

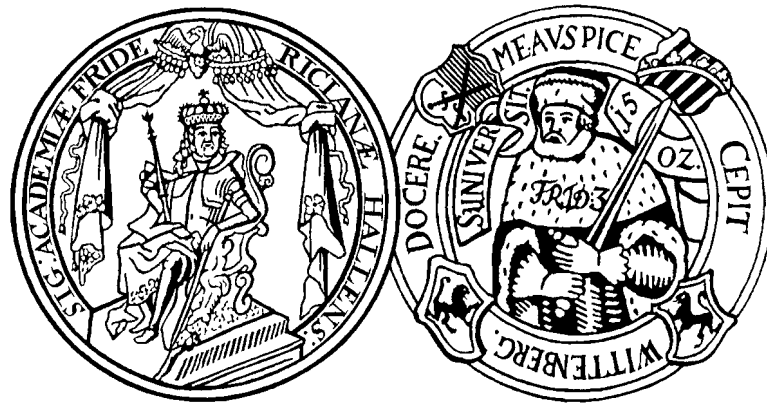
Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an bakteriellen Kälteschockproteinen:

Charakterisierung eines durch Kälte denaturierenden Proteins und Bindung einzelsträngiger RNA

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Rolf Sachs
geboren am 15. September 1980
in Wolfen

Diese Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Oktober 2010 am Lehrstuhl für Biophysik des Instituts für Physik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Balbach angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht im November 2010

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 06. September 2011

Gutachter:

Prof. Dr. Milton T. Stubbs

Prof. Dr. Jochen Balbach

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie der Anpassung an veränderliche Temperaturen.....	1
1.2	Bakterielle Kälteschockproteine und deren Rolle beim Kälteschock.....	3
1.3	Bakterielle Kälteschockproteine als Modellproteine der Proteinfaltung und Proteinstabilität	7
1.4	Das Phänomen der Kältedenaturierung	10
1.5	Das Kälteschockprotein <i>Bc-Csp R3E L66E</i> beim Studium der Kältedenaturierung.....	12
1.6	Ziele dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Molekularbiologische Methoden	16
2.1.1	Herstellung und Transformation CaCl_2 -kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	16
2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	17
2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	17
2.1.4	Klonierung einer Variante des Kälteschockproteins von <i>Bacillus</i> <i>caldolyticus</i> in den pET11a-Vektor	17
2.1.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow	18
2.2	Zellbiologie und Proteinreinigungsmethoden.....	19
2.2.1	Rekombinante Expression von Kälteschockproteinen in Vollmedium	20
2.2.2	Rekombinante Expression von Kälteschockproteinen in Minimalmedium	20
2.2.3	Bakterieller Aufschluss.....	21
2.2.4	Anionenaustauschchromatographie	21
2.2.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie	21
2.2.6	Größenausschlusschromatographie	22
2.2.7	Pufferlösungen zur Proteinreinigung	22
2.2.8	Präparation von <i>Bs-CspB</i> -Oligonukleotidkomplexen	23
2.3	Optische Spektroskopie	24
2.3.1	Photometrische Bestimmung von Protein- und Oligonukleotidkonzentrationen	24
2.3.2	Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von <i>Bs-</i> <i>CspB</i> -Oligonukleotidkomplexen mittels Fluoreszenzspektroskopie..	25
2.3.3	Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von <i>Bs-CspB</i> -Oligonukleotidkomplexen mittels <i>stopped-flow-</i> Fluoreszenzspektroskopie	26
2.3.4	Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge.....	27
2.4	Isothermale Titrationskalorimetrie	29
2.5	NMR-Spektroskopie	30
2.5.1	^1H - ^{15}N NMR-Korrelationspektroskopie zur Detektion von <i>Bs-CspB-</i> Oligonukleotid-Titrationsen	30

2.5.2	Dreidimensionale Experimente zur Rückgratzuordnung.....	31
2.5.3	¹ H- ¹⁵ N-Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie.....	32
2.6	Kristallstrukturanalyse	33
2.6.1	Proteinkristallisation	33
2.6.2	Einfrieren von Proteinkristallen.....	35
2.6.3	Aufnahme von Röntgenstreubildern.....	35
2.6.4	Indizierung und Integration von Reflexen	38
2.6.5	Molekularer Ersatz zur Lösung des Phasenproblems	39
2.6.6	Berechnung von Elektronendichtekarten.....	41
2.6.7	Strukturverfeinerung	42
2.6.8	Bewertung und Validierung der Struktur.....	44
2.6.9	Visuelle Darstellung der molekularen Struktur	45
3	Der chemisch-entfaltete Zustand von <i>Bc</i>-Csp R3E L66E	46
3.1	Ergebnisse	46
3.1.1	Stabilität von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E	46
3.1.2	NMR-Spektroskopische Charakterisierung des mittels Harnstoff entfalteten <i>Bc</i> -Csp R3E L66E.....	48
3.2	Diskussion- <i>Bc</i> -Csp R3E L66E, ein geeignetes Protein zur Untersuchung der Kältedenaturierung mittels multidimensionaler NMR-Spektroskopie	52
4	Bindung einzelsträngiger RNA an das Kälteschockprotein B aus <i>Bacillus subtilis</i>	55
4.1	Ergebnisse	55
4.1.1	Bindungsaffinität einzelsträngiger RNA an <i>Bs</i> -CspB	55
4.1.2	Kinetik der Oligonukleotidbindung an <i>Bs</i> -CspB	57
4.1.3	Thermodynamik der Oligonukleotidbindung an <i>Bs</i> -CspB	58
4.1.4	NMR-Titration von <i>Bs</i> -CspB mit einzelsträngiger RNA	60
4.2	Diskussion.....	62
4.2.1	<i>Bs</i> -CspB bindet ssRNA mit geringerer Affinität als ssDNA.....	63
4.2.2	Ort der ssRNA-Bindung an <i>Bs</i> -CspB in Lösung	66
5	Kristallstruktur des Kälteschockproteins B aus <i>Bacillus subtilis</i> im Komplex mit einzelsträngiger RNA	68
5.1	Ergebnisse	68
5.1.1	Kristallstrukturbestimmung	68
5.1.2	Strukturelle Organisation des Liganden	73
5.1.3	Ligandenbindungsoberfläche und Protein-Ligand-Interaktionen.....	75
5.2	Diskussion.....	77
5.2.1	Identifizierung von vier ssRNA-Bindetaschen.....	78
5.2.2	Gegenüberstellung der strukturellen Ergebnisse aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie	79
5.2.3	Die Bindung von <i>Bs</i> -CspB an einzelsträngige RNA und die Auswirkungen auf die Funktion	82
	Zusammenfassung	88
	Weitere wissenschaftliche Ergebnisse und Publikationen	90
	Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1.....	90
	Interaktion des Alzheimer β -Amyloid-Peptids (1-40) mit der Antikörperdomäne B10.....	92

Interaktion des β -Amyloid-Peptids (1-40) mit der Peptidyl-Prolyl-cis/trans- Isomerase Cyclophilin F	95
Listen und Verzeichnisse	97
Literaturverzeichnis	97
Abbildungsverzeichnis.....	108
Tabellenverzeichnis	110
Gleichungsverzeichnis	111
Abkürzungen.....	112
Abkürzungen.....	112
Zuordnungen	113
Pulsprogramme	115
^1H - ^{15}N FHSQC	115
trHNCA.....	116
trHNCACB	117
^1H - ^{15}N NOESY-HSQC	118
^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC	119
^1H - ^{15}N -Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie.....	120
Angaben zur Person.....	121
Eigene Publikationen	122
Danksagung.....	123
Erklärung.....	124

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Anpassung an veränderliche Temperaturen

Bacillus subtilis ein gram-positives mesophiles Bakterium lebt in den oberen Schichten des Bodens. Dort ist es veränderlichen Umgebungstemperaturen ausgesetzt, die die Anpassung der zellulären Prozesse erfordern. Die Antwort von Organismen auf die Erhöhung der Temperatur über ihre physiologische Wachstumstemperatur hinaus ist weitgehend gut untersucht. Diesem Temperaturstress, der sich zum Beispiel in der zunehmenden Instabilität von Proteinen äußert, begegnen die Zellen mit der Expression von Hitzeschockproteinen, die unter anderem die Proteinfaltung unterstützen (Arsene *et al.*, 2000). Die Reaktion von Bakterien auf die Verringerung ihrer Umgebungstemperatur ist dagegen erst in letzter Zeit in den Focus der Forschung gerückt. Neben *Bacillus subtilis* konzentrieren sich die Untersuchungen vor allem auch auf den Modellorganismus für gram-negative Bakterien: *Escherichia coli*.

Die abrupte Reduzierung der Wachstumstemperatur, die als Kälteschock bezeichnet wird und für mesophile Eubakterien einer Temperaturänderung von 37°C auf 15°C oder 10°C entspricht, ruft eine besonders deutliche Reaktion hervor. Das Zellwachstum wird gestoppt und die Expression der meisten Gene wird heruntergeregelt. Während der Akklimatisationsphase, die einige Stunden dauern kann, werden jedoch kälte-induzierte Proteine (*cold induced proteins*, CIPs) besonders stark exprimiert, die die Anpassung vermitteln (Jones *et al.*, 1987; Graumann *et al.*, 1996). Zum Beispiel erreicht die Expression des Kälteschockproteins A aus *Escherichia coli* nach 1-1,5 Stunden 13 % der gesamten Proteinsynthese (Goldstein *et al.*, 1990). Nach dieser Periode sinkt das Level der CIPs wieder und der Umfang der ursprünglichen Proteinsynthese unter Berücksichtigung der neuen Umweltbedingungen wird wieder hergestellt.

Zu den physiologischen Veränderungen, die mit einer Temperaturverringerung einhergehen, gehört zunächst eine Reduktion der molekularen Dynamik von Lipiden, die sich in einer reduzierten Membranfluidität äußert (Weber und Marahiel, 2002). *Bacillus sub-*

tilis verfügt mit DesK, einem integralen Membranprotein, über einen Sensor für diese Vorgänge. Die Phosphorylierung von DesR durch DesK aktiviert im Verlauf der Signalweiterverarbeitung einen Transkriptionsfaktor, der das Ablesen des *desA*-Gens reguliert. Die Acyl-Lipid-Desaturase DesA ist schließlich in der Lage, den Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran zu erhöhen und deren Fluidität wieder herzustellen (Shivaji und Prakash, 2010). Auch über die Änderung der Kettenlänge der Fettsäuren, dem Verhältnis zwischen *cis* und *trans* Fettsäuren oder den Proportionen zwischen *iso* und *anteiso* Fettsäuren stellt für das Bakterium eine Möglichkeit dar, die Funktionsfähigkeit seiner Grenzfläche zur Umwelt aufrechtzuerhalten.

Die reduzierte Expression von Enzymen, die von zentraler Bedeutung für die Glykolyse und den Citratzyklus sind (Beckering *et al.*, 2002), weist auf die allgemein verringerte metabolische Aktivität von *Bacillus subtilis* nach einem Kälteschock hin. Für den Organismus ist es jedoch nötig, durch den Aufbau von osmotisch wirksamen Substanzen die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, falls die Temperaturen unter den Gefrierpunkt fallen. *Escherichia coli* löst diese Aufgabe durch die Synthese von Trehalose (Kandror *et al.*, 2002), einem Disaccharid, das neben seiner Funktion als Kryoprotektanz auch bei anderen Stresssituationen bekannt ist, wie die Stabilisierung von Proteinen bei drohender Austrocknung (Jain und Roy, 2009). Der Mechanismus mit dem sich *Bacillus subtilis* gegen Eisbildung schützt ist noch nicht geklärt. Der Kälteschock beeinflusst jedoch eine Vielzahl von Stoffwechsel-Genen (Beckering *et al.*, 2002), so dass auch hier zu erwarten ist, dass organische Osmolyte an der Stressantwort beteiligt sind (Yancey, 2005).

Eine weitere Herausforderung für die Physiologie der Bakterienzelle ergibt sich aus der Tatsache, dass verringerte Wachstumstemperaturen Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren stabilisieren, da die Enthalpie-Entropie-Kompensation bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in Watson-Crick-Basenpaarungen günstiger ausfällt. Auf der Ebene der DNA bedeutet das ein starkes Aneinanderhaften des Doppelstrangs, das die Transkription behindert. *Bacillus subtilis* reagiert darauf mit verstärkter Expression der Gene für DNA-Gyrasen (auch Typ-II-Topoisomerasen genannt) und reduzierter Expression der Gene für Typ-I-Topoisomerasen (Beckering *et al.*, 2002). Typ-II-Topoisomerasen schneiden den DNA-Doppelstrang und führen einen anderen Teil des Strang hindurch bevor die Bruchstelle wieder geschlossen wird, Typ-I-Topoisomerasen

dagegen schneiden nur einen Strang, entspannen die superspiralisierte DNA und verknüpfen die Strangteile wieder. Durch ein verändertes Verhältnis beider Enzymklassen ist es der Bakterienzelle nun möglich, vermehrt negativ superspiralisierte DNA zu erzeugen und somit die Trennung des DNA-Doppelstrangs herbeizuführen, was die Transkription bei niedrigen Temperaturen wieder ermöglicht. Während die Stabilisierung von Sekundärstrukturen in der DNA die Expression von Genen nur indirekt beeinflusst, behindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der mRNA die Translation unmittelbar. Regulatorische Sequenzen, wie die Shine-Dalgarno-Sequenz, können verdeckt werden, so dass Translationsfaktoren nicht mehr binden können (Ermolenko und Makhatadze, 2002), oder einfach die Expressionsgeschwindigkeit wird durch die von den Ribosomen aufzuwendende Energie beim Auflösen der Sekundärstrukturen während der Translation verringert. Auch für diese Herausforderungen wurden in Prokaryoten zelluläre Antworten nachgewiesen. In *Escherichia coli* (Jones *et al.*, 1996) sowie in *Bacillus subtilis* (Beckering *et al.*, 2002) werden RNA Helikasen exprimiert, die in der Lage sind doppelsträngige RNA wieder zu entwinden. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass in *Bacillus subtilis* die Helikasen CshA und CshB mit dem Kälteschockprotein CspB und Ribosomen in Regionen um das Nukleoid kolokalisiert sind. *In vivo* konnte gar durch einen starken Förster-Resonanzenergietransfer zwischen CshB und CspB nachgewiesen werden, dass kälteinduzierte Helikasen und Kälteschockproteine (CSP) bei der Rettung missgefalteter mRNA-Moleküle zusammenarbeiten (Hunger *et al.*, 2006), um die Initiation der Translation bei niedrigen Temperaturen aufrechtzuerhalten.

1.2 Bakterielle Kälteschockproteine und deren Rolle beim Kälteschock

Zu den Proteinen, die nach einem Kälteschock besonders stark exprimiert werden, gehören Vertreter aus der soeben erwähnten Familie der Kälteschockproteine (Jones *et al.*, 1987; Graumann *et al.*, 1996; Beckering *et al.*, 2002), wenn auch nicht alle CSP in die Adaption an niedrige Wachstumstemperaturen involviert sind. Diese Proteine können in der gesamten Domäne der Eubakterien und Archaeen gefunden werden (Graumann und Marahiel, 1998; Giaquinto *et al.*, 2007). In *Escherichia coli* sind neun verschiedene

CSP gefunden wurden, in *Bacillus caldolyticus* eins, in *Thermotoga maritima* zwei und für *Bacillus subtilis* sind drei CSP (CspB, CspC, CspD) beschrieben worden (Schröder *et al.*, 1993; Graumann *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999).

CSP sind kleine Proteine, die aus etwa 65-75 Aminosäuren bestehen und an einzelsträngige DNA oder RNA mit mikro- bis nanomolaren Dissoziationskonstanten binden. Ihre zelluläre Funktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die erhöhte Expression von CspB und CspC aus *Bacillus subtilis*, nicht nur wenn die Bakterienzellen einem Kälteschock ausgesetzt werden, sondern auch beim Übergang vom exponentiellen Wachstum in die stationäre Phase, verdeutlicht, dass die CSP an der Antwort auf verschiedene Stresssituationen beteiligt sind (Graumann und Marahiel, 1999). Die am besten charakterisierten CSP sind die CSP aus *Escherichia coli*. Für die Gene *cspA*, *cspB*, *cspG* and *cspI* ist beobachtet worden, dass sie nach einem Kälteschock vorübergehend induziert werden (Phadtare, 2004). Jedoch führten zwei und dreifach Deletionen dieser Gene zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums bei niedrigen Temperaturen. Erst bei einem Stamm mit der vierfachen Deletion $\Delta cspA \Delta cspB \Delta cspE \Delta cspG$ war dies zu beobachten, konnte aber durch die Überexpression anderer Kälteschockproteine wieder komplementiert werden. Daraus ist zu schließen, dass die CSP in der Lage sind, sich gegenseitig bei der Akklimatisation an die Kälte zu ersetzen (Xia *et al.*, 2001).

In vitro wurde für *Ec*-CspA, dem bedeutendsten CSP aus *Escherichia coli*, gezeigt, dass es die Bildung von Sekundärstrukturen in RNA-Molekülen bei niedrigen Temperaturen verhindert und wurde deshalb als RNA-Chaperon bezeichnet (Jiang *et al.*, 1997). In einem *in vitro* Translationssystem konnte die Zugabe von Kälteschockproteinen aus *Thermotoga maritima*, *Bacillus caldolyticus* sowie des CspB aus *Bacillus subtilis* die Translationseffizienz bei niedrigen Temperaturen jedoch nicht beschleunigen, sondern inhibierte sie vielmehr (Hofweber *et al.*, 2005). Der Einfluss der CSP auf die Transkription ist in einer weiteren Studie beschrieben. *Ec*-CspA und seine Verwandten *Ec*-CspC und *Ec*-CspE reduzierten die Effizienz der Transkriptionstermination *in vitro*. Außerdem induzierte die Überexpression von CspC and CspE *in vivo* die Transkription der Gene *nusA*, *infB*, *rbfA* und *pnp* in dem *metY-rpsO* Operon, die jenseits verschiedener Transkriptionsterminatoren liegen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vorgeschlagen, die Familie der Kälteschockproteine als Transkriptionsantiterminatoren zu bezeichnen (Bae *et al.*, 2000). In sich anschließenden Arbeiten konnte aber gezeigt werden, dass

beiden Beschreibungen der Funktion ein Mechanismus zu Grunde liegt: *Ec*-CspE-Mutanten, die im Gegensatz zum Wildtyp nicht in der Lage sind, Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren aufzulösen, auch nicht die Transkriptionstermination aufheben können, verdeutlichen, dass die Aktivität als RNA-Chaperon essentiell für die Funktion des Proteins als Transkriptionsantiterminator ist (Phadtare *et al.*, 2002a; Phadtare *et al.*, 2002b; Phadtare, 2004; Phadtare *et al.*, 2004).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *E. coli cspA* mRNA einer strukturellen Veränderung unterliegt, wenn die Temperatur von 37°C auf 10°C gesenkt wird, und auf Grund dessen auch effizienter translatiert wird (Giuliodori *et al.*, 2010). Die ungewöhnlich lange 5'-nichttranslatierte Region (5'-UTR) dieser mRNA enthält die Sequenz 5'-UGACGUACAGA-3', die „cold shock box“ genannt wird. Hierfür existieren homologe Sequenzen in den mRNAs verschiedener anderer Kälteschockproteine in *Escherichia coli* (Jiang *et al.*, 1996). Diese „cold shock box“ könnte das Ziel der Autoregulation der CSP sein, indem CspA an seine eigene mRNA bindet (Jiang *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 1997; Mitta *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 2007). Die Sequenzen der beiden „cold shock boxes“ in den 5'-UTR der *cspB* und *cspC* mRNA aus *Bacillus subtilis* unterscheiden sich deutlich von der Sequenz aus *Escherichia coli*. Sie lauten für die „cold shock box 1“ 5'-AAUUAUUUUUGUUC-3' und für die „cold shock box 2“ 5'-UUUUCGUCUUGA-3' (Graumann *et al.*, 1997). Der hohe Anteil von Uridinen in diesen „cold shock box“-Sequenzen stimmt mit der allgemeinen Präferenz des CspB aus *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB) für Thymin-reiche DNA-Oligonukleotide überein (Lopez *et al.*, 2001), so dass auch für *Bs*-CspB eine Autoregulation möglich erscheint, bei der das Kälteschockprotein die Translation der eigenen mRNA herunterregeln könnte und so die zelluläre Konzentration limitiert (Graumann und Marahiel, 1998).

Umfangreiche Bindungsstudien sind für *Bs*-CspB und einzelsträngige DNA (ssDNA) durchgeführt worden. Die Sequenz mit der höchsten Affinität, 5'-TTCTTTT-3', konnte durch Fluoreszenztitrationsexperimente gefunden werden (Max *et al.*, 2007). Eine DNA-Microarray-Anwendung kommt zu einem ähnlichen Ergebnis. Durch Überlagerung von 50 der höchst affinen Binder wurde die Consensus-Sequenz 5'-GTCTTTG/T-3' ermittelt (Morgan *et al.*, 2007). Eine bevorzugte Bindung an pyrimidinreiche Sequenzen ist auch für *Ec*-CspA nachgewiesen worden, für das eine 70 %ige Sequenzhomologie zu *Bs*-CspB besteht (Lopez und Makhatadze, 2000). Ein hoher Anteil an Deso-

xythymidinen führt bei *Ec*-CspA im Gegensatz zu *Bs*-CspB jedoch nicht zu einer höheren Affinität.

Verschiedene CSP-Strukturen von *Escherichia coli* (*Ec*-CspA), *Neisseria meningitidis* (*Nm*-Csp), *Bacillus caldolyticus* (*Bc*-Csp), *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB), *Thermotoga maritima* (*Tm*-Csp) und *Salmonella typhimurium* (*St*-CspE) konnten mittels Röntgenkristallographie (Schindelin *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2009) und NMR-Spektroskopie (Schnuchel *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 2001) bestimmt werden. Allen Proteinen ist gemein, dass sie in eine β -Fasstruktur falten, die aus fünf antiparallelen β -Strängen besteht. Diese Struktur wird als Kälteschockdomäne (CSD) bezeichnet. Somit gehören die Kälteschockproteine in die Klasse der Proteine mit OB(*oligonucleotide/oligosaccharide binding*)-Faltungsmotiv. Die CSD kann auch in eukaryotischen nukleinsäurebindenden Proteinen gefunden werden. Hohe Sequenzidentität besteht z.B. mit dem humanen YB-1 (Wistow, 1990), das als Transkriptionsaktivator fungiert (Sommerville, 1999) und für die Resistenz von Krebszellen gegen Medikamente verantwortlich ist (Kuwano *et al.*, 2004).

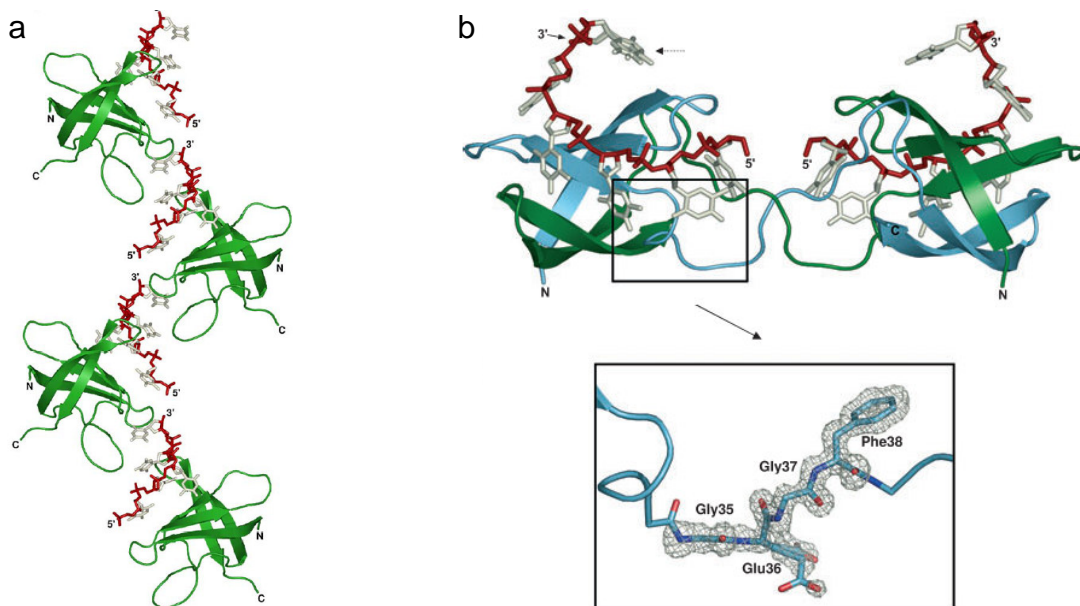


Abb. 1.1 Kristallstrukturen von Kälteschockprotein-ssDNA-Komplexen. (a) *Bs*-CspB·dT₆. Die kontinuierliche Anordnung wird von Protein (grün) und dT₆ (grau, Rückgrat rot) gebildet. (b) *Bc*-Csp·dT₆. Zwei Proteinmoleküle (grün und blau) bilden durch einen „domain swap“ zwei Kälteschockdomänen, die mit zwei dT₆-Molekülen (grau, Rückgrat rot) assoziiert sind. Ausschnitt: Region des „domain swap“ mit der F₀-F_c-Differenzelektronendichte (2,5 σ), berechnet aus einem Model ohne den Resten 35-38. Abbildungen aus (Max *et al.*, 2006) und (Max *et al.*, 2007).

Mit den Kristallstrukturen von *Bs*-CspB und *Bc*-Csp im Komplex mit dem Oligonukleotid Hexadesoxythymidin (dT₆) (Max *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2007) und NMR-Experimenten mit *Bs*-CspB und dem Oligonukleotid Heptadesoxythymidin (dT₇) (Zeeb *et al.*, 2006) konnte die Bindung an ssDNA charakterisiert werden. Eine amphipatische Oberfläche, die aus Aminosäuren des RNP(*ribonucleoprotein*)-Motivs 1 (K13-V20) und 2 (V26-F30) sowie aus weiteren Aminosäuren (K7, W8, F38) gebildet wird, fungiert als Bindestelle für ssDNA, die in bakteriellen Kälteschockproteinen stark konserviert ist. Stapelwechselwirkungen zwischen Nukleobasen und aromatischen Seitenketten vermitteln die Interaktion mit dem Liganden. Durch die Kristallpackung werden jedoch Wechselwirkungen forciert, die in Lösung so nicht beobachtet werden können. In der *Bs*-CspB·dT₆-Struktur werden benachbarte Proteinmoleküle durch die DNA verbrückt und in der *Bc*-Csp·dT₆-Struktur liegt das Protein als Dimer mit einem sogenannten „*domain swap*“ vor, bei dem zwei Proteinmoleküle durch teilweisen Austausch der Peptidketten zwei verknüpfte Kälteschockproteindomänen bilden (Abb. 1.1).

1.3 Bakterielle Kälteschockproteine als Modellproteine der Proteinfaltung und Proteinstabilität

Die vielfältigen Funktionen, die von Proteinen ausgeübt werden, setzen immer das Vorhandensein einer dreidimensionalen Struktur voraus. Nur so kann das aktive Zentrum eines Enzyms oder die Oberfläche, die zur Erkennung eines Bindungspartners benötigt wird, erzeugt werden. Dabei ist die Ausbildung einer Tertiärstruktur aber nicht selbstverständlich, denn nicht jede beliebige Peptidkette ist auch thermodynamisch und kinetisch in eine Struktur faltbar (Onuchic *et al.*, 1997). So ist auch in einigen Beispielen von nativ entfaltenen Proteinen berichtet worden, bei denen zunächst keine geordnete Struktur vorliegt. Die Ausbildung einer definierten Anordnung der Peptidkette im Raum kann allerdings beobachtet werden, sobald der entsprechende Ligand anwesend ist. Durch die Bindung des Proteins an den Interaktionspartner, der in diesen Fällen häufig die DNA ist, wird eine Struktur induziert, die eine große zwischenmolekulare Interaktionsfläche mit dem Liganden aufweist (Fink, 2005). Die Funktionsfähigkeit des Proteins ist somit auch hier gegeben.

Bei der Erforschung der Proteinfaltung wird der Fragestellung nachgegangen, wie aus einer linearen Peptidkette die dreidimensionale Struktur gebildet wird und welche Kräfte sie erhalten. Im einfachsten Modell ist der native Zustand vom denaturierten Zustand durch eine Energiebarriere getrennt und thermodynamisch begünstigt (Abb. 1.2a). Die Stabilität von Proteinen und der Verlauf von Faltungsreaktionen lassen sich damit gut beschreiben. Dies Bild wurde schließlich erweitert, so dass man heute vielmehr von einem Faltungstrichter spricht (Wolynes *et al.*, 1995) (Abb. 1.2b). Bei diesem Modell wird die große konformationelle Freiheit der Aminosäuren im entfalteten Zustand und die definierte Struktur des nativen Zustandes in die Darstellung mit einbezogen. Die Beschreibung der Proteinfaltung als ein Weg auf einer Energiehyperfläche trägt der Tatsache Rechnung, dass bei der Proteinfaltung eben nicht wie bei chemischen Reaktionen Bindungen gebrochen und neu geformt werden, sondern die freie Enthalpie durch sukzessive Ausbildung von Wechselwirkungen in der Peptidkette reduziert wird. Parallele Faltungswege sind somit erklärbar.

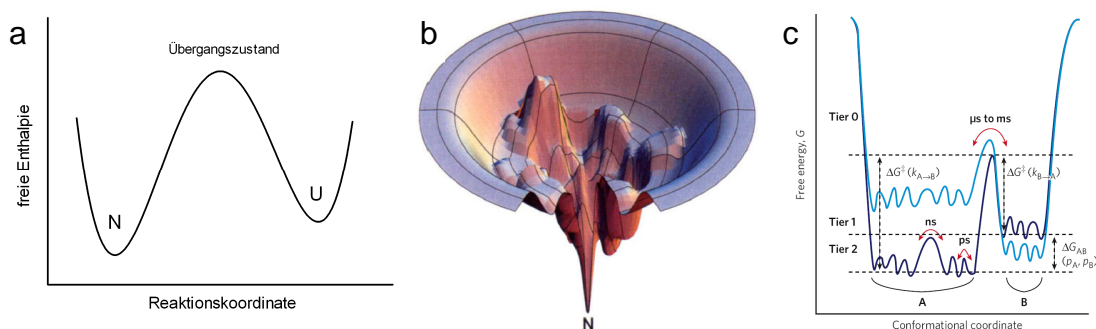


Abb. 1.2 Modelle der Proteinfaltung und Dynamik. (a) Beschreibung als chemische Reaktion mit nativen (N), entfalteten (U) und Übergangszustand. (b) Faltungstrichter aus (Dill und Chan, 1997). Die große konformationelle Freiheit des entfalteten Zustandes am Rande des Trichters steht die definierte Struktur des gefalteten Zustands gegenüber, die die niedrigste freie Enthalpie besitzt. (c) Ein-dimensionales Profil der Energielandschaft des nativen Zustands. Der Unterschied zwischen den Energieniveaus (ΔG_{AB}) bestimmt den Anteil der Populationen (p_A, p_B), die Energiebarrieren (ΔG^{\ddagger}) zwischen verschiedenen Konformationen die Zeitskala der Proteindynamik. Die hellblaue und die dunkelblaue Linie beschreibt das Profil vor und nach einer Änderung im System, z.B. der Bindung eines Liganden. Abbildung aus (Henzler-Wildman und Kern, 2007).

Auch der native Zustand, der im Faltungstrichtermodell noch als ein klar definiertes Minimum dargestellt wird, besitzt eine raue Energiehyperfläche. Dies äußert sich darin, dass die native Struktur nicht statisch ist, sondern es treten ständig kleinere Konformationsänderungen wie Seitenkettenrotationen oder Bewegungen von Schleifen auf. Da die Energiebarrieren zwischen diesen einzelnen Zuständen nur gering sind, verläuft die-

ser Prozess auf einer Zeitskala von Pico- bis Mikrosekunden (Henzler-Wildman und Kern, 2007) (Abb. 1.2c). Beim Vorgang der Proteinfaltung sind dagegen höherenergetische Zustände zu überwinden, so dass der Zeitbereich der Faltung zwischen Millisekunden und Sekunden liegt.

In den vergangenen Jahren ist eine Vielfalt von Methoden entwickelt wurden, um die Mechanismen der Proteinfaltung zu erforschen (Bartlett und Radford, 2009). Die bakteriellen Kälteschockproteine sind dabei immer wieder grundlegende Modellproteine gewesen. Durch Detektion der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz in einer *stopped-flow*-Apparatur konnte ermittelt werden, dass CspB aus *Bacillus subtilis* dem Zwei-Zustandsmodell folgt, es existiert nur im nativen oder entfalteten Zustand. Während der Proteinfaltung, die im Millisekundenbereich abläuft, treten also keine dedektierbaren Intermediate auf (Schindler *et al.*, 1995; Schindler und Schmid, 1996). Dieser Mechanismus der Proteinfaltung ist in den homologen CSP aus dem thermophilen *Bacillus caldolyticus* und dem hyperthermophilen *Thermotoga maritima* konserviert. Die unterschiedlichen Stabilitäten dieser Proteine sind vor allem in abweichenden Entfaltungsraten begründet (Perl *et al.*, 1998). Der Übergangszustand bei der Faltung von *Bs*-CspB wurde zunächst durch Drucksprünge thermodynamisch charakterisiert (Jacob *et al.*, 1999). Eine Studie, die 23 verschiedene Mutationen in der Peptidkette von *Bs*-CspB einschloss, ermöglichte auf Grund der Tanford- β -Werte, die jeweils $\geq 0,9$ betragen, die Schlussfolgerung, dass der Übergangszustand dem nativen Zustand ähnlich ist. Darüber hinaus ergab die Φ -Wert-Analyse, dass vor allem der erste β -Strang den Übergangszustand stabilisiert, Coulomb-Wechselwirkungen spielen dabei eine entscheidende Rolle (Garcia-Mira *et al.*, 2004; Garcia-Mira und Schmid, 2006). Das Faltungsgleichgewicht des *Bs*-CspB wurde durch Messung der ^{15}N transversalen Relaxationsdispersion mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Durch den Beitrag des chemischen Austausches zur R_2 -Rate konnten die Austauschraten von sechs Aminosäuren in verschiedenen Positionen der Struktur des Proteins bestimmt werden, bei denen diese ausschließlich auf die globale Faltungsreaktion zurückzuführen ist. Die Durchführung der Experimente bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen ermöglicht es Faltungsraten zu bestimmen (Zeeb und Balbach, 2005), die sehr genau mit den fluoreszenzspektroskopischen Daten übereinstimmen und belegen, dass das Tryptophan 8 (W8) ein verlässlicher Sensor für die Faltungsreaktion des Kälteschockproteins ist. Die frühen Ereignisse bei der Faltung von

Kälteschockproteinen wurden unter Ausnutzung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) an *Bc*-Csp untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die schnelle Faltungsreaktion von *Bc*-Csp ein plötzlicher Kollaps vorausgeht, bei dem die intramolekularen Abstände in der entfalteten Peptidkette stark verkürzt werden (Magg und Schmid, 2004). Die Beobachtung von *Tm*-Csp mittels Einzelmolekül-FRET-Experimenten (Schuler *et al.*, 2002) ermöglichte es, die Rekonfigurationzeit der entfalteten Peptidkette zu bestimmen, die sich durch den Kollaps verringert (Nettels *et al.*, 2007). In diesem Zustand ist nur ein geringer Anteil von Sekundärstrukturelementen vorhanden (Hoffmann *et al.*, 2007).

1.4 Das Phänomen der Kältedenaturierung

Die Thermodynamik der Proteinfaltung und -stabilität lässt sich untersuchen, indem die dreidimensionale Struktur reversibel faltender Proteine durch Erhöhung der Temperatur, Zugabe von chemischen Denaturierungsmitteln oder Erhöhung des Druckes aufgelöst wird. Die Denaturierung von Proteinen durch Senken der Temperatur ist eine Art, Proteine zu entfalten, die zunächst nicht naheliegend ist. Denn bei der Hitzedenaturierung wird mit ansteigender Temperatur der entfaltete Zustand populiert, der durch eine hohe Entropie gekennzeichnet ist. Durch Senken der Temperatur sollten also nur Prozesse induziert werden, die zu einer hohen Ordnung führen. Da der native Zustand eines Proteins der am höchsten geordnete Zustand ist, sollte demzufolge die Struktur auch bei sehr niedrigen Temperaturen nicht wieder zerstört werden. Jedoch vernachlässigt diese Überlegung die für die Stabilität von Proteinen entscheidenden Wechselwirkungen der Aminosäuren mit dem Lösungsmittel. Denn die Kältedenaturierung wird durch die stark temperaturabhängige Interaktion von nichtpolaren Gruppen mit dem Wasser verursacht. Der hydrophobe Effekt, der dafür verantwortlich ist, dass hydrophobe Aminosäuren in der nativen Struktur lösungsmittelunzugänglich verpackt sind, ist bei ausreichend niedrigen Temperaturen soweit abgeschwächt, dass es thermodynamisch günstig sein kann, jene Seitenketten nach außen zu kehren, was den Verlust der Tertiärstruktur zur Folge hat (Privalov, 1990; Makhatadze und Privalov, 1993; Privalov und Makhatadze, 1993). Für Proteine existiert also ein definierter Temperaturbereich, innerhalb dessen sie thermodynamisch stabil sind. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen nimmt die freie

Enthalpie der Entfaltung (ΔG_U) stark ab. Dies lässt sich mit Gleichung 1.1 beschreiben. Dabei wird die Annahme gemacht, dass es sich bei der Faltung um ein Zwei-Zustandsmodell handelt, der entfaltete Zustand eine höhere Wärmekapazität besitzt als der gefaltete und der Unterschied der Wärmekapazitäten zwischen beiden Zuständen (ΔC_p) temperaturunabhängig ist.

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_h) \cdot \left(\frac{T_h - T}{T_h} \right) - \Delta C_p \left[T_h - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_h} \right) \right]$$

Gleichung 1.1 Freie Enthalpie der Entfaltung in Abhängigkeit von der Temperatur. $\Delta H_U(T_h)$ Enthalpieänderung der Entfaltung, T_h Temperatur am Mittelpunkt der Hitzedenaturierung, ΔC_p Unterschied der Wärmekapazität zwischen nativen und entfaltenen Protein.

Eine genaue Untersuchung der Kältedenaturierung bei gleichzeitiger Kenntnis der Hitze- und sonstiger denaturierter Zustände kann dazu beitragen, die Faltung und die Kräfte, die zur Stabilisierung von Proteinen führen, genau zu verstehen. Die Hitzedenaturierung ist experimentell einfach durchzuführen. Die Kältedenaturierung wird für die meisten Proteine dagegen jenseits des Gefrierpunktes von Wasser erwartet (Privalov, 1990). Eine Ausnahme stellt das Frataxin aus *Saccharomyces cerevisiae* dar. Dieses Protein ist unter physiologischen Bedingungen so instabil, dass es bei 31°C den Mittelpunkt der Hitzedenaturierung und bei 7°C den Mittelpunkt der Kältedenaturierung besitzt (Pastore *et al.*, 2007). Für die meisten Proteine mussten zunächst Methoden entwickelt werden, um die Proteinfaltung bei niedrigen Temperaturen zu untersuchen. Dazu gehört, dass die Proteine durch Zugabe von chaotropen Substanzen oder Änderung des pH-Wertes soweit destabilisiert werden, dass die Kältedenaturierung noch über 0°C beobachtet werden kann (Privalov, 1990). Jedoch wird dafür die Möglichkeit aufgegeben, das Protein in einer ungestörten wässrigen Lösung zu untersuchen. Durch Zusatz von Glycerol oder Methanol zur Proteinlösung wurde versucht, das Problem zu lösen, indem der Gefrierpunkt des Wassers herabgesetzt wurde (Franks, 1995). Jedoch haben auch diese Substanzen selbst einen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen. Ähnlich verhält es sich mit dem Anlegen eines hohen Druckes (Jonas, 2002). Temperaturen unter 0°C sind erreichbar, aber beide Effekte: Kälte- und Druckdenaturierung müssen von einander getrennt werden. Am vielversprechendsten ist die Methode, bei denen Mutationen in Proteinen eingefügt werden, um Proteinfaltungsstudien zu vereinfachen (Chen und Schell-

man, 1989). Gerade für die NMR-Spektroskopie hat sich auch die Verwendung von Kapillaren bewährt. Proteinlösungen können so bis -15°C ohne Einfrieren herabgekühlt werden (Skalicky *et al.*, 2000). In der Literatur ist gar eine Temperatur von -35°C beschrieben, die erreicht werden kann, wenn Ubiquitin in Micellen aus Bis(2-Ethylhexyl)-sulfonsuccinat (AOT) eingeschlossen wird (Babu *et al.*, 2004). Die hierbei mittels hochauflösender NMR gemachten Beobachtung, dass es sich bei der Kältedenaturierung im Gegensatz zur Hitzedenaturierung um einen nicht kooperativen Vorgang handelt, müssen allerdings kritisch betrachtet werden, solange eine Interaktion von AOT mit dem Protein nicht ausgeschlossen ist (Van Horn *et al.*, 2005). Dennoch zeigt diese Studie die besondere Möglichkeit der Kältedenaturierung auf, den Zugang zu Faltungsin-termediaten unter nativen Bedingungen zu ermöglichen, die mittels Hitzedenaturierung nicht sichtbar gemacht werden können (Whitten *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnten am Beispiel der C-terminalen Domäne des ribosomalen Proteins L9 interessante Beobachtungen gemacht werden, dass sich der kältedenaturierte Zustand von sonstigen denaturierten Zuständen durch die Anwesenheit eines Restes an Sekundärstrukturen unterscheidet (Shan *et al.*, 2010).

1.5 Das Kälteschockprotein *Bc-Csp* R3E L66E beim Studium der Kältedenaturierung

Die Kältedenaturierung von Kälteschockproteinen lässt sich nicht direkt beobachten. *Bs-CspB* und erst recht *Bc-Csp* haben mit den freien Enthalpien der Entfaltung von 11,4 bzw. 22,2 kJ/mol bei 25°C eine zu große Stabilität, als dass die Entfaltung durch niedrige Temperaturen ausgelöst werden könnte. Der Mittelpunkt der Kältedenaturierung liegt für beide Proteine bei etwa -33°C (Abb. 1.3).

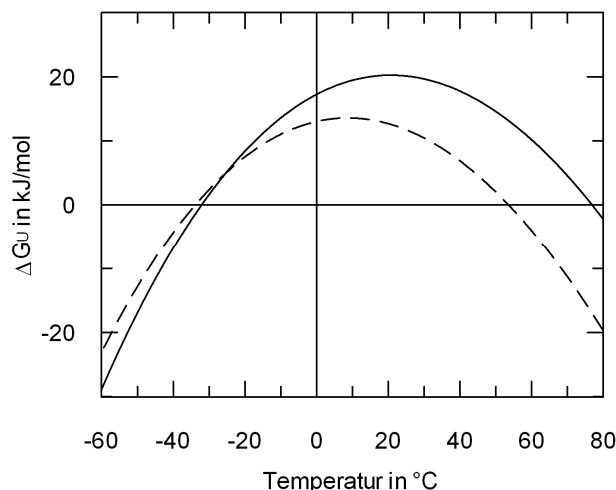


Abb. 1.3 Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von der Temperatur für *Bc* Csp (durchgezogene Linie) und *Bs* CspB (gestrichelte Linie). Berechnet unter Verwendung von Gleichung 1.1 und den thermodynamischen Parametern aus (Perl *et al.*, 2000; Perl und Schmid, 2001) für den Puffer 100 mM Natrium-Cacodylat/HCl pH 7,0.

Bs-CspB und *Bc*-Csp unterscheiden sich in der Sequenz an 12 Positionen, aber die höhere Stabilität von *Bc*-Csp gegenüber *Bs*-CspB resultiert fast ausschließlich aus den Aminosäuren Arg3 und Leu66, die Glutamatreste in *Bs*-CspB ersetzen. Beide Reste liegen in der dreidimensionalen Struktur dicht beieinander. Durch Einführen dieser Aminosäuren in *Bs*-CspB, wodurch die Mutante *Bs*-CspB E3R E66L entsteht, kann der Mittelpunkt der Hitzedenaturierung von 54°C nach 75°C verschoben werden und erreicht damit fast die Stabilität von *Bc*-Csp, das bei 77°C entfaltet. Umgekehrt ist die Mutante *Bc*-Csp R3E L66E durch eine starke Destabilisierung gekennzeichnet. Ihr Mittelpunkt der thermischen Entfaltung liegt mit 45°C sogar unterhalb des Wertes für *Bs*-CspB (Perl *et al.*, 2000). In umfassenden Faltungsstudien und Kristallstrukturanalysen von *Bc*-Csp-Mutanten konnten die Ursachen für den destabilisierenden Effekt ermittelt werden (Delbrück *et al.*, 2001; Perl und Schmid, 2001). Danach verstärkt der aliphatische Teil von Arg3 hydrophobe Interaktionen und die elektrostatische Abstoßung zwischen Glu3 und Glu66 schwächt die Struktur. Außerdem ist die Guanidin-Gruppe von Arg3 in *Bc*-Csp zwar nicht in Salzbrücken involviert, verhindert aber Coulomb-Abstoßungen, durch das Einführen einer positiven Ladung in einer sonst negativ geladenen Proteinoberfläche. Durch die stark destabilisierenden Mutationen besitzt *Bc*-Csp R3E L66E nur noch einen ΔG_U -Wert von $5,0 \pm 0,3$ kJ/mol bei 25°C, so dass es möglich war, Kälte- und Hitzedenaturierung mittels 1D-NMR-Spektroskopie bei -11°C bzw.

39°C zu detektieren (Abb. 1.4) und alle thermodynamischen Parameter nach Gleichung 1.1 zu bestimmen (Szyperski *et al.*, 2006).

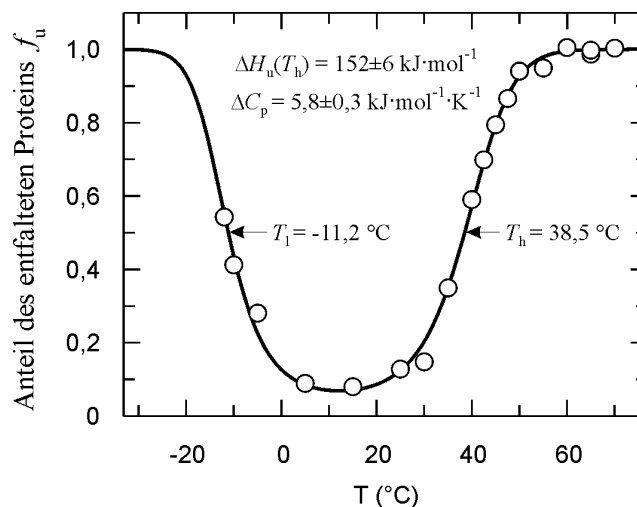


Abb. 1.4 Anteil des entfaltenen *Bc*-Csp R3E L66E (f_u). Er wurde ermittelt aus 1D ^1H NMR-Spektren, die bei verschiedenen Temperaturen (T) aufgenommen wurden. Die durchgezogene Linie entspricht einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 1.1. Abbildung aus (Szyperski *et al.*, 2006).

1.6 Ziele dieser Arbeit

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Szyperski (Universität Buffalo, USA) sollten der durch Harnstoff, Hitze und Kälte denaturierte Zustand des *Bc*-Csp R3E L66E NMR-spektroskopisch untersucht werden, um eventuell vorhandene Reststrukturen in den entfaltenen Peptidketten aufzudecken. Die Analyse der Hitze- und Kältedenaturierung wird von der Arbeitsgruppe Szyperski übernommen. Ihre Erfahrung bei NMR-Experimenten mit Proteinlösungen in Glaskapillaren wird die Analyse der Faltung von *Bc*-Csp R3E L66E bei bis zu -15 °C ermöglichen. Bestandteil dieser Arbeit ist die Bereitstellung des Probenmaterials sowie Experimente zur Charakterisierung des mittels Denaturierungsmittel entfaltenen Proteins.

Die Wechselwirkung von *Bs*-CspB mit ssDNA ist bereits gut charakterisiert worden. Die Kristallstrukturen von *Bs*-CspB·dT₆ und *Bc*-Csp·dT₆ liefern sogar detaillierte Strukturinformationen über die Interaktionen einzelner Nucleobasen in verschiedenen Binde-taschen des Proteins. Da in der Bakterienzelle DNA aber fast ausschließlich als Doppelstrang vorliegt und die Funktion der Kälteschockproteine ausschließlich auf der Ebene der RNA beschrieben worden ist, ob als RNA-Chaperon oder Transkriptionsantitermi-

nator, kann nur einzelsträngige RNA das natürliche Substrat der Kälteschockproteine darstellen. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Bindung von einzelsträngiger RNA (ssRNA) an *Bs*-CspB untersucht werden. Zunächst sollten Präferenzen des Proteins für bestimmte Nukleotidsequenzen mittels Titrationsexperimente aufgedeckt werden und die Ursachen für Unterschiede der Bindungsaffinität durch Vergleiche mit ssDNA identifiziert werden. Schließlich sollte durch Kombination der wichtigsten strukturbio-
logischen Methoden, der NMR-Spektroskopie und der Röntgenkristallographie, die Wechselwirkung hoch affiner Oligonukleotide mit *Bs*-CspB anhand von hochaufgelösten Strukturen aufgeklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Herstellung und Transformation CaCl_2 -kompetenter

Escherichia coli Zellen

Zur Transformation des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) und des *E. coli* Stamms TOP10, der sich durch eine hohe Plasmidkopienzahl auszeichnet, wurden CaCl_2 -kompetente Zellen verwendet.

500 ml dYT-Medium (Tab. 2-5) wurden mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stamms beimpft und bei 30°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ von 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation bei 7000 Umdrehungen pro Minute (Rotor: SLA-3000, Zentrifuge: SORVALL RC 6 PLUS) und 4°C für 15 min geerntet. Anschließend wurden die Bakterien in 200 ml sterilem, eisgekühlten 100 mM CaCl_2 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 10 ml 100 mM CaCl_2 resuspendiert abermals zentrifugiert und schließlich in 2 ml 100 mM CaCl_2 und 1 ml 87 % (v/v) Glycerol gelöst. Aliquots von 200 µl wurden bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, 2-5 µl Plasmid (1 - 10 ng DNA) hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 s auf 42°C erhitzt, auf Eis wieder abgekühlt und 600 µl dYT-Medium hinzugegeben. Die Bakterien wurden bei 37°C für 30 min geschüttelt und anschließend auf Nährböden (Tab. 2-1) mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten verfolgte bei 37°C.

Nährboden	16 g/l Trypton
	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	15 g/l Agar-Agar

Tab. 2-1 Zusammensetzung des Nährbodens. Er wurden bei 121°C für 20 Minuten dampfsterilisiert.

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Ein 50 µl Reaktionsansatz bestand aus 32,5 µl H₂O, 5 µl 10xTaq-Puffer (Fermentas), 5 µl 25 mM MgCl₂, 1,5 µl 10 mM (je Nukleotidart) dNTP-Mix, 2 x 2 µl 10 pmol/µl Primer, 1 µl 10 ng/µl Plasmid, 1 µl 5u/µl Taq-Polymerase (Fermentas) und wurde in 200 µl PCR-Reaktionsgefäße gefüllt. Das Temperaturprogramm für die PCR lautete wie folgt: 1 min 95°C; anschließend 30 Zyklen von 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Anlagerung der Primer bei 49°C und 45 s Polymerase-Kettenreaktion bei 72°C; 10 min 72°C und Lagerung bei 4°C. Das Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese dient zur Überprüfung der Größe und zur Reinigung von DNA-Fragmenten. Abhängig von der Länge der aufzutragenden DNA wurden Agarosekonzentrationen (Agarose GTQ, Roth oder Genagarose Tiny, Inno-train Diagnostik) von 0,6 bzw. 1,6 % (w/v) in TAE-Puffer (Tab. 2-2) eingesetzt. Proben wurden mit 6 x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Feldstärke von 6 V/cm. DNA-Banden wurden nach Inkubation in einer 4 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung mittels Fluoreszenz im UV-Licht (312 nm) nachgewiesen.

TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0
6 x Probenpuffer (Roth):	60 mM Tris/HCl, 30 mM Natriumacetat, 12 mM EDTA, 60 % (w/v) Glycerol, 0,18 % (w/v) Bromphenolblau, 0,12 % (w/v) Xylencyanolblau

Tab. 2-2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

2.1.4 Klonierung einer Variante des Kälteschockproteins von *Bacillus caldolyticus* in den pET11a-Vektor

Die Amplifikation des *Bc-Csp* R3E L66E Gens mittels PCR erfolgte mit einem N-terminalen Primer, der eine *NdeI*-Schnittstelle enthält, einem C-terminalen Primer, der

eine *BamHI*-Schnittstelle enthält (Tab. 2-3), und dem Plasmid pCspBc R3E L66E (Mueller *et al.*, 2000). Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese vom Plasmid getrennt und mit dem Perfectprep Gel cleanup Kit (Eppendorf) aus der Agarose isoliert. Der Restriktionsverdau des gereinigten PCR Produktes erfolgte mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* (FastDigest, Fermentas) bei 37°C für 2 h im Puffer 2xTango™. Das geschnittene DNA-Fragment wurde anschließend mittels PCR Purification Kit (Jena Bioscience) gereinigt. Der Restriktionsverdau des Plasmids pET11a (Novagen) wurde in derselben Weise durchgeführt, jedoch nach der Spaltung *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Fermentas) für 1 h bei 37°C hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inaktivierung bei 80°C für 20 min und die Reinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese und Perfectprep Gel cleanup Kit. Zur Ligation wurden das geschnittene DNA-Fragment und das geschnittene Plasmid in Anwesenheit von T4 DNA Ligase (Fermentas) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden *E. coli* TOP10-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe Abschnitt 2.1.1). Von gewachsenen Kolonien wurde das Plasmid mit dem Plasmid Mini-Prep Kit (Jena Bioscience) isoliert und die korrekte Insertion durch DNA-Sequenzierung überprüft (Seq-Lab).

Primer	Sequenz
N-terminal mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	5'-AGTCATATGCAAGAAGGTAAAGTAAAATGG-3'
C-terminal mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle	5'-AACGGATCCTTATTCTTTGACAACGTTTCGCTG-3'

Tab. 2-3 Primer für die PCR. Unterstrichen sind die codierende bzw. komplementäre Gensequenz von *Bc-Csp R3E L66E*.

2.1.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow

Proben der Bakterienkulturen und Fraktionen während der Proteinreinigung wurden mit der Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (Schägger und von Jagow, 1987) untersucht. Ähnlich wie bei der verbreiteten Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proteine durch Natriumlaurylsulfat (SDS) entfaltet und mit einer negativen Ladung versehen. Somit können sie in

einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Größe getrennt werden. Die Methode nach Schägger und von Jagow verwendet jedoch Tricin anstatt Glycin als Folgeion und erreicht damit eine hohe Auflösung für kleine Proteine zwischen 5 und 20 kDa.

Alle verwendeten Lösungen sind in Tab. 2-4 aufgeführt. Zunächst wurde das Trenngel in die Gelapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol durch Spülen mit Wasser entfernt, das Sammelgel darüber gegossen und die Kämme eingesetzt. Fertige Gelen wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammer mit Kathoden- und Anodenpuffer befüllt. Die Proteinlösungen wurden mit 4 x Roti-Load-1-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und vor dem Auftragen zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel und 45 mA für das Trenngel. Anschließend wurden die Proteine für 10 min fixiert, gefärbt und schließlich wieder entfärbt.

Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3% (w/v) SDS pH 8,45
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS pH 8,25
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
12,5 % Trenngel-lösung:	6 ml Wasser, 8 ml Gelpuffer, 10 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 15 µl TEMED, 200 µl 10 % (w/v) APS
6 % Sammelgel-lösung:	7,3 ml Wasser, 3,3 ml Gelpuffer, 2,6 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 10 µl TEMED, 100 µl 10 % (w/v) APS
Fixierlösung:	20 % (w/v) Trichloressigsäure
Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % Coomassie Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Tab. 2-4 Lösungen für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow.

2.2 Zellbiologie und Proteinreinigungsmethoden

Die Expression von *Bs-CspB* und *Bc-Csp R3E L66E* erfolgte in *Escherichia coli* BL21(DE3) Zellen, die mit dem sequenzkodierenden Plasmid pET11a (Novagen) transformiert waren. Die Bakterien wurden im Schüttelkolben fermentiert. Die anschließende Proteinreinigung erfolgte bei 4°C und wurde mit dem Flüssigkeitschromatographie-System ÄKTApurifier (GE Healthcare) durchgeführt.

2.2.1 Rekombinante Expression von Kälteschockproteinen in Vollmedium

Transformierte Zellen wurden zunächst in einer 5 ml und anschließend in einer 125 ml Vorkultur aus dYT-Medium (Tab. 2-5) angezogen, dem sterilfiltriertes Ampicillin in einer Endkonzentrationen von 300 µg/ml zugegeben wurde. Danach wurden 3 l Kulturmedium mit der Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 250 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG bei einer OD_{600 nm} von 1,1-1,3 induziert. Zwei Stunden nach der Induktion wurden die Zellen bei 7000 Umdrehungen pro Minute (Rotor: SLA-3000, Zentrifuge: SORVALL RC 6 PLUS) und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 50 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

dYT-Medium	16 g/l Trypton
	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

Tab. 2-5 Zusammensetzung des Vollmediums. Es wurde bei 121°C für 20 Minuten dampfsterilisiert.

2.2.2 Rekombinante Expression von Kälteschockproteinen in Minimalmedium

Zur Markierung von Kälteschockproteinen mit ¹⁵N und ¹³C für bestimmte NMR-Experimente wurden die *E. coli* Zellen in Minimalmedium (Tab. 2-6) angezogen. Zur Isotopenmarkierung wurde ¹⁵N-Ammoniumchlorid bzw. ¹³C-Glukose eingesetzt.

Zunächst wurden die Bakterienzellen in einer 5 ml Vorkultur aus dYT-Medium angezogen und anschließend in eine 5 ml Vorkultur mit Minimalmedium überführt. Nach einer weiteren Vorkultur von 125 ml wurden 2 l Minimalmedium inokuliert und bis zu einer OD_{600 nm} von 1,1-1,3 fermentiert. Allen Medien wurde dabei 300 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG. Nach 3 Stunden wurden die Zellen bei 7000 Umdrehungen pro Minute (Rotor: SLA-3000, Zentrifuge: SORVALL RC 6 PLUS) und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 50 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Minimal-Medium	200 ml 5xM9-Lösung, 2 ml TS2-Lösung, 1 ml 1M MgSO ₄ , 1 ml 0,1M CaCl ₂ , 1ml 10 mM Fe(III)-citrate (sterilfiltriert), 20-40 ml 20% Glukose (sterilfiltriert), 775 ml H ₂ O
5xM9-Lösung	85 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2,5 g NaCl, 5 g NH ₄ Cl pro 1 l H ₂ O
TS2-Lösung	100 mg ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 30 mg MnCl ₂ ·4H ₂ O, 300 mg H ₃ BO ₃ , 200 mg CoCl ₂ ·6H ₂ O, 20 mg NiCl ₂ ·6H ₂ O, 10 mg CuCl ₂ ·2H ₂ O, 900 mg Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 20 mg Na ₂ SeO ₃ pro 1 l H ₂ O (sterilfiltriert)

Tab. 2-6 Zusammensetzung des Minimalmediums. Die einzelnen Bestandteile des Minimalmediums wurden bei 121°C für 20 Minuten dampfsterilisiert, außer es ist anderes angegeben.

2.2.3 Bakterieller Aufschluss

Die Bakterienlösung wurde im Wasserbad aufgetaut und die Zellen entweder mit dem Microfluidizer (Emulsi Flex-C5, Avestin) bei einem Druck von 700 bar oder mit einem Ultraschallgerät (Sonifier W-250, Branson) aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde durch Zentrifugation bei 20000 Umdrehungen pro Minute (Rotor: SS-34, Zentrifuge: SORVALL RC 6 PLUS) und 4°C für 30 min von restlichen Zellen und Zelltrümmern getrennt und durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert.

2.2.4 Anionenaustauschchromatographie

Das klare Lysat wurde zu gleichen Teilen mit Puffer A verdünnt und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschchromatographiesäule gepumpt, die mit dem Material Fractogel EMD TMAE (M) (Merck, 120 ml) gefüllt war. Es wurde mit Puffer A so lange gespült bis die Absorption bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreichte (ca. 480 ml). Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0% bis 60% Puffer B und wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die eine hohe Absorption bei 280 nm aufwiesen, wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht.

2.2.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Fraktionen, die CSP enthielten, wurden vereinigt und mit fein gemörsertem Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 2,3 M versetzt und auf eine mit Puffer B äquilibrierte hydrophobe Interaktionschromatographie-Säule gegeben. Das Säulenmaterial bestand aus 25 ml Butylsepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Anschließend wurde

die Säule mit 125 ml Puffer B gespült bis die Absorption bei 280 nm wieder der des Puffers entsprach. Die Elution erfolgte durch ein Gradienten von 100% bis 0% Puffer B in 25 ml, gefolgt von weiteren 75 ml Puffer A. Während dessen wurden Fraktionen zu je 4 ml gesammelt. Alle Fraktionen, die Protein enthielten, wurden vereinigt und gegen 5 l Gelfiltrationspuffer dialysiert.

2.2.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer HiLoad Superdex 75 16/60 bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Hierbei wurden nacheinander jeweils 5 ml Proteinlösung aufgetragen und in Abständen von 1 ml Fraktionen gesammelt. Das Eluat wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die Anwesenheit des Kälteschockproteins untersucht. Durch Vergleich der Absorption bei 280 nm und 260 nm im Chromatogramm konnten außerdem Fraktionen ausgewählt werden, die frei von Nukleotiden sind. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat (4 x 5 l) dialysiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich lyophilisiert. Das gereinigte Protein wurde bei -20°C gelagert.

2.2.7 Pufferlösungen zur Proteinreinigung

Bakterieller Aufschluss

50 mM TRIS / HCl, pH 8,0

Anionenaustauschchromatographie

Puffer A 50 mM TRIS / HCl, pH 7,8

Puffer B 50 mM TRIS / HCl, pH 7,8, 1 M NaCl

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Puffer C 50 mM TRIS / HCl, pH 7,6

Puffer D 50 mM TRIS / HCl, 2,3 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,6

Gelfiltrationschromatographie

Puffer E 50 mM TRIS / HCl, 100 mM KCl, pH 7,2

2.2.8 Präparation von *Bs*-CspB-Oligonukleotidkomplexen

Der zur Präparation von *Bs*-CspB-Oligonukleotidkomplexen verwendete Puffer (50 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5) wurde über Nacht im 0,1 % v/v Diethylpyrocarbonat inkubiert und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert. Lyophilisiertes *Bs*-CspB wurde nun in diesem Puffer gelöst und mit einem 10-25 prozentigen Überschuss an RNA (HPLC gereinigt, Thermo Fischer Scientific) versetzt. 2 ml dieser Lösung wurden auf eine Größenausschlusschromatographie-Säule (Superdex 75 16/60 prep grade) aufgetragen und bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. In Abb. 2.1a ist exemplarisch das Chromatogramm für den *Bs*-CspB·rU₆-Komplex dargestellt.

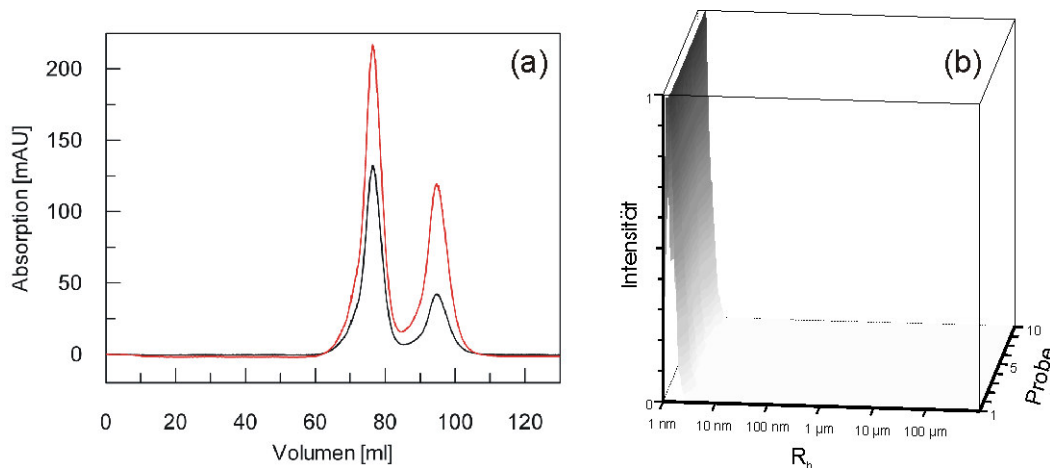


Abb. 2.1 Präparation und Analyse des *Bs*-CspB·rU₆-Komplexes. (a) Chromatogramm der Gelfiltration, rot Absorption bei 260 nm, schwarz Absorption bei 280 nm (b) Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung. Anteil der gelösten Moleküle mit ermittelten hydrodynamischen Radien. Die Helligkeit des Grautons nimmt mit steigender Intensität ab. Dargestellt sind zehn Messungen.

Es wurden die Fraktionen von 72 ml bis 84 ml Elutionsvolumen vereinigt und somit überschüssige RNA vom Komplex abgetrennt. Eine kleine Schulter beim Elutionsvolumen von 69 ml könnte ein Hinweis auf aggregiertes Protein sein. Die entsprechenden Fraktionen wurden aus diesem Grund verworfen. Die Kälteschockprotein-RNA-Komplexlösungen wurden mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin 2, 3 kDa MWCO, PES, Satorius) in einer Tischzentrifuge bei 3500 g eingengt. Anschließend wurde die Homogenität der Lösung mittels dynamischer Lichtstreuung (SpectroScatter 201 RiNA GmbH) überprüft. Dabei wird der hydrodynamische Radius aller gelösten Moleküle ermittelt. Beispielhaft ist das Ergebnis für den *Bs*-CspB·rU₆-Komplex in Abb. 2.1b dargestellt. Der hydrodynamische Radius der Partikel in der Lösung wurde mit ca. 1 nm

bestimmt und zeigt an, dass sich durch das Aufkonzentrieren keine Aggregate gebildet haben und die Komplex-Lösung für Kristallisationsansätze verwendet werden kann.

Es wurden Komplexe von *Bs*-CspB mit den einzelsträngigen RNA-Fragmenten rU₆ (5'-UUUUUU-3'), rC7 (5'-GUCUUUA-3'), rcons_d (5'-GUCUUU-3') und rcons_e (5'-UCUUUG-3') erzeugt.

2.3 Optische Spektroskopie

2.3.1 Photometrische Bestimmung von Protein- und Oligonukleotidkonzentrationen

Die Konzentrationen von Proteinen und Oligonukleotiden wurden mit einem UV/Vis Spektralphotometer (V-650, Jasco) in Halbmikroküvetten bei Raumtemperatur bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2.1) nach Messung der Absorption bei 280 nm für Proteine und 260 nm für Oligonukleotide.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2.1 Lambert-Beersches Gesetz. E_{λ} Extinktion bei der Wellenlänge λ , ε_{λ} Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c Konzentration, d optische Weglänge.

Der Extinktionskoeffizient für gefaltetes *Bs*-CspB beträgt $5800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für gefaltetes *Bc*-Csp R3E L66E $7100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Die Extinktionskoeffizienten für einzelsträngige RNA und DNA wurde nach dem Modell des nächsten Nachbarn (*Nearest neighbor model*) ermittelt (Owczarzy, 2008; Tataurov *et al.*, 2008). Die Berechnung erfolgte durch Nutzung zweier Web-Anwendungen (Applied_Biosystems, 2010; IDT_Biophysics, 2010).

2.3.2 Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von *Bs*-CspB-Oligonukleotidkomplexen mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Bindung von einzelsträngigen Nukleinsäuren an *Bs*-CspB kann durch die Fluoreszenzlöschung des Tryptophan 8 (W8) untersucht werden. Da die Menge des Fluoreszenzintensitätsverlustes direkt proportional zum Anteil des an den Liganden gebundenen Proteins ist, lässt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des Kälteschockprotein-Oligonukleotid-Komplexes bestimmen (Gleichung 2.2).

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad \text{für die Gleichgewichtsreaktion} \quad P + L \rightleftharpoons PL$$

Gleichung 2.2 K_D Gleichgewichtsdissoziationskonstante, $[P]$ Proteinkonzentration, $[L]$ Ligandenkonzentration, $[PL]$ Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes.

Zur Bestimmung von K_D -Werten wurde *Bs*-CspB mit verschiedenen RNA und DNA Fragmenten titriert und die Tryptophan-Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer (FP 6500, JASCO) aufgezeichnet. Eine 1 x 1 cm Quarzküvette wurde mit 1,7 ml Proteinlösung befüllt und durch ein angeschlossenes Wasserbad auf 15°C temperiert. Um eine gut interpretierbare Titrationskurve zu erhalten wurde die Proteinkonzentration entsprechend dem erwarteten K_D -Wert angepasst und befand sich im Bereich von nM bis μ M. Die Messung der Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 343 nm durchgeführt. Nach Zugabe eines Aliquots Oligonukleotidstammllösung sorgte das ständige Rühren für eine schnelle Durchmischung, so dass nach zwei Minuten ein weiterer Messpunkt aufgenommen werden konnte. Die maximale Volumenzunahme in weiteren Titrationsschritten wurde unter 5 % gehalten. Zur Auswertung wurde vom gemessenen Fluoreszenzsignal die Pufferfluoreszenz abgezogen und das Signal um die Volumenzunahme korrigiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzlöschung nach Gleichung 2.3 berechnet.

$$Q = \frac{F_0 - F}{F_0}$$

Gleichung 2.3 Q Fluoreszenzlöschung, F_0 Fluoreszenzintensität des Proteins, F Fluoreszenzintensität des Protein in Anwesenheit des Oligonukleotids.

Durch Auftragen der Fluoreszenzlöschung gegen die Oligonukleotidkonzentration und Anpassung an Gleichung 2.4 lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante und das stöchiometrische Verhältnis ermitteln.

$$Q = Q_{\max} \cdot \frac{A - \sqrt{A^2 - 4n \cdot [P] \cdot [L]}}{2 \cdot [P]} \quad \text{mit} \quad A = K_D + [P] + n \cdot [L]$$

Gleichung 2.4 Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration. Q_{\max} maximale Fluoreszenzlöschung, K_D Gleichgewichtsdissoziationskonstante, $[P]$ Proteinkonzentration, $[L]$ Ligandenkonzentration, n stöchiometrisches Verhältnis zwischen Protein und Ligand (Anzahl der Proteinmoleküle pro Ligandmolekül).

2.3.3 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von *Bs*-CspB-Oligonukleotidkomplexen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie

Unter Ausnutzung der selben Tryptophan-Fluoreszenz wie unter 2.3.2 beschrieben, kann auch die Assoziationsreaktion von *Bs*-CspB und Oligonukleotiden durch schnelles Mischen der Komponenten verfolgt werden und somit können Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten bestimmt werden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung lässt sich mit Gleichung 2.5 beschreiben.

$$-\frac{d[P]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [P] \cdot [L] - k_{\text{off}} \cdot [PL] \quad \text{für die Gleichgewichtsreaktion} \quad P + L \xrightleftharpoons[k_{\text{off}}]{k_{\text{on}}} PL$$

Gleichung 2.5 Reaktionsgeschwindigkeit für die gegebene Gleichgewichtsreaktion. k_{on} Assoziationsratenkonstante, k_{off} Dissoziationsratenkonstante, $[P]$ Protein-, $[L]$ Liganden-, $[PL]$ Komplexkonzentration.

Unter der Bedingung, dass die Ligandenkonzentration deutlich größer als die Proteinkonzentration ist und sich damit nicht wesentlich während des Reaktionsverlaufs ändert ($[L]=[L]_0$) und durch Ersetzen von $[PL]$ mit $[P]_0-[P]$ ergibt sich Gleichung 2.6.

$$-\frac{d[P]}{dt} = k_{\text{obs}} \cdot [P] - k_{\text{off}} \cdot [P]_0 \quad \text{mit} \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{on}} \cdot [L]_0 + k_{\text{off}}$$

Gleichung 2.6 Reaktionsgeschwindigkeit bei $[L]_0 \gg [P]_0$. k_{obs} beobachtete Geschwindigkeitskonstante, $[L]_0$ und $[P]_0$ Liganden- und Proteinkonzentration bei Beginn der Reaktion.

Die Lösung der Differentialgleichung führt zu Gleichung 2.7. Daraus ist ersichtlich, dass die Proteinkonzentration während der Reaktion exponentiell abfällt und damit auch die detektierte Fluoreszenzintensität. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante hängt linear von der Ligandenkonzentration ab. Somit lassen sich durch Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Ligandenkonzentration Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten bestimmen.

$$[P] = \left([P]_0 - \frac{k_{\text{off}} \cdot [P]_0}{k_{\text{obs}}} \right) \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} + \frac{k_{\text{off}} \cdot [P]_0}{k_{\text{obs}}} \quad \text{mit} \quad k_{\text{obs}} = k_{\text{on}} \cdot [L]_0 + k_{\text{off}}$$

Gleichung 2.7 Änderung der Konzentration des freien Proteins während der Assoziationsreaktion.

Die Messung von Assoziationskinetiken von *Bs*-CspB·ssRNA/ssDNA-Komplexen erfolgte an einer Fluoreszenz-*stopped-flow*-Apparatur (SX-20MV, Applied Photophysics). Es wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm (Anregungsbreite 10 nm) angeregt und mittels eines Filters das gesamte Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge größer 320 nm detektiert. Alle Experimente wurden bei 15°C in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 durchgeführt. Es wurde ein Volumen einer 0,12 µM *Bs*-CspB-Lösung mit einem Volumen einer Oligonukleotidlösung in einem Mischkammervolumen von 20 µl gemischt. Die Konzentration des Oligonukleotids wurde in aufeinander folgenden Experimenten zwischen 0,6 und 2,4 µM variiert. Zu jedem Experiment wurden mindestens 12 Kinetiken aufgezeichnet, gemittelt und an eine einfachexponentielle Gleichung angepasst, um die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zu erhalten.

2.3.4 Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge

Die konformationelle Stabilität eines Proteins ist durch die Lage des Gleichgewichts zwischen dem nativen und dem entfaltenen Zustand definiert. Für Eindomänenproteine, wie den bakteriellen Kälteschockproteinen, kann das Zweizustandsmodell angenommen werden (Schindler *et al.*, 1995). Das Falten und Entfalten des Proteins erfolgt dabei ohne das Auftreten von Intermediaten. Die freie Enthalpie der Entfaltung kann somit durch Gleichung 2.8 beschrieben werden.

$$\Delta G_U = -RT \ln \frac{[U]}{[N]} \quad \text{für die Gleichgewichtsreaktion} \quad N \rightleftharpoons U$$

Gleichung 2.8 ΔG_U Freie Enthalpie der Entfaltung im Zweizustandsmodell. R universelle Gaskonstante, T Temperatur $[U]$ Konzentration des entfalteten Proteins, $[N]$ Konzentration des gefalteten Proteins.

Sie kann in Entfaltungsübergängen ermittelt werden, bei denen die Gleichgewichtslage durch Änderung des Druckes, der Temperatur oder durch Zugabe von chemischen Denaturierungsmitteln, wie Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff, verschoben wird. Bei der chemischen Denaturierung wird von der linearen Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittelkonzentration ausgegangen (Gleichung 2.9). Der Parameter m beschreibt dabei die Kooperativität des Entfaltungsübergangs und ist proportional zur Änderung der durch das Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche des Proteins während der Denaturierung (Pace *et al.*, 2005).

$$\Delta G_U = \Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [D]$$

Gleichung 2.9 Lineare Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von der Denaturierungsmittelkonzentration. $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ freie Enthalpie der Entfaltung bei 0 M Denaturierungsmittel, m Maß für die Kooperativität des Übergangs, $[D]$ Denaturierungsmittelkonzentration.

Wenn sich die spektroskopischen Eigenschaften wie z.B. die Absorption, die Fluoreszenz, der Zirkulardichroismus oder das NMR-Spektrum vom nativen und entfalteten Protein unterscheiden kann durch Kombination von Gleichung 2.8 und Gleichung 2.9 die Signalintensität mit Gleichung 2.10 ausgedrückt werden (Maxwell *et al.*, 2005). Das Signal vom nativen und entfalteten Protein wird dabei als linearabhängig von der Denaturierungsmittelkonzentration beschrieben.

$$F = \frac{(a_N + b_N \cdot [D]) + (a_U + b_U \cdot [D]) \cdot e^{\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [D]}{R \cdot T}}}{1 + e^{\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) - m \cdot [D]}{R \cdot T}}}$$

Gleichung 2.10 Gleichung zur Anpassung von Entfaltungsübergängen. F Intensität des spektroskopischen Signals, $a_{N/U}$ Intensität des spektroskopischen Signals bei 0 M Denaturierungsmittel, $b_{N/U}$ lineare Abhängigkeit des spektroskopischen Signals von der Konzentration des Denaturierungsmittels, ΔG_U freie Enthalpie der Entfaltung, R universelle Gaskonstante, T Temperatur.

Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge wurden von *Bc-Csp R3E L66E* in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 bei 15°C in An- und Abwesenheit von 15% D₂O gemessen. Dabei wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität des W8 durch Anregung bei 295

nm und Aufzeichnung von Emissionsspektren von 310 bis 400 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer (FP 6500, JASCO) detektiert. 2 ml einer 2 μ M Proteinlösung mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen wurden in eine gerührte Küvette gegeben und 2 min im Küvettenhalter vor der Messung temperiert. Die exakte Harnstoffkonzentration wurde durch Messung des Brechungsindex der Lösung mit einem Refraktometer (Krüss) unter Anwendung von Gleichung 2.11 bestimmt.

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot \Delta n^2 + 185,56 \cdot \Delta n^3$$

Gleichung 2.11 Berechnung der Harnstoffkonzentration aus dem Brechungsindex. Δn Differenz des Brechungsindex der Lösung in An- und Abwesenheit von Harnstoff.

2.4 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Charakterisierung der Interaktion von *Bs*-CspB und einzelsträngigen Oligonukleotiden wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben, kann auch mit der isothermalen Titrationskalorimetrie erfolgen. Dabei wird die Proteinlösung in eine Messzelle gefüllt, die von einem adiabatischen Mantel umgeben ist. Die Ligandenlösung wird nun schrittweise hinzutitriert und die dabei freiwerdende Reaktionswärme detektiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie damit die Reaktionsenthalpie direkt ermitteln kann (Gleichung 2.12). Somit ist nicht nur die Gleichgewichtsdissoziationskonstante und die Stöchiometrie des Komplexes bestimmbar, sondern über die thermodynamische Gleichungen 2.12 und 2.13 auch die Reaktionsentropie.

$$Q = \frac{n[P]_t \Delta H V_0}{2} \left\{ 1 + \frac{[L]_t}{n[P]_t} + \frac{K_D}{n[P]_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_t}{n[P]_t} + \frac{K_D}{n[P]_t} \right)^2 - \frac{4[L]_t}{n[P]_t}} \right\}$$

Gleichung 2.12 Anpassung der Daten aus der isothermalen Titrationskalorimetrie. Q aufzuwendende oder freiwerdende Wärmemenge durch Bindung des Liganden an das Protein, n Stöchiometrie, ΔH molare Enthalpieänderung, V_0 Volumen der Messzelle, K_D Gleichgewichtsdissoziationskonstante, $[L]_t$ gesamt Ligandenkonzentration, $[P]_t$ gesamte Proteinkonzentration.

$$\Delta G = -RT \ln \frac{1}{K_D}$$

Gleichung 2.13 Freie Enthalpie und Gleichgewichtsdissoziationskonstante. ΔG Änderung der freien Enthalpie, R Gaskonstante, T Temperatur, K_D Gleichgewichtsdissoziationskonstante.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Gleichung 2.14 Freie Enthalpie nach Gibbs. ΔG Änderung der freien Enthalpie, ΔH Änderung der Enthalpie, T Temperatur, ΔS Änderung der Entropie.

Die Experimente wurden an dem Titrationskalorimeter VP-ITC (MicroCal) durchgeführt. In ca. 1,7 ml einer 2 μ M bzw. 6 μ M *Bs-CspB*-Lösung wurden etwa 20 Injektionen zu je 13 μ l Oligonukleotidlösung gegeben bis ein zweifacher Konzentrationsüberschuss erreicht war. Zwischen jedem Titrationsschritt wurden 350 s äquilibriert und die Rührgeschwindigkeit betrug 307 Umdrehungen pro Minute. Die Messungen erfolgten in 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 bei 15°C. Die Daten wurden mit der zum Gerät gelieferten ORIGIN Software analysiert. Auftretende Verdünnungswärme des Liganden konnte durch ein Referenzexperiment ermittelt werden, bei dem die Oligonukleotidlösung in Puffer titriert wurde.

2.5 NMR-Spektroskopie

NMR-Messungen wurden an dem Spektrometer Avance III 600 (Bruker) mit einer Magnetfeldstärke von 14,1 T unter Verwendung der Software Topspin 2.1 aufgenommen. 2D und 3D NMR-Spektren wurden mit NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson, 2004) ausgewertet.

2.5.1 ^1H - ^{15}N NMR-Korrelationsspektroskopie zur Detektion von *Bs-CspB*-Oligonukleotid-Titrationsen

Durch die Aufnahme von ^1H - ^{15}N HSQC(*heteronuclear single quantum coherence*)-Spektren von ^{15}N markiertem Protein in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen eines Liganden können Aussagen über den Ort der Ligandenbindung getroffen werden. Die Kreuzsignale in den Spektren geben die Korrelation von Stickstoffkernen und stickstoffgebundenen Protonen wieder, wie sie im Proteinrückgrat und in einigen Seitenketten vorkommen. Eine nahe räumliche Bindung des Liganden oder eine Konformationsänderung des Proteins auf Grund der Ligandenbindung resultiert in einer Änderung der chemischen Verschiebung oder der Intensität bestimmter Kreuzsignale bei Ligandenzugabe. Getrennte Kreuzsignale für freies und an den Liganden gebundenes

Protein können nur dann beobachtet werden, wenn die Geschwindigkeitskonstante des chemischen Austausches zwischen dem freien Protein und dem Protein im Komplex kleiner der Differenz der Resonanzfrequenzen der Kerne in ihren unterschiedlichen magnetischen Umgebungen ist (langsamer Austausch). Liegt jedoch ein schneller Austausch vor, die Geschwindigkeitskonstante des chemischen Austausches ist größer als die Differenz der Resonanzfrequenzen der Kerne, kann nur ein einziges gemittelttes Kreuzsignal detektiert werden. Die Kreuzsignale verschieben dann graduell mit steigender Ligandenkonzentration bis alle Proteinmoleküle im Komplex vorliegen (Levitt, 2008). Die Zuordnung der Resonanzen des freien Proteins kann in diesem Fall einfach auf den gebundenen Zustand übertragen werden. Die mittlere gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung berechnet sich wie folgt:

$$\Delta\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}_\text{N}, ^{15}\text{N}) = \sqrt{(\Delta\delta(^1\text{H}_\text{N}))^2 + \Delta\delta(^{15}\text{N})^2/25}/2 \quad (\text{Grzesiek } et al., 1996)$$

Gleichung 2.15 Mittlere gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung. $\Delta\delta(^1\text{H}_\text{N})$ und $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ Änderung der chemischen Verschiebung von Protonen und Stickstoffatomen.

Strukturelle Informationen über die *Bs*-CspB-RNA-Komplexe wurden mit Hilfe der 2D- ^1H - ^{15}N NMR-Korrelationsspektroskopie gewonnen. Für die Experimente wurde eine 100 μM Lösung von ^{15}N markierten *Bs*-CspB vorgelegt und Aliquots der Oligonukleotide rU₆ (5'-UUUUUU-3') oder rC7 (5'-GUCUUUA-3') sukzessive hinzugegeben bis ein stöchiometrisches Verhältnis von Protein zu RNA von 1:1,5 erreicht war. Nach jedem Titrationsschritt wurden fHSQC-Spektren (Mori *et al.*, 1995) mit einer Datenmatrix von 1024(^1H) x 256(^{15}N) komplexen Punkten aufgezeichnet. Die NMR Experimente wurden bei 20°C in 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 10% D₂O durchgeführt. Bei der Prozessierung wurden die Daten mit einer Cosinus-Fensterfunktion multipliziert und ein einfaches *zero filling* angewendet.

2.5.2 Dreidimensionale Experimente zur Rückgratzuordnung

Die sequentielle Rückgratzuordnung erfolgt mit Hilfe dreidimensionaler Tripel-Resonanz-Experimente an ^{13}C und ^{15}N markierten Proteinproben. Dabei werden die ^1J und ^2J skalare Kopplungen der Kerne $^1\text{H}^\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$ und $^{13}\text{C}^\beta$ ausgenutzt. Die Experimente HNCA und HNCACB liefern zu einem Amidprotonen-Stickstoff-Paar des Rück-

grats einer Aminosäure die chemischen Verschiebungen der C^α und C^β Atome der eigenen und der vorgängigen Aminosäure. Somit können alle Kreuzsignale in einem ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum einem Rest in der Sequenz zugeordnet werden und ermöglichen so in weiteren Experimenten (siehe Abschnitt 2.5.1 und 2.5.3) aminosäure-spezifische Aussagen zu treffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zuordnung der Rückgratresonanzen von gefaltetem und entfaltetem *Bc*-Csp R3E L66E durchgeführt. Die Zuordnung von *Bs*-CspB dagegen ist bereits bekannt (Schnuchel *et al.*, 1993). ^{13}C und ^{15}N markiertes *Bc*-Csp R3E L66E wurde in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 und 15% D_2O gelöst. Durch Hinzugeben von 5,6 M Harnstoff wurde eine Probe des entfaltetes *Bc*-Csp R3E L66E hergestellt. Es wurden TROSY-basierte HNCA (Ikura *et al.*, 1990) und HNCACB (Kay *et al.*, 1990) Spektren mit $1024(^1\text{H}) \times 64(^{15}\text{N}) \times 48(^{13}\text{C})$ bzw. $1024(^1\text{H}) \times 64(^{15}\text{N}) \times 80(^{13}\text{C})$ komplexen Punkten aufgezeichnet, die mit einer Cosinus-Fensterfunktion multipliziert und einem *zero filling* prozessiert wurden. Außerdem wurden ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC- und ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC-Spektren mit $1024(^1\text{H}) \times 232(^1\text{H}) \times 48(^{15}\text{N})$ Datenpunkten aufgenommen und wie oben beschrieben prozessiert. Die Mischzeit des TOCSY-Experiments betrug 100 ms und des NOESY-Experiments 100 ms für das gefaltete Protein bzw. 150 ms für das entfaltete Protein.

2.5.3 ^1H - ^{15}N -Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie

Die relative Intensitätsänderung einer Resonanz im NMR-Spektrum durch Sättigung einer anderen Resonanz wird als Kern-Overhauser-Effekt bezeichnet. Er beruht auf dem Dipol-Dipol-Relaxationsmechanismus, der vom Abstand wechselwirkender Kernspins und von der Rotationskorrelationszeit abhängt. Da die Distanz zwischen Amidproton und Stickstoffatom im Proteinrückgrat für alle Aminosäuren konstant ist, kann durch Messung des ^1H - ^{15}N -Kern-Overhauser-Effekts (^1H - ^{15}N NOE) die Bewegung des Proteinrückgrates auf der Pico- bis Nanosekunden-Zeitskala untersucht werden.

Das Experiment für das Protein *Bc*-Csp R3E L66E wurde in 5,6 M Harnstoff, 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 bei 15°C durchgeführt. Es wurden zwei 2D ^1H - ^{15}N Korrelationsspektren mit und ohne Sättigung der ^1H -Spins aufgenommen (Kwaku und Wagner, 1994). Die Vorsättigung erfolgt nach 3 s Wartezeit vor jedem Scan durch eine Serie von

120° Pulsen für 3 s, die 5 ms von einander getrennt waren. Beide Experimente wurden im *interleaved*-Modus aufgenommen. Der ^1H - ^{15}N NOE ergibt sich aus dem Quotienten der Signalintensität im gesättigten und ungesättigten Experiment und ist über Gleichung 2.16 mit der NOE-Verstärkungsfaktor verknüpft. Der NOE hängt von der Korrelationszeit ab und somit von der Bewegung des Moleküls. Bei sehr schnellen Molekülbewegungen (kleine Korrelationszeit) erreicht er einen theoretischen Wert für das ^1H - ^{15}N -Spinsystem von -3,93 und für sehr langsame Molekülbewegungen (große Korrelationszeit) von 0,83 für eine Magnetfeldstärke von 14,1 T.

$$\text{NOE} = \frac{S_{\text{sat}}}{S_{\text{unsat}}} = 1 + \eta_{\text{IS}}$$

Gleichung 2.16 NOE-Effekt. S_{sat} Signalintensität im gesättigten Experiment, S_{unsat} Signalintensität im ungesättigten Experiment, η_{IS} NOE-Verstärkungsfaktor.

2.6 Kristallstrukturanalyse

Kristallstrukturanalysen an *B_S*-CspB-RNA-Komplexen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch durchgeführt. Dabei übernahm Dr. Klaas E. A. Max die Arbeitsschritte des Einfrierens von Proteinkristallen (2.6.2), die Aufnahme von Röntgenstreubildern (2.6.3) sowie die Indizierung und Integration von Reflexen (2.6.4).

2.6.1 Proteinkristallisation

Die Voraussetzung für die Kristallstrukturanalyse ist die Verfügbarkeit von Einkristallen. Diese lassen sich nur aus Proteinlösungen erzeugen, die hohe Anforderungen an Reinheit und Homogenität erfüllen. Die Reinheit der Proteine kann mit Hilfe leistungsfähiger chromatographischer Verfahren sichergestellt werden und die Homogenität der Probe lässt sich mittels dynamischer Lichtstreuung überprüfen (siehe 2.2.8).

Die Kristallisation der Proteinlösung tritt ein, wenn die Kombination aus Protein- und Fällungsmittelkonzentration eine übersättigte Lösung bilden. Der initiale Schritt stellt die Bildung eines Kristallisationskeimes dar, der schließlich durch die Anlagerung wei-

terer Moleküle zu einem makroskopischen Kristall heranwächst. Da die Bedingungen für die Kristallisation für verschiedene Makromoleküle variieren, müssen sie empirisch gefunden werden. Dabei können neben der Protein- und Fällungsmittelkonzentration auch der pH-Wert, Salzkonzentrationen, Temperatur und die Polarität des Lösungsmittels verändert werden. Daneben können auch Liganden von Proteinen wie z.B. Ionen, Lipide, Zuckermoleküle, Peptide, Coenzyme oder Nukleinsäuren die Kristallisation befördern, indem sie Konformationen des Proteinmoleküls stabilisieren.

Eine häufig angewendete Methode, um eine übersättigte Proteinlösung zu erreichen ist die Methode der Verdampfung eines sitzenden Tropfens (*sitting-drop vapour-diffusion method*) (Abb. 2.2). Hierbei wird ein Teil der Proteinstammlösung mit der Kristallisierlösung, die das Fällungsmittel enthält, gemischt. Der so entstandene Tropfen wird zusammen mit der Kristallisierlösung in einem geschlossenen Gefäß äquilibriert. Die unterschiedlichen Dampfdrücke des Wassers im Tropfen und der Kristallisierlösung verursachen ein Verdampfen des Wassers im Tropfen, Diffusion durch die Gasphase und Kondensieren in der Kristallisierlösung. Dadurch erhöht sich die Konzentration der Makromoleküle im Tropfen langsam, bis schließlich eine übersättigte Lösung entsteht und sich Kristalle bilden.

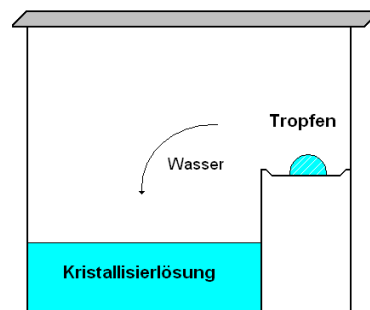


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Proteinkristallisationsanordnung nach der Methode der Verdampfung des sitzenden Tropfens.

Kristallisationsexperimente wurden unter Verwendung der *sitting-drop vapour-diffusion method* durchgeführt. Die Kristallisationsansätze wurden automatisiert mit Hilfe eines Kristallisierroboters (Hydra-plus-One, MATRIX TECHNOLOGIES) durch Mischen von 0,3-0,4 μl *Bs-CspB*-RNA-Komplex-Lösung zu gleichen Teilen mit Kristallisierlösung in Mikrotiterplatten (Crystal Quick LP, GREINER BIO-ONE) hergestellt. Erste Kristallisierungsversuche wurden mit den Screens PEG, PEG II, Ammoniumsulfat, Classics, Classics II, pH Clear, pH Clear II, JCSG (Qiagen) durchgeführt. Gefundene Kris-

tallisationsbedingungen wurden durch Variation der Fällungsmittel- und Salzkonzentration optimiert. Die Kristallisationsplatten wurden bei 20 °C inkubiert und das Kristallwachstum mit einem automatischen Abbildungssystem überwacht.

2.6.2 Einfrieren von Proteinkristallen

Die Datenaufnahme von Röntgenstreubildern unter Tieftemperaturbedingungen hat entscheidende Vorteile gegenüber denen bei Raumtemperatur. Zunächst verbessert die geringere molekulare Bewegung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Diffraktionsbildern. Des Weiteren reduziert sich die Geschwindigkeit von Decarboxylierungsreaktionen von Glutamat- und Aspartat-Resten, die durch Ionen- und Radikalbildung bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auftreten.

Aus diesem Grund wurden alle Kristalle in flüssigen Stickstoff eingefroren und während der Datenaufnahme mit Stickstoffgas gekühlt. Um die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren zu verhindern, bietet es sich an die Kristalle zunächst in einer Lösung mit zugesetztem Kryoprotektanz zu inkubieren. Dies kann die Qualität der Streubilder erhöhen. Jedoch zeigte sich, dass die Kristalle der *Bs-CspB*-ssRNA-Komplexe durch dieses Vorgehen zerstört werden, so dass darauf verzichtet werden musste.

2.6.3 Aufnahme von Röntgenstreubildern

Bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf die Moleküle in einem Kristall werden diese elastisch an den Elektronen gestreut (Thomson-Streuung). Als Röntgenstrahlungsquelle kann eine Röntgenröhre oder ein Synchrotron dienen. Der Vorteil der Synchrotronstrahlung liegt in ihrer hohen Intensität, dem geringen Strahldurchmesser und der Möglichkeit die Wellenlänge einstellen zu können. Röntgenbeugungsdaten wurden aus diesem Grund zum Teil bei der Berliner Elektronen-Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) aufgenommen. Im diesem Abschnitt sollen die Grundlagen der Röntgenbeugung am Kristall skizziert werden.

Das Kristallgitter setzt sich aus einzelnen Elementarzellen zusammen. Diese kleinste Einheit bildet durch Translation entlang der Einheitszellachsen den gesamten Kristall. Die Flächen, die die Elementarzelle begrenzen, und allen Flächen, die sich zwischen

Gitterpunkten aufspannen lassen, können als geometrisches Modell benutzt werden, um die Orte positiver Interferenz der Röntgenstrahlung zu beschreiben. Eine Serie paralleler Ebenen wird dabei eindeutig durch die drei Millerschen Indices h , k und l gekennzeichnet. Nach dem Bragg'schen Gesetz (Gleichung 2.17) lässt sich die Röntgenbeugung als Reflexion an diesen Gitterebenen beschreiben.

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

Gleichung 2.17 Bragg'sches Gesetz. d_{hkl} Distanz zweier Ebenen mit den Millerschen Indices h , k und l , θ Einfallswinkel des Röntgenstrahls, $n \in \mathbf{N}$, λ Wellenlänge der Röntgenstrahlung.

Die Reflexbedingung ist dann erfüllt, wenn der Gangunterschied der Röntgenstrahlen, die an parallelen Ebenen gebeugt werden, ein Vielfaches der Wellenlänge entspricht (Abb. 2.3). Bei definiertem Einfallswinkel des Röntgenstrahls relativ zum Kristall ist dies nur für einen Bruchteil der mit hkl bezeichneten Gitterebenen gegeben. Die beobachteten Reflexe werden nun mit denselben Millerschen Indices benannt wie die Gitterebenen aus denen sie hervorgehen. Durch Rotation des Kristalls und damit Veränderung des Einfallswinkels des Röntgenstrahls werden verschiedene Beugungsbedingungen erfüllt, die die Detektion weiterer Reflexe ermöglichen. In der Praxis wird gewöhnlich jeweils nach einer Drehung von 1° ein Beugungsbild aufgezeichnet.

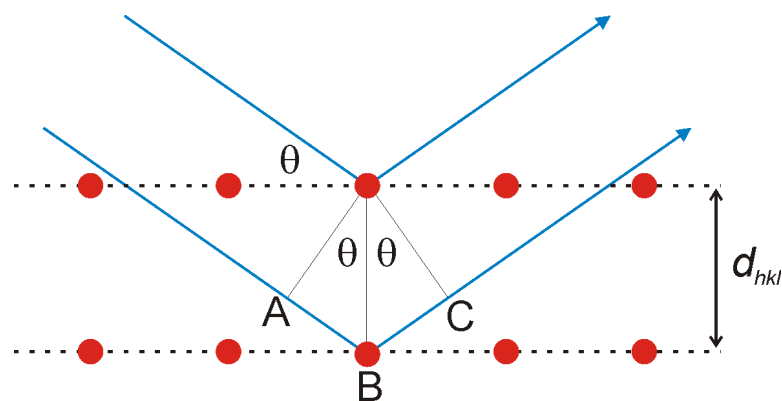


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes. Die Röntgenstrahlen (blaue Linien) werden am Kristallgitter (Gitterpunkte in rot) gebeugt. Reflexbedingungen werden dabei durch Reflexion der Röntgenstrahlen an parallelen Ebenen mit den Millerschen Indices hkl (gestrichelte Linie mit der Distanz d_{hkl} zwischen zwei Ebenen) erklärt. Zur positiven Interferenz zweier Röntgenstrahlen kommt es, wenn die durch den Einfallswinkel θ definierte Strecke ABC einem vielfachen der Wellenlänge entspricht.

Die Positionen der Reflexe auf dem Detektor lassen sich mit einem weiteren mathematischen Modell beschreiben: dem reziproken Gitter. Reales und reziprokes Gitter besitzen denselben Koordinatenursprung, jedoch sind die Abstände der reziproken Gitterpunkte invers zum realen Kristallgitter. Die Formulierung des Braggschen Gesetzes im Reziproken Raum beschreibt nun, dass genau dann die Reflexbedingung erfüllt ist, wenn ein reziproker Gitterpunkt auf der Oberfläche der Ewald-Kugel liegt. Die Ewald-Kugel besitzt im reziproken Raum den Radius $1/\lambda$ und berührt den Koordinatenursprung. Die Rotation des Kristalls im realen Raum entspricht im mathematischen Modell der Drehung der Ewald-Kugel um den Koordinatenursprung und beschreibt so die Erfüllung weiterer Reflexbedingungen. Somit ist auch die theoretische Anzahl detektierbaren Reflexe begrenzt, die von der Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung und der Größe der Elementarzelle abhängt (Gleichung 2.18).

$$N = (4\pi/3) \cdot (2/\lambda)^3 \cdot V$$

Gleichung 2.18 N Anzahl der detektierbaren Reflexe. λ Wellenlänge der Röntgenstrahlung, V Volumen der Elementarzelle.

Die maximal mittels Röntgenkristallographie erzielbare Auflösung eines Molekülmodells wird durch die Reflexe bestimmt, die den größten Streuwinkel aufweisen, also am weitesten außen auf dem Detektor liegen, und entspricht der halben Wellenlänge der Röntgenstrahlung. Dieser theoretische Wert wird allerdings nicht erreicht. Vielmehr ist die Auflösung durch die Mosaizität der Kristallstruktur begrenzt und reduziert so die Zahl der messbaren Reflexe. Damit sind allerdings auch weniger Parameter verfügbar, um das Modell der Moleküle in der Elementarzelle zu beschreiben.

Jeder einzelne Reflex kann durch einen Strukturfaktor beschrieben werden, einer komplexen Einheit, die die Information der Amplitude des gebeugten Röntgenstrahls enthält sowie die Phasenverschiebung (Gleichung 2.19).

$$\vec{F}_{hkl} = |\vec{F}_{hkl}| \cdot e^{i\varphi_{hkl}}$$

Gleichung 2.19 \vec{F}_{hkl} Strukturfaktor mit den Millerschen Indices hkl. $|\vec{F}_{hkl}|$ Strukturfaktoramplitude, φ_{hkl} Phasenverschiebung.

Strukturfaktoren lassen sich auch als Fourier-Synthese aus den Positionen aller atomaren Streuzentren in der Elementarzelle darstellen (Gleichung 2.20) und ermöglichen somit durch Umkehrung ein molekulares Modell zu erstellen.

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

Gleichung 2.20 \vec{F}_{hkl} Strukturfaktor als Fourier-Synthese aus den atomaren Streuzentren. n Anzahl der Atome in der Elementarzelle, f_j atomarer Streufaktor des Atoms j , x_j, y_j, z_j Koordinaten des Atoms j in der Elementarzelle, hkl Millersche Indices.

Mit den zur Verfügung stehenden Röntgenstrahl-Detektoren kann nur die Intensität des Röntgenstrahls gemessen werden, dessen Quadratwurzel proportional zur Strukturfaktoramplitude ist (Gleichung 2.21). Somit geht mit der Phasenverschiebung eine wichtige Größe verloren, die es erforderlich macht weitere Methoden anzuwenden, bevor aus den gemessenen Röntgenstreudaten ein molekulares Modell erstellt werden kann (siehe Abschnitt 2.6.5).

$$\left| \vec{F}_{hkl} \right| \propto \sqrt{I_{hkl}}$$

Gleichung 2.21 $\left| \vec{F}_{hkl} \right|$ Strukturfaktoramplitude. I_{hkl} Intensität des Röntgenstrahls.

Röntgen-Diffraktionsdaten wurden bei 110 K am BESSY unter Verwendung des mar245 *Image-plate*-Detektors (Mar Research) oder der CCD-Kamera MW-225 (Rayonix) aufgenommen.

2.6.4 Indizierung und Integration von Reflexen

Das Konzept des reziproken Gitters ermöglicht es jeden gemessenen Reflex eindeutig mit den Millerschen Indices zu identifizieren. Dabei müssen während der Datenaufnahme nicht alle möglichen Reflexe detektiert werden. Nach dem Friedelschen Gesetz sind generell nur die Hälfte aller Streuintensitäten einzigartig. Außerdem können in der Elementarzelle je nach Raumgruppe weitere Symmetrien vorliegen. Dabei kann mit einem Bruchteil der Elementarzelle, der asymmetrischen Einheit, durch Rotation und Schrau-

bung (bei chiralen Molekülen) der Inhalt der gesamten Elementarzelle beschrieben werden. Somit erhöht sich die Zahl der Bijvoet-Paare (Reflexen mit identischer Intensität) und der Kristall muss um einen noch geringeren Teil gedreht werden, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Dennoch ist in der Praxis Redundanz im Datensatz erwünscht, um die Datenqualität zu erhöhen und die Standardabweichung einzigartiger Reflexe in der Strukturverfeinerung zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 2.6.7). Der Parameter R_{meas} (Gleichung 2.22) dient dabei als Indikator für die Datenqualität (Diederichs und Karplus, 1997).

$$R_{\text{meas}} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sqrt{\frac{M}{M-1}} \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M \frac{|\bar{I}_j - I_{jk}|}{|\bar{I}_j|}$$

Gleichung 2.22 R_{meas} R-Faktor zum Vergleich von symmetrieverwandten Reflexen. N Anzahl der gemessenen einzigartigen Reflexe, M Anzahl der mehrfachen Messung eines einzigartigen Reflexes, \bar{I}_j Mittelwert der Intensität eines mehrfach gemessenen Reflexes, I_{jk} individuelle Intensität eines Reflexes.

Nachdem alle Reflexe zugeordnet sind können die Elementarzellparameter und die Raumgruppe bestimmt werden (Programm: HKL-2000) sowie die Reflexe integriert werden (Programm: XDS). Des Weiteren werden die Reflexintensitäten um auftretende Effekte, wie Röntgenabsorption und inelastische Streuung (Compton-Effekt) korrigiert (Programm: XSCALE). Schließlich wird ein Satz Strukturfaktoramplituden erzeugt, die im MTZ-Dateiformat abgelegt werden. Diese kann dann mit dem CCP4-Programmpaket weiter verarbeitet werden.

2.6.5 Molekularer Ersatz zur Lösung des Phasenproblems

Um vollständige Strukturfaktoren zu erhalten, müssen neben den Strukturfaktoramplituden auch deren Phasen bestimmt werden. Die Methode des molekularen Ersatzes nutzt dabei die Atomkoordinaten eines bereits vorhandenen molekularen Modells. Dieses muss dem Zielmolekül ähnlich sein, aber nur wenn die Kristalle des Modells und des neuen Makromoleküls isomorph zueinander sind, können die Phasen aus dem Modell direkt mit den experimentellen Strukturfaktoramplituden kombiniert werden.

Falls sich die Orientierung und Position der Moleküle in den Elementarzellen der beiden Kristalle unterscheiden, muss das Modell für den molekularen Ersatz neu ausgerichtet und verschoben werden. Mit Hilfe der Patterson-Funktion (Gleichung 2.23) kann diese Aufgabe gelöst werden.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left| \vec{F}_{hkl} \right|^2 \cdot e^{-2\pi i(hu + kv + lw)}$$

Gleichung 2.23 Patterson Funktion. $\left| \vec{F}_{hkl} \right|$ Strukturfaktoramplitude, V Volumen der Elementarzelle.

Sie lässt sich allein aus den Strukturfaktoramplituden berechnen, Phasen werden dabei nicht benötigt. Durch Multiplikation der Patterson-Funktion unter Verwendung der experimentellen Daten mit Patterson-Funktionen, die sich aus verschiedenen Orientierungen und Positionen der Modellstruktur ergeben, und anschließender Integration über einen definierten Radius kann eine Bewertungsfunktion (Gleichung 2.24) definiert werden. Diese wird dann maximal, wenn die Lage des Makromoleküls aus dem Modell mit der Zielstruktur übereinstimmt.

$$S = \int_{r=r_1}^{r_2} P_{\text{Experiment}} \cdot P_{\text{Model}} \, dr$$

Gleichung 2.24 Bewertungsfunktion. $P_{\text{Experiment}}$ Patterson-Funktion der experimentellen Daten, P_{Model} Patterson-Funktion der Modell-Daten, r Integrationsradius.

Da der rechentechnische Aufwand der gleichzeitigen Optimierung von Rotation und Translation zu groß wäre, werden bei den Berechnungen beide Operationen durch geeignete Wahl des Integrationsradius in eine Rotations- und eine Translationsfunktion getrennt.

Weitere Methoden, wie eine *Rigid-body*-Verfeinerung und Tests auf intermolekulare Überlappungen unterstützen schließlich das Auffinden der exakten Lösung. Mit dieser können dann Strukturfaktoren des Modells in der experimentellen Elementarzelle berechnet werden. Die sich daraus ergebenden Phasen des Modells werden mit den experimentellen Strukturfaktoramplituden kombiniert und ergeben so die anfänglichen Strukturfaktoren des gesuchten Moleküls.

Das Phasenproblem für beide *Bs*-CspB-ssRNA-Komplexstrukturen konnte durch molekularen Ersatz unter Verwendung des Programms Phaser 2.1.4 aus dem CCP4-Programmpaket gelöst werden. Die Kristallstruktur des freien *Bs*-CspB diente dabei als molekulares Modell.

2.6.6 Berechnung von Elektronendichtekarten

Für die folgenden Schritte auf dem Weg zu einer Struktur für das Zielmolekül sind Elektronendichtekarten von entscheidender Bedeutung. Sie lassen sich direkt aus Strukturfaktoren berechnen (Gleichung 2.25). Lokale Maxima der Elektronendichte beschreiben dabei Positionen von Atomen, so dass sich damit ein neues molekulares Modell erstellen lässt.

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

Gleichung 2.25 $\rho(x, y, z)$ Elektronendichte an der Position x, y, z . \vec{F}_{hkl} Strukturfaktor, V Volumen der Elementarzelle.

Nach der Lösung des Phasenproblems mit Hilfe des molekularen Ersatzes stehen nun neben experimentellen Strukturfaktoramplituden auch Abschätzungen für deren Phasen zur Verfügung, so dass sich erste Elektronendichtekarten erstellen lassen. Da jedoch die Phasen des Modells die experimentellen Strukturfaktoramplituden bei der Berechnung der Elektronendichte dominieren können, werden bevorzugt Differenzelektronendichtekarten erzeugt (Gleichung 2.26). Hierbei bildet die Differenz aus experimentellen Strukturfaktoramplituden und aus dem Modell berechnete Strukturfaktoramplituden die Amplitude für die Fourier-Synthese.

$2F_0 - F_c$ Elektronendichtekarte:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left(2 \left| \vec{F}_{hkl, \text{obs}} \right| - \left| \vec{F}_{hkl, \text{calc}} \right| \right) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz) + i\varphi_{\text{calc}}}$$

F_0 - F_c Elektronendichtekarte:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \left(\left| \vec{F}_{hkl, \text{obs}} \right| - \left| \vec{F}_{hkl, \text{calc}} \right| \right) \cdot e^{-2\pi i (hx + ky + lz) + i\varphi_{\text{calc}}}$$

Gleichung 2.26 Differenzelektronendichtekarten zur Darstellung von Unterschieden der experimentellen Strukturfaktoramplituden ($\left| \vec{F}_{hkl, \text{obs}} \right|$) und denen aus dem molekularen Modell berechneten ($\left| \vec{F}_{hkl, \text{calc}} \right|$). V Volumen der Elementarzelle, φ_{calc} Phasen, die aus dem Modell berechnet werden.

Während die $2F_0$ - F_c -Karte Positionen von Atomen anzeigt, können mit der F_0 - F_c -Karte Bereiche sichtbar gemacht werden, in denen das aktuelle Modell nicht die experimentellen Daten erklären kann. Die Aufgabe der folgenden Arbeitsschritte besteht nun darin das molekulare Modell zu verbessern, um somit diese Unterschiede zu minimieren.

$2F_0$ - F_c und F_0 - F_c -Karten wurden nach jedem Strukturverfeinerungszyklus (siehe folgender Abschnitt) durch das Programm Refmac 5.5.0072 berechnet und anschließend zusammen mit dem molekularen Modell unter Verwendung des Programms Coot 0.5.2 dargestellt.

2.6.7 Strukturverfeinerung

Neben der Verbesserung des Modells durch manuelles Hinzufügen, Entfernen und Neuorientieren von Molekülgruppen im realen Raum mit Hilfe von Elektronendichtekarten wird die Verfeinerung im reziproken Raum durch Computerunterstützung vorangetrieben. Während dieser Prozedur werden die Positionen der Atome des Modells variiert, um eine möglichst große Übereinstimmung der experimentellen Daten mit denen aus dem Modell berechneten zu erreichen, ohne dabei chemische Beschränkungen wie Bindungslängen, -winkel und andere stereochemische Parameter wesentlich zu verletzen. Im Laufe des Verfeinerungsprozesses wird die Lage eines Atoms durch die drei Raumkoordinaten (x, y, z) beschrieben und zunächst eine isotrope Auslenkung um dieses Zentrum angenommen. Die Ursache für diese Auslenkung kann eine tatsächliche thermische Bewegung oder unterschiedliche Positionen des Atoms in verschiedenen Elementarzellen sein. Die isotrope Auslenkung fließt als zusätzlicher Parameter in die Berechnung von Struktur Faktoren ein (Gleichung 2.27, vergleiche mit Gleichung 2.20).

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} e^{-B_j \sin^2 \theta / \lambda^2}$$

Gleichung 2.27 Berechnung der Strukturfaktoren unter Berücksichtigung isotroper Bewegung des Streuzentrums. B_j Debye-Waller-Faktor (Temperaturfaktor). $\sin^2 \theta / \lambda^2$ Korrektur, abhängig vom Einfallswinkel θ des Röntgenstrahls mit der Wellenlänge λ .

Bei fortschreitender Verfeinerung kann darüber hinaus eine anisotrope Bewegung von Atomgruppen angenommen werden. Diese sogenannte TLS-Verfeinerung geht davon aus, dass sequentiell aufeinander folgende Aminosäuren konzertiert eine Translations-, Librations- oder Schraubungsbewegung ausführen, die sich mit 20 Parametern pro Gruppe beschreiben lässt. Der Vorteil gegenüber der Anpassung an eine anisotrope Bewegung jedes einzelnen Atoms besteht darin, deutlich weniger Parameter zu benötigen. Die vollständig anisotrope Verfeinerung wird deshalb nur dann angewendet, wenn Reflexdaten mit ausreichend hoher Auflösung und somit großer Anzahl von experimentellen Strukturfaktoramplituden vorliegen.

Der Fortschritt der Strukturverfeinerung wird anhand des kristallographischen R-Faktors verfolgt (Gleichung 2.28), der den Unterschied zwischen den experimentellen und den aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden beschreibt. Hierbei wird zwischen dem R_{work} und dem R_{free} -Faktor unterschieden. Letzterer geht aus einem kleinen Teil der experimentellen Strukturfaktoramplituden (z.B. 5 %) hervor, der nicht für die Strukturverfeinerung verwendet wird, und somit ein verlässlicher Parameter ist, um zu verhindern, dass das Modell zu stark an die Daten angepasst wird.

$$R = \sum_{j=1}^N \frac{\left\| \vec{F}_{j,\text{obs}} - \vec{F}_{j,\text{calc}} \right\|}{\left| \vec{F}_{j,\text{obs}} \right|}$$

Gleichung 2.28 Kristallographischer R-Faktor. N Anzahl der gemessenen einzigartigen Reflexe, $\left| \vec{F}_{j,\text{obs}} \right|$ experimentelle Strukturfaktoramplitude, $\left| \vec{F}_{j,\text{calc}} \right|$ aus dem molekularen Modell berechnete Strukturfaktoramplitude.

Die Verfeinerung erfolgt abwechselnd im realen und im reziproken Raum. Mit dem Ziel den Wert des kristallographischen R-Faktors fortlaufend zu reduzieren, bis schließlich keine Verbesserung mehr erreicht werden kann. Die Elektronendichtekarten werden

dadurch immer klarer und mehr molekulare Details lassen sich erkennen, die zu einem schrittweise verbesserten Modell führen.

Automatische Positions- und Temperaturfaktor-Verfeinerung basierend auf der *Maximum-Likelihood*-Methode wurde mit dem Programm Refmac 5.5.0072 durchgeführt. Für erste Modellanpassungen der *Bs-CspB*-ssRNA-Komplexe im realen Raum wurde ARP/wARP 7.0.1 eingesetzt, das in der Lage ist, selbstständig Aminosäuren in Elektronendichtekarten einzufügen. Dies wurde im weiteren Verlauf durch manuelles Bauen des Modells mittels Coot 0.5.2 ersetzt. Nachdem das Protein vollständig in die Elektronendichte eingepasst war, konnte zusätzliche Dichte in der $2F_0$ -Fc- und der F_0 -Fc-Karte mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Das Einfügen von Wasseratomen an Positionen, die die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in einer Distanz von 2,4 -3,6 Å ermöglichte, führte zu einer weiteren Verringerung der kristallographischen R-Faktoren. Während der letzten Verfeinerungszyklen wurde außerdem die Anwesenheit von Wasserstoffatomen berücksichtigt. In dem finalen röntgen-kristallographischen Modell werden diese jedoch nicht dargestellt. Die TLS-Verfeinerung wurde mit 8 bzw. 10 Gruppen für jedes Proteinmolekül im *Bs-CspB*-rU₆ und im *Bs-CspB*-rC7-Komplex durchgeführt. Die Definition der Gruppen erfolgte mit Hilfe des TLS *Motion Determination* Web-Servers (Painter und Merritt, 2006). Die TLS-Parameter nach dem letzten Verfeinerungszyklus konnten schließlich in Anisotropie-Parameter für die einzelnen Atome des Proteinmoleküls im *Bs-CspB*-rU₆ Komplex umgerechnet werden (Programm: Tlsanl, CCP4 Programmpaket). Die Reflexdaten für den *Bs-CspB*-rC7 waren von ausreichender Qualität, um im letzten Verfeinerungsschritt eine unabhängige anistrophe Bewegung aller Atome anzunehmen.

2.6.8 Bewertung und Validierung der Struktur

Das Ziel der Strukturverfeinerung ist es den kristallographischen R_{work} -Faktor so weit wie möglich zu reduzieren. Der R_{free} -Faktor ist dabei ein verlässlicher Indikator um zu überprüfen, ob die Annahmen im molekularen Modell tatsächlich mit den Diffraktionsdaten erklärt werden können. Darüber hinaus wurden weitere Parameter mit dem Programm SFCHECK aus dem CCP4 Programmpaket bestimmt. Zum Beispiel beschreibt der Elektronendichte-Korrelationskoeffizient (*real space correlation coeffi-*

cient), in welchem Maße die Elektronendichtekarten, die aus dem Modell und den experimentellen Daten errechnet wurden, übereinstimmen. Aus der Auftragung der kristallographischen R-Faktoren gegen die Auflösung im Luzzati-Diagramm lässt sich die Obergrenze des mittleren Koordinatenfehlers der Atome abschätzen.

Einen anderen Ansatz verfolgen die Programme PROCHECK (CCP4 Programmpaket) und WHATCHECK (Hoofst *et al.*, 1996). Sie überprüfen die Plausibilität des molekularen Modells durch Vergleich ihrer strukturellen Eigenschaften mit anderen Kristallstrukturen. Dabei werden Bindungslängen, Bindungswinkel sowie Rückgrattorsionswinkel (Ramachandran-Diagramm) und Chiralitäten untersucht. Außerdem wird getestet, ob nichtkovalente Atomabstände im erlaubten Bereich sind und Wassermoleküle an möglichen Positionen eingefügt wurden. Auch alternative Konformationen von Histidin, Glutamin und Asparagin-Seitenketten werden vorgeschlagen, um nur einige Parameter zu nennen.

Die anisotrope Verfeinerung wurde mit der Web-Anwendung Parvati (*Protein Anisotropic Refinement Validation and Analysis Tool*) (Merritt, 1999) überprüft.

2.6.9 Visuelle Darstellung der molekularen Struktur

Alle visuellen Darstellungen des Modells wurden mit der Pymol-Software erstellt. Zur Berechnung von elektrostatischen Oberflächenpotentialen wurde das Programm Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) eingesetzt.

3 Der chemisch-entfaltete Zustand von *Bc-Csp* R3E L66E

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Stabilität von *Bc-Csp* R3E L66E

Die Stabilität der Doppelmutanten Arg 3 → Glu/Leu 66 → Glu des Kälteschockproteins von *Bacillus caldolyticus* wurde gegenüber dem Denaturierungsmittel Harnstoff untersucht. Der Puffer 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 garantiert eine geringe Ionenstärke, wodurch die negativen Ladungen der Glutamatreste kaum abgeschwächt werden und durch elektrostatische Abstoßung das Protein besonders destabilisieren. Die Experimente wurden bei 15°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur *Bc-Csp* R3E L66E die höchste Stabilität besitzt (Szyperski *et al.*, 2006). Außerdem erfolgten die Messungen in Wasser (H₂O) und in einem 15 %igen Gemisch aus schwerem und leichtem Wasser (15% D₂O), weil geplante NMR-Experimente die Zugabe von 15 Vol.-% D₂O erfordern. Die Faltungsübergänge (Abb. 3.1 und Abb. 3.2) wurden nach dem Zwei-Zustandsmodell analysiert und lassen eine genaue Bestimmung der freien Enthalpie der Entfaltung zu (Tab. 3-1).

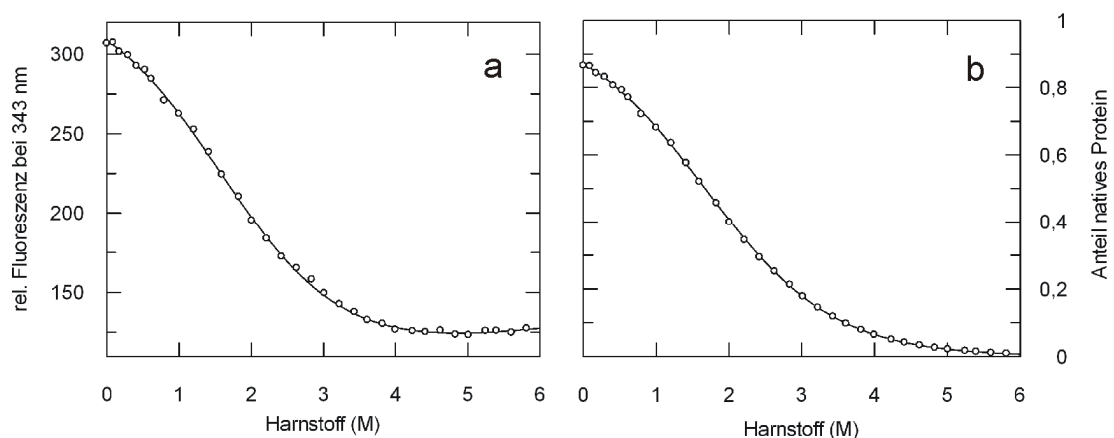


Abb. 3.1 Harnstoffübergang von *Bc-Csp* R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensität (a) und der Anteil des nativen Proteins (b) in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Die durchgezogenen Linien beschreiben die Anpassung der Daten an das Zwei-Zustandsmodell. Die Parameter sind in Tab. 3-1 aufgeführt.

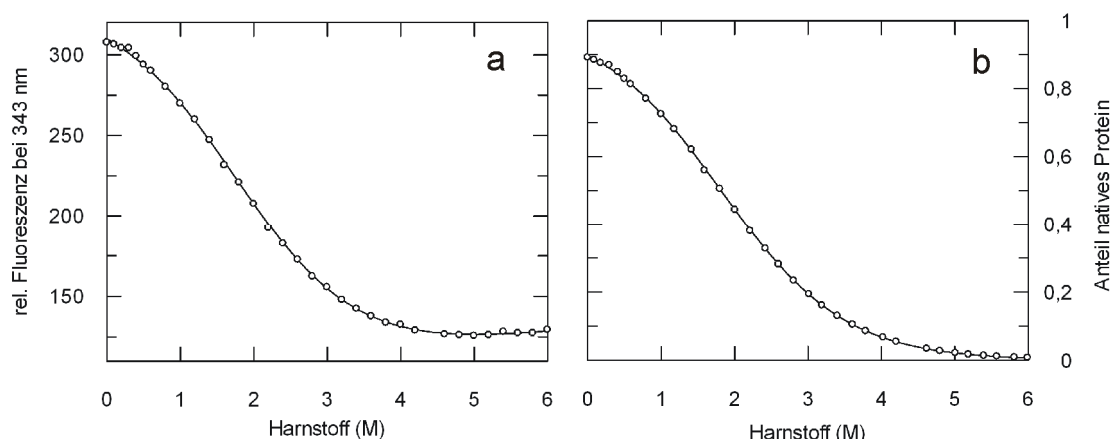


Abb. 3.2 Harnstoffübergang von *Bc-Csp R3E L66E* in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 15% D₂O. Aufgetragen sind die Fluoreszenzintensität (a) und der Anteil des nativen Proteins (b) in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Die durchgezogenen Linien beschreiben die Anpassung der Daten an das Zwei-Zustandsmodell. Die Parameter sind in Tab. 3-1 aufgeführt.

In 15 Vol.-% D₂O ist das Protein geringfügig stabiler als in Wasser, dennoch liegt selbst in Abwesenheit von Harnstoff ein erheblicher Teil der Proteinmoleküle, der 13 bzw. 10 % beträgt, entfaltet vor. Beide Übergänge sind durch eine sehr geringe Kooperativität gekennzeichnet, stimmen jedoch weitgehend mit den Werten, die für *Bs-CspB* unter fast identischen Bedingungen ermittelt wurden (Tab. 3-2), überein. Mit Hilfe dieser thermodynamischen Parameter lässt sich berechnen, dass bei 5,6 M Harnstoff und 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 und 15°C 99 % der *Bc-Csp R3E L66E*-Moleküle im entfalteten Zustand vorliegen.

	H ₂ O	15 % D ₂ O
$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ in kJ/mol ⁻¹	4,57 ± 0,20	5,20 ± 0,15
m in kJ(mol·M ⁻¹)	-2,74 ± 0,13	-2,86 ± 0,09

Tab. 3-1 Thermodynamische Parameter von *Bc-Csp R3E L66E* in 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 bei 15°C in Ab- und Anwesenheit von 15% D₂O.

	H ₂ O	10 % D ₂ O
$\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$ in kJ/mol ⁻¹	9,96 ± 0,90	12,37 ± 0,39
m in kJ(mol·M ⁻¹)	-2,85 ± 0,21	-3,48 ± 0,13

Tab. 3-2 Thermodynamische Parameter von *Bs-CspB* in 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 bei 15°C in Ab- und Anwesenheit von 10% D₂O.

3.1.2 NMR-Spektroskopische Charakterisierung des mittels Harnstoff entfalteten *Bc-Csp* R3E L66E

Von nativem und in 5,6 M Harnstoff entfaltetem ^{13}C und ^{15}N markiertem *Bc-Csp* R3E L66E wurden ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren an einem 18,8 T NMR-Spektrometer aufgenommen (Abb. 3.3). Das Spektrum des nativen Proteins weist die für gefaltete Proteine typische Dispersion der Kreuzsignale auf. Jedoch sind die Linienbreiten für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 7,3 kDa recht groß. Außerdem besitzen einige Resonanzen eine sehr geringe Intensität. Folglich ist auch die Qualität der Spektren von den Tripelresonanz-Experimenten HNCA und HNCACB nicht ausreichend, um eine vollständige Zuordnung der Resonanzen des Proteinerückgrates durchzuführen. Nach dem Hinzuziehen der Spektren der 3D-Experimente ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC und ^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC konnten 37 von 64 erwarteten Kreuzsignalen der Rückgratamide zugeordnet werden (Abb. 3.5).

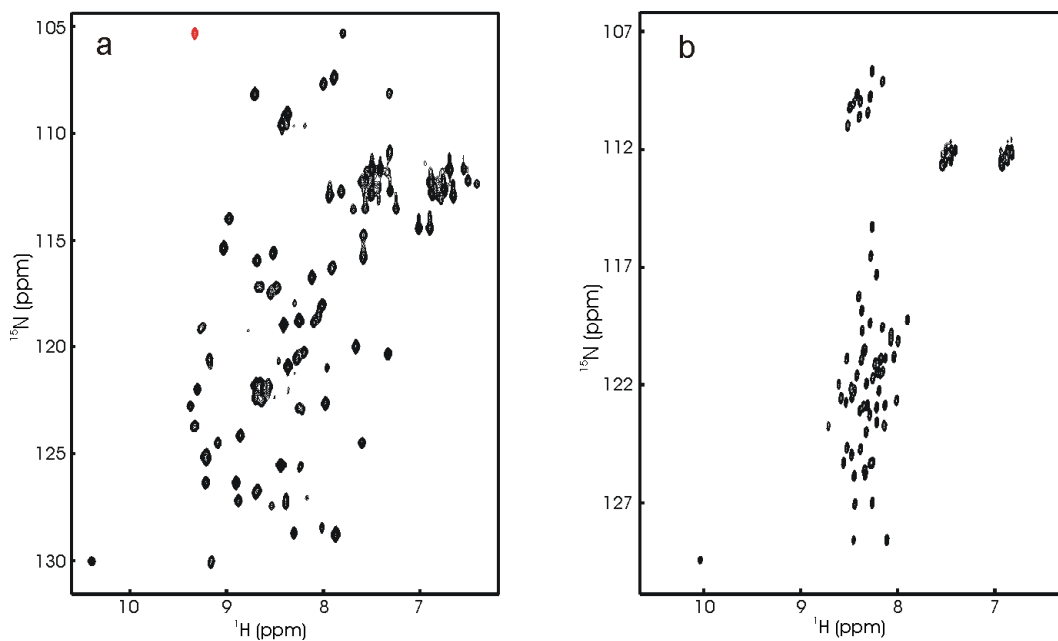


Abb. 3.3 ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von *Bc-Csp* R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 15% D_2O bei 15°C . (a) in Abwesenheit und (b) in Anwesenheit von 5,6 M Harnstoff. Die Proteinkonzentration betrug $760\ \mu\text{M}$ (a) bzw. $660\ \mu\text{M}$ (b). Die in rot gezeigte Resonanz besitzt eine negative Intensität..

Im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum des entfalteten *Bc-Csp* R3E L66E befinden sich die Resonanzfrequenzen der Amidprotonen in einem nur schmalen Bereich zwischen 7,9 und 8,7 ppm, so wie es für Proteine ohne Tertiärstruktur erwartet wird. Trotz der geringen Dis-

persion sind die Kreuzsignale auf Grund der geringen Linienbreite so weit separiert, dass nach der Durchführung der Tripelresonanz-Experimente HNCA und HNCACB an dem ^{13}C und ^{15}N markierten Protein und genauer Inspektion der Spektren die Rückgratamide vollständig zugeordnet werden konnten (Abb. 3.6). Die scharfen Peaks weisen bereits auf eine niedrige Rotationskorrelationszeit hin. Um zu bestimmen, ob es sich tatsächlich um eine flexible Peptidkette handelt, wurde der ^1H - ^{15}N -Kern-Overhauser-Effekt jeder Aminosäure gemessen, womit sich die Beweglichkeit des Vektors zwischen Amidproton und Stickstoffatom im Proteinrückgrat auf der Pico- bis Nanosekunden-Zeitskala bestimmen lässt. Die niedrigen NOE-Effekte von $\leq 0,4$ (Abb. 3.4) bestätigen die Ergebnisse aus der Korrelationspektroskopie, dass es sich um eine Peptidkette ohne jegliche Sekundärstrukturelemente handelt.

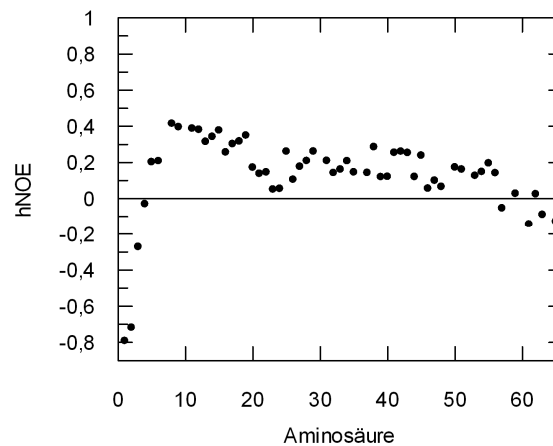


Abb. 3.4 Heteronuklearer NOE-Effekt von *Bc-Csp* R3E L66E in 5,6 M Harnstoff, 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 15% D_2O bei 15°C . Gemessen bei einer ^{15}N -Resonanzfrequenz von 60,9 MHz.

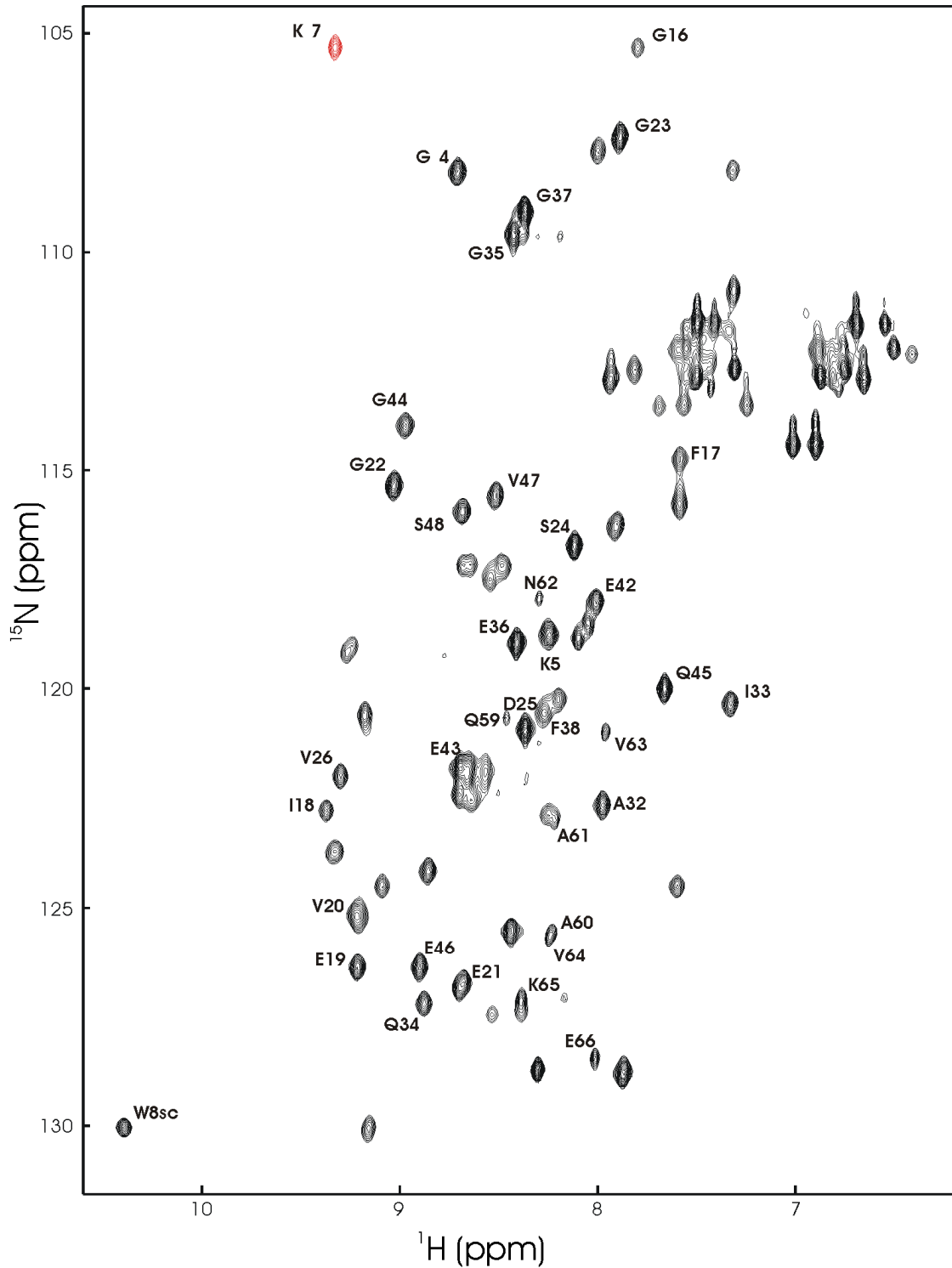


Abb. 3.5 ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von *Bc*-Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 15% D_2O bei 15°C . Die Kreuzsignale der Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

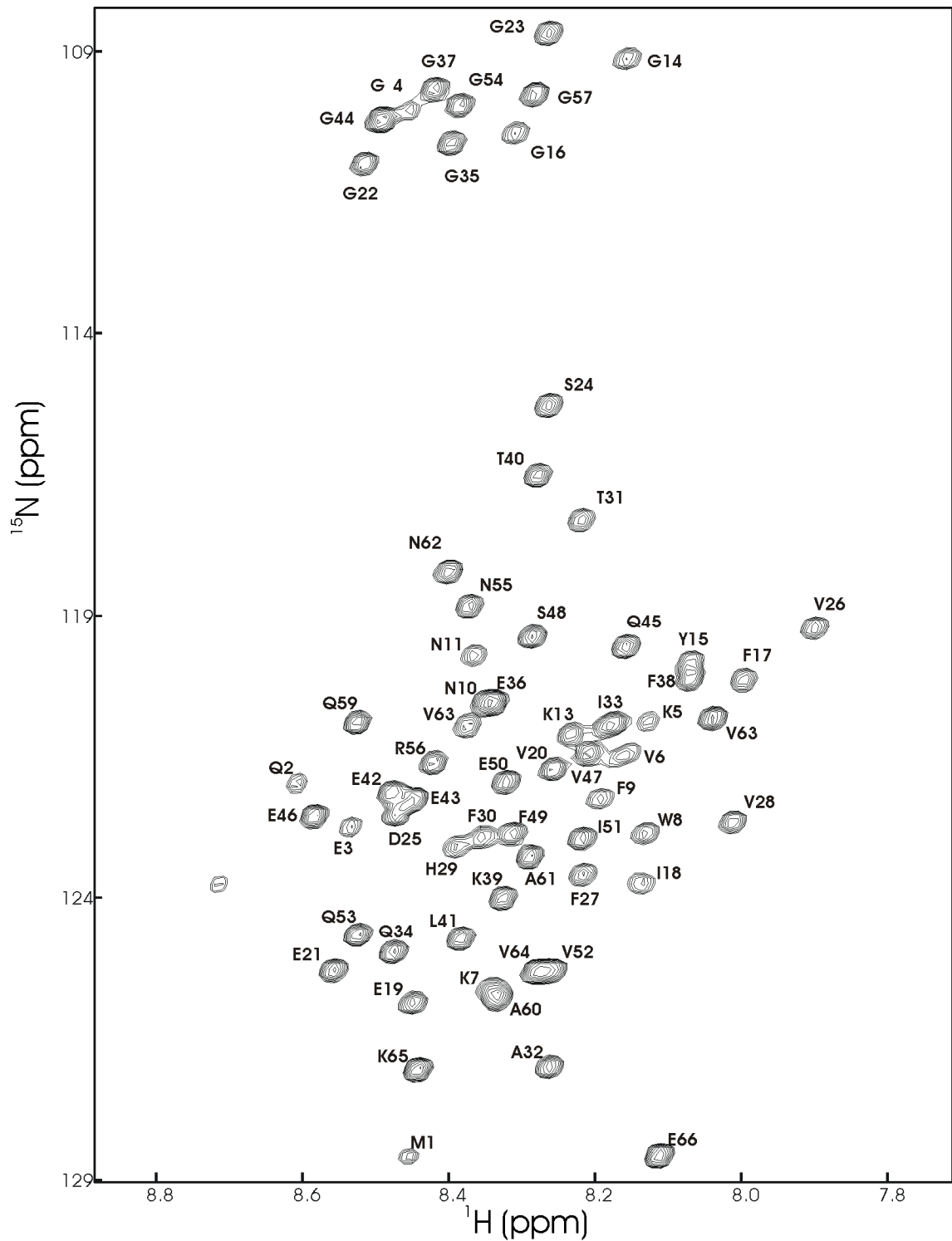


Abb. 3.6 ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von *Bc*-Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, 5,6 M Harnstoff, pH 7,0 15% D_2O bei 15°C. Die Kreuzsignale der Amidprotonen sind im Einbuchstabencode beschriftet.

3.2 Diskussion- *Bc*-Csp R3E L66E, ein geeignetes Protein zur Untersuchung der Kältedenaturierung mittels multidimensionaler NMR-Spektroskopie

Der Harnstoffübergang der kältesensitiven Doppelmutante *Bc*-Csp R3E L66E belegt die geringe Änderung der freien Enthalpie während der Entfaltung des Proteins selbst bei einer Temperatur von 15°C, bei der die höchste Stabilität erwartet wird (Abb. 1.4). Der prinzipielle Faltungsmechanismus des Proteins wird durch die Mutationen jedoch nicht beeinflusst. Er lässt sich wie für das Wildtyp-Protein mit dem 2-Zustandsmodell beschreiben. Auch das Maß der Kooperativität des Übergangs (m-Wert, Tab. 3-1), der proportional zu der Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche bei der Entfaltung ist, stimmt mit dem Wert für das homologe Kälteschockprotein *Bs*-CspB überein. Der direkte Vergleich der m-Werte von *Bc*-Csp R3E L66E und *Bc*-Csp ist nicht möglich, da auf Grund der hohen Stabilität des Wildtyp-Proteins ein Übergang mit Harnstoff nicht detektiert werden kann.

Die Stabilität des *Bc*-Csp R3E L66E, die in Gegenwart von 15 % D₂O/85 % H₂O höher ist als in einem Puffer mit 100 % H₂O, weist einen deutlichen Isotopeneffekt auf. Die schnelle Faltungs- und Entfaltungsreaktion des Proteins (Perl *et al.*, 1998) garantiert, dass die austauschbaren Amidprotonen des Proteinrückgrates in kürzester Zeit nach dem Auflösen des Proteins in dem 15% D₂O/85 % H₂O-Puffer ein stabiles N-H/N-D-Verhältnis erreichen und Messungen im thermodynamischen Gleichgewicht so leicht zugänglich sind. Der Einfluss von D₂O auf die Stabilität von Proteinen ist in der Literatur vielfach beschrieben. So werden z.B. RNase A, Lysozym, Cytochrom c, Azurin und die N-terminale Domäne des ribosomalen Proteins L9 (Makhatadze *et al.*, 1995; Guzzi *et al.*, 1998; Krantz *et al.*, 2000; Sato und Raleigh, 2007) durch die Anwesenheit von schwerem Wasser destabilisiert. Eine weitere Studie beschreibt die Wirkung von D₂O auf Lysozym und Rinderserumalbumin als stabilisierend (Efimova *et al.*, 2007). Zwei gegensätzliche Effekte sind für die unterschiedlichen Beobachtungen verantwortlich. Einerseits verstärkt D₂O den hydrophoben Effekt (Kresheck *et al.*, 1965), andererseits schwächt D₂O Wasserstoffbrückenbindungen vor allem bei Proteinen, die einen hohen Anteil an α -Helices besitzen (Krantz *et al.*, 2002). Da das Verbergen von hydrophoben Seitenketten eine treibende Kraft bei der Faltung des aus β -Faltblättern bestehenden *Bc*-

Csp R3E L66E ist, dominiert hier der Einfluss auf den hydrophoben Effekt und verschiebt das Gleichgewicht zwischen gefaltet und entfaltet zu Gunsten des nativen Proteins. Die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15°C in 15 % D₂O/85 % H₂O ermittelt durch Extrapolation auf 0 M Harnstoff erreicht mit einem Wert von $5,20 \pm 0,15$ kJ/mol so fast auch den zuvor bei identischen Bedingungen durch thermische Entfaltung ermittelten ΔG_U -Wert von $6,19 \pm 0,53$ kJ/mol (Szyperski *et al.*, 2006).

Die geringe Stabilität von *Bc*-Csp R3E L66E birgt einige Schwierigkeiten für die Charakterisierung des nativen Zustandes mittels NMR-Spektroskopie. Der höchste Anteil an nativem Protein wird bei 15°C erreicht und beträgt 87 %. NMR-Experimente werden jedoch bevorzugt bei höheren Temperaturen durchgeführt, bei denen sich die Rotationskorrelationszeit des Proteins verkürzt und zu schmalen Linienbreiten führt. Die geringe Qualität des ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrums in Abb. 3.3 a lässt sich allerdings nicht allein auf die niedrigen Temperaturen, bei denen das Experiment durchgeführt wurde, zurückführen, vielmehr scheint die hohe Entfaltungsrate dieses Proteins, den Austausch der Amidprotonen mit den Protonen des Wassers zu begünstigen, wodurch die Intensität der Kreuzsignale verringert wird. Die Reduktion des pH-Wertes von 7,0 auf 6,0 sollte den Austausch um den Faktor 10 verlangsamen. Allerdings konnte durch diese Änderung der Pufferbedingungen keine deutliche Verbesserung erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Als weitere Ursache der geringen Qualität des Spektrums kommt auch der chemische Austausch zwischen gefaltetem und entfaltetem Protein in Frage. Unter nativen Bedingungen konnten in dem ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrum neben den Resonanzen für das gefaltete Protein auch Signale mit geringer Intensität für das entfaltete Protein identifiziert werden. Es liegt also ein langsamer Austausch vor, bei dem die Differenz der chemischen Verschiebung ($\Delta\omega$) größer als die Austauschrate (k_{ex}) ist. $\Delta\omega$ z.B. für das Kreuzsignal des G16 im gefalteten und entfalteten *Bc*-Csp R3E L66E lässt sich mit etwa 5700 s⁻¹ abschätzen und ist damit zwar größer als k_{ex} des gesamten Proteins, das mit etwa 1000 Hz angegeben werden kann (Perl *et al.*, 1998), liegt jedoch in der selben Größenordnung. Die Nähe zum intermediären Austausch ($\Delta\omega \approx k_{ex}$) bei dem gegebenen Populationsverhältnis des gefalteten und entfalteten Proteins von 0,87:0,13 liefert somit eine mögliche Erklärung für die hohen Linienbreiten und geringen Intensitäten.

Schließlich muss für folgende Experimente berücksichtigt werden, dass für Proteinkonzentrationen über 800 μM keine Verbesserung des Verhältnisses von Signal-zu-Rauschen erzielt werden konnte. Dies deutet auf eine vorübergehende Aggregation des *Bc-Csp R3E L66E*, was ebenfalls Einfluss auf die Qualität von NMR-Spektren hat.

Das entfaltete *Bc-Csp R3E L66E* liefert im Gegensatz zum nativen *Bc-Csp R3E L66E* Spektren mit hoher Qualität. Eine vollständige Zuordnung des ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrums konnte somit erfolgen und ermöglichte auch durch Bestimmung des ^1H - ^{15}N -Kern-Overhauser-Effektes den Nachweis, dass die Polypeptidkette in Anwesenheit von 5,6 M Harnstoff keine verbleibenden Sekundärstrukturelemente besitzt. Es bleibt abzuwarten, ob die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Szyperski (Universität Buffalo, USA) Unterschiede zwischen dem durch Kälte und Hitze denaturierten Zuständen und dem durch Harnstoff denaturierten Zustand aufdecken kann.

4 Bindung einzelsträngiger RNA an das Kälteschockprotein B aus *Bacillus subtilis*

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Bindungsaffinität einzelsträngiger RNA an *Bs*-CspB

Verschiedene ssRNA-Oligonukleotide wurden mit Tryptophan-Fluoreszenz-Titrationsexperimenten getestet, um geeignete Fragmente für die Strukturbestimmung eines *Bs*-CspB·ssRNA-Komplexes zu finden. Als Beispiel ist in Abb. 4.1 die Titration des Kälteschockproteins mit Heptauridin (rU₇, 5'-UUUUUUU-3') gezeigt. Durch die Zugabe der ssRNA nimmt die Fluoreszenzintensität um bis zu über 95 % ab. Die Anpassung an Gleichung 2.4 liefert eine Dissoziationskonstante von 183 ± 6 nM und ein stöchiometrisches Verhältnis von Liganden zu Protein von 1,01:1.

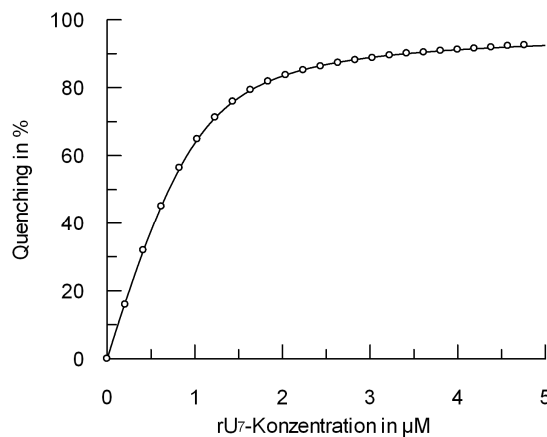


Abb. 4.1 Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für den *Bs*-CspB·rU₇-Komplex. Die Proteinkonzentration betrug 1 µM in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 bei 15 °C. Die durchgezogene Linie beschreibt die Anpassung der Daten an Gleichung 2.4.

Einige weitere untersuchte Oligonukleotide leiten sich von einer vermuteten Bindestelle des *Bs*-CspB zu der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) der *Bs*-CspB mRNA ab, die als *cold box2* bezeichnet wird (Graumann *et al.*, 1997), andere von der Konsensus-Sequenz, die sich aus DNA-Oligonukleotiden mit der höchsten Affinität ergibt und mit Hilfe eines DNA-Microarrays bestimmt wurden (Morgan *et al.*, 2007). Die Präferenz

des *Bs*-CspB für ssDNA, die viele Desoxythymidin-Nukleotide enthält (Lopez *et al.*, 2001), und die berichtete hohe Bindungsaffinität des ssDNA-Fragments Heptadesoxythymidin (Zeeb *et al.*, 2006) gab den Anlass die entsprechenden ssRNA-Analogen Hexa- und Heptauridin zu untersuchen.

Oligonukleotid und Sequenz	Länge	K_D (nM)		Oligonukleotid und Sequenz	Länge	K_D (nM)
rC7U ^{a,e} GUCUUUU	7	88 ± 5		rcb2_a ^{a,c} AGUUUUC	7	182 ± 23
rC7 ^{a,c} GUCUUUA	7	159 ± 11		rcb2_b ^{a,c} UUCGUCU	7	1280 ± 55
rC7G ^{a,c} GUCUUUG	7	158 ± 19		rcb2_c ^{a,c} GUCUUGA	7	307 ± 26
rAC7 ^{a,e} AUCUUUG	7	485 ± 21		rC6 ^{b,e} GUCUUU	6	323 ± 33
rCC7 ^{a,e} CUCUUUG	7	822 ± 25		rC6G ^{b,e} UCUUUG	6	748 ± 54
rU ₇ ^{a,d} UUUUUUU	7	183 ± 6		rU ₆ ^a UUUUUU	6	336 ± 27

Tab. 4-1 Dissoziationskonstanten von *Bs*-CspB-ssRNA-Komplexen, bestimmt mittels Tryptophan-Fluoreszenz-Titrations.

^a Experimente wurden bei 15°C in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 durchgeführt.

^b Experimente wurden bei 15°C in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 durchgeführt.

^c Abgeleitet von der mutmaßlichen Bindestelle von *Bs*-CspB zu der 5'-UTR Region der *Bs*-CspB mRNA (*cold box2*).

^d Eine starke Bindung der korrespondierenden ssDNA wurde beschrieben in: (Zeeb *et al.*, 2006).

^e Abgeleitet von der DNA-Consensus-Sequenz der bevorzugten Bindung, ermittelt durch einen DNA Microarray (Morgan *et al.*, 2007).

Alle ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tab. 4-1 zusammengefasst. Sie liegen im mittleren bis hohen nanomolaren Bereich. Die stöchiometrischen Verhältnisse haben einen experimentellen Wert von nahe 1. Der Vergleich der K_D -Werte für die ssRNA rC7G und den verwandten Fragmenten rC6 und rC6G, denen ein Nukleotid am 5' bzw. 3'-Ende fehlt, verdeutlicht die höhere Bindungsaffinität von *Bs*-CspB für Heptanukleotide gegenüber Hexanukleotiden. Dies ist ebenso für die Oligonukleotide rU₇ und rU₆ zu beobachten. Als stärkster Binder wurde das Fragment rC7U mit der Sequenz 5'-GUCUUUUU-3' identifiziert. Es ist analog zu der DNA-Konsensus-Sequenz (5'-GTCTTTG/T-3'), die aus Oligonukleotiden mit der höchsten Affinität in einen DNA-Microarray ermittelt wurde. Fragmente, die von dieser Sequenz nur in der ersten und letzten Position abweichen, haben einen K_D -Wert, der bis zu einem Faktor von 9 höher ist, und unterscheiden sich in ihrer Affinität nicht wesentlich von zwei Oligonukleoti-

den, die von der vermuteten Bindestelle des *Bs*-CspB im 5'-UTR der eigenen mRNA abgeleitet wurden. Nur das Fragment rcb2_b, das eine Purinbase in der Mitte der Sequenz besitzt, hat eine deutlich geringere Affinität und belegt die bevorzugte Bindung von Sequenzen durch *Bs*-CspB, die reich an Pyrimidinen sind.

4.1.2 Kinetik der Oligonukleotidbindung an *Bs*-CspB

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante aus Abschnitt 4.1.1 gibt das Verhältnis zwischen der Dissoziations- (k_{off}) und der Assoziationsratenkonstante (k_{on}) wieder. Um einen tieferen Einblick in die Komplexbildung zu erhalten, wurden beide Konstanten experimentell durch schnelles Mischen der Proteinlösung mit verschiedenen Konzentrationen an Oligonukleotid bestimmt (Abb. 4.2). Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen: Pseudo 1. Ordnung entspricht k_{on} dem Anstieg der beobachteten Geschwindigkeitskonstante mit steigender Oligonukleotidkonzentration. k_{off} ergibt sich aus dem Achsenabschnitt bei 0 M Oligonukleotid. Dieser Wert ist durch die lineare Extrapolation weniger genau bestimmt als k_{on} und wird deshalb häufig über die Beziehung $k_{off} = k_{on} \cdot K_D$ ermittelt.

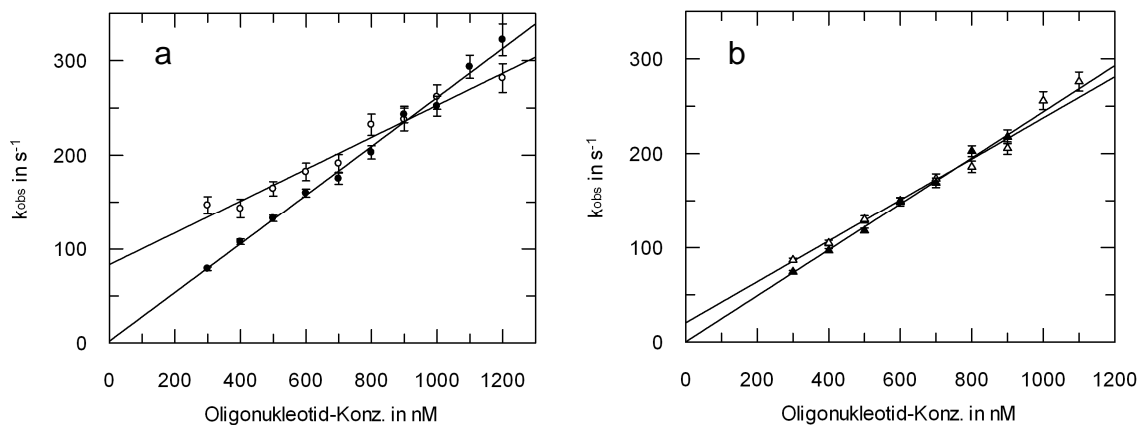


Abb. 4.2 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der *Bs*-CspB-Oligonukleotid-Komplexe. (a) rU₆ (offene Kreise), dT₆ (geschlossene Kreise); (b) rC7 (offene Dreiecke), dC7 (geschlossene Dreiecke). Die durchgezogene Linie beschreibt die lineare Regression.

Die Konstanten k_{on} und k_{off} der ssRNA-Fragmente rU₆ und rC7 sowie die zu diesen analogen ssDNA dT₆ und dC7 sind in Tab. 4-2 zusammengefasst. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante wurde separat in Fluoreszenz-Titrationsexperimenten bestimmt. Die Assoziationsratenkonstanten variieren nur geringfügig zwischen $1,69 \cdot 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$ und

$2,59 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, die Dissoziationsratenkonstante deckt dagegen einen größeren Bereich von $3,5 \text{ s}^{-1}$ bis $56,8 \text{ s}^{-1}$ ab. Außerdem korreliert k_{off} mit K_{D} . Oligonukleotide mit einer geringeren Affinität zu *Bs-CspB* besitzen auch eine erhöhte Dissoziationsratenkonstante, Oligonukleotide mit einer hohen Affinität dagegen eine niedrige Dissoziationsratenkonstante. Dies gilt sowohl für ssRNA als auch für ssDNA.

Oligonukleotid und Sequenz	K_{D} (nM)	$k_{\text{on}} \cdot 10^8$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{off} (s^{-1}) ^a
rU ₆ UUUUUU	336 ± 27	$1,69 \pm 0,14$	$83,4 \pm 8,8$	$56,8 \pm 6,6$
dT ₆ TTTTTT	$53,3 \pm 4,2$	$2,59 \pm 0,06$	$1,9 \pm 2,8$	$13,8 \pm 1,2$
rC7 GUCUUUA	159 ± 11	$2,17 \pm 0,09$	$20,3 \pm 4,3$	$34,5 \pm 2,8$
dC7 GTCCTTA	$14,1 \pm 1,1$	$2,44 \pm 0,08$	$0,15 \pm 3,2$	$3,5 \pm 0,3$

Tab. 4-2 Gleichgewichtsdissoziationskonstante sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von *Bs-CspB*-Oligonukleotid-Komplexen, bestimmt mittels Fluoreszenz-Titrations- und Fluoreszenz-*stopped-flow*-Messungen. Alle Experimente wurden bei 15°C in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 durchgeführt.

^a k_{off} wurde über die Beziehung $k_{\text{off}} = k_{\text{on}} \cdot K_{\text{D}}$ berechnet.

4.1.3 Thermodynamik der Oligonukleotidbindung an *Bs-CspB*

RNA und DNA unterscheiden sich in zwei Eigenschaften voneinander. Zunächst enthält die RNA eine Ribose als Zuckerbaustein anstatt einer Desoxyribose und des Weiteren ist die Base Thymin durch Uracil ersetzt. In den folgenden Experimenten sollte mittels isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht werden, welcher dieser Unterschiede einen Einfluss auf die Affinität und Thermodynamik der Oligonukleotidbindung an *Bs-CspB* hat. Dazu wurden Messungen mit rU₇, einer ssRNA, dT₇, einer ssDNA, und dU₇, einem Oligonukleotid, das den Zuckerbaustein Desoxyribose mit der Base Uracil kombiniert. Somit unterscheidet sich dU₇ von rU₇ und dT₇ jeweils in nur einer Eigenschaft. Die einzelnen Titrationskurven sind in Abb. 4.3 a-c dargestellt. Die Proteinkonzentration betrug 6 μM. Da für die Messung mit dT₇ der Quotient aus Proteinkonzentration und Dissoziationskonstante einen Wert von 496 erreicht und damit nur noch knapp in dem Bereich von 10 bis 500 liegt, für den alle thermodynamischen Parameter in einer Messung zuverlässig bestimmt werden können, wurde die Messung bei 2 μM wiederholt (Abb. 4.3 d).

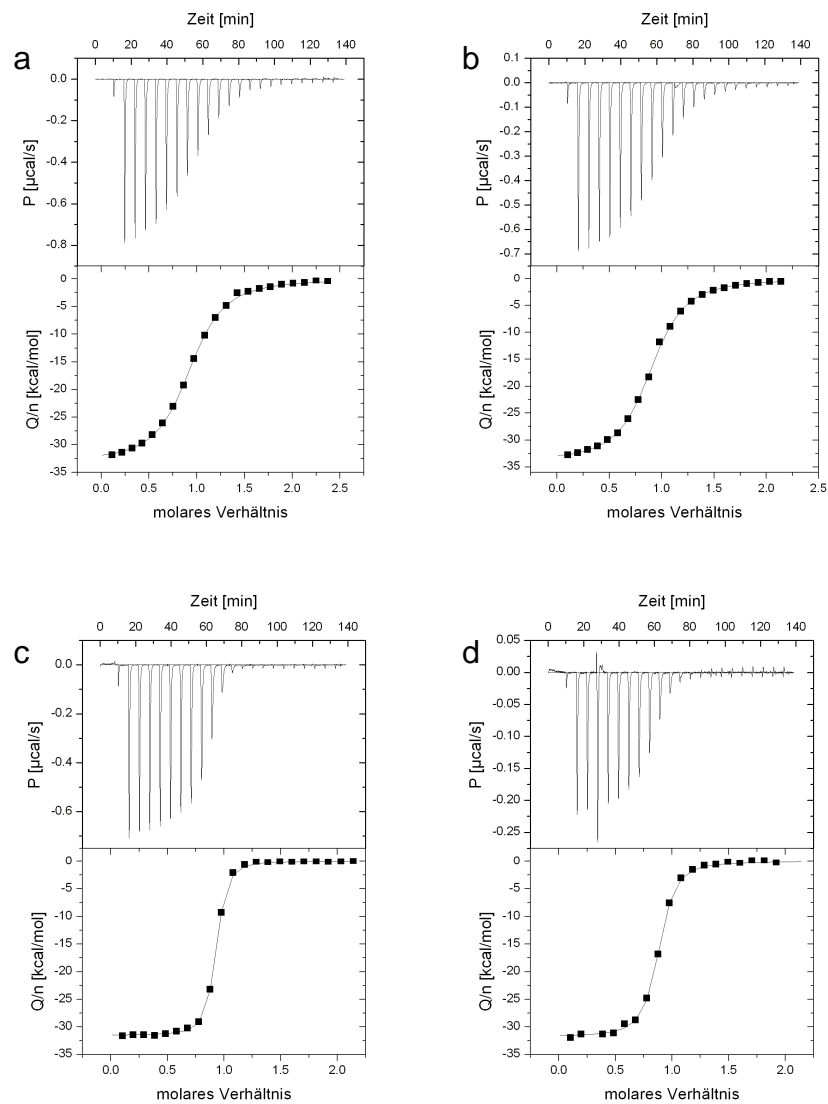


Abb. 4.3 Isothermale Titrationskalorimetrie von *Bs*-CspB titriert mit rU₇ (a), dU₇ (b) und dT₇ (c+d). Die Proteinkonzentration betrug 6 µM (a+b+c) bzw. 2 µM (d). Die jeweils obere Abbildung gibt die Heizleistung während jedem Titrationsschritt wieder, die nötig ist, damit keine Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle entsteht. In der jeweils unteren Abbildung ist die molare Wärmemenge gegen das Konzentrationsverhältnis Ligand/Protein aufgetragen. Die durchgezogene Linie ist die Anpassung der Daten an ein Modell mit mehreren identischen Bindestellen.

Die ermittelten Dissoziationskonstanten und die thermodynamischen Parameter sind in Tab. 4-3 zusammengefasst. Die Ergebnisse für die 1. und 2. Messung des Oligonukleotids dT₇ stimmen nahezu überein, so dass das Experiment bei 6 µM *Bs*-CspB ausreichend genaue Werte liefert und für Vergleiche herangezogen werden kann. Die stöchiometrischen Verhältnisse für die Experimente mit den Oligonukleotiden rU₇, dU₇ und dT₇ (1. und 2. Messung) betragen 0,905; 0,880; 0,885 und 0,843. Abgesehen von der 2.

Messung mit dT_7 unterscheiden sie sich nur um 1,7 % von einander und garantieren so auch eine gute Vergleichbarkeit der thermodynamischen Parameter der verschiedenen Oligonukleotide untereinander. Die systematische Abweichung von einer 1:1 Stöchiometrie ist wahrscheinlich auf die Absorption des Proteins an Oberflächen der Experimentiergefäße bei der Herstellung der Verdünnungen zurückzuführen. Dadurch wird die tatsächliche Proteinkonzentration überschätzt.

Das Oligonukleotid rU_7 hat eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante im mittleren nanomolaren Bereich. Durch die Substitution der Ribose durch Desoxyribose in dem nicht natürlichen Oligonukleotid dU_7 ändert sich der K_D -Wert nur geringfügig, aber die darüber hinaus gehende Substitution der Base Uracil durch Thymin in dem Oligonukleotid dT_7 erhöht die Affinität erheblich. Die Komplexbildung ist durch eine exotherme Reaktion charakterisiert und die einzelnen molaren Reaktionsenthalpien weichen nur 4 % vom Mittelwert ab. Die molare Reaktionsentropie von dT_7 ist dagegen signifikant niedriger als von rU_7 und dU_7 , die sich wiederum kaum von einander unterscheiden.

Oligonukleotid und Sequenz	K_D (nM)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	$T \cdot \Delta S$ (kJ·mol ⁻¹) ^c
rU_7 ^a UUUUUUU	218 ± 9	-139,0 ± 0,8	-354,1 ± 2,5	-102,0 ± 0,8
dU_7 ^a (2-Desoxyuridin) ₇	177 ± 8	-142,3 ± 0,9	-364,5 ± 3,2	-105,0 ± 1,0
dT_7 ^a TTTTTTT	12,1 ± 0,7	-132,1 ± 0,4	-310,1 ± 2,3	-88,4 ± 0,5
dT_7 ^b TTTTTTT	11,6 ± 0,8	-133,2 ± 0,7	-306,7 ± 1,4	-89,4 ± 0,7

Tab. 4-3 Dissoziationskonstanten und thermodynamische Parameter von *Bs*-CspB-Oligonukleotid-Komplexen, bestimmt mittels isothermaler Titrationskalorimetrie. Alle Experimente wurden bei 15°C in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug ^a 6 μM bzw. ^b 2 μM *Bs*-CspB. ^c Berechnet für 15°C.

4.1.4 NMR-Titration von *Bs*-CspB mit einzelsträngiger RNA

Es wurden zwei NMR-Titrations mit ¹⁵N-markierten *Bs*-CspB und der unmarkierten ssRNA rU_6 (5'-UUUUUU-3') und $rC7$ (5'-GUCUUUA-3') durchgeführt. Eine Überlagerung des ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrums von freiem Kälteschockprotein und dem mit Oligonukleotide gesättigten Protein ist in Abb. 4.4 bzw. Abb. 4.5 dargestellt.

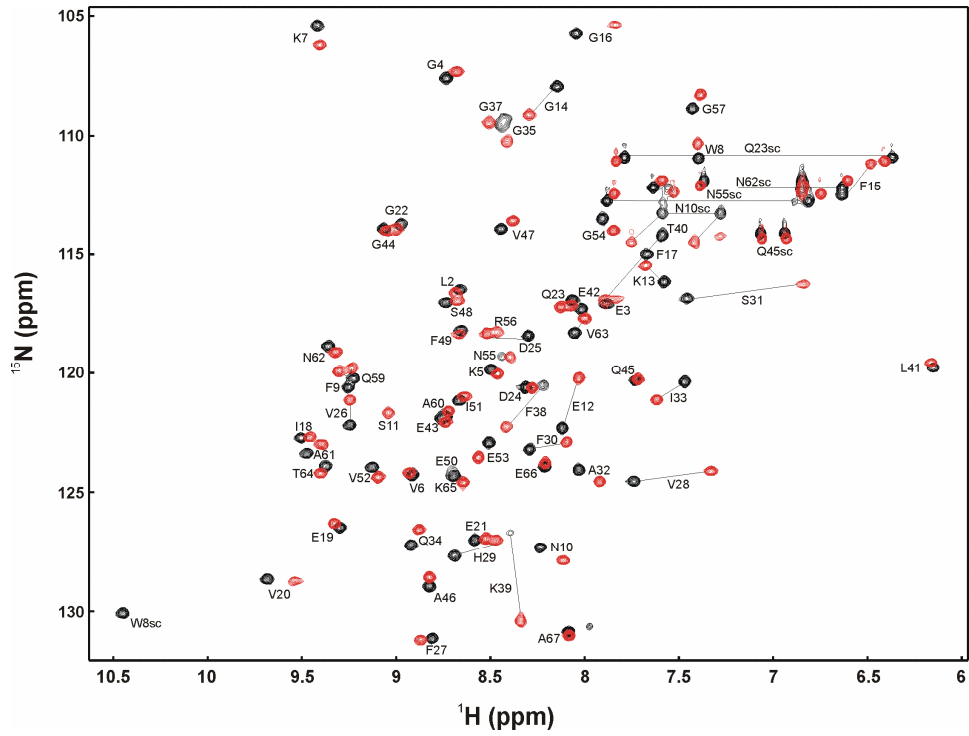


Abb. 4.4 2D ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum vom freien (schwarz) und rU_6 gebundenen (rot) *Bs*-CspB in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,5, 10% D_2O bei 20°C. Das Spektrum des Komplexes wurde bei einem 1,5 fachen molaren Überschuss an rU_6 aufgenommen.

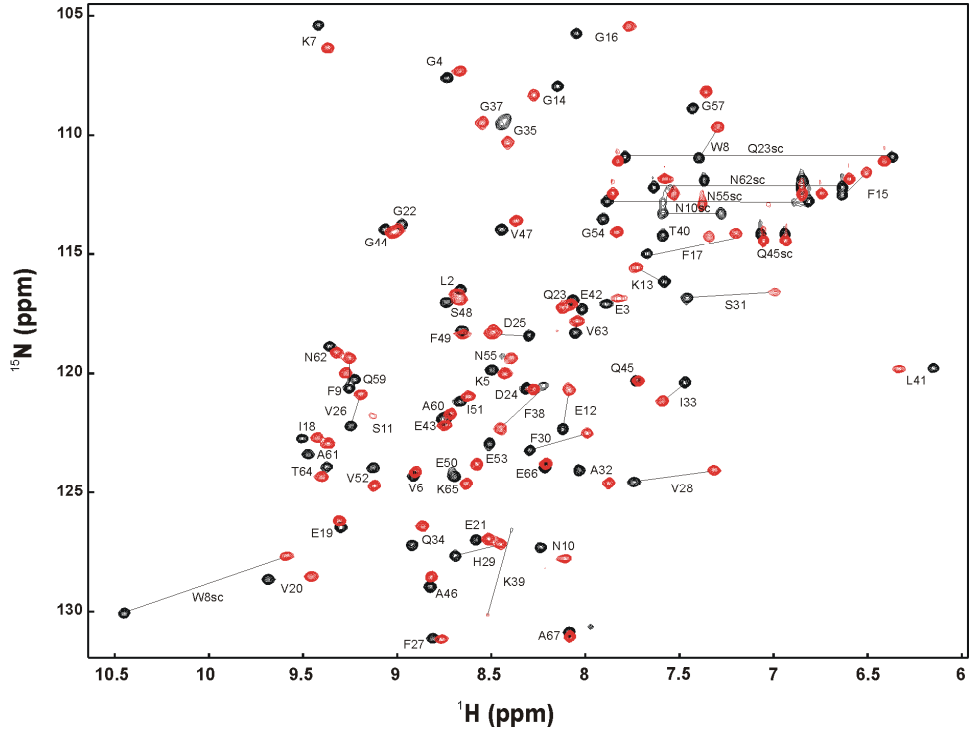


Abb. 4.5 2D ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum vom freien (schwarz) und rC7 gebundenen (rot) *Bs*-CspB in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,5, 10% D_2O bei 20°C. Das Spektrum des Komplexes wurde bei einem 1,5 fachen molaren Überschuss an rC7 aufgenommen.

Die meisten Amidprotonen weisen einen schnellen chemischen Austausch auf der NMR-Zeitskala auf, was die Zuordnung der Kreuzsignale in den Komplexen *Bs-CspB*·rU₆ und *Bs-CspB*·rC7 auf Grund des graduellen Verschiebens der Resonanzen während der Titration ermöglichte. Folgende Aminosäuren treten durch einen hohen Wert der mittleren gewichteten Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta_{MW}(^1\text{H}_N, ^{15}\text{N})$) von größer als 0,13 ppm hervor (Abb. 5.8, identische Aminosäuren sind unterstrichen):

Bs-CspB titriert mit rU₆: K7 (β -Strang 1); E12 (Schleife β 1- β 2); G14, F15, G16 (RNP-Motiv I); D25 (β -Strang 3); V26, V28, H29, F30 (RNP-Motiv II); S31, I33, F38, K39, T40 (Schleife β 3- β 4).

Bs-CspB titriert mit rC7: K7, W8, F9 (β -Strang 1); E12 (Schleife β 1- β 2); K13, F15, G16, V20 (RNP-Motiv I); D25 (β strand 3); V26, V28, H29, F30 (RNP-Motiv II); S31, A32, I33, F38, K39 (Schleife β 3- β 4); E53 (β -Strang 1).

Die Rückgratresonanzen dieser Reste reagieren auf die Bindung von rU₆ bzw. rC7 entweder durch direkte Interaktion mit der Aminosäure oder durch Konformationsänderungen des Proteins, die in einiger Entfernung von der Bindestelle verursacht werden. Rest T40 im *Bs-CspB*·rU₆-Komplex weist einen langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala auf und konnte somit während der Titration nicht verfolgt werden, ebenso Rest F17 im *Bs-CspB*·rU₆ und *Bs-CspB*·rC7-Komplex. Die Zuordnung von F17 im *Bs-CspB*·rC7-Komplex konnte jedoch mit dem Tripelresonanzexperiment HNCA gelöst werden. Auffällig unterscheiden sich die beiden Experimente in Bezug auf den Rest W8. Während bei der Titration mit rC7 eine wesentliche Verschiebung der Rückgrat- und der Seitenkettenresonanz beobachtet werden konnte, verändert sich die Position des Kreuzsignals für das Amidproton bei der Titration mit rU₆ nur geringfügig. Außerdem verschwindet das Signal für die Seitenkette während der Titration und erscheint auch nicht an einer neuen Position nachdem der Komplex geformt ist.

4.2 Diskussion

Durch Ausnutzung der intrinsischen Fluoreszenz des Tryptophan 8 als Sonde für die Bindung von Liganden an das *Bs-CspB* ist es gelungen, verschiedene Aspekte der Interaktion von ssRNA mit *Bs-CspB* zu charakterisieren und mit *Bs-CspB*·ssDNA-

Komplexen zu vergleichen. Die nahezu identischen Affinitäten, die z.B. für rU₇ mittels Fluoreszenztitration und isothermaler Titrationskalorimetrie ermittelt wurden, belegen, dass es möglich ist, mit Hilfe der Fluoreszenzeigenschaften einer einzelnen Aminosäure (W8) auf die Wechselwirkung des gesamten Proteins mit dem Oligonukleotid zu schließen.

4.2.1 *Bs*-CspB bindet ssRNA mit geringerer Affinität als ssDNA

Mit Hilfe der Kristallstrukturen von CSP-ssDNA-Komplexen konnten sieben Bindetaschen in *Bs*-CspB identifiziert werden (Max *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2007). Entsprechend diesem Befund wurden in der vorliegenden Arbeit Tryptophan-Fluoreszenztitrationsexperimente und isothermale Titrationskalorimetrie mit Heptanukleotiden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Affinität von *Bs*-CspB gegenüber ssRNA niedriger ist als gegenüber ssDNA (Tab. 4-2, Tab. 4-3). Die Bindung von *Bs*-CspB an ssRNA mit verschiedenen Basenzusammensetzungen und Nukleotidanzahlen belegt dennoch, dass eine stärkere Bindung von Heptanukleotiden verglichen mit Hexanukleotiden erfolgt (Tab. 4-1) und legt somit nahe, dass auch ssRNA wie ssDNA unter Nutzung von sieben Bindetaschen an *Bs*-CspB bindet. Durch Vergleich der Affinitäten von Heptanukleotiden mit Hexanukleotiden, die durch Verkürzung am 5' bzw. 3'-Ende von dem Heptanukleotid abgeleitet sind, wie das Oligonukleotid rU₇ (5'-UUUUUUU-3') mit rU₆ (5'-UUUUUU-3') und rC7G (5'-GUCUUUG-3') mit rC6G (5'-UCUUUG-3') sowie rC6 (5'-GUCUUU-3'), wird deutlich, dass der Unterschied zwischen sieben und sechs Nukleotiden jedoch nur einen Faktor von 2 bis 4,7 beinhaltet. Dies entspricht einer Änderung der freien Enthalpie der Bindung ($\Delta\Delta G_A$) von 1,7-3,7 kJ/mol und erreicht damit kaum die Größenordnung des Ennergiegehalts einer Wasserstoffbrückenbindung (4-13 kJ/mol) oder Van-der-Waals-Wechselwirkung (2-4 kJ/mol je Atompaar). In der siebten Bindetasche sind allerdings eine Vielzahl von Wechselwirkungen zu erwarten, so dass der geringe $\Delta\Delta G_A$ -Wert von 1,7-3,7 kJ/mol nur mit einer Kompensation der Enthalpie durch die Entropie bei der Bindung erklärt werden kann. Im Gegensatz zur ssRNA konnte bei dem Vergleich der ssDNA dT₇ (5'-TTTTTTT-3') mit dT₆ (5'-TTTTTT-3') ein deutlich höherer $\Delta\Delta G_A$ -Wert von 12,5

kJ/mol bestimmt werden (Zeeb *et al.*, 2006) und belegt hier eindeutig das Vorhandensein von sieben Bindetaschen.

Die zugrunde liegenden Mechanismen der geringeren Affinität von *Bs*-CspB zu ssRNA im Vergleich zu ssDNA wurde anhand von zwei ssDNA Oligonukleotide und ihren ssRNA-Analogen, die 6 bzw. 11-fach schwächer an das Kälteschockprotein binden, durch Messung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der Komplexbildung mit Hilfe einer *stopped-flow*-Fluoreszenzapparatur untersucht (Tab. 4-2). Die ähnlichen k_{on} -Werte der untersuchten ssRNA und ssDNA offenbaren die geringe Spezifität von *Bs*-CspB bei der Assoziation betreffend der Zusammensetzung der Nukleobasen und der Art des Zuckerrückgrates. k_{off} variiert jedoch entsprechend dem dazugehörigen K_D -Wert. Eine niedrige Bindungsaffinität auf Grund destabilisierender oder fehlender Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Protein und Ligand erhöht den k_{off} -Wert. Was nun die molekularen Ursachen für die höheren k_{off} -Werte von ssRNA verglichen mit ssDNA sind, konnte in den folgenden Experimenten mit Hilfe der isothermalen Titrationskalorimetrie ermittelt werden.

Aus dem Vergleich der K_D -Werte des RNA-Fragments rU₇ (5'-UUUUUUU-3'), dem DNA-Fragment dT₇ (5'-TTTTTTT-3') sowie der Desoxyribonukleinsäure dU₇, die sieben Uracil-Basen beinhaltet, kann geschlossen werden, dass nur die zusätzliche Methylgruppe, die die Base Thymin von der Base Uracil unterscheidet, für die höhere Affinität von dT₇ verantwortlich ist. Durch die siebenfache Wiederholung dieses Motivs ist die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand derart erhöht, dass sich daraus ein etwa 15-fach niedriger K_D -Wert ergibt. Aus den experimentellen Daten kann auch abgelesen werden, dass die Art des Zuckerphosphatrückgrates für die Interaktion von *Bs*-CspB mit Oligonukleotiden keine Rolle spielt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Röntgenstrukturanalyse, die zeigen, dass die Bindung von Oligonukleotiden an das Protein nur über die Nukleobase erfolgt (siehe Abschnitt 5.1.2).

Die Komplexbildung ist durch eine stark negative Reaktionsentropie geprägt. Dies bedeutet, dass die Affinität von *Bs*-CspB gegenüber Oligonukleotiden mit sinkenden Temperaturen deutlich zunimmt. Dies steht im Einklang mit der Funktion der Kälteschockproteine, die Adaption von Prokaryoten an niedrige Wachstumstemperaturen zu vermitteln. Denn auch die Tendenz von Nukleinsäuren zur Bildung von Doppelsträngen

nimmt mit sinkenden Temperaturen zu. Ob als RNA-Chaperon oder Transkriptionsantiterminator, um dies zu verhindern, muss das *Bs*-CspB eine effektive Bindung mit der RNA eingehen. Für den *Bs*-CspB·dT₇ Komplex wurde in dieser Arbeit (Abschnitt 4.1.3) ein ΔS bei 15°C von -310 J/(mol·K) bestimmt. Zeeb et al. ermittelten bei der Komplexbildung eine Entropieänderung der Proteinkette von -470 J/(mol·K). ΔS konnte hierbei durch Vergleich der Ordnungsparameters S^2 von freiem und gebundenem Protein aus Nano- bis Picosekunden-Dynamiken des Rückgrates bei 25°C berechnet werden (Zeeb et al., 2006). Für das flexible einzelsträngige Oligonukleotid dT₇ ist darüber hinaus ebenfalls eine Entropieabnahme durch die Bindung zu erwarten. Für die gesamte Entropieänderung bei der Komplexbildung sind aber nicht nur die daran beteiligten Moleküle, Protein und Ligand, zu berücksichtigen, sondern auch das Lösungsmittel Wasser. Der in dieser Arbeit gemessene ΔS -Wert steht somit nicht im Widerspruch zu dem von Zeeb et al. gefundenen Wert. Hervorzuheben ist außerdem, dass die Beträge der ΔS -Werte der Oligonukleotide rU₇ und dU₇ größer sind als bei dT₇, während alle Reaktionsenthalpien nahezu identisch sind (Tab. 4-3). Hierin ist auch der vergleichsweise niedrigere K_D -Wert von dT₇ begründet. Auf molekularer Ebene könnte dafür eine Erklärung sein, dass ungebundenes dT₇ eine höhere konformationelle Freiheit als rU₇ und dU₇ besitzt, die für alle Nukleotide in der gleichen Weise durch die Bindung an *Bs*-CspB eingeschränkt wird. Jedoch zeigen quantenchemische Berechnungen, dass die Methylgruppe der Base Thymin die energetisch günstigen Torsionswinkel der N-glykosidische Bindung zwischen Zucker und Base nicht einschränkt (Saenger, 1984). Viel entscheidender für die möglichen Konformationen des Nukleotids ist die 2'-OH-Gruppe in der Ribose, deren Abwesenheit in der Desoxyribose die Anzahl der energetisch günstigen Konformationen erhöht. Dieses molekulare Modell spiegelt sich aber so nicht in den gefundenen ΔS -Werten wieder, denn die Änderung der Entropie durch die Bindung von *Bs*-CspB an rU₇ und dU₇ ist fast identisch (Tab. 4-3). Somit ist die Ursache für einen geringeren Betrag der Reaktionsentropie bei dem Oligonukleotid dT₇ nur in der zusätzlichen Methylgruppe zu suchen. Durch diese erhöht sich die hydrophobe Oberfläche der Base, so dass im ungebundenen Zustand mehr Wassermoleküle des Lösungsmittels eine geordnete Schicht um die Base ausbilden (hydrophober Effekt). Infolge der Bindung von dT₇ an *Bs*-CspB gewinnen diese Wassermoleküle an Bewegungsfreiheit und tragen somit zu einer Erhöhung der Entropie bei, so dass in der gesamten

Entropiebilanz eine geringere Abnahme der Entropie durch die Anlagerung des Oligonukleotids an das Protein beobachtet werden kann. Untersuchungen zur Selbstassoziation von Nukleosiden, die durch ein Stapeln zweier Basen gegeneinander verursacht wird und somit der Interaktion der aromatischen Aminosäuren des *Bs*-CspB mit den Basen des Oligonukleotids ähnlich ist (siehe Abschnitt 5.1.3), unterstützen diese Interpretation (Lawaczek und Wagner, 1974; van Holde *et al.*, 1998; Bloomfield, 1999). Danach ist die Gleichgewichtsassoziationskonstante von Desoxythimidin größer als von Uridin und belegt auch hier die Bedeutung der Methylgruppe für die Wechselwirkung.

4.2.2 Ort der ssRNA-Bindung an *Bs*-CspB in Lösung

Die strukturellen Konsequenzen der Bindung des ssRNA Hexanukleotids rU₆ und des ssRNA Heptanukleotids rC7 an *Bs*-CspB wurden in Lösung mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Die mittlere gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung der Amidproton-Stickstoff-Korrelationen während der Titrationsexperimente ermöglicht es den Ort der ssRNA-Bindung zu lokalisieren, auch wenn die chemische Umgebung der betreffenden Atome nicht nur in unmittelbarer Nähe zur Ligandenbindestelle, sondern durch größere Konformationsänderungen des Proteins auch weiter entfernt davon beeinflusst sein kann. Es wurde für sehr viele Kreuzsignale im ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrum eine Verschiebung beobachtet. Dies erforderte es den Grenzwert von $\Delta\delta_{MW}({}^1\text{H}_N, {}^{15}\text{N})$ mit 0,13 ppm auf einen vergleichsweise hohen Wert zu setzen, um für die Bindung relevante Aminosäuren zu identifizieren. Für die Aminosäuren F15, F17, F27, H29, F30 und W8, die in CSP·ssDNA- (Max *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2007) und *Bs*-CspB·ssRNA-Komplexen (Abb. 5.7) eine Stapelinteraktion mit der Base des Oligonukleotid eingehen und auch in NMR-Titrationsexperimenten auffielen (Zeeb *et al.*, 2006), zeigen ebenso eine Verschiebung bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experiment mit rC7. Ausgenommen hiervon ist die Aminosäure F27, dessen Rückgratatom durch die Bindung keine deutliche Änderung der chemischen Verschiebung erfahren. Auch bei der Titration mit rU₆ verschiebt F27 im NMR-Spektrum nicht wesentlich. Außerdem konnte hier F17 auch unter zur Hilfenahme von ¹⁵N-editierten 3D Experimenten im gebundenen Zustand nicht eindeutig zugeordnet werden. Besondere Aufmerksamkeit ist aber auf die Aminosäure W8 zu richten. Die Position des Kreuzsig-

nals des Rückgratatoms ändert sich kaum durch die Anwesenheit von rU₆, die Seitenkettenresonanz W8sc verschwindet jedoch während der Titration und erscheint auch beim Erreichen einer 1:1 oder 1:1,5 Stöchiometrie nicht an einer neuen Position. Dies deutet auf einen intermediären chemischen Austausch im gebundenen Zustand hin und unterscheidet das Oligonukleotid rU₆ von rC7. Vor dem Hintergrund, dass rU₆ ein Hexanukleotid ist, so dass es nicht alle sieben Bindetaschen an *Bs*-CspB besetzen kann und dass W8, nach den Ergebnissen aus der Kristallstruktur, in eine Stapelinteraktion in der siebten Bindetasche involviert ist (Abb. 5.7), müssen zwei verschiedene *Bs*-CspB·rU₆-Komplexe in Lösung vorliegen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, um das Verhalten der Seitenkettenresonanz W8sc zu erklären. In einem Komplex belegt rU₆ die Bindetaschen 1-6 und in einem anderen Komplex belegt es die Bindetaschen 2-7. Eine ähnliche Linienverbreiterung wie für die Resonanz W8sc ist nicht für die Resonanz des F38 zu erwarten, das die an einer Stapelinteraktion in der ersten Bindetasche beteiligt ist (Max *et al.*, 2006). Denn F38 bildet auch den Interaktionspartner für die Base in der zweiten Bindetasche und sollte somit beim Wechsel der Modalität kaum eine Änderung der chemischen Verschiebung erfahren. Der Übergang von der einen in die andere Form könnte durch vollständige Dissoziation des Oligonukleotids und sich wieder anschließende Assoziation an andere Bindetaschen erfolgen, oder durch ein Gleiten der ssRNA auf dem Protein. Aufschluss darüber könnten Einzelmolekülspektroskopie-Experimente liefern, wie Roy *et al.* für das ssDNA-bindende Protein (SSB) aus *E.coli* zeigen konnten (Roy *et al.*, 2009).

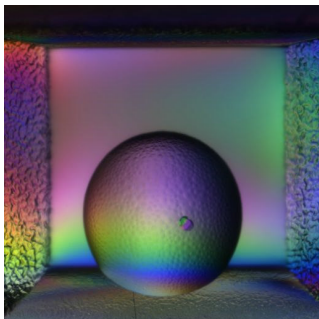
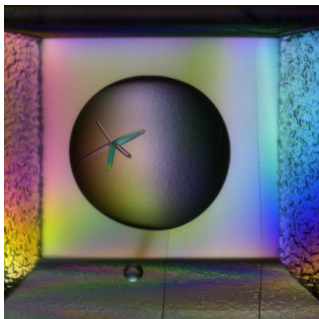
Neben den Aminosäuren, die an Stapelinteraktionen beteiligt sind, können auch Aminosäuren mit einem hohen $\Delta\delta_{\text{MW}}(^1\text{H}_\text{N}, ^{15}\text{N})$ -Wert in den beiden Titrationsexperimenten beobachtet werden, die an Interaktionen mit den Kopfgruppen der Nukleobasen in den Kristallstrukturen von *Bs*-CspB·rU₆ und *Bs*-CspB·rC7 beteiligt sind (siehe Abschnitt 5.1.3, Abb. 5.7). Dazu zählen D25, K7 und F9. N10 verfehlt nur knapp das gewählte Kriterium von 0,13 ppm. Auch bei Q59 kann die Interaktion der Seitenkette mit der ssRNA die Resonanzfrequenz der Rückgratome nicht stark genug beeinflussen. Auffällig ist, dass auch die Position des Peaks K39 stark verschoben wird, in den Kristallstrukturen jedoch nicht mit dem Oligonukleotid in Wechselwirkung tritt. Dies ist Gegenstand weiterer Diskussion in Abschnitt 5.2.2.

5 Kristallstruktur des Kälteschockproteins B aus *Bacillus subtilis* im Komplex mit einzelsträngiger RNA

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Kristallstrukturbestimmung

Für die Komplexe aus *Bs*-CspB und den einzelsträngigen RNA-Fragmenten rU₆ (5'-UUUUUU-3') bzw. rC7 (5'-GUCUUUA-3') konnten Kristalle in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ gezüchtet werden. Die Kristallisationsbedingungen sind in Tab. 5-2 beschrieben. Röntgenstreudaten wurden für *Bs*-CspB·rU₆ an einem Röntgengenerator und für *Bs*-CspB·rC7 am BESSY Synchrotron bis zu einer Auflösung von 1,68 Å bzw. 1,38 Å aufgenommen (Tab. 5-2).

Komplex	<i>Bs</i> -CspB·rU ₆	<i>Bs</i> -CspB·rC7
Probenlösung	50 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 7,5	
Kristallisierlösung	31 % (w/v) PEG 3350 0,25 M MgCl ₂ 0,1 M Tris pH 8,5	30 % (w/v) PEG 4000 0,2 M MgCl ₂ 0,1 M Tris pH 8,5
Kristallisieransatz	400 nl Probenlösung + 400 nl Kristallisierlösung mit anschließender Inkubation bei 20 °C	
Kristalle		

Tab. 5-1 Kristallisierung der *Bs*-CspB·ssRNA-Komplexe mit Abbildungen der Kristalle.

Komplex	<i>Bs-CspB·rU₆</i>	<i>Bs-CspB·rC7</i>
Wellenlänge (Å)	1,5418	0,91840
Auflösung (Å)	17,46-1,68	19,02-1,38
Letzte Schale (Å)	1,72-1,68	1,50-1,38
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Temperatur (K)	110	110
Röntgenstrahlenquelle	rotierende Anode	Synchrotron Bessy 14.2
Detektor	Image-Plate MAR345	CCD Rayonix MX-225
Elementarzellparameter		
a (Å)	49,038	49,275
b (Å)	49,769	50,512
c (Å)	57,380	57,802
Einzigartige Reflexe	15961	30207
I/σ(I) (Letzte Schale)	10,48 (1,85)	20,73 (2,8)
Vollständigkeit der Reflexe (%)	96,3 (93,7)	99,6 (99,8)
R_{meas} (%)	7,9	3,9

Tab. 5-2 Parameter zur Aufnahme der Röntgenstreudaten der Komplexe *Bs-CspB·rU₆* und *Bs-CspB·rC7*.

Das Phasenproblem konnte für beide Datensätze durch molekularen Ersatz mit der Struktur des freien *Bs-CspB* (PDB: 1CSP) gelöst werden und wurde bis zu den $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ -Werten von 18,0/23,5 bzw. 15,4/19,4 verfeinert (Tab. 5-3).

Komplex	<i>Bs-CspB·rU₆</i>	<i>Bs-CspB·rC7</i>
Protein Data Bank Eintrag	3PF5	3PF4
Auflösung (Å)	17,46-1,68	19,02-1,38
verwendete Reflexe	15162	28688
Reflexe zur Berechnung von R_{free} (5 %)	798	1510
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^b$ (%)	18,0/23,5	15,4/19,4
Anzahl der Atome	1359	1385
Anzahl der Proteinmoleküle	2	2
Anzahl der RNA Moleküle	2	1
Anzahl der Wassermoleküle	178	197
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	25,5	22,2

Tab. 5-3 Parameter zur Strukturverfeinerung der Komplexe *Bs-CspB·rU₆* und *Bs-CspB·rC7*.

Dafür wurde für den *Bs-CspB·rU₆* Komplex eine TLS-Verfeinerung für das Proteinmolekül und für den *Bs-CspB·rC7* Komplex zusätzlich im letzten Verfeinerungszyklus eine anisotrope Verfeinerung durchgeführt. Die resultierende Elektronendichte der Proteinmoleküle ist in beiden Komplexen gut definiert. Die Nukleotide sind deutlich flexibler, was sich in höheren B-Faktoren bzw. anisotropen Auslenkungsparametern wider-

spiegelt. In Abb. 5.1 sind die anisotropen Auslenkungsparameter für den *Bs*-CspB·rC7 Komplex dargestellt. Es fallen von den in der Struktur aufgelösten Nukleotiden besonders das 3'-terminale (gelb) und das 5'-terminale Nukleotid (rot) durch eine hohe Unordnung im Kristall auf.

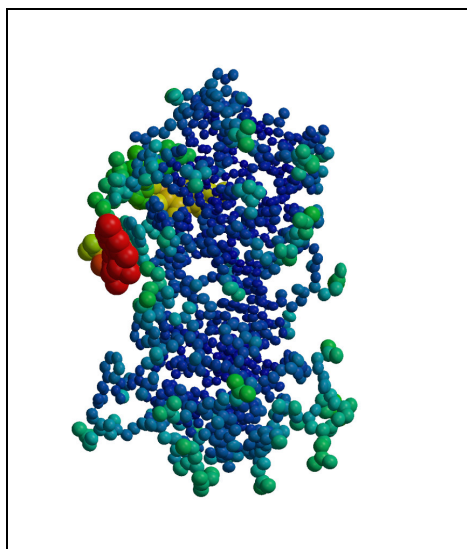


Abb. 5.1 Darstellung der anisotropen Auslenkungsparameter für den *Bs*-CspB·rC7 Komplex. Der Auslenkungsparameter steigt von blau über grün und gelb nach rot an. Die Abbildung wurde mit der Web-Anwendung Parvati (Merritt, 1999) erstellt.

Nach Abschluss der Verfeinerung konnten keine Auffälligkeiten bei der Validierung der Strukturen festgestellt werden (Tab. 5-4). 99,1 % und 0,9 % bzw. 97,2 % und 2,8 % aller Reste befinden sich in den erlaubten und zusätzlich erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms.

Komplex	<i>Bs</i> -CspB·rU ₆	<i>Bs</i> -CspB·rC7
RMSD:		
Bindungslängen (Å)	0,016	0,017
Bindungswinkel (°)	1,5	1,63
Torsionswinkel (°)	5,85	5,84
Planarität (Å)	0,006	0,008
Ramachandran Statistiken:		
Reste in der erlaubten Region (%)	99,1	97,2
Reste in der zusätzlich erlaubten Region (%)	0,9	2,8

Tab. 5-4 Parameter nach der Evaluierung der Komplexe *Bs*-CspB·rU₆ und *Bs*-CspB·rC7.

Die asymmetrische Einheit in beiden Kristallstrukturen enthält zwei Kälteschockproteinmoleküle. An eines von ihnen ist ein RNA-Ligand gebunden. In der *Bs*-CspB·rU₆ Struktur interagiert das zweite Proteinmolekül mit einem weiteren einzelnen RNA-Nukleotid (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). In beiden Komplexstrukturen konnten fünf Nukleotide des RNA-Moleküls in die Elektronendichte eingepasst werden. Dabei handelt es sich ausschließlich um Nukleotide mit Pyrimidin-Basen. Bei dem *Bs*-CspB·rU₆ Komplex ist ein Nukleotid nicht aufgelöst. Um den Vergleich der *Bs*-CspB·rU₆ und der *Bs*-CspB·rC7 Struktur zu vereinfachen, wird festgelegt, dass es sich hierbei um das 5'-terminale Uridin handelt. In dem *Bs*-CspB·rC7 Komplex fehlt das 5' und das 3'-terminale Nukleotid mit einer Purinbase.

Im Folgenden soll nur das Proteinmolekül in beiden Strukturen, das mit der einzelsträngigen RNA assoziiert ist, und dessen Interaktionen mit dem Oligonukleotid beschrieben werden. Da die Kristallstrukturen von *Bs*-CspB·rU₆ und *Bs*-CspB·rC7 im Wesentlichen übereinstimmen, bezieht sich die nun anschließende Beschreibung auf beide Komplexstrukturen. Unterschiede werden im Text gesondert hervorgehoben.

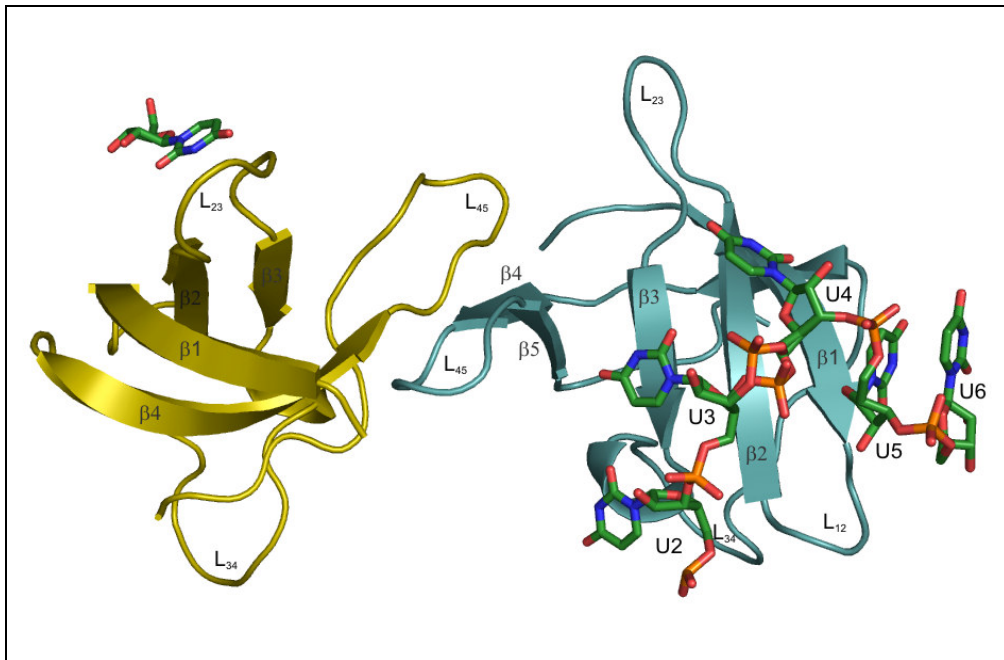


Abb. 5.2 Kristallstruktur von *Bs*-CspB in Komplex mit rU₆. Darstellung des Inhaltes der asymmetrischen Einheit. β -Faltblätter sind mit β beschriftet, Schleifen mit L. Nukleotide sind mit dem Einbuchstabencode ihrer Base und einer Nummer entsprechend ihrer Position in der Sequenz bezeichnet.

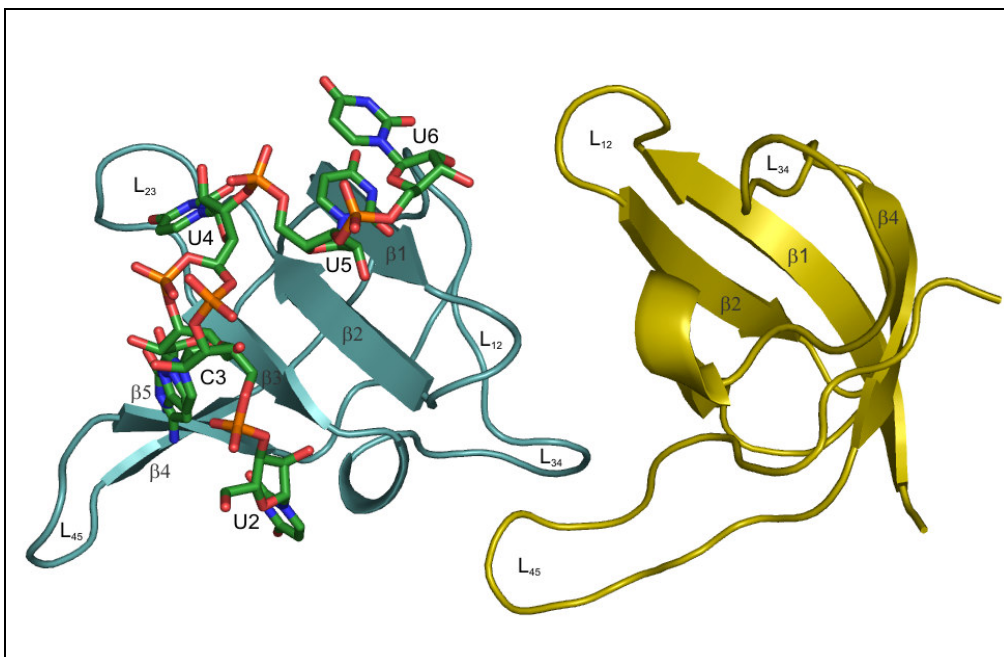


Abb. 5.3 Kristallstruktur von *Bs*-CspB in Komplex mit rC7. Darstellung des Inhaltes der asymmetrischen Einheit. β -Faltblätter sind mit β beschriftet, Schleifen mit L. Nukleotide sind mit dem Einbuchstabencode ihrer Base und einer Nummer entsprechend ihrer Position in der Sequenz bezeichnet.

Die Struktur des freien *Bs*-CspB (PDB: 1CSP) und die Proteinketten der Komplexstrukturen von *Bs*-CspB·rU₆ und *Bs*-CspB·rC7 überlagern sehr gut. Die mittlere quadratische Abweichung (r.m.s.d.) der Rückgratome beträgt nur 0,34 Å bzw. 0,29 Å. Die beiden Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit aus der *Bs*-CspB·rC7-Struktur eignen sich, freies und ssRNA-gebundenes *Bs*-CspB direkt mit einander zu überlagern (Abb. 5.4). Auch bei diesem Vergleich weichen die Rückgratome mit einem r.m.s.d. von 0,18 Å sehr wenig von einander ab. Selbst die Position der in den folgenden Beschreibungen wichtigen Seitenketten von Trp8, Phe17, Phe27 und His29 ist nahezu identisch.

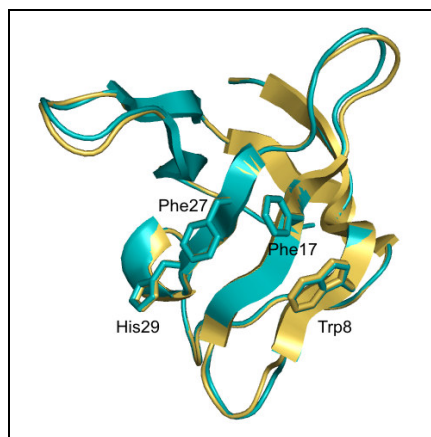


Abb. 5.4 Übereinanderlagerung beider Proteinketten aus der asymmetrischen Einheit des *Bs*-CspB·rC7 Komplexes. Freies *Bs*-CspB in gelb, an das Oligonukleotid gebundenes *Bs*-CspB in blau.

5.1.2 Strukturelle Organisation des Liganden

In die Elektronendichten der beiden Komplexstrukturen konnten die Nukleotidsequenzen 5'-UUUUU-3' (*Bs*-CspB·rU₆) und 5'-UCUUU-3' (*Bs*-CspB·rC7) eingepasst werden (Abb. 5.5). Alle Basen sind in Richtung der hydrophoben Proteinoberfläche orientiert und das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist dem Lösungsmittel zugewandt. Nur die Base des Nukleotids U5 bildet eine Stapelinteraktion mit der Base des Nukleotids U6. Die 5'-3'-Polarität entspricht der zuvor für Kälteschockprotein-ssDNA-Komplexe beschriebenen (Max *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2007) und der für die meisten anderen Proteine mit OB-Faltungsmotiv beobachteten Orientierung (Theobald *et al.*, 2003). Das 5'-Ende ist dem Strang β 5 und das 3'-Ende dem Strang β 1 zugewandt.

Im Falle des Oligonukleotids rC7 nimmt das Cytidin (C3) und die Phosphodiestergruppe des folgenden Nukleotids zwei Konformationen ein. Die erste Konformation ermöglicht eine Stapelinteraktion des vorangehenden Nukleotids U2 mit der Aminosäure His29. In der zweiten Konformation des C3 ist die Bindung zwischen U2 und His 29 durch eine zu große Distanz nicht möglich. Aus der daraus folgenden hohen Flexibilität des Nukleotids U2 kann für dieses keine Elektronendichte detektiert werden. In der Kristallstruktur von *Bs*-CspB·rU₆ existiert nur die Phosphodiesterbindung, die Nukleotid U3 mit U4 verbindet, in zwei Konformationen.

Die Konformation des Zuckers für die Nukleotide U2 bis U6 in *Bs*-CspB·rU₆ ist wie folgt: C_{3'}-*exo*, C_{2'}-*endo*, C_{2'}-*endo*, C_{3'}-*endo* und die energetisch ungünstige O_{4'}-*endo* Konformation, und in *Bs*-CspB·rC7: C_{4'}-*exo*, C_{2'}-*endo*, C_{2'}-*endo*, C_{2'}-*exo*, C_{4'}-*exo*. Somit sind die typischen Konformationen der RNA, C_{2'}-*endo* und C_{3'}-*endo*, sowie zu diesen ähnliche in den Strukturen vertreten (Saenger, 1984). Bei allen Nukleobasen wird die *anti*-Konformation beobachtet, außer Nukleotid U2 in *Bs*-CspB·rC7, welches die *syn*-Konformation einnimmt. Allerdings kann der Torsionswinkel der N-glykosidische Bindung der Base in dieser Position auf Grund der Doppelkonformation des Nukleotids nur unsicher bestimmt werden.

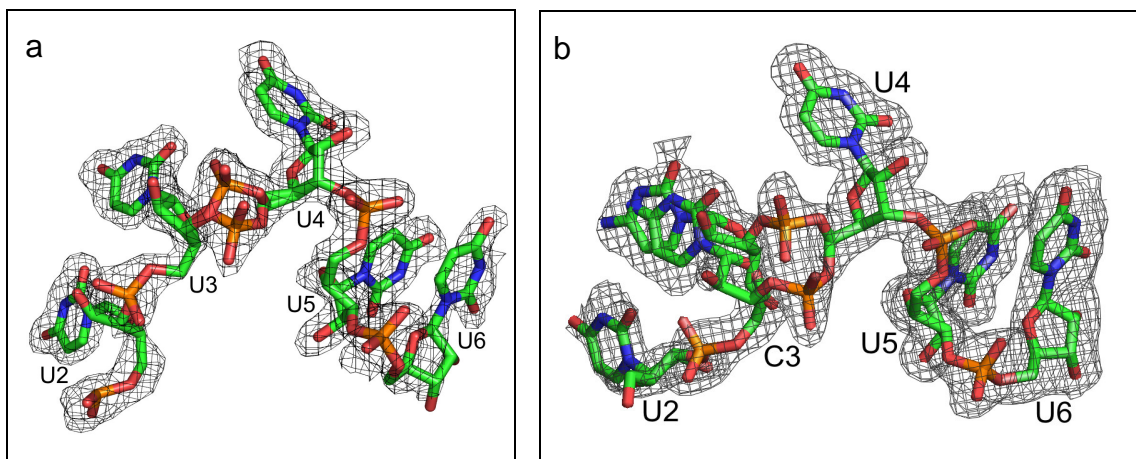


Abb. 5.5 Orthoskopische Darstellung der ssRNA-Liganden rU₆ (a) und rC7 (b) umgeben von ihrer Elektronendichte. Die ssRNA ist entsprechend dem CPK Schema eingefärbt mit Ausnahme der Kohlenstoffatome, die in grün dargestellt sind. Die 2F₀-F_C Elektronendichtekarten haben ein Konturlevel von 1,0 Ligandenbindungsoberfläche und Protein-Ligand-Interaktionen beziehungsweise 0,5 σ . (a) Fünf von sechs Uridinen konnten in die Elektronendichte eingepasst werden. Die Phosphodiestergruppe, die Nukleotid 2 und 3 verbindet, nimmt zwei Konformationen ein. (b) Nukleotid U2 bis U6 konnten in die Elektronendichte eingepasst werden. Nukleotid C3 und die Phosphodiestergruppe des folgenden Nukleotids existieren in zwei Konformationen. Bei der zweiten Konformation konnte keine Dichte für U2 detektiert werden.

5.1.3 Ligandenbindungsoberfläche und Protein-Ligand-Interaktionen

Die Oberfläche des Kälteschockproteins B aus *Bacillus subtilis* teilt sich in zwei Bereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften. Eine Seite wird von Aminosäuren mit sauren Resten dominiert, die dort ein negatives Oberflächenpotential erzeugen. Auf der gegenüberliegenden Seite formen einige aromatische Aminosäuren, die von basischen Gruppen umgeben sind, eine amphipatische Grenzfläche, die den Ort der Ligandenbindung darstellt (Abb. 5.6).

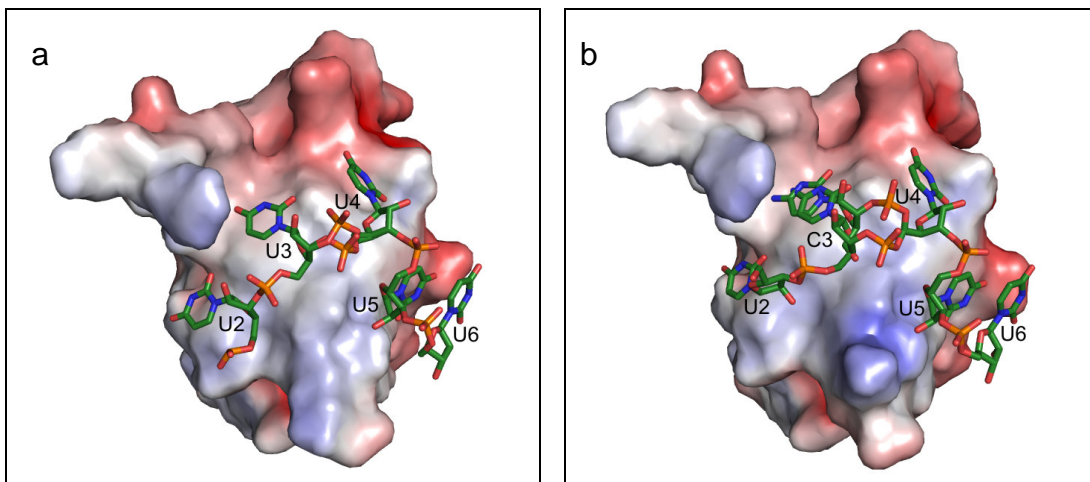


Abb. 5.6 Elektrostatisches Oberflächenpotential des Proteins im *Bs-CspB-rU₆* (a) und *Bs-CspB-rC7* Komplex (b) am Ort der Ligandenbindung. Das elektrostatische Potential der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche ist auf die Kontaktoberfläche des Proteins projiziert. Es wurde mit den Programmen APBS (Baker *et al.*, 2001) und PROPKA (Li *et al.*, 2005) für einen pH-Wert von 7,5 berechnet und für den Bereich von -5 (rot) bis +5 kT (blau) dargestellt.

Die an der Bindung beteiligten Aminosäuren entstammen hauptsächlich den ersten drei β -Faltblättern sowie dem β -Faltblatt 5 (Abb. 5.7). Dabei dominiert das Stapeln der Nucleobasen U2 bis U5 mit den aromatischen Resten His29, Phe27, Phe17 und Trp8 die Interaktion mit dem Oligonucleotid. Phe15 partizipiert nicht an der Bindung der RNA ebenso wenig Phe30. Eine Stapelung der Seitenkette von Phe38 mit der Nucleobase U3 in rU₆ bzw. C3 in rC7 wird nur durch ein symmetrieverwandtes *Bs-CspB*-Molekül vermittelt.

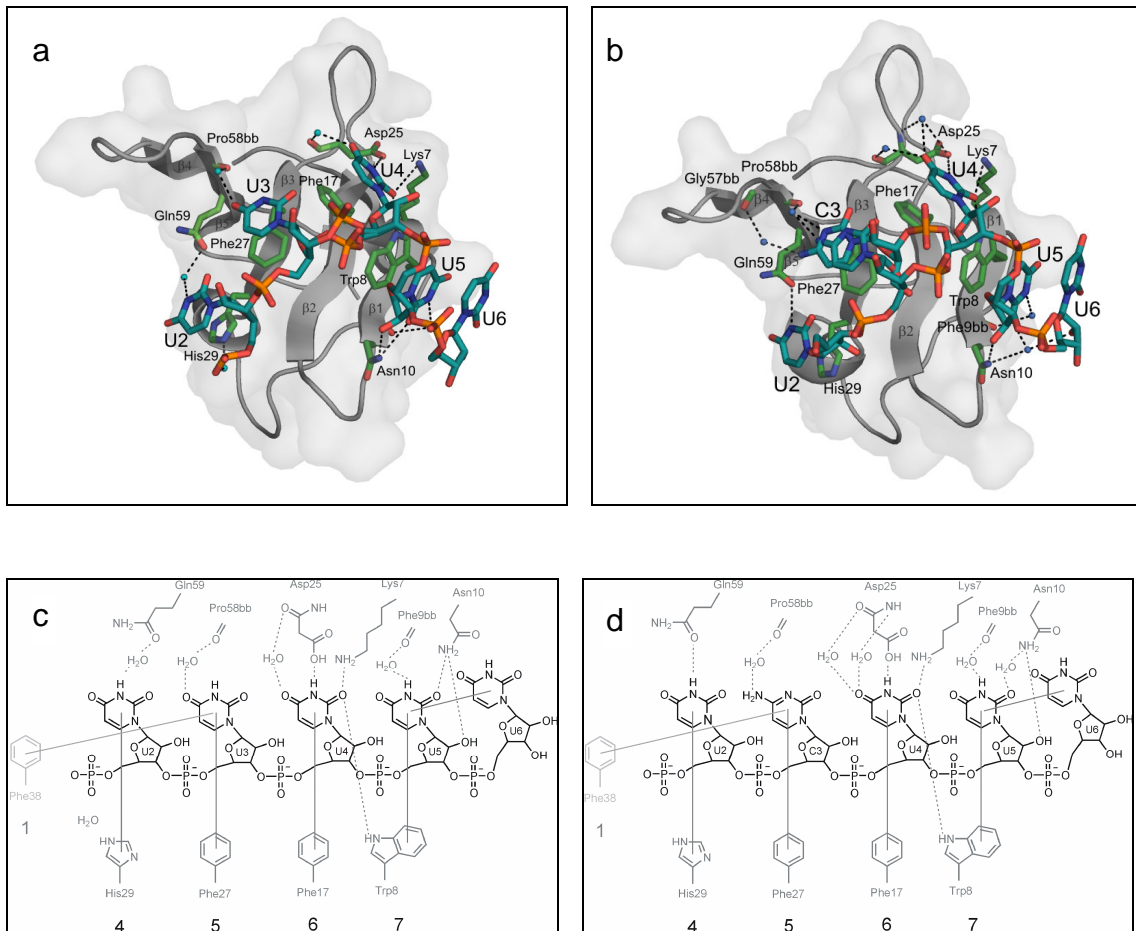


Abb. 5.7 Hydrophobe und polare Interaktionen zwischen *Bs*-CspB und dem Oligonukleotid rU₆ (a) bzw. rC₇ (b). Die Kontaktoberfläche ist als ein halbdurchsichtiges graues Objekt dargestellt. Proteingruppen, die in Stapelinteraktionen und Wasserstoffbrücken involviert sind, sind entsprechend dem CPK-Schema eingefärbt mit Ausnahme der Kohlenstoffatome, die in grün dargestellt sind. Das RNA-Molekül ist entsprechend dem CPK-Schema eingefärbt mit Ausnahme der Kohlenstoffatome, die in hellblau dargestellt sind. Wasserstoffbrücken zwischen Protein und RNA sind als gestrichelte Linie gezeigt. Wassermoleküle, die Protein-Liganden-Interaktionen vermitteln, sind als blaue Kugeln dargestellt. (c+d) Ausschnitt der RNA-Bindestelle in Strukturformeln illustriert. Die Oligonukleotide rU₆ (c) und rC₇ (d) sind in schwarz und Proteingruppen in dunkelgrau dargestellt (bb, Proteinrückgrat). Die längste beobachtete Nukleotidsequenz von rC₇ ist gezeigt. Ein Aminosäurerest eines symmetrieverwandten *Bs*-CspB-Moleküls ist in hellgrau dargestellt. Stapelinteraktionen zwischen aromatischen Seitenketten und Nukleobasen sind als durchgezogene Linien verdeutlicht, Wasserstoffbrücken als gepunktete Linien. Die Nummer der Bindeta-sche für einzelne Nukleobasen ist unter der entsprechenden Stapelinteraktion angegeben und entspricht der veröffentlichten Nummerierung nach (Max *et al.*, 2006).

Verschiedene Wasserstoffbrücken verstärken die Interaktion mit dem Liganden. Eine Wasserstoffbrücke verbindet die Seitenkette von Gln59 mit dem H³ von U2 in *Bs*-CspB·rC₇. Dieser Kontakt wird durch ein Wassermolekül in *Bs*-CspB·rU₆ vermittelt. Weitere Wasserstoffbrücken werden zwischen der Seitenkette von Asp25 und H³ von U4 und zwischen der Seitenkette von Lys7 sowie Trp8 und dem O² von U4 ausgebildet. Asp10 kontaktiert das O² von U5 in *Bs*-CspB·rU₆ direkt und über ein Wassermolekül in

Bs-CspB·*rC7*. Zusätzliche durch Wassermoleküle vermittelte Wechselwirkungen treten zwischen der Rückgrat-Carbonylgruppe und dem O⁴ von U3 bzw. dem H⁴ von C3 auf. Des Weiteren existieren Interaktionen zwischen der Rückgrat-Carbonylgruppe von Asp25 und dem O⁴ von U4 sowie zwischen der Rückgrat-Carbonylgruppe von Phe9 und dem H³ von U5. Nur eine Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem Zuckerrückgrat konnte beobachtet werden. In beiden Kristallstrukturen bildet die 2'-OH-Gruppe von U5 eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Asn10.

Die zentrale Seitenkette aus der Schleife L₄₅: Arg56 bildet einen intermolekularen Kontakt mit symmetrieverwandten Proteinmolekülen, anstatt der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Phosphatgruppen des Liganden, wie es in der *Bs-CspB*·*dT₆* Komplexstruktur beobachtet wurde (Max *et al.*, 2006).

5.2 Diskussion

Die Strukturen von *Bs-CspB* im Komplex mit den einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden *rU₆* und *rC7* konnten mittels Röntgenkristallographie gelöst werden. In den beiden Kristallstrukturen bindet ein RNA-Molekül an ein Proteinmolekül. Dies steht im Gegensatz zu vorher bestimmten Kristallstrukturen von *Bs-CspB* und *Bc-Csp* im Komplex mit dem ssDNA Fragment Hexadesoxythymidin (*dT₆*) (Max *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2007). In der *Bs-CspB*·*dT₆*-Struktur sind benachbarte Proteinmoleküle fortlaufend durch die ssDNA verbunden und in der *Bc-Csp*·*dT₆*-Struktur wurde ein Dimer mit *domain-swap* beobachtet, bei dem zwei Proteinmoleküle durch teilweisen Austausch der Peptidketten zwei verknüpfte Kälteschockproteindomänen bilden. Ergebnisse aus der Ultrazentrifugation von diesen CSP-Oligonukleotid-Komplexen verdeutlichten jedoch, dass es sich in Lösung um eine 1:1 Stöchiometrie handelt, bei der ein Proteinmolekül mit einem ssDNA-Molekül interagiert (Max, 2006). Auch die NMR-spektroskopische Bestimmung der Rotationskorrelationszeit von *Bs-CspB* und *Bs-CspB*·*dT₆* führt zu der selben Schlussfolgerung (Zeeb *et al.*, 2006). Die Kristallstrukturen *Bs-CspB*·*dT₆* und *Bc-Csp*·*dT₆* geben somit also ein globuläres Gefüge wieder, das nicht die Verhältnisse in Lösung widerspiegelt. Mit den in dieser Arbeit präsentierten Strukturen von *Bs-CspB*·*rU₆* und *Bs-CspB*·*rC7* konnte erstmals auch im Kristall beo-

bachtet werden, dass nur ein Kälteschockprotein mit einem Oligonukleotid in Kontakt ist.

Dessen ungeachtet weisen alle vier Strukturen Gemeinsamkeiten in der Art der Nukleotidbindung auf: die RNA-Bindestelle wird von einer amphipatischen Proteinoberfläche gebildet und die Interaktionen mit dem Liganden werden vor allem durch Stapelwechselwirkungen zwischen Nucleobasen und aromatischen Seitenketten vermittelt. Nur die Tatsache, dass von den sechs Nucleotiden in dem *Bs*-CspB·rU₆-Komplex und von den sieben Nucleotiden in dem *Bs*-CspB·rC7-Komplex nur fünf in der Elektronendichte erkennbar sind, verhindert, dass alle zuvor für CSP-ssDNA-Strukturen beschriebenen Interaktionen mit denen aus den *Bs*-CspB·ssRNA-Strukturen verglichen werden können.

5.2.1 Identifizierung von vier ssRNA-Bindetaschen

Die Interaktionsfläche von *Bs*-CspB mit dem Liganden kann in verschiedene Bindetaschen unterteilt werden, die jeweils durch ein Nucleotid besetzt werden. Von den zuvor für *Bs*-CspB beschriebenen sieben Bindetaschen, die der 5'-3'-Polarität des Liganden folgend von 1 bis 7 nummeriert werden, können vier in den Komplexen mit ssRNA beobachtet werden (Abb. 5.7 c+d). Alle diese Bindetaschen sind durch eine Stapelinteraktion einer aromatischen Aminosäure und einer Nucleobase gekennzeichnet. Die Bindetaschen 1 bis 3 sind nicht besetzt. Die Wechselwirkung des Phe38 eines symmetrieverwandten Proteinmoleküls mit der Nucleobase U3 bzw. C3 ersetzt jedoch die Interaktion in der Bindetasche 1. In der Bindetasche 4 stapelt die Nucleobase U2 mit His 29. Die Base U3 in *Bs*-CspB·rU₆ bzw. die Base C3 in *Bs*-CspB·rC7 stapelt mit der Seitenkette von Phe25 und bildet so die Bindetasche 5. In der Tasche 6 wechselwirkt die Nucleobase U4 mit Phe17. Die letzte Bindetasche mit der Nummer 7 ist gekennzeichnet durch eine Stapelinteraktion der Nucleobase U5 mit Trp8. Ein weiteres in der Elektronendichte aufgelöstes Nucleotid interagiert mit dem vorangehenden Nucleotid durch Stapelung der Nucleobasen. Diese Anordnung wird allerdings durch die Kristallpackung begünstigt, da eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Kopfgruppe O⁴ der Base U6 und der Aminosäureseitenkette des Lys13 eines symmetrieverwandten Prote-

inmoleküls diese Konformation stabilisiert. Eine derartige Basenstapelung ist somit in Lösung nicht zu erwarten.

5.2.2 Gegenüberstellung der strukturellen Ergebnisse aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie

Die Abwesenheit von Interaktionen der ssRNA mit *Bs*-CspB in den Bindetaschen 1 bis 3 ist darauf zurückzuführen, dass die Bindetasche 2, die durch Stapelung einer Nukleobase zwischen den Seitenketten von Phe30 und Phe38 gebildet wird, in den Kristallstrukturen durch die Seitenkette des Arg56 eines symmetrieverwandten Proteinmoleküls belegt ist. Die Guanidin-Gruppe wird dabei durch Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carbonylgruppe von Lys39 und der Hydroxylgruppe von Thr40 in dieser Position gebunden. Diese durch die Kristallpackung verursachte Wechselwirkung gab den Anlass, die Bindung von ssRNA an *Bs*-CspB in Lösung zu untersuchen. Die Änderung der chemischen Verschiebung der Resonanzen des Proteins in NMR-Titrationsexperimenten ermöglichte es, den Bindungsort von rU₆ und rC7 zu lokalisieren (Abschnitt 4.1.4). Die Darstellung der Aminosäuren, die eine große Änderung der chemischen Verschiebung erfahren, auf der Proteinoberfläche der Komplexstrukturen (Abb. 5.8) verdeutlicht, dass die Fläche, die von dem Liganden in Lösung bedeckt wird, ausgedehnter ist, als es die Kristallstruktur zeigt. Besonders die Kreuzsignale der Aminosäuren Phe38 und Phe30 erfahren eine der größten Verschiebungen (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Diese Reste fallen auch bei der NMR-Titration des *Bs*-CspB mit dT₇ auf (Zeeb *et al.*, 2006). Außerdem sind die Seitenketten dieser Reste in der Kristallstruktur des *Bs*-CspB·dT₆-Komplexes in eine vierteilige Stapelinteraktion mit den Nukleobasen von zwei Nukleotiden in den Bindetaschen 1 und 2 involviert (Max *et al.*, 2006). Des Weiteren erfährt das Kreuzsignal von Lys39 eine erhebliche Änderung der chemischen Verschiebung durch die Bindung von ssRNA. In der *Bs*-CspB·dT₆-Struktur bilden die Rückgrat-Atome von Lys39 Wasserstoffbrückenbindungen mit den Kopfgruppen der Nukleobase in der Bindetasche 2. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in Lösung rU₆ und rC7 die Bindetasche 2 besetzen.

Auffällig ist, dass bei den NMR-Titrationsexperimenten zwei Aminosäuren, die in Stapelinteraktionen mit den Nukleobasen in den Kristallstrukturen von *Bs*-CspB·rU₆ und

Bs-CspB·rC7 involviert sind, keine starken Verschiebungen ihrer Kreuzsignale aufweisen. Dazu gehört Phe27 und im Fall der Titration mit rU₆ auch Trp8 (Phe17 konnte bei der Titration mit rU₆ wegen des langsamen chemischen Austausches nicht verfolgt werden). Die nahezu identischen Konformationen dieser Aminosäuren im freien und gebundenen Zustand, wie es mit den Kristallstrukturen aufgezeigt werden konnte (Abb. 5.4), liefert dafür eine Erklärung. In Lösung ändert sich die elektronische Umgebung der entsprechenden Atomkerne des Proteinrückgrates durch die Anlagerung der ssRNA an die Seitenkette kaum und somit auch nicht ihre Resonanzfrequenz, die im ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrum detektiert wird.

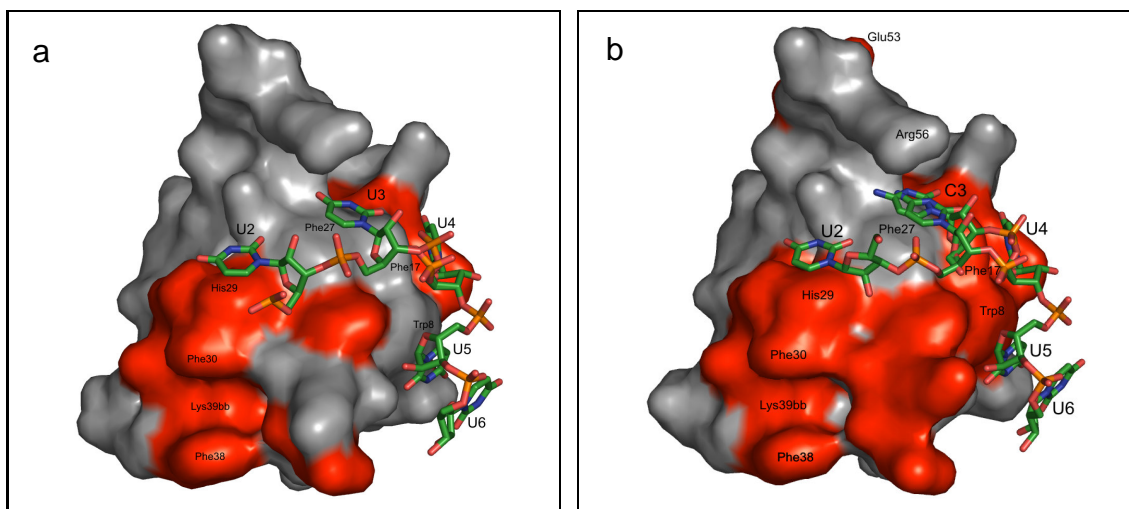


Abb. 5.8 Interaktion der ssRNA mit *Bs*-CspB detektiert mittels NMR-Titrationsexperimenten (¹H-¹⁵N HSQC-Spektren). Die Oberfläche des Proteins der Kristallstrukturen *Bs*-CspB·rU₆ (a) und *Bs*-CspB·rC7 (b) ist als graues Objekt dargestellt. Aminosäurereste, die sich durch einen hohen Wert für die mittlere gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung von ¹H_N und ¹⁵N auszeichnen ($\Delta\delta > 0,13$ ppm), sind in rot gezeigt. Aminosäurereste, die sich durch Stapelinteraktionen in Komplexen von *Bs*-CspB und ssRNA (diese Arbeit) und in Komplexen von *Bs*-CspB und ssDNA (Max *et al.*, 2006) auszeichnen sowie die Rückgratome von Lys39 sind beschriftet. Außerdem sind die Aminosäuren Glu53 und Arg56 gekennzeichnet.

Bei der NMR-Titration von *Bs*-CspB mit rC7 verschiebt das Kreuzsignal von Glu53 sehr weit, obwohl sich diese Aminosäure weit entfernt von der Protein-RNA-Interaktionsfläche befindet. Glu53 ist die letzte Aminosäure des β -sheet 4 (β_4 , Abb. 5.3). In der sich anschließenden Schleife (L₄₅) befindet sich die Aminosäure Arg56, für die in der Struktur von *Bc*-Csp·dT₆ eine Wechselwirkung der Guanidingruppe mit dem Phosphatrückgrat der ssDNA beschrieben ist (Max *et al.*, 2007). Glu53 fungiert deshalb in Lösung wahrscheinlich als Scharnier für die Schleife L₄₅ und ermöglicht so eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von Arg56 und der Phosphatgruppe, die

sich zwischen der Bindetasche 4 und 5 befindet. Glu53 ist somit ein Sensor für die Konformationsänderung des Proteins entfernt von der Kontaktstelle mit der ssRNA.

Auf Basis dieser Untersuchungen lässt sich die erwartete Interaktionsfläche von rC7 und rU₆ in Lösung wie folgt beschreiben (Abb. 5.9): Das Heptanukleotid rC7 belegt alle sieben Bindetaschen auf der Oberfläche von *Bs*-CspB, das Hexanukleotid rU₆ dagegen nur die Bindetaschen 2 bis 7. Für rU₆ ist es auch vorstellbar, dass durch eine Verschiebung des Liganden die Bindetaschen 1 bis 6 besetzt werden. Bindetasche 7, die durch die Stapelinteraktion einer Nukleobase mit Trp8 gekennzeichnet ist, wäre dann nicht besetzt. Das Verschwinden des Kreuzsignals der Seitenkette von Try8 im ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrum des *Bs*-CspB·rU₆-Komplexes (Abb. 4.4), was auf einen intermediären chemischen Austausch zurückzuführen ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Lösung zwei Modalitäten der Komplexbildung vorliegen.

Trotz der Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der Röntgenkristallographie und dem Modell für die Verhältnisse in Lösung liefern die Kristallstrukturen ein klares Bild der Erkennung von ssRNA-Substraten in den Bindetaschen 4 bis 7.

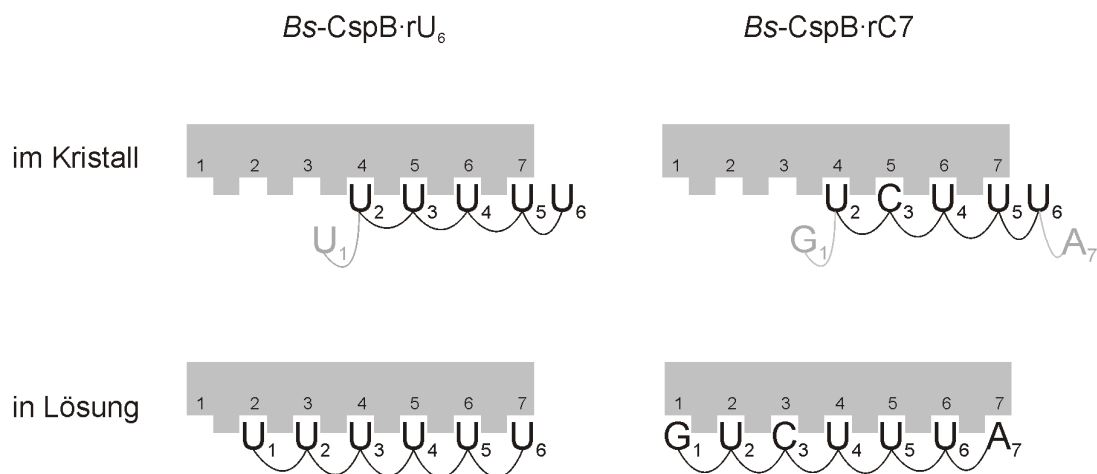


Abb. 5.9 Schematische Darstellung der *Bs*-CspB-ssRNA-Interaktionen im Kristall und in Lösung. Proteinmoleküle (graue Objekte) interagieren mit Nucleobasen in den Bindetaschen (nummerierte Aussparungen). Nucleotide sind mit dem Einbuchstabencode ihrer Base und einer Nummer, hier als Index, entsprechend ihrer Position in der Sequenz bezeichnet. Nucleotide, für die keine Elektronendichte in der Röntgenstrukturanalyse identifiziert werden konnte, sind hellgrau eingefärbt.

5.2.3 Die Bindung von *Bs*-CspB an einzelsträngige RNA und die Auswirkungen auf die Funktion

In den bisher aufgeklärten CSP·ssDNA sowie in den in dieser Arbeit beschriebenen *Bs*-CspB·ssRNA-Komplexstrukturen sind die an der Bindung des Liganden beteiligten Seitenketten des Proteins in fast unveränderter Orientierung verglichen mit der Struktur des freien Proteins. Außerdem kann auf Grund der hohen Assoziationsratenkonstanten bei der Ligandenbindung (siehe Abschnitt 4.1.2), die auf einen niedrig-energetischen Übergangszustand hinweisen, geschlossen werden, dass auch die Struktur des Übergangszustandes bei der Ligandenbindung kaum von der Struktur des freien Kälteschockproteins abweicht. Damit ist die Interaktion von *Bs*-CspB mit Oligonukleotiden am ehesten mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip als mit dem *Induced-Fit*-Modell zu beschreiben.

Bei einem genauen Blick auf die einzelnen Bindetaschen fällt die Bindetasche Nummer 6 besonders auf, die sich von den anderen durch die Anzahl der Kontakte des Proteins mit den Kopfgruppen der Nukleobase unterscheidet. Drei Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen dem Pyrimidinring und Aminosäureseitenketten gebildet (Abb. 5.10). Alle anderen Nukleobasen sind durch weniger Kontakte in ihrer Bindetasche fixiert. Die Position 6 ist spezifisch für die Base Uracil, denn eine Wasserstoffbrücke verbindet das protonierte N³ der Nukleobase U4 mit der Carboxylgruppe des Asp25. Das deprotonierte N³ der Base Cytosin würde hier eine destabilisierende Wechselwirkung verursachen. Eine fast identische Interaktion in dieser Bindetasche wurde auch schon in der Kristallstruktur von *Bc*-Csp·dT₆ beobachtet (Max *et al.*, 2007). Auch bestätigen Untersuchungen der Bindungsaffinität von ssDNA an *Bs*-CspB, dass Thymin in Position 6 gegenüber Cytosin bevorzugt wird (Max *et al.*, 2006). Die zusätzliche Methylgruppe in der Base Thymin, die sie von der Base Uracil unterscheidet, beeinflusst diese Vergleiche nicht, da in der *Bc*-Csp·dT₆ und der *Bs*-CspB·dT₆-Struktur diese Methylgruppe nicht an Interaktionen mit dem Protein beteiligt ist.

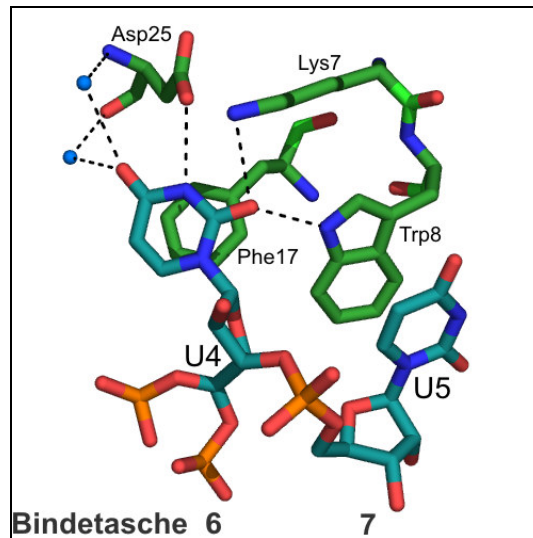


Abb. 5.10 Interaktion von Kopfgruppen der Nucleobase U4 mit Proteingruppen in der Bindetasche 6 des Komplexes *Bs-CspB·rC7*. Die Art der Darstellung entspricht der von Abb. 5.7.

In der Bindetasche 4 im *Bs-CspB·rC7*-Komplex lässt sich ein weiterer Hinweis auf eine basenspezifische Wechselwirkung finden. Das protonierte N^3 der Nucleobase U2 bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe in der Seitenkette des Gln59. Jedoch ist die Elektronendichte für U2 in *Bs-CspB·rC7* schlecht definiert und die beschriebene Interaktion wird im *Bs-CspB·rU6*-Komplex nur durch ein Wassermolekül vermittelt, so dass eine die Nucleobase festlegende Wechselwirkung in Bindetasche 4 nicht bewiesen ist. Weitere Präferenzen für bestimmte Basen können in den *Bs-CspB*-ssRNA-Kristallstrukturen nicht beobachtet werden, da Wechselwirkungen der Kopfgruppen der Nucleobasen mit dem Protein in den Bindetaschen 5, 6 und 7 fast nur durch Wassermoleküle vermittelt werden. Somit lässt sich die Bindung von ssRNA durch *Bs-CspB* als weitgehend sequenzunspezifisch gegenüber den Basen Uracil und Cytosin beschreiben. Die erhöhten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von Oligonucleotidsequenzen, die Purine enthalten, können jedoch gut durch eine sterische Hinderung erklärt werden.

Eine wichtige Wechselwirkung ist für die Seitenkette des Asn10 zu beobachten, das eine Wasserstoffbrückenbindung mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose von Nucleotid U5 in der Bindetasche 7 bildet. Diese Interaktion ist spezifisch für RNA, denn in DNA-Molekülen ist auf Grund der 2'-Desoxyribose diese Wechselwirkung nicht möglich. In allen anderen Bindetaschen ist die Ribose weg von der Proteinoberfläche zum Lösungsmittel hin orientiert und interagiert nicht mit dem Kälteschockprotein, das somit einzelsträngige RNA und DNA nicht unterscheiden kann. Da in der Bakterienzelle

DNA fast ausschließlich als Doppelstrang vorliegt, ist einzelsträngige RNA jedoch das Substrat, das in der höchsten Konzentration vorliegt und der häufigste Interaktionspartner für das Kälteschockprotein darstellt.

Mit Hilfe der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie konnten bereits einige Strukturen von Proteinen im Komplex mit ssRNA bestimmt werden. In dem heterotetrameren *exon junction core* Komplex, der für das *splicing* der prä-mRNA verantwortlich ist, konnte die Wechselwirkung der DEAD-box Adenosintriophosphatase mit Hexauridin beobachtet werden (Andersen *et al.*, 2006). DEAD-box Proteine nutzen die Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriophosphat um doppelsträngige Nukleinsäuren zu entwinden (Cordin *et al.*, 2006). Die für diese Funktion nötige sequenzspezifische Bindung an mRNA reflektiert sich in der molekularen Struktur durch einen ausschließlichen Kontakt der Helikase mit dem Zuckerphosphatrückgrat aller RNA-Reste wieder. Nicht nur in diesem Punkt unterscheidet sich die Wechselwirkungen des DEAD-box Proteins mit ssRNA von dem Kälteschockprotein *Bs-CspB*, sondern ebenso durch die Erkennung von vier 2'OH-Gruppen in dem Hexauridin.

Die Struktur des *splicing factor 1*, der ebenfalls an der Prozessierung der prä-mRNA beteiligt ist, konnte in Lösung aufgeklärt werden (Liu *et al.*, 2001). Die an ihn gebundene elf Nukleotide umfassende ssRNA schließt die *intron branch point sequence* 5'-UACUAAC-3' ein, dessen letztes Adenosin die Verzweigungsstelle ist, an dem die Zirkularisierung des Introns stattfindet. Ähnlich wie beim *Bs-CspB* bindet die RNA in einer ausgedehnten Konformation an eine hydrophobe Oberfläche auf dem Protein, die von positiv geladenen Seitenketten umgeben ist, so dass das Zuckerphosphatrückgrat dem Lösungsmittel zugewandt ist. Jedoch konnten keine Stapelwechselwirkungen der Basen mit aromatischen Aminosäuren identifiziert werden, stattdessen stapeln die Basen von drei Nukleotiden gegeneinander und bilden so eine helikale Struktur. In Übereinstimmung mit der Konservierung des Adenosins an der Verzweigungsstelle wird dieses auch durch Wasserstoffbrücken der Kopfgruppen der Base mit dem Proteinrückgrat spezifische gebunden.

Ein weiteres Beispiel für die Interaktion von Proteinen mit ssRNA ist das *RNA-binding attenuation protein* (TRAP) (Antson *et al.*, 1999). Es reguliert die Expression von Tryptophanbiosynthese-Genen in verschiedenen *Bacilli*. Das zirkulare aus elf Untereinheiten bestehende TRAP ist aktiv im Komplex mit Tryptophan und bindet Segmente von elf

5'-(G/U)AG-3' Triplets, die jeweils durch zwei oder drei nicht konservierte Nukleotide getrennt sind. Die Interaktion des Proteins mit der RNA erfolgt in der Art, dass die ssRNA um das TRAP gewunden ist und die Basen der Proteinoberfläche sowie das Zuckerphosphatrückgrat dem Lösungsmittel zugewandt ist. Trotz dieser Konformation sind 2'-Hydroxylgruppen der Ribose an einigen Stellen in Wasserstoffbrücken mit dem Protein involviert. In den Bindetaschen können die verschiedensten Wechselwirkungsmotive beobachtet werden. Darunter die Van-der-Waals-Wechselwirkung einer Base mit dem hydrophoben Bereich einer Lysinseitenkette, das Stapeln von Basen untereinander und das Stapeln einer Base gegen die aromatische Aminosäure Phenylalanin. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu den *Bs-CspB*·ssRNA-Strukturen ist, dass die Kopfgruppen der Basen in dem Triplett spezifisch durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erkannt werden.

Auf Grund der bevorzugten Bindung von Pyrimidinen ist das *polypyrimidine tract binding protein 1* (PTB) in dieser Hinsicht dem *Bs-CspB* vergleichbar. PTB ist am Metabolismus der mRNA beteiligt und besteht aus vier RNA-bindenden Domänen (RBDs), die jeweils durch eine unstrukturierte Polypeptidkette getrennt sind. Die Strukturen der einzelnen RBDs komplexiert mit der ssRNA der Sequenz 5'-CUCUCU-3' konnten in Lösung bestimmt werden (Oberstrass *et al.*, 2005). Das Protein faltet in eine $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Topologie und besitzt wie *Bs-CspB* die RNP-Motive 1 und 2, die in *Bs-CspB* an der Bindung von Oligonukleotiden beteiligt sind. Jedoch ist in PTB das RNP-Motive 1 kaum in die Bindung der ssRNA involviert. Des Weiteren unterscheidet sich PTB von *Bs-CspB* durch selektive Erkennung der Basen Cytosin und Uracil in einigen Bindetaschen und neben der Stapelung von Basen mit aromatischen Aminosäuren ist auch die Interaktion von Basen mit der Guanidinogruppe der Argininseitenkette zu beobachten. Auch in PTB ermöglichen Wasserstoffbrücken des Proteins mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose die Unterscheidung zwischen ssRNA und ssDNA.

Die Interaktion von ssRNA mit der RNase II (Frazao *et al.*, 2006) weicht zunächst deutlich von *Bs-CspB* ab. In der katalytischen Domäne der RNase II wird die Phosphatgruppe jedes Nukleotids durch ein oder zwei Wasserstoffbrücken mit Proteinresten gebunden, ein Charakteristikum für sequenzunspezifische Nukleotidinteraktion. Wechselwirkung mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose erklären die ausschließliche Spaltung von ssRNA durch die Exoribonuklease. Die RNase II besitzt neben der katalytischen

Domäne aber auch eine sogenannte Ankerregion, die dem katalytischen Zentrum den Nukleotidstrang zuführt. Sie besteht aus einer S1-Domäne und zweier Kälteschockdomänen (CSD1 und CSD2). In der S1-Domäne dominieren Basenstapelungen mit aromatischen Aminosäuren die Interaktion des Proteins mit der ssRNA. Das Zuckerphosphatrückgrat ist hier ebenso wie in den *Bs*-CspB·ssRNA-Strukturen hauptsächlich von dem Lösungsmittel umgeben. Aber auch in einem weiteren Punkt sind sich die Kristallstrukturen von RNase II und *Bs*-CspB im Komplex mit ssRNA ähnlich. Die Atome der RNA in der CSD2 weisen hohe B-Faktoren auf und heben sich damit von den Nukleotiden in der katalytischen Domäne ab, deren Struktur klarer definiert ist.

Die biologische Funktion der CSP ist immer noch nicht eindeutig geklärt. Für das CspA aus *Escherichia coli* führte die Bindung einzelsträngiger Nukleinsäure und das damit verbundene Verhindern der Ausbildung von Doppelsträngen zur Beschreibung der Funktion als RNA-Chaperon (Jiang *et al.*, 1997), die bei niedrigen Temperaturen die Translation der mRNA sicherstellen soll. Die Sequenzspezifität der Bindung von ssRNA und die Art und Weise der Abschirmung der Kopfgruppen der Nukleobasen in den *Bs*-CspB·ssRNA-Strukturen unterstützt diese Interpretation.

Neben der Funktion als RNA-Chaperon ist für die CSP aus *E. coli* außerdem eine Aktivität als Transkriptionsantiterminator beschrieben (Bae *et al.*, 2000), die aber ebenfalls das Auflösen von Sekundärstrukturen beinhaltet. In dieser Arbeit wurde das Operon *metY-rpsO* untersucht (Sands *et al.*, 1988), das die Sequenz für Proteine NusA, If2, RbfA und PNP codiert, die eine Rolle bei der Adaption der Zellen an Kälte spielen. Es konnte *in vivo* beobachtet werden, dass durch Überexpression von *E. coli* CspC und CspE oder unter Kälteschockbedingungen, auf die die Zellen mit einer Überproduktion von CspA reagieren, Gene jenseits von Transkriptionsterminatoren in diesem Operon abgelesen werden. Dies konnte auch *in vitro* bestätigt werden. Das Transkriptionsterminatorsignal ist in der neusynthetisierten RNA codiert und besteht aus einer Stamm-Schleifen-Struktur, worauf eine Uridin-Sequenz folgt. Es wird erwartet, dass die Zerstörung der Stamm-Schleifen-Struktur die Termination verhindert, so dass nachgelagerte Gene abgelesen werden können. Zusammen mit einer Mutationsstudie an *E. coli* CspE (Phadtare *et al.*, 2002a) legen die Ergebnisse von Bae *et al.* nahe, dass CspE durch Auflösen dieser Stamm-Schleifen-Struktur in der naszierenden RNA die Transkriptionsanti-

terminationsfunktion ausübt. Die Aminosäuren Phe30, Phe17 und His32 spielen dabei eine entscheidende Rolle (Phadtare *et al.*, 2002b).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind in dem zu *E. coli* CspE homologen *Bs*-CspB die Aminosäuren Phe17 und das dem His32 entsprechende His29 an Stapelinteraktionen mit den Nukleobasen der ssRNA beteiligt. Auch die Wechselwirkung von Phe30 mit ssDNA ist belegt (Max *et al.*, 2006). Für *E. coli* CspE ergeben sich schließlich zwei mögliche Modelle, wie die Stamm-Schleifen-Struktur des Transkriptionsterminatorsignals aufgelöst werden könnte (Phadtare *et al.*, 2004). Zunächst könnte CspE die ssRNA in der Schleifen-Struktur binden und initiiert dadurch die Trennung der Stränge in der Stamm-Struktur, oder CspE bindet direkt am Übergang von der Stamm- in Schleifen-Struktur. Die Aminosäuren Phe17 und Phe30 binden dabei das 5' bzw. das 3'-Ende der Schleife, His32 dagegen interkaliert in den Doppelstrang des Stammes und ist somit aktiv an der Auflösung der Sekundärstruktur beteiligt (Abb. 5.11). Übertragen auf *Bs*-CspB würde dies bedeuten, dass die Bindetaschen 1-4 und 5-7 jeweils eine zusammenhängende Nukleotidsequenz binden würden. Auch wenn die bisher verfügbaren Kristallstrukturen von *Bs*-CspB in Komplex mit ssDNA und ssRNA belegen, dass es möglich ist, dass ein einziger Oligonukleotidstrang in der Lage ist alle Bindetaschen zu besetzen, gibt es keinen Anlass das beschriebene Modell auszuschließen. Am besten Aufschluss darüber könnten Röntgenkristallographie-Experiment mit *E. coli* CspE im Komplex mit ssRNA geben, um letztendlich strukturelle Ergebnisse mit *in vivo* und *in vitro* Daten des in Bezug auf die Funktion am besten beschriebenen Kälteschockproteins miteinander verknüpfen zu können.

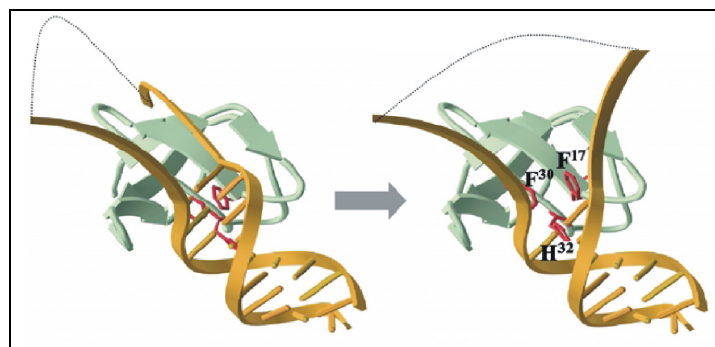


Abb. 5.11 Modell des Auflösens der Stamm-Schleifen-Struktur durch *E. coli* CspE. Die Kristallstruktur von *E. coli* CspA ist in grün dargestellt, die Nukleinsäure in gelb. Die Seitenketten von F17, F30 und H32 sind in rot gezeichnet. F17 und F30 binden das 5'- und das 3'-Ende des Strangs, während H32 in den Doppelstrang interkaliert und das Aufschmelzen vorantreibt. Die Abbildung ist aus (Phadtare *et al.*, 2004) entnommen.

Zusammenfassung

Die bakteriellen Kälteschockproteine (CSP) sind kleine Proteine, die aus ca. 70 Aminosäuren bestehen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Antwort der Bakterienzelle auf eine abrupte Reduktion der Wachstumstemperatur. Ihre biologische Aktivität ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Funktionen als Transkriptionsantiterminator beschreibt die Bindung dieser Proteine an eine Stamm-Schleifen-Struktur der RNA, die dadurch aufgelöst wird. Somit ermöglichen sie das Ablesen von Genen, die jenseits dieses Transkriptionsterminatorsignals liegen. Die Interaktion der CSP mit einzelsträngiger DNA (ssDNA) ist gut charakterisiert, und die Strukturen zweier Kälteschockproteine aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus caldolyticus* (*Bs-CspB* und *Bc-Csp*) im Komplex mit Hexadesoxythymidin (dT₆) sind bekannt. Allerdings war über die Wechselwirkung der CSP mit ssRNA bisher wenig bekannt. Daneben sind die CSP auf Grund ihres geringen Molekulargewichts und der Möglichkeit, die thermodynamische Stabilität mit dem Zwei-Zustandsmodell zu beschreiben, geeignete Proteine für die Untersuchung der Proteinfaltung.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Doppelmutante des Kälteschockproteins aus *Bacillus caldolyticus* (*Bc-Csp R3E L66E*) mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Dieses Protein besitzt nur eine sehr geringe thermodynamische Stabilität und entfaltet bereits bei Temperaturen größer als 39°C und niedriger als -11°C. Dies macht es möglich, den bei vielen Proteinen unzugänglichen und bisher ungenügend erforschten durch Kälte denaturierten Zustand zu charakterisieren.

Auf Grund des Faltungsgleichgewichts und des schnellen Austausches der Amidprotonen mit dem Wasser konnte die Rückgratzuordnung für nur 37 von 66 Aminosäuren des nativen Proteins durchgeführt werden. Die Rückgratzuordnung des mittels Harnstoff denaturierten Proteins gelang jedoch unter Verwendung von Tripelresonanzexperimenten vollständig. Bei 5,6 M Harnstoff ist die Polypeptidkette komplett entfaltet und enthält keine Sekundärstrukturen mehr. Mit dem der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Thomas Szyperski (Universität Buffalo, USA) zur Verfügung gestellten ¹³C,¹⁵N-markierten Protein sollte es möglich sein, den durch Hitze und Kälte denaturierten Zustand von *Bc-Csp R3E L66E* zu analysieren und mit dem durch Harnstoff denaturierten Zustand zu vergleichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde zunächst die Affinität von *Bs*-CspB gegenüber ssRNA ermittelt. Uridinreiche Heptanukleotide weisen die niedrigsten K_D -Werte auf, die im hohen nanomolaren Bereich liegen. Dennoch ist auffällig, dass ssRNA schwächer gebunden wird als ssDNA. Dies ist auf den Austausch der Base Thymin in der DNA gegen die Base Uracil in der RNA zurückzuführen, das Zuckerphosphatrückgrat spielt dagegen keine Rolle für die Interaktion von *Bs*-CspB mit dem Oligonukleotid. Die Assoziationsratenkonstanten wiederum sind für beide Nukleinsäurearten gleich, so dass die unterschiedlichen K_D -Werte nur aus verschiedenen Dissoziationsratenkonstanten resultieren.

Um die molekularen Prinzipien der Erkennung von ssRNA durch CSP analysieren zu können, wurde *Bs*-CspB zusammen mit den Oligonukleotiden rU₆ (5'-UUUUUU-3') und rC7 (5'-GUCUUUA-3') kristallisiert und die Komplexstrukturen durch Röntgenstreuung mit Auflösungen von bis zu 1,68 Å bzw. 1,38 Å gelöst. Dies sind somit die ersten publizierten Kristallstrukturen eines Kälteschockproteins mit seinem natürlichen Substrat: der RNA. Allerdings sind nur vier der zuvor an CSP identifizierten sieben Bindetaschen durch Nukleotide besetzt. Die Bindetaschen 1-3 sind durch die molekulare Packung im Kristall nicht zugänglich. Trotz der Unterschiede in der globulären Anordnung der Proteinmoleküle ähneln die Komplexstrukturen von *Bs*-Csp·rU₆ und *Bs*-Csp·rC7 in molekularen Details dem publizierten *Bc*-Csp·dT₆-Komplex. Die ssRNA nimmt eine ausgestreckte Konformation ein und die Interaktion von *Bs*-CspB mit dem Oligonukleotid wird von Stapelinteraktionen der Nukleobasen mit aromatischen Seitenketten dominiert. Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen der Nukleobasen sind aber nur schwach ausgeprägt, so dass nur in der Bindetasche 6 Uracil spezifisch gebunden wird. Eine Wasserstoffbrücke vom Protein zum Zuckerphosphatrückgrat der ssRNA existiert nur an einer Stelle. Darin involviert ist eine 2'-OH-Gruppe, die RNA von DNA unterscheidet. Auf Grund der geringen Anzahl der Wechselwirkungen, ermöglicht dies es dem Kälteschockprotein jedoch nicht zwischen RNA und DNA zu selektieren.

NMR-Spektroskopische Experimente, bei denen die Änderung der chemischen Verschiebung der Proteinrückgratome durch die Bindung der ssRNA analysiert wurde, ergänzen die strukturbioologischen Untersuchungen an den Komplexen *Bs*-Csp·rU₆ und *Bs*-Csp·rC7. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Bindung der ssRNA in Lösung im Gegensatz zum Kristall auf sechs bzw. alle sieben Bindetaschen erstreckt.

Weitere wissenschaftliche Ergebnisse und Publikationen

Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1

Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) ist eine Krankheit, die durch eine Trinukleotidexpansion in dem Gen des Poly(A)-bindenden Proteins aus dem Zellkern (PABPN1) verursacht wird (Brais *et al.*, 1998). Dadurch wird auf der Ebene der Translation eine Polyalaninsequenz gleich nach dem Startmethionin des PABPN1 verlängert. OPMD ist durch amyloid-ähnliche intranukleäre Ablagerungen gekennzeichnet, die hauptsächlich aus PABPN1 bestehen (Calado *et al.*, 2000). In Folge dessen leiden Patienten im höheren Alter vor allem an hängenden Augenlidern und haben Schluckbeschwerden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Elisabeth Schwarz (Universität Halle-Wittenberg) wurde die Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1, die eine um sieben Alanine verlängerte Polyalaninsequenz und eine Tryptophaninsertion an Position 22 direkt nach der Polyalaninsequenz trägt (W(22)-N-(+7)Ala), *in vitro* mittels 1D ^1H Echtzeit-NMR-Spektroskopie untersucht. Die sieben Alanine entsprechen der längsten in Patienten gefundenen Expansion und das zusätzliche Tryptophan ermöglicht eine bessere spektroskopische Zugänglichkeit, da eine separate Resonanz für das H^{e1} Proton der Tryptophanseitenkette im 1D NMR-Spektrum beobachtet werden kann (Abbildung 1 a).

Das Protein wurde in dem Fibrillierungspuffer, bestehend aus 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 1 % (w/v) NaN_3 , 90 % H_2O /10 % D_2O pH 7,4 aufgelöst und bei 37°C eine Serie von 860 1D ^1H -NMR-Spektren in 110 h aufgezeichnet. Zwei weitere Spektren wurden nach 400 und 615 h aufgenommen. Bei der Auswertung wurden die Bereiche der Methylen/Methyl-Gruppen, der Amidprotonen und des H^{e1} Protons im 1D Spektrum integriert und gegen die Fibrillierungszeit aufgetragen (Abbildung 1 b). Alle Kinetiken zeigen eine *lag phase* von 50 h gefolgt von einem exponentiellen Abfall. Das NMR-Integral nimmt über die Zeit ab, da sich die Anzahl der löslichen, sich schnell bewegen-

den Moleküle mit fortschreitender Fibrillierung reduziert. Interessant ist, dass das Signal der Tryptophanseitenkette nahezu vollständig verschwand (Abbildung 1 a + b), während die Amidprotonen und die Methylen/Methyl-Gruppen etwa 20 % der initialen Intensität behalten. Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich das Tryptophan von W(22)-N-(+7)Ala ebenso wie die Polyalaninsequenz im Zentrum der Fibrille befinden, wo die lokale Dynamik auf Grund der Ausbildung einer stabilen β -Kreuz-Struktur eingeschränkt ist. Die verbleibenden Signale gehören zu dem C-terminalen Teil der Polypeptidkette, die dem Lösungsmittel zugewandt ist und ausreichend Flexibilität besitzt, um mittels NMR-Spektroskopie detektiert zu werden.

Die Ergebnisse wurden in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht: (Rohrberg *et al.*, 2008)

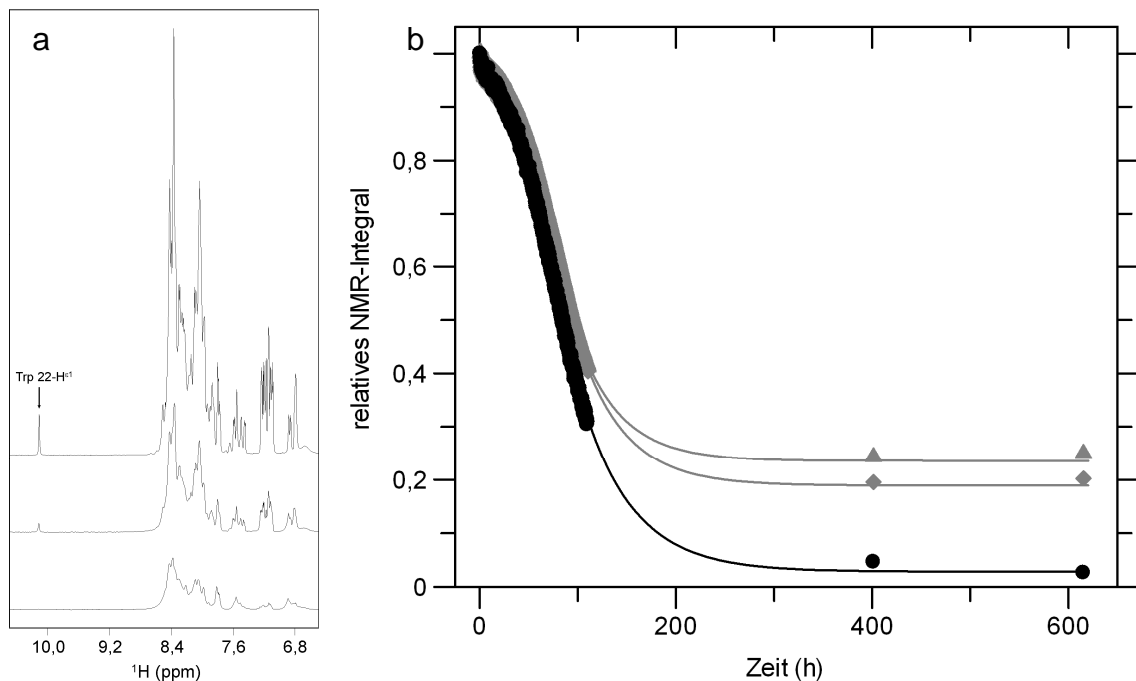


Abbildung 1 Echt-Zeit-NMR-Analyse der Fibrillenbildung von W(22)-N-(+7)Ala. (a) Niedrigfeldauschnitt des 1D ¹H NMR-Spektrums von W(22)-N-(+7)Ala am Beginn (oben), nach 110 h (mittig) und am Ende des Fibrillierungsexperiments (unten) bei 37°C. (b) Abfall der 1D ¹H NMR-Resonanzen von W(22)-N-(+7)Ala während der Fibrillenbildung. Relative NMR-Integrale der Amidregion (Dreiecke, 7,3-8,7 ppm), Methylen/Methyl-Gruppenregion (Rauten, 0,7-1,0 ppm) und der einzelnen Tryptophanseitenkettenresonanz (Kreise, 10,1 ppm). Für die Abnahme der NMR-Integrale wurde eine einfach-exponentielle Funktion zwischen 75 und 620 h angenommen (durchgezogene Linie).

Interaktion des Alzheimer β -Amyloid-Peptids (1-40) mit der Antikörperdomäne B10

Die Alzheimersche Krankheit ist durch die Ausbildung von Fibrillen, die aus den Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) bestehen, gekennzeichnet. In diesen Fibrillen sind die Peptidketten in einer sogenannten β -Kreuz-Struktur arrangiert, die sich durch β -Faltblätter senkrecht zur Fibrillenachse auszeichnet (Sunde *et al.*, 1997; Dobson, 2003). Die strukturellen Unterschiede zwischen monomerem Protein und aus diesem Protein gebildeten Fibrillen macht es möglich, diese beiden Zustände mit Antikörpern, die ein konformationell definiertes Epitop erkennen, zu unterscheiden. Zu diesem Zweck wurde die Antikörperdomäne B10 aus einer rekombinanten Bibliothek von Kamel-Antikörper-Domänen mittels Phagen-*Display* ausgewählt. Oberflächen-Plasmonresonanz-Experimente bestätigten, dass diese Antikörperdomäne bevorzugt an $A\beta$ -Fibrillen bindet und kaum eine Affinität zu nicht aggregiertem $A\beta$ -Peptid sowie $A\beta$ -Oligomeren zeigt. Außerdem kann sie die Bildung von reifen Amyloid-Fibrillen durch Stabilisierung von $A\beta$ -Protofibrillen verhindern (Habicht *et al.*, 2007). Mittels NMR-Titrationsexperimenten sollte nun überprüft werden, ob es möglich ist, eine Interaktion der Antikörperdomäne B10 mit dem monomeren $A\beta(1-40)$ nachzuweisen und die beteiligten Aminosäuren zu identifizieren. Dazu wurden unmarkierte und ^{15}N markierte Antikörperdomäne sowie $A\beta(1-40)$ von der Arbeitsgruppe von Dr. habil. Marcus Fändrich (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) bereitgestellt.

Zunächst wurde die Rückgratzuordnung von $A\beta(1-40)$ auf Grundlage der Publikation von (Hou und Zagorski, 2006) und mittels ^{15}N -TOCSY-HSQC sowie ^{15}N -NOESY-HSQC Spektren auf die verwendeten Pufferbedingungen (20 mM HEPES pH 7,4 bei 8°C) übertragen. Die Experimente wurden an einem Bruker Avance III 800 Spektrometer mit Kryoprobekopf durchgeführt. Die niedrige Temperatur war erforderlich, um den Amidprotonen-Austausch in dem entfalteten Protein soweit zu verlangsamen, dass fast alle Kreuzsignale des Proteinrückgrates im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum detektiert werden konnten. Darüber hinaus verhindert die niedrige Temperaturen die Fibrillierung des monomeren $A\beta(1-40)$. Während der Titration des ^{15}N -markierten $A\beta$ mit unmarkierter Antikörperdomäne B10, bei der nach jedem Titrationsschritt ein ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum aufgezeichnet wurde, konnte zwar kaum eine Verschiebung der Resonanzen

beobachtet werden, jedoch nahm die Intensität einiger Kreuzsignale erheblich ab (Abbildung 2 a). Da keine neuen Signale auftauchten, die den gebundenen Zustand mit veränderter chemischer Umgebung repräsentieren würden, ist davon auszugehen, dass es sich um eine schwache Bindung von B10 an A β (1-40) handelt. Die relativen Verluste der Signalintensitäten bei einem 2,4 fachen Überschuss an B10 wurden gegen die Aminosäuresequenz von A β (1-40) aufgetragen (Abbildung 2 b). Dadurch wird deutlich, dass vor allem die hydrophoben Aminosäuren von L17 bis A21 an Signalintensität verlieren und somit den wahrscheinlichen Ort der Bindung von B10 an das monomere A β (1-40) darstellen.

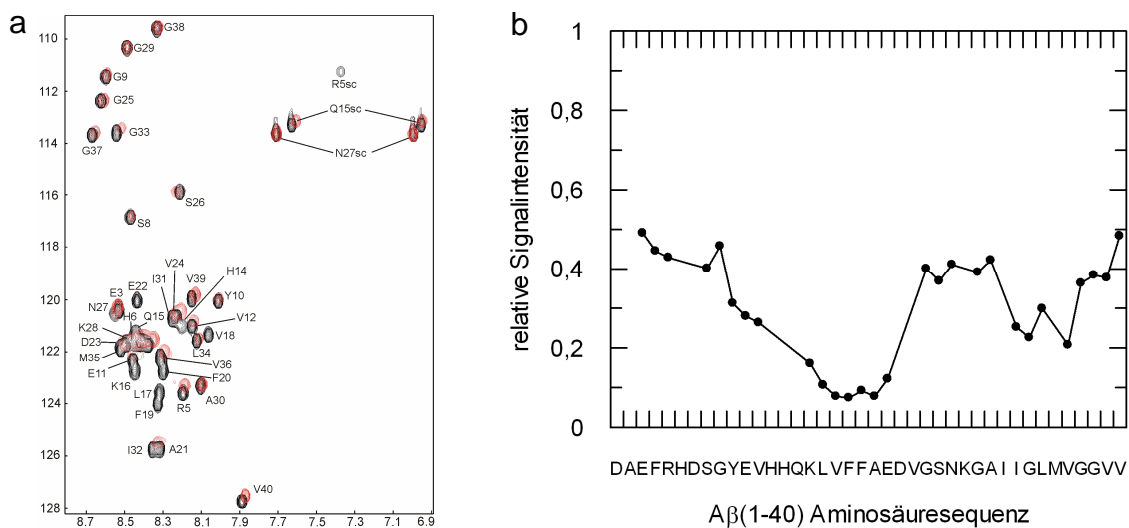


Abbildung 2 Bindung von A β (1-40) an die Antikörperdomäne B10. (a) ¹⁵N-¹H HSQC-Spektrum von 100 μ M freiem A β (schwarz) und nach Zugabe eines 2,4 fachen Überschuss der Antikörperdomäne B10 (rot) in 20 mM HEPES pH 7,4 bei 8°C (Endkonzentrationen: 37 μ M A β , 89 μ M B10). (b) Relative Signalintensität aufgetragen gegen die A β -Aminosäuresequenz bei einem stöchiometrischen Verhältnis von A β zu Antikörperdomäne B10 von 1:1.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Interaktionsstudien der Arbeitsgruppe Fändrich. Hierbei wurde durch eine Alanin-Scan-Mutagenese die Affinität verschiedener B10 Mutanten zu A β -Fibrillen mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Es zeigte sich, dass positiv-geladene Reste in der Antikörperdomäne für die Wechselwirkung der Proteine von Bedeutung sind. Bindung von A β (1-40)-Fibrillen und die Interaktion mit monomeren A β (1-40) durch B10 unterscheiden sich also. Die Ursache dafür kann nur in der unterschiedlichen dreidimensionalen Strukturen von Fibrille und entfalteter Peptidkette liegen.

Bei der Titration von ^{15}N -markiertem B10 mit unmarkiertem $\text{A}\beta(1-40)$ konnten keine Änderungen im Spektrum der Antikörperdomäne B10 festgestellt werden. Dies ist sicherlich auf die geringe Affinität der Bindungspartner zurückzuführen und auf die Tatsache, dass es sich bei B10 um ein Protein mit Tertiärstruktur handelt, im Gegensatz zum entfalteten $\text{A}\beta(1-40)$. Dadurch wird die Änderung der chemischen Umgebung der ^{15}N und ^1H Kerne durch die Bindung eines Liganden nicht so deutlich ausgeprägt sein, wie es für $\text{A}\beta(1-40)$ der Fall ist.

Interaktion des β -Amyloid-Peptids (1-40) mit der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Cyclophilin F

Bei der Untersuchung der Alzheimerschen Krankheit ist in den letzten Jahren die Fehlfunktion der Mitochondrien in den Blickpunkt der Forscher getreten (Lin und Beal, 2006; Lin und Beal, 2006). Hier akkumuliert das Amyloid-Vorläufer-Protein oder das daraus gebildete A β -Peptid. Wie es letztlich dadurch zu einer erhöhten Konzentration freier Radikale kommt und oxidativer Schaden entsteht, ist Gegenstand der Debatte (Lustbader *et al.*, 2004; Manczak *et al.*, 2006; Reddy, 2006). Die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP), die eine zentrale Rolle im neuronalen Zelltod spielt, wird von der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Cyclophilin F (CypF, auch Cyclophilin D genannt) gesteuert. Es wurde berichtet, dass CypF mit dem mitochondrialen Amyloid- β -Peptid interagiert und somit den mitochondrialen, neuronalen und synaptischen Stress verstärkt. Dagegen schützt die Abwesenheit von CypF die Neuronen vor Zelltod durch A β und oxidativen Stress und erhöht die Lern- und Gedächtnisleistung im Maus-Modell. Aus diesem Grund könnte die Inhibierung von CypF ein möglicher therapeutischer Ansatz bei der Therapie der Alzheimerschen Krankheit sein (Du *et al.*, 2008).

Der Einfluss von CypF auf die Fibrillenbildung von A β wird in der Arbeitsgruppe von Dr. Cordelia Schiene-Fischer (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) erforscht. Im Rahmen meiner Arbeit wurde die Interaktion von CypF mit monomerem A β (1-40) mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde ^{15}N -markiertes A β (1-40) mit CypF titriert und mittels ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren detektiert (Abbildung 3 a). Auch hier konnte eine schwache Wechselwirkung der Interaktionspartner beobachtet werden. Die Auftragung der relativen Signalintensität bei einem 1,5 fachen Überschuss an CypF gegen die Aminosäuresequenz von A β (1-40) zeigt auf, dass der hauptsächlich hydrophobe Bereich von L17 bis G25 aber auch die Aminosäuren R5, Y10 und V12 an der Bindung beteiligt sind (Abbildung 3 b).

In einer von mir betreuten Bachelor-Arbeit konnte darüber hinaus die Bindestelle des A β (1-40) in der Nähe des aktiven Zentrums von CypF lokalisiert werden. Bei diesen Experimenten wurde zu einem ^{15}N -A β (1-40)-CypF-Komplex Cyclosporin A oder die Substanz MM258 hinzugegeben und so A β (1-40) von CypF verdrängt. Das typische

Muster der reduzierten Signalintensitäten im ^{15}N -A β (1-40)-CypF-Komplex (Abbildung 3 b) ging dadurch verloren. Cyclosporin A und MM258 sind cyclische Peptide und Inhibitoren von CypF, wobei MM258 dem Cyclosporin A sehr ähnlich ist, jedoch eine höhere Löslichkeit in Wasser besitzt. Sie binden beide am aktiven Zentrum von CypF (Kajitani *et al.*, 2008) mit einer sehr hohen Affinität. Kontrollexperimente bestätigten, dass es sich bei den beobachteten Effekten nicht um eine Interaktion von Cyclosporin A oder MM258 mit A β (1-40) handelt oder die Bindung von A β (1-40) an CypF durch das Lösungsmittel für die cyclischen Peptide (Ethanol) beeinflusst wird (Hengst, 2010). In folgenden Experimenten soll ^{15}N markiertes CypF mit unmarkiertem A β (1-40) mittels NMR-Titration untersucht werden, um die Ergebnisse zu bestätigen und die Bindestelle genauer lokalisieren zu können.

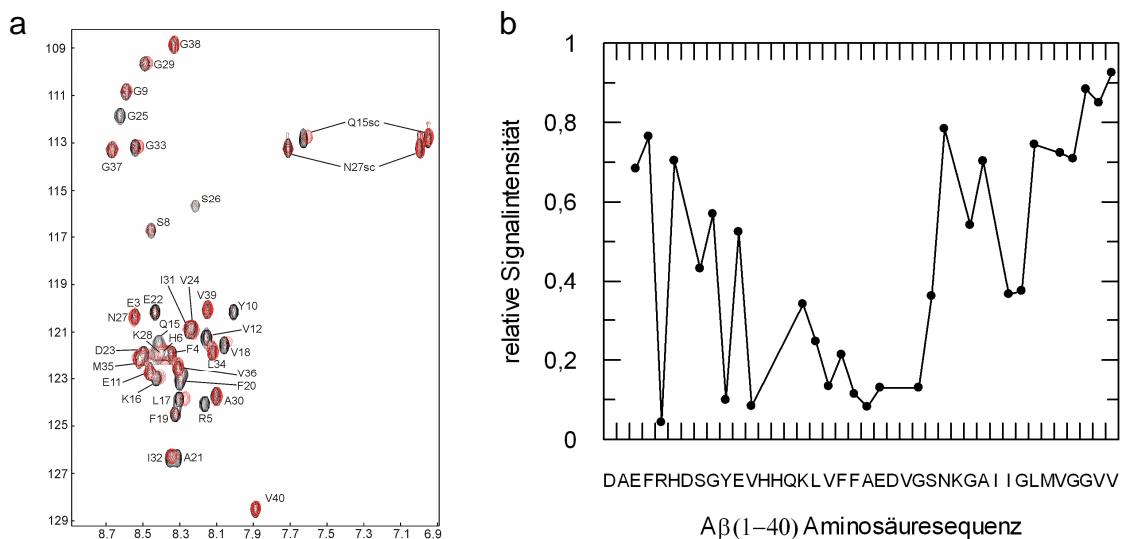


Abbildung 3 Bindung von A β (1-40) an Cyclophilin F. (a) ^{15}N - ^1H HSQC-Spektrum von 100 μM freiem A β (schwarz) und nach Zugabe eines 1,5 fachen Überschuss von Cyclophilin F (rot) in 35 mM Hepes pH 7,8 bei 8°C (Endkonzentrationen: 70 μM A β , 105 μM CypF). (b) Relative Signalintensität aufgetragen gegen die A β Aminosäuresequenz bei einem stöchiometrischen Verhältnis von A β zu Cyclophilin F von 1:1,5.

Listen und Verzeichnisse

Literaturverzeichnis

- Andersen, C. B., *et al.* (2006). "Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA." *Science* **313**: 1968-72.
- Antson, A. A., *et al.* (1999). "Structure of the trp RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA." *Nature* **401**: 235-42.
- Applied_Biosystems. "Oligonucleotide MW and Extinction Coefficient Calculator." abgerufen am 16.06.2010, von http://www.ambion.com/techlib/misc/oligo_calculator.html.
- Arsene, F., T. Tomoyasu und B. Bukau (2000). "The heat shock response of *Escherichia coli*." *Int J Food Microbiol* **55**: 3-9.
- Babu, C. R., V. J. Hilser und A. J. Wand (2004). "Direct access to the cooperative substructure of proteins and the protein ensemble via cold denaturation." *Nat Struct Mol Biol* **11**: 352-7.
- Bae, W., P. G. Jones und M. Inouye (1997). "CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression." *J. Bacteriol.* **179**: 7081-8.
- Bae, W., B. Xia, M. Inouye und K. Severinov (2000). "*Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7784-9.
- Baker, N. A., D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst und J. A. McCammon (2001). "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10037-41.
- Bartlett, A. I. und S. E. Radford (2009). "An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms." *Nat Struct Mol Biol* **16**: 582-8.
- Beckerling, C. L., L. Steil, M. H. Weber, U. Volker und M. A. Marahiel (2002). "Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **184**: 6395-402.
- Bloomfield, V. A. (1999). Base Pairing and Base Stacking. Nucleic Acids Structures, Properties, and Functions. Sausalito, University Science Books.
- Brais, B., *et al.* (1998). "Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy." *Nat Genet* **18**: 164-7.

- Calado, A., *et al.* (2000). "Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA." *Hum Mol Genet* **9**: 2321-8.
- Chen, B. L. und J. A. Schellman (1989). "Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 1. Equilibrium studies." *Biochemistry* **28**: 685-691.
- Cordin, O., J. Banroques, N. K. Tanner und P. Linder (2006). "The DEAD-box protein family of RNA helicases." *Gene* **367**: 17-37.
- Delaglio, F., *et al.* (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J. Biomol. NMR* **6**: 277-293.
- Delbrück, H., U. Mueller, D. Perl, F. X. Schmid und U. Heinemann (2001). "Crystal structures of mutant forms of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein differing in thermal stability." *J Mol Biol* **313**: 359-69.
- Diederichs, K. und P. A. Karplus (1997). "Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography." *Nat Struct Biol* **4**: 269-75.
- Dill, K. A. und H. S. Chan (1997). "From Levinthal to pathways to funnels." *Nat Struct Biol* **4**: 10-9.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." *Nature* **426**: 884-90.
- Du, H., *et al.* (2008). "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease." *Nat Med* **14**: 1097-105.
- Efimova, Y. M., S. Haemers, B. Wierczinski, W. Norde und A. A. van Well (2007). "Stability of globular proteins in H₂O and D₂O." *Biopolymers* **85**: 264-73.
- Ermolenko, D. N. und G. I. Makhatadze (2002). "Bacterial cold-shock proteins." *Cell Mol Life Sci* **59**: 1902-13.
- Fang, L., Y. Hou und M. Inouye (1998). "Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **180**: 90-95.
- Fink, A. L. (2005). "Natively unfolded proteins." *Curr Opin Struct Biol* **15**: 35-41.
- Franks, F. (1995). "Protein destabilization at low temperatures." *Adv. Protein Chem.* **46**: 106-139.
- Frazao, C., *et al.* (2006). "Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex." *Nature* **443**: 110-4.

- Garcia-Mira, M. M., D. Boehringer und F. X. Schmid (2004). "The folding transition state of the cold shock protein is strongly polarized." *J Mol Biol* **339**: 555-69.
- Garcia-Mira, M. M. und F. X. Schmid (2006). "Key role of coulombic interactions for the folding transition state of the cold shock protein." *J Mol Biol* **364**: 458-68.
- Giaquinto, L., *et al.* (2007). "Structure and function of cold shock proteins in archaea." *J Bacteriol* **189**: 5738-48.
- Giuliodori, A. M., *et al.* (2010). "The cspA mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA." *Mol Cell* **37**: 21-33.
- Goldstein, J., N. S. Pollitt und M. Inouye (1990). "Major cold shock protein of *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 283-7.
- Graumann, P., K. Schröder, R. Schmid und M. A. Marahiel (1996). "Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **178**: 4611-9.
- Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schröder und M. A. Marahiel (1997). "A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures." *Mol. Microbiol.* **25**: 741-756.
- Graumann, P. L. und M. A. Marahiel (1998). "A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain." *Trends Biochem Sci* **23**: 286-90.
- Graumann, P. L. und M. A. Marahiel (1999). "Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*." *Arch Microbiol* **171**: 135-8.
- Grzesiek, S., S. J. Stahl, P. T. Wingfield und A. Bax (1996). "The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR." *Biochemistry* **35**: 10256-61.
- Guzzi, R., L. Sportelli, C. La Rosa, D. Milardi und D. Grasso (1998). "Solvent isotope effects on azurin thermal unfolding." *Journal of Physical Chemistry B* **102**: 1021-1028.
- Habicht, G., *et al.* (2007). "Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19232-7.
- Hengst, M. (2010). NMR-Untersuchungen am Alzheimerpeptid A β (1-40). Institut für Physik, Fachgruppe Biophysik. Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität. Bachelor.
- Henzler-Wildman, K. und D. Kern (2007). "Dynamic personalities of proteins." *Nature* **450**: 964-72.

- Hoffmann, A., *et al.* (2007). "Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 105-10.
- Hofweber, R., *et al.* (2005). "The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems." *FEBS J* **272**: 4691-702.
- Hooft, R. W. W., G. Vriend, C. Sander und E. E. Abola (1996). "Errors in protein structures." *Nature* **381**: 272.
- Horn, G., R. Hofweber, W. Kremer und H. R. Kalbitzer (2007). "Structure and function of bacterial cold shock proteins." *Cell Mol Life Sci* **64**: 1457-70.
- Hou, L. und M. G. Zagorski (2006). "NMR reveals anomalous copper(II) binding to the amyloid Abeta peptide of Alzheimer's disease." *J Am Chem Soc* **128**: 9260-1.
- Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegeshoff, P. L. Graumann und M. A. Marahiel (2006). "Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **188**: 240-8.
- IDT_Biophysics. "UV Spectrum of DNA " abgerufen am 16.06.2010, von <http://biophysics.idtdna.com>.
- Ikura, M., L. E. Kay und A. Bax (1990). "A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin." *Biochemistry* **29**: 4659-4667.
- Jacob, M., *et al.* (1999). "Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique." *Biochemistry* **38**: 2882-2891.
- Jain, N. K. und I. Roy (2009). "Effect of trehalose on protein structure." *Protein Sci* **18**: 24-36.
- Jiang, W., L. Fang und M. Inouye (1996). "The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation." *J. Bacteriol.* **178**: 4919-4925.
- Jiang, W., Y. Hou und M. Inouye (1997). "CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone." *J. Biol. Chem.* **272**: 196-202.
- Johnson, B. A. (2004). "Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules." *Methods Mol. Biol.* **278**: 313-52.
- Jonas, J. (2002). "High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins." *Biochim Biophys Acta* **1595**: 145-159.

- Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. Jiang und M. Inouye (1996). "Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 76-80.
- Jones, P. G., R. A. VanBogelen und F. C. Neidhardt (1987). "Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **169**: 2092-2095.
- Kajitani, K., *et al.* (2008). "Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution." *Proteins* **70**: 1635-9.
- Kandror, O., A. DeLeon und A. L. Goldberg (2002). "Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9727-32.
- Kay, L. E., M. Ikura, R. Tschudin und A. Bax (1990). "3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins." *Journal of Magnetic Resonance* **89**: 496-514.
- Krantz, B. A., L. B. Moran, A. Kentsis und T. R. Sosnick (2000). "D/H amide kinetic isotope effects reveal when hydrogen bonds form during protein folding." *Nat Struct Biol* **7**: 62-71.
- Krantz, B. A., *et al.* (2002). "Understanding protein hydrogen bond formation with kinetic H/D amide isotope effects." *Nat Struct Biol* **9**: 458-63.
- Kremer, W., *et al.* (2001). "Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." *Eur. J. Biochem.* **268**: 2527-2539.
- Kresheck, G. C., H. Schneider und H. A. Scheraga (1965). "The effect of D₂O on the thermal stability of proteins. Thermodynamic parameters for the transfer of model compounds from H₂O to D₂O." *J Phys Chem* **69**: 3132-44.
- Kuwano, M., *et al.* (2004). "The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance." *Mol Cancer Ther* **3**: 1485-92.
- Kwaku, T. D. und G. Wagner (1994). "Relaxation of ¹⁵N-¹H groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways." *J. Magn. Reson. A* **111**: 121-126.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lawaczeck, R. und K. G. Wagner (1974). "Stacking Specificity and Polarization. Comparative Synopsis of Affinity Data." *Biopolymers* **13**: 2003-2014.
- Levitt, M. H. (2008). Steady-State Nuclear Overhauser Effect. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 566-570.

- Li, H., A. D. Robertson und J. H. Jensen (2005). "Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values." *Proteins* **61**: 704-21.
- Lin, M. T. und M. F. Beal (2006). "Alzheimer's APP mangles mitochondria." *Nat Med* **12**: 1241-3.
- Lin, M. T. und M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* **443**: 787-95.
- Liu, Z., *et al.* (2001). "Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1." *Science* **294**: 1098-102.
- Lopez, M. M. und G. I. Makhatadze (2000). "Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates." *Biochim. Biophys. Acta* **1479**: 196-202.
- Lopez, M. M., K. Yutani und G. I. Makhatadze (2001). "Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template." *J. Biol. Chem.* **276**: 15511-15518.
- Lustbader, J. W., *et al.* (2004). "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease." *Science* **304**: 448-52.
- Magg, C. und F. X. Schmid (2004). "Rapid collapse precedes the fast two-state folding of the cold shock protein." *J Mol Biol* **335**: 1309-1323.
- Makhatadze, G. I., G. M. Clore und A. M. Gronenborn (1995). "Solvent isotope effect and protein stability." *Nat Struct Biol* **2**: 852-5.
- Makhatadze, G. I. und P. L. Privalov (1993). "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. I. The enthalpy of hydration." *J Mol Biol* **232**: 639-59.
- Manczak, M., *et al.* (2006). "Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression." *Hum Mol Genet* **15**: 1437-49.
- Max, K. E., M. Zeeb, R. Bienert, J. Balbach und U. Heinemann (2006). "T-rich DNA single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein *Bs*-CspB." *J Mol Biol* **360**: 702-14.
- Max, K. E., M. Zeeb, R. Bienert, J. Balbach und U. Heinemann (2007). "Common mode of DNA binding to cold shock domains. Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*." *Febs J* **274**: 1265-79.
- Max, K. E. A. (2006). Structural and Functional Studies on Bacterial Cold Shock Proteins: Nucleic-Acid Binding, the Architecture of Domain Swap, and Mechanisms

Contributing to their Stabilization. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie.
Berlin, Freie Universität. Dr. rer. nat.

- Maxwell, K. L., *et al.* (2005). "Protein folding: defining a "standard" set of experimental conditions and a preliminary kinetic data set of two-state proteins." *Protein Sci* **14**: 602-16.
- Merritt, E. A. (1999). "Expanding the model: anisotropic displacement parameters in protein structure refinement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**: 1109-17.
- Mitta, M., L. Fang und M. Inouye (1997). "Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction." *Mol Microbiol* **26**: 321-35.
- Morgan, H. P., *et al.* (2007). "Sequence specificity of single-stranded DNA-binding proteins: a novel DNA microarray approach." *Nucleic Acids Res* **35**: e75.
- Morgan, H. P., M. A. Wear, I. McNae, M. P. Gallagher und M. D. Walkinshaw (2009). "Crystallization and X-ray structure of cold-shock protein E from *Salmonella typhimurium*." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**: 1240-5.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, M. O. Johnson und P. C. van Zijl (1995). "Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation." *J. Magn. Reson. B* **108**: 94-98.
- Mueller, U., D. Perl, F. X. Schmid und U. Heinemann (2000). "Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein." *J Mol Biol* **297**: 975-88.
- Nelson, K. E., *et al.* (1999). "Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*." *Nature* **399**: 323-9.
- Nettels, D., I. V. Gopich, A. Hoffmann und B. Schuler (2007). "Ultrafast dynamics of protein collapse from single-molecule photon statistics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2655-60.
- Oberstrass, F. C., *et al.* (2005). "Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation." *Science* **309**: 2054-7.
- Onuchic, J. N., Z. Luthey-Schulten und P. G. Wolynes (1997). "Theory of protein folding: the energy landscape perspective." *Annu Rev Phys Chem* **48**: 545-600.
- Owczarzy, R. "Extinction (absorption) coefficients of nucleic acids calculated at 260 nm." abgerufen am 16.06.2010, von <http://www.owczarzy.net/extinct.htm>.

- Pace, C. N., G. R. Grimsley und J. M. Scholtz (2005). Denaturation of Proteins by Urea and Guanidine Hydrochloride. *Protein Folding Handbook*. J. Buchner and T. Kiefhaber. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **1**: 45-69.
- Painter, J. und E. A. Merritt (2006). "TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models." *J Appl. Cryst.* **39**: 109-111.
- Pastore, A., *et al.* (2007). "Unbiased cold denaturation: low- and high-temperature unfolding of yeast frataxin under physiological conditions." *J Am Chem Soc* **129**: 5374-5.
- Perl, D., U. Mueller, U. Heinemann und F. X. Schmid (2000). "Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein." *Nat Struct Biol* **7**: 380-3.
- Perl, D. und F. X. Schmid (2001). "Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein." *J Mol Biol* **313**: 343-57.
- Perl, D., *et al.* (1998). "Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins." *Nat Struct Biol* **5**: 229-35.
- Phadtare, S. (2004). "Recent developments in bacterial cold-shock response." *Curr Issues Mol Biol* **6**: 125-36.
- Phadtare, S., M. Inouye und K. Severinov (2002a). "The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells." *J Biol Chem* **277**: 7239-45.
- Phadtare, S., M. Inouye und K. Severinov (2004). "The mechanism of nucleic acid melting by a CspA family protein." *J Mol Biol* **337**: 147-55.
- Phadtare, S., S. Tyagi, M. Inouye und K. Severinov (2002b). "Three amino acids in *Escherichia coli* CspE surface-exposed aromatic patch are critical for nucleic acid melting activity leading to transcription antitermination and cold acclimation of cells." *J Biol Chem* **277**: 46706-11.
- Privalov, P. L. (1990). "Cold denaturation of proteins." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**: 281-305.
- Privalov, P. L. und G. I. Makhatadze (1993). "Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration." *J Mol Biol* **232**: 660-79.
- Reddy, P. H. (2006). "Amyloid precursor protein-mediated free radicals and oxidative damage: implications for the development and progression of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **96**: 1-13.

- Ren, J., J. E. Nettleship, S. Sainsbury, N. J. Saunders und R. J. Owens (2008). "Structure of the cold-shock domain protein from *Neisseria meningitidis* reveals a strand-exchanged dimer." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**: 247-51.
- Rohrberg, J., *et al.* (2008). "Monitoring fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 carrying an alanine repeat by tryptophan fluorescence and real-time NMR." *FEBS Lett* **582**: 1587-92.
- Roy, R., A. G. Kozlov, T. M. Lohman und T. Ha (2009). "SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation." *Nature* **461**: 1092-7.
- Saenger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure. New York, Springer-Verlag New York Inc.
- Sands, J. F., P. Regnier, H. S. Cummings, M. Grunberg-Manago und J. W. Hershey (1988). "The existence of two genes between *infB* and *rpsO* in the *Escherichia coli* genome: DNA sequencing and S1 nuclease mapping." *Nucleic Acids Res* **16**: 10803-16.
- Sato, S. und D. P. Raleigh (2007). "Kinetic Isotope Effects Reveal the Presence of Significant Secondary Structure in the Transition State for the Folding of the N-terminal Domain of L9." *J. Mol. Biol.*: doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.084.
- Schägger, H. und G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379.
- Schindelin, H., M. A. Marahiel und U. Heinemann (1993). "Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein." *Nature* **364**: 164-168.
- Schindler, T., M. Herrler, M. A. Marahiel und F. X. Schmid (1995). "Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*." *Nat. Struct. Biol.* **2**: 663-673.
- Schindler, T. und F. X. Schmid (1996). "Thermodynamic properties of an extremely rapid protein folding reaction." *Biochemistry* **35**: 16833-42.
- Schnuchel, A., *et al.* (1993). "Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*." *Nature* **364**: 169-171.
- Schröder, K., P. Zuber, G. Willimsky, B. Wagner und M. A. Marahiel (1993). "Mapping of the *Bacillus subtilis* *cspB* gene and cloning of its homologs in thermophilic, mesophilic and psychrotrophic bacilli." *Gene* **136**: 277-80.

- Schuler, B., E. A. Lipman und W. A. Eaton (2002). "Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy." *Nature* **419**: 743-7.
- Shan, B., S. McClendon, C. Rospigliosi, D. Eliezer und D. P. Raleigh (2010). "The cold denatured state of the C-terminal domain of protein L9 is compact and contains both native and non-native structure." *J Am Chem Soc* **132**: 4669-77.
- Shivaji, S. und J. S. Prakash (2010). "How do bacteria sense and respond to low temperature?" *Arch Microbiol* **192**: 85-95.
- Skalicky, J. J., D. K. Sukumaran, J. L. Mills und T. Szyperski (2000). "Toward structural biology in supercooled water." *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 3230-3231.
- Sommerville, J. (1999). "Activities of cold-shock domain proteins in translation control." *Bioessays* **21**: 319-25.
- Sunde, M., *et al.* (1997). "Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction." *J Mol Biol* **273**: 729-39.
- Szyperski, T., J. L. Mills, D. Perl und J. Balbach (2006). "Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of delta ΔC_p of protein unfolding." *Eur. Biophys. J.* **35**: 363-366.
- Tataurov, A. V., Y. You und R. Owczarzy (2008). "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids." *Biophys Chem* **133**: 66-70.
- Theobald, D. L., R. M. Mitton-Fry und D. S. Wuttke (2003). "Nucleic acid recognition by OB-fold proteins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 115-33.
- van Holde, K. E., W. C. Johnson und P. S. Ho (1998). Base-stacking. Principles of Physical Biochemistry. New Jersey, Prentice-Hall.
- Van Horn, W. D., A. K. Simorellis und P. F. Flynn (2005). "Low-temperature studies of encapsulated proteins." *J Am Chem Soc* **127**: 13553-60.
- Weber, M. H. und M. A. Marahiel (2002). "Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**: 895-907.
- Whitten, S. T., A. J. Kurtz, M. S. Pometun, A. J. Wand und V. J. Hilser (2006). "Revealing the nature of the native state ensemble through cold denaturation." *Biochemistry* **45**: 10163-74.
- Wistow, G. (1990). "Cold shock and DNA binding." *Nature* **344**: 823-4.

- Wolynes, P. G., J. N. Onuchic und D. Thirumalai (1995). "Navigating the folding routes." *Science* **267**: 1619-20.
- Xia, B., H. Ke und M. Inouye (2001). "Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **40**: 179-88.
- Yamanaka, K., L. Fang und M. Inouye (1998). "The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation." *Mol Microbiol* **27**: 247-55.
- Yancey, P. H. (2005). "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses." *J Exp Biol* **208**: 2819-30.
- Zeeb, M. und J. Balbach (2005). "NMR spectroscopic characterization of millisecond protein folding by transverse relaxation dispersion measurements." *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 13207-13012.
- Zeeb, M., *et al.* (2006). "Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein *Bs*-CspB in solution." *Nucleic Acids Res.* **34**: 4561-4571.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Kristallstrukturen von Kälteschockprotein-ssDNA-Komplexen.....	6
Abb. 1.2	Modelle der Proteinfaltung und Dynamik.....	8
Abb. 1.3	Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von der Temperatur für <i>Bc</i> Csp und <i>Bs</i> CspB.....	13
Abb. 1.4	Anteil des entfalteten <i>Bc</i> -Csp R3E L66E (f_U).....	14
Abb. 2.1	Präparation und Analyse des <i>Bs</i> -CspB·rU ₆ -Komplexes.....	23
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Proteinkristallisationsanordnung nach der Methode der Verdampfung des sitzenden Tropfens.....	34
Abb. 2.3	Schematische Darstellung des Bragg'schen Gesetzes.....	36
Abb. 3.1	Harnstoffübergang von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0.....	46
Abb. 3.2	Harnstoffübergang von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 15% D ₂ O.....	47
Abb. 3.3	¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium- Cacodylat, pH 7,0 15% D ₂ O bei 15°C. (a) in Abwesenheit und (b) in Anwesenheit von 5,6 M Harnstoff.....	48
Abb. 3.4	Heteronuklearer NOE-Effekt von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 5,6 M Harnstoff, 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 15% D ₂ O bei 15°C.....	49
Abb. 3.5	¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium- Cacodylat, pH 7,0 15% D ₂ O bei 15°C.....	50
Abb. 3.6	¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium- Cacodylat, 5,6 M Harnstoff, pH 7,0 15% D ₂ O bei 15°C.....	51
Abb. 4.1	Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für den <i>Bs</i> -CspB·rU ₇ - Komplex.....	55
Abb. 4.2	Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der <i>Bs</i> - CspB-Oligonukleotid-Komplexe.....	57
Abb. 4.3	Isothermale Titrationskalorimetrie von <i>Bs</i> -CspB titriert mit rU ₇ (a), dU ₇ (b) und dT ₇ (c+d)..	59
Abb. 4.4	2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum vom freien (schwarz) und rU ₆ gebundenen (rot) <i>Bs</i> -CspB in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,5, 10% D ₂ O bei 20°C.....	61
Abb. 4.5	2D ¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektrum vom freien (schwarz) und rC7 gebundenen (rot) <i>Bs</i> -CspB in 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7,5, 10% D ₂ O bei 20°C.....	61
Abb. 5.1	Darstellung der anisotropen Auslenkungsparameter für den <i>Bs</i> -CspB·rC7 Komplex.....	70
Abb. 5.2	Kristallstruktur von <i>Bs</i> -CspB in Komplex mit rU ₆	72
Abb. 5.3	Kristallstruktur von <i>Bs</i> -CspB in Komplex mit rC7.....	72
Abb. 5.4	Übereinanderlagerung beider Proteinketten aus der asymmetrischen Einheit des <i>Bs</i> -CspB·rC7 Komplexes.....	73
Abb. 5.5	Orthoskopische Darstellung der ssRNA-Liganden rU ₆ (a) und rC7 (b) umgeben von ihrer Elektronendichte.....	74
Abb. 5.6	Elektrostatisches Oberflächenpotential des Proteins im <i>Bs</i> -CspB·rU ₆ (a) und <i>Bs</i> -CspB·rC7 Komplex (b) am Ort der Ligandenbindung.....	75
Abb. 5.7	Hydrophobe und polare Interaktionen zwischen <i>Bs</i> -CspB und dem Oligonukleotid rU ₆ (a) bzw. rC7 (b).....	76
Abb. 5.8	Interaktion der ssRNA mit <i>Bs</i> -CspB detektiert mittels NMR- Titrationsexperimenten (¹ H- ¹⁵ N HSQC-Spektren).....	80

Abb. 5.9 Schematische Darstellung der <i>Bs</i> -CspB-ssRNA-Interaktionen im Kristall und in Lösung.....	81
Abb. 5.10 Interaktion von Kopfgruppen der Nukleobase U4 mit Proteingruppen in der Bindetasche 6 des Komplexes <i>Bs</i> -CspB·rC7.....	83
Abb. 5.11 Modell des Auflösens der Stamm-Schleifen-Struktur durch <i>E. coli</i> CspE. ..	87
Abbildung 1 Echt-Zeit-NMR-Analyse der Fibrillenbildung von W(22)-N-(+7)Ala. ...	91
Abbildung 2 Bindung von A β (1-40) an die Antikörperdomäne B10.....	93
Abbildung 3 Bindung von A β (1-40) an Cyclophilin F.	96

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Zusammensetzung des Nährbodens.....	16
Tab. 2-2 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	17
Tab. 2-3 Primer für die PCR.....	18
Tab. 2-4 Lösungen für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow.....	19
Tab. 2-5 Zusammensetzung des Vollmediums.....	20
Tab. 2-6 Zusammensetzung des Minimalmediums.....	21
Tab. 3-1 Thermodynamische Parameter von <i>Bc</i> -Csp R3E L66E in 20 mM Natrium- Cacodylat pH 7,0 bei 15°C in Ab- und Anwesenheit von 15% D ₂ O.....	47
Tab. 3-2 Thermodynamische Parameter von <i>Bs</i> -CspB in 20 mM Natrium-Cacodylat pH 7,0 bei 15°C in Ab- und Anwesenheit von 10% D ₂ O.....	47
Tab. 4-1 Dissoziationskonstanten von <i>Bs</i> -CspB·ssRNA-Komplexen, bestimmt mittels Tryptophan-Fluoreszenz-Titrations.....	56
Tab. 4-2 Gleichgewichtsdissoziationskonstante sowie Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von <i>Bs</i> -CspB-Oligonukleotid-Komplexen, bestimmt mittels Fluoreszenz-Titrations- und Fluoreszenz- <i>stopped-flow</i> - Messungen.....	58
Tab. 4-3 Dissoziationskonstanten und thermodynamische Parameter von <i>Bs</i> -CspB- Oligonukleotid-Komplexen, bestimmt mittels isothermaler Titrationskalorimetrie.....	60
Tab. 5-1 Kristallisierung der <i>Bs</i> -CspB·ssRNA-Komplexe mit Abbildungen der Kristalle.....	68
Tab. 5-2 Parameter zur Aufnahme der Röntgenstreudaten der Komplexe <i>Bs</i> -CspB·rU ₆ und <i>Bs</i> -CspB·rC7.....	69
Tab. 5-3 Parameter zur Strukturverfeinerung der Komplexe <i>Bs</i> -CspB·rU ₆ und <i>Bs</i> - CspB·rC7.....	69
Tab. 5-4 Parameter nach der Evaluierung der Komplexe <i>Bs</i> -CspB·rU ₆ und <i>Bs</i> - CspB·rC7.....	70

Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1.1 Freie Enthalpie der Entfaltung in Abhängigkeit von der Temperatur...	11
Gleichung 2.1 Lambert-Beersches Gesetz.....	24
Gleichung 2.2 K_D Gleichgewichtsdissoziationskonstante.....	25
Gleichung 2.3 Q Fluoreszenzlösung.	25
Gleichung 2.4 Fluoreszenzlösung in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration.	26
Gleichung 2.5 Reaktionsgeschwindigkeit für die gegebene Gleichgewichtsreaktion..	26
Gleichung 2.6 Reaktionsgeschwindigkeit bei $[L]_0 \gg [P]_0$	26
Gleichung 2.7 Änderung der Konzentration des freien Proteins während der Assoziationsreaktion.	27
Gleichung 2.8 ΔG_U Freie Enthalpie der Entfaltung im Zweizustandsmodell.....	28
Gleichung 2.9 Lineare Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von der Denaturierungsmittelkonzentration.....	28
Gleichung 2.10 Gleichung zur Anpassung von Entfaltungsübergängen.	28
Gleichung 2.11 Berechnung der Harnstoffkonzentration aus dem Brechungsindex.	29
Gleichung 2.12 Anpassung der Daten aus der isothermalen Titrationskalorimetrie.	29
Gleichung 2.13 Freie Enthalpie und Gleichgewichtsdissoziationskonstante.	29
Gleichung 2.14 Freie Enthalpie nach Gibbs..	30
Gleichung 2.15 Mittlere gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung.	31
Gleichung 2.16 NOE-Effekt.	33
Gleichung 2.17 Bragg'sches Gesetz.....	36
Gleichung 2.18 N Anzahl der detektierbaren Reflexe.	37
Gleichung 2.19 \vec{F}_{hkl} Strukturfaktor mit den Millerschen Indices hkl.	37
Gleichung 2.20 \vec{F}_{hkl} Strukturfaktor als Fourier-Synthese aus den atomaren Streuzentren.	38
Gleichung 2.21 $\left \vec{F}_{hkl} \right $ Strukturfaktoramplitude.	38
Gleichung 2.22 R_{meas} R-Faktor zum Vergleich von symmetrieverwandten Reflexen. ..	39
Gleichung 2.23 Patterson Funktion.....	40
Gleichung 2.24 Bewertungsfunktion.	40
Gleichung 2.25 $\rho(x, y, z)$ Elektronendichte an der Position x, y, z	41
Gleichung 2.26 Differenzelektronendichtekarten zur Darstellung von Unterschieden der experimentellen Strukturfaktoramplituden und denen aus dem molekularen Modell berechneten.....	42
Gleichung 2.27 Berechnung der Strukturfaktoren unter Berücksichtigung isotroper Bewegung des Streuzentrums.	43
Gleichung 2.28 Kristallographischer R-Faktor.....	43

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Bs</i> -CspB	Kälteschockprotein B aus <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bc</i> -Csp	Kälteschockprotein aus <i>Bacillus caldolyticus</i>
<i>Bc</i> -Csp R3E L66E	<i>Bc</i> -Csp mit den Mutationen R3E und L66E
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCP4	Collaborative Computational Project Number 4
CIP	kälte-induzierte Proteine
CSD	Kälteschockdomäne
CSP	Kälteschockproteine im allgemeinen
Csp	spezielles Kälteschockproteine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT ₆ , dT ₇	Hexadesoxythymidin, Heptadesoxythymidin,
ΔG_U	freie Enthalpie der Entfaltung
$\Delta\Delta G_A$	Änderung der freien Enthalpie der Bindung
ΔH	Reaktionsenthalpie
ΔS	Reaktionsentropie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactoside
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
k_{on}	Assoziationsratenkonstante
k_{off}	Dissoziationsratenkonstante
mRNA	<i>messenger</i> RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RBD	RNA bindende Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
PTB	<i>polypyrimidine tract binding protein 1</i>
rU ₆ , rU ₇	Hexauridin, Heptauridin
SDS	Natriumlaurylsulfat
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAP	<i>RNA-binding attenuation protein</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.-%	Volumenprozent
5'-UTR	5'-nichttranslatierte Region

Zuordnungen

Aminosäure	H ^N (ppm)	N (ppm)	H ^α (ppm)	C ^α (ppm)	C ^β (ppm)
M1					
Q2					
E3					
G4	8,71	108,19	3,84 3,84	45,62	108,19
K5	8,25	118,78	4,30	54,09	36,48
V6	8,86	124,16		65,16	31,78
K7	9,33				
W8					
F9					
N10					
N11					
E12					
K13					
G14					
Y15					
G16	7,80	105,34			
F17	7,58	114,75			
I18	9,37	122,78			
E19	9,21	126,37			
V20	9,22	125,19	4,41	60,37	34,97
E21	8,68	126,76	4,05	57,96	29,15
G22	9,03	115,36	4,00 3,71	45,82	
G23	7,89	107,36	3,86 3,60	44,36	
S24	8,12	116,71	4,41	58,61	64,29
D25	8,37	120,91	4,99	54,72	41,48
V26	9,30	121,98		61,40	35,10
F27					
V28					
H29					
F30					
T31					
A32	7,98	122,66	4,35	52,73	20,66
I33	7,33	120,34	4,24	63,09	38,19
Q34	8,88	127,22	4,21	55,02	30,32
G35	8,43	109,60	4,29 3,71	44,36	
E36	8,41	118,97	4,29	56,02	31,11
G37	8,37	109,08	3,88 3,70	44,36	
F38	8,27	120,55	4,29	56,22	38,99
K39					
T40					
L41					
E42	8,01	117,99	4,49	53,93	32,41
E43	8,69	121,83	4,29	58,61	29,62
G44	8,97	113,98		45,06	
Q45	7,67	120,02	4,05	56,52	30,02
E46	8,90	126,39	4,69	57,01	29,82
V47	8,51	115,55		36,69	58,61
S48	8,68	115,93	5,56	56,72	65,78
F49					
E50					
I51					
V52					
Q53					
G54					
N55					
R56					
G57					
P58				63,39	32,11
Q59	8,47	120,66	4,17	55,52	29,62
A60	8,23	125,49	4,12	52,53	19,16
A61	8,22	122,98	4,15	52,43	19,26
N62	8,30	117,92	4,55	53,13	38,79
V63	7,97	121,00	3,97	62,39	32,91
V64	8,25	125,73	3,95	62,39	32,81
K65	8,39	127,19	4,22	56,22	33,21
E66	8,02	128,45	3,98	58,11	31,12

Zuordnung von *Bc*-Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,0 bei 15°C.

Aminosäure	H ^N (ppm)	N (ppm)	H ^α (ppm)	C ^α (ppm)	C ^β (ppm)
M1	8,45	128,58	4,45	54,53	33,41
Q2	8,61	121,96	4,27	56,30	29,65
E3	8,53	122,74	4,18	57,07	30,65
G4	8,45	110,03	3,87	45,55	
K5	8,12	120,85	4,25	56,53	33,72
V6	8,16	121,48	3,93	62,52	33,34
K7	8,35	125,72	4,18	56,27	28,52
W8	8,13	122,88	4,56	56,99	30,42
F9	8,19	122,25	4,45	57,60	40,40
N10	8,35	120,57	4,46	53,46	39,10
N11	8,37	119,72	4,56	53,53	39,10
E12	8,38	120,99	4,12	57,37	30,42
K13	8,23	121,11	4,12	56,91	33,26
G14	8,16	109,12	3,747 3,812	45,32	
Y15	8,07	119,76	4,45	58,31	39,35
G16	8,31	110,44	3,704 3,769	45,35	
F17	7,99	120,13	4,54	58,01	40,22
I18	8,14	123,73	4,04	60,92	39,45
E19	8,45	125,88	4,20	56,63	30,71
V20	8,26	121,70	4,04	62,38	33,47
E21	8,56	125,30	4,20	57,01	30,56
G22	8,52	110,99	3,90	45,66	
G23	8,26	108,67	3,94	45,58	
S24	8,26	115,28	4,41	58,70	64,45
D25	8,47	122,55	4,54	54,71	41,44
V26	7,90	119,22	3,95	62,61	33,09
F27	8,22	123,59	4,54	57,78	39,91
V28	8,01	122,70	3,90	62,38	33,24
H29	8,39	123,11	4,51	55,78	30,33
F30	8,36	122,94	4,59	58,08	40,22
T31	8,22	117,29	4,19	61,94	70,30
A32	8,26	127,00	4,22	52,74	19,49
I33	8,18	120,96	4,01	61,38	38,99
Q34	8,48	124,96	4,24	56,24	29,79
G35	8,39	110,59	3,90	45,43	
E36	8,33	120,55	4,19	56,93	30,79
G37	8,42	109,64	3,79	45,43	
F38	8,07	120,15	4,51	58,08	40,06
K39	8,32	123,99	4,31	56,32	33,93
T40	8,28	116,49	4,22	62,12	70,30
L41	8,38	124,71	4,28	55,55	42,75
E42	8,48	122,12	4,19	56,86	30,56
E43	8,45	122,26	4,18	57,16	30,71
G44	8,49	110,24	3,89	45,58	
Q45	8,16	119,54	4,27	56,01	30,10
E46	8,58	122,54	4,20	56,93	30,56
V47	8,21	121,48	4,02	62,38	33,32
S48	8,29	119,37	4,38	58,08	64,29
F49	8,31	122,86	4,56	58,08	40,06
E50	8,32	121,96	4,16	56,70	30,76
I51	8,22	122,94	4,05	61,46	38,76
V52	8,27	125,29	4,00	62,68	33,01
Q53	8,52	124,65	4,24	56,24	29,79
G54	8,38	109,96	3,87	45,51	
N55	8,37	118,80	4,64	53,48	39,22
R56	8,42	121,64	4,31	56,40	31,25
G57	8,28	109,78	3,975 4,048	44,89	
P58				63,45	32,47
Q59	8,52	120,86	4,22	56,01	29,94
A60	8,34	125,72	4,18	52,74	19,49
A61	8,29	123,27	4,20	52,74	19,49
N62	8,40	118,24	4,62	53,36	39,03
V63	8,04	120,85	4,04	62,55	33,20
V64	8,28	125,35	4,00	62,64	33,11
K65	8,44	127,04	4,28	56,45	33,55
E66	8,11	128,57	4,03	58,40	31,43

Zuordnung von *Bc*-Csp R3E L66E in 20 mM Natrium-Cacodylat, 5,6 M Harnstoff, pH 7,0 bei 15°C.

Pulsprogramme

¹H-¹⁵N FHSQC

```
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method
;with decoupling during acquisition
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson & P.C.M. van
Zijl,
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"

"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u-p21-108u"

"TAU=d26-p16-d16-4u"

"CEN_HN2=(p22*2+6u-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"

;:"I3=(t1/2)"

1 ze
d11 p116:f3
2 d1 do:f3
3 m
3 d11
4 d12 p11:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU p13:f3
(CEN_HN2 p2 ph0) (p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21 ph0):f3
TAU
4u
p16:gp1
d16 p12:f2
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
(p21 ph4):f3
d0
(CEN_HC2 p2 ph6) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp2

d16
(p1 ph2)
DELTA1
p16:gp3
d16 p118:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp3
d16
4u BLKGRAD
DELTA2
(p21 ph0):f3
4u
100u p116:f3
4u
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 mc #0 to 2 F1PH(ip4, id0)
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 0 0 2 2 2 2
ph6=0 0 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - 1H PL for p1 (high pow)
;p118: f1 channel - 1H PL for p28 (3-9-19)
;p12 : f2 channel - 13C PL for p3 (high pow)
;p13 : f3 channel - 15N PL for p21 (high pow)
;p116: f3 channel - 15N PL for pcpd3 (decoup.)
;p1 : f1 channel - 90 deg high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 deg high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 deg high power pulse
;p28 : f1 channel - 90 deg pulse (3-9-19)
;p16 : gradient pulse
;d16 : delay for gradient recovery
;pcpd3: f3 channel - 90 deg dec. pulse at p116
;cpdprg3: composite pulse dec. for ch.3 [garp]
;d26 : ca. 1/(2*J(N,HN)) [2.5m]
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
; d19 = 90u for 600 MHz
;d1 : relaxation delay
;ND0 = 2
;NS = N*2
;DS >= 8
;phc0(F1) = 90 deg, phc1(F1) = -180 deg
;gradient ration : 50 : 80 : 30
;use sine.100
```


trHNCA

```

:TROSY-HNCA
;avance-version

;SOWNER=nmsu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

;GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;p14/sp3 G3.256
;p13/sp2 rect100
;p14/sp5 G3.256 -117ppm offset
;p15/sp13 rect100
;p13/sp8 rect100

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=90u"

"d0=4u"
"d10=4u"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-
d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-4u+3u+p22"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"
"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-
p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"
"TAU1=p14"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

"spoffs2=0"
"spoffs3=0"
"spoffs5=17660"
"spoffs8=0"
"spoffs13=0"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 p11:f1 p12:f2 p13:f3
50u UNBLKGRAD

(p11 ph3)
4u
20u p11:f1
4u
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
DELTA1
p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
3u
TAU1
d3 p1:f1
(p21 ph1):f3
4u

(p13:sp2 ph8):f2
d0
(p2 ph0):f1
3u
(p14:sp5 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
d0
(p15:sp13 ph11):f2
DELTA
(p2 ph2):f1
3u
(p14:sp5 ph12):f2
4u
(p13:sp8 ph13):f2
4u

(p21 ph6):f3
d30
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2
3u
(p22 ph9):f3
3u
TAU1
d29
d10
(p14:sp5 ph12):f2
d10
d28
p16:gp3*EA
d16 p11:f1
(p11 ph0):f1
4u
20u p11:f1

4u
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp4
d16
(p1 ph2)
DELTA1
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp5
d17 p18:f1
DELTA2
DELTA3
(p22 ph0):f3
DELTA3
p28*0.231 ph0
d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
d19*2
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d17
(p21 ph5):f3 ;; ph7=0 . invert
for second FID
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
FIPH(rd10 & rd30 & ip8, id0)
F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10
& dd30 & ip6*2 & ip31*2)
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph12=0
ph13=0
ph31=0 2 2 0

```

trHNCACB

```

:TROSY-HNCACB
;avance-version

;SOWNER=nmsru
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/4"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

;GPZ=50-80-(-80)-(-30)-(-65)
;p14/sp3 G3.256
;p14/sp5 G3.256 131ppm offset

"d3=12.4m"
"d11=30m"
"d16=100u"
"d17=200u"
"d19=90u"

"d0=10u"
"d10=4u"
"d23=(3.5m-p14)*0.5"
"d26=2.65m"
"d30=d3*0.5"
"d29=d30-d10"
"d28=d29-p16-
d16+p21*1.273+DELTA1-p11-28u"
"TAU=d26-p16-d16-4u"
"DELTA=d0*2-10u+3u+p22"
"DELTA1=4u"
"DELTA2=d26-p16-d17-4u"
"DELTA3=0.5*(p16+d17+8u-
p28*4.770-d19*10-p22-DELTA1)"
"DELTA4=DELTA2-p28*4.77-d19*10"
"TAU1=p14"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN2=(p14-p22)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

"spoffs3=0"
"spoffs5=19770"

"in30=in10" ;; nd0 = 4

aqseq 321

1 ze
d11
2 d11
d1 p11:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p11 ph3)
4u
20u p11:f1
4u
(p1 ph0)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU

p16:gp1
d16
(p1 ph3)
4u
p16:gp2*EA
d16
(p21 ph7):f3
d3
(p14:sp3 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
3u
TAU1
d3 pl1:f1 pl2:f2
(p21 ph1):f3
4u
(p3 ph8):f2
4u
d23 pl0:f2
(p14:sp5 ph0):f2
4u
d23 pl2:f2
(p4 ph10):f2
4u
d23 pl0:f2
(p14:sp5 ph0):f2
4u
d23 pl2:f2
(p3 ph12):f2
4u
d0 pl0:f2
(p2 ph0):f1
3u
(p14:sp5 ph10):f2
3u
(p22 ph0):f3
d0
4u pl2:f2
(p4 ph10):f2
4u
DELTA pl0:f2
(p2 ph2):f1
3u
(p14:sp5 ph7):f2
10u
4u pl2:f2

(p3 ph11):f2
4u
d23 pl0:f2
(p14:sp5 ph10):f2
4u
d23 pl2:f2
(p4 ph0):f2
4u
d23 pl0:f2
(p14:sp5 ph0):f2
4u
d23 pl2:f2
(p3 ph13):f2
4u
(p21 ph6):f3
d30 pl0:f2
(p14:sp5 ph10):f2
d30
(p14:sp3 ph11):f2
3u
(p22 ph9):f3
3u
TAU1
d29

d10
(p14:sp5 ph12):f2
d10
d28
p16:gp3*EA
d16 pl11:f1
(p11 ph0):f1
4u
20u p11:f1
4u
(p1 ph4)
4u
p16:gp4
d16
TAU
(CEN_HN2 p2 ph1) (p22 ph0):f3
4u
TAU
p16:gp4
d16
(p1 ph2)
DELTA1
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp5
d17 pl18:f1
DELTA2
DELTA3
(p22 ph0):f3
DELTA3
p28*0.231 ph0
d19*2
p28*0.692 ph0
d19*2
p28*1.462 ph0
d19*2
p28*1.462 ph2
d19*2
p28*0.692 ph2
d19*2
p28*0.231 ph2
4u
DELTA4
p16:gp5
d17
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp3*0.1013
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip11 & ip13, id0)
F2EA(igrad EA & ip4*2 & ip5*2, id10
& dd30 & ip6*2 & ip31*2)
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1
ph5=0
ph6=1 3
ph7=0
ph8=0 0 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2
ph10=0
ph11=3 3 3 3 1 1 1 1
ph12=1 1 1 1 3 3 3 3
ph13=0
ph31=0      2      2      0

```

¹H-¹⁵N NOESY-HSQC

```

:NOESY-HSQC ("nsyhsqc_ks")
;avance-version
;3D 15N-edited NOESY
;phase sensitive using States-TPPI
method in both indirect dimensions
;optimized pulse sequence for exchanging
protons
;S. Talluri and G. Wagner
; J. Magn. Reson. B 112, 200-205
(1996)
;using composite pulses for C13-
decoupling

;Author: Kristian Schweimer, 04.12.97
;
;Setup:
;F1 = 15N
;F2, F3 = 1H

;$OWNER=nmsru
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p16=1m"
"p28=40u"

"d0=4u"
"d10=4u"
"d22=d10*2+p22*2+p4*2+12u+3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d16=100u"
"d19=90u"
"d26=2.5m"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-
d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-
d19*5+p22/2-8u"
"DELTA3=p3*4+6u+d0*2"

"TAU=d26-p16-d16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_CN1=(p22-p3*4-6u)/2"
"CEN_HC1=(p3*4+6u-p2)/2"

"l3=(td1/2)"
"l13=(td2/2)"

aqseq 312

1 ze
d11 pl16:f3
2 d1 do:f3
6m
3 3m
4 3m
5 3m
6 3m
d11 fq=cnst26(bf ppm):f2 ;; set
carbon transmitter in the aliphatic center
42 ppm
d12 pl3:f3
d12 pl2:f2
d12 pl1:f1
(p1 ph1)
d10 ; H1-Evolution
(p3 ph13 3u p4 ph14 3u p3 ph13):f2
3u
(p21 ph13 3u p22 ph14 3u p21 ph13):f3
d10
(p2 ph4) ; spin-echo for avoiding
phase evolution
d22
(p1 ph3)
50u UNBLKGRAD
d8 fq=cnst27(bf ppm):f2 ; mixing
time, set C13-transm. to 115 ppm
p16:gp1 ; scrambling residual
transv. magnetization
d16
(p1 ph4)
4u
p16:gp2
d16
TAU pl3:f3
(CEN_HN2 p2 ph4) (p22 ph5):f3
4u
TAU
p16:gp2
d16
(p1 ph6)
4u
p16:gp3
d16
(p21 ph7):f3
d0 ; N15-Evolution
(CEN_HC1 p2 ph8) (p3 ph13 3u p4
ph14 3u p3 ph13):f2
d0
(p22 ph13):f3
DELTA3
(p21 ph9):f3
4u
p16:gp3
d16
(p1 ph10)
DELTA1
p16:gp4

d16 pl18:f1
p28*0.231 ph11
d19*2
p28*0.692 ph11
d19*2
p28*1.462 ph11
DELTA
(p22 ph13):f3
DELTA
p28*1.462 ph12
d19*2
p28*0.692 ph12
d19*2
p28*0.231 ph12
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #0 if #0 zd ; ph7 = States-
TPPI phase for N15
3m ip7
3m ip5
lo to 3 times 2
3m id0 ; incrementing N15
Evolution
lo to 4 times l3
3m ip1 rd0 ; ph1 = States-TPPI
phase for H1, resetting N15-Evol.
lo to 5 times 2
3m id10 ; incrementing H1-
Evolution
lo to 6 times l13
exit

ph1=0
ph2=0 0 0 0 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0
ph5=0
ph6=1
ph7=0 2
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph9=0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2
ph10=2
ph11=1
ph12=3
ph13=0 0 0 0 2 2 2 2
ph14=1 1 1 1 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 2 0 2

;cnst26 : frequency ali 42 ppm
;cnst27 : frequency aro 115 ppm

```


¹H-¹⁵N-Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie

```

:heteronuclear nuclear overhauser effect
with gradient pulses
;with saturation to 1H

;$OWNER=nmrsmu
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"in0=infl/4"

"p2=p1*2" ; 180 to 1H
"p22=p21*2" ; 180 to 15N
"p5=1.333*p1" ; saturation pulse to 1H
"d5=1.333*p1"
"p17=10m" ; "spin lock pulse" to 1H
(10ms...)
"d11=30m" ; prescan-delay
"d12=20u"
"d13=3u" ; delay
"d14=d4-2*d0-p2" ; half J-coupling
(corrected by pulse-length)
"d24=2.5m" ; half J-coupling
"d4=2.5m" ; half J-coupling

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-
d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-
d19*5+p22/2-8u"
"DELTA4=d27-p16-d16-4u"
"DELTA3=d27-p16-d16-4u-p4*2-6u-
2*d0"

"TAU=d26-p16-4u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"

"d0=3u" ; increment time
"d26=2.5m"
"d27=2.75m"

1 ze
d11 pl16:f3
;; *****saturated experiment*****
2 d1 do:f3
3 d11
4 d12 pl1:f1
d12 pl3:f3
d12 pl2:f2
5 5m
(p5 ph0):f1 ; saturation pulse - satura-
tion time
lo to 5 times l3 ; approximately 600
6 50u UNBLKGRAD
20u pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1

4u
p16:gp1
d16
(p21 ph4):f3
4u
p16:gp2
d16
DELTA4
(CEN_HN2 p2 ph0):f1 (p22 ph6):f3
DELTA3
4u
p16:gp2
d16
d0
(CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p3 ph0 3u p4
ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp3
d16 pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
;; *****unsaturated experiment*****
7 d1 do:f3
8 d11
9 d12 pl1:f1
d12 pl3:f3
d12 pl2:f2
10 5m
d5 ; delay
lo to 10 times l3 ; approximately 600
11 50u UNBLKGRAD
20u pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1

4u
p16:gp1
d16
(p21 ph4):f3
4u
p16:gp2
d16
DELTA4
(CEN_HN2 p2 ph0):f1 (p22 ph6):f3
DELTA3
4u
p16:gp2
d16
d0
(CEN_HC2 p2 ph2):f1 (p3 ph0 3u p4
ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph0):f3
4u
p16:gp3
d16 pl11:f1
(p11 ph2):f1
20u pl1:f1
(p1 ph0):f1
DELTA1
p16:gp4
d16 pl18:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp4
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 pl16:f3
go=7 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 wr #1 if #1 id0 ip4 zd
lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=1 1 1 1 3 3 3 3
ph5=0
ph6=0 1 2 3
ph7=0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

Angaben zur Person

Name Rolf Sachs
Geburtsdatum, -ort 15.09.1980, Wolfen

Lebenslauf

10/2005 – 9/2010 Promotionsstudent
an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
in der Fachgruppe Biophysik

Thema: „Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an bakteriellen Kälteschockproteinen“

davon 10/2005-12/2007 DFG Stipendiat mit dem Projekt
'NMR-spektroskopische Charakterisierung der elementaren Proteinfaltung und der Nukleinsäurebindung des Kälteschockproteins CspB'

10/2000 – 10/2005 Studium der Biochemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie
Thema: „Untersuchungen zum Einfluss makromolekularer Substanzen auf die Polyalanin vermittelte Fibrillenbildung“

11/1999 – 6/2000 Wehrdienst

9/1990 – 7/1999 Gymnasium Wolfen/Stadt

Halle (Saale), den 07.11.2010

Rolf Sachs

Eigene Publikationen

Rohrberg, J., R. Sachs, G. Lodderstedt, M. Sackewitz, J. Balbach und E. Schwarz (2008). "Monitoring fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 carrying an alanine repeat by tryptophan fluorescence and real-time NMR." *FEBS Lett* **582**: 1587-92.

Lodderstedt, G., R. Sachs, J. Faust, F. Bordusa, U. Kuhn, R. Golbik, A. Kerth, E. Wahle, J. Balbach und E. Schwarz (2008). "Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate in vitro fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension." *Biochemistry* **47**: 2181-9.

Danksagung

Bei Prof. Dr. Jochen Balbach möchte ich mich für das Überlassen des interessanten Themas bedanken und die durch ihn eröffnete Möglichkeit meine Kenntnisse auch auf die Gebiete der NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie auszuweiten. Sein unterstützendes Wissen und die ständige Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Udo Heinemann vom Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin Berlin-Buch möchte ich dafür danken, in seinen Laboratorien Kristallisationsexperimente durchführen zu können sowie für das Lösen der Komplexstrukturen in Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank gilt hierbei Dr. Klaas E. A. Max für die Aufnahme von Röntgenstreubildern, die Indizierung und Integration von Reflexen sowie für die Einführung und Begleitung der Röntgenstrukturanalyse.

Prof. Dr. Elisabeth Schwarz und Dipl.-Biochemikerin Julia Rohrberg ermöglichten es im Rahmen einer Kooperation Fragestellungen zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 über meine Diplomarbeit hinaus weiter zu bearbeiten.

PD Marcus Fändrich und Dr. Isabel Morgado danke ich für die Bereitstellung der Proteine zur Untersuchung der Interaktion des Alzheimer β -Amyloid-Peptids (1-40) mit der Antikörperdomäne B10.

Dr. Cordelia Schiene-Fischer und Dipl.-Biologe Marten Villmow gilt Dank die gemeinsame Bearbeitung und Analyse der Bindung des β -Amyloid-Peptids (1-40) an die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Cyclophilin F.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biophysik möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Christian Löw, der mit seinen zahlreichen Hinweisen die Erfolge bei Experimenten beförderte. Dr. Ulrich Weininger begleitet mich bei den ersten NMR-spektroskopischen Messungen und führte mich in die Auswertung von Spektren ein. Verschiedene Forschungsprojekte wurden gemeinsam mit Dipl.-Physiker Michael Kovermann bearbeitet.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Dipl.-Kauffrau Dipl.-Philologin Axana Volkova. Sie lehrte mich mit den Erfolgsrisiken des wissenschaftlichen Alltags richtig umzugehen und sorgte dafür, dass ich meine Ziele nie aus den Augen verliere.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BA 1821/3), dem Land Sachsen-Anhalt (Exzellenznetzwerk Biowissenschaften „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“) und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung unterstützt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus der Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, die vorliegende Dissertation an keiner anderen Einrichtung eingereicht und ich mich noch nicht früher um einen Doktorgrad beworben zu haben.

Halle (Saale), den 07.11.2010

Rolf Sachs