

Virale Regulatoren der Transkription

**Klonierung, Expression und Reinigung von CAEV-Tat,
HK022 Nun und λ N (1–53)
sowie ihrer Wirtsfaktoren JunbZIP (222–331) und *E. coli* NusA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

Sabine Schwarz

aus Lauda

Bayreuth 2002

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Trans-Aktivierung der Transkription durch das CAEV-Tat-Protein.....	2
1.1.1 Die Lentiviren.....	2
1.1.2 Die Lentiviren der kleinen Wiederkäuer (SRLV).....	3
1.1.3 Die Genomorganisation der Lentiviren der kleinen Wiederkäuer.....	5
1.1.4 Der Aufbau der viralen LTRs.....	7
1.1.5 Die Transaktivator-Proteine der SRLV.....	8
1.2 Die N-vermittelte Antitermination im Phagen λ.....	13
1.2.1 Der Bakteriophage λ	13
1.2.2 Der lysogene Infektionsweg des Phagen λ	14
1.2.3 Induktion des Prophagen und lytischer Infektionsweg.....	16
1.2.4 Antitermination im Infektionszyklus des Phagen λ	17
1.2.5 Die N-vermittelte Antitermination.....	17
1.2.6 Die nut-RNA.....	19
1.2.7 Das N-Protein.....	20
1.2.8 Die Struktur von nutboxB-RNA und N(1-36) im Komplex.....	21
1.2.9 Der Wirtsfaktor NusA aus <i>E. coli</i>	24
1.2.10 Der Mechanismus der N-vermittelten Antitermination.....	27
1.3 Die Nun-vermittelte Termination.....	28
1.3.1 Das Nun-Protein des lamdoiden Phagen HK022.....	28
1.3.2 Die Struktur von HKI022 Nun(20-44) und λ -nutboxB-RNA im Komplex.....	30
1.3.3 Der Mechanismus der Nun-vermittelten Termination.....	33
2 ZIELE.....	37
3 MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1 Bakterienstämme.....	39
3.1.1 <i>E. coli</i> DH5a und <i>E. coli</i> Top10.....	40
3.1.2 <i>E. coli</i> BL21 und <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	40
3.1.3 Rosetta, Rosetta DE3 und <i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus-RIL.....	40
3.2 Plasmide.....	41
3.3 Oligonukleotide.....	45
3.4 Nährmedien.....	50
3.4.1 LB-Medium (Luria Bertani).....	51
3.4.2 SOC-Medium.....	51
3.4.3 TB-Medium.....	51
3.4.4 Minimalmedium M9.....	51
3.5 Enzyme, Standards und Chemikalien.....	52
3.6 Sonstige Materialien.....	53
3.7 Absorptionsmessung.....	55
3.7.1 Bestimmung der Bakteriendichte.....	55
3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	55
3.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	55
3.7.4 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	56
3.8 SDS-Gelelektrophorese.....	56
3.8.1 SDS-Gele nach Laemmli.....	57
3.8.2 SDS-Gele nach Schagger und von Jagow.....	57

3.8.4	Proteinstandards.....	58
3.8.5	Färbung.....	59
3.9	Western Blot.....	59
3.9.1	Nachweis von Histidin-Fusionsproteinen.....	60
3.10	Agarosegelelektrophorese.....	61
3.11	Zentrifugationen.....	62
3.12	Isolierung von Plasmid-DNA.....	62
3.12.1	Präparation über alkalische Lyse.....	62
3.12.2	Präparation über Anionenaustauscherchromatographie.....	63
3.13	Fällung und Reinigung von DNA.....	63
3.13.1	Butanolpräzipitation.....	63
3.13.2	Reinigung über Silikagelmembranen.....	64
3.13.3	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosgelen.....	64
3.14	Enzymatische Behandlung von DNA.....	64
3.14.1	Restriktion.....	64
3.14.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	65
3.14.3	Generierung stumpfer Enden mit T4 DNA-Polymerase.....	65
3.14.4	Annealing von Oligonukleotiden.....	65
3.14.5	Ligation.....	65
3.14.6	Sequenzierung.....	66
3.15	Anwendungen der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	66
3.15.1	Kolonie-PCR.....	66
3.15.2	Direkte PCR-Mutagenese.....	67
3.15.3	Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese.....	68
3.15.4	<i>Splicing by overlap extension</i> -PCR-Mutagenese.....	69
3.16	Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	70
3.16.1	Transformation von Bakterien mit der CaCl ₂ -Methode.....	70
3.16.2	Elektroporation.....	71
3.17	Anzucht von Bakterien.....	72
3.17.1	Bakterienanzucht.....	72
3.17.2	Dauerkulturen.....	72
3.17.3	Induktionsversuche.....	73
3.17.4	Zellkultivierung.....	73
3.18	Proteinreinigung.....	73
3.18.1	Reinigung von CAEV-Tat.....	73
3.18.2	Reinigung von GST-JunbZIP.....	75
3.18.3	Reinigung von HK022 Nun.....	76
3.18.4	Reinigung von N(1-53).....	77
3.18.5	Reinigung von NusA.....	78
3.19	CD-Spektroskopie.....	80
3.20	Bestimmung des hydrodynamischen Radius mittels Pulse Field Gradient (PFG) NMR Technik.....	80
3.21	NMR-Spektroskopie.....	82
3.21.1	Probenvorbereitung.....	82
3.21.2	Allgemeine Meßbedingungen.....	82
3.21.3	Aufnahme der Spektren.....	83
3.21.4	Prozessierung und Auswertung der Spektren.....	83
4	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....	85
4.1	Klonierung, Expression und Reinigung von CAEV-Tat.....	85

4.1.1 Anpassungen an die <i>E. coli codon usage</i>	85
4.1.2 Expressionssysteme und Reinigungsstrategien für CAEV-Tat.....	87
4.1.3 Das Expressionssystem für CAEV-Tat.....	94
4.1.4 Erste strukturelle Charakterisierung von CAEV-Tat.....	101
4.1.5 Das Expressionssystem für CAEV-Tat-cys ⁻	103
4.2 Klonierung von Jun, Fos und FosbZIP.....	107
4.2.1 Klonierung von c-jun und c-fos.....	107
4.2.2 Klonierung von FosbZIP.....	110
4.3 Klonierung, Expression und Reinigung von JunbZIP (222–331).....	111
4.3.1 Die Konstruktion von pBlueskript II KS-JunbZIP und pGEX-6P-2-JunbZIP.....	111
4.3.2 Expression und Reinigung von JunbZIP.....	112
4.4 Klonierung, Expression und Reinigung des Nun-Proteins aus dem lambdoiden Phagen HK022.....	116
4.4.1 Entwurf eines synthetischen <i>nun</i> -Gens.....	117
4.4.2 Konstruktion eines synthetischen <i>nun</i> -Gens mittels rekursiver PCR.....	120
4.4.3 Konstruktion eines synthetischen <i>nun</i> -Gens nach Kim <i>et al.</i>	122
4.4.4 Expression und Reinigung von HK022 Nun-Protein.....	124
4.4.5 Erste strukturelle Charakterisierung von HK022 Nun.....	127
4.5 Klonierung, Expression und Reinigung des NusA-Proteins aus <i>E. coli</i>.....	130
4.5.1 Das Expressionssystem für <i>E. coli</i> NusA (1–495).....	131
4.5.2 Konstruktion der Plasmide pBlueskript-NusA (1–495) und pTKK19-NusA (1–495).....	132
4.5.3 Reinigung von <i>E. coli</i> NusA 81–495).....	134
4.5.4 CD-Spektroskopie.....	136
4.6 Klonierung, Expression und Reinigung des N-Proteins (1–53) aus dem Phagen λ.....	137
4.6.1 Das Expressionssystem für λN(1–53)-Protein.....	137
4.6.2 Konstruktion des Plasmids pTKK19-λN(1–53).....	138
4.6.3 Reinigung von λN(1–53)-Protein.....	140
4.6.4 Erste strukturelle Charakterisierung von λN(1–53).....	144
4.7 Erste strukturelle Charakterisierung der Interaktion des N(1–53)-nutboxB-Komplexes mit <i>E. coli</i> NusA.....	146
5 DISKUSSION.....	151
5.1 NMR-Probenherstellung am Beispiel von CAEV-Tat.....	152
5.1.1 Probleme durch die eukaryotische <i>codon usage</i>	152
5.1.2 Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls.....	154
5.1.3 Erste strukturelle Charakterisierung von CAEV-Tat.....	158
5.1.4 Aggregationsprobleme.....	158
5.1.5 Vergleich von CAEV-Tat und CAEV-Tat-cys ⁻	159
5.1.6 Ausblick.....	160
5.2 Klonierung von <i>jun</i>, <i>fos</i>, <i>junbZIP</i> und <i>fosbZIP</i>.....	161
5.2.1 Wahl der Konstrukte.....	161
5.2.2 Verwendung von I.M.A.G.E.-Klonen.....	162
5.2.3 Expression und Reinigung.....	163
5.3 Gensynthese am Beispiel von HK022.....	164
5.3.1 Synthese mittels rekursiver PCR.....	165
5.3.2 Synthese nach Kim.....	166
5.3.3 Expression und Reinigung von HK022Nun.....	167
5.3.4 Erste spektroskopische Charakterisierung von HK022 Nun.....	167

5.3.5 Ausblick.....	168
5.4 Klonierung, Expression und Reinigung von λN(1–53).....	169
5.4.1 Wahl des Konstrukts.....	169
5.4.2 Expression mit dem Ubiquitinsystem.....	169
5.5 Klonierung, Expression und Reinigung von <i>E. coli</i> NusA (1–495)	170
5.5.1 Expressions- und Reinigungsprotokoll für NusA.....	171
5.6 Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der Bindung von <i>E. coli</i> NusA (1–495) an den N–nutboxB-Komplex.....	173
5.6.1 Vergleich der binären Komplexe N(1–36)–nutboxB und N(1–53)–nutboxB.....	173
5.6.2 Vergleich zwischen N(1–53)–nutboxB und N(1–53)–nutboxB–NusA.....	174
5.6.3 Aussicht.....	175
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	177
7 SUMMARY.....	179
ABKÜRZUNGEN.....	181
LITERATUR.....	183
ANHANG.....	197
DANKSAGUNG.....	211
ERKLÄRUNG.....	213

1 EINLEITUNG

Viren besitzen nur ein relativ kleines Genom und kodieren dementsprechend nur für wenige virale Proteine. Daher ist ein Virus bei so essentiellen Vorgängen wie der Replikation und der Transkription des Virusgenoms und der Translation der viralen Proteine auf die Maschinerie der Wirtszelle angewiesen. Umso wichtiger ist es für das Virus, regulatorisch in diese Prozesse einzugreifen und diese zu kontrollieren, um den eigenen Replikationszyklus steuern zu können.

Drei Beispiele für virale Regulatoren der Transkription werden im folgenden vorgestellt. Jedes dieser Proteine interagiert mit zellulären Proteinen und einem bestimmten Abschnitt viraler oder viral kodierter Nukleinsäure, um den Transkriptionsinitiationsapparat zu positionieren bzw. die Transkriptionselongation aufrechtzuerhalten oder diese vorzeitig zu beenden.

– Das Transaktivator–Protein Tat aus dem Caprinen Arthritis–Enzephalitis–Virus (CAEV) bringt – durch Interaktion mit Wirtsproteinen – den Transkriptionsapparat der Wirtszelle in die räumliche Nähe des zu transkribierenden Virusgenoms.

– Das Antiterminator–Protein N aus dem Bakteriophagen λ bewirkt über die Interaktion mit dem zellulären Elongationsfaktor NusA das Überlesen von Terminationssignalen bei der Transkription des λ –Genoms.

– Das Terminator–Protein Nun aus dem lambdoien Phagen HK022 nutzt dieselben Wirtsfaktoren wie das N–Protein aus λ . Bei einer Superinfektion mit dem Phagen λ konkurriert das Nun–Protein mit dem N–Protein um diese und bringt die Transkription des λ –Genoms zum vorzeitigen Abbruch.

1.1 Trans–Aktivierung der Transkription durch das CAEV–Tat–Protein

Zwischen 1935 und 1955 kam es auf Island mehrmals zu epidemieartigen Ausbrüchen einer Schafskrankheit, die unter dem Namen *Maedi* (<isländisch> schwere Atmung) bekannt wurde. *Maedi* ist eine chronische interstitielle Pneumonie und führt zu Gewichtsverlust und zum physischen Verfall des betroffenen Tieres. Fast alle erkrankten Tiere sterben innerhalb eines Jahres nach Krankheitsausbruch (Sigurdsson *et al.*, 1952). Unter den Namen *Ovine Progressive Pneumonia* (OPP), Graaff–Rinet disease, la bouhite bzw. Zwoegerziekte war dieses Krankheitsbild schon in den 1920er Jahren u.a. in den USA, den Niederlanden, Frankreich und Südafrika beschrieben worden.

In seltenen Fällen trat als Begleiterscheinung von *Maedi* eine Form der Leukoenzephalomyelitis auf, die als *Visna* (<isländ.> Auszehrung, fortschreitende Apathie) bezeichnet wurde. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einem fortschreitenden Abbau der Myelinschicht, was zunächst zu Bewegungsstörungen in den hinteren Extremitäten und schließlich zur vollständigen Paralyse des erkrankten Tieres führt (Sigurdsson *et al.*, 1954).

Schafe in der Laktatperiode entwickeln häufig zusätzlich schwere Mastitis (Cutlip *et al.*, 1986). In einigen seltenen Fällen erkrankten die Tiere an Arthritis (Oliver *et al.*, 1981). Durch intensive Keulungsmassnahmen konnten *Maedi* und *Visna* in Island Ende der Fünfziger Jahre erfolgreich bekämpft werden (Pálsson, 1976).

Dem isländischen Tierarzt Björn Sigurdsson gelang der Nachweis, daß es sich bei dem Erreger beider Krankheiten um dasselbe Virus handelte. Aufgrund der langen Inkubationszeit des Maedi–Visna–Viruses (MVV) von mehreren Monaten bis hin zu Jahren prägte Sigurdsson den Begriff der 'langsamen viralen Infektionen' (Sigurdsson *et al.*, 1957), der schließlich zum Namensgeber für eine ganze Gruppe von Viren, der sog. Lentiviren (*lentus* <lat.> für langsam) wurde.

1.1.1 Die Lentiviren

Die Lentiviren sind der Familie der Retroviren zugeordnet.

Retroviren besitzen ein in diploider Form vorliegendes, unsegmentiertes '+'–Strang–RNA–Genom. Das hervorstechendste Merkmal der Retroviren ist ihre Replikationsstrategie, die auf der reversen

Transkription der Virion-RNA in lineare doppelsträngige DNA und der anschließenden Integration dieser DNA in das Genom des Wirts beruht. Dabei findet eine Umkehrung des sonst üblichen genetischen Informationsflusses von der DNA zur RNA statt, von der sich die Bezeichnung 'Retro'viren ableitet (Baltimore, 1970; Temin, 1964; Temin und Mizutani, 1970).

Nach der Organisation ihres Genoms lassen sich Retroviren grob in zwei Kategorien unterteilen: Das Genom der einfachen Retroviren besteht nur aus den drei elementaren kodierenden Domänen *gag*, *pol* und *env* (s. Kapitel 1.1.3). Komplexe Retroviren kodieren zusätzlich für regulatorische Proteine.

Taxonomisch werden die Retroviren in sieben Genera unterteilt, von denen fünf Genera Retroviren mit onkogenem Potential umfassen, die sog. Onkoviren (*Oncovirinae*). Die beiden anderen Gruppen sind die Lentiviren (*Lentivirinae*) und die Spumaviren (*Spumavirinae*). Bei fast allen onkogenen Retroviren handelt es sich um einfache Retroviren, während die Lentiviren und die Spumaviren komplexe Retroviren sind.

Zu den Lentiviren gehören die humanen Immundefizienzviren (HIV-1, HIV-2 *Human Immunodeficiency Virus*) sowie das Affen- (SIV *simian immunodeficiency virus*), das Katzen- (FIV *feline immunodeficiency virus*) und das Rinder-Immundefizienzvirus (BIV *bovine immunodeficiency virus*) sowie ein Virus, das bei Pferden eine infektiöse Anämie auslöst (EIAV *equine infectious anemia virus*). Eine tabellarische Übersicht der Lentiviren und der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

1.1.2 Die Lentiviren der kleinen Wiederkäuer (SRLV)

Ein Maedi-Visna ähnliches Krankheitsbild wurde auch für Ziegen beschrieben. Der Krankheitsverlauf ist bei Ziegen jedoch stark vom Alter des betroffenen Tieres abhängig. Infizierte Jungtiere erkranken vor allem an Leukoenzephalomyelitis, einer Visna bei Schafen entsprechenden Krankheit (Cork *et al.*, 1974). Erwachsene Tiere zwischen zwei und neun Jahren hingegen leiden meist an chronischer Arthritis, vor allem in den Kniegelenken (Crawford und Adams, 1981). Mastitis und Pneumonie treten bei Ziegen seltener auf (Kennedy-Stoskopf *et al.*, 1985).

1980 wurde das *Caprine Arthritis-Enzephalitis-Virus* (CAEV) als Erreger dieser Krankheit identifiziert. Hiermit wurde erstmals ein Virus als Auslöser einer arthritischen Erkrankung identifiziert (Crawford *et al.*, 1980).

Virus	Wirt	Zielzellen des Immunsystems	Krankheiten
Caprines Arthritis-Enzephalitis-Virus (CAEV)	Ziege	Monozyten / Makrophagen	Arthritis, Enzephalitis, Mastitis, Pneumonie
Maedi-Visna Virus (MVV)	Schaf	Monozyten / Makrophagen	Pneumonie, Enzephalitis, Mastitis, Arthritis
Felines Immundefizienzvirus (FIV)	Katze	Monozyten / Makrophagen CD4+ / CD8+ T-Lymphozyten	Immundefizienz, opportunistische Infektionen
Equine infectious anaemia virus (EIAV)	Pferd	Monozyten / Makrophagen	Fieber, Anämie
Bovine immunodeficiency virus (BIV)	Rind	Monozyten / Makrophagen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten	subklinische Infektion, evtl. Immundefizienz
Simian immunodeficiency virus (SIV)	Affe	Monozyten / Makrophagen Lymphozyten	Immundefizienz, opportunistische Infektionen
Humanes Immundefizienzvirus (HIV)	Mensch	Monozyten / Makrophagen Lymphozyten CD 4+	Immundefizienz, Enzephalopathie, Myelopathie, opportunistische Infektionen (AIDS)

Tabelle 1.1 Übersicht über die Lentiviren

Lentiviren, ihre jeweiligen Wirte und die von ihnen infizierten Zellen des Immunsystems sowie die von ihnen hervorgerufenen Krankheitsbilder sind tabellarisch zusammengefaßt.

Das CAE-Virus ist eng mit dem Erreger von Maedi/Visna verwandt. CAEV und MVV werden oft unter dem Begriff SRLV ("*small ruminant lentiviruses*" – Lentiviren der kleinen Wiederkäuer) zusammengefaßt (Narayan *et al.*, 1993).

Das Genom mehrerer MVV- und CAEV-Stämme aus verschiedenen Kontinenten wurde vollständig sequenziert (Sonigo *et al.*, 1985; Querat *et al.*, 1990; Saltarelli *et al.*, 1990; Sargan *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1997). Während sich die CAEV-Stämme nur geringfügig in ihrer Nucleotidsequenz voneinander unterscheiden, bilden die MVV-Stämme mindestens drei verschiedene Gruppen (Valas *et al.*, 1997). Sequenzvergleiche der *pol*- und *env*-Gene der SRLV (Kapitel 1.1.3) zeigten, daß die in Frankreich und Nordamerika verbreiteten Formen des Maedi-Visna-Virus näher mit CAEV verwandt sind als mit anderen in Europa und Südafrika verbreiteten MVV-Formen (Leroux *et al.*, 1995). Man vermutet deshalb, daß CAEV ursprünglich durch die Anpassung eines MVV-Stammes an Ziegen als Wirtsorganismus entstanden ist (Valas *et al.*, 1997).

1.1.3 Die Genomorganisation der Lentiviren der kleinen Wiederkäuer

Die Virionen der SRLV sind kugelförmig und haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Sie sind von einer Hüllmembran umgeben, die von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Mit der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine verbunden.

Im Innern befindet sich das Viruscapsid, das eine für Lentiviren untypische, sphärisch-ikosaedrische Form aufweist. Das Capsid enthält das Virusgenom, zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle, und das Enzym Reverse Transkriptase. Die RNA ist mit Nucleocapsidproteinen komplexiert (Pépin *et al.*, 1998; Joag, 1996).

Die Genome von CAEV und MVV sind gleich aufgebaut (Abbildung 1.1), ihre RNAs umfassen jeweils ca. 9200 Basen (Sonigo *et al.*, 1985; Saltarelli *et al.*, 1990). Neben den drei Strukturgenen *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) besitzt das Genom der SRLV zusätzlich noch die regulatorischen Gene *tat* (*trans-activator of transcription*), *vif* (*viral infectivity factor*) und *rev* (*regulator of expression of virion proteins*) (Clements und Zink, 1996).

Das *gag*-Gen kodiert die Capsid-, Nucleocapsid- und Matrixproteine. Sie werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet, das durch die virale Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird.

Auch die von *env* kodierten Proteine werden zunächst als Vorläufermolekül synthetisiert und dann in zwei Proteine gespalten: das in der Hüllmembran verankerte Transmembrannglykoprotein und das

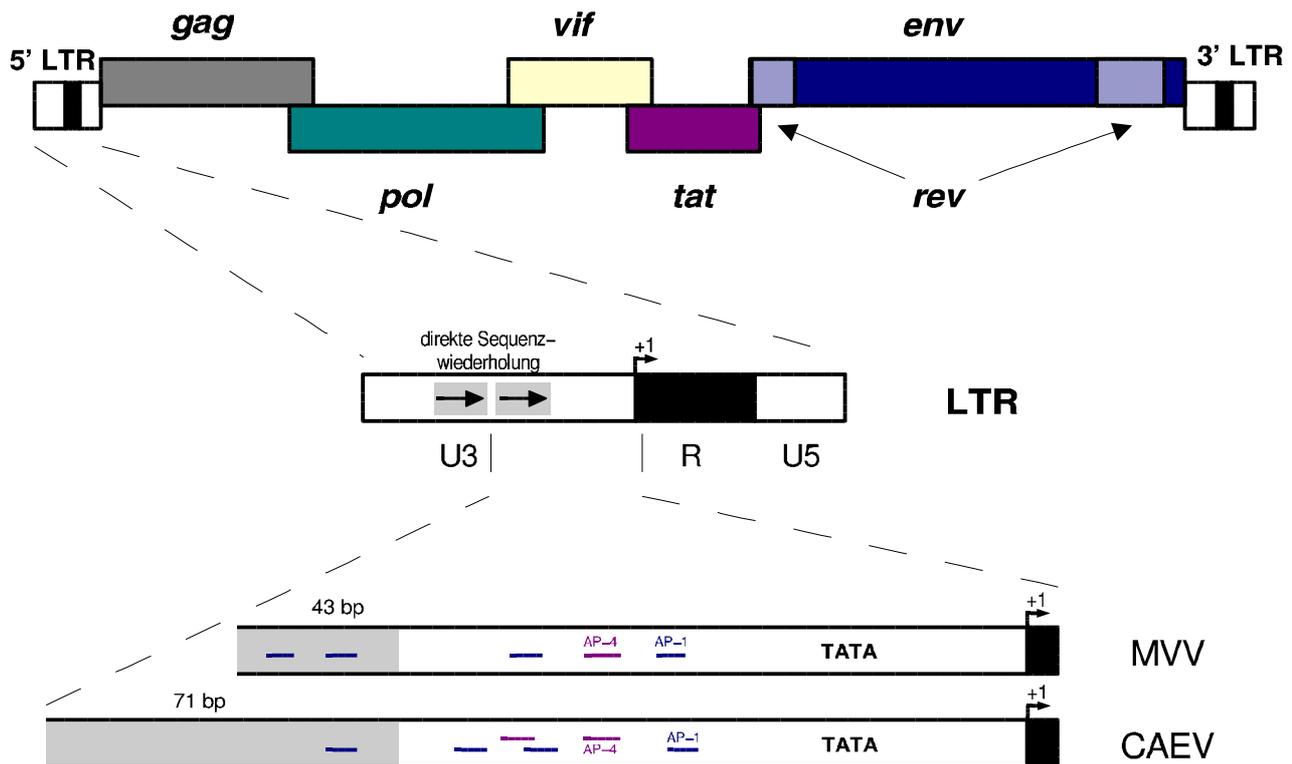


Abbildung 1.1 Die Genomorganisation der SRLV

Der Aufbau des SRLV-Genoms (oben) wurde aus der Nukleotidsequenz zweier MVV-Stämme (Sonigo *et al.*, 1985; Braun *et al.*, 1987) und eines CAEV-Stammes (Saltarelli *et al.*, 1990) abgeleitet.

In der Mitte ist schematisch der Aufbau der *long terminal repeats* der SRLV dargestellt, wobei unten eine vergrößerte Ansicht der für die Transkriptionskontrolle wichtigen Abschnitte in der *unique 3*-Region für MVV und CAEV gezeigt ist.

Oberflächenglykoprotein, das nicht-kovalent mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des Transmembranglykoproteins verbunden ist.

Das Gen *pol* kodiert für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, die das RNA-Genom in DNA transkribiert, Integrase, die die neusynthetisierte DNA in die Wirts-DNA integriert, und Protease, die die viralen Vorläuferproteine prozessiert. Zusätzlich wird von *pol* noch das Enzym dUTPase kodiert (Elder *et al.*, 1992).

Das Produkt des *rev*-Gens spielt eine wichtige Rolle beim Transport ungespleißter mRNA ins Cytoplasma. Es bindet an eine als RRE (*rev-responsive element*) bezeichnete RNA-Sequenz, die sich im Bereich des *env*-Gens jeder ungespleißten viralen mRNA findet (Mazarin *et al.*, 1990).

Die Bedeutung des *vif*-Proteins für die Replikation bei MVV ist unbekannt, bei CAEV scheint es jedoch eine wichtige Funktion im späten Replikationszyklus zu spielen (Harmache *et al.*, 1996).

Das *tat*-Protein der SRLV wird – im Gegensatz zu den *tat*-Proteinen einiger anderer Lentiviren – nur von einem Exon kodiert und wird zu einem frühen Zeitpunkt im viralen Replikationszyklus gebildet (Gourdou *et al.*, 1989; Kalinski *et al.*, 1994). Auf seine Funktion wird in Kapitel 1.1.5 ausführlicher eingegangen.

1.1.4 Der Aufbau der viralen LTRs

Das in die Wirts-DNA integrierte Provirusgenom wird an den Enden von langen identischen Sequenzwiederholungen, den sog. *long terminal repeats* (LTR) flankiert (Abbildung 1.1). Sie liegen in gleicher Orientierung vor und enthalten die Promotor- und Verstärkerelemente (*enhancer*), die die virale Genexpression kontrollieren. Die LTRs bestehen aus den Regionen U3 (U = *unique*), R (R = *redundant*) und U5. Innerhalb der U3-Region liegen alle für die Transkriptionskontrolle wichtigen Sequenzen, die U5- und die R-Region sind ohne Einfluß auf die Transkriptionsaktivität deletierbar (Hess *et al.*, 1989; Sherman *et al.*, 1989).

Die LTRs von CAEV und MVV besitzen mit 414 bzw. 450 Basenpaaren zwar eine ähnliche Größe, ihre Sequenzen weisen allerdings nur eine Homologie von ca. 50 % auf (Hess *et al.*, 1985; Hess *et al.*, 1986). Einige Bereiche der LTRs sind jedoch in beiden Viren konserviert, vor allem die *cis*-aktiven Sequenzen der U3-Region (Hess *et al.*, 1986).

- Am 3'-Ende beider U3-Regionen befindet sich ca. 20 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt eine TATA-Box.
- Eine 43 Basenpaare lange Sequenz wird in MVV in gleicher Orientierung wiederholt. CAEV verfügt über eine entsprechende 71 bp lange Sequenz. Das 5'-Ende dieser Sequenz weist eine große Homologie mit der 43 bp langen Wiederholungssequenz von MVV auf (Saltarelli *et al.*, 1990).
- Beide U3-Regionen besitzen mehrere Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren: MVV verfügt über eine, CAEV über zwei Bindungsstellen für das Aktivatorprotein 4 (AP-4). In MVV sind sechs Bindungsstellen für das Aktivatorprotein 1 (AP-1), einem Heterodimer aus den Proteinen Jun und Fos bzw. einem Jun/Jun-Homodimer, vorhanden, vier davon liegen im Bereich der 43 Basenpaare langen wiederholten Sequenz. Die Bindungsstelle, die der TATA-Box am nächsten liegt, besitzt eine perfekte AP-1-Konsensussequenz und ist kritisch für eine effiziente Transkription (Hess *et al.*, 1989). CAEV besitzt fünf AP-1-Bindungsmotive, zwei davon innerhalb der 71 Basenpaare langen Wiederholungssequenz. Eine der AP-4-Bindungsstellen überlappt sich

mit einer AP-1-Bindungsstelle. Weder CAEV- noch MVV-LTR verfügen über Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B oder SP-1 wie sie in LTRs anderer Lentiviren wie z.B. HIV vorhanden sind.

Die erhebliche Steigerung der viralen Transkription nach der Differenzierung der monozytischen Zellen zu Makrophagen ist auf eine verstärkte Expression der Transkriptionsaktivatoren AP-1 und AP-4 in Makrophagen und deren Bindung an ihre Zielsequenzen in den LTRs zurückzuführen (Saltarelli, 1990).

1.1.5 Die Transaktivator-Proteine der SRLV

Alle Lentiviren besitzen ein *trans*-aktives Tat-Protein, das die virale Transkription beeinflusst. Auch die Tat-Proteine der SRLV bewirken eine Steigerung der Transkription, allerdings ist ihre Wirkung im Vergleich zu anderen lentiviralen Tat-Proteinen nur gering: *In vitro* bewirken die SRLV-Tat-Proteine je nach Zelltyp nur eine drei- bis sechsfache Steigerung der Transkriptionsrate, während z.B. HIV-Tat die virale Genexpression um das 100-fache erhöht (Davis und Clements, 1989; Gourdou *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1991). Allerdings besitzen die SRLV *in vitro* eine höhere basale Transkriptionsaktivität als andere Lentiviren, die durch Tat nur noch geringfügig zu steigern sein dürfte (Hess *et al.*, 1985; Hess *et al.*, 1986).

Die Situation *in vivo* ist hingegen völlig unklar. Bei der Einleitung der verstärkten Genexpression während der Differenzierung von Monocyten zu Makrophagen könnte der Einfluß des *trans*-aktiven Tat-Proteins auf die Transkription erheblich größer sein (Saltarelli *et al.*, 1993).

Die Bedeutung der Tat-Proteine der SRLV für die Virusreplikation wird noch diskutiert. Eine Deletion des *tat*-Gens im CAEV-Genom führt *in vitro* zu einem um das Tausendfache verringerten Virustiter in infizierten Zellen (Saltarelli *et al.*, 1997), *in vivo* wird die Replikation jedoch nur leicht verzögert, und das Virus hat noch pathogene Wirkung (Harmache *et al.*, 1995). Die hervorgerufenen Entzündungskrankheiten sind allerdings weniger schwer als bei Infektionen mit Wildtyp-CAEV (Harmache *et al.*, 1998).

Der Mechanismus der Transaktivierung

Die Transaktivator-Proteine der Lentiviren lassen sich nach ihrem Transaktivierungsmechanismus in zwei Klassen unterteilen:

HIV-1-, HIV-2-, SIV-, EIAV- und BIV-Tat rekrutieren über Reste der in diesen Tat-Proteinen konservierten *Core*-Region Cyclin T1, das als Heterodimer mit der Cyclin-abhängigen Kinase 9 (Cdk 9) den positiven Transkriptionselongationsfaktor \bar{b} (PTEFb) ausmacht.

Tat und Cyclin T1 binden zusammen an ein RNA-Element am 5'-Ende der viralen mRNA, das als TAR (*tat responsive element*) bezeichnet wird. Auf diese Weise wird Cdk 9 in räumliche Nähe zum Transkriptionselongationskomplex am viralen LTR gebracht, von wo aus Cdk 9 die COOH-terminale Domäne der RNA-Polymerase II hyperphosphorylieren kann (Wei *et al.*, 1998). Die Hyperphosphorylierung der COOH-terminalen Domäne steigert die Prozessivität der RNA-Polymerase und führt zur effizienten Transkriptionselongation (Abb. 1.2)

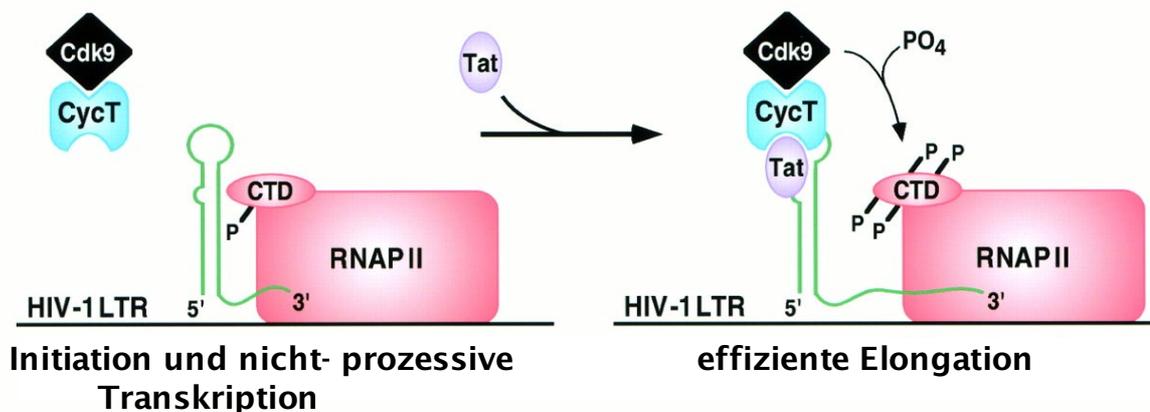


Abbildung 1.2 Der Transkriptionsmechanismus von HIV-Tat

Ohne die Anwesenheit des Tat-Proteins bleibt die Elongation wegen der Hypophosphorylierung der COOH-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II ineffizient. Das 5'-Ende der HIV-mRNA wird transkribiert, das eine *stem-loop*-Struktur (TAR) ausbildet. Im Komplex mit Cyclin T und Cdk9 bindet Tat an die TAR. Cdk9 hyperphosphoryliert die CTD der RNA-Polymerase, was zur effizienten Transkriptionselongation führt (aus Emerman und Malim, 1998).

Die Tat-Proteine von MVV, CAEV und FIV verfolgen einen völlig anderen Mechanismus der Transaktivierung als die anderen lentiviralen Tat-Proteine: Eine vergleichbare TAR-Sequenz fehlt bei den SRLV und FIV (Saltarelli *et al.*, 1990; Neuveut *et al.*, 1993; de Parseval *et al.*, 1999); zudem binden die Tat-Proteine dieser Gruppe auch an keine andere RNA-Sequenz des viralen Transkripts (Gdovin und Clements, 1992).

Die Tat-Proteine der SRLV bewirken über die AP-1-Bindestellen in den LTRs eine Steigerung der viralen Transkription (Gdovin und Clements, 1992; Saltarelli *et al.*, 1993). Für MVV-Tat konnte auch eine gesteigerte Transkription zellulärer Gene, die über AP-1-Bindestellen in ihrem Promotor verfügen, nachgewiesen werden, unter anderem für *c-jun* und *c-fos* (Neuveut *et al.*, 1993; Carruth *et al.*, 1994). Eine direkte Bindung von MVV-Tat an ein AP-1-Bindungsmotiv oder eine andere DNA-Sequenz im viralen LTR konnte nicht nachgewiesen werden (Gdovin und Clements, 1992; Neuveut *et al.*, 1993). *In vitro* und *in vivo* bindet MVV-Tat jedoch sowohl an das Jun- als auch an das Fos-Protein, die zusammen als Heterodimer den Transkriptionsfaktors AP-1 ausmachen (Morse *et al.*, 1999). MVV-Tat verstärkt zudem die DNA-Bindungsaktivität von Jun (Neuveut *et al.*, 1993).

Eine direkte Wechselwirkung von MVV-Tat mit Bestandteilen des Transkriptionskomplexes wurde postuliert, da MVV-Tat über eine Sequenzdomäne verfügt, die der Aktivierungsdomäne eines sauren Transaktivatorproteins ähnelt (Carruth *et al.*, 1996). Inzwischen konnte *in vitro* die Bindung von MVV-Tat an das TATA *box binding protein* (TBP) nachgewiesen werden (Morse *et al.*, 1999).

MVV-Tat bindet also indirekt über Bestandteile des zellulären Transkriptionsfaktors AP-1 an stromaufwärts vom Promotor gelegene Sequenzen im viralen LTR. Von dort kommt es zur Wechselwirkung mit dem Transkriptionskomplex. MVV-Tat steigert zudem die Genexpression der Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1 und verändert dessen DNA-Bindungseigenschaften.

Der Transaktivierungsmechanismus von CAEV-Tat ist wenig untersucht. Da CAEV-Tat jedoch eine hohe Sequenzidentität mit MVV-Tat aufweist und die beiden Proteine auch funktionell austauschbar sind, geht man davon aus, daß CAEV die Genexpression auf die gleiche Weise transaktiviert wie MVV (Davis und Clements, 1989; Gdovin und Clements, 1992).

FIV-Tat benötigt für seine Transaktivierungsaktivität ebenfalls eine AP-1-Sequenz im viralen FIV-LTR (de Parseval *et al.*, 1999).

1994). *In vitro* bindet dieser Sequenzabschnitt an das TATA *box binding protein* (TBP) (Morse *et al.*, 1999).

An die Aktivierungsdomäne schließt sich die AP-1-Zielsteuerungsdomäne an (Aminosäuren 34 bis 69). Der konservierte Leucin-reiche Sequenzabschnitt ist Teil dieser Domäne. Dieser Abschnitt des Proteins bindet *in vitro* und *in vivo* sowohl an das Jun- als auch an das Fos-Protein. *In vitro* konnte auch eine Bindung von MVV-Tat an Jun/Fos-Heterodimere bzw. Jun-Homodimere beobachtet werden. In *Gelshift*-Experimenten mit Abschnitten des viralen LTR, die die AP-1-Sequenzen umfassen, konnte zusätzlich zu Shifts von Jun/Fos bzw. Jun/Jun mit der viralen DNA bei Zugabe von MVV-Tat ein *Supershift* beobachtet werden (Morse *et al.*, 1999).

Durch Mutationsstudien konnten die für die MVV-Bindung verantwortlichen Domänen im Jun- bzw. Fosprotein eingegrenzt werden. Deletionen in den basischen Domänen der beiden Leucin-Zipper-Proteine bzw. Verkürzungen der Zipper-Domäne wirkten sich negativ auf die MVV-Bindungsaktivität aus. Eine Interaktion zwischen MVV-Tat und Jun bzw. Fos über deren bZIP-Domänen ist demnach wahrscheinlich (Morse *et al.*, 1999).

Die Funktion des konservierten Cystein-reichen Sequenzabschnittes am COOH-Terminus ist unklar. Für die Bindung an TBP bzw. Jun und Fos ist diese Sequenzabschnitt jedoch nicht erforderlich (Morse *et al.*, 1999). Ein Austausch der Cysteine gegen Glycine vermindert jedoch die Transaktivierungsaktivität um den Faktor drei. Zudem wurde *in vitro* unter bestimmten Bedingungen die Ausbildung schwacher Tat-Dimere über Disulfidbrücken beobachtet (Carruth *et al.*, 1996).

Andere Funktionen der Tat-Proteine der SRLV

Das Tat-Protein hat auch pathogene Wirkung: Transgene Mäuse, die das MVV-Tat-Gen besitzen, entwickeln in verschiedenen Organen und lymphatischen Geweben Maedi entsprechende Krankheitsbilder (Vellutini *et al.*, 1994). Intracerebrale Injektionen von MVV-Tat-analogen Peptiden lösen bei Ratten Visna vergleichbare Entzündungsprozesse im Gehirn aus (Gourdou *et al.*, 1990). Die Expression einiger Cytokine wie z.B. TNF α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 wird eingeleitet (Philippon *et al.*, 1994).

1.2 Die N-vermittelte Antitermination im Phagen λ

Bevor näher auf die an der Antitermination im Phagen λ beteiligten Komponenten und den zugrundeliegenden Mechanismus eingegangen wird, soll zunächst kurz der Infektionsweg des Bakteriophagen λ umrissen werden, um die Bedeutung der Antitermination im viralen Lebenszyklus zu verdeutlichen.

1.2.1 Der Bakteriophage λ

Der Phage λ ist ein *E. coli* und andere Enterobakterien infizierendes Virus aus der Familie der *Siphoviridae* (Ackermann, 1998). Er besteht aus einem ikosaederförmigen Kopf mit einem Durchmesser von ca. 50 nm, der die lineare 48502 bp große Phagen-DNA enthält, und einem flexiblen ca. 150 nm langen Schwanz (Abbildung 1.4).

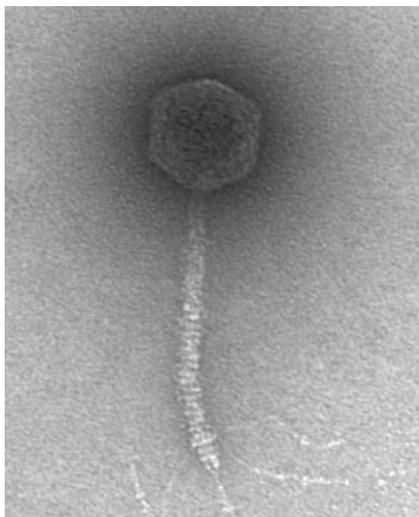
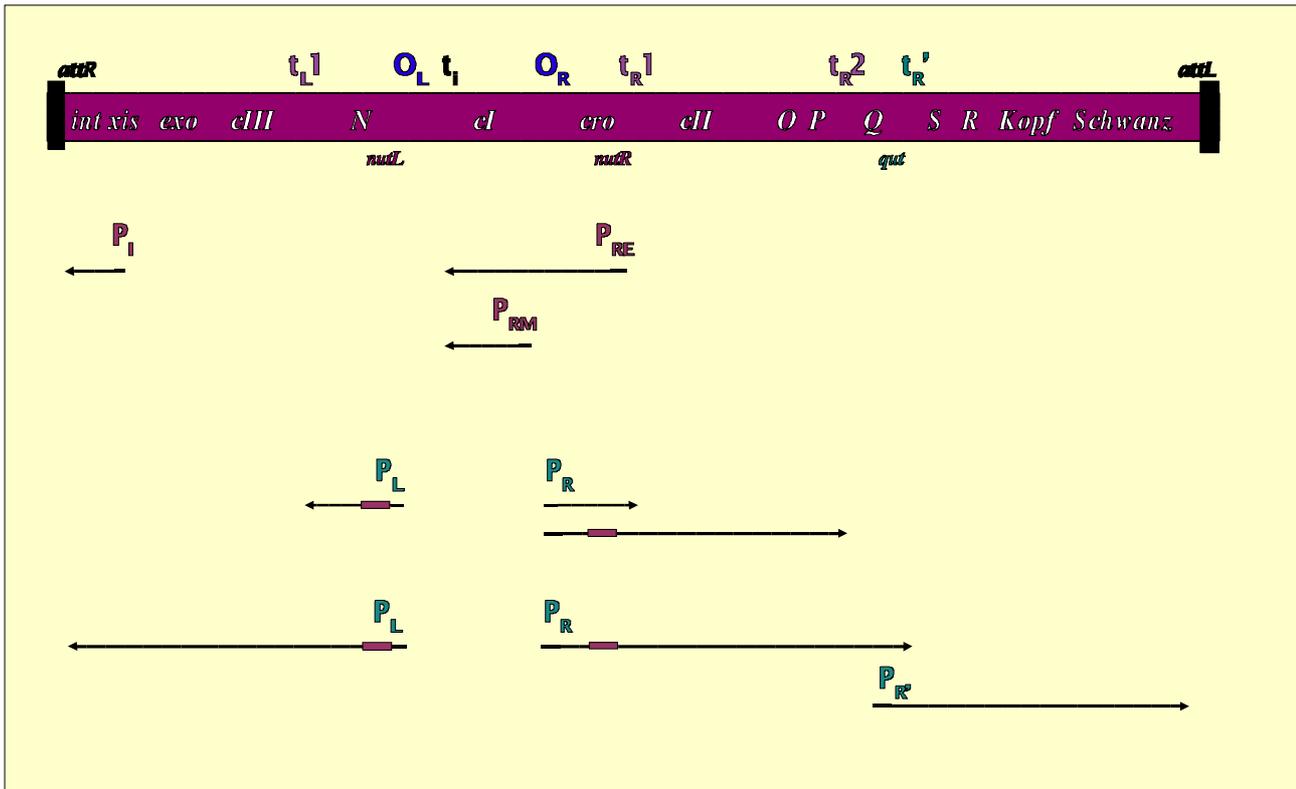


Abbildung 1.4 Der Bakteriophage λ
Elektronenmikroskopische Aufnahme eines
 λ -Phagen.
(<http://www.PhageBase.org>)

Über die Schwanzspitze adsorbiert der Phage an MalB, einen in der äußeren Zellmembran von *E. coli* lokalisierten Rezeptor, der eigentlich zur Aufnahme von Maltose dient. In der Bakterienzelle wird die lineare Phagen-DNA über ihre beiden zueinander komplementären 12 bp langen einzelsträngigen Enden (die sog. *cos*-sites; für '*cohesive end sites*') zu einem Ring geschlossen und durch die bakterielle Ligase kovalent verknüpft.

Der Phage λ gehört zu den sog. temperenten Phagen, d. h. nach der Infektion der Bakterienzelle



kann in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Wirtszelle und der sogenannten Infektionsmultiplizität (d. h. der Anzahl der Phagen in der Zelle) entweder der lytische oder der lysogene Lebenszyklus eingeleitet werden. Beim lytischen Entwicklungsweg kommt es zur verstärkten Phagenbildung und der anschließenden Lyse der Bakterienzelle. Bei der lysogenen Entwicklung werden die Gene für die lytische Vermehrung abgeschaltet und die Phagen-DNA wird in das Genom der Wirtszelle eingebaut, wo sie bis zur Induktion der lytischen Entwicklung als Prophage mitvererbt wird.

Abbildung 1.5 zeigt eine vereinfachte Genkarte des Phagen λ und die transkribierten Bereiche während der lysogenen und der lytischen Entwicklung (Friedman und Court, 2001).

1.2.2 Der lysogene Infektionsweg des Phagen λ

Bei der Einleitung der Lysogenie spielt das *cII*-Protein (*'clear'* II) die zentrale Rolle. Seine Aktivität wird durch verschiedene Wirtszell-Faktoren (Lon-Protease, Hfl AB, Him AD) und das λ -kodierte *cIII*-Protein beeinflusst.



Abbildung 1.5 Transkription im lytischen und im lysogenen Lebenszyklus des Phagen λ

Gezeigt ist eine vereinfachte Genkarte des λ-Prophagen mit den während der lysogenen und der lytischen Phase transkribierten Abschnitten und exprimierten Proteinen.

Die Antiterminationsproteine N und Q und die Position der nut- und der qut-Sequenz im λ-Genom bzw. den λ-Transkripten sind farblich gekennzeichnet.

(grün: Q, qut; magenta: N, nut)
(nach Klaus *et al.*, 1992; Friedman und Court, 2001)

Das cII-Protein ist ein Aktivator für die Promotoren P_{RE} (*repressor establishment*) und P_I (*intern*). In seiner Gegenwart wird der Genomabschnitt vom Promotor P_{RE} bis $t_{i(intern)}$ bzw. der Abschnitt *xis-int* ('*excision*', '*integration*') des λ-Genoms transkribiert. Dies führt zur Expression des cI-Proteins und der Integrase.

Durch die Integrase erfolgt der Einbau der Phagen-DNA in das Bakteriengenom an den sog. *att*-sites ('*attachment*'). Das cI-Protein ist ein Repressor, der mit hoher Affinität an die Operatoren O_R und O_L bindet. Diese Operatorstellen überlappen mit wesentlichen Elementen der Promotoren P_R und P_L , so daß diese nach der Bindung des Repressors unzugänglich für die RNA-Polymerase sind. Damit ist der größte Teil des λ-Genoms stillgelegt. Auch die Transkription des *cI*-Gens vom Promotor P_{RE} aus ist nicht mehr möglich. Der cI-Repressor liegt im Weg der RNA-Polymerase. Für den ständigen Nachschub mit Repressor sorgt jetzt der Promotor P_{RM} (*repressor maintenance*).

Die lysogene Zelle enthält etwa 100 Repressor-Moleküle, d. h. mehr als zur Blockade von P_L und P_R nötig sind. Deswegen ist eine lysogene Bakterienzelle gegen Infektionen mit λ-Phagen immun.

Die überschüssigen Repressor-Moleküle binden an die Kontrollregionen eines infizierenden Phagen und verhindern dessen Genexpression.

Über die Immunität lassen sich temperente Phagen klassifizieren (Campbell, 1994): Lambdoide Phagen, d. h. Phagen mit Kontrollregionen, die denen von λ entsprechen, werden durch den λ -Repressor stillgelegt. Dagegen können artfremde Phagen einen erfolgreichen Infektionsprozeß durchlaufen.

1.2.3 Induktion des Prophagen und lytischer Infektionsweg

Bei einer Schädigung der bakteriellen DNA, beispielsweise durch ultraviolettes Licht oder chemische Agentien, wird der λ -Repressor durch das aktivierte RecA-Protein proteolytisch gespalten und abgebaut. Damit werden die Promotoren P_L und P_R wieder frei und der lytische Infektionsweg wird eingeleitet.

Die Genexpression verläuft in drei Etappen: In der frühen Phase der Transkription werden Regulationsproteine exprimiert, in der verzögert frühen Phase erfolgt die Expression der Proteine, die für das Ausschneiden des Prophagen aus dem Wirtsgenom und die Initiation der λ -Replikation erforderlich sind, und in der späten Phase der viralen Transkription werden die Gene für die Strukturproteine der Phagenhülle und die Lysisgene exprimiert.

Während der frühen Phase der Transkription wird vom Promotor $P_{R \text{ (rechts)}}$ aus bis zum Terminator t_{R1} bzw. vom Promotor $P_{L \text{ (links)}}$ aus in der Gegenrichtung bis zum Terminator t_L transkribiert. Dabei werden die Gene N und cro exprimiert. Cro (*'control of repressor and other genes'*) bindet mit hoher Affinität an die Operatorsequenz O_R und blockiert so die Expression des cI -Repressors. Das N -Protein ist ein Antiterminator und ermöglicht die Transkription über die Terminatoren t_L , t_{R1} und t_{R2} hinaus, so daß die sog. verzögert frühen Gene O , P , Q und xis transkribiert werden können. Die von xis kodierte Excisionase wird für das Ausschneiden des λ -Prophagen aus dem Bakteriengenom benötigt. Die Proteine O und P leiten die Replikation der Phagen-DNA ein. Das Q -Protein ist ebenfalls ein Antiterminator und ermöglicht die Transkription vom stärksten λ -Promotor $P_{R'}$ aus über den Terminator $t_{R'}$ hinaus. Damit werden die Lysisgene R und S und die Gene für die Strukturproteine der Phagenhülle exprimiert.

Nach der Verpackung der Phagen-DNA und dem Zusammenbau von Phagenkopf und Phagenschwanz wird ca. 60 Minuten nach Beginn des lytischen Infektionsweges die bakterielle Zellmembran durch das von *R* kodierte Enzym Endolysin und das *S*-Genprodukt Holin lysiert und etwa 100 neue Phagen pro Bakterienzelle werden freigesetzt.

Die Genexpression im lytischen Zyklus unterliegt einer genauen zeitlichen Kontrolle. So muß z. B. sichergestellt werden, daß ausreichend Phagen-DNA repliziert wird, bevor die Strukturgene exprimiert werden bzw. daß die Lyse der Wirtszelle erst nach dem Zusammenbau der Phagenpartikel eingeleitet wird (Greenblatt, 1993).

Der Übergang in die jeweils nächste Phase der viralen Transkription wird durch die Expression der Antiterminator-Proteine N und Q reguliert, die der RNA-Polymerase das Überlesen von Terminationssignalen ermöglichen.

1.2.4 Antitermination im Infektionszyklus des Phagen λ

Die Q-abhängige Antitermination, die die Expression der späten λ -Gene einleitet, führt über die Interaktion des Q-Proteins mit der spezifischen DNA-Sequenz *qut* ('*Q utilization*') unter Beteiligung von Wirtsproteinen zur Bildung eines terminationsresistenten Transkriptionselongationskomplexes.

Die N-vermittelte Antitermination, die zur Expression der verzögert frühen Gene führt, funktioniert hingegen im wesentlichen über die Interaktion des N-Proteins mit dem auf der naszierenden mRNA liegenden *nut*-RNA-Element ('*N utilization*'), das aus den beiden funktionellen Komponenten *nutboxA* und *nutboxB* besteht. Zusätzlich sind die Wirtsfaktoren NusA ('*N-utilization substance*'), NusB, NusG und NusE (entspricht dem ribosomalen Protein S10) erforderlich (Weisberg und Gottesman, 1999).

Die N-vermittelte Antitermination

Nach der Initiation der Transkription an den Promotoren P_L und P_R dissoziiert die σ -Untereinheit von der RNA-Polymerase. Sie wird durch das NusA-Protein ersetzt, das an die elongierende

RNA-Polymerase bindet. Das N-Protein bindet nach der Transkription der *nut*-Sequenz an die *nutboxB*-Haarnadelschleife, an NusA und an die RNA-Polymerase. NusB und NusE/S10 bilden ein Heterodimer, das an die *nutboxA*-RNA und an den Kern-Terminationskomplex aus N, *nutboxB*-RNA und NusA bindet (Mason *et al.*, 1992b; Mogridge *et al.*, 1998b). NusG bindet schwach an die RNA-Polymerase, an NusB und an die *nutboxA*-RNA (Li *et al.*, 1992; Mogridge *et al.*, 1998b).

Während der weiteren Elongation bleiben das N-Protein, die Nus-Proteine und die *nutboxB*-RNA mit dem Transkriptionelongationskomplex assoziiert, wobei die naszierende RNA eine immer größer werdende Schlaufe bildet (Nodwell und Greenblatt, 1991; Whalen und Das, 1990). Der so gebildete prozessive Antiterminationskomplex (Abbildung 1.6 b) verhindert die Termination sowohl an intrinsischen, ρ -unabhängigen (t_R' und t_R2) als auch an ρ -abhängigen Terminatoren (t_{R1} , t_{L1}), die mehrere Tausend Basenpaare hinter der *nut*-Sequenz liegen (Whalen *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1992b).

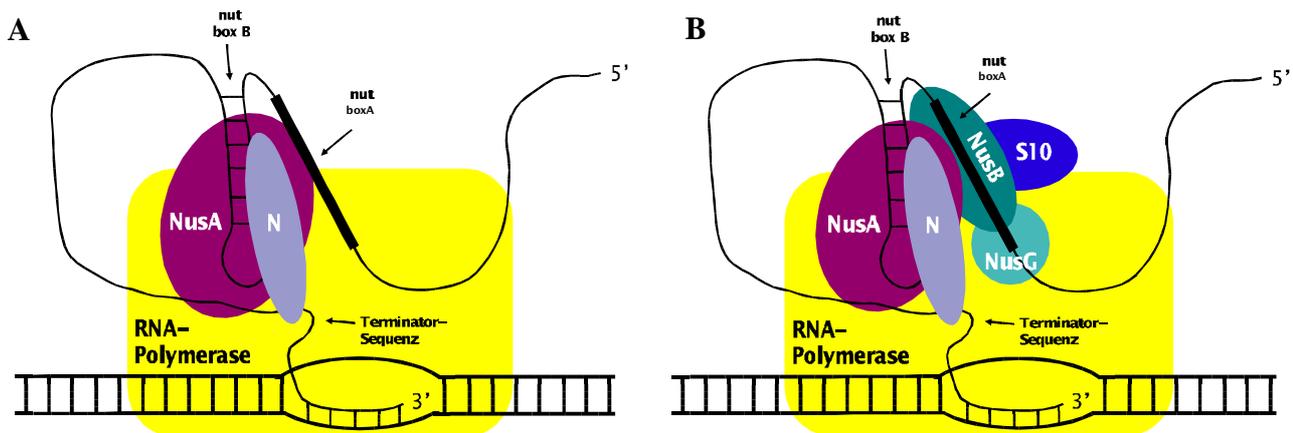


Abbildung 1.6 N-abhängige Antiterminationskomplexe

A: Modell des nicht-prozessiven Kern-Antiterminationskomplexes aus N-Protein, NusA und *nut*-RNA.

B: Modell des prozessiven Antiterminationskomplexes bestehend aus dem Kern-Antiterminationskomplex und den Nus-Proteinen G, B und E/S10)

(nach Greenblatt *et al.*, 1998)

Für den Zusammenhalt des Antiterminationskomplexes sind eine Vielzahl von Protein-Protein- und Protein-RNA-Wechselwirkungen verantwortlich (van Gilst und von Hippel, 2000). Die

zentrale Rolle bei der Antitermination selbst kommt allerdings dem ternären Komplex aus N-Protein, *nutboxB*-RNA und NusA zu (Abbildung 1.6 a). Ein Komplex aus diesen drei Komponenten ist *in vitro* und *in vivo* bereits antiterminationskompetent und kann die Termination sequenzspezifisch unterbinden, allerdings nur an Terminatoren, die nicht mehr als einige Hundert Basenpaare hinter der *nut*-RNA positioniert sind (Mogridge *et al.*, 1995). Der Beitritt der NusB-, NusE- und NusG-Proteine überführt diesen Kern-Terminationskomplex in eine prozessivere Form, die in der Lage ist, auch weiter entfernte Terminatoren zu inaktivieren (De Vito und Das, 1994; Burova *et al.*, 1995).

Auf die Bestandteile des Kern-Antiterminationskomplexes N-Protein, *nut*-RNA und NusA wird im folgenden näher eingegangen.

1.2.6 Die *nut*-RNA

Im Genom des Phagen λ sind zwei *nut*-Sequenzen kodiert: *nutL* und *nutR* sind je 60 bp lang und liegen 50 bzw. 250 bp auf der 3' Seite der dazugehörigen Promotoren p_L und p_R (Rosenberg *et al.*, 1978). Die *nut*-Sequenzen bestehen aus einem als *boxA* und einem als *boxB* bezeichneten Element (Abbildung 1.7).

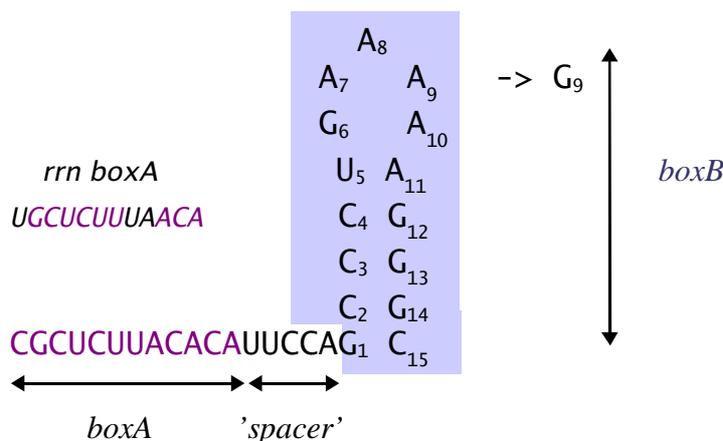


Abbildung 1.7:

Die Sequenz der λ *nutR*-RNA

Gezeigt sind die 12 bp lange *boxA*-Sequenz, die 15 Nucleotide umfassende *boxB*-Haarnadelschleife (Nummerierung nach Schärpf *et al.*, 2000) und die dazwischenliegende 'spacer'-Region. Die λ *nutL*-RNA-Sequenz ist bis auf den eingezeichneten A9G-Austausch identisch mit der *nutR*-Sequenz.

Zum Vergleich ist die *boxA*-Sequenz der ribosomalen RNA angegeben. (nach Mogridge *et al.*, 1995)

Die *nutboxA*-RNA ist 12 bp lang. Dort erfolgt die Bindung des Heterodimers aus NusB und NusE/S10 (Nodwell und Greenblatt, 1993). Die *nutboxA*-Sequenz weist eine hohe Ähnlichkeit mit

der *boxA*-Sequenz in den Operons der ribosomalen RNA (*rrn*) auf (Li *et al.*, 1984). Die *rrnboxA* ist dort hinreichend für eine Antitermination an ρ -abhängigen Terminatoren (Berg *et al.*, 1984). Das Heterodimer aus NusB und S10 bindet in diesem bakteriellen Antiterminationssystem ebenfalls an *rrnboxA*-RNA (Mason *et al.*, 1992a; Nodwell und Greenblatt, 1993).

Die *nutboxB*-RNA besteht aus einem 15 bp langen unterbrochenen Palindrom und bildet eine stabile Haarnadelschleife aus. An diesen Teil der *nut*-RNA bindet das N-Protein (Chattopadhyay *et al.*, 1995a; Mogridge *et al.*, 1995; Nodwell und Greenblatt, 1991). Durch RNase-*footprint*-Experimente und Mutationsstudien konnte eine asymmetrische Bindung von N an den Loop und an die 5'-Bereich des Stammes postuliert werden (Chattopadhyay *et al.*, 1995a).

1.2.7 Das N-Protein

Das N-Protein des Phagen λ besteht aus 107 AS und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 12298 Da. Aufgrund seiner hohen Anzahl an basischen Aminosäuren (13 Arginine und 11 Lysine) hat das N-Protein einen berechneten pI von 11,0 (Franklin und Benett, 1979). Die Sequenz und der Aufbau des λ N-Proteins sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

```

  1           11           21           31           41           51
  |           |           |           |           |           |
MDAQTRRRER RAEKQAQWKA ANPLLVGVSA KPVNRPILSL NRKPKSRVES ALNPIDLTVL

 61           71           81           91           101
  |           |           |           |           |
AEYHKQIESN LQRIERKNQR TWYSKPGERG ITCSGRQKIK GKSIPLI

```

Abbildung 1.8: Sequenz und funktionelle Domänen im N-Protein aus dem Phagen λ

Arginine und Lysine sind hervorgehoben. Das argininreiche Motiv ist blau hinterlegt, die für die Bindung an NusA verantwortliche Region violett. Die COOH-terminale Bindungsregion für die RNA-Polymerase ist gelb gekennzeichnet.
(nach Weiss, 1998)

Die Bindung des N-Proteins an die *nutboxB*-RNA erfolgt ausschließlich über das argininreiche Motiv (ARM, 'arginine rich motif') am NH₂-Terminus (Lazinski *et al.*, 1989; Mogridge *et al.*, 1998a). Der K_d für die Bindung des ARM umfassenden N(1–22)-Peptids an die *nutboxB*-RNA entspricht mit 20 nM dem K_d für die Bindung des gesamten N-Proteins an die *nutboxB*-RNA (Tan und Frankel, 1995; Chattopadhyay *et al.*, 1995a).

Weitere funktionelle Sequenzabschnitte des N-Proteins wurden durch GST-pulldown-Experimente ermittelt. Die Region von Aminosäure 34 bis 47 ist für die Bindung an NusA verantwortlich, die Interaktion mit der RNA-Polymerase erfolgt über die Reste 73 bis 107 (Mogridge *et al.*, 1998a).

In Lösung liegt das N-Protein unstrukturiert vor. Erste Hinweise hierfür lieferte bereits die Tatsache, daß N nur eine kurze Halbwertszeit von ca. 2 Minuten hat und deshalb zunächst nur schwer experimentell zugänglich war (Gottesman *et al.*, 1981). Das N-Protein ist ein Zielprotein der Lon-Protease, die entfaltete Proteine in *E. coli* abbaut (Maurizi, 1987). Wegen des schnellen proteolytischen Abbaus des N-Proteins ist die N-vermittelte Antitermination abhängig von der Syntheserate des N-Proteins.

Der unstrukturierte Zustand des N-Proteins konnte durch NMR- und CD-Spektroskopie bestätigt werden (Kirsch, 1996; Mogridge *et al.*, 1998a; Schärpf, 1999).

Erst bei Bindung an die *nutboxB*-RNA kommt es zur Strukturierung des ARM umfassenden Sequenzabschnitts, während der restliche Teil des N-Proteins weiter unstrukturiert bleibt und wahrscheinlich ebenfalls erst durch Interaktion mit den jeweiligen Bindungspartnern strukturiert wird (Van Gilst und von Hippel, 1997; Mogridge *et al.*, 1998a).

1.2.8 Die Struktur von *nutboxB*-RNA und N(1–36) im Komplex

Die Struktur eines das NH₂-terminale ARM umfassenden λN-Peptids (1–36) im Komplex mit der *nutRboxB*-RNA (s. Abbildung 1.7) wurde bereits mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Schärpf, 1999; Schärpf *et al.*, 2000).

Das argininreiche Motiv bildet im Komplex mit *nutRboxB*-RNA eine gebogene α-Helix aus. Diese bindet – wie aus früheren RNase-footprint-Experimenten vermutet – ausschließlich an den 5'-Strang des *boxB*-Stammes und die ersten drei Reste des Loops (Abbildung 1.9).

Vier der fünf Nukleotide des *boxB* Loops (G6–A7–A8–A9–A10) bilden einen Tetraloop. Das Nukleotid A9 an der vierten Position des *boxB* loops wird dazu ausgeklappt. Der resultierende

GAAA-Tetraloop weist die typische Faltung eines sog. GNRA-Tetraloops (G/N = G, A, C, U/ R = A, G/ A) auf (Heus und Pardi, 1991): Zwischen dem ersten (G6) und dem letzten Nukleotid (A10) des Tetraloops kommt es zur Ausbildung eines 'sheared basepair', eines nicht-regulären Watson-Crick-Basenpaares. Dadurch wird das Phosphatrückgrat der RNA zwischen dem ersten und dem zweiten Nukleotid stark verdreht, und die drei folgenden Purine (A7, A8 und A10) stapeln auf den 3' Strang der RNA.

Der Indolring von Tryptophan 18 des N-Peptids stapelt auf den Purinring von A7, wodurch das Peptid mit der RNA verankert wird.

Die Bindung zwischen ARM und der *nutboxB*-RNA erfolgt über eine Vielzahl von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Sequenzabschnitte außerhalb des ARM (ab Alanin 21) sind nicht an der RNA-Bindung beteiligt.

Der Komplex aus dem ein ARM umfassenden N(1-20)-Peptid aus dem Phagen P22 mit der entsprechenden P22-*nutboxB*-RNA (Cai *et al.*, 1998) und der Komplex aus λ N (1-22) mit *nutLboxB*-RNA (Legault *et al.*, 1998) weisen ähnliche Struktureigenschaften auf (Weiss, 1998).

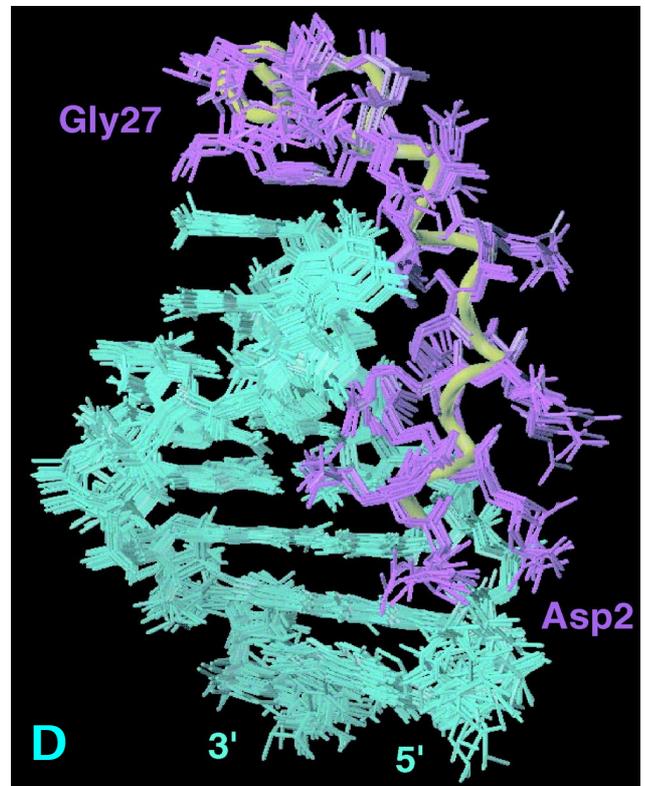
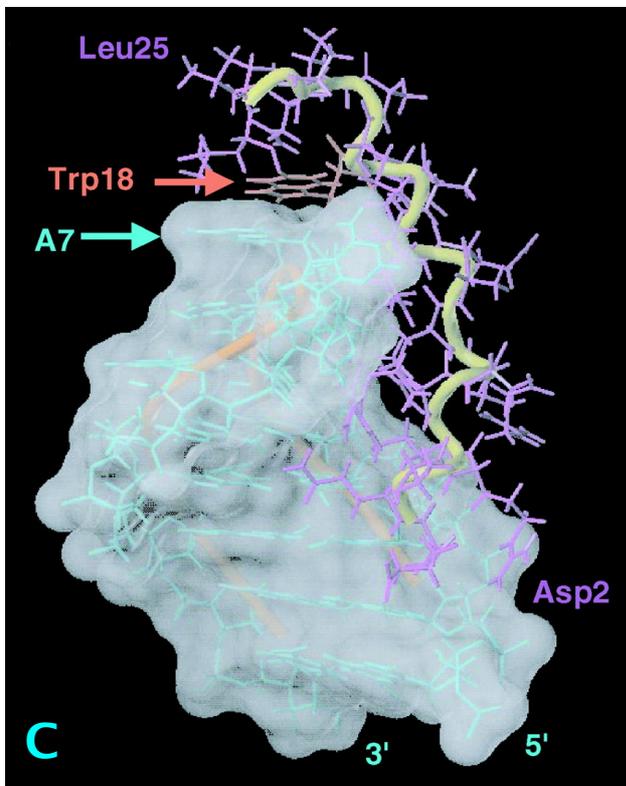
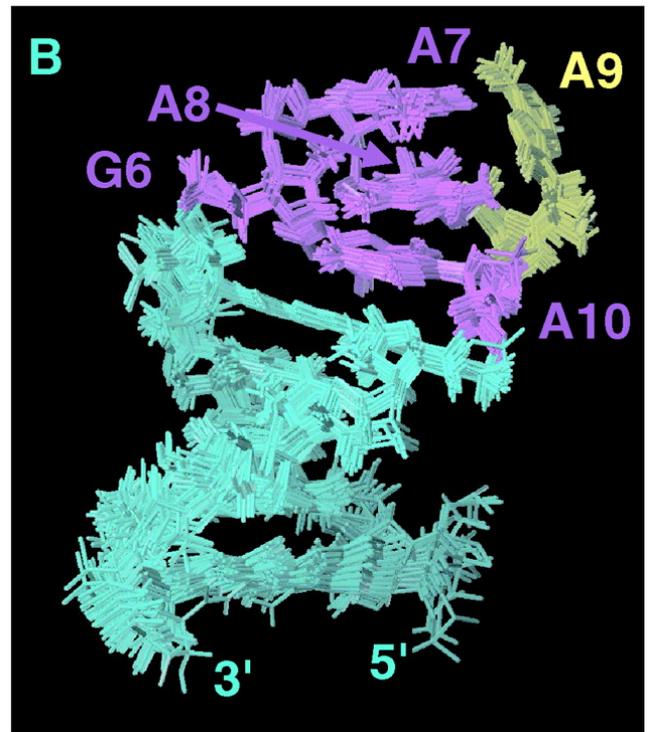
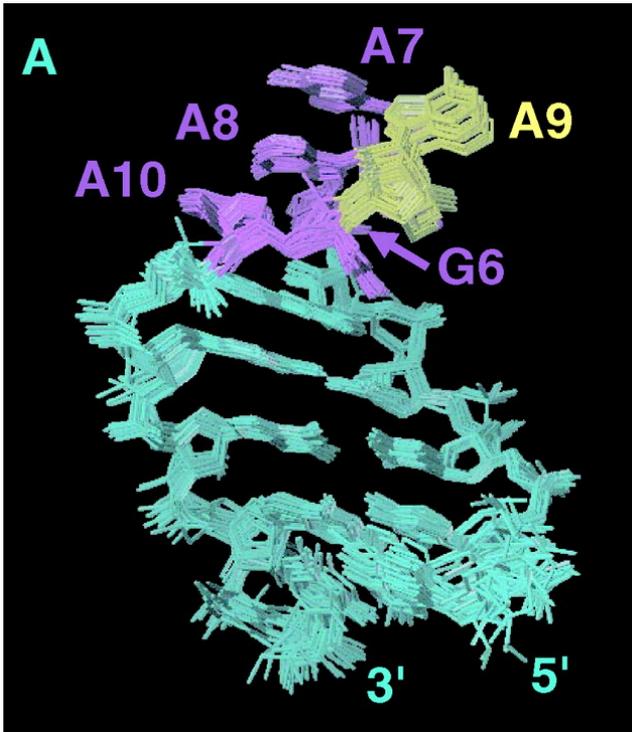
Aus Untersuchungen zur Bindung von NusA an den N-*nutboxB*-Komplex ist bekannt, daß die ausgeklappte Base des *boxB*-loops eine wichtige Rolle für die Bindung von NusA, aber keine für die N-nut-Wechselwirkung spielt. So wird bei einer Mutation des A9 zu einem Pyrimidin oder bei dessen Deletion die Bildung des N-nut-Komplexes nicht beeinträchtigt, es kommt allerdings nicht mehr zur Bildung des ternären Komplexes aus N, nut und NusA (Legault *et al.*, 1998).

Abbildungen 1.9 A und B (rechts) Die Struktur der *nutboxB*-RNA im Komplex

Die 20 energieärmsten Strukturen sind übereinander gelegt. Der Stamm bildet eine A-Helix und ist in blau dargestellt. Die vier Nukleotide, die den GNRA-Tetraloop ausbilden, sind rosa, das ausgeklappte Nukleotid A9 ist gelb eingefärbt. In Abbildung A sind nur die schweren Atome dargestellt, um die Stapelung der Basen A7, A8 und A10 auf den 3'-Strang des Stammes zu verdeutlichen. Abbildung B ist um 90° gedreht. Zwischen G6 und A10 kommt es zur Ausbildung eines 'sheared basepair'.

Abbildungen 1.9 C und D (rechts) Die Struktur des Komplexes aus λ N(1-36)-Peptid und *nutboxB*-RNA

Die *boxB*-RNA ist in blau, das N(1-36)-Peptid ist rosa eingefärbt. Das Proteinrückgrat von N(1-36) ist als gelbes Band dargestellt. Abbildung C zeigt die RNA als transparente Conolly-Oberfläche. Deutlich ist die Verbiegung der α -Helix und die Stapelung des Indolrings von Trp 18 auf A7 zu erkennen. Abbildung D zeigt die Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen.



1.2.9 Der Wirtsfaktor NusA aus *E. coli*

NusA ist ein essentielles *E. coli* Protein, das nach dem Eintritt in die Elongationsphase der Transkription an die RNA-Polymerase bindet und die Elongation, das Pausieren der RNA-Polymerase, die Termination und die Antitermination reguliert (Richardson und Greenblatt, 1996).

NusA ist mit einem Molekulargewicht von 55 kDa das größte der Nus-Proteine. Fünf funktionelle Sequenzabschnitte konnten bislang identifiziert werden (Abbildung 1.10):

Die NH₂-terminale Domäne von NusA bindet an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase (Mah *et al.*, 1999). Diese Domäne weist strukturellen Ähnlichkeiten mit der B-Kette der Rad50cd ATP binding cassette ATPase (ABC-ATPase) auf (Gopal *et al.*, 2001b).

Im Anschluß folgen drei Domänen, die durch Sequenz- und Strukturvergleiche als RNA-bindende Module identifiziert werden konnten: eine S1- und zwei KH-Domänen (Bycroft *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1993; Worbs *et al.*, 2001; Gopal *et al.*, 2001b).

Die sog. S1-Domäne ist eine RNA-bindende Domäne, die in einer Vielzahl RNA-assoziiierter Proteine vorhanden ist. Strukturell ähneln S1-Domänen dem Nukleinsäure-bindenden Kälteschockprotein und besitzen eine typische OB-Faltung (Schindelin *et al.*, 1993; Bycroft *et al.*, 1997). Ihre Bezeichnung leitet sich vom ribosomalen Protein S1 ab, das sechs S1-Domänen enthält (Subramanian, 1983). Für das S1-Protein selbst konnte eine Bindung an die *boxA*-RNA in

-

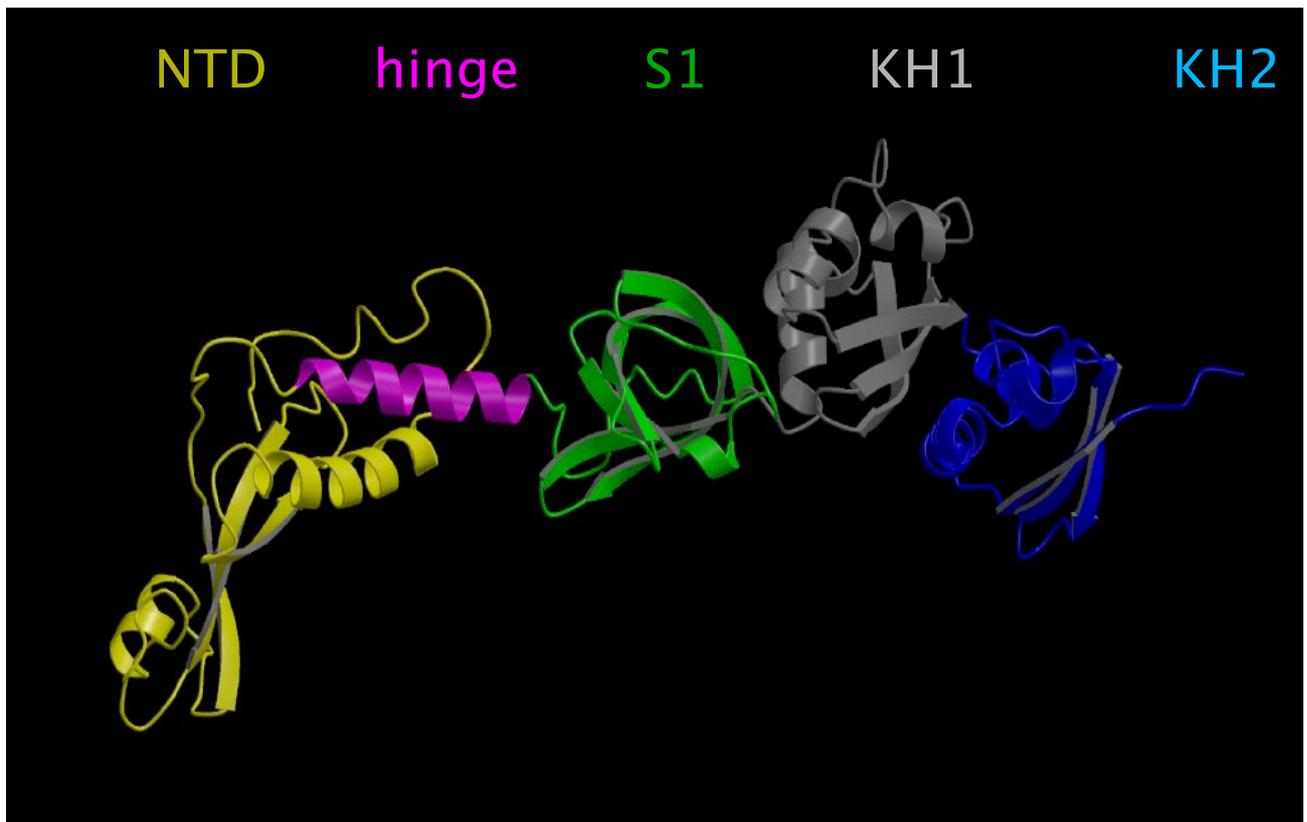
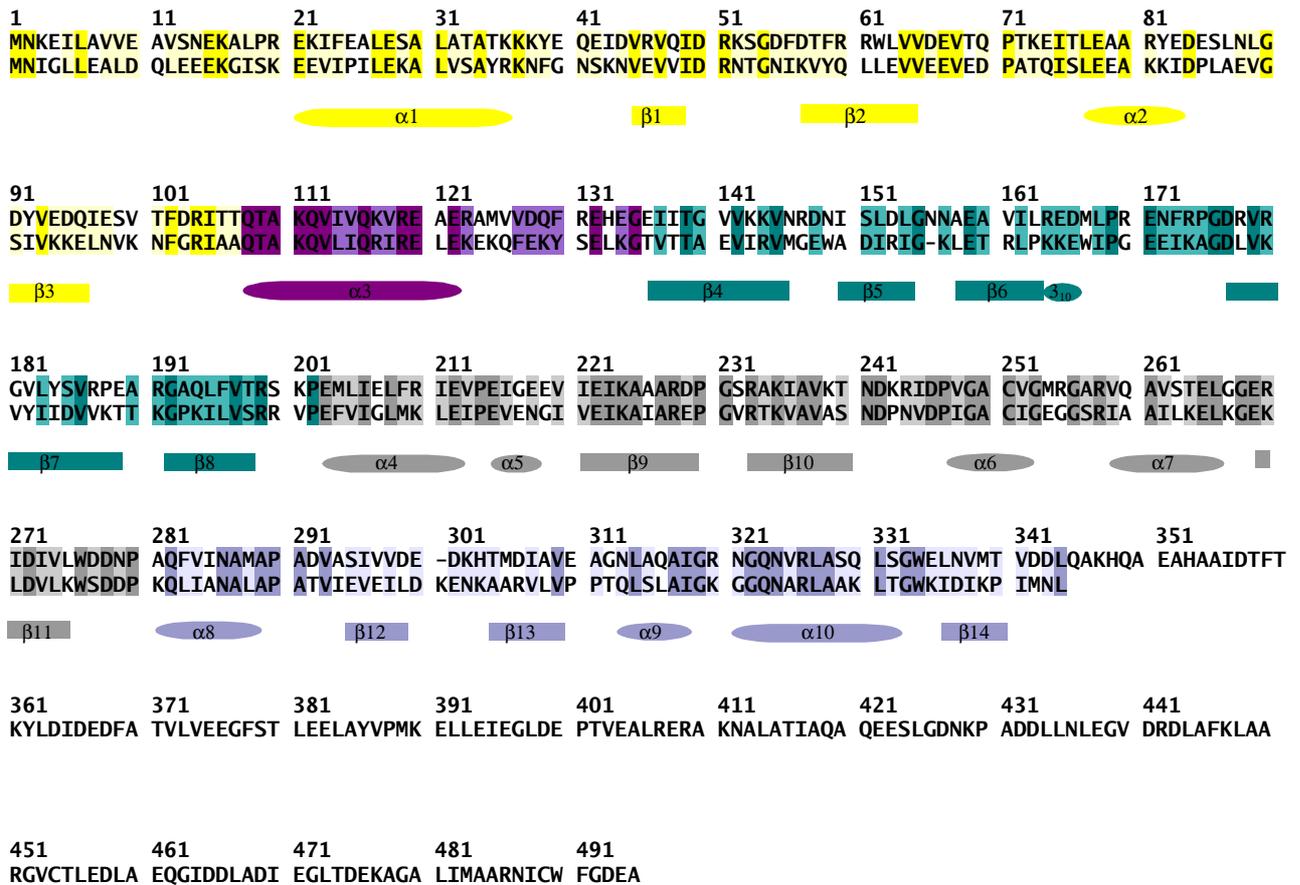
Abbildung 1.10 (oben) Sequenzalignment von NusA aus *Escherichia coli* und *Thermotoga maritima*

E. coli NusA (obere Sequenz) besitzt im Gegensatz zu *T. maritima* NusA (untere Sequenz) eine zusätzliche COOH-terminale Domäne. Die NH₂-terminalen Domänen sind gelb hinterlegt, die S1-Domänen grün, die KH1-Domänen grau und die KH2-Domänen blau. Die 'hinge'-Helix ist in violett abgebildet. Die aus der Röntgenkristallstruktur von *T. maritima* NusA ermittelte Sekundärstruktur von NusA ist unter dem Sequenzalignment symbolisiert (oval: α -Helices bzw. 3_{10} -Helix, rechteckig: β -Faltblattstränge). Identische Aminosäuren sind dunkel, ähnliche Aminosäuren sind hell hinterlegt.

Abbildung 1.10 (unten) Röntgenkristallstruktur von *T. maritima* NusA (Worbs *et al.*, 2001)

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 52 % sowie des Fehlens von *gaps* im Sequenzalignment kann von einer identischen Faltung der NusA-Proteine aus *Thermotoga maritima* und *Escherichia coli* bis Rest 340 ausgegangen werden.

Die NusA-Domänen sind farblich wie im Alignment eingefärbt.



ribosomalen Operons und auch an λ *nutboxA* nachgewiesen werden (Mogridge und Greenblatt, 1998). Deshalb wird angenommen, daß für die *in vitro* beobachtete Bindung von NusA an eine λ *nutboxA* enthaltende RNA (Tsugawa *et al.*, 1985) die S1-Domäne von NusA verantwortlich ist. Auch Mutationsstudien liefern Hinweise auf eine Beteiligung der S1-Domäne, vor allem der $\beta 5/\beta 6$ -Region, an der *nutboxA*-Bindung (Friedman *et al.*, 1990; Craven *et al.*, 1994).

Eine KH-Domäne (für Protein K-homolog) wurde erstmals im humanen heterogenen nukleären Ribonukleoprotein (hnRNP) K beschrieben (Siomi *et al.*, 1993). Während einige KH-Domänen enthaltende Proteine unspezifisch mit einzelsträngiger RNA wechselwirken, bindet das Protein Vigilin, das insgesamt 15 KH-Domänen aufweist, sequenzspezifisch an eine bestimmte mRNA (Kanamori *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2000). Eine Mutation im GXXG-Motiv der ersten KH-Domäne von NusA resultiert im Verlust der mRNA-Bindung und verhindert die N-abhängige Antitermination in λ (Worbs *et al.*, 2001).

Die COOH-terminale Domäne von *E. coli* NusA ist an der Wechselwirkung zwischen NusA und der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und der zwischen NusA und dem λ -N-Protein beteiligt (Mah *et al.*, 2000).

Diese Domäne weist Sequenzähnlichkeiten mit der NH₂-terminalen Domäne der eukaryotischen bzw. archaischen Rekombinasen Rad51 bzw. RadA, dem Helix-hairpin-Helix-Motiv bakterieller NAD⁺-DNA-Ligasen und der COOH-terminalen Domäne der α -Untereinheiten der bakteriellen RNA-Polymerase auf (Mah *et al.*, 2000). In Gelretardationsexperimenten bindet NusA nicht an *nut*-RNA. Die Deletion eines Großteils der COOH-terminalen Domäne ermöglicht jedoch die Bindung an *nut*-RNA *in vitro*. Möglicherweise autoinhibiert die COOH-terminale Domäne die RNA-Bindung durch eine Interaktion mit den RNA-bindenden S1- und KH-Domänen. Durch die Bindung der COOH-terminalen Domäne an N bzw. die α -Untereinheit der RNA-Polymerase werden die RNA-bindenden Domänen wieder zugänglich (Mah *et al.*, 2000).

Eine NusA-Mutation, die zum Verlust der gesamten COOH-terminalen Domäne führt, resultiert in einem zwar temperatursensitiven, aber sonst normalen Phänotyp. In vielen Bakterien, z.B. allen Gram-Positiven, bei den blau-grünen und den ϵ -Proteobakterien, fehlt die COOH-terminale Domäne ganz. In diesen Organismen erfolgt die Interaktion mit der RNA-Polymerase ausschließlich über deren β -Untereinheit und die NH₂-terminale Domäne von NusA (Tsugawa *et al.*, 1988).

Die Kristallstrukturen zweier verkürzter NusA-Proteine wurden kürzlich aufgeklärt: NusA aus *Thermotoga maritima* (Abbildung 1.10; Worbs *et al.*, 2000) und aus *Mycobacterium tuberculosis* (Gopal *et al.*, 2001b).

Abbildung 1.11 faßt die beschriebenen Interaktionen zwischen NusA, nut-RNA und N-Protein zusammen.

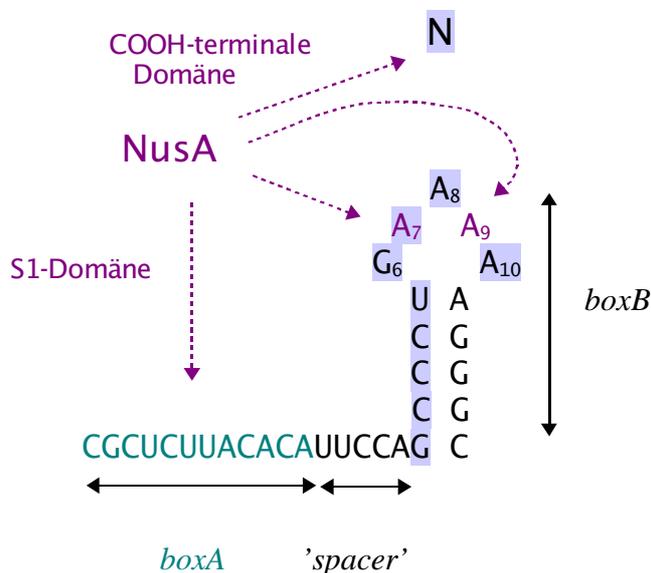


Abbildung 1.11 Die Wechselwirkungen zwischen NusA, λ nut-RNA und λ N

Die ARM-Domäne von λ N bindet an den 5' Stamm der nutboxB-RNA und an den GNRA-Loop (blau hinterlegte Nukleotide). Die COOH-terminale Domäne von NusA interagiert mit den Aminosäuren 34 bis 47 von λ N.

Die S1-Domäne bindet wahrscheinlich über die boxA-Sequenz an die nut-RNA. Ob die der S1-Domäne benachbarten KH-Domänen, insbesondere KH 1, für die Interaktion von NusA mit dem aus dem GNRA-Tetraloop ausgeklappten A9 der nutboxB-RNA verantwortlich sein könnten, ist noch unbekannt. Die violett eingefärbten Reste des boxB-Loops führen bei Mutation zum Verlust der Bindung von NusA an den N-nut-Komplex. (nach Greenblatt *et al.*, 1998)

1.2.10 Der Mechanismus der N-vermittelten Antitermination

Der eigentliche Mechanismus der Antitermination, der die RNA-Polymerase dazu veranlaßt, Terminationssignale zu überlesen, ist jedoch weitgehend unverstanden. Neue Hinweise ergeben sich aus den Arbeiten von Gusarov und Nudler (2001): Da das N-Protein in hohen Konzentrationen unter bestimmten Voraussetzungen *in vitro* auch ohne nut-RNA oder NusA an den intrinsischen Terminatoren t_{R2} und t_R Antitermination induzieren kann (Rees *et al.*, 1996), muß in diesen Fällen der Interaktion zwischen N und der RNA-Polymerase die entscheidende Rolle bei der

Antitermination zukommen. Die *nut*-RNA, NusB, NusG, NusE und die argininreiche Domäne von N scheinen demnach für die sequenzspezifische Rekrutierung des N-Proteins zum Transkriptionselongationskomplex und für die korrekte Positionierung des N-Proteins auf der RNA-Polymerase nötig zu sein. Durch 'Crosslink'-Experimente konnte gezeigt werden, daß N im Elongationskomplex mit einem 18 bis 24 Nukleotide vom katalytischen Zentrum der RNA-Polymerase entfernten Bereich der naszierenden RNA wechselwirkt. Während der Termination entspricht diese Position dem 5' liegenden Abschnitt der noch nicht ausgebildeten Terminations-Haarnadelschleife. N verhindert durch seine Interaktion mit dem 5'-Abschnitt die Annäherung des 5'-Abschnittes an den 3'-Abschnitt und so die Ausbildung der Haarnadelschleife.

NusA hingegen fördert – bei Abwesenheit von N – die Ausbildung von Hairpin-Strukturen, indem es im Elongationskomplex schwache Protein-RNA-Interaktionen zwischen der RNA-Polymerase und der naszierenden RNA destabilisiert, die die Haarnadelschleifen-Bildung behindern könnten (Gusarov und Nudler, 2001).

1.3 Die Nun-vermittelte Termination

λ *nutboxB*-RNA, NusA und die anderen Nus-Proteine sind jedoch nicht nur Komponenten bei der λ -N-vermittelten Antitermination, sondern sie sind auch Bestandteile eines Komplexes, der zur Termination der Transkription führt. In diesem Komplex ist λ -N durch Nun ersetzt, ein Protein des lambdoiden Phagen HK022. Die Unterschiede zwischen den beiden homologen Proteinen N und Nun, die zu ihren gegensätzlichen biologischen Aktivitäten führen, sind Gegenstand intensiver Forschung (Weisberg und Gottesman, 1999).

1.3.1 Das Nun-Protein des lambdoiden Phagen HK022

Das *nun*-Gen liegt im HK022-Genom an einer Position, die der des *N*-Gens im λ -Genom entspricht. Nun selbst wird weder für die lytische noch die lysogene Entwicklung des Phagen HK022 benötigt (Oberto *et al.*, 1989). HK022 Prophagen exprimieren konstitutiv einen *cI*-Repressor und Nun. Der Repressor verhindert – wie im λ -Prophagen – die lytische Entwicklung von HK022. Die Aufgabe des Nun-Proteins ist die Aufrechterhaltung der Immunität gegenüber

einer Superinfektion mit λ (Cam *et al.*, 1991). Nun bindet hierbei kompetitiv mit dem λ -N-Protein an die λ -*nutboxB*-RNA (Hung und Gottesman, 1995). Nun fungiert hierbei als Terminator der Transkription an oder nahe der *nut*-Sequenz von λ und verhindert die Ausbildung eines N-vermittelten Antiterminationskomplexes (Robert *et al.*, 1987).

Nun hat ein berechnetes Molekulargewicht von 13108 Da und einen ähnlich hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren wie λ -N (pI 9.5). Die Sequenz des Nun-Proteins ist in Abbildung 1.12 dargestellt.

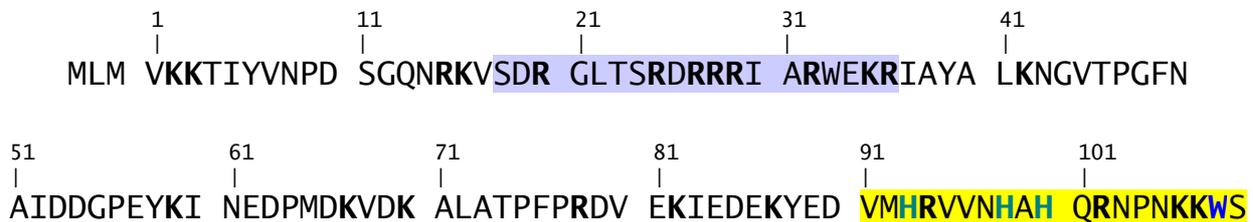


Abbildung 1.12: Aminosäuresequenz von HK022 Nun

Die Aminosäuresequenz beruht auf der Sequenz des *nun*-Gens aus HK022. Die Nummerierung erfolgt nach Oberto *et al.* (1989). Diese klonierten ein Fragment des *nun*-Gens, in dem das erste und zweite Codon fehlten. Das erhaltene Genprodukt war – laut NH₂-terminaler Ansequenzierung – um das vom dritten Codon kodierte Methionin verkürzt, weshalb standardmäßig das vom vierten Codon kodierte Valin als erste Aminosäure bezeichnet wird. Arginine und Lysine sind fett gedruckt. Das ARM ist blau, die 19 COOH-terminalen Reste, die an der Bindung an NusA bzw. die RNA-Polymerase beteiligt sind, sind gelb hinterlegt. Die in grün eingefärbten Reste His93, His98 und His100 sind an der Zn²⁺-Koordination beteiligt. Trp 108 erwies sich in Mutationsstudien als essentiell für die Terminationsaktivität von Nun.

Nun aus HK022 und N aus λ besitzen nur eine geringe Sequenzhomologiet von ca. 20 Prozent. Ihre NH₂-terminalen Bereiche besitzen jedoch große Ähnlichkeit (Abbildung 1.13): Auch Nun enthält in diesem Bereich ein argininreiches Motiv, das für die Bindung an die λ -*nutboxB*-RNA verantwortlich ist (Chattopadhyay *et al.*, 1995).

Eine Nun-Mutante, bei der die 19 COOH-terminalen Reste deletiert sind, bindet die RNA-Polymerase und auch NusA *in vitro* nicht mehr und führt *in vitro* und *in vivo* zum Transkriptionsarrest (Watnick und Gottesman, 1998).

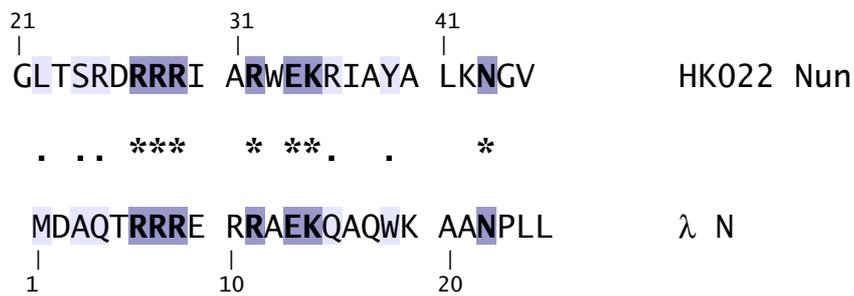


Abbildung 1.13 Sequenzalignment der NH₂-terminalen Bereiche von HK022 Nun und λ N.

Ähnliche Aminosäuren sind hell hinterlegt und durch Punkte markiert, identische Aminosäuren sind dunkel hinterlegt und durch Sterne gekennzeichnet. Die abgebildeten ARM-Domänen von λ N und HK022 Nun sind funktionell untereinander austauschbar (Henthorn und Friedman, 1996).

Crosslink-Experimente zeigten, daß der COOH-Terminus von HK022 Nun im Transkriptionselongationskomplex die Matrizen-DNA kontaktiert (Watnick und Gottesman, 1999). Tryptophan 108 scheint hierfür essentiell zu sein, da Mutationen zu Alanin oder Leucin die Terminationsaktivität von Nun blockieren (Watnick *et al.*, 2000).

Die Koordination von Zn²⁺-Ionen über 3 Histidin-Reste in COOH-Terminus von Nun verhindert die Bindung des argininreichen Motivs im NH₂-Terminus an nut-RNA (Watnick *et al.*, 2000; Watnick und Gottesman, 1998). Erst bei Bindung von NusA an den COOH-Terminus kommt es bei hohen Zn²⁺-Konzentrationen zur Ausbildung des Nun-nut-Komplexes. Dieser Komplex ist *in vitro* terminationsinkompetent. NusG, NusB und NusE sind für die Arretierung der Transkription zusätzlich erforderlich (Watnick und Gottesman, 1998).

1.3.2 Die Struktur von HK022 Nun(20–44) und λ-nutboxB-RNA im Komplex

Die NMR-Struktur des Komplexes aus λ-nutboxB-RNA und einem die argininreiche Domäne umfassenden Nun-Peptid aus HK022 (Abbildung 1.14) zeigt, daß die Bindung von Nun(20–44) an die nutboxB-RNA sehr ähnlich wie die Bindung von N(1–36) an die nutboxB-RNA erfolgt (Becker, 2001; Faber *et al.*, 2001).

Das Nun-Peptid bildet ebenfalls eine gebogene α-Helix aus und bindet die nutboxB-RNA auf der

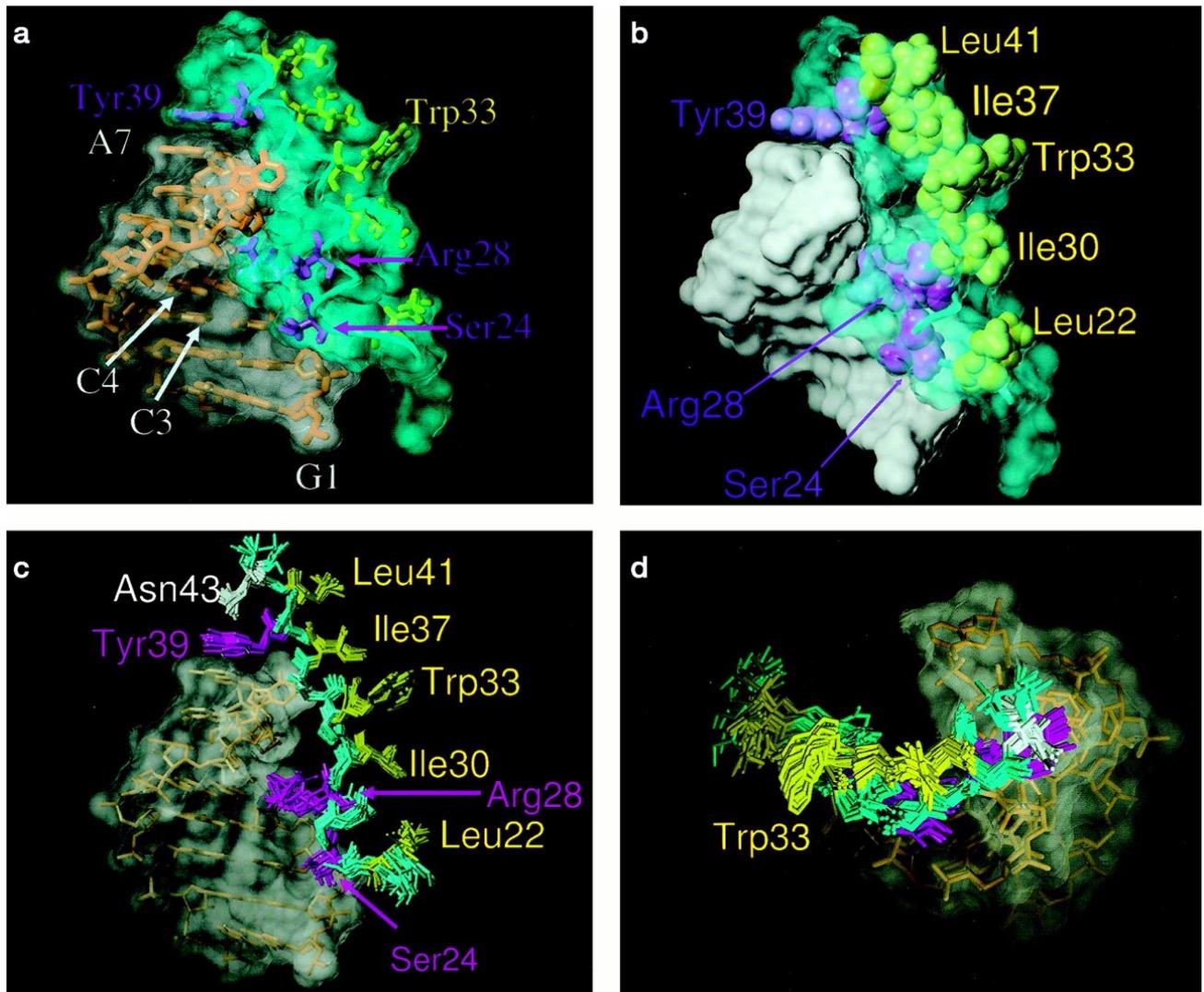


Abbildung 1.14 a: Die energieärmste Struktur des Nun(20–44)–nutboxB-Komplexes.

Die RNA-Oberfläche ist als durchscheinend graue, die Peptidoberfläche als durchscheinend hellblaue Conollyoberfläche dargestellt. Die RNA ist als Stabmodell (orange), das Peptidrückgrat in cyan abgebildet. Mit der RNA wechselwirkende Aminosäuren sind in magenta eingefärbt, Aminosäuren, die eine hydrophobe Oberfläche ausbilden, in gelb. Das Peptid bindet in die große Furche der RNA und bildet eine gebogene α -Helix. Tyrosin 39 stapelt auf A7.

Abbildung 1.14 b: Raumfüllende Darstellung des Komplexes.

Die hydrophoben auf der lösungsmittlexponierten Seite liegenden Reste des Nun-Peptids bilden ein hydrophobes Netzwerk (in gelb dargestellt).

Abbildung 1.14 c: Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen

A7, Tyrosin 39 und Asparagin 43 zeigen die gleichen strukturellen Charakteristika wie A7, Tryptophan 18 und Asparagin 22 im N(1–36)–nutboxB–RNA-Komplex. Asparagin 43 packt auf die aromatische Seitenkette von Tyrosin 39, die auf A7 stapelt.

Abbildung 1.14 d: Aufsicht auf die hydrophoben Reste

Die hydrophoben Reste an der lösungsmittlexponierten Seite bilden eine Struktur, die an einen scharfgeschnittener Grat erinnert.

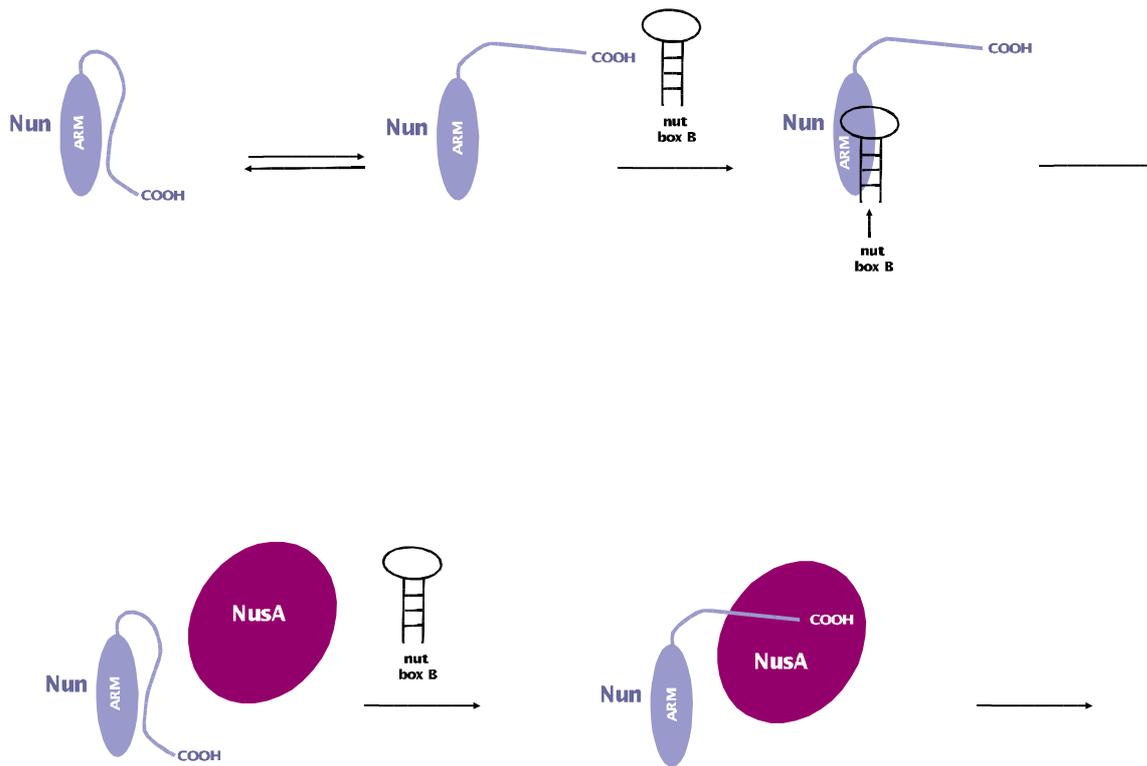


Abbildung 1.15: Modell zur Erklärung der Wechselwirkungen zwischen Nun, nutboxB-RNA, NusA und RNAP (obere Zeile)

Der COOH-Terminus von Nun blockiert die NH_2 -terminale ARM-Region. Diese inaktive Konformation wird durch die Bindung von Zn^{2+} an den COOH-Terminus stabilisiert. Ohne Zn^{2+} bindet Nun über das ARM an nutboxB und über COOH-terminale Reste an die RNAP. Dieser Komplex ist *in vitro* eingeschränkt terminationsaktiv.

5'-Seite an der großen Furche und im Loopbereich. Im Unterschied zum N-nutboxB-Komplex ist im Nun-nutboxB-Komplex jedoch die lösungsmittellorientierte Peptidoberfläche auf der der Peptid-RNA-Bindungsfläche gegenüberliegenden Seite durch ein Netzwerk hydrophober Kontakte gekennzeichnet, die zusammen mit dem ausgeklappten Nukleotid des GNRA-Loops eine Erkennungsfläche für *E. coli* Wirtsfaktoren bei der Ausbildung des spezifischen Terminationskomplexes an den nut-Sequenzen des Phagen λ darstellen könnten.

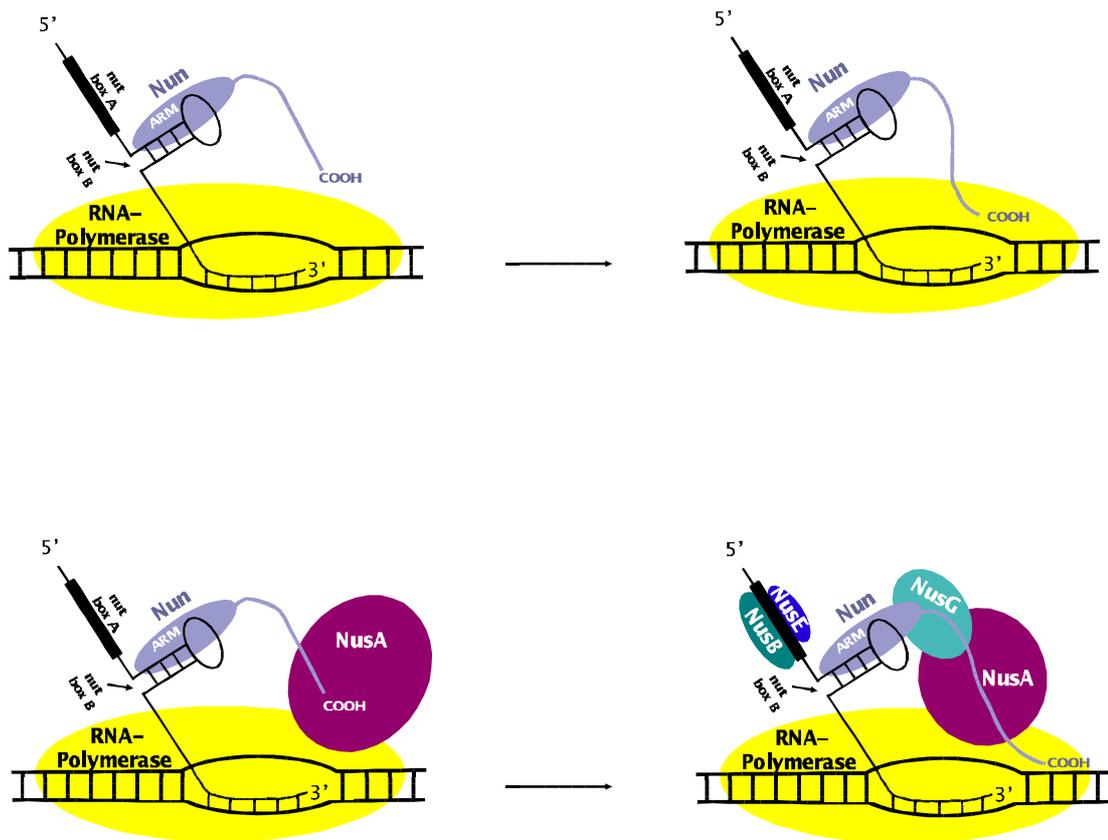


Abbildung 1.15: Modell zur Erklärung der Wechselwirkungen zwischen Nun, nutboxB-RNA, NusA und RNAP (untere Zeile)

NusA bindet auch in Gegenwart von Zn^{2+} an COOH-terminale Reste von Nun und überführt Nun in die boxB-bindungsaktive Konformation. Der NusA-Nun-boxB-Komplex ist jedoch nicht terminationskompetent, da die Bindung von NusA die Interaktion von Nun mit der RNAP verhindert. Die Bindung von NusB, NusE und NusG führt zur Umlagerung von NusA im Komplex und überführt den Komplex in seine terminationsaktive Konformation.

(nach Watnick *et al.*, 1998)

1.3.3 Der Mechanismus der Nun-vermittelten Termination

Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen nut-RNA, Nun, NusA und der RNA-Polymerase *in vitro* zeigten, daß der COOH-Terminus von Nun in Gegenwart von Zn^{2+} die Bindung an nutboxB-RNA inhibiert, indem er die argininreiche NH_2 -terminale Domäne verdeckt und Nun in einer inaktiven Form hält. Erst die Bindung von NusA an den COOH-Terminus setzt die RNA-bindende Domäne frei und Nun kann an nutboxB-RNA binden (Watnick *et al.*, 1998).

Der Komplex aus Nun, nut-RNA und NusA bewirkt jedoch weder *in vitro* noch *in vivo* einen

Transkriptionsstop. Vermutlich verhindert NusA eine Wechselwirkung des Nun–COOH–Terminus mit der RNA–Polymerase. Erst die Bindung von NusB, NusE und NusG macht den Komplex terminationskompetent (Robert *et al.*, 1987; Robledo *et al.*, 1991). In Mutationsstudien erwies sich NusG als essentiell für die Nun–vermittelte Termination an *nutR* und *nutL* (Burova *et al.*, 1999). Vermutlich bindet NusG über die exponierte hydrophobe Kontaktfläche der argininreichen Domäne an den Komplex aus Nun und *nutboxB*–RNA und führt zur Rekrutierung der anderen Nusfaktoren (Faber *et al.*, 2001). Dabei kommt es entweder zur Freisetzung von NusA oder zu dessen Umlagerung innerhalb des Komplexes (Abbildung 1.15).

Der COOH–terminale Bereich von Nun bindet in einer Zn^{2+} –abhängigen Reaktion an die β' –Untereinheit der RNA–Polymerase (Abbildung 1.16). Dabei wird vermutlich ein Zn^{2+} –Ion von zwei Histidinen von Nun und vier Cysteinen des aminoterinalen Zinkfingers der β' –Untereinheit in einer ungewöhnlichen oktaedrischen Konformation koordiniert (Watnick *et al.*, 2000).

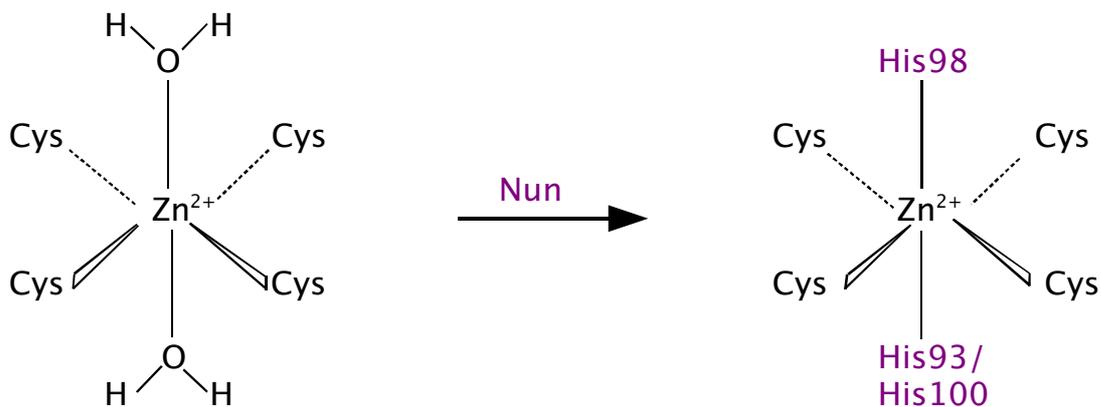
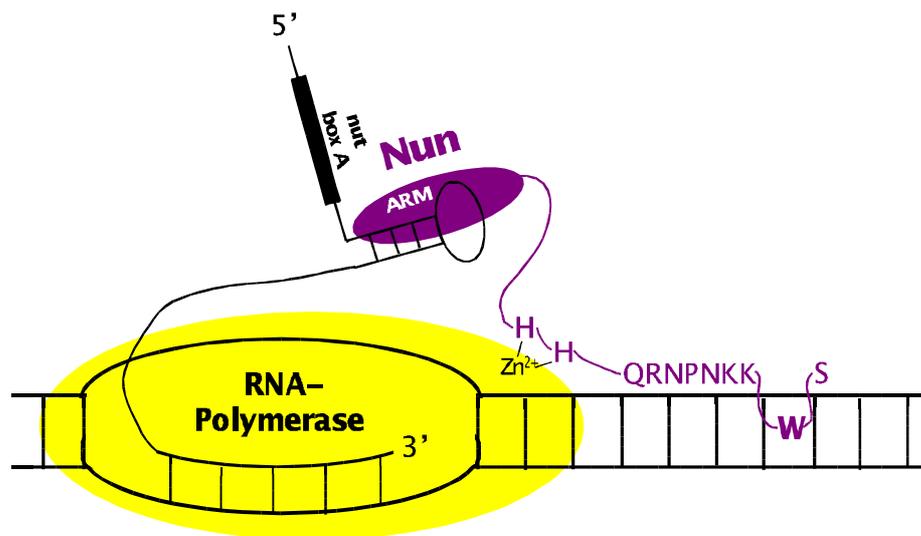


Abbildung 1.16 Oktaedrische Zinkkoordination

Im NH_2 –terminalen Zinkfinger der β' –Untereinheit der RNA–Polymerase ist ein Zinkkation über vier Cysteine und zwei Wassermoleküle oktaedrisch koordiniert. Zwei Histidine von Nun verdrängen bei der Bindung an die RNA–Polymerase die Wassermoleküle.

Durch basische Reste von Nun, die COOH–terminal zu den an der Zn^{2+} –Bindung beteiligten Histidinen liegen, wird der COOH–Terminus von Nun so zur DNA–Matrize orientiert, daß eine Interkalation von Tryptophan 108 in die Matrizen–DNA möglich wird (Watnick und Gottesman, 1999; Watnick *et al.*, 2000). Nun wirkt dadurch wie ein Bremsarm, der die Translokation der RNA–Polymerase verhindert und auf diese Weise die Transkription terminiert (Abbildung 1.17).

**Abbildung 1.17: Modell zur Terminationsaktivität von Nun**

Der COOH-Terminus von Nun bindet an die β' -Untereinheit der RNA-Polymerase. Dabei wird ein Zinkkation durch zwei Histidine von Nun und vier Cysteine des Zinkfingermoduls der β' -RNAP komplexiert. Basische Reste COOH-terminal zu den Histidinen orientieren Trp 108, das direkt mit der DNA-Matrize wechselwirkt und die Translokation der RNAP blockiert.

(nach Watnick *et al.*, 2000)

2 ZIELE

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, für NMR-spektroskopische Untersuchungen ausreichende Mengen (typischerweise im Milligramm-Bereich) folgender viraler Regulator-Proteine zu erhalten:

- Transaktivator-Protein Tat aus dem Arthritis-Enzephalitis-Virus der Ziege (CAEV)
- Terminator-Protein Nun aus dem lambdoiden Phagen HK022
- Antiterminator-Protein N aus dem Bakteriophagen λ

Zu diesem Zweck sollten effiziente bakterielle Expressions- und Reinigungsprotokolle etabliert werden, um eine spätere Isotopenmarkierung der Proteine, die für weitergehende NMR-Studien erforderlich ist, ermöglichen zu können.

Durch erste strukturelle Charakterisierungen der exprimierten Proteine mittels CD- und NMR-Spektroskopie sollte die Eignung der einzelnen Proteinproben für eine Strukturaufklärung mittels NMR hinsichtlich ihres Löslichkeitsverhaltens und eventueller Aggregationstendenzen bei NMR-typischen Konzentrationen von ca. 1 mM beurteilt werden.

Falls die Probeneigenschaften nicht ausreichend für weitergehende NMR-spektroskopische Untersuchungen sind, sollte versucht werden, diese zu verbessern (z.B. durch die Einführung von Mutationen).

Für erste Untersuchungen zur Interaktion des *E. coli*-Proteins NusA mit einem Komplex aus λ N(1-53) und *nutboxB*-RNA mittels NMR sollten ausreichende Mengen an NusA-Protein bereitgestellt werden.

Für spätere Studien einer möglichen Interaktion von CAEV-Tat mit Jun und Fos sollten die entsprechenden Nukleotidsequenzen beschafft bzw. generiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Es wurden ausschließlich Bakterien der Spezies *Escherichia coli* verwendet.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA</i> , <i>argF</i>)U169, ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, k ⁻	Jessee (1986)
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Grant et al. (1990)
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>lon</i> ⁻	Studier und Moffat (1986), Grodberg und Dunn (1988)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , (DE3), <i>lon</i> ⁻	Studier und Moffat (1986), Grodberg und Dunn (1988)
Rosetta TM (<i>E. coli</i> BL21 / pRARE)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>lon</i> ⁻ , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , pRARE (Cm ^R)	Novagen, Madison, USA
Rosetta TM (DE3) (<i>E. coli</i> BL21 DE3 / pRARE)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>lon</i> ⁻ , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> (DE3), pRARE (Cm ^R)	Novagen, Madison, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Codon-Plus-RIL	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> , (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , <i>gal</i> , <i>endA</i> , Hte [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , Cam ^R]	Stratagene, La Jolla, USA

Tabelle 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Angegeben sind die Namen der *E. coli*-Stämme, ihr Genotyp und dazugehörige Referenzen.

3.1.1 *E. coli* DH5 α und *E. coli* Top10

Zur Transformation rekombinanter Plasmide und zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Stämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* Top10 verwendet.

Diese Stämme zeichnen sich durch ihre hohe Transformationseffizienz aus. Das Fehlen von Restriktionsenzymen (*hsdR*) verhindert den Abbau der Plasmid-DNA. Ein Einbau des Plasmids in die chromosomale DNA ist bei diesen rekombinationsnegativen (*recA1*) Stämmen nicht möglich.

Der Marker $\phi 80lacZ\Delta M15$ eröffnet zusätzlich die Möglichkeit der α -Komplementation, hiervon wurde allerdings in dieser Arbeit kein Gebrauch gemacht.

3.1.2 *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 (DE3)

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die Stämme *E. coli* BL21 bzw. *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Diese Stämme sind restriktionsnegativ (*hsdS*), zudem fehlen die Proteasen OmpT und Lon.

Für die Expression von Proteinen, deren Gene unter Kontrolle des *tac*-Promotors stehen, wurde *E. coli* BL21 verwendet.

Der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) zeichnet sich gegenüber *E. coli* BL21 dadurch aus, daß zusätzlich der Bakteriophage DE3 –ein λ -Derivat– als Prophage im Bakterienchromosom eingebaut ist. In das *int*-Gen von DE3 sind das für den Lactoserepressor kodierende Gen *lacI* und das Gen für T7 RNA-Polymerase inseriert. Das Gen für T7 RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors und des *lacO*-Operators. Dieser Promotor ist durch IPTG induzierbar, so daß nach IPTG-Zugabe die T7 RNA-Polymerase exprimiert wird. Diese transkribiert ausschließlich unter Kontrolle des T7 Promotors stehende Gene. Dieser Stamm wurde daher zur Expression rekombinanter Proteine, deren Gene unter der Kontrolle des T7 Promotors und des *lacO*-Operators stehen, eingesetzt.

3.1.1 Rosetta, Rosetta DE3 und *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL

Bei diesen Stämmen handelt es sich um *E. coli* BL21- bzw. *E. coli* BL21 (DE3)-Derivate, die zusätzliche plasmidal kodierte tRNA-Gene besitzen.

Der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL verfügt über zusätzliche Gene für tRNAs, die die

Codons AGA/AGG (*argU*), AUA (*ileY*) und CUA (*leuW*) erkennenden, die Rosetta–Stämme kodieren zusätzlich für tRNAs, die die Codons CCC (*proL*) und GGA (*glyT*) erkennen. Diese Codons sind in *E. coli* selten und entsprechend geringe tRNA–Mengen für diese Codons stehen zur Verfügung.

Diese Stämme wurden für die Expression von Proteinen verwendet, deren Gene mehrere dieser in *E. coli* seltenen Codons enthalten.

3.2 Plasmide

Die kommerziell erhältlichen bzw. von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellten Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Herkunft
pBlueskript II KS Phagemid	Ap	Klonierungsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pGEX–4T–2	Ap	Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg
pGEX–6P–2	Ap	Expressionsvektor	Amersham Biosciences, Freiburg
pET 11a	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 16b	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 19b	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 28c(+)	Kan	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 31b(+)	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 32a(+)	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pET 43a(+)	Ap	Expressionsvektor	Novagen, Madison, USA
pCAL–n	Ap	Expressionsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pTKK19	Kan	Expressionsvektor	Dr. Toshiyuki Kohno, Tokio, Japan
pUBS 520	Kan	kodiert für tRNA ^{AGG/AGA}	Prof. Dr. R. Mattes, Universität Stuttgart

Tabelle 3.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Plasmide

Angegeben sind jeweils der Name des Plasmids, die selektierbare Antibiotikaresistenz, der Verwendungszweck und die Quelle.

Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die vom I.M.A.G.E. Consortium über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) bezogenen Klone.

RZPD/IMAGE Identifikationsnummer	Vektor	Restistenz	Kodierte Sequenz
IMAGp998F066235Q2 IMAG:2504837	pT7T3D–Pac	Ampicillin	kodiert für Fos (1–170)
IMAGp998L197579Q2 IMAG:3125922	pCMV–SPORT6	Ampicillin	kodiert für Fos (1–170)
IMAGp998M166255Q2 IMAG:2512695	pT7T3D–Pac	Ampicillin	kodiert für Fos (1–175)
IMAGp998O218740Q2 IMAG:3583724	pCMV–SPORT6	Ampicillin	kodiert für Fos (121–265)
IMAGp998I147767Q2 IMAG:3178837	pT7T3D–Pac	Ampicillin	kodiert für Fos (184–380)
IMAGp998E099135Q2 IMAG:3964784	pCMV–SPORT6	Ampicillin	kodiert für Jun (5–292)
IMAGp998M168809Q2 IMAG:3648183	pT7T3D–Pac	Ampicillin	kodiert für Jun (109–331)

Tabelle 3.3 Verwendete I.M.A.G.E.–Klone

Aufgeführt sind die Identifikationsnummern des RZPD und des I.M.A.G.E. Consortiums, die zugrundeliegenden Vektortypen und ihre Resistenzen sowie die enthaltenen Nukleotidsequenzen.

In Tabelle 3.4 sind die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten und aus Vorarbeiten von Schwarz (1999) bzw. Dr. Silke Hoffmann und Dr. Manuela Schärpf erhaltenen Plasmide aufgeführt. Die jeweiligen Resistenzen lassen sich von den zugrundeliegenden kommerziellen Plasmiden ableiten.

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft [Kennziffer]
pLN 5 (pET 16b)	kodiert für (His) ₁₀ -Xa-λN (1-107)	Dr. Silke Hoffmann/ Dr. Manuela Schärpf
pTKK19-λN(1-53)	kodiert für (His) ₁₀ -EK-Ubiquitin-λN (1-53)-Fusionsprotein	diese Arbeit, [1]
pBlueskript-Nun-syn	enthält synthetisches HK022 <i>nun</i> -Gen	diese Arbeit, [2]
pET 11a-Nun	kodiert für HK022 Nun-Protein (-3-109) ohne Affinitätsanhang	diese Arbeit
pTKK 19-Nun (-3-44)	kodiert für (His) ₁₀ -EK-Ubiquitin-HK022 Nun (-3-44)-Fusionsprotein	diese Arbeit, [3]
pTKK 19-Nun (45-109)	kodiert für (His) ₁₀ -EK-Ubiquitin-HK022 Nun (45-109)-Fusionsprotein	diese Arbeit, [4]
pBlueskript-NusA (1-495)	enthält <i>nusA</i> -Gen aus <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [5]
pTKK19-NusA (1-495)	kodiert für (His) ₁₀ -EK-PreScission- <i>E. coli</i> -NusA (1-495)-Fusionsprotein	diese Arbeit
pBlueskript-Fos (1-380)	enthält <i>c-fos</i> -Gen	diese Arbeit, [6]
pBlueskript-Fos-bZIP (129-212)	enthält die für die basische und Leucin-Zipper-Region von Fos kodierende Nukleotidsequenz und die Nukleotidsequenz für eine NH ₂ -terminale PreScission-Spaltstelle	diese Arbeit, [7]
pBlueskript-Fos-bZIP (129-F212Y)	s.o. zusätzlich Austausch von Phe 212 zu Tyr	diese Arbeit
pBlueskript-Jun (1-331)	enthält <i>c-jun</i> -Gen	diese Arbeit, [8]
pBlueskript-Jun-bZIP (222-331)	enthält die für die basische und Leucin-Zipper-Region von Jun kodierende Nukleotidsequenz und die Nukleotidsequenz für eine NH ₂ -terminale Xa-Spaltstelle	diese Arbeit, [9]
pBlueskript-Jun-bZIP (222-F331Y)	s.o. zusätzlich Austausch von Phe 331 zu Tyr	diese Arbeit
pGEX-6P-2-Jun-bZIP (222-331)	kodiert für GST-PreScission-Xa-JunbZIP (222-331)-Fusionsprotein	diese Arbeit

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft
pGEX-6P-2-Jun-bZIP (222-F331Y)	kodiert für GST-PreScission-Xa-JunbZIP (222-F331Y)-Fusionsprotein, zusätzlich Austausch von Phe 331 zu Tyr	diese Arbeit
pGEX-4T-2-CAEV-Tat	kodiert für GST-Thrombin-CAEV-Tat	Schwarz, 1999
pGEX-6P-2-CAEV-Tat	kodiert für GST-PreScission-CAEV-Tat	Schwarz, 1999; [10]
pGEX-6P-2-CAEV-Tat- C76S-C78S-C81S	kodiert für GST-PreScission-CAEV-Tat, zusätzlich Austausch der Aminosäuren Cys 76, Cys 78 und Cys 81 gegen Serin	Schwarz, 1999; [11]
pGEX-6P-2-CAEV-Tat- IR	kodiert für GST-PreScission-CAEV-Tat, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> (Ile 25, Arg35)	Schwarz, 1999; [12]
pGEX-6P-2-CAEV-Tat- L	kodiert für GST-PreScission-CAEV-Tat, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> (Leu 49, 52, 54, 62, 85, Pro 73, 76, 80, Gly 82)	Schwarz, 1999; [12]
pGEX-6P-2-CAEV-Tat- IRL	kodiert für GST-PreScission-CAEV-Tat, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> (Ile 25, Arg35, Leu 49, 52, 54, 62, 85, Pro 73, 76, 80, Gly 82)	diese Arbeit, [12]
pCAL-n-CAEV-Tat-IRL	kodiert für CAEV-Tat-Xa-CBP, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [13]
pET 31b-CAEV-Tat- IRL-Xa	kodiert für CAEV-Tat-Xa-(His) ₆ , zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [14]
pET 31b-CAEV-Tat- IRL-PreScission	kodiert für CAEV-Tat-PreScission-(His) ₁₀ , zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [15]
pET 31b-CAEV-Tat- IRL-Strep	kodiert für CAEV-Tat-Strep, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [16]
pET 28c-CAEV-Tat IRL-Xa	kodiert für CAEV-Tat-Xa-Spacer-(His) ₆ , zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [17]
pET 28c-CAEV-Tat IRL-PreScission	kodiert für CAEV-Tat-PreScission- Spacer-(His) ₆ , zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [18]

Bezeichnung	Eigenschaft	Herkunft
pET 19b–CAEV–Tat IRL–Xa	kodiert für CAEV–Tat–Xa–Spacer–(His) ₆ , zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET 19b–CAEV–Tat IRL–tagless	kodiert für CAEV–Tat ohne Affinitätsanhang, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [19]
pET 16b–CAEV–Tat– C76S–C78S–C81S	kodiert für CAEV–Tat ohne Affinitätsanhang, zusätzlich Austausch der Aminosäuren Cys 76, Cys 78 und Cys 81 gegen Serin	diese Arbeit, [20]
pET 32a–CAEV–Tat– IRL–C76S–C78S–C81S	kodiert für CAEV–Tat ohne Affinitätsanhang, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> und Austausch der Aminosäuren Cys 76, Cys 78 und Cys 81 gegen Serin	diese Arbeit, [21]
pTKK19–Ubi–CAEV– Tat–IRL	kodiert für (His) ₁₀ –EK–Ubiquitin–CAEV–Tat Fusionsprotein, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i>	diese Arbeit, [22]
pTKK19–Ubi–CAEV– Tat–IRLC76S–C78S– C81S	kodiert für (His) ₁₀ –EK–Ubiquitin–CAEV–Tat Fusionsprotein, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> und Austausch der Aminosäuren Cys 76, Cys 78 und Cys 81 gegen Serin	diese Arbeit, [23]
pTKK19–CAEV–Tat– IRL–C76S–C78S–C81S	kodiert für CAEV–Tat ohne Affinitätsanhang, zusätzliche Anpassungen an die <i>codon usage</i> von <i>E. coli</i> und Austausch der Aminosäuren Cys 76, Cys 78 und Cys 81 gegen Serin	diese Arbeit

Tabelle 3.4 Konstruierte Plasmide

Die Namen der Plasmide leiten sich vom zugrundeliegenden Vektor und dem kodierten Gen ab. Die Eigenschaften des kodierten Proteins sind aufgeführt. Die Abkürzungen bedeuten dabei: (His)₁₀ bzw. (His)₆: Dekä- bzw. Hexa–Histidinanhang; EK: Enterkinasespaltstelle; Xa: Faktor Xa–Spaltstelle; PreScission: PreScission–Spaltstelle; GST: Glutathion–S–Transferase; CBD: Calmodulin *binding peptide*; Strep: Strep–tag

3.3 Oligonukleotide

In Tabelle 3.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG–Biotech (Ebersberg), BioTez (Berlin–Buch), Operon (Hilden) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

Name	Sequenz	Länge	Funktion
N(1–53) 5'	5' – [p]ATG GAT GCA CAA ACA CGC CG – 3'	20mer	[1]
N (1–53)3'	5' – GGA GGA GCT CAG CTC AAT TTA GTG – CGC TTT CTA CTC GTG – 3'	39mer	[1]
Nun 5'	5' – GGA GGA CTC GAG CAT ATG C – 3'	19mer	[2]
Nun 3'	5' – GGA GGA AAG CTT GCT CAG C – 3'	19mer	[2]
Nun coding 1	5' – GGA GGA CTC GAG CCA TGG TGA AAA – AAA CCA TTT ATG TGA ACC CGG ATA – GTG GCC AGA ACC GCA AAG TGA GCG – ATC GCG G – 3'	79mer	[2]
Nun noncoding 2	5' – [p]CAG CGC GTA CGC AAT GCG TTT TTC– CCA GCG CGC AAT GCG GCG CCG ATC – GCG AGA CGT CAG GCC GCG ATC GCT – CAC TTT GC – 3'	81mer	[2]
Nun coding 3	5' – [p]CGC ATT GCG TAC GCG CTG AAA AAC – GGC GTG ACC CCG GGC TTT AAC GCA AT– T GAT GAT GGC CCG GAA TAT AAA ATT – AAC G – 3'	80mer	[2]
Nun noncoding 4	5' – [p]CCA CAT CAC GTG GAA ACG GGG TCG – CCA GCG CTT TAT CCA CTT TAT CCA TCG – GAT CTT CGT TAA TTT TAT ATT CCG GGC – C – 3'	80mer	[2]
Nun coding 5	5' – [p]CCG TTT CCA CGT GAT GTG GAA AAA – ATT GAA GAT GAA AAA TAT GAA GAT G – TG ATG CAT CGC GTG GTG AAC CAT GCG – C – 3'	76mer	[2]
Nun noncoding 6	5' – GGA GGA AAG CTT GCT CAG CTT AAC TC – C ATT TTT TGT TCG GGT TGC GCT GAT GC – G CAT GGT TCA CCA CGC – 3'	69mer	[2]
Nun fill 1	5' – GGT TCT GGC CAC TAT CCG GGT TCA CAT – AAA TGG TTT TTT TCA CCA TCA GCA TAT – GCT CGA GTC CTC C – 3'	67mer	[2]
Nun fill 2	5' – [p]CCT GAC GTC TCG CGA TCG GCG CCG – C AT TGC GCG CTG GGA AAA A – 3'	43mer	[2]
Nun fill 3	5' – [p]ATC ATC AAT TGC GTT AAA GCC CGG – GGT CAC GCC GTT TTT – 3'	39mer	[2]

Name	Sequenz	Länge	Funktion
Nun fill 4	5' – [p]AAG ATC CGA TGG ATA AAG TGG ATA – AAG CGC TGG CGA CC – 3'	38mer	[2]
Nun fill 5	5' – [p]GAT GCA TCA CAT CTT CAT ATT TTT C– AT CTT CAA TTT TTT – 3'	39mer	[2]
Nun fill 6	5' – ATC AGC GCA ACC CGA ACA AAA AAT G– GA GTT AAG CTG AGC AAG CTT TCC – 3'	51mer	[2]
NunNterm5'	5' – [p]ATG CTG ATG GTG AAA AAA ACC – 3'	21mer	[3]
NunNterm3'	5' – GGA GGA AAG CTT GCT CAG CTC AGC C– GT TTT TCA GCG CGT AC – 3'	41mer	[3]
NunCterm5'	5' – [p]GTG ACC CCG GGC TTT AAC GC – 3'	20mer	[4]
NusA 5'	5' – GGA GGA AGC TTC ATA TGC TGG AAG T– GC TGT TTC AGG GCC CGA TGA ACA AA – G AAA TTT TGG – 3'	60mer	[5]
NusA 3'	5' – GGA GGA GGA TCC TCA CGC TTC GTC A– CC GAA CCA GC – 3'	35mer	[5]
NusA seq	5' – CAT CTC TCT GGA TCT GGG C – 3'	19mer	[5]
Fos vorn 5'	5' – GGA GGA GAA TTC CTG GAA GTG CTG T– TT CAG GGC CCG CAT ATG ATG TTC TC – G GGC TTC – 3'	57mer	[6]
Fos vorn 3'	5' – GGC AAT TTC GGT CTG CAG GGC GCT T – TT CTC ATC TTC TAG TTG GTC – 3'	45mer	[6]
Fos vorn 3' II	5' – GTT GGC AAT TTC GGT CTG CAG GGC G – CT TTT CTC ATC TTC TAG TTG GTC TGT – CTC C – 3'	55mer	[6]
Fos hinten 5'	5' – GAA AAG CGC CCT GCA GAC CGA AAT T – GC CAA CCT GCT GAA GGA G – 3'	43mer	[6]
Fos hinten 3'	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAC A – GG GCC AGC AGC GTG G – 3'	40mer	[6]
Fos bZIP 5'	5' – GGA GGA GGA TCC ATT GAA GGA CGT G – TA GAG CAG CTA T – 3'	37mer	[7]

Name	Sequenz	Länge	Funktion
Fos bZIP 3'	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAG – AAG CCA AGG TCA T – 3'	37mer	[7]
Fos bZIP 3' F212Y	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAG – TAG CCA AGG TCA T – 3'	37mer	[7]
Fos bZIP 5' II	5' – GGA GGA GGA TCC CAT ATG CTG GAA – GTG CTG TTT CAG GGC CCG GTG GAA – CAG TTA TCT CC – 3'	59mer	[7]
Fos bZIP 3' II	5' – GGA GGA GCG GCC GCG CTC AGC TCA – GAA GCC CAG GTC ATC AGG G – 3'	43mer	[7]
Fos bZIP 3' II F212Y	5' – GGA GGA GCG GCC GCG CTC AGC TCA – GTA GCC CAG GTC ATC AGG G – 3'	43mer	[7]
Jun vorn 5'	5' – GGA GGA GAA TTC CTG GAA GTG CTG – TTT CAG GGC CCG CAT ATG ACC GCG – AAA ATG GAA ACG ACC TTC TAC G – 3'	70mer	[8]
Jun vorn 3'	5' – GGA GGA GGA TCC GCT GCC GCC TGC – TAC TGA GGC CAC C – 3'	37mer	[8]
Jun hinten 5'	5' – GGA GGA GGA TCC GGC GGC TTC AGC – GCC AGC CTG C – 3'	34mer	[8]
Jun hinten 3'	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAA – AAT GTT TGC AAC TGC – 3'	39mer	[8]
Jun repair 5'	5' – GCA GGC GGC AGC GGA TCC GGC GGC – TTC AGC GCC AGC CTG C – 3'	40mer	[8]
Jun repair 3'	5' – [P]GCA GGC TGG CGC TGA AGC CGC CGG – ATC CGC TGC CGC CTG C – 3'	40mer	[8]
Jun bZIP 5'	5' – GGA GGA GGA TCC ATT GAA GGA CGT – CTG CAG GCC CTG AAG GAG G – 3'	43mer	[9]
Jun bZIP 3'	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAA – AAT GTT TGC AAC TGC – 3'	39mer	[9]
Jun bZIP 3' F331Y	5' – GGA GGA GCG GCC GCC TCG AGT CAA – TAT GTT TGC AAC TGC – 3'	39mer	[9]

Name	Sequenz	Länge	Funktion
c-Tat 5'	5' – GGA GGA CTC GAG GGA TCC ATG AGT – GAA G AA CTG CCT CGT GAA AGA GAG – G – 3'	49mer	[10]
c-Tat 3'	5' – GGA GGA CTC GAG TTA TGA CCC CCA CC– C TGG G–3'	31mer	[10]
c-Tat-cys- 3'	5' – GGA GGA CTC GAG TTA TGA CCC CCA CCC – TGG GTT AGA TAG TCT AGA TCC AGA AGG – CCT AAT CAC AGG – 3'	66mer	[11]
c-Tat-IR 3'	5' – GCT TGC ACG TTG CCA GGT GTC CCT TTC – TCT TTC CCA GAT GTT CCT TAC – 3'	48mer	[12]
c-Tat-L 3'	5' – GGA TGT TTC CAC ATC CAT TTT TGC ATT – TCC CTC AGT ACT TTT CTT CTA TGT CTG C – CC AGT CTC AGC ATT GCC AGC CAT CTT T – GC–3'	84mer	[12]
c-Tat-L 5'	5' – GCA AAA ATG GAT GTG GAA ACA TCC – GAA GGC GCC GGT GAT TAG GCC GTG T– GG TTG CAG ACT GTG TAA CCC – 3'	69mer	[12]
c-Tat II 5'	5' – GGA GGA CAT ATG AGT GAA GAA CTG C– CT CG – 3'	29mer	[13,14,15, 16,19,20]
c-Tat- Pres 3'	5' – GGA GGA CAT ATG GCG GCC TTC AAT T– GA CCC CCA CCC TGG GTT – 3'	42mer	[13]
c-Tat Xa 3'	5' – GGA GGA CTC GAG GCG GCC TTC AAT TG– A CCCA CCA CCC CCA CCC TGG GTT – 3'	42mer	[14]
c-Tat Pres His10 3'	5' – GTG GTG GGG CCC CTG GAA CAG AAC – TTC CAG TGA CCC CCA CCC TGG – 3'	48mer	[15]
c-Tat Pres His10 5'	5' – GTT CTG TTC CAG GGG CCC CAC CAC – CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC – TGA GAT – 3'	54mer	[15]
c-Tat Strep 3'	5' – GGA GGA GCT CAG CTC ACT TTT CGA – ACT GCG GGT GGG ACC ATG ACC CCC – ACC CTG G GT T – 3'	58mer	[16]
c-Tat 5' II	5' – GGA GGA AAG CTT TCA TGA GTG AAG – AAC T GC C – 3'	31mer	[17]
c-Tat Xa Spacer 3'	5' – GGA GGA TCT AGA GGA TCC CCG CGG – CCT TC A ATT GAC C – 3'	37mer	[17]

Name	Sequenz	Länge	Funktion
c-Tat Pres Spacer 3'	5' – GGA GGA TCT AGA GGA TCC AGC GGG – CCC T GG AAC AGA ACT TCC AGT GAC – CCC CAC CC T GGG – 3'	60mer	[18]
c-Tat Cys ⁻ 3' II	5' – GGA GGA CTC GAG TTA TGA CCC CCA – CCC T GG GTT AGA CAG TCT GGA ACC – AGA CGG CCT AAT CAC CGG – 3'	66mer	[21]
c-Tat Cys ⁻ 3' III	5' – GGA GGA GGA TCC CTC GAG TTA TGA – CCC CCA CCC TGG GTT AG – 3'	41mer	[21,23]
c-Tat Ubi	5' – [p]ATG AGT GAA GAA CTG CCT CG – 3'	20mer	[22,23]
pGEX 5'	5'– CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG–3'	23mer	[*]
pGEX 3'	5'– GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG T–3'	22mer	[*]
T7 Promotor	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'	20mer	[*]
T7 Terminator	5' – CAA GAC CCG TTT AGA GG – 3'	17mer	[*]
pUCseq	5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3'	17mer	[*]
pUCseq rev	5' – GGA AAC AGC TAT GAC CAT G – 3'	19mer	[*]
T3	5' – AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG – 3'	20mer	[*]

Tabelle 3.5 **Verwendete Oligonukleotide**

Angegeben sind die Bezeichnung, die Sequenz in 5'→3' Richtung und die Länge. In eckigen Klammern sind die Kennziffern der Plasmide (s. Tabelle 3.4) angegeben, die unter Verwendung des jeweiligen Oligonukleotids konstruiert wurden. Mit [*] sind vektorspezifische Oligonukleotide gekennzeichnet, die für Sequenzierungen bzw. bei der Kolonie-PCR verwendet wurden.

3.4 Nährmedien

Für Flüssigmedien wurden die nachfolgenden Zusammensetzungen verwendet. Die Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien noch 15 g Agar pro Liter Medium zugesetzt.

Die Sterilisation erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren bei 121°C (Autoklav Typ 23, bzw. Varioklav, Melag, Berlin).

Für die Herstellung von Selektivmedien wurde den sterilisierten Medien nach Abkühlen auf etwa

50°C sterilfiltriertes (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) Ampicillin, Chloramphenicol bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, 32 µg/ml bzw. 50 µg/ml zugegeben.

3.4.1 LB–Medium (Luria Bertani)

10 g Pepton (tryptisch verdaut)
5 g Hefe
10 g NaCl
ad 1000 ml mit H₂O

3.4.2 SOC–Medium

Pepton
(tryptisch verdaut) 20 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 0,5 g
250 mM KCl 10 ml
ad 1000 ml mit H₂O

Der pH–Wert wurde durch Zugabe von 5 M KOH–Lösung auf 7,0 eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 10 ml SOC–Medium 50 µl 1M MgSO₄ und 200 µl 1 M Glukose zugegeben.

3.4.3 TB–Medium

Hefeextrakt 12 g
Pepton (tryptisch verdaut) 6 g
Glycerin 2 ml
KH₂PO₄ 1,16 g
K₂HPO₄ 6,27 g
ad 500 ml mit H₂O, pH 7

3.4.4 Minimalmedium M9

Dem Minimalmedium M9 nach Sambrook *et al.*(1989) wurde die Spurenelementelösung TS2 zugegeben (Meyer und Schlegel, 1983).

5 x M9–Medium:	NaHPO ₄ · 12 H ₂ O	85,5 g
	KH ₂ PO ₄	15,0 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5,0 g
	<i>ad</i> 1000 ml mit H ₂ O	

TS2:	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	100 mg
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	30 mg
	H ₃ BO ₃	300 mg
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200 mg
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	900 mg
	Na ₂ SeO ₃	20 mg
	<i>ad</i> 1000 ml mit H ₂ O	

Zur Herstellung von 1 l Minimalmedium wurden 200 ml 5 x M9 mit 800 ml Wasser versetzt und autoklaviert. Dazu wurden folgende autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Lösungen gegeben:

1 M MgSO ₄	2,0 ml
TS2–Lösung	2,0 ml
10 mM Fe(III)citrat	1,0 ml
50 % (w/v) Glukose	8,0 ml
1 M CaCl ₂	100 µl
0,5 % Vitamin B1	100 µl

3.5 Enzyme, Standards und Chemikalien

Enzyme, Nukleinsäurestandards, Proteinstandards und Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biotech (Freiburg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu (Gaiberg), MBI–Fermentas (Vilna, Litauen), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) bzw. Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.6 Sonstige Materialien

Chromatographie-Läufe wurden mit Hilfe einer P1-Pumpe (Amersham Biotech, Freiburg) durchgeführt bzw. über ein ÄKTApurifier 10-System (Amersham Biotech, Freiburg) bzw. über ein Kontron HPLC-System (Kontron, Eching) gesteuert.

Verwendete Chromatographie-Säulen:

Die verwendeten Säulen sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

Entsalzen

HiPrep 26/10 Desalting Column (Amersham Biotech, Freiburg)

NAP-10 (Amersham Biotech, Freiburg)

NAP-25 (Amersham Biotech, Freiburg)

Größenausschlußchromatographie

Superdex 75 HR 30/10 (Amersham Biotech, Freiburg)

HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (Amersham Biotech, Freiburg)

Ionenaustauschchromatographie

HiTrap IEX Selection Kit (Amersham Biotech, Freiburg):

- SP Sepharose Fast Flow
- CM Sepharose Fast Flow
- SP Sepharose XL

MonoS[®] HR 5/5 (Amersham Biotech, Freiburg)

HiPrep 16/10 Sepharose CM Fast Flow (Amersham Biotech, Freiburg)

CM Sepharose Fast Flow/XK16/20-Säulenmantel (Amersham Biotech, Freiburg)

Affinitätschromatographie

GSTrap Fast Flow (Amersham Biotech, Freiburg)

Glutathion Sepharose 4 Fast Flow/XK16/20-Säulenmantel (Amersham Biotech, Freiburg)

HiTrap Heparin (Amersham Biotech, Freiburg)

Heparin Sepharose 6 Fast Flow/XK26/20-Säulenmantel (Amersham Biotech, Freiburg)

HiTrap Chelating HP (Amersham Biotech, Freiburg)

HisTrap Kit (Amersham Biotech, Freiburg)

Chelating Sepharose Fast Flow/XK 16/20–Säulenmantel (Amersham Biotech, Freiburg)

TALON–Superflow (Clontech, Heidelberg)

TALON 1ml SpinSäulen (Clontech, Heidelberg)

Streptavidin–Sepharose (IBA, Berlin)

Calmodulin Sepharose 4B (Invitrogen)

Hydrophobe Interaktionschromatographie

HiTrap HIC Selection Kit (Amersham Biotech, Freiburg):

- HiTrap Phenyl Fast Flow (high sub)
- HiTrap Phenyl Fast Flow (low sub)
- HiTrap Butyl Fast Flow
- HiTrap Octyl Fast Flow

Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)/XK 16/20–Säulenmantel (Amersham Biotech, Freiburg)

***reversed phase*–Chromatographie**

Waters C18: PrepLC™ 25 mm Module (Waters, Milford, Massachusetts, USA)

Tabelle 3.6 Verwendete Chromatographiesäulen

Aufgeführt sind die die kommerziell erworbenen vorgepackten Säulen bzw. bei selbstgepackten Säulen das Säulenmaterial und die Bezeichnung des verwendeten Säulenmantels.

Verschiedenes

Sartolon–Blotting–Membran (Sartorius, Göttingen)

Spectra/Por–Dialyseschläuche mit 1000 Da Molekulargewicht–Ausschlußgrenze (Spectrum, Houston, USA)

PVDF–Membran

Amicon / Centrikon (Millipore)

CentriPrep (Millipore)

3.7 Absorptionsmessung

Absorptionsmessungen im UV–VIS–Bereich wurden mit einem Uvikon 930 Zweistrahl–Spektralphotometer (Kontron, Eching) durchgeführt. UV–Absorptionsbestimmungen wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Für Messungen im sichtbaren Bereich wurden Polystyrol–Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Roth, Karlsruhe) verwendet.

3.7.1 Bestimmung der Bakteriendichte

Trübungsmessungen von Bakterienkulturen erfolgten bei 600 nm, wobei eine Absorptionseinheit (OD_{600}) einer Bakteriendichte von etwa 1×10^9 Zellen/ml entspricht. Als Referenzlösung wurde das entsprechende unbeimpfte Nährmedium verwendet. Bei Absorptionswerten oberhalb von 0,3 OD_{600} wurde die Probe mit dem entsprechenden Nährmedium verdünnt.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm bestimmt. Als Referenzlösung diente der jeweils verwendete Puffer. Der gewählte Meßbereich lag zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen, die höhere Meßwerte aufwiesen, wurden entsprechend vorverdünnt.

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lambert–Beer’schen Gesetz bestimmt:

$$c = \frac{A}{d \cdot \epsilon_{280}} \quad (\text{Gleichung 3.1.})$$

(mit c , Konzentration [M]; A , Absorption; d , Schichtdicke der Küvette [cm] und ϵ_{280} , molarer Extinktionskoeffizient des nativen Moleküls [$M^{-1}cm^{-1}$])

Für die Konzentrationsbestimmungen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} nach Gill und von Hippel (1989) aus der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins ermittelt.

3.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur näherungsweisen Bestimmung von DNA–Konzentrationen wurde die Absorption der jeweiligen Lösungen bei 260 nm ermittelt. Dabei gilt im allgemeinen, daß 1 A_{260} einer dsDNA–Menge von 50 μg und einer ssDNA–Menge von 33 μg entspricht (Sambrook *et al.*, 1989).

Um den Grad der Verunreinigung mit Proteinen festzustellen, wurde zusätzlich noch die Absorption der Lösung bei 280 nm ermittelt. Bei Nukleinsäurelösungen mit gutem Reinheitsgrad liegt der Quotient von A_{260}/A_{280} zwischen 1,7 und 2.

Da Absorptionsmessungen keine Rückschlüsse auf die Art der Nukleinsäurespezies zulassen (z.B. Verunreinigungen einer Plasmidpräparation mit genomischer DNA oder RNA) wurden DNA-Proben zusätzlich optisch im Agarosegel überprüft. Außerdem konnte die ungefähre Konzentration der DNA-Proben durch Vergleich der Intensitäten der Ethidiumbromid-gefärbten Probenbande mit einem Molekulargewichtsstandard bekannter Konzentration ermittelt werden.

3.7.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der *nutboxB*-RNA wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} von $128000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Kirsch, 1996) durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

3.8 SDS-Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen wurden denaturierende Elektrophoresen mit Natriumlaurylsulfat (SDS-PAGE) verwendet. Sollte ein Proteingemisch dabei im Molekulargewichtsbereich zwischen 10 und 100 kDa getrennt werden, wurden 15 bis 19,5 %ige SDS-Gele im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) verwendet; lag der erforderliche Trennbereich unterhalb von 15 kDa, wurden Gele in einem Tricinpuffersystem nach Schägger und von Jagow (1987) eingesetzt.

Für beide Gelsysteme wurden Gele der Größe 8 cm x 10,2 cm und einer Dicke von 0,75 mm gegossen, wobei das Trenngel ca. 6 cm und das Sammelgel ca. 2 cm hoch war. Die Elektrophorese wurde in einer Mighty Small II SE Gelelektrophoresekammer (Hoefer/Pharmacia, Freiburg) mit einem Power Pac 300- bzw. einem Power Pac 3000- (Bio-Rad, München) oder einem MultiDrive XL-Netzgerät (LKB Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

Nach der Färbung wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, München) dokumentiert.

3.8.1 SDS–Gele nach Laemmli

15 %ige SDS–Gele

Das Trenngel bestand aus 15 % Acrylamid, 2,7 % (w/v) N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8. Das Sammelgel bestand aus 4,6 % (w/v) Acrylamid, 2,7 % N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 125 mM Tris/HCl, pH 6,8.

Durch Zugabe von 67 µl N,N,N',N'–Tetramethyldiamin (TEMED) und 1 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) je 100 ml Gel–Lösung wurde die Polymerisation gestartet.

19 % SDS–Gele

Das Trenngel bestand aus 19 % Acrylamid, 0,46 % (w/v) N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 375 mM Tris/HCl, pH 8,8. Das Sammelgel bestand aus 8 % (w/v) Acrylamid, 0,21 % N,N'–Methylenbisacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS und 125 mM Tris/HCl, pH 6,8.

Durch Zugabe von 8 µl TEMED und 40 µl einer 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) pro 20 ml Gel–Lösung wurde die Polymerisation gestartet.

SDS–Laufpuffer

Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer mit 25 mM Tris, pH 8,3, 192,5 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS bei einer konstanten Stromstärke von 24 mA.

3.8.2 SDS–Gele nach Schägger und von Jagow

SDS–Gel nach Schägger und von Jagow (ohne Harnstoff)

Das Trenngel setzte sich aus 16,5 % T und 6 % C in 1 M Tris/HCl, pH 8,45 und 0,1 % (w/v) SDS zusammen. Das Sammelgel bestand aus 4 % T und 6 % C in 0,775 M Tris/HCl, pH 8,45 und 0,1 % (w/v) SDS.

Zum Start der Polymerisation wurden 8 µl TEMED und 40 µl einer 10 % (w/v) APS–Lösung pro 20 ml Gellösung zugegeben.

SDS–Gel nach Schägger und von Jagow (mit Harnstoff)

Trenn– und Sammelgel setzten sich wie bei SDS–Gelen nach Schägger und Jagow beschrieben zusammen. Es wurde jedoch zusätzlich 6 M Harnstoff zugegeben.

Laufpuffer

Die obere Kammer des Elektrophoresegerätes wurde mit Kathodenpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,25, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS), die untere Kammer mit Anodenpuffer (0,2 M Tris/HCl, pH 8,9) befüllt. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 28 mA durchgeführt. Sobald die Proben in das Trenngel eingewandert waren, wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht.

3.8.3 Probenvorbereitung

Jeweils 10 µl der zu analysierenden Proteinlösung wurden vor dem Probenauftrag mit 10 µl Probenpuffer (4 x Roti–Load® (Roth, Karlsruhe), 1:2 verdünnt mit Wasser) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Zellpellets wurden mit 50 µl Probenpuffer versetzt und mindestens 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 15 µl auf das Gel aufgetragen.

3.8.4 Proteinstandards

Als Molekulargewichtsstandards wurden der *low–range* Standard von Bio–Rad (München) und der Fluka–Molekulargewichtsstandard (Fluka, Neu–Ulm) verwendet.

Fluka:

Bromcyan–Spaltungsfragmente aus Pferdeherzmyoglobin:

17,0 kDa, 14,5 kDa, 10,7 kDa, 8,2 kDa, 6,3 kDa, 2,5 kDa

Bio–Rad:

Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel	97,4 kDa
Rinderserumalbumin	66,2 kDa
Ovalbumin aus Hühnereiweiß	45,0 kDa
Rinder–Carboanhydrase	31,0 kDa
Trypsin–Inhibitor aus Sojabohnen	21,5 kDa
Lysozym aus Hühnereiweiß	14,4 kDa

3.8.5 Färbung

Coomassie–Blau–Färbung

Die Färbung mit Coomassie–Blau wurde für das Sichtbarmachen von Proteinmengen größer 1 µg verwendet. Hierfür wurden die Gele unmittelbar nach der Elektrophorese 30 min in Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R–250, 45 % (v/v) Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure), anschließend 30 min in Entfärbelösung I (25 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) und bis zum völligen Entfärben des Gelhintergrundes in Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) bei 30 rpm geschüttelt.

Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Protein- und Peptidmengen (10 ng) wurde eine schnelle Silberfärbung ohne Glutardialdehyd–Fixierungsschritt durchgeführt (Bloom et al., 1987). Das Gel wurde für 10 Minuten in Formaldehyd–Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 0,0185 % (v/v) Formaldehyd) eingelegt, zweimal je fünf min mit Wasser gewaschen und für eine min in 0,02 % iger (w/v) Natriumthiosulfatlösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 20 sec wurde das Gel 10 Minuten in einer 0,1 %igen (w/v) Silbernitratlösung gefärbt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde durch Zugabe von formaldehydhaltiger Entwicklerlösung (3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,04 % (w/v) Natriumthiosulfat, 1,85 % (v/v) Formaldehyd) der Entwicklungsprozeß gestartet. Nach Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens 3 M Zitronensäure gestoppt.

3.9 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Histidin–Fusionsproteinen wurden Western Blots durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Proben zunächst einer Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für etwa 10 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Anschließend wurden vier Lagen Blotting Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) exakt auf Gelgröße und eine Lage Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Sartorius, Göttingen) etwa 2 mm größer als das

Gel zugeschnitten. Danach wurden beide in Transferpuffer äquilibriert. Zwei Lagen Blotting Papier, eine Lage Nitrocellulosemembran, das Gel und abschließend noch einmal zwei Lagen Blotting Papier wurden luftblasenfrei übereinandergestapelt und auf die anodische Graphitplatte eines Semi-Dry-System (Semi-Phor, Hoefer, San Francisco, USA) gelegt. Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden mittels Elektroblooming auf die Nitrocellulosemembran übertragen (Tovey und Baldo, 1987). Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA pro cm² des Gels bei maximal 50 V für etwa 75 Minuten.

Anschließend wurden die Bahnen mit den Molekulargewichtsstandards vorsichtig vom Rest der Nitrocellulosemembran abgeschnitten und bis zum Sichtbarwerden der Banden für ca. 10 Minuten in 0,5 % Ponceau S, 1 % (v/v) Eisessig geschwenkt (Salinovich und Motelaro, 1986). Überschüssiger Farbstoff wurde mit Wasser abgespült. Das Gel wurde silbergefärbt.

3.9.1 Nachweis von Histidin-Fusionsproteinen

Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran eine Stunde in TBS (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,9 % NaCl) und 0,1 % (v/v) Tween 20 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in einer 1:4000 Verdünnung des primären Antikörpers (Ziege-anti-His-IgG, Qiagen) in TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20 wurde der mit alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre Antikörper (Hase-anti-Ziege-IgG, Sigma) in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben und für eine Stunde in TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20 inkubiert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 15 Minuten in TBS gewaschen und fünf Minuten in 50 ml Reaktionspuffer (10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5,3 mM Tris/HCl, 95,6 mM Tris-Base, pH 9,5) äquilibriert. Die Detektion wurde durch Zugabe von 3,4 µl Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT, 100 mg/ml in 100 % DMF) und 4,5 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Toluidin-Salz (BCIP, 50 mg/ml in 100 % DMF) gestartet. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion durch Dekantieren der Substratlösung und Zugabe von H₂O gestoppt.

3.10 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophoresen wurden zur Kontrolle von Plasmidpräparationen und Restriktionsreaktionen sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe durchgeführt.

Je nach Volumen und Anzahl der Proben wurde Gele der Größe 25 cm x 15 cm in einer Agal Maxi Gelkammer (Biometra, Göttingen) oder 10 cm x 6 cm in einer Mini-DNA-Sub-Cell-Gelkammer (Biorad, München) gegossen. Agarose wurde in Konzentrationen von 0,8 bis 3 % (w/v) durch Aufkochen in TAE-Puffer (10 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst, mit 5 µl einer 1 % igen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung versetzt und bei 60 °C aufbewahrt. Für analytische Gele wurde Agarose NEEO (Roth, Karlsruhe), für präparative Gele wurden *low melting* Agarosen der Firmen Biozym (Hess, Oldendorf) und FMC (Rockland, USA) verwendet.

Die Proben wurden jeweils mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (50 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Als Längenstandards wurde *HindIII* restrigierte DNA des Bakteriophagen λ (Fragmentgrößen: 23,13 kb; 9,416 kb; 6,557 kb, 4,631 kb; 2,322 kb; 2,027 kb; 0,564 kb; 0,125 kb), 100 bp ladder Standard (MBI-Fermentas), 3000 bp standard (MBI-Fermentas) oder *MspI* verdaute pUC19-DNA (Fragmentgrößen: 0,501 kb; 0,489 kb; 0,242 kb; 0,190 kb; 0,147 kb; 0,111 kb; 0,110 kb; 0,067 kb; 0,034 kb; 0,026 kb) eingesetzt. Anoden- und Kathodenraum der Gelkammer wurden mit TAE-Puffer befüllt.

Die Elektrophorese wurde bei konstant 90 V mit einem PowerPac-3000-Netzgerät von BioRad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 30 bis 60 Minuten. Der Verlauf der Elektrophorese konnte mit einer UV-Handlampe durch kurzzeitiges Beleuchten (254 nm) des Geles verfolgt werden.

Die DNA-Banden wurden anschließend durch Fluoreszenz auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Geldokumentationssystem (Gel-Doc 2000, Biometra, Göttingen) dokumentiert.

Für die präparative Gewinnung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus extrahiert.

3.11 Zentrifugationen

Zentrifugationen wurden in Abhängigkeit von Volumina, Geschwindigkeit und Temperatur in folgenden Zentrifugentypen durchgeführt:

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) für Probenvolumina bis 2,0 ml unter Kühlung bis max. 13000 rpm.

Tischzentrifuge Biofuge Fresco (Heraeus, Hanau) für Probenvolumina bis 1,5 ml bei Raumtemperatur bis max. 13000 rpm.

Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Eching) für Probenvolumina bis 30 ml mit einem KA 18.50 Rotor bis max. 18000 rpm und für Probenvolumina bis 300 ml mit einem A 6.9 Rotor bis max. 9000 rpm unter Kühlung.

Tischzentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen) mit einem Ausschwingrotor Typ 1424 A für Probenvolumina bis 50 ml und max. 5000 rpm bzw. mit einem Winkelrotor Typ 1412 für Volumina bis 2,0 ml und max. 15000 rpm unter Kühlung.

Ultrazentrifuge Centrikon T-1170 (Kontron, Eching) mit einem TFT 70,38 Rotor für Volumina bis 30 ml und max. 70000 rpm unter Kühlung.

3.12 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde für Restriktionsanalysen, zur Sequenzierung und für Transformationen benötigt. Je nach benötigter DNA-Menge und erwünschtem Reinheitsgrad wurden unterschiedliche Verfahren zur Plasmid-DNA-Isolierung eingesetzt.

3.12.1 Präparation über alkalische Lyse

Mit einer modifizierten Plasmid-Reinigungsmethode nach Birnboim und Doly (1979) konnten bis zu 5 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

Das Zellpellet von 5 ml einer Übernachtskultur wurde in 100 µl 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert, mit 200 µl 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS für 5 Minuten versetzt und nach Zugabe von 150 µl 3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5 für 10 Minuten auf Eis inkubiert, wodurch chromosomale DNA und Proteine zusammen mit SDS gefällt wurden. Die lysierten Zellen wurden abzentrifugiert (15 Minuten, 13000 rpm, 4°C). Anschließend wurden 400 µl des Plasmid-DNA-haltigen Überstandes mit 1 ml vorgekühltem Ethanol versetzt und eine Stunde auf Eis gefällt. Die

DNA wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 Minuten, 4°C) präzipitiert. Zur Entfernung von überschüssigem Salz wurde das DNA–Pellet zweimal mit kaltem 70 %igen Ethanol geschwaschen und 20 Minuten luftgetrocknet. Die trockene DNA wurde in 40 µl TE–Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oder H₂O aufgenommen und bei –20°C gelagert.

3.12.2 Präparation über Anionenaustauscherchromatographie

Zur Präparation plasmidaler DNA für Sequenzierreaktionen (20 µg Maßstab) sowie zur Präparation größerer Mengen Plasmid–DNA (100 µg Maßstab) wurden Kits von QIAGEN (QIAGEN Plasmid Mini Kit bzw. QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Hilden) oder Macherey–Nagel (Nukleobond AX 20 Kit und Nukleobond SpinPrep bzw. Nukleobond AX 100 Kit, Macherey–Nagel, Düren) verwendet.

Diese Verfahren beruhen auf einer Kombination von alkalischer Lyse und anschließender Fällung der chromosomalen DNA sowie der Proteine mit einer Chromatographie an einer DEAE–Anionenaustauschersäule.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN Plasmid Handbook, QIAGEN, Hilden bzw. Nucleobond AX, *properties and application*, Macherey–Nagel, Düren). Die getrocknete Plasmid–DNA wurde in 40 µl bzw. 150 µl Wasser aufgenommen.

Die Reinheit wurde durch Agarosegelelektrophorese von 4 µl in H₂O gelöster Plasmid–DNA überprüft.

3.13 Fällung und Reinigung von DNA

3.13.1 Butanolpräzipitation

Butanol als Fällungsmittel (Thomas, 1994) wurde zur Präzipitation von DNA aus Ligationsansätzen verwendet. Hierfür wurden zu dem jeweiligen Ansatz das zehnfache Volumen an n–Butanol pipettiert und so lange heftig geschüttelt, bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Die DNA wurde durch einer zwanzigminütige Zentrifugation präzipitiert (13000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das zurückbleibende DNA–Pellet für 5 Minuten in einer SpeedVac vacubrand (ABM Graffenberger Antriebstechnik, Marktredwitz) getrocknet. Die DNA wurde in 10 µl H₂O aufgenommen und direkt für eine Elektroporation eingesetzt.

3.13.2 Reinigung über Silikagelmembranen

DNA-modifizierende Enzyme sowie Salze konnten einfach durch den Einsatz von Säulen mit einer Silikagelmembran (QIAquick spin columns, QIAGEN, Hilden) aus der DNA-Lösung entfernt werden. Dabei konnte gleichzeitig das Volumen auf bis ca. 30 µl eingeeengt werden. Die Reinigung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben (QIAquick Handbuch, QIAGEN, Hilden). Eluiert wurde mit 50 µl H₂O bzw. Pufferlösung EB (10 mM Tris/HCl, pH 8,5; QIAGEN).

3.13.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Abtrennung unerwünschter DNA-Spezies nach PCR oder Restriktion wurden die Ansätze einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (bis 10 µg DNA, QIAGEN, Hilden) oder des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit* (mehr als 10 µg DNA, QIAGEN, Hilden) zurückgewonnen. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben (QIAquick Spin Handbook bzw. QIAEX II Handbook, QIAGEN, Hilden), die gereinigte DNA wurde in 50 µl H₂O oder Puffer EB (QIAGEN) aufgenommen.

3.14 Enzymatische Behandlung von DNA

3.14.1 Restriktion

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurde die jeweilige DNA-Lösung (0,1 – 0,5 µg DNA/µl) mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer versetzt. Pro µg DNA wurden 1 bis 5 U Enzym eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden die Ansätze mindestens 4 Stunden bzw. über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Typ BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert. Sollte die DNA mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut werden, geschah dies gleichzeitig, sofern die verwendeten Enzyme ähnliche Pufferbedingungen benötigten. Ansonsten wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym verdaut, das die niedrigere Salzkonzentration im Puffer benötigte und nach 4 Stunden wurde die Salzkonzentration der für das zweite Restriktionsenzym empfohlenen angepaßt.

Nach dem Verdau wurden die Restriktionsenzyme, soweit diese hitzeempfindlich waren, durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Sollte die DNA anschließend direkt für Ligationen

eingesetzt werden, wurden Puffer und Enzyme durch eine QIAquick Spinsäule entfernt. Falls noch ein Dephosphorylierungsschritt zwischengeschaltet werden sollte, wurden nach der Hitzeinaktivierung durch Zugabe einer entsprechenden Menge an 10-fach konzentriertem Dephosphorylierungspuffer die entsprechenden Pufferbedingungen hergestellt und durch Zugabe von Alkalischer Phosphatase wurde die Dephosphorylierungsreaktion eingeleitet. Erst nach der Dephosphorylierung wurden in diesem Fall durch eine QIAquick Spinsäule Puffer und Enzyme entfernt.

Die Vollständigkeit der Restriktion wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.14.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Zur Abspaltung von 5'-überhängenden Phosphatgruppen nach einer Restriktion wurde 1 U alkalische Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP, Boehringer, Mannheim bzw. *calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP, MBI, Vilna, Litauen) pro μg DNA in Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 1 mM ZnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl) zugegeben. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37°C wurde eine weitere Einheit CIAP pro μg DNA zupipettiert und nochmals 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Enzym und Puffer wurden anschließend durch Verwendung einer QIAquick Spin Säule entfernt.

3.14.3 Generierung stumpfer Enden mit T4 DNA-Polymerase

Zur Generierung stumpfer Enden aus den aus der Restriktion mit Nsi I entstandenen 3'-Überhängen wurden zu ca. 200 ng Plasmid 3 U T4-DNA-Polymerase in 70 mM Tris/HCl, pH 8,8, 17 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 33 μM ATP, 22 μM GTP, 33 μM TTP, 33 μM CTP, 0,2 mg/ml BSA und 0,2 mM denaturierte Kalbsthymus-DNA gegeben und für eine Stunde bei 12 ° C inkubiert.

Anschließend wurden Enzym und Puffer mit einer QIAquick Spinsäule von der DNA getrennt.

3.14.4 Annealing von Oligonukleotiden

Äquimolare Mengen der zu annealenden DNA-Stränge wurden 5 Minuten in 100 mM NaCl bei 95 ° C temperiert und anschließend über 3 Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.14.5 Ligation

Etwa 50 bis 100 ng doppelt verdaute dephosphorylierte Vektor-DNA wurde im molaren Verhältnis

von 1:1 oder 1:2 mit dem doppelt verdauten Insert in T4-DNA-Ligasepuffer mit T4-Ligase 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. bei 16°C über Nacht inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase (10 Minuten bei 65 °C) wurde die ligierte DNA durch Butanolfällung präzipitiert und anschließend transformiert.

Zur Kontrolle für die Dephosphorylierungsreaktion wurde ein entsprechender Ligationsansatz, der jedoch kein DNA-Insert enthielt, ebenfalls Butanol-gefällt und transformiert. Aus der Zahl der Transformanten konnte auf die Religationsrate des Vektors geschlossen werden.

3.14.6 Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde von der Firma TOPLAB/MediGenomix (Martinsried) durch Cycle-Sequencing mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs als Kettenterminatoren auf einem ABI-System sequenziert. Die Datenauswertung erfolgte mit der ABI-Prism-Software.

3.15 Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt eine selektive, enzymatische Anreicherung von DNA-Fragmenten *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985). Diese Methode wurde zur Mutagenese von DNA-Fragmenten sowie zum Auffinden positiver Transformanten nach Klonierungsexperimenten eingesetzt.

Verwendet wurde das GeneAmp PCR 2400 System bzw. das GeneAmp PCR System 9600 von Perkin Elmer (Norwalk, USA).

3.15.1 Kolonie-PCR

Transformanten-Kolonien konnten auf diese Weise auf erfolgreiche Klonierung ohne Präparation der plasmidalen DNA überprüft werden. Dabei wurden Bakterienkolonien als DNA-Lieferant für eine PCR eingesetzt, als Primer dienten Oligonukleotide, die stromauf- bzw. stromabwärts des klonierten Fragments hybridisierten.

In einem PCR-Gefäß wurden je 0,4 µM der beiden Primer, 200 µM jedes dNTPs, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM NaCl, 0,08 % Nonidet P-40 und 0,4 mg BSA/ml vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze wurde vorsichtig eine gut separierte Bakterienkultur von der Agarplatte mit Transformanten abgenommen und in den PCR-Ansatz eingetaucht.

Anschließend wurde der Zahnstocher bzw. die Pipettenspitze in 5 ml steriles LB, das mit den entsprechenden Selektiv-Antibiotika versetzt war, überführt. Diese Bakterienlösung wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und konnte –falls das Ergebnis bei der Kolonie-PCR positiv war– zur Plasmid-DNA-Isolierung verwendet werden.

Vor Beginn der PCR wurden 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (MBI-Fermentas, Vilna, Litauen) pro 50 µl Ansatz zupipettiert. Nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C wurden 30 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Primerannealing bei 50°C und Primerverlängerung bei 72 °C durchgeführt.

Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um zu ermitteln, ob ein DNA-Fragment angereichert worden war, dessen Größe dem klonierten Fragment entsprach.

3.15.2 Direkte PCR-Mutagenese

Gerichtete Mutationen in flankierenden Bereichen von DNA-Fragmenten lassen sich durch direkte PCR-Mutagenese erzeugen.

Durch mutagenisierende Oligonukleotide als PCR-Primer können sowohl im 5' – als auch im 3'-Terminus unabhängig oder gleichzeitig Sequenzänderungen vorgenommen werden. Für die Auswahl der geeigneten Primer sollten folgende Regeln eingehalten werden:

Der zur Matrize komplementäre 3'-Bereich, der die Annealing-Temperatur bestimmt, sollte mindestens 17 Nukleotide umfassen. In einem Abstand von 5 Nukleotiden zum 3'-Terminus des Primers sind maximal drei Mismatch-Positionen erlaubt.

In einem 50 µl Ansatz wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA, je 0,4 µM der beiden Primer, 200 µM jedes dNTPs in 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 0,1 % Triton X-100 und 5 mM MgSO₄ gemischt. Die Zugabe von 3 U *Vent*-DNA-Polymerase erfolgte nach 5 min Denaturierung des DNA-Templates bei 95°C. Standardmäßig wurden jeweils 25 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95°C, Primer-Annealing und Primer-Verlängerung durchgeführt. Die Primer wurden 15 bis 30 s bei einer Temperatur, welche 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m des zuerst schmelzenden Primers lag, annealt. Die Verlängerung der Primer (Extension) erfolgte bei 72°C über einen Zeitraum von 10 s pro 100 bp.

Die Berechnung des T_m -Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 69,4 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC-Gehalt}) - \frac{650}{\text{Oligonukleotidlänge}} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Die Proben wurden durch Präparation des PCR-Amplifikats aus einem Agarosegel von Enzym,

Puffer und Ausgangsplasmid befreit.

3.15.3 Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese

Mit dieser Mutagenesemethode (Landt *et al.*, 1990, modifiziert) konnten bis zu sechs Basen am Stück mutiert bzw. eine Base deletiert oder inseriert werden. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die nötigen Arbeitsschritte.

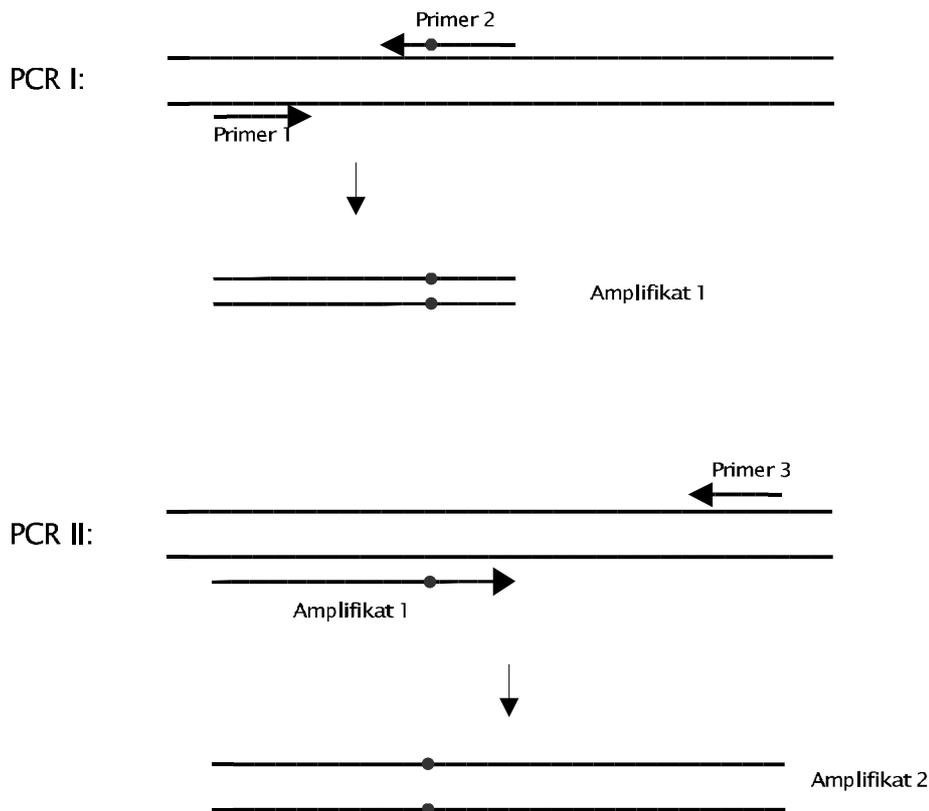


Abbildung 3.1: Schematischer Ablauf einer Zwei-Schritt-Mutagenese

In der ersten PCR werden ein Mutageneseprimer (die Mutation ist durch einen Punkt gekennzeichnet) und ein weiterer Primer eingesetzt. Als PCR-Produkt entsteht ein doppelsträngiges Amplifikat, das die gewünschte Mutation enthält.

In der zweiten PCR wird das gereinigte Produkt aus PCR I und ein dritter Primer verwendet.

Für den ersten PCR-Ansatz wurden die Komponenten wie unter Kapitel 3.15.2 beschrieben gemischt und amplifiziert. Entweder 3'- oder 5'-Primer enthielten die gewünschten Nukleotidveränderungen. Die Orientierung des Mutageneseprimers wurde jeweils so gewählt, daß das kürzest mögliche Doppelstrang-Amplifikat entstand. Das Produkt der ersten PCR wurde mittel

Agarosegelelektrophorese von der Plasmid-DNA getrennt, aus dem Gel präpariert und in 40 μl H_2O aufgenommen. Die zweite PCR wurde in einem 100 μl Maßstab durchgeführt, wobei das gereinigte Produkt der ersten PCR als "Doppelstrang-Primer" eingesetzt wurde. Die Reaktionsprodukte wurden erneut mittels Agarosegelelektrophorese getrennt, das Fragment der richtigen Größe aus dem Gel präpariert und in 40 μl H_2O aufgenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde 1/10 des gereinigten Fragments auf einem Agarosegel analysiert.

3.15.4 *splicing by overlap extension*–PCR–Mutagenese

Eine Weiterentwicklung der gerichteten Mutagenese durch direkte PCR stellt die *splicing by overlap extension* (SOE) – Technik dar, die es erlaubt, Punktmutationen an beliebigen Positionen einer DNA-Matrize einzuführen (Ho *et al.*, 1989). Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Ablauf.

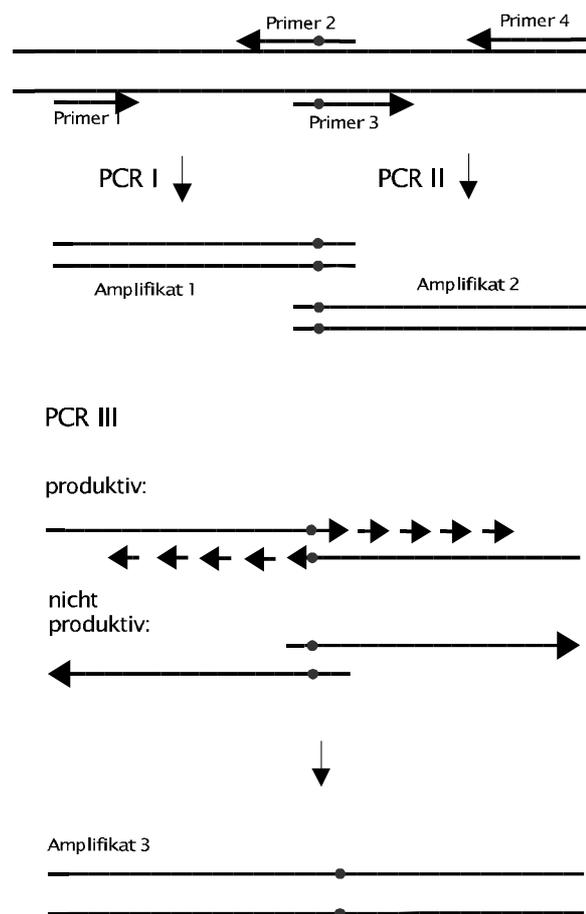


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der SOE-PCR-Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen

Pfeile repräsentieren die 5'-3'-Richtung der Oligonukleotide. Die Punktmutation ist durch einen Kreis repräsentiert.

Diese Methode basiert auf zwei getrennt durchgeführten direkten PCR–Mutagenesen mit den Primerpaaren 1 und 2 bzw. 3 und 4, die aufgrund ihrer Bindung an dieselbe Matrize zwei Fragmente mit überlappenden Enden liefern. Nach der präparativen Isolierung dieser Fragmente und der Abtrennung des nichtmutierten Edukts über Agarosegelelektrophorese wurden die beiden doppelsträngigen primären PCR–Produkte denaturiert und durch Annealing rekombiniert, so daß ein produktiver partieller Doppelstrang entstand, der als Matrize in einer nachfolgenden sekundären PCR–Reaktion aufgefüllt und amplifiziert wurde. Das nichtproduktive Konstrukt des Annealing–Ansatzes besaß keine Primerfunktion und konnte daher nicht vermehrt werden.

Die SOE–PCR–Mutagenese benötigte vier Oligonukleotide als Primer, wobei die beiden flankierenden Primer 1 und 4 singuläre Restriktionsschnittstellen für den sich anschließenden Klonierungsschritt enthielten. Die Mutationen wurden über die beiden inneren Primer 2 und 3 eingeführt, die einen mindestens 24 bp langen komplementären Sequenzabschnitt umfassen mußten. Für die Auswahl der Oligonukleotide galten dieselben Regeln wie unter Kapitel 3.15.2 beschrieben.

3.16 Übertragung von Plasmid–DNA in Bakterienzellen

Zum Übertragen von Plasmid–DNA in Bakterienzellen wurde sowohl die CaCl_2 –Methode (Cohen *et al.*, 1972) als auch die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) verwendet. In Fällen, in denen nur geringe Transformationseffizienzen nötig waren, wie z.B. bei der Übertragung eines Plasmids auf einen anderen Bakterienstamm, wurde die CaCl_2 –Methode eingesetzt. Waren hohe Transformationseffizienzen nötig, z.B. bei der Übertragung von DNA aus Ligationsansätzen, wurden die Bakterien einer Elektrotransformation (Elektroporation) unterzogen.

3.16.1 Transformation von Bakterien mit der CaCl_2 –Methode

Herstellung normalkompetenter Zellen für die CaCl_2 –Methode

50 ml LB–Medium wurden mit einer ÜNK auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft, bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 bei 37°C inkubiert, die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Minuten bei 4°C pelletiert, in 20 ml eiskalter CaCl_2 –Lösung (50 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl , 15 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml der Lösung aufgenommen und mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml CaCl_2 –Lösung resuspendiert und in 50 μl –Aliquots geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei -80°C bis zu einem Jahr

gelagert werden.

CaCl₂-Methode (modifiziert nach Hanahan, 1983)

Für die eigentliche Transformation wurden zu 50 µl kompetenten Zellen 20 bis 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und der Ansatz 30 Minuten auf Eis stengelassen. Der Hitzeschock erfolgte für 90 Sekunden bei 42°C, gefolgt von zwei Minuten Inkubation auf Eis. Zu den Zellen wurde 1 ml SOC-Medium gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt (Certomat HK und Certomat R, Braun, Melsungen). Anschließend wurden direkt 200 µl der transformierten Bakterien sowie eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung des Ansatzes auf das jeweilige Selektivmedium ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation (1 Minute, 10000rpm, 4°C) konzentriert und auf eine weitere Platte mit Selektivmedium aufgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Typ BE 200, Memmert, Schwabach) inkubiert.

Vereinfachte CaCl₂-Methode (Pope und Kent, 1996)

Zu 50 µl der kompetenten Zellen wurden 20 bis 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und direkt auf eine auf 37°C vorgewärmte Agarplatte mit Selektivmedium ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Diese Methode wurde nur dann angewandt, wenn ausschließlich auf Ampicillin-Resistenz selektiert werden sollte. Ampicillin blockiert die Zellwandsynthese gram-negativer Bakterien wie *E. coli* und kann durch das plasmidal kodierte Exoenzym β-Lactamase gespalten werden. Da durch Ampicillin die Replikation, Transkription und Translation des Bakteriengenoms nicht gestört wird, kann das β-Lactamase-Gen auch auf Ampicillin-haltigen Agarplatten exprimiert werden. Eine Inkubation in Antibiotika-freiem Medium vor dem Ausplattieren auf Selektivmedium, um die Expression des Resistenzgens sicherzustellen, ist also nicht nötig.

3.16.2 Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Präparation elektrokompetenter Zellen wurde 1 l LB-Medium mit einer ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 bei 37°C geschüttelt (200 rpm). Die Zellen wurden in vorgekühlten Zentrifugenbechern pelletiert (15 Minuten, 4000 rpm, 4°C) und im weiteren Verlauf immer auf Eis gehalten. Das Medium wurde vollständig abgezogen und das

Zellpellet vorsichtig in 1 l Glycerinlösung (10 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut wie oben abzentrifugiert und zuerst in 500 ml sowie anschließend in 250 ml Glycerinlösung aufgenommen und erneut pelletiert. Schließlich wurden die Bakterien in 3 ml Glycerinlösung resuspendiert (ca. 1×10^{10} Zellen/ml) und in 40 μ l–Aliquots geteilt. Die Zellen konnten direkt für eine Elektroporation eingesetzt oder bei -80°C bis zu einem Jahr gelagert werden.

Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 5 bis 100 ng Plasmid–DNA in 2 μ l H_2O in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm, BioRad, München) vorgelegt. 40 μ l elektrokompetente Zellen wurden zugegeben und der Ansatz wurde 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde dann in den vorgekühlten Elektroporatorschlitten eingesetzt und sofort in die Schockkammer des Elektroporators (*E. coli* Pulser, BioRad, München) eingeführt. Der Puls erfolgte mit 1,8 kV. Die Bakterien wurden sofort mit 1 ml SOC–Medium vermischt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) für eine Stunde inkubiert. Die elektrotransformierten Zellen wurden wie bei der Transformation nach der CaCl_2 –Methode beschrieben auf Platten mit Selektivmedium transferiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.17 Anzucht von Bakterien

3.17.1 Bakterienanzucht

5 ml LB–, TB– oder M9–Medium wurden mit den jeweils erforderlichen Antibiotika versetzt (Ampicillin: 100 $\mu\text{g/ml}$; Kanamycin: 50 $\mu\text{g/ml}$). Angeimpft wurde mit einer gut separierten Bakterienkolonie, die mit einem sterilen Zahnstocher vorsichtig von der Agarplatte entnommen wurde, oder mit 50 μ l einer Dauerkultur. Die Kultur wurde über Nacht – wenn nicht anders vermerkt – bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

3.17.2 Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen von 850 μ l ÜNK mit 150 μ l sterilem Glycerin (87 % (v/v)) hergestellt. Die Kulturen wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.17.3 Induktionsversuche

Vor der Anzucht von größeren Mengen an Bakterien wurden von jedem Bakterienstamm mit dem gewünschten Expressionsplasmid Induktionsversuche durchgeführt. Dazu wurden 50 ml LB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben (mit Schikanen) mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen, mit einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienstammes auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 angeimpft und bei der jeweiligen Temperatur unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 wurde die Bakterienkultur durch Zugabe von 0,1–2 mM IPTG induziert. Die Proteinexpression wurde durch Probennahme vor und stündlich nach der Induktion durch Gelelektrophorese überprüft.

3.17.4 Zellkultivierung

Die Fermentation der Expressionsstämme zur Gewinnung rekombinanter Proteine erfolgte im 7 l Maßstab im Fermenter oder mit 1 bis 3 l Schüttelkultur im Schüttelinkubator. 5 ml Medium mit Ampicillin wurden mit 50 μ l (LB Medium) bzw. 100 μ l (M9 Medium) einer Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die 5 ml Kultur wurde zu 150–250 ml Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 7 l Medium mit Antibiotika wurden mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 bis 0,2 inokuliert und mit 3 l/min Druckluft, 300 rpm (Fermenter) bzw. 160 rpm (Schüttelkultur) bei 37 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,7–1,0 wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 2 mM induziert. Bei Kultivierung im Fermenter wurde die Luftzufuhr auf 7 l/min und das Rührwerk auf 700 rpm hochgeregelt. Vier bis sechs Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch 10 minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4 °C geerntet und das Nasszellgewicht bestimmt. Die Zellpellets wurden sofort weiterverarbeitet oder bei 80 °C eingefroren. Die Überexpression des Zielproteins wurde durch Aliquotentnahme vor Induktion und vor dem Abernten überprüft.

3.18 Proteinreinigung

3.18.1 Reinigung von CAEV-Tat

Die Reinigung der cysteinfreien Mutante erfolgte analog, jedoch konnte auf die Zugabe von DTT verzichtet werden.

Zellaufschluß

Die Zellpellets wurden in 8 ml Lysispuffer je Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 120 Watt). Die Lösung wurde zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

Puffer (CM–Sephrose):

Lysispuffer/Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM DTT
Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM DTT; 1 M NaCl

Puffer (Phenyl–Sephrose Fast flow):

Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM DTT; ca. 550 mM NaCl; 1M Ammoniumsulfat
Puffer D: 50 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM DTT
Puffer E: 30 % Isopropanol

Puffer (Heparin–Sephrose):

Lysispuffer/Puffer F: 20 mM Kaliumphosphat, pH 6,5; 1 mM DTT; 200 mM NaCl
Puffer G: 20 mM Kaliumphosphat, pH 6,5; 1 mM DTT; 2 M NaCl

Reinigung über CM–Sephrose und Phenyl–Sephrose (*low sub*)

Die Kationenaustauscher–Chromatographie erfolgte an einer CM–Sephrose–Säule mit Hilfe eines ÄKTApurifier10–Systems. Die Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer A äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über 20 Säulenvolumen. Es wurde mit weitere fünf Säulenvolumen Puffer B nachgespült. Fraktionen, die CAEV–Tat enthielten, wurden vereinigt und mit einer gesättigten Ammoniumsulfat–Lösung auf die Pufferbedingungen von Puffer C gebracht.

Die Phenyl–Sephrose–Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer C äquilibriert

(Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer C von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer D über 20 Säulenvolumen. Es wurde mit weitere fünf Säulenvolumen Puffer D nachgespült. Anschließend wurde mit 5 Säulenvolumen Puffer E nachgespült. Fraktionen, die CAEV-Tat enthielten, wurden vereinigt und gegen NMR-Probenpuffer dialysiert.

Reinigung über Heparin-Säule

Die Kationenaustauscher-Chromatographie erfolgte an einer Heparin-Säule mit Hilfe eines ÄKTApurifier10 Systems. Die Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer F äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml) äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer F von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer G über 20 Säulenvolumen. Es wurde mit weitere fünf Säulenvolumen Puffer B nachgespült. Fraktionen, die CAEV-Tat enthielten, wurden vereinigt und gegen NMR-Probenpuffer dialysiert.

3.18.2 Reinigung von GST-JunbZIP

Zellaufschluß

Die Zellpellets wurden in 8 ml Lysispuffer je Gramm Nasszellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 150 Watt). Die Lösung wurde zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension über Nacht bei –80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde erneut dreimal 30 sec mit Ultraschall behandelt. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

Puffer:

Lysispuffer/Puffer A: 1 x PBS pH 7, 3; 50 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM EDTA

Puffer B: 1 x PBS pH 7, 3; 50 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM EDTA; 20 mM

Glutathion (reduziert)

Puffer C: 1 x PBS pH 7, 3; 50 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM EDTA

Puffer D: 1 x PBS pH 7, 3; 50 mM β -Mercaptoethanol; 2 mM EDTA; 2 M NaCl

Reinigung über Glutathion–Sephrose–Säule

Die Affinitäts–Chromatographie erfolgte an einer Glutathionsäule–Säule mit Hilfe eines ÄKTApurifier10 Systems. Die Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer A äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über 10 Säulenvolumen. Es wurde mit weiteren fünf Säulenvolumen Puffer B nachgespült. Fraktionen, die GST–JunbZIP enthielten, wurden vereinigt und mit PreScission–Protease nach Herstellerangaben versetzt.

Die Spaltung wurde über SDS–Gelelektrophorese verfolgt.

Reinigung über Heparin–Sephrose–Säule

Die Kationenaustauscher–Chromatographie zur Trennung des Spaltansatzes erfolgte an einer Heparin–Säule mit Hilfe eines ÄKTApurifier10 Systems. Die Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer C äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer C von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer D über 20 Säulenvolumen. Es wurde mit weiteren fünf Säulenvolumen Puffer D nachgespült. Fraktionen, die JunbZIP enthielten, wurden vereinigt.

3.18.3 Reinigung von HK022 Nun

Zellaufschluß

Die Zellpellets wurden in 10 ml Lysispuffer je 100 ml Anzuchtkulturvolumen aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 150 Watt). Die Lösung wurde zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration

durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

Puffer:

Lysispuffer/Puffer A: 50 mM Tris / HCl pH 8,0; 2 mM EDTA

Puffer B: 50 mM Tris / HCl pH 8,0; 2 mM EDTA; 2 M NaCl

Reinigung über Heparin–Sephrose–Säule

Die Kationenaustauscher–Chromatographie erfolgte an einer Heparin–Säule mit Hilfe eines ÄKTApurifier10 Systems. Die Säule wurde mit mindestens sieben Säulenvolumen Puffer A äquilibriert (Flussraten 0,5 bis 1,5 ml). Nach dem Probenauftrag wurden Proteine, die nicht an die Säule binden, mit 5 –10 Bettvolumen Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über 20 Säulenvolumen. Es wurde mit weiteren fünf Säulenvolumen Puffer B nachgespült. Fraktionen, die HK022 Nun enthielten, wurden vereinigt und gegen NMR–Puffer dialysiert.

3.18.4 Reinigung von N (1–53)

Zellaufschluß

Die Zellpellets wurden in 40 ml Lysispuffer je 10 g Naßzellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt (Nadelsonde 40T, 150 Watt). Die Lösung wurde zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

Puffer:

Lysispuffer: 50 mM Tris / HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM β – Mercaptoethanol (β –ME);
1 Protease–Inhibitortablette /200 ml; 20 μ g /ml Lysozym; 20 μ g /ml
DNaseI

Puffer A: 50 mM NiSO₄

- Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol; 1 mM β -ME
- Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol; 1 mM β -ME
- Puffer D: 200 mM EDTA, pH 8,0
- Puffer E: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl, 1 mM β -ME
- Puffer F: 0,1 % TFA in H₂O
- Puffer G: 0,1 % TFA in 80 % Acetonitril

Reinigung des His-tag-Fusionsproteins

Die Reinigung erfolgte durch immobilisierte Nickelionen-Affinitäts-Chromatographie (Porath, 1992). Die Chelating Sepharose-Säule wurde mit einer P 1 Peristaltik Pumpe mit 200 ml Wasser bei einer Flussrate von 5 ml/min gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Puffer A beladen und mit 150 ml Puffer B äquilibriert. Der Rohextrakt wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgebracht. Zelluläre Proteine wurden durch Waschen mit 200 ml Puffer B entfernt. Anschließend wurde die Säule an ein ÄKTApurifier10-System gehängt und mit diesem gesteuert. Die Elution erfolgte mit Puffer C. Es wurde ein Stufengradient mit je 2 Säulenvolumen 10 % Puffer C, 20 % Puffer C, 30 % Puffer C, 50 % Puffer C und 100 % Puffer C gefahren. Die Säule wurde mit Puffer D gereinigt.

Ubiquitin-N(1-53) enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen mindestens sechs Stunden gegen Puffer E dialysiert.

Die Spaltung erfolgte durch Zugabe von Ubiquitin-Hydrolase über Nacht bei 37 °C.

Reinigung des Spaltansatzes über C18-HPLC

Dem Spaltansatz wurde auf eine Endkonzentration von 0,1 % TFA gebracht und auf eine mit Puffer F äquilibrierte C18-Säule aufgetragen. Diese wurde über ein HPLC-System gesteuert. Die Elution erfolgte durch einen – mehrfach variierten – Stufengradienten gegen Puffer G.

Fraktionen, die N (1-53) enthielten, wurden vereinigt und an der *SpeedVac* eingengt.

3.18.5 Reinigung von NUSA

Zellaufschluß

Die Zellpellets wurden in 40 ml Puffer B je 10 g Naßzellgewicht aufgenommen und 30 min unter Rühren auf Eis gehalten. Die Suspension wurde dreimal je 30 s mit Ultraschall behandelt

(Nadelsonde 40T, 150 Watt). Die Lösung wurde zwischen den Ultraschallbehandlungen je 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden zur Abtrennung von Zelltrümmern 45 min bei 40.000 rpm, 4 °C, in einem TFT 70.38 Rotor (160.000 g) zentrifugiert. Schwebeteilchen wurden durch Filtration durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) entfernt.

Puffer:

Puffer A: 50 mM NiSO₄

Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol; 1 mM β-ME

Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol; 1 mM β-ME

Puffer D: 200 mM EDTA, pH 8,0

Puffer E: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1mM DTT

Reinigung des His-tag-Fusionsproteins

Die Reinigung erfolgte durch immobilisierte Nickelionen-Affinitätschromatographie (Porath, 1992). Die Chelating Sepharose Säule wurde mit einer P 1 Peristaltik Pumpe mit 200 ml Wasser bei einer Flussrate von 5 ml/min gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Puffer A beladen und mit 150 ml Puffer B äquilibriert. Der Rohextrakt wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgebracht. Zelluläre Proteine wurden durch Waschen mit 200 ml Puffer B entfernt. Anschließend wurde die Säule an ein FPLC-System gehängt und mit diesem gesteuert. Die Elution erfolgte mit Puffer C. Es wurde ein Stufengradient mit je 2 Säulenvolumen 10 % Puffer C, 20 % Puffer C, 30 % Puffer C, 50 % Puffer C und 100 % Puffer C gefahren. Die Säule wurde mit Puffer D gereinigt.

Histidin-NusA enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und gegen mindestens sechs Stunden gegen Puffer E dialysiert und anschließend durch PreScission-Protease nach Herstellerangaben gespalten.

Die Trennung des Spaltansatzes erfolgte durch einen weiteren Chelating-Sepharose-Säule-Schritt. Abgespaltenes NusA befand sich im Durchbruch. Dieser wurde über eine mit Puffer E äquilibrierte Glutathionsäule gegeben, um GST-PreScission zu entfernen.

Der NusA enthaltende Durchbruch wurde über einen Pufferwechsel über eine NAP-Säule nach Herstelleranleitung auf die erforderlichen Pufferbedingungen gebracht.

3.19 CD–Spektroskopie

UV–Circulardichroismus–Spektren wurden mit einem J 810 S Spektrometer (JASCO International, Tokyo, Japan) aufgenommen. Es wurden verschiedene Küvetten (Hellma, Müllheim) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration verwendet.

Die Schlitzweite betrug 1 nm, die Zeitkonstante 1 s, die Auflösung der Datenpunkte 0,2 nm und die Aufnahmegeschwindigkeit 20 bis 50 nm/min. Der Wellenlängenbereich betrug 260 bis 185 nm. Bei größeren Schichtdicken wurde nur bis 190, 195 oder 200 nm gemessen. Datenpunkte, bei denen das Hochspannungssignal des Detektors > 600 V war, wurden verworfen. Es wurden 8 Spektren akkumuliert und gemittelt. Pufferspektren wurden unter denselben Bedingungen aufgenommen und subtrahiert. Die Sensitivität betrug ± 100 mdeg, die gemessenen Elliptizitäten lagen im Bereich von ± 30 mdeg. Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest erfolgte nach folgender Gleichung (Schmid 1989):

$$[\theta]_{MRW} = (10^5 \cdot \theta) / (c \cdot d \cdot N) \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

$[\theta]_{MRW}$:	mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
θ :	gemessene Elliptizität (mdeg)
c :	Proteinkonzentration (μM)
d :	Schichtdicke der Küvette (cm)
N :	Zahl der Aminosäuren im Protein

3.20 Bestimmung des hydrodynamischen Radius mittels Pulse Field Gradient (PFG) NMR Technik

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius erfolgte mittels Pulse Field Gradient (PFG) NMR Technik (Jones *et al.* 1997, Wilkins *et al.* 1999). Hierbei kam die *pulse gradient stimulated echo longitudinal encode decode* (PG–SLED) Sequenz zum Einsatz (Gibbs & Johnson 1991). Die Intensität der NMR Resonanzsignale ist hier u.a. abhängig von der angelegten Gradientenstärke und dem Diffusionskoeffizienten D des Moleküls (Slichter 1996).

$$I(G) = A \cdot \exp(-d \cdot G^2) \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

- I*: Signalintensität
G: relative Gradientenstärke
A: Konstante
d: Zerfallskonstante ($d \propto$ Diffusionskoeffizient D)

Bei Variation der relativen Gradientenstärke kann nach Bestimmung der Signalintensität durch Integration die Zerfallskonstante d bestimmt werden, die dem Diffusionskoeffizienten D proportional ist. Die Abnahme der Intensität kann einer Gauss-Kurve angepasst werden. D kann nicht ohne Weiteres aus d bestimmt werden, weil hierzu die genaue Kenntnis von Temperatur und Viskosität der Probelösung notwendig ist. Der Diffusionskoeffizient und damit auch die Zerfallskonstante d ist nach der Stokes-Einstein-Gleichung indirekt proportional zum hydrodynamischen Radius R_h eines Moleküls.

$$D = (kT) / (6 \cdot \pi \cdot R_h \cdot \eta) \quad (\text{Stokes Einstein Gleichung}) \quad (\text{Gleichung 3.5})$$

- D*: Diffusionskoeffizient
k: Boltzmann Konstante
T: absolute Temperaturkontrolleinheit
R_h: hydrodynamischer Radius des Moleküls
 η : Viskosität der Lösungsmittel

d.h. $R_h \propto d^{-1}$ (Gleichung 3.6)

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius ohne Kenntnis des Diffusionskoeffizienten ist möglich, wenn die Diffusion des Proteins mit der Diffusion einer Referenzsubstanz mit bekanntem hydrodynamischen Radius verglichen wird.

$$R_h (Prot) = (d^{Ref} / d^{Prot}) \cdot R_h (Ref) \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

- R_h(Prot)*: hydrodynamischer Radius des Proteins
R_h(Ref): hydrodynamischer Radius der Referenzsubstanz
d^{Prot}: Zerfallskonstante des Proteins
d^{Ref}: Zerfallskonstante der Referenzsubstanz

Hier wurde die Diffusion der jeweiligen Probe mit der Diffusion von 1,4 Dioxan verglichen. Hierzu wurden ^1H - 1D Spektren der Probe in D_2O mit 0,2 % (v/v) 1,4 Dioxan gemessen. Die reaktive Gradientenstärke wurde in 18 Schritten von 5 bis 100 % variiert. Die Aufnahme aller Spektren wurde jeweils mindestens viermal wiederholt, um die Daten statistisch abzusichern.

Die Abnahme der Signalintensität wurde für das jeweilige Protein durch Integration der Signale im Bereich der Methylprotonen (0,15 bis 1,20 ppm) bestimmt. Zur Bestimmung der Signalintensität für 1,4-Dioxan wurde der Bereich von 3,0 bis 4,1 ppm herangezogen, dem allerdings das Proteinsignal überlagert ist. Daher wurde wie in Wilkins et al. (1999) beschrieben, zunächst eine Gauss-Kurve an die Abnahme der Methylgruppenintensität angepasst und so d^{Prot} bestimmt. Anschließend wurde eine Summe zweier Gauss-Kurven an die Abnahme der Dioxan/Protein Intensität angepasst, wobei die aus der Abnahme der Methylgruppenintensität bestimmte Zerfallskonstante d^{Prot} für den Proteinanteil vorgegeben wurde. Daraus erhält man die Zerfallskonstante des Dioxananteils d^{Ref} . Der hydrodynamische Radius wurde nach Gleichung 4.7 bestimmt, wobei für den hydrodynamische Radius von 1,4-Dioxan 2,12 Å angenommen wurden (Wilkins et al. 1999).

3.21 NMR-Spektroskopie

3.21.1 Probenvorbereitung

Lyophilisierte Proteine wurden direkt in den jeweiligen Lösungsmitteln aufgenommen und zusätzlich mit 10 % (v/v) D_2O versetzt.

Alle Proben wurden vor dem Abfüllen in NMR-Röhrchen (Norell, Landsville, USA oder Shigemi Co., Campro, Emmerich) 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

3.21.2 Allgemeine Meßbedingungen

Alle mehrdimensionalen NMR Experimente wurden an einem Bruker DRX600-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem inversen Vierfachresonanz-Probenkopf mit Dreiaachsen-Gradienten durchgeführt. Die Aufnahme von ^1H - 1D -Spektren erfolgte teilweise an einem AMX400 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe).

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in allen Zeitdimensionen unter Verwendung der *States*-TPPI Methode (Marion *et al.* 1989a,b). Die Eichung der ppm-Skala erfolgte für ^1H durch den externen Standard 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS), für ^{15}N indirekt über das Frequenzverhältnis der Nullpunktfrequenz ($\omega_{\text{N}}/\omega_{\text{H}} = 0,101329051$, Edison, 1994). Die Experimente wurden bei 298 K durchgeführt. Die Temperatur wurde durch eine BVT3000 Temperaturreguleinheit (Bruker, Karlsruhe) reguliert.

3.15.3 Aufnahme der Spektren

Für eindimensionale Protonenspektren wurden je nach Probenkonzentration 8 bis 1024 Scans mit 4096 bis 16384 komplexen Datenpunkten summiert.

Für die ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren wurden 2048 Datenpunkte in t_2 und 256 bis 512 Experimente in t_1 aufgenommen.

3.15.4 Prozessierung und Auswertung der Spektren

Die Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit den Programmen Xwin-NMR (Bruker, Karlsruhe) und NDEE (SpinUp Inc., Dortmund). Zur Steigerung der digitalen Auflösung wurde die Länge der FIDs typischerweise in beiden Dimensionen durch Auffüllen mit Nullen verdoppelt (einfaches zero-filling). Eine anschließende Multiplikation mit $\pi/2$ oder $\pi/3$ verschobenen Sinusquadratfunktion als Filterfunktion reduzierte die durch das Abschneiden der FIDs bei zu kurzen Aufnahmezeiten verursachten Artefakte. Soweit notwendig erfolgte eine Basislinienkorrektur in der direkten Dimension mit Hilfe des Programmes *base_fast* (Schweimer, 2000).

Zur graphischen Darstellung der Spektren dienten die Softwarepakete NDEE und NMRView 5.1.3 (Johnson und Blevins, 1994).

4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von CAEV–Tat

Um eine spätere strukturelle Charakterisierung des Transaktivatorproteins aus CAEV zu ermöglichen, war es zunächst notwendig, ein geeignetes bakterielles Expressionssystem und ein Reinigungsprotokoll zu etablieren, das die benötigten Milligramm–Mengen an Protein liefert und eine Markierung mit Isotopen erlaubt.

4.1.1 Anpassungen an die *E. coli* codon usage

CAEV–Tat enthält insgesamt 15 Arginine, von denen 13 durch die Codons AGA bzw. AGG kodiert werden. Diese Codons treten in *E. coli* nur äußerst selten auf (nur 4 bzw. 2 % aller *E. coli*–Arginine werden durch diese Codons kodiert). Da auch nur entsprechend geringe Mengen an tRNA_{AGA/AGG} in *E. coli* vorliegen, kommt es bei der Expression von rekombinanten eukaryotischen Proteinen häufig zu einem Abbruch der Translation an diesen Stellen bzw. zu dem Einbau falscher Aminosäuren (Gurskii *et al.*, 1992, Kane, 1995).

Aus vorherigen Arbeiten (Schwarz, 1999) war bereits bekannt, daß das verfügbare CAEV–tat–Gen nur dann effizient exprimiert werden kann, wenn zusätzlich tRNAs für diese seltenen Codons koexprimiert werden.

Dies erfolgte durch die Kotransformation des Plasmids pUBS 520 (Abbildung 4.1), das für die tRNA_{AGA/AGG} kodiert.

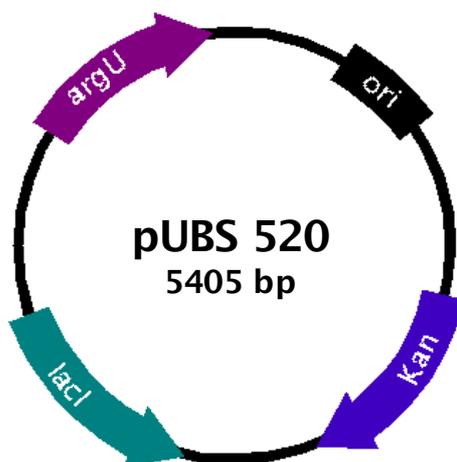


Abbildung 4.1: pUBS520–Vektor

Abgebildet ist die Vektorkarte von pUBS520. pUBS520 kodiert das tRNA–Gen *argU*, besitzt eine Kanamycinresistenz, auf die selektiert werden kann und kodiert zusätzlich den LacI–Lactoserepressor.

Für andere in *E. coli* ebenfalls seltene Codons stand keine Möglichkeit zu einer Koexpression der jeweiligen tRNAs zur Verfügung, weshalb diese Codons durch die Anwendung verschiedener PCR–Mutagenese–Techniken (Kapitel 3.15.2 bis 3.15.3) in mehreren Schritten gegen die jeweiligen in *E. coli* häufiger verwendeten synonymen Codons ausgetauscht wurden (Abbildung 4.2).

Hierbei handelte es sich um die Codons für Isoleucin 20 (ATA; 7 %), Arginin 30 (CGG; 10 %), Leucin 44 (CTC; 10 %), Leucin 47 (CTT; 10 %), Leucin 57 und 80 (CTA; 4 %), Prolin 68 (CCC; 12 %), Prolin 71 (CCT, 16 %) und Glycin 77 (GGA; 11 %). Die Zahlen in Klammern geben den Prozentsatz an, mit dem die jeweilige Aminosäure in *E. coli* durch dieses Codon kodiert wird.

```

ATGAGTGAAGAAGTGCCTCGTGAAAGAGAGGTGTCTCCAGAAGAAGCTGTAAGGAACATATGGGAAAGAGAAAGGGACACCTGGCAA
ATGAGTGAAGAAGTGCCTCGTGAAAGAGAGGTGTCTCCAGAAGAAGCTGTAAGGAACATCTGGGAAAGAGAAAGGGACACCTGGCAA
M S E E L P R E R E V S P E E A V R N I W E R E R D T W Q
1                               10                               20

CGGCAAGCATTAGAGTACCTGGGAAACACTGCAAAGATGGCTCGCAATGCTTAGATTAGGCAGACATAGAAGAAAAGTACTAAGG
CGTCAAGCATTAGAGTACCTGGGAAACACTGCAAAGATGGCTGGCAATGCTGAGACTGGGCAGACATAGAAGAAAAGTACTGAGG
R A S I R V P G E T L Q R W L A M L R L G R H R R K V L R
30                               40                               50

GAAATGCAAAAATGGATGTGGAACATCCCAAGGCGCCTGTGATTAGGCCTTGTGGATGCAGACTATGTAACCCAGGGTGGGGTCA
GAAATGCAAAAATGGATGTGGAACATCCGAAGGCGCCGGTGTATTAGGCCGTGTGGTTGCAGACTGTGTAACCCAGGGTGGGGTCA
E M Q K W M W K H P K A P V I R P C G C R L C N P G W G S
60                               70                               80

```

Abbildung 4.2 Das modifizierte CAEV–*tat*

In der oberen Zeile ist die ursprüngliche, in der unteren die veränderte Nukleotidsequenz von CAEV–*tat* abgebildet. Arginin–Codons, die durch die von *argU* kodierte tRNA erkannt werden, sind in rot, veränderte Codons in blau eingezeichnet.

Abbildung 4.3 zeigt die Auswirkungen der *codon usage* Verbesserungen im CAEV *tat* –Gen und der zusätzlichen tRNA_{AGA/AGG}–Koexpression auf die Expressionrate von CAEV–Tat.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit bestand mit den kommerziell erhältlichen *E. coli* Stämmen *E. c.* BL21 Rosetta (DE3) bzw. *E. c.* BL21 (DE3) CodonPlus–RIL auch die Möglichkeit zur Koexpression der tRNAs für die Codons AGG/AGA (Arginin), AUA (Ile) und CTA (Leu). Bei der Verwendung dieser Stämme konnte die gleiche Verbesserung der Expression des CAEV–*tat*–Gens beobachtet werden wie bei der Verwendung des pUBS520–Plasmides (Daten nicht gezeigt).

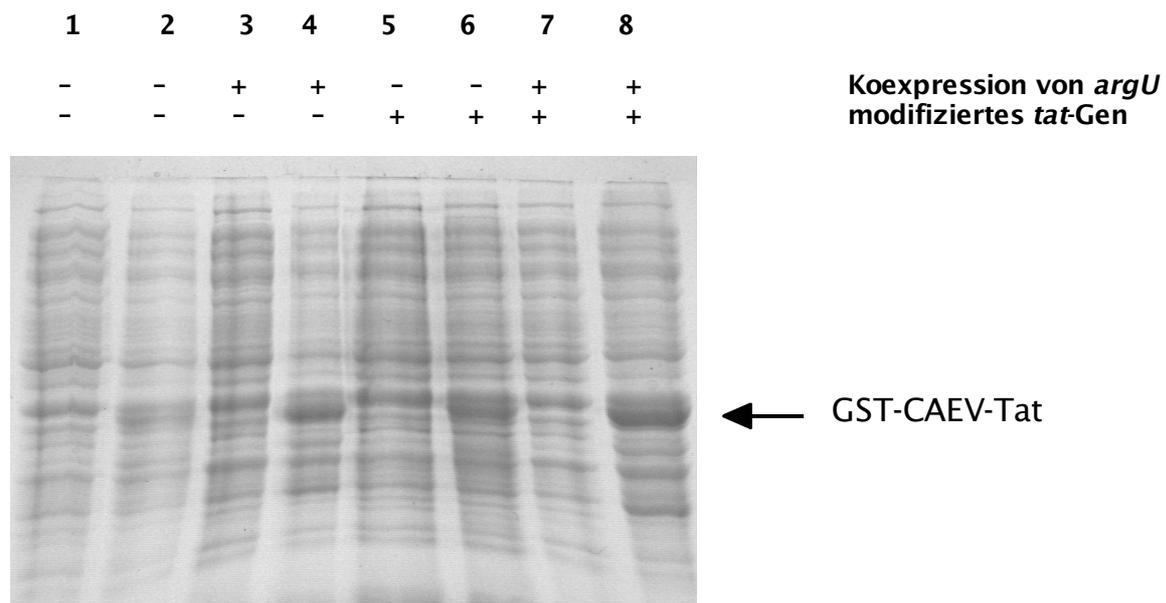


Abbildung 4.3: Anpassungen an die *codon usage* von *E. coli*

Das ursprüngliche CAEV *tat* – (Bahnen 1 bis 4) bzw. das an die *E. coli codon usage* angepaßte Gen (Bahnen 5 bis 8) wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL 21 exprimiert. Zusätzlich wurde das Plasmid pUBS520, das für die in *E. coli* seltenen Arginin-tRNAs kodiert, koexprimiert (Bahnen 3, 4, 7 und 8).

Die Bakterien wurden jeweils in 30 ml LB mit Ampicillin (100 µg/ml) bzw. bei pUBS520-Koexpression zusätzlich mit Kanamycin (50 µg/ml) bei 37°C und 200 rpm angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit jeweils 2 mM IPTG induziert. Vor (Bahnen 1, 3, 5 und 7) und vier Stunden nach Induktion (Bahnen 2, 4, 6 und 8) wurde den Kulturen ein einer OD₆₀₀ von 1 entsprechendes Aliquot entnommen, pelletiert und auf ein 19%iges SDS-Gel aufgetragen.

Die für GST-CAEV-Tat erwartete Laufhöhe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Sowohl die Koexpression von *argU* als auch die eingeführten Anpassungen des *tat*-Gens an die *E. coli codon usage* tragen zu einer deutlichen Verbesserung der Expression bei.

4.1.2 Expressionssysteme und Reinigungsstrategien für CAEV-Tat

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere Expressionssysteme und Reinigungsstrategien für CAEV-Tat auf ihre Tauglichkeit zur Gewinnung der benötigten Proteinmengen für NMR-Spektroskopie hin untersucht.

In Tabelle 4.1 sind die verwendeten Expressionssysteme, die Reinigungsschritte und die dabei auftretenden Probleme zusammengefaßt.

Expressionssystem / Klonierungsprodukt	Intention	Klonierung
<p><i>E. coli</i> BL21 / pGEX-4T-2-CAEV-Tat / pUBS520</p> <p>GST-Thrombin-CAEV-Tat (Original-Codons)</p>	<p>Expression von CAEV-Tat als GST-Fusionsprotein, Koexpression von <i>argU</i> zur Verbesserung der Translationseffizienz der in <i>E. coli</i> seltenen Arginin-codons AGA und AGG</p>	<p>Ausgangsplasmid</p>
<p><i>E. coli</i> BL21/pGEX-6P-2-CAEV-Tat / pUBS520</p> <p>GST-Presc.-CAEV-Tat (Original-Codons)</p>	<p>Einbau einer PreScission-Spaltstelle statt einer Thrombin-Spaltstelle; Expression von CAEV-Tat als GST-Fusionsprotein, Koexpression von <i>argU</i> zur Verbesserung der Translationseffizienz der in <i>E. coli</i> seltenen Arginin-codons AGA und AGG</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) Matrize: pGEX-4T-2-CAEV-Tat Primer: c-Tat 5' und c-Tat 3' Einbau des Amplifikats über <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i>-Schnittstelle</p>
<p><i>E. coli</i> BL21 / pGEX-6P-2-CAEV-Tat-IRL / pUBS520</p> <p>GST-Presc.-CAEV-Tat (angepaßte Codons)</p>	<p>Austausch der in <i>E. coli</i> selten verwendeten Codons gegen in <i>E. coli</i> häufiger verwendete synonyme Codons (v.a. Leu, Gly, Pro, Ile) durch verschiedene PCR-Mutagenese-Techniken; Koexpression von <i>argU</i> zur Verbesserung der Translationseffizienz der in <i>E. coli</i> seltenen Arginin-codons AGA und AGG</p>	<p>Kombination einer Zwei-Stufen-PCR mit einer SOE-PCR-Mutagenese (Schwarz, 1999): Matrize: pGEX-6P-2-CAEV-Tat Primer: c-Tat-IR 3', c-Tat-L 3', c-Tat-L 5', pGEX 5', pGEX 3' (Kapitel 3.15.3 und 3.15.4)</p>
<p><i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pCAL-n-CAEV-Tat-IRL / pUBS520</p> <p>CAEV-Tat-Xa-CBP (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression von CAEV-Tat mit COOH-terminaler Fusion von Calmodulin <i>binding peptide</i> (4 kDa); durch COOH-terminalen Affinitätsanhang ist die Entfernung von Translationsabbruchprodukten bereits beim ersten affinitätschromatographischen Schritt möglich</p>	<p>PCR mit Linker-Primern Matrize: pGEX-6P-2-CAEV-Tat Primer: c-Tat II 5' und c-Tat-CALn-Xa 3' Einbau des PCR-Amplifikats in pCAL-n über <i>NdeI</i>-Schnittstelle; Einbau einer COOH-terminalen Faktor Xa-Spaltstelle über 3'-Primer (Kapitel 3.15.2)</p>
<p><i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pET31b-CAEV-Tat-IRL-Strep / pUBS520</p> <p>CAEV-Tat-Strep (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression von CAEV-Tat mit zusätzlichen sieben Aminosäuren (Strep-tag II) am COOH-Terminus, über die eine Reinigung durch Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Sepharose ermöglicht werden soll</p>	<p>PCR mit Linker-Primern: Matrize: pET-31b-CAEV-Tat-IRL Xa Primer: c-Tat II 5' und c-Tat Strep 3' Klonierung des SOE-Amplifikats über <i>NdeI</i> und <i>Bpu1102I</i> in pET 31b (Kapitel 3.15.2)</p>

Reinigung	Variationen	Probleme
Affinitätschromatographie mit Glutathionsepharose; Thrombinspaltung führt zu CAEV-Tat-Fragmenten		intrinsische sekundäre Thrombin-Spaltstelle in CAEV-Tat; keine Abspaltung des GST-Fusionsanteils (26 kDa) möglich
Affinitätschromatographie mit Glutathionsepharose; anschließend Spaltung des Eluats mit PreScission-Protease; zweite Affinitätschromatographie mit Glutathionsäule, Säulendurchbruch enthält CAEV-Tat und CAEV-Tat-Abbruchprodukte	Versuche zur Trennung von CAEV-Tat von den Abbruchprodukten: RP-HPLC, Kationenaustauscherchromatographie	zu geringe Ausbeuten an CAEV-Tat voller Länge; Abtrennung der COOH-terminal verkürzten CAEV-Tat-Abbruchprodukte erfordert mindestens einen weiteren Chromatographie-Schritt; Abbruch findet an in <i>E. coli</i> seltenen Codons (v.a. Leu, Pro, Gly, Ile) statt
Affinitätschromatographie mit Glutathionsepharose; anschließend Spaltung des Eluats mit PreScission-Protease; zweite Affinitätschromatographie mit Glutathionsäule, Säulendurchbruch enthält CAEV-Tat; deutliche Reduktion der Abbruchprodukte	Versuche zur weiteren Reduzierung der Abbruchprodukte durch Absenken der Kultivierungstemperatur	Translationsabbruch nach GST; Ausbeuten zu gering für Isotopenmarkierung
Affiniätschromatographie an Calmodulin <i>Affinity Resin</i> (Stratagene); Elution mit EGTA	keine	keine Bindung an Calmodulin-Affinitätssäule
Affinitätschromatographie an Strep-Tactin Sepharose; Elution mit 5 mM Desthiobiotin	keine	Säulenmaterial nicht im präparativen Maßstab erhältlich; zu geringe Ausbeuten für NMR-Spektroskopie

Expressionssystem / Klonierungsprodukt	Intention	Klonierung
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) / pET-31b-CAEV-Tat-IRL Xa / pUBS520</p> <p>CAEV-Tat-Xa-(His)₆ (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression von CAEV-Tat mit COOH-terminalem Hexahistidinanhang; Hexahistidinanhang erlaubt Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, so soll auch in <i>inclusion bodies</i> vorliegendes CAEV-Tat-Protein für eine Reinigung zugänglich gemacht werden; durch COOH-terminalen Affinitätsanhang ist die Entfernung von Translationsabbruchprodukten bereits beim ersten affinitätschromatographischen Schritt möglich</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2)</p> <p>Matrize:</p> <p>pGEX-6P-2-CAEV-Tat Primer c-Tat II 5' und c-Tat-Xa 3' Einbau des PCR-Amplifikats in pET31b über <i>NdeI</i>- und <i>XhoI</i>-Schnittstellen; Einbau einer COOH-terminalen Faktor Xa-Spaltstelle über 3'-Primer</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) / pET-31b-CAEV-Tat-IRL PreScission / pUBS520</p> <p>CAEV-Tat-PreScission-(His)₁₀ (angepaßte Codons)</p>	<p>Verlängerung des Histidin-tags zu Deka-Histidin-Affinitätsanhang soll Bindung an IMAC-Säulenmaterial verbessern; PreScission-Protease-Spaltstelle zur Entfernung des His-tags</p>	<p>SOE-PCR (Kapitel 3.15.4)</p> <p>Matrize: pET-31b-CAEV-Tat-IRL Xa Primer: c-Tat Pres His10 5' und c-Tat II 5' T7 Terminator und c-Tat Pres His10 3'</p> <p>Klonierung des SOE-Amplifikats über <i>NdeI</i> und <i>Bpu1102I</i> in pET 31b</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) / pET-28c-CAEV-Tat-IRL PreScission</p> <p>CAEV-Tat-PreScission-Spacer-(His)₆ (angepaßte Codons)</p>	<p>Einfügen eines Spacers zwischen soll die Zugänglichkeit des His-tags bei der Bindung an IMAC-Säulenmaterial verbessern; PreScission-Spaltstelle zur Entfernung des His-tags</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2)</p> <p>Matrize: pET-31b-CAEV-Tat-IRL PreScission Primer: c-Tat III 5' und c-Tat Pres Spacer 3'</p> <p>Klonierung des <i>PagI</i>-, <i>BamHI</i>-geschnittenen Amplifikats in pET 28c / <i>NcoI</i>, <i>BamHI</i></p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) / pET-28c-CAEV-Tat-IRL Xa</p> <p>CAEV-Tat-Xa-Spacer-(His)₆ (angepaßte Codons)</p>	<p>Einfügen eines Spacers zwischen soll die Zugänglichkeit des His-tags bei der Bindung an IMAC-Säulenmaterial verbessern; Faktor Xa-Spaltstelle zur Entfernung des His-tags</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2)</p> <p>Matrize: pET-31b-CAEV-Tat-IRL PreScission Primer: c-Tat III 5' und c-Tat Xa Spacer 3'</p> <p>Klonierung des <i>PagI</i>-, <i>BamHI</i>-geschnittenen Amplifikats in pET 28c / <i>NcoI</i>, <i>BamHI</i></p>

Reinigung	Variationen	Probleme
Affinitätschromatographie an TALON-Säulenmaterial; Elution durch 100 mM Imidazol	Variation des verwendeten IMAC-Säulenmaterials	bei Affinitätschromatographie mit Nickel-beladener <i>Chelating Sepharose Fast flow</i> keine Bindung des Hexahistidininfusionsproteins; nur schwache Bindung an Cobalt-basierendes TALON-IMAC-Säulenmaterial
Affinitätschromatographie mit Nickel-beladener <i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> (nativ bzw. mit 6 M Harnstoff); Dialyse des Eluats gegen PreScission-Spaltpuffer; PreScission-Spaltung	Variation des verwendeten IMAC-Säulenmaterials Variation der Dialyseschritte nach Reinigung mit IMAC unter denaturierenden Bedingungen	geringe Ausbeuten bei IMAC unter nativen Bedingungen; nach IMAC unter denaturierenden Bedingungen große Probenverluste bei Dialyse gegen PreScission-Spaltpuffer; keine Spaltung mit PreScission
Affinitätschromatographie mit TALON <i>Superflow</i> (nativ bzw. mit 6 M Harnstoff); Dialyse des Eluats gegen PreScission-Spaltpuffer; PreScission-Spaltung	Variation des verwendeten IMAC-Säulenmaterials Variation der Dialyseschritte nach Reinigung mit IMAC unter denaturierenden Bedingungen	nach IMAC unter denaturierenden Bedingungen große Probenverluste bei Dialyse gegen PreScission-Spaltpuffer; keine Spaltung mit PreScission
Affinitätschromatographie mit Nickel- <i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> (nativ bzw. mit 6 M Harnstoff); Dialyse des Eluats gegen fallende HCl-Konzentrationen (bis 1mM); Lyophilisation; Xa-Spaltung in Xa-Spaltpuffer mit 200 mM Harnstoff und 1% Triton X-100 bei Raumtemperatur; zweite Nickelsäule	Variation der Spaltungsbedingungen	Kanamycin-Resistenz des pET28-Plasmid ermöglicht keine Koexpression von pUBS520-Plasmid (besitzt ebenfalls Kanamycin-Resistenz)

Expressionssystem/ Klonierungsprodukt	Intention	Klonierung
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) / pET-19b-CAEV-Tat-IRL Xa / pUBS 520</p> <p>CAEV-Tat-Xa-Spacer-(His)₆ (angepaßte Codons)</p>	<p>Einfügen eines Spacers zwischen soll die Zugänglichkeit des His-tags bei der Bindung an IMAC-Säulenmaterial verbessern; Faktor Xa-Spaltstelle zur Entfernung des His-tags; durch Umklonieren in Vektor mit Ampicillin-Resistenz soll Möglichkeit zur Koexpression mit pUBS520 (Kanamycin-Resistenz) geschaffen werden</p>	<p>Verdau von pET-28c-CAEV-Tat-IRL Xa mit <i>Xba</i>I und <i>Bpu</i>1102I, Insertion in <i>Xba</i>I-, <i>Bpu</i>1102I geschnittenen pET19b</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) RIL/ pTKK19-Ubi-CAEV-Tat-IRL</p> <p>(His)₁₀-EK-Ubiquitin-CAEV-Tat (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression als Dekahistidin-Ubiquitin-Fusion; Reinigung über IMAC auch unter denaturierenden Bedingungen möglich; Abspaltung der Ubiquitininfusion über Ubiquitin-Hydrolase hinterläßt keine zusätzlichen Aminosäuren am NH₂-Terminus; Erhöhung der Ausbeute an rekombinantem Protein durch Verwendung eines <i>high copy</i> Plasmids</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) Matrize: pET-19b-CAEV-Tat-IRL-tagless Primer: c-Tat Ubi und T7-Terminator Klonierung in pTKK19-Ubi / <i>Nsi</i>I, T4 Pol, <i>Bam</i>HI/deph. über <i>blunt end</i> bzw. <i>Bam</i>HI-Schnittstelle</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) RIL/ pTKK19-Ubi-CAEV-Tat-IRL-C76S-C78S-C81S</p> <p>(His)₁₀-EK-Ubiquitin-CAEV-Tat cys⁻ (angepaßte Codons)</p>	<p>s. o. Austausch der Cysteine gegen Serine, um Aggregationsprobleme zu umgehen</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) Matrize: pET-19b-CAEV-Tat-IRL-tagless Primer: c-Tat Ubi und c-Tat Cys⁻ III Klonierung in pTKK19-Ubi / <i>Nsi</i>I, T4 Pol, <i>Bam</i>HI/deph. über <i>blunt end</i> bzw. <i>Bam</i>HI-Schnittstelle</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) RIL / pET-19b-CAEV-Tat-IRL-tagless</p> <p>CAEV-Tat ohne Affinitätsanhang (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression ohne Affinitätsanhang; keine Abspaltung eines Affinitätsanhangs nötig</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) Matrize: pGEX-6P-2-CAEV-Tat-IRL Primer: c-Tat II 5' und pGEX 3' Klonierung des <i>Pag</i>I, <i>Xho</i>I geschnittenen PCR-Amplifikats in pET19b / <i>Nco</i>I, <i>Xho</i>I, deph.</p>
<p><i>E. c.</i> BL21 (DE3) RIL / pET-32a-CAEV-Tat-IRL-C76S-C78S-C81S</p> <p>CAEV-Tat cys⁻ ohne Affinitätsanhang (angepaßte Codons)</p>	<p>Expression ohne Affinitätsanhang; keine Abspaltung eines Affinitätsanhangs nötig; Austausch der Cysteine gegen Serine, um Aggregationsprobleme zu umgehen</p>	<p>PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) Matrize: pGEX-6P-2-CAEV-Tat-IRL Primer: c-Tat II 5' und c-Tat Cys⁻ III Klonierung des <i>Pag</i>I, <i>Xho</i>I geschnittenen PCR-Amplifikats in pET19b / <i>Nco</i>I, <i>Xho</i>I, deph.</p>

Reinigung	Variationen	Probleme
Affinitätschromatographie mit Nickel- <i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> (nativ bzw. mit 6 M Harnstoff); Dialyse des Eluats fallende HCl-Konzentrationen (bis 1mM); Lyophilisation; Xa-Spaltung in Xa-Spaltpuffer mit 200 mM Harnstoff und 1% Triton X-100 bei Raumtemperatur; zweite Nickelsäule	Variation der Spaltungsbedingungen; Versuche, Triton X-100 aus Probe zu entfernen	Triton X-100 nur über weiteren chromatographischen Schritt (Kationentauscher) zu entfernen; geringe Ausbeuten
Affinitätschromatographie mit Nickel- <i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> unter nativen Bedingungen; Spaltung mit Ubiquitinhydrolase	Absenkung der Wachstumstemperatur zur Verringerung der Abbruchprodukte	durch Expression von <i>high copy</i> Plasmid verstärkte Bildung von Translationsabbruchprodukten keine Spaltung mit Ubiquitinhydrolase
s. o.	s. o.	s. o.
Reinigung über Kationenaustauscher-Chromatographie und anschließende Hydrophobe Interaktionschromatographie; Reinigung in einem chromatographischen Schritt mittels Heparinsäule	verschiedene Kationenaustauscher-Materialien; pH-Wert bei der Kationenaustauscherchromatographie; verschiedene HIC-Materialien (Octyl-Sepharose, Butyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose (<i>low sub</i> und <i>high sub</i>))	Aggregation bei Konzentrationen größer 400 μ M
Reinigung in einem chromatographischen Schritt mittels Heparinsäule	keine	gewähltes Expressions- und Reinigungsprotokoll

← Tabelle 4.1 Expressionssysteme und Reinigungsprotokolle für CAEV–Tat

Alle im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Expressionssysteme für CAEV–Tat, die zugrundeliegenden Intentionen, die verwendeten Klonierungsstrategien, Reinigungsprotokolle und sich ergebenden Probleme sind tabellarisch zusammengefaßt.

Ausgehend von dem oben beschriebenen auf die *codon usage* in *E. coli* optimierten CAEV *tat*–Gen wurde das Tat–Protein als Glutathion–S–Transferase–Fusionsprotein (GST), als Fusion mit dem Calmodulin *binding peptide* (CBP), als Hexa– bzw. Dekahistidininfusion, als Ubiquitininfusion und als Fusion mit dem Streptavidin bindenden Strep–tag II exprimiert. Der Fusionsanteil wurde hierbei sowohl COOH–terminal (CBP, Histidininfusion, Strep–tag II) als auch NH₂–terminal (GST, Histidin–Ubiquitininfusion) von CAEV–Tat angebracht. Durch das Anbringen des Affinitätsanhangs am COOH–Terminus sollten Translationsabbruchprodukte bereits im ersten affinitätschromatographischen Schritt entfernt werden können, da diese – aufgrund des vorzeitigen Abbruchs – keinen Affinitätsanhang besitzen. Zur Abspaltung des Fusionspartners wurden verschiedene Proteasespaltstellen (Faktor Xa, PreScission–Protease, Enterokinase, Ubiquitin–Hydrolase) zwischen Fusionspartner und CAEV–Tat eingeführt.

Die Reinigung von CAEV–Tat sollte über Affinitätschromatographie mit dem jeweiligen Affinitätsanhang, Abspaltung des Affinitätsanhangs mit der jeweiligen Protease und einen abschließenden zweiten Affinitätschromatographie–Schritt, bei dem der abgespaltene Affinitätsanhang und ungespaltenes Fusionsprotein entfernt werden sollten, durchgeführt werden.

Nur mit den letzten beiden aufgeführten Systemen konnten ausreichende Mengen an CAEV–Tat für NMR–spektroskopische Untersuchungen erhalten werden. Diese werden im Folgenden näher vorgestellt.

4.1.3 Das Expressionssystem für CAEV–Tat

CAEV–Tat wurde daraufhin ohne Affinitätsanhang mit dem Vektor pET 19b exprimiert (Kapitel 4.11.4). Dieser erlaubt eine T7–RNA–Polymerase abhängige Expression von CAEV–Tat. Der Expressionsstamm *E. c.* BL21 (DE3) *CodonPlus*–RIL (Kapitel 3.1) besitzt eine chromosomale Kopie des T7 RNA–Polymerase–Gens unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors, das bei Induktion mit IPTG gebildet exprimiert wird. Das pET 19b–Plasmid verfügt über eine Ampicillin–Resistenz (Kapitel 3.2), das für die tRNAs kodierende bereitgestellte Plasmid des RIL–Stammes

besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz (Kapitel 3.1).

Zur Reinigung von CAEV-Tat bot sich Kationenaustauscherchromatographie an, da CAEV-Tat einen berechneten pI von ca. 11,0 besitzt und bei physiologischen pH-Werten mit positiver Nettoladung vorliegt.

Konstruktion des Plasmids pET 19b-CAEV-Tat

Durch PCR mit den beiden Linker-Primern c-Tat II 5' und pGEX 3' wurde die für CAEV-Tat kodierende Nukleotidsequenz aus dem Vektor pGEX-6P-2-CAEV-Tat-IRL amplifiziert (Kapitel 3.15.2). Der Primer c-Tat II 5' führte zusätzlich eine *PagI*-Schnittstelle am 5'-Ende zu der bereits am 3'-Ende der *tat*-Sequenz vorliegenden *XhoI*-Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *PagI* und *XhoI* restringiert (Kapitel 3.14.1) und mit einem *NcoI*- und *XhoI*- geschnittenen und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pET 19b-Plasmid ligiert (Kapitel 3.14.5). Nach der Transformation des butanolgefällten (Kapitel 3.13.1) Ligationsansatzes in elektrokompetente *E. c.* Top 10-Zellen (Kapitel 3.16.2) wurden positive Transformanten mittels Kolonie-PCR (Kapitel 3.15.1) identifiziert. Die präparierte Plasmid-DNA (Kapitel 3.12.2) wurde zur Kontrolle sequenziert (3.14.6) und anschließend in normalkompetente *E. c.* BL21 (DE3) *CodonPlus*-RIL transformiert (Kapitel 3.16). Abbildung 4.4 zeigt den Aufbau des so generierten Plasmids.

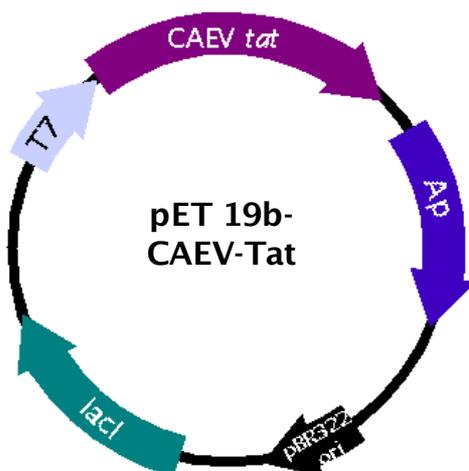


Abbildung 4.4 Das Plasmid pET19-CAEV-Tat
CAEV *tat* wird ohne Affinitätsanhang T7-RNA-Polymerase-abhängig exprimiert. Das T7 RNA-Polymerase-Gen wird vom Wirtstamm *E.c.* BL21 (DE3) *CodonPlus*-RIL chromosomal kodiert und bei IPTG-Zugabe exprimiert.

Einige Transformanten wurden Induktionstests mit IPTG unterzogen (Kapitel 3.17.3). Das Auftreten einer zusätzlichen Bande auf einem SDS-Gel (Kapitel 3.8.1) bei ca. 11 kDa vier Stunden

nach der Induktion zeigte eine erfolgreiche Expression von CAEV-Tat an (Abbildung 4.5)

Reinigung von CAEV-Tat

E. c. BL21 (DE3) *CodonPlus*-RIL/pET 19b-CAEV-Tat wurde bei 37°C in Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigem Medium angezogen und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 mit 1 mM IPTG induziert (Kapitel 3.17.4). Nach vier Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und in Lysispuffer resuspendiert (Kapitel 3.18.1). Nach dem Zellaufschluß durch mehrmaliges Behandeln mit Ultraschall wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (Abbildung 4.5), und mit dem Überstand wurde eine Kationenaustauscherchromatographie durchgeführt.

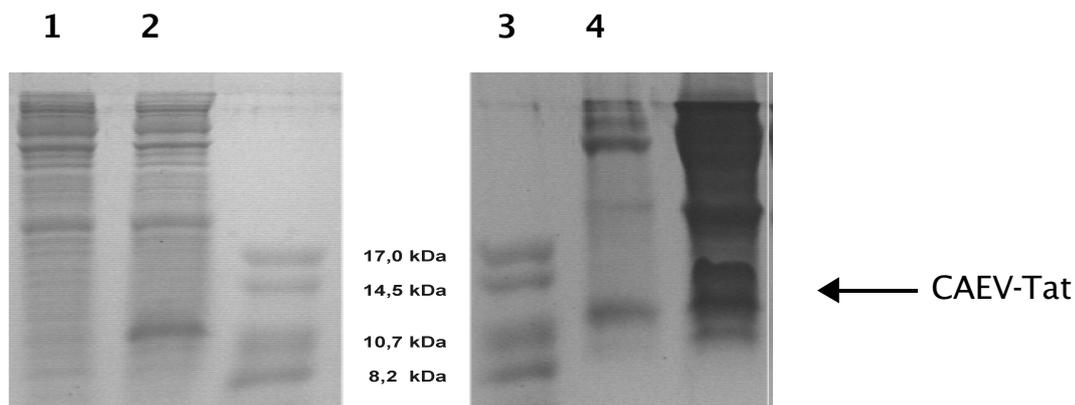


Abbildung 4.5 Induktion und Zellaufschluß von CAEV-Tat

Gezeigt sind Schägger-Jagow-Gele mit 6M Harnstoff. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Fluka-Standard (Fluka, Neu-Ulm) verwendet. Die für CAEV-Tat erwartete Laufhöhe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bahn 1: vor Induktion

Bahn 2: 4 h nach Induktion

Bahn 3: unlösliche Zellbestandteile

Bahn4: Überstand für die Kationenaustauscher-Chromatographie

Reinigung über CM-Sepharose und Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Der erste Reinigungsschritt erfolgte über Kationenaustauscherchromatographie mit einer CM-Sepharose-Säule bei pH 8.0. Die Verwendung anderer Kationenaustauscherchromatographie-

Materialien wie Mono S erbrachte keine Verbesserung gegenüber der Verwendung von CM-Sephrose. Säulenläufe bei pH-Werten unter 8.0 führten zu einer verstärkten Bindung zellulärer Proteine an das Säulenmaterial und setzten so die Säulenkapazität herab. pH-Werte über 8.0 führten zu keiner Verbesserung mehr.

Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte über einen Salzgradienten bis 1 M NaCl über insgesamt 20 Säulenvolumen (Kapitel 3.18.1). CAEV-Tat eluierte bei Salzkonzentrationen größer 500 mM NaCl von der Säule. Da in SDS-Gelen noch zusätzliche Proteinbanden in einigen CAEV-Tat enthaltenden Fraktionen sichtbar waren, war ein weiterer Reinigungsschritt notwendig (Abbildung 4.6).

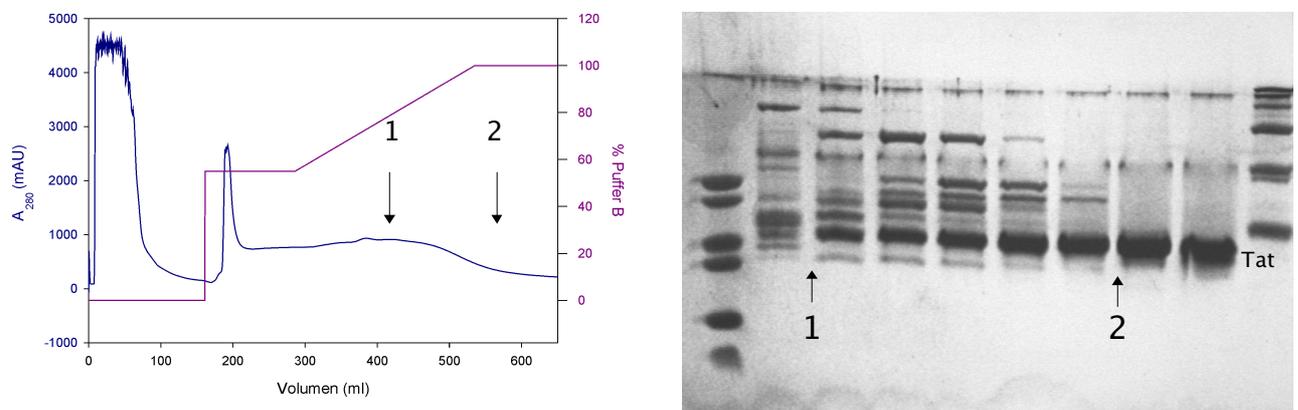


Abbildung 4.6 Reinigung von CAEV-Tat über Kationenaustauscher-Chromatographie mit CM-Sephrose (Kapitel 3.18.1)

In der oberen Abbildung ist das für die verwendete CM-Sephrose Fast Flow-Säule (25 ml Bettvolumen) erhaltene Elutionsprofil gezeigt. In Blau ist die Absorption bei 280 nm eingezeichnet, in Rot die Konzentration des Elutionspuffers (1 M NaCl entsprechen 100 %). In der unteren Abbildung ist ein Schägger-Jagow-Gel (3.8.2) mit einigen Fraktionen der Säule abgebildet (Bahn 1: Fluka-Molekulargewichtsstandard, Bahn 2: Fraktion unterhalb 500 mM NaCl, Bahnen 3–6: Fraktionen der CM-Sephrose-Säule zwischen Pfeil 1 und Pfeil 2, Bahnen 7 und 8: Fraktionen rechts von Pfeil 2, Bahn 10: Biorad-Molekulargewichtsstandard).

Im Säulendurchbruch befanden sich zelluläre Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden hatten, in den Fraktionen unterhalb einer Salzkonzentration von 500 mM befand sich kein CAEV-Tat. Bei höheren Salzkonzentrationen (ab Pfeil 1 im Elutionsprofil) eluierte CAEV-Tat von der Säule, zunächst noch mit Verunreinigungen durch andere Proteine (Fraktionen zwischen Pfeil 1 und Pfeil 2).

Da nach dem Kationenaustauscherschritt CAEV-Tat in einem Puffer mit hoher Salzkonzentration vorlag, erschien die Verwendung einer HIC-Säule als nächstem Schritt sinnvoll, da hierbei die Bindung an das Säulenmaterial bei hohen Salzkonzentrationen stattfindet und durch abnehmende Salzkonzentrationen eluiert wird.

Die CAEV-Tat enthaltenden Fraktionen der CM-Sephrose-Säule wurden vereinigt und nach der

Zugabe von Ammoniumsulfat (Endkonzentration 1 M) auf eine HIC-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte durch fallende Salzkonzentrationen bis zu einer Endkonzentration von 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0 M NaCl in Puffer B. Anschließend wurde noch an die Säule gebundenes Protein durch 30 % Isopropanol entfernt.

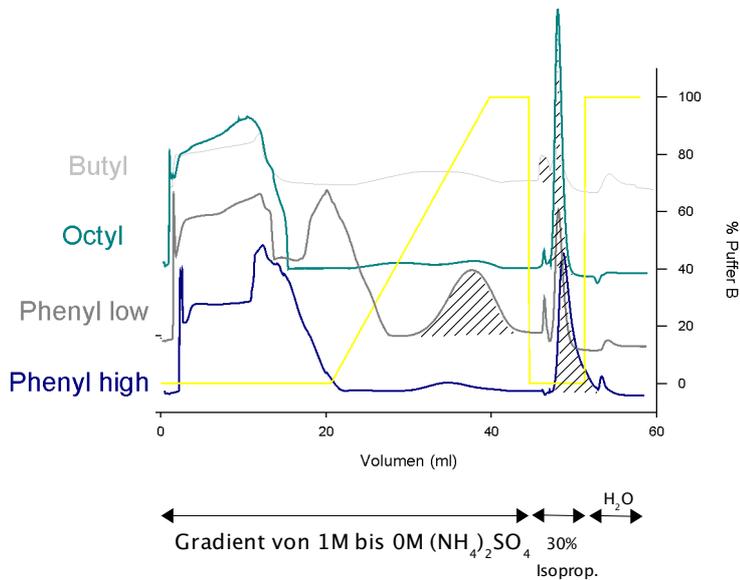


Abbildung 4.7 Eignung verschiedener HIC-Materialien für die Reinigung von CAEV-Tat

Vier verschiedene HIC-Materialien wurden ausprobiert. Gezeigt ist eine Überlagerung der für die einzelnen Materialien erhaltenen Elutionsprofile. Grau schraffiert sind jeweils die Fraktionen, die sauberes CAEV-Tat enthielten, hinterlegt. Nur bei Verwendung von Phenyl-Sepharose (low sub) eluierte CAEV-Tat bereits ohne Isopropanol-Zusatz von der Säule.

Vier verschiedene HIC-Säulenmaterialien wurden auf diese Weise getestet (Abbildung 4.7). Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (low sub) erwies sich als geeignetstes Material, da CAEV-Tat an dieses Säulenmaterial binden konnte, die Verunreinigungen vollständig entfernt werden konnten und die Elution von CAEV-Tat noch bei niedrigen Salzkonzentrationen stattfand und nicht erst bei Isopropanol-Zugabe (Abbildung 4.8).

Das hier beschriebene Expressions- und Reinigungsprotokoll konnte auch auf die Expression in Minimalmedium übertragen werden und kam auch bei der Präparation von ^{15}N -markiertem CAEV-Tat zum Einsatz.

Die typischen Ausbeuten lagen bei ca. 3 mg/l Kulturvolumen.

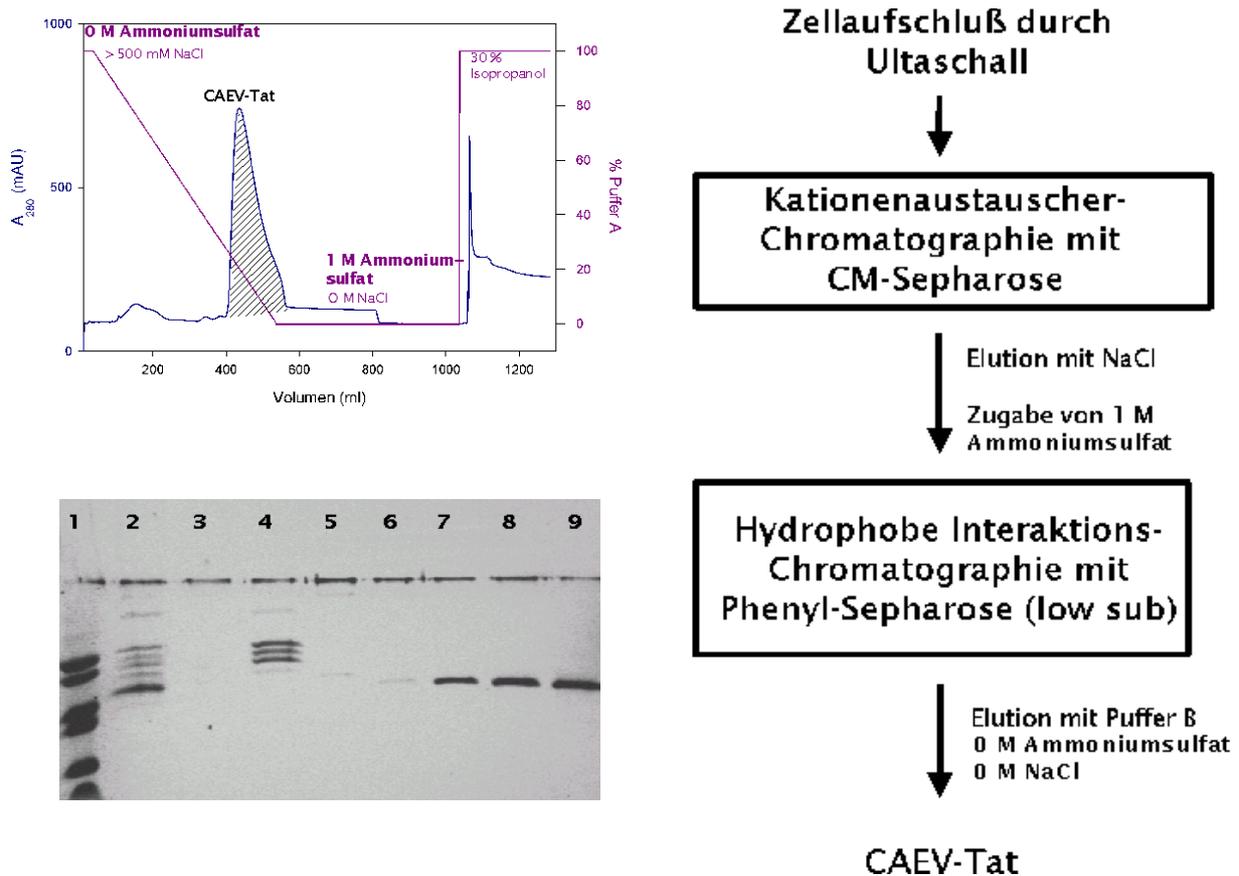


Abbildung 4.8 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit Phenylsepharose (low sub)

Links abgebildet ist das Elutionsprofil des zweiten Reinigungsschritt über HIC mit Phenylsepharose (low sub)–Säulenmaterial (blau: A₂₈₀, violett: Gradientenverlauf). Darunter gezeigt ist ein Schagger–Jagow–Gel (Kapitel 3.8.2) mit einzelnen Fraktionen des Säulenlaufs (Bahn 1: Fluka–Molekulargewichtsstandard, Bahn 2: Probenauftrag (vereinigte CAEV–Tat–Fraktionen der CM–Sepharose), Bahnen 3 bis 5: Fraktionen mit Verunreinigungen, Bahnen 6 bis 9: Fraktionen mit sauberem CAEV–Tat).

Rechts abgebildet ist eine Zusammenfassung des etablierten Reinigungsprotokolls für CAEV–Tat.

Reinigung über Heparinsäule

Um die Ausbeuten zu erhöhen, wurde ein weiteres Reinigungsprotokoll etabliert, das auf der Verwendung von Heparin–Sepharose als Kationenaustauschermaterial beruht (Abbildung 4.9).

Bei diesem Protokoll erfolgen Zellaufschluß und Kationenaustauscher–Schritt bei pH 6,5. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen Salzgradienten bis 2 M NaCl über insgesamt 30 Säulenvolumen. CAEV–Tat eluiert bei Salzkonzentrationen größer 1 M NaCl mit einer Reinheit von ~ 95%. Auf weitere Reinigungsschritte konnte daher verzichtet werden. Dieses Protokoll

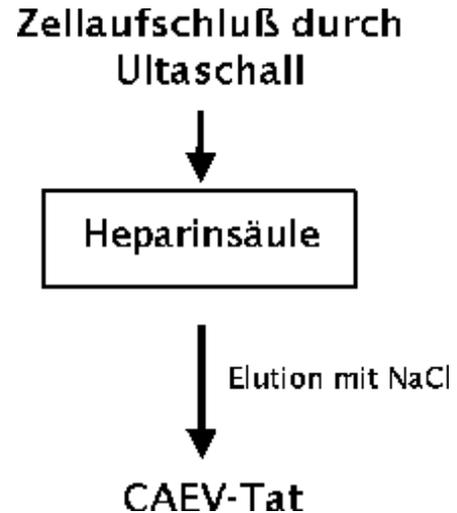
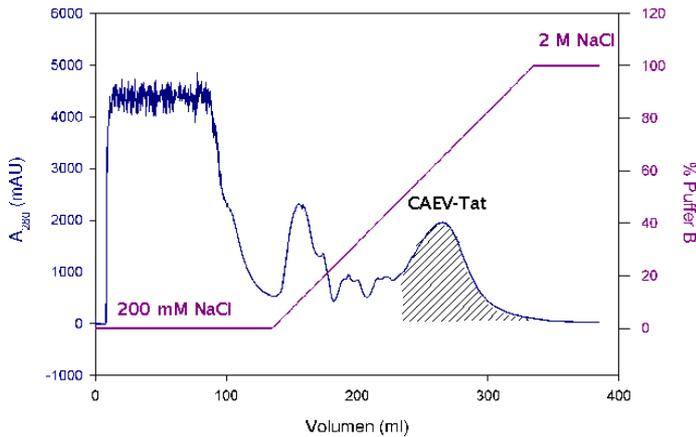
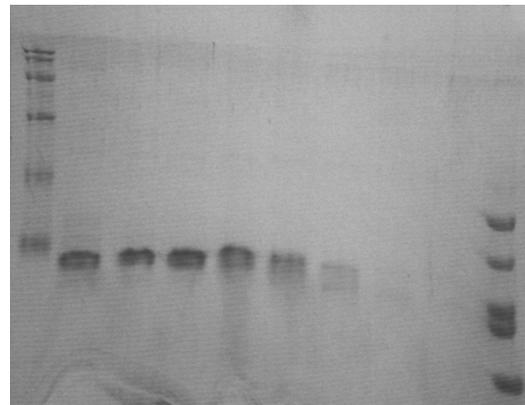


Abbildung 4.9: Reinigung von CAEV-Tat über Heparin-Säule (Kapitel 3.12.1)

Rechts oben ist der Ablauf der Reinigung über Heparin-Säule zusammengefaßt.

Links oben gezeigt ist das erhaltene Elutionsprofil für eine 15 ml HiTrap Heparin-Säule. Die Elution erfolgte durch steigende NaCl-Konzentrationen. CAEV-Tat eluierte sauber bei NaCl-Konzentrationen über 1 M (schraffierter Bereich im Elutionsprofil).

Rechts unten ist ein Schägger-Jagow-Gel (Kapitel 3.8.2) mit den CAEV-Tat enthaltenden Fraktionen abgebildet.



konnte auch erfolgreich auf die Reinigung von CAEV-Tat-cys⁻ (Kap. 4.1.5) angewendet werden und konnte auch auf die Expression in Minimalmedium übertragen werden.

Durch NH₂-terminales Ansequenzierung konnte bestätigt werden, daß es sich bei dem gereinigten Protein um CAEV-Tat handelt. Ferner wurde festgestellt, daß das NH₂-terminale Methionin fehlt. Durch MALDI-MS wurde das Molekulargewicht des Proteins ermittelt. Der erhaltene Wert von 10416 kDaa entspricht dabei bis auf 2 Da dem theoretischen Molekulargewicht von CAEV-Tat ohne NH₂-terminales Methionin.

Die typischen Ausbeuten dieses Protokolls lagen bei 7 mg/l Kulturvolumen Minimalmedium. Somit lagen ausreichende Mengen für erste strukturelle Charakterisierungen mit CD- und NMR-Spektroskopie vor. Die Markierung mit ¹⁵N durch Anzucht in Minimalmedium (Kapitel 3.4) mit ¹⁵NH₄Cl als einziger Stickstoffquelle konnte ebenfalls durchgeführt werden.

4.1.4 Erste strukturelle Charakterisierung von CAEV-Tat

Um Aussagen über die Sekundärstruktur von CAEV-Tat zu erhalten, wurde ein CD-Spektrum im Fern-UV-Bereich (Kapitel 3.19) aufgenommen (Abbildung 4.10).

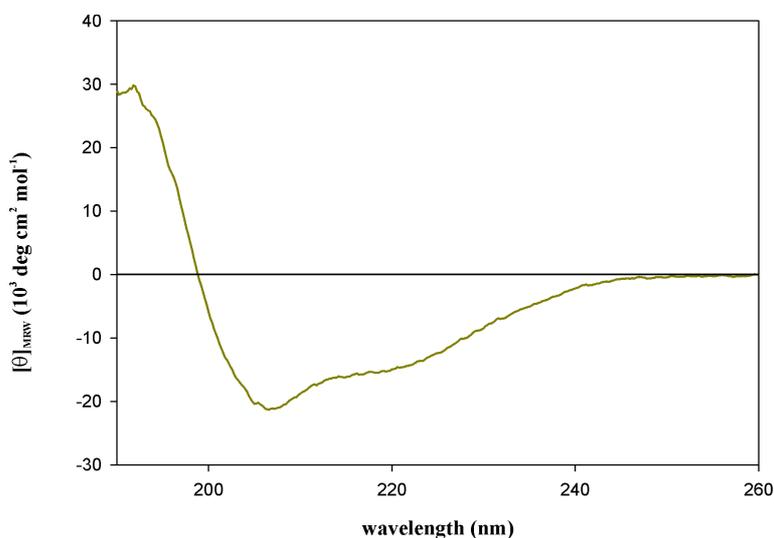


Abbildung 4.10 CD-Spektrum von CAEV-Tat

Fern-UV-CD-Spektrum einer 10 μM Lösung von CAEV-Tat in 50 mM Kaliumphosphat, pH 5,8. Minima bei 208 und 222 nm sind Anzeichen für ein α-helikales Protein.

Das erhaltene CD-Spektrum zeigt, daß es sich bei CAEV-Tat um ein α-helikales Protein handelt: Die Elliptizitätsminima bei 208 und bei 222 nm und das stark positive Signal unterhalb von 195 nm sind typische Merkmale eines α-Helix-Spektrums (Woody, 1994).

Sowohl das in Abbildung 4.14 gezeigte 1D-Spektrum als auch das ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum (Abbildung 4.11) weisen typische Charakteristika von Spektren α-helikaler Proteine auf: Im 1D-Spektrum liegen die H_α-Resonanzen hochfeld von 4,5 ppm und der Bereich der Amidprotonen weist nur eine geringe Dispersion auf.

Drei hochfeldverschobene Resonanzen von Methylgruppen zwischen -0,5 und 0,5 ppm im 1D-Spektrum und die gute Dispersion der Resonanzen der insgesamt sechs Tryptophan-Reste in CAEV-Tat bei ca. 10 ppm rühren von unterschiedlichen chemischen Umgebungen dieser Protonen her und sind daher Hinweise auf das Vorliegen eines gefalteten Proteins.

Im HSQC-Spektrum fallen vor allem die Intensitätsunterschiede zwischen den Resonanzen auf. Dies deutet auf das Vorliegen von konformationellen Heterogenitäten hin. Während einige Bereiche

des CAEV-Tat-Proteins anscheinend flexibler sind und dadurch zu scharfen Resonanzlinien führen, deuten die Linienverbreiterungen der übrigen Resonanzen auf dynamische Prozesse hin, die auf der intermediären NMR-Zeitskala ablaufen.

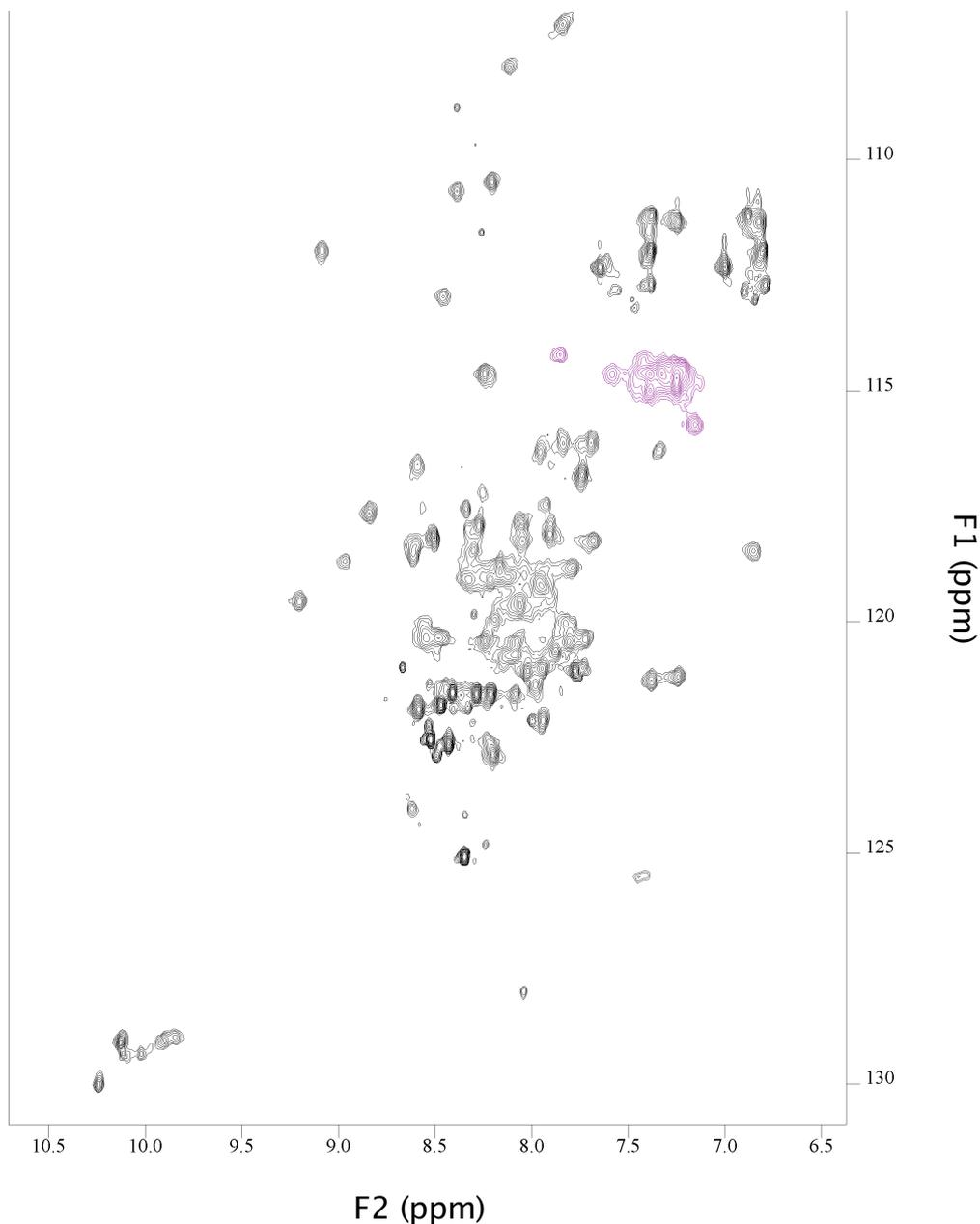


Abbildung 4.11 ^1H - ^{15}N -HSQC von CAEV-Tat

HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem CAEV-Tat (100 μM in 100 mM Kaliumphosphat, pH 5,8 und 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % (v/v) D_2O). Zu sehen sind Resonanzen von Protonen, die an ^{15}N -Kerne gebunden sind: Amidprotonen des Proteinrückgrats, der Seitenketten von Asparagin- und Glutamin-Resten und stickstoffgebundene Seitenketten von Argininen sowie die NH-Protonen der Indolringe der Tryptophane. Farbig markierte Signale sind entlang der ^{15}N -Dimension (F1) einfach gefaltet.

Bei den für NMR-spektroskopischen Proteinkonzentrationen traten Aggregationsphänomene auf (Kapitel 4.1.5): Bei Proteinkonzentrationen ab ca. 400 μM führte eine weitere Konzentrationserhöhung auf ca. 800 μM nicht zu der erwarteten Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, sondern resultierte in einer Verschlechterung. Das Rückverdünnen der höherkonzentrierten Probe auf die Ausgangskonzentration führte nicht mehr zum ursprünglichen Signal-Rausch-Verhältnis, die Aggregation der Probe war also irreversibel.

Beim Auftragen der ca. 1 mM konzentrierten NMR-Probe auf ein denaturierendes Schägger-Jagow-Gel (Kapitel 3.8.2) waren CAEV-Tat-Dimere bzw. Oligomere zu beobachten (Abbildung 4.13), die bei niedrigeren Konzentrationen, z. B. auf Gelen, die während der Präparation von CAEV-Tat gefahren worden waren, nicht zu beobachten waren.

Dimere und Oligomere von CAEV-Tat sind als Ursache des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses naheliegend, da eine Vergrößerung des Molekulargewichts, z. B. durch Oligomerisierung zu einer Verlängerung der Korrelationszeiten des Moleküls und zu einer Erniedrigung der T_2 -Zeit für die transversale Relaxation führt. Dies führt zu einem schnelleren Abklingen des FID und nach der Fouriertransformation zu einer Linienverbreiterung. Durch Oligomerisierung kann es auch zur Ausbildung von Mikro-Heterogenitäten kommen. Möglicherweise wurde durch die Konzentrierung der Probe der Anteil der für die NMR-signifikanten Monomer-Spezies drastisch verringert. Die längeren Korrelationszeiten der Dimere und Oligomere führt zu einer Linienverbreiterung, so daß man für diese keine Signale mehr erhält und nur noch die – verringerten – Signale für das Monomer.

4.1.5 Das Expressionssystem für CAEV-Tat-cys⁻

Als mögliche Ursache für die Aggregation von CAEV-Tat und das Auftreten von Oligomeren bei höheren Protein-Konzentrationen kamen die drei Cystein-Reste am COOH-Terminus von CAEV-Tat in Frage (Abbildung 1.3). Daher wurden diese durch PCR-Mutagenese mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2) gegen Serine ausgetauscht, um zu klären, ob eine cysteinfreie CAEV-Tat-Mutante in höheren Konzentrationen weniger aggregationsanfällig und damit für NMR-spektroskopische Untersuchungen geeigneter ist.

CAEV-Tat-cys⁻ wurde ebenfalls ohne Affinitätsanhang exprimiert und sollte nach dem für das Wildtyp-Protein entwickelten Protokoll über Kationenaustauscherchromatographie über eine Heparinsäule gereinigt werden (Kapitel 3.18.1).

Konstruktion des Plasmids pET 32a–CAEV–Tat–cys⁻

Mit den Primern c–Tat II 5' und c–Tat Cys⁻ III wurde eine PCR mit Linker–Primern mit dem Plasmid pGEX–6P–2–CAEV–Tat–IRL durchgeführt (Kapitel 3.15.2). Über das Oligonukleotid c–Tat II 5' wurden die für die Cysteine 76, 78 und 81 kodierenden Basen gegen Serincodons ausgetauscht. Außerdem wurde eine *PagI*–Schnittstelle am 5'–Ende der CAEV–*tat*–Nukleotidsequenz eingeführt.

Das PCR–Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese gereinigt (Kapitel 3.13.3) und mit den Restriktionsendonukleasen *PagI* und *XhoI* verdaut (Kapitel 3.14.1). Nach der Ligation mit einem *NcoI* und *XhoI* verdauten und dephosphorylierten pET 32a–Plasmid (Kapitel 3.14.5) wurde der Ligationsansatz mit Butanol gefällt (3.13.1) und in elektrokompetente *E. c.* Top 10 transformiert (Kapitel 3.16.2).

Positive Transformanten konnten durch Kolonie–PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden identifiziert werden (Kapitel 3.15.1). Nach der Verifizierung der Mutationen durch Sequenzierung der Plasmid–DNA (Kapitel 3.14.6) wurde die DNA in normalkompetente *E. c.* BL21 (DE3) *CodonPlus*–RIL–Zellen transformiert (Kapitel 3.16.1). Mit einigen Transformanten wurden Induktionstests durchgeführt (Kapitel 3.17.3).

Die Expression von CAEV–Tat konnte vier Stunden nach der Induktion mit IPTG durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei ca. 11 kDa im SDS–Gel (Kapitel 3..8) bestätigt werden.

Reinigung von CAEV–Tat–cys

Expression und Reinigung von CAEV–Tat–cys⁻ verliefen analog wie für CAEV–Tat (Kapitel 3.18.1), lediglich auf die Zugabe von Reduktionsmittel in Aufschluß–, Säulen– und NMR–Puffern wurde verzichtet (Abbildung 4.12).

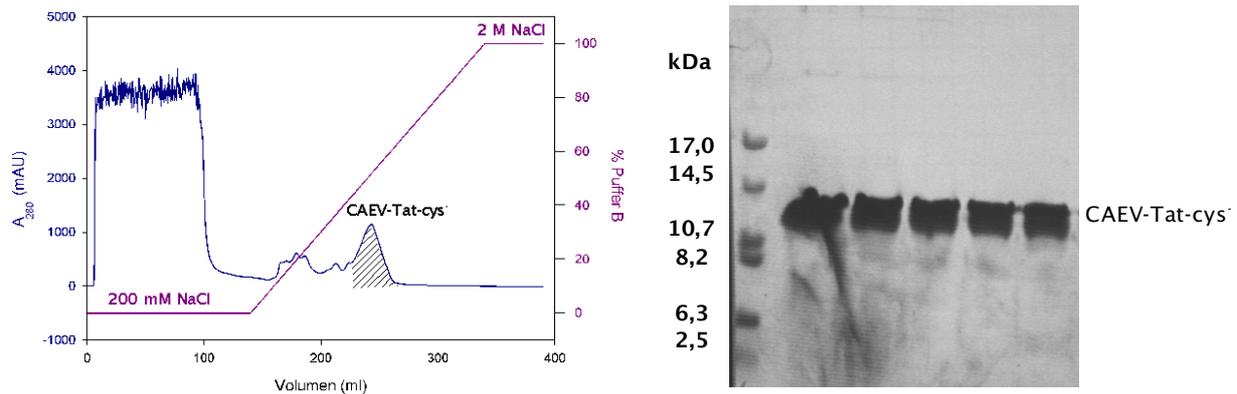


Abbildung 4.12: Die Reinigung von CAEV-Tat-Cys⁻

Die Reinigung von CAEV-Tat-Cys⁻ erfolgte nach dem für das Wildtyp-Protein etablierten Protokoll (Kapitel 3.18.1). Links ist das Elutionsprofil der Heparinsäule, rechts ein 19 %iges SDS-Gel mit den CAEV-Tat-Cys⁻ enthaltenden Elutionsfraktionen abgebildet (Kapitel 3.8.1).

Dimer- bzw. Oligomer-Banden in SDS-Gelen konnten bei CAEV-Tat-cys⁻ nicht mehr beobachtet werden (Abbildung 4.13).

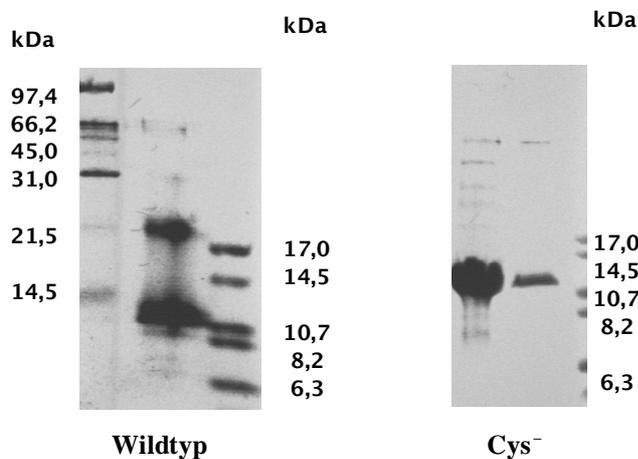


Abbildung 4.13: Vergleich CAEV-Tat und CAEV-Tat-cys⁻

Abgebildet sind zwei Schägger-Jagow-Gele (Kapitel 3.8.2), auf die jeweils 20 μ l einer 1 mM NMR-Probe von CAEV-Tat bzw. CAEV-Tat-cys⁻ aufgetragen wurde. Beim Wildtyp-Protein ist bei dieser hohen Konzentration die Bildung einer Dimer-Bande bei ca. 22 kDa und höherer Oligomere zu erkennen, obwohl β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel im Probenauftragspuffer bzw. DTT im NMR-Puffer enthalten war. Bei der cysteinfreien Mutante hingegen ist keine Dimerisierung mehr zu beobachten.

Die cysteinfreie Mutante wies bei der NMR-Spektroskopie keine Anzeichen für Aggregation auf und war in NMR-Konzentrationen (ca. 1 mM) löslich.

Um zu überprüfen, ob die Mutationen Auswirkungen auf die Struktur des Proteins genommen hatten, wurde ein Vergleichsspektrum aufgenommen (Abbildung 4.14). Die für CAEV-Tat charakteristischen Merkmale im 1D-Spektrum blieben auch in der cysteinfreien Mutante erhalten: Auch hier treten die hochfeldverschobenen Methylgruppen auf und die NH-Protonen der Tryptophan-Indolringe weisen eine gute Dispersion auf.

Das hohe Maß an Ähnlichkeit zwischen den beiden Spektren läßt darauf schließen, daß auch die Strukturen von CAEV-Tat und der cysteinfreien Mutante von CAEV-Tat nahezu identisch sind.

Für weitergehende strukturelle Untersuchungen an CAEV-Tat kann also auf die NMR-tauglichere cysteinfreie Mutante des Proteins zurückgegriffen werden.

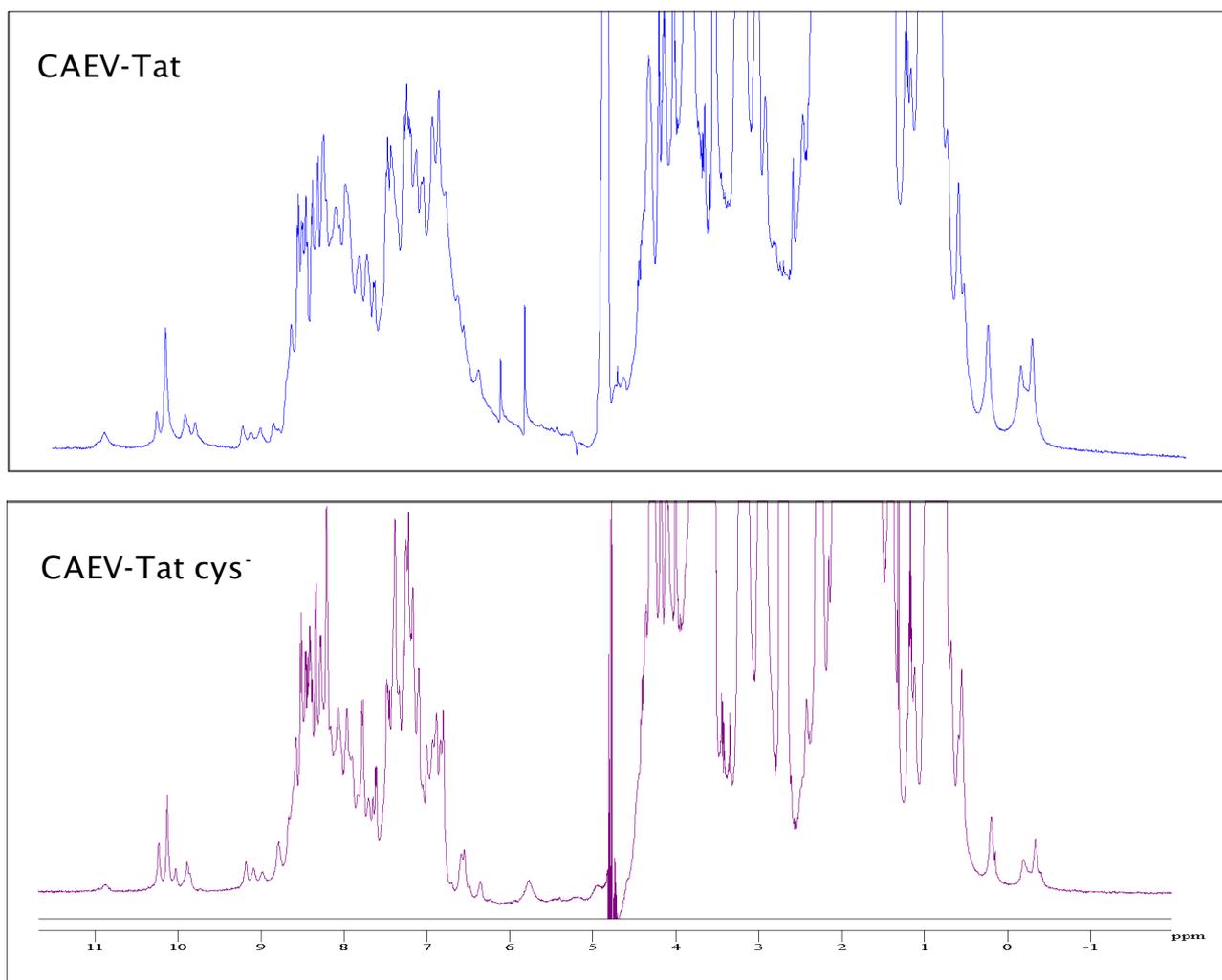


Abbildung 4.14 Vergleich der 1D-¹H-Spektren von CAEV-Tat und CAEV-Tat-cys⁻

CAEV-Tat war 200 µM in 100 mM Kaliumphosphat pH 5,8; 100 mM NaCl; 5 mM DTT; 10 % (v/v) D₂O gelöst, CAEV-Tat-cys⁻ war 600 µM in 100 mM Kaliumphosphat pH 5,8; 100 mM NaCl; 10 % (v/v) D₂O gelöst. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen.

4.2 Klonierung von Jun, Fos und FosbZIP

In den Arbeiten von Morse et al. (1999) zur Interaktion von MVV-Tat mit den zellulären Proteinen Jun und Fos war auf die entsprechenden Proteine aus Ratte und aus Mensch zurückgegriffen worden, da die entsprechenden Proteinsequenzen aus Schaf bzw. Ziege nicht bzw. nur unvollständig bekannt sind. Deshalb soll bei späteren Untersuchungen zur Interaktion von CAEV-Tat mit Jun bzw. Fos ebenfalls zunächst auf die entsprechenden humanen Proteine zurückgegriffen werden.

4.2.1 Klonierung von *c-jun* und *c-fos*

Durch eine TBLASTN-Suche mit den humanen Proteinsequenzen von *c-Jun* und *c-Fos* gegen die dbEST-Datenbank wurde eine Liste mit Nukleotidsequenzen entsprechender *c-DNA*-Klone erhalten. Es fand sich für beide Proteine kein *c-DNA*-Klon, der der gesamten Proteinsequenz von Jun bzw. Fos entsprach. Daher wurden mehrere *c-DNA*-Klone ausgewählt, deren Nukleotidsequenzen zusammen die komplette *jun*- bzw. *fos*-Nukleotidsequenz abdeckten. Die entsprechenden Bereiche sollten über PCR mit Linker-Primern amplifiziert werden (Kapitel 3.15.3) und über Restriktion (Kapitel 3.14.1) und Ligation (Kapitel 3.14.5) bzw. SOE-PCR (Kapitel 3.14.4) der Fragmente zu einem kompletten Gen zusammengesetzt werden (Abbildung 4.15 bzw. 4.16).

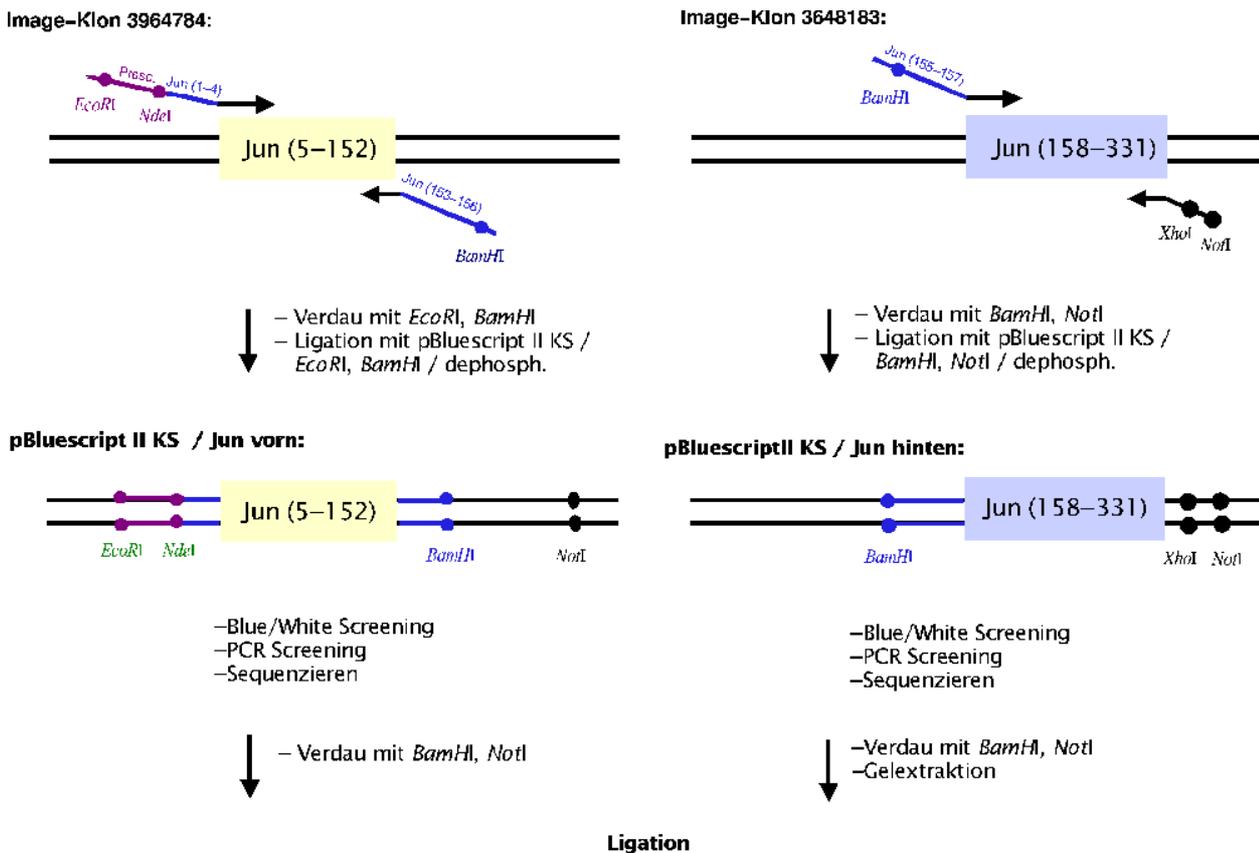


Abbildung 4.15: Die Klonierungsstrategie für *c-jun*

Schematisch ist der Ablauf der Klonierung von *c-jun* aus zwei I.M.A.G.E.–Klonen gezeigt. Durch PCR mit Linker-Primern (Kapitel 3.15.2), Restriktion (Kapitel 3.14.1) und anschließende Ligation (Kapitel 3.14.5) der beiden Amplifikate wurde ein vollständiges *c-jun*–Gen erhalten.

Die entsprechenden *c*–DNA–Klone wurden über das I.M.A.G.E. Consortium, RZPD Berlin als Stichkulturen bezogen.

Die erhaltenen Kulturen wurden in LB mit Ampicillin (50 µg/ml) angezogen, anschließend wurde die enthaltene Vektor–DNA isoliert (Kapitel 3.18.2). Mit den entsprechenden Primern (s. Abb. 4.15 bzw. 4.16) wurden die gewünschten Sequenzabschnitte über PCR amplifiziert (3.15). Dabei gelang es nicht, aus dem Klon 2504837 Vektor–DNA zu isolieren.

Daraufhin wurden zwei andere I.M.A.G.E. Klone beschafft (2504837 und 3125933), die den gleichen Bereich der Fos–Nukleotidsequenz umfassen wie 2504837. Zwar gelang es, aus beiden Klonen Vektor–DNA zu präparieren, jedoch konnte nur mit 2504837 als Matrize eine erfolgreiche PCR–Reaktion durchgeführt werden, bei Verwendung von 3125933 konnte keine PCR–Produkt der gewünschten Länge erhalten werden.

Fos-Klonierung:

Image-Klon 2504837:

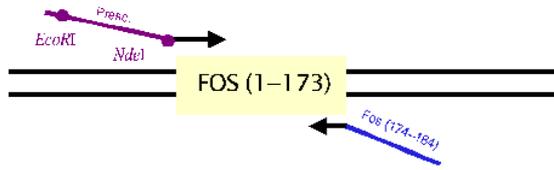
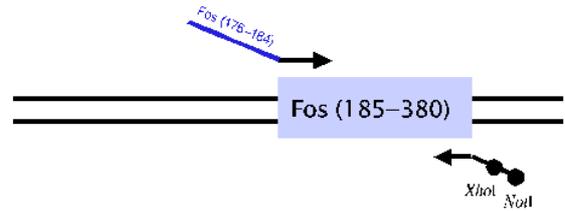
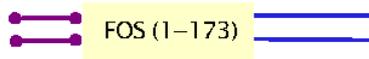


Image-Klon 3178837:



Amplifikat I:



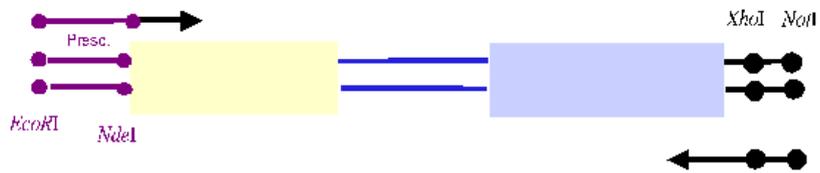
Amplifikat II:



nicht produktiv:

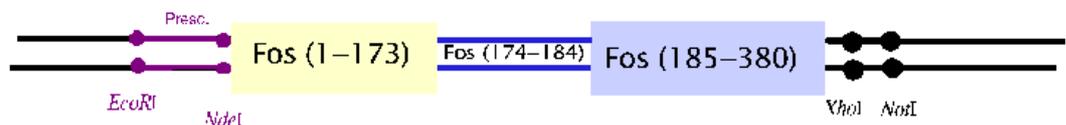


produktiv:



- Amplifikation
- Gelextraktion
- Verdau mit *EcoRI*, *NotI*
- Ligation mit pBluescript II KS / *EcoRI*, *NotI* / dephosph.

pBluescript II KS / Fos (1-380)



<- **Abbildung 4.16: Klonierungsstrategie für c-fos**

Durch SOE-PCR-Mutagenese (Kapitel 3.15.4) zweier aus verschiedenen IMAGE-Klonen amplifizierten PCR-Produkte konnte ein vollständiges c-fos-Gen erhalten werden.

Der weitere Verlauf der *fos*-Klonierung konnte wie in Abbildung 4.16 gezeigt erfolgen. Eine Subklonierung in Expressionsplasmide, Expressions- und Reinigungsversuche konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Durch die Wahl der über die PCR an den 5'- bzw. 3'-Enden der Gene eingeführten Restriktionsschnittstellen ist eine Subklonierung in mehrere Expressionsplasmide und damit die Expression von Jun bzw. Fos als GST-, Histidin- oder Thioredoxin-fusionsprotein möglich. Die Abspaltung des Affinitätsanhangs kann mittels PreScission-Protease durchgeführt werden. Auch die Subklonierung in ein Expressionsplasmid, daß die Expression ohne Affinitätsanhang ermöglicht, ist möglich.

pBlueskript II KS-Fos diente bereits als Matrize für die Klonierung von pBlueskript II KS FosbZIP, pBlueskript II KS - Junhinter dient als Matrize für die Klonierung von pBlueskript II KS -Jun.

4.2.2. Klonierung von FosbZIP

Zur Klonierung der bZIP-Domäne aus Fos wurde zunächst der I.M.A.G.E. Klon 3583724, der diese Region der Fos-Nukleotidsequenz umfaßt, beschafft. Da sich auch aus diesem Klon keine Vektor-DNA gewinnen ließ und ein anderer die gewünschte Region umfassender I.M.A.G.E. Klon nicht ermittelt werden konnte, wurde auf weitere Versuche die bZIP-Domäne von Fos direkt aus einem I.M.A.G.E. Klon zu klonieren verzichtet.

Stattdessen sollte das konstruierte *fos*-Gen als Ausgangspunkt für die Klonierung von FosbZIP dienen. Ausgewählt wurde der Sequenzabschnitt Valin 129 bis Phenylalanin 212, da dieser Sequenzabschnitt die in den Arbeiten von Morse *et al.* (1999) als hinreichend für die Interaktion mit MVV-Tat beschriebenen Sequenzabschnitte des Fos-Proteins beinhaltet.

Die PCR wurde mit den Linker-Primern Fos bZIP 5' II und Fos bZIP 3' II durchgeführt (Kapitel 3.15.2). Durch die Oligonukleotide wurden am 5'-Ende der *fosbZIP*-Nukleotidsequenz eine *Bam*HI-Schnittstelle, eine *Nde*I-Schnittstelle und die für die Erkennungsstelle der PreScission-Protease kodierende Nukleotidsequenz eingeführt, am 3'-Ende wurde ein Stop-Codon, eine

Bpu1102I- und eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Amplifikat wurde über Agarosegelelektrophorese gereinigt (Kapitel 3.13.3) und mit *BamHI* und *NotI* verdaut (Kapitel 3.14.1) und mit einem entsprechend restringierten, dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pBlueskript II KS-Vektor ligiert. Positive Transformanten konnte mittel Blau-Weiß-*Screening* und Kolonie-PCR (Kapitel 3.15.1) identifiziert werden. Eine Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigte die Korrektheit des Konstrukts (Kapitel 3.14.6). Folgende Subklonierungen der *fosbZIP*-Nukleotidsequenz in verschiedene Expressionsplasmide waren möglich: über die Schnittstellen *NdeI* und *Bpu1102I* in Plasmide der pET-Familie (Histidin-Fusion, Thioredoxin-Fusion) bzw. über *BamHI* und *NotI* in den Vektor pGEX-6P-2 (Expression als GST-Fusion).

Expressions- und Reinigungsversuche konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Auf der Basis des hergestellten FosbZIP-Konstrukts wird die von Morse et al. (1999) für MVV-Tat vermutete Interaktion mit der basischen und der Leucin-Zipper-Domäne von Fos auch für das MVV-homologe CAEV-Tat-Protein überprüft werden können.

4.3. Klonierung, Expression und Reinigung von JunbZIP (222–331)

Die für die basische und die Leucin-Zipper-Domäne von Jun kodierende Nukleotidsequenz lag bereits im Konstrukt pBlueskript-Jun hinten vollständig vor. Daher konnte zur Klonierung der bZIP-Domäne von Jun über PCR auf diesen Vektor als Matrize zurückgegriffen werden. Als zu klonierender Sequenzabschnitt wurde Leucin 222 bis Phenylalanin 331 ausgewählt, da Morse *et al.* bereits mit dem gleichen Jun-Fragment über *Two-Hybrid*-Experimente die Bindung des Leucinreichen Sequenzabschnitts von MVV-Tat an die Leucin-Zipper-Domäne von Jun nachgewiesen hatten (Morse *et al.*, 1999).

4.3.1 Die Konstruktion von pBlueskript II KS-JunbZIP und pGEX-6P-2-JunbZIP

Mit den Linker-Primern Jun bZIP 5' und Jun 3' bzw. JunbZIP 3' F331Y wurde eine PCR durchgeführt (Kapitel 3.15.2). Über das Oligonukleotid Jun bZIP 5' wurde eine *BamHI*-Schnittstelle und die Nukleotidsequenz für eine Faktor Xa-Schnittstelle an das 5'-Ende der

junbZIP-Nukleotidsequenz eingeführt. Mit dem Primer Jun 3' bzw. JunbZIP 3' F331Y wurde eine *XhoI*- und eine *NotI*-Schnittstelle hinter der *junbZIP*-Sequenz angefügt. Das PCR-Amplifikat wurde über eine Agarosegelelektrophorese (3.13.3) gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NotI* verdaut (3.14.1) und mit einem ebenso geschnittenen und dephosphorylierten (3.14.2) pBlueskript II KS ligiert (Kapitel 3.14.3). Nach der Inaktivierung der Ligase und einer Butanolfällung (Kapitel 3.13.1) wurde die DNA in elektrokompente *E. coli* Top 10 transformiert (Kapitel 3.16.2). Transformanten mit einer Insertion in der MCS von pBlueskript II KS wurden durch *Blue-White-Screening* auf Selektivmedium mit IPTG und XGal identifiziert. Positive Kolonien wurden zusätzlich einer Kolonie-PCR mit genspezifischen Primern unterzogen (Kapitel 3.15.1) und anschließend sequenziert (Kapitel 3.14.6).

Aus einem Klon mit korrekter Vektorsequenz wurde die Vektor-DNA präpariert (Kapitel 3.12.2) und mit *BamHI* und *NotI* verdaut (Kapitel 3.14.1). Das der *junbZIP*-Sequenz entsprechende Fragment wurde über Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.13.3) abgetrennt und gereinigt und mit einem *BamHI*- und *NotI*-verdauten (Kapitel 3.14.1) und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pGEX-6P-2-Plasmid ligiert (Kapitel 3.14.2). Nach der Transformation der DNA in elektrokompente *E. c.* Top 10 (Kapitel 3.16.2) wurden durch Kolonie-PCR (Kapitel 3.15.1) mit vektorspezifischen Primern positive Transformanten identifiziert. Aus diesen wurde die Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.12.2) und in normalkompetente *E. c.* Rosetta transformiert (Kapitel 3.16.1). Das GST-JunbZIP-Expressionsplasmid wurde in den *E. c.* Rosetta-Stamm (Kapitel 3.1.1) transformiert, da aufgrund der zahlreichen in *E. coli* seltenen Codons in der eukaryotischen *jun*-Nukleotidsequenz ohne eine Koexpression der entsprechenden tRNAs mit einer schlechteren Translationseffizienz zu rechnen war. Einige der so erhaltenen Bakterienkolonien wurden Induktionstests mit IPTG unterzogen (Kapitel 3.17.3). Eine erfolgreiche Induktion konnte durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei 40 kDa, die dem Molekulargewicht des GST-JunbZIP-Fusionsproteins entspricht, ca. 4h nach Induktion nachgewiesen werden.

4.3.2 Expression und Reinigung von Jun bZIP

Die Expression des JunbZIP-Proteins als GST-Fusion durch die Subklonierung in das Plasmid pGEX-6P-2 und die nachfolgende Reinigungsstrategie (Kapitel 3.18.2) wird schematisch in Abb. 4.17 dargestellt.

Nach dem Zellaufschluß wurde eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion

durchgeführt. Anschließend war entweder eine Spaltung des GST-Fusionsproteins mit Faktor Xa (durch PCR mit Linker-Primern eingeführt) oder mit PreScission-Protease (durch die Vektorsequenz vorgegeben) möglich. Die Trennung des Spaltansatzes erfolgte über eine Heparinsäule, von der das basische und DNA-bindende JunbZIP-Protein erst bei Salzkonzentrationen über 1M NaCl elutierte.

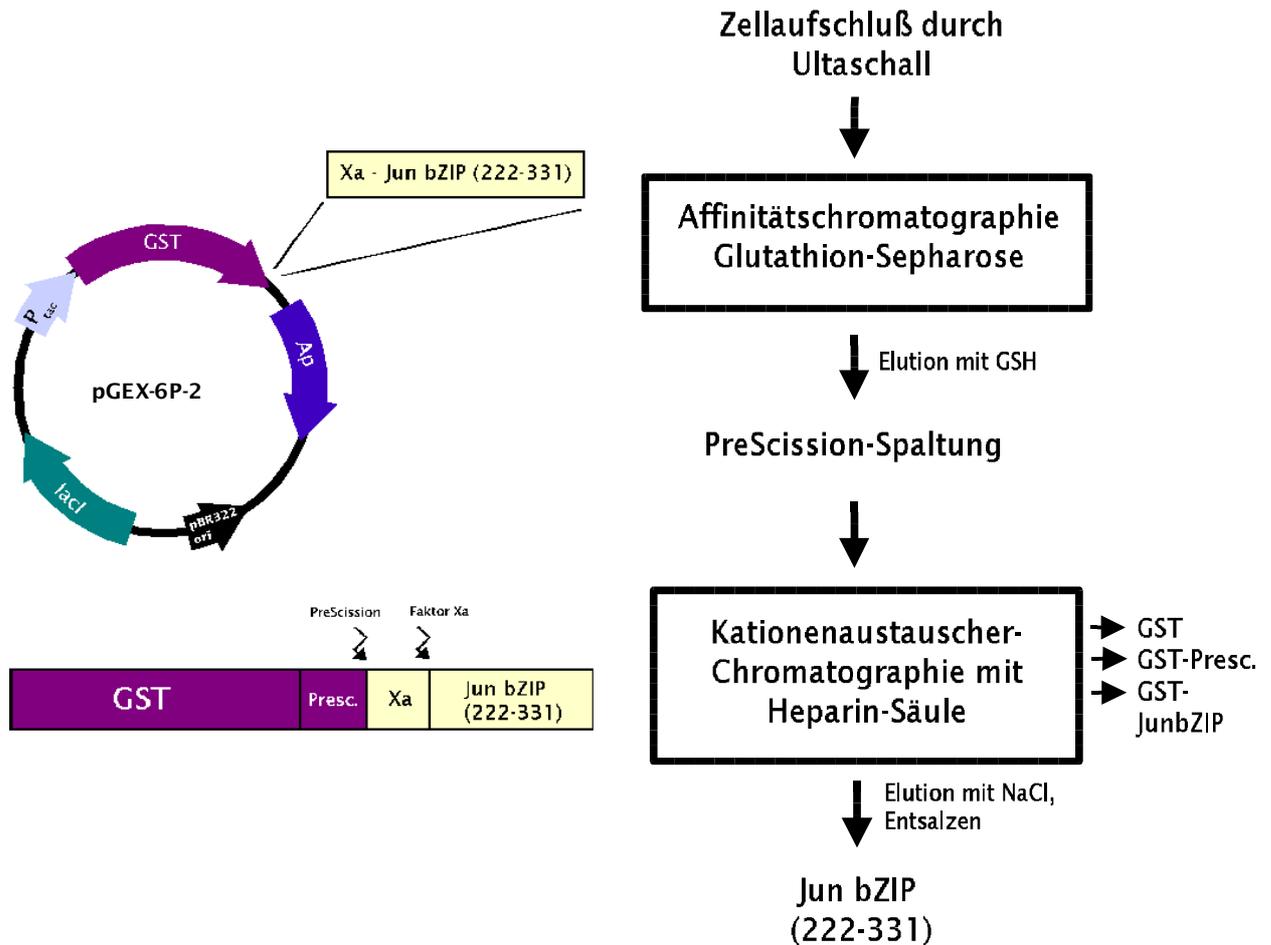


Abbildung 4.17: Das Expressionssystem für GST-JunbZIP (222-331)

Abgebildet ist eine Vektorkarte des Plasmids pGEX-6P-2, in das über die *Bam*HI- und die *Not*I-Schnittstelle die Nukleotidsequenz für Jun bZIP (222-331) insertiert wurde. Das exprimierte Konstrukt ist unten schematisch abgebildet. Der GST-Fusionsanteil ist durch Spaltung mit PreScission-Protease (von der Vektor-Sequenz vorgegeben) bzw. mit Faktor Xa (durch PCR mit Linker-Primern vor die *junbZIP*-Sequenz eingeführt) abspaltbar.

Die Anzucht erfolgte in TB-Vollmedium (Kapitel 3.4.3), da zunächst nur unmarkiertes JunbZIP-Protein benötigt wurde und eine Optimierung auf Expression in Minimalmedium noch nicht erforderlich war. Die Bakterien wurden bei 37°C angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 mit 2 mM IPTG induziert. Nach einer weiteren Inkubation von 4 Stunden bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte durch

Resuspendieren in Lysispuffer und mehrmaliges Behandeln mit Ultraschall. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile wurde der lösliche Überstand einer Affinitätschromatographie mit Glutathion–Sephrose unterzogen (Abbildung 4.18). Die Elution erfolgte hierbei durch steigende Konzentrationen an freiem Glutathion (GSH) im Elutionspuffer. Die Fraktionen, die GST–JunbZIP–Fusionsprotein enthielten, wurden mit einem Zehntel der Herstellerangabe an PreScission–Protease versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zudem war eine PreScission–Spaltung im GSH–Elutionspuffer ohne vorherigen Pufferwechsel möglich.

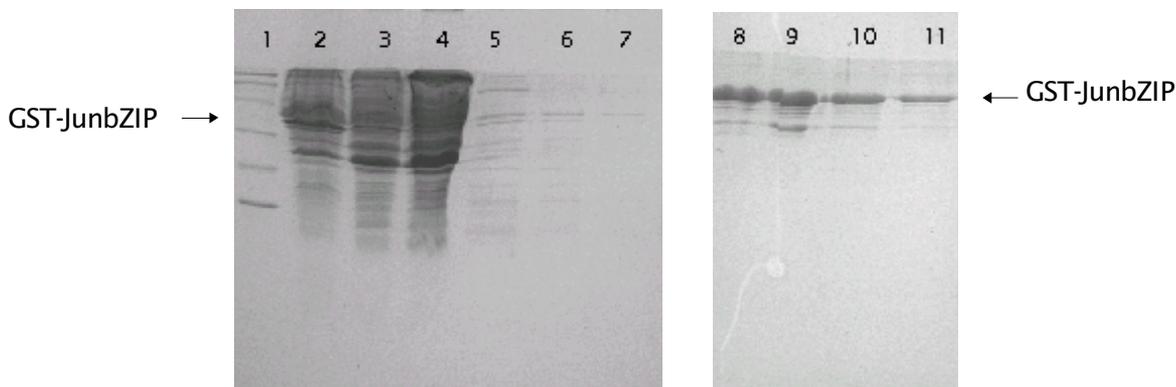
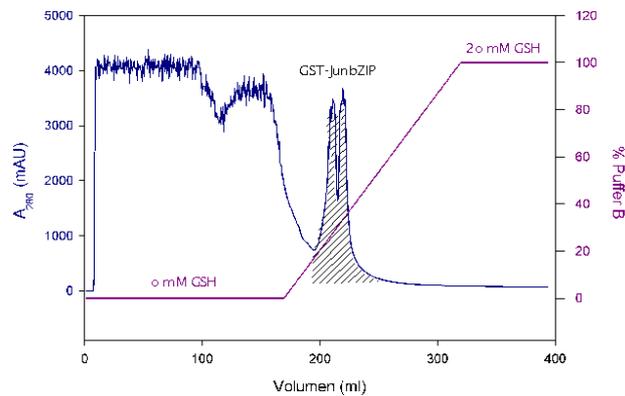


Abbildung 4.18: Affinitätschromatographie mit Glutathion–Sephrose

Gezeigt ist das Elutionsprofil der Glutathionsäule (blau: A_{280} , violett: Gradientenverlauf). Der schraffierte Bereich gibt den Elutionsbereich von GST–JunbZIP an.

Unten sind 15%ige SDS–Gele verschiedener Fraktionen des Laufs abgebildet (1: Biorad–Molekulargewichtstandard, 2: Rohextrakt, 3 und 4: Probendurchbruch, 5 bis 7: Waschfraktionen, 8 bis 11: Eluate).

Der Verlauf der Spaltungsreaktion wurde über SDS–Gelelektrophorese verfolgt (Abbildung 4.19). Bereits nach 30 Minuten war eine vollständige Spaltung des GST–Fusionsproteins zu beobachten. Die Spaltung mit Faktor Xa hingegen war weniger effizient als mit PreScission–Protease (Spaltung mit der 10fachen vom Hersteller empfohlenen Menge über 16 Stunden) und verlief nicht vollständig.

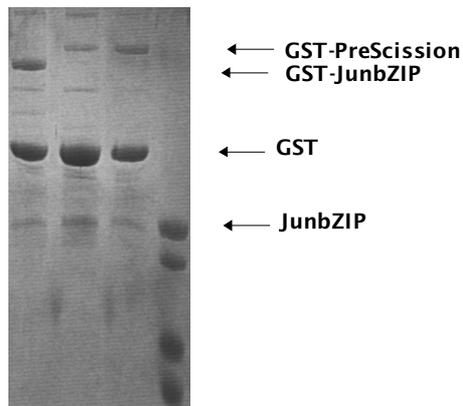


Abbildung 4.19: Verlauf der PreScission-Spaltung

Abgebildet ist ein 15%iges SDS-Gel
Bahn 1: 5 Minuten nach Beginn der Spaltung
Bahn 2: 30 Minuten nach Spaltungsbeginn
Bahn 3: 2 h nach Spaltungsbeginn
Bereits nach 30 Minuten war die Spaltung vollständig erfolgt.

Der Spaltansatz wurde über eine Heparinsäule getrennt, die Elution erfolgte hierbei durch einen NaCl-Gradienten von 140 mM bis 2,14 M NaCl (Abbildung 4.20). Die JunbZIP enthaltenden Fraktionen wurden hierbei durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 3.8.1) identifiziert, da die Leucin-Zipper-Domäne des Jun-Proteins keine Tryptophan- bzw. Tyrosinreste enthält und deshalb nicht über die Absorption bei 280 nm nachgewiesen werden kann. Der ungefähre Elutionsbereich konnte hierbei durch Vergleich des Elutionsprofils mit dem Elutionsprofil, das bei der Reinigung einer bei 280 nm absorbierenden JunbZIP F331Y-Mutante erhalten worden war, abgeschätzt werden.

Die JunbZIP enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über eine Fast Desalting Säule in NMR-Puffer aufgenommen. Die Konzentrierung erfolgte je nach Probenvolumen über Lyophilisieren bzw. eine Amicon-Membran und durch Zentrifugation mit Zentrikonröhrchen.

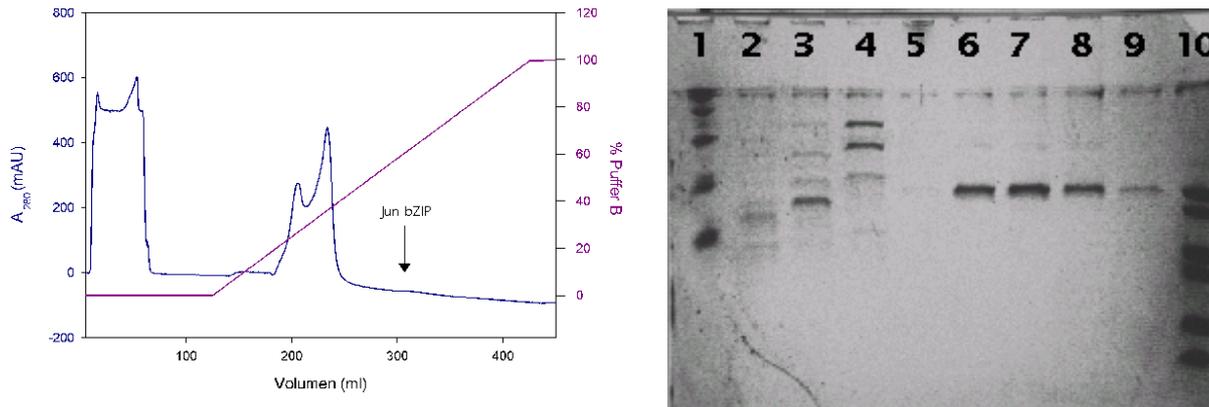


Abbildung 4.20: Trennung des Spaltansatzes durch Heparinsäule

Links ist das Elutionsprofil der Heparinsäule gezeigt (rot: Gradientenverlauf, 100 % Puffer B entsprechen hierbei 2 M NaCl; blau: A₂₈₀). Der Pfeil kennzeichnet den Elutionsbereich von JunbZIP, das keine bei 280 nm absorbierenden Aminosäuren enthält.

Rechts ist ein 15 %iges SDS-Gel mit verschiedenen Fraktionen des Laufs abgebildet (Bahn 1, Bahn 10: Molekulargewichtstandards, Bahnen 2 bis 5: Probendurchbruch bzw. Waschfraktionen, Bahnen 6 bis 9: JunbZIP).

4.4 Klonierung, Expression und Reinigung des Nun-Proteins aus dem lambda-doiden Phagen HK022

Die Struktur des Komplexes aus *nutboxB*-RNA und der *nutboxB*-Bindungsregion des HK022 Nun-Proteins (Nun 20–44) konnte kürzlich mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Faber *et al.*, 2001; Becker, 2001). Hierzu war auf ein kommerziell erworbenes unmarkiertes Peptid zurückgegriffen worden. Die auftretenden Aggregationsprobleme bei höheren Konzentrationen und die schlechte Dispersion vor allem der Arginin-Seitenketten des Peptids in homonuklearen Spektren verhinderten jedoch die Bestimmung einer hochaufgelösten Komplexstruktur im Bereich der Peptid-RNA-Bindungsfläche (Becker, 2001). Für eine strukturelle Charakterisierung des gesamten Nun-Proteins und spätere Untersuchungen zur Komplexbildung mit *nutboxB*-RNA und NusA erschien deshalb die Schaffung eines bakteriellen Expressionssystems für HK022 Nun unumgänglich, um eine Isotopenmarkierung zu ermöglichen.

Da das *nun*-Gen der Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung stand, mußte zunächst ein synthetisches *nun*-Gen generiert werden. Eine Analyse der Nukleotidsequenz des authentischen *nun*-Gens aus HK022 ergab größere Abweichungen zu der für *E. coli* typischen Codonverwendung, was Probleme bei der Expression befürchten ließ. Daher wurde zum Entwurf des synthetischen Gens nicht auf die HK022 Nukleotidsequenz zurückgegriffen. Stattdessen bildete die durch Rückübersetzung der Nun-Proteinsequenz unter der Verwendung des jeweils für die Expression in *E. coli* optimalen Codons generierte Nukleotidsequenz den Ausgangspunkt für die Konstruktion des synthetischen

nun-Gens.

Auf der Basis des synthetischen Gens sollte ein Expressions- und Reinigungsprotokoll für das Nun-Protein entwickelt werden, das auch zur Isotopenmarkierung eingesetzt werden kann. Außerdem sollte das *nun*-Gen zu einem späteren Zeitpunkt auch als Ausgangspunkt für die Klonierung von Nun-Peptiden in das Ubiquitin-System (Kapitel 4.6.1) dienen, um eine Isotopenmarkierung von Nun-Peptiden zu ermöglichen.

4.4.1 Entwurf eines synthetischen *nun*-Gens

Mit dem Programm `Backtranslate` des GCG-Programmpakets wurde die Nun-Proteinsequenz (Oberto *et al.*, 1989) in eine Nukleotidsequenz rückübersetzt. Dabei wurde für jede Aminosäure das Codon benutzt, das in *E. coli* am häufigsten zur Kodierung der jeweiligen Aminosäure eingesetzt wird. Hierzu wurde die aktuelle Häufigkeitstabelle für *E. coli* der *Codon Usage Database* ([http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+K12+\[gbbct\]](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Escherichia+coli+K12+[gbbct])) und nicht die veraltete vorinstallierte GCG-Tabelle benutzt.

Da bei den eingesetzten Methoden (s. Kapitel 4.4.2 und Kapitel 4.4.3) erfahrungsgemäß nicht mit der Synthese eines vollständig korrekten *nun*-Gens zu rechnen ist, sollte die Möglichkeit geschaffen werden, über den Verdau mit Restriktionsendonukleasen aus mehreren nicht korrekten *nun*-Sequenzen Fragmente mit korrekten Teilsequenzen herauszuschneiden und durch Ligation dieser Fragmente einen Klon mit einer korrekten *nun*-Sequenz zu generieren.

Um die Anzahl der möglichen Restriktionsschnittstellen zu erhöhen, wurde mit dem Programm `Map` des GCG-Programms die aus der Rückübersetzung erhaltene Nukleotidsequenz auf die Möglichkeit zur Einführung translational stiller Restriktionsschnittstellen geprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die bei der Einführung einer Schnittstelle auszutauschenden Codons nicht zu den in *E. coli* nur selten vorkommenden Codons hin verändert werden mußten. Nur Codons, die mit einer Häufigkeit von über 15 % die jeweilige Aminosäure kodieren, wurden statt der ursprünglich ermittelten Codons eingesetzt.

Auf diese Weise konnten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Mlu*NI, *Sgf*I, *Aat*II, *Nar*I, *Bsi*WI, *Mun*I, *Eco*47III, *Eco* 72I und *Nsi*I eingeführt werden.

Als Klonierungsvektor für das synthetische *nun*-Gen wurde pBlueskript II KS gewählt, da dieser die Möglichkeit zum *Blue-White-Screening* bietet und eine in den Vektor erfolgte Insertion so einfach anhand der Koloniefärbung durch Ausplattieren auf Selektivmedium mit IPTG und XGal zu

identifizieren ist. Zudem bietet dieser Vektor durch seine hohe Kopienzahl die Möglichkeit, in großen Mengen Vektor-DNA für die anschließenden Sequenzierreaktionen bzw. Subklonierungen zu präparieren.

Um die Klonierung in die MCS von pBlueskript II KS zu ermöglichen, wurden am 5'-Ende des synthetischen Gens eine *XhoI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle generiert. Zuvor war überprüft worden, daß weder *XhoI* noch *HindIII*-Schnittstellen im *nun*-Gen vorliegen. Zusätzlich wurde überprüft, daß die beim Entwurf des synthetischen Gens zusätzlich eingeführten translational stillen Restriktionsschnittstellen nicht im Klonierungsvektor pBlueskript II KS vorliegen, um – bei der wahrscheinlich notwendigen Reparatur des zu erwartenden Produkts – keine zusätzlichen störenden Vektor-Fragmente bei einem Verdau mit diesen Restriktionsendonukleasen zu erhalten.

Als Expressionsplasmide sollten Mitglieder der pET-Familie verwendet werden, da diese kommerziell erhältliche Plasmidserie eine große Anzahl verschiedener Affinitätsanhänge (*His-tag*, *GST*, *NusA*, *Thioredoxin*) und *Protease*-Schnittstellen bereitstellt. Die MCS aller Mitglieder dieser Plasmidfamilie sind prinzipiell gleich aufgebaut, so daß durch die Einführung einer *NdeI*-Schnittstelle am 5'- und einer *Bpu1102I*-Schnittstelle am 3'-Ende eine Subklonierung des *nun*-Gens in eine Vielzahl von verschiedenen pET-Vektoren ermöglicht wurde. Abbildung 4.21 zeigt das so entworfene *nun*-Gen.

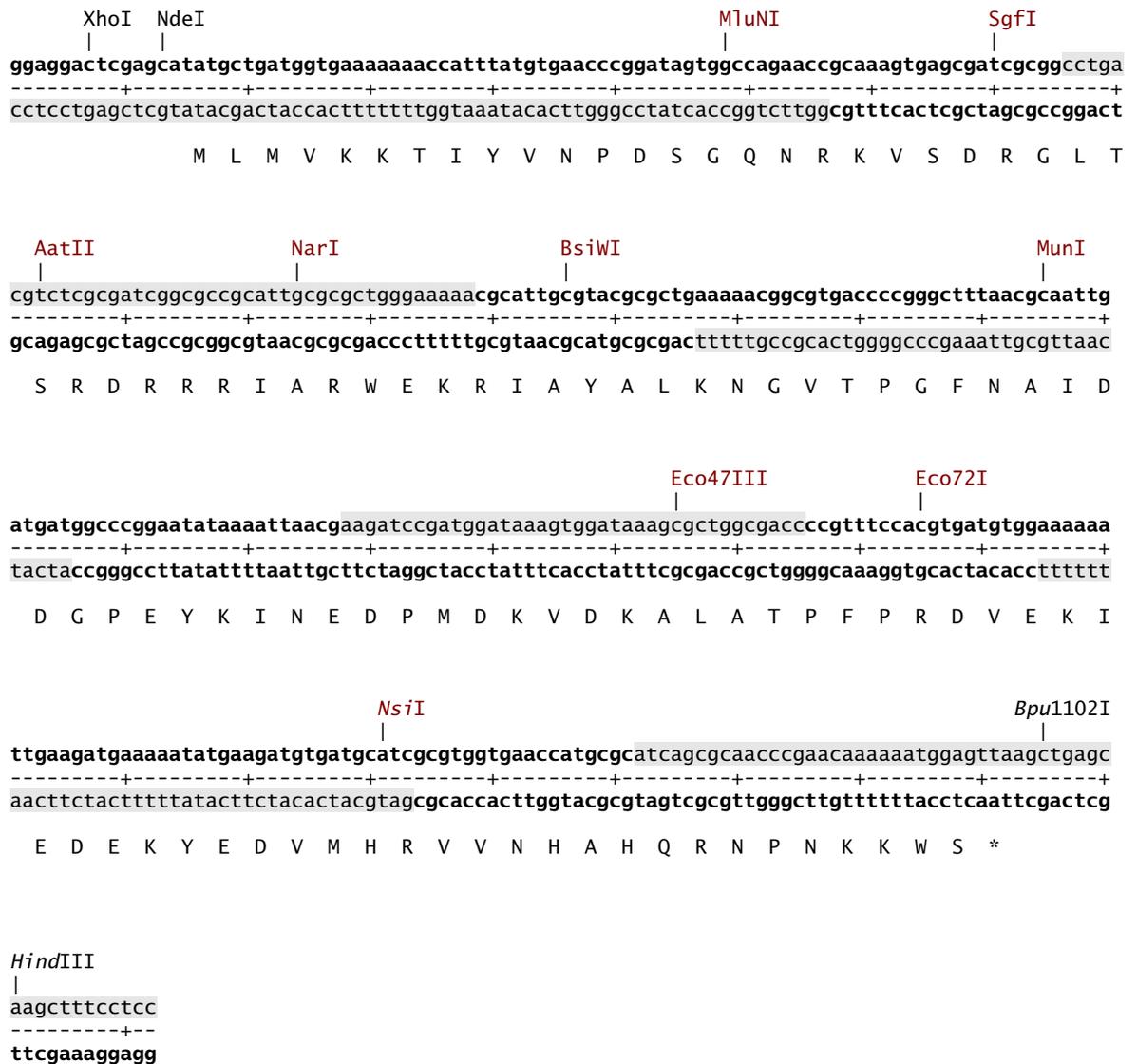


Abbildung 4.21: Das synthetische *nun*-Gen

Abgebildet sind die Proteinsequenz von HK022 Nun und die rückübersetzte Nukleotidsequenz. Die zusätzlich eingeführten translational stillen Restriktionsschnittstellen sind rot eingefärbt. Die als Primer für die rekursive PCR (Kapitel 4.4.2) verwendeten Bereiche der Nukleotidsequenz sind fett gedruckt, die für die zusätzlichen Oligonukleotide, die bei der Methode nach Kim *et al.* (Kapitel 4.4.3) eingesetzt wurden, verwendeten Bereiche der Nukleotidsequenz sind grau unterlegt (die Oligonukleotide sind unter [2] in Tabelle 3.5 aufgeführt).

4.4.2 Konstruktion eines synthetischen *nun*-Gens mittels rekursiver PCR

Zur Konstruktion des synthetischen *nun*-Gens sollte die Methode der rekursiven PCR eingesetzt werden (Prodromou und Pearl, 1992). Hierbei werden miteinander überlappende Oligonukleotide, die die Sequenz des zu klonierenden Gens abdecken, in fünf PCR-Zyklen durch die DNA-Polymerase stückweise verlängert. Das dabei in geringen Mengen entstehende vollständige Gen wird durch die Zugabe im Überschuß von genspezifischen äußeren Primern in 20 bis 50 weiteren PCR-Schritten amplifiziert. (Abbildung 4.22).

Diese Methode bietet den Vorteil, mit der Hälfte der bei Verwendung der Methode nach Kim *et al.* (Abbildung 4.21 und 4.23) nötigen Anzahl an Oligonukleotiden auszukommen. Dies hätte zu einer beträchtlichen Kostenreduktion führen können.

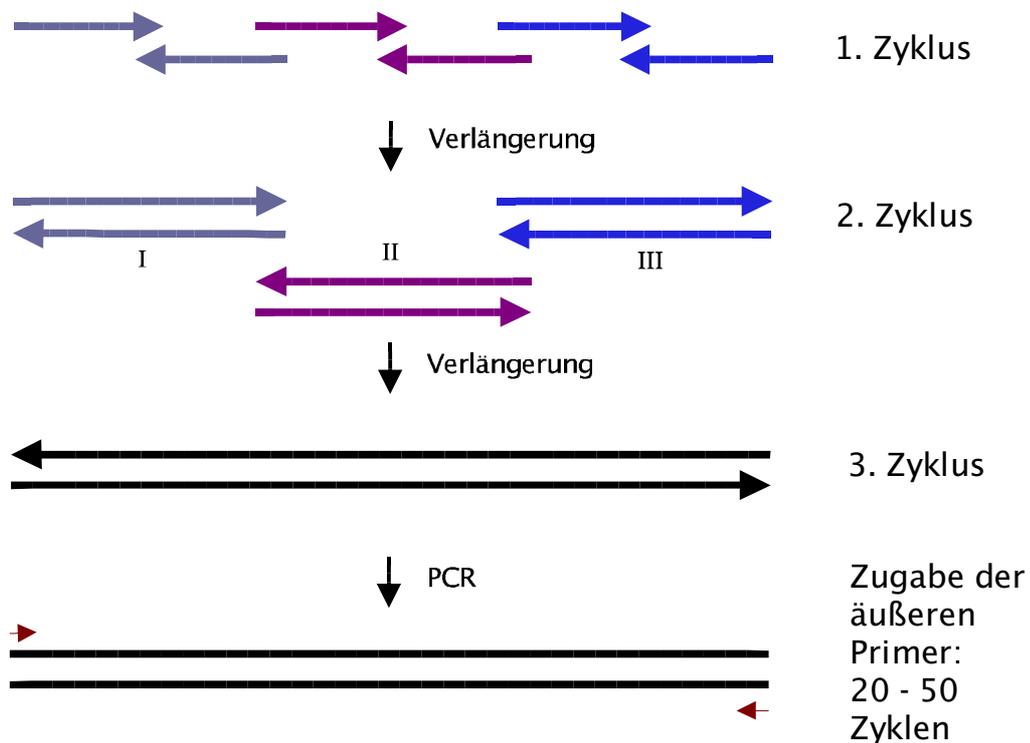


Abbildung 4.22: Gensynthese mittels rekursiver PCR

Dargestellt ist der schematische Ablauf der durchgeführten Reaktion. Im Unterschied zu dem zur Verfügung stehenden Protokoll (Prytulla *et al.*, 1996) wurden die Oligonukleotide nicht in einem gemeinsamen Ansatz zusammengegeben, sondern zunächst in drei getrennten Ansätzen durch die *Vent*-DNA-Polymerase verlängert. Nach der Vereinigung der Ansätze wurden nach fünf weiteren Verlängerungszyklen die äußeren Primer Nun 5' und Nun 3' zugegeben. Durch die anschließende PCR mit 25 Zyklen wurde das verlängerte *nun*-Gen amplifiziert.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, daß etwa gleichlange Oligonukleotide mit ähnlichem Schmelzpunkt entstanden. Die miteinander überlappenden Bereiche der Oligonukleotide waren jeweils 18 Nukleotide lang und besaßen alle ähnliche Schmelzpunkte. Alle Oligonukleotide wurden über HPLC gereinigt und waren am 5'-Ende phosphoryliert worden (Abbildung 4.21 zeigt anhand der zugrundeliegenden optimierten *nun*-Sequenz fett gedruckt die bei der rekursiven PCR eingesetzten Oligonukleotide).

Abweichend von den verfügbaren Protokollen mußte die rekursive PCR-Reaktion in mehreren Schritten optimiert werden, um überhaupt ein nachweisbares Amplifikat der erforderlichen Größe zu erhalten. Es war nötig, zunächst in drei verschiedenen Ansätzen aus jeweils zwei teilweise komplementären Oligonukleotiden durch die 5'→3'-Auffüllreaktion der DNA-Polymerase drei doppelsträngige Baublöcke zu generieren. Diese wurden dann im Verhältnis 10:1:10 (Block I: Block II : Block III) in einer PCR eingesetzt.

Nach 5 Zyklen der PCR wurden zusätzlich die äußeren Primer Nun 5' und Nun 3' eingesetzt, um das in den ersten Runden der PCR aus den drei Baublöcken gebildete Amplifikat weiter zu amplifizieren.

Das PCR-Produkt wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (Kapitel 3.13.39, mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *HindIII* geschnitten (Kapitel 3.14.1) und mit einem mit *XhoI* und *HindIII* restringierten, dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pBlueskript II KS ligiert (Kapitel 3.14.5). Der Ligationsansatz wurde butanolgefällt (Kapitel 3.13.3) und in elektrokompetente *E. coli* Top 10 (3.16.2) transformiert. Diese wurden auf Selektivmedium, das zusätzlich IPTG und XGal enthielt, ausplattiert. Kolonien mit einer Insertion in pBlueskript wurden aufgrund ihrer weißen Färbung im *blue-white-screening* identifiziert. Mit einer Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden pUCseq und pUCseqrev wurden diese auf eine Insertion der erforderlichen Länge überprüft (Kapitel 3.15.1).

Aus fünf positiven Transformanten wurde die Vektor-DNA isoliert (Kapitel 3.12.2) und sequenziert (Kapitel 3.14.6). Keiner der sequenzierten Klone verfügte über eine korrekte *nun*-Sequenz. Die am besten übereinstimmende Sequenz wies insgesamt 11 *frameshift*-Mutationen und zwei Punktmutationen auf. Eine Rekonstruktion des korrekten *nun*-Gens über den Verdau mit Restriktionsendonukleasen und anschließende Ligation korrekter Fragmente aus verschiedenen falschen Klonen war nach der Analyse der Sequenzen nicht möglich und eine Reparaturmutagenese erschien zu aufwendig.

Daher wurde das bestehende Oligonukleotid-Ensemble um sechs weitere Oligonukleotide erweitert und nach Kim et al. (1989) die Konstruktion des synthetischen *nun*-Gens über die Ligation der die

komplette *nun*-Sequenz abdeckenden Oligonukleotide durchgeführt.

4.4.3 Konstruktion eines synthetischen *nun*-Gens nach Kim *et al.*

Abbildung 4.23 zeigt den Ablauf der Klonierung des synthetischen Gens nach Kim *et al.* (1989). In drei verschiedenen Ansätzen wurden zunächst drei Baublöcke für das synthetische *nun*-Gen generiert. Jeweils vier benachbarte Oligonukleotide wurden annealt (Kapitel 3.14.4) und anschließend ligiert (Kapitel 3.14.5). In einem weiteren Ansatz wurden die drei Baublöcke vereinigt und miteinander annealt (Kapitel 3.14.4) und ligiert (Kapitel 3.14.5). Auf einem Agarosegel (Kapitel 3.10) wurde der Erfolg der Ligationsreaktion überprüft. Da nur geringe Mengen des gewünschten Produkts erhalten worden waren, wurde der der Größe des *nun*-Gens entsprechende Bereich aus dem Agarosegel extrahiert (Kapitel 3.13.3) und in einer PCR mit den Primern Nun 5' und Nun 3' amplifiziert (3.15).

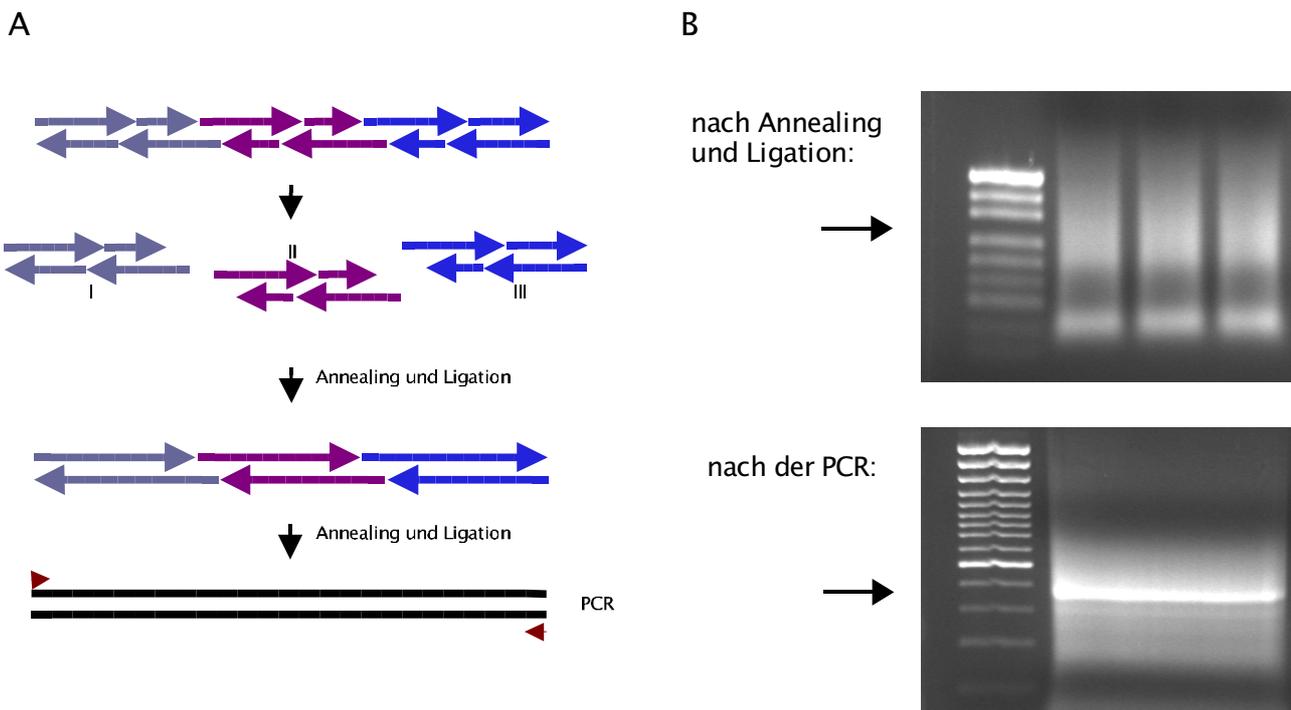


Abbildung 4.21: Ablauf der Gensynthese nach Kim *et al.*

In Abbildung A ist schematisch der Ablauf der Gensynthese dargestellt. Zunächst wurden in drei getrennten Reaktionen jeweils vier Oligonukleotide annealt (Kapitel 3.14.4) und ligiert (Kapitel 3.14.5). Anschließend wurden die drei so generierten Baublöcke in einer weiteren Reaktion miteinander verbunden. Der Reaktionsansatz wurde auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen (Abbildung B, oben). Da keine distinkte Bande zu erkennen war, wurde der Bereich des Gels, der der zu erwartenden Größe des *nun*-Gens entsprach, ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA extrahiert (Kapitel 3.13.3). In einer anschließenden PCR wurde die DNA als Matrize eingesetzt und mit genspezifischen Primern amplifiziert (Kapitel 3.15.2). Das erhaltene PCR-Produkt (Abbildung B, unten) wurde über ein 1,5 %iges Agarosegel gereinigt (Kapitel 3.13.3) und nach der Restriktion mit *Xho*I und *Hind*III (Kapitel 3.14.1) in einen pBlueskript II KS-Vektor inseriert.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt (Kapitel 3.13.3), mit *XhoI* und *HindIII* verdaut (Kapitel 3.14.1) und mit einem entsprechend restringierten und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pBlueskript II KS-Vektor ligiert (Kapitel 3.14.5). Der Ligationsansatz wurde nach einer Butanolfällung (Kapitel 3.13.1) in elektrokompente *E. coli* Top 10 transformiert (Kapitel 3.16.2). Positive Transformanten wurden durch *Blue-White-Screening* und anschließende Kolonie-PCR (Kapitel 3.15.1) identifiziert und sequenziert (Kapitel 3.14.6).

Keine der erhaltenen Sequenzen entsprach vollständig der korrekten *nun*-Sequenz, jedoch war die Anzahl der auftretenden Punktmutationen mit maximal drei in den einzelnen Klonen deutlich geringer als bei der Gensynthese mittels rekursiver PCR. Nach der Analyse der erhaltenen Sequenzen konnte ein vollständig korrektes *nun*-Gen aus dem Verdau des Plasmids pBlueskript NunsynC mit *XhoI* und *MunI* und dem Verdau des Plasmids pBlueskript NunsynA mit *MunI* und *HindIII* (Kapitel 3.14.1) und anschließender Ligation der Fragmente (Kapitel 3.14.5) mit einem *XhoI* und *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pBlueskript II KS erzeugt werden (Abbildung 4.24).

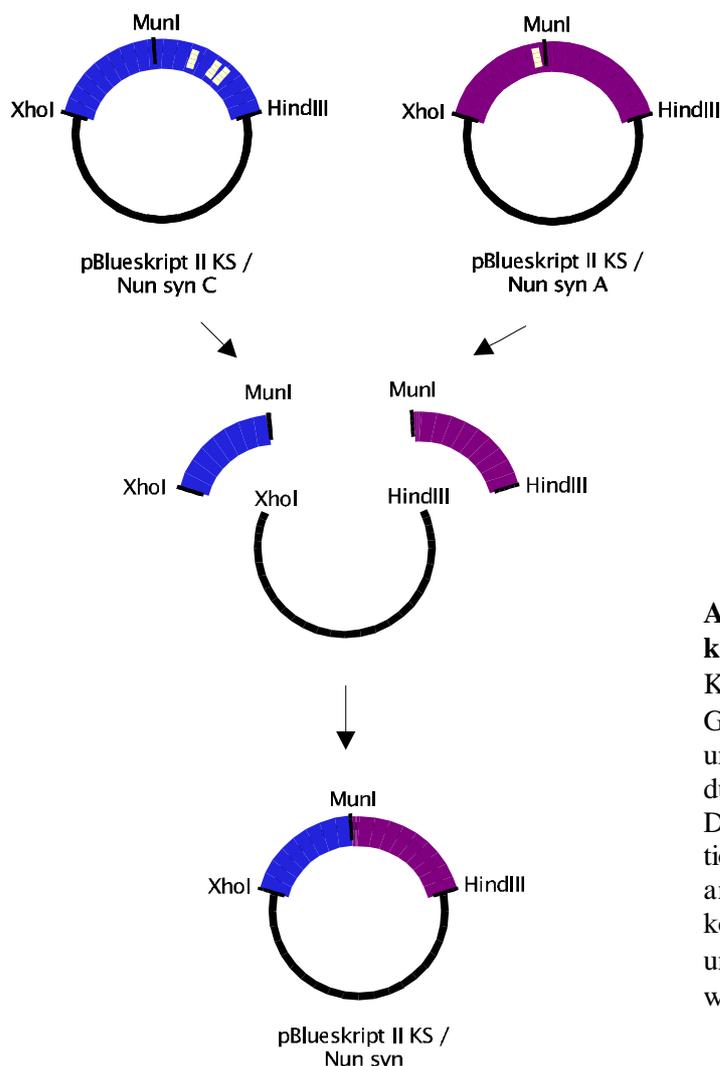


Abbildung 4.24: Konstruktion eines korrekten *nun*-Gens

Keines der sequenzierten synthetischen *nun*-Gene war vollständig korrekt. Die in NunsynC und NunsynA gefundenen Punktmutationen sind durch gelbe Striche dargestellt.

Durch Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Kapitel 3.14.1) und anschließender Ligation (Kapitel 3.14.5) der korrekten Sequenzabschnitte mit einem *XhoI*- und *HindIII*-geschnittenen pBlueskript II KS wurde ein korrektes *nun*-Gen erhalten.

4.4.4 Expression und Reinigung von HK022 Nun–Protein

Das gewählte Expressionssystem für das Nun–Protein aus dem lambdoiden Phagen HK022 beruht auf dem Vektor pET11a, der eine T7–RNA–Polymerase abhängige Expression des Nun–Proteins erlaubt. Die T7 RNA Polymerase wird vom Expressionsstamm *E. c.* BL21 (DE3), der eine chromosomale Kopie des T7 RNA–Polymerase–Gens unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors enthält, bei Induktion mit IPTG bereitgestellt (Abbildung 4.25).

Das Nun–Protein wird bei Verwendung dieses Vektors ohne einen Affinitätsanhang exprimiert. Da das Nun–Protein mit einem berechneten pI von 9,5 und insgesamt 11 Argininen und 12 Lysinen über eine ähnlich hohe Netto–Ladung verfügt wie CAEV–Tat, bei dessen Reinigung sich die Heparinsäule bereits bewährt hatte (Kapitel 4.1.3) und zudem mit dem ARM über eine RNA–bindende Sequenzdomäne verfügt, erschien eine Reinigung über eine Heparinsäule als sinnvoll, da hierbei neben der positiven Ladung des Nun–Proteins bei der Kationenaustauscherchromatographie auch die Nukleinsäure–bindende Eigenschaft des Nun–Proteins bei der Bindung an die Nukleinsäure–ähnliche Polyanionstruktur der Sulfatgruppen des Heparins genutzt werden können.

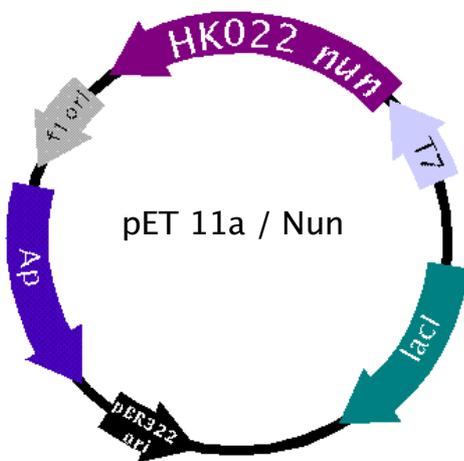


Abbildung 4.25 Das Expressionsplasmid pET11a–HK022 Nun

Dargestellt ist die Vektorkarte des Plasmids. Das *nun*-Gen steht unter der Kontrolle des T7-Promotors. Das Nun-Protein wird ohne einen Affinitätsanhang exprimiert.

Konstruktion des Plasmids pET 11a – Nun

Nach der Konstruktion des synthetischen *nun*–Gens wurde über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bpu*1102 das *nun*–Gen aus dem pBlueskript–Vektor ausgeschnitten (Kapitel 3.14.1) und in ein mit *Nde*I und *Bpu*1102 geschnittenes (Kapitel 3.14.1) und dephosphoryliertes (Kapitel 3.14.2) pET11a–Plasmid subkloniert. Das Plasmid wurde in normalkompetente *E. coli* BL 21 (DE3)

transformiert (Kapitel 3.16.1). Anschließend wurden einige der Transformanten Induktionstests unterzogen (Kapitel 3.17.3). Die erfolgreiche Expression von HK022 Nun-Protein wurde durch das Erscheinen einer zusätzlichen einem Molekulargewicht von ca. 13 kDa entsprechenden Bande vier Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 3.8) nachgewiesen (Abbildung 4.26).

Reinigung von HK022 Nun-Protein

E. c. BL21 (DE3) / pET11a-Nun wurde bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von ca. 0,8 angezogen. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Bakterienkultur weitere vier Stunden bei 37°C geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (Kapitel 3.17.4).

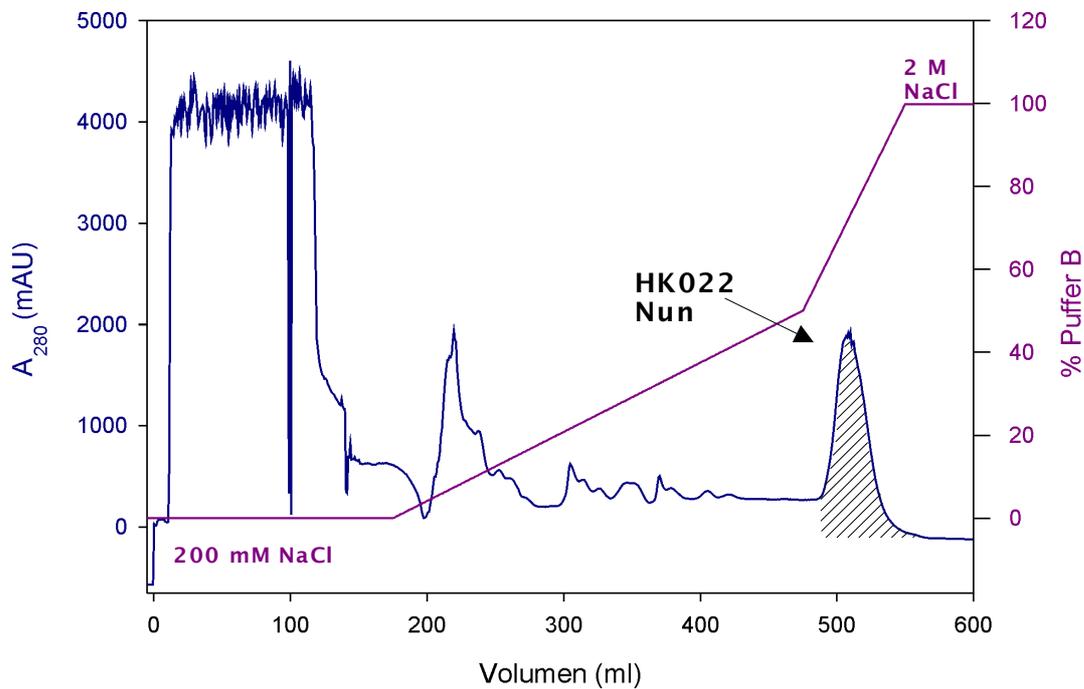
Der Zellaufschluß erfolgte durch mehrmalige Ultraschall-Behandlung der in Lysis-Puffer resuspendierten Bakterienzellen und anschließende Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile. Bei Verwendung eines EDTA-haltigen Lysispuffers mit pH 8.0 konnte Nun fast komplett im löslichen Zellüberstand gefunden werden.

Die Reinigung erfolgte über Kationenaustauscherchromatographie mit einer Heparinsäule bei pH 8.0 (Kapitel 4.12.3). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte über einen Salzgradienten bis 2 M NaCl über insgesamt 30 Säulenvolumen. HK022 Nun eluiert bei Salzkonzentrationen größer 1 M NaCl mit einer Reinheit von ~ 95%. Auf weitere Reinigungsschritte konnte daher verzichtet werden.

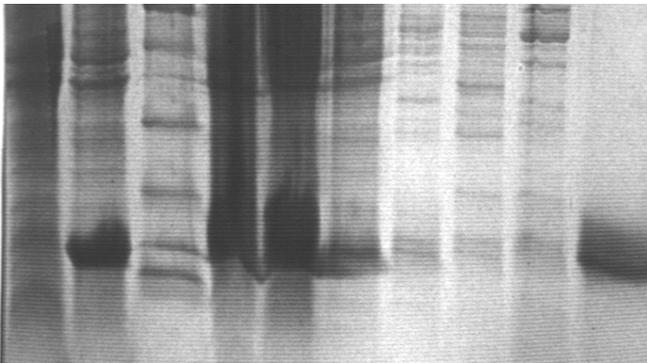
Die typischen Ausbeuten lagen bei 70 mg/l Kulturvolumen LB.

Abbildung 4.26 zeigt die Expression und Reinigung von HK022 Nun-Protein.

Das beschriebene Expressions- und Reinigungsprotokoll konnte direkt auf die Anzucht in Minimalmedium und die Reinigung von ^{15}N -markiertem HK022 Nun-Protein übertragen werden.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



19 %iges SDS-Gel:

- Bahn 1: vor Induktion
- Bahn 2: 4 h nach Induktion
- Bahn 3: Molekulargewichtsstandard
- Bahn 4: Pellet nach 1 x Ultraschall
- Bahn 5: Rohextrakt für Heparinsäule
- Bahn 6: Pellet nach 2 x Ultraschall
- Bahn 7–9: Durchbruch und Waschfraktionen
- Bahn 10: HK022 Nun Eluatfraktion

Abbildung 4.26: Reinigung von HK022 Nun

Oben ist das Elutionsprofil der Heparinsäule abgebildet (blau: A_{280} , rot: Gradientenverlauf). Die Elution erfolgte über steigende Konzentrationen NaCl. Der Bereich, in dem HK022 Nun sauber von der Säule eluierte, ist schraffiert hinterlegt.

Unten ist ein SDS-Gel abgebildet, das den Verlauf der Reinigung zeigt. Nach mehrmaligem Behandeln des resuspendierten Zellpellets befand sich Nun fast komplett im löslichen Überstand (Bahn 5). Bahn 10 zeigt das saubere Eluat.

4.4.5 Erste strukturelle Charakterisierung von HK022 Nun

CD-Spektroskopie

Um Aussagen über die Sekundärstruktur von HK022 Nun zu erhalten, wurde ein Fern-UV-CD-Spektrum (Kapitel 3.19) aufgenommen (Abbildung 4.27).

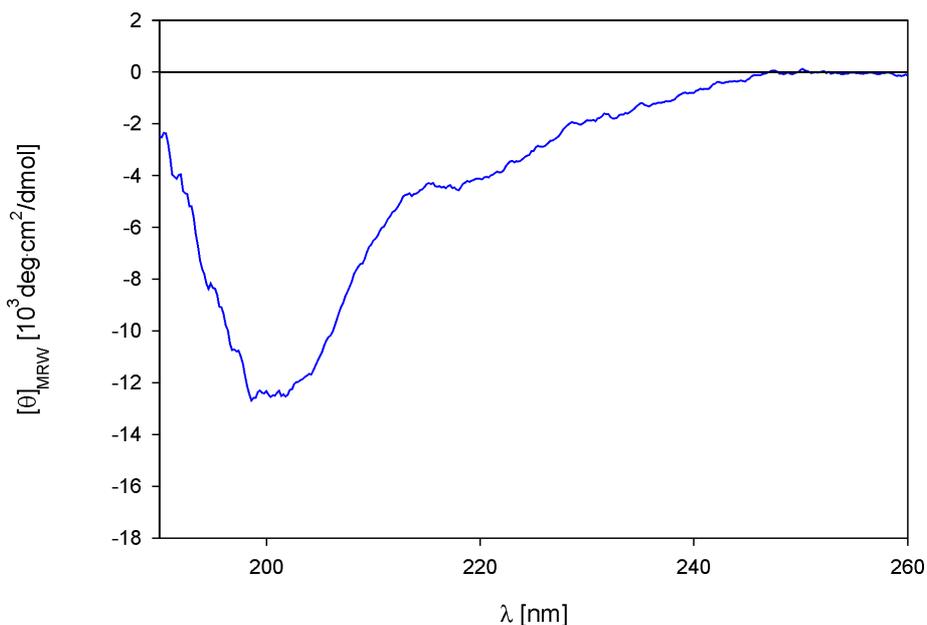


Abbildung 4.27 Fern-UV-CD-Spektrum von HK022 Nun

Das Spektrum wurde bei 25 °C in 10 mM Kaliumphosphat pH 5,8 und 50 mM NaCl aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 120 μM . Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1 cm. Es wurden 8 Spektren akkumuliert.

Das erhaltene Spektrum weist ein für ein *random coil*-Protein typisches Minimum bei 200 nm auf. Ein ähnliches Spektrum war bereits für ein HK022-Nun-Fragment erhalten worden (Becker, 2001).

NMR-Spektroskopie

Von einer ^{15}N -markierten Probe wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen (Abbildung 4.28). Die geringe Dispersion der Amidprotonen in ^1H -Richtung deutet darauf hin, daß Nun nicht über ein ausgeprägte Tertiärstruktur verfügt. Die scharfen Resonanzlinien sind Anzeichen für eine hohe Flexibilität des Proteins. Der schnelle Austausch der Protonen bei der Aufnahme von D_2O -Spektren deutet ebenfalls darauf hin, daß HK022 über wenig stabile Strukturelemente verfügt (Daten nicht gezeigt).

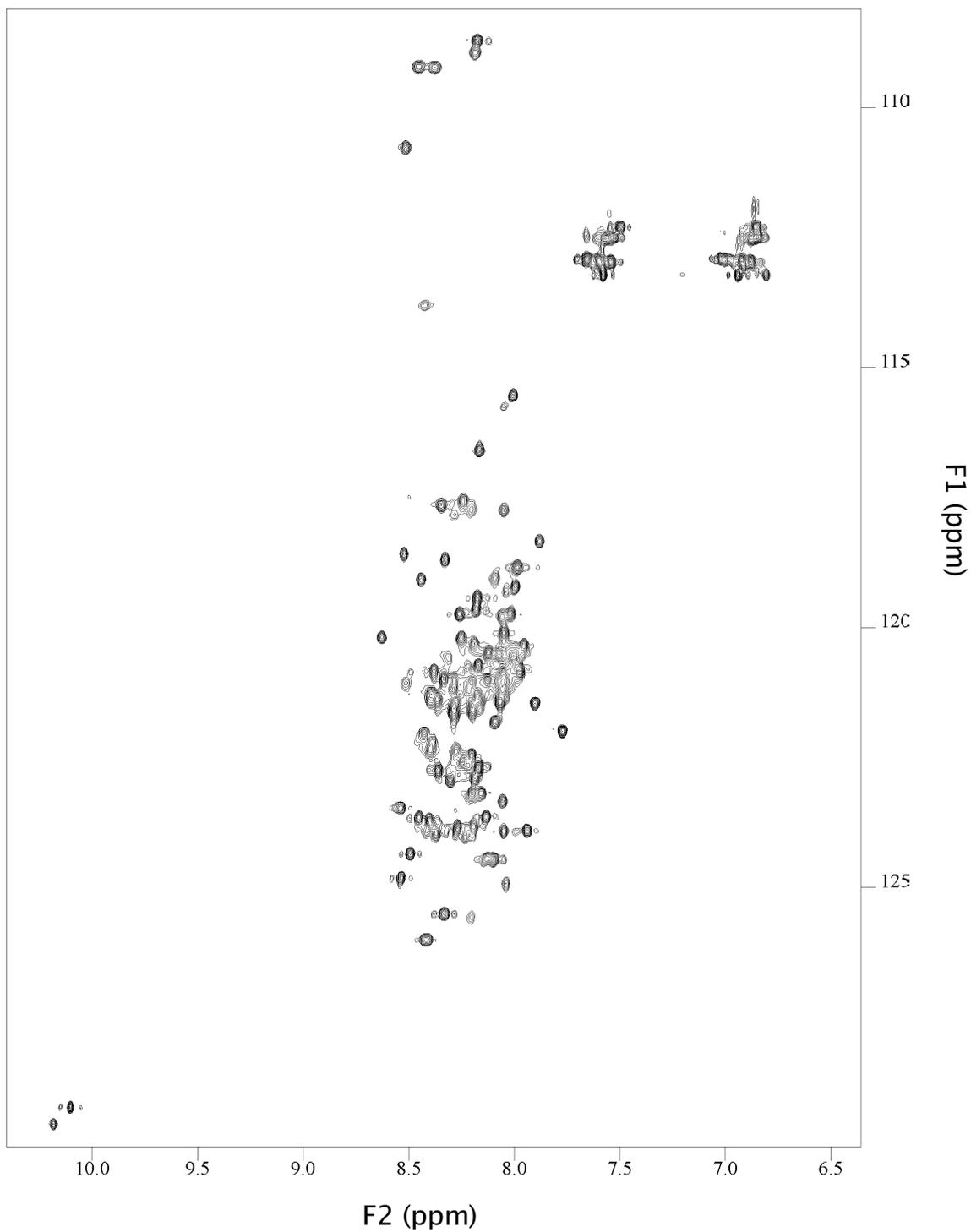


Abbildung 4.28 ^1H - ^{15}N -HSQC von HK022 Nun

Das Spektrum von 120 μM Nun-Protein in 10 mM Kaliumphosphat pH 5,8; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) D_2O bei 298 K gemessen.

Bestimmung des hydrodynamischen Radius

Mittels NMR-Diffusionsmessungen wurde der hydrodynamische Radius des HK022 Nun-Proteins ermittelt (Kapitel 3.20). Die Messungen wurden bei pH 4,6 durchgeführt, da sich HK022 Nun bei höheren pH-Werten nicht in genügend hohen Konzentrationen löste und die Spektrenaufnahme durch die geringe Konzentration zeitlich zu aufwendig gewesen wäre. CD- und NMR-Spektren der Probe bei pH 4,6 sind jedoch identisch zu den gezeigten bei pH 5,8.

Hierzu wurde das Diffusionsverhalten von HK022 Nun mit dem der Referenzsubstanz 1,4-Dioxan verglichen. Beobachtet wurde die Abnahme des Integrals der NMR-Signale bei steigender Gradientenstärke (Abbildung 4.29). Die Datenpunkte wurden Gauss-Kurven angeglichen und darüber die Zerfallskonstanten d^{Prot} und d^{Ref} bestimmt.

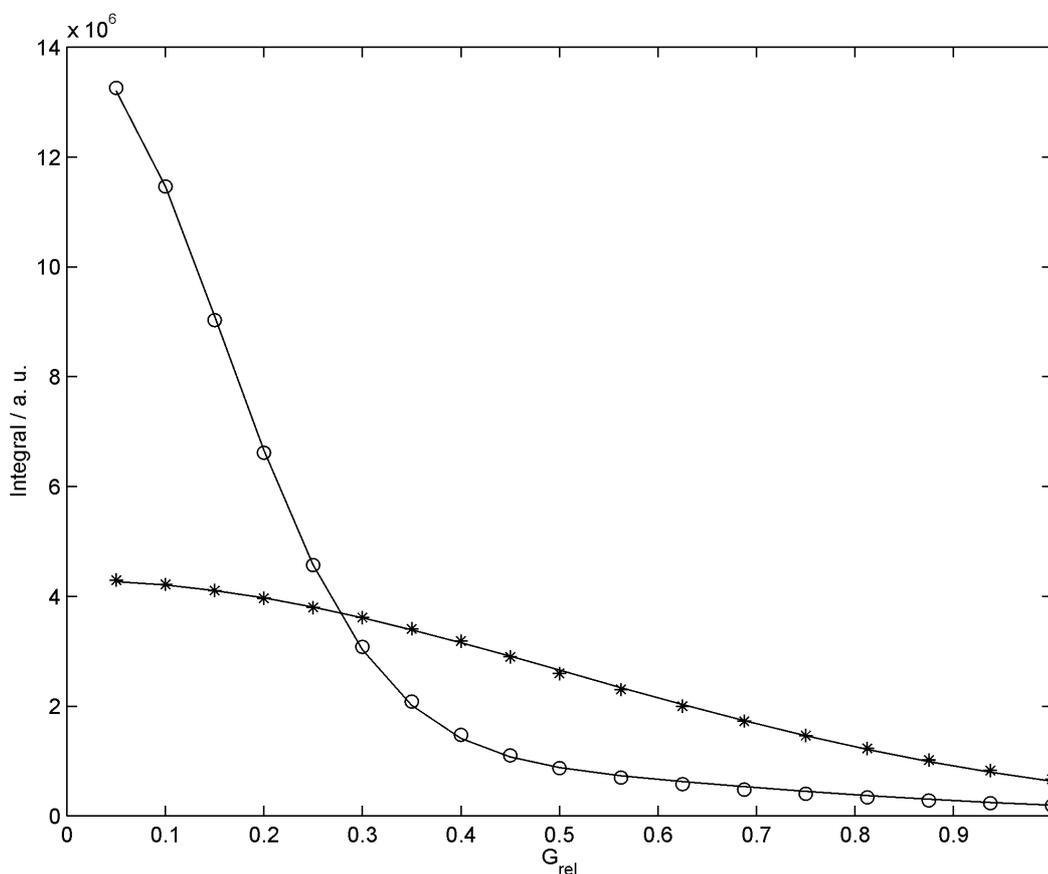


Abbildung 4.29 Auswertung der Diffusionsmessungen von HK022-Nun und Dioxan

Es wurden 18 1H-1D-Spektren einer 250 μ M HK022 Nun-Probe in D₂O pH 4,6; 0,2 % (v/v) 1,4-Dioxan bei einer Variation der relativen Gradientenstärke von 5 – 100 % gemessen. Die Experimente wurden jeweils viermal wiederholt. Die Abbildung zeigt das erste der Experimente, die Integration der Resonanzsignale erfolgte für HK022 Nun für den Spektrenbereich von 0,15 – 1,2 ppm und für Dioxan von 3,0 bis 4,1 ppm, wobei das Dioxansignal um das Proteinsignal korrigiert wurde. Die Datenpunkte wurden Gauss-Kurven angeglichen.

Offene Kreise: Dioxan + HK022 Nun (3,6 – 4,1 ppm)

Sterne: HK022 Nun (0,15 – 1,2 ppm)

Für das Verhältnis d^{Ref}/d^{Prot} wurden aus den vier Datensätzen folgende Werte bestimmt:

10, 8641 11, 5199 11, 4933 11, 5787

Daraus ergibt sich ein Mittelwert von 11,36 mit einer Standardabweichung von 0,34.

Unter der Annahme eines hydrodynamischen Radius von 2,12 Å für Dioxan (Wilkins, 1999) ergibt sich für den hydrodynamischen Radius von HK022 Nun:

$$R_h (\text{HK022 Nun}) = 11,36 \pm (0,34) \cdot 2,12 \text{ \AA} = \mathbf{24,1 \text{ \AA} \pm 0,4 \text{ \AA}}$$

Wilkins *et al.* konnten sowohl einen empirischen Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius nativer sphärischer gefalteter Proteine und der Länge der Polypeptidkette als auch zwischen dem hydrodynamischen Radius entfalteter Proteine und der Länge der Polypeptidkette ermitteln.

Für ein Protein mit 112 Aminosäuren wie HK022 Nun ergibt sich nach Wilkins *et al.* ein theoretischer zu erwartender hydrodynamischer Radius von $18,7 \text{ \AA} \pm 2,6 \text{ \AA}$, falls das Protein gefaltet und sphärisch vorliegt bzw. von $32,5 \text{ \AA} \pm 3,8 \text{ \AA}$, falls es ungefaltet ist. Demnach handelt es sich bei HK022 Nun nicht um ein Protein mit einer kompakten kugelförmigen Tertiärstruktur. Es kann jedoch auch nicht davon ausgegangen werden, daß HK022 komplett entfaltet vorliegt.

4.5 Klonierung, Expression und Reinigung des NusA–Proteins aus *E. coli*

Für erste Versuche zur Komplexbildung aus λ N–Protein, *nutboxB*–RNA und NusA aus *E. coli* mußte ein Expressions– und Reinigungsprotokoll für NusA entwickelt werden. Da noch unbekannt ist, welche Domäne aus NusA für die Interaktion mit *nutboxB*–RNA verantwortlich ist, und die für die Bindung an λ N–Protein verantwortlichen Abschnitte der COOH–terminalen Domäne von NusA konträr diskutiert werden (Mah *et al.*, 1999; Mah *et al.*, 2000), sollte zunächst das gesamte NusA–Protein in NMR–spektroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden. Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob es zur Ausbildung eines definierten Komplexes aus *nutboxB*–RNA, λ N (1–53) und NusA kommt und ob dieser für NMR–spektroskopische Untersuchungen von N (1–53) und *nutboxB*–RNA im Komplex geeignet ist.

4.5.1 Das Expressionssystem für *E. coli* NusA (1–495)

Das gewählte Expressionsplasmid pTKK19 ist ein *high copy* Plasmid, d.h. es liegen ca. 300 bis 500 Kopien des Plasmids pro Zelle vor. Durch die erhöhte Kopienzahl ist eine verstärkte Expression des Zielproteins möglich. Aufgrund der zu erwartenden hohen Löslichkeit des NusA-Proteins, das als sog. "Löslichkeits-tag" bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* eingesetzt wird (Novagen), konnte davon ausgegangen werden, daß die verstärkte Expression nicht zur Aggregation des NusA-Proteins in *inclusion bodies* führen würde.

Durch die Klonierung über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* wurde das *nusA*-Gen hinter die für einen Dekahistidin-Anhang und eine Enterokinase-Spaltstelle kodierenden Nukleotidsequenzen von pTKK19 inseriert. Der für Ubiquitin kodierende Sequenzabschnitt von pTKK19 wurde beim Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* entfernt.

Abb. 4.30 zeigt schematisch den Aufbau des mit diesem System exprimierten His-tag-Fusionsproteins. Eine erfolgreiche Reinigung von NH₂-terminalen NusA-Fragmenten aus *E. coli* über die Fusion mit einem His-Tag am NH₂-Terminus wurde bereits von Mah *et al.* (1999) beschrieben. Deshalb erschien auch eine Reinigung des gesamten NusA-Proteins mittels eines Histidin-Affinitätsanhangs über IMAC möglich. In den Kristallstrukturen der homologen NusA-Proteine aus *Thermotoga maritima* (Worbs *et al.*, 2001) bzw. *Mycobacterium tuberculosis* (Gopal *et al.*, 2001) ist der NH₂-Terminus frei zugänglich. Aufgrund der für *E. coli* NusA ebenfalls erwartenden guten Zugänglichkeit des NH₂-Terminus erschien die Positionierung des His-tags und der Proteasespaltstelle am NH₂-Terminus von NusA als sinnvoll.

Die Abspaltung des His-tags sollte über PreScission-Protease erfolgen, da diese als GST-Fusion vorliegt und nach der Spaltung leicht über eine Glutathion-Sepharose-Säule wieder aus dem Spaltansatz entfernt werden kann. Der abgespaltene Histidin-Anhang sollte über eine zweite IMAC entfernt werden.

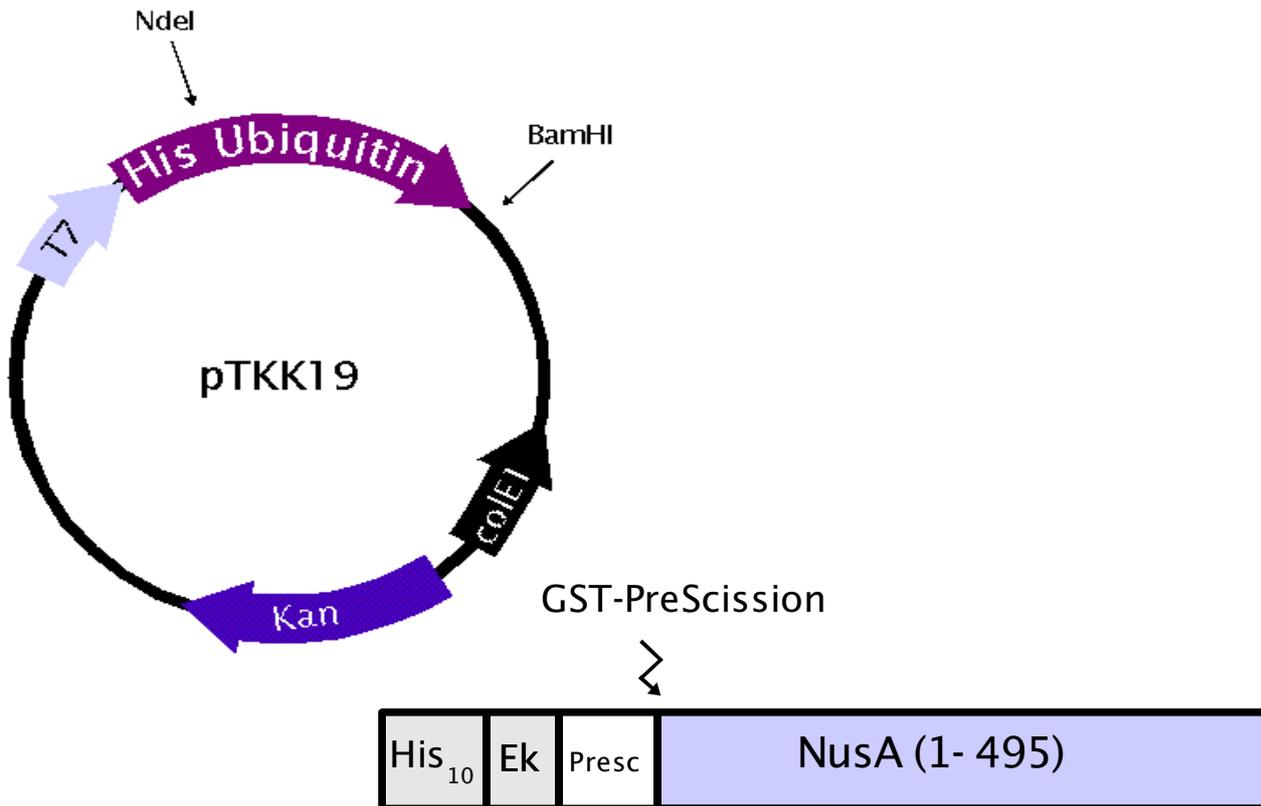


Abbildung 4.30: Das Expressionssystem für *E. coli* NusA (1–495)

Dargestellt ist das Plasmid pTKK19, in das das über PCR amplifizierte *nusA*-Gen über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* inseriert wurde. Unten ist schematisch der Aufbau des so als Dekahistidin-Fusionsprotein exprimierten NusA und die Lage der PreScission-Protease-Erkennungssequenz abgebildet.

4.5.2 Konstruktion der Plasmide pBlueskript-NusA (1–495) und pTKK19-NusA (1–495)

Der kommerziell erhältliche Vektor pET 43a (Novagen, Madison, USA) enthält die Nukleotidsequenz für das *nusA*-Gen aus *E. coli*.

In pET 43a ist das *nusA*-Gen vor einer für einen Hexahistidin-Affinitätsanhang und für eine Thrombin- bzw. für eine Enterokinase-Spaltstelle kodierenden Nukleotidsequenz und der MCS des Vektors inseriert. Die direkte Verwendung von pET 43a zur Expression von NusA schied daher aus, da dies in einem am COOH-Terminus um sechs Histidine, einen S-Tag, eine Thrombin- und eine Enterokinase-Spaltstelle sowie um die von der MCS des Vektors kodierte Aminosäuresequenz verlängerten NusA-Protein resultiert hätte. Deshalb wurde der NusA-kodierenden Bereich durch eine PCR mit den Primern NusA 5' und NusA 3' aus pET 43a amplifiziert (Kapitel 3.15.2). Über

den Primer NusA 5' wurde zusätzlich eine *HindIII*, eine *NdeI*-Schnittstelle und eine für die Erkennungssequenz der PreScission-Protease kodierende Nukleotidsequenz am 5'-Ende des *nusA*-Gens eingeführt. Über den Primer NusA 3' wurde ein Stopcodon und eine *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *nusA*-Gens eingeführt.

Das PCR-Amplifikat wurde mit *HindIII* und *BamHI* verdaut (Kapitel 3.14.1) und mit einem entsprechend verdauten und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pBlueskript II KS ligiert (Kapitel 3.14.5). Nach der Hitzeinaktivierung wurde der Ligationsansatz mit Butanol gefällt (Kapitel 3.13.1) und in elektrokompentente *E. coli* Top 10 transformiert (Kapitel 3.16.2). Positive Transformanten wurden über *Blue-White-Screening* und Kolonie-PCR mit genspezifischen Primern identifiziert (Kapitel 3.15.1). Die aus einem Transformanten präparierte Vektor-DNA (Kapitel 3.12.2) wurde durch Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft (Kapitel 3.14.6).

Aus pBlueskript-NusA (1-495) wurde über Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* die korrekte *nusA*-Sequenz ausgeschnitten (Kapitel 3.14.1) und mit einem mit *NdeI* und *BamHI* geschnittenen und dephosphorylierten (Kapitel 3.14.2) pTKK19-Plasmid ligiert (Kapitel 3.14.5). Der Ligationsansatz wurde hitzeinaktiviert, butanolgefällt (Kapitel 3.13.1) und anschließend über Elektroporation in *E. coli* Top 10 Zellen transformiert (Kapitel 3.16.2). Positive Transformanten wurden über Kolonie-PCR identifiziert (Kapitel 3.15.1). Die aus einem positiven Transformanten gewonnene Plasmid-DNA (Kapitel 3.12.2) wurde mittels CaCl_2 -Methode in normalkompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (3.16.1). Einige Kolonien wurden in Kanamycin-haltigem LB angezogen und Induktionstests mit IPTG unterzogen (Kapitel 3.17.3). Auf SDS-Gelen (Kapitel 3.8.1) wurde eine erfolgreiche Induktion durch das Erscheinen einer zusätzlichen Proteinbande bei ca. 55 kDa vier Stunden nach Induktion nachgewiesen (Abbildung 4.31).

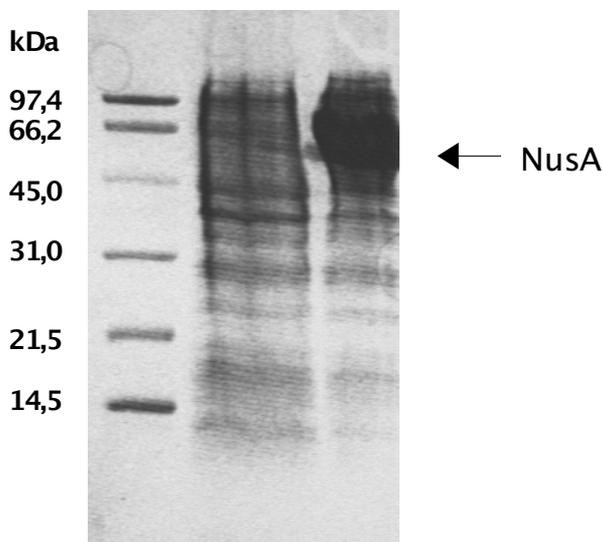


Abbildung 4.31 Induktionsgel von *E. coli* NusA

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem 15 % SDS-Gel (Kapitel 3.8.1).

Bahn 1: Molekulargewichtsstandard

Bahn 2: vor Induktion

Bahn 3: 4 h nach Induktion

E. coli NusA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.5.3 Reinigung von *E. coli* NusA (1–495)

E. coli BL21 (DE3)/pTKK19 NusA (1–495) wurde in TB-Medium bei 37°C in Schikanenkolben angezogen (Kapitel 3.17.4). Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert und weitere vier Stunden bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in Lysispuffer resuspendiert und durch mehrmalige Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen.

Abbildung 4.32 zeigt den Ablauf der Expression und Reinigung von NusA aus *E. coli* (Kapitel 3.18.5).

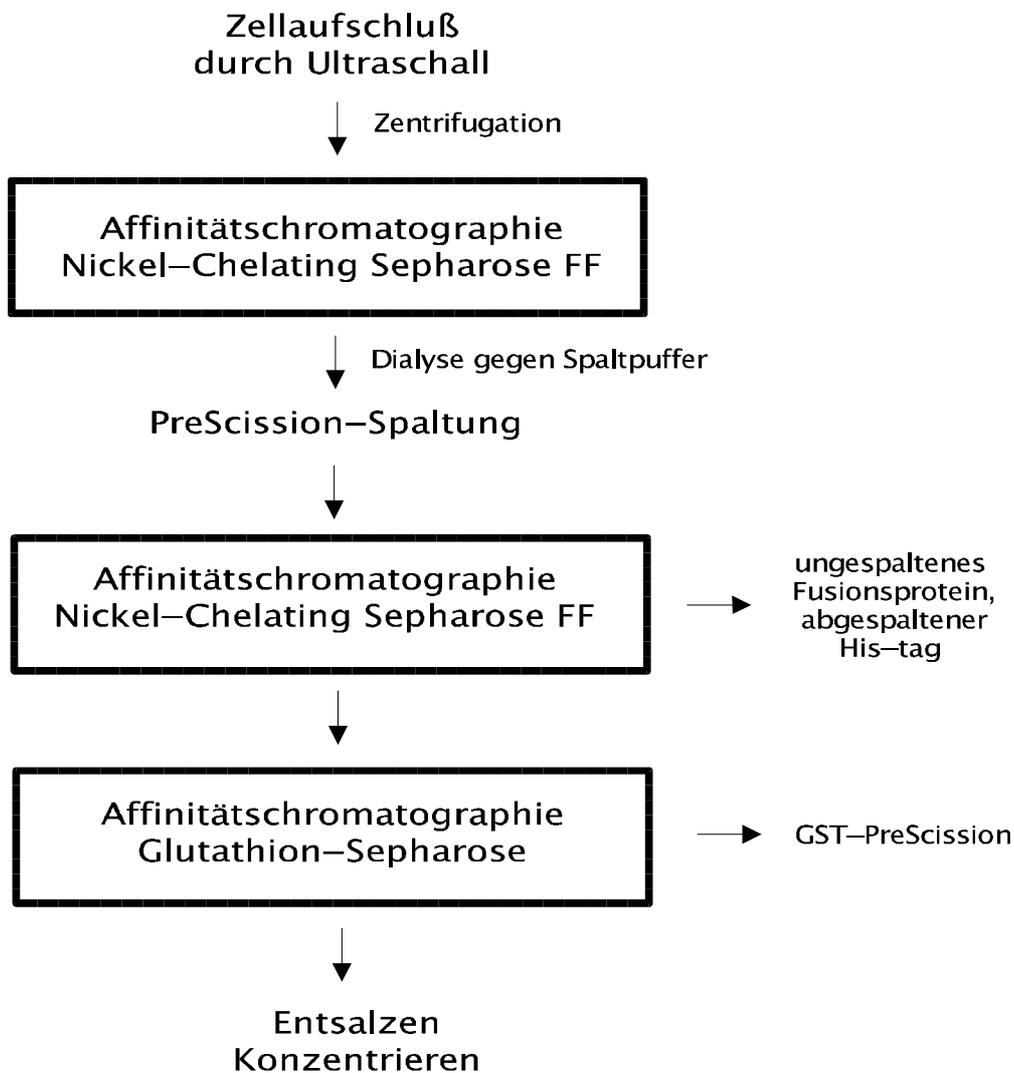


Abbildung 4.32: Expressions- und Reinigungsprotokoll für *E. coli* NusA (1–495)

Oben ist schematisch das verwendete Reinigungsprotokoll für das NusA-Protein aus *E. coli* dargestellt (Kapitel 3.18.5)

Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile wurde der Rohextrakt einer ersten IMAC mit einer Nickel-beladenen Chelating Sepharose Fast Flow-Säule unterzogen (Abbildung 4.34). Die Elution erfolgte mit steigenden Imidazol-Konzentrationen über einem Stufengradienten. Die NusA-enthaltenden Fraktionen wurden über Nacht gegen PreScission-Spaltpuffer dialysiert und nach Zugabe von PreScission-Protease in einer Konzentration, die etwa einem Zehntel der Herstellerangabe entspricht, acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft, und der Spaltansatz wurde über eine zweite mit Nickel beladene Chelating Sepharose Fast Flow-Säule, hinter die zusätzlich noch eine Glutathion-Sepharose Fast Flow-Säule geschaltet war, gegeben. Auf diese Weise konnten ungespaltenes Fusionsprotein, der abgespaltene Histidin-Affinitätsanhang und die GST-PreScission-Protease abgetrennt werden. Sauberes NusA-Protein, das am NH₂-Terminus durch die PreScission-Protease-Spaltstelle um die zwei Aminosäuren Glycin und Prolin verlängert ist, konnte auf diese Weise im Säulendurchbruch aufgefangen werden.

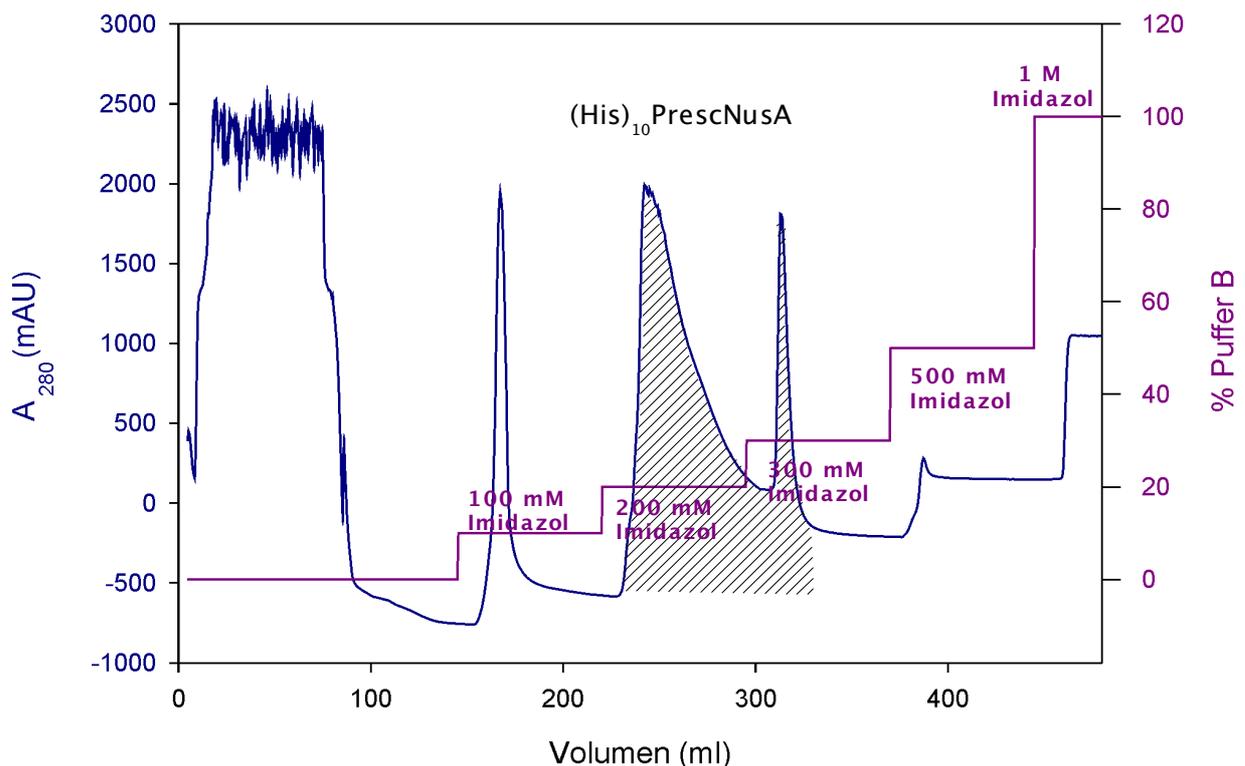
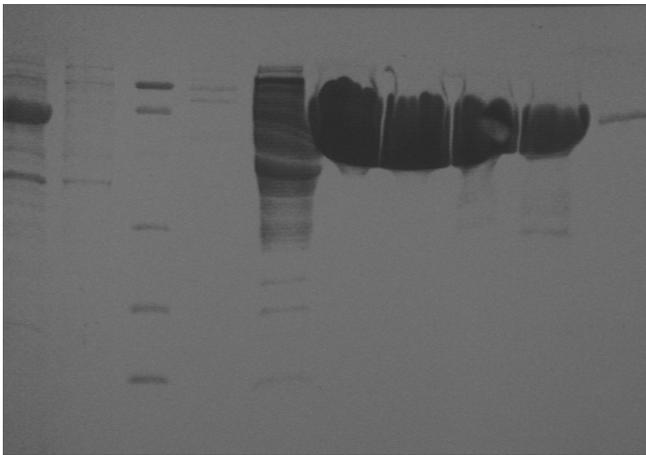


Abbildung 4.34: Reinigung von *E. coli* NusA (1–495)

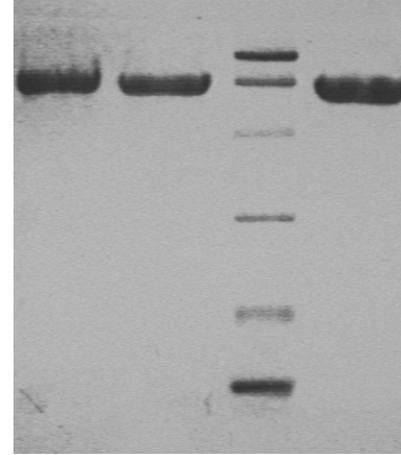
Oben ist das Elutionsprofil der Nickel-Chelating-Sepharose Fast Flow Säule abgebildet (blau: A_{280} ; rot: Stufengradient). Die Elution erfolgte über einen Stufengradienten mit Imidazol. Die NusA-enthaltenden Fraktionen sind schraffiert dargestellt.

Nächste Seite: 15 % ige SDS-Gele, die den weiteren Reinigungsverlauf zeigen. NusA wurde anschließend mit PreScission-Protease gespalten und über eine weitere Nickelsäule und eine Glutathionsäule gereinigt.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



11 12 13 14



Bahnen 3 und 13: Molekulargewichtstandard
 Bahnen 1, 2 und 4: Probendurchbruch
 Bahn 5: Waschfraktion (100 mM Imidazol)
 Bahnen 6–9: His–NusA–Eluat (200 mM Imidazol)
 Bahn 10: His–NusA–Eluat (300 mM Imidazol)

Bahn 11: vor Spaltung
 Bahn 12: nach Spaltung
 Bahn 14: nach Abschluß der
 Reinigung

Danach wurde der Durchbruch über Lyophilisieren und anschließende Aufnahme in H₂O in einem Zehntel des Ausgangsvolumens konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde über eine mit NusA–NMR–Puffer äquilibrierte Fast–Desalting–Säule bzw. eine NAP–25–Säule gegeben und durch die Elution mit NusA–NMR–Puffer entsalzt.

4.5.4 CD–Spektroskopie

Um zu überprüfen, ob *E. coli* NusA (1–495) nach der Reinigung im NMR–Puffer gefaltet vorliegt, wurde ein Fern–UV–CD–Spektrum (Kapitel 3.19) aufgenommen (Abbildung 4.36).

Das erhaltene Spektrum weist Minima bei 208 und 222 nm auf, was auf das Vorliegen von α –Helices hindeutet. Zudem ist das Spektrum einem für *E. coli* NusA (1–495) publizierten CD–Spektrum (Mah *et al.*, 1999) sehr ähnlich.

NusA lag also im erforderlichen Puffer gefaltet vor und konnte für die Untersuchungen zur Interaktion des Komplexes aus N und nutboxB–RNA mit NusA (Kapitel 4.7) eingesetzt werden.

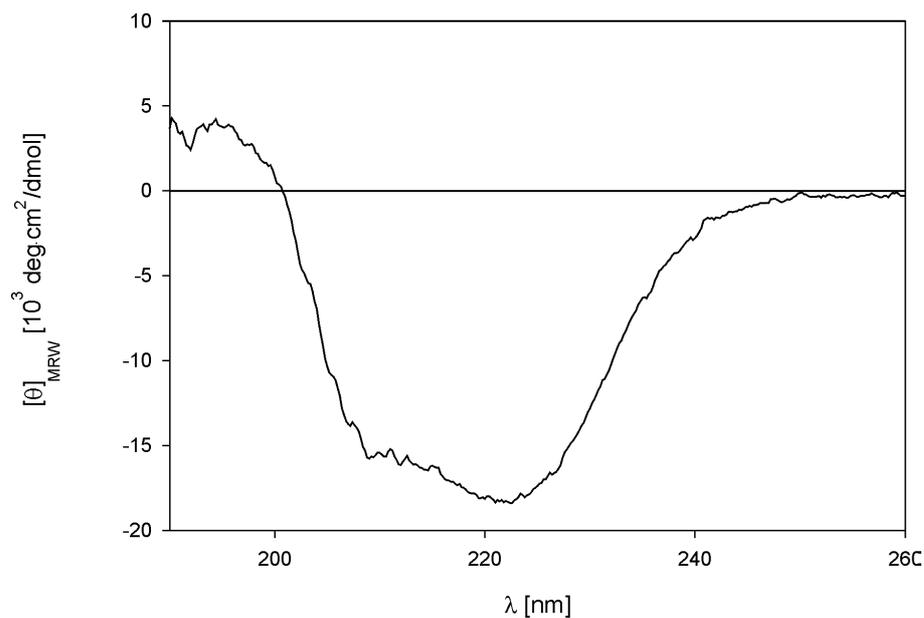


Abbildung 4. 34 Fern-UV-CD-Spektrum von E. coli NusA (1-495)

NusA wurde in einer Konzentration von 50 μM in 10 mM Kaliumphosphat pH 6,5; 50 mM NaCl in einer 0,1 mm dicken Küvette bei 298 K aufgenommen. Es wurden 8 Spektren akkumuliert.

4.6 Klonierung, Expression und Reinigung des N-Proteins (1-53) aus dem Phagen λ

Für spätere NMR-spektroskopische Untersuchungen des ternären Komplexes aus *nutboxB*-RNA, NusA aus *E. coli* und dem N-Protein aus dem Bakteriophagen λ war es notwendig, ein effizientes Expressions- und Reinigungsprotokoll für λ N (1-53) zu entwickeln.

4.6.1 Das Expressionssystem für λ N(1-53)-Protein

Das gewählte Expressionssystem für das N (1-53)-Fragment (Abbildung 4.35)) beruht auf dem Plasmid pTKK19, das von Kohno *et al.* (1998) zur Biosynthese von isotopenmarkierten Peptiden entwickelt wurde. Hierbei wird das gewünschte Peptid als Fusionsprotein mit Ubiquitin aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Ein Dekahistidin-Anhang am NH_2 -Terminus des Ubiquitin-Anteils ermöglicht die Reinigung über IMAC unter nativen Bedingungen oder – bei einer Expression als *inclusion bodies* – unter denaturierenden Bedingungen durch Harnstoffzugabe.

Das Plasmid pTKK19 ist ein pET–19b–Derivat, der Replikationsursprung wurde jedoch durch den der pUC–Vektoren ersetzt, wodurch die Kopienzahl des Vektors in der Zelle erheblich gesteigert wird.

Der Ubiquitin–Anteil kann durch Ubiquitin–Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*yeast ubiquitin hydrolase*, YUH) leicht abgespalten werden. Diese Protease ist *in vivo* an der Prozessierung von Ubiquitin–Vorläufern und von ubiquitinierten Proteinen beteiligt. Ubiquitin–Hydrolase erkennt und hydrolysiert spezifisch die Peptidbindung am COOH–terminalen Glycin 76 von Ubiquitin. *In vitro* können durch YUH hinter Glycin 76 fusionierte Peptide von bis zu 100 Aminosäuren Länge vom Ubiquitin–Anteil abgespalten werden (Mildner *et al.*, 1999).

YUH kann mit hohen Ausbeuten selbst rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Ein COOH–terminaler Hexa–Histidin–Affinitätsanhang erlaubt eine einfache Reinigung der Protease über IMAC.

Der His–tag ermöglicht zusätzlich das leichte Entfernen der Protease aus dem Spaltansatz über einen zweiten IMAC–Schritt, bei dem gleichzeitig ungespaltenes Fusionsprotein und der abgespaltene Histidin–Ubiquitin–Anteil entfernt werden können.

4.6.2 Konstruktion des Plasmids pTKK19–λN(1–53)

Ausgehend vom Plasmid pLN5 (Dr. S. Hoffmann, Dr. M. Schärpf), das die Nukleotidsequenz des gesamten λ N–Proteins enthält, wurde mit den Primern N (1–53) 5' und N (1–53) 3' der den Sequenzabschnitt 1 bis 53 kodierenden Bereich mittels PCR amplifiziert (Kapitel 3.15.2). Der Primer N (1–53) 5' war am 5'–Ende phosphoryliert, um die folgende *blunt end*–Ligation zu erleichtern, der Primer N (1–53) 3' führte am 3'–Ende des N (1–53) kodierenden Abschnitts ein Stopcodon und eine *Bpu1102I*–Schnittstelle ein. Das erhaltene PCR–Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese gereinigt (Kapitel 3.13.1) und mit *Bpu1102I* verdaut (Kapitel 3.14.1). Der Vektor pTKK19, in den das so behandelte Amplifikat inseriert werden sollte, wurde zunächst mit *NsiI* verdaut (Kapitel 3.14.1) (Abbildung 4.35). Die dabei entstehenden 3'–Überhänge wurden durch die 3'→5'–Exonuklease–Funktion der T4 DNA–Polymerase entfernt (Kapitel 3.14.3). Anschließend wurde das Plasmid mit *Bpu1102I* geschnitten (Kapitel 3.14.1) und dephosphoryliert (Kapitel 3.14.2). Das PCR–Produkt wurde 5' *blunt end* und 3' über die *Bpu1102I*–Schnittstelle mit dem so vorbehandelten Vektor ligiert (Kapitel 3.14.5). Der Ligationsansatz wurde nach Hitzeinaktivierung und Butanolfällung (Kapitel 3.13.1) in elektrokompetente *E. coli* Top 10 transformiert (Kapitel 3.16.2). Positive Transformanten wurden durch Kolonie–PCR mit

genspezifischen Primern identifiziert (Kapitel 3.15.1). Die Plasmid-DNA wurde präpariert (Kapitel 3.12.2) und sequenziert (Kapitel 3.14.6). Ein Plasmid mit der korrekten Sequenz wurde in normalkompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (Kapitel 3.16.1). Einige der erhaltenen Transformanten wurden in LB-Medium mit Kanamycin angezogen und Induktionstests mit IPTG unterzogen (Kapitel 3.17.3).

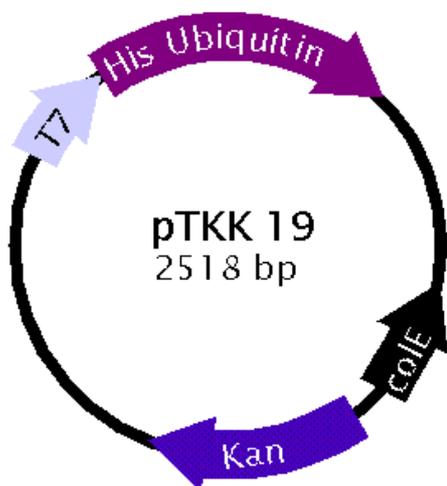


Abbildung 4.35: Das Expressionssystem für λ N (1-53)

Dargestellt ist das Plasmid pTKK19, auf dem das Expressionssystem beruht, und eine schematische Darstellung der Klonierungsschritte in diesen Vektor. Auf der nächsten Seite ist schematisch das exprimierte mit einem Deka-Histidin-Anhang versehene Ubiquitin-Fusionsprotein abgebildet.



4.6.3 Reinigung von λ N(1–53)–Protein

E. coli BL21 (DE3) / pTKK19 λ N (1–53) wurde in LB mit Kanamycin (50 μ g/ml) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 angezogen und durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (Kapitel 3.17). Nach der Induktion wurden die Bakterien weitere 16 Stunden bei 22°C geschüttelt, abzentrifugiert und durch mehrmaliges Behandeln mit Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 3.18.4).

Abbildung 4.36 zeigt unlösliche Zellbestandteile und den weiterverwendeten Rohextrakt. Bereits hier ist deutlich zu erkennen, daß neben dem bei einem Molekulargewicht von 17,4 kDa erwarteten Ubiquitin–N(1–53)–Fusionsprotein noch weitere, wahrscheinlich durch Translationsabbruch entstandene Ubiquitininfusionspeptide gebildet worden sind, deren Molekulargewicht zwischen Ubiquitin ohne Fusionspartner (11,3 kDa) und dem des gesamten Ubiquitin–N–Fusionspeptids liegt. Diese sind auch schon in den Induktionsgelen zu beobachten und nicht durch zu intensive Behandlung mit Ultraschall entstanden.

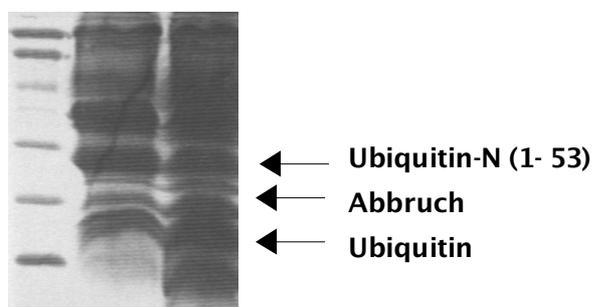


Abbildung 4.36: Abbruchprodukte bei der Expression von Ubiquitin–N (1–53)

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem 19 %igen SDS–Gel (Kapitel 3.8.1; Bahn 1: Molekulargewichtstandard, Bahn 2: unlösliche Zellbestandteile; Bahn 3: Rohextrakt)

Eine Analyse der Ubiquitin- und der λ N-Nukleotidsequenz ergab, daß mehrere in *E. coli* selten vorkommenden Codons im für die Aminosäuren 1 bis 53 kodierenden Bereich von λ N vorliegen: Threonin 5 wird von ACA (13 %), Prolin 23 wird von CCC (12 %), Leucin 25 wird von TTG (13 %), Glycin 27 wird von GGG (15 %), Valin 28 und Valin 48 werden von GTA (15 %), Leucin 38 wird von CTC (10 %), Serin 39 wird von TCG (15 %) und Serin 46 von TCA (12 %), Arginin 47 von CGA (7 %) und Leucin 52 wird von CTA (4 %) kodiert. Die Zahlen in Klammern geben an, wie oft die jeweiligen Aminosäuren durch diese Codons kodiert werden (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Der Abbruch am COOH-Terminus von Ubiquitin rührt wahrscheinlich von den beiden von dem in *E. coli* seltenen Codon AGA (4 %) kodierten Argininen 72 und 74 bzw. von dem seltenen Codon GGA (11 %) für Glycin 76 her. Diese Codons sind in einer überarbeiteten Version des Ubiquitin-Expressionssystems inzwischen durch die synonymen in *E. coli* häufigeren Codons ersetzt worden. Durch diese Maßnahme konnten die Ausbeuten für verschiedene Testpeptide im Ubiquitinsystem deutlich verbessert werden (Dr. T. Kohno, pers. Mitteilung).

Durch die Verwendung von *E. coli* Rosetta (DE3) als Expressionsstamm und die damit verbundene Koexpression von tRNAs für die Codons AGA, CUA und CCC wurde im Vergleich zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3) keine deutliche Verbesserung erzielt. Das Herabsetzen der Temperatur nach Induktion von 37°C auf 22°C führte ebenfalls nicht zu einer wesentlichen Reduzierung der Abbruchfragmente.

Das verwendete Reinigungsprotokoll ist in Abbildung 4.37 dargestellt (Kapitel 3.18.4).

Das Zellpellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und durch mehrmalige Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Ubiquitin-N-Fusionspeptid befand sich danach fast ausschließlich im löslichen Überstand. Die Reinigung des Ubiquitininfusionspeptids erfolgte über IMAC mit einer mit Nickelionen beladenen Chelating Sepharose Fast Flow-Säule unter nativen Bedingungen. Eluiert wurde mit Imidazol in steigenden Konzentrationen. Fraktionen, die Ubiquitininfusionspeptid bzw. Ubiquitin-N-Abbruchfragmente enthielten, wurden gegen YUH-Spaltpuffer dialysiert. Durch Zugabe von Ubiquitin-Hydrolase (1 mg/ml Spaltansatz) wurde die Spaltungsreaktion (1 h bei 37°C) gestartet. Der Erfolg der Spaltung wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. Neben abgespaltenem Dekahistidin-Ubiquitin-Anteil (11,3 kDa), YUH (26 kDa) und geringen Mengen an ungespaltenem Fusionsprotein waren neben der bei einem Molekulargewicht von ca. 6,5 kDa erwarteten Bande von abgespaltenem N (1-53)-Peptid zusätzliche Banden bei geringerem Molekulargewicht zu erkennen. Bei diesen zusätzlichen Banden handelt es sich um die vom Ubiquitin-Anteil abgespaltenen Translationsabbruchprodukte.

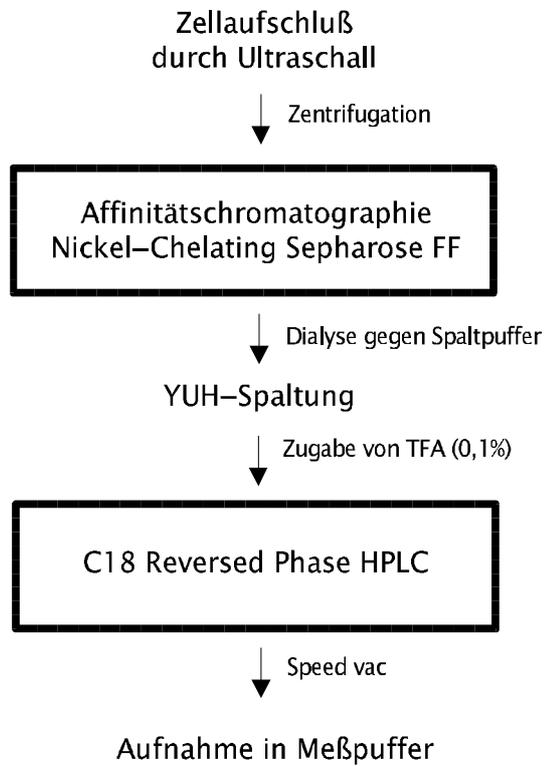
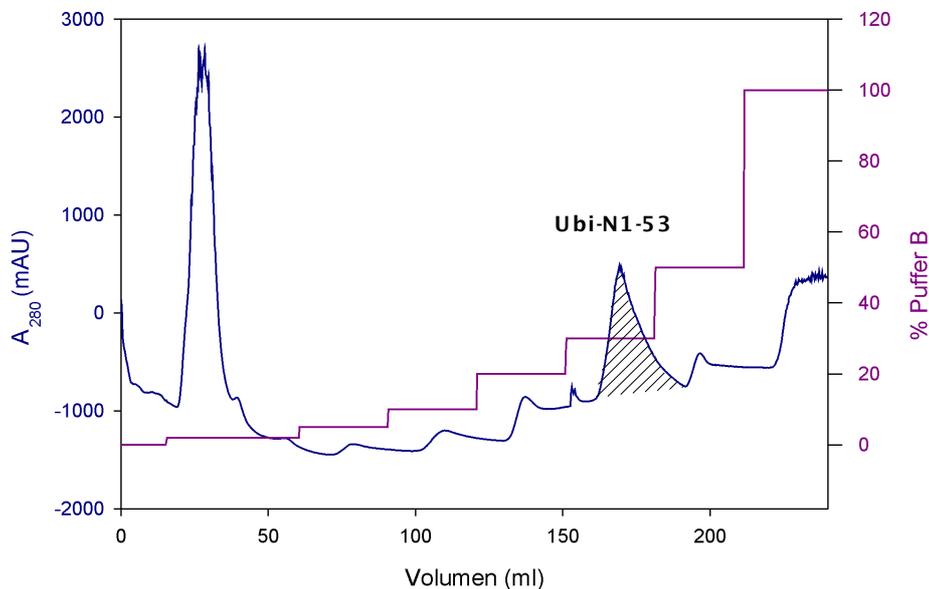


Abbildung 4.37: Das Reinigungsprotokoll für λ N (1–53)

Dargestellt ist der schematische Ablauf der Reinigung des λ N (1–53)–Peptids.

Unten ist das Elutionsprofil für die Nickel-Chelating-Sepharose-Fast-Flow-Säule dargestellt (blau: A_{280} , rot: Gradientenverlauf). Die Fraktionen, die Ubiquitin-N(1–53)–Fusionspeptid enthalten, sind schraffiert hinterlegt.

Das zugehörige Gel ist auf der folgenden Seite dargestellt.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

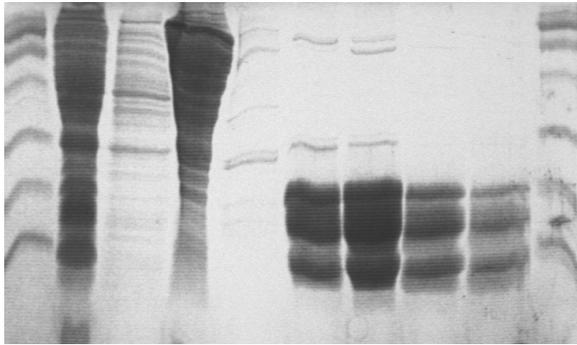


Abbildung 4.37-2 19%iges SDS-Gel der Nickel-Affinitätschromatographie

Bahnen 1 und 10: Molekulargewichtsstandard

Bahn 2: Rohextrakt

Bahnen 3 bis 5: Probendurchlauf und Waschfraktionen

Bahnen 6 –9: Eluat der Nickelsäule

Ein zweiter IMAC-Schritt zur Abtrennung der noch mit einem Histidin-Affinitätsanhang versehenen Proteine (Ubiquitin, ungespaltenes Fusionspeptid, YUH) erschien nicht sinnvoll, da anschließend noch ein weiterer chromatographischer Schritt zur Trennung von N (1–53) von den N-Abbruchprodukten erforderlich gewesen wäre. Stattdessen konnte der Spaltansatz über *reversed phase* HPLC mit einer C18-Säule in einem Schritt getrennt werden (Abbildung 4.38).

Das hier dargestellte Expressions- und Reinigungsprotokoll konnte auch erfolgreich auf eine Expression von Ubiquitin-N (1–53) in Minimalmedium bzw. ^{15}N -isotopenmarkiertem Minimalmedium angewendet werden. Die Ausbeuten an N (1–53) waren mit ca. 0,5 mg / 1 Minimalmedium aufgrund des hohen Anteils an Abbruchprodukten jedoch gering.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

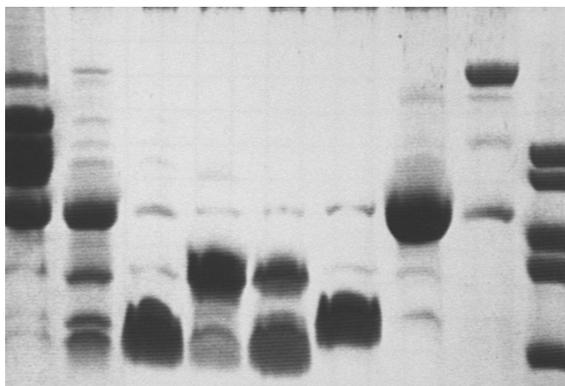


Abbildung 4.38 C18-RP-HPLC-Lauf

Auf der folgenden Seite ist das Elutionsprofil eines HPLC-Laufs abgebildet (blau: A_{280} , rot: Gradientenverlauf).

Links ist ein Schägger-Jagow-Gel mit Harnstoff der YUH-Spaltung und des anschließenden Laufs abgebildet.

Bahn 1: vor der YUH-Spaltung

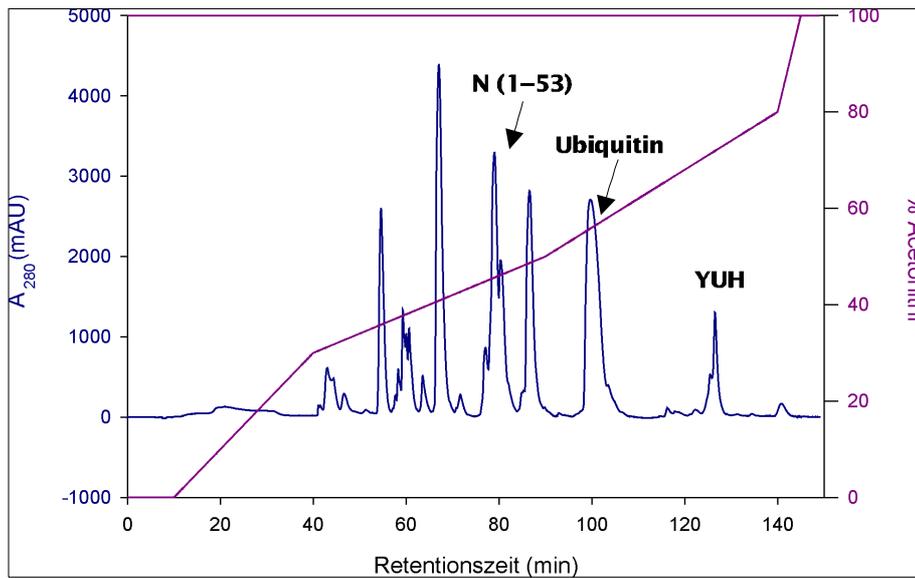
Bahn 2: nach der Spaltung

Bahnen 3, 5, 6: Abbruchprodukte

Bahn 7: Ubiquitin

Bahn 8: YUH mit ungespaltenem Fusionsprotein und Ubiquitin

Bahn 9: N (1–53) mit Verunreinigung; durch ein Abflachen des Acetonitrilgradienten konnte die Verunreinigung in späteren Läufen von N (1–53) abgetrennt werden.



4.6.4 Erste strukturelle Charakterisierungen von λ N (1–53)

CD–Spektroskopie

Zunächst wurde ein Fern–UV–CD–Spektrum (Kapitel 3.19) von N (1–53) aufgenommen (Abbildung 4.39). Bereits Kirsch (1995) und Schärpf (1999) hatten für das gesamte N–Protein bzw. für das N(1–36)–Peptid keine Hinweise auf Sekundärstruktur mittels CD–Spektroskopie erhalten.

Auch für das N (1–53)–Peptid wurde ein typisches *random coil*–Spektrum mit einem Minimum bei 203 nm erhalten.

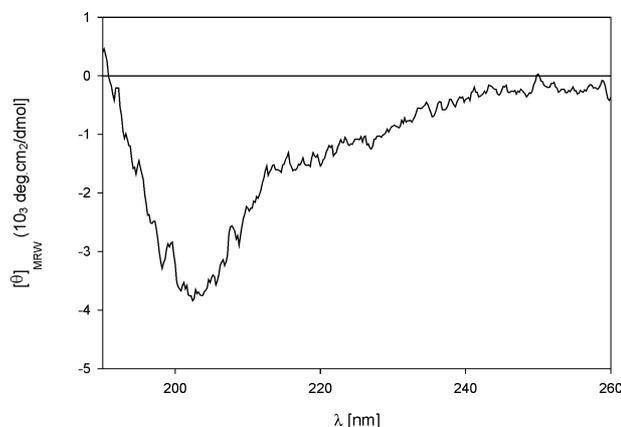


Abbildung 4.39 Fern–UV–CD–Spektrum von 1 N (1–53)

Das Peptid lag in einer Konzentration von 400 μ M in 10 mM Kaliumphosphat pH 6,4; 50 mM NaCl vor. Gemessen wurde mit einer 0,1 mm Küvette. Acht Scans wurden aufsummiert.

Diffusionsmessungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius

Analog wie bei der Bestimmung des hydrodynamischen Radius (Kapitel 3.10) für das Nun-Protein aus HK022 (Kapitel 4.4.5) wurde auch für λ N (1–53) der hydrodynamische Radius bestimmt (Abbildung 4.40).

Folgende fünf Werte wurden erhalten:

9,3467 9,3032 9,3139 9,3132 9,3636

Daraus ergibt sich als Mittelwert: $9,328 \pm 0,026$

Der hydrodynamische Radius errechnet sich daher zu: **$19,78 \text{ \AA} \pm 0,03 \text{ \AA}$**

Für ein Peptid mit 53 Aminosäuren ist nach Wilkins et al. (1999) für ein globulärer Faltung ein theoretischer hydrodynamischer Radius von $15,0 \text{ \AA} \pm 1,9 \text{ \AA}$ zu erwarten, für ein nicht gefaltetes Peptid ein Radius von $21,2 \text{ \AA} \pm 2,2 \text{ \AA}$. Demnach kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei N (1–53) um ein unstrukturiertes Peptid handelt.

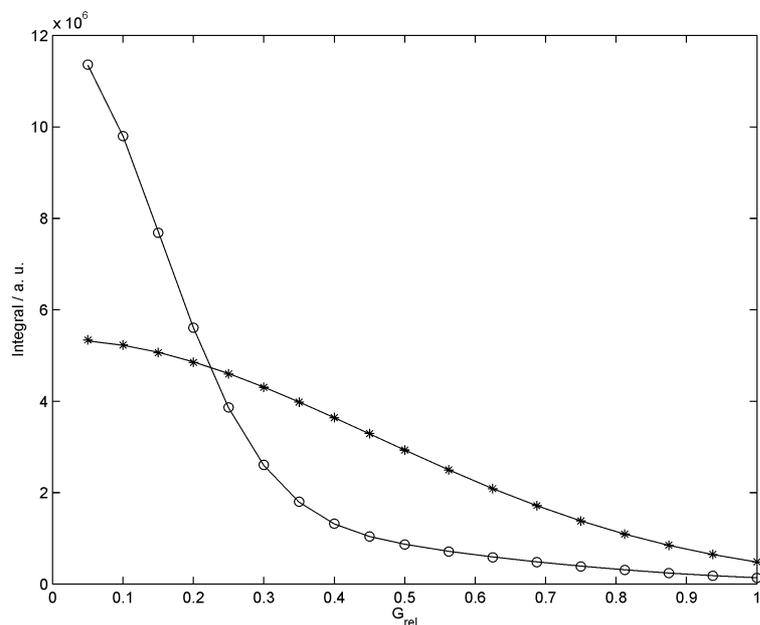


Abbildung 4.40 Bestimmung des hydrodynamischen Radius von N (1–53)

Es wurden 18 Spektren einer $200 \mu\text{m}$ Probe in D_2O , 10 mM Kaliumphosphat pH 6,4; 50 mM NaCl bei verschiedenen Gradientenstärken aufgenommen.

Gezeigt ist das erste von fünf Experimenten.

Kreise: Dioxan + N (1–53)
(3,6–4,1 ppm)

Sterne: N (0,15–1,2 ppm)

4.7 Erste strukturelle Charakterisierung der Interaktion des N(1–53)–*nutboxB*–Komplexes mit *E. coli* NusA

Zur Herstellung eines N (1–53)–*nutboxB*–Komplexes wurde zu einer ca. 150 μM konzentrierten Probe (10 mM Kaliumphosphat, pH 6,4, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D_2O) von unmarkierter *nutboxB*–RNA so lange ^{15}N –markiertes N(1–53)–Peptid zutitriert, bis anhand des typischen Musters der Iminoprotonenresonanzen im ^1H –1D–Spektrum der *nutboxB*–RNA zu erkennen war, daß die RNA im Komplex mit ^{15}N –N(1–53) vorlag.

Abbildung 4.41 zeigt den Bereich der Iminoprotonenresonanzen der *nutboxB*–RNA im Verlauf der Messung. Dieser Bereich weist aufgrund seiner exponierten Lage keine zusätzlichen Resonanzlinien von N bzw. NusA auf. Die Iminoprotonen von G12, G13 und G14 zeigen für den N–gebundenen und den N–ungebundenen Zustand separierte Resonanzen und eignen sich daher zur Kontrolle der Komplexbildung mit N.

Das Muster der Iminoprotonenresonanzen der *nutboxB*–RNA nach der Komplexbildung mit λ N (1–53) ist identisch zu dem des N(1–36)–*nutboxB*–RNA–Komplexes und dem des Nun(10–44)–*nutboxB*–RNA–Komplexes, was auf eine gleiche Faltung in allen drei Fällen hindeutet. Dieses Muster zeichnet sich durch eine die Verschiebung der drei auch in der freien RNA sichtbaren Resonanzen für G12, G13 und G14 und zwei zusätzliche Signale für die Iminoprotonen von U5 und G6 aus. Das tieffeldverschobene Signal entspricht U5 aus dem apikalen Basenpaar. Man erhält ein Signal, weil das Iminoproton nun in eine Wasserstoffbrückenbindung involviert ist, was zu einem langsameren Austausch mit dem Lösungsmittel bezüglich der NMR–Zeitskala und damit zu einem beobachtbaren Signal führt. Ein weiteres Signal erhält man für G6, was ein Hinweis auf die Stabilisierung der RNA–Struktur bei der Bindung des Peptids ist und vermutlich durch Ausbildung des sheared basepairs an der Basis des GNRA–Tetra-loops erklärbar ist. Zudem tritt eine zusätzliche Resonanz für das Iminoproton von G1 auf.

Zu diesem binären Komplex wurde anschließend unmarkiertes *E. coli* NusA im Überschuß zupipettiert.

Die Zugabe von NusA führt im Bereich der Iminoprotonenresonanzen der *nutboxB*–RNA nicht zu weiteren Shifts der einzelnen Resonanzen. Das Signal–Rausch–Verhältnis für dieses Spektrum ist

schlechter als bei den ersten beiden, was aber durch die Verdünnung der RNA-Probe bei der Zugabe von NusA zu erklären ist.

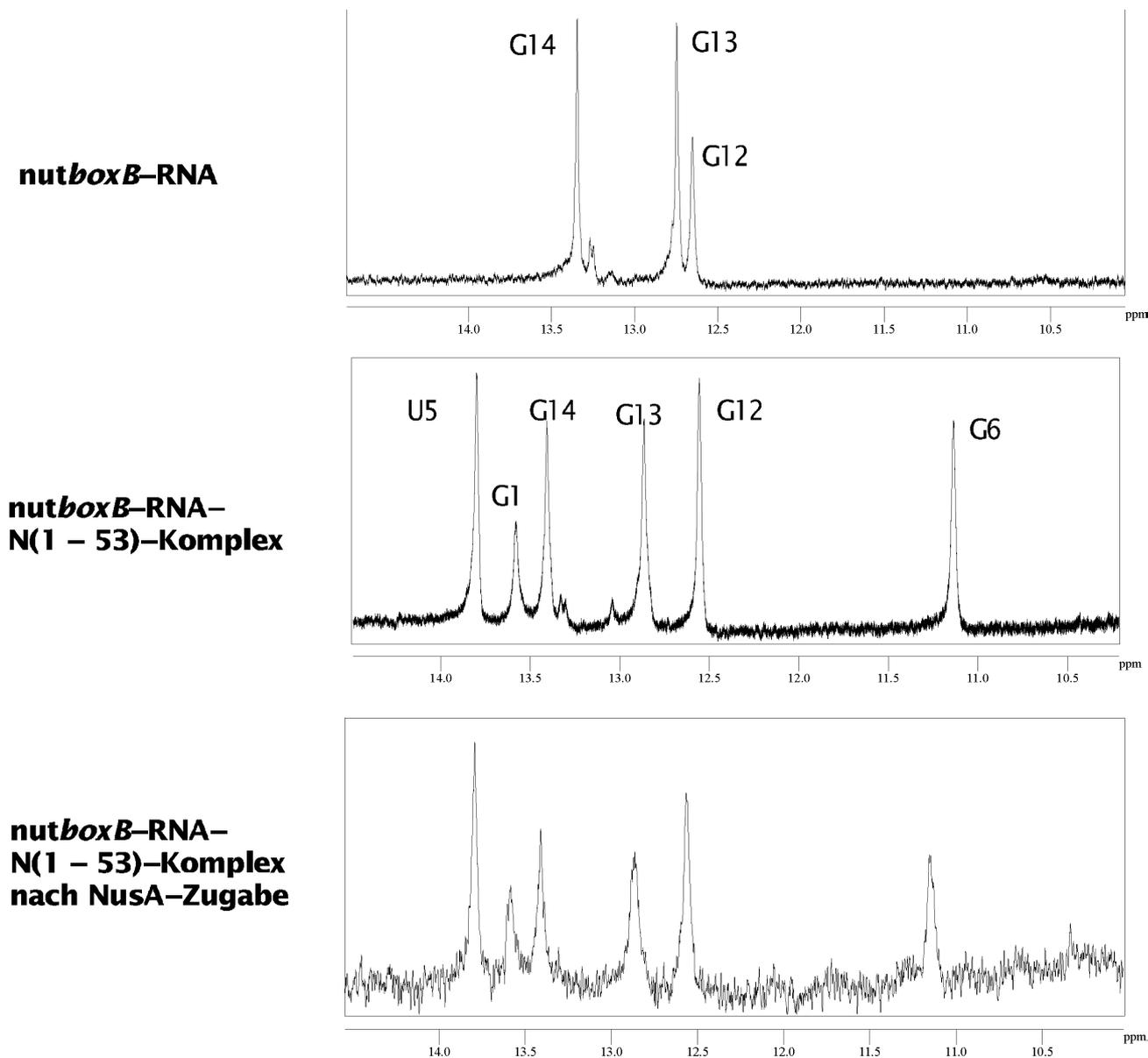


Abbildung 4.41 Iminoprotonen-Bereich der nutboxB-RNA bei Zugabe von N(1-53) und NusA

Oben: freie nutboxB-RNA (10 mM Kaliumphosphat, pH 6,4, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D₂O)

Mitte: nutboxB-RNA im Komplex mit N(1-53) (10 mM Kaliumphosphat, pH 6,4, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D₂O)

Unten: nutboxB-RNA-N(1-53)Komplex (10 mM Kaliumphosphat, pH 6,4, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) D₂O) nach NusA-Zugabe.

Sowohl vom ^{15}N -N(1-53)-*nutboxB*-Komplex als auch vom ^{15}N -N(1-53)-*nutboxB*-Komplex mit NusA wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC aufgenommen.

In Abbildung 4.42 ist das für den Komplex aus ^{15}N -N(1-53)-*nutboxB*-RNA erhaltene HSQC-Spektrum dem für den Komplex aus ^{15}N -N(1-36)-*nutboxB*-RNA (Schärpf, 1999) überlagert. Die Resonanzen sind weitgehend deckungsgleich. 14 zusätzliche Amidprotonen-Resonanzen sind im HSQC-Spektrum des ^{15}N -N(1-53)-*nutboxB*-RNA-Komplexes zusätzlich zu erkennen, die denen einiger der 17 zusätzlichen Aminosäuren im längeren N-Konstrukt entsprechen. Da Prolin 44 kein Signal im HSQC liefern kann, sind also fast alle zusätzlichen Amidprotonen auszumachen. Auch die Resonanzlinien einer zusätzlichen Seitenkette, wahrscheinlich die von Asparagin 41 sind zu erkennen (durch Verbindungslinie gekennzeichnet).

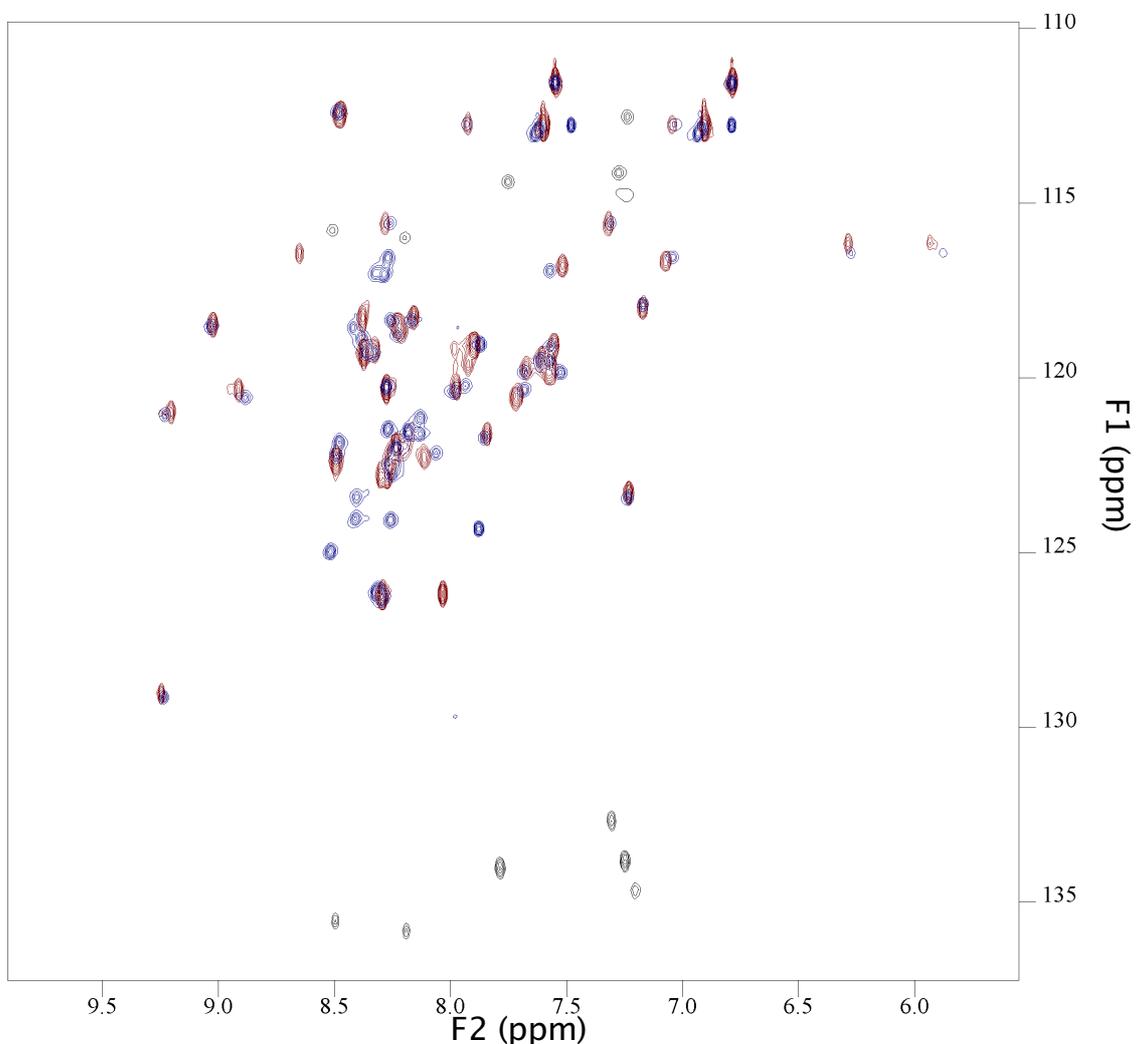


Abbildung 4.42 ^1H - ^{15}N -HSQC von ^{15}N -N(1-36)-*nutboxB*-RNA (Schärpf, 1999) in rot überlagert mit dem ^1H - ^{15}N -HSQC von ^{15}N -N(1-53)-*nutboxB*-RNA (in blau). Die beiden Spektren sind in ^{15}N -Richtung unterschiedlich gefaltet. Gefaltete Resonanzen sind in schwarz eingezeichnet. Zusätzliche Resonanzen sind mit Pfeilen versehen.

Das hohe Maß an Übereinstimmung zwischen den beiden Spektren legt nahe, daß der NH₂-terminale Teil des N(1–53)–Peptids, der an der Bindung an *nutboxB*–RNA beteiligt ist, die gleiche Struktur aufweist wie das N(1–36)–Peptid im Komplex mit *nutboxB*–RNA.

Abbildung 4.43 zeigt die Überlagerung der ¹H–¹⁵N–HSQC–Spektren des ¹⁵N–N(1–53)–*nutboxB*–RNA–Komplexes (blau) und des ¹⁵N–N(1–53)–*nutboxB*–RNA–Komplexes nach NusA–Zugabe (grün).

Einige der Resonanzen verschwinden nach NusA–Zugabe (orange Pfeile), z. T. kommt es zu *Shifts* (schwarze Pfeile) bzw. einer Linienverbreiterung oder Peaks treten an neuen Stellen auf (rote Pfeile). Dies deutet auf eine Interaktion von *nutboxB*–komplexgebundem N(1–53)–Peptid mit NusA hin.

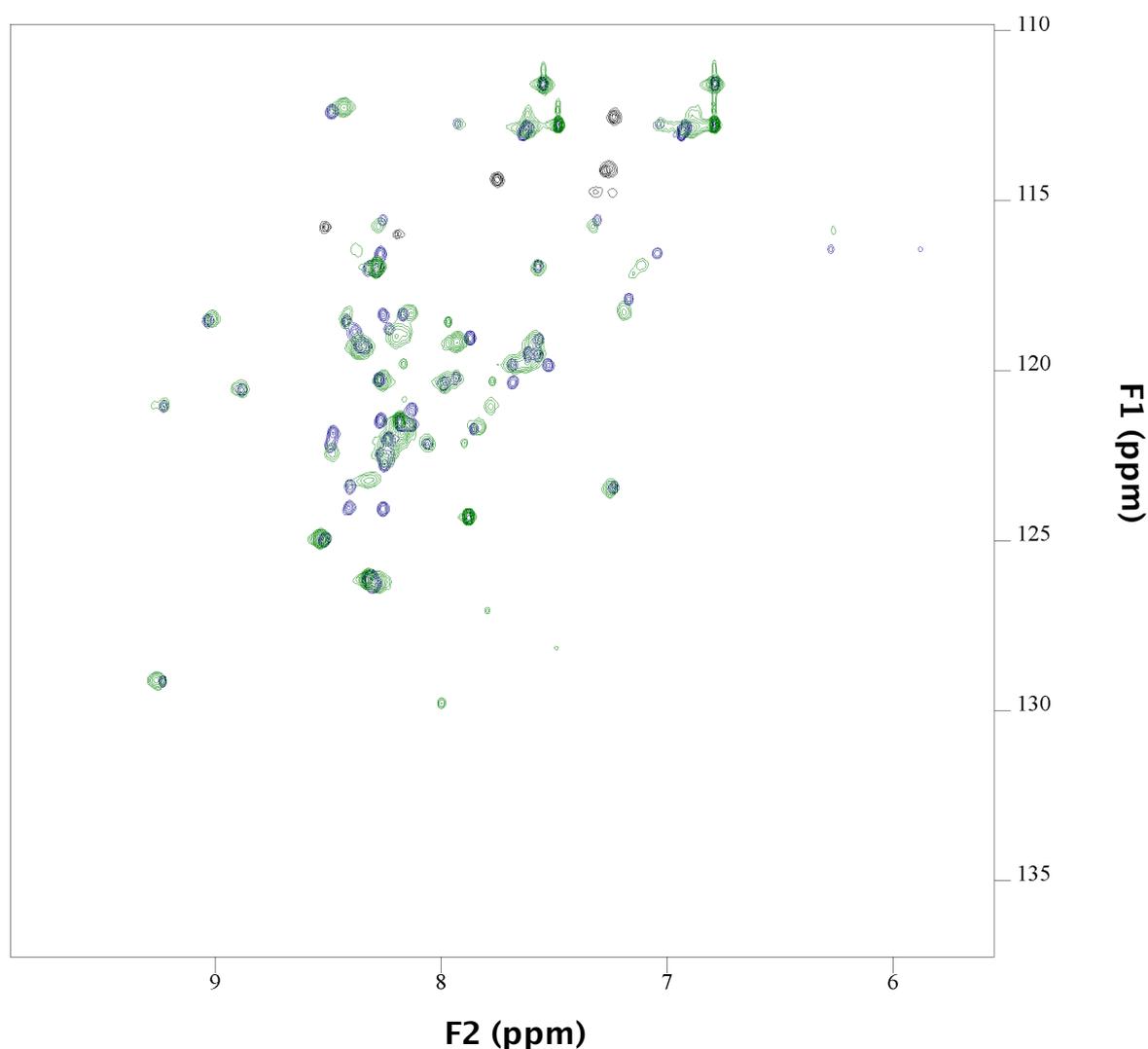


Abbildung 4.43 Vergleich N(1–53)–nut–RNA–Komplex mit (grün) und ohne NusA (blau)

Abbildung 4.44 zeigt die Überlagerung von Abbildung 4.43 mit dem ¹H–¹⁵N–HSQC–Spektren des ¹⁵N–N(1–36)–*nutboxB*–RNA–Komplexes. Die Bedeutung der Pfeile ist im Text erläutert.

In Abbildung 4.44 ist eine Überlagerung der in Abbildung 4.43 gezeigten Spektren mit dem für N(1–36)–*nutboxB*–RNA–Komplex erhaltenen HSQC dargestellt. Auffällig ist, daß Resonanzen, die nicht von Veränderungen durch die NusA–Zugabe betroffen sind, in der Regel zu derjenigen Gruppe an Resonanzen gehören, die bereits im N(1–36)–*nutboxB*–RNA–Komplex vorlagen.

Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß vor allem die nicht im Komplex mit *nutboxB*–RNA vorliegenden Reste von der Interaktion mit NusA betroffen sind.

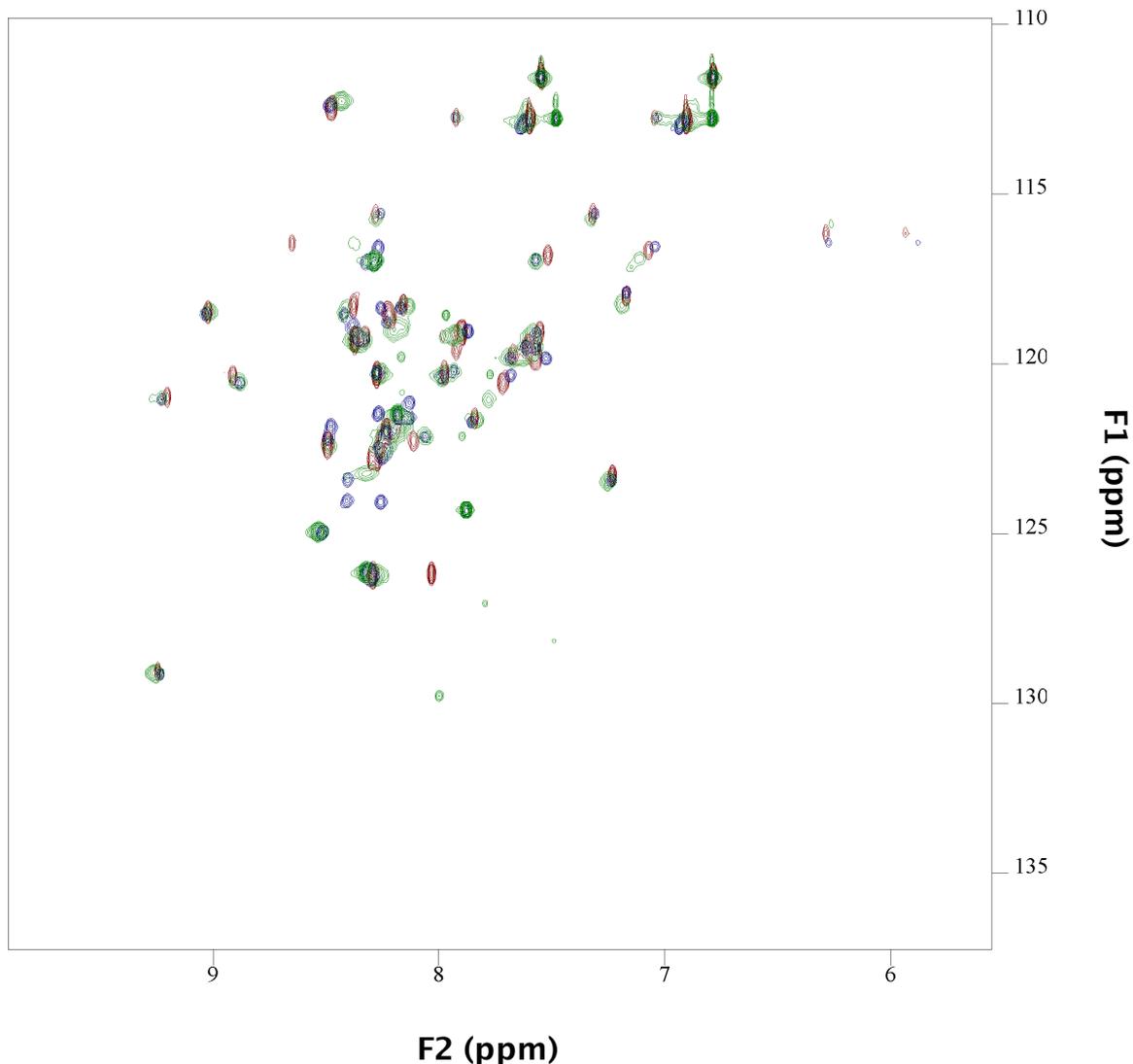


Abbildung 4.44: Überlagerung der ^1H – ^{15}N –HSQC–Spektren des ^{15}N –N(1–53)–*nutboxB*–RNA–Komplexes (blau) und des ^{15}N –N(1–53)–*nutboxB*–RNA–Komplexes nach NusA–Zugabe (grün) mit dem des ^{15}N –N(1–36)–*nutboxB*–RNA–Komplexes (rot) (Schärfp, 1999).

5 DISKUSSION

Die Untersuchung von biologischen Makromolekülen mittels NMR–Spektroskopie hat in großem Ausmaß von der Möglichkeit zur Isotopenmarkierung profitiert:

Mit zunehmender Größe des Proteins nimmt durch die größere Korrelationszeit die Linienbreite der Resonanzen zu und die Zahl der Spinsystem steigt, was zu einer Signalüberlagerung führt. Durch den Einsatz von ^{15}N und ^{13}C markierten Makromolekülen und die Anwendung mehrdimensionaler heteronuklearer NMR–Experimente können die überlappenden ^1H –Resonanzen zusätzlich nach den chemischen Verschiebungen der koppelnden ^{15}N – bzw. ^{13}C –Kerne in zusätzliche Dimensionen aufgespalten werden. Dies erlaubt mittlerweile die Strukturbestimmung von Proteinen mit einem Molekulargewicht bis zu 25 kDa.

Durch die selektive Isotopenmarkierung einer einzelnen Proteinkomponente in einem Komplex aus zwei oder mehr Proteinen bzw. eines Protein–Nukleinsäure–Komplexes können strukturelle Informationen über die Einzelkomponente – ohne Störung durch die anderen Komponenten – erhalten werden (Dötsch, 2001).

Isotopenmarkierte Proteine werden bislang hauptsächlich durch heterologe Proteinexpression in *E. coli* erhalten. Eine Expression in *Pichia pastoris* bzw. die Verwendung von zellfreien Expressionssystemen, was die Möglichkeit zur Expression posttranslational modifizierter bzw. toxischer Proteine bieten würde, ist – vor allem bei einer Markierung mit ^{13}C – aus wirtschaftlichen Gründen meist nicht tragbar (Goto und Kay, 2000). Eine Markierung mit ^{13}C ist in der Regel nur ökonomisch sinnvoll, wenn die Ausbeuten bei mehr als 10 mg reinem Protein pro Liter Minimalmedium liegen.

Die Etablierung eines für spätere Isotopenmarkierung geeigneten bakteriellen Expressionssystems und ein effizientes Reinigungsprotokoll mit hohen Ausbeuten bilden also die Grundlage für NMR–spektroskopische Untersuchungen sowohl von Einzelproteinen größer 10 kDa sowie Protein–Protein oder Protein–Nukleinsäure–Komplexen.

Hinzu kommen noch die allgemein hohen Probenanforderungen, die die NMR–Spektroskopie stellt: Milligramm–Mengen Protein, hohe Löslichkeit (ca. 1 mM) und Stabilität unter geeigneten pH–Bedingungen (< pH 7) bei Raumtemperatur über mehrere Wochen hinweg (Bagby *et al.*, 2001).

Diese hohen Anforderungen machen die Probenherstellung mittlerweile zu einer oft entscheidenden Hürde bei der Strukturaufklärung mit NMR–Spektroskopie.

In dieser Arbeit wurden verschiedene virale, pro– und eukaryotische Proteine kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt, um sie in späteren NMR–spektroskopischen Untersuchungen – z. T. auch isotonenmarkiert und im Komplex mit anderen Proteinen bzw. Nukleinsäuren – einsetzen zu können.

Am Beispiel der Klonierung, Expression und Reinigung des Transaktivatorproteins Tat aus dem Caprinen Arthritis–Enzephalitis Virus (CAEV–Tat) sollen kritische Schritte bei der Herstellung einer NMR–tauglichen Proteinprobe kurz dargestellt werden (Kapitel 4.1).

5. 1 NMR–Probenherstellung am Beispiel von CAEV–Tat

5.1.1 Probleme durch die eukaryotische *codon usage*

Die Notwendigkeit, auf *E. coli* als prokaryotisches Expressionssystem zurückgreifen zu müssen, um eine Isotonenmarkierung des Proteins zu ermöglichen, kollidiert häufig mit der eukaryotischen *codon usage* des zu exprimierenden Zielproteins.

Die meisten Aminosäuren werden von mehr als einem Codon kodiert und in jedem Organismus werden die 61 Aminosäuren–Codons mit unterschiedlichen Häufigkeiten verwendet. Die Codonhäufigkeit ist mit der Häufigkeit der entsprechenden tRNAs korreliert. Deshalb liegen in der Zelle nur geringe Konzentrationen an tRNAs für seltene Codons vor (Dong *et al.*, 1996). Die Häufigkeit, mit der die in einem Gen vorhandenen Codons im übrigen Genom auftreten, übt einen starken Einfluß auf die Translationseffizienz dieses Gens aus. Werden die entsprechenden Codons häufig verwendet, steht auch mehr der entsprechenden tRNA in der Zelle zu Verfügung und die Translation kann schnell fortschreiten. Entsprechend wird die Translation durch die Verwendung seltener Codons verlangsamt (Kane, 1995).

Wenn die mRNA eines heterologen Zielgens in *E. coli* überexprimiert wird, können Differenzen in der *codon usage* die Translation behindern und zu Translationsstillstand, vorzeitigem Translationsabbruch, *frameshifts* und dem Fehleinbau von Aminosäuren führen (Kurland und

Gallant, 1996).

In *E. coli* sind die am seltensten vorkommenden Codons AGA und AGG (0,12 % bzw. 0,21 % aller Codons), die zusammen für lediglich 6 % der in *E. coli* auftretenden Arginine kodieren (*Codon usage database*; <http://www.kasuzo.or.jp/codon/>). Diese Codons werden in den in *E. coli* am häufigsten exprimierten Genen zudem ganz vermieden.

Im Genom der Lentiviren werden jedoch 80 % der Arginine durch AGA und AGG kodiert. Im CAEV-tat-Gen selbst werden 13 der insgesamt 15 Arginine durch diese Codons kodiert (*Codon usage database*).

In einigen Arbeiten wurde gezeigt, daß die Proteinexpression von Genen, die über seltene Codons verfügen, durch die Koexpression der entsprechenden tRNA gesteigert werden kann (Rosenberg et al., 1993; Seidel et al., 1992). Der positive Effekt der Koexpression der von argU kodierten tRNA_{AGA/AGG} auf die Expression des menschlichen Plasminogenaktivators in *E. coli* wurde schon 1989 beschrieben (Brinkmann et al., 1989).

Deshalb wurde zur Verbesserung der Expression von CAEV-Tat in *E. coli* die tRNA_{Arg(AGA/AGG)} koexprimiert, um genügend tRNA für die Translation der Arginincodons AGG und AGA bereitzustellen (Kapitel 4.1.1).

Die Codons GGA (Glycin), CTA (Leucin) und CCC (Prolin) werden in *E. coli* in häufig exprimierten Genen nur in jeweils weniger als zwei Prozent der Fälle zur Kodierung der jeweiligen Aminosäure eingesetzt (Henaut und Danchin, 1996).

Diese und andere in *E. coli* seltene Codons wie das Arginincodon CGC, die Leucincodons CTC und CTT sowie das Prolincodon CCT wurden im CAEV-tat-Gen durch PCR-Mutagenese gegen die jeweiligen synonymen in *E. coli* häufigeren Codons ersetzt, da keine Möglichkeit zur Koexpression der entsprechenden tRNAs bestand (Abbildung 4.2).

Die Mutagenese der seltenen Codons bzw. die Koexpression der entsprechenden tRNA führten zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von CAEV-Tat, die über SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.3).

Das authentische CAEV-tat-Gen hatte zuvor – ohne Koexpression von *argU* – nur in durch Silberfärbung nachzuweisenden Mengen exprimiert werden können.

5.1.2 Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls

Expression und Reinigungsversuche über Affinitätschromatographie

Die Expression des Zielgens als Fusionsprotein bietet die Möglichkeit einer schnellen und einfachen Reinigung über Affinitätschromatographie des Fusionspartners an einen immobilisierten Liganden. Die Beschaffenheit des fusionierten Zielproteins spielt hierbei für die Etablierung des Reinigungsprotokolls nur eine untergeordnete Rolle und es kann auf standardisierte Reinigungsprotokolle zurückgegriffen werden.

Als Standardsysteme zur Expression von Proteinen werden oft die Fusion des Zielproteins mit Glutathion-S-Transferase und anschließende Reinigung über Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion bzw. die Fusion mit einem Poly-Histidin-Anhang mit einem anschließenden IMAC-Reinigungsschritt (Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie) gewählt.

Der GST-Anteil trägt zudem zur besseren Löslichkeit des Fusionsproteins bei, die Fusion mit einem His-tag ermöglicht neben der Reinigung unter nativen Bedingungen auch die Möglichkeit, in *inclusion bodies* aggregierte Proteine über einen IMAC-Schritt unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen.

Der Fusionsanteil muß zudem abspaltbar sein, da GST mit einem Molekulargewicht von 26 kDa zu groß für NMR-spektroskopische Untersuchungen ist und das Fusionsprotein über einen His-tag bei typischen NMR-Konzentrationen von ca. 1 mM oft aggregiert.

Durch geeignete Wahl der Protease-Spaltstelle sollten möglichst wenige zusätzliche Aminosäuren nach der Spaltung an CAEV-Tat verbleiben.

Zur Trennung der Spaltprodukte sollten möglichst wenige zusätzliche Chromatographie-Schritte aufgewendet werden müssen, da jeder weitere Reinigungsschritt die Ausbeute vermindert.

Das verfügbare Expressionssystem beruhte auf der Expression von CAEV-Tat als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein mit unterschiedlichen Spaltstellen (Tabelle 4.1).

Durch vom Expressionsplasmid vorgegebene seltene Codons am COOH-Terminus des GST-Anteils kam es jedoch zu einem verstärkten Translationsabbruch nach dem GST-Anteil, weshalb die Ausbeuten an vollständig translatiertem GST-CAEV-Tat-Fusionsprotein gering blieben.

Für weitere Versuche zur Expression und Reinigung von CAEV-Tat wurde mit dem Calmodulin *binding peptide* und Strep-Tag II auf Systeme zurückgegriffen, bei denen der Affinitätsanhang mit

4 kDa bzw. 7 Aminosäuren deutlich kleiner als GST ist. Im Fall von CAEV–Tat–Strep hätte sogar auf die Abtrennung des Affinitätsanhangs verzichtet werden können.

Beide Systeme erwiesen sich jedoch als untauglich, die benötigten Proteinmengen herzustellen, da die zu diesem Zeitpunkt kommerziell erhältlichen Affinitätssäulenmaterialien nicht für präparative Maßstäbe ausgelegt waren bzw. keine Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial erfolgte.

Die Expression von CAEV–Tat als Histidin–Fusionsprotein erfolgte über verschiedene Konstrukte: Ein Deka–Histidinanhang bzw. Hexahistidinanhang wurde NH₂–terminal bzw. COOH–terminal von CAEV–Tat angebracht. Die Positionierung des Affinitätsanhangs am COOH–Terminus von CAEV–Tat ermöglichte es, Abbruchprodukte bereits im ersten Reinigungsschritt zu entfernen, da diese aufgrund des vorzeitigen Abbruchs über keinen Affinitätsanhang verfügen und nicht an die Affinitätssäule binden. Die Reinigung konnte über Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen erfolgen, wobei sowohl auf Co²⁺ als auch auf Ni²⁺–Ionen basierendes Säulenmaterial eingesetzt wurde.

Zwischen Histidinanhang und CAEV–Tat wurden verschiedene Proteasespaltstellen eingebaut, um eine Abspaltung des Histidin–Tags zu ermöglichen, der für seine Aggregationsanfälligkeit bekannt ist. Die PreScission– bzw. Faktor Xa–Spaltstellen am COOH–Terminus von CAEV–Tat erwiesen sich hierbei als ungeeignet, da keine Spaltung erfolgte. Die Zugabe von Detergens zum Spaltansatz führte zu unspezifischen Spaltungsnebenreaktionen. Zur Entfernung des Detergens wäre zudem ein zusätzlicher chromatographischer Schritt notwendig gewesen.

Die Expression von CAEV–Tat als Histidin–Ubiquitininfusion erwies sich ebenfalls als ungeeignet, da zwar eine Reinigung des Fusionsproteins mit IMAC möglich war, der Ubiquitininfusionsanteil jedoch nicht durch Ubiquitinhydrolase (YUH) abzuspalten war.

YUH ist eine Cystein–Protease, die nach der Sequenz RLRGG am COOH–Terminus von Ubiquitin spaltet. Neben der Erkennungssequenz wird von dieser Protease allerdings zusätzlich die Tertiärstruktur des Ubiquitinsubstrats erkannt; ohne diese wird die Erkennungssequenz nicht gespalten (Sakamoto et al., 1999). Die Fusion mit CAEV–Tat scheint also die Ausbildung der Ubiquitin–Tertiärstruktur entscheidend behindert zu haben oder es war zur Ausbildung tertiärer Kontakte zwischen dem korrekt gefalteten Ubiquitinanteil und dem fusionierten CAEV–Tat gekommen, die eine Interaktion von Ubiquitin mit YUH verhinderten.

Da sowohl am NH₂–Terminus als auch am COOH–Terminus angebrachte Protease–Spaltstellen nicht bzw. nur bei Zugabe von Detergens zugänglich für die entsprechende Protease waren und somit keine Abspaltung des Affinitätsanhangs möglich war, wurde eine Änderung der Expressions– und Reinigungsstrategie notwendig: CAEV–Tat sollte ohne jeglichen Affinitätsanhang exprimiert

werden. Zur Reinigung von CAEV-Tat mußte daher ein Protokoll erarbeitet werden, das auf den Eigenschaften des Proteins selbst basierte.

Reinigung von CAEV-Tat ohne Fusionsanteil

CAEV-Tat verfügt über insgesamt 19 positiv geladene Aminosäuren, die gleichmäßig über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt sind, und besitzt einen theoretischen pI von 11,3. Daher erschien als erster Schritt der Reinigung Kationenaustauscherchromatographie als geeignet (Kapitel 4.1.3).

Zwei-Stufen-Reinigung über CM-Sepharose und Phenyl Sepharose (low sub)

Verschiedene Kationenaustauscherchromatographie-Säulenmaterialien wurden bei verschiedenen pH-Werten getestet werden, wobei sich ergab, daß bei pH-Werten unter 8,0 vermehrt zelluläre Proteine an das Säulenmaterial binden und so die Säulenkapazität verringern und daß bei pH-Werten über 8,0 keine Verbesserung gegenüber pH 8 mehr erzielt werden konnte.

Die Wahl des Kationentauscher-Säulenmaterials (SP Sepharose bzw. CM-Sepharose) hingegen hatte keinen Einfluß auf das Elutionsverhalten von CAEV-Tat.

Die Elution erfolgte durch steigende Salzkonzentrationen, wobei CAEV-Tat bei Salzkonzentrationen über 500 mM von der verwendeten CM-Sepharose-Säule eluierte (Abbildung 4.6).

Da noch Verunreinigungen durch andere Proteine in den CAEV-Tat enthaltenden Fraktionen vorhanden waren, mußte ein weiterer Reinigungsschritt nachgeschaltet werden.

Nach der Elution von der Kationenaustauschersäule lag CAEV-Tat in Hochsalzpuffer, daher bot sich als nächster Schritt die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an. Bei dieser Chromatographie-Methode werden Proteine nach ihrer Hydrophobizität getrennt. Die Trennung beruht auf der reversiblen Interaktion zwischen Protein und hydrophober Oberfläche des Säulenmaterials. Diese Wechselwirkung wird durch hohe Ionenstärke im Puffer begünstigt. Die Elution erfolgt durch Erniedrigung der Salzkonzentration bzw. durch einen weniger polaren Eluenten wie Isopropanol.

Das für die Reinigung eines bestimmten Proteins jeweils günstigste Säulenmaterial muß empirisch ermittelt werden. Phenyl-Sepharose (low sub) erwies sich hierbei als am geeignetsten, da CAEV-Tat sauber noch unter Niedersalzbedingungen eluierte und nicht erst durch steigende Konzentrationen Isopropanol (Abbildung 4.7). Die Elution unter Niedersalzbedingungen bot zusätzlich den Vorteil, auf einen nach der Kationenaustauscherchromatographie nötigen Entsalzungsschritt verzichten zu können.

Das auf diese Weise etablierte Protokoll erlaubte die Expression von CAEV-Tat ohne Affinitätsanhang und die Reinigung unter nativen Bedingungen über lediglich zwei Reinigungsstufen (Abbildung 4.8).

Ein-Stufen-Reinigung über Heparin-Sepharose

Im weiteren Verlauf konnte dieses Protokoll weiter verbessert werden. Durch die Wahl von Heparin-Sepharose als Säulenmaterial für den Kationenaustauscherschritt konnte eine verbesserte Trennung von CAEV-Tat von anderen basischen *E. coli*-Proteinen erzielt werden, die einen zweiten Chromatographie-Schritt überflüssig machte (Abbildung 4.9).

Immobilisiertes Heparin kann über zwei verschiedene Arten mit Proteinen interagieren: Als Affinitätsligand, z. B. mit Wachstumsfaktoren oder Antithrombin III, und als Kationenaustauscher wegen des hohen Gehalts an anionischen Sulfatgruppen, z. B. mit Nukleinsäure-bindenden Proteinen, wobei von Heparin die ähnliche polyanionische Struktur von Nukleinsäuren nachgebildet wird.

Die Ausbeute konnte durch die Vermeidung des zweiten Schrittes auf 7 mg / l Minimalmedium erhöht werden und erlaubte die Markierung mit Isotopen.

Die Identität des gereinigten Proteins wurde durch NH₂-terminale Ansequenzierung bestätigt. Mit Massenspektroskopie wurde eine dem theoretischen Molekulargewicht von CAEV-Tat ohne NH₂-terminalem Methionin entsprechende Masse ermittelt.

5.1.3 Erste strukturelle Charakterisierung von CAEV-Tat

Erste strukturelle Charakterisierungen des gereinigten Proteins wurden mittels CD-Spektroskopie und der Aufnahme eines 1D-Spektrums bzw. eines ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums durchgeführt (Kapitel 4.14).

Durch diesen Schritt sollte überprüft werden, ob CAEV-Tat unter den gewählten Meßbedingungen gefaltet vorliegt.

Das CD-Spektrum wies bereits auf eine α -helikale Sekundärstruktur des Proteins hin. Dieser Befund wurde auch durch das 1D- und das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum bestätigt, das die für α -helikale Proteine typische geringe Dispersion der Amidprotonenresonanzen und eine Hochfeldverschiebung der $\text{H}\alpha$ -Resonanzen aufweist.

5.1.4 Aggregationsprobleme

Bevor weitere strukturelle Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden konnten, mußte der Aggregationszustand des CAEV-Tat-Proteins und die Langzeitstabilität der Probe ermittelt werden.

Im Falle von CAEV-Tat resultierte eine Verdopplung der Konzentration von 400 μM auf 800 μM in einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Erneutes Rückverdünnen der Probe resultierte nicht mehr im ursprünglichen Signal-Rausch-Verhältnis, das Protein war irreversibel aggregiert. Zudem fiel die Proteinlösung bei Temperaturen über 30°C aus.

Die erforderliche Proteinkonzentration und die nötige Probenstabilität zur Aufnahme eines für die Strukturbestimmung nötigen Spektrensatzes waren also nicht gegeben.

Cysteinreste sind durch die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken oft die Ursache von Aggregation bei hohen Proteinkonzentrationen (Boehm, 1998; Kirsch et al., 1996). Durch die Mutation von oberflächenorientierten und daher zur Ausbildung intermolekularer Cysteinbrücken fähigen Cysteinen kann die Aggregationsanfälligkeit von Proteinen oft behoben werden (Schwede et al., 1999).

Da CAEV-Tat als Transaktivatorprotein der Transkription fungiert und über einen basischen Sequenzabschnitt verfügt, der als Kernlokalisationssequenz diskutiert wird, ist von der Lokalisation

des Proteins im Zellkern auszugehen. Die drei Cysteine am COOH-Terminus sollten *in vivo* also reduziert vorliegen. Dennoch kam es *in vitro* bei höheren Proteinkonzentrationen trotz der Zugabe von Reduktionsmittel im Überstand zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken und damit zur Bildung von Oligomeren. Die Cysteine kamen also als Ursache der auftretenden Aggregationsphänomene in Frage.

Daher wurden die drei Cysteine über PCR-Mutagenese gegen Serine ersetzt (Kapitel 4.1.5).

Die cysteinfreie Mutante bildete keine Oligomere und konnte im Gegensatz zur Wildtypform in ausreichend hohen Konzentrationen ohne das Auftreten von Aggregationsphänomenen in Lösung gebracht werden, weshalb für die weitere spektroskopische Charakterisierung auf diese Mutante zurückgegriffen wurde.

5.1.5 Vergleich von CAEV-Tat und CAEV-Tat-Cys⁻

Der Cystein-reiche Sequenzabschnitt ist in allen SRLV-Tat-Proteinen streng konserviert. Eine genaue Funktion konnte diesem Abschnitt zwar noch nicht zugeordnet werden, die Mutation der Cysteine zu Glycinen senkte die Transaktivierungsaktivität des CAEV-Tat-Homologen MVV-Tat aber *in vitro* auf ein Drittel des ursprünglichen Wertes. Eine Dimerisierung von zwei MVV-Tat-Molekülen über die gemeinsame Bindung von Zn²⁺ über den Cysteinreichen Sequenzabschnitt bzw. die Interaktion von MVV-Tat mit einem weiteren Protein über die Cysteinreste wurden als mögliche Funktionen dieses konservierten Sequenzabschnitts diskutiert (vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Dimerisierung des nicht zu SRLV-Tat-Proteinen homologen HIV-Tat-Proteins über die Bindung von zwei Cd²⁺ und zwei Zn²⁺-Ionen an einen cysteinreichen Sequenzabschnitt, der insgesamt 7 Cysteine umfaßt), jedoch nie experimentell überprüft (Frankel *et al.*, 1988; Carruth *et al.*, 1996). Ob die erzeugte Cystein-Serin-Mutante von CAEV-Tat noch Transaktivierungsaktivität besitzt, ist nicht bekannt.

Wegen dem hohen Maß an Ähnlichkeit der 1D-Spektren von Wildtyp-CAEV-Tat und cysteinfreiem CAEV-Tat kann allerdings davon ausgegangen werden, daß Wildtypform und cysteinfreie Mutante keine Unterschiede auf Strukturebene aufweisen.

Damit ist die cysteinfreie CAEV-Tat-Mutante bei weiteren strukturellen Untersuchungen ein geeignetes Modellsystem für das schwerer zugängliche Wildtyp-Protein.

Von Morse *et al.* konnte der ebenfalls konservierte Leucin-reiche Sequenzabschnitt von MVV-Tat als für die Bindung an die Wirtsproteine Jun und Fos verantwortlicher Bereich ermittelt werden (Morse *et al.*, 1996). Der cysteinreiche Abschnitt am COOH-Terminus konnte deletiert werden, ohne die Interaktion von MVV-Tat mit den beiden zellulären Proteinen zu beeinträchtigen. Für spätere Untersuchungen zur Interaktion von CAEV-Tat mit den Proteinen Jun und Fos wäre also auch die Verwendung der Cysteinfreien Mutante denkbar.

5.1.6 Ausblick

In den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren traten z. T. überlappende Resonanzen und Unterschiede in der Intensität der Resonanzen auf.

Dies sind Hinweise auf das Vorliegen einer konformationell heterogenen Probe. Ursache könnten dynamische Prozesse auf der intermediären Zeitskala sein, die zur Verbreiterung zum Verschwinden der NMR-Signale führen. Scharfe Linien rühren von Bereichen des Proteins mit hoher Flexibilität her. Durch Optimieren der Lösungsmittelbedingungen z. B. Zugabe von Na_2SO_4 oder Glycin können diese Art von Spektren in manchen Fällen verbessert werden (Boehm, 1999).

Virale Proteine zeichnen sich häufig durch eine erhöhte Flexibilität aus, da sie oft – durch die limitierten Größe des lentiviralen Genoms bedingt – mehrere Aktivitäten durch Wechselwirkung mit jeweils verschiedenen Kofaktoren zu erfüllen haben, was eine nicht zu starre Struktur voraussetzt. Auch im Fall von CAEV-Tat kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer – für das homologe MVV-Tat nachgewiesenen – Interaktion mit mehreren zellulären Proteinen (Jun, Fos und TBP) ausgegangen werden (Morse *et al.*, 1999).

Die bei Ligandenbindung auftretende Stabilisierung führt oft zu Verbesserungen der NMR-Spektren solcher Proteine (Bagby *et al.*, 2001). Ob dies auch im Falle von CAEV-Tat zutrifft, werden Studien zur Bindung von Jun und Fos zeigen.

Die Notwendigkeit der Anpassung der *Codon usage*, die Etablierung eines nicht auf Affinitätschromatographie basierenden individuellen Reinigungsprotokolls und die durch Mutation der Cysteine behobene Aggregationsanfälligkeit zeigen, welche Komplikationen bei der Herstellung einer für NMR-Spektroskopische Untersuchungen tauglichen Probe auftreten können. Individuelle Anpassungen der einzelnen Ablaufschritte der Probenherstellung sind jedoch unumgänglich, wenn

die Aufklärung einer ganz bestimmten Proteinstruktur anvisiert wird und nicht – im Sinne einer *structure factory* – nur die der mit Standardverfahren zu erhaltenden Proteine.

In einer kürzlich durchgeführten Studie wurden insgesamt 512 Proteine unter 23 kDa aus fünf verschiedenen Organismen auf ihre Eignung für eine spätere Strukturaufklärung mittels NMR getestet (Yee *et al.*, 2002). Hierzu wurden diese unter der Verwendung standardisierter Protokolle kloniert, in *E. coli* exprimiert, über Affinitätschromatographie gereinigt, isotopenmarkiert und ersten NMR-spektroskopischen Analysen unterzogen. Hierbei ergaben sich je nach Herkunft des Proteins große Differenzen: Bei einer Herkunft aus *E. coli* konnten von einem Drittel der überhaupt exprimierbaren und löslichen Proteine verwertbare Spektren erhalten werden, bei Proteinen aus dem Myxoma Virus lediglich noch von acht Prozent. Dies wurde von den Autoren auf die Tatsache zurückgeführt, daß die meisten viralen Proteine mit – teilweise mehreren verschiedenen – Wirtsproteinen interagieren müssen und ohne Wechselwirkungspartner nur wenig stabil sind.

Auch die Struktur von CAEV-Tat wird vermutlich erst im Komplex mit zellulären Wirtsfaktoren stabil ausgebildet.

5.2 Klonierung von jun, fos, junbZIP und fosbZIP

Die Arbeiten von Morse *et al.* (1999) hatten gezeigt, daß der Leucinreiche Sequenzabschnitt, der zwischen CAEV und MVV-Tat konserviert ist, für die Interaktion mit Jun und Fos verantwortlich ist. Daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, daß auch CAEV-Tat über diesen Sequenzabschnitt mit Jun und Fos wechselwirken kann.

Für spätere Untersuchungen der Interaktion von CAEV-Tat mit den Wirtsproteinen Jun und Fos war es zunächst nötig, die entsprechenden Gene für diese Proteine zu beschaffen.

5.2.1 Wahl der Konstrukte

Auf Seiten von Jun und Fos wurden Hinweise darauf gefunden, daß die basischen und die Leucin-Zipper-Domänen der beiden Proteine für die Interaktion verantwortlich sein könnten. Daher wurden neben dem gesamten Jun- und dem gesamten Fos-Protein auch die jeweilige basische und

Leucin-Zipper-Domäne aus Jun und Fos kloniert. Als Grundlage dienten die Proteinsequenzen der entsprechenden humanen Proteine (Kapitel 4.2.1).

Die Sequenzen von c-Jun und c-Fos aus Ziege oder Schaf sind bisher nicht bzw. nicht vollständig bekannt. Auch in den Arbeiten zur Interaktion von MVV-Tat mit Jun und Fos wurde nicht mit den Proteinen aus Schaf gearbeitet, sondern es wurde auf die entsprechenden Proteine aus der Ratte bzw. dem Menschen zurückgegriffen (Morse *et al.*, 1999).

Der bisher sequenzierte Bereich des c-*jun*-Gens aus dem Schaf entspricht auf Proteinebene der Region 30 bis 79 der NH₂-terminalen Aktivierungsdomäne des humanen c-Jun-Proteins und ist in diesem Bereich vollständig identisch zu dem humanen Protein (Robertson *et al.*, 1998). Die COOH-terminale Aktivierungsdomäne von c-Fos besitzt zwar in 12 Positionen abweichende Aminosäuren zu der humanen Fos-Sequenz. Der Bereich der Leucin-Zipper-Domäne von c-Fos, auf der die Interaktion zwischen MVV-Tat und Fos beruht, ist hingegen vollständig zwischen Schaf und Mensch konserviert (Dolan *et al.*, 2000).

5.2.2 Verwendung von I.M.A.G.E.-Klonen

Durch eine Suche mit den entsprechenden Proteinsequenzen in der dbEST-Datenbank wurde eine Reihe von c-DNA-Klonen ermittelt, die die entsprechenden Nukleotidsequenzen bzw. Teile davon aufwiesen. Diese Klone wurden über das I.M.A.G.E. Consortium beschafft (Lennon *et al.*, 1996). Bei dem I.M.A.G.E. Consortium (*Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*) handelt es sich um eine *nonprofit*-Organisation, die über cDNA-Bibliotheken für Mensch, Ratte, Zebrafisch, Xenopus und Rhesusaffe verfügt. Die Informationen über die Klone (Sequenz, Vektorinformationen, Expressionsdaten) sind öffentlich zugänglich, und gegen einen Unkostenbeitrag können die entsprechenden Klone bezogen werden.

Da keine vollständige *jun*- bzw. *fos*-Sequenz verfügbar war, wurden Teilabschnitte umfassende cDNA-Klone beschafft. Durch PCR mit Linkerprimern wurden fehlende Abschnitte ergänzt und die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Über SOE-PCR bzw. durch Ligation der Fragmente wurden vollständige *jun*- bzw. *fos*-Sequenzen generiert.

Die Qualität der erhaltenen Klone war z. T. unbefriedigend: aus einem für die Klonierung von c-*fos* bezogenen Klone ließ sich keine Vektor-DNA gewinnen. Daher mußten zwei andere Klone

nachbestellt werden, die den entsprechenden fos-Sequenzabschnitt ebenfalls umfaßten. Trotz der hinterlegten identischen Nukleotidsequenz der beiden nachbestellten Klone konnte nur ein Klon erfolgreich als Matrize in der PCR eingesetzt werden.

Aus einem weiteren I.M.A.G.E.-Klon, der die bZIP-Domäne von Fos umfassen sollte, konnte ebenfalls kein PCR-Amplifikat aus der isolierten Vektor-DNA erhalten werden. Die bZIP-Domäne wurde deshalb – nach der erfolgreichen Klonierung des gesamten *c-fos*-Gens – aus diesem amplifiziert (Kapitel 4.2.2). Mit den übrigen Klonen traten keine Probleme auf.

Für die Übereinstimmung mit der hinterlegten EST-Sequenz der entsprechenden Klone wird keine Garantie durch das I.M.A.G.E. Consortium bzw. dessen Verteilerorganisationen (z.B. RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) übernommen, ebensowenig für die Isolierbarkeit der Vektor-DNA. Eine Liste mit 'problematischen' Klonen auf der Basis von Kundeneinträgen steht zwar zur Verfügung, die Vollständigkeit dieser Liste kann allerdings nicht gewährleistet werden.

Dies macht es notwendig, auf der Basis möglichst vieler I.M.A.G.E.-Klone zu starten, da es – wie dargestellt – durch evtl. fehlerhafte Sequenzen oder Plasmidverlust – im Einzelfall zu erheblichen Problemen bei der Klonierung kommen kann.

Die so generierten Nukleotidsequenzen für *c-Fos* und *c-Jun* konnten als Matrize für die Klonierung von *JunbZIP* (222–331) und *FosbZIP* (129–212) über PCR-Amplifikation eingesetzt werden.

5.2.3 Expression und Reinigung

Zur Expression der Konstrukte sollten möglichst verschiedene Expressionssysteme herangezogen werden können, um – falls ein gewähltes Expressionssystem sich als nicht geeignet erweisen sollte – langwieriges Umklonieren in ein neues Expressionsplasmid zu vermeiden. Daher wurden *jun*, *fos*, *junbZIP* und *fosbZIP* zunächst jeweils in einen pBlueskript-Vektor kloniert. Durch das Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende der Nukleotidsequenzen besteht die Möglichkeit, die Gene in verschiedene Expressionsplasmide zu subklonieren. Auf diese Weise kann das Expressionssystem bei Bedarf ohne langwieriges Neuklonieren des Konstrukts schnell gewechselt werden.

Für das die basische und die Leucin-Zipper-Domäne umfassende *junbZIP* konnte bereits ein Expressions- und Reinigungsprotokoll etabliert werden (Kapitel 4.3.2). JunbZIP wird hierbei als GST-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt. Nach der Abspaltung des GST-Fusionsanteils mit PreScission-Protease wurde der Spaltansatz über eine Heparin-Säule getrennt. JunbZIP als Nukleinsäure-bindende Proteindomäne bleibt hierbei am längsten an die Heparinsäule gebunden.

Die eukaryotische *codon usage* machte es – wie schon bei CAEV-Tat – erforderlich, seltene tRNAs koexprimieren. Dies wurde durch die Verwendung des kommerziellen *E. coli* Wirtsstamms RosettaTM ermöglicht, der plasmidal tRNAs für die seltenen Codons CTA (Leucin; 12 %), CCC (Prolin; 4 %), ATA (Isoleucin; 7 %), AGA und AGG (Arginin; 4 bzw. 2 %) und GGA (Glycin; 11 %) kodiert. Die Expression eines Plaminogenaktivatorfragments in *E. coli* konnte durch die Verwendung des Rosetta-Stammes gegenüber der Expression in einem herkömmlichen *E. coli* BL 21 (DE3) deutlich gesteigert werden (Novy et al., 2001).

Die Verwendung dieses Stammes erübrigte die sonst nötige Anpassung der in *E. coli* seltenen Codons durch langwierige Mutagenese.

5.3 Gensynthese am Beispiel von HK022 Nun

Ein Gen für HK022 Nun-Protein stand nicht zur Verfügung und konnte weder über Kooperationspartner noch über Institutionen wie das I.M.A.G.E. Consortium beschafft werden. Als letzte Alternative blieb die Gensynthese (Kapitel 4.4).

Gegenüber der Verwendung von authentischen Genen aus genomischen Bibliotheken bzw. von Kooperationspartnern bietet die Gensynthese einige Vorteile:

Gezielt können wirtsspezifisch bevorzugte Codons eingesetzt und seltene Codons vermieden werden, was zur Steigerung der Expressionseffizienz beiträgt und die Koexpression von tRNAs unnötig macht (Kapitel 4.4.1).

Zudem können gezielt Veränderungen an der Gensequenz vorgenommen werden, z. B. das Herausschneiden von Domänen etc.

Durch den gezielten Einbau von Restriktionsschnittstellen können spätere Klonierungsschritte z. B. durch Kassettensubstitution ermöglicht werden.

Zur Herstellung eines synthetischen Gens gibt es verschiedene Verfahren. Diese basieren entweder auf der enzymatischen Ligation von Duplex-DNA-Fragmenten, die durch Hybridisieren von komplementären Oligonukleotiden erhalten wurden, oder auf teilweise überlappenden Oligonukleotiden, wobei die fehlenden Bereiche durch DNA-Polymerase aufgefüllt werden.

Durch die Einführung der PCR sind aus diesen beiden Grundprotokollen eine Vielzahl weiterer Methoden entstanden (Casimiro *et al.*, 1997).

Bei einer modifizierten Methode nach Kim (Kim *et al.*, 1989) wird die Gensequenz (Strang und Gegenstrang) komplett durch Oligonukleotide nachgebildet. Nachdem Annealen der komplementären Oligonukleotide werden die Oligonukleotide durch Ligation miteinander verknüpft und das entstandene Produkt wird über kurze flankierende Primer mittels PCR amplifiziert.

Die Methode der sog. rekursiven PCR (Prodromou und Pearl, 1992) verwendet lange, teilweise überlappende Oligonukleotide, deren Sequenzen abwechselnd denen des kodierenden bzw. des nicht-kodierenden Strangs entsprechen. Im ersten PCR-Zyklus werden aus jedem Paar benachbarter Oligonukleotide Duplexe gebildet. Diese Duplexe werden in den folgenden Zyklen weiter verlängert, was schließlich zum Entstehen des kompletten Gens führt. Das entstandene Produkt wird amplifiziert, indem im Überschuß kurze flankierende Primer zugegeben werden und eine herkömmliche PCR durchgeführt wird.

Diese Methode bietet den Vorteil, daß nur die Hälfte der Nukleotidsequenz des zu synthetisierenden Gens durch Oligonukleotide abgedeckt werden muß, was die Kosten für ein synthetisches Gen gegenüber der Verwendung der Methode nach Kim erheblich reduziert.

5.3.1 Synthese mittels rekursiver PCR

Daher wurde zur Synthese des *nun*-Gens zunächst die rekursive PCR eingesetzt (Kapitel 4.4.2). Zwar konnte nach einigen Veränderungen des ursprünglichen Protokolls ein Amplifikat der gewünschten Gengröße erhalten und in einen pBlueskript-Vektor inseriert werden, die Sequenzierung ergab jedoch, daß kein Konstrukt die vollständig korrekte *nun*-Sequenz besaß. Die am besten übereinstimmende Sequenz wies insgesamt 11 frameshift-Mutationen und zwei Punktmutationen auf.

Zur Amplifikation war *Vent*-DNA-Polymerase eingesetzt worden, die durch die 3'→5' proofreading Aktivität nur eine Fehlerrate von ca. 10^{-5} pro Base besitzt. Die Häufigkeit des Fehleinbaus neben der Fehlerrate der DNA-Polymerase auch von der Anzahl der PCR Zyklen und der Länge des PCR-Produkts abhängig. Durch die notwendige Erhöhung der Zyklenzahl konnte es trotz der Genauigkeit der eingesetzten DNA-Polymerase zu verstärktem Fehleinbau von Nukleotiden kommen. Die *frameshift*-Mutationen sind wahrscheinlich durch nicht korrektes Annealen der überlappenden Oligonukleotide entstanden.

Bei der mittels rekursiver PCR durchgeführten Synthese des Rusticyanin-Gens, das 500 bp groß ist, wurden insgesamt 22 Klone sequenziert, die alle nicht die korrekte Sequenz aufwiesen (Prytulla *et al.*, 1996). Aus zweien konnte allerdings durch aufwendige PCR-Mutagenese-Techniken ein korrektes Gen konstruiert werden. Über ähnlich schlechte Ausbeuten an korrekten Gensequenzen bei Anwendung der rekursiven PCR berichten auch andere Arbeitsgruppen (Johnson *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2000; Baedeker und Schulz, 1999).

Eine Möglichkeit zur Reparatur auf der Basis der bereits sequenzierten Klone wäre äußerst aufwendig gewesen und schied aus. Eine Optimierung der Annealing-Temperatur und der Zyklenzahl zur Verbesserung der Methode erschien ebenfalls zu aufwendig: Der Erfolg der angewandten Variationen hätte erst durch – weitere teure – Sequenzierungen der erhaltenen Produkte ermittelt werden können.

5.3.2 Synthese nach Kim

Stattdessen wurde auf die Methode nach Kim *et al.* (1989) zurückgegriffen, die sich als robuster und wesentlich weniger fehlerbehaftet erwies (Kapitel 4.4.3).

Für noch nicht durch Oligonukleotide abgedeckten Bereiche der *nun*-Sequenz wurden zusätzliche Oligonukleotide eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden annealt und ligiert und über PCR amplifiziert. Bei Anwendung dieser Methode traten deutlich weniger Mutationen auf. Aus zwei nicht vollständig korrekten *nun*-Genen konnte durch Restriktion mit beim Gendesign zusätzlich eingeführten Restriktionsschnittstellen und anschließende Ligation der Fragmente ein vollständig korrektes *nun*-Gen erhalten werden.

Die Methode bot zusätzlich die Möglichkeit zur Anwendung eines Temperaturgradienten während der Annealing-Reaktion, so daß die jeweils optimale Temperatur für die Annäherung der Oligonukleotide sicher erfaßt werden konnte.

Die vorgestellte Methode wurde inzwischen auch für die Synthese eines synthetischen N(1–53)-Gens eingesetzt. Hierbei wiesen 60 % der sequenzierten Klone bereits die korrekte Sequenz auf. Als wesentliche Änderung zur Synthese des *nun*-Gens wurde hier auf Oligonukleotide mit ähnlicher Länge und ähnlicher Schmelztemperatur zurückgegriffen. Bei der Synthese des *nun*-Gens war dies nicht möglich, da durch die Weiterverwendung des für die rekursive PCR entworfenen Oligonukleotidensembles bei der Synthese nach Kim die zusätzlich nötigen Oligonukleotide bereits vorgegeben waren und nicht den optimalen Voraussetzungen für die Kim-Methode entsprachen.

5.3.3 Expression und Reinigung von HK022 Nun

Das Nun-Protein konnte weitgehend nach dem für CAEV-Tat entwickelten Protokoll exprimiert und gereinigt werden (Kapitel 4.4.4), da beide Proteine – trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen – eine wesentliche Gemeinsamkeiten besitzen: Beide besitzen einen hohen pI und können daher über Kationenaustauscherchromatographie gereinigt werden. Auch für Nun bot sich die Anwendung von Heparinsepharose als Säulenmaterial an, da Nun mit dem ARM über eine RNA-Bindungsdomäne verfügt, die unspezifisch an Heparin binden kann.

5.3.4 Erste spektroskopische Charakterisierung von HK022 Nun

HK022 Nun zeigt sowohl bei pH 4,6 (Daten nicht gezeigt) und bei pH 5,8 (Abbildung 4.27) ein typisches *random coil* CD-Spektrum mit einem Minimum bei 198 nm und liefert keine Hinweise auf das Vorhandensein regulärer Sekundärstrukturelemente. Ein ähnliches Spektrum war auch bereits für ein das ARM umfassenden Nun-Peptid erhalten worden (Becker, 2001).

Der aus den NMR-Diffusionsmessungen (Abbildung 4.29) bei pH 4,6 ermittelte hydrodynamische Radius von 24,1 Å liegt über dem theoretisch für ein gefaltetes Protein mit 112 Aminosäuren erwarteten Wert von 18,7 Å (Wilkins et al., 1999). Dies kann in einer nicht globulären Form des HK022 Nun-Proteins begründet liegen, könnte aber auch einen Hinweis darauf geben, daß Nun nicht über eine stabile, kompakte Tertiärstruktur verfügt.

Auch das HSQC-Spektrum (Abbildung 4.28) bei pH 5,8 weist aufgrund der äußerst geringen Dispersion und der Linienschärfe eher darauf hin, daß es sich bei Nun größtenteils um ein ungefaltetes Protein handelt.

Ähnliche Befunde für das freie Nun-Protein waren bereits von Chattopadhyay *et al.* (1995) erhalten worden. Chattopadhyay *et al.* (1995) fanden zudem Hinweise auf die Ausbildung einer kompakteren Struktur der NH₂-terminalen Nun-Domäne nach der Bindung an die *nutboxB*-RNA. Diese Nun-Region wurde durch *nutboxB*-RNA in Trypsin-Verdau-Experimenten geschützt.

In einem das ARM der NH₂-terminalen Domäne umfassenden Nun-Peptid wurde bei der Bindung an *nutboxB*-RNA eine α -helikale Sekundärstruktur induziert (Becker, 2001). Auch in der Komplexstruktur mit *nutboxB*-RNA weist das Nun-Peptid die Form einer gebogenen α -Helix auf (Faber *et al.*, 2001).

5.3.5 Ausblick

Für weitergehende NMR-spektroskopische Untersuchung mit dem gesamten HK022 Nun-Protein bzw. zusammen mit der *nutboxB*-RNA ist die Löslichkeit von ca. 100 μ M des Proteins in dem für die RNA erforderlichen Puffer mit pH6,8 zu gering. Gegenwärtig wird versucht, die Lösungsmittelbedingungen für HK022 Nun zu optimieren.

Im Fall des homologen N-Proteins aus dem Phagen λ war es nicht möglich, eine für eine Strukturbestimmung des gesamten Proteins im Komplex mit der *nutboxB*-RNA taugliche NMR-Probe herzustellen (Schärf, 2000). Hierzu mußte schließlich auf ein 36 Aminosäuren großes N-Fragment zurückgegriffen werden.

Auch im Fall von HK022 Nun könnte der Rückgriff auf verkürzte Peptidfragmente nötig werden. Einige Nun-Peptide konnten bereits – unter Verwendung des synthetischen *nun*-Gens – kloniert und schon erfolgreich als Ubiquitininfusion exprimiert werden.

Einfache Titrationsexperimente mit *nutboxB*-RNA, Zn²⁺ bzw. *E. coli* NusA sind allerdings schon bei den gegenwärtigen Konzentrationen von HK022 Nun möglich. Die so erhaltenen Spektren könnten Hinweise auf die Bindung von *nutboxB*-RNA an Nun in Gegenwart von Zn²⁺-Ionen bzw. NusA liefern und so die Modellvorstellung von Watnick und Gottesman (1998) überprüfen.

5.4 Klonierung, Expression und Reinigung von λ N (1–53)

Für erste strukturelle Charakterisierungen der Interaktion zwischen dem binären Komplex aus λ N–Protein und *nutboxB* mit NusA mußte zunächst ein neues Konstrukt von λ N kloniert, exprimiert und gereinigt werden (Kapitel 4.6). Die Etablierung eines Expressionssystem für N war notwendig, um die für die Komplexstudien notwendige Isotopenmarkierung möglich zu machen. Ein Rückgriff auf ein synthetisches N–Peptid war nicht sinnvoll, da die chemische Herstellung eines mit Isotopen angereicherten Peptids sehr teuer bzw. nicht für alle Aminosäuren möglich ist.

5.4.1 Wahl des Konstrukts

Aus früheren Arbeiten (Legault *et al.*, 1998; Schärpf, 2000; Schärpf *et al.*, 2000) war bereits bekannt, daß λ N (1–107) bei Konzentrationen über 300 μ M aggregiert. Deshalb war für die Strukturbestimmung des binären Komplexes aus λ N und *nutboxB*–RNA auf das verkürzte λ N–Fragment 1–36 zurückgegriffen worden, das das *nutboxB*–bindende argininreiche Motiv umfaßt. Die Erweiterung des Komplexes um das NusA–Protein machte es erforderlich, auf ein neues längeres λ N–Peptid zurückzugreifen, das zusätzlich zur *nutboxB*–Bindungsregion den NusA–bindenden Sequenzabschnitt zwischen Asparagin 34 und Arginin 47 umfaßt. Da auch für die Reste 48 bis 51 von λ N eine Zugehörigkeit zur NusA–Bindungsregion diskutiert wird, wurde ein längeres Konstrukt gewählt, das die Aminosäuren 1 bis 53 des λ N–Protein umfaßt. Ein λ N–Peptid mit ähnlicher Größe (1–47) wurde bereits von Legault *et al.* (1998) als in Konzentrationen von 900 μ M löslich und für NMR–Spektroskopie geeignet beschrieben.

5.4.2 Expression mit dem Ubiquitinsystem

Die Expression als Ubiquitininfusion erschien aus mehreren Gründen sinnvoll (Kapitel 4.6.1):

- Auch bei einer Expression des Fusionsproteins als *inclusion bodies* hätte ein Zellaufschluß und eine Reinigung noch über IMAC unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden können.
- Die Abspaltung des Ubiquitininfusionsanteils mit der Ubiquitin–Hydrolase hinterläßt keine

zusätzlichen Aminosäuren am NH₂-Terminus von N (1–53) und kann zudem selbst kostengünstig hergestellt werden.

– Zudem wird durch die Verwendung eines *high copy* Plasmids die Expression des Ubiquitininfusionsproteins gesteigert.

Das Auftreten von Abbruchfragmenten aufgrund einiger in *E. coli* seltenen Codons reduzierte jedoch die Ausbeuten des Systems (Kapitel 4.6.3).

Koexpression von in *E. coli* seltenen tRNAs durch die Verwendung des *E. coli* Stammes Rosetta (DE3) führte nicht zu einer Verringerung der Abbruchfragmente. Die von einem Plasmid mit geringer Kopienzahl kodierte tRNAs sind vermutlich nicht ausreichend für eine vollständige Versorgung des Transkriptionsapparates bei der Transkription eines Plasmids mit hoher Kopienzahl.

Durch die Synthese eines N-Gens mit für *E. coli* optimierten Codons konnte die Expression von vollständigem Ubiquitin-N (1–53)-Fusionsprotein inzwischen verbessert werden.

5.5 Klonierung, Expression und Reinigung von *E. coli* NusA (1–495)

Für die Interaktion von NusA mit dem N-Protein sind Bereiche der COOH-terminalen Domäne von NusA verantwortlich (Mah et al., 1999; Mah et al., 2000)

NusA interagiert nicht mit der *nut*-RNA allein, sondern erst nach der Bindung des N-Proteins an die RNA. In Deletionsstudien (Mah et al., 1999) wurden die Bereiche 132 bis 416 als notwendig für die Bindung von NusA an einen N-*nut*-Komplex ermittelt. Dieser Bereich schließt die S1-Domäne, die KH1 und die KH2-Domäne und Teile der COOH-terminalen Domäne mit ein. Ob die Interaktion von NusA mit der *nut*-RNA über die *nutboxB* oder über die *nutboxA*-RNA vonstatten geht oder über beide RNA-Motive und welche der aufgeführten Domänen des NusA-Proteins für diese beiden möglichen Wechselwirkungen verantwortlich sind, ist unklar.

Zwar ist aus Homologie-Überlegungen und durch *in vitro*-Experimente bekannt, daß die S1-Domäne aus NusA die *boxA* der *nut*-RNA binden kann, ob diese Bindung jedoch *in vivo*

tatsächlich stattfindet, ist noch umstritten, da auch für die Nus-Faktoren B, E und G eine Bindung an die – lediglich 12 bp große – nutboxA-RNA diskutiert wird (Mogridge und Greenblatt, 1998). Die Nukleotide A7 und A9 der nutboxB-RNA sind in Mutationsstudien als essentiell für die Interaktion mit NusA ermittelt worden (Chattopadhyay *et al.*, 1995; Mogridge *et al.*, 1999). A9, das aus dem GAAA-Tetraloop ausgeklappte Nukleotid, kann hierbei deletiert oder mutiert werden, ohne daß die Bindung des N-Proteins an die nutboxB-RNA beeinträchtigt wird (Legault *et al.*, 1998). Eine Bindung von NusA hingegen kann in beiden Fällen nicht mehr stattfinden. Welcher Abschnitt von NusA an dieser Wechselwirkung mit der nutboxB-RNA beteiligt ist, ist nicht bekannt.

Für eine Untersuchung der Interaktionen zwischen nutboxB allein, λ N-Protein und NusA-Protein hätte man also lediglich NusA um die NH₂-terminale Domäne verkürzen können, für alle anderen Domänen ist entweder eine Interaktion mit λ N (COOH-terminale Domäne) nachgewiesen bzw. eine Beteiligung an der Bindung der nut-RNA nicht auszuschließen (S1, KH1, KH2, COOH-terminale Domäne). Zudem ist aus den Kristallstrukturen der homologen NusA-Proteine aus *T. maritima* und *M. tuberculosis* ersichtlich, daß die S1- und die beiden KH-Domänen durch mehrere – auch in *E. coli* NusA konservierte – Reste in den Domänen *interfaces* starr miteinander verbunden sind. Bei einer Trennung der S1 und der KH-Domänen wäre die strukturelle Integrität der Einzeldomänen nicht mehr zu gewährleisten gewesen: Ein *E. coli* NusA-Konstrukt, das die NH₂-terminale Domäne und lediglich die S1-Domäne umfaßt, hatte sich in NMR-spektroskopischen Untersuchung als ungefaltet erwiesen (Mah *et al.*, 1999).

Die Verkürzung um die NH₂-terminale Domäne mit 136 Aminosäuren erschien nicht sinnvoll, da auch das dann 359 Aminosäuren große Fragment nicht für eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie zugänglich gewesen wäre.

Daher wurde zunächst das gesamte NusA-Protein eingesetzt, um festzustellen, ob es zu einer Interaktion von NusA mit einem Komplex aus I N (1–53) und nutboxB-RNA kommt und ob diese für weitergehende Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie geeignet ist.

5.5.2 Expressions- und Reinigungsprotokoll für NusA

Klonierung, Expression und Reinigung von *E. coli* NusA gestalteten sich – aus mehreren Gründen – relativ einfach (Kapitel 4.5):

Die Nukleotidsequenz von *E. coli* NusA ist im kommerziell erhältlichen Plasmid pET 43a (Novagen) enthalten und konnte durch PCR mit Linkerprimern amplifiziert und in einen geeigneteren Vektor umgesetzt werden (Kapitel 4.5.2).

Es konnte von einer äußerst hohen Löslichkeit von NusA ausgegangen werden:

Der eigentliche Zweck des Plasmides pET 43a ist die Expression schwer löslicher Proteine als Fusion mit NusA (Harrison, 2000). Auf der Basis eines statistischen Modells für Löslichkeit in *E. coli* wurden ca. 4000 *E. coli* Proteinsequenzen untersucht. Proteine mit einer hohen Löslichkeitswahrscheinlichkeit, die zusätzlich stabil in *E. coli* exprimiert werden und aus mehr als 100 Aminosäuren bestehen, wurden als Fusionsprotein mit verschiedenen unlöslichen Proteinen exprimiert. Die Fusion mit NusA erwies sich hierbei am effektivsten, da NusA zusätzlich zu der Steigerung der Löslichkeit der bislang nur als inclusion bodies in *E. coli* zu exprimierenden Fusionsproteine noch eine erhöhte Expressionsrate dieser Proteine bewirkte (Davies et al., 1998).

Mehrere verschiedene Reinigungsprotokolle für NusA bzw. NusA-Fragmente sind bereits beschrieben, u.a. als GST-Fusion oder mit His-tag und konnten für die Planung des Expressionssystems herangezogen werden (Mah et al., 1999; Mah et al., 2000).

Die Kristallstrukturen der homologen NusA-Proteine aus *T. maritima* und *M. tuberculosis* lieferten Hinweise auf die exponierte Lage und gute Zugänglichkeit des NH₂-Terminus von NusA (Abbildung 1.10), worauf der NH₂-Terminus zur Positionierung der PreScission-Spaltstelle ausgewählt wurde (Worbs et al., 2001; Gopal et al., 2001).

Die Reinigung (Kapitel 3.5.3) erfolgte durch Affinitätschromatographie an Nickel-Chelating-Sepharose, anschließende Abspaltung des His-tags mit PreScission-Protease und einen zweiten IMAC-Schritt. Die mit GST fusionierte Protease konnte durch Affinintätschromatographie an immobilisiertem Glutathion aus dem Spaltansatz entfernt werden.

5.6 Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der Bindung von *E. coli* NusA (1–495) an den N–nutboxB-Komplex

NusA ist mit einer Größe von 55 kDa nicht selbst für NMR-Spektroskopie geeignet. Daher können lediglich die Auswirkungen der Zugabe von NusA zu einem N–nutboxB-Komplex untersucht werden und nicht die Auswirkungen auf die NusA-Struktur.

Hierzu wurde ein binärer Komplex aus ^{15}N -markiertem λ N (1–53) und unmarkierter *nutboxB*-RNA hergestellt.

5.6.1 Vergleich der binären Komplexe N(1–36)–*nutboxB* und N(1–53)–*nutboxB*

Für die Bildung des binären Komplexes mit *nutboxB*-RNA sind die Reste 1 bis 22 des λ N-Proteins, die das ARM umfassen, ausreichend. Bei Bindung an die *nutboxB*-RNA kommt es zur Ausbildung einer α -helikalen Sekundärstruktur in diesem Bereich des N-Proteins, die übrigen Teile des λ N-Proteins werden durch die RNA-Bindung nicht beeinträchtigt und bleiben unstrukturiert. Dies konnte durch den Vergleich der HSQC-Spektren mehrerer verschieden langer ^{15}N markierter λ N-Fragmente allein und im Komplex mit *nutboxB* nachgewiesen werden (Mogridge *et al.*, 1998).

Im Komplex zwischen λ N (1–36) und *nutboxB*-RNA waren ebenfalls nur die Reste bis Alanin 20 an der RNA-Bindung beteiligt und bildeten eine α -Helix im Komplex aus. Die übrigen Reste blieben unstrukturiert (Schärpf *et al.*, 2000).

Die Überlagerung des für λ N (1–53) erhaltenen HSQC-Spektrums mit einem HSQC-Spektrum des Komplexes aus λ N (1–36) und *nutboxB*-RNA ist für die beiden Peptiden gemeinsamen Reste deckungsgleich (Abbildung 4.4.2). Daher kann davon ausgegangen werden, daß auch λ N (1–53) einen Komplex mit *nutboxB*-RNA bildet und die gleichen Reste wie im kürzeren Peptid von der

Interaktion mit *nutboxB*-RNA betroffen sind.

Auch die Effekte der Bindung von λ N (1–53) auf die *nutboxB*-RNA-Struktur entsprechen den für die Bindung des kürzeren λ N (1–36) an die RNA beobachteten: Die 1D-NMR-Spektren im Iminoprotonenbereich der beiden Komplexe sind ebenfalls deckungsgleich. Das zusätzliche Auftreten des Iminoproteins von U5 läßt sich durch die Stabilisierung des apikalen U5–A11 Basenpaares nach der Bindung an λ N erklären, das Auftreten einer zusätzlichen Resonanz für das Iminoproton des G6 bei extremer Hochfeldverschiebung ist typisch für die Ausbildung von G–A Basenpaaren (*sheared basepairs*), wie sie im GNRA-Tetraloop beobachtet werden.

Es kann also davon ausgegangen werden, daß N (1–53) ebenfalls einen Komplex mit *nutboxB*-RNA ausbildet und das dieser strukturell dem Komplex aus N (1–36)–*nutboxB* entspricht. Die zusätzlich im längeren N-Peptid vorhandenen Aminosäuren liegen vermutlich unstrukturiert vor. Um diese Frage endgültig zu klären, wäre eine Strukturaufklärung des binären Komplexes nötig.

5.6.2 Vergleich zwischen N(1–53)–*nutboxB* und N(1–53)–*nutboxB*–NusA

Zu dem binären Komplex wurde unmarkiertes, gefaltetes *E. coli* NusA-Protein (1–495) gegeben. Im erhaltenen HSQC-Spektrum waren mehrere Effekte zu beobachten (Abbildung 4.43 bzw. 4.44):

- Exponierte Resonanzen, die über den Vergleich mit den für den λ N(1–36)–*nutboxB* erhaltenen Spektren eindeutig Amidprotonen der für die *nutboxB*-Bindung ausreichenden ARM-Domäne zugeordnet werden konnten, erfuhren keine Veränderung bei der Zugabe von NusA
- einige der im HSQC-Spektrum von λ N(1–53)–*nutboxB* gegenüber dem HSQC-Spektrum von λ N(1–36)–*nutboxB* auftretenden zusätzlichen Resonanzen, bei denen es sich also um Amidprotonenresonanzen der zusätzlichen Aminosäuren im längeren Peptid handeln mußte, shifteten nach NusA-Zugabe.

Zwischen NusA und N (1–53) im Komplex mit *nutboxB*-RNA fand also zweifelsfrei eine spezifische Interaktion statt. Die *nutboxB*-bindende Region von λ N (1–53) war hiervon wahrscheinlich nicht betroffen, da die Resonanzen der Amidprotonen dieses Peptidabschnitts keine

Veränderungen bei NusA-Zugabe erfuhren.

Die von den gegenüber N(1–36) zusätzlichen Aminosäuren herrührenden Amidprotonenresonanzen shifteten jedoch zum Teil, was auf eine Bindung von NusA in dieser Region von N hinweist.

Van Gilst und von Hippel (1997) konnten mittels CD-Spektroskopie und Fluoreszenz-Spektroskopie eine Bindung von NusA an N nachweisen, die strukturell unabhängig von der Bindung an *nutboxB* verlief. Sie beschrieben λ N als ein ungefaltetes Multidomänenprotein, das modulartig bei Zugabe der verschiedenen Bindungspartner strukturiert wird. Das von freiem N(1–53) erhaltene CD-Spektrum ohne Anzeichen von Sekundärstruktur-Signalen und der ermittelte hydrodynamische Radius, der eher dem eines ungefalteten Peptids gleicht, wiesen ebenfalls darauf hin, daß N in Lösung unstrukturiert vorliegt (Kapitel 4.6.4).

Im exponierten Bereich der Iminoprotonenresonanzen der *nutboxB*-RNA (Abbildung 4.41) sind nach Zugabe von NusA keine Veränderungen zu beobachten. Der Bereich des *nutboxB*-RNA-Stammes scheint also nicht mit NusA zu interagieren. Laut Mutationsstudien sind die beiden Nukleotide A7 und A9 im Loop wichtig für die Erkennung des Wirtsfaktors NusA. Beide sind in der Struktur des binären Komplexes aus N(1–36) und *nutboxB*-RNA teilweise exponiert für eine mögliche Interaktion mit NusA. Aus den bislang verfügbaren 1D-Spektren sind allerdings wegen der Überlagerung der Signale mit denen der beiden Proteine keine Aussagen über die Auswirkungen der NusA-Bindung auf die *nutboxB*-RNA möglich.

Erst die Aufnahme eines kompletten homonuklearen Spektrensatzes bzw. eine spätere Isotopenmarkierung der RNA wird über strukturelle Auswirkungen auf die *nutboxB*-RNA Auskunft geben können.

5.6.3 Aussicht

Die Interaktion des binären Komplexes aus N(1–53) und *nutboxB*-RNA mit dem 55 kDa großen Wirtsfaktor NusA kann also prinzipiell mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Das Expressionssystem für N(1–53) konnte inzwischen durch den Einsatz eines synthetischen Gens verbessert werden und die nötige isotopenmarkierte RNA ist in Präparation. Die Aufklärung der

Struktur von N (1–53) im Komplex mit *nutboxB*-RNA und NusA sollte damit ermöglicht werden. Inwieweit die *nutboxB*-RNA – insbesondere die Basen A7 und A9 des Loops – mit NusA interagiert, wird ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden drei virale Regulator-Proteine (CAEV-Tat, HK022 Nun und λ N (1-53)) und mehrere ihrer nicht-viralen Bindungspartner kloniert, exprimiert, gereinigt und strukturell charakterisiert.

CAEV-Tat (Caprines Arthritis-Enzephalitis-Virus) ist ein Transaktivatorprotein aus einem HIV-verwandten Lentivirus der Ziege.

Zur effizienten Expression von CAEV-Tat war es notwendig, einige seltene Codons des *tat*-Gens gegen die jeweils synonymen, aber in *E. coli* häufiger verwendeten Codons auszutauschen. Ferner mußte eine in *E. coli* seltene Arginin-tRNA (*argU*) koexprimiert werden, um die für NMR-Spektroskopie nötigen Proteinmengen herstellen zu können.

Expression und Reinigung von CAEV-Tat mittels Standardverfahren wie Metallionenaffinitätschromatographie über einen Histidinanhang oder die Expression und Reinigung als GST-Fusionsprotein waren nicht erfolgreich. Daher mußte ein individuell auf CAEV-Tat zugeschnittenes Reinigungsprotokoll etabliert werden.

Aufgrund seines hohen pI von 11 konnte CAEV-Tat über Kationenaustauscher-Chromatographie an CM-Sepharose und anschließende Hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt werden. Die Ausbeuten an Protein ließ sich durch Verwenden von Heparin-Sepharose als Kationenaustauscher-Material noch weiter steigern.

CAEV-Tat zeigte in CD- und NMR-Spektren typische Charakteristika eines α -helikalen Proteins. Da CAEV-Tat in Konzentrationen über 400 μ M aggregierte und daher nicht für weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen, die höher Konzentrationen voraussetzen, geeignet war, wurde eine cysteinfreie Mutante von CAEV-Tat kloniert und nach dem für das Wildtyp-Protein etablierten Protokoll gereinigt. Die Mutante erwies sich als weitaus NMR-tauglicher und zeigte keinerlei Aggregationstendenzen bei Konzentrationen von 1 mM.

Durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß Wildtyp-Protein und cysteinfreie Mutante strukturell identisch sind. Somit steht mit der cysteinfreien Mutante ein für weitergehende NMR-spektroskopische Untersuchungen geeignetes Konstrukt zur Verfügung.

Für das CAEV-Tat homologe Maedi-Visna-Virus-Tat-Protein war eine Interaktion mit der basischen und der Leucin-Zipper-Domäne der beiden zellulären Transkriptionsfaktoren Jun und Fos postuliert worden (Morse et al., 1999).

Für spätere Vergleichsstudien mit CAEV-Tat und Jun / Fos zu ermöglichen, wurden im Rahmen

dieser Arbeit mit der Beschaffung der entsprechenden Nukleotidsequenzen und der Generierung expressionsfähiger Klone von *c-jun*, *c-fos* sowie *fosbZIP* bereits wichtige Voraussetzungen für spätere Bindungsstudien mit NMR-Spektroskopie geschaffen. JunbZIP (222–331) konnte bereits erfolgreich als GST-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sephrose gereinigt werden.

Nun aus dem lambdoiden Phagen HK022 fungiert bei einer Superinfektion des Wirts mit dem λ -Phagen als Terminator der viralen Genexpression. Um spätere Strukturuntersuchungen an diesem System durchführen zu können, mußte zunächst ein auf die *E. coli codon usage* optimiertes synthetisches Gen für Nun generiert werden. Hierbei erwies sich die Methode nach Kim (1989) als erfolgreich.

HK022 konnte mit Ausbeuten von 70 mg/l Kulturmedium über Kationenaustauscher-Chromatographie mit Heparin-Sephrose gereinigt werden. Erste strukturelle Befunde (CD, HSQC-Spektren, Messung des hydrodynamischen Radius) deuten darauf hin, daß es sich bei Nun um ein Protein mit nur gering ausgeprägter Tertiärstruktur handelt.

Ein Fragment (1–53) des Antiterminator-Protein N aus dem Phagen λ konnte kloniert und als Fusionsprotein mit Ubiquitin exprimiert werden. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie und einen abschließenden RP-HPLC-Schritt nach der Abspaltung des Ubiquitinanteils.

λ N-Protein liegt in Lösung unstrukturiert vor. Dieser Befund wurde auch für das N(1–53)-Peptid durch CD-Spektroskopie und die Bestimmung des hydrodynamischen Radius erhalten.

Bei der Bindung von ^{15}N -N(1–53) an *nutboxB*-RNA bildet sich ein Komplex, der höchstwahrscheinlich weitgehend die gleiche Struktur wie der Komplex aus N(1–36) und *nutboxB*-RNA besitzt.

Bei Zugabe des Wirtsfaktors NusA aus *E. coli* zu diesem binären Komplex kommt es auf Seiten von λ N (1–53) zu Veränderungen im HSQC-Spektrum, was auf eine spezifische Interaktion zwischen dem längeren λ -Peptid und NusA hindeutet. Hiervon sind vor allem die nicht im Komplex mit *nutboxB* vorliegenden Reste von λ N betroffen.

Weitergehende NMR-spektroskopische Untersuchungen werden klären, inwieweit die *nutboxB*-RNA an der Interaktion mit NusA beteiligt ist. Mit der Etablierung eines Reinigungsprotokolls für N(1–53) und für *E. coli* NusA konnten wichtige Voraussetzungen hierfür bereits erfüllt werden.

7 SUMMARY

In the present work three viral regulatory proteins (CAEV-Tat, HK022 Nun and λ N (1-53)) were cloned, expressed, purified and structurally characterized.

CAEV-Tat (caprine arthritis encephalitis virus) is a transactivator protein from a HIV-related virus from goat.

For an efficient expression of CAEV-Tat it was necessary to replace some infrequent codons of the *tat* gene by the synonymous codons that are more frequently used in *E. coli*. Additionally, in order to allow the production of sufficient amounts of protein for NMR-spectroscopy, *argU*, a rare tRNA in *E. coli* coding for arginine had to be coexpressed.

Expression and purification of CAEV-Tat using standard protocols like metal ion affinity chromatography using a his-tagged protein or expression and purification as GST-fused protein did not result in sufficient amounts of pure protein. For that reason an individual purification procedure adapted to the specific properties of CAEV-Tat had to be established.

Because of its high pI of 11 CAEV-Tat could be purified by cation-exchange chromatography using CM sepharose followed by a hydrophobic exchange chromatography. The protein yield could be further increased by using heparin sepharose for the cation-exchange-chromatography.

CAEV-Tat exhibited CD- and NMR-spectra typical for α -helical proteins. CAEV-Tat showed aggregation at concentrations higher than 400 μ M and was thus not suitable for further NMR-spectroscopic studies that require higher protein concentrations. For that reason a cysteine-free mutant of CAEV-Tat was cloned and purified according to the protocol established for the wildtype protein. The mutant proved to be more suitable for NMR-spectroscopic studies since it showed no tendency for aggregation at protein concentrations of 1 mM.

NMR-spectroscopy revealed that the wildtype protein and the cysteine-free mutant exhibit an identical structure. Thus, the cysteine-free mutant appears to be a suitable construct for further spectroscopical studies.

For maedi visna virus Tat protein, a close homologue of CAEV-Tat, an interaction with the basic and the leucine zipper domain of the cellular transcription factors Jun and Fos has been postulated (Morse *et al.*, 1999).

Verification of this hypothesis for CAEV–Tat using NMR binding studies requires sufficient amounts of *c-jun*, *c-fos*, *junbZIP* and *fosbZIP*. The corresponding proteins were cloned in the present work and *JunbZIP* (222–331) could also be expressed successfully as GST–fused protein and purified using a glutathione–sepharose affinity chromatography.

Nun protein from the lambdoid phage HK022 acts as a terminator of transcription during superinfection of the host by λ phages. In order to perform structural studies of this protein a synthetic gene had to be generated that is adjusted to the optimal codon usage in *E. coli* using the strategy of Kim (1989).

HK022 Nun could be expressed with yields of 70 mg/l medium and purified by cation exchange chromatography using heparin sepharose. Initial spectroscopic studies (CD– and NMR–HSQC–spectra, determination of the hydrodynamic radius) suggests that Nun only exhibits a small amount of tertiary structure.

A fragment (1–53) of the antiterminator protein N from the phage λ was cloned and expressed as a fusion protein with ubiquitin and was purified by affinity chromatography followed by a RP–HPLC step after cleavage of the ubiquitin moiety.

Similar to λ N, N(1–53) is also unstructured in solution, as evidenced from CD–spectroscopy and the determination of the hydrodynamic radius.

Binding of ^{15}N –labeled N(1–53) to the *nutboxB*–RNA results in a complex that is – as suggested by the features of its HSQC–spectrum – highly similar in structure to the complex formed by N(1–36). Addition of the *E. coli* host factor NusA to this binary complex results in shifts of the λ N(1–53) resonances suggesting a specific interaction between this longer λ N–peptide and NusA. This effect is mainly observed for those residues that are not involved in complex formation with *nutboxB*.

Subsequent NMR spectroscopic studies will help to answer the question to which extent *nutboxB* RNA is involved in the interaction with NusA.

ABKÜRZUNGEN

CAES	Caprine Arthritis Encephalitis syndrome
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency virus</i>
AP-1	Aktivatorprotein-1
AP-4	Aktivatorprotein-4
BIV	<i>Bovine immunodeficiency virus</i>
CAEV	<i>Caprine Arthritis Encephalitis virus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIAV	<i>Equine infectious anemia virus</i>
<i>env</i>	<i>envelope</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
<i>gag</i>	gruppenspezifisches Antigen
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus</i>
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
LTR	<i>long terminal repeat</i>
mRNA	Boten-RNA
MVV	Maedi-Visna Virus
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
<i>pol</i>	Polymerase
R	<i>redundant</i>
<i>rev</i>	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	<i>rev-responsive element</i>
RSV	Rous-Sarkom-Virus
s.	siehe
SFV	<i>Simian foamy virus</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SRLV	<i>Small ruminant Lentiviruses</i>
TAR	<i>tat-responsive element</i>
<i>tat</i>	<i>transactivator of transcription</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U3	<i>unique</i>
U5	<i>unique</i>
<i>vif</i>	<i>viral infectivity factor</i>
VP16	Virusprotein 16 aus <i>Herpes simplex</i>
z.B.	zum Beispiel
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ap	Ampicillin
Km	Kanamycin
vgl.	vergleiche
MCS	<i>multiple cloning site</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid

tRNA	Transfer-RNA
bp	Basenpaare
kb	Kilobasenpaare
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
NBT	Nitroblautetrazolium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	<i>high -performance liquid chromatography</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase-HPLC</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
kDa	Kilodalton
IgG	Immunglobulin G
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	<i>units</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
GSH	Glutathion
MALDI	<i>matrix-assisted-laser-desorption ionization</i>
CD	Circulardichroismus
TOF	<i>time of flight</i>
AP	alkalische Phosphatase
DNase	Desoxyribonuklease
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

LITERATUR

Ackermann, H.W. (1998)

Tailed bacteriophages: the order caudovirales.
Adv. Virus Res. **51**, 135–201

Baedeker, M. und Schulz, G.E. (1999)

Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in *Escherichia coli*.
FEBS Lett **457**, 57–60

Bagby, S., Tong, K.I. und Ikura, M. (2001)

Optimization of protein solubility and stability for protein nuclear magnetic resonance.
Methods Enzymol. **339**, 20–41

Baltimore, D. (1970)

RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.
Nature **226**, 1209–1211

Becker, T. (2001)

Strukturbestimmung des Nun(20–44)–Peptid–nutboxB–RNA–Komplexes.
Diplomarbeit Universität Bayreuth 2001

Berg, K.L., Squires, C. und Squires, C.L. (1989)

Ribosomal RNA operon anti-termination. Function of leader and spacer region box B–box A sequences and their conservation in diverse micro-organisms.
J. Mol. Biol. 1989 **209**, 345–358

Brinkmann, U., Mattes, R.E. und Buckel, P. (1989)

High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product.
Gene **21**, 109–114

Burova, E., Hung, S. C., Chen, J., Court, D. L., Zhou, J. G., Mogilnitskiy, G. und Gottesman, M. E. (1999)

Escherichia coli nusG mutations that block transcription termination by coliphage HK022 Nun protein.
Mol. Microbiol. **31**, 1783–1793

Burova, E., Hung, S. C., Sagitov, V., Stitt, B. L. und Gottesman, M.E. (1995)

Escherichia coli NusG protein stimulates transcription elongation rates in vivo and in vitro.
J. Bacteriol. **177**, 1388–1392

Bycroft, M., Hubbard, T. J., Proctor, M., Freund, S. M. und Murzin, A. G. (1997)

The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold.
Cell **88**, 235–242

Cai, Z., Gorin, A., Frederick, R., Ye, X., Hu, W., Majumdar, A., Kettani, A. und Patel, D. J. (1998)

Solution structure of P22 transcriptional antitermination N peptide–boxB RNA complex.
Nat. Struct. Biol. **5**, 203–12

Cam, K. M., Oberto, J. und Weisberg, R. A. (1991)

The early promoters of bacteriophage HK022: contrasts and similarities to other lambdoid phages.
J. Bacteriol. **173**, 734–40

Campbell, A. (1994)

Comparative molecular biology of lambdoid phages.
Annu. Rev. Microbiol. **48**, 193–222

Campbell, B.J., Avery, R.J. (1997)

Sequence analysis and transcriptional activity of the LTR of OLV–CU1, a North American ovine lentivirus.
J Gen Virol **77**, 2999–3004

Carruth, L.M., Hardwick, J.M., Morse, B.A. und Clements, J.E. (1994)

Visna virus Tat protein: a potent transcription factor with both activator and suppressor domains.
J Virol **68**, 6137–6146

Carruth, L.M., Morse, B.A. und Clements, J.E. (1996)

The leucine domain of the visna virus Tat protein mediates targeting to an AP-1 site in the viral long terminal repeat.
J. Virol. **70**, 4338–4344

Chattopadhyay, S., Garcia-Mena, J., DeVito, J., Wolska, K. und Das, A. (1995a)

Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**, 4061–4065

Chattopadhyay, S., Hung, S. C., Stuart, A. C., Palmer, A. G. 3rd, Garcia-Mena, J., Das, A. und Gottesman, M. E. (1995)

Interaction between the phage HK022 Nun protein and the nut RNA of phage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 12131–12135

Chattopadhyay, S., Hung, S. C., Stuart, A. C., Palmer, A. G. 3rd, Garcia-Mena, J., Das, A. und Gottesman, M. E. (1995b)

Interaction between the phage HK022 Nun protein and the nut RNA of phage lambda.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **92**, 12131–12135

Clements, J.E. und Zink, M.C. (1996)

Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections.
Clin. Microbiol. Rev. **9**, 100–117

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972)

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 2210–2214
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Cork, L.C., Hadlow, W.J., Crawford, T.B., Gorham, J.R. und Piper, R.C. (1974)

Infectious leukoencephalomyelitis of young goats.
J. Infect. Dis. **129**, 134–141

Craven, M. G., Granston, A. E., Schauer, A. T., Zheng, C., Gray, T. A. und Friedman, D. I. (1994)

Escherichia coli–*Salmonella typhimurium* hybrid nusA genes: identification of a short motif required for action of the lambda N transcription antitermination protein.

J. Bacteriol. **176**, 1394–1404

Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.P. und Cork, L.C. (1980)

Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus.
Science **207**, 997–999

Crawford, T.B. und Adams, D.S. (1981)

Caprine Arthritis–Encephalitis: clinical features and presence of antibodies in selected goat populations.
J. Am. Vet. Med. Assoc. **178**, 713–719

Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Brogden, K.A. und Bolin, S.R. (1986)

Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep
Am. Vet. Pathol. **46**, 326

Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. und Harrison, R.G. (1999)

Biotechnol. Bioeng. **65**, 382–388.

Davis, J.L. und Clements, J.E. (1989)

Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein.
Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 414–418

de Parseval, A und Elder, J.H. (1999)

Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity.

J Virol **73**, 608–617

DeVito, J. und Das, A. (1994)

Control of transcription processivity in phage lambda: Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by N antiterminator.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **91**, 8660–8664

Dolan, S., Kelly, J.G. and Nolan, A.M. (2001)

Ovis aries c-jun mRNA

Unpublished

Dötsch, V. (2001)

Protein–DNA interactions.

Methods Enzymol. **339**, 343–357

Elder, J.H., Lerner, D.L., Hasselkus–Light, C.S., Fontenot, D.J., Hunter, E., Luciew, P.A., Montelaro, R.C. und Phillips, T.R. (1992)

Distinct subsets of retroviruses encode dUTPase.

J. Virol. **66**, 1791–1794

Emerman, M. und Malim, M.H. (1998)

HIV–1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology.

Science **280**, 1880–1884

Faber, C., Schärpf, M., Becker, T., Sticht, H. und Rösch, P. (2001)

The structure of the coliphage HK022 Nun protein–lambda–phage boxB RNA complex. Implications for the mechanism of transcription termination.

J. Biol. Chem. **276**, 32064–32070

Frankel, A.D., Bredt, D.S. und Pabo, C.O. (1988) T

at protein from human immunodeficiency virus forms a metal–linked dimer.

Science **240**, 70–3

Franklin, N. C. und Bennett, G. N. (1979)

The N protein of bacteriophage lambda, defined by its DNA sequence, is highly basic.

Gene **8**, 107–119

Friedman, D. I., Olson, E. R., Johnson, L. L., Alessi, D. und Craven, M. G. (1990)

Transcription–dependent competition for a host factor: the function and optimal sequence of the phage lambda boxA transcription antitermination signal.

Genes Dev. **4**, 2210–2222

Friedman, D. I. und Court, D.L. (2001)

Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing.

Curr. Opin. Microbiol. **2**, 201–207

Gdovin, S.L. und Clements, J.E. (1992)

Molecular mechanisms of visna virus Tat: identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post–transcriptional effect.

Virology **188**, 438–450

Gibson, T. J., Thompson, J. D. und Heringa, J. (1993)

The KH domain occurs in a diverse set of RNA–binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid.

FEBS Lett. **324**, 361–366

Gill, S.C. und von Hippel, P.H. (1989)

Calculation of Protein extinction coefficients from amino acid sequence data

Anal. Biochem. **182**, 319–326

Gopal, B., Haire, L. F., Gamblin, S. J., Dodson, E. J., Lane, A. N., Papavinasasundaram, K. G., Colston, M. J. und Dodson, G. (2001b)

Crystal Structure of the Transcription Elongation/Anti-termination Factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å Resolution.

J. Mol. Biol. **314**, 1087–1095

Gopal, B., Papavinasasundaram, K. G., Colston, M. J., Dodson, G. und Haire, L.F. (2001a)

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the N-utilizing substance A (NusA) from *Mycobacterium tuberculosis*.

Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **57**, 1187–1188

Goto, N.K. und Kay, L.E. (2000)

New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy.

Curr Opin Struct Biol **10**, 585–592

Gottesman, S., Gottesman, M., Shaw, J. E. und Pearson, M. L. (1981)

Protein degradation in *E. coli*: the Ion mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability.

Cell **24**, 225–233

Gourdou, I., Mabrouk, K., Harkiss, G., Marchot, P., Watt, N., Hery, F. und Vigne, R. (1990)

Neurotoxicity in mice due to cysteine-rich parts of visna virus and HIV-1 Tat proteins.

C. R. Acad. Sci. III **311**, 149–155

Gourdou, I., Mazarin, V., Querat, G., Sauze, N. und Vigne, R. (1989)

The open reading frame S of visna virus genome is a trans-activating gene.

Virology **171**, 170–178

Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990)

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

Proc Natl Acad Sci U S A **87**, 4645–4649

Greenblatt, J., Mah, T. F., Legault, P., Mogridge, J., Li, J. und Kay, L. E. (1998)

Structure and mechanism in transcriptional antitermination by the bacteriophage lambda N protein.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **63**, 327–336

Greenblatt, J., Nodwell, J. R. und Mason, S.W. (1993)

Transcriptional antitermination.

Nature **364**, 401–406

Grodberg, J. und Dunn, J.J. (1988)

OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification

J. Bacteriol. **170**, 1245–1253

Gurskii, I.G., Marimont, N.I., Shevelev, A.I., Iuzhakov, A.A. und Bibilashvili, R.S (1992)

Rare codons and gene expression in *Escherichia coli*.

Mol Biol (Mosk) **26**; 1063–1079

Gusarov, I. und Nudler, E. (2001)

Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms.

Cell **107**, 437–449

Hanahan, D. (1983)

Techniques for transformation of *E. coli* in: Glover, DM (ed.). DNA cloning. A practical approach. Vol.1, IRL Press, Oxford. 109–135

Harmache, A., Russo, P., Guiguen, F., Vitu, C., Vignoni, M., Bouyac, M., Hièblot, C., Pépin, M., Vigne, R. und Suzan, M. (1996)

Requirement of Caprine Arthritis Encephalitis Virus *vif* gene for *in vivo* replication.
Virology **224**, 246–255

Harmache, A., Vitu, C., Guiguen, F., Russo, P., Bertoni, G., Pepin, M., Vigne, R. und Suzan, M.

Priming with tat–deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV.
J. Virol. **72**, 6796–6804

Harmache, A., Vitu, C., Russo, P., Bouyac, M., Hieblot, C., Peveri, P., Vigne, R. und Suzan, M. (1995)

The caprine arthritis encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication *in vitro* and *in vivo*.
J. Virol. **69**, 5445–5454

Harrison, G. (2000)

Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein.
inNovations **11**

Henaut, A. und Danchin, A. (1996)

in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology, vol. 2, pp. 2047–2066

Henthorn, K. S. und Friedman, D. I. (1996)

Identification of functional regions of the Nun transcription termination protein of phage HK022 and the N antitermination protein of phage gamma using hybrid nun–N genes.
J. Mol. Biol. **257**, 9–20

Hess, J.L., Clements, J.E. und Narayan, O. (1985) c

is– and trans–acting transcriptional regulation of visna virus.
Science **229**, 482–485

Hess, J.L., Pyper, J.M. und Clements, J.E. (1986)

Nucleotide sequence and transcriptional activity of the caprine arthritis–encephalitis virus long terminal repeat.
J. Virol. **60**, 385–393

Hess, J.L., Small, J.A. und Clements, J.E. (1989)

Sequences in the visna virus long terminal repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans–activation: involvement of AP–1 sites in basal activity and trans–activation.
J. Virol. **63**, 3001–3015

Heus, H. A. und Pardi, A. (1991)

Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops.
Science **253**, 191–194

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. und Pease, L.R. (1989)

Site–directed mutagenesis by overlap extension using PCR.
Gene **77**, 54–59

Hung, S. C. und Gottesman, M. E. (1995)

Phage HK022 Nun protein arrests transcription on phage lambda DNA *in vitro* and competes with the phage lambda N antitermination protein.
J. Mol. Biol. **247**, 428–442

Jackson, M.K., Knowles, D.P., Stem, T.A., Harwood, W.G., Robinson, M.M. und Cheevers, W.P. (1991)

Genetic structure of the pol–env region of the caprine arthritis–encephalitis lentivirus genome.
Virology **180**, 389–394

Jaffe, E.K., Volin, M., Bronson–Mullins, C.R., Dunbrack, R.L. Jr, Kervinen, J., Martins, J., Quinlan, J.F. Jr, Sazinsky, M.H., Steinhouse, E.M. und Yeung, A.T. (2000)

An artificial gene for human porphobilinogen synthase allows comparison of an allelic variation implicated in susceptibility to lead poisoning.
J. Biol. Chem. **275**, 2619–2626

- Jensen, K. B., Musunuru, K., Lewis, H. A., Burley, S. K. und Darnell, R. B. (2000)** The tetranucleotide UCAY directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 5740–5745
- Jessee, J. (1986)**
New Subclonig efficiency of competent cells: $>10^6$ transformants/ μg
Focus **8** 9–10
- Joag, S.V., Stephens, E.B. und Narayan, O. (1996)**
Lentiviruses in Fields M (ed.), Virology; Lippincott–Raven Publishers, New York 1977–1996
- Johnson, B.A. und Blevins, R.A. (1994)**
NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data.
J. Biomol. NMR **4**, 603–614
- Johnson, T.M., Quick, M.W., Sakai, T.T. und Krishna, N.R. (2000)**
Expression of functional recombinant scorpion beta-neurotoxin C_{ss} II in E. coli.
Peptides **21**, 767–772
- Jones, J.A., Wilkins, D.K., Smith, L.J. und Dobson, C.M. (1997)**
Characterization of protein unfolding by NMR diffusion measurements.
J. Biomol. NMR **10**, 199–203
- Kalinski, H., Mashiah, P., Rotem, D., Orzech, Y., Sherman, L., Miki, T., Yaniv, A., Gazit, A. und Tronick, S.R. (1994)**
Characterization of cDNAs species encoding the Tat protein of caprine arthritis encephalitis virus.
Virology **204**, 828–834
- Kanamori, H., Dodson, R. E. und Shapiro, D.J. (1998)**
In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein.
Mol. Cell. Biol. **18**, 3991–4003
- Kane, J.F. (1995)**
Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in E. coli
Curr. Opin. Biotechnol. **6**, 495–500
- Kennedy–Stoskopf, S., Narayan, O. und Strandberg, J.D. (1985)**
The mammary glands as a target organ for infection with CAEV.
J. Comp. Pathol. **95**, 609
- Kim, H.J.S., Nishikawa, T. Tanaka, S. uesugi, H. Gakenaka, M. Hamada und S.A. Kuby (1989)**
Synthetic genes for human muscle type adenylate kinase in Escherichia coli.
Protein Engineering **2**, 379–386
- Kirsch, T. (1996)**
Expression des Tat-Proteins des Humanen Immundefizienz Virus Typ 1 sowie Expression und Charakterisierung des N-Proteins des Bakteriophagen λ .
Dissertation Universität Bayreuth
- Klaus, S. , Krüger, D. H. und Meyer, J. (1992)** Bakterienviren. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. und Wakamatsu, K. (1998)**
A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. *J. Biomol. NMR* **12**, 109–121
- Kurland C, Gallant J. (1996)**
Errors of heterologous protein expression.
Curr. Opin. Biotechnol. **7**, 489–493

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**, 680–685

Landt, O., Grunert, H.P. und Hahn, U. (1990)

A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction.
Gene **96**, 125–128

Lazinski, D., Grzadzilska, E. und Das, A. (1989)

Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif.
Cell **59**, 207–218

Legault, P., Li, J., Mogridge, J., Kay, L. E. und Greenblatt, J. (1998)

NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif.
Cell **93**, 289–99

Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M. und Soares, M.B. (1996)

The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression.
Genomics **33**, 151–152

Leroux, C., Vuillermoz, S., Mornex, J.F. und Greenland, T. (1995)

Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France.
J. Gen. Virol. **76**, 1533–1537

Li, J., Horwitz, R., McCracken, S. und Greenblatt, J. (1992)

NusG, a new Escherichia coli elongation factor involved in transcriptional antitermination by the N protein of phage lambda.
J. Biol. Chem. **267**, 6012–6019

Li, S.C., Squires, C.L. und Squires, C. (1984)

Antitermination of E. coli rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda nut-like sequences.
Cell **38**, 851–860

Mah, T. F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., Severinov, K. und Greenblatt, J. (2000)

The alpha subunit of E. coli RNA polymerase activates RNA binding by NusA.
Genes Dev. **14**, 2664–2675

Mah, T. F., Li, J., Davidson, A. R. und Greenblatt, J. (1999)

Functional importance of regions in Escherichia coli elongation factor NusA that interact with RNA polymerase, the bacteriophage lambda N protein and RNA.
Mol. Microbiol. **34**, 523–537

Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M. und Clore, G.M. (1989b)

Overcoming the overlap problem in the assignment of ^1H NMR spectra of larger proteins by use of three dimensional heteronuclear ^1H – ^{15}N Hartmann Hahn multiple quantum coherence and nuclear Overhauser multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1b.
Biochemistry **28**, 6150–6156

Marion, D., Ikura, M., Tschudin, L. und Bax, A. (1989a)

Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins.
J. Magn. Res. **85**, 393–399

Mason, S. W., Li, J. und Greenblatt, J. (1992a)

Direct interaction between two Escherichia coli transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10.
J. Mol. Biol. 1992 **223**, 55–66

Mason, S. W., Li, J. und Greenblatt J. (1992b)

Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage lambda.

J. Biol. Chem. **267**, 19418–19426

Maurizi, M. R. (1987)

Degradation in vitro of bacteriophage lambda N protein by Lon protease from *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **262**, 2696–2703

Mazarin, V., Gourdou, I., Quèrat, G., Sauze, N., Audoly, G., Vitu, C., Russo, P., Rousset, C., Filippi, P. und Vigne, R. (1990)

Subcellular localization of *rev*-gene product in visna virus-infected cells.

Virology **178**, 305–310

Meyer, O. und Schlegel, H.G. (1983)

Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria

Annu. Rev. Microbiol. **37**, 227–310

Mildner, A.M., Paddock, D.J., LeCureux, L.W., Leone, J.W., Anderson, D.C., Tomasselli, A.G und Heinrikson, R.L. (1999)

Production of chemokines CTAPIII and NAP/2 by digestion of recombinant ubiquitin-CTAPIII with yeast ubiquitin C-terminal hydrolase and human immunodeficiency virus protease.

Protein. Expr. Purif. **16**, 347–354

Mogridge, J., Legault, P., Li, J., Van Oene, M.D., Kay, L.E. und Greenblatt, J. (1998a)

Independent ligand-induced folding of the RNA-binding domain and two functionally distinct antitermination regions in the phage lambda N protein.

Mol. Cell **1**, 265–275

Mogridge, J., Mah, T.F. und Greenblatt, J. (1995)

A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the lambda N protein.

Genes Dev. **9**, 2831–2845

Mogridge, J., Mah, T. F. und Greenblatt, J. (1998b)

Involvement of boxA nucleotides in the formation of a stable ribonucleoprotein complex containing the bacteriophage lambda N protein.

J. Biol. Chem. **273**, 4143–4148

Mogridge, J. und Greenblatt, J. (1998)

Specific binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to boxA transcriptional antiterminator RNA.

J. Bacteriol. **180**, 2248–2252

Morse, B.A., Carruth, L.M. und Clements, J.E. (1999)

Targeting of the visna virus tat protein to AP-1 sites: interactions with the bZIP domains of fos and jun in vitro and in vivo.

J. Virol. **73**, 37–45

Narayan, O., Zink, M.C., Gorrell, M., Crane, S., Huso, D., Jolly, P., Saltarelli, M., Adams, R.J. und Clements, J.E. (1993)

The Lentiviruses of sheep and goats in 'The Retroviridae' (volume 2) edited by Jay A. Levy; Plenum Press, New York

Neuveut, C., Vigne, R., Clements, J.E. und Sire, J. (1993)

The visna transcriptional activator Tat: effects on the viral LTR and on cellular genes.

Virology **197**, 236–244

Nodwell, J.R. und Greenblatt, J. (1991)

The nut site of bacteriophage lambda is made of RNA and is bound by transcription antitermination factors on the surface of RNA polymerase.

Genes Dev. **5**, 2141–2151

Nodwell, J.R. und Greenblatt, J. (1993)

Recognition of boxA antiterminator RNA by the E. coli antitermination factors NusB and ribosomal protein S10.
Cell **72**, 261–268

Novy, R., Drott, D. Yaeger, K. und Mierendorf, R. (2001)

Overcoming the codon bias of E.coli for enhanced protein expression.
in *Innovations* **12**, 1–3

Oberto, J., Weisberg, R. A. und Gottesman, M. E. (1989)

Structure and function of the nun gene and the immunity region of the lambdoid phage HK022.
J. Mol. Biol. **207**, 675–693

Oberto, J., Weisberg, R.A. und Gottesman, M.E.(1989)

Structure and function of the nun gene and the immunity region of the lambdoid phage HK022.
J. Mol. Biol. **207**, 675–93

Oliver, R.E.; Gorham, J.R., Parish, S.F., Hadlow, W.J. und Narayan, O. (1981)

Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease.
Am J. Vet. Res. **42**, 1554–1559

Palsson, P.A. (1976)

Maedi and visna in sheep.
Front. Biol. **44**, 17–43

Pepin, M., Vitu, C., Russo, P., Mornex, J.F. und Peterhans, E. (1998)

Maedi–visna virus infection in sheep: a review.
Vet. Res. **29**, 341–367

Pope, B.P. und Kent, H.M. (1996)

High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*

Prodromou, C. und Pearl, L.H.(1992)

Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis.
Protein. Eng. **5**, 827–829

Prytulla, S., Dyson, H.J. und Wright, P.E. (1996)

Gene synthesis, high–level expression and assignment of backbone 15N and 13C resonances of soybean leghemoglobin.
FEBS Lett. **399**, 283–289

Querat, G., Audoly, G., Sonigo, P. und Vigne, R. (1990)

Nucleotide sequence analysis of SA–OMVV, a visna–related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses.
Virology **175**, 434–447

Rees, W. A., Weitzel, S. E., Yager, T. D., Das, A, und von Hippel, P. H. (1996)

Bacteriophage lambda N protein alone can induce transcription antitermination in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **93**, 342–346

Richardson, J. P. und Greenblatt, J. (1996)

Control of RNA chain elongation and termination in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaecher, M. und Umberger, H. E., eds)822–848, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Robert, J., Sloan, S. B., Weisberg, R. A., Gottesman, M. E., Robledo, R. und Harbrecht, D. (1987)

The remarkable specificity of a new transcription termination factor suggests that the mechanisms of termination and antitermination are similar.
Cell 1987 **51**, 483–492

Robertson, J.A., Bhattacharyya, S. und Ing, N.H. (1998)

Tamoxifen up-regulates oestrogen receptor- α , c-fos and glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase mRNAs in ovine endometrium

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **67**, 285–292

Robledo, R., Atkinson, B. L. und Gottesman, M. E. (1991)

Escherichia coli mutations that block transcription termination by phage HK022 Nun protein.

J. Mol. Biol. **220**, 613–619

Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W. und Zubay, G.(1993)

Effects of consecutive AGG codons on translation in Escherichia coli, demonstrated with a versatile codon test system.

J. Bacteriol. **175**, 716–722

Rosenberg, M., Court, D., Shimatake, H., Brady, C. und Wulff, D.L. (1978)

The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage lambda.

Nature **272**, 414–423

Sakamoto, T., Tanaka, T., Ito, Y., Rajesh, S., Iwamoto-Sugai, M., Kodera, Y., Tsuchida, N., Shibata, T. und Kohno T. (1999)

An NMR analysis of ubiquitin recognition by yeast ubiquitin hydrolase: evidence for novel substrate recognition by a cysteine protease.

Biochemistry **38**, 11634–11642

Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D.A., Vigne, R. und Clements, J.E. (1990)

Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus.

Virology **179**, 347–364

Saltarelli, M.J., Schoborg, R., Gdovin, S.L. und Clements, J.E. (1993)

The CAEV tat gene trans-activates the viral LTR and is necessary for efficient viral replication.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, M. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual**Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J. und McConnell, I. (1991)**

Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)

Tricine-sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide Gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Anal. Biochem. **166**, 368–379

Schärf, M., Sticht, H., Schweimer, K., Boehm, M., Hoffmann, S. und Rösch, P. (2000)

Antitermination in bacteriophage lambda. The structure of the N36 peptide-boxB RNA complex.

Eur. J. Biochem. **267**, 2397–2408

Schärf, M. (1999)

Antitermination im Bakteriophagen λ : Die Struktur des N36-Peptid-nutboxB-RNA-Komplexes.

Dissertation Universität Bayreuth

Schindelin, H., Marahiel, M. A. und Heinemann, U. (1993)

Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein.

Nature **364**, 164–168

Schmid, F. X. (1989)

Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. in Creighton, T. E. (ed.), Protein structure: A practical approach, IRL Press, Oxford

Schwarz, S. (1999) Überexpression und Reinigung des Transaktivator-Proteins Tat aus CAEV.

Diplomarbeit Universität Bayreuth.

Schwede, T.F., Badeker, M., Langer, M., Retey, J., Schulz, G.E. (1999)

Homogenization and crystallization of histidine ammonia-lyase by exchange of a surface cysteine residue.
Protein. Eng. **12**, 151–153

Schweimer, K. (2000)

Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des Guillardia theta Rubredoxins und des [2Fe 2S] Ferredoxins aus Halobacterium salinarum
Dissertation, Universität Bayreuth

Seidel, H.M., Pompliano, D.L. und Knowes, J.R. (1992)

Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from Tetrahymena pyriformis and overexpression of the gene product in Escherichia coli.
Biochemistry **31**, 2598–2608

Sherman, L., Yaniv, A., Lichtman-Pleban, H., Tronick, S.R. und Gazit, A. (1989)

Analysis of regulatory elements of the equine infectious anemia virus and caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeats.
J. Virol. **63**, 4925–4931

Sigurdsson, B., Palsson, P. A. und Grimsson, H. (1954)

Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. **16**, 389–403

Sigurdsson, B. (1952)

Observations on three slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida a slow encephalitis of sheep with general remarks of infections which develop slowly and some of their special characteristics.
Br. Vet. J. **110**:255–270

Sigurdsson B, Grimsson H, Palsson PA (1957)

Maedi, a chronic progressive infection of sheep lungs.
J. Infect. Dis. **90**, 233–241

Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M. und Dreyfuss, G. (1993)

The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif.
Nucleic Acids Res. **21**, 1193–1198

Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A. und Wain-Hobson, S. (1985)

Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus.
Cell **42**, 369–382

Studier, F.W. und Moffat (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes
J. Mol. Biol. **189**, 113–130

Subramanian AR. (1983)

Structure and functions of ribosomal protein S1.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **28**, 101–142

Tan, R. und Frankel, A. D. (1995) Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 5282–5286**Temin, H.M. und Mizutani, S. (1970)**

RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus
Nature **226**, 1211–1213

Thomas, M.R. (1994)

Simple, effective cleanup of DNA ligation reaction prior to electro-transformation of *E. coli*
BioTechniques **16**, 988–990

Tsugawa, A., Kurihara, T., Zuber, M., Court, D. L. und Nakamura, Y. (1985)

E. coli NusA protein binds in vitro to an RNA sequence immediately upstream of the boxA signal of bacteriophage lambda.

EMBO J. **4**, 2337–2342

Valas, S., Benoit, C., Guionaud, C., Perrin, G. und Mamoun, R.Z. (1997)

North American and French caprine arthritis–encephalitis viruses emerge from ovine maedi–visna viruses.

Virology **237**, 307–318

Van Gilst, M. R. und von Hippel, P. H. (1997)

Assembly of the N–dependent antitermination complex of phage lambda: NusA and RNA bind independently to different unfolded domains of the N protein.

J. Mol. Biol. **274**, 160–173

Van Gilst, M.R. und von Hippel, P.H. (2000)

Quantitative dissection of transcriptional control system: N–dependent antitermination complex of phage lambda as regulatory paradigm.

Methods Enzymol. **323**, 1–31

Vellutini, C., Philippon, V., Gambarelli, D., Horschowski, N., Nave, K.A., Navarro, J.M., Auphan, M., Courcoul, M.A. und Filippi, P (1994)

The maedi–visna virus Tat protein induces multiorgan lymphoid hyperplasia in transgenic mice.

J Virol **68**, 4955–4962

Watnick, R. S., Herring, S. C., Palmer, A. G. 3rd und Gottesman, M. E. (2000)

The carboxyl terminus of phage HK022 Nun includes a novel zinc–binding motif and a tryptophan required for transcription termination.

Genes Dev. **14**, 731–739

Watnick, R. S. und Gottesman, M. E. (1998)

Escherichia coli NusA is required for efficient RNA binding by phage HK022 nun protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**, 1546–1551

Watnick, R. S. und Gottesman, M. E. (1999)

Binding of transcription termination protein nun to nascent RNA and template DNA.

Science **286**, 2337–2339

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. und Jones, K.A. (1998)

A novel CDK9–associated C–type cyclin interacts directly with HIV–1 Tat and mediates its high–affinity, loop–specific binding to TAR RNA.

Cell **92**, 451–462

Weisberg, R.A. und Gottesman, M.E. (1999)

Processive antitermination.

J. Bacteriol. **181**, 359–367

Weiss, M. A. (1998)

RNA–mediated signaling in transcription.

Nat. Struct. Biol. **5**, 329–333

Whalen, W., Ghosh, B. und Das, A. (1988)

NusA protein is necessary and sufficient in vitro for phage lambda N gene product to suppress a rho–independent terminator placed downstream of nutL.

Proc Natl Acad Sci U S A **85**, 2494–2498

Whalen, W.A. und Das, A. (1990)

Action of an RNA site at a distance: role of the nut genetic signal in transcription antitermination by phage–lambda N gene product.

New Biol. **2**, 975–991

Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A. und Smith, L.J. (1999)

Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured using pulse field gradient NMR techniques.
Biochemistry **38**, 16424–16431

Worbs, M., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. und Wahl, M. C. (2001)

An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA.
Mol. Cell **7**, 1177–1189

Yee, A.Chang, X., Pineda–Lucena, A., Wu, B., Semesi, A., Le, B., Ramelot, T., Lee,G.M., Chattacharyya, S., Gutierrez, P.,Denisov, A., Lee, C.H., Cort, J.R., Kozlov, G., Liao, J., Finak, G., Chen, L., Wishart, D., Lee, W., McIntosh, L.P., Gehring, K., Kennedy, M.A., Edwards, A.M. und Arrowsmith, C.H. (2002)

An NMR approach to structural proteomics.
Proc. Natl .Acad Sci. U S A **99**, 1825–1830

XhoI NotI

```

AACGCAGCAGTTGCAAACATTTTACTCGAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 653
TTGCGTCGTCAACGTTTGTAAAACCTGAGCTCCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCG

```

b T Q Q L Q T F * L E A A A T A V E -

pBlueskript–JunbZIP(222–331)

BamHI

```

AAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCATTGAAGGACGTCTGCAGGCCCTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 300
TTCGAACTATAGCTTAAGGACGTCTGGGCCCCCTAGGTAACCTCCTGCAGACGTCCGGGAC

```

a K L D I E F L Q P G G S I E G R L Q A L -

```

AAGGAGGAGCCTCAGACAGTGCCCGAGATGCCCGGCGAGACACCGCCCCTGTCCCCCATC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 360
TTCTCCTCGGAGTCTGTTCACGGGCTCTACGGGCCGCTCTGTGGCGGGGACAGGGGGTAG

```

a K E E P Q T V P E M P G E T P P L S P I -

```

GACATGGAGTCCCAGGAGCGGATCAAGGCGGAGAGGAAGCGCATGAGGAACCGCATCGCT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 420
CTGTACCTCAGGGTCTCGCTAGTTCCGCTCTCCTTCGCGTACTCCTTGCGGTAGCGA

```

a D M E S Q E R I K A E R K R M R N R I A -

```

GCCTCCAAGTGCCGAAAAAGGAAGCTGGAGAGAAATCGCCCGGCTGGAGGAAAAAGTGAAA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 480
CGGAGGTTACGGCTTTTTCTTCGACCTCTCTTAGCGGGCCGACCTCCTTTTTCACTTT

```

a A S K C R K R K L E R I A R L E E K V K -

```

ACCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAGCTGGCGTCCACGGCCAACATGCTAAGGGAACAGGTG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 540
TGAAACTTTTCGAGTCTTGAGCCTCGACCGCAGGTGCCGTTGTACGATTCCTTGTCCAC

```

a T L K A Q N S E L A S T A N M L R E Q V -

```

GCACAGCTTAAACAGAAAAGTCATGAACCACGTTAACAGTGGGTGCCAACTCATGCTAACG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 600
CGTGTGCAATTTGTCTTTTCAGTACTTGGTGCAATTGTCACCCACGGTTGAGTACGATTGC

```

a A Q L K Q K V M N H V N S G C Q L M L T -

BamHI NotI

```

CAGCAGTTGCAAACATTTTACTCGAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 654
GTCGTCAACGTTTGTAAAACCTGAGCTCCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTT

```

a Q Q L Q T F * L E A A A T A V E L Q -

pBlueskript-Fos (1-380):

EcoRI
|

1 CCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGGAAGTGCTGTTTC 60
-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTTCGAACTATAGCTTAAGGACCTTCACGACAAAG

c P L E V D G I D K L D I E F L E V L F Q -

NdeI
|

61 AGGGCCCGCATATGATGTTCTCGGGCTTCAACGCAGACTACGAGGCGTCATCCTCCCGCT 120
-----+-----+-----+-----+-----+
TCCCGGGCGTATACTACAAGAGCCCCGAAGTTGCGTCTGATGCTCCGCAGTAGGAGGGCGA

c G P H M M F S G F N A D Y E A S S S R C -

121 GCAGCAGCGCTCCCCGGCCGGGGATAGCCTCTCTTACTACCACTCACCCGCAGACTCCT 180
-----+-----+-----+-----+-----+
CGTCGTCGCGCAGGGCCGGCCCTATCGGAGAGAATGATGGTGAGTGGGCGTCTGAGGA

c S S A S P A G D S L S Y Y H S P A D S F -

181 TCTCCAGCATGGGCTCGCCTGTCAACGCGCAGGACTTCTGCACGGACCTGGCCGTCTCCA 240
-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGGTTCGTACCCGAGCGGACAGTTGCGCGTCTCTGAAGACGTGCCTGGACCCGCAGAGGT

c S S M G S P V N A Q D F C T D L A V S S -

241 GTGCCAACTTCATTCCCACGGTCACTGCCATCTCG 275
-----+-----+-----+
CACGGTTGAAGTAAGGGTGCCAGTGACGGTAGAGC

c A N F I P T V T A I S -

1 AAAGCGCCTGCAGACCGAAATTGCCAACCTGCTGAAGGAGAAGGAAAACTAGAGTTCAT 60
-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCGCGGACGTCTGGCTTTAACGGTTGGACGACTTCTCTTCTTTTGTATCTCAAGTA

b L Q T E I A N L L K E K E K L E F I -

61 CCTGGCAGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCCCTGATGACCTGGGCTTCCCAGAAGAGAT 120
-----+-----+-----+-----+-----+
GGACCGTTCGAGTGGCTGGACGGACGTTCTAGGGACTACTGGACCCGAAGGGTCTTCTCTA

b L A A H R P A C K I P D D L G F P E E M -

121 GTCTGTGGCTTCCCTTGATCTGACTGGGGGCCTGCCAGAGGTTGCCACCCCGGAGTCTGA 180
-----+-----+-----+-----+-----+
CAGACACCGAAGGGAAGTACTGACCCCGGACGGTCTCCAACGGTGGGGCTCAGACT

b S V A S L D L T G G L P E V A T P E S E -

```

GGAGGCCTTCACCCTGCCTCTCCTCAATGACCCTGAGCCCAAGCCCTCAGTGGAACCTGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCTCCGGAAGTGGGACGGAGAGGAGTTACTGGGACTCGGGTTCGGGAGTCACCTTGGACA
b   E A F T L P L L N D P E P K P S V E P V -

CAAGAGCATCAGCAGCATGGAGCTGAAGACCGAGCCCTTTGATGACTTCCTGTTACCAGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GTTCTCGTAGTTCGTTCGTACCTCGACTTCTGGCTCGGGAAACTACTGAAGGACAATGGTCG
b   K S I S S M E L K T E P F D D F L L P A -

ATCATCCAGGCCAGTGGCTCTGAGACAGCCCGCTCCGTGCCAGACATGGACCTATCTGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TAGTAGGTCCGGGTCACCGAGACTCTGTCTGGGCGAGGCACGGTCTGTACCTGGATAGACC
b   S S R P S G S E T A R S V P D M D L S G -

GTCCTTCTATGCAGCAGACTGGGAGCCTCTGCACAGTGGCTCCCTGGGGATGGGGCCCAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CAGGAAGATACGTTCGTCTGACCCCTCGGAGACGTGTCACCGAGGGACCCCTACCCCGGTA
b   S F Y A A D W E P L H S G S L G M G P M -

GGCCACAGAGCTGGAGCCCTGTGCACTCCGGTGGTCACCTGTACTCCCAGCTGCACCTGC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CCGGTGTCTCGACCTCGGGGACACGTGAGGCCACCAGTGGACATGAGGGTCGACGTGACG
b   A T E L E P L C T P V V T C T P S C T A -

TTACACGTCTTCCTTCGTCTTCACCTACCCCGAGGCTGACTCCTTCCCAGCTGTGCAGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AATGTGCAGAAGGAAGCAGAAGTGGATGGGGCTCCGACTGAGGAAGGGTTCGACACGTGC
b   Y T S S F V F T Y P E A D S F P S C A A -

TGCCACCCGCAAGGGCAGCAGCAATGAGCCTTCCTCTGACTCGCTCAGCTCACCCAC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ACGGGTGGCGTTCCCGTCGTTCGTTCGTTACTCGGAAGGAGACTGAGCGAGTTCGAGTGGGTG
b   A H R K G S S S N E P S S D S L S S P T -

                XhoI  Not I
                |    |
GCTGCTGGCCCTGTGACTCGAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 647
CGACGACCCGGGACACTGAGCTCCGCCGCGGTGGCGCCACCTCGACG
b   L L A L * L E A A A T A V E L -

```

pBlueskript–Fos–bZIP (129–212)

BamHI
|

301 AGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCCATATGCTGGAAGTGCTGTTTCAGG 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCGAACTATAGCTTAAGGACGTTCGGCCCCCTAGGGTATACGACCTTCACGACAAAGTCC

c L D I E F L Q P G G S H M L E V L F Q G -

361 GCCCGGTGGAACAGTTATCTCCAGAAGAAGAAGAGAAAAGGAGAATCCGAAGGGAAAGGA 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGCCACCTTGTC AATAGAGGTCTTCTTCTCTCTTTTCTCTTAGGCTTCCCTTTCCT

c P V E Q L S P E E E E K R R I R R E R N -

421 ATAAGATGGCTGCAGCCAAATGCCGCAACCGGAGGAGGGAGCTGACTGATACTCCAAG 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATTCTACCGACGTTCGGTTTACGGCGTTGGCCTCCTCCCTCGACTGACTATGTGAGGTTT

c K M A A A K C R N R R R E L T D T L Q A -

481 CGGAGACAGACCAACTAGAAGATGAGAAAAGCGCCCTGCAGACCGAAATTGCCAACCTGC 540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCCTCTGTCTGGTTGATCTTCTACTCTTTTTCGCGGGACGTCTGGCTTTAACGGTTGGACG

c E T D Q L E D E K S A L Q T E I A N L L -

541 TGAAGGAGAAGGAAAAACTAGAGTTCATCCTGGCAGCTCACCGACCTGCCTGCAAGATCC 600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCCTCTTCCTTTTTGATCTCAAGTAGGACCGTCGAGTGGCTGGACGGACGTTCTAGG

c K E K E K L E F I L A A H R P A C K I P -

NotI
|

601 CTGATGACCTGGGCTTCTGAGCTGAGCGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAAT 655
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTACTGGACCCGAAGACTCGACTCGCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTTA

c D D L G F * A E R G R H R G G A P -

pBlueskript–Nun–syn

```

                XhoI   NdeI
                |     |
1  GTACCGGGCCCCCTCGAGCATATGCTGATGGTGAAAAAACCATTTATGTGAACCCGG 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CATGGCCCCGGGGGAGCTCGTATACGACTACCACTTTTTTTGGTAAATACACTTGGGCC

c      T G P P L E H M L M V K K T I Y V N P D -

121 ATAGTGGCCAGAACCGCAAAGTGAGCGATCGCGCCTGACGTCTCGCGATCGGCGCCGCA 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TATCACCGGTCTTGGCGTTTCACTCGCTAGCGCCGACTGCAGAGCGCTAGCCGCGGCGT

c      S G Q N R K V S D R G L T S R D R R R I -

181 TTGCGCGCTGGGAAAAACGCATTGCGTACGCGCTGAAAAACGGCGTGACCCCGGGCTTTA 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   AACGCGGACCCTTTTTTCGTAACGCATGCGCGACTTTTTTGCCGCACTGGGGCCCCGAAAT

c      A R W E K R I A Y A L K N G V T P G F N -

MunI
|
181 ACGCAATTGATGATGGCCCGGAATATAAAATTAACGAAGATCCGATGGATAAAGTGGATA 240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TGCGTTAACTACTACCGGGCCTTATATTTTAATTGCTTCTAGGCTACCTATTTTCACCTAT

c      A I D D G P E Y K I N E D P M D K V D K -

241 AAGCGCTGGCGACCCCGTTTCCACGTGATGTGAAAAAATGAAGATGAAAAATATGAAG 300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGCGACCGCTGGGGCAAAGGTGCACTACACCTTTTTTAACTTCTACTTTTTATACTTC

c      A L A T P F P R D V E K I E D E K Y E D -

301 ATGTGATGCATCGCGTGGTGAACCATGCGCATCAGCGCAACCCGAACAAAAATGGAGTT 360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TACACTACGTAGCGCACCCTTGGTACGCGTAGTCGCGTTGGGCTTGTTTTTTACCTCAA

c      V M H R V V N H A H Q R N P N K K W S * -
d      I H H M A H H V M R M L A V R V F F P T -
e      S T I C R T T F W A C * R L G F L F H L -
f      H S A D R P S G H A D A C G S C F I S N -

                HindIII
                |
Bpu1102I
|
361 AAGCTGAGCAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCG 420
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGACTCGTTTGAAGTATAGCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGC

```

pTKK19-λN(1-53)

XbaI
|

1 GGTTCCTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCCATCA 60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAAAGGGAGATCTTTATTA AAAACAAATTGAAATTCCTCCTCTATATGGTACCCGGTAGT

b V S L * K * F C L T L R R R Y T M G H H -

61 TCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATAT 120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTGTCTGCTCGCCGGTATAGCTGCTGCTGCTGTTTCGTATA

b H H H H H H H S S G H I D D D D K H M -

121 GCAAATTTTTGTCAAGACACTGACAGGTAAGACTATAACCCTAGAGGTTGAATCTTCTGA 180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTTTTAAAACAGTTCTGTGACTGTCCATTCTGATATTGGGATCTCCAACCTAGAAGACT

b Q I F V K T L T G K T I T L E V E S S D -

181 CACTATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGTATTCCTCCAGATCAACA 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGATAGCTGTTGCAATTCAGCTTTTAAGTTCTGTTCCCTTCCATAAGGAGGTCTAGTTGT

b T I D N V K S K I Q D K E G I P P D Q Q -

241 AAGATTGATTTTTTGTGGTAAGCAACTGGAAGACGGTAGAACGCTGTCTGATTATAACAT 300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTAACTAAAACGACCATTTCGTTGACCTTCTGCCATCTTGCGACAGACTAATATTGTA

b R L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N I -

301 TCAGAAAGAGTCTACGTTGCATTTGGTGGTGGAGATTGAGAGGTGGAATGGATGCACAAAC 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTCTTTCTCAGATGCAACGTAAACCACAACCTAACTCTCCACCTTACCTACGTGTTTG

b Q K E S T L H L V L R L R G G M D A Q T -

361 ACGCCGCGCGAACGTCGCGCAGAGAAAACAGGCTCAATGGAAAAGCAGCAAATCCCCTGTT 420
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCGGCGCGCTTGCAGCGCTCTCTTTGTCCGAGTTACCTTTTCGTCGTTTAGGGGACAA

b R R R E R R A E K Q A Q W K A A N P L L -

421 GGTTGGGGTAAGCGCAAAACCAGTTAACCGCCCTATTCTCTCGCTGAATCGCAAACCGAA 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAACCCCATTCGCGTTTTTGGTCAATTGGCGGGATAAGAGAGCGACTTAGCGTTTGGCTT

b V G V S A K P V N R P I L S L N R K P K -

Bpu1102I
|

481 ATCACGAGTAGAAAGCGCACTAAATTGAGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGC 540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTGCTCATCTTTCGCGTGATTTAACTCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCG

b S R V E S A L N * A E Q * L A * P L G A -

541 CAACAACGCTGAAGCCGTGATCCTGCGCGAAGATATGCTGCCGCGTGAAAACCTTCGCCCC 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGTGCGACTTCGGCACTAGGACGCGCTTCTATACGACGGCGCACTTTTGAAGGCGGG
 b N N A E A V I L R E D M L P R E N F R P -

601 TGGCGACCGCGTTTCGTGGCGTGCTCTATTCCGTTTCGCCCGGAAGCGCGTGGC 652
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACCGCTGGCGCAAGCACCGCACGAGATAAAGCAAGCGGGCCTTCGCGCACCG
 b G D R V R G V L Y S V R P E A R G -

61 CGACCGCGTTTCGTGGCGTGCTCTATTCCGTTTCGCCCGGAAGCGCGTGCGCGCAACTGTT 120
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCTGGCGCAAGCACCGCACGAGATAAAGCAAGCGGGCCTTCGCGCACCGCGCTTGACAA
 b D R V R G V L Y S V R P E A R G A Q L F -

121 CGTCACTCGTTCCAAGCCGAAATGCTGATCGAACTGTTCCGTATTGAAGTGCCAGAAAT 180
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCAGTGAGCAAGGTTTCGGCCTTTACGACTAGCTTGACAAGGCATAACTTCACGGTCTTTA
 b V T R S K P E M L I E L F R I E V P E I -

181 CGGCGAAGAAGTGATTGAAATTAAGCAGCGGCTCGCGATCCGGGTTCTCGTGCGAAAAAT 240
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCCGCTTCTTCACTAACTTTAATTTTCGTCGCGGAGCGCTAGGCCCAAGAGCACGCTTTTA
 b G E E V I E I K A A A R D P G S R A K I -

241 CGCGGTGAAAACCAACGATAAACGTATCGATCCGGTAGGTGCTTGCGTAGGTATGCGTGG 300
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCGCCACTTTTGGTTGCTATTTGCATAGCTAGGCCATCCACGAACGCATCCATACGCACC
 b A V K T N D K R I D P V G A C V G M R G -

301 CGCGCGTGTTTCAGGCGGTGTCTACTGAACTGGGTGGCGAGCGTATCGATATCGTCCTGTG 360
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCGCGCACAAAGTCCGCCACAGATGACTTGACCCACCGCTCGCATAGCTATAGCAGGACAC
 b A R V Q A V S T E L G G E R I D I V L W -

361 GGATGATAACCCGGCGCAGTTTCGTGATTAACGCAATGGCACCGGCAGACGTTGCTTCTAT 420
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCTACTATTGGGCCGCGTCAAGCACTAATTGCGTTACCGTGGCCGTCTGCAACGAAGATA
 b D D N P A Q F V I N A M A P A D V A S I -

421 CGTGGTGGATGAAGATAAACACACCATGGACATCGCCGTTGAAGCCGGTAATCTGGCGCA 480
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCACCACCTACTTCTATTTGTGTGGTACCTGTAGCGGCAACTTCGGCCATTAGACCGCGT
 b V V D E D K H T M D I A V E A G N L A Q -

481 GCGGATTGGCCGTAACGGTCAGAACGTGCGTCTGGCTTCGCAACTGAGCGGTTGGGAACT 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGCTAACCGGCATTGCCAGTCTTGCACGCAGACCGAAGCGTTGACTCGCCAACCCTTGA

b A I G R N G Q N V R L A S Q L S G W E L -

541 CAACGTGATGACCGTTGACGACCTGCAAGCTAAGCATCAGGCGGAAGCGCACGCAGCGAT 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGCACACTACTGGCAACTGCTGGACGTTTCGATTTCGTAGTCCGCCTTCGCGTGCCTCGCTA

b N V M T V D D L Q A K H Q A E A H A A I -

601 CGACACCTTCACCAAATATCTCGACATCGACGAAGACTTCGCGACTGTTCTGG 653
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTGTGGAAGTGGTTTATAGAGCTGTAGCTGCTTCTGAAGCGCTGACAAGACC

b D T F T K Y L D I D E D F A T V L -

181 AGCGATCGACACCTTCACCAAATATCTCGACATCGACGAAGACTTCGCGACTGTTCTGGT 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGCTAGCTGTGGAAGTGGTTTATAGAGCTGTAGCTGCTTCTGAAGCGCTGACAAGACCA

b A I D T F T K Y L D I D E D F A T V L V -

241 AGAAGAAGGCTTCTCGACGCTGGAAGAATTGGCCTATGTGCCGATGAAAGAGCTGTTGGA 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCTTCTTCCGAAGAGCTGCGACCTTCTTAACCGGATACACGGCTACTTTCTCGACAACCT

b E E G F S T L E E L A Y V P M K E L L E -

301 AATCGAAGGCCCTTGATGAGCCGACCGTTGAAGCACTGCGCGAGCGTGCTAAAAATGCACT 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTAGCTTCCGGAACACTCGGCTGGCAACTTCGTGACGCGCTCGCACGATTTTTTACGTGA

b I E G L D E P T V E A L R E R A K N A L -

361 GGCCACCATTGCACAGGCCAGGAAGAAAGCCTCGGTGATAACAAACCGGCTGACGATCT 420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGTGGTAACGTGTCCGGTCTTCTTTTCGAGCCACTATTGTTTGGCCGACTGCTAGA

b A T I A Q A Q E E S L G D N K P A D D L -

421 GCTGAACCTTGAAGGGGTAGATCGTGATTTGGCATTCAAACCTGGCCGCCCGTGGCGTTTG 480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGACTTGGAACTTCCCCATCTAGCACTAAACCGTAAGTTTGACCGGCGGGCACCGCAAAC

b L N L E G V D R D L A F K L A A R G V C -

481 TACGCTGGAAGATCTCGCCGAACAGGGCATTGATGATCTGGCTGATATCGAAGGGTTGAC 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGCGACCTTCTAGAGCGGCTTGTCCCGTAACTACTAGACCGACTATAGCTTCCCAACTG

b T L E D L A E Q G I D D L A D I E G L T -

541 CGACGAAAAAGCCGGAGCACTGATTATGGCTGCCCGTAATATTTGCTGGTTCCGGTGACGA 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTGCTTTTTTCGGCCTCGTGACTAATACCGACGGGCATTATAAACGACCAAGCCACTGCT

b D E K A G A L I M A A R N I C W F G D E -

BamHI
|

601 AGCGTGAGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGGGTGGAGCTCCAATT 654
-----+-----+-----+-----+-----+-----
TCGCACTCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTTAA

b **A * G S T S S R A A A T A V E L Q** -

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1999 bis April 2002 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere unter Leitung von Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt. Ihm danke ich für die Überlassung der interessanten Themen und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

PD Dr. Heinrich Sticht danke ich für die vielen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, die mir stets wertvolle Denkanstöße gegeben haben und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Philipp Neudecker, Dr. Heinrich Sticht und Dr. Kristian Schweimer möchte ich für die Aufnahme vieler Spektren danken, Philipp Neudecker insbesondere für die Hilfe beim Prozessieren.

Dr. Silke Hoffmann verdanke ich nicht nur fast mein ganzes Labor *know how*, sondern auch noch manch anderen guten Ratschlag.

Dr. Karl-Heinz Gührs und Dr. Bernhard Schlott (IMB Jena) danke ich für die MALDI-TOF-Messungen und die NH₂-terminale Ansequenzierung.

Katrin Lehmann, Andrea Engler, Finn Bauer und Jörg Nerkamp danke ich für die anregenden Diskussionen zum Laboralltag, Petra Deuerling, Nadine Herz und Ulrike Herzing für alle großen und kleinen Handgriffe im Labor (und so manchen Puffer...).

Marc Ehnert, Ulrich Scheckenhofer, Anke Eisenmann, PD Dr. Heinrich Sticht und Philipp Neudecker danke ich für Kaffee, Jörg Nerkamp für Pizza und Eis.

Rainer Hofmann danke ich für die schnelle Lösung der anfallenden Computerprobleme, Gudrun Wagner, Sabine Ruckdäschel und Angela Rösler für die Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Lehrstuhls Biopolymere danke ich für die freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre, die wesentlich dazu beigetragen hat, daß ich mich in der Zeit am Lehrstuhl sehr wohl gefühlt habe.

Abschließend danke ich dem Graduiertenkolleg „Biosynthese der Proteine und Regulation ihrer Aktivität“ und dem SFB 466 für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 17. 04. 2002

Sabine Schwarz

