

Protokoll Versuch B2

Kristallisation von Hühnereiweiß- Lysozym

Gruppe 8
Susanne Duncker und Friedrich Hahn

Einleitung und Fragestellung

Um die Struktur eines Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären, benötigt man Kristalle dieses Proteins, die man im Kristalllabor züchten muss. In diesem Versuch führten wir die Kristallisation des Hühnereiweißlysozys durch Dampfdiffusion mittels *Hanging drop*-Methode durch, wobei wir verschiedene Puffer und Fällungsmittelkonzentrationen testeten, um die optimalen Werte zu bestimmen.

Durchführung

Wir untersuchten zwei Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0 und 100 mM NaOAc, pH 4,5) und zwei Fällungsmittel (NaCl und MPD). Jeder Puffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Fällungsmittel kombiniert, um die optimalen Bedingungen für Kristallwachstum zu bestimmen. Je 700 µl Reservoirlösung (Puffer + Fällungsmittel) wurden dann nach dem in Tabelle 1 dargestellten Pipettierschema in eine 24-well-Platte gegeben.

	1	2	3	4	5	6
A	100 mM Tris 0,6 M NaCl	100 mM Tris 0,75 M NaCl	100 mM Tris 0,9 M NaCl	100 mM Tris 1,05 M NaCl	100 mM Tris 1,2 M NaCl	100 mM Tris 1,35 M NaCl
B	100 mM Tris 55 % MPD	100 mM Tris 60 % MPD	100 mM Tris 65 % MPD	100 mM Tris 70 % MPD	100 mM Tris 75 % MPD	100 mM Tris 80 % MPD
C	100 mM NaOAc 0,6 M NaCl	100 mM NaOAc 0,75 M NaCl	100 mM NaOAc 0,9 M NaCl	100 mM NaOAc 1,05 M NaCl	100 mM NaOAc 1,2 M NaCl	100 mM NaOAc 1,35 M NaCl
D	100 mM NaOAc 55 % MPD	100 mM NaOAc 60 % MPD	100 mM NaOAc 65 % MPD	100 mM NaOAc 70 % MPD	100 mM NaOAc 75 % MPD	100 mM NaOAc 80 % MPD

Tabelle 1: Pipettierschema; in der ersten Zeile ist der jeweilige Puffer, in der zweiten Zeile das Fällungsmittel genannt

Mit 200 µl jedes Puffers sowie 5 mg pulverisierten Lysozys wurden zwei Proteinlösungen mit jeweils 25 mg/ml hergestellt, die gründlich gemischt und danach abzentrifugiert wurden, um klare, kristallfreie Lösungen zu erhalten, von denen jeweils 2 µl zu 2 µl Reservoirlösung (es wurde darauf geachtet, auch jeweils die Lösungen, in denen derselbe Puffer verwendet wurde, zu vermischen) gegeben wurden. Diese je 4 µl wurden als *hanging drop* auf je ein Deckgläschen gegeben, mit denen die wells verschlossen wurden.

Die fertige Kristallisationsbox wurde bei 20 °C zwei Wochen im Klimaschrank inkubiert, wobei am zweiten sowie am letzten Tag die Kristallbildung mithilfe eines Mikroskops überprüft und fotografiert wurde.

Ergebnisse

Die am ersten sowie letzten Tag beobachteten Ergebnisse wurden in den im Anhang 1 befindlichen Tabellen 2 (erster Tag) und 3 (letzter Tag) dokumentiert, evtl. vorhandene Bilder sind dort angegeben.

Die erste auffällige Beobachtung, die wir machten, war, dass in Reihe A und C, also in den Reihen, in denen NaCl als Fällungsmittel verwendet worden war, überall Kristalle wuchsen, während in den Reihen B und besonders D Ausfälle zu verzeichnen waren – NaCl scheint also ein besseres Fällungsmittel zu sein als MPD. In Kombination mit Tris/HCl als Puffer ergibt NaCl viele kleine Kristalle (wells A1 – A6), die für Röntgenstrukturanalysen leider zu klein sind, mit dem Puffer NaOAc hingegen wachsen größere Kristalle. Die optimalsten Bedingungen für Kristallwachstum scheinen demnach 100 mM NaOAc als Puffer sowie 0,9 M NaCl als Fällungsmittel zu sein.

Die Kombination von NaOAc und MPD führte zu keinem richtigen Einzelkristall, das Protein fiel im Gegenteil zum Teil sogar aus. MPD mit Tris/HCl ergab nur bei Konzentrationen von

65 – 75 % MPD überhaupt Kristalle, die jedoch allesamt zu klein waren, um sie für Röntgenstrukturanalysen einsetzen zu können. Hierbei scheint jedoch die Konzentration von 70 % MPD das Optimum darzustellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination von 100 mM NaOAc und 0,9 M NaCl das Optimum für die Kristallisation von Hühnereiweißlysozym zu sein scheint.

Im Anhang 3 befinden sich die Antworten zu den im Skript gestellten Fragen.

Anhang 1: Beobachtungen beim Kristallwachstum

Beobachtungen erster Tag (25.11.2005)

Well	Beobachtung	vgl. Abb.
A1	Sehr viele sehr kleine Kristalle	A1-1
A2	Sehr viele sehr kleine Kristalle, unregelmäßiger als in A1	
A3	Sehr viele sehr kleine Kristalle, noch unregelmäßiger als A2	A3-1
A4	Sehr viele sehr kleine Kristalle, viel kleiner als bisher	A4-1
A5	Sehr viele sehr kleine Kristalle, chaotischer als in A4	
A6	Sehr viele sehr kleine Kristalle, chaotischer als in A4	
B1	<i>Keine Kristalle</i>	
B2	<i>Keine Kristalle</i>	
B3	<i>Keine Kristalle</i>	
B4	Wenige kleine, am Rand befindliche Kristalle, viele zusammengewachsen	
B5	Sehr wenige winzige Kristalle, nur sehr vereinzelt	
B6	<i>Keine Kristalle</i>	
C1	<i>Keine Kristalle</i>	
C2	Sehr wenige winzige Kristalle	
C3	Sehr wenige Kristalle	
C4	Einige große, schöne, regelmäßige Kristalle, wenige verwachsen	C4-1
C5	Einige große, schöne, regelmäßige Kristalle	C5-1
C6	Einige große Kristalle, viele Verwachsungen	C6-1
D1	<i>Keine Kristalle</i>	
D2	<i>Keine Kristalle</i>	
D3	<i>Keine Kristalle</i>	
D4	<i>Keine Kristalle</i>	
D5	<i>Keine Kristalle</i>	
D6	<i>Keine Kristalle</i>	

Tabelle 2: Kristallisationsbeobachtungen am ersten Tag

Beobachtungen letzter Tag (07.12.2005)

Well	Beobachtung	vgl. Abb.
A1	Sehr viele kleine Kristalle	
A2	Sehr viele kleine Kristalle	A2-2
A3	Sehr viele kleine Kristalle, Formen regelmäßiger als in A1	
A4	Sehr viele kleine Kristalle, viele verwachsen	
A5	Sehr viele kleine Kristalle	A5-2
A6	Extrem viele kleine Kristalle, einige verwachsen	A6-2
B1	<i>Keine Kristalle</i>	
B2	<i>Keine Kristalle</i>	
B3	Sehr wenige kleine Kristalle, nur am Rand	B3-2
B4	Wenige einzelne kleine Kristalle am Rand, Anhäufung in der Mitte	B4-2
B5	Wenige kleine, längliche Kristalle am Rand, in der Mitte Nadeln	B5a-2
B6	<i>Keine Kristalle</i>	
C1	Drei Kristalle, davon zwei verwachsen	C1-2
C2	Sehr wenige Kristalle	C2-2
C3	Sehr wenige, einzelne, große, schöne Kristalle	C3-2
C4	Wenige einzelne Kristalle, kleiner als in C3	

C5	Wenige Kristalle, noch kompakter als in C4, aber meist auch einzeln	
C6	Wenige Kristalle, die so lang wie breit sind, einige verwachsen	
D1	<i>Keine Kristalle</i>	
D2	<i>Keine Kristalle</i>	
D3	<i>Keine Kristalle</i>	
D4	Ein großer Kristall in der Mitte, aus vielen Einzelkristallen bestehend	D4-2
D5	Ein großer, unvollständig aussehender Kristall	D5-2
D6	<i>Keine Kristalle</i>	

Tabelle 3: Kristallisationsbeobachtungen am letzten Tag

Anhang 2: Kristallbilder

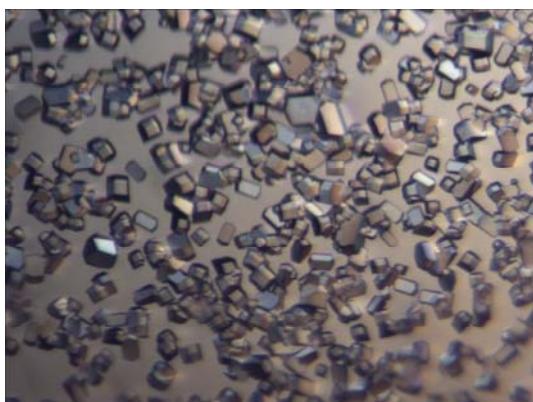


Abb. A1-1: Beobachtung Well A1, 1. Tag



Abb. A2-2: Beobachtung Well A2, letzter Tag

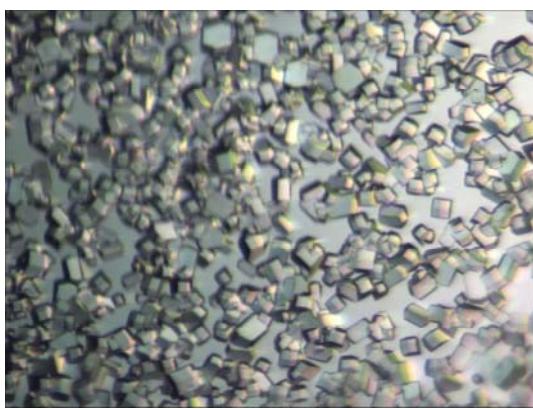


Abb. A3-1: Beobachtung Well A3, 1. Tag



Abb. A4-1: Beobachtung Well A4, 1. Tag

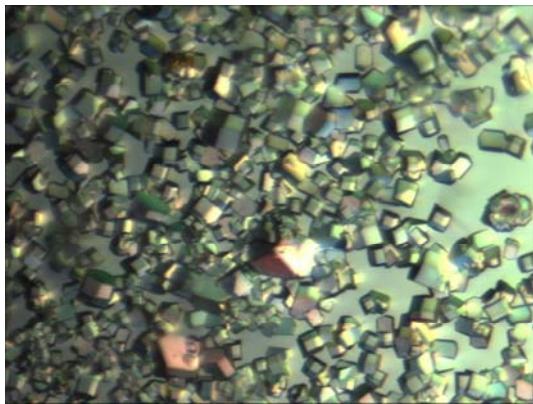


Abb. A5-2: Beobachtung Well A5, letzter Tag

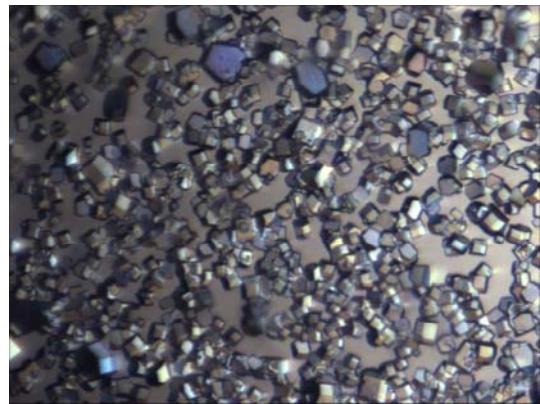


Abb. A6-2: Beobachtung Well A6, letzter Tag

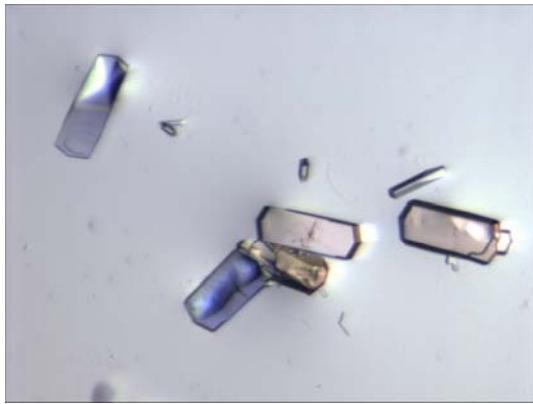


Abb. B3-2: Beobachtung Well B3, letzter Tag

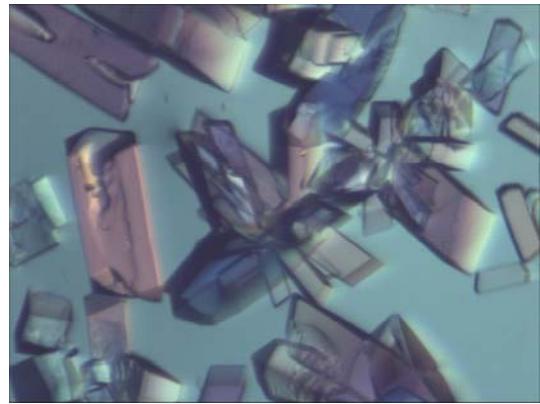


Abb. B4-2: Beobachtung Well B4, letzter Tag



Abb. B5a-2: Beobachtung Well B5, letzter Tag



Abb. C1-2: Beobachtung Well C1, letzter Tag



Abb. C2-2: Beobachtung Well C2, letzter Tag

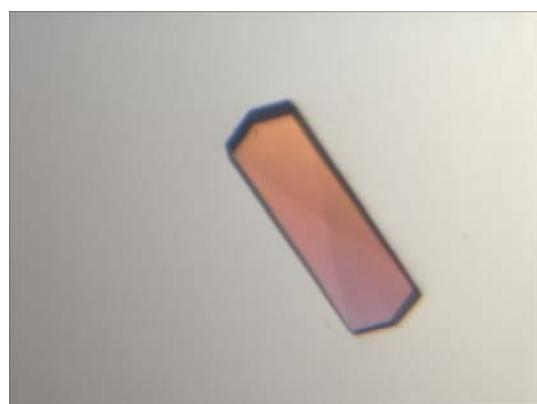


Abb. C3-2: Beobachtung Well C3, letzter Tag

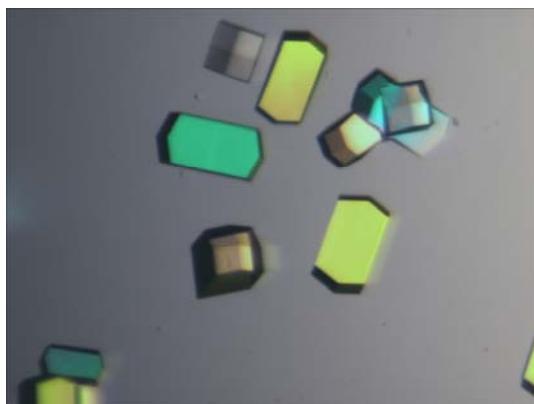


Abb. C4-1: Beobachtung Well C4, 1. Tag

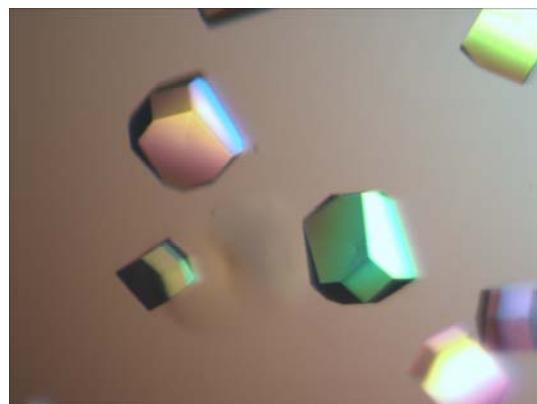


Abb. C5-1: Beobachtung Well C5, 1. Tag

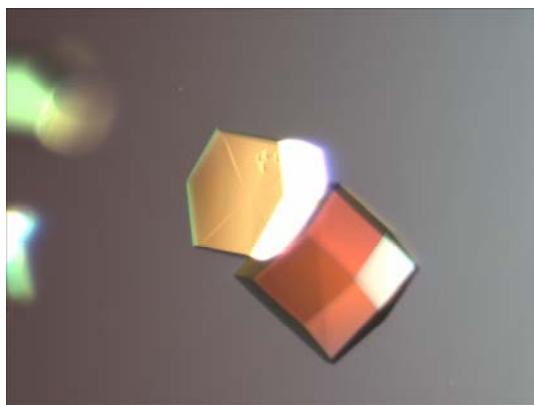


Abb. C6-1: Beobachtung Well C6, 1. Tag

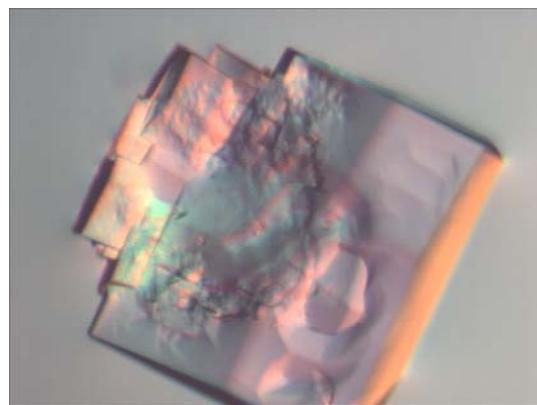


Abb. D4-2: Beobachtung Well D4, letzter Tag

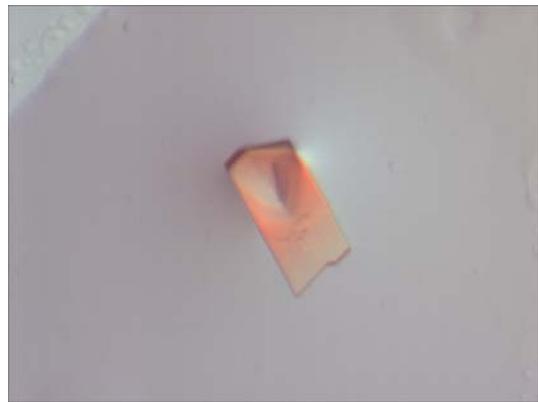


Abb. D5-2: Beobachtung Well D5, letzter Tag

Anhang 3: Beantwortung der im Skript gestellten Fragen

- 1) Eine bereits länger bekannte Methode der Proteinpräparation ist die sog. Ammoniumsulfat-Fällung. Beschreiben Sie die Methode und diskutieren Sie, warum als Salz ausgerechnet $(NH_4)_2SO_4$ und nicht beispielsweise $CaBr_2$ oder $Ba(SCN)_2$ verwendet wird.

Um Proteine auszufällen, kann man die Ionenstärke, den pH-Wert oder die Konzentration von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln verändern. Am häufigsten fällt man Proteine durch hohe Salzkonzentration, wobei meist Ammoniumsulfat verwendet wird, da es laut der Hofmeisterreihe am leichtesten löslich ist.

In Lösung befindliche Proteine sind von einer Solvathülle aus Wassermolekülen umgeben. Gibt man nun Salz hinzu, lösen sich die Ionen des Salzes und binden ebenfalls Wassermoleküle, die den Proteinen dann fehlen → Proteindomänen, die nur schwache Wechselwirkungen mit Wasser eingehen, sind nicht mehr gut löslich, interagieren miteinander und fallen aus. Proteine mit großen hydrophoben Domänen fallen folglich bei geringeren Salzkonzentrationen aus als Proteine mit hydrophilen Domänen.

$CaBr_2$ und $Ba(SCN)_2$ wären für die Proteinfällung ungeeignet, da die Ionen Ca^{2+} , Ba^{2+} und SCN^- Proteine denaturieren.

- 2) Sie haben einen Gridscreen angesetzt, mit dessen Hilfe Sie Proteinkristalle erzeugen wollen. Bei der Untersuchung der einzelnen Bedingungen stellen Sie fest, dass es in fast allen Tropfen zu Niederschlag gekommen ist. Sie haben aber glücklicherweise nicht ihre gesamte Proteinlösung verkristallisiert und können deshalb einen zweiten Versuch starten. Welche Parameter können Sie in welcher Weise verändern, um größere Aussicht auf Erfolg zu haben?

Folgende Parameter könnte man variieren:

- Puffer
- Fällungsmittel
- Fällungsmittelkonzentration
- pH-Wert
- Temperatur

- 3) Welche anderen, hier nicht beschriebenen Techniken der Proteinkristallisation kennen Sie?

Proteinkristallisation erfolgt über Dampfdiffusion. Hier gibt es zwei Methoden: Die von uns verwendete *hanging drop*-Methode sowie die *sitting drop*-Methode. Hierbei hängt der Tropfen Proteinlösung nicht, wie bei unserem Versuch, oben am Deckglas, sondern sitzt auf einem von der Reservoirlösung umgebenen Untergrund.

Des Weiteren gibt es noch die sog. Batch-Methode, bei der die Proteinlösung unter Öl gehalten wird – das Öl ist teilweise wasserdurchlässig und ermöglicht so Diffusion zwischen Protein- und Reservoirlösung.

Als letzte uns bekannte Methode ist die Mikrodialyse zu nennen, bei der die Proteinlösung durch eine Dialysemembran Kontakt zur Reservoirlösung hat.

- 4) Was können Sie aussagen über die Größe der Molekülkontakte im Kristall verglichen mit der Größe der Kontakte zwischen Untereinheiten in oligomeren Proteinen?

Proteinkristalle bestehen nur zu etwa 50 % aus Protein, der Rest ist Lösungsmittel. Die Proteine sind demnach nicht so nahe beieinander, wie sie es ohne Lösungsmittel wären, und haben demnach geringeren Kontakt zueinander.

5) *Wie könnte man Proteinkristalle stabilisieren?*

Strukturbedingt bestehen Proteinkristalle aus etwa 50 % Lösungsmittel, wodurch sie sehr instabil sind. Mit den derzeitigen Kristallisationsverfahren lässt sich dieser Wert wohl auch verbessern, d.h. die Stabilisierung der Kristalle muss über äußere Faktoren (siehe Frage 2) erreicht werden.

6) *Warum ist die Kristallisation von Membranproteinen häufig schwieriger als die von löslichen Proteinen?*

Membranproteine befinden sich in ihrer natürlichen Umgebung, einer Membran, in hydrophobem Äußeren. Um sie zu kristallisieren, muss man sie jedoch in einem Lösungsmittel lösen – hierzu benötigt man Detergenzien. Die Schicht, die die Detergenzien um die Proteine bilden, verhindert jedoch zum Teil Kontakte zwischen den Molekülen und erschwert dadurch die Kristallisation.

7) *Skizzieren sie den Katalysemechanismus von Lysozym.*

Lysozym ist eine die Zellwand von Bakterien angreifende Hydrolase, die die alternierenden β -(1-4)-glykosidischen Bindungen zwischen den beiden Grundbausteinen der Zellwand (N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetylmuraminsäure) hydrolysiert.