

1

Einleitung und Zielsetzung

Die Proteinkristallographie befaßt sich mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Makromolekülen biologischen Ursprungs. Zu diesen zählen nicht nur Proteine, sondern auch Nukleinsäuren, Viren etc., die in geeigneten Kristallen erhalten werden können [1],[2].

Soll ein Protein in seiner Funktionsweise verstanden werden, muß dessen dreidimensionale Struktur bekannt sein. Nur dann ist der Aufbau eines aktiven Zentrums oder einer Erkennungsstelle erfaßt, d.h. welche Aminosäuren in welcher Konstellation beteiligt sind. Aus diesem Grund ist die Proteinkristallographie zu einer der wichtigsten Methoden in Biochemie und Molekularbiologie geworden [3]. Die erzielten Details über die molekulare Architektur von Proteinen lassen sich mit keinem anderen Mittel gewinnen [4].

Um kristallographische Techniken benutzen zu können, muß das Molekül im kristallinen Zustand vorliegen, d.h. als Festkörper [5]. In der Praxis werden Proteinkristalle aus wässrigen Lösungen nach Zugabe eines Fällungsmittels z.B. in Form eines Elektrolyten gewonnen. In den Kristallisationsansätzen werden die Proteinkonzentration, Art und Konzentration des Fällungsmittels, des Puffers und des pH-Wertes miteinander kombiniert, insgesamt auch als Screening bekannt. Die hohe Anzahl dieser Parameter und deren Kombination untereinander erhöht in der Praxis in erheblichem Maße den Kristallisationsaufwand [6].

Darüber hinaus sind die theoretischen Erkenntnisse dieses Phasenüberganges erster Ordnung von einem gelösten Protein zum kristallinen Feststoff gering [7]. Das liegt daran, daß Proteine ausgesprochen komplexe Systeme sind, was sich in der Oberflächenladung

und -struktur, in den Radien von einigen nm und in den unspezifischen Wechselwirkungen untereinander manifestiert. Daher besteht ein großes Interesse an Erkenntnissen über erfolgsversprechende Kristallisationsbedingungen [8].

Zusätzlich zu den Kristallisationsbedingungen ist auch ein genaues Verständnis der Kristallisations- und Wachstumsvorgänge wichtig. Schon zu einem frühen Zeitpunkt nach Zugabe des Fällungsmittels zu der Proteinlösung wird der weitere Verlauf und das Endresultat des Aggregationsprozesses festgelegt. Für derartige Untersuchungen sind Verfahren wie die Lichtstreuung sehr gut geeignet [9],[10].

Die Aufklärung kolloidaler Systeme [11] mit Lichtstreuexperimenten entspricht der Röntgenstrukturanalyse atomarer Systeme. Ein Unterschied zeigt sich lediglich in den Dimensionen der Teilchengrößen und -abständen sowie der Wellenlänge der verwendeten Strahlung. Daher können die gleichen Beugungserscheinungen wie bei der Röntgenstreuung beobachtet werden, wenn bei Kolloidsystemen die Wellenlänge an den Partikelabstand entsprechend angepaßt wird.

An diesem Institut sind bereits eine Fülle an Veröffentlichungen von statischen und dynamischen Lichtstreuexperimenten gemacht worden, die im wesentlichen Aggregationsexperimente des Modellproteins Lysozym vorstellen. Dabei zeigte sich, daß die Aggregate nicht in kompakten Strukturen wachsen, sondern in lose gepackten fraktalen Clustern, wie es schon vorher für anorganische Kolloide beschrieben worden ist [12]-[21]. Es besteht jedoch noch ein großer Bedarf an Daten, die Aussagen über die Aggregationsprozesse bei der Bildung von Proteinkristallen treffen.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist, einen weiteren Einblick in die Proteinaggregationsprozesse zu geben und einen Beitrag zum Verständnis der Kristallisationsbedingungen von Proteinen zu leisten. Denn die Bedingungen und die physikalisch-chemischen Prozesse sind bei den Proteinkristallisationen noch ungenügend beschrieben. Des weiteren soll angegeben werden, welche Parameter für das Erreichen einer optimalen Kristallisation vorliegen müssen.

Für diese Aufgabe spielt die schon vielfach verwendete dynamische Lichtstreuung eine große Rolle [22], wobei als besondere Fortführung zu diesen Experimenten die elektrophoretische Lichtstreuung zum Einsatz kommt [23].

Mit der dynamischen Lichtstreuung lassen sich über die Diffusionsmessung Partikelgrößen von wenigen nm bis in den Mikrometerbereich detektieren. Damit können Aussagen über

die mittleren Teilchenwechselwirkungen des Proteinsystems sowie über die Aggregationskinetiken aufgezeichnet werden [24].

Die elektrophoretische Lichtsteuerung liefert über die Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Teilchen Aussagen über die Stabilität der zu untersuchenden Proteinlösungen. Dies führt zu dem bekannten Zetapotential und darüber hinaus zu der Oberflächenladung der beteiligten Partikel [25].

In dieser Arbeit werden drei Eigenbauten vorgestellt, die das dynamische wie elektrophoretische Meßverfahren umsetzen. Es werden Messungen hauptsächlich an dem Modellprotein Lysozym durchgeführt, bei denen systematisch die Art und Konzentration der Salze sowie die Lysozymkonzentration variiert werden. Diese Messungen geben einen Einblick in die physikalischen Eigenschaften des Proteinmonomers mit seiner Elektrolytumgebung.

Des weiteren werden Studien über Stabilitätsübergänge des Lysozysystems vorgestellt, die mit dem elektrophoretischen Meßverfahren durchgeführt werden. Insbesondere werden auch Aggregationskinetiken in sehr kleinen Probenvolumina [26],[27], d.h. Tropfen der Größe von $10\mu\text{l}$, unter günstigen wie auch ungünstigen Kristallisationsbedingungen präsentiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über Aggregation und Kristallisation von Proteinen zu erhalten und so eine Grundlage für eine Kristallisationsdiagnostik zur Unterstützung der Kristallographen zu liefern. Auch sollen die entwickelten Lichtstreutechniken die mögliche Automatisierung von diagnostischen Systemen fördern.