allgemeine Eigenschaften

Proteine der Ras-Superfamilie fungieren als GDP/GTP-regulierte molekulare Schalter (Vetter und Wittinghofer, 2001). Für die Bindung des Nukleotids und die Funktion als molekularer Schalter ist ein konservierter Strukturbereich verantwortlich, der den Aminosäuren 5-166 in Ras entspricht und als G-Domäne bezeichnet wird. Das Nukleotid bindet in Form eines trimeren Komplexes der Form $\text{Ras} \cdot \text{GXP} \cdot \text{Mg}^{2+}$ an die G-Domäne. Das Magnesium-Ion sorgt dabei für einen Ladungsausgleich des negativ geladenen Nukleotids und geht diverse essentielle Wechselwirkungen ein. GTP-gebundene Proteine der Ras-Superfamilie befinden sich im aktiven Zustand und kehren unter Hydrolyse von GTP in den GDP-gebundenen, inaktiven Zustand zurück. Die G-Domäne durchläuft bei einer Veränderung des Nukleotid-Zustands konformelle Veränderungen, die hauptsächlich in

zwei Regionen lokalisiert sind: der Schalter-Region I (*switch I*, Ras Aminosäurereste 30-38) und der Schalter-Region II (*switch II*, Ras Aminosäurereste 59-67). Hauptsächlich durch die Veränderungen in den Schalter-Regionen sind regulatorische Proteine und Effektoren in der Lage, den Nukleotid-Zustand eines Proteins der Ras-Superfamilie zu „messen“ und z.B. selektiv mit bestimmten Nukleotid-Zuständen zu interagieren. In einigen Fällen kommen noch weitere Bereiche hinzu die beim Wechsel zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand Veränderungen durchlaufen. So weisen Arf-Proteine beispielsweise einen N-terminalen Bereich auf, der eine Membranwechselwirkung im GTP-gebundenen Zustand erlaubt (Wennerberg *et al.*, 2005).

Es gibt zwei Hauptklassen von Proteinen, welche den Nukleotid-Gehalt von Proteinen der Ras-Superfamilie regulieren. GTPase-aktivierende Proteine (*GTPase activating proteins*, GAPs) beschleunigen die intrinsisch sehr langsam ablaufende GTPase-Aktivität, was für eine schnelle Ras-Inaktivierung notwendig ist. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (*guanine-nucleotide exchange factors*, GEFs) erhöhen die Geschwindigkeit des Nukleotid-Austausches. Da in lebenden Zellen die GTP-Konzentration etwa 10 mal höher ist als die Konzentration an GDP, stellt sich dadurch ein Gleichgewicht mit hauptsächlich GTP-gebundenem Protein ein, GEFs wirken auf Ras-Proteine also aktivierend (s. Abbildung 10).

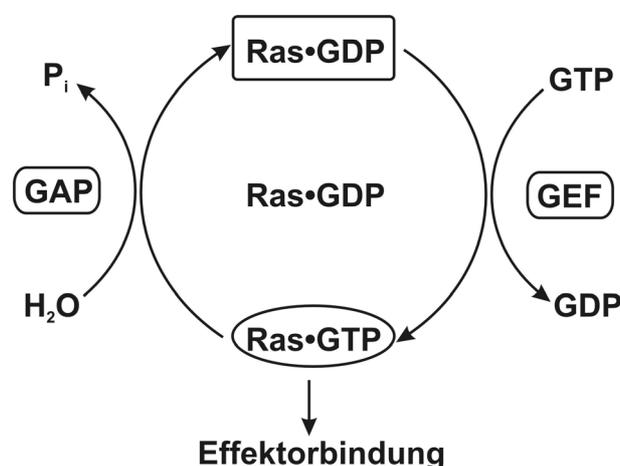


Abbildung 10: Ras als molekularer Schalter. GEFs wirken durch eine Beschleunigung des Nukleotidaustauschs von GDP zu GTP aktivierend, während GAPs die GTPase-Effizienz von Ras erhöhen und somit inaktivierend wirken. Im aktivierten Zustand ist Ras in der Lage, an Effektoren zu binden.

Für einige Mitglieder der Ras-Superfamilie ist eine weitere Art regulatorischer Proteine beschrieben, die Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*, GDIs) Diese führen zu einer verringerten Aktivierbarkeit der Ras-

Proteine und damit zu einer Modulation der Signalamplitude bei Aktivierung eines Ras-abhängigen Signalweges.

Neben der G-Domäne weisen fast alle Proteine der Ras-Superfamilie eine C-terminale Aminosäuresequenz auf, an der durch post-translationale Modifikationen Lipide wie eine Farnesyl-Gruppe oder eine Geranylgeranyl-Gruppe gebunden werden können, was für die Interaktion mit bestimmten Membranbereichen oder subzellulären Regionen von Bedeutung ist.

2.4.3.2 Unterteilung der Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie kleiner GTPasen ist eine ausgesprochen vielseitige Gruppe von Proteinen, die an einer großen Zahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Sie besitzt alleine über 150 humane Mitglieder (Wennerberg *et al.*, 2005). Anhand von Sequenz- und Funktionsmerkmalen unterscheidet man die fünf wichtigsten Hauptgruppen **Ras**, **Rho** (*Ras homologous*), **Rab** (*Ras-like proteins in brain*), **Ran** (*Ras-like nuclear proteins*) und **Arf** (*ADP-ribosylation factor family*). Zusätzlich sind noch eine Reihe von weiteren Gruppen (**Rad**, **Rheb**, **Rit**, **Rag**) bekannt, deren Funktion bisher nur teilweise verstanden ist und auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Proteine der **Ras**-Untergruppe sind an der Signalweiterleitung beteiligt und regulieren Prozesse wie die Gen-Expression, die Zell-Proliferation und Differenzierung sowie Apoptose. Sie werden nach einer externen Stimulation aktiviert und wirken als Umwandler und Gabelungssignalproteine, welche die Natur des empfangenen Signals ändern und in viele stromabwärts führende Richtungen weiterleiten. Der am besten charakterisierte Ras-Signalweg ist die über MAP-Kinasen verlaufende reversible Phosphorylierung von Serin und Threonin. Dieser Signalkaskade-Mechanismus ist in größerem Detail in Kapitel 2.4.4.1 dargestellt. Mutationen, die zu einer permanenten Aktivierung von Proteinen der Ras-Untergruppe führen, sind ein häufiger Grund für Krebs. Es wird geschätzt, dass etwa 30 % aller menschlichen Tumore eine hyperaktive Ras-Mutation aufweisen.

Proteine der **Rho**-Unterfamilie sind unter anderem für die Regulation der Organisation des Actin-Cytoskeletts, der Genexpression und des Zell-Zyklus verantwortlich. Mit mehr als 60 bekannten Aktivatoren (GEFs) und 70 bekannten Inaktivatoren (GAPs) im menschlichen

Genom werden die Rho-Proteine sehr sorgfältig reguliert, was ihre zentrale Bedeutung für die eukaryotische Zelle unterstreicht (Etienne-Manneville und Hall, 2002).

Rab-Proteine bilden mit 61 Mitgliedern die größte Untergruppe der Ras-Proteine (Pereira-Leal und Seabra, 2001). Sie sind für die Regulation des intrazellulären Vesikel-Transports und für den Austausch von Proteinen zwischen verschiedenen Organellen verantwortlich (Zerial und McBride, 2001). Dabei werden die Rab-Proteine von einem GEF auf der Donor-Membran aktiviert und binden bei der Abspaltung eines Vesikels an die Vesikelmembran. An der Ziel-Membran interagieren Sie mit einem spezifischen Effektor und stellen somit den ersten Kontakt zwischen dem Transport-Vesikel und seiner Zielmembran her. Sie sind somit zusammen mit den SNARE-Proteinen an der Zielfindung der Vesikel beteiligt.

Ran ist für den Im- und Export von Proteinen und RNA in bzw. aus dem Zellkern verantwortlich. Anders als bei anderen kleinen GTPasen ist die Funktion von Ran von einem räumlichen Gradienten seiner GDP- und GTP-gebundenen Form abhängig. Die Ran-Aktivierung erfolgt durch ein spezifisches GEF im Zellkern, während die GTPase-Aktivität durch GAPs im Cytoplasma erhöht wird. Für den Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma bindet Ran•GTP im Zellkern an einen beladenen Kernimportrezeptor (Importin), sorgt für die Freisetzung seiner Fracht und eskortiert ihn zurück ins Cytoplasma. Für den Export aus dem Zellkern eskortiert Ran•GTP in analoger Weise einen beladenen Zellexportrezeptor (Exportin) vom Zellkern ins Zytoplasma.

Proteine der **Arf**-Unterfamilie sind an verschiedenen Schritten der Regulation des vesikulären Transports beteiligt. Sie aktivieren vesikuläre Hüllproteine und regulieren die Bildung von Vesikelhüllen. Arf-Proteine besitzen durch post-translationale Modifikation eine N-terminale Myristat-Gruppe, durch die sie in ihrer GTP-gebundenen Form an Membranen binden können.

2.4.4 Ras

2.4.4.1 Die biologische Funktion von Ras

Ras wurde zuerst in Form des hyperaktiven Produkts eines mutierten Ras-Gens in tumor-induzierenden Viren entdeckt, das die Entwicklung von Krebs fördert. Es gibt drei humane Ras-Gene: H-Ras, K-Ras und N-Ras. H-Ras und K-Ras wurden nach ihren Entdeckern Harvey bzw. Kirsten benannt. N-Ras wurde aus einer Neuroblastoma-Zelllinie isoliert. Die viralen Ras-Proteine weisen Punktmutationen an den Positionen 12 und 59 ihrer Aminosäuresequenz auf. Diese Veränderungen führen zu einer verminderten GTPase-Aktivität und damit zu einer dauerhaften Aktivierung des Proteins (Bos, 1989). Punktmutationen im Ras-Gen spielen nicht nur bei viral bedingten Tumoren eine Rolle. In etwa 30 % aller menschlichen Tumore werden Punktmutationen an den Positionen 12, 13 oder 61 der Aminosäuresequenz diagnostiziert.

Ras-Proteine besitzen ein Molekulargewicht von etwa 21 kDa, woraus sich auch die Bezeichnung Ras p21 ableitet. Sie werden post-translational durch proteolytische Spaltung von drei terminalen Aminosäuren, Carboxymethylierung und Farnesylierung über Thioetherbindungen an C-terminalen Cystein-Resten modifiziert. H- und N-Ras werden zusätzlich C-terminal palmitoyliert. Diese Modifikationen führen zu einer Lokalisierung an der Plasmamembran, was für ihre biologische Aktivität essentiell ist. Für die Aktivität als molekularer Schalter sind die C-terminalen Aminosäurereste jedoch nicht von Bedeutung: Ein verkürztes Protein, das nur die Aminosäurereste 1-166 aufweist, zeigt eine mit dem Wildtyp vergleichbare GTPase-Aktivität und ist in der Lage zur Komplexbildung mit Ras-spezifischen Effektoren. Da solche verkürzten Proteine gut wasserlöslich und somit leicht handhabbar sind, werden sie häufig in strukturellen Untersuchungen anstelle des Wildtyp-Proteins verwendet.

Die biologische Funktion von Ras liegt in der Regulation von Signal-Transduktionswegen, die zu Zell-Proliferation, Differenzierung und Apoptose führen. Der am besten untersuchte Ras-Signaltransduktionsweg, der auch eine wichtige Rolle bei der Transformation einer Zelle in eine potentielle Tumorzelle spielt, soll im Folgenden exemplarisch erläutert werden.

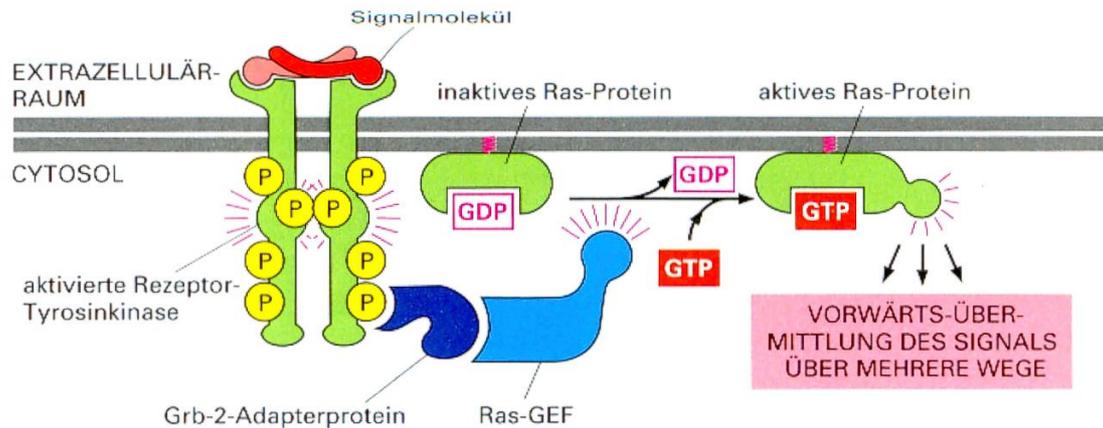


Abbildung 11: Aktivierung von Ras durch eine aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Erläuterungen siehe Text). Entnommen aus Alberts *et al.* (2004). Einer der durch das aktivierte Ras aktivierten Signalwege ist in Abbildung 12 dargestellt.

Die Aktivierung der Signalkaskade beginnt mit der Anlagerung von extrazellulären Signalmolekülen an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs). RTKs sind transmembrane Proteine mit einer extrazellulären Bindungsdomäne für den Liganden, einem transmembranen Segment und einer intrazellulären Kinasedomäne. Die Ligandenbindung führt zur Dimerisierung der RTKs, wodurch die intrazellulären Kinasedomänen in räumliche Nähe zueinander kommen und sich gegenseitig an Multi-Tyrosin-Bereichen über Kreuz phosphorylieren. An die phosphorylierten Kinasedomänen können nun Signalproteine wie das Adapterprotein Grb-2 binden, welches wiederum an das Ras-spezifische GEF Sos (*son of sevenless*) bindet. Die Gruppierung aus RTK + Grb-2 + Sos bringt Sos in die Position, aus der es benachbarte Ras-Moleküle aktivieren kann. Nach seiner eigenen Aktivierung aktiviert Ras wiederum verschiedene andere Signalproteine, wodurch das Signal über mehrere Wege stromabwärts geleitet wird. Einer der über Ras aktivierten Signalwege ist eine Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade, die in vielen eukaryotischen Zellen in hoch konservierter Form erhalten geblieben ist (s. Abbildung 12).

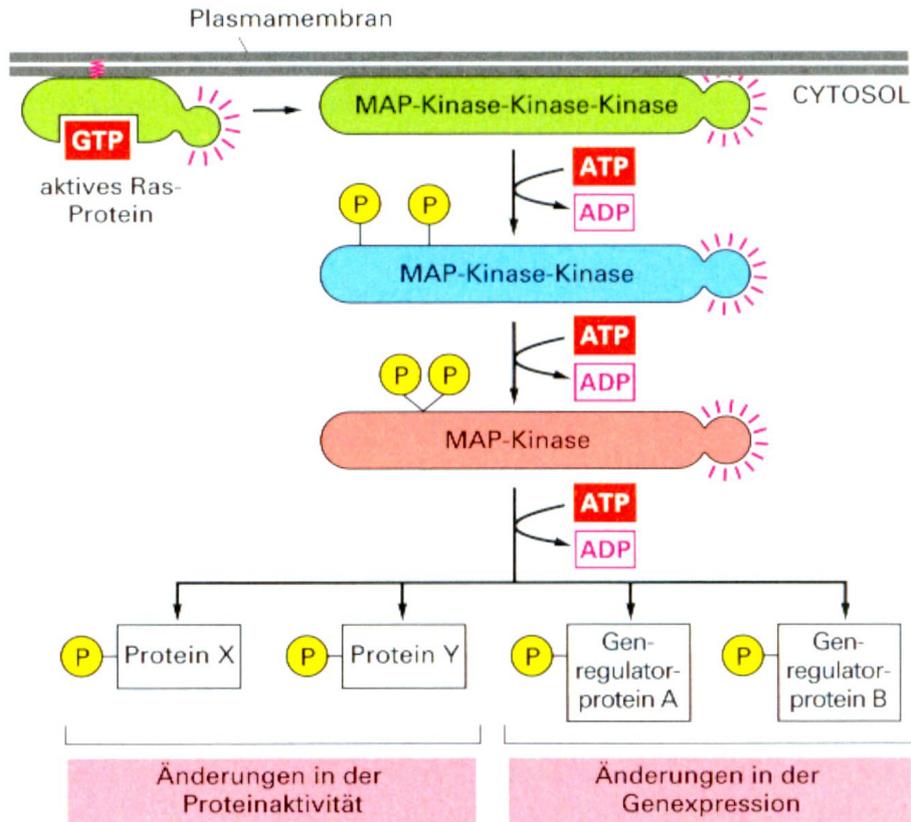


Abbildung 12: Aktivierung einer Protein-Phosphorylierungskaskade durch Ras (Erläuterungen siehe Text). Entnommen aus Alberts *et al.* (2004).

Um die relativ kurzlebigen Tyrosin-Phosphorylierungen und die Aktivierung von Ras in eine nachhaltige Stimulierung von Zellen zur Proliferation und Differenzierung umzuwandeln, wird eine Reihe von deutlich langlebigeren Serin/Threonin-Phosphorylierungen ausgelöst. Viele Serin/Threonin-Kinasen nehmen an dieser Kaskade teil, von denen drei das zentrale Modul der Kaskade darstellen. Die letzte dieser drei Kinasen wird als Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) bezeichnet. Ras aktiviert eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase, die im Ras-Signalweg der Säugetiere als Raf bezeichnet wird. Raf sorgt für die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase MEK, welche wiederum die MAP-Kinase Erk phosphoryliert. Erk dringt z.B. in den Kern ein und phosphoryliert verschiedene Komponenten eines Genregulatorkomplexes.

2.4.4.2 Architektur der Guaninnukleotid-Bindungstasche

An der GTP-Bindung von Ras sind verschiedene Sequenzmotive beteiligt, die in allen Ras-Proteinen konserviert sind. Je nach der Art der Wechselwirkungen bezeichnet man die Sequenzmotive mit G1, G2 und G3 (Bindung der Guaninbase) und PM1, PM2 und PM3 (Bindung der Phosphatgruppen und des Mg^{2+} -Ions). Die relevanten Wechselwirkungen zwischen diesen Sequenzmotiven mit dem GTP-Analogon GppNHp sind in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

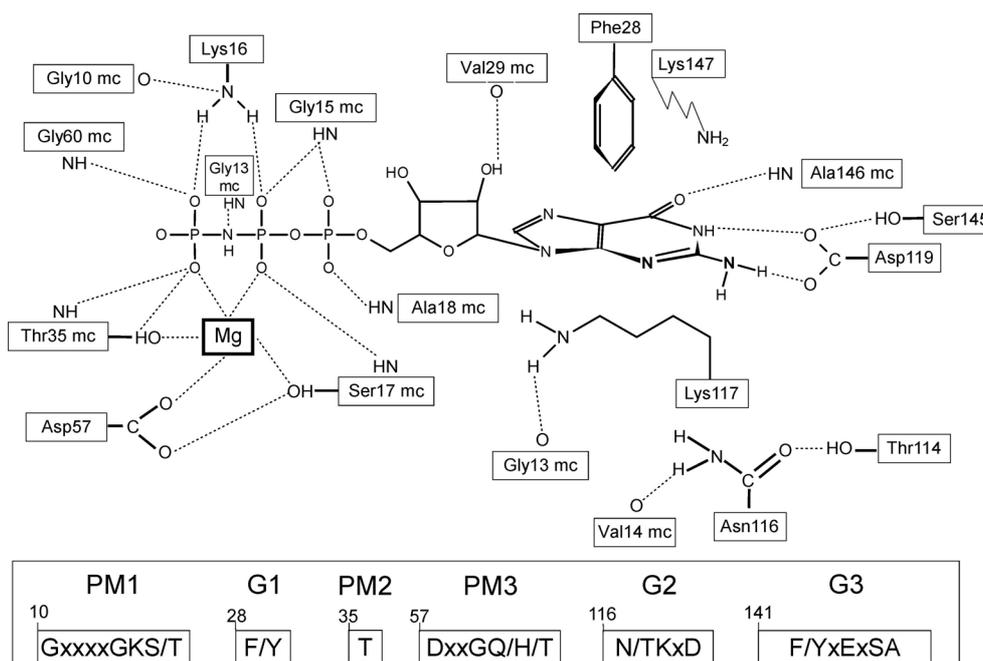


Abbildung 13: Die Motive der G-Domäne. Dargestellt ist das Nukleotid GppNHp, das Mg^{2+} -Ion und die für eine Bindung an Ras ausgebildeten Hauptkettenkontakte (mc) und Kontakte durch Aminosäureseitenketten. Im unteren Kasten sind die konservierten Motive der G-Domäne aufgeführt (PM: Koordination von Phosphatgruppen und Mg^{2+} -Ion, G: Koordination der Guaninbase). Die Aminosäurereste sind im Einbuchstabencode angegeben (x = beliebiger Aminosäurerest). Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Ras. Nach Zerial und Huber (1995).

Die Aminosäurereste des PM1-Motivs (GxxxxGKS/T) sind an verschiedenen Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen des Nukleotids und mit dem Mg^{2+} -Ion beteiligt. Die Motive PM2 (T) und PM3 (DxxGQ/H/T) befinden sich in Regionen von Ras, die während des Schaltvorgangs von Ras große Konformationsänderungen durchlaufen. Durch Wechselwirkungen von Thr-35 aus der Schalter-Region I und Gly-60 aus der Schalter-Region II mit dem γ -Phosphat des Nukleotids werden die Schalter-Regionen in einer Konformation gehalten, die den aktiven Zustand des Proteins charakterisiert. Durch

Hydrolyse von GTP entfallen diese Wechselwirkungen, und die Schalter-Regionen relaxieren zu einer neuen Konformation, die dem inaktiven Zustand von Ras entspricht.

Der Phenylring von Phe-28 aus Motiv G1 (F/Y) steht senkrecht zur Guaninbase und trägt über elektrostatische Wechselwirkungen zur Bindung der Base bei. Einen entscheidenden Beitrag für die Spezifität der Nukleotidbindung leistet das konservierte Asp-119 des G2-Motivs (N/TKxD). Es bildet über seine Seitenkette zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der Guanin-Base aus. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen Asparagin führt zu einer Veränderung der Spezifität der Nukleotidbindung von Guanin zu Xanthin (Hwang und Miller, 1987; Schmidt *et al.*, 1996). Die Wasserstoffbrückenbindung von Ala-146 aus dem G3-Motiv (F/YxExSA) mit der Guanin-Base ist maßgeblich für die Diskriminierung gegen Adenin-Nukleotide (Rensland *et al.*, 1995).

2.4.4.3 Mechanismus der GTP-Hydrolyse

Der Mechanismus der GTP-Hydrolyse von Ras ist in der Vergangenheit ausgiebig untersucht worden. Eine der Fragestellungen war die Funktion von GAPs bei der GTP-Hydrolyse, welche die Reaktionsgeschwindigkeit um mehrere Größenordnungen beschleunigen. Es wurden zwei Modelle diskutiert, welche die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse erklären sollten. Im ersten Modell wurde davon ausgegangen, dass Ras an sich die Fähigkeit zu einer schnellen Hydrolyse besitzt und dass GAPs lediglich eine ratenlimitierende Isomerisierungsreaktion beschleunigen. Im zweiten Modell wurde ein direkter Einfluss der GAPs auf die GTP-Hydrolyse angenommen. Die Kokristallisation von Ras mit GDP, AlF_3 und der katalytischen Domäne von p120-GAP (GAP-334) lieferten den Beweis für das zweite Modell (Ahmadian *et al.*, 1997; Scheffzek *et al.*, 1997).

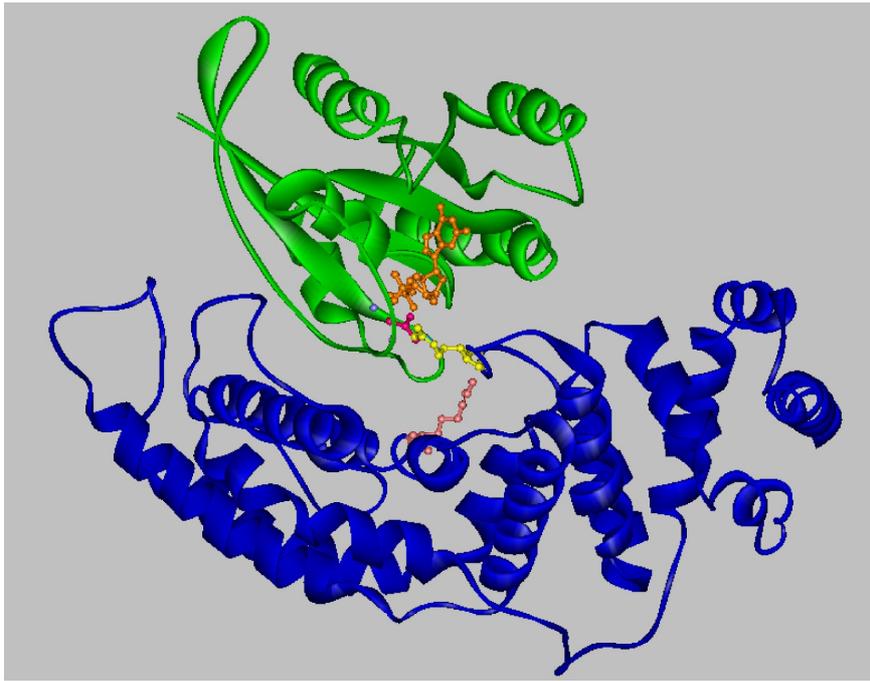


Abbildung 14: Struktur eines Komplexes aus Ras (grün), GDP (orange), AlF_3 (magenta) und GAP-334 (blau). Zusätzlich sind Arg-789 (gelb) und Arg-903 (rosa) von GAP-334 gezeigt. Entnommen aus Krämer (2001).

Der Ras•GDP• AlF_3 •GAP-334-Komplex ähnelt dem Übergangszustand während der Hydrolyse von GTP. Dabei ersetzt AlF_3 die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids. Es ist zu erkennen, dass GAP-334 über eine sogenannte Finger-Schleife in die Nukleotid-Bindungstasche hineinragt. Dabei kontaktiert die Seitenkette des katalytischen Arg-789 die β -Phosphatgruppe des Nukleotids und AlF_3 . Die Seitenkette von Arg-903 stabilisiert das katalytische Arg-789. Über einen Hauptkettenkontakt stabilisiert Arg-789 zusätzlich Glu-61 von Ras. Glu-61 wiederum kontaktiert AlF_3 und das nukleophile Wassermolekül, das für die GTP-Hydrolyse von zentraler Bedeutung ist. Eine Mutation an Position 61 führt zu einer verminderten Hydrolyserate für GTP und wird häufig in Tumor-Zellen gefunden.

Die Natur des Übergangs-Zustands, der während der GTP-Hydrolyse durchlaufen wird, wird noch immer kontrovers diskutiert. Die Diskussion konzentriert sich dabei hauptsächlich auf die Frage, ob der Übergangszustand dissoziativer oder assoziativer Natur ist. Bei einem dissoziativen Mechanismus würde die Anhydrid-Brücke zwischen β und γ -Phosphatgruppe des Nukleotids zunächst aufgelöst werden, bevor ein Wassermolekül nukleophil an das aus der γ -Phosphatgruppe entstandene Metaphosphat angreift. Bei diesem Mechanismus würde also ein Metaphosphat-ähnlicher Zustand PO_3^{2-} mit $\text{P}_\gamma\text{-O}_a$ bzw. $\text{P}_\gamma\text{-O}_{\beta,\gamma}$ -Abständen größer 3,4 Å durchlaufen werden. Bei einem assoziativen Mechanismus erfolgt

die Bindung zum katalytischen Wassermolekül, bevor die Bindung zum Sauerstoff $O_{\beta,\gamma}$ gebrochen wird. Dabei könnte ein pentavalentes Oxy-Phosphoran-Intermediat mit $P_\gamma-O_a$ bzw. $P_\gamma-O_{\beta,\gamma}$ -Abständen von etwa $1,7 \text{ \AA}$ entstehen (s. Abbildung 15, b).

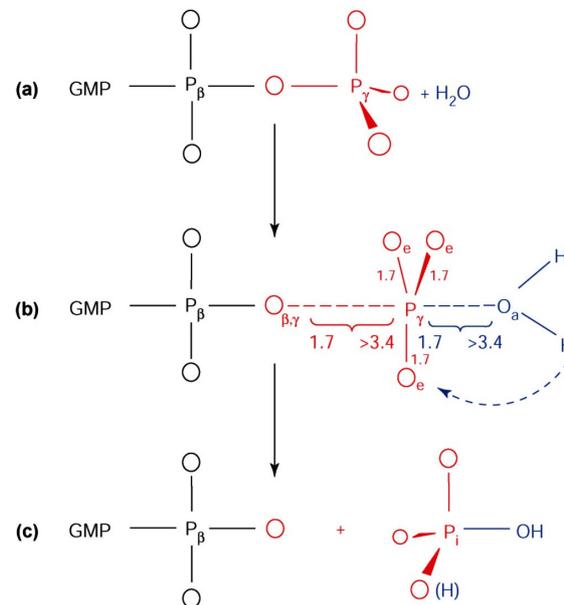


Abbildung 15: Mögliche Mechanismen für die GTP-Hydrolyse in GTP-bindenden Proteinen. Bei einem dissoziativen Mechanismus würde ein Metaphosphat-ähnlicher Zustand PO_3^{2-} mit $P_\gamma-O_a$ bzw. $P_\gamma-O_{\beta,\gamma}$ -Abständen größer $3,4 \text{ \AA}$ durchlaufen werden. Bei einem assoziativen Mechanismus könnte ein pentavalentes Oxy-Phosphoran-Intermediat mit $P_\gamma-O_a$ bzw. $P_\gamma-O_{\beta,\gamma}$ -Abständen von etwa $1,7 \text{ \AA}$ entstehen. Entnommen aus Wittinghofer (2006).

Während einige Untersuchungen eher auf einen assoziativen Reaktionsmechanismus hindeuten, sprechen andere Experimente mehr für einen dissoziativen Mechanismus. Eine aktuelle Arbeit von Wittinghofer (2006) fasst die Diskussion um den Mechanismus der GTP-Hydrolyse anschaulich zusammen. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass kein einheitlicher Reaktionsmechanismus für die GTP-Hydrolyse in verschiedenen GTP-bindenden Proteinen oder für die intrinsische bzw. GAP-stimulierte Hydrolyse existiert. Um eine Gesetzmäßigkeit zu finden, in welcher Art ein System beschaffen sein muss um den einen oder anderem Reaktionsweg zu bevorzugen, sind in Zukunft noch weitere Experimente sowohl experimenteller als auch theoretischer Natur notwendig.

2.4.5 Röntgenographische Untersuchungen an H-Ras p21

Da H-Ras p21 in seiner unverkürzten Form nur schwer kristallisiert werden kann, wurde für röntgenkristallographische Untersuchungen meist ein C-terminal verkürztes Protein mit Aminosäureresten 1-171 (de Vos *et al.*, 1988; Milburn *et al.*, 1990; Prive *et al.*, 1992; Tong *et al.*, 1989; Tong *et al.*, 1991) oder mit Aminosäureresten 1-166 (Krengel *et al.*, 1990; Pai *et al.*, 1989; Pai *et al.*, 1990; Scheidig *et al.*, 1995; Schlichting *et al.*, 1990) verwendet. Auch das intakte Protein mit allen 189 Aminosäureresten konnte kristallisiert werden, jedoch zeigte sich, dass die C-terminalen Aminosäurereste keine geordnete Struktur einnehmen (Milburn *et al.*, 1990), was auch die bessere Kristallisierbarkeit der verkürzten Formen erklärt. Die C-terminalen Aminosäurereste sind hauptsächlich für eine Lokalisierung an der Plasmamembran notwendig, nicht jedoch für die Funktion der G-Domäne selbst. H-Ras p21 mit mindestens seinen ersten 166 Aminosäuren zeigt normale GTPase-Aktivität (de Vos *et al.*, 1988; John *et al.*, 1989) und ist in der Lage, mit Ras-spezifischen Effektoren zu interagieren.

Ein Vergleich der Röntgenstrukturdaten des Komplexes H-Ras p21•GDP•Mg²⁺ (Milburn *et al.*, 1990; Tong *et al.*, 1991) mit dem Komplex aus H-Ras p21 mit Mg²⁺ und einem der hydrolysestabilen GTP-Analoga GppNHp (Pai *et al.*, 1990) oder GppCH₂p (Milburn *et al.*, 1990) zeigt, dass Konformationsänderungen während der GTP-Hydrolyse hauptsächlich in zwei Regionen des Proteins auftreten. Eine dieser Regionen, die als Schalterregion I (*switch I*) bezeichnet wird, bildet einen Teil der Mg²⁺-Bindungsstelle. Sie umfasst in H-Ras p21 etwa die Aminosäuren 30-38. Die zweite mobile Region wird als Schalterregion II (*switch II*) bezeichnet und umfasst etwa Aminosäuren 59-67. Sie bildet die Bindungsstelle für die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids. Die Verwendung von GTP-ähnlichen Nukleotid-Analoga wie GppNHp und GppCH₂p ist für eine mechanistische Betrachtung der GTP-Hydrolyse kritisch, da das gegen Stickstoff bzw. Kohlenstoff ersetzte Sauerstoff-Atom direkt an der während der GTP-Hydrolyse zu spaltenden Bindung beteiligt ist. Um einen realistischeren Übergangszustand von H-Ras p21 in Komplex mit GTP zu erhalten, wurde das Protein deshalb mit dem lichtempfindlichen, hydrolysestabilen Nukleotid-Analogen Guanosin-5'-triphosphat-*P*³-[1-(2-nitrophenyl)-ethyl-ester] (*caged GTP*) kokristallisiert (Schlichting *et al.*, 1989). Durch Bestrahlung des Kristalls mit UV-Licht kann das Nukleotid in GTP und 2-Nitrosoacetophenon gespalten werden (s. Abbildung 16).

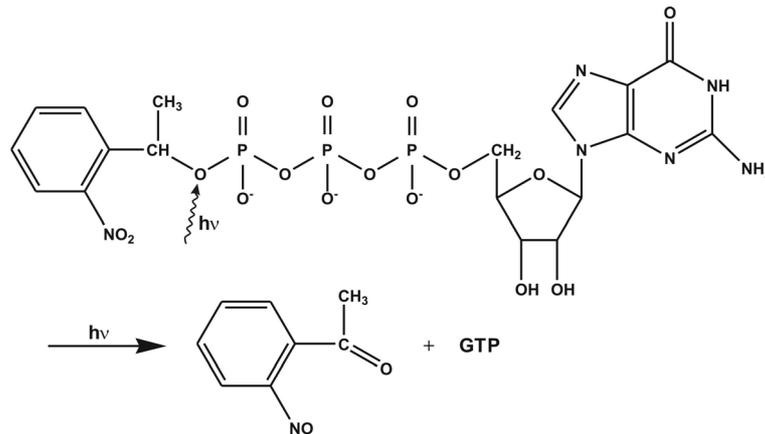


Abbildung 16: Freisetzung von GTP und 2-Nitrosoacetophenon durch Bestrahlung von *caged* GTP mit UV-Licht.

Durch diese Methode kann also ein homogener, kristalliner Komplex H-Ras p21•GTP erzeugt werden, was durch direkte Kokristallisation mit GTP aufgrund der zu hohen Hydrolysegeschwindigkeit von H-Ras p21 nicht möglich wäre. Da H-Ras p21 auch im kristallinen Zustand aktiv ist, wird GTP im Kristall langsam zu GDP hydrolysiert. Es muss deshalb die Aufzeichnung eines vollständigen kristallographischen Datensatzes gewährleistet werden, bevor eine signifikante Menge GTP zu GDP hydrolysiert wurde. Dazu wurden Diffraktionsexperimente nach der *Laue*-Methode (s. Kapitel 2.3.4.2) angewandt, bei der durch Verwendung von polychromatischer Röntgenstrahlung eine erheblich schnellere Datensammlung erreicht wird, als mit monochromatischer Strahlung möglich ist (Scheidig *et al.*, 1994; Schlichting *et al.*, 1990). Ein vollständiger Datensatz konnte so innerhalb von wenigen Minuten nach Photolyse von *caged* GTP gewonnen werden.

Die Entwicklung der Kryo-Kristallographie (Garman und Schneider, 1997; Rodgers, 1997) eröffnete eine weitere elegante Methode, um kurzlebige Intermediate wie H-Ras p21•GTP lange genug zu stabilisieren, um einen vollständigen Datensatz vom Intermediat-Zustand aufnehmen zu können. Dabei wird der Proteinkristall nicht bei Raumtemperatur in einer Kapillare, sondern in einem kalten Gasstrom bei etwa 100 K in einer Nylon-Schleife stabilisiert. Mit dieser Methode wurde beispielsweise von Scheidig *et al.* (1999) ein röntgenographischer Datensatz des Komplexes H-Ras p21•GTP aufgenommen, welcher eine im Vergleich zu früheren *Laue*-Experimenten deutlich höhere Datenqualität aufwies. Interessanterweise wurde eine Temperaturabhängigkeit in der Position einiger Wassermoleküle festgestellt. Es wurde diskutiert dass diese Temperaturabhängigkeit

möglicherweise von unterschiedlichen Energie-Potentialfunktionen einiger Wasserpositionen herrührt, die bei der GTP-Hydrolyse eine Rolle spielen, aber zu kurzlebig sind um bei Raumtemperatur beobachtet werden zu können. In diesem Fall könnten möglicherweise aus der Annäherung eines Wassermoleküls an das γ -Phosphoratom des Nukleotids bei 100 K einige Rückschlüsse auf den Mechanismus der GTP-Hydrolyse gezogen werden (Scheidig *et al.*, 1999). Man erkennt, wie selbst kleinste Detailinformationen einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion eines Proteins liefern können.

2.4.6 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an H-Ras p21

Neben einer hohen räumlichen Auflösung der Proteinstruktur, welche durch Röntgen-Diffraktionsexperimente gewonnen werden kann, ist auch eine hohe zeitliche Auflösung der Veränderungen wünschenswert, die bei einer Reaktion wie z.B. der GTP-Hydrolyse durchlaufen werden. Da Röntgen-Diffraktionsexperimente für die Verfolgung zeitlicher Veränderungen in einem Protein nur sehr bedingt geeignet sind, wurden dafür häufig fluoreszenzspektroskopische Methoden an dem Protein in wässriger Lösung eingesetzt. H-Ras p21 besitzt kein intrinsisches Tryptophan, aber es enthält neun Tyrosin-Reste, die über die gesamte Proteinlänge verteilt sind. Es ist nicht überraschend, dass Fluoreszenzänderungen, welche durch Nukleotidbindung, Nukleotidaustausch, oder durch GTP-Hydrolyse verursacht werden, aufgrund der geringen intrinsischen Fluoreszenz ebenfalls sehr gering ausfallen. Eine Möglichkeit, um die intrinsische Fluoreszenz zu erhöhen, ist die ortsgerichtete Mutagenese einer geeigneten Aminosäure zu Tryptophan. Es wird dabei eine Position gewählt, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch Ereignisse im aktiven Zentrum des Proteins beeinflusst wird (Antonny *et al.*, 1991; Skelly *et al.*, 1990; Yamasaki *et al.*, 1994). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden wie mant GTP oder mant dGppNHp. Mant-Nukleotide wurden für die Untersuchung von Bindungskinetiken (John *et al.*, 1990), der GTPase-Kinetik (Moore *et al.*, 1993; Neal *et al.*, 1990; Rensland *et al.*, 1991) sowie des Mechanismus der GAP-Interaktion (Moore *et al.*, 1993; Rensland *et al.*, 1991) verwendet. Bei der Bindung eines dieser Nukleotide an H-Ras p21 wird ein großer Fluoreszenzanstieg beobachtet, der durch eine Verminderung von Fluoreszenz-löschenden Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Bei der anschließenden Hydrolyse im Falle von mant GTP wird eine

kleinere Fluoreszenz-Abnahme beobachtet, die vermutlich auf der Bewegung von Tyr-32 während der mant GTP-Hydrolyse herrührt (Schlichting *et al.*, 1990). Für eine detaillierte Interpretation der beobachteten Fluoreszenzänderung wurden Röntgen-Diffraktionsexperimente am Komplex aus H-Ras p21•mant GppNHp durchgeführt (Scheidig *et al.*, 1995), welche die Wechselwirkung von Tyr-32 mit der mant-Gruppe des Nukleotids belegen. Anhand dieser Arbeit wurde die Möglichkeit vorgeschlagen, einen an Aminosäurerest 32 angebrachten Fluorophor als Indikator für den Zustand der Effektor-Schleife (Schalter-Region I) in kinetischen Untersuchungen in Lösung und potentiell auch in kristalliner Form zu verwenden. Die beschriebenen Experimente sind ein gutes Beispiel, um die Vorteile einer Kombination von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten zu verdeutlichen.

Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung ist die künstliche Einbringung von kovalent an das Protein gebundenen Fluorophoren. Dies hat den Vorteil, dass man nicht auf die natürlich vorkommenden fluoreszenten Aminosäuren beschränkt ist. Durch eine Kombination von ortsgerichteter Mutagenese und der spezifischen Kopplung von verschiedenen Thiol-reaktiven Fluorophoren konnte A. Krämer gezielt Fluoreszenzsonden in der Nähe des aktiven Zentrums und von Effektor-Interaktionsflächen einbringen (Krämer, 2001). Mit derart modifizierten Ras-Varianten konnte die Effektorinteraktion und die Ras-Deaktivierung in Echtzeit untersucht werden. Auch wenn die verwendeten Fluorophore für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht in Frage kamen, bildete die von A. Krämer hergestellte Doppelmutante H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) die Grundlage für die Entwicklung des in dieser Arbeit verwendeten biologischen Modellsystems.

3 Materialien

3.1 Proteine und Chemikalien

3.1.1 Verwendetes Proteinkonstrukt

Ein ptac Expressions-Plasmid (Tucker *et al.*, 1986), das für eine verkürzte Form von H-Ras p21 (Aminosäuren 1-166) mit zwei Mutationen (Y32C, C118S) kodiert, wurde von Astrid Krämer (MPI für molekulare Physiologie, Abteilung I (Strukturbiologie), Dortmund; (Krämer, 2001)) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid wurde in *E. coli* Stamm CK600K (K12 Wildtyp CK600, welcher das Plasmid pDMI,1 enthält (John *et al.*, 1989)) transformiert.

3.1.2 Chemikalien

Alle in der nachfolgenden Liste nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden entweder von Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt) oder von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Chemikalie	Bezugsquelle
(NH ₄) ₂ SO ₄	Applichem (Darmstadt)
Acetonitril	Fisher Scientific (Loughborough, UK)
Acrylamid (40 %)	Serva (Heidelberg)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Antifoam A Konzentrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
APS	Roth (Karlsruhe)
Benzamidin	Merck (Darmstadt)
Bradford-Lösung	Sigma (Steinheim)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Seelze)
CHCA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva (Heidelberg)
Crystal Screen 2 TM	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
Crystal Screen TM	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
DMSO	Fisher Scientific (Loughborough, UK)
DTT	Gerbu Biotechnik (Gaiberg)

Chemikalie	Bezugsquelle
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Baker (Deventer, Holland)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Seelze)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Guanidin-Hydrochlorid	Acros Organics (New Jersey, USA)
HCl	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
IPTG	BioVectra - BTS Biotech (Leon-Rot)
IZIT? Crystal Indicator	Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA)
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (Steinheim)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
L(+)-Ascorbinsäure	J.T. Baker (Deventer, Holland)
MgCl ₂	Merck (Darmstadt)
MgSO ₄	Fluka (Buchs)
<i>N,N'</i> -Methylen-bisacrylamid (2 % w/v)	Serva (Heidelberg)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Na-Desoxycholat	Merck (Darmstadt)
NaN ₃	Merck (Darmstadt)
NaOH	Roth (Karlsruhe)
NTCB	Sigma (Steinheim)
PEG (400, 4000, 6000, 8000)	Fluka (Buchs)
PEG/Ion Screen TM	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
PMSF	Sigma (Steinheim)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Sinapinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TBABr	Fluka (Buchs)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure	Fluka (Buchs)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
ZnCl ₂	Fluka (Steinheim)
β-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)

3.1.3 Enzyme und Proteinstandards

Enzym	Bezugsquelle
alkalische Phosphatase (Kälberdarm, 10 U/ μ l)	Roche (Mannheim)
BSA	Sigma (Steinheim)
DNase I	Roche (Mannheim)
LMW-Proteinstandard	Pharmacia (Freiburg)
Lysozym	Sigma (Steinheim)

3.1.4 Nukleotide und Fluoreszenzfarbstoffe

Die Nukleotide GDP, GTP und GppNHp wurden in einer Reinheit von ≤ 95 % bezogen und von Sascha Gentz (MPI für molekulare Physiologie, Abteilung III (Physikalische Biochemie), Dortmund) nachgereinigt. Das Isomergemisch R/S-*caged* GTP wurde von Sascha Gentz synthetisiert. Isomerenreines R-*caged* GTP und S-*caged* GTP wurde von John E. Corrie (MRC, London, Mill Hill) synthetisiert.

Nukleotid	Bezugsquelle
7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylsäure-succinimidyl-ester	Molecular Probes (Oregon, USA)
Fluorescein	Zentrales Chemikalienlager (Universität des Saarlandes)
di-Natrium-Fluorescein	Zentrales Chemikalienlager (Universität des Saarlandes)
GDP	Fluka (Buchs)
GppNHp	Fluka (Buchs)
GTP	Fluka (Buchs)
IANBD Amid	Molecular Probes (Oregon, USA)
IANBD Ester	Molecular Probes (Oregon, USA)
NBDCI	Molecular Probes (Oregon, USA)

3.1.5 Medien und Antibiotika

Medien und Kulturschalen mit verschiedenen Antibiotika wurden von der ZE Biotechnologie (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) hergestellt.

Medium/Antibiotikum	Zusammensetzung/Bezugsquelle
Ampicillin	Fluka (Buchs)
Carbenicillin	Sigma (Steinheim)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l NaCl, 5 mM NaOH, 5 g/l Hefe-Extrakt
Standard I - Medium	Für ~ 1 Liter Medium werden zusammengegeben: 7,8 g Pepton aus Fleisch, 7,8 g Pepton aus Casein, 2,8 g Hefe-Extrakt, 5,6 g NaCl, 1 g D(+)-Glukose und 1000 ml H ₂ O (dest.).

3.1.6 Puffer

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
C/2-	32 mM TRIS / HCl pH 7,6, 0,5 mM NaN ₃ , 5 mM MgCl ₂
C/2+	32 mM TRIS / HCl pH 7,6, 0,5 mM NaN ₃ , 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT
C+	64 mM TRIS / HCl pH 7,6, 1 mM NaN ₃ , 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
Coomassie-Lösung	0,1 % (w/v) Coomassie R250, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
D	64 mM TRIS / HCl pH 7,6, 1 mM NaN ₃ , 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 400 mM NaCl, 0,1 mM GDP
HPLC-Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 6,5, 5 mM TBABr, 0,1 mM NaN ₃ , Acetonitril (Konzentration 8-20 % (v/v) je nach zu analysierender Substanz)
KCM	100 mM KCl, 30 mM CaCl ₂ , 50 mM MgCl ₂
L.B.4	75 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7,6, 5 mM MgCl ₂ , 0,5 mM NaN ₃ , 3 mM Ascorbinsäure / HCl pH 7,0, 0,05 mM GDP
Lyse-Puffer	32 mM TRIS / HCl pH 7,6, 0,5 mM NaN ₃ , 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 mM Benzamidin
N.E.-Puffer	50 mM TRIS / HCl pH 8,5, 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM DTT, 10 μM ZnCl ₂

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
NTCB-Verdaupuffer	2 mg/ml NTCB, 100 mM TRIS / HCl pH 8,0, 6 M Guanidin-HCl
PP	für ~ 10 ml PP werden zusammengegeben: 3 ml 160 mM TRIS / HCl pH 8,0, 3 ml 2 mM EDTA, 2 ml Glycerin, 2 ml β -Mercaptoethanol, 4 mg Bromphenolblau, 1g SDS
PP 4x	200 mM TRIS / HCl pH 7,0, 400 mM DTT, 8 % (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin
SDS-Entfärbepuffer	10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS, 0,2M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
STE	20 mM TRIS / HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
TSB	LB-Medium (mit HCl auf pH 6,1 eingestellt), 10 % (w/v) PEG-3350, 5 % (v/v) DMSO, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂
X	64 mM TRIS / HCl pH 7,6, 0,1 mM NaN ₃ , 20 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
XK 16/10	100 mM HEPES pH 7,2, 64 mM TRIS / HCl pH 7,6, 20 mM MgCl ₂ , 200 mM Mg-Acetat, 0,1 mM NaN ₃ , 10 % (v/v) Glycerin, 16 % (v/v) PEG 8000 (frisch angesetzt)
XK 17/20	100 mM HEPES pH 7,2, 64 mM TRIS / HCl pH 7,6, 20 mM MgCl ₂ , 200 mM Mg-Acetat, 0,1 mM NaN ₃ , 20 % (v/v) Glycerin, 17 % (v/v) PEG 8000 (frisch angesetzt),

3.2 Säulen und Säulenmaterialien

Säulenmaterial	Bezugsquelle
DEAE Sepharose FF	Pharmacia (Freiburg)
HPLC-Säule 25/4,6 ODS Hypersil 5 μ m	Bischoff, Leonberg
Superdex 75 prep grade 26/60	Pharmacia (Freiburg)

3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Bezugsquelle
Akupunkturadeln	Aku-Net (Ostfildern)
Deckgläser, Ø 22 mm	Roth (Karlsruhe)
Einmal-Filtrationseinheit Nalgene 500 ml	Nalge Nunco Int. (New York, USA)
Einmalküvetten 1,5 ml Plastibrand	Brand (Wertheim)
Einmal-Vakuum-Filtermembranen 0,22 µm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Konzentrator Amicon Ultra	Millipor (Bedford, USA)
Konzentrator Microcon	Millipor (Bedford, USA)
Linbro Zellkulturplatten (für Kristallisation)	ICN (Eschwege)
NAP-5 Entsalzungssäulen	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Nylonschleifen 0,05 - 1 mm Ø, mit Halterung und Lagerungsgefäß	Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA)
PD-10 Entsalzungssäulen	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Siliconpaste Baysilone mittelviskos	Bayer (Leverkusen)
Spritzenfilter (0,2 µm oder 0,45 µm Porengröße)	Wicom (Heppenheim)

3.4 Geräte und Zubehör

Gerät	Bezugsquelle
Analysenwaage Ohaus Explorer	Ohaus (Schweiz)
Analysenwaage Sartorius Basic BP110S	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzspektrometer Aminco SLM 8100	Sopra (Büttelborn)
FPLC-System	Pharmacia (Freiburg)
FPLC-System Äkta Basic	Amersham Biosciences (Freiburg)
Gelelektrophorese-Apparatur Mini Protean 2	BioRad (München)
Geltrockner Modell 543	Biorad (München)
Heizblock Dri-Block DB2A	Techne (Cambridge, UK)
HPLC-System	Varian (Darmstadt)
LQC Massenspektrometer	Finnigen (Bremen)
MALDI-TOF Voyager TM -DE Pro Biospectrometry Workstation	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Mikrofluidizer	Microfluidics (Newton, MA, USA)

Gerät	Bezugsquelle
OPO-Laser Surelite II-10	Continuum (Int.)
pH-Messgerät	Inolab (Weilheim)
pH-Messgerät 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipetten 2µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Int. B.V. (Bad Camberg)
Schüttler für Expressionskulturen	New Brunswick Sci. (Edison, USA)
Schüttler für Gele KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Sonifikator Bandelin HD 70	Bandelin (Berlin)
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK103 H	Bandelin (Berlin)
UV/VIS- Spektralphotometer	Shimadzu (Düsseldorf)
UV/VIS- Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Heraeus Biofuge primio R	Kendro (Osterode)
Zentrifuge Minispin	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Sorval RC-5B	Kendro (Düsseldorf)

3.5 Komponenten des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers

Gerät	Bezugsquelle
CCD-Detektor USB-2000	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Faser-Verbindungsstücke SMA 905	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Inline-Filterhalter INLINE-FH	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Justierlichtquelle LS-1	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Küvettenhalterung CUV-ALL-UV	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Laser He-Cd, Modell IK5652R-G	Soliton (Gilching)
Lochplättchen, ID 35 µm	Edmund Optik (Karlsruhe)
Luftfeuchteconditionierer DG-1	Sable Systems Int. (Las Vegas, USA)
Magnet 50x50x15 mm, NdFeB, N48	Björn Klink, www.wundermagnete.de (Eigenvertrieb)
mech. Licht-Unterbrecher INLINE-TTL-S	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)
Messgerät für Laserintensität PM-100	Soliton (Gilching)
Monochromator H10-UV	ISA Instruments SA, division Jobin-Yvon
optische Fasern	Ocean Optics (Duiven, Niederlande)

Gerät	Bezugsquelle
optische Filter	Ocean Optics (Duiven, Niederlande), Itos (Mainz)
Spiegelobjektiv	4DX Systems AB (Uppsala, Schweden)
Wachs-Heizgerät Mod. 8901	Babor Treatment Systems
Xenon-Hochdrucklampe 150W MOD A1000	PTI

3.6 Röntgenquellen und Zubehör

Gerät/Messstation	Herkunft/Standort
CCD-Röntgendetektor Onyx	Oxford Diffraction (Oxford, England)
Generator für kalten Gasstrom Cryojet XL	Oxford Diffraction (Oxford, England)
Synchrotron-Messstation PX-I	SLS (Villigen, Schweiz)
Synchrotron-Messstationen ID14-1, ID14-2, ID14-3 und ID14-4	ESRF (Grenoble, Frankreich)
Xcalibur PX Ultra Labor-Röntgendiffraktometer	Oxford Diffraction (Oxford, England)

3.7 Computerprogramme

Neben üblichen Programmpaketen zur Erstellung von Texten und Grafiken von Microsoft, Adobe, Corel und anderen Anbietern wurden die folgenden spezialisierten Programme verwendet:

Programmpaket, Version	Hersteller/Literatur
ACONIO, Version 990129	unpubliziertes Programm (Kleywegt <i>et al.</i> , 2001)
ARP/WARP, Versionen 5.0 - 6.1	Perrakis <i>et al.</i> (2001)
CCP4 Programmpaket, Versionen 4.1 - 5.0.2	Collaborative Computational Project (1994)
CrysAlis, Version 1.171.21 beta	Oxford Diffraction (Oxford, England)
EMACS, Version 21.3.1	Free Software Foundation, Inc. (Boston, USA)
Hyperchem Version 7.1	Hypercube, Inc.(Gainesville, FL, USA)
Monomer Library Sketcher	(Collaborative Computational Project Number 4, 1994)

Programmpaket, Version	Hersteller/Literatur
O, Version 8.011-9.03	Jones <i>et al.</i> (1991)
OOIBase32 Platinum, Version 2.0.1.4	Ocean Optics (Niederlande)
Origin, Version 6.0	Microcal Software (Northampton, USA)
PROCHECK, Version 3.5	Laskowski <i>et al.</i> (1993)
PyMOL, Versionen 0.90 – 0.97	Delano (2002)
Star Chromatography Workstation, Version 5.0	Varian (Darmstadt)
XDS Programmpaket (XDS, XSCALE, XDSCONV), Versionen der Jahre 2001-2004	Kabsch (1988; 1993)
XPLO2D, Version 051002-3.3.2	(Kleywegt <i>et al.</i> , 2001)

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

PEG/DMSO-kompetente Zellen wurden von Diana Ludwig (MPI für molekulare Physiologie, Abteilung III (Physikalische Biochemie), Dortmund) nach der Methode von Chung und Miller (1988) hergestellt.

4.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden 40 µl einer PEG/DMSO-kompetenten Bakteriensuspension in TSB-Puffer auf Eis aufgetaut und mit 39 µl KCM-Puffer und 1 µl einer Plasmid-Lösung (Konzentration etwa 10 ng/µl) versetzt. Der Ansatz wurde leicht ohne maschinelle Hilfe (durch „Anschneiden“) gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von dem Gemisch wurden 10 µl bzw. 70 µl auf zwei LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4.1.3 Proteinexpression

Für die Expression von H-Ras p21 in *E. coli* Stamm CK600K wurden 25 ml Standard I-Medium mit 50 mg/l Carbenicillin und 50 mg/l Kanamycin mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und für etwa 15 Stunden bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurden 500 ml Standard I-Medium mit 100 mg/l Ampicillin und 50 mg/l Kanamycin mit 10 ml dieser Bakteriensuspension angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4200xg zentrifugiert, und mit dem Pellet wurden 9,5 Liter Standard I-Medium angeimpft. Nach Zugabe von einem Tropfen Antifoam A Konzentrat pro 1,5 Liter Medium wurde die Bakteriensuspension in 5 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37 °C geschüttelt. Nach Erreichen von $OD_{600} = 0,7$ wurde mit 0,5 mM IPTG die Proteinexpression induziert und für 13 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 4200xg und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit STE-Puffer gewaschen,

erneut zentrifugiert und in C/2+ - Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von je 2 mM PMSF und Benzamidin wurde die Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

4.1.4 Test auf Einschlusskörper (*inclusion bodies*)

Es wurden 100 µl einer Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von etwa $OD_{600} = 5$ zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5 ml STE-Puffer gewaschen und in 100 µl STE-Puffer resuspendiert. Es wurde 1 µl einer Lösung aus 10 mg/ml Lysozym in STE-Puffer und 1 µl einer 4 %igen Na-Desoxycholat-Lösung zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit 10 Ultraschall-Pulsen sonifiziert. Die Probe wurde bei 12000xg zentrifugiert, und das Pellet wurde vom Überstand getrennt. Nach Zugabe von 100 µl PP-Puffer zum Pellet und 30 µl PP 4x-Puffer zum Überstand wurden die getrennten Proben mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 4.2.5) analysiert.

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Zellaufschluss

Die entsprechend Kapitel 4.1.3 hergestellte Bakteriensuspension wurde in kaltem Wasser aufgetaut. Die Konsistenz der Suspension wurde anhand ihres Fliessverhaltens überprüft. Bei starker Schleimbildung, welche durch freie DNA aus bereits lysierten Bakterien hervorgerufen wird, wurde etwa 1 mg DNase I zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem Mikrofluidizer bei einem Druck von 6 bar aufgeschlossen, wobei die Druckzelle mit Eis gekühlt wurde. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30000xg, 4 °C, 2 Std.) abgetrennt und der Überstand durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße) filtriert.

4.2.2 Proteinreinigung aus dem Zell-Lysat

Das Protein H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie und eine anschließende Endreinigung durch Gelfiltration aus dem Zell-Lysat gewonnen. Für die zwei säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurde dabei ein FPLC-System der Firma Pharmacia (Freiburg) eingesetzt. Im ersten Reinigungsschritt wurde das filtrierte Zell-Lysat auf eine mit C/2+ - Puffer equilibrierte DEAE Sepharose FF Ionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit C/2+ - Puffer gewaschen und mit einem Gradienten von 0 - 100 % C/2+ - Puffer mit 400 mM NaCl über 5 Säulenvolumina eluiert. Alternativ konnte das Protein durch einen Stufengradienten von C/2+ - Puffer mit 32 mM NaCl auf C/2+ - Puffer mit 64 mM NaCl eluiert werden. H-Ras p21-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 4.2.5) identifiziert und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung (s. Kapitel 4.2.3) oder durch Membranfiltration (s. Kapitel 4.2.4) eingengt und in D-Puffer überführt. Für den zweiten Schritt der Proteinreinigung wurde das konzentrierte Eluat auf eine mit D-Puffer equilibrierte Superdex 75 (26/60) Gelfiltrationssäule aufgetragen und bei einer Flussrate von 1,5 ml/min eluiert. H-Ras p21-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 4.2.5) identifiziert und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Membranfiltration auf etwa 15 mg/ml konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Konzentrierung durch Ammoniumsulfat-Fällung

Durch eine Ammoniumsulfat-Fällung können Proteine aus großen Volumina einer Proteinlösung konzentriert werden. Für die Konzentrierung von H-Ras p21 - haltigen Lösungen wurden pro Milliliter Proteinlösung 0,472 g fein zerriebenes Ammoniumsulfat-Pulver in kleinen Portionen unter Rühren zugegeben, so dass eine 70 %ige Ammoniumsulfat-Lösung erreicht wurde. H-Ras p21 geht unter diesen Bedingungen in Form von Salz-Addukten in den festen Zustand über, ohne dabei zu denaturieren oder signifikant an Aktivität zu verlieren. Die Lösung wurde für mindestens drei Stunden bei 4 °C belassen und anschließend bei etwa 10000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Protein-Pellet wurde durch Zugabe eines geeigneten Puffers wieder in Lösung gebracht oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu einer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.4 Konzentrierung und Pufferaustausch durch Membranfiltration

Proteinlösungen können durch Filtration mit einer semipermeablen Membran, die nur für Moleküle bis zu einem bestimmten Molekulargewicht durchlässig ist, konzentriert werden. Für die Konzentrierung von H-Ras p21 wurden Konzentratoren (je nach Probenvolumen Microcon oder Amicon Ultra (Millipor, Bedford, USA)) mit Porengrößen verwendet, die für Moleküle mit einem Molekulargewicht über 10 kDa undurchlässig sind. Kleinere Moleküle und Salze wandern durch die Membran und können so von der Proteinlösung getrennt werden. Durch mehrfaches Zugeben einer geeigneten Pufferlösung zur konzentrierten Proteinlösung und erneutes Konzentrieren konnte auf diese Weise auch ein Pufferwechsel durchgeführt werden. Für einen vollständigen Pufferwechsel wurde die Proteinlösung fünfmal um einen Faktor von 5-10 aufkonzentriert und wieder mit frischem Puffer verdünnt.

4.2.5 Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen zur Reinheits- und Molekulargewichtsbestimmung wurde nach dem System von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein bezüglich Porengröße und Pufferzusammensetzung diskontinuierliches System zur Auftrennung von mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturierten Proteinen. Die elektrophoretische Trennung beruht hierbei auf Siebeffekten durch die Poren des Acrylamid-Gels, die Proteine werden also nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die zu untersuchende Proteinlösung wurde im Verhältnis 1:1 mit PP-Puffer bzw. im Verhältnis 3:1 mit PP 4x - Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden auf ein aus Sammel- und Trenngel bestehendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Sammelgel enthielt 5 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM TRIS/HCl pH 6,8 und 0,06 % (w/v) SDS, und das Trenngel enthielt 15 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM TRIS/HCl pH 8,8 und 0,06 % (w/v) SDS. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl 10 % (w/v) APS und 5 µl TEMED pro 10 ml Gelvolumen eingeleitet. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel. Zum Größenvergleich diente LMW-Proteinstandard, ein Gemisch aus unterschiedlichen Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Nach beendeter

Elektrophorese wurden die Acrylamid-Gele in Coomassie-Lösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Waschen in SDS-Entfärbepuffer entfernt.

4.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Eine etwa 10 µg Protein enthaltende Lösung wurde mit 200 µl Bradford-Lösung versetzt und mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Extinktion der Lösung bei 595 nm bestimmt. Durch Vergleich mit einer Eichmessung am Referenzprotein BSA (*bovine serum albumine*) konnte dann die Proteinkonzentration ermittelt werden.

4.2.7 Kopplung von NBD-Fluorophoren an exponierte Cysteine

Zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen wurden NBD-Fluorophore kovalent an exponierte Cysteine gebunden. Das Reaktionsschema der Kopplungsreaktion und die verwendeten Fluorophore sind in Abbildung 17 dargestellt.

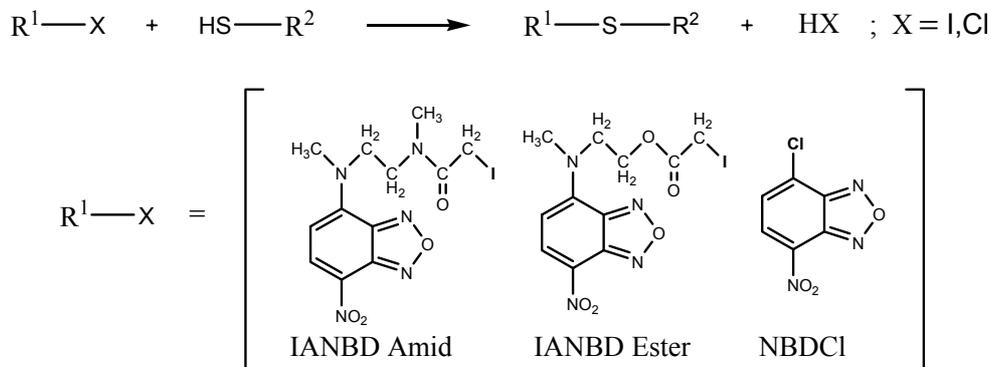


Abbildung 17: Reaktionsschema für die Reaktion der verwendeten NBD-Fluorophore (R^1-X , $X = I, Cl$) mit exponierten Cysteinen eines Proteins (R^2-SH).

Die aufgeführten NBD-Fluorophore reagieren unter Abspaltung von HX ($X = I, Cl$) mit exponierten Cystein-Gruppen. Da die Reaktion auch mit anderen Thiol-haltigen Molekülen stattfinden kann, wurde die Fluoreszenzmarkierung in Abwesenheit von DTT durchgeführt. Als Thiol-freies Reduktionsmittel wurde stattdessen Ascorbinsäure verwendet. Die Kopplungsreaktion erfolgte in einer Lösung aus etwa 25 mg H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) in 1,5 ml L.B.4-Puffer. Die Löslichkeit der oben dargestellten Fluorophore in

DMSO ist am höchsten für NBDCI und am niedrigsten für IANBD Amid. Für die Fluoreszenzmarkierung mit IANBD Amid wurden etwa 5 mg Fluorophor in 130 μ l DMSO suspendiert und unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads teilweise in Lösung gebracht. Die Fluorophor-Suspension wurde über einen Zeitraum von etwa 5 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur in die Proteinlösung eingetropfelt und unter Lichtausschluss weiter gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde regelmäßig durch MALDI-Massenspektroskopie (s. Kapitel 4.3.1.2) kontrolliert. Dazu wurden 0,5 μ l der Reaktionslösung entnommen und ohne sonstige Nachbehandlung in verschiedenen Verdünnungen mit einer Lösung aus 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % TFA und 10 mg/ml Sinapinsäure durch MALDI-MS vermessen. Die erhaltenen Massenspektren waren aufgrund der komplexen Pufferzusammensetzung verrauscht, jedoch ausreichend um die Hauptanteile der Proteinlösung zu analysieren (Beispielspektrum siehe Kapitel 5.1.4, Abbildung 23). Nach etwa einer Stunde wurden weitere 6,5 mg IANBD Amid in DMSO tropfenweise zugegeben. Nach etwa 1,5 Stunden Gesamt-Reaktionszeit wurde keine weitere Veränderung im Markierungsgrad festgestellt. Um eine vollständige Reaktion sicherzustellen, wurde weitere 4,5 Stunden gerührt und durch Gelfiltration mit einer PD10-Säule in D-Puffer umpuffert. Anschließend wurden durch eine mit D-Puffer equilibrierte Superdex 75 (26/60) Gelfiltrationssäule verbleibende Verunreinigungen abgetrennt.

4.2.8 Nukleotidaustausch

Für die Einführung von hydrolysestabilen Nukleotid-Analoga wie GppNHp und *caged* GTP in H-Ras p21 wurde die Methode des enzymatischen Abbaus von GDP durch alkalische Phosphatase (Tucker *et al.*, 1986) gewählt. Da H-Ras p21 in Nukleotid-freier Form sehr instabil ist, ist eine vollständige Nukleotid-Befreiung und anschließende Einführung des gewünschten Nukleotids nur in Ausnahmefällen sinnvoll (Feuerstein *et al.*, 1987). Stattdessen kann durch Zugabe eines geringen Überschusses des einzuführenden Nukleotids ein Gleichgewicht mit dem nach der Reinigung vorliegenden Komplex H-Ras p21•GDP eingestellt werden. H-Ras p21 zeigt eine signifikante Dissoziationsrate für GDP und andere gebundene Nukleotide, welche durch Zugabe von Ammoniumsulfat noch erhöht werden kann. Durch alkalische Phosphatase kann freigesetztes GDP enzymatisch abgebaut und somit dem Gleichgewicht entzogen werden.

Zunächst wurde durch Membranfiltration (s. Kapitel 4.2.4) fluoreszenzmarkiertes H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S, C32-IANBD-amid) (im weiteren Verlauf als „p21(mod)“ bezeichnet) in N.E.-Puffer überführt. Zu jeweils 500 µl einer Proteinlösung der Konzentration 10 mg/ml wurden 0,1 µl (1 U) alkalische Phosphatase sowie ein 3-5-facher molarer Überschuss des einzuführenden Nukleotids zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert und die Vollständigkeit der GDP-Hydrolyse durch HPLC (s. Kapitel 4.3.3) verfolgt. Nach vollständiger Hydrolyse von GDP wurde durch Zugabe von 10 mM Magnesiumchlorid der Nukleotid-gebundene Zustand von p21(mod) stabilisiert. Die Proteinlösung wurde über eine mit X-Puffer equilibrierte NAP-5 oder PD-10-Säule von überschüssigem Nukleotid befreit und für die anschließende Proteinkristallisation in X-Puffer überführt. Nach einer Konzentrierung der Proteinlösung durch Membranfiltration auf etwa 15 mg/ml wurde das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu einer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um ein Bleichen des Fluorophors und gegebenenfalls eine vorzeitige Photolyse von *caged* GTP zu vermeiden.

4.2.9 Proteinfragmentierung durch NTCB

Zur Verifizierung der Fluoreszenzmarkierung wurde eine chemische Spaltung mit 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (NTCB) durchgeführt. Die chemische Spaltung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, was gegenüber einer enzymatischen Spaltung den Vorteil hat, dass die Spaltung unabhängig von der Sekundärstruktur des Proteins ablaufen kann. Gemäß Abbildung 18 werden Proteine durch NTCB spezifisch vor freien Cysteinen gespalten (Wu *et al.*, 1996), nicht jedoch vor fluoreszenzmarkierten Cysteinen.

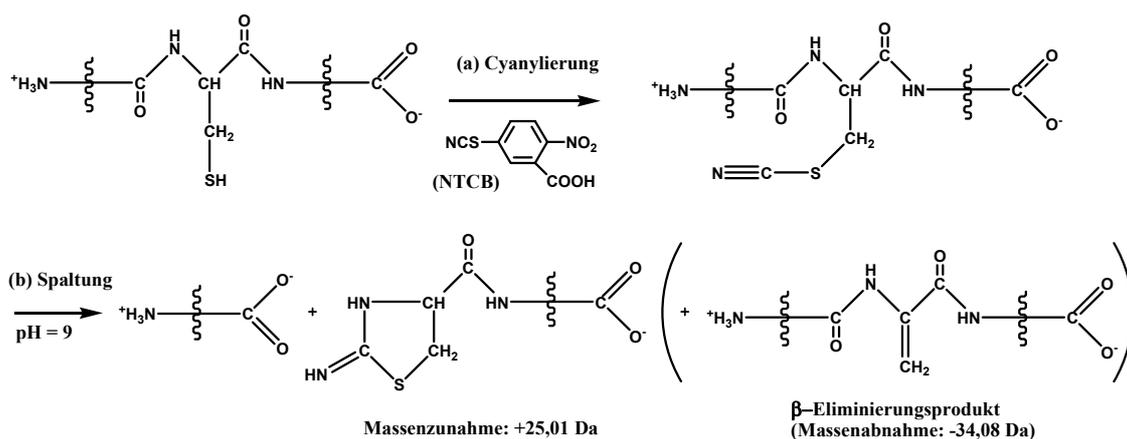


Abbildung 18: Reaktionsschema der Proteinfragmentierung an freien Cysteinen durch NTCB. In einem ersten Reaktionsschritt werden die Cysteine cyanyliert, und anschließend wird durch eine Erhöhung des pH-Werts an den cyanylierten Cystein-Gruppen gespalten. Als Nebenreaktion kann eine Eliminierung am C β -Atom des cyanylierten Cysteins eintreten.

Es wurden 50 μ l NTCB-Verdaupuffer mit 7,5 μ l einer Proteinlösung der Konzentration 20 mg/ml vermischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde ein etwa 5-10-facher NTCB-Überschuss gegenüber freien Thiol-Gruppen eingehalten, so dass geringe Mengen DTT in der Proteinlösung (maximal 10 mM) die Analyse nicht negativ beeinflussen konnten. Anschließend wurde die Lösung mit 3 M TRIS Base (etwa 6,7 μ l) auf einen pH-Wert von $pH = 9$ eingestellt und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Aus einem Mikroliter der Lösung wurde mit einer Lösung aus 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA und 10 mg/ml einer geeigneten MALDI-Matrix (CHCA, Sinapinsäure) eine Verdünnungsreihe hergestellt und durch MALDI-MS (s. Kapitel 4.3.1.2) analysiert.

Die beschriebene Methode eignet sich für die Analyse von Proteinmengen ab etwa 100 pmol (Wu *et al.*, 1996). Da genügend Protein zur Verfügung stand, wurde jedoch mit sehr viel größeren Mengen gearbeitet, was verlässlichere Ergebnisse und eine einfachere Handhabung ermöglichte.

4.3 Biophysikalische Methoden

4.3.1 Massenspektroskopie

4.3.1.1 ESI-MS

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie (*electro spray ionisation mass spectroscopy*, ESI-MS) war die beste zur Verfügung stehende Methode zur Analyse von ganzen Proteinen mit einer Größe über 10 kDa (Fehlerabweichung der erhaltenen Massen <0,05 %). Die Methode beruht auf der Zerstäubung der Probe an der Spitze einer Kapillaren in einem starken elektrischen Feld, wobei die Proteinmoleküle desolvatisiert und ionisiert werden. Proteine werden typischerweise pro 1000 Da einfach ionisiert, wobei sich eine *Gauß*-Verteilung um den häufigsten Ladungszustand einstellt. Da mehrfach geladene Teilchen sich schneller im elektrischen Feld bewegen als einfach geladene Teilchen, kommt es bei der Verwendung eines Flugzeit-Analysators als Massendetektor zu einer Mehrdeutigkeit des erhaltenen Messsignals bezüglich Ionenmasse m und Ladung z . Um diese Mehrdeutigkeit zu eliminieren, wird in einer als Dekonvolution bezeichneten Methode die reale Masse des Proteins aus der *Gauß*-Verteilung der Peaks für die unterschiedlichen Ladungszustände des Proteins rekonstruiert. Aufgrund der notwendigen Spektren-Dekonvolution ist die ESI- Massenspektroskopie nur bedingt für die Analyse von heterogenen Proteinmischungen geeignet.

Da hohe Salzkonzentrationen und nichtflüchtige Pufferbestandteile sich negativ auf den Ionisationsprozess auswirken, wurden Proteinproben für die ESI-Massenspektroskopie durch Membranfiltration (s. Kapitel 4.2.4) in einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration (10 mM TRIS/HCl pH 7,5) überführt. Die Messung wurde an einem LQC Massenspektrometer (Finnigen, Bremen) durchgeführt. Für eine Analyse wurden etwa 20 μ l einer Proteinlösung der Konzentration 1-10 mg/ml verwendet.

4.3.1.2 MALDI-MS

Im Gegensatz zur ESI-MS ist die MALDI-Massenspektroskopie (*matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectroscopy*) auch für die Analyse von heterogenen Protein-Lösungen und von Proben mit hohem Salzgehalt geeignet. Bei der MALDI-MS wird die zu analysierende Substanz in eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet,

wodurch die Ionisierung der Proteinmoleküle erleichtert und eine Fragmentierung des Proteins vermindert wird. Die Ionisierung erfolgt durch Bestrahlung mit einem intensiven Laser-Puls.

Zur Probenvorbereitung wurde eine Verdünnungsreihe aus einem Mikroliter der zu analysierenden Proteinlösung und einer Lösung aus 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA und 10 mg/ml einer geeigneten MALDI-Matrix hergestellt (Sinapinsäure für Peptide über 10 kDa, CHCA für kleinere Proteinfragmente). Jeweils ein Mikroliter der unterschiedlich konzentrierten Proben wurden auf einer MALDI-Analysenplatte eingetrocknet und in einer MALDI-TOF VoyagerTM-DE Pro Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die geeignetste Verdünnung der zu analysierenden Probe wurde empirisch durch Messung aller getrockneten Tropfen an verschiedenen Messpunkten und mit unterschiedlichen Laser-Intensitäten bestimmt.

4.3.2 Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an großen Probenvolumina (~ 1 ml) wurden mit einem handelsüblichen UV/VIS Spektralphotometer (Shimadzu, Düsseldorf oder Amersham Biosciences, Freiburg) bzw. an einem Fluoreszenzspektrometer Aminco SLM 8100 (Sopra, Büttelborn) durchgeführt. Des weiteren stand für Fluoreszenzexperimente die ansonsten für Referenzmessungen genutzte Probenkammer CUV-ALL-UV (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers zur Verfügung.

Fluoreszenzexperimente an kleinen Probenvolumina (~ 1-2 µl) sowie an Proteinkristallen wurden mit dem selbst entworfenen FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer (s. Kapitel 5.2.2, Abbildung 32) durchgeführt.

4.3.3 Bestimmung des Nukleotid-Gehalts mittels HPLC

Die Nukleotidanalyse mittels HPLC wurde zur Qualitätskontrolle von Nukleotid-Lösungen und zur Bestimmung von an H-Ras p21 gebundene Nukleotide nach einem Nukleotidaustausch oder einer Photolyse von *caged* GTP, sowie für kinetische Messungen der GTPase-Aktivität von H-Ras p21 angewandt.

Durch Umkehrphasen-HPLC (*reversed phase high performance liquid chromatography*) konnten die Nukleotide unter Ionenpaarbedingungen qualitativ und quantitativ bestimmt werden (Feuerstein *et al.*, 1987). Es wurde eine C18-HPLC-Säule (25/4,6, ODS Hypersil, 5 μm) verwendet. Die stationäre Phase war dabei unpolarer als die mobile Phase (HPLC-Puffer). Durch Komplexierung der negativ geladenen Phosphatgruppen eines Nukleotids durch Tetrabutylammonium-Ionen (Ionenpaarbildung) konnten die Nukleotide mit der hydrophoben Säulenmatrix interagieren, so dass die Retentionszeit der Nukleotide mit steigender Phosphatgruppen-Anzahl zunahm. Die Elution erfolgte bei Anwesenheit von *caged* GTP isokratisch durch HPLC-Puffer mit 18 % Acetonitril, und mit geringeren Acetonitril-Konzentrationen (etwa 8-15 %), wenn nur GDP, GTP und/oder GppNHp zu analysieren waren. Die Detektion erfolgte bei einer Absorptionswellenlänge von 254 nm. Die Retentionszeit der zu analysierenden Nukleotide wurde durch Vorversuche mit reiner Nukleotid-Lösung an jedem Versuchstag neu bestimmt.

4.4 Herstellung und Handhabung von Proteinkristallen

4.4.1 Kristallisation

Die Kristallisation von p21(mod) in Komplex mit verschiedenen Nukleotiden erfolgte nach der Methode des hängenden Tropfens (s. Kapitel 2.2) bei 18 °C. Die Reservoirlösungen wurden entweder einem vorgefertigten Puffer-Sortiment der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) entnommen, oder aus Stammlösungen selbst zusammengemischt. Für die Kristallisation wurden gleiche Mengen Reservoir- und Proteinlösung auf einem Deckgläschen vermischt. Das Deckgläschen mit dem hängenden Kristallisationstropfen wurde dann über einem Töpfchen einer Kristallisationsplatte (Linbro-Zellkulturplatte für jeweils 24 Kristallisationsansätze) platziert, welches mit 500-1000 μl der zugehörigen Reservoirlösung gefüllt war. In ersten Optimierungsschritten wurde jeweils ein Mikroliter der beiden Lösungen für den Kristallisationstropfen eingesetzt, während in späteren Schritten zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit und Kristallqualität höhere Volumina (je 1,5-10 μl) zusammengegeben wurden.

Für ein optimales Kristallwachstum war es in einigen Fällen nötig, durch das Animpfen der Kristallisationsansätze mit einer definierten Menge an Kristallisationskeimen ein

gleichmäßiges Kristallwachstum zu initiieren. Dazu wurde ein Einkristall aus einem früheren Experiment in reiner Reservoirlösung aufgenommen und mit einer Akupunkturnadel oder einem Glasplättchen grob zerrieben. Ein Nylon-Faden (hier wurde eine einseitig aufgerissene Nylon-Schleife mit 0,7 mm Durchmesser verwendet) wurde nun zunächst kurz in diese Suspension aus Kristall-Splittern und anschließend nacheinander in mehrere etwa 30 Minuten zuvor angesetzte Kristallisationsansätze eingetaucht (*streak-seeding*). Da nach jedem Eintauchen die verbleibende Menge an Kristallsplittern am Faden abnahm, konnte so eine Reihe mit abnehmender Menge an Kristallisationskeimen realisiert werden. Mit sinkender Anzahl an Kristallisationskeimen wuchsen weniger, dafür aber größere Kristalle heran. Auf diese Weise konnte die Kristallgröße gezielt eingestellt werden, was für anschließende Experimente mit dem FLUMIX-Spektrometer sehr wichtig war.

Eine alternative Methode zur Zugabe von abnehmenden Mengen an Kristallisationskeimen war die Anfertigung einer Verdünnungsreihe aus der ursprünglichen Kristall-Suspension. Es wurde ein Mikroliter der Suspension mit Reservoir-Lösung auf 10 μl verdünnt, und von der verdünnten Lösung wiederum ein Mikroliter für den nächsten Verdünnungsschritt abgenommen, u.s.w.. Auf diese Weise wurde die Kristallsplitter-Suspension um Faktoren von 10 bis etwa 10^{10} verdünnt. Mit diesen Suspensionen wurden nun unter Verwendung eines Mikroliters Proteinlösung, 0,5 μl Reservoirlösung und 0,5 μl der entsprechend verdünnten Kristallsplitter-Suspension Kristallisationsansätze hergestellt. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, resultierten auch hier zunehmend größer werdende Kristalle mit abnehmender Anzahl an Kristallisationskeimen.

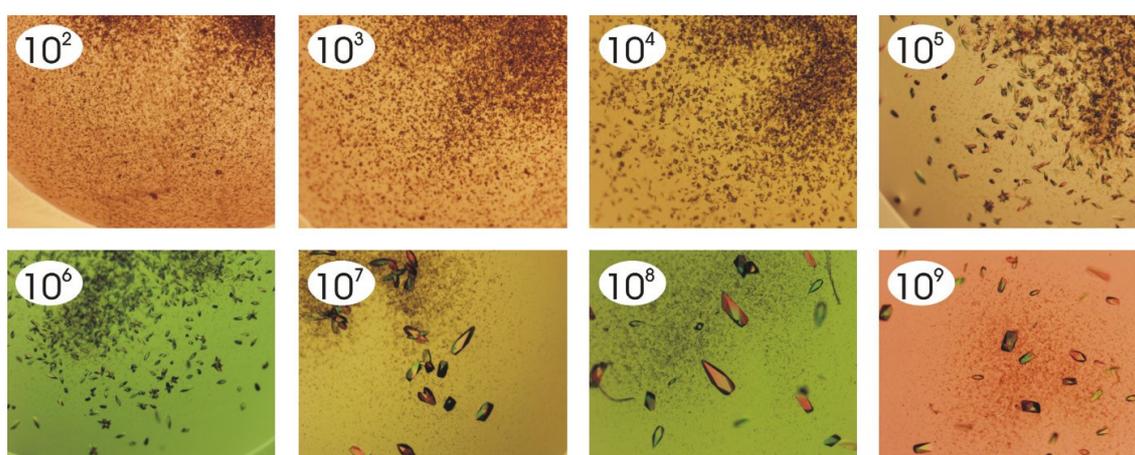


Abbildung 19: Animpf- (*seeding*)-Experimente an H-Ras p21 (Asr 1-166) unter Zugabe einer zunehmend verdünnten Kristallsplitter-Suspension zum Kristallisationsansatz. Die Verdünnungsfaktoren sind auf den einzelnen Bildern angegeben. Alle Bilder wurden bei gleicher Vergrößerungsstufe aufgenommen.

4.4.2 Handhabung von Proteinkristallen

Zur Langzeit-Lagerung und für Experimente unter Kryo-Bedingungen wurden die Proteinkristalle zunächst in einen geeigneten Puffer überführt, welcher glasartig gefriert und in welchem die Kristalle beim Einfrieren keinen Schaden nehmen (Kryo-Puffer). Um eine Schädigung des Kristalls durch die sprunghafte Veränderung des umgebenden Puffers zu vermeiden, war es in einigen Fällen vorteilhaft, den Pufferwechsel über mehrere Zwischenschritte vorzunehmen. Bei der Verwendung von PEG 400 als Fällungsmittel konnten die Kristalle auch direkt in ihrer Mutterlauge eingefroren werden. Die Kristalle wurden mit einer Nylon-Schleife aufgenommen und zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für röntgenographische Untersuchungen unter Kryo-Bedingungen wurde eine Nylon-Schleife mit etwa dem doppelten Durchmesser des Proteinkristalls gewählt. Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen und für röntgenographische Untersuchungen bei Raumtemperatur wurde die Größe der Nylon-Schleife bevorzugt so gewählt, dass der Kristall die Schleife ganz ausfüllt und gegebenenfalls seitlich etwas übersteht. Überschüssige Mutterlauge konnte kurz vor dem Eintauchen in flüssigen Stickstoff durch Abtupfen der Nylon-Schleife an der Probenschale weitgehend entfernt werden. Auf diese Weise wurde eine möglichst geringe Störung des Lichtwegs in Fluoreszenz-Experimenten sichergestellt. Außerdem wurden so Bewegungen des Kristalls in der Nylon-Schleife verhindert, welche in Experimenten bei Raumtemperatur zu Problemen führen würden.

Für fluoreszenzspektroskopische und röntgenographische Untersuchungen an Proteinkristallen bei Raumtemperatur war es oft nötig, die Kristalle für längere Zeit in einer Nylon-Schleife stabil zu halten. Die Kristalle wurden dazu mit einem Gasstrom mit definiertem Wassergehalt umspült, um eine Austrocknung zu verhindern. Als Gas wurde Stickstoff aus einer handelsüblichen 300 bar Stickstoff-Flasche eingesetzt, welches durch eine Apparatur zur Luftfeuchteconditionierung (s. Kapitel 5.2.8) auf den gewünschten Feuchtigkeitsgehalt eingestellt wurde.

4.4.3 Reaktionsinitiierung und Erzeugung intermediärer Zustände im Proteinkristall

Zur Reaktionsinitiierung in *caged* GTP-haltigen Lösungen oder in Kristallen von H-Ras p21 wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 325 nm bis zur vollständigen Photolyse von *caged* GTP zu GTP und 2-Nitrosoacetophenon bestrahlt. Die Vollständigkeit der Photolyse wurde entweder nach der Belichtung durch HPLC (s. Kapitel 4.3.3) oder während der Belichtung durch eine kinetische Messung von Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Kristalls mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer (s. Kapitel 5.3.2.3) analysiert. Als Lichtquelle diente ein *Dual-Mode* He-Cd-Laser (Modell IK5652R-G, Soliton, Gilching). Das Licht wurde vom Laser durch eine optische Faser aufgenommen und zur Belichtung größerer Probenvolumina (z.B. homogene Belichtung des ganzen Tropfens einer Proteinlösung) ohne weitere Fokussierung auf die Probe geleitet. Zur Belichtung einzelner Proteinkristalle wurde das Licht durch ein Spiegelobjektiv auf den Kristall fokussiert (s. Kapitel 5.2.10).

Zur Erzeugung intermediärer Kristall-Zustände wurde die Probe nach der Photolyse von *caged* GTP bei Raumtemperatur bis zum Erreichen des gewünschten Zustands inkubiert. Auch hier wurde der Kristall-Zustand entweder mittels HPLC (s. Kapitel 4.3.3) oder durch FLUMIX-Fluoreszenzspektroskopie (s. Kapitel 5.3.2.3) analysiert.

4.5 Röntgenographische Methoden

4.5.1 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte unter Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung an den Synchrotron-Strahlquellen ID14-1, ID14-2, ID14-3 und ID14-4 (ESRF, Grenoble, Frankreich) und PX-I (SLS, Villigen, Schweiz). Je nach apparativer Gegebenheit wurden unterschiedliche Wellenlängen im Bereich von 0,827 – 0,976 Å eingesetzt (s. Kapitel 5.5, Tabelle 2). Zur Kontrolle der Kristall-Qualität wurde eine Labor-Röntgenquelle (Xcalibur PX Ultra, Oxford Diffraction, Oxford, England) eingesetzt, welche Röntgenstrahlung der Wellenlänge 1,54 Å (Kupfer K_{α} -Strahlung) erzeugt. Die durch ionisierende Röntgenstrahlung verursachten Schäden am Kristall nehmen mit der Kristall-Temperatur ab (Garman und Schneider, 1997). Um solche Schäden zu minimieren, wurden die Diffraktionsexperimente deshalb bei 100 K durchgeführt, soweit die Art des

Experimentes keine anderen Temperaturen voraussetzte (beispielsweise bei kinetischen Untersuchungen bei Raumtemperatur).

Während der Aufnahme eines Diffraktionsbildes wurde der Kristall um die eigene Achse (φ) gedreht. Ein vollständiger röntgenkristallographischer Datensatz setzt sich aus vielen einzelnen Diffraktionsbildern zusammen, die zusammen einen Winkelbereich von etwa 60-180 Grad abdecken. Der Drehwinkel pro Diffraktionsbild wurde dabei aufgrund verschiedener Parameter wie der Mosaizität des Kristalls, des Kristall/Detektor-Abstands und der Divergenz des Röntgenstrahls gewählt. Es wurde versucht, die Anzahl der sich überlappenden Röntgenreflexe auf einem Diffraktionsbild möglichst gering zu halten, gleichzeitig aber auch eine möglichst hohe Anzahl von vollständigen Reflexen auf einem Bild aufzunehmen. Der untersuchte Winkelbereich wurde durch die Kristallsymmetrie, die Kristall-Orientierung und durch die gewünschte bzw. durch die ohne zu starken Strahlschaden erreichbare Redundanz der gemessenen Daten bestimmt. Um hochaufgelöste Strukturdaten ($<1,5 \text{ \AA}$) zu erhalten, wurden zwei oder drei Datensätze bei verschiedenen Kristall-Detektor-Abständen aufgenommen, um sowohl eine hohe maximale Auflösung als auch eine hohe Datenqualität der Röntgenreflexe bei geringen Beugungswinkeln zu erhalten. Dabei wurde der (höchstauflösende) Datensatz bei geringstem Kristall-Detektor-Abstand zuerst aufgenommen, da eine Verminderung der Kristallqualität durch einsetzenden Strahlschaden sich am stärksten auf die Reflexe bei hohen Beugungswinkeln auswirkt. Die Belichtungszeit und Strahl-Intensität wurden so eingestellt, dass ein akzeptabler Kompromiss aus einem guten Signal-Rausch-Verhältnis und geringem Strahlschaden erzielt wurde.

4.5.2 Datenprozessierung

Die Datenprozessierung erfolgt für gewöhnlich in vier Hauptschritten (Otwinowski und Minor, 1997). Im ersten Schritt werden anhand von Röntgenreflexen hoher Intensität aus einigen wenigen Diffraktionsbildern die Raumgruppe und die Zellparameter des Kristalls sowie seine Orientierungsmatrix bestimmt. Die Zellparameter werden anschließend unter Berücksichtigung zusätzlicher Reflexe aus weiteren Diffraktionsbildern verfeinert. Anhand der verfeinerten Parameter können nun allen Reflexen aus dem gesamten Datensatz ihre *Miller'schen* Indizes (s. Kapitel 2.3.1.3) zugeordnet werden. Die Intensitäten aller Reflexe werden zusammen mit ihrem Messfehler und ihren *Miller'schen* Indizes in einer Datei

abgelegt. In einem letzten Schritt werden die Reflexe der Einzelbilder und mehrfach gemessene Reflexe aufeinander skaliert. Die Qualität der erhaltenen Daten kann dabei anhand des R_{sym} -Faktors bestimmt werden:

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)} \quad (11)$$

Der R_{sym} -Faktor ist ein Maß für die mittlere Abweichung der Intensitäten $I(hkl)$ der Reflexe mit den *Miller'schen* Indizes (h,k,l) von der gemittelten Intensität $\langle I(hkl) \rangle$. Ein kleiner Wert für R_{sym} bedeutet eine gute Übereinstimmung der symmetrieverwandten bzw. mehrfach gemessenen Reflexe und ist somit ein Zeichen für einen guten Datensatz.

Zur Datenprozessierung und zur Zusammenführung verschiedener Teildatensätze wurden die Programme XDS und XSCALE (Kabsch, 1993; Kabsch, 1988) eingesetzt. Die Konvertierung in unterschiedliche Dateiformate erfolgte mit den Programmen XDSCONV (Kabsch, 1993), sowie mit den Programmen MTZ2VARIOUS und F2MTZ aus dem CCP4-Programmpaket (Collaborative Computational Project Number 4, 1994).

4.5.3 Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz

Das Phasenproblem wurde für alle in dieser Arbeit analysierten Strukturdaten durch molekularen Ersatz (s. Kapitel 2.3.1.7) gelöst. Dazu wurde das Programm MOLREP aus dem CCP4-Programmpaket (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) eingesetzt, welches anhand der gemäß Kapitel 4.5.2 prozessierten Strukturdaten und einem mit dem analysierten Protein ausreichend homologen Strukturmodell die experimentell nicht gemessenen Phasen der Strukturfaktoren rekonstruiert (s. Kapitel 2.3.1.7). MOLREP führt mit dem Strukturmodell zunächst eine automatische Rotationssuche und anschließend mit den besten Rotationslösungen eine Translationssuche durch. Als Strukturmodell dienten Strukturen des verkürzten Wildtyp-Proteins H-Ras p21 in Komplex mit GDP oder GppNHp (PDB-Einträge 4Q21 bzw. 5P21). In einigen Fällen wurden die noch im Stadium der Verfeinerung befindlichen Strukturmodelle von p21 (mod) verwendet, soweit für diese eine höhere Homologie zu erwarten war. Potentiell stark zwischen dem Strukturmodell und dem

analysierten Protein abweichende Bereiche (Wassermoleküle, Nukleotide, Magnesium-Ionen, sowie Aminosäuren der Schalterregionen) wurden zuvor aus dem Strukturmodell entfernt.

4.5.4 Strukturverfeinerung

Das durch molekularen Ersatz positionierte Strukturmodell stellt für gewöhnlich nur einen Teil der aufzuklärenden Struktur dar und stimmt in einigen Bereichen noch nicht exakt mit der realen Struktur überein. Es muss deshalb während der Strukturverfeinerung so lange verbessert werden, bis eine möglichst hohe Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Diffraktionsdaten erreicht wird (s. Kapitel 2.3.2).

Im ersten Schritt der Strukturverfeinerung wurde eine Energieminimierung mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) durchgeführt. Die dafür benötigten Topologie- und Parameterdateien zur Beschreibung des verwendeten NBD-Fluorophors wurden anhand der Ergebnisse einer *ab initio*-Computersimulation erstellt (s. Kapitel 4.5.4.1). Alle anderen vorkommenden Aminosäuren und Nukleotide waren bereits in den Standardbibliotheken des Programms REFMAC5 implementiert. In späteren Verfeinerungsschritten wurde mit REFMAC5 vor der Energieminimierung zusätzlich eine TLS-Verfeinerung (s. Kapitel 2.3.2.2) durchgeführt, um anisotrope Schwingungsanteile zu berücksichtigen.

Im zweiten Schritt wurde mit dem Programm FFT des CCP4-Programmpakets (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) aus dem energieminierten Strukturmodell und den experimentell bestimmten Intensitäten der Strukturfaktoren eine Elektronendichtekarte berechnet (s. Kapitel 2.3.2.1). Das Strukturmodell und die berechnete Elektronendichtekarte wurden mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) dargestellt. Die Übereinstimmung der Elektronendichtekarte mit dem Strukturmodell wurde visuell kontrolliert, und fehlerhafte Bereiche wurden manuell durch Verschieben, Hinzufügen oder Entfernen von Atomen bzw. Atomgruppen korrigiert. Bei der Beschreibung einiger Aminosäurereste mit alternativen Konformationen musste die Datei des Strukturmodells zur Darstellung mit O zunächst mit dem Programm ACONIO (unpubliziertes Programm, (Kleywegt *et al.*, 2001)) in zwei separate Dateien für die verschiedenen Konformationen aufgespalten werden. Die Anpassung der Besetzungszahl der in alternativen Konformationen vorliegenden Atome erfolgte mit dem Programm EMACS (Free Software

Foundation, Inc., Boston, USA). Vor einer Weiterbearbeitung mit anderen Programmen mussten die separierten Dateien wieder mit dem Programm ACONIO zu einer Datei zusammengeführt werden. Für das Hinzufügen größerer Mengen an Wassermolekülen zum Strukturmodell wurde das Programm ARP/WARP (Perrakis *et al.*, 2001) eingesetzt. Dieses Programm führt eine Suche nach nicht interpretierter Elektronendichte durch, welche sinnvoll durch Wassermoleküle beschrieben werden kann. Dabei wird auch die chemische Umgebung der Wassermoleküle in Betracht gezogen. Wassermoleküle mit unrealistischer chemischer Umgebung werden aus dem Strukturmodell entfernt.

Nach jeder Manipulation des Strukturmodells wurde eine weitere Energieminimierung mit REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) durchgeführt. Die Verfeinerung wurde iterativ solange durchgeführt, bis eine akzeptable Übereinstimmung des Strukturmodells mit den experimentellen Daten erreicht war. Das Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) diente in späteren Verfeinerungsschritten dazu, das Strukturmodell auf offensichtliche Fehler oder unrealistische Geometrien hin zu überprüfen.

4.5.4.1 Erstellen von Topologie- und Parameterdateien

Da für den Fluorophor IANBD Amid keine vorgefertigten Topologie- und Parameterdateien für eine Energieminimierung mit REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) zur Verfügung standen, mussten diese zunächst angefertigt werden. Dazu wurde zunächst die Ideal-Konformation des Fluorophors durch eine *ab initio*-Computersimulation (s. Kapitel 2.3.2.4 und Kapitel 5.4) bestimmt. Die errechnete Konformation wurde mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) anhand der beiden in der Computersimulation eingebundenen Cystein-Atome manuell mit einem vollständigen Cystein überlagert, und die beiden Moleküle miteinander kombiniert. Aus dem kombinierten Molekül (Cystein mit kovalent gebundenem Fluorophor, gemäß dem in Abbildung 17 dargestellten Reaktionsschema) wurden mit dem Programm „Monomer Library Sketcher“ (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) oder XPLO2D (Kleywegt *et al.*, 2001) die benötigten Topologie- und Parameterdateien erzeugt. Die erzeugten Dateien mussten noch an einigen Stellen manuell angepasst werden, um eine Kompatibilität mit allen verwendeten Programmen zu gewährleisten.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Entwicklung des biologischen Modellsystems

5.1.1 Anforderungen an das biologische Modellsystem

Zur Entwicklung des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers war es notwendig, ein biologisches Modellsystem auszuwählen, an welchem die Funktion des Spektrometers und die Anwendbarkeit von kinetischen Fluoreszenzexperimenten in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten getestet werden konnte. Dieses Modellsystem musste verschiedene Kriterien erfüllen:

- Um kinetische Analysen durchführen zu können, musste eine homogene Reaktionsinitiierung im kristallinen Protein möglich sein. Die Geschwindigkeitskonstante der initiierten Reaktion sollte in einem Bereich liegen, der durch Fluoreszenzspektroskopie gut zu verfolgen ist.
- Es musste gewährleistet sein, dass nach Reaktionsinitiierung eine ausreichend starke Veränderung im Proteinkristall auftritt, die jedoch nicht zu einer Zerstörung des Kristallgitters führen durfte.
- Das Protein musste für fluoreszenzspektroskopische Analysen einen Fluorophor enthalten.
- Der Fluorophor musste eine starke Abhängigkeit seiner Fluoreszenzeigenschaften von seiner chemischen Umgebung aufweisen und in der Nähe des aktiven Zentrums positioniert sein, um eine messbare Veränderung des Fluoreszenzsignals während einer Reaktion im Proteinkristall zu gewährleisten.
- Beim biologischen Modellsystem sollte es sich um ein gut exprimierbares und leicht kristallisierbares Protein handeln, da für die Optimierung des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers ein hoher Bedarf an hochwertigen und in Größe und Form reproduzierbaren Kristallen zu erwarten war.
- Es sollte gezeigt werden, dass sich die Anwendbarkeit kinetischer Fluoreszenzspektroskopie an Proteinkristallen nicht auf einige wenige Sonderfälle beschränkt. Es wurde deshalb bewusst kein Protein mit intrinsischer Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich (z.B. GFP (*green fluorescent protein*)) oder mit einer intrinsischen Möglichkeit zur Reaktionsinitiierung (z.B. Bakteriorhodopsin) als

biologisches Modellsystem gewählt. Stattdessen sollten Methoden entwickelt werden, mit denen unter gewissen Voraussetzungen auch Proteine ohne diese intrinsischen Eigenschaften in einer geeigneten Art und Weise modifiziert werden können, um ihre dynamischen Eigenschaften durch kinetische Fluoreszenzmessungen in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten zu untersuchen.

- Um dem Protein fluoreszente Eigenschaften zu verleihen, kam nur die Einführung kleiner fluorophorer Gruppen in Frage, um die Veränderungen im Protein möglichst gering zu halten. Die Absorptionseigenschaften des Fluorophors durften nicht mit der Absorption von anderen Gruppen im Protein überlagern. Der Fluorophor sollte außerdem eine möglichst große *Stokes*-Verschiebung aufweisen, um in Fluoreszenzexperimenten das Anregungslicht vom emittierten Fluoreszenzlicht trennen zu können.
- Um einen Erhalt der Kristallisierbarkeit des fluoreszenzmarkierten Proteins zu gewährleisten, war eine selektive und stöchiometrische Fluoreszenzmarkierung unerlässlich. Der einzuführende Fluorophor durfte außerdem aufgrund seiner Größe und Struktur die Protein-Kristallisation nicht behindern.

5.1.2 Auswahl des biologischen Modellsystems

Als gutes Modellsystem erwies sich H-Ras p21. Dieses Protein kann stellvertretend für eine Vielzahl von Guanin-Nukleotid bindenden Proteinen angesehen werden, so dass sich Experimente an H-Ras p21 leicht auch auf andere GNBPs übertragen lassen. Es konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass dieses Protein seine enzymatische Aktivität auch im kristallinen Zustand ausüben kann (Schlichting *et al.*, 1989). Die Geschwindigkeit der durch H-Ras p21 katalysierten GTP-Hydrolyse liegt dabei in einem gut durch Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchenden Zeitbereich. Durch die Einführung von lichtempfindlichen Nukleotid-Analoga wie *caged* GTP kann die Möglichkeit geschaffen werden, in kristallinem H-Ras p21 durch Bestrahlung mit UV-Licht homogen eine Reaktion zu initiieren (Schlichting *et al.*, 1989). H-Ras p21 durchläuft während der Hydrolyse von GTP Konformationsänderungen, die hauptsächlich in zwei Schalter-Regionen (*switch* I und *switch* II) lokalisiert sind. Eine Fluoreszenzmarkierung mit einem stark umgebungssensitiven Fluorophor in einer dieser Schalterregionen erschien deshalb als eine geeignete Möglichkeit zur Generierung einer fluoreszenten H-Ras p21-Variante mit den

gewünschten Eigenschaften für kinetische Fluoreszenzuntersuchungen in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten.

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit diente eine verkürzte Variante von H-Ras p21 mit zwei Punktmutationen (H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S)), welche von A. Krämer (MPI für molekulare Physiologie, Abteilung I (Strukturbiologie), Dortmund) angefertigt wurde. Anhand einer Kristallstrukturanalyse des verkürzten Protein-Konstrukts H-Ras p21 (Asr 1-166) und der Interaktionsflächen von Komplexen mit verschiedenen Effektor-Molekülen identifizierte A. Krämer Aminosäurerest 32 als eine günstige Position zur Fluoreszenzmarkierung (Krämer, 2001). Die Aminosäure Tyr-32 des Wildtyp-Proteins wurde gegen ein Cystein ersetzt, an welches anschließend Thiol-reaktive Fluorophore kovalent gebunden werden konnten. Zur Vermeidung einer doppelten Markierung wurde als weitere Punktmutation das exponierte Cystein Cys-118 gegen ein Serin ausgetauscht. Da die verbleibenden Cysteine Cys-51 und Cys-80 des verkürzten Proteinkonstrukts nicht exponiert sind, war eine Fluoreszenzmarkierung dieser Positionen unter nicht-denaturierenden Bedingungen nicht zu erwarten (Krämer, 2001).

Aufgrund der hohen Anforderungen an den kovalent an H-Ras p21 zu bindenden Fluorophor kamen nur wenige Substanzen in Frage. NBD-Fluorophore zeichnen sich durch eine geringe Größe und eine für das recht kompakte aromatische System hohe Anregungswellenlänge aus. Des Weiteren zeigen NBD-Fluorophore eine große *Stokes*-Verschiebung und eine ausgesprochen starke Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzeigenschaften von der chemischen Umgebung. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden drei verschiedene NBD-Fluorophore getestet (s. Abbildung 17), von denen sich IANBD Amid als günstigste Variante herausstellte.

5.1.3 Proteinexpression und Reinigung

Als Ausgangspunkt zur Herstellung einer fluoreszenten H-Ras p21-Variante wurde ein ptac Expressions-Plasmid (Tucker *et al.*, 1986) verwendet, welches für eine verkürzte Form des Wildtyps (Asr 1-166) mit zwei Mutationen (Y32C, C118S) kodiert. Dieses Plasmid wurde in Form einer transformierten Bakterienkultur (*E. coli* Stamm CK600K, s. Kapitel 4.1.2) von Astrid Krämer (MPI für molekulare Physiologie, Abteilung I (Strukturbiologie), Dortmund) zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde in *E. coli* Stamm CK600K nach der in Kapitel 4.1.3 dargestellten Methode exprimiert. Die Bakterien wurden gemäß Kapitel 4.2.1 mit einem Mikrofluidizer aufgeschlossen, und das rekombinante Protein wurde wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben gereinigt. Eine gelelektrophoretische Analyse mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 4.2.5) von verschiedenen während der Proteinreinigung angefallenen Fraktionen ist in Abbildung 20 dargestellt.

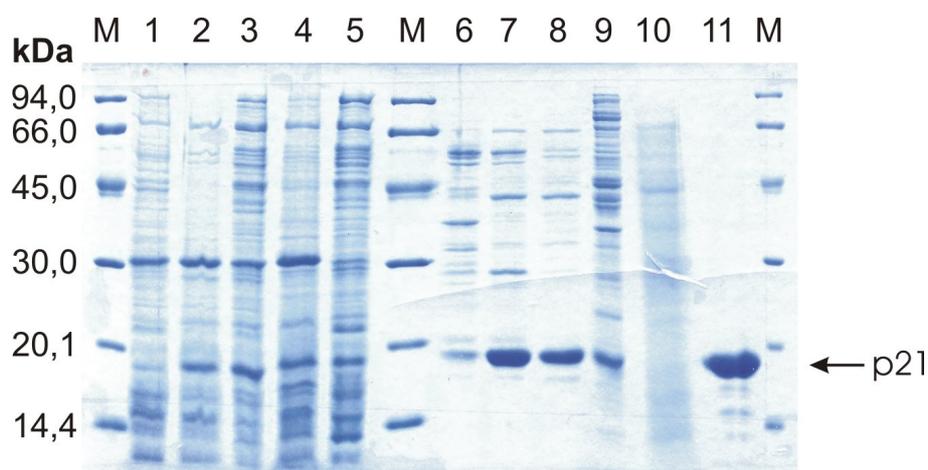


Abbildung 20: SDS-Gel von verschiedenen während der Reinigung angefallenen H-Ras p21-haltigen Fraktionen. (M): LMW-Proteinstandard; (1): Zellen vor Induktion; (2): Zellen nach 13 Stunden Induktion; (3): Zell-Lysat nach Aufschluss mit Mikrofluidizer; (4) Zell-Lysat (nur nicht-löslicher Anteil); (5): Zell-Lysat (nur löslicher Anteil); (6-9): Aufeinanderfolgende Eluat-Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie (C/2+ - Puffer mit 60 mM NaCl). Fraktionen 6 und 9 wurden verworfen und Fraktionen 7 und 8 für die weitere Aufreinigung vereinigt.; (10): Wasch-Fraktion der Ionenaustauschchromatographie (C/2+ - Puffer mit 100 mM NaCl); (11): gereinigtes Protein nach der Gelfiltration.

5.1.4 Herstellung von fluoreszentelem H-Ras p21

Von den drei getesteten NBD-Fluorophoren (s. Abbildung 17) war für NBDCI nach einer Kopplung an Cys-32 der modifizierten H-Ras-Variante die größte Ähnlichkeit mit der ursprünglichen Aminosäure Tyr-32 des Wildtyps zu erwarten. Aufgrund der geringen Spezifität und der Neigung zu einer Migration der Fluoreszenzmarkierung konnte jedoch keine stabile stöchiometrische Markierung mit NBDCI erreicht werden. Die Fluorophore IANBD Ester und IANBD Amid können über eine Iodacetamid-Gruppierung sehr selektiv und irreversibel an exponierte Cysteine gekoppelt werden. Dabei zeigte IANBD Ester eine höhere Löslichkeit und eine bessere Kopplungseffizienz als IANBD Amid. Eine Analyse des mit IANBD Ester fluoreszenzmarkierten Proteins durch ESI-Massenspektroskopie zeigte eine praktisch stöchiometrische Markierung (s. Abbildung 21).

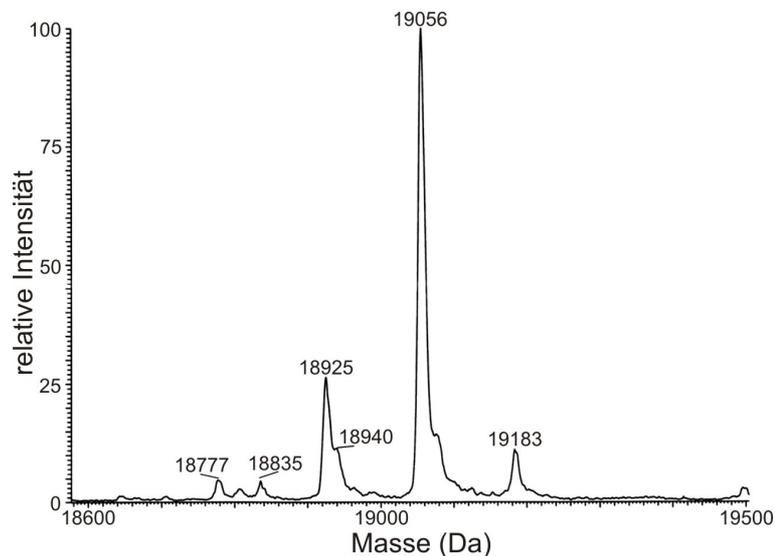


Abbildung 21: Dekonvolviertes ESI-Massenspektrum einer mit IANBD Ester fluoreszenzmarkierten Probe von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S). Der Peak bei 19056 Da entspricht dem einfach markierten Protein, Reste des unmarkierten Proteins sind bei 18777 Da zu erkennen (für ein ESI-Massenspektrum des unmarkierten Proteins s. Abbildung 25).

Es zeigte sich jedoch, dass bei hohen pH-Werten eine basen-katalysierte Spaltung der Ester-Gruppierung des Fluorophors einsetzte. Nach einer Inkubation des fluoreszenten Proteins in N.E.-Puffer (pH = 8,5) bei Raumtemperatur über Nacht wurde durch ESI-Massenspektroskopie bereits eine Spaltung des größten Teils des Fluorophors nachgewiesen (s. Abbildung 22).

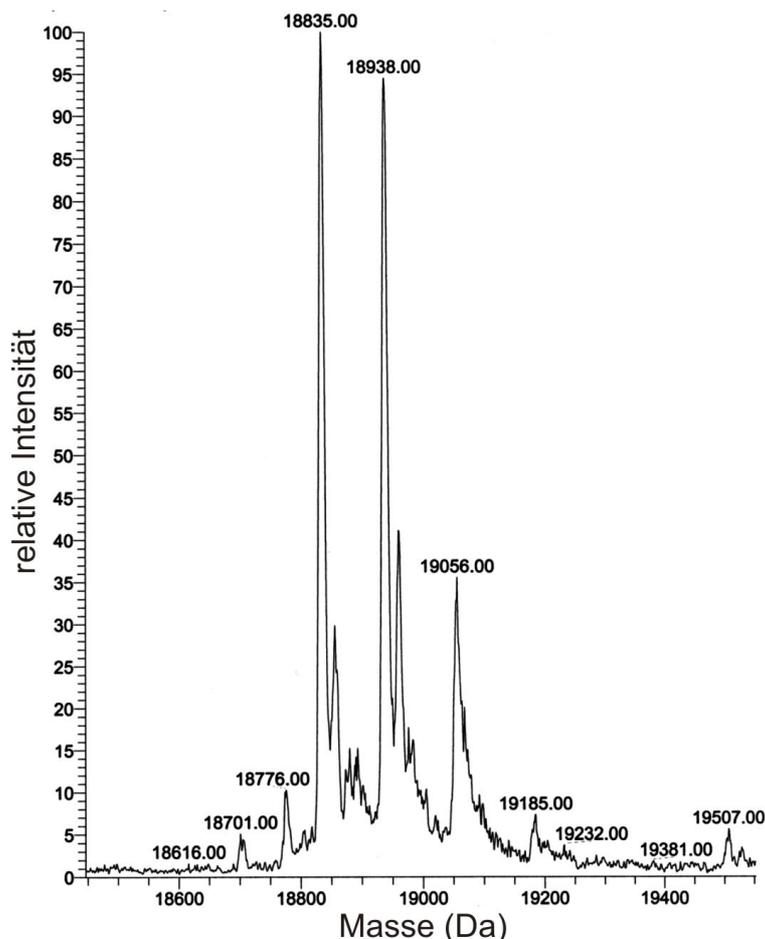


Abbildung 22: Dekontolviertes ESI-Massenspektrum einer mit IANBD Ester fluoreszenzmarkierten Probe von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) nach Inkubation in N.E.-Puffer (pH = 8,5) bei Raumtemperatur über Nacht. Der Peak bei 19056 Da entspricht dem einfach markierten Protein, die Masse von 18835 Da entspricht dem Protein mit an der Ester-Gruppe hydrolysiertem Fluorophor (Cys-32-CH₂COOH; die Strukturformel von IANBD Ester ist in Abbildung 17 dargestellt).

Da für eine Kristallisation des fluoreszenten Proteins eine Stabilität über mehrere Tage bis Wochen bei leicht basischem pH-Wert und Raumtemperatur Voraussetzung war, wurde die Fluoreszenzmarkierung mit IANBD Amid wiederholt. Dieser Fluorophor zeigte eine geringere Reaktivität als IANBD Ester und musste gemäß Kapitel 4.2.7 unter mehrstündigem Rühren in großem Überschuss zugesetzt werden. Mit IANBD Amid markiertes Protein wies dafür die für einen anschließenden Nukleotidaustausch (s. Kapitel 5.1.5) und für die Kristallisation notwendige Stabilität in leicht basischem Puffermilieu auf. Im Verlauf der Kopplungsreaktion wurde die Vollständigkeit der Fluoreszenzmarkierung durch MALDI-Massenspektroskopie (s. Kapitel 4.3.1.2) kontrolliert. In Abbildung 23 ist exemplarisch ein MALDI-Massenspektrum eines etwa zur Hälfte umgesetzten Reaktionsansatzes gezeigt.

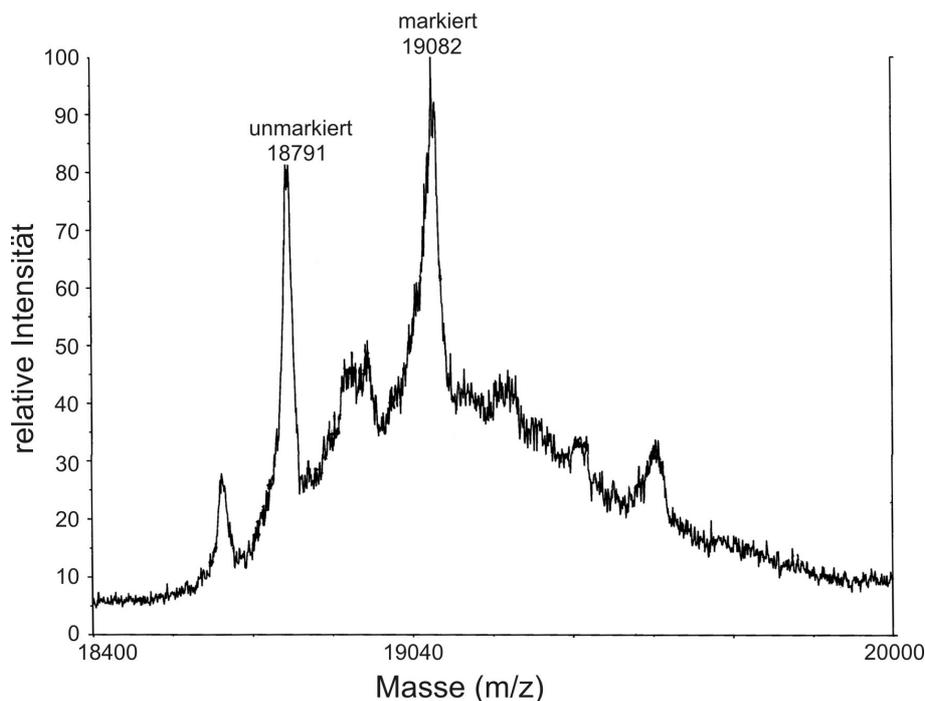


Abbildung 23: MALDI-Massenspektrum eines Reaktionsansatzes zur Fluoreszenzmarkierung von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) mit IANBD Amid. Aufgrund der hohen Salzkonzentration im Reaktionsgemisch und daraus resultierenden Salz-Addukten des Proteins ist das Massenspektrum verrauscht. Dennoch ist gut zu erkennen, dass noch ein signifikanter Teil des Proteins unmarkiert ist.

Die Reaktionslösung wurde inkubiert, bis verbleibende Reste des unmarkierten Proteins nicht mehr vom Rauschen zu unterscheiden waren. Anschließend wurde noch für einige Stunden weiter inkubiert, um letzte Spuren an unmarkiertem Protein umzusetzen. Für die Verifikation einer 100%igen Umsetzung waren Untersuchungen durch ESI-MS besser geeignet. Diese wurden zur Erfassung etwaiger Instabilitäten des Fluorophors erst nach einem Nukleotidaustausch an der für die Kristallisation vorbereiteten Proteinlösung durchgeführt (s. Kapitel 5.1.6.1, Abbildung 25).

5.1.5 Nukleotidaustausch

Das fluoreszenzmarkierte Protein H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S, C32-IANBD-amid)•Mg²⁺•GDP (im weiteren Verlauf als p21(mod)•GDP abgekürzt) weist in dieser Form keine intrinsische Möglichkeit zur Reaktionsinitiierung auf. Für kinetische Fluoreszenzuntersuchungen wurde das Nukleotid GDP deshalb gemäß einer von Scherer *et al.* (1989) entwickelten Methode (s. Kapitel 4.2.8) gegen das hydrolysestabile GTP-Analogon *caged* GTP ausgetauscht, aus welchem durch Photolyse mit UV-Licht GTP

freigesetzt werden kann. Für Vortests sowie für einige Experimente in Lösung wurde dabei das leichter erhältliche Diastereomeren-Gemisch *R/S-caged* GTP eingesetzt, während für Kristallisationsexperimente isomerenreines *R*- bzw. *S-caged* GTP verwendet wurde. Zusätzlich wurde für Kontrollexperimente und für die Röntgenstrukturanalyse p21(mod) im Komplex mit dem Licht- und Hydrolyse-stabilen GTP-Analogon GppNHp hergestellt.

Die Nukleotide wurden in etwa dreifachem molarem Überschuss zu einer Proteinlösung aus 10 mg/ml p21(mod)•GDP in N.E.-Puffer mit alkalischer Phosphatase (20 Nanoliter (0,2 U) alkalische Phosphatase pro Milligramm Protein) gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vollständigkeit des Nukleotid-Austausches wurde durch HPLC (s. Kapitel 4.3.3) verfolgt. Nach vollständigem Abbau von GDP wurde ein Pufferwechsel zu X-Puffer durchgeführt, wobei überschüssige Nukleotide entfernt wurden. Die Proteinlösung wurde für eine anschließende Kristallisation auf etwa 15 mg/ml aufkonzentriert und zeigte einen Restgehalt von weniger als 1 % GDP, sowie eine stöchiometrische Besetzung des Proteins mit dem entsprechenden Nukleotid. In Abbildung 24 sind exemplarisch die HPLC-Spektren für einen Austausch von GDP zu *R-caged* GTP dargestellt.

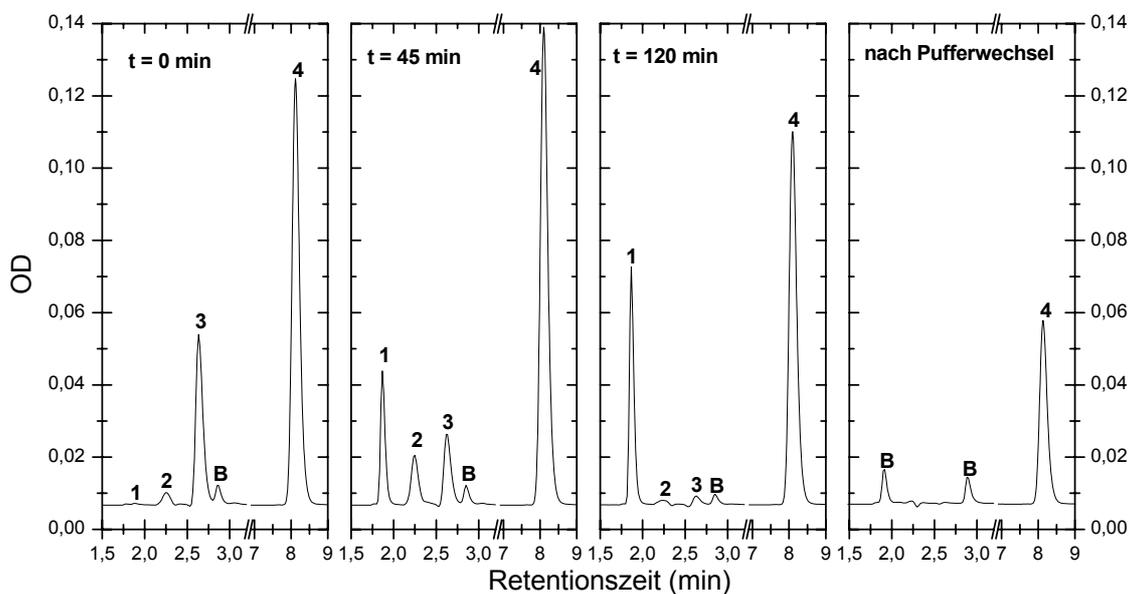


Abbildung 24: HPLC-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Nukleotid-Austausches von GDP zu *R-caged* GTP ($t = 0-120$ min). (1): Guanosin, $t_{ret} = 1,86$ min; (2): GMP, $t_{ret} = 2,25$ min; (3): GDP, $t_{ret} = 2,63$ min; (4): *R-caged* GTP, $t_{ret} = 8,1$ min; (B): Bestandteile des Puffers, $t_{ret1} = 1,92$ min, $t_{ret2} = 2,85$ min. Nachdem GDP vollständig durch alkalische Phosphatase abgebaut war, wurde ein Pufferwechsel durchgeführt, wobei alle nicht an das Protein gebundenen Nukleotide entfernt wurden. Die Elution erfolgte isokratisch durch HPLC-Puffer mit 18 % Acetonitril.

5.1.6 Eigenschaften von p21(mod)•R-caged GTP

5.1.6.1 Qualitätsanalyse durch ESI-MS

Um die Vollständigkeit und Homogenität der Fluoreszenzmarkierung und die Stabilität des Fluorophors zu überprüfen, wurde nach erfolgtem Nukleotidaustausch und Pufferwechsel zu X-Puffer eine Analyse durch ESI-MS (s. Kapitel 4.3.1.1) durchgeführt. Anders als bei einer Markierung durch den in basischer Lösung instabilen Fluorophor IANBD Ester (s. Abbildung 22) zeigte das durch IANBD Amid fluoreszenzmarkierte Protein keine größere Inhomogenität im Molekulargewicht.

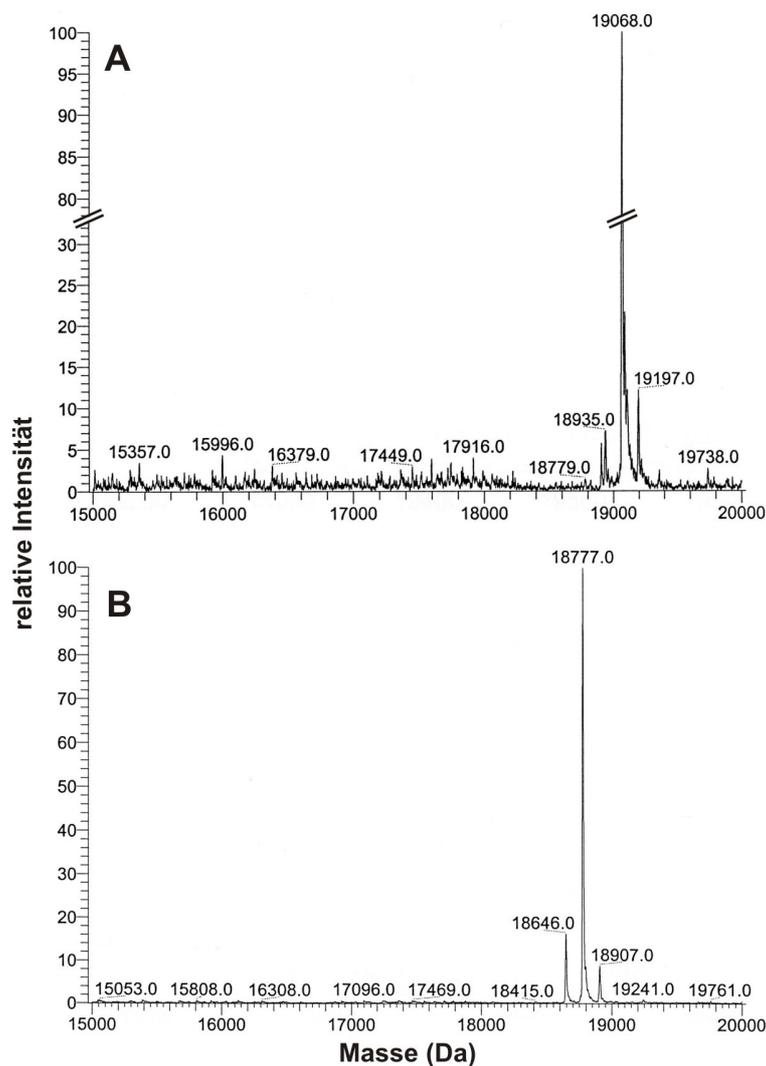


Abbildung 25: Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) (A) nach Fluoreszenz-Markierung mit IANBD Amid und (B) der Vergleich mit unmarkiertem Protein. Die Massenzunahme entspricht einer Markierung mit einem Fluorophor-Molekül pro Protein-Molekül. Nach der Fluoreszenzmarkierung sind massenspektroskopisch keine unmarkierten oder doppelt markierten Protein-Spezies nachzuweisen.

Es konnte eine homogene, einfache Fluoreszenzmarkierung festgestellt werden, die auch nach mehrstündiger Inkubation in N.E.-Puffer (während des Nukleotid-Austausches) stabil blieb.

5.1.6.2 Bestimmung der Fluorophor-Bindungsstelle

Nachdem eine homogene Einfachmarkierung und die chemische Stabilität des Fluorophors durch ESI-MS bestätigt werden konnte, musste die Position der Fluoreszenzmarkierung analysiert werden. Da im verwendeten Protein p21(mod) neben dem künstlich eingeführten Cystein Cys-32 noch zwei weitere Cystein-Positionen (Cys-51, Cys-80) vorhanden waren, musste eine fehlerhafte oder inhomogene Fluoreszenzmarkierung ausgeschlossen werden. Dazu wurde mittels MALDI-MS das Spaltungsmuster einer Proteinfragmentierung durch NTCB analysiert (s. Kapitel 4.2.9 und 4.3.1.2). Entsprechend Abbildung 18 werden durch NTCB Proteine selektiv an freien Cystein-Gruppen gespalten, während an fluoreszenzmarkierten Cysteinen keine Spaltung erfolgen kann. Die Primärstruktur von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) und die zu erwartenden Massen der durch NTCB-Spaltung generierten Proteinfragmente sind in Abbildung 26 dargestellt.

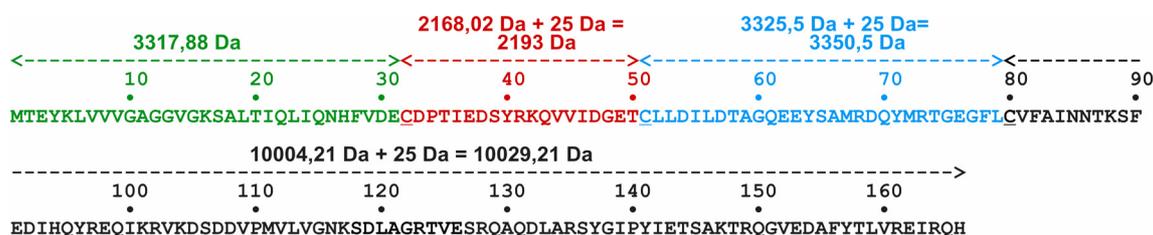


Abbildung 26: Primärstruktur von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S) und die zu erwartende Größe (m_{calc}) der Spaltprodukte einer Proteinfragmentierung durch NTCB. Alle Spaltprodukte, die ein durch die NTCB-Fragmentierung modifiziertes Cystein enthalten, sind um 25 Da größer als das unmodifizierte Polypeptid.

Durch MALDI-MS wurden die Fragmentierungsmuster von fluoreszenzmarkiertem und nicht markiertem Protein miteinander verglichen. Als MALDI-Matrix wurde Sinapinsäure für die Analyse von größeren Proteinfragmenten (10-20 kDa) und CHCA für kleinere Fragmente (<5 kDa) eingesetzt. Durch die Analysen mit Sinapinsäure als Matrix konnte sowohl für das markierte als auch für das unmarkierte Protein das C-terminale Fragment (Asr 80-166) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet auf ein

nicht fluoreszenzmarkiertes Cys-80 hin und war konsistent mit der Analyse des Massenbereiches bis 5 kDa (s. Abbildung 27).

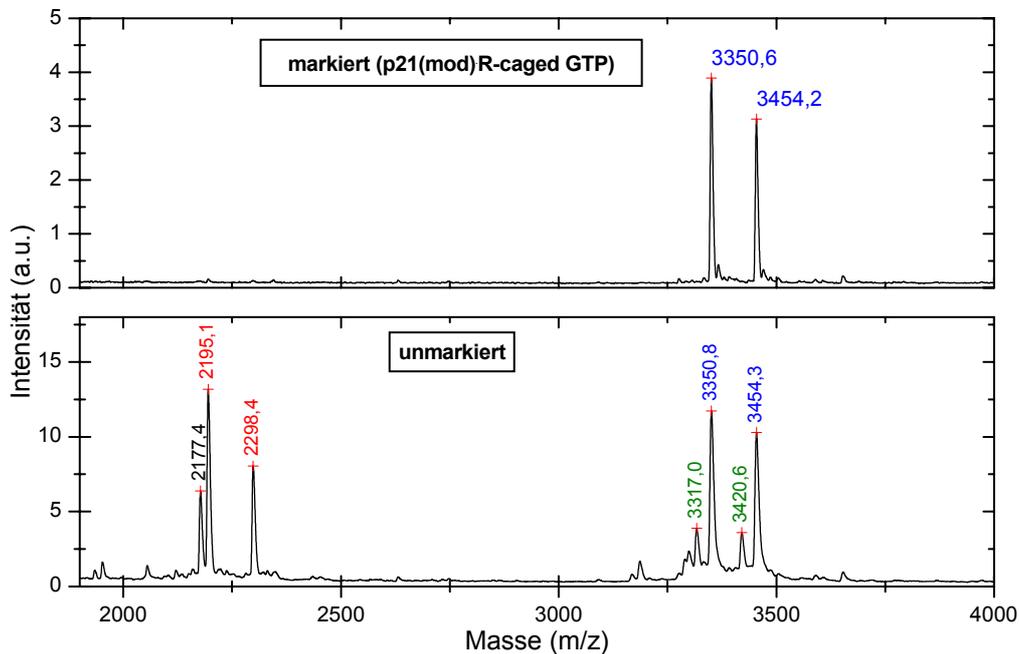


Abbildung 27: MALDI-Massenspektren einer mit IANBD Amid fluoreszenzmarkierten und einer unmarkierten Probe von H-Ras p21 (Asr 1-166, Y32C, C118S). Als Matrix wurde 10 mg/ml CHCA verwendet. Die Farbkodierung der Peak-Beschriftungen soll auf die Zugehörigkeit zum entsprechend markierten Bereich der Primärsequenz (s. Abbildung 26) hinweisen. Für jedes Fragment trat noch ein zweiter Peak mit einer um etwa 103 Da über dem theoretischen Wert liegenden Masse auf. Die Ursache für diese zusätzlichen Peaks konnte nicht eindeutig geklärt werden; eine mögliche Ursache wären Nebenreaktionen mit Bestandteilen der Pufferlösung. Das Auftreten derartiger Doppelpeaks mit einem Abstand von 103 Da war reproduzierbar und wurde auch bei der Analyse anderer Proteine beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse der Spaltprodukte des unmarkierten Proteins im Massenbereich bis 5 kDa konnten die erwarteten Fragmente für den Sequenzbereich 1-31 ($m/z = 3317,0$ Da; $m_{calc} = 3317,9$ Da), Sequenzbereich 32-50 ($m/z = 2195,1$ Da; $m_{calc} = 2193,0$ Da) und Sequenzbereich 51-79 ($m/z = 3350,8$ Da; $m_{calc} = 3350,5$ Da) nachgewiesen werden. Die Analyse des fluoreszenzmarkierten Proteins (p21(mod)•R-caged GTP) zeigte im Bereich bis 5 kDa hingegen ausschließlich das Fragment für Aminosäuren 51-79 ($m/z = 3350,6$ Da; $m_{calc} = 3350,5$ Da). Dies kann durch unmarkierte Cysteine Cys-51 und Cys-80 und eine vollständige Fluoreszenzmarkierung der Position Cys-32 erklärt werden. Da das Protein an einem fluoreszenzmarkiertem Cystein nicht geschnitten werden konnte, entstand für den Sequenzbereich 1-50 ein einzelnes, größeres Fragment. Diese Ergebnisse bestätigen also die gewünschte Fluoreszenzmarkierung an der Position Cys-32.

5.1.6.3 Analyse der GTPase-Aktivität von p21(mod) durch HPLC

Zur Bestimmung der GTPase-Aktivität des fluoreszenzmarkierten Proteins p21(mod) wurden 4 μl einer Lösung von 12,3 mg/ml p21(mod)•R-caged GTP in X-Puffer für drei Minuten mit 2,5 mW UV-Licht (325 nm) bestrahlt. Durch Photolyse von R-caged GTP wurde dadurch GTP freigesetzt und somit die GTPase-Reaktion gestartet. Der Tropfen der Proteinlösung wurde dazu entsprechend Abbildung 5, A unter einem Deckgläschen hängend über einer Reservoir-Lösung aus X-Puffer platziert. Die Bestrahlung erfolgte durch unfokussiertes Licht von einem He-Cd-Laser (Modell IK5652R-G, Soliton, Gilching), welches durch eine optische Faser ($\varnothing = 400 \mu\text{m}$) zum Deckgläschen geleitet wurde. Eine Analyse per HPLC (s. Kapitel 4.3.3) zeigte eine vollständige Photolyse von R-caged GTP zu GTP und 2-Nitrosoacetophenon (Daten nicht gezeigt). Für jeden Messpunkt wurden 0,5 μl der Proteinlösung durch HPLC gemäß Kapitel 4.3.3 analysiert. Die Elution erfolgte bei 1 ml/min mit HPLC-Puffer (12 % Acetonitril) als mobile Phase. Es ergaben sich Retentionszeiten von $t_{\text{ret}}(\text{GDP}) = 4,48 \text{ min}$ und $t_{\text{ret}}(\text{GTP}) = 5,59 \text{ min}$. Die Integration der HPLC-Spektren erfolgte mit dem Programmpaket Star Chromatography Workstation (Version 5.0, Varian, Darmstadt). Für den ersten Messpunkt nach Start der Photolyse ($t = 5 \text{ min}$) wurde das Verhältnis der Nukleotide GDP und GTP bestimmt und der GTP-Anteil zu diesem Zeitpunkt auf 100 % normiert. Die HPLC-Spektren und der Verlauf der Hydrolyse des verbleibenden GTP sind in Abbildung 28 dargestellt.

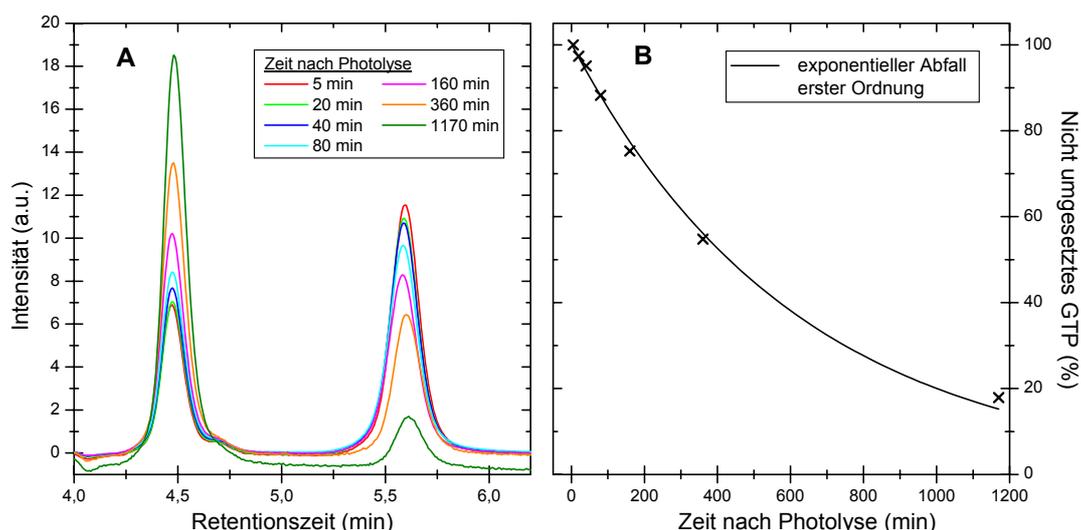


Abbildung 28: (A): HPLC-Spektren einer Lösung aus 12,3 mg/ml p21(mod)•R-caged GTP in X-Puffer zu verschiedenen Zeitpunkten nach Photolyse mit UV-Licht (325 nm). Alle Spektren wurden auf eine gleiche Summe der Peak-Flächen für die Nukleotide GDP ($t_{\text{ret}}(\text{GDP}) = 4,48 \text{ min}$) und GTP ($t_{\text{ret}}(\text{GTP}) = 5,59 \text{ min}$) normiert. (B): Umsetzungsgrad des nach der Photolyse freigesetzten GTP. Für den Zeitpunkt $t = 5 \text{ min}$ nach Start der Photolyse wurde der verbleibende GTP-Gehalt auf 100 % normiert.

Der Verlauf der Hydrolyse wurde mit dem Programm Origin (Version 6.0, Microcal Software, Northampton, USA) unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung durch Gleichung 12 angenähert:

$$y_{GTP} = y_0 \cdot e^{-(t_{Hydrolyse} \cdot k)}, \quad t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (12)$$

Der Umsetzungsgrad y_{GTP} in Abhängigkeit der Reaktionszeit $t_{Hydrolyse}$ kann gemäß Gleichung 12 mit einer Geschwindigkeitskonstanten $k = (620,9 \pm 26,3 \text{ min})^{-1}$ beschrieben werden, woraus sich eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 430,4 \pm 18,2 \text{ min}$ für die GTP-Hydrolyse ergibt. Die Halbwertszeit ist deutlich höher als beim Wildtyp-Protein, welche von John *et al.* (1989) mit $t_{1/2} = 18,7 \text{ min}$ bei 37 °C bestimmt wurde. Durch die eingeführten Modifikationen wurde also eine deutliche Reduktion der GTPase-Aktivität hervorgerufen, was für die an p21(mod) durchgeführten FLUMIX-Experimente jedoch nicht von Nachteil war.

5.1.6.4 Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften

Für die Planung und Durchführung von FLUMIX-Experimenten an p21(mod) waren zunächst detaillierte Informationen über die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des biologischen Modellsystems notwendig. Absorptionsspektren von reinem R/S-caged GTP und von p21(mod)•R/S-caged GTP wurden mit einem UV/VIS-Spektralphotometer (Shimadzu, Düsseldorf) gemessen (s. Abbildung 29).

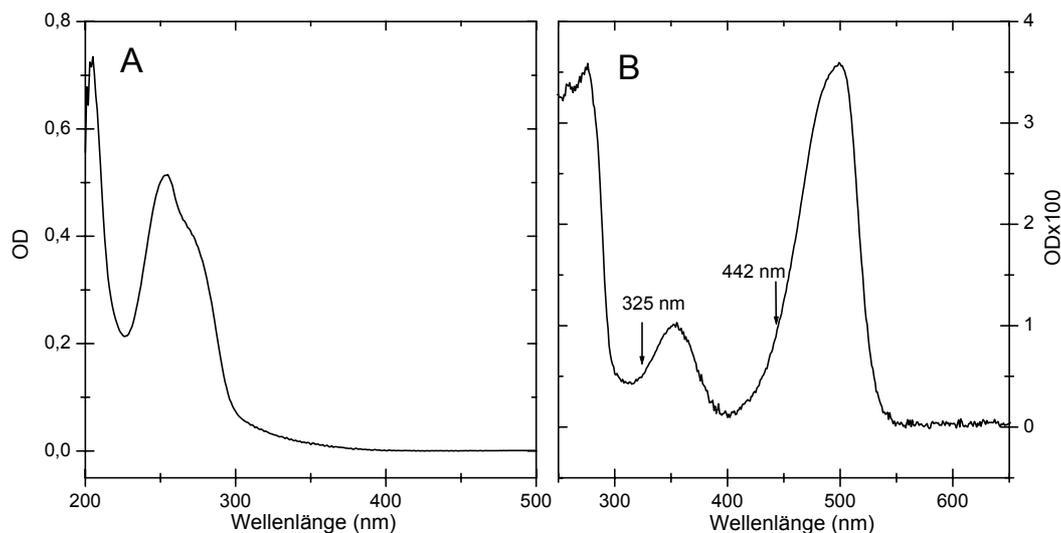


Abbildung 29: (A): Absorptionsspektrum einer Lösung von R/S-*caged* GTP (31,3 μ M)
 (B): Absorptionsspektrum einer Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP (31,7 μ g/ml). Zusätzlich sind die beiden Anregungswellenlängen eines *Dual-Mode* He-Cd-Lasers (325 und 442 nm) markiert.

Für die Fluoreszenzanregung von p21(mod) und die Photolyse von *caged* GTP kam in späteren Experimenten (s. Kapitel 5.3) ein *Dual-Mode* He-Cd-Laser (Soliton, Gilching) zum Einsatz. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, liegen beide Laserwellenlängen, die von einer solchen Lichtquelle generiert werden (325 und 442 nm) jeweils an den Schultern der Absorptionsbanden einer Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP. Dies ist für Fluoreszenzuntersuchungen und für die Reaktionsinitiierung an kristallinem p21(mod) sehr vorteilhaft, da so trotz der sehr hohen Proteinkonzentration im Proteinkristall eine annähernd homogene Belichtung erzielt werden kann. Ausgehend von dem Absorptionsspektrum in wässriger Lösung (Abbildung 29, B) wurde die optische Dichte eines Kristalls von p21(mod)•R-*caged* GTP mit 50 μ m Dicke auf $OD = 0,59$ bei 325 nm und $OD = 0,94$ bei 442 nm extrapoliert.

Fluoreszenzspektren einer Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer Aminco SLM 8100 (Sopra, Büttelborn) aufgenommen (s. Abbildung 30).

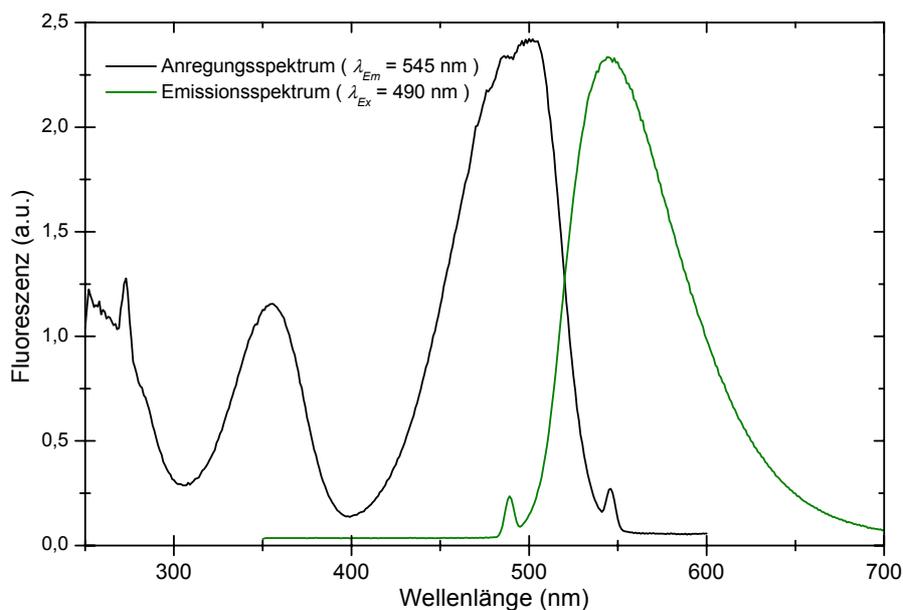


Abbildung 30: Fluoreszenzspektrn einer Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP. Dargestellt sind ein Anregungsspektrum, welches bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{Em} = 545$ nm aufgenommen wurde und ein Emissionsspektrum, welches bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{Ex} = 490$ nm gemessen wurde.

Wie aus Abbildung 30 ersichtlich wird, hat eine Fluoreszenz-Anregung durch blaues Licht des He-Cd-Lasers ($\lambda_{Ex} = 442$ nm) neben der Möglichkeit einer homogenen Kristall-Belichtung auch bezüglich der Separierung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht große Vorteile. Durch die Verwendung eines optischen Filters, der nur für Licht oberhalb etwa 450 nm durchlässig ist (z.B. Schott GG-455; Itos, Mainz), kann so das Anregungslicht bei 442 nm ohne Beeinflussung des Fluoreszenzspektrums abgetrennt werden, was bei einer Fluoreszenzanregung am Fluoreszenzmaximum von 490 nm nicht möglich wäre.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren (Abbildung 29) und Fluoreszenzspektrn (Abbildung 30) von p21(mod)•R/S-*caged* GTP zeigt, dass die Absorptionsbanden bei ~ 350 nm und ~ 550 nm auf den künstlich eingeführten Fluorophor zurückzuführen sind. Obwohl für *caged* GTP eine maximale Photolyseeffizienz im Bereich 300-360 nm festgestellt wurde (Schlichting *et al.*, 1989), weist das Nukleotid bei dieser Wellenlänge nur eine geringe Absorption auf. Dies ist auf einen geringen Absorptionskoeffizienten der 2-Nitrophenylethyl- (2-NPE-, *cage*-) Gruppe im Vergleich zum Guanin-Ring des Nukleotids zurückzuführen. Die Absorption von *caged* GTP im Bereich von 250-300 nm beruht auf einer Absorption durch die Guanin-Gruppe des Nukleotids und führt im Gegensatz zu einer Anregung der 2-NPE-Gruppe nicht zur Spaltung von *caged* GTP.

Die Laserwellenlänge von 325 nm stellt insofern für die Photolyse von *caged* GTP in p21(mod)•*caged* GTP einen guten Kompromiss dar zwischen einer recht hohen Photolyse-Effizienz und einer geringen Lichtabsorption durch den Fluorophor oder die Guanin-Gruppe des Nukleotids.

5.1.7 Kristallisation und Stabilisierung intermediärer Kristall-Zustände

Die Kristallisation von p21(mod) im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden erfolgte nach der Methode des hängenden Tropfens (s. Kapitel 2.2). Die von Scherer *et al.* (1989) für die verkürzte Form des Wildtyp-Proteins H-Ras p21 (Asr 1-166) eingesetzte Kristallisations-Bedingung mit leichten Variationen (X-Puffer mit PEG-400 als Fällungsmittel) führte nur für p21(mod)•GppNHp nach kurzer Zeit zu Einkristallen. In einem Kristallisationsansatz auf Basis dieser Bedingungen mit p21(mod)•GDP wuchs erst nach etwa 6 Monaten ein einzelner großer Kristall heran, der dafür jedoch über hervorragende Diffraktionseigenschaften verfügte (Kristall C2, s. Tabelle 1).

Eine Variation der ursprünglichen Kristallisationsbedingungen führte für p21(mod)•R-*caged* GTP oder p21(mod)•S-*caged* GTP zu keinen geeigneten Kristallen. Die Kristallisationsbedingungen wurden deshalb unter Verwendung von Kristallisations-Screens der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) neu optimiert. Als günstigste Reservoir-Lösung stellte sich 0,2 mM Mg-Acetat, 0,1 mM HEPES pH 7,2 und 16-17 % PEG 8000 heraus. Das Protein lag in X-Puffer gelöst vor, so dass sich im Kristallisationsansatz ein gemischtes TRIS/HEPES-Puffersystem ergab. Unter diesen Kristallisationsbedingungen konnten hochwertige Kristalle von p21(mod)•R-*caged* GTP, p21(mod)•S-*caged* GTP und auch von p21(mod)•GppNHp innerhalb von weniger als 24 Stunden erhalten werden. Kristalle von p21(mod)•GDP (s. Abbildung 31, 1), welche durch Variation dieser neuen Kristallisationsbedingungen erhalten wurden, zeigten jedoch eine vergleichsweise geringe Kristallqualität und wurden deshalb nicht weiter analysiert. In Abbildung 31 sind exemplarisch einige der erhaltenen Kristallformen für p21(mod) in Komplex mit GppNHp, GDP und R-*caged* GTP dargestellt.

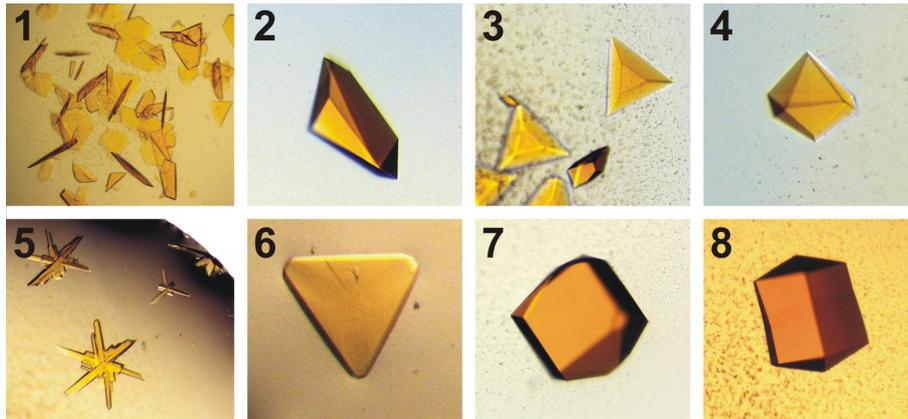


Abbildung 31: Verschiedene Kristall-Formen von p21(mod). (1): p21(mod)•GDP; (2-4): p21(mod)•GppNHp; (5-8): p21(mod)•R-caged GTP

Für FLUMIX-Experimente in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten wurden Kristalle mit einer Dicke von etwa 50 μm angestrebt, um einerseits ein ausreichendes Streuvolumen für die Röntgendiffraktion bereitzustellen, andererseits aber auch eine homogene Belichtung des gesamten Kristall-Volumens mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer zu ermöglichen (s. Kapitel 5.1.6.4). Für die Optimierung der Form und Größe von p21(mod)-Kristallen wurden etwa 30 Minuten alte Kristallisationsansätze gemäß Kapitel 4.4.1 durch *streak-seeding* angeimpft. Für alle Kristallisationsansätze war die Verwendung von frisch angesetzten PEG-Lösungen essentiell für ein schnelles Kristallwachstum. Die erfolgreichen Kristallisationsparameter für die in dieser Arbeit durch Röntgenstrukturanalyse untersuchten Kristalle sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Kristallisationsparameter zur Herstellung der Kristalle C1-C7

Kristall	Nukleotid	<i>c</i> (Protein) (mg/ml)	Reservoir-Lösung	Kryo-Lösung	Reservoir-Volumen	Tropfen-Größe	Animpf-Technik	Alter der Kristalle
C1	GppNHp	12,64	X-Puffer + 26 % PEG 400	direkt eingefroren	450 µl	2 µl	-	2 Tage
C2	GDP	17,27	X-Puffer + 35 % PEG 400	direkt eingefroren	500 µl	4 µl	-	6 Monate
C3	S-caged GTP	15,40	0,2 M Mg-Acetat 0,1 M HEPES pH 7,4 17 % PEG 8000	XK 17/20-Puffer	1 ml	20 µl	<i>streak-seeding</i>	3 Tage
C4	R-caged GTP	13,35	0,2 mM Mg-Acetat 0,1 M HEPES pH 7,2 16 % PEG 8000	~ 3 min. in XK 16/10-Puffer, dann überführt in XK 17/20-Puffer	500 µl	4 µl	<i>streak-seeding</i>	3 Tage
C5	R-caged GTP→GTP	13,35	0,2 M Mg-Acetat 0,1 M HEPES pH 7,2 16 % PEG 8000	XK 17/20-Puffer	1 ml	4 µl	<i>streak-seeding</i>	3 Tage + ~ 4 min nach Photolyse
C6	R-caged GTP→GDP	13,35	0,2 M Mg-Acetat 0,1 M HEPES pH 7,2 16 % PEG 8000	XK 17/20-Puffer	1 ml	4 µl	<i>streak-seeding</i>	3 Tage + 68 Std. nach Photolyse
C7	R-caged GTP→GTP	13,35	0,2 M Mg-Acetat 0,1 M HEPES pH 7,2 16 % PEG 8000	XK 17/20-Puffer	1 ml	4 µl	<i>streak-seeding</i>	3 Tage + ~ 3 min nach Photolyse

Die Kristallisation erfolgte bei 18 °C unter Lichtausschluss. Alle Proteine lagen in X-Puffer gelöst vor.

Die Kristalle C5 - C7 wurden aus Kristallen von p21(mod)•R-caged GTP hergestellt. Dazu wurden die Kristalle gemäß Kapitel 4.4.3 zunächst mit UV-Licht (325 nm) bis zur vollständigen Photolyse von R-caged GTP belichtet und anschließend bis zum Erreichen des gewünschten intermediären Zustands inkubiert.

Der intermediäre GTP-gebundene Zustand wurde in zwei unterschiedlichen Versuchsanordnungen hergestellt (Kristalle C5 und C7). Kristall C5 wurde in einer Anordnung entsprechend Abbildung 5, A belichtet, während Kristall C7 in einer Nylon-Schleife montiert und mit einem Luftfeuchteconditionierer (s. Kapitel 5.2.8) stabilisiert wurde. Beide Kristalle wurden dafür zuvor in XK 17/20-Puffer überführt, um nach der vollständigen Photolyse ein zügiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff zu ermöglichen. Die Vollständigkeit der Photolyse wurde dabei durch FLUMIX-Experimente analysiert (s. Kapitel 5.3.2.3). Anhand der FLUMIX-Analysen konnte auch die Qualität der erreichten intermediären Zustände abgeschätzt werden. Die Photolyse im hängenden Tropfen

(Kristall C5) stellte nach diesen Experimenten die günstigere Methode zur Herstellung von p21(mod)•(R-caged GTP→GTP)- Kristallen dar (s. Kapitel 5.3.2.3).

Zur Herstellung eines p21(mod)-Kristalls in Komplex mit GDP, welches erst im Kristall durch Hydrolyse von GTP erzeugt wurde („p21(mod)•R-caged GTP→GDP“, Kristall C6) wurde ein Kristall von p21(mod)•R-caged GTP in einer Anordnung entsprechend Abbildung 5, A photolysiert, jedoch erst nach einer Inkubationszeit von 68 Stunden schockgefroren, um eine vollständige Hydrolyse von GTP zu GDP zu ermöglichen.

5.2 Entwicklung des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers

5.2.1 Anforderungen an das Spektrometer

Es sollte ein geeignetes Fluoreszenzspektrometer entwickelt werden, um kinetische Fluoreszenzexperimente in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten an Proteinkristallen zu ermöglichen. Wie bereits in Kapitel 1.2 diskutiert wurde, musste ein solches Spektrometer sehr kompakt aufgebaut werden, um in den komplexen Aufbau eines Röntgen-Diffraktometers integriert werden zu können. Da das Spektrometer an verschiedenen Röntgenquellen eingesetzt werden sollte, musste außerdem ein flexibler, transportabler Aufbau gewährleistet sein, der leicht an unterschiedliche Gegebenheiten angepasst werden kann. Insbesondere die Kombination mit verschiedenen Synchrotron-Messstationen war hier eine wichtige Voraussetzung.

Neben diesen rein geometrischen Voraussetzungen mussten mit dem Spektrometer Fluoreszenzanalysen an sehr kleinen Objekten mit nur etwa 50-100 μm Kantenlänge möglich sein, was hohe Anforderungen an die verwendeten optischen Komponenten stellte. Des Weiteren sollte eine möglichst hohe zeitliche Auflösung in kinetischen Untersuchungen erreicht werden. Dies musste bei einer ausreichend niedrigen Intensität des Anregungslichts ermöglicht werden, da eine zu hohe Lichtintensität eine Schädigung des Protein-Kristalls, z.B. durch Erwärmung oder Fluoreszenzbleichung, hervorrufen würde. Für kinetische Untersuchungen mussten die Proteinkristalle bei Raumtemperatur in einer Nylon-Schleife stabilisiert werden können.

5.2.2 Gesamtaufbau des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers

Das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer wurde modular aufgebaut, wobei die einzelnen Komponenten des Spektrometers durch Lichtleiter-Fasern miteinander verbunden wurden. Dies ermöglichte eine maximale Flexibilität bei der Platzierung der Komponenten, die nicht in direkter Nähe des Kristalls angebracht werden mussten. Der Strahlengang und die verwendeten Einzelteile wie z.B. Lichtquelle, optische Filter, Referenz-Küvette etc. konnten außerdem aufgrund dieser modularen Bauweise leicht den jeweiligen experimentellen Erfordernissen angepasst werden. Der für Fluoreszenzuntersuchungen an p21(mod) am häufigsten verwendete Aufbau ist in Abbildung 32 dargestellt.

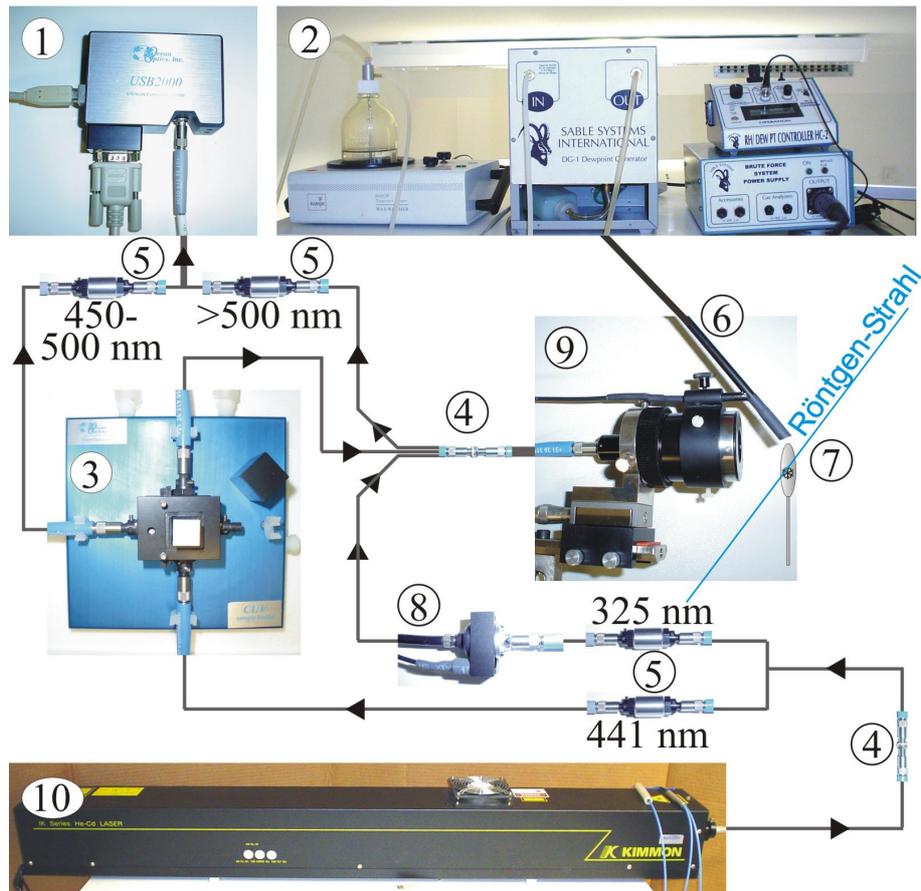


Abbildung 32: Aufbau des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers. (1): CCD-Detektor; (2): Geräte zur Luftfeuchtekkonditionierung (*humidifier*); (3): Referenz-Küvette; (4): direkte Faser-Übergänge; (5): Faser-Übergang mit integriertem optischen Filter; (6): Feuchtluftzuführung vom Luftfeuchtekkonditionierer; (7): Protein-Kristall; (8): mechanischer Licht-Unterbrecher; (9): Spiegel-Objektiv; (10): He-Cd-Laser.

In der dargestellten Versuchsanordnung wurde das Licht vom He-Cd-Laser zunächst in zwei Lichtwege aufgeteilt und durch geeignete optische Filter jeweils eine der beiden Laser-Wellenlängen (325 bzw. 441,6 nm) abgetrennt. Der Lichtweg für blaues Licht (441,6 nm) diente der Fluoreszenzanregung. Das Licht passierte zunächst eine Referenz-Küvette zur Korrektur von Signalschwankungen der Lichtquelle und wurde von dort zum Spiegelobjektiv weitergeleitet. Der Lichtweg für UV-Licht (325 nm) konnte durch einen mechanischen Licht-Unterbrecher wahlweise geöffnet oder geschlossen werden und diente der Photolyse von *caged* GTP. Reaktionsinitiierung, Fluoreszenzanregung und Fluoreszenzdetektion erfolgten in einer 0°-Geometrie durch ein einzelnes Spiegel-Objektiv, wodurch der Platzbedarf um den Kristall im Vergleich zu einer klassischen 90°-Geometrie stark reduziert werden konnte. An dem Objektiv konnte auch die Feuchtluftzuführung zur Stabilisierung von Proteinkristallen bei Raumtemperatur angebracht werden. Das

Referenzsignal und das Fluoreszenzspektrum der eigentlichen Probe wurden vor dem Detektor zusammengeführt und gemeinsam in einem Spektrum aufgezeichnet. Mit geeigneten optischen Filtern wurde sichergestellt, dass der Wellenlängenbereich des Referenzlichts nicht mit dem Fluoreszenzspektrum der Probe überlagert. Im Folgenden sollen die einzelnen Komponenten des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers in größerem Detail beschrieben werden.

5.2.3 Lichtquellen

Für die Justage der optischen Komponenten des Spektrometers wurde eine Wolfram-Lampe LS-1 (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) verwendet. Die Lampe konnte über eine integrierte Faser-Einkopplung an die optischen Lichtleiter-Fasern des Spektrometers angeschlossen werden und hatte gegenüber intensiveren Lichtquellen den Vorteil einer kompakten Bauweise und einer für das Auge ungefährlichen Lichtintensität. Für die Reaktionsinitiierung und für die Fluoreszenzanregung wurde ein *Dual-Mode* He-Cd-Laser (Modell IK5652R-G, Soliton, Gilching) verwendet, welcher etwa 38 mW Lichtintensität im ultravioletten Bereich ($\lambda = 325$ nm) und etwa 132 mW Intensität im blauen Spektralbereich ($\lambda = 441,6$ nm) erzeugte. Das Laserlicht wurde in eine optische Faser mit 200 μm Durchmesser eingekoppelt. Mit einem Laserenergie-Messgerät (Modell PM-100, Soliton, Gilching) wurde eine Transmission von blauem Licht von >100 mW ($\lambda = 441,6$ nm) durch die 200 μm -Faser gemessen, was einer Einkopplungseffizienz von über 75 % entspricht. Alternativ zur Laser-Lichtquelle stand eine 150 W Xenon-Lampe (Modell MOD A1000, PTI) mit angeschlossenem Monochromator (Modell H10-UV, ISA instruments SA, division Jobin-Yvon) für die Fluoreszenz-Anregung zur Verfügung. Aufgrund der geringeren Einkopplungs-Effizienz in dünne optische Fasern musste bei einer Fluoreszenzanregung mit dieser Lichtquelle für die Aufnahme eines Fluoreszenz-Spektrums von einem kleinen Proteinkristall etwa 5 Sekunden integriert werden, um ein Signal mit etwa 50 % Detektor-Sättigung zu erreichen (Fluoreszenzmessung an einem Kristall von p21(mod)•GTP mit $\sim 50\text{-}100$ μm Kantenlänge in einer Nylon-Schleife, $T = 100$ K, $\lambda_{\text{Ex}} = 441,6$ nm). Die Bandweite der Strahlung lag bei 10 nm FWHM, und die Lichtintensität vor dem Kristall wurde mit ~ 1 μW gemessen. Obwohl die mit der Xenon-Lampe erzeugte nutzbare Lichtintensität für die meisten kinetischen Experimente nicht ausreichte, konnten damit akzeptable statische Fluoreszenzspektren aufgenommen werden. Somit war aufgrund der

variablen Anregungswellenlänge auch die Messung von Fluoreszenz-Anregungs-Spektren von kleinen Proteinkristallen möglich.

5.2.3.1 Auswahl des He-Cd-Lasers als Lichtquelle

Die Auswahl des He-Cd-Lasers als Lichtquelle für das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer erfolgte aufgrund verschiedener zu berücksichtigender Parameter. Der Aufbau des Spektrometers beinhaltete mehrere Übergänge zwischen optischen Fasern, die jeweils mit Lichtverlust behaftet waren. Außerdem musste das Anregungs-Licht auf einen kleinen Kristall mit Kantenlängen von nur etwa 50-100 μm fokussiert werden. Um eine zeitliche Auflösung von wenigen Millisekunden in kinetischen Fluoreszenzuntersuchungen zu erreichen, wurde also eine Lichtquelle mit hoher Intensität und Fokussierbarkeit benötigt. Um diesen Voraussetzungen gerecht zu werden, kam nur eine Laser-Lichtquelle in Frage.

Des Weiteren musste entschieden werden, ob ein Laser mit gepulster oder mit kontinuierlicher Lichtemission für die durchzuführenden Experimente sinnvoller wäre. Mit gepulsten Lichtquellen ist theoretisch eine homogene Reaktionsinitiierung in einem Proteinkristall innerhalb von wenigen Nanosekunden denkbar. Bei der Photolyse von *caged* GTP in Kristallen des verkürzten Wildtyp-Proteins H-Ras p21 (Asr 1-166) mit einer Xenon-Blitzlampe (Schlichting *et al.*, 1989) stellte sich jedoch heraus, dass durch einen einzelnen Licht-Puls normalerweise keine vollständige Photolyse von *caged* GTP erreicht werden kann. Schlichting *et al.* (1989) verwendeten für eine vollständige Photolyse etwa 10 Licht-Pulse, was die hohe zeitliche Auflösung von 2 Millisekunden der Einzel-Pulse größtenteils zunichte machte. Für die Untersuchung des in dieser Arbeit verwendeten Proteins p21(mod) war die Verwendung einer gepulsten Lichtquelle besonders kritisch, da der künstlich eingeführte Fluorophor IANBD Amid bei etwa 350 nm eine Absorptionsbande aufweist (s. Kapitel 5.1.6.4). Es musste sichergestellt werden, dass während der Photolyse von *caged* GTP nicht auch gleichzeitig eine Bleichung des Fluorophors eintritt.

Der Fluoreszenz-Bleichung und der Photolyse von *caged* GTP liegen unterschiedliche physikalische Prozesse zugrunde. Während Photolyse von *caged* GTP bereits durch die Absorption eines einzelnen Licht-Photons stattfinden kann, wird durch den Fluorophor absorbierte Energie mit großer Wahrscheinlichkeit in Form von Wärme und Fluoreszenzlicht wieder freigesetzt, ohne den Fluorophor zu zerstören. Erst bei hohen Licht-

Intensitäten ist deshalb eine signifikante Fluoreszenz-Bleichung aufgrund von Mehr-Photonen-Prozessen zu erwarten.

Um das Verhalten von p21(mod) bei Bestrahlung mit unterschiedlich hohen Licht-Intensitäten zu untersuchen, wurde eine Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP (25,2 mg/ml) mit einer gepulsten und einer kontinuierlichen Lichtquelle bestrahlt. Die Photolyse-Effizienz wurde mittels HPLC (s. Kapitel 4.3.3) analysiert, und die Fluorophor-Bleichung wurde anhand Veränderungen der Absorption bei 499 nm untersucht. Als gepulste Lichtquelle wurde ein durchstimbarer OPO-Laser (Continuum, Modell Surelite II-10) bei einer Wellenlänge von 350 nm (10 ns / Puls, ~ 50 mJ / Puls, 10 µl Probenvolumen) eingesetzt. Das Experiment wurde mit einer kontinuierlichen Laser-Lichtquelle (351 nm, ~ 20 µW Lichtintensität, 10 µl Probenvolumen) wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 33 dargestellt.

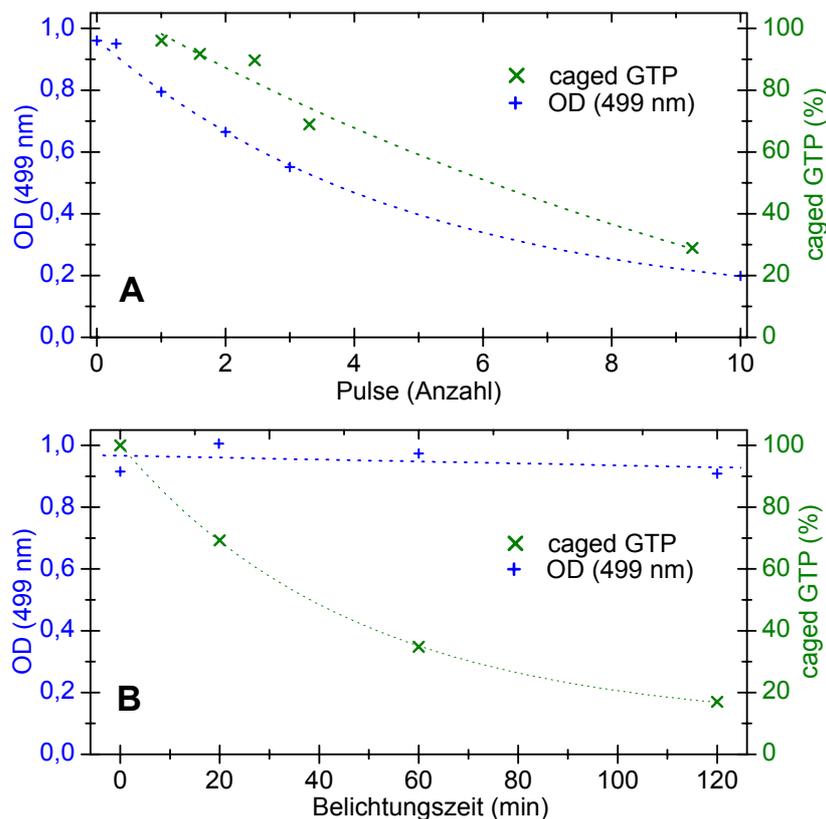


Abbildung 33: Veränderungen des Anteils an nicht photolysiertem *caged* GTP, sowie der Absorption einer Lösung von p21(mod)•R/S-*caged* GTP bei 499 nm (1:10 verdünnt auf 2,52 mg/ml). Die gepunkteten Linien stellen den Verlauf einer linearen bzw. exponentiellen Abnahme erster Ordnung dar. (A): Belichtung mit einem gepulsten Laser (Modell Surelite II-10, Continuum; λ_{Ex} = 350 nm, 10 ns / Puls, ~ 50 mJ / Puls, 10 µl Probenvolumen); (B): Belichtung mit einer kontinuierlichen Lichtquelle (λ_{Ex} = 351 nm, ~ 20 µW Lichtintensität, 10 µl Probenvolumen).

Wie zu erkennen ist, konnte bei Belichtung mit dem gepulsten Laser aufgrund der sehr hohen Lichtintensität (50 Megawatt während der Licht-Pulse) keine vollständige Photolyse von *caged* GTP ohne gleichzeitige Zerstörung des Fluorophors erreicht werden. Wurde hingegen mit geringen Licht-Intensitäten bestrahlt, so wurde während der Photolyse von *caged* GTP die Absorption bei 499 nm nur unwesentlich beeinflusst, was auf eine sehr geringe Fluoreszenz-Bleichung hindeutet. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Verwendung einer kontinuierlichen Lichtquelle gegenüber einer gepulsten Quelle zu bevorzugen war.

Für das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer wurde ein *Dual-Mode* He-Cd-Laser (Modell IK5652R-G, Soliton, Gilching) angeschafft. Die Anregungswellenlänge dieses Lasers im UV-Bereich (325 nm) lag deutlich unter der Absorptionsbande des Fluorophors bei etwa 350 nm (s. Abbildung 29, *B*), so dass eine noch geringere Fluoreszenzbleichung zu erwarten war als mit dem zu Testzwecken verwendeten Laser (s. Abbildung 33, *B*). Der He-Cd-Laser hatte zusätzlich den Vorteil, dass die zweite generierte Laserlinie bei 441,6 nm für die Fluoreszenz-Anregung des NBD-Fluorophors genutzt werden konnte, so dass mit nur einem Laser sowohl die Reaktionsinitiierung als auch die Fluoreszenzanregung in FLUMIX-Experimenten an p21(mod) abgedeckt werden konnten. Mit dem He-Cd-Laser konnte in einem Aufbau gemäß Abbildung 32 eine Lichtintensität von knapp 1 mW bei 325 nm, und deutlich über 1 mW bei 441,7 nm, auf einen kleinen Protein-Kristall mit 50 - 100 μm Kantenlänge fokussiert werden, was für die durchzuführenden Experimente mehr als ausreichend war.

5.2.4 Lichtleiterfasern, optische Filter und Referenzmessungen

Die einzelnen Komponenten des Spektrometers wurden durch Lichtleiter-Fasern mit SMA-905 Anschlüssen (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) miteinander verbunden. Zur Zusammenführung oder Aufteilung verschiedener Lichtwege wurden zweifach aufgeteilte (Y-Anordnung) oder dreifach aufgeteilte (Ψ -Anordnung) Faser-Kombinationen verwendet. Zur Abtrennung von Anregungslicht oder zur Selektion des benötigten Spektralbereichs wurden optische Filter (Schott, bezogen von Ocean Optics (Duiven, Niederlande) und Itos (Mainz)) verwendet, die durch Faser-Übergangsstücke mit integriertem Filterhalter (Modell INLINE FH, Ocean Optics, Duiven, Niederlande) zwischen zwei Lichtleitern angebracht werden konnten. Referenz-Messungen wurden mit Hilfe einer Küvetten-Halterung mit integrierten Faser-Anschlüssen (Modell CUV-ALL-UV, Ocean Optics, Duiven,

Niederlande) durchgeführt. Da nur ein einzelner CCD-Detektor zur Verfügung stand, wurde das Referenz-Signal zusammen mit dem Fluoreszenzlicht von der Probe in einem kombinierten Spektrum aufgezeichnet. Gemäß dem in Abbildung 32 dargestellten Strahlengang wurden vor dem CCD-Detektor die Strahlengänge für Referenzlicht und Fluoreszenzlicht vereinigt. Als Referenz-Signal wurde durch eine Kombination von zwei optischen Filtern (Schott GG-455 und Schott BG-4) ein enger Spektralbereich von 445-485 nm (>1 % Transmission) ausgewählt, der nicht mit dem Fluoreszenzspektrum von p21(mod) überlagert. Dabei diente eine Lösung aus 0,1 mM 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylsäure-succinimidyl-ester (Molecular Probes, Oregon, USA) in DMSO als Referenz-Fluorophor. Wie in Abbildung 32 ersichtlich ist, wurde das Referenz-Spektrum in konventioneller 90°-Anordnung aufgezeichnet. Das Licht, welches die Referenz-Küvette passiert, wurde dabei wieder in den Lichtweg für die Fluoreszenz-Anregung im Proteinkristall eingekoppelt. Diese Geometrie wurde gewählt, weil die erhaltenen Signale nur schlecht miteinander korrelierten, wenn die beiden Lichtwege für Fluoreszenz- und Referenzmessungen schon vor der Referenz-Küvette getrennt wurden. Eine große Quelle für Signalschwankungen waren Schwankung der Einkopplungs-Effizienz in dünne optische Fasern (und damit der Transmission durch diese Fasern), vermutlich aufgrund geringer Winkelveränderungen des Laserstrahls. Solche Schwankungen konnten nur korrigiert werden, indem dasselbe Licht, welches die Referenz-Küvette passierte, auch für die Fluoreszenzanregung im Proteinkristall genutzt wurde.

Eine richtige Auswahl der verwendeten optischen Faseranordnungen war sehr wichtig, um Probleme durch Signal-Instabilitäten zu vermeiden und um die detektierte Signalintensität zu maximieren. So wurden beispielsweise durch die direkte Verbindung zweier sehr dünner optischer Fasern hohe Schwankungen der Signal-Intensität hervorgerufen. An einem Übergang zwischen zwei Fasern mit je 50 µm Durchmesser wurden Signalschwankungen von 50 % und mehr beobachtet. Dies war vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Positionierungs-Ungenauigkeit der verwendeten Faser-Verbindungsstücke in derselben Größenordnung oder sogar über dem Durchmesser der optischen Fasern lag. Durch geringe mechanische Veränderungen oder Temperaturschwankungen konnte es so leicht zu einer Dejustage der Faserausrichtung kommen. Um solche Probleme zu vermeiden, wurde ein direkter Übergang zwischen zwei dünnen optischen Fasern weitestgehend vermieden. Sehr dünne optische Fasern wurden zur Vermeidung von Signalfluktuationen nur mit Fasern mit deutlich höherem Durchmesser verbunden, so dass Positionierungs-Ungenauigkeiten keine

signifikante Rolle mehr spielten. Eine weitere Möglichkeit war die Verwendung von geteilten Einzelfasern anstelle von aus mehreren dünnen Einzelfasern bestehenden aufgeteilten Faserbündeln (s. Abbildung 34).

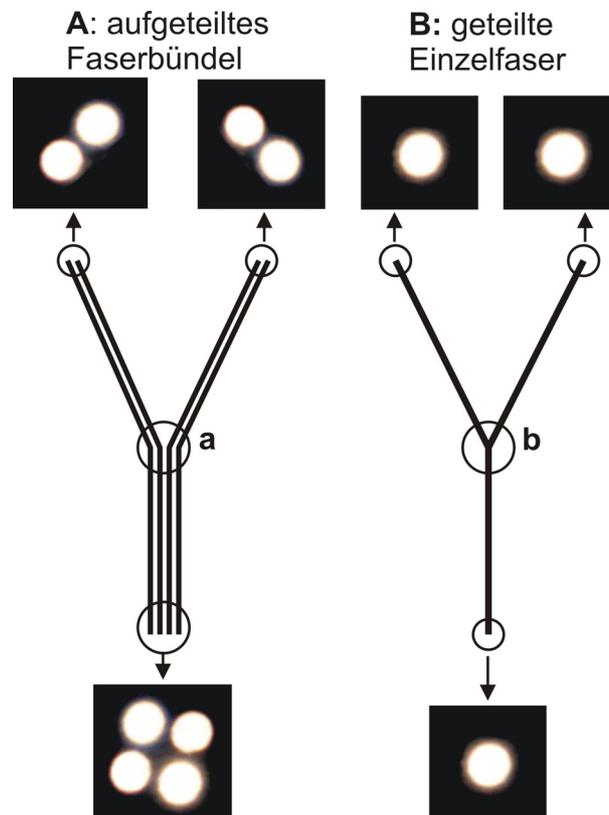


Abbildung 34: Verschiedene Bauweisen einer verzweigten optischen Faseranordnung. (A): Aufgeteilte Faserbündel bestehen aus mehreren unabhängigen Einzelfasern, welche am Gabelungspunkt (a) nicht miteinander interagieren. Zusätzlich ist eine typische Intensitätsverteilung am Ende eines aufgeteilten Faserbündels aus vier optischen Fasern mit je $200\ \mu\text{m}$ Durchmesser dargestellt. Da die einzelnen Fasern durch einen etwa $100\ \mu\text{m}$ dicken, lichtundurchlässigen Klebstoff-Bereich voneinander getrennt sind, entstehen vier einzelne Lichtpunkte, die nicht miteinander überlappen. (B) Geteilte Einzelfasern können zur Optimierung der Einkopplungs-Effizienz bei der Verbindung mit anderen optischen Faseranordnungen genutzt werden. Hierbei werden Einzelfasern verwendet, welche am Verzweigungspunkt (b) verklebt oder verschmolzen werden.

Eine geteilte Einzelfaser mit $200\ \mu\text{m}$ Durchmesser wurde für die Aufspaltung des Laser-Lichts in jeweils einen Lichtweg für blaues ($441,6\ \text{nm}$) und UV-Licht ($325\ \text{nm}$) verwendet. Im Vergleich zu einem aus vier Fasern mit je $200\ \mu\text{m}$ Durchmesser bestehenden aufgeteilten Faserbündel konnte so die effektive Transmissionseffizienz etwa um den Faktor 1,5 verbessert werden.

5.2.5 Objektiv und Halterung

Die Probe wurde durch ein Spiegelobjektiv mit einem Vergrößerungsfaktor von 15 und einem Arbeitsabstand von 24 mm (4DX Systems AB, Uppsala, Schweden) belichtet. Aufgrund der Spiegeloptik produzierte dieses Objektiv praktisch keine chromatischen oder sphärischen Abbildungsfehler (Bourgeois *et al.*, 2002) und war in der Lage, Licht auf einen Punkt von weniger als 50 μm Durchmesser zu fokussieren. Für einen Spektrometer-Aufbau gemäß Abbildung 32 wurde nur ein einziges Objektiv benötigt, wodurch die Entwicklung einer geeigneten Objektiv-Halterung relativ unkompliziert war. Die Objektiv-Halterung bestand aus einem starken Magneten mit etwa 100 kg Hubkraft (50x50x15 mm, Material NeFeB, remanente Flussdichte $B_r = 1,4$ Tesla), an welchen ein dreieckiger Stahl-Block angeklebt wurde. An dem Metallblock wurde ein flexibler Arm aus drei miteinander verschraubten, identischen Stahl-Stegen angebracht, an welchem das Objektiv befestigt werden konnte (s. Abbildung 35).

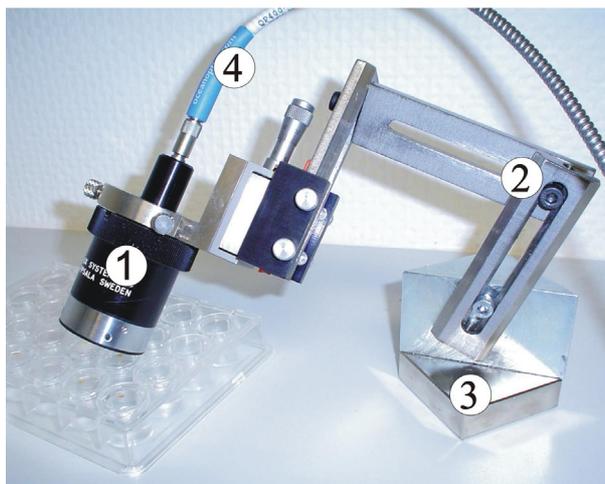


Abbildung 35: Das Spiegelobjektiv (1) des FLUMIX-Spektrometers mit magnetischer Halterung (3), flexiblem Arm zur Positionierung (2) und angeschlossener optischer Faser (4).

Da das Objektiv bereits werksmäßig über eine Möglichkeit zur Feinjustage in alle drei Raumrichtungen verfügte, musste über den flexiblen Arm nur eine Grob-Positionierung des Objektivs durchgeführt werden. Dank der vielen Freiheitsgrade konnte nahezu jede gewünschte Orientierung des Objektivs eingestellt werden, was die Kombination mit verschiedenen Röntgen-Diffraktometern und anderen Geräten stark vereinfachte (s. Kapitel 5.2.10).

5.2.6 Fluoreszenzdetektion in 0°-Geometrie

Das FLUMIX-Spektrometer wurde in einer 0°-Orientierung aufgebaut, Fluoreszenz-Anregung und Signal-Detektion erfolgten also durch das selbe Objektiv. Diese Bauweise hatte gegenüber einer herkömmlichen Detektion in 90°-Geometrie verschiedene Vorteile: Durch die geringeren räumlichen Anforderungen wurde die Kombination mit verschiedenen Röntgen-Diffraktometern oder anderen Geräten stark vereinfacht, und die Entwicklung einer geeigneten Halterung erwies sich als relativ unkompliziert. Außerdem wurde die Ausrichtung auf den Kristall im Vergleich zu zwei Objektiven, die auf den selben Punkt im dreidimensionalen Raum ausgerichtet werden müssen, wesentlich vereinfacht. Des weiteren hat eine Messung in *Front-Face*-Geometrie (s. Kapitel 2.1.2; (Eisinger 1979)) den Vorteil, dass auch Proben mit sehr hoher optischer Dichte untersucht werden können. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings bedacht werden, dass in *Front-Face*-Messungen nicht notwendigerweise der Zustand aller Moleküle des gesamten Probenvolumens untersucht wird (Bourgeois *et al.*, 2002). Das kann beispielsweise dann zu fehlerhaften Interpretationen führen, wenn bei einer Reaktionsinitiierung durch Belichtung mit UV-Licht nur die Probenoberfläche photolysiert wird, aber in einem anschließenden Röntgen-Diffraktionsexperiment ein Datensatz vom gesamten Kristall-Volumen aufgenommen wird. Bei den Wellenlängen des verwendeten He-Cd-Lasers war die optische Dichte der verwendeten Kristalle von p21(mod) mit einer Kantenlänge von etwa 50 μm jedoch niedrig genug, um eine nahezu homogene Belichtung sicherzustellen (s. Kapitel 5.1.6.4).

5.2.7 Geometrie der Lichtwege

Um Reaktionsinitiierung und Fluoreszenzanregung unabhängig voneinander durchführen zu können, wurde gemäß Abbildung 32 zunächst das vom He-Cd-Laser generierte Licht in zwei unterschiedliche Lichtwege aufgetrennt und durch optische Filter die jeweils unerwünschte Laser-Linie ausgefiltert. Aufgrund der Verwendung von nur einem Spiegelobjektiv für Fluoreszenzexperimente mussten folglich die beiden Anregungslichtwege und ein dritter Lichtweg zur Fluoreszenzdetektion am Spiegelobjektiv zusammengeführt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Faserbündel in Ψ -Anordnung verwendet, welches aus drei verschiedenen Faser-Strängen bestand, die auf Objektivseite zu einem einzelnen Faser-Strang zusammenliefen. Das Faserbündel bestand aus sieben

Einzel Fasern mit jeweils 100 μm Durchmesser, welche sich in einen Faserstrang aus vier Einzel Fasern für den Lichtweg der Signal-Detektion, einen zweiten Strang aus zwei Fasern für die Zuführung von UV-Licht zur Reaktionsinitiierung und in einen dritten Strang aus einer einzelnen Faser für den Lichtweg zur Fluoreszenzanregung aufteilten. Die Faser zur Fluoreszenzanregung lag im Zentrum des Faserbündels und generierte somit aufgrund ihrer exakt zentrischen Lage die geringsten Signal-Fluktuationen durch Schwankungen der Einkopplungs-Effizienz an den Faser-Übergängen.

In einem Faser-Bündel aus mehreren voneinander unabhängigen Einzel Fasern hat jede Faser ihren eigenen Brennpunkt, was zu Problemen führen kann, wenn die Überlappung der Brennpunkte für die Fasern der anregenden und der detektierenden Lichtwege zu gering ist (s. Abbildung 34). Das verwendete Spiegelobjektiv kann Licht auf eine Punktgröße von weniger als 50 μm fokussieren, während der Abstand der einzelnen Fasern in einem Faser-Bündel aufgrund der Dicke des Klebstoff-Films etc. typischerweise etwa 100 μm beträgt. Bei einer direkten Verbindung des Faserbündels mit dem Spiegelobjektiv wären die Brennpunkte der Fasern der anregenden und detektierenden Lichtwege deshalb räumlich voneinander getrennt, was in einem geringen detektierten Fluoreszenzsignal resultieren würde. Um dieses Problem zu vermeiden, wurden die sieben Einzel Fasern des Ψ -Faserbündels vor dem Objektiv zunächst in eine Übergangs-Faser mit hohem Durchmesser (400 μm) eingekoppelt und erst über diese Einzel faser an das Spiegelobjektiv angeschlossen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass die Brennpunkte für Fluoreszenzdetektion und Anregung exakt identisch waren (unter der Annahme einer gleichmäßigen Licht-Verteilung innerhalb der 400 μm - Einzel faser). Durch die Einführung der 400 μm -Faser konnte trotz der Verluste an dem zusätzlichen Faser-Übergang eine etwas höhere Signal-Intensität für das detektierte Fluoreszenz-Signal erzielt werden, als bei einer direkten Verbindung des Faserbündels mit dem Spiegelobjektiv erzielt wurde. Dabei wurde durch den größeren Brennpunkt bei Verwendung der 400 μm -Faser eine geringere Photonendichte im Kristall und damit eine geringere thermische Belastung erzeugt. Außerdem wurde eine gleichmäßigere Belichtung des Kristalls erreicht, was insbesondere für Methoden zur Reaktionsinitiierung, welche auf einer Bestrahlung des Kristalls mit Licht (z.B. die Photolyse von *caged* GTP) beruhen, von großem Vorteil ist.

5.2.8 Feuchtluftgenerator für Kristallmanipulation bei Raumtemperatur

Zur Manipulation von Proteinkristallen bei Raumtemperatur wurde ein DG-1 Feuchtluftgenerator (*humidifier*) (Sable Systems Int., Las Vegas, USA) zur Erzeugung eines Luft- oder Stickstoff-Stroms mit definiertem Feuchtigkeitsgehalt eingesetzt. Vor diesem Gerät wurde ein Gasstrom zunächst durch eine Wasserflasche geleitet und dadurch mit Wasser gesättigt. Im Luftfeuchteconditionierer wurde dann überschüssige Feuchtigkeit durch Kondensation an gekühlten Oberflächen abgetrennt, wobei die Temperatur der Oberflächen anhand der gewünschten Luftfeuchtigkeit und der vorherrschenden Temperatur am Punkt des Gas-Austritts kontinuierlich berechnet und angepasst wurde. Die Zuführung des Gasstroms zum Proteinkristall erfolgte über ein einfaches Metallrohr, das über eine ringförmige Befestigung direkt an dem Spiegelobjektiv angebracht werden konnte, was den Platzbedarf um den Kristall für diese zusätzliche Komponente minimierte (s. Abbildung 32, 6). Auf das Ende des Metallrohrs wurde ein kurzes Stück Schrumpf-Schlauch aufgeschrumpft, um den Öffnungsdurchmesser zu erhöhen und um zur Verminderung von Turbulenzen im Gasstrom eine scharfe Luftabriss-Kante zu erzeugen. In dem Metallrohr konnte durch eine Y-förmig angebrachte Verzweigung ein Temperatur-Sensor in der Nähe des Gas-Austritts platziert werden, der durch eine kontinuierliche Rückkopplung mit dem Feuchtluftgenerator die Erzeugung einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit (*relative humidity, RH*) selbst bei variierender Raumtemperatur ermöglichte. Um auch relative Feuchtigkeitswerte von annähernd $RH = 100\%$ erreichen zu können, wurde ein Typ 8901 Wachs-Erwärmer (Babor Treatment Systems) eingesetzt, mit dem die zur Wasser-Sättigung des Gasstroms eingesetzte Wasserflasche auf einige Grad über die Temperatur des Gas-Austritts aufgewärmt wurde.

Ein solches Gerät zur Luftfeuchteconditionierung kann genutzt werden, um Kristalle für viele Stunden bis Tage in einer Nylon-Schleife bei Raum-Temperatur stabil zu halten. Durch gezielte Manipulation der Luftfeuchtigkeit („schrumpfen“ des Kristalls) kann sogar in vielen Fällen eine Verbesserung der Diffraktionsfähigkeit erreicht werden (Kiefersauer *et al.*, 2000).

5.2.9 Detektor und Analyse-Software

Das Fluoreszenz-Signal wurde durch ein USB-2000 Spektrometer mit monolithischem Aufbau (Ocean Optics, Duiven, Niederlande) detektiert. Das Spektrometer bestand aus einem 200 μm Eingangs-Schlitz, einem Gitter mit 600 Linien / mm (Gitter Nr. 2, Ocean Optics, Duiven, Niederlande) und einem linearen CCD-Sensor mit 2048 Pixeln. Die Licht-Zuführung erfolgte durch optische Fasern, die über einen integrierten SMA-905 Faser-Anschluss mit dem Spektrometer verbunden werden konnten. Das maximale Signal/Rausch-Verhältnis des Spektrometers betrug 250:1, und die spektrale Auflösung lag bei 7,5 nm.

Die Datenaufnahme sowie die Steuerung des Spektrometers erfolgte mit dem Software-Paket OOIBase32 Platinum Version 2.0.1.4 (Ocean Optics, Duiven, Niederlande). Die integrierte Skriptsprache auf Basis von Visual Basic erlaubte die Erstellung von spezifischen Datenaufnahme-Protokollen und die Steuerung von externen Geräten wie einem externen mechanischen Licht-Unterbrecher (Modell INLINE-TTL-S, Ocean Optics, Duiven, Niederlande), der direkt an das USB-2000 Spektrometer angeschlossen und mit diesem synchronisiert werden konnte. Auf diese Weise waren auch Langzeitmessungen möglich, wenn beispielsweise in Abständen von mehreren Minuten ein Fluoreszenzspektrum der zu untersuchenden Probe aufgenommen und in der Zwischenzeit der Lichtweg zur Probe geschlossen werden sollte, um eine Fluoreszenz-Bleichung zu minimieren.

5.2.10 Verschiedene Einsatzmöglichkeiten des Spektrometers

5.2.10.1 Fluoreszenz-Spektroskopie und Reaktionsinitiierung an Kristallen im hängenden Tropfen

Unter bestimmten Umständen kann ein Protein-Kristall während seines Wachstums, z.B. in einem Kristallisationsansatz nach der Methode des hängenden Tropfens (s. Kapitel 4.4.1), seine spektroskopischen Eigenschaften verändern. So kann sich beispielsweise in NAD(P)-bindenden Proteinen während der Kristallisation der Oxidations-Zustand des gebundenen Nukleotids ändern. Da nur die reduzierte Form NAD(P)H fluoresziert, kann anhand einer Fluoreszenz-Messung leicht der Oxidationszustand überprüft werden (Dambe, 2004).

Im Falle des in dieser Arbeit untersuchten Proteins p21(mod) können durch Veränderungen im Gehalt der an das Protein komplexierten Nukleotide Änderungen der Fluoreszenz-Intensität des kovalent gebundenen IANBD Amid-Fluorophors auftreten (s. Kapitel 5.3.2.1). Solche Veränderungen können beispielsweise durch Photolyse von gebundenem *caged* GTP auftreten, entweder gezielt in einem Photolyse-Experiment, oder durch Streulicht, das während der Kristallisation die Kristalle erreicht. Aber auch unter Licht-Ausschluss kann ein Abbau von *caged* GTP stattfinden: Obwohl *caged* GTP nicht über den normalen Hydrolyse-Weg von H-Ras p21 zu GDP abgebaut werden kann, wurde ein langsamer, Licht- unabhängiger Zerfall zu GDP und 2-Nitrophenylethyl-phosphat (*caged* Pi) in kristallinem H-Ras p21 (Asr 1-166) festgestellt (Scheidig *et al.*, 1995). Dabei wurde eine deutlich höhere Zerfallsgeschwindigkeit für gebundenes S-*caged* GTP als für R-*caged* GTP beobachtet. Ein übereinstimmender Trend wurde auch für p21(mod) beobachtet: HPLC-Analysen an Kristallen von p21(mod)•S-*caged* GTP zeigten eine etwa 80 %ige Hydrolyse innerhalb von 100 Tagen, während bei p21(mod)•R-*caged* GTP-Kristallen innerhalb 100 Tagen nur eine 22 %ige Hydrolyse des gebundenen Nukleotids beobachtet wurde. Fluoreszenzuntersuchungen könnten hier beispielsweise eingesetzt werden, um während des Wachstums eines Kristalls regelmäßig den Nukleotid-Gehalt zu überprüfen, ohne durch diese Untersuchung die Kristallisation negativ zu beeinflussen.

Durch die für das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer umgesetzte Detektion in 0°-Geometrie wird es möglich, im Wachstum befindliche Proteinkristalle zerstörungsfrei zu analysieren, ohne dabei den Kristallisationsansatz zu öffnen. Absorptionmessungen mit einer 180°-Orientierung der optischen Komponenten können nicht ohne weiteres an den üblichen Kristallisationsplatten (Linbro Zellkulturplatten, ICN, Eschwege) durchgeführt

werden, da die optischen Eigenschaften dieser Platten eine Messung in 180°-Geometrie nicht zulassen. Eine Fluoreszenzmessung in 90°-Orientierung wäre zwar denkbar, jedoch wäre aufgrund der hohen und schwer berechenbaren Lichtbrechung an dem Deckgläschen und dem Kristallisationstropfen eine exakte Fokussierung von zwei Objektiven auf den Proteinkristall sehr schwierig zu bewerkstelligen. Mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer ist ein solches Experiment leicht durchzuführen, da die Lichtwege für Fluoreszenzanregung und Detektion identisch sind. Ein Aufbau, wie er für die Reaktionsinitiierung und für Fluoreszenzuntersuchungen an den Kristallen C5 und C6 (s. Kapitel 5.1.7) eingesetzt wurde, ist in Abbildung 36 dargestellt.

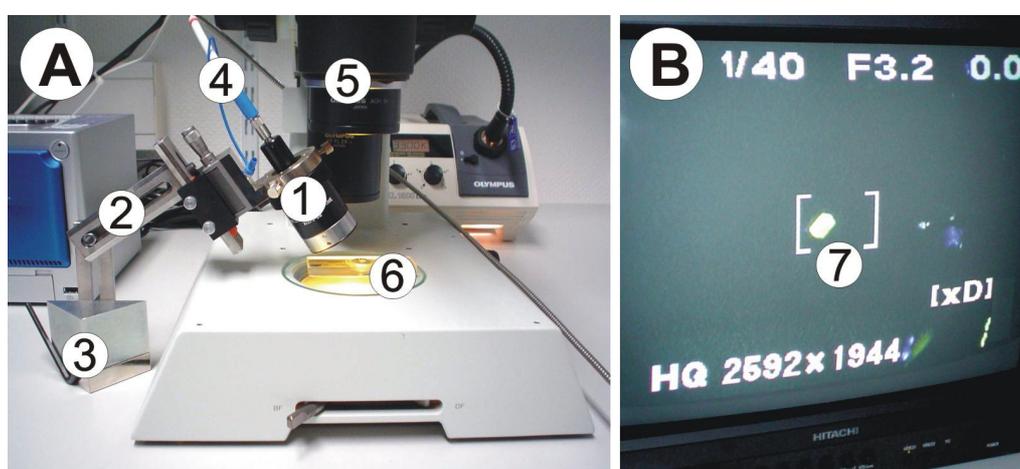


Abbildung 36: (A): Das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer im Einsatz an einem konventionellen Stereo-Mikroskop. Der Proteinkristall (6) befindet sich hier in einem Kristallisationsansatz nach der *batch*-Methode (s. Abbildung 5, D). Das Spiegelobjektiv (1) ist über einen flexiblen Arm (2) mit der magnetischen Halterung (3) verbunden. Da keine metallische Oberfläche zur Anbringung der Halterung zur Verfügung stand, wurde der Magnet der Halterung durch einen zweiten Magneten unter der Tischplatte in Position gehalten. Fluoreszenzanregung, Reaktionsinitiierung und Signaldetektion erfolgten durch die mit dem Spiegelobjektiv verbundene optische Faser in Ψ -Anordnung (4). Die Fokussierung des Objektivs und eine homogene Belichtung des Kristalls konnten mit Hilfe eines Stereo-Mikroskops mit angebrachter Digitalkamera (5) überprüft werden. (B): Ein Kristall von p21(mod)•R-caged GTP (7), welcher durch das FLUMIX-Spektrometer mit blauem Licht (441,6 nm) bestrahlt wurde, wurde über die Digital-Kamera am Stereo-Mikroskop beobachtet. Das Anregungslicht wurde durch einen optischen Filter (Schott, GG-455) abgetrennt. Wie an der homogenen Fluoreszenzemission zu erkennen ist, wurde der Kristall gleichmäßig belichtet.

Das Objektiv wurde so positioniert, dass der Kristall bestrahlt wurde, was sich mit Hilfe eines konventionellen Stereo-Mikroskops überprüfen ließ. Die Fein-Fokussierung konnte dann durch Maximierung des detektierten Fluoreszenz-Signals erfolgen. Dabei konnte durch visuelle Kontrolle mit einem Stereo-Mikroskop eine homogene Anregung des Kristalls verifiziert werden. Für Licht-Intensitäten, die für eine direkte Beobachtung zu hoch waren,

war eine Digitalkamera mit dem Mikroskop verbunden. Über einen an die Kamera angeschlossenen Monitor konnte der Kristall so auch indirekt inspiziert werden (s. Abbildung 36, B).

5.2.10.2 Kombination des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers mit einem Labor-Röntgendiffraktometer

Für Fluoreszenzmessungen in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten musste das Spiegelobjektiv über die magnetische Halterung an einem Röntgen-Diffraktometer angebracht werden, ohne dass sich die Komponenten der beiden Geräte gegenseitig behinderten (s. Kapitel 1.2). Eine mögliche Orientierung an einem Xcalibur PX Ultra Röntngengenerator (Oxford Diffraction, Oxford, England) ist in Abbildung 37 dargestellt.

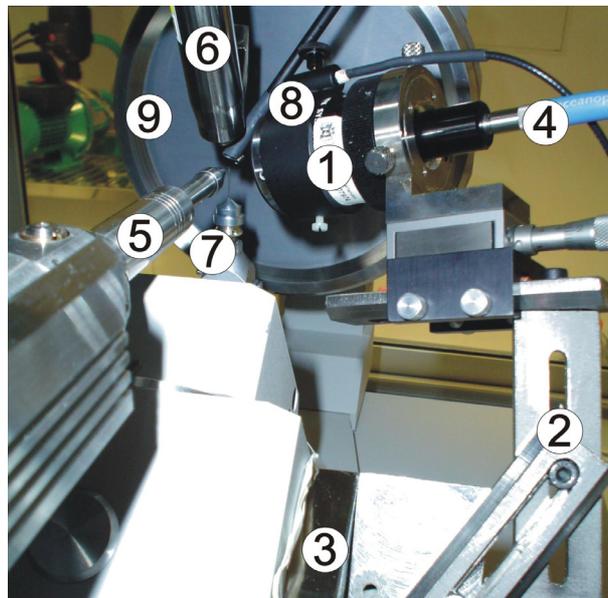


Abbildung 37: Das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer in Kombination mit einer Labor-Röntgenquelle (Xcalibur PX Ultra, Oxford Diffraction, Oxford, England). (1): Spiegelobjektiv; (2): flexibler Arm der magnetischen Halterung (3); (4): optische Faser; (5): Röntgen-Kollimator; (6):Zuführung eines kalten Gas-Stroms für Experimente unter Kryobedingungen; (7): Goniometerkopf mit montiertem Proteinkristall; (8): Zuführung eines feuchten Gasstroms für Experimente bei Raumtemperatur; (9): CCD-Detektor des Röntgen-Diffraktometers.

Mit einer solchen Anordnung ist es möglich, einen kompletten Datensatz von Kristallen mit ausreichend hoher Symmetrie aufzunehmen, ohne dabei die Orientierung des Kristalls relativ zum Objektiv des Fluoreszenzspektrometers zu verändern. Das ist beispielsweise dann wichtig, wenn Fluoreszenzänderungen während der Messung eines

röntgenographischen Datensatzes verfolgt werden sollen. Für ein solches Experiment muss die Rotation des Kristalls über die Omega-Achse des Kappa-Diffraktometers erfolgen. Man kann auf diese Weise einen Winkelbereich von bis zu 90° untersuchen, bevor das Spiegelobjektiv mit dem Röntgen-Detektor kollidiert.

Die Experimente konnten an gefrorenen Kristallen unter Verwendung der Tieftemperatur-Einrichtung (Cryojet) des Xcalibur-Systems durchgeführt werden. Für Messungen bei Raumtemperatur wurde der Kristall in einem feuchten Gasstrom stabil gehalten, der von einem DG-1 Luftfeuchteconditionierer erzeugt wurde (s. Kapitel 5.2.8).

5.2.10.3 Kombination des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers mit einer Synchrotron-Strahlquelle

Die Anbringung des Spiegelobjektivs wurde an drei verschiedenen Synchrotron-Messstationen getestet (ID14-2 und ID14-3 am ESRF, Grenoble, Frankreich; PX-I am SLS, PSI Villigen, Schweiz). In allen drei Fällen konnte das Objektiv ohne Modifikation der entwickelten Halterung montiert und auf einen Proteinkristall fokussiert werden (s. Abbildung 38).

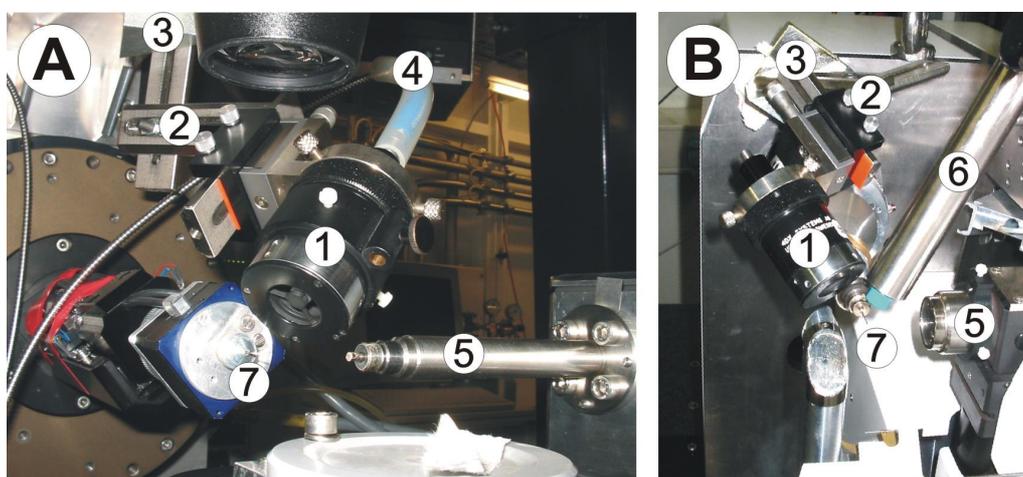


Abbildung 38: Das FLUMIX-Spektrometer in Kombination mit Synchrotron-Messstationen. (A): Messstation PX-I, SLS, PSI Villigen, Schweiz; (B): Messstation ID14-2, ESRF, Grenoble, Frankreich. (1): Spiegelobjektiv; (2): flexibler Arm der magnetischen Halterung (3); (4): optische Faser; (5): Röntgen-Kollimator; (6): Zuführung eines kalten Gasstroms für Experimente unter Kryo-Bedingungen; (7): Goniometerkopf mit montiertem Proteinkristall.

Durch kleine Modifikationen an der Orientierung der Komponenten konnte entweder ein feuchter Gasstrom für die Kristallmanipulation bei Raumtemperatur, oder ein kalter Stickstoff-Strom für Messungen an gefrorenen Kristallen verwendet werden.

5.2.11 Spezifikationen des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers

Als Referenz-Substanz zum Vergleich der verschiedenen Spektrometer-Konfigurationen wurden 0,3 mM di-Natrium-Fluorescein in 40 % Glycerin bei 170 K in einer Nylon-Schleife ($\varnothing = 0,4\text{-}0,5$ mm) analysiert. Bourgeois *et al.* (2002) verwendeten ähnliche Bedingungen für Test-Messungen mit einem Mikrospektrophotometer für Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinkristallen in herkömmlicher 90°-Orientierung. Da die von Bourgeois *et al.* (2002) verwendeten Komponenten wie Spiegelobjektive, optische Fasern und CCD-Detektor annähernd identisch mit den in dieser Arbeit verwendeten Komponenten waren, erschien dieses Spektrometer als das geeignetste System zum Vergleich der erhaltenen Spektren-Qualität und Signalintensität. Da die unterschiedlichen verwendeten Laser-Wellenlängen und andere Parameter wie Probengröße und die Orientierung der Probe einen signifikanten Einfluss auf die gemessene Signal-Intensität haben, kann dieser Vergleich jedoch nur qualitativer Natur sein. Auch bezüglich der Eigenschaften der untersuchten Probenlösung gab es einige Unterschiede: Bourgeois *et al.* (2002) beobachteten für die untersuchte 0,3 mM Fluorescein-Lösung in 40% Glycerin ein Absorptionsmaximum bei 490 nm. Aufgrund von Löslichkeits-Problemen mit reinem Fluorescein wurde in dieser Arbeit das di-Natrium-Salz verwendet. Ein Absorptionsspektrum einer Lösung aus 0,3 mM di-Natrium-Fluorescein in 40 % Glycerin bei Raumtemperatur zeigte jedoch im Gegensatz zu dem von Bourgeois *et al.* (2002) beschriebenen Spektrenverlauf einen Doppel-Peak bei 450 nm und 477 nm. Erst bei höheren Konzentrationen an di-Natrium-Fluorescein konnte ein Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 490 nm reproduziert werden (s. Abbildung 39).

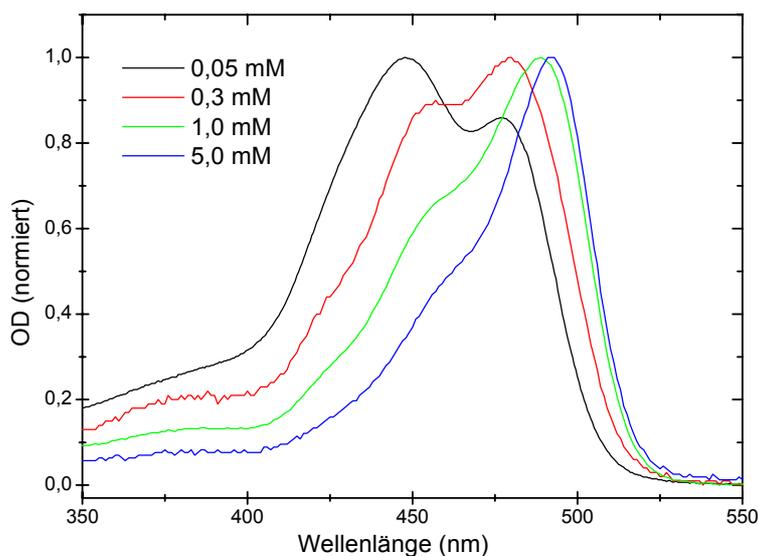


Abbildung 39: Absorptionsspektren unterschiedlich konzentrierter Lösungen von di-Natrium-Fluorescein in 40 % Glycerin ($T = 293$ K). Die Messungen erfolgten mit einem UV/VIS Spektralphotometer Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Schichtdicke der Lösung wurde zwischen zwei im Strahlengang platzierten Deckgläschen so eingestellt, dass eine optische Dichte unter $OD = 1$ am Absorptionsmaximum erreicht wurde. Dazu wurden die beiden Deckgläschen durch Silikonfett auf den gewünschten Abstand eingestellt. Die dargestellten Spektren sind für eine bessere Vergleichbarkeit auf eins normiert.

Die Abweichungen der oben dargestellten Spektren von den Beobachtungen von Bourgeois *et al.* (2002) sind möglicherweise auf die unterschiedliche Temperatur der Spektrenaufnahme, auf die Verwendung von Fluorescein anstelle des di-Natrium-Salzes, oder auf eine Konzentrationserhöhung der von Bourgeois *et al.* (2002) untersuchten Probe durch partielles Austrocknen der Fluorescein-Lösung während der Montage in einer Nylon-Schleife zurückzuführen. Da die für anschließende Fluoreszenzuntersuchungen verwendeten Laserwellenlängen in einem Bereich lagen, wo große Abweichungen zwischen dem oben dargestellten Absorptionsspektrum bei 0,3 mM di-Natrium-Fluorescein und dem von Bourgeois *et al.* (2002) gemessenen Spektrum auftraten, muss auch hier von einem signifikanten Einfluss auf die in den Fluoreszenzuntersuchungen erzielten Signalintensitäten ausgegangen werden.

Ein Vergleich des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers mit der von Bourgeois *et al.* (2002) vorgestellten Spektrometerkonfiguration erschien trotz der beschriebenen experimentellen Unterschiede als sinnvoll. Die mit verschiedenen Spektrometer-Konfigurationen gemessenen Fluoreszenz-Spektren sind in Abbildung 40 dargestellt.

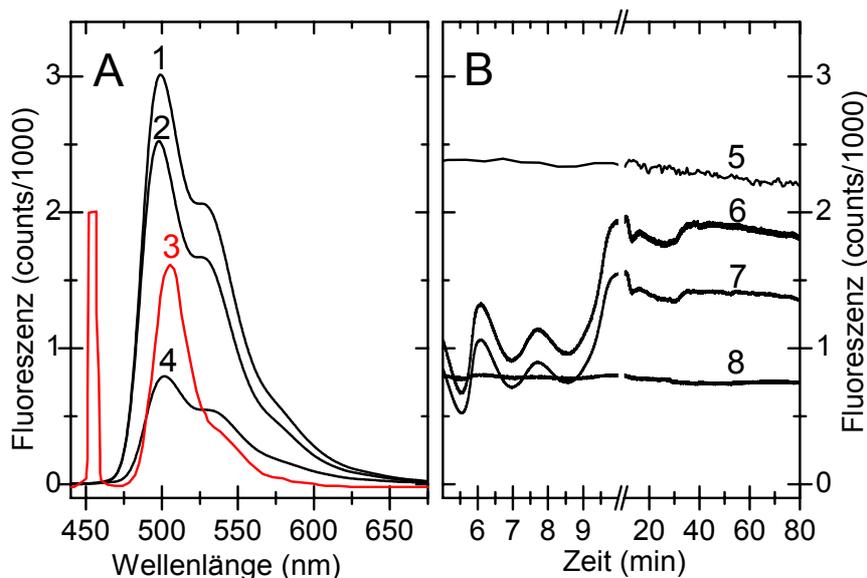


Abbildung 40: Signal-Intensität und Signal-Stabilität einer Fluoreszenzmessung mit verschiedenen Spektrometer-Konfigurationen. (A): Fluoreszenzspektren ($\lambda_{Ex} = 441,6$ nm) von di-Natrium-Fluorescein in einer 0,4–0,5 mm Nylon-Schleife (0,3 mM di-Natrium-Fluorescein in 40 % Glycerin, $T = 170$ K). (B): Stabilitätsmessungen an di-Natrium-Fluorescein (5) und an p21(mod)•GDP (7), sowie Korrektur von Signalschwankungen durch Referenzmessungen (6,8). Die einzelnen Spektren bzw. Verläufe sind im Text näher erläutert.

Spektrum 4 in Abbildung 40, A repräsentiert ein Fluoreszenzspektrum, wie es mit der am häufigsten verwendeten Konfiguration des FLUMIX-Spektrometers gemäß Abbildung 32 aufgezeichnet wurde. Die Integrationszeit betrug 20 ms, und die Lichtintensität vor der Probe wurde mit etwa 1 mW (441,6 nm) gemessen. Zum Vergleich ist ein bei gleicher Integrationszeit gemessenes Fluoreszenzspektrum aus der Arbeit von Bourgeois *et al.* (2002) dargestellt (Spektrum 3). Wie zu erkennen ist, konnte mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer trotz einer deutlich geringeren Anregungsenergie ein vergleichbares Fluoreszenzsignal detektiert werden. Durch kleine Modifikationen an der Spektrometer-Konfiguration konnte die Signal-Intensität sogar noch um einen Faktor von 15 erhöht werden: Spektrum 1 wurde mit der kürzesten für den Detektor einstellbaren Integrationszeit von 5 ms aufgezeichnet, wobei beide Anregungs-Lichtwege gemäß Abbildung 32 für eine Fluoreszenzanregung mit blauem Licht genutzt wurden. Es resultierte eine Lichtintensität vor der Probe von etwa 2 mW. Die Referenz-Küvette wurde gemäß Abbildung 32 im Strahlengang belassen, jedoch wurde das Referenzsignal nicht aufgezeichnet. Stattdessen wurde der vom Spiegelobjektiv kommende Detektions-Lichtweg über eine ungeteilte optische Faser (400 μ m Durchmesser) direkt mit dem Detektor verbunden, wodurch die Übertragung des Fluoreszenzsignals zum Detektor deutlich

verbessert wurde. Eine solche Anordnung wäre für Experimente zu bevorzugen, in denen nur eine Anregungswellenlänge benötigt wird und in denen eine Referenzmessung nicht nötig ist oder über einen zweiten Detektor-Kanal erfolgen kann. Aus Spektrum 1 ergibt sich eine Detektor-Sättigung (4000 counts) innerhalb von weniger als 7 ms.

Spektrum 2 in Abbildung 40 zeigt das Fluoreszenzsignal bei direkter Verbindung der Ψ -Faseranordnung mit dem Spiegelobjektiv und ansonsten gegenüber Spektrum 1 unveränderter Gesamtanordnung. Interessanterweise führte die Einführung einer zusätzlichen 400 μm -Faser zwischen der die verschiedenen Lichtwege zusammenführenden Ψ -Faseranordnung und dem Spiegelobjektiv zu einer leicht erhöhten Signalintensität des detektierten Fluoreszenzsignals (Spektrum 1), obwohl die ins Objektiv eintretende Lichtintensität aufgrund des zusätzlichen Faserübergangs von etwa 3 mW auf 2 mW reduziert wurde. Es kann geschlussfolgert werden, dass der Vorteil eines identischen Brennpunktes für die anregenden und detektierenden Lichtwege die erhöhten Verluste am zusätzlichen Faserübergang überkompensiert. Aufgrund der reduzierten Photonen-Dichte und der homogeneren Proben-Belichtung durch einen größeren Brennpunkt ist diese Anordnung für die meisten Experimente an Protein-Einkristallen zu bevorzugen.

Stabilitätsmessungen an di-Natrium-Fluorescein ($\lambda_{Em} = 513 \text{ nm}$) zeigten eine rms-Abweichung von 0,68 % und einen linearen Signal-Abfall von 6,0 % / Stunde (Abbildung 40, B, Spektrum 5). Dazu wurde in einem Aufbau gemäß Abbildung 32 mit dem He-Cd-Laser bei 441,6 nm angeregt. Der Laser wurde dafür einige Stunden vor dem Experiment angeschaltet, um während der Aufwärm-Phase auftretende Signalschwankungen zu vermeiden.

Während der ersten 15-30 Minuten nach Einsschalten des He-Cd-Lasers traten starke Schwankungen in der emittierten Lichtintensität auf, welche durch Referenz-Messungen gemäß Kapitel 5.2.4 korrigiert werden konnten. In Abbildung 40, B sind das unkorrigierte Fluoreszenzsignal einer Probe von p21(mod)•GDP in einer Nylon-Schleife (Spektrum 7, $\lambda_{Em} = 540 \text{ nm}$, $T = 100 \text{ K}$) sowie ein Referenzsignal von einer 0,1 mM Lösung von Diethylaminocoumarin-3-carboxylsäure-succinimidylester (Molecular Probes, Oregon, USA) in DMSO dargestellt (Spektrum 6 (multipliziert mit Faktor 10), $\lambda_{Em} = 470 \text{ nm}$). Durch Division der beiden Spektren erhält man ein bezüglich Schwankungen der Lichtintensität korrigiertes Spektrum 8 (Spektrum 8 = 2000•Spektrum 7 / Spektrum 6). Spektrum 8 zeigt eine rms-Abweichung von etwa 1,0 % innerhalb der ersten 5 Minuten, in denen die

stärksten Signalschwankungen stattfanden, und etwa 0,75 % nach Stabilisierung des Lasers. Wie man erkennt, können Schwankungen in der Lichtintensität gut durch die gewählte Referenz-Strategie gemäß Kapitel 5.2.4 korrigiert werden.

5.3 FLUMIX-Analysen an p21(mod)

5.3.1 FLUMIX-Experimente an p21(mod) in wässriger Lösung

Die Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften von p21(mod)•R-caged GTP in wässriger Lösung während und nach der Photolyse von R-caged GTP wurden durch FLUMIX-Experimente an einer Proteinlösung im hängenden Tropfen analysiert. Die Photolyse von R-caged GTP erfolgte in einem Tropfen aus einer Lösung von 13,35 mg/ml p21(mod)•R-caged GTP in X-Puffer ($T = 21\text{ °C}$) durch Bestrahlung mit UV-Licht (325 nm, $\sim 3\text{ mW}$). Es resultierte ein Fluoreszenzabfall um einen Faktor von 1,8. Während der daraufhin stattfindenden GTP-Hydrolyse wurde ein weiterer Fluoreszenzabfall um etwa 20 % beobachtet (s. Abbildung 41).

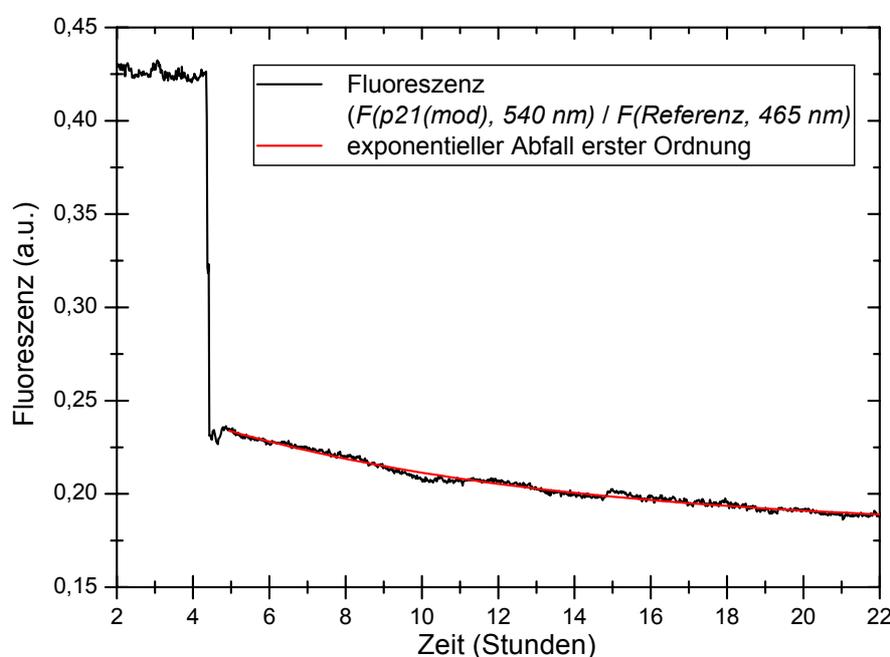


Abbildung 41: Fluoreszenzänderungen während und nach der Photolyse von caged GTP in einem Tropfen aus p21(mod)•R-caged GTP. Das Fluoreszenzsignal wurde durch eine Referenzmessung an einer Lösung aus 0,1 mM 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylsäure-succinimidyl-ester (Molecular Probes, Oregon, USA) in DMSO normiert (s. Kapitel 5.2.4).

Für die Fluoreszenz-Messung wurde über einen Zeitraum von etwa 18 Stunden jede Minute ein Fluoreszenzspektrum mit 400 ms Integrationszeit bei einer Lichtintensität von $I(441,7\text{ nm}) = 0,3\text{ mW}$ aufgenommen und der Lichtweg zur Probe für den Rest der Zeit unterbrochen. Auf diese Weise konnte ein Fluoreszenzabfall durch Fluoreszenz-Bleichung weitestgehend ausgeschlossen werden. Signalschwankungen der Lichtquelle wurden durch

eine Referenzmessung an einer Lösung aus 0,1 mM 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylsäure-succinimidyl-ester (Molecular Probes, Oregon, USA) in DMSO (s. Kapitel 5.2.4) korrigiert.

Der Fluoreszenzabfall aufgrund der GTP-Hydrolyse durch p21(mod) lässt sich durch einen exponentiellen Abfall erster Ordnung beschreiben. Es ergab sich eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 384 \pm 7$ min, was gut mit der durch HPLC-Analysen bestimmten Halbwertszeit der GTP-Hydrolyse von $t_{1/2} = 430 \pm 18$ min übereinstimmt (s. Kapitel 5.1.6.3).

Die deutlich erniedrigte GTPase-Aktivität des modifizierten Proteins im Vergleich zum Wildtyp mit $t_{1/2} = 18,7$ min bei 37 °C (John *et al.*, 1989) kann nur durch den an Cys-32 gekoppelten Fluorophor hervorgerufen werden. Es ist bekannt, dass die Schalter-Region I von H-Ras p21 verschiedene Konformationen annehmen kann. Es ist deshalb anzunehmen, dass in der modifizierten Form des Proteins Konformationen bevorzugt werden, welche für eine GTP-Hydrolyse nicht optimal sind. Dies hatte jedoch auf die an p21(mod) durchgeführten FLUMIX-Experimente keinen negativen Einfluss und konnte sogar die homogene Akkumulation einer intermediären GTP-gebundenen Form p21(mod)•GTP deutlich erleichtern.

5.3.2 Eigenschaften von kristallinem p21(mod)

5.3.2.1 Photolyse von *caged* GTP und GTP-Hydrolyse im kristallinen Zustand

Für p21(mod)-Kristalle, in denen GTP durch Photolyse von R-*caged* GTP freigesetzt wurde („p21(mod)•R-*caged* GTP → GTP“), wurde mittels HPLC die Hydrolyserate von GTP zu GDP bei Raumtemperatur auf etwa $t_{1/2} \sim 462$ min bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Hydrolyse läuft somit im kristallinen Protein nur unwesentlich langsamer ab als in wässriger Lösung (s. Kapitel 5.3.1). Im Gegensatz zur Photolyse in wässriger Lösung wird durch die Photolyse von *caged* GTP in kristallinem p21(mod) ein starker Fluoreszenzanstieg hervorgerufen. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Unterschied kann aus der Kristallstruktur von p21(mod)•R-*caged* GTP abgeleitet werden: Die 2-NPE- (*cage*-) Gruppe von *caged* GTP und der NBD-Fluorophor bilden eine starke Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkung mit zwei Resten eines Nachbarmoleküls (Tyr-64, Arg-102) aus (s. Abbildungen 49 und 54). Diese Stapel-Wechselwirkung kann sich nach Abspaltung der 2-NPE- (*cage*-) Gruppe durch Photolyse von *caged* GTP nicht mehr ausbilden. Dadurch

nimmt für den Fluorophor die Wahrscheinlichkeit für eine Relaxation durch strahlungslose Deaktivierungsprozesse ab, und somit erhöht sich die Fluoreszenz-Quantenausbeute.

5.3.2.2 Kristall-Analysen durch FLUMIX-Experimente und HPLC

Die direkte Messung von Fluoreszenz-Änderungen nach der Photolyse von *caged* GTP in p21(mod)-Kristallen kann komplementäre Informationen zu anderen Methoden wie beispielsweise HPLC liefern. HPLC-Analysen an Proteinkristallen, von denen bereits ein röntgenographischer Datensatz aufgenommen wurde, können zu fehlerhaften Interpretationen führen. So zeigten HPLC-Untersuchungen an Kristallen von p21(mod)•R-*caged* GTP, von denen bei 100 K ein röntgenographischer Datensatz an einer Synchrotron-Strahlquelle aufgenommen wurde, fast vollständige Photolyse von *caged* GTP. Dies wurde selbst dann beobachtet, wenn der Kristall nie mit UV-Licht bestrahlt wurde. Interessanterweise zeigte die Kristallstruktur dieser Kristalle im Widerspruch zu den HPLC-Resultaten eine gut definierte Elektronendichte für unphotolysiertes *caged* GTP (s. Kapitel 5.5.3, Abbildung 49). HPLC-Experimente an vergleichbaren Kristallen, die nicht zuvor mit Röntgenstrahlung untersucht wurden, zeigten keine Anzeichen von photolysiertem *caged* GTP. Es kann geschlussfolgert werden, dass durch die hohe Intensität moderner Synchrotron-Röntgenquellen eine Radiolyse von *caged* GTP in Kristallen aus p21(mod)•R-*caged* GTP selbst bei 100 K stattfinden kann. Obwohl die kovalente Bindung zwischen der 2-NPE-Gruppe und GTP durch die Radiolyse aufgebrochen wird, können die Reaktionsprodukte bei 100 K nicht im Kristall diffundieren und verbleiben somit an ihrer ursprünglichen Position. Die Kristallstruktur zeigt deshalb für das Nukleotid eine nicht von unphotolysiertem *caged* GTP zu unterscheidende Struktur. Hier zeigt sich ein großer Vorteil von FLUMIX-Fluoreszenzexperimenten: Da Fluoreszenzänderungen im untersuchten Protein p21(mod) nicht direkt durch die photochemische Spaltung von *caged* GTP, sondern durch damit verknüpfte Konformationsänderungen im Protein hervorgerufen werden, können durch FLUMIX-Analysen komplementäre Informationen zu HPLC-Analysen gewonnen werden. Während durch HPLC die Photolysereaktion selbst untersucht wird, können durch Fluoreszenzmessungen Konformationsänderungen im Protein analysiert werden, die mit der Photolyse von *caged* GTP einhergehen, und somit detailliertere Informationen über den Kristall-Zustand erhalten werden.

5.3.2.3 FLUMIX-Spektroskopie zur Qualitätskontrolle bei der Herstellung intermediärer Kristall-Zustände

Um Kristalle von p21(mod) im intermediären GTP-gebundenen Zustand zu erhalten, wurden verschiedene unter identischen Bedingungen hergestellte Kristalle von p21(mod)•R-caged GTP mit vergleichbarer Größe und Form durch Bestrahlung mit UV-Licht (325 nm) bei Raumtemperatur photolysiert. Während der Photolyse wurde der Kristall-Zustand anhand der Fluoreszenzänderungen bei 560 nm verfolgt ($\lambda_{Ex} = 441,6$ nm). Wie anhand von HPLC-Analysen an photolysierten, aufgelösten Kristallen bestätigt werden konnte, kann von einer vollständigen Photolyse von caged GTP ausgegangen werden, wenn keine weiteren Fluoreszenzänderungen bei Bestrahlung mit UV-Licht mehr beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigten Kristalle, die in einem Kristallisationsansatz nach der Methode des hängenden Tropfens photolysiert wurden, einen deutlich höheren Fluoreszenzanstieg als Kristalle, die während der Photolyse durch einen feuchten Gasstrom in einer Nylon-Schleife stabilisiert wurden (s. Abbildung 42).

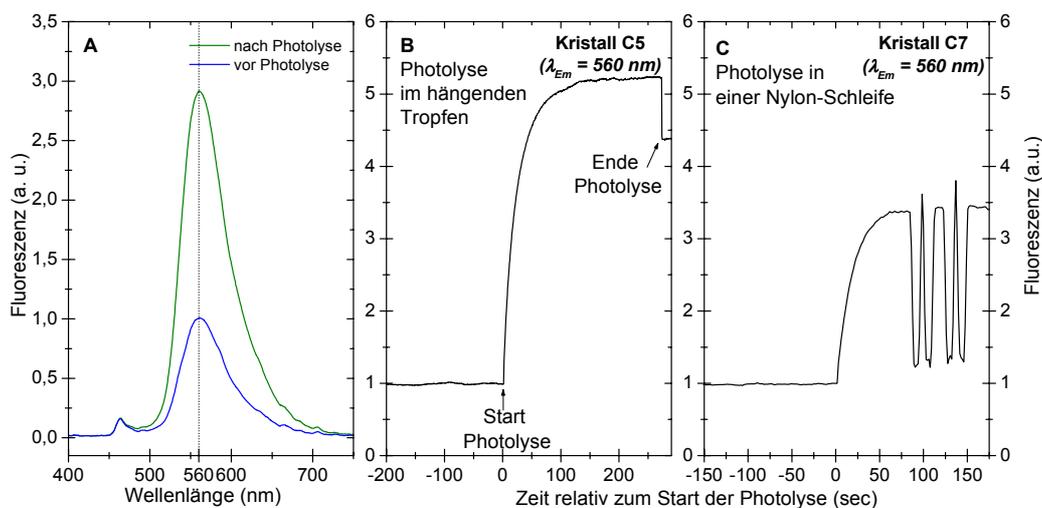


Abbildung 42: (A): Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{Ex} = 442$ nm) eines Kristalls von p21(mod)•R-caged GTP vor bzw. nach Photolyse von caged GTP durch UV-Licht ($\lambda_{Photolyse} = 325$ nm); (B,C): Fluoreszenzanstieg während der Photolyse von caged GTP im Kristall C5 (B) und C7 (C) ($\lambda_{Ex} = 441,6$ nm, $\lambda_{Em} = 560$ nm). Die Fluoreszenzschwankungen von Kristall C7 (80-150 Sekunden nach Photolyse) sind auf eine 720°-Drehung des Kristalls relativ zum Objektiv des Spektrometers zurückzuführen, wodurch eine homogenere Belichtung des gesamten Kristallvolumens sichergestellt werden sollte.

Der in Abbildung 42 zu erkennende Trend, dass im hängenden Tropfen belichtete Kristalle einen stärkeren Fluoreszenzanstieg zeigen als Kristalle welche in einer Nylon-Schleife photolysiert wurden, konnte anhand mehrerer Kristalle bestätigt werden. Vergleichbare

Kristalle aus demselben Kristallisationsansatz zeigten einen Fluoreszenzanstieg um einen Faktor von 4,9, 5,2 und 5,4 für die Photolyse im hängenden Tropfen, und um einen Faktor von 2,8 und 3,4 für Photolyse in einer Nylon-Schleife. Ein Vergleich der von Kristallen C5 und C7 gemessenen Röntgen-Diffraktionsdaten zeigte deutliche Unterschiede in der Elektronendichte um die γ -Phosphatgruppe des Nukleotids (s. Abbildung 43).

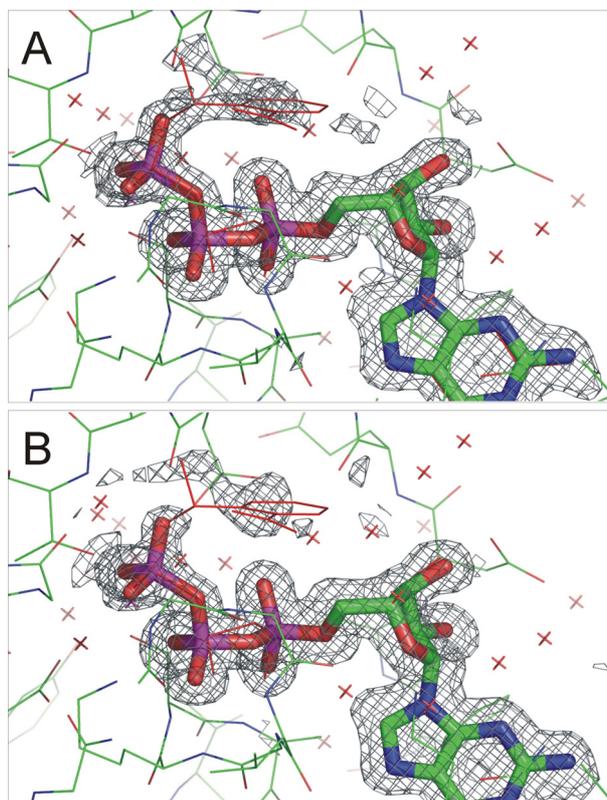


Abbildung 43: Die Umgebung des Nukleotids in Kristallen von p21(mod)•R-caged GTP → GTP. (A): Strukturdarstellung von Kristall C7, welcher in einer Nylon-Schleife photolysiert wurde. (B): Strukturdarstellung von Kristall C5, welcher in hängenden Tropfen photolysiert wurde. Für beide Kristalle wurde die Vollständigkeit der Photolyse von caged GTP durch HPLC verifiziert. Das durch HPLC nachgewiesene Nukleotid GTP ist in Stäbchen-Darstellung gezeigt. Die roten Linien stellen die ursprüngliche Position von R-caged GTP dar. Die dargestellte F_o-F_c Elektronendichtekarte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet (2σ cutoff-level, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)). Das Nukleotid wurde für die Strukturverfeinerung und für die Berechnung der Elektronendichtekarte aus dem Strukturmodell entfernt.

Der in einer Nylon-Schleife photolysierte Kristall C7 zeigte eine deutlich sichtbare Elektronendichte an der Position, an welcher sich vor der Photolyse die 2-NPE- (cage-) Gruppe des Nukleotids befand (Abbildung 43, A). Im Gegensatz dazu zeigte der im hängenden Tropfen belichtete Kristall C5 praktisch keine Rest-Elektronendichte in diesem Bereich (Abbildung 43, B). Der Faktor des Fluoreszenz-Anstiegs nach der Photolyse von

caged GTP in p21(mod)-Kristallen ist gemäß dieser Ergebnisse mit der Qualität des erreichten intermediären Zustands p21(mod)•R-*caged* GTP→GTP korreliert. Ein Grund für die beobachteten Unterschiede liegt vermutlich in unterschiedlichen Volumina der die Kristalle umgebenden Reservoirösungen: Während die Kristalle im hängenden Tropfen von etwa 2 µl Mutterlauge umgeben waren, wurden die Kristalle in einer Nylon-Schleife nur mit einer minimalen Menge an umgebender Mutterlauge montiert. Die Diffusion der Reaktionsprodukte der *caged* GTP-Photolyse ist demzufolge in den Kristallen in einer Nylon-Schleife stark eingeschränkt, und das freigesetzte 2-Nitrosoacetophenon verbleibt zum großen Teil in der Nähe seiner ursprünglichen Position. Zusätzlich können Effekte wie ein reduzierter Feuchtigkeitsgehalt im Kristall aufgrund von durch den Luftfeuchteconditionierer eingestellter geringer relativer Luftfeuchtigkeits-Werte („Schrumpfen“ der Kristalle) einen starken Einfluss auf die Diffusion des 2-Nitrosoacetophenons und auf die allgemeine Beweglichkeit des Proteins im Kristall haben. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass FLUMIX-Fluoreszenzspektroskopie eine effiziente, zerstörungsfreie Methode darstellt, um in der kinetischen Kristallographie detaillierte Informationen über den Zustand eines makromolekularen Kristalls zu erhalten.

5.3.2.4 Herkunft der Fluoreszenzänderungen nach Photolyse von p21(mod)•R-*caged* GTP-Kristallen

Um zu überprüfen, ob die starken Fluoreszenzänderungen während der Photolyse von *caged* GTP hauptsächlich durch Konformationsänderungen im Kristall, und nicht bereits durch die photolytische Bildung einer Nitronsäure (s. Abbildung 50, 2; (Corrie *et al.*, 2003)), hervorgerufen wurden, wurden Kristalle von p21(mod)•R-*caged* GTP nach einer kurzen Belichtung mit UV-Licht (325 nm) bei verschiedenen Temperaturen analysiert (s. Abbildung 44).

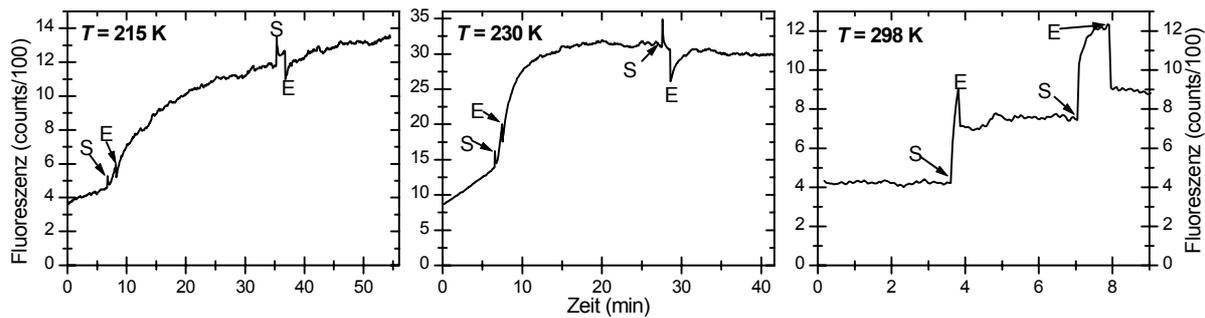


Abbildung 44: Photolyse von Kristallen von p21(mod)•R-caged GTP bei verschiedenen Temperaturen. Die Fluoreszenz-Anregung erfolgte durch blaues Licht ($\lambda_{Ex} = 441,6 \text{ nm}$) eines He-Cd-Lasers. Der Start der Photolyse ($\lambda_{Photolyse} = 325 \text{ nm}$) ist in den Diagrammen mit 'S' markiert und das Ende der Photolyse (Unterbrechen des UV-Lichtwegs) mit 'E'. Der Drift der Basislinien bei 215 K und 230 K ist auf eine langsame Abnahme der Kristallqualität bei diesen Temperaturen zurückzuführen, was zu einer erhöhten Flexibilität des Fluorophors und somit zu einer erhöhten Fluoreszenz-Quantenausbeute führt. Die Abnahme der Kristall-Ordnung wurde auch durch die Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsbildern während des Experiments an einer Labor-Röntgenquelle (Xcalibur PX Ultra, Oxford Diffraction, Oxford, England) bestätigt.

Während bei Raumtemperatur kein weiterer Fluoreszenzanstieg nach dem Ausschalten des UV-Lichts zu erkennen war, konnte bei niedrigeren Temperaturen ein anhaltender Fluoreszenzanstieg nach UV-Belichtung beobachtet werden. Die Fluoreszenzänderungen bei niedrigeren Temperaturen im Zeitbereich von mehreren Sekunden bis Minuten können entweder auf Dunkel-Reaktionen nach der Photolyse von caged GTP, die zu einer Spaltung in GTP und 2-Nitrosoacetophenon resultieren, und/oder auf Konformationsänderungen in der Protein-Umgebung des Nukleotids zurückzuführen sein. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Fluoreszenzänderungen ausschließlich auf die photolytische Bildung einer Nitronsäure zurückzuführen sind, da dies im Sub-Millisekunden Bereich stattfinden würde (Corrie *et al.*, 2003) und somit durch FLUMIX-Experimente zeitlich nicht aufgelöst werden könnte.

Interessanterweise nahm die Photolyse-Effizienz bei Bestrahlung durch UV-Licht mit der Temperatur stark ab. Bei 100 K konnte selbst nach 100-minütiger UV-Belichtung keine vollständige Photolyse erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Unter Kryo-Bedingungen könnte insofern die durch Röntgenstrahlung induzierte Radiolyse von Verbindungen mit photolabiler Schutzgruppe eine alternative Methode zur Initiierung von schnellen enzymatischen Reaktionen darstellen (Ursby *et al.*, 2002), worauf im nächsten Kapitel näher eingegangen werden soll (s. Kapitel 5.3.3).

5.3.3 Einfluss von Synchrotron-Röntgenstrahlung auf Kristalle des fluoreszenten H-Ras p21

Durch Synchrotron-Röntgenstrahlung können signifikante Veränderungen in einem Proteinkristall hervorgerufen werden, wie z.B. durch die Zerstörung der Kristall-Qualität (Strahlschaden) (Nave und Garman, 2005) oder durch Radiolyse von Verbindungen mit photolabiler Schutzgruppe (Schlichting und Goody, 1997; Ursby *et al.*, 2002).

Enzymatische Reaktionen in einem Proteinkristall werden bei ausreichend niedrigen Temperaturen weitestgehend eingefroren. Es wurde deshalb vorgeschlagen, die Radiolyse von Verbindungen mit photolabiler Schutzgruppe als Methode zur Reaktionsinitiierung in Systemen zu verwenden, in denen eine homogene Initiierung bei Raumtemperatur nicht ohne Probleme bewerkstelligt werden kann, beispielsweise aufgrund einer im Vergleich zum Zeitbedarf für die Reaktionsinitiierung hohen Reaktionsgeschwindigkeit (Ursby *et al.*, 2002).

Die gewünschten bzw. unerwünschten Veränderungen durch Röntgen-induzierte Radiolyse von p21(mod)-Kristallen konnten nicht ohne weiteres durch das Röntgen-Diffraktionsexperiment selbst bestimmt werden. Deshalb wurde das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer verwendet, um Veränderungen im Kristall anhand von Fluoreszenzänderungen während einer Röntgen-Bestrahlung bei Raumtemperatur und unter Kryo-Bedingungen zu untersuchen. Das FLUMIX-Spektrometer wurde dazu entsprechend Abbildung 38, A mit der Synchrotron-Messstation PX-I (SLS, PSI Villigen, Schweiz) verbunden.

5.3.3.1 Röntgen-induzierte Veränderungen in p21(mod)-Kristallen bei Raumtemperatur

In einer ersten Reihe von Experimenten wurde die Röntgen-induzierte Radiolyse von *caged* GTP in Kristallen von p21(mod) bei 302,5 K untersucht (s. Abbildung 45). Die Röntgen-Bestrahlung wurde an der Synchrotron-Messstation PX-I (SLS, PSI Villigen, Schweiz) durchgeführt.

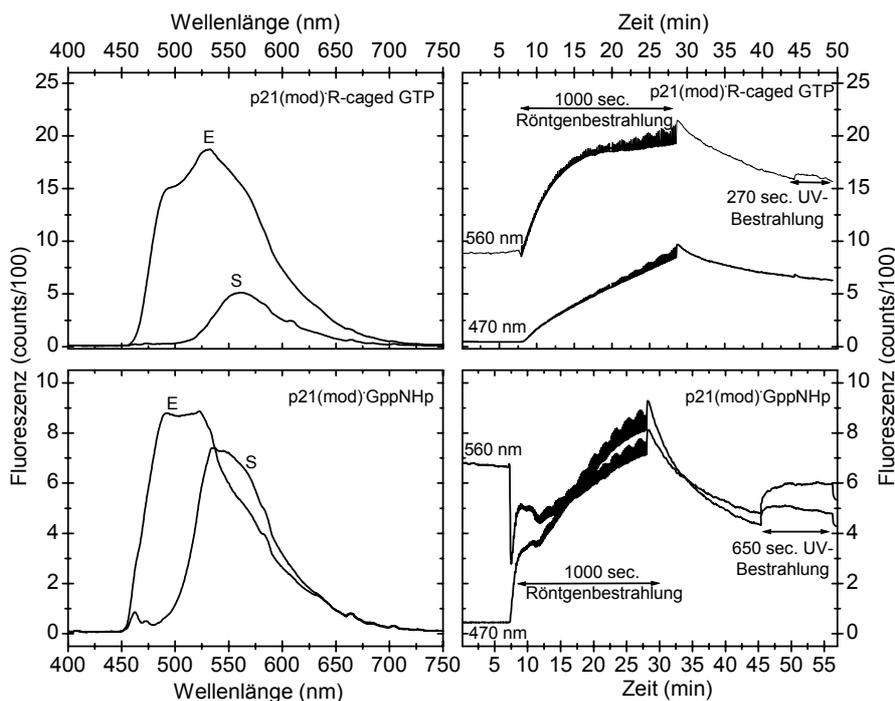


Abbildung 45: Effekt der Bestrahlung von p21(mod)-Kristallen mit Synchrotron-Röntgenstrahlung ($\lambda = 0,919 \text{ \AA}$) bei 302,5 K. In den linken Diagrammen sind Fluoreszenz-Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 441,6 \text{ nm}$) vor (S) und nach (E) Röntgenbestrahlung gezeigt. Die zugehörigen zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzänderungen bei zwei charakteristischen Emissions-Wellenlängen sind in den rechten Diagrammen dargestellt. Die Kristalle wurden in 0,05-0,1 mm Nylon-Schleifen montiert und in einem Stickstoffstrom mit 97,5 % relativer Luftfeuchtigkeit stabilisiert. Während der Röntgen-Bestrahlung wurden kontinuierlich Diffraktionsbilder aufgezeichnet, wobei der Kristall für jedes Bild ausgehend vom selben φ -Winkel um $0,1^\circ$ rotiert wurde. Während der Auslesezeit der Diffraktionsbilder ($\sim 2,5 \text{ s / Bild}$) wurde der Strahlengang zum Kristall unterbrochen. In den Zeitverläufen sind die aufsummierten Belichtungszeiten markiert. Die Intensität der Röntgenstrahlung lag bei $4 \cdot 10^{10}$ Photonen / s. Nach der Röntgenbestrahlung wurde mit UV-Licht ($\lambda = 325 \text{ nm}$) mit einer Intensität von $\sim 0,1 \text{ mW}$ bestrahlt.

Bei der Röntgen-Bestrahlung von Kristallen aus p21(mod)•R-*caged* GTP wurde ein monoexponentieller Fluoreszenz-Anstieg mit einer Halbwerts-Zeit von $t_{1/2} = 138,5 \pm 2,1 \text{ s}$ beobachtet (korrigiert mit der Auslesezeit, während welcher der Röntgen-Strahl unterbrochen war). Eine Bestrahlung mit UV-Licht nach der Röntgenbestrahlung zeigte

keinen weiteren Fluoreszenzanstieg, was auf eine vollständige Radiolyse von *caged* GTP hindeutet. Als Negativ-Kontrolle wurde das Experiment mit Kristallen aus p21(mod)•GppNHp wiederholt. Wie erwartet, zeigten diese Kristalle während einer Röntgen-Bestrahlung aufgrund des nicht photolysierbaren Nukleotid-Analogons keinen signifikanten Fluoreszenzanstieg. Es muss hier beachtet werden, dass die Fluktuationen im Fluoreszenzsignal bei $\lambda_{Em} = 560$ nm auf die Akkumulation von Spezies mit blauverschobenem Fluoreszenzmaximum zurückzuführen sind. Die integrierte Fluoreszenzintensität ändert sich jedoch während der Photolyse von p21(mod)•GppNHp-Kristallen nur geringfügig, im Gegensatz zur Photolyse von p21(mod)•R-*caged* GTP-Kristallen (s. Abbildung 45). Es kann geschlussfolgert werden, dass der monoexponentielle Anstieg mit $t_{1/2} = 138,5 \pm 2,1$ s, der in Kristallen aus p21(mod)•R-*caged* GTP beobachtet wurde, auf die radiolytische Spaltung von *caged* GTP und damit verbundene Konformationsänderungen in der Protein-Umgebung des Nukleotids (s. Kapitel 5.3.2) zurückzuführen ist.

Neben der Röntgen-induzierten Radiolyse von *caged* GTP konnten noch weitere Effekte der Röntgen-Bestrahlung beobachtet werden. Während der ersten 10 Sekunden Bestrahlung von Kristallen aus p21(mod)•GppNHp wurde ein starker Fluoreszenz-Abfall bei $\lambda_{Em} = 560$ nm beobachtet, welcher mit der Ausbildung von Spezies mit blau-verschobenem Fluoreszenz-Maximum einherging. Mit zunehmender Akkumulation dieser blauverschobenen Spezies nahm auch das Fluoreszenzsignal bei $\lambda_{Em} = 560$ nm wieder zu, was jedoch hauptsächlich auf einen Beitrag der Schulter der Fluoreszenzbande der blauverschobenen Spezies zurückzuführen war. Kristalle von p21(mod)•GppNHp verloren innerhalb von etwa 20 Sekunden praktisch vollständig ihre Diffraktionsfähigkeit, was zeitlich gut mit dem anfänglichen Fluoreszenzabfall übereinstimmt.

Die Stabilität der Diffraktionsfähigkeit von p21(mod)-Kristallen bei Röntgen-Bestrahlung variierte je nach Nukleotid, mit welchem das Protein kokristallisiert wurde. Kristalle von p21(mod)•R-*caged* GTP zeigten eine deutlich höhere anfängliche Diffraktionsfähigkeit als p21(mod)•GppNHp-Kristalle und verloren ihre Diffraktionsfähigkeit erst innerhalb von etwa 200 Sekunden Röntgen-Bestrahlung. Es kann angenommen werden, dass in Kristallen aus p21(mod)•R-*caged* GTP der Fluoreszenzanstieg aufgrund einer Radiolyse von *caged* GTP einen in diesen Kristallen relativ langsam stattfindenden Fluoreszenz-Abfall aufgrund eines Verlusts der Kristall-Ordnung und damit einhergehenden Veränderungen in der

Umgebung des Fluorophors überkompensiert. Diese Annahme wird durch zwei Beobachtungen untermauert: Zum einen liegt der Fluoreszenzanstieg bei vollständiger Radiolyse von *caged* GTP in p21(mod)•R-*caged* GTP-Kristallen mit einem Faktor von $\sim 2,3$ deutlich unter den Werten, die bei Photolyse mit UV-Licht erreicht wurden (Faktoren von 2,8-5,4), was auf eine geringe Kristall-Qualität des erreichten intermediären GTP-gebundenen Zustands hindeutet (s. Kapitel 5.3.2.3). Außerdem wurde eine zeitliche Verzögerung von etwa 20 Sekunden zwischen dem Start der Röntgen-Belichtung und dem Beginn des Fluoreszenz-Anstiegs beobachtet. Diese Verzögerung könnte durch die konkurrierenden Einflüsse einer Fluoreszenzabnahme durch Verlust der Kristallordnung und einem Fluoreszenzanstieg durch *caged* GTP-Radiolyse hervorgerufen werden. Die Ausbildung einer Spezies mit blau-verschobenem Fluoreszenz-Emissionsmaximum durch Röntgen-Bestrahlung wurde auch in Kristallen von p21(mod)•R-*caged* GTP beobachtet. Die Ausbildung dieser Spezies erfolgte jedoch deutlich langsamer als in p21(mod)•GppNHp-Kristallen, was konsistent war mit der höheren Stabilität dieser Kristalle gegenüber Röntgenstrahlung.

Nach dem Beenden der Röntgen-Bestrahlung nahm das Fluoreszenzsignal sowohl bei $\lambda_{Ex} = 470$ nm als auch bei $\lambda_{Ex} = 560$ nm in beiden Kristall-Varianten (p21(mod)•GppNHp und p21(mod)•R-*caged* GTP) ab. Dieser Abfall kann möglicherweise durch die Ausbildung von reaktiven Spezies (z.B. Radikale) und/oder fortlaufenden Veränderungen in der Fluorophor-Umgebung erklärt werden, wodurch auch nach Unterbrechung der Röntgen-Bestrahlung der Protein-Kristall geschädigt werden kann. Dabei wäre entweder eine direkte Schädigung denkbar, oder eine indirekte Schädigung durch eine erhöhte Anfälligkeit des Fluorophors für Fluoreszenzbleichung durch die anhaltende Bestrahlung mit blauem Licht zur Fluoreszenzanregung.

5.3.3.2 Röntgen-induzierte Veränderungen in p21(mod)-Kristallen unter Kryo-Bedingungen

In einer zweiten Reihe von Experimenten an der Synchrotron-Messstation PX-I (SLS, PSI Villigen, Schweiz) wurde mit Hilfe des FLUMIX-Spektrometers der Einfluss von Röntgenstrahlung auf Kristalle von p21(mod) unter Kryo-Bedingungen ($T = 100$ K) untersucht (s. Abbildung 46).

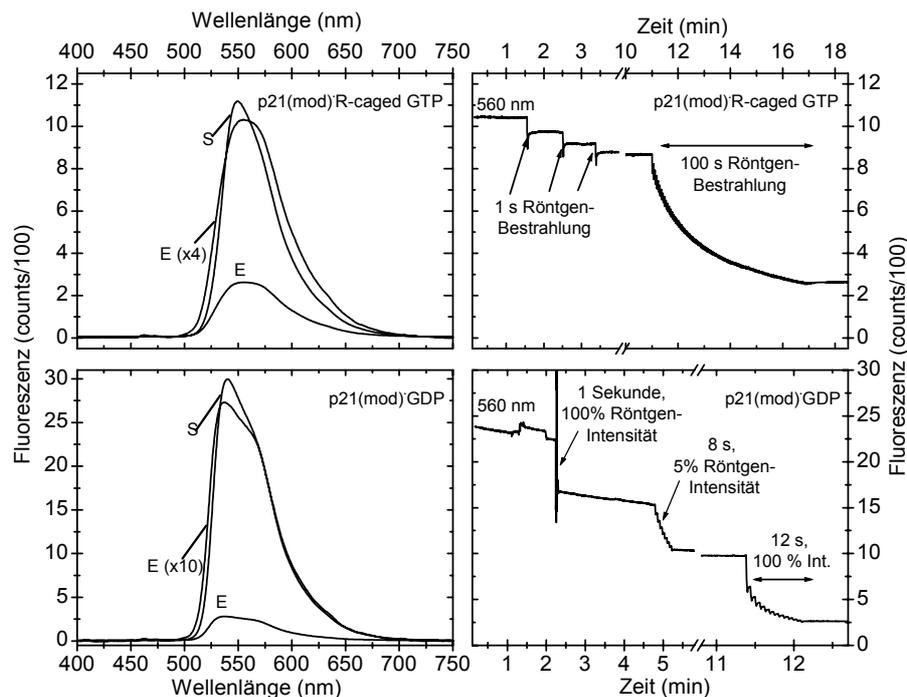


Abbildung 46: Effekt der Bestrahlung von Kristallen von p21(mod) mit Synchrotron-Röntgenstrahlung ($\lambda = 0,919$ Å) unter Kryo-Bedingungen. In den linken Diagrammen sind Fluoreszenz-Emissionsspektren ($\lambda_{Ex} = 441,6$ nm) vor (S) und nach (E) Röntgenbestrahlung gezeigt. Die zugehörigen zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzänderungen ($\lambda_{Ex} = 560$ nm) sind in den rechten Diagrammen dargestellt. Die Kristalle wurden in 0,05-0,1 mm Nylon-Schleifen mit einem kalten Stickstoff-Strom ($T = 100$ K) stabilisiert. Während der Röntgen-Bestrahlung wurden kontinuierlich Diffraktionsbilder aufgezeichnet, wobei der Kristall für jedes Bild ausgehend vom selben ϕ -Winkel um $0,1^\circ$ rotiert wurde. Während der Auslesezeit der Diffraktionsbilder ($\sim 2,5$ s / Bild) wurde der Strahlengang der Röntgenstrahlung zum Kristall unterbrochen. In den Zeitverläufen sind die aufsummierten Belichtungszeiten markiert (100 % Intensität entspricht $4 \cdot 10^{10}$ Photonen / s).

Kristalle von p21(mod)•R-caged GTP zeigten bei Röntgenbestrahlung unter Kryo-Bedingungen einen schnellen Abfall des Fluoreszenz-Signals. Schon nach einer Sekunde Belichtungszeit wurde eine signifikante Abnahme beobachtet. Da die Fluoreszenzänderungen negativ waren und auf einer deutlich kürzeren Zeitskala als die Radiolyse von caged GTP bei Raumtemperatur abliefen (s. Kapitel 5.3.3.1), kann davon

ausgegangen werden, dass die Änderungen nicht auf der Radiolyse von *caged* GTP beruhen. Dies wurde auch durch Kontrollexperimente mit p21(mod)•GDP-Kristallen bestätigt, die kein photolabiles Nukleotid enthielten. Bei solchen Kristallen wurde nach einer Sekunde Röntgen-Bestrahlung bereits ein Abfall der Fluoreszenz-Intensität um 25 % beobachtet, und acht weitere Röntgenpulse mit auf 5 % reduzierter Strahl-Intensität ($\sim 2 \cdot 10^9$ Photonen / s, 1 s / Puls) resultierten in einem weiteren Abfall der Fluoreszenz-Intensität um 32 %. Diese Ergebnisse waren recht unerwartet, da die Fluoreszenz-Änderungen bei Röntgen-Dosen auftraten, die klein waren im Vergleich zu einer typischen Dosis, die für die Aufnahme eines vollständigen röntgenographischen Datensatzes benötigt wird. Trotz der starken Fluoreszenzänderungen behielten beide untersuchten Kristalle (p21(mod)•R-*caged* GTP bzw. p21(mod)•GDP) selbst nach 100 s Röntgen-Bestrahlung annähernd ihre volle anfängliche Diffraktionsfähigkeit.

Die starken Fluoreszenzänderungen, die schon bei einer relativ geringen Röntgen-Dosis beobachtet werden konnten, verdeutlichen den großen Nutzen von Fluoreszenzuntersuchungen in Kombination mit Röntgen-Diffraktionsexperimenten. Solche kombinierten Untersuchungen stellen eine sehr vielversprechende Methode dar, um während der Messung eines röntgenographischen Datensatzes auch solche röntgeninduzierten Veränderungen in einem Proteinkristall (z.B. Strahl-Schaden) quantifizieren zu können, welche sich nicht in einer signifikanten Veränderung der Diffraktionsfähigkeit eines Kristalls äußern.

Anhand der starken Veränderungen bei kleinen Röntgen-Dosen muss davon ausgegangen werden, dass eine Röntgen-induzierte Radiolyse von Verbindungen mit photolabilen Schutzgruppen zur Reaktionsinitiierung in einem Proteinkristall verschiedene Probleme mit sich bringen kann. Die Radiolyse-Bedingungen müssen für eine solche Strategie sorgfältig optimiert werden, um unerwünschte Nebenreaktionen auszuschließen. Optische Fluoreszenzmessungen mit Hilfe des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers haben sich in dieser Hinsicht als höchst sensitive Methode bewährt, um kleine röntgeninduzierte Veränderungen in einem Protein-Kristall zu detektieren, welche auf solche Nebenreaktionen hindeuten können.

5.4 Computersimulation des kovalent mit Cys-32 verknüpften Fluorophors IANBD Amid

Der Fluorophor IANBD Amid wurde zur Herstellung von p21(mod) kovalent an das exponierte Cys-32 des Proteins gebunden. Um den Fluorophor in einer Röntgenstrukturanalyse adäquat berücksichtigen zu können, musste zunächst ein Satz von „Topologie- und Parameterdateien“ für die Strukturverfeinerung erzeugt werden (s. Kapitel 2.3.2.4). Dazu wurde zunächst die Ideal-Konformation des an Cys-32 gebundenen Fluorophors durch Computersimulation berechnet. Da eine Ideal-Konformation durch einfache molekulardynamische Simulationen nicht zufriedenstellend generiert werden konnte, wurde eine *ab initio*-Simulation des Fluorophors durchgeführt. Da eine Einbeziehung des kompletten Cystein-Moleküls in die Simulation zu einer zu hohen Rechenzeit geführt hätte, wurde für die Computersimulation nur der Fluorophor zusammen mit den verknüpften Cystein-Atomen C_β und S_γ berücksichtigt. Ein entsprechendes Strukturmodell wurde mit dem Programm Hyperchem erzeugt und die Geometrie durch semiempirische Methoden voroptimiert. Aus dieser Simulation ging jedoch eine unrealistische, nicht-planare Struktur für die Stickstoff-Atome der Linker-Region (s. Abbildung 47) des Fluorophors hervor. Um das Modell des Fluorophors weiter zu verbessern, wurde anschließend mit dem Programm Hyperchem eine HF-SCF *ab initio*-Simulation mit dem Basissatz 6-31G* (s. Kapitel 2.3.2.4) durchgeführt. Die Simulation wurde zunächst 4 Wochen an einem Pentium IV-Computer mit 1 GHz Prozessorgeschwindigkeit gerechnet und anschließend innerhalb weiterer 2 Wochen an einem Pentium IV-Computer mit 2,4 GHz Prozessorgeschwindigkeit zu Ende geführt. Aus dieser Simulation ging für alle Stickstoff-Atome des Fluorophors eine planare Struktur hervor. Die berechnete Konformation ist in Abbildung 47 dargestellt.

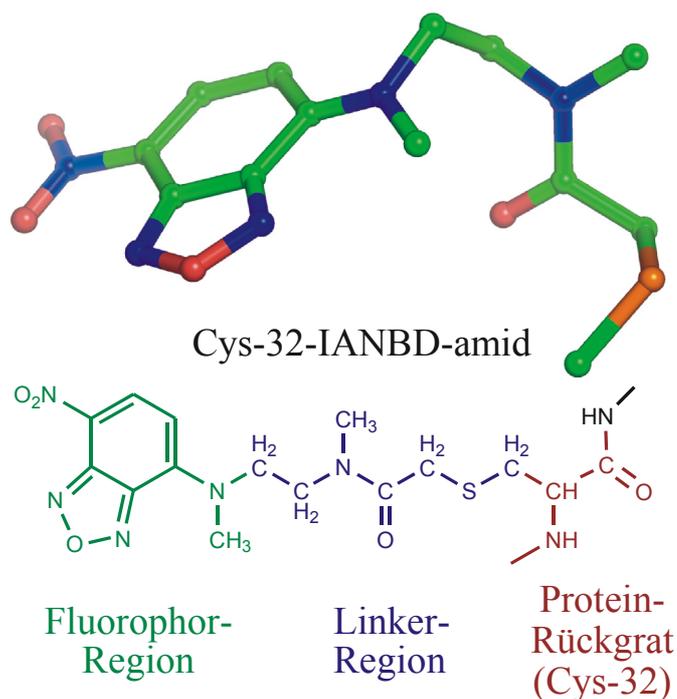


Abbildung 47: Schematische Darstellung des an Cys-32 gebundenen Fluorophors IANBD Amid (unten) und das Ergebnis der Computersimulation (oben). In der Computersimulation wurden nur der Fluorophor (grüne Markierung) und die Atome der Linker-Region (blaue Markierung) berücksichtigt.

Anhand der aus der Computersimulation gewonnenen Parameter für Bindungslängen sowie Bindungs- und Torsionswinkel wurden, wie in Kapitel 4.5.4.1 beschrieben, die für eine Strukturverfeinerung benötigten „Topologie- und Parameterdateien“ erzeugt.

5.5 Röntgenstrukturanalysen an p21(mod)

Für die Interpretation der Experimente mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer war eine detaillierte Kenntnis der Kristallstrukturen des modifizierten Proteins p21(mod) im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden oder Nukleotid-Analoga vonnöten. Die Kenntnis der Kristallstrukturen von p21(mod)•R-caged GTP und den aus solchen Kristallen durch photolytische Spaltung des Nukleotids und Reaktion im Kristall gewonnenen Zuständen (p21(mod)•R-caged GTP→GTP, p21(mod)•R-caged GTP→GDP) war unmittelbar notwendig, um die durch Fluoreszenzspektroskopie beobachteten Veränderungen mit strukturellen Veränderungen im Kristall korrelieren zu können. Für Referenzmessungen wurden zusätzlich Kristalle von p21(mod)•GppNHp und p21(mod)•GDP hergestellt. Neben dem Einsatz als unter UV-Licht invariante Referenzkristalle für FLUMIX-Fluoreszenzexperimente war auch die Röntgenstrukturanalyse dieser Kristalle von großer Wichtigkeit. Da die chemische Umgebung eines Protein-Moleküls im Proteinkristall deutlich von der Lösungssituation abweicht, musste geklärt werden, ob die im Kristall ablaufenden Reaktionen einem mit der Lösungssituation vergleichbaren Reaktionsweg folgen. Durch einen Vergleich der Kristallstrukturen der durch Kokristallisation mit den entsprechenden Nukleotiden hergestellten Kristalle (p21(mod)•GppNHp und p21(mod)•GDP) mit solchen, die durch Reaktion im Kristall gewonnen wurden (p21(mod)•R-caged GTP→GTP und p21(mod)•R-caged GTP→GDP) konnten strukturelle Unterschiede aufgedeckt werden, anhand derer wichtige Informationen über die Anwendbarkeit und über mögliche Limitierungen der kinetischen Kristallographie gewonnen werden konnten.

Es wurden insgesamt 7 Kristalle in unterschiedlichen Nukleotid-Zuständen durch Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die Datenstatistik für diese Experimente ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Datenstatistik für Kristalle C1 bis C7

	Kristallbezeichnung und Nukleotidgehalt						
	C1 GppNHp	C2 GDP	C3 S-caged GTP	C4 R-caged GTP	C5 R-caged GTP→GTP	C6 R-caged GTP→GDP	C7 R-caged GTP→GTP
Datensammlung und Prozessierung							
Synchrotron (Messstation)	ESRF (ID14-1)	SLS (PX-I)	ESRF (ID14-4)	ESRF (ID14-4)	ESRF (ID14-4)	ESRF (ID14-4)	ESRF (ID14-4)
Röntgendetektor	Q4R ADSC	CCD CHESS	Q4R ADSC	Q4R ADSC	Q4R ADSC	Q4R ADSC	Q4R ADSC
Temperatur (K)	100	100	100	100	100	100	100
Wellenlänge (Å)	0,934	0,827	0,920	0,939	0,976	0,939	0,976
Raumgruppe	R32	C222(1)	P4(1)	P4(1)	P4(1)	P4(1)	P4(1)
Zellparameter (Å)	$a = b = 88,5$ $c = 144,1$	$a = 49,0$ $b = 53,8$ $c = 116,0$	$a = b = 69,1$ $c = 35,5$	$a = b = 69,1$ $c = 35,5$	$a = b = 69,3$ $c = 35,0$	$a = b = 69,4$ $c = 34,8$	$a = b = 69,3$ $c = 35,0$
maximale Auflösung^a (Å)	67,42 - 1,70 (1,75 - 1,70)	50,00 - 0,99 (1,00 - 0,99)	69,01 - 1,24 (1,26 - 1,24)	69,34 - 1,00 (1,05 - 1,00)	69,34 - 1,25 (1,30 - 1,25)	69,34 - 1,22 (1,30 - 1,22)	69,34 - 1,30 (1,40 - 1,30)
Anzahl der gemessenen Reflexe	276701	400222	317470	541277	283084	286285	258379
Anzahl der gemessenen symmetrie-äquivalenten Reflexe	23933	82821	46194	91096	46204	47013	41195
Durchschnittliche Redundanz	11,6	4,8	6,9	5,9	6,1	6,1	6,3
$R_{\text{sym}}^{\text{ab}}$ (%)	8,1 (86,1)	4,9 (60,5)	4,9 (33,4)	5,2 (67,9)	4,3 (51,5)	4,6 (45,7)	5,5 (54,9)
Durchschnittliches I/σ (I)	16,9 (2,1)	15,0 (2,3)	18,7 (3,1)	13,6 (2,3)	20,7 (3,5)	21,5 (3,0)	16,05 (3,14)
Wilson-B-Faktor (Å²)	30,9	12,0	18,3	14,0	21,1	22,1	22,6
Statistik der Verfeinerung							
Auflösungsbereich^a (Å)	67,42 - 1,80 (1,85 - 1,80)	50,00 - 1,00 (1,03 - 1,00)	69,01 - 1,24 (1,27 - 1,24)	69,34 - 1,05 (1,08 - 1,05)	69,34 - 1,25 (1,28 - 1,25)	69,34 - 1,22 (1,25 - 1,22)	69,34 - 1,30 (1,33 - 1,30)
Anzahl der symmetrie-äquivalenten Reflexe	19368	76394	44152	78796	43911	44702	39138
Vollständigkeit^a (%)	99,88 (100,00)	96,95 (96,03)	96,78 (76,25)	99,93 (99,97)	99,92 (99,94)	94,12 (55,47)	100,00 (100,00)
$R_{\text{cryst}}^{\text{ac}} / R_{\text{free}}^{\text{ad}}$ (%)	14,6 / 18,5 (18,9 / 23,7)	14,4 / 16,3 (27,0 / 27,7)	14,6 / 18,6 (21,8 / 21,2)	15,6 / 18,1 (26,5 / 27,9)	14,8 / 17,0 (24,6 / 24,3)	14,9 / 17,6 (31,4 / 34,5)	14,9 / 18,0 (27,2 / 30,9)
Ramachandran-Diagramm^c	94,7, 5,3, 0,0, 0,0	89,3, 10,0, 0,7, 0,0	87,3, 10,3, 1,0, 0,3	89,3, 9,0, 1,0, 0,7	90,0, 9,7, 0,0, 0,3	90,0, 9,0, 0,7, 0,3	89,7, 10,0, 0,0, 0,3
Rmsd der Bindungslängen (Å)	0,016	0,012	0,012	0,015	0,015	0,011	0,015
Rmsd der Bindungswinkel (Grad)	1,808	1,719	1,625	1,855	1,742	1,534	1,753
Durchschnitt / rmsd der B-Faktoren (Å²)							
Hauptkette (Konformation A B)	30,0 / 0,69	8,0 / 0,43 8,4 / 0,40	14,2 / 0,44 14,9 / 0,49	5,2 / 0,53 4,8 / 0,48	7,0 / 0,57 8,5 / 0,57	18,0 / 0,56 16,6 / 0,40	13,0 / 0,60 14,9 / 0,54
Seitenkette (Konformation A B)	34,4 / 2,0	10,3 / 1,2 11,0 / 1,2	16,1 / 1,3 17,2 / 1,2	7,4 / 1,4 6,9 / 1,4	10,1 / 1,4 11,3 / 1,5	20,58 / 1,5 18,3 / 1,1	15,9 / 1,5 17,7 / 1,4
Nukleotid (Konformation A B)	25,7 / 1,4	6,8 / 1,1 6,8 / 0,88	15,0 / 2,1 16,2 / 2,9	6,0 / 1,3 7,3 / 2,7	6,7 / 1,1 7,2 / 1,4	20,0 / 2,7 16,0 / 2,2	12,3 / 1,1 12,6 / 0,83
Fluorophor (Konformation A B)	85,6 / 7,7	32,0 / 1,8 33,4 / 3,1	23,6 / 1,6 30,8 / 2,5	19,7 / 3,9 12,5 / 1,8	42,0 / 1,8 32,2 / 3,2	-	43,5 / 1,1 42,4 / 4,6
Solvens	49,4	24,0	26,3	28,5	29,7	38,2	24,1
PDB ID	2CLO	2CE2	2CL6	2EVW	2CL7	2CLD	2CLC

^a Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

^b Berechnet nach Gleichung 11 (s. Kapitel 4.5.2)

^c Berechnet nach Gleichung 9 (s. Kapitel 2.3.2)

^d R_{free} wurde gemäß Gleichung 9 aus einem zufällig ausgewählten Anteil von 5% der Röntgenreflexe berechnet, welche in der Verfeinerung ansonsten nicht berücksichtigt wurden (s. Kapitel 2.3.2).

^e Berechnet mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993)

In den meisten Fällen zeigten die erhaltenen Kristall-Strukturen von p21(mod) eine deutlich höhere Auflösung, als in den entsprechenden Kristallstrukturen des Wildtyp-Proteins (H-Ras p21 (Asr 1-166), im Folgenden als p21(wt) abgekürzt) im Komplex mit demselben Nukleotid erreicht wurde. Es wurden verschiedene strukturelle Details beobachtet, die von den entsprechenden Strukturen von p21(wt) abwichen oder in diesen nicht sichtbar waren. Obwohl die GTPase-Aktivität von p21(mod) ($t_{1/2} = 430 \pm 18$ min bei 21 °C) deutlich geringer ist als die Aktivität von p21(wt) ($t_{1/2} = 18,7$ min bei 37 °C, John *et al.* (1989)), konnte gezeigt werden, dass mehrere der beobachteten strukturellen Details einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von H-Ras p21 im Allgemeinen leisten können.

5.5.1 Allgemeine Struktur

Der generelle Aufbau der G-Domäne (s. Kapitel 2.4.4.2), welche in praktisch allen Guanosin-Nukleotid bindenden Proteinen vorkommt (Stouten *et al.*, 1993; Vetter und Wittinghofer, 2001), war auch in allen untersuchten Datensätzen von p21(mod) konserviert. Einige der analysierten Strukturen, wie p21(mod)•GDP, waren fast identisch mit dem Wildtyp-Protein p21(wt) und sind somit aufgrund der hohen erreichten Auflösung potentiell als hochaufgelöste Modell-Strukturen für H-Ras p21 geeignet.

Es bestanden einige kleine aber signifikante Unterschiede zu p21(wt), die hauptsächlich in den flexiblen Schleifen-Regionen L2 (Asr 30-36) und L4 (Asr 60-66) lokalisiert waren. Ein Beispiel für einen sehr signifikanten Unterschied zwischen p21(mod) und p21(wt) ist die Bindung eines zweiten Mg^{2+} -Ions im aktiven Zentrum von p21(mod)•GppNHp. Die Bindung eines zweiten Kations im aktiven Zentrum von H-Ras p21 wurde bereits aufgrund von kombinierten quantenmechanischen und molekularmechanischen (QM/MM) Untersuchungen vorausgesagt (Klahn *et al.*, 2005) und ist möglicherweise von einiger Relevanz für ein eingehenderes Verständnis der Funktionsweise von H-Ras p21 im Allgemeinen, wie im Kapitel 5.5.7 eingehender erläutert werden soll.

Aufgrund der hohen Datenqualität war es möglich, in den Kristallstrukturen von p21(mod) in Komplex mit R-caged GTP, S-caged GTP, GTP und GDP zwei diskrete Konformationen zu unterscheiden, welche in den Schalter-Regionen I und II sowie in Helix $\alpha 2$ (Asr 67-74) und der Region von Helix $\alpha 3$ bis zur Schleife L7 (Asr 98-108) die stärksten Abweichungen

voneinander zeigten. Die Existenz mehrerer Sub-Konformationen, die in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander stehen, ergibt sich aus der Funktion von H-Ras p21 als molekularer Schalter, welche eine niedrige Energie-Barriere zwischen den verschiedenen involvierten Konformationen des Proteins erfordert. Anhand von ^{31}P -NMR-Untersuchungen konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass selbst in kristallinem p21(wt)•GppNHp und p21(wt)•GppCH₂p mindestens zwei unterschiedliche Zustände vorkommen, die als Zustand 1 und Zustand 2 bezeichnet wurden (Spoerner *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu diesen ^{31}P -NMR-Untersuchungen wurden in p21(mod) jedoch Abweichungen zwischen den alternativen Konformationen hauptsächlich in Regionen beobachtet, welche durch ^{31}P -NMR-Untersuchungen voraussichtlich nicht unterscheidbar wären. Innerhalb eines Datensatzes entsprachen die in p21(mod) beobachteten Konformationen in Bezug auf die Orientierung von Aminosäureresten um das Nukleotid entweder dem in ^{31}P -Untersuchungen beschriebenen Zustand 1 oder dem Zustand 2 (Spoerner *et al.*, 2005).

5.5.2 Alternative Hauptkettenkonformationen

Mit der hohen Datenqualität (in Bezug auf Auflösung und Signalstärke), die für die meisten Röntgenstruktur-Datensätze von p21(mod) zur Verfügung stand, wurde bereits in frühen Verfeinerungsschritten deutlich, dass ein großer Teil der Aminosäurereste in mindestens zwei alternativen Konformationen vorlag. Dabei wurden in einigen Fällen über eine Region von mehr als 10 aufeinanderfolgenden Resten signifikante Abweichungen in den Hauptketten-Konformationen beobachtet. In den ersten Runden der Verfeinerung wurden nur die alternativen Konformationen mit starken Abweichungen in den Haupt- oder Seitenketten-Konformationen in das Modell integriert (etwa 25 % aller Aminosäurereste im Kristall C4 (p21(mod)•R-caged GTP)). Es ist davon auszugehen, dass sich eine derart hohe Heterogenität der Protein-Konformation in einem kleinen globulären Protein wie H-Ras p21 auch auf die meisten übrigen Aminosäurereste auswirkt. In den späteren Verfeinerungsschritten wurden deshalb auch für alle verbleibenden Aminosäuren zwei alternative Konformationen in das Strukturmodell aufgenommen. Für Kristalle C2-C7 (s. Tabelle 1) konnte dadurch ein weiterer Abfall des kristallographischen und des freien R-Faktors (R_{cryst} und R_{free}) um mehr als 1 % und eine deutliche Verbesserung der Elektronendichtekarte erzielt werden. Die relativ geringe Heterogenität in den zusätzlich

eingeführten alternativen Konformationen ist bei mittlerer Auflösung nicht sichtbar. Für eine adäquate Interpretation der Elektronendichte bei den erzielten Auflösungen von bis zu 1.0 Å (Kristall C2, p21(mod)•GDP) war jedoch die Beschreibung mit mindestens zwei alternativen Hauptkettenkonformationen unerlässlich, wie in Abbildung 48 exemplarisch verdeutlicht wird.

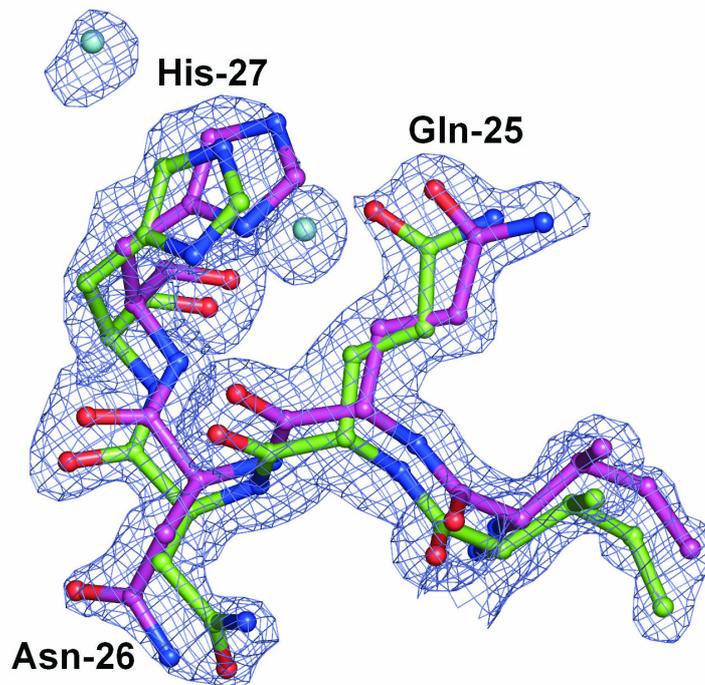


Abbildung 48: Kleine Unterschiede zwischen den beiden Sub-Konformationen (grüne bzw. magenta Stäbchen) der Aminosäuren 24-27 im Kristall C4 (p21(mod)•R-caged GTP). Die gezeigte $2F_o - F_c$ Elektronendichte-Karte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet (0,9 σ cutoff-level, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)).

Wie zu erkennen ist, zeigt selbst die sehr deutlich erkennbare Elektronendichte im Bereich von Ile-24 bis His-27, welche nicht in einer der flexiblen Regionen des Proteins positioniert ist, eine gewisse konformelle Heterogenität, die durch eine einzelne Konformation der Aminosäurereste nur unzureichend beschrieben werden könnte.

In p21(mod)•GppNHp (Kristall C1) reichte die Datenqualität (1.8 Å Auflösung) nicht aus, um eine eindeutige Interpretation mit zwei Hauptketten-Konformationen zu erlauben. Uninterpretierte Bereiche in der Elektronendichtekarte deuten jedoch auch hier die Anwesenheit einer zweiten möglichen Konformation an.

Es muss davon ausgegangen werden, dass die Konformation einzelner Aminosäurereste oder Protein-Regionen in p21(mod) nicht unabhängig vom Rest der Proteinkette sind, da

sonst in einigen Aminosäureresten eine sterische Überlappung resultieren würde (s. Kapitel 5.5.3, Abbildung 52). Die Besetzung der beiden im Strukturmodell verwendeten Konformationen wurde deshalb über die gesamte Protein-Kette konstant gehalten. In den meisten Fällen gab es keine starken Argumente gegen eine Besetzungszahl von jeweils 0,5 für beide Konformationen.

5.5.3 Vergleich von p21(mod)•R-caged GTP mit p21(wt)•R-caged GTP

Die allgemeine Struktur von p21(mod)•R-caged GTP stimmt weitgehend mit bekannten Strukturen von p21(wt) überein. Die wichtigsten Abweichungen im Vergleich zu p21(wt)•R-caged GTP sind eine gut definierte Schleife L2 (Asr Asp-30 bis Ile-36), eine um 180° gedrehte 2-NPE-Gruppe des Nukleotids und eine unterschiedliche Konformation in Schleife L4 (Asr Gly-60 bis Ala-66), welche durch den an Cys-32 gekoppelten Fluorophor hervorgerufen wird.

Die Hauptketten-Konformation der Schleife L2 in p21(mod)•R-caged GTP ähnelt Strukturen von p21(wt) in Komplex mit GTP oder GppNHp (z.B. PDB-Einträge 1QRA, 1CTQ oder 5P21). Die Seitenkette von Cys-32 mit dem kovalent gebundenen NBD-Fluorophor zeigt in die selbe Richtung wie Tyr-32 in Strukturen von p21(wt), und die umgebenden Aminosäurereste sind fast identisch positioniert. Die Konformation von Schleife L2 entspricht der in ³¹P-NMR-Untersuchungen (Spoerner *et al.*, 2001) als „Zustand 2“ bezeichneten Orientierung, mit einer an das Mg²⁺-Ion orientierten Hydroxyl-Gruppe von Thr-35. Der Abstand der Hydroxyl-Gruppe von Thr-35 zum Mg²⁺-Ion (2,1 Å) in p21(mod)•R-caged GTP ähnelt mehr dem Abstand in p21(wt)•GppNHp (2,08 Å) als dem Abstand in p21(wt)•R-caged GTP (2,35 Å). Während Scheidig *et al.* (1995) zwei alternative Hauptketten-Konformationen in der Schleifen-Region L2 von p21(wt)•R-caged GTP (PDB-Eintrag 1GNR) beobachteten, wurde keine signifikante Abweichung zwischen den beiden für die Verfeinerung von p21(mod)•R-caged GTP verwendeten Ketten beobachtet. Der Unterschied zu p21(wt)•R-caged GTP kann durch Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen in p21(mod)•R-caged GTP zwischen der 2-NPE- (*cage*-) Gruppe des Nukleotids, dem an Cys-32 gekoppelten NBD-Fluorophor und den Aminosäureresten Arg-102 und Tyr-64 eines Nachbarmoleküls im Kristall erklärt werden (s. Abbildung 49).

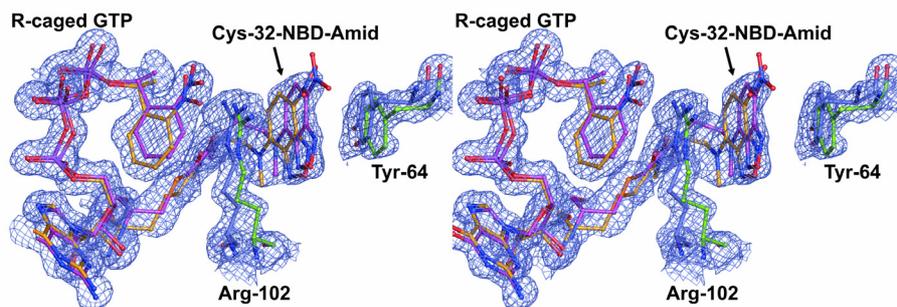


Abbildung 49: Stereo-Darstellung der strukturellen Umgebung des NBD-Fluorophors und der 2-NPE- (*cage*-) Gruppe des Nukleotids in p21(mod)•R-*caged* GTP. Es sind beide in der Verfeinerung verwendeten Ketten dargestellt. Im Kristall bilden sich starke Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und der 2-NPE-Gruppe eines Moleküls (orange bzw. magenta Stäbchen) mit den Aminosäureresten Tyr-64 und Arg-102 eines Nachbarmoleküls (blaue bzw. grüne Stäbchen) aus. Die dargestellte $2F_o-F_c$ Elektronendichte-Karte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet (1σ *cut-off-level*, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)).

Der Fluorophor wirkt wie ein Anker, welcher die Flexibilität der Schleife L2 limitiert. Durch die lange, flexible Linker-Region des Fluorophors wird dadurch jedoch keine signifikante Verzerrung der Schleife L2 im Vergleich zu p21(wt)•GppNHp (PDB-Eintrag 1CTQ, Scheidig *et al.* (1999)) hervorgerufen. In dieser Hinsicht zeigt die Schleife L2 in p21(mod)•R-*caged* GTP offenbar eine größere Übereinstimmung mit der „ON“-Konformation von H-Ras p21 als die abweichende Konformation, die in p21(wt)•R-*caged* GTP beobachtet wurde (PDB-Eintrag 1GNR, Scheidig *et al.* (1995)).

Die Konformation des GTP-Teils des Nukleotids in p21(mod)•R-*caged* GTP ist fast identisch mit der Konformation in p21(wt)•R-*caged* GTP. Lediglich die 2-NPE- (*cage*-) Gruppe ist im Vergleich zu p21(wt)•R-*caged* GTP um 180° rotiert, was vermutlich auf elektronische Erfordernisse für die beschriebenen Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen zurückzuführen ist. Dies hat wichtige Konsequenzen für den möglichen Mechanismus der *caged* GTP-Photolyse. Jüngste zeitaufgelöste Untersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie an 2-NPE-modifizierten Verbindungen (*caged compounds*) (Corrie *et al.*, 2003) deuten auf zwei miteinander konkurrierende Reaktionswege für die Dunkel-Reaktionen kurz nach erfolgter Blitzlicht-Photolyse hin (s. Abbildung 50).

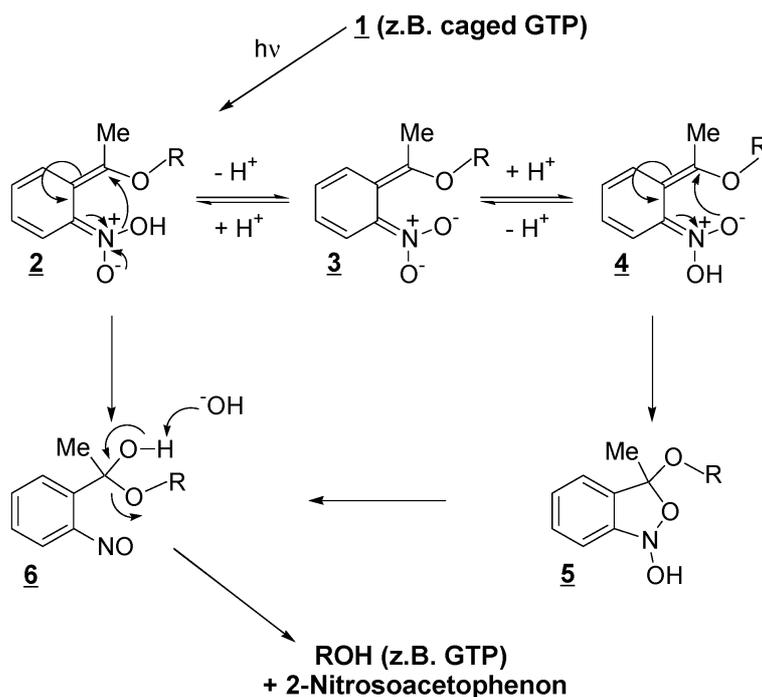


Abbildung 50: Mögliche Reaktionswege für die Dunkelreaktionen nach der Belichtung von 2-NPE-modifizierten Verbindungen (*caged compounds*) (nach Corrie *et al.* (2003)). Die Pfeile repräsentieren elektronische Umlagerungen, wobei in Struktur **2** der Fall für die direkte Reaktion nach Struktur **6** und in Struktur **4** die Reaktion nach Struktur **5** dargestellt ist.

Der indirekte Reaktionsweg, welcher die Bildung eines Aci-Nitro-Intermediats **3** und die anschließende Bildung einer bityklischen Spezies **5** beinhaltet, wurde als der wichtigste Reaktionsweg für die Photolyse von *caged ATP* diskutiert (Walker *et al.*, 1989). In p21(mod)•R-*caged GTP* erlaubt die Positionierung der 2-NPE-Gruppe des Nukleotids keine Bildung einer bityklischen Spezies ohne größere Atom- bzw. Gruppen-Bewegungen (vgl. Abbildung 49). Es ist deshalb wahrscheinlicher, dass in p21(mod)•R-*caged GTP* der direkte Reaktionsweg bevorzugt wird, bei welchem eine Reaktion von der photolytisch gebildeten Nitronsäure **2** direkt zum Hemi-Acetal **6** stattfindet. Wie von Corrie *et al.* (2003) diskutiert wurde, muss dieser Reaktionsschritt notwendigerweise auf der selben Zeitskala wie die Ionisation der Nitronsäure im indirekten Reaktionsweg liegen, welche im Sub-Millisekunden-Zeitbereich abläuft.

Schleife L4 in p21(mod)•R-*caged GTP* zeigt nur schwache Elektronendichte für Aminosäurereste Gln-61 bis Glu-63. Im Gegensatz zu p21(wt)•R-*caged GTP* endet der flexible Bereich bei Glu-63, und Tyr-64 ist klar definiert. Aufgrund der Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen Tyr-64 und dem an Cys-32 gekoppelten Fluorophor wird Schleife L4 in einer ungewöhnlichen Konformation fixiert,

welche stark von bekannten Strukturen von p21(wt) in Komplex mit *R-caged* GTP (PDB-Eintrag 1GNN) oder GppNHp (PDB-Einträge 1CTQ, 5P21) abweicht. Eine der beiden im Bereich Ala-66 bis Thr-74 gefundenen alternativen Konformationen in p21(mod)•*R-caged* GTP ist nahezu identisch mit Strukturen von p21(wt) in Komplex mit GTP oder GTP-Analoga (PDB-Einträge 5P21, 1QRA, 1CTQ und 1GNN). Für eine vollständigere Interpretation der Elektronendichtekarte in diesem Struktur-Bereich ist jedoch eine zweite Konformation mit stark abweichender Haupt- und Seitenketten-Konformation notwendig (s. Abbildung 51).

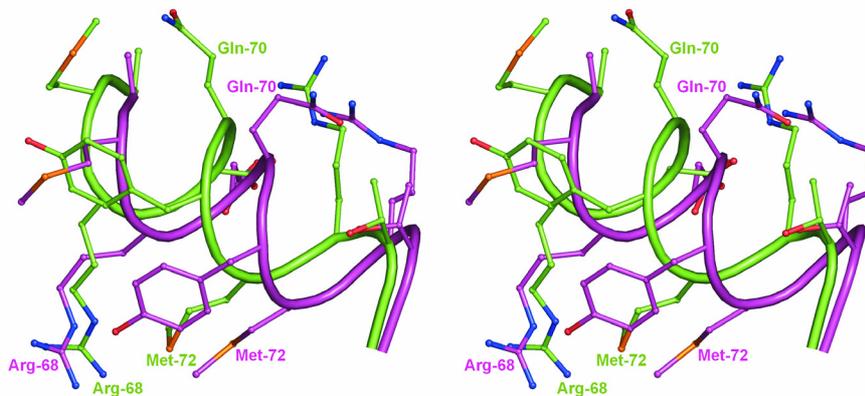


Abbildung 51: Stereo-Darstellung der konformellen Heterogenität in Helix α_2 . Dargestellt sind die beiden alternativen Konformationen der Aminosäurereste 66-75 in p21(mod)•*R-caged* GTP (grüne bzw. magenta Stäbchen).

Aufgrund der großen Abweichung zwischen den beiden Konformationen in Aminosäureresten 67-74 kommt es in einigen Bereichen zu einer Überlappung zwischen unterschiedlichen Aminosäureresten, so dass Atome von verschiedenen Aminosäureresten zu derselben Elektronendichte beitragen. Aufgrund der starken Heterogenität in diesem Strukturbereich weist die Elektronendichtekarte ein stärkeres Rauschen auf als für andere Bereiche des Proteins. Dennoch konnte die Position der Hauptkette und der meisten Seitenketten eindeutig interpretiert werden. Eine signifikante Reduktion des freien R-Faktors R_{free} bestätigte die Notwendigkeit der Verwendung von zwei Konformationen für eine vollständigere Beschreibung der beobachteten Elektronendichteverteilung. Die Notwendigkeit der Interpretation mit einer zweiten Hauptketten-Konformation wird besonders gut in der Kontakt-Region von Met-72 mit Val-103 deutlich (s. Abbildung 52).

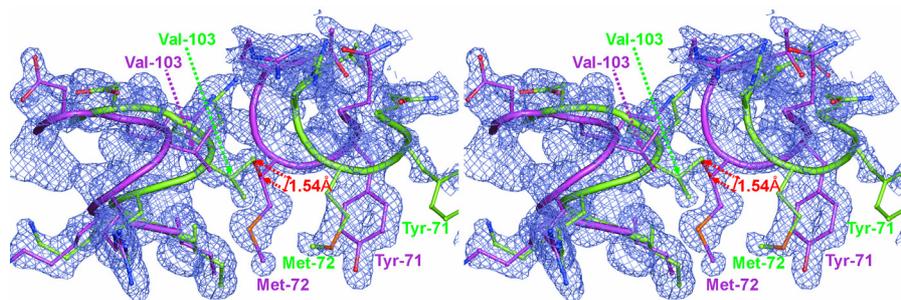


Abbildung 52: Stereo-Darstellung der konformellen Heterogenität in der Kontakt-Region von Met-72 und Val-103. Dargestellt sind die beiden alternativen Konformationen der Aminosäurereste 70-74 und 100-106 in p21(mod)•R-caged GTP (grüne bzw. magenta Stäbchen). Die dargestellte 2F_o-F_c Elektronendichte-Karte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet (0,65 σ cutoff-level, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)).

Den Seitenketten von Met-72 und von Val-103 kann jeweils ein gut definierter Bereich in der Elektronendichtekarte zugeordnet werden. Die Richtigkeit der Positionierung kann anhand der Elektronendichteverteilung und der Positionierung der im Sequenzverlauf vorhergehenden bzw. nachfolgenden Aminosäurereste eindeutig verifiziert werden. Aus dieser Positionierung resultiert jedoch ein Atom-Abstand, der mit einem Minimalabstand eines Atoms von Met-72 mit einem Atom von Val-103 von 1,55 Å physikalisch nicht möglich ist. Es muss deshalb von der Anwesenheit einer zweiten Konformation ausgegangen werden. Die konformelle Heterogenität im Bereich Ala-66 bis Thr-74 geht mit einer Heterogenität in den anliegenden Aminosäureresten Glu-98 bis Asp-108 einher, welche ebenfalls durch zwei deutlich voneinander abweichende Hauptketten-Konformationen interpretiert werden konnten. Es ist erwähnenswert, dass die Region Glu-98 bis Asp-108 auch in den meisten Untersuchungen an p21(wt) problematisch war, was sich anhand von hohen B-Faktoren und/oder einer schwachen oder schlecht definierten Elektronendichtekarte äußerte. Ein Vergleich dieser Region in p21(mod)•R-caged GTP mit Strukturen von p21(wt) (z.B. PDB-Eintrag 1CTQ) zeigt, dass die Wildtyp-Konformation einen Mittelwert aus den beiden alternativen Konformationen in p21(mod) darstellt. Anhand dieser Beobachtungen ist zu vermuten, dass auch im Wildtyp-Protein ähnliche alternative Konformationen vorliegen, die jedoch nur dann interpretierbar werden, wenn Strukturdaten mit sehr hoher Auflösung zur Verfügung stehen.

5.5.4 Vergleich von p21(mod)•S-caged GTP mit p21(mod)•R-caged GTP

Die Kristallisation von p21(mod) in Komplex mit R-caged GTP (Kristall C4) bzw. S-caged GTP (Kristall C3) erfolgte unter praktisch identischen Kristallisationsbedingungen für beide Diastereomere (s. Tabelle 1). Beide Varianten kristallisierten in der selben Raumgruppe, und die Kristalle zeigten eine ähnliche Form, Größe und Diffraktionsfähigkeit. HPLC-Analysen zeigten jedoch, dass bereits ohne Belichtung Kristalle von p21(mod)•S-caged GTP eine wesentlich höhere Hydrolyse-Rate für S-caged GTP zu caged P_i und GDP (80 % Hydrolyse innerhalb 100 Tagen) aufwiesen als Kristalle von p21(mod)•R-caged GTP (22 % Hydrolyse innerhalb 100 Tagen). Dieses Phänomen wurde auch in Kristallen des Wildtyp-Proteins beobachtet (Scheidig *et al.* (1995), PDB-Einträge 1G9R bzw. 1G9Q), jedoch war aufgrund der recht geringen Auflösung (2,5 Å für p21(wt)•S-caged GTP) keine auf Strukturdaten basierende Erklärung möglich. Mit der für p21(mod) verfügbaren Auflösung (1,05 Å für p21(mod)•R-caged GTP bzw. 1,24 Å für p21(mod)•S-caged GTP) konnten einige Rückschlüsse auf die möglichen strukturellen Ursachen für die unterschiedlichen Hydrolyse-Raten gezogen werden.

Die Strukturen von p21(mod)•R-caged GTP und p21(mod)•S-caged GTP sind einander sehr ähnlich, wobei signifikante Unterschiede hauptsächlich in der Positionierung der 2-NPE-(cage-) Gruppe des Nukleotids und den Regionen Asp-30 bis Asp-38 und Gly-60 bis Gly-63 lokalisiert sind (s. Abbildung 53).

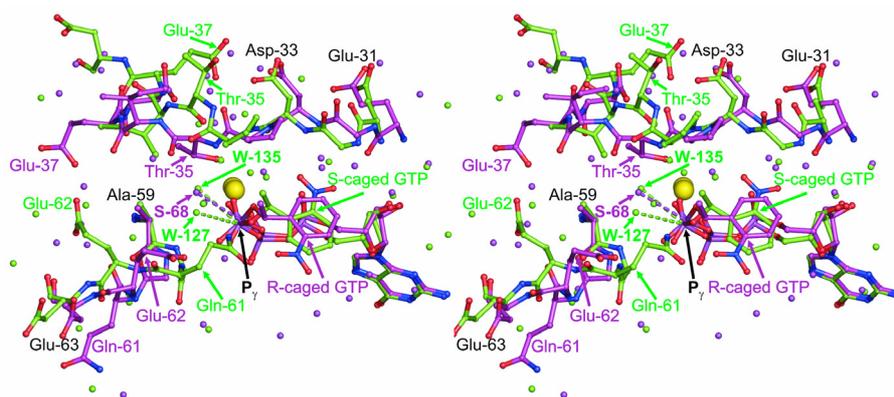


Abbildung 53: Stereo-Darstellung der Regionen, in denen starke Abweichungen zwischen p21(mod)•R-caged GTP (magenta Stäbchen) und p21(mod)•S-caged GTP (grüne Stäbchen) auftreten. Es sind die Aminosäuren 31-38, 59-63, das Nukleotid mit dem daran koordinierten Mg²⁺-Ion (gelbe Kugeln) und die umgebenden Wassermoleküle dargestellt. Die hydrolytisch aktiven Wassermoleküle (S-68 in p21(mod)•R-caged GTP bzw. W-127 und W-135 in p21(mod)•S-caged GTP) sind durch gestrichelte Linien zum γ -Phosphoratom des Nukleotids gekennzeichnet. Es ist jeweils nur eine der beiden in der Verfeinerung verwendeten alternativen Konformationen dargestellt. Der an Cys-32 gebundene Fluorophor wurde für eine bessere graphische Darstellung im Bild nicht gezeigt.

In p21(mod)•R-caged GTP ist die Nitro-Gruppe des Nukleotids in eine von Schleife L2 abgewandte Richtung orientiert. Im Gegensatz dazu ist in p21(mod)•S-caged GTP zwar der aromatische Ring in der selben Ebene positioniert, jedoch ist die Nitro-Gruppe des Nukleotids in Richtung der Aminosäurereste 31-33 der Schleife L2 orientiert und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der NH-Gruppe der Hauptkette von Asp-33 aus. Die Interaktionen der Nitro-Gruppe des Nukleotids lösen im Bereich Asp-30 bis Pro-34 in p21(mod)•S-caged GTP nur geringe Veränderungen im Vergleich zu p21(mod)•R-caged GTP aus. Diese Unterschiede sind jedoch ausreichend, um die angrenzende Region Thr-35 bis Asp-38 signifikant zu beeinflussen, welche eine stark von p21(mod)•R-caged GTP abweichende Konformation aufweist. In p21(mod)•R-caged GTP ist die Interaktion der NH-Gruppe der Hauptkette von Thr-35 mit einem Sauerstoff-Atom der γ -Phosphatgruppe, die Koordination der Seitenketten-Hydroxylgruppe von Thr-35 mit dem Mg^{2+} -Ion und die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff von Thr-35 mit dem hydrolytisch aktiven Wassermolekül S-68 vergleichbar mit Strukturen von p21(wt)•GppNHp (PDB-Einträge 5P21 (Pai *et al.*, 1990) und 1CTQ (Scheidig *et al.*, 1999)). Im Gegensatz dazu ist in p21(mod)•S-caged GTP die Seitenkette von Thr-35 weg von dem Nukleotid orientiert. Als Konsequenz interagiert das Carbonyl-Sauerstoff von Thr-35 nicht mit einem hydrolytisch aktiven Wassermolekül, sondern stattdessen über einen Wasser-vermittelten Kontakt mit dem Mg^{2+} -Ion.

In p21(mod)•S-caged GTP wurden zwei gut definierte Wasser-Moleküle (W-127 und W-135) in der Nähe der γ -Phosphoratoms (P_γ) des Nukleotids gefunden. Der Abstand der beiden Wassermoleküle zueinander beträgt 2,57 Å, und sie liegen beide nahezu auf einer Linie mit der Bindung zwischen dem γ -Phosphoratom und dem mit P_β verbrückenden Sauerstoffatom (Winkel von 16,7° für W-135 und 22,8° für W-127). W-135 ist an ein Sauerstoffatom der γ -Phosphatgruppe und an das Carbonyl-Sauerstoffatom von Pro-34 koordiniert. Der Abstand zu P_γ beträgt 3,32 Å. W-127 ist an eine der möglichen Seitenketten-Konformationen von Gln-61 koordiniert (Gln-61 ist in einem flexiblen Strukturbereich positioniert und liegt in verschiedenen schwach definierten Konformationen vor). Im Gegensatz zu p21(mod)•S-caged GTP wurde in p21(mod)•R-caged GTP nur ein geordnetes Wassermolekül (S-68) beobachtet, welches nicht an Gln-61 koordiniert. Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedliche Orientierung der Wassermoleküle in der Nähe der γ -Phosphat-Gruppe eine wichtige Rolle für die unterschiedlichen Hydrolyseraten für

R-caged GTP bzw. S-caged GTP in GDP und caged Pi spielen. Die Seitenkette von Gln-61 in p21(mod)•S-caged GTP kann Wassermolekül W-127 positionieren und aktivieren, welches wiederum gemeinsam mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Pro-34 das hydrolytisch aktive Wassermolekül W-135 aktiviert. Die Konformation der Schalter-Region I in p21(mod)•S-caged GTP ähnelt der Konformation in p21(wt)•GDP (PDB-Eintrag 4Q21 (Milburn *et al.*, 1990)) insofern, dass Thr-35 keine direkten Wechselwirkungen mit dem Mg^{2+} -Ion oder dem Nukleotid zeigt. Dies mag zu einer weiteren Erniedrigung der Energie-Barriere für den Abbau von caged GTP in GDP und caged P_i führen.

Obwohl die Nitro-Gruppe des Nukleotids in p21(mod)•R-caged GTP anders orientiert ist als in p21(mod)•S-caged GTP, ist die Orientierung in Bezug auf das chirale Kohlenstoff-Atom C^* der 2-NPE-Gruppe in beiden Strukturen ähnlich (s. Abbildung 54).

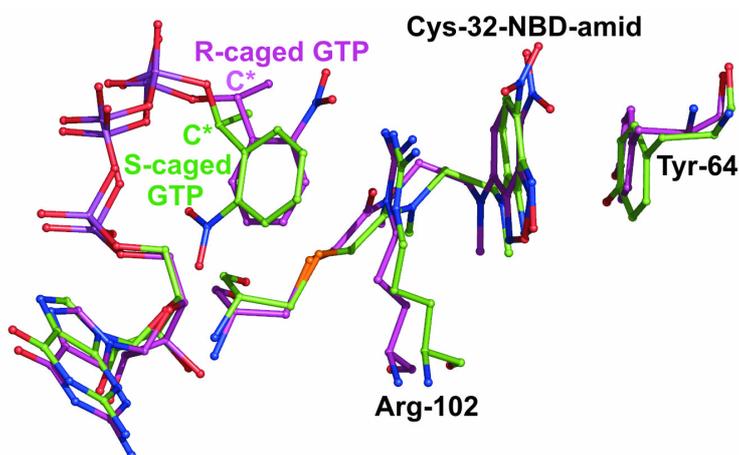


Abbildung 54: Orientierung der Nitro-Gruppen der Nukleotide in p21(mod)•R-caged GTP (magenta Stäbchen) und p21(mod)•S-caged GTP (grüne Stäbchen). Die starken Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten des NBD-Fluorophors und der 2-NPE-Gruppe des Nukleotids mit den Aminosäuren Tyr-64 und Arg-102 eines Nachbarmoleküls können für beide Diastereomere ausgebildet werden, jedoch zeigen dabei die Nitro-Gruppen in unterschiedliche Richtungen. Für eine übersichtlichere Darstellung ist jeweils nur eine der beiden für die Verfeinerung der verwendeten alternativen Konformationen dargestellt.

Aufgrund der Orientierung der Nitro-Gruppe in Bezug zum chiralen Kohlenstoff C^* der 2-NPE-Gruppe des Nukleotids in p21(mod)•S-caged GTP können ähnliche Schlussfolgerungen bezüglich des Mechanismus der Photolyse von S-caged GTP wie für p21(mod)•R-caged GTP (s. Kapitel 5.5.3) getroffen werden: Eine direkte Reaktion von einer photolytisch gebildeten Nitronsäure (Abbildung 50, **2**) zu einer Hemiacetal-Spezies (Abbildung 50, **6**) ist auch für p21(mod)•S-caged GTP wahrscheinlicher als die Reaktion

über eine bityklische Spezies (Abbildung 50, **5**), da im letzteren Fall größere Atom- bzw. Gruppen-Bewegungen notwendig wären.

5.5.5 p21(mod)•GDP und p21(mod)•R-caged GTP→GDP

Zur Herstellung von Kristallen von p21(mod) in Komplex mit GDP wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt: Kristall C2 (p21(mod)•GDP) wurde in einem Kristallisationsansatz nach der Methode des hängenden Tropfens aus einer Lösung von p21(mod) in Komplex mit GDP kristallisiert. Kristall C6 (p21(mod)•R-caged GTP→GDP) wurde hingegen aus einem Kristall von p21(mod)•R-caged GTP hergestellt, indem durch Bestrahlung mit UV-Licht (325 nm) GTP im Kristall freigesetzt wurde, welches dann durch p21(mod) zu GDP hydrolysiert wurde (s. Kapitel 5.5.5).

Während die Struktur von p21(mod)•GDP nahezu identisch ist mit der Struktur des Wildtyp-Proteins p21(wt)•GDP (PDB-Eintrag 4Q21; Milburn *et al.* (1990)), zeigt die Struktur von p21(mod)•R-caged GTP→GDP verschiedene Abweichungen. Die Position des Nukleotids in p21(mod)•R-caged GTP→GDP ist vergleichbar mit der GDP-Position in p21(wt)•GDP. Die Elektronendichte um das Nukleotid ist gut definiert und bestätigt eine vollständige Hydrolyse zu GDP. Thr-35 ist wie in p21(wt)•GDP vom Mg²⁺-Ion weg gedreht, was ein wichtiges Merkmal der "OFF"-Konformation in p21(wt)•GDP ist. Die Elektronendichtekarte zeigt im Bereich der Aminosäurereste 30-32 von Schleife L2 in p21(mod)•R-caged GTP→GDP praktisch keine interpretierbare Elektronendichte. Diese Aminosäuren wurden deshalb für die Strukturverfeinerung aus dem Proteinmodell entfernt. Die Konformation der Aminosäurereste 60-66 ähnelt mehr der Konformation in p21(mod)•R-caged GTP als der Konformation in p21(mod)•GDP oder p21(wt)•GDP. Tyr-64 ist an einer ähnlichen Position wie in p21(mod)•R-caged GTP lokalisiert, zeigt jedoch nur eine schwach definierte Elektronendichte. Für Aminosäurereste 67-74 und 98-108 in p21(mod)•R-caged GTP→GDP wurden zwei alternative Konformationen beobachtet, welche mit den Konformationen in p21(mod)•R-caged GTP (s. Kapitel 5.5.3) praktisch identisch sind. Es war eine generelle Beobachtung in den analysierten Strukturen von p21(mod)•R-caged GTP→GDP und p21(mod)•R-caged GTP→GTP (s. Kapitel 5.5.6), dass Regionen, welche während einer Reaktion im kristallinen Zustand große Konformationsänderungen durchlaufen, meist keine einheitliche Position nach der Umlagerung erreichen. Dies mag auf eine eingeschränkte Beweglichkeit der flexiblen

Regionen im Kristallgitter zurückzuführen sein, wodurch Reaktionen nicht in exakt derselben Weise wie in wässriger Lösung ablaufen können. Die Struktur kann dadurch in multiplen lokalen Minima gefangen bleiben, was sich in schwacher oder uninterpretierbarer Elektronendichte für Bereiche äußert, in denen große Konformationsänderungen durchlaufen werden.

Im Gegensatz zu p21(mod)•R-caged GTP→GDP waren praktisch alle Aminosäurereste in p21(mod)•GDP in der Elektronendichtekarte gut zu erkennen. Die größte Abweichung in der Primärstruktur von p21(mod)•GDP im Vergleich zu p21(wt)•GDP liegt in Aminosäurerest 32, wo durch Punktmutation ein Cystein eingeführt und an dieses ein NBD-Fluorophor gebunden wurde. Selbst dieser signifikante Unterschied in der Primärstruktur ruft jedoch nur minimale Veränderungen in der dreidimensionalen Protein-Struktur hervor. Der Fluorophor in p21(mod)•GDP ist in einer schlecht definierten Position in der Nähe von Tyr-40 positioniert. Die Wechselwirkung mit Tyr-40 erfolgt höchstwahrscheinlich über eine π - π Stapelwechselwirkung, im Gegensatz zu p21(wt)•GDP, wo Tyr-32 eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr-40 eingeht. Die Konformation von Schleife L2 wird durch diese unterschiedliche Natur der Wechselwirkungen mit Tyr-40 jedoch nur minimal beeinflusst. Aufgrund der flexiblen Linker-Region des Fluorophors kann Schleife L2 eine Konformation einnehmen, die praktisch identisch ist mit der Konformation in p21(wt)•GDP.

Aufgrund der im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich höheren Auflösung (1,0 Å Auflösung in p21(mod)•GDP (Kristall C2, s. Tabelle 2); 2,0 Å Auflösung in p21(wt)•GDP (PDB-Eintrag 4Q21)) konnte die gesamte Protein-Kette von p21(mod)•GDP mit zwei alternativen Konformationen interpretiert werden. Anhand der signifikanten Verringerung des freien R-Faktors (R_{free}) nach der Einführung der zweiten alternativen Konformation ins Strukturmodell konnte deutlich die Notwendigkeit einer solchen Vorgehensweise bestätigt werden. Eine deutliche Abweichung zwischen den beiden Konformationen wurde hauptsächlich in Aminosäureresten 59-63, 99-109, 121-123 und 132-138 beobachtet. Selbst in diesen Regionen waren die Abweichungen zwischen den beiden Hauptketten-Konformationen im Vergleich zu den Abweichungen in p21(mod)•R-caged GTP relativ gering (typischerweise weniger als 1,5 Å), konnten aber eindeutig identifiziert werden.

Bei Aminosäurerest Ala-59 induziert eine Umlagerung der Peptid-Bindung (*peptide flip*) eine signifikante Abweichung zwischen den beiden alternativen Ketten in p21(mod)•GDP (s. Abbildung 55).

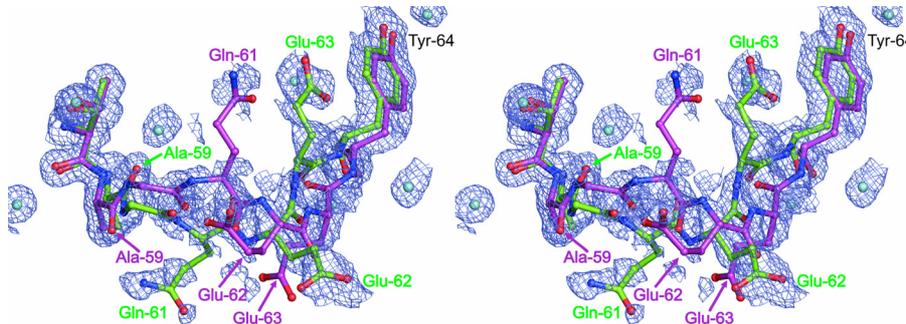


Abbildung 55: Alternative Konformationen der Aminosäurereste 59-63 in p21(mod)•GDP (grüne bzw. magenta Stäbchen). Die dargestellte $2F_o - F_c$ Elektronendichte-Karte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet ($0,4 \sigma$ cutoff-level, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)).

Gln-61 und Glu-62 sind die einzigen Aminosäurereste in der Struktur von p21(mod)•GDP, welche in schwacher Elektronendichte positioniert sind. Die Seitenketten der beiden alternativen Konformationen von Glu-63 zeigen in gegensätzliche Richtungen. Nach Glu-63 laufen die alternativen Proteinketten in Tyr-64 wieder zusammen. Im Gegensatz zu p21(mod)•R-caged GTP wurde in Aminosäureresten 67-74 von p21(mod)•GDP keine starke konformelle Heterogenität beobachtet.

Da durch die Unterschiede der Primärstrukturen von p21(mod)•GDP und p21(wt)•GDP nur minimale Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur des Proteins induziert werden, ist es wahrscheinlich, dass viele der beobachteten strukturellen Details, wie beispielsweise die beiden diskreten Sub-Konformationen im Bereich der Aminosäurereste 60-63, auch im Wildtyp-Protein vorliegen. Die Struktur von p21(mod)•GDP mag insofern gut als hochaufgelöste Modell-Struktur für das Wildtyp-Protein geeignet sein. Die hohe Auflösung der Röntgenstrukturdaten von p21(mod)•GDP erlaubt eine detailliertere Einsicht in die strukturelle Dynamik der flexiblen Regionen des Proteins, wodurch ein allgemein besseres Verständnis der Dynamik von H-Ras p21 ermöglicht wird.

5.5.6 p21(mod)•R-caged GTP→GTP

Kristalle von p21(mod)•R-caged GTP→GTP wurden durch Photolyse von p21(mod)•R-caged GTP-Kristallen gewonnen. Dazu wurden die Kristalle durch Bestrahlung mit UV-Licht (325 nm) photolysiert und direkt nach der vollständigen Photolyse von caged GTP (kontrolliert durch FLUMIX-Fluoreszenzmessungen, s. Kapitel 5.3.2.3) in flüssigem Stickstoff schockgefroren (s. Kapitel 5.1.7). Da aufgrund der kurzen Inkubationszeit kein signifikanter Anteil des entstandenen GTP zu GDP hydrolysiert wurde, konnte so der GTP-gebundene intermediäre Zustand stabilisiert werden.

Es ist nicht überraschend, dass die Struktur von p21(mod)•R-caged GTP→GTP noch mehr Ähnlichkeiten zur Ausgangsstruktur p21(mod)•R-caged GTP zeigt als die Struktur von p21(mod)•R-caged GTP→GDP (s. Kapitel 5.5.5). Signifikante Veränderungen im Vergleich zu p21(mod)•R-caged GTP wurden hauptsächlich im aktiven Zentrum des Proteins festgestellt. Die vollständige Photolyse des Nukleotids zu GTP kann anhand der Strukturdaten von p21(mod)•R-caged GTP→GTP bestätigt werden. Die Elektronendichteverteilung in den flexiblen Schalter-Regionen zeigt mehr Rauschen als in p21(mod)•R-caged GTP, was zum einen auf die etwas niedrigere Auflösung und zum anderen auf Konformationsänderungen in diesen Bereichen nach der Photolyse von caged GTP zurückzuführen ist. Thr-35 und Ile-36 sind in sehr schlecht definierter Elektronendichte positioniert, was darauf hindeutet dass die stärksten Konformationsänderungen innerhalb der Schalter-Region I in diesen Aminosäureresten stattfinden. Die Elektronendichteverteilung für die Schalter-Region I in p21(mod)•R-caged GTP→GTP ist deutlich besser definiert als in p21(mod)•R-caged GTP→GDP und nimmt eine mit der Ausgangsstruktur p21(mod)•R-caged GTP vergleichbare Konformation ein, welche dem GTP-gebundenen („ON“-Zustand von H-Ras p21 ähnelt. Thr-35 ist in Richtung des Mg²⁺-Ions orientiert, wobei die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette an Mg²⁺ koordiniert ist. Analog zur Ausgangsstruktur sind auch in p21(mod)•R-caged GTP→GTP die Aminosäurereste 61-63 in schwacher Elektronendichte positioniert. Schleife L4 ist wie in p21(mod)•R-caged GTP in einer ungewöhnlichen Konformation angeordnet, welche stark von bekannten Strukturen von p21(wt)•R-caged GTP (PDB-Eintrag 1GNR (Scheidig *et al.*, 1995)) und p21(wt)•GppNHp (PDB-Einträge 1CTQ (Scheidig *et al.*, 1999) und 5P21 (Pai *et al.*, 1990)) abweicht.

5.5.7 p21(mod)•GppNHp

Die Struktur von p21(mod)•GppNHp zeigt einige strukturelle Details, die bisher nicht in Strukturen von p21(wt) in Komplex mit GTP - analogen Nukleotiden beobachtet wurden. Die wichtigste Beobachtung ist ein zweites Mg^{2+} -Ion, welches direkt an das γ -Phosphat des Nukleotids und an ein Sauerstoff-Atom der Carbonyl-Gruppe von Glu-63 koordiniert ist (s. Abbildung 56). Das zweite Mg^{2+} -Ion bildet außerdem Wasser-vermittelte Kontakte mit Asp-33, Pro-34, Thr-35 und dem zweiten Carbonyl-Sauerstoff von Glu-63 aus. Pro-34 ist in p21(mod)•GppNHp vom Nukleotid weg bewegt, da eine Position wie in p21(wt)•GppNHp (PDB-Einträge 5P21 (Pai *et al.*, 1990) und 1CTQ (Scheidig *et al.*, 1999) mit dem zweiten Mg^{2+} -Ion überlappen würde. Die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette von Thr-35 ist, vermutlich aufgrund dieser Verzerrung in der Hauptkette der Schalter-Region I, nicht an das erste Mg^{2+} -Ion koordiniert und bildet stattdessen eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Asp-33 aus. Die relevanten Bereiche des aktiven Zentrums in p21(mod)•GppNHp sind in Abbildung 56 dargestellt.

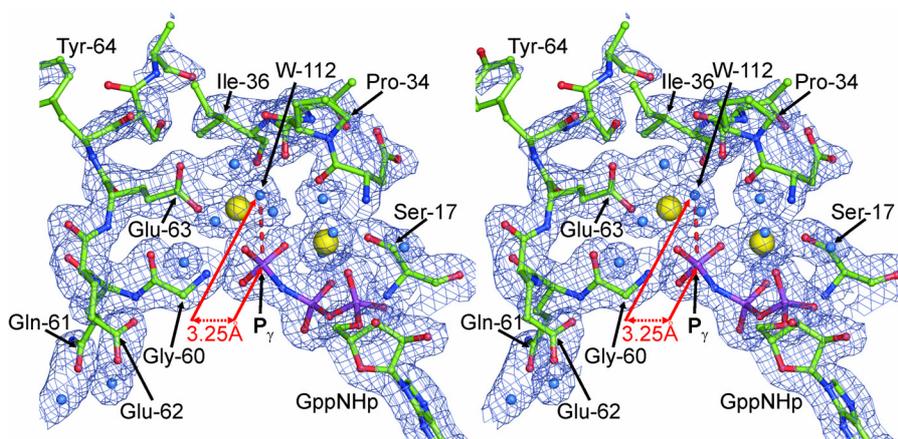


Abbildung 56: Das aktive Zentrum in p21(mod)•GppNHp. Gezeigt sind Aminosäurereste 17, 33-36 und 60-66 (grüne Stäbchen), das an zwei Mg^{2+} -Ionen (gelbe Kugeln) koordinierte Nukleotid GppNHp und umgebende Wassermoleküle (blaue Kugeln). Die dargestellte $2F_o - F_c$ Elektronendichte-Karte wurde nach der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm REFMAC5 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994) berechnet ($0,7 \sigma$ cutoff-level, dargestellt mit dem Programm PyMOL (Delano, 2002)).

Wie in Abbildung 56 zu erkennen ist, ist die Elektronendichte für Aminosäurereste 60-63 der Schalter-Region II gut definiert. Dies ist vermutlich auf die Fixierung der Seitenkette von Glu-63 durch die Koordination an das zweite Mg^{2+} -Ion und einer engen Schleife mit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff von Gly-60 und dem Stickstoff-Atom der Amidgruppe von Glu-63 zurückzuführen. Aufgrund dieser

Strukturmerkmale weicht die Konformation von Schleife L4 in p21(mod)•GppNHp deutlich von Strukturen von p21(wt)•GppNHp ab. Der zweite Teil der Schalter-Region II (Helix α_2 ; Asr 67-74) liegt in einer Konformation vor, welche den Konformationen in p21(mod)•R-caged GTP (Kristall C4) und (mit geringerer Übereinstimmung) in p21(wt)•GppNHp (PDB-Einträge 5P21 und 1CTQ) ähnelt.

Die großen Unterschiede zwischen p21(mod)•GppNHp und p21(wt)•GppNHp waren recht unerwartet. Die Mutation C118S induziert keine signifikanten Unterschiede zwischen p21(mod) und p21(wt) in der Umgebung von Ser-118. Der an Cys-32 gebundene NBD-Fluorophor ist deshalb die einzige künstlich eingeführte Gruppe mit dem Potential, die Protein-Struktur signifikant zu verändern. Die Position und Ausrichtung des Fluorophors stimmt weitgehend mit der für Tyr-32 in p21(wt)•GppNHp beobachteten Position und Ausrichtung überein. Weiterhin geht der Fluorophor keine starken Wechselwirkungen mit anderen Gruppen ein und ist in schwacher Elektronendichte in einem Lösungsmittelkanal des Kristalls positioniert. Starke Kation- $\pi/\pi-\pi$ -Stapelwechselwirkungen mit anderen Gruppen, die in einigen Regionen von p21(mod)•R-caged GTP und p21(mod)•S-caged GTP zu signifikanten Verzerrungen gegenüber dem Wildtyp-Protein führten (s. Kapitel 5.5.3 und 5.5.4), wurden in p21(mod)•GppNHp, vermutlich aufgrund der fehlenden 2-NPE-Gruppe des Nukleotids, nicht beobachtet.

Es stellt sich die Frage, warum in p21(mod)•GppNHp derart große Unterschiede zu p21(wt)•GppNHp auftreten, während die Struktur von p21(mod)•GDP praktisch identisch ist zur Struktur des entsprechenden Wildtyp-Proteins (s. Kapitel 5.5.5). In den meisten Strukturen von p21(wt) in Komplex mit GTP, GppNHp oder GppCH₂p interagiert Tyr-32 mit der γ -Phosphatgruppe eines benachbarten Moleküls (PDB - Einträge 1CTQ, 1QRA und 5P21) oder des selben Moleküls (PDB - Eintrag 6Q21 (Milburn *et al.*, 1990)). Da p21(wt) in wässriger Lösung keine Dimere bildet, ist es offensichtlich, dass es sich bei den intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Tyr-32 und der γ -Phosphatgruppe des Nukleotids eines Nachbarmoleküls um ein Kristallisations-Artefakt handelt. Durch den Austausch von Tyr-32 gegen ein Cystein mit kovalent gebundenem NBD-Fluorophor in p21(mod) wurde die Fähigkeit des Proteins, diesen artifiziellen Kristall-Kontakt zu bilden, eliminiert. Als Konsequenz können andere Interaktionen mit der γ -Phosphatgruppe aufgebaut werden. Es gibt Hinweise aus quantenmechanischen und molekularmechanischen (QM/MM) Rechnungen an p21(wt)•GTP (Klahn *et al.*, 2005), dass ein zweites Kation an

das γ -Phosphat des Nukleotids binden kann. Wie von Klahn *et al.* (2005) diskutiert wurde, würde die Anwesenheit eines zweiten Kations einige experimentelle Befunde erklären, wie den Protonierungszustand von an H-Ras p21 gebundenem GTP bei physiologischen pH-Werten (Cheng *et al.*, 2001) und eine erhöhte intrinsische GTPase-Aktivität von H-Ras p21 (Q61E) (Frech *et al.*, 1994). Die generelle Tendenz der γ -Phosphatgruppe zur Koordination an Mg^{2+} ist bereits aus Studien in wässriger Lösung (pH = 7,5) bekannt, wo GTP einen dreizähligen Komplex mit Mg^{2+} bildet (Wang *et al.*, 1998). Mit der Röntgenstruktur von p21(mod)•GppNHp konnte nun gezeigt werden, dass die Bindung eines zweiten Mg^{2+} -Ions an ein GTP-analoges Nukleotid auch innerhalb der Protein-Matrix von H-Ras p21 zumindest energetisch möglich ist. Die beobachtete Wechselwirkung ist stark genug, um eine geordnete oktaedrische Koordinationssphäre um das Mg^{2+} -Ion auszubilden, die in der Elektronendichtekarte gut erkennbar ist. Es wurde von Klahn *et al.* (2005) diskutiert, dass das zweite Kation an der Katalyse der GTP-Hydrolysereaktion beteiligt sein könnte, indem es ein Wasser-Molekül in der Nähe der γ -Phosphatgruppe fixiert. Tatsächlich fixiert das zweite Mg^{2+} -Ion in p21(mod)•GppNHp das Wasser-Molekül W-112 in einem Abstand von 3,25 Å zum γ -Phosphoratom (s. Abbildung 56). Dieser Abstand liegt deutlich unter den in Strukturen von p21(wt) beobachteten Abständen des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls zum γ -Phosphoratom (3,69 Å in PDB-Eintrag 5P21, 3,63 Å in 1CTQ, 4,74 Å in 1GNR und 3,69 Å in 1QRA).

Da der an Cys-32 gekoppelte Fluorophor in p21(mod)•GppNHp in einem Lösungsmittelkanal des Kristalls positioniert ist und keine starken Wechselwirkungen mit anderen Gruppen eingeht, kann vermutet werden, dass der Grund für die Bindung des zweiten Mg^{2+} -Ions die Eliminierung von artifiziellen intermolekularen Wechselwirkungen von Tyr-32 ist und nicht ein direkter Effekt des NBD-Fluorophors selbst. Nach diesen Überlegungen könnte die Bindung des zweiten Mg^{2+} -Ions im aktiven Zentrum von p21(mod)•GppNHp von hoher Relevanz für ein detaillierteres Verständnis der Funktionsweise von H-Ras p21 sein. Selbst wenn keine dauerhafte Koordination eines zweiten Kations in p21(wt) stattfindet, ist zumindest eine transiente Wechselwirkung vorstellbar, welche für den Hydrolyse-Mechanismus von H-Ras p21 von hoher Relevanz sein könnte. Es sollte in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob das Wildtyp-Protein ebenfalls in der Lage ist, ein zweites Kation in ähnlicher Weise wie p21(mod)•GppNHp zu binden und inwiefern diese Wechselwirkungen für den Katalyse-Mechanismus von H-Ras p21 und verwandten GTPasen von Bedeutung sind.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Kinetische Fluoreszenzspektroskopie mit dem FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer

Die kinetische Röntgen-Kristallographie ist eine leistungsfähige Methode, um die Dynamik eines biologischen Makromoleküls bei atomarer Auflösung zu untersuchen. Um den durch ein Röntgen-Diffraktionsexperiment an einem Proteinkristall gewonnenen Strukturdaten einen Punkt entlang eines Reaktionsweges zuordnen zu können, ist es oft notwendig, den Kristall-Zustand während des Diffraktionsexperimentes durch eine unabhängige Methode verfolgen zu können. Bislang stehen jedoch nur wenige Methoden zur Verfügung, die sich mit dem komplexen Aufbau eines Röntgendiffraktometers, insbesondere einer Synchrotron-Messstation, kombinieren lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenzspektrometer für kinetische Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinkristallen hergestellt, welches in Kombination mit einem Röntgendiffraktometer eingesetzt werden kann (FLUMIX). Durch Fluoreszenzmessungen mit dem FLUMIX-Spektrometer steht damit eine Methode zur Verfügung, um während der Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsdaten den Zustand eines Proteinkristalls anhand eines unabhängigen Messsignals verfolgen zu können. Aufgrund der Realisierung einer 0° -Geometrie des Spektrometer-Strahlengangs und der Verwendung von Komponenten, die einen sehr flexiblen Aufbau ermöglichen, lässt sich das FLUMIX-Spektrometer leicht in die Konfigurationen von verschiedenen Röntgendiffraktometern integrieren. Zusätzlich kann das Spektrometer auch für andere Anwendungen eingesetzt werden, wie beispielsweise für die Reaktionsinitiierung und für Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinkristallen in einem Kristallisationsansatz. Durch die Verwendung eines *Dual-Mode* He-Cd-Lasers als Lichtquelle mit Emissionswellenlängen von 325 nm und 441,6 nm kann mit dem FLUMIX-Spektrometer eine Reaktion in einem Proteinkristall durch Bestrahlung mit UV-Licht initiiert werden und eine daraus resultierende Fluoreszenzänderung durch gleichzeitige Fluoreszenzanregung mit blauem Licht verfolgt werden.

Als biologisches Modellsystem wurde die langsame GTPase H-Ras p21 verwendet, welche bei einer Veränderung des an das Protein gebundenen Nukleotids starke Veränderungen in zwei als Schalter-Regionen bezeichneten Bereichen durchläuft. Anhand dieses

Modellsystems konnte gezeigt werden, dass kinetische Fluoreszenzuntersuchungen an Proteinkristallen sich nicht auf einige Spezialfälle beschränken, sondern sich unter gewissen Voraussetzungen auch an Systemen anwenden lassen, die wie H-Ras p21 im unmodifizierten Zustand weder über eine intrinsische Fluoreszenz noch über eine Möglichkeit zur Reaktionsinitiierung im kristallinen Zustand verfügen. Ein NBD-Fluorophor (IANBD Amid) wurde kovalent an ein künstlich eingeführtes Cystein in der Schalter-Region I des Proteins gebunden, um im Kristall stattfindende Veränderungen anhand von Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors verfolgen zu können. Um eine Möglichkeit zur Reaktionsinitiierung zu schaffen, wurde das an das Protein gebundene Nukleotid gegen Photolyse-labiles *caged* GTP ausgetauscht. Durch Bestrahlung mit UV-Licht konnte dieses lichtempfindliche GTP-Analogon in kristallisiertem Protein zu GTP und 2-Nitrosoacetophenon gespalten werden, um so die GTP-Hydrolyse in allen Proteinmolekülen synchron zu starten.

Bei der Photolyse von *caged* GTP in kristallinem p21(mod) wurde ein starker Fluoreszenzanstieg aufgrund von Konformationsänderungen im Protein beobachtet, der von einem kleineren und langsamen Fluoreszenzabfall während der Hydrolyse von freigesetztem GTP zu GDP gefolgt wurde. Das Ausmaß des anfänglichen Fluoreszenzanstiegs hing nicht nur von der Vollständigkeit der *caged* GTP-Photolyse, sondern auch von der Qualität des gebildeten intermediären, GTP-gebundenen Zustands ab. Kristalle, welche in einem Nylon-Faden mit einer sehr geringen Menge an umgebendem Reservoir-Volumen photolysiert wurden, zeigten einen geringeren anfänglichen Fluoreszenzanstieg als Kristalle, welche in einem Kristallisationsansatz nach der Methode des hängenden Tropfens in einem Reservoirvolumen von etwa 2 µl photolysiert wurden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im hängenden Tropfen das Photolyseprodukt 2-Nitrosoacetophenon frei diffundieren konnte, was im Nylon-loop nur eingeschränkt möglich war. Anhand des Faktors des anfänglichen Fluoreszenzanstiegs konnte somit auf die Qualität des gebildeten intermediären, GTP-gebundenen Zustands zurückgeschlossen werden. Auf diese Weise konnten FLUMIX-Fluoreszenzmessungen zur Optimierung der Akkumulation des GTP-gebundenen Zustandes von H-Ras p21 eingesetzt werden.

In Röntgen-Radiolyseexperimenten an Proteinkristallen haben sich kombinierte Fluoreszenzuntersuchungen mit dem FLUMIX-Spektrometer bewährt, um den Zustand eines Proteinkristalls während eines Diffraktionsexperimentes verfolgen zu können. Mit Hilfe des FLUMIX-Fluoreszenzspektrometers war es erstmals möglich, anhand von

röntgeninduzierten Fluoreszenzänderungen in Kristallen von p21(mod) zeitaufgelöst kleine Veränderungen nachzuweisen, welche sich nicht in einer deutlichen Veränderung der Diffraktionsfähigkeit der Kristalle äußerten. So zeigten Röntgen-Radiolyseexperimente an einer Synchrotron-Messstation bei 100 K einen starken Fluoreszenzabfall in Kristallen von p21(mod), welcher in einigen Fällen bereits nach wenigen Sekunden Röntgen-Exposition zu einer fast vollständigen Fluoreszenzbleichung der Proteinkristalle führte, ohne dass eine signifikante Minderung der Diffraktionsfähigkeit der Kristalle beobachtet wurde. In allen untersuchten Kristallen war die Röntgen-Dosis, nach der ein signifikanter Fluoreszenzabfall beobachtet wurde, klein gegenüber der typischen Dosis, die für die Aufnahme eines vollständigen röntgenographischen Datensatzes benötigt wird. FLUMIX-Fluoreszenzexperimente sind insofern eine äußerst vielversprechende Methode, um das Ausmaß von Röntgen-induzierten Veränderungen in einem Proteinkristall, wie beispielsweise Strahlschaden, während der Aufnahme eines kristallographischen Datensatzes quantifizieren zu können.

Die röntgeninduzierte Radiolyse von Nukleotid-Analoga mit einer photolabilen Schutzgruppe wie *caged* GTP wurde von Ursby *et al.* (2002) als Methode zur Reaktionsinitiierung in einem Proteinkristall unter Kryo-Bedingungen vorgeschlagen. Die an p21(mod) durchgeführten Fluoreszenzmessungen weisen jedoch darauf hin, dass zusätzliche, unerwünschte Veränderungen des Proteinkristalls aufgrund der Röntgen-Exposition auftreten können. Für eine Reaktionsinitiierung durch röntgeninduzierte Radiolyse von Nukleotid-Analoga mit einer photolabilen Schutzgruppe müssen folglich die Radiolyse-Bedingungen wie Röntgen-Wellenlänge, Intensität der Röntgenstrahlung, Temperatur und Belichtungszeit sorgfältig optimiert werden, um solche Nebenreaktionen auszuschließen. Dabei können FLUMIX-Fluoreszenzexperimente als höchst sensitive Methode eingesetzt werden, um kleine Veränderungen im Proteinkristall während der Radiolyse zu verfolgen.

Zusammenfassend hat sich das FLUMIX-Fluoreszenzspektrometer bewährt, um zerstörungsfrei detaillierte Informationen über den Zustand eines Proteinkristalls zu erhalten. Das FLUMIX-Spektrometer wurde hauptsächlich für den Einsatz in der Röntgenkristallographie hergestellt, aber es kann auch in vielen anderen Bereichen zum Einsatz kommen, wo kinetische Fluoreszenzmessungen an Volumina im Nanoliter-Bereich notwendig sind.

6.2 Kristallstrukturanalyse an p21(mod)

Um eine Interpretation der durch FLUMIX-Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Messdaten anhand von strukturellen Veränderungen im Proteinkristall zu ermöglichen, wurde die Struktur des Proteins p21(mod) im Komplex mit verschiedenen Nukleotiden durch Kristallstrukturanalyse bestimmt. Die Analyse der Strukturdaten offenbarte eine weitgehende Übereinstimmung des modifizierten Proteins mit dem Wildtyp-Protein p21(wt). Es wurden jedoch verschiedene strukturelle Details beobachtet, die von den entsprechenden Strukturen von p21(wt) abwichen oder in diesen nicht sichtbar waren. Es konnte gezeigt werden, dass mehrere dieser beobachteten strukturellen Details einen wichtigen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Funktionsweise von H-Ras p21 im Allgemeinen leisten können.

Die meisten der erhaltenen Datensätze erlaubten aufgrund der hohen erreichten Datenqualität (in Bezug auf Auflösung und Signalstärke) die Unterscheidung von zwei diskreten Konformationen für die gesamte Proteinkette, wodurch die Strukturqualität erheblich verbessert werden konnte. Signifikante Abweichungen zwischen den beiden Konformationen wurden hauptsächlich in den flexiblen Schalter-Regionen des Proteins beobachtet. Es ist wahrscheinlich, dass ähnliche konformelle Heterogenitäten auch im Wildtyp-Protein vorliegen, aber erst bei der Verfügbarkeit von hochaufgelösten Röntgenstrukturdaten richtig interpretiert werden können.

Die Struktur von p21(mod)•GDP ist nahezu identisch mit der Wildtyp-Struktur p21(wt)•GDP, was beweist, dass die eingeführten Modifikationen (Y32C, C118S, C32-IANBD-amid) nicht notwendigerweise eine artifizielle Protein-Faltung induzieren. Da zur Zeit keine Struktur von p21(wt)•GDP mit mehr als 2 Å Auflösung zur Verfügung steht, kann die Struktur von p21(mod)•GDP mit 1 Å Auflösung als hochaufgelöste Modellstruktur für H-Ras p21 im GDP-gebundenen Zustand eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Kristalle von p21(mod)•R-caged GTP→GDP, welche durch Photolyse von caged GTP und anschließende GTP-Hydrolyse im kristallinen Protein gewonnen wurden, starke Abweichungen zum Wildtyp-Protein p21(wt)•GDP. Einige Regionen des Proteins ähneln mehr der Ausgangsstruktur p21(mod)•R-caged GTP als der Struktur von p21(wt)•GDP, obwohl die Elektronendichte in der Umgebung des Nukleotids deutlich die vollständige Hydrolyse zu GDP zeigt. Die Regionen, in welchen während der GTP-Hydrolyse die stärksten Umlagerungen stattfinden, zeigen in p21(mod)•R-caged GTP→GDP eine

uninterpretierbare Elektronendichteverteilung, vermutlich weil diese Regionen in verschiedenen lokalen Minima gefangen wurden. Es war eine allgemeine Beobachtung, dass Gruppen, welche während einer Reaktion im kristallinen Protein große konformelle Umlagerungen durchlaufen, nach Beendigung der Reaktion keine einheitlichen Positionen mehr einnehmen.

In Kristallen von p21(mod) in Komplex mit R-*caged* GTP und S-*caged* GTP war die Nitro-Gruppe von *caged* GTP in Bezug auf das chirale Kohlenstoffatom der 2-NPE-Gruppe des Nukleotids anders orientiert als in der publizierten Struktur von p21(wt)•R-*caged* GTP (Scheidig *et al.*, 1995). Dies hat wichtige Konsequenzen für die Stabilität von *caged* GTP und für den Mechanismus der *caged* GTP-Photolyse in kristallinem p21(mod). Ein Mechanismus, welcher die Bildung einer bizyklischen Spezies erfordert, wie von Walker *et al.* (1989) für die *caged* ATP-Photolyse vorgeschlagen wurde, ist unwahrscheinlich, da für einen solchen Mechanismus große Atom- und Gruppenbewegungen notwendig wären. Stattdessen ist eine direkte Reaktion von einer photolytisch gebildeten Nitronsäure zu einer Hemi-Acetal-Spezies, wie von Corrie *et al.* (2003) diskutiert wurde, wahrscheinlicher. Die Orientierung der 2-NPE-Gruppe ist vermutlich auch die Ursache für die deutlich höhere Hydrolysegeschwindigkeit von *caged* GTP zu GDP und *caged* P_i in p21(mod)•S-*caged* GTP, im Vergleich zu p21(mod)•R-*caged* GTP. Wechselwirkungen zwischen der Nitro-Gruppe von *caged* GTP in p21(mod)•S-*caged* GTP mit der Schalter-Region I, welche in p21(mod)•R-*caged* GTP nicht auftreten, induzieren konformelle Änderungen, welche in einer stärkeren Aktivierung des hydrolytisch aktiven Wassermoleküls und somit in einer erhöhten Hydrolysegeschwindigkeit resultieren.

Ein unerwartetes, aber für das Verständnis der Funktionsweise von H-Ras p21 sehr bedeutsames Ergebnis war die Identifizierung eines zweiten Mg²⁺-Ions im aktiven Zentrum von p21(mod)•GppNHp, welches im Wildtyp-Protein bisher nicht beobachtet wurde. Das zweite Mg²⁺-Ion positioniert das hydrolytisch aktive Wassermolekül in einem Abstand von 3,25 Å zum γ-Phosphor-Atom des Nukleotids, was wesentlich unter den Abständen in Strukturen des Wildtyp-Proteins in Komplex mit GTP-analogen Nukleotiden liegt. Die Koordination eines zweiten Kations an die γ-Phosphatgruppe wurde bereits in kombinierten quantenmechanischen und molekularmechanischen (QM/MM) Berechnungen an p21(wt)•GTP vorhergesagt (Klahn *et al.*, 2005) und ist möglicherweise auch für den GTP-Hydrolysemechanismus von H-Ras p21 im Allgemeinen relevant. Es sollte in weiteren

Experimenten geklärt werden, ob das Wildtyp-Protein in ähnlicher Weise in der Lage ist, ein zweites Mg^{2+} -Ion zu binden und inwiefern diese im Wildtyp-Protein möglicherweise nur transient auftretenden Wechselwirkungen für den Katalysemechanismus von H-Ras p21 und verwandten GTPasen von Bedeutung sind.

Literatur

- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K. und Wittinghofer, A. (1997) Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 686-689.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- Antonny, B., Chardin, P., Roux, M. und Chabre, M. (1991) GTP hydrolysis mechanisms in ras p21 and in the ras-GAP complex studied by fluorescence measurements on tryptophan mutants. *Biochemistry* **30**, 8287-8295.
- Atkins, P.W. (1990) Physikalische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A. und Hajdu, J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**, 463-468.
- Bos, J.L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.
- Bourgeois, D., Vernede, X., Adam, V., Fioravanti, E. und Ursby, T. (2002) A microspectrophotometer for UV-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals. *J. Appl. Cryst.* **35**, 319-326.
- Bradford, 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.
- Chen, Y., Srajer, V., Ng, K., LeGrand, A. und Moffat, K. (1994) Optical monitoring of protein crystals in time-resolved x-ray experiments: Microspectrophotometer design and performance. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 1506-1511.
- Cheng, H., Sukal, S., Deng, H., Leyh, T.S. und Callender, R. (2001) Vibrational structure of GDP and GTP bound to RAS: an isotope-edited FTIR study. *Biochemistry* **40**, 4035-4043.
- Chung, C.T. und Miller, R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3580.
- Collaborative Computational Project Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760-763.
- Corrie, J.E., Barth, A., Munasinghe, V.R., Trentham, D.R. und Hutter, M.C. (2003) Photolytic cleavage of 1-(2-nitrophenyl)ethyl ethers involves two parallel pathways and product release is rate-limited by decomposition of a common hemiacetal intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8546-8554.

- Dambe, T. R. (2004) Strukturelle Untersuchungen an 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. und SoxXA aus *Paracoccus pantotrophus*. Dissertation, MPI für molekulare Physiologie (Dortmund) und Universität des Saarlandes (Homburg).
- de Vos, A.M., Tong, L., Milburn, M.V., Matias, P.M., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E. und Kim, S.H. (1988) Three-dimensional structure of an oncogene protein: catalytic domain of human c-H-ras p21. *Science* **239**, 888-893.
- Delano, W.L. (2002) The pymol molecular graphics system. on World Wide Web <http://www.pymol.org>.
- Drenth, J. (1994) Principles in Protein Crystallography. Springer-Verlag, Inc., New York, USA.
- Duke, E.M., Wakatsuki, S., Hadfield, A. und Johnson, L.N. (1994) Laue and monochromatic diffraction studies on catalysis in phosphorylase b crystals. *Protein Sci.* **3**, 1178-1196.
- Eisinger, J. und Flores, J. (1979) Front-face fluorometry of liquid samples. *Anal. Biochem.* **94**, 15-21.
- Engh, R.A. und Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr. A* **47**, 392-400.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Feuerstein, J., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1987) Preparation and characterization of nucleotide-free and metal ion-free p21 "apoprotein". *J. Biol. Chem.* **262**, 8455-8458.
- Frech, M., Darden, T.A., Pedersen, L.G., Foley, C.K., Charifson, P.S., Anderson, M.W. und Wittinghofer, A. (1994) Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* **33**, 3237-3244.
- Garman, E.F. und Schneider, T.R. (1997) Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.
- Goody, R.S., Pai, E.F., Schlichting, I., Rensland, H., Scheidig, A., Franken, S. und Wittinghofer, A. (1992) Studies on the structure and mechanism of H-ras p21. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **336**, 3-10.
- Hadfield, A. und Hajdu, J. (1993) A fast and portable microspectrophotometer for protein crystallography. *J. Appl. Cryst.* **26**, 839-842.
- Hajdu, J., Neutze, R., Sjogren, T., Edman, K., Szoke, A., Wilmouth, R.C. und Wilmot, C.M. (2000) Analyzing protein functions in four dimensions. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1006-1012.
- Herrmann, C. (2003) Ras-effector interactions: after one decade. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 122-129.

- Hwang, Y.W. und Miller, D.L. (1987) A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 13081-13085.
- John, J., Schlichting, I., Schiltz, E., Rosch, P. und Wittinghofer, A. (1989) C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 13086-13092.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1990) Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110-119.
- Kabsch, W. (1988) Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. *J. Appl. Cryst.* **21**, 916-924.
- Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800.
- Karlsson, A., Parales, J.V., Parales, R.E., Gibson, D.T., Eklund, H. und Ramaswamy, S. (2000) The reduction of the Rieske iron-sulfur cluster in naphthalene dioxygenase by X-rays. *J. Inorg. Biochem.* **78**, 83-87.
- Kasha, M. (1950) Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Disc. Faraday Soc.* **9**, 14-19.
- Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T. und Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *J. Appl. Cryst.* **33**, 1223-1230.
- Klahn, M., Schlitter, J. und Gerwert, K. (2005) Theoretical IR spectroscopy based on QM/MM calculations provides changes in charge distribution, bond lengths, and bond angles of the GTP ligand induced by the Ras-protein. *Biophys. J.* **88**, 3829-3844.
- Kleywegt, G.J., Zou, J.Y., Kjeldgaard, M. und Jones, T.A. (2001) Around O. In *International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules* (ed. Rossmann, M.G. und Arnold, E.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Dordrecht, 353-367.
- Krämer, A. U. (2001) Untersuchungen zur Interaktion von humanem Ras und Rap mit regulatorischen Proteinen. Dissertation, Dortmund, MPI für molekulare Physiologie.
- Krengel, U., Schlichting, L., Scherer, A., Schumann, R., Frech, M., John, J., Kabsch, W., Pai, E.F. und Wittinghofer, A. (1990) Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**, 539-548.

- 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. (1993) Procheck - A Programm to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283.
- McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P. und Willard, F.S. (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 551-577.
- McRee, D.E. (1999) Practical Protein Crystallography. Academic Press, San Diego USA.
- Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. und Kim, S.H. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- Moore, K.J., Webb, M.R. und Eccleston, J.F. (1993) Mechanism of GTP hydrolysis by p21N-ras catalyzed by GAP: studies with a fluorescent GTP analogue. *Biochemistry* **32**, 7451-7459.
- Mozzarelli, A. und Rossi, G.L. (1996) Protein function in the crystal. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 343-365.
- Nave, C. und Garman, E.F. (2005) Towards an understanding of radiation damage in cryocooled macromolecular crystals. *J. Synchrotron. Radiat.* **12**, 257-260.
- Neal, S.E., Eccleston, J.F. und Webb, M.R. (1990) Hydrolysis of GTP by p21NRAS, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3562-3565.
- O'Hara, P., Goodwin, P. und Stoddard, B.L. (1995) Direct measurement of diffusion rates in enzyme crystals by video absorbance spectroscopy. *J. Appl. Cryst.* **28**, 829-834.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods Enzymol.* Academic Press, 307-326.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. und Wittinghofer, A. (1989) Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Pai, E.F., Krengel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. und Wittinghofer, A. (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Pereira-Leal, J.B. und Seabra, M.C. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**, 889-901.

- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K.S. und Lamzin, V.S. (2001) ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 1445-1450.
- Praefcke, G.J. und McMahon, H.T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147.
- Prive, G.G., Milburn, M.V., Tong, L., de Vos, A.M., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. und Kim, S.H. (1992) X-ray crystal structures of transforming p21 ras mutants suggest a transition-state stabilization mechanism for GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3649-3653.
- Ramachandran, G.N. und Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-483.
- Read, R. (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr. A* **42**, 140-149.
- Ren, Z., Perman, B., Srajer, V., Teng, T.Y., Pradervand, C., Bourgeois, D., Schotte, F., Ursby, T., Kort, R., Wulff, M. und Moffat, K. (2001) A molecular movie at 1.8 Å resolution displays the photocycle of photoactive yellow protein, a eubacterial blue-light receptor, from nanoseconds to seconds. *Biochemistry* **40**, 13788-13801.
- Rensland, H., John, J., Linke, R., Simon, I., Schlichting, I., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1995) Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry* **34**, 593-599.
- Rensland, H., Lautwein, A., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1991) Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* **30**, 11181-11185.
- Rhodes, G. (2000) *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Rodgers, D.W. (1997) Practical cryocrystallography. In *Methods in Enzymology* (ed. Carter, C.W., Jr. und Sweet, R.M.) Academic Press, New York, **276** 183-203.
- Sakai, K., Matsui, Y., Kouyama, T., Shiro, Y. und Adachi, S.i. (2002) Optical monitoring of freeze-trapped reaction intermediates in protein crystals: a microspectrophotometer for cryogenic protein crystallography. *J. Appl. Cryst.* **35**, 270-273.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. und Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338.
- Scheidig, A.J., Burmester, C. und Goody, R.S. (1998) Use of caged nucleotides to characterize unstable intermediates by X-ray crystallography. *Methods Enzymol.* **291**, 251-264.

- Scheidig, A.J., Burmester, C. und Goody, R.S. (1999) The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure. Fold. Des* **7**, 1311-1324.
- Scheidig, A.J., Franken, S.M., Corrie, J.E., Reid, G.P., Wittinghofer, A., Pai, E.F. und Goody, R.S. (1995) X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21H-ras complexed with caged GTP and mant dGppNHp. *J. Mol. Biol.* **253**, 132-150.
- Scheidig, A.J., Sanchez-Llorente, A., Lautwein, A., Pai, E.F., Corrie, J.E., Reid, G.P., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1994) Crystallographic studies on p21(H-ras) using the synchrotron Laue method: improvement of crystal quality and monitoring of the GTPase reaction at different time points. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **50**, 512-520.
- Scherer, A., John, J., Linke, R., Goody, R.S., Wittinghofer, A., Pai, E.F. und Homes, K.C. (1989) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the human c-H-ras-oncogene product p21 complexed with GTP analogues. *J. Mol. Biol.* **206**, 257-259.
- Schlichting, I. (2000) Crystallographic structure determination of unstable species. *Acc. Chem. Res.* **33**, 532-538.
- Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F., Petsko, G.A. und Goody, R.S. (1990) Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* **345**, 309-315.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A. und Sligar, S.G. (2000) The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* **287**, 1615-1622.
- Schlichting, I., Rapp, G., John, J., Wittinghofer, A., Pai, E.F. und Goody, R.S. (1989) Biochemical and crystallographic characterization of a complex of c-Ha-ras p21 and caged GTP with flash photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7687-7690.
- Schlichting, I. und Goody, R.S. (1997) [24] Triggering methods in crystallographic enzyme kinetics. In *Methods in Enzymology* Academic Press, 467-490.
- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R.H., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1996) Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene* **12**, 87-96.
- Sjogren, T., Carlsson, G., Larsson, G., Hajdu, A., Andersson, C., Pettersson, H. und Hajdu, J. (2002) Protein crystallography in a vapour stream: data collection, reaction initiation and intermediate trapping in naked hydrated protein crystals. *J. Appl. Cryst.* **35**, 113-116.
- Skelly, J.V., Suter, D.A., Kuroda, R., Neidle, S., Hancock, J.F. und Drake, A. (1990) Conformational effects of nucleotide exchange in ras p21 proteins as studied by fluorescence spectroscopy. *FEBS Lett.* **262**, 127-130.

- Specht, A., Ursby, T., Weik, M., Peng, L., Kroon, J., Bourgeois, D. und Goeldner, M. (2001) Cryophotolysis of ortho-nitrobenzyl derivatives of enzyme ligands for the potential kinetic crystallography of macromolecules. *Chembiochem.* **2**, 845-848.
- Spoerner, M., Herrmann, C., Vetter, I.R., Kalbitzer, H.R. und Wittinghofer, A. (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4944-4949.
- Spoerner, M., Nuehs, A., Ganser, P., Herrmann, C., Wittinghofer, A. und Kalbitzer, H.R. (2005) Conformational states of Ras complexed with the GTP analogue GppNHp or GppCH2p: implications for the interaction with effector proteins. *Biochemistry* **44**, 2225-2236.
- Srajer, V., Teng, T., Ursby, T., Pradervand, C., Ren, Z., Adachi, S., Schildkamp, W., Bourgeois, D., Wulff, M. und Moffat, K. (1996) Photolysis of the carbon monoxide complex of myoglobin: nanosecond time-resolved crystallography. *Science* **274**, 1726-1729.
- Srinivasan, R. (1966) Weighting functions for use in the early stage of structure analysis when a part of the structure is known. *Acta Crystallogr.* **20**, 143-144.
- Stoddard, B.L. (1998) New results using Laue diffraction and time-resolved crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 612-618.
- Stoddard, B.L. und Farber, G.K. (1995) Direct measurement of reactivity in the protein crystal by steady-state kinetic studies. *Structure.* **3**, 991-996.
- Stoddard, B.L. (2001) Trapping Reaction Intermediates in Macromolecular Crystals for Structural Analyses. *Methods* **24**, 125-138.
- Stouten, P.F., Sander, C., Wittinghofer, A. und Valencia, A. (1993) How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Lett.* **320**, 1-6.
- Szabo, A. und Ostlund, N.S. (1989) Introduction to Advanced Electronic Structure Theory. McGraw-Hill, New York ; Hamburg.
- Tong, L., Milburn, M.V., de Vos, A.M. und Kim, S.H. (1989) Structure of ras proteins. *Science* **245**, 244.
- Tong, L.A., de Vos, A.M., Milburn, M.V. und Kim, S.H. (1991) Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J. Mol. Biol.* **217**, 503-516.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1986) Expression of p21 proteins in Escherichia coli and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.* **5**, 1351-1358.
- Unwin, P.N. und Henderson, R. (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* **94**, 425-440.

- Ursby, T., Weik, M., Fioravanti, E., Delarue, M., Goeldner, M. und Bourgeois, D. (2002) Cryophotolysis of caged compounds: a technique for trapping intermediate states in protein crystals. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**, 607-614.
- Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-1304.
- Walker, J.W., Feeney, J. und Trentham, D.R. (1989) Photolabile precursors of inositol phosphates. Preparation and properties of 1-(2-nitrophenyl)ethyl esters of myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochemistry* **28**, 3272-3280.
- Wang, J.H., Xiao, D.G., Deng, H., Callender, R. und Webb, M.R. (1998) Vibrational study of phosphate modes in GDP and GTP and their interaction with magnesium in aqueous solution. *Biospectroscopy*. **4**, 219-227.
- Weik, M., Vernede, X., Royant, A. und Bourgeois, D. (2004) Temperature derivative fluorescence spectroscopy as a tool to study dynamical changes in protein crystals. *Biophys. J.* **86**, 3176-3185.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. und Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843-846.
- Winn, M.D., Isupov, M.N. und Murshudov, G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D* **57**, 122-133.
- Wittinghofer, A. (2006) Phosphoryl transfer in Ras proteins, conclusive or elusive? *Trends Biochem. Sci.* **31**, 20-23.
- Wu, J., Gage, D.A. und Watson, J.T. (1996) A Strategy to locate cysteine residues in proteins by specific chemical cleavage followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **235**, 161-174.
- Yamasaki, K., Shirouzu, M., Muto, Y., Fujita-Yoshigaki, J., Koide, H., Ito, Y., Kawai, G., Hattori, S., Yokoyama, S. und Nishimura, S. (1994) Site-directed mutagenesis, fluorescence, and two-dimensional NMR studies on microenvironments of effector region aromatic residues of human c-Ha-Ras protein. *Biochemistry* **33**, 65-73.
- Zerial, M. und Huber, L.A. (1995) Guidebook to the Small GTPases. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Zerial, M. und McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117.

Lebenslauf

persönliche Daten:

Name: Björn Udo Klink
Geburtstag: 30. Mai 1975
Geburtsort: Dortmund
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
Staatsangehörigkeit: deutsch
Vater: Heinz Klink
Mutter: Iris Klink (verstorben)
Stiefmutter: Jeanette Klink (ehemals Schön, geb. Schadkowski)

Schulbildung:

1982 – 1985: Grundschule: Adolf-Kolping-Schule in Hüingsen
1986 – 1994: Gymnasium: Walram-Gymnasium in Menden

Wehrdienst:

1994 – 1995: Luftwaffe, Kasernen in Ulmen und Arolsen

Studium und Promotion:

1996: Beginn des Chemiestudiums an der Universität in Dortmund.
1/2000-6/2000: Auslandsaufenthalt an der Universität in Reading, England unter der Betreuung von Prof. Dr. M. Bowker.
Thema: *Angular resolved molecular beam studies of CO oxidation on the Pt{110}(1x2) surface.*
2000 - 2001: Diplomarbeit am Max Planck Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. M. Engelhard.
Thema: *Druckabhängigkeit des Photozyklus von Bakteriorhodopsin.*
4/2001-4/2003: Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel J. Scheidig.
Thema: *Entwicklung eines Fluoreszenzspektrometers zur Untersuchung von intermediären Zuständen in der Röntgenkristallographie.*
4/2003: Wechsel des Arbeitskreises an die Universität des Saarlandes in Homburg

Homburg, 25. Juli 2006