



Die Struktur-Aufklärung von Proteinen am Beispiel des Kälteschock-Proteins in *Bacillus caldolyticus*

Stephanie Hackenberg, SS 15

Gliederung

1	Aufklärung der Primär-Struktur	1
2	Kristallographie zur Aufklärung von Sekundär- und Tertiär-Struktur	2
2.1	Einkristall-Zucht	2
2.2	Röntgen-Strukturanalyse	3
2.2.1	Prinzip	3
2.2.2	Auswertung	3
3	Struktur-Funktionsbeziehung	4

Einstieg: Im Laufe der Evolution entwickelten Organismen die verschiedensten Mechanismen, um sich an extreme Bedingungen, wie zum Beispiel Kälte, anzupassen. Im Visier der Forschung stehen dabei vor allem molekulare Mechanismen, wie etwa die Expression von Genen, die zur Synthese sogenannter cold shock proteins (csp) bei Bakterien führt. Besonders gut sind die Kälteschock-Proteine von *Bacillus subtilis* und *Bacillus caldolyticus* erforscht. Um zu klären, wie diese Proteine aufgebaut sein müssen, damit Kälte-Toleranz erreicht werden kann, ist eine Struktur-Analyse dieser Proteine notwendig.

1 Aufklärung der Primär-Struktur

Ganz allgemein ist die Primär-Struktur eines Proteins als die Sequenz der im Protein vorkommenden Aminosäuren definiert. Diese kann beispielsweise mithilfe der folgenden Methoden geklärt werden:

- DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert
- DNA-Sequenzierung mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger
- Aminosäure-Sequenzierung durch Edman-Abbau mit Phenylisothiocyanat

Die aufgeklärte Primär-Struktur bietet die Grundlage für weitere Untersuchungen hinsichtlich der räumlichen Protein-Struktur. Die Analyse der Primär-Struktur des Kälteschock-Proteins von *Bacillus caldolyticus* ergab, dass sich diese an nur zwölf Stellen von der Primär-Struktur des Kälteschock-Proteins in *Bacillus subtilis* unterscheidet.

2 Kristallographie zur Aufklärung von Sekundär- und Tertiär-Struktur

Die Sekundär-Struktur von Proteinen stellt die durch Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren hervorgerufene Struktur dar. In den meisten Fällen resultieren daraus α -Helix und β -Faltblatt.

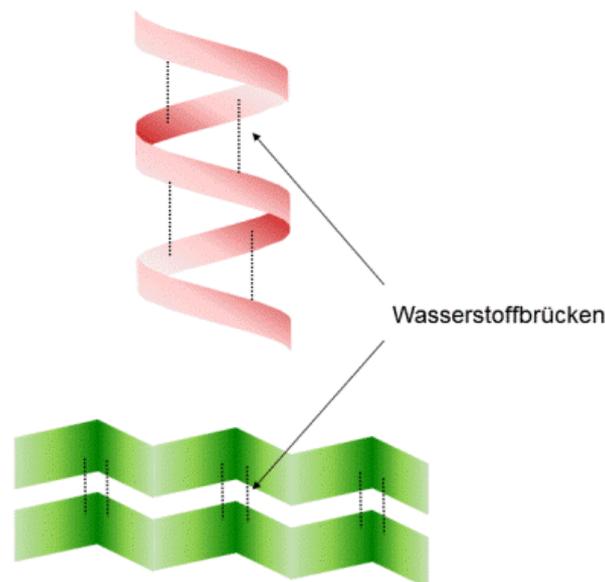


Abb. 1: Schematische Darstellung einer α -Helix-Struktur (oben) und einer β -Faltblatt-Struktur (unten)

Die Zusammensetzung mehrerer Elemente der Sekundär-Struktur zu einer Kette beschreibt inklusive der resultierenden Wechselwirkungen (Disulfid-Brücken, Wasserstoff-Brücken) die räumliche Struktur eines Proteins in Form der Tertiär-Struktur. Diese dreidimensionale Struktur ist für die biologische Funktion eines Proteins essentiell und damit ein individuelles Charakteristikum. Bei *Bacillus caldolyticus* wird beispielsweise durch die individuelle räumliche Struktur des Kälteschock-Proteins Kälte-Toleranz erreicht.

2.1 Einkristall-Zucht

Grundlagen für eine Röntgen-Strukturanalyse sind neben der bereits ermittelten Aminosäure-Sequenz zunächst eine Überexpression des Proteins und im Anschluss daran die Aufreinigung des Proteins. Diese erfolgt in der Regel mittels SDS- und IEF-Gelelektrophorese. Den limitierenden Faktor für die Durchführung der Kristallographie stellt (namensgebend) jedoch die Züchtung eines reinen Protein-Einkristalls dar. Nicht selten dauert es einige Monate, bis dies gelingt. Meist wird hierfür die Methode des „hanging drop“ gewählt.

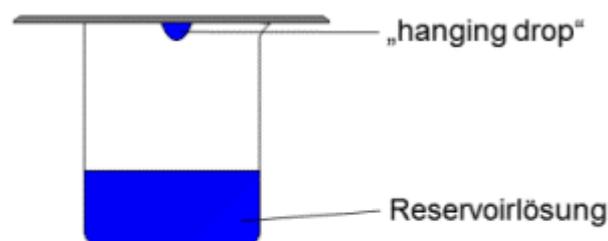


Abb. 2: Protein-Kristall-Züchtung über die Dampf-Phase mit der „hanging drop“-Methode

Der Probe-Tropfen wird auf ein Glas-Plättchen aufgetragen, womit das Gefäß, in welchem sich die Salzreservoir-Flüssigkeit befindet, letztlich verschlossen wird. Somit hängt der Tropfen nach unten über der Reservoir-Lösung, wodurch die Kontakt-Fläche zwischen Tropfen und Glas verkleinert wird. In dieser Position bleiben jedoch nur sehr kleine Tropfen mechanisch stabil, größere fallen aufgrund ihres Eigengewichts nach unten ab.

2.2 Röntgen-Strukturanalyse

2.2.1 Prinzip

Ist die Einkristall-Zucht geglückt, so wird der Protein-Kristall in ein sog. Goniometer eingespannt und mit gebündelten Röntgen-Strahlen aus einer Röntgen-Quelle beschossen. Während dieser Prozedur dreht sich der Kristall im Goniometer, sodass dieser von allen Seiten in unterschiedlichen Winkeln von den Röntgen-Strahlen durchdrungen wird, um letztlich eine möglichst realistische dreidimensionale Struktur hervorbringen zu können.

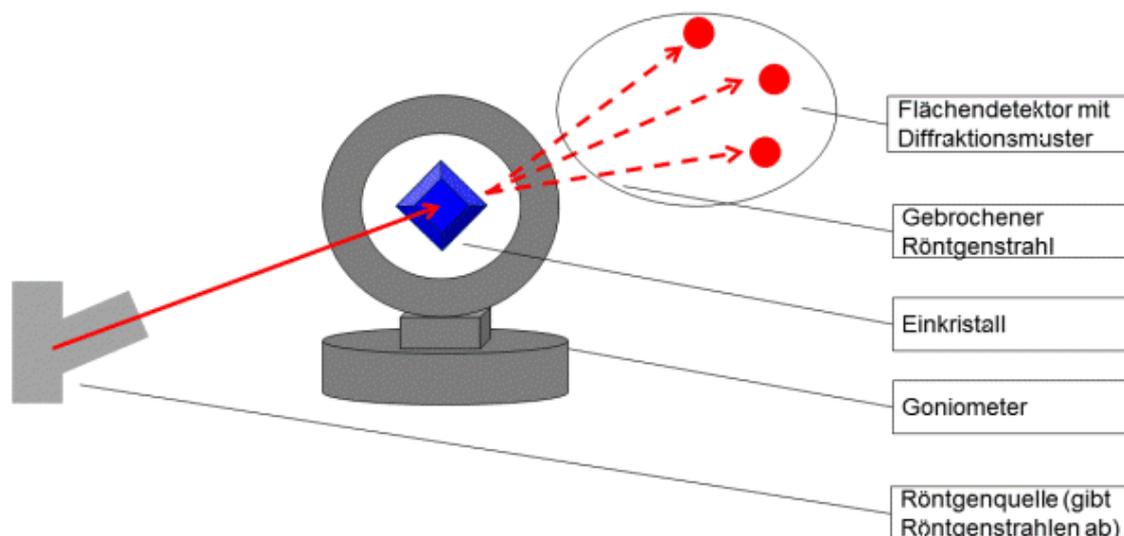


Abb. 3: Schematische Darstellung des Prinzips einer Röntgen-Strukturanalyse

Durch die Struktur des Kristalls und seiner Elektronendichte-Verteilung werden die Röntgen-Strahlen unterschiedlich gebeugt, wodurch sich auf einem Röntgen-Film für jeden Kristall ein charakteristisches Diffraktionsmuster ergibt.

2.2.2 Auswertung

Mithilfe von Computer-Programmen können diese „Roh-Daten“ nun visualisiert werden. Dabei wird ein Elektronendichte-Verteilungsnetz durch eine spezielle NMR-Technik (Fourier-Transformation) erstellt, in welche die bereits bekannte Primär-Struktur eingepasst wird. Daraus resultiert ein Abbild der dreidimensionalen Tertiär-Struktur.

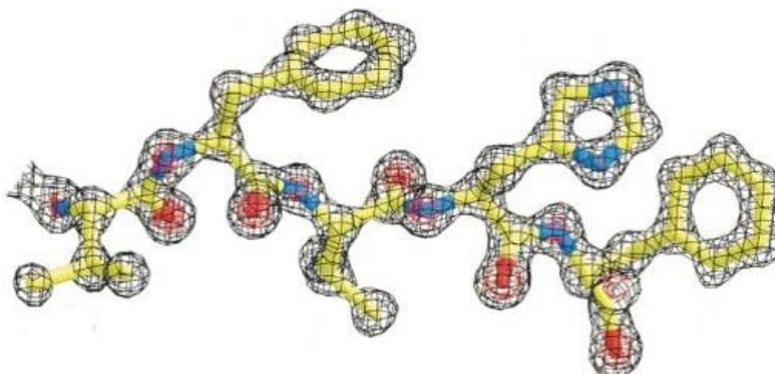


Abb. 4: Einpassen der Primär-Struktur in das erhaltene Elektronendichte-Verteilungsnetz [2]

Diese Struktur wird mithilfe des Programms PROCHECK nochmals auf logische Abstände zwischen den Aminosäure-Resten überprüft. Nach Einbezug von Wechselwirkungen (z. B. Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brücken) innerhalb des Moleküls, wird dieses ein letztes Mal optimiert.

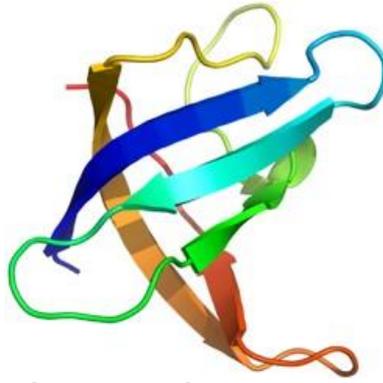


Abb. 5: Tertiär-Struktur von CspB in *Bacillus caldolyticus* [2]

Im Falle des Kälteschock-Proteins *CspB* von *Bacillus caldolyticus* handelte es sich allerdings nicht um eine *de novo* Struktur-Analyse. Vielmehr spricht man hier vom Prinzip des molekularen Ersatz. Dies bedeutet, dass die räumliche Protein-Struktur rückwärts analysiert wurde, indem neue Messdaten mit der bereits bekannten Struktur (*Csp* von *Bacillus subtilis*) verglichen wurden. Für eine solche „Rückwärtsanalyse“ müssen mindestens 25% der Aminosäure-Sequenzen identisch sein.

3 Struktur-Funktionsbeziehung

Im Rahmen dieser Studie konnte herausgefunden werden, dass die Reste der Aminosäuren hauptsächlich aromatischer Natur sind. Wenn die DNA durch die *cold shock proteins* „gebunden“ (nicht im Sinne der chemischen Bindung), wird diese isoliert und nimmt somit keinen Schaden durch kalte Temperaturen, wodurch die DNA-Expression, sowie die Protein-Biosynthese selbst unter Bedingungen extremer Kälte gewährleistet werden kann.

Zusammenfassung: fehlt.

Abschluss: Mithilfe bioanalytischer Verfahren gelingt es heute, komplexe Protein-Strukturen aufzuklären, sowie die räumliche Struktur mithilfe von Programmen sinngemäß zu visualisieren. Durch diese Technologien ist es möglich, Erkenntnisse über Struktur im Zusammenhang mit der Funktion zu gewinnen. Im Fall von *B. caldolyticus* ist festzuhalten, dass die Funktion „Kälte-Toleranz“ vor allem durch aromatische Reste der Aminosäuren erreicht werden kann, wodurch die DNA vor Kälte „isoliert“ wird.

Quellen:

1. Lottspeich F., Zorbas H. (1998). Bioanalytik, Heidelberg-Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
2. Mueller U. et al. (2000). Thermal stability and Atomic-resolution Crystal Structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. Journal of Molecular Biology. Volume 297. P.975-988.
3. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinkristallisation/54154>; 15.06.2016