

**Analyse von kleinen Fusionspartnern zur
Stabilitätserhöhung schwerlöslicher Proteine:
Eine Perspektive für die Strukturanalyse
durch NMR-Spektroskopie?**

Diplomarbeit

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Shinichi Sunagawa
im April 2002
in Frankfurt am Main

Diese Diplomarbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans im Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, in der Zeit von Oktober 2001 bis April 2002 angefertigt.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe.

Ort und Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die funktionelle Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	1
1.2	Probleme bei der Überproduktion von Proteinen	2
1.2.1	Die proteolytische Degradation rekombinanter Proteine	2
1.2.2	Die Bildung von Inclusion Bodies	2
1.3	Optimierung der Überproduktion rekombinanter Proteine	3
1.3.1	Expression in unterschiedlichen Kompartimenten	3
1.3.2	Die Koexpression von Chaperonen	4
1.3.1	Optimierung der Fermentationsbedingungen	5
1.3.2	Rückfaltung <i>in vitro</i>	6
1.4	Überproduktion von Fusionsproteinen	7
1.4.1	Das Maltose-Bindungs-Protein (MBP)	8
1.4.2	Fusionen mit dem Protein D aus dem Bakteriophagen Lambda	10
1.4.3	Fusionen mit dem Protein G (B1) aus <i>Streptococcus</i>	11
1.5	Die DNA-bindenden Regulatorproteine RcsA, RcsF, ArsR und Hha	12
1.6	Aufgabenstellung	13
2.	Material	14
2.1	Oligonucleotide für die PCR	14
2.2	Chemikalien, Puffer- und Lösungen	14
2.3	Medien und Antibiotika	16
2.4	Enzyme (New England Biolabs, Schwalbach)	17
2.5	Standardmarker und Kits	17
2.6	<i>E. coli</i> - Stämme	18
2.7	Expressionsvektoren	18
2.8	Technische Ausstattung	19
2.9	Sonstige Materialien	21
2.10	Online-Datenbanken	22
3.	Methoden	23
3.1	Mikrobiologische Methoden	23
3.1.1	Lagerung und Kultivierung Bakterienstämmen	23
3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	23
3.1.3	Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	24
3.2	Überproduktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	24
3.2.1	Expression im analytischen Maßstab	24

3.2.1.1	Kontrolle einer Klonierung durch Expressionsanalyse	24
3.2.1.2	Analyse der Löslichkeit überproduzierter Proteine	25
3.2.1.3	Optimierung der Expressionsbedingungen	25
3.2.2	Präparative Überproduktion von rekombinanten Proteinen	25
3.2.2.1	Fermentation von Bakterien in LB-Medium	25
3.2.2.2	¹⁵ N-Isotopenanreicherung eines Proteins	26
3.3	Molekulargenetische Methoden	26
3.3.1	Isolierung von DNA	26
3.3.1.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	26
3.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	27
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.3.3	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen	28
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
3.3.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	29
3.3.6	Ligation	29
3.3.7	DNA-Sequenzierung	30
3.3.8	Expressionsvektoren zur Überproduktion rekombinanter Proteine	30
3.3.8.1	Konstruktion von Proteinen mit (His) ₆ -GroES als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pQEGroES	31
3.3.8.2	Konstruktion von Proteinen mit dem Protein GpHD als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pAT037	31
3.3.8.3	Konstruktion von Proteinen mit Protein G (B1) als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pET30-GBF1	32
3.4	Biochemische und Chromatographische Methoden	33
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.4.2	Aufreinigung von Proteinen	34
3.4.2.1	Metal-Chelat-Chromatographie (IMAC)	34
3.4.2.2	Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)	34
3.4.2.3	Gelfiltrationschromatographie (SEC)	35
3.4.3	Aufkonzentrieren und Überprüfung der Stabilität von Proteinen	35
3.5	Spektroskopische Methoden	36
3.5.1	UV/Vis-Spektroskopie	36
3.5.1.1	Protein-Konzentrationsbestimmung	36
3.5.1.2	Quantifizierung von DNA	36
3.5.1.3	Bestimmung der Bakterienkulturdichte (OD ₆₀₀)	36
3.5.2	NMR-Spektroskopische Methoden	36
3.5.2.1	Aufnahme eines homonuklearen ¹ H-Spektrums	36
3.5.2.2	Aufnahme eines heteronuklearen ¹ H ¹⁵ N-TROSY-Spektrums	37

4.	Ergebnisse	38
4.1	Klonierung der Gene <i>rcsA</i>, <i>rcsF</i>, <i>hha</i> und <i>arsR</i> in die Expressionsvektoren pQE30groES, pAT037 und pET30-GBF1	38
4.1.1	Präparation der Expressionsvektoren pQEGroES, pAT037 und pET30GBF1	38
4.1.2	Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate	39
4.1.3	Amplifikation der Ligationsprodukte in <i>E. coli</i>	40
4.1.4	Restriktionsanalysen der konstruierten Plasmide	41
4.1.5	Sequenzanalyse der Plasmide pAT037-hha, pAT037-arsR, pET30-arsR und pQEGroES-arsR	44
4.2	Überexpression der konstruierten Fusionsgene in <i>E. coli</i>	44
4.2.1	Analyse und Optimierung der Expressionsbedingungen	44
4.2.2	Expressionsanalyse der pQEGroES abgeleiteten Plasmide in verschiedenen <i>E. coli</i> - Stämmen	45
4.2.3	Koexpression von (His) ₆ -GroES-RcsF bzw. (His) ₆ -GroES-ArsR mit den Chaperonen GroES und GroEL	47
4.2.4	Expressions- und Löslichkeitsanalyse der pAT037 abgeleiteten Plasmide	48
4.2.5	Expressions- und Löslichkeitsanalyse der pET30-GBF1 abgeleiteten Plasmide in λ(DE3)-lysogenen Wirtsstämmen	50
4.2.6	Zusammenfassung der Expressionsanalysen und Optimierungen	52
4.2.7	Präparative Produktion und Isolierung des Proteins GpHD-Hha	53
4.2.8	Präparative Produktion und Isolierung des Proteins GB1-Hha	56
4.2.9	Stabilitätsanalyse des Proteins GB1-Hha	60
4.2.10	¹⁵ N-Isotopenanreicherung im Protein GB1-Hha	61
4.3	NMR-Spektroskopie	62
4.3.1	Eindimensionale ¹ H-Spektren des Proteins GB1-Hha	62
4.3.2	Analyse des Faltungszustandes des Proteins GB1-Hha durch Aufnahme eines heteronuklearen ¹ H ¹⁵ N-TROSY-Spektrums	63
5.	Diskussion	68
6.	Zusammenfassung (Deutsche Version / English version)	73
7.	Literatur	75
8.	Anhang	83

Verwendete Abkürzungen

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast performance liquid chromatography
h	Stunde
H ₂ O _{milli}	über Millipore-Filtrationsanlage gefiltertes Wasser
IEC	Ion-Exchange-Chromatography
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactosid
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
LB	Luria Broth Base
min	Minute
MWCO	Molecular weight cut off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ori	Origin of replication
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	parts per million
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Size-Exclusion-Chormatography
Tris	Tris(hydroxymethyl)-methylamin
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Die funktionelle Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Als im Jahre 1997 die vollständige Sequenzierung des ca. 4,6 mio. Basenpaare umfassenden *E. coli*-Genoms Schlagzeilen machte, galt dies noch als eine sensationelle Errungenschaft der modernen Biotechnologie. Nur wenige Jahre später wurde die Entschlüsselung des menschlichen Genoms mit einer Anzahl von etwa 35 000 Genen bekannt gegeben (Venter *et al.*, 2001). Einhergehend steigt stetig die Anzahl identifizierter Gene, und in Anbetracht dieser rasanten Entwicklung gewinnt die Funktions- und Strukturanalyse der von ihnen codierten Proteine immer mehr an Bedeutung (Lesley, 2001).

Durch die fortgeschrittene Entwicklung der rekombinanten DNA-Technik ist es möglich, Proteine durch Transformation von Mikroorganismen in großen Mengen zu produzieren. In vielen Fällen wird hierfür das gram-negative Bakterium *E. coli* als Wirtsorganismus verwendet, da es eine Vielzahl von sowohl praktischen, als auch finanziellen Vorteilen bietet. Darunter zählt sein schnelles Wachstum mit kostengünstigen Substraten zu hohen Zelldichten, seine intensiv erforschte Genetik und damit zusammenhängend, die Verfügbarkeit mehrerer Mutanten mit unterschiedlichsten Eigenschaften (Baneyx, 1999). Aufgrund der Entwicklung geeigneter Expressionsvektoren und gleichzeitiger Zunahme profunder Kenntnisse über den Proteinsynthese-Apparat, ist die Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* zu einer vielfach angewandten Technik geworden (Georgiou und Valax, 1996).

Dennoch, es gibt keinerlei Garantien, daß die Überproduktion zu einer Anreicherung des rekombinanten Proteins in einem a.) korrekt gefalteten, b.) löslichen und c.) biologisch aktiven Zustand führt. Dies sind jedoch Voraussetzungen für die Anwendung von Techniken, wie die kristallographische Röntgenstrukturanalyse oder magnetische Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie), mit Hilfe derer es möglich ist, die Struktur von Proteinen zu bestimmen. Zusätzlich erfordern diese Methoden sehr hohe Proteinkonzentrationen, was eine Überproduktion und Isolierung von mehreren Milligramm des gewünschten Proteins notwendig macht. Man trifft jedoch gerade in dieser Hinsicht auf eine Anzahl grundlegender Probleme. Beispielsweise sind rekombinante Proteine oft toxisch für den Wirtsorganismus und werden direkt nach ihrer Synthese proteolytisch abgebaut (Sachdev und Chirgwin, 1997). Weiterhin beobachtet man des öfteren, infolge unkorrekter Ausbildung der dreidimensionalen Struktur, die Bildung von Aggregaten unlöslicher Proteine in Form von Einschlußkörperchen, den sogenannten

„Inclusion Bodies“. Schließlich gestaltet sich häufig die effiziente Isolierung der Zielproteine aus der deutlichen Überzahl wirtseigener Proteine als eine nicht einfach zu lösende Aufgabe. Zur Überwindung dieser Probleme wurde viel Forschungsarbeit investiert und die unterschiedlichsten Ansätze entwickelt, um die Überproduktion funktioneller Proteine zu ermöglichen (Hannig und Makrides, 1998).

1.2 Probleme bei der Überproduktion von Proteinen

1.2.1 Die proteolytische Degradation rekombinanter Proteine

Der proteolytische Abbau von fehlerhaft gefalteten oder irreparabel beschädigten Proteinen ist ein natürlicher katabolischer Weg, um die zellulären Reserven an freien Aminosäuren zu konservieren.

Im Cytoplasma von *E. coli* sind im wesentlichen fünf ATP-abhängige Hitzeschockproteine (Hsps) an der frühen Degradation von Proteinen beteiligt: Lon/La, FtsH/HflB, ClpAP, ClpXP und ClpYQ/HslUV (Gottesman, 1996). Die Proteasen ClpAP, ClpXP und FtsH/HZflB sind hauptsächlich für den Abbau von Proteinen verantwortlich, die durch das Anfügen unpolare Peptidketten am C-Terminus durch das SsrA-System (Herman *et al.*, 1998) modifiziert worden sind. Dagegen scheint der Mechanismus von Lon/La und ClpYQ/HslUV unspezifischerer Natur zu sein (Gottesman, 1996).

1.2.2 Die Bildung von Inclusion Bodies

Einschlußkörperchen sind sehr dichte Partikel aggregierter Proteine (Abb. 1.1), die sich typischerweise bilden, wenn überproduzierte rekombinante Proteine in der Zelle nicht mehr in löslicher Form toleriert werden können (Mogk *et al.*, 2001).

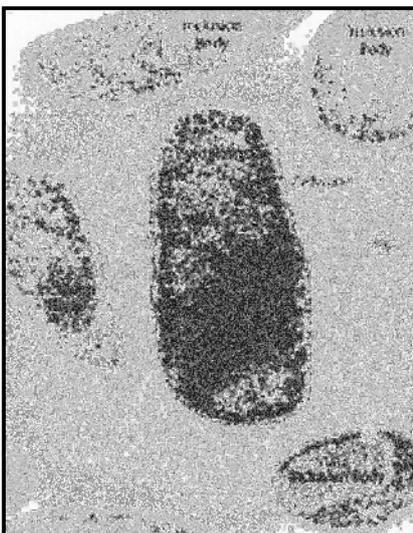


Abbildung 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bakterienzellen mit Inclusion Bodies (A. Mogk, M. P. Mayer, E. Deuerling, 2001).

Versuche die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Einschlusskörperchen mit intrinsischen Eigenschaften des Proteins, wie Größe, relative Hydrophobizität oder seinem Ursprung, aber auch mit den Eigenschaften des Wirtsorganismus oder des Expressionssystems zu korrelieren, blieben im Allgemeinen ergebnislos. Auch homologe, cytosolische Proteine bilden bei hoher Expressionsrate Einschlusskörperchen, daher scheint die Konzentration an nicht-nativen Polypeptiden der maßgebliche Faktor für die Aggregation zu sein. Nach diesen Erkenntnissen wurden kinetische Studien zur Bildung von Einschlusskörperchen durchgeführt. Diese führten zu dem Ergebnis, daß die Ausbeute an korrekt gefalteten Proteinen ausschließlich von ihrer Synthese-, Faltungs-, und kompetitiven Aggregationsrate abhängig ist (Rudolph und Lilie, 1996).

1.3 Optimierung der Überproduktion rekombinanter Proteine

Zur Verbesserung der Überproduktion rekombinanter Proteine in löslicher Form sind zahlreiche Modifikationen möglich. Das größte Problem hierbei ist, daß sich keine allgemeingültige Strategie entwickeln läßt, die sich auf die Überproduktion aller Proteine übertragen ließe. Vielmehr ist es die individuelle Eigenschaft eines jeden Proteins, die darüber entscheidet, ob mit den im Folgenden beschriebenen Methoden eine Verbesserung der Überproduktion erzielt werden kann, oder nicht. Dazu zählen die Expression in proteasedefizienten Wirtsstämmen (Meerman und Georgiou, 1994), das Dirigieren der Proteine in den Extrazellulärraum bzw. ins Periplasma, die Koexpression von Chaperonen, Optimierung der Fermentationsbedingungen oder die Konstruktion von N- oder C-terminalen Fusionsproteinen (Baneyx, 1999). Alternativ erweist sich in einigen Fällen auch die *in vitro* Rückfaltung von Inclusion Bodies als praktikabel (Rudolph und Lilie, 1996).

1.3.1 Expression in unterschiedlichen Kompartimenten

Neben der generellen Möglichkeit rekombinante Proteine im Cytosol von *E. coli* zu überproduzieren, können bestimmte Genprodukte auch durch Fusion mit einem Signalpeptid aus der Zelle ins Periplasma oder in den Extrazellulärraum geleitet werden (Murby *et al.*, 1996). In diesen oxidativen Kompartimenten ist zum einen die Faltung von Proteinen durch vereinfachte Disulfidbrückenbildung begünstigt, zum anderen ist hier ihre Isolierung wesentlich unkomplizierter als aus dem Cytosol. Doch nicht alle Proteine lassen sich durch Anfügen eines Signalpeptids sekretieren und außerdem ist die Bildung von Einschlusskörperchen auch im Periplasma nicht auszuschließen (Murby *et al.*, 1994). Die Wahl, in welchem Kompartiment die

Anreicherung des Proteins erfolgen soll, ist daher mit der Abwägung von diversen Vor- und Nachteilen (Tab. 1.1) verbunden (Hanning und Markrides, 1998).

Tabelle 1.1 Vor- und Nachteile der Proteinproduktion in unterschiedlichen Kompartimenten

Kompartiment	Vorteile	Nachteile
Cytoplasma	<ul style="list-style-type: none"> · Einschlußkörperchen: einfache Isolierung · Schutz vor Proteasen · Protein inaktiv bzw. nicht toxisch · höhere Ausbeute · einfachere Plasmidkonstrukte 	<ul style="list-style-type: none"> · Einschlußkörperchen: Protein-Faltung unkorrekt · anschließende Renaturierung · Disulfidbrückenbildung schwierig · hohe Gefahr der Proteolyse · Isolierung komplex
Periplasma	<ul style="list-style-type: none"> · rel. einfache Aufreinigung · Proteolyse geringer als im Cytoplasma · Bildung von Disulfidbrücken erleichtert 	<ul style="list-style-type: none"> · Sekretion nicht immer möglich · Bildung von Einschlußkörperchen nicht ausgeschlossen
Extrazellulärraum	<ul style="list-style-type: none"> · einfachere Aufreinigung · praktisch keine Proteolyse · Bildung von Disulfidbrücken erleichtert 	<ul style="list-style-type: none"> · sehr starke Verdünnung der Proteine

1.3.2 Die Koexpression von Chaperonen

Molekulare Chaperone unterstützen die Faltung von Proteinen zu ihrer dreidimensionalen Struktur. Am besten verstanden sind die ATP-abhängigen DnaK/DnaJ/GrpE- und GroEL/GroES-Systeme im Cytoplasma von *E. coli*. Sie interagieren mit hydrophoben Bereichen von Faltungsintermediaten und verhindern dadurch die Aggregation von Proteinen, was schließlich die Ursache der Bildung von Inclusion Bodies ist. Andere Chaperone katalysieren geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Protein-Faltung. Zu diesen zählen die Peptidyl-Propyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen) SlyD, SlpA und TF (Hottenrott *et al.*, 1997, Stoller *et al.*, 1995), welche die cis/trans-Isomerisierung an Prolin-Peptidbindungen katalysieren und die Disulfidisomerasen Thioredoxin 1 und 2, Glutaredoxin 1, 2, 3, DsbA und DsbC, die für die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken verantwortlich sind (Åslund und Beckwith, 1999).

Die gemeinsame Überproduktion von Chaperonen und Zielprotein im Expressionsstamm führte in einer Vielzahl von Versuchen zur Erhöhung der Ausbeute an biologisch funktionellen rekombinanten Proteinen (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2 Ausgewählte Beispiele für die erfolgreiche Überproduktion funktioneller Proteine durch die Koexpression von Chaperonen

Chaperon	Überproduktion von	Ergebnis	Referenz
Gro EL/Gro ES	Neuronale NO-Synthase der Ratte	Produktion von 20-24 mg/l aktivem Enzym, mit Co-Faktoren, ohne Koexpression im wesentlichen unlöslich	Roman <i>et al.</i> , 1995
	Rubisco	6% des gesamten Zellproteins besteht aus löslichem Rubisco. <i>A.nidulans</i> , Chaperone erhöhen Löslichkeit	Wickner <i>et al.</i> , 1994
	Ferredoxin NADP-Oxidoreduktase	Koexpression von GroES/EL aus <i>Chromatium vinosum</i> erhöht die Produktion von aktivem Enzym auf das 12-fache im Vgl. zur Kontrolle	Carrillo <i>et al.</i> , 1992
	α -Ketosäure-Dehydrogenase- Kinase (mit MBP fusioniert)	3 bis 4-fache Erhöhung der Expression durch Koexpression von GroES/EL	Davie <i>et al.</i> , 1995
DnaK	HGH – Human growth hormone	Koexpression von DnaK erhöht den löslichen Anteil von 5% auf 85%	Blum <i>et al.</i> , 1992
GroES/Gro EL und DnaK	Protein Tyrosin Kinasen	Erhöhung der Löslichkeit von Csk, Fyn und Lck durch Koexpression	Lee und Olins, 1992
DsbA	α -Amylase / trypsin inhibitor	Durch Koexpression und Zugabe von Glutathion erhöht die Produktion von löslichem Protein auf das 14-fache	Wunderlich und Glockshuber, 1993

1.3.3 Optimierung der Fermentationsbedingungen

Da die Wechselwirkung zwischen hydrophoben Bereichen für die Bildung von Einschlußkörperchen verantwortlich gemacht wird, scheint die Reduktion der Expressionsrate, durch Senkung der Wachstums- und Induktionstemperatur die korrekte Faltung zu begünstigen und gleichzeitig die Aktivität proteolytischer Enzyme zu senken (Dalbøge *et al.*, 1989). Dies steht auch im Einklang mit Versuchen, in denen die Expression bei niedrigeren Temperaturen zu einer deutlichen Steigerung korrekt gefalteter Produkte führte. Beispielsweise konnte die Ausbeute an rekombinanten Antikörper-Fragmenten (F_{ab} -Fragmente) durch Wachstum und Induktion bei 21°C anstatt 37°C um den Faktor 10 erhöht werden (Cabilly, 1989). Man kann jedoch nicht davon ausgehen, daß es sich hierbei um einen Regelfall handelt, da neben der Temperatur auch die Zusammensetzung des Wachstumsmediums, die Methode der Expressionsinduktion, der Induktionszeitpunkt und schließlich die Dauer der Expression eine wesentliche Rolle spielen (Donovan *et al.*, 1996).

Eine Zusammenfassung der angesprochenen Probleme und Lösungsansätze zur Überproduktion rekombinanter Proteine im löslichen Zustand, durch Reduktion der Proteolyse bzw. der Bildung von Inclusion Bodies, ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

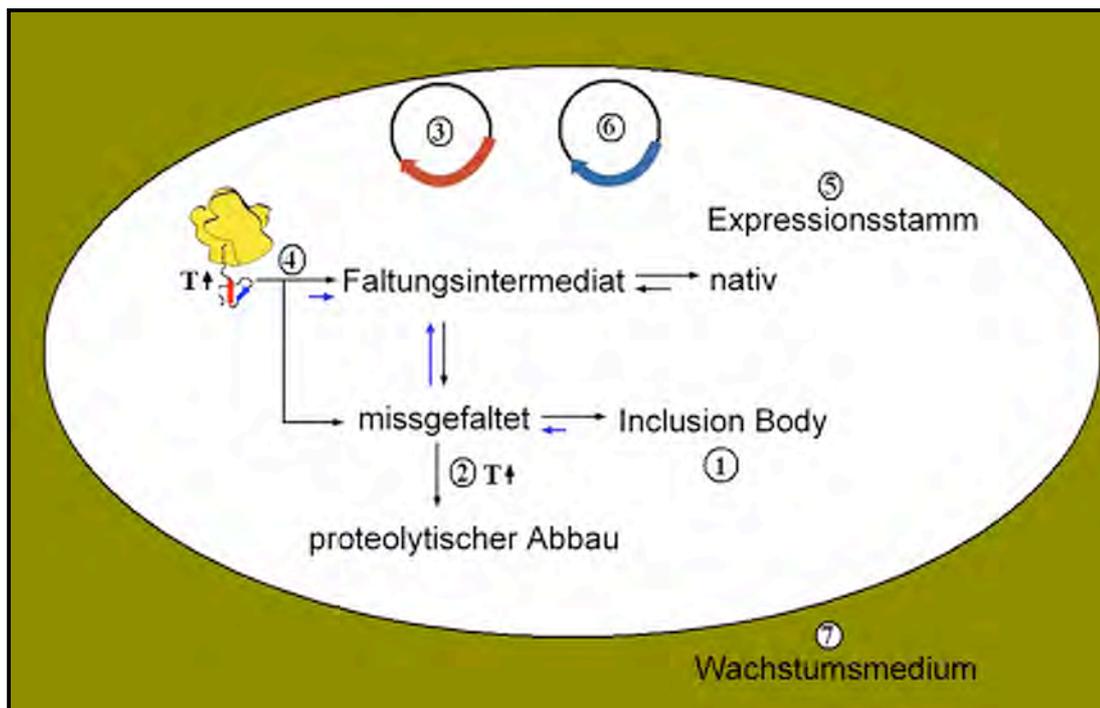


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Überproduktion rekombinanter Proteine ohne (3) und mit (3+6) Koexpression von Chaperonen

Die Bildung von Inclusion Bodies (1) hängt von Faktoren, wie Proteinproduktionsrate (4), proteolytischer Abbau missgefalteter Proteine (2), Temperatur (T) oder korrekte Faltung durch Chaperone ab. Die blauen Pfeile zeigen Reaktionswege, die eventuell durch die Anwesenheit von Chaperonen begünstigt werden können. Des Weiteren sind für eine erfolgreiche Überexpression die Wahl des Expressionsvektors (3) und -stammes (5), die Fermentationsbedingungen wie Temperatur (T) und die Zusammensetzung des Wachstumsmediums (7) von signifikanter Bedeutung.

1.3.4 Rückfaltung *in vitro*

In manchen Fällen sind die oben genannten Optimierungsmethoden jedoch nicht ausreichend, um die Bildung von Einschlusskörperchen zu vermeiden, was vor allem bei Proteinen, die Disulfidbrücken ausbilden der Fall ist (Lilie *et al.*, 1998).

Eine Alternative zur Gewinnung von rekombinanten Proteinen stellt die *in vitro* Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörperchen dar. Diese machen bei der Überproduktion bis zu 50% des Gesamtzellproteins aus (Rudolph, 1995) und enthalten fast ausschließlich das gewünschte Produkt. Zudem besteht die einfache Möglichkeit, Einschlusskörperchen aufgrund ihrer hohen Dichte (ca. 1,3 mg/ml), durch Zentrifugation nach Aufschluß der Wirtszellen zu isolieren (Mukhopadhyay, 1997).

Obwohl durch dieses Verfahren potentiell sehr hohe Ausbeuten erzielt werden können, ist der entscheidende Nachteil, daß das Protein zunächst aus dem Aggregat, z.B. in hochkonzentrierten Guanidiniumchlorid- oder Harnstofflösungen solubilisiert und anschließend in seine native dreidimensionale Struktur gefaltet werden muss (Rudolph *et al.*, 1997). Dies kann durch starke Verdünnung oder Dialyse in bzw.

gegen einen Renaturierungspuffer erreicht werden, wobei die korrekte Faltung trotzdem nicht garantiert ist. Der zusätzliche Einsatz von Chaperonen erhöht zwar die Erfolgchancen dieser Prozedur, ist jedoch gleichzeitig mit hohen Kosten verbunden (Lilie *et al.*, 1998).

1.4 Überproduktion von Fusionsproteinen

Obwohl Fusionsysteme (Vektoren zur Expression von Fusionsgenen) ursprünglich entwickelt wurden, um die Aufreinigung von Proteinen zu erleichtern, wurde bald offensichtlich, daß bestimmte Fusionspartner in der Lage sind, die Löslichkeit eines Proteins erheblich zu steigern. Die Möglichkeit auf diese Weise Proteine, die sonst in Inclusion Bodies akkumulieren würden, in löslicher Form zu überproduzieren, war schnell erkannt und geeignete Expressionsvektoren wurden konstruiert und kommerzialisiert. Zu den prominentesten unter ihnen zählen die Glutathion S-Transferase (GST), Thioredoxin (TrxA), Ubiquitin oder das Maltose-Bindungs-Protein (MBP).

Darüber hinaus wird in letzter Zeit immer häufiger von neu entdeckten, löslichkeitssteigernden Fusionspartnern wie DsbA (Zhang *et al.*, 1998), NusA (Davis *et al.*, 1999), Protein D (Forrer und Jaussi, 1998), oder Protein G (B1) (Zhou *et al.*, 2000) berichtet, was die Aktualität dieser Technik unterstreicht. Sie stehen alle im Verdacht die Faltung der Zielproteine entweder durch ihre hohe Löslichkeit oder durch Rekrutierung zellulärer Chaperone zu fördern (Baneyx, 1999), und dadurch die Bildung von Inclusion Bodies zu reduzieren. Im Falle von MBP wird sogar die potentielle Funktion eines „intramolekularen Chaperons“ diskutiert (Kapust und Waugh, 1999).

Tabelle 1.3 Beispiele löslichkeitserhöhender Fusionspartner

Fusionspartner	Größe [kD]	Referenz
Thioredoxin (TrxA)	11,8	(LaVallie <i>et al.</i> , 1993)
Glutathione-S-Transferase (GST)	26	(Smith und Johnson, 1988)
Maltose-Bindungs-Protein (MBP)	40,6	(Kapust und Waugh, 1999)
NusA	54,4	(Davis <i>et al.</i> , 1999)
DsbA	21,1	(Zhang <i>et al.</i> , 1998)
Protein G (B1)	6,4	(Zhou <i>et al.</i> , 2000)
Protein D	11,6	(Forrer und Jaussi, 1998)

1.4.1 Das Maltose-Bindungs-Protein (MBP)

Das im periplasmatischen Raum von *E. coli* lokalisierte, ~40 kD große Maltose-Bindungs-Protein ist für die Bindung und anschließende Beförderung von Maltooligosacchariden zum transmembranären Maltose/Maltrodextrin-Transportsystem verantwortlich (Boss und Shuman, 1998). Neben seiner natürlichen Funktion hat es sich mehrfach als löslichkeitssteigernder Fusionspartner bewährt und übertrifft in dieser Eigenschaft auch andere Proteine wie GST oder TrxA (Kapust und Waugh, 1999), wobei die Reihenfolge der Fusionierung (C- oder N-terminal) ebenfalls drastische Auswirkungen haben kann (Hayhurst, 1999).

Kapust und Waugh postulierten im Jahre 1999, daß der stabilisierende Effekt durch das MBP nicht nur auf seine hohe Löslichkeit zurückzuführen sei, sondern auch intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Zielprotein eine wesentliche Rolle spielten (Kapust und Waugh, 1999). Das MBP besitzt mehrere hydrophobe Regionen auf seiner Oberfläche (Sprulino *et al.*, 1991) und weiterhin eine hydrophobe Tasche zwischen zwei annähernd symmetrischen Domänen, welche auch den Ort der natürlichen Substratbindung darstellt (Abb. 1.3).

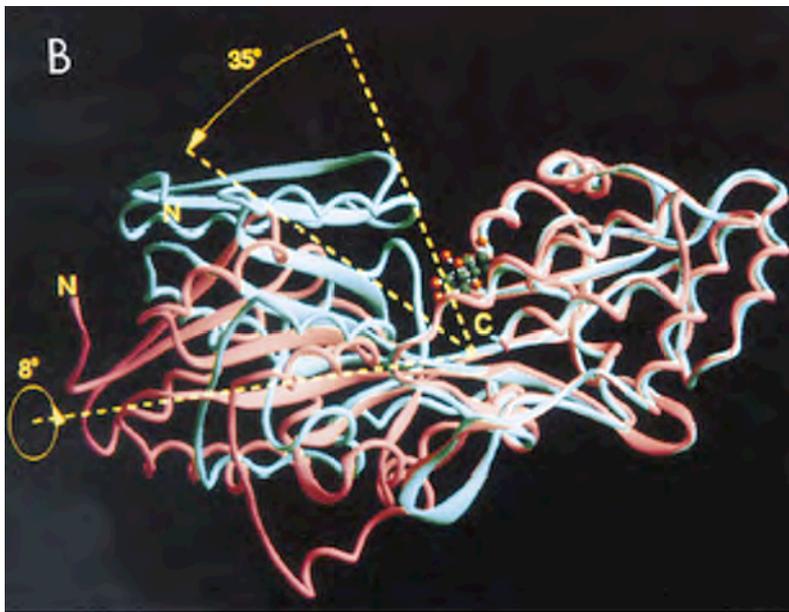


Abbildung 1.3 Konformationsänderung des Maltose-Bindungs-Proteins durch Substratbindung
Das ~40 kD große Maltose-Bindungs-Protein bindet seine Substrate in einer hydrophoben Tasche unter Ausführung einer relativen Beuge- (35°) und Drehbewegung (8°) der beiden Domänen zueinander. Das Peptidrückgrat ist in offener (rot) und mit gebundenem Maltosemolekül in geschlossener Form (blau) dargestellt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Analogie zum Chaperon GroEL, das ebenfalls eine hydrophobe Tasche besitzt in der Faltungsintermediate gebunden werden (Abb. 1.4). Dies läßt vermuten, daß die hydrophoben Regionen des MBPs mit unvollständig gefalteten Zielproteinen wechselwirken und dadurch die Funktion eines intramolekularen Chaperons ausüben könnten.

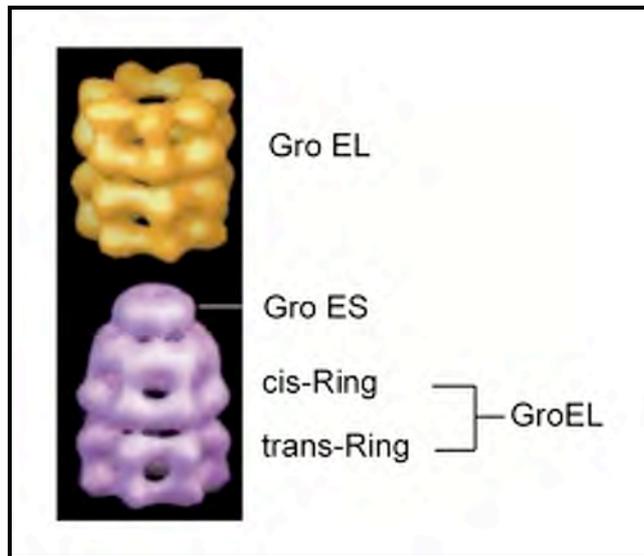


Abbildung 1.4 Das GroEL / GroES-System

Das tonnenförmige Chaperon GroEL (orange) besteht aus zwei übereinanderliegenden heptameren Ringen (cis- und trans-Ring) die einen hydrophoben Hohlraum bilden, in dem das unvollständig gefaltete Polypeptid gebunden wird. Die Anlagerung des 10 kD kleinen Co-Chaperons GroES, ebenfalls ein Heptamer, führt unter kooperativer ATP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung der Untereinheiten (lila), wodurch es vermutlich zu einer Entfaltung des Substrats kommt. Es wird angenommen, daß dadurch ungünstige hydrophobe Interaktionen gelöst werden und das Protein die Gelegenheit bekommt, sich korrekt zu falten (verändert, nach Mogk *et al.*, 2001).

Durch den Einsatz des MBPs kann bei der Überproduktion rekombinanter Proteine eine Reduktion der Bildung von Inclusion Bodies erreicht werden, doch prinzipiell ist die Untersuchung eines Proteins in seinem nativen Zustand, d. h. ohne Modifikationen erwünscht. In der Regel wird daher das MBP wieder abgespalten. In vielen Fällen führt dies jedoch dazu, daß das Zielprotein aufgrund seiner Instabilität bzw. Unlöslichkeit wieder ausfällt. Prinzipiell könnte man auch versuchen, das gesamte Fusionskonstrukt aus MBP und Zielprotein zu analysieren. Im Falle NMR-spektroskopischer Untersuchungen stößt man jedoch auf folgendes Problem: die maximale Größenbeschränkung dieser Methode liegt bei etwa 30 - 40 kD (Huth *et al.*, 1997) und durch die Tatsache, daß das MBP mit seinen ca. 40 kD dieses Größenlimit bereits erreicht, wird eine Strukturbestimmung seiner Fusionskonstrukte unmöglich. Auch eine funktionelle Verkürzung des MBPs scheint in Anbetracht seiner komplexen Faltungsstruktur und Konformationsdynamik relativ aussichtslos (Duan *et al.*, 2001).

1.4.2 Fusionen mit dem Protein D aus dem Bakteriophagen Lambda

Das Protein D (GpD) des Bakteriophagen λ ist ein kleines (11,6 kD) Kapsid-Protein, das für die korrekte Morphogenese des Phagenkopfes essentiell ist. Ein Derivat mit einer Serie von Histidin-Resten am N-Terminus (GpHD) zeigte sich als effektiver Fusionspartner zur Überproduktion rekombinanter Proteine (Forrer und Jaussi, 1998). Nach Überproduktion und anschließender Abspaltung des Zielproteins konnte kürzlich die Kristallstruktur eines am Eisen- und Vitamin B₁₂-Import von *E. coli* beteiligten Proteins bestimmt werden und dadurch das Modell dieses Transportmechanismus erweitert werden (Chang *et al.*, 2001). Neben der Strukturbestimmung durch Röntgenkristallographie (Abb. 1.5) konnten vor allem auch NMR-spektroskopische Messungen bei einer relativ hohen Konzentration von 1,3 mM durchgeführt werden, was auf eine hohe Stabilität des Proteins hindeutet (Yang *et al.*, 2000). Diese Eigenschaften machen es zu einem interessanten Fusionspartner zur Strukturaufklärung schwieriger Proteine in Form eines Fusionsproteins.

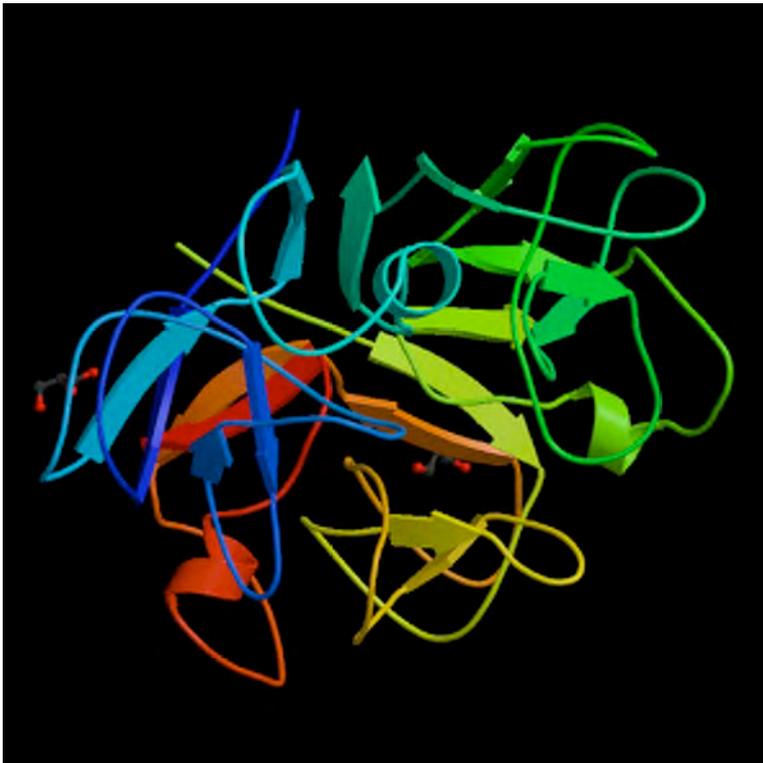


Abbildung 1.5 Dreidimensionale Struktur des Protein D

Das Protein D des Phagen Lambda besteht aus einer α -Helix und 7 kurzen β -Faltblättern. Auffällig ist sein relativ hoher Anteil unstrukturierter Regionen (ca. 65%). Die Struktur wurde durch Röntgenstrukturanalyse von Yang *et al.* im Jahre 2000 aufgeklärt.

1.4.3 Fusionen mit dem Protein G (B1) aus *Streptococcus*

Die 56 Aminosäuren umfassende B1-Domäne des Proteins G (GB1) aus dem Bakterium *Streptococcus* stellt eine extrem stabile, globuläre Faltungseinheit (Schmelztemperatur 87 °C, reversibel) aus vier β -Faltblättern und einer langen α -Helix dar. Die geringe Größe, die hohe Löslichkeit und das Fehlen von Disulfidbrücken und Prolin-Seitenketten macht dieses Polypeptid zu einem besonders attraktiven Fusionspartner zum Zwecke der Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie (P. Zhou *et al.*, 2001). Ferner wurde seine dreidimensionale Struktur im Jahre 1991 aufgeklärt (Abb. 1.6), wodurch die Zuordnung von Signalen des Zielproteins relativ einfach ist. Aus diesem Grund kann bei Fusionierung mit GB1 durch Aufnahme eines ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum vergleichsweise schnell und einfach ermittelt werden, ob das Zielprotein in einem gefalteten, strukturell intakten Zustand überproduziert wurde (Gronenborn *et al.* 1996).

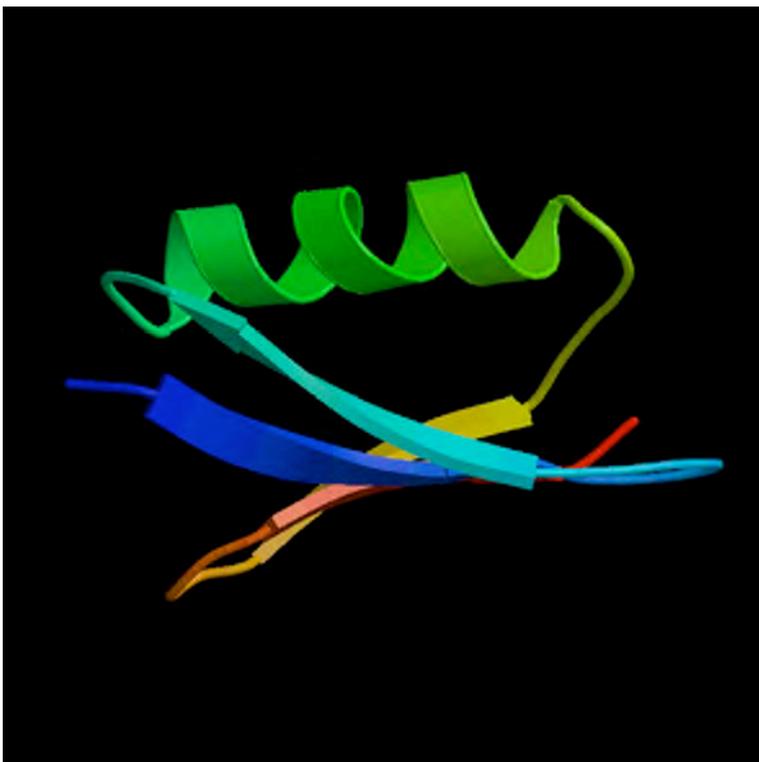


Abbildung 1.6 Dreidimensionale Struktur des Protein G (B1)

Die Struktur wurde durch NMR-Spektroskopie im Jahre 1991 von Gronenborn und Clore aufgeklärt.

Als weitere Besonderheit ist zu erwähnen, daß die Kristallstruktur eines Antikörper-F_{ab}-Fragmentes (komplexiert mit seinem Antigen) mit fusioniertem GB1 bestimmt worden ist (Derrick, 1999), während ähnliches bislang mit Fusionskonstrukten von MBP, GST, etc. nicht gelungen ist.

1.5 Die DNA-bindenden Regulatorproteine RcsA, RcsF, ArsR und Hha

Während einige Gene des Bakteriengenoms konstitutiv exprimiert werden unterliegt die Aktivität anderer Gene einer genauen Regulation. Diese Gene stehen oft im Zusammenhang mit der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Die Expression ihrer Produkte wird unter anderem durch DNA-bindende Regulatorproteine gesteuert, indem sie die Transkription bestimmter Gene positiv oder negativ beeinflussen.

So sind beispielsweise viele Bakterien in der Lage, auf ihrer Oberfläche Kapseln zu bilden, die aus polymeren Polysacchariden bestehen. Im Falle von *E. coli* und anderer Enterobakterien konnten einige Proteine identifiziert werden, die an der Regulation der Kapselbildung beteiligt sind. Sie werden allgemein als Rcs-Proteine (Rcs = regulator of capsule synthesis) bezeichnet. Zu ihnen gehören unter anderem die Proteine RcsA, RcsB, RcsC und RcsF. Das 23 kD große Protein RcsA besitzt ein Helix-Loop-Helix-DNA-Bindungsmotiv und fungiert zusammen mit RcsB als Heterodimer auf Transkriptionsebene als positiver Regulator (O. Kelm *et al.*, 1997). Auch das 14 kD große RcsF-Protein ist imstande die Kapselbiosynthese zu induzieren, wobei die Anwesenheit von RcsA erforderlich ist (Gervais und Drapeau, 1992).

Enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC-Stämme) können den Virulenzfaktor α -Hämolysin produzieren, ein Toxin, das seinen Namen aufgrund seiner Eigenschaft erhielt, *in vitro* rote Blutkörperchen lysieren zu können. Dabei spielt das DNA-bindende Protein Hha (8 kD) durch seine Modulation des thermisch-osmolytisch regulierten Hämolysinoperons eine entscheidende Rolle (Mourino *et al.*, 1996). Seine inhibitorische Wirkungsweise wurde mehrfach durch die erhöhte Hämolysinproduktion bei *hha* Mutanten bestätigt (Nieto *et al.*, 2000).

Das metallsensorische DNA-Regulatorprotein ArsR (13 kD) ist ein Repressor des *ars*-Operons, welches für ein Transportsystem codiert, das toxische Oxyanionen der Metalle Arsen (AsO_2^- , AsO_4^{3-}) oder Antimon (SbO_2^-) unter ATP-Verbrauch aus der Zelle befördert und somit das Bakterium resistent gegen diese Metalle macht. Nach Induktion durch diese Metalle verlässt der als Homodimer gebundene Repressor seine Bindungsstelle und gibt somit die Gene, die unter der Kontrolle des *ars*-Operons stehen, zur Transkription frei (Wu und Rosen, 1993).

1.6 Aufgabenstellung

Eine Strukturbestimmung der Proteine RcsA, RcsF, Hha und ArsR war bisher aufgrund ihrer Unlöslichkeit, schlechter Produktionsrate bzw. Instabilität nicht möglich. Beim Versuch sie mit einem N-terminalen (His)₆-Tag zu überproduzieren zeigte sich, daß sie als Inclusion Bodies aggregieren. Durch den Einsatz des Maltose-Bindungs-Proteins war zwar ihre Überproduktion in einem löslichen Zustand möglich, doch aufgrund der Größe der Fusionsproteine war die Abspaltung vom Zielprotein erforderlich, um es für NMR-spektroskopische Untersuchungen zugänglich zu machen. Nach dem Abspalten fielen die Proteine jedoch unmittelbar wieder aus (F. Bernhard, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt).

Daher war das primäre Ziel dieser Arbeit diese unlöslichen Proteine am N-Terminus mit den kleineren Fusionspartnern GpHD (Forrer und Jaussi, 1998) und GB1 (Zhou *et al.*, 2001) zu fusionieren, um ihre Löslichkeit und Stabilität zu erhöhen. Durch die relativ geringe Größe als Fusionsprotein wären NMR-spektroskopische Untersuchungen ohne ihre vorherige Abspaltung möglich und somit ein Weg gefunden, Strukturbestimmungen dieser schwerlöslichen Proteine zu ermöglichen. Neben diesen bereits in der Literatur bekannten Fusionspartnern, sollte das Potential der N-terminalen Fusionierung des Chaperons GroES für diese Absicht untersucht werden. Abgesehen von seiner geringen Größe (10 kD) bestand durch die bekannte Wechselwirkung mit dem Chaperon GroEL besonders große Hoffnung es als löslichkeitssteigernden Fusionspartner einzusetzen.

Diese Zielsetzung schloß zunächst die Klonierung der Gene *rcaA*, *rcaF*, *hha* und *arsR* in die Expressionsvektoren pAT037 (GpHD), pET30 (GB1) und pQEGroES (GroES) ein. Anschließend wurden mit den neu konstruierten Vektoren unterschiedliche *E. coli*-Stämme transformiert und die Zweckmäßigkeit dieser Systeme durch Überexpressionen und Löslichkeitsanalysen untersucht. Dies beinhaltete auch die Optimierung der Expressionsbedingungen durch Variation des Induktionszeitpunktes bzw. der Induktionstemperatur, sowie die Analyse des Einflusses der Koexpression von Chaperonen. Nach dieser Optimierung sollten Proben hergestellt werden, die für NMR-spektroskopische Untersuchungen geeignet sind. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei der NMR-Spektroskopie um eine relativ unempfindliche Methode handelt, benötigt man hochkonzentrierte Proteinproben (bis zu 1 mM). Dies erforderte das Erstellen eines effizienten Produktions- und Aufreinigungsschemas mit anschließender Aufkonzentrierung und gleichzeitiger Kontrolle der Stabilität. Die erhaltenen Proben sollten anschließend zur Aufnahme homonuklearer ¹H-, bzw. nach Anreicherung der Proteine mit dem Stickstoffisotop ¹⁵N, auch für heteronukleare ¹H¹⁵N-Korrelationsspektren dienen, um Aussagen über den Faltungszustand der Fusionsproteine machen zu können.

2. Material

2.1 Oligonucleotide für die PCR

Die verwendeten Oligonucleotide (Tab. 1) wurden von der Firma Sigma-ARK GmbH, Darmstadt, bezogen und dienten bei der PCR als Primer für die eingesetzte DNA-Polymerase.

Tabelle 2.1 Verwendete Oligonucleotide für die PCR ¹

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
<i>rcsA_{E.a.}</i> (up)-Primer	5'-gc aga tct atg ccg acg att att atg	<i>Bgl</i> II
<i>rcsA_{E.a.}</i> (low)-Primer	5'-gc aag ctt cct atc ttt cgt taa cat c	<i>Hind</i> III
<i>rcsF</i> (up)-Primer	5'-gc gga tcc atg cgt gct tta ccg atc tgt tta g	<i>Bam</i> H I
<i>rcsF</i> (low)-Primer	5'-gc aag ctt tca ttt cgc cgt aat gtt aag cgc ag	<i>Hind</i> III
<i>hha</i> (up)-Primer	5'-cg gga tcc atg tcc gaa aaa cct tta acg aaa acc	<i>Bam</i> H I
<i>hha</i> (low)-Primer	5'-cg aag ctt tta gcg aat aaa ttt cca tac tga gg	<i>Hind</i> III
<i>arsR</i> (up)-Primer	5'-cg gga tcc atg tca ttt ctg tta ccc atc caa ttg	<i>Bam</i> H I
<i>arsR</i> (low)-Primer	5'-cg aag ctt tta act gca aat gtt ctt act gtc ccc	<i>Hind</i> III

¹ Die durch die Oligonucleotide generierten Restriktionsschnittstellen sind in folgender Tabelle fettgedruckt, Start- und Stopcodons unterstrichen und zusätzlich die zugehörigen sequenzspezifischen Restriktionsendonucleasen angegeben.

2.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien:

Folgende Chemikalien wurden von der Fa. Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen:

α -D-Glucose-Monohydrat, Agar-Agar, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ampicillin (Ap), Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Chloramphenicol (Cm), Desoxy-Nucleotid-Mix 10 mM (dNTPs), Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Eisenchlorid (FeCl_3), Ethanol 99,8 % *p.a.*(EtOH), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycerin 99,8%, Isopropanol *p.a.*, Isopropyl-thio- β -D-galactosid (IPTG), Kaliumacetat (KOAc), Kaliumchlorid (KCl), Kalium-Dihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Manganchlorid (MnCl_2), MOPS, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Natriumacetat (NaAc), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Natriumhydroxid (NaOH), Pepton aus Casein (Bacto Trypton), Rotiphorese Gel (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), Rubidiumchlorid (RbCl), Tris Ultra Qualität

Alle weiteren Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bestellt:

E. Merck GmbH, Darmstadt: Ethidiumbromid (EtBr) , Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Methyleneblau, Perchlorsäure (70%)

Martek Bioscience Corp., Columbia, MD, USA: ^{15}N -Ammoniumchlorid (99 % ^{15}N)

Fluka Chemie AG, Neu-Ulm: β -Mercaptoethanol, Imidazol

FMC BioProducts: Agarose - SeaKem LE

Gibco GmbH, Eggenstein: Hefeextract (Select Yeast Extract), Luria Broth Base (LB)

New England Biolabs, Schwalbach: Magnesiumsulfat-Lösung ($MgSO_4$) 100 mM

Riedel-de-Haën GmbH, Seelze: Natriumdodecylsulfat (SDS)

Serva GmbH & Co., Heidelberg: Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R-250, Natriumazid (NaN_3)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim: Kanamycin (Km)

Puffer und Lösungen:

DNA-Puffer	Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 (autoklavieren)
TFB I-Puffer	100 mM RbCl, 100 mM $MnCl_2$, 30 mM KOAc, 10 mM $CaCl_2$, 15% (v/v) Glycerin, mit Eisessig auf pH 5,8 einstellen, Lösung sterilfiltrieren (0,22 μm) und bei 4°C lagern
TFB II-Puffer	100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15% (v/v) Glycerin mit 1 N NaOH auf pH 7,0 einstellen, Lösung sterilfiltrieren (0,22 μm) und bei 4°C lagern
Stripping-Puffer	0,1 M EDTA, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7,6, filtriert (0,2 μm), entgast
Puffer A1	50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8, filtriert (0,2 μm), entgast
Puffer A3	50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 6,4, filtriert (0,2 μm), entgast
Puffer B1	Puffer A1 mit zusätzlich 1 M Imidazol
Puffer B2	Puffer A1 mit zusätzlich 1 M NaCl
Puffer B3	Puffer A3 mit zusätzlich 1 M NaCl
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris-Ac (pH 8,0), 50 mM EDTA, 6 % (v/v) Eisessig
TGS-Puffer (10 x)	30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS <i>ad</i> 1 l, pH 8
Probenpuffer Agarose-Gelelektrophorese (6 x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen-Cyanol FF, 30 % (w/v) Glycerin

Probenpuffer für SDS-PAGE (10 x)	500 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 % (w/v) Glycerin, 12,5 % β -Mercaptoethanol, 7,5 % (w/v) SDS, 0,25 mg/ml Bromphenolblau
PAG-Färbelösung	0,4 g Coomassie Brilliant Blue R250, 50 ml Ethanol (99%), 34 ml Perchlorsäure (70%), 800 ml H ₂ O
PAG-Puffer A	Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
PAG-Puffer B	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

2.3 Medien und Antibiotika

Medien:

SOC-Medium	5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2 mM NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7,0 autoklavieren, dann 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose zugeben																		
LB-Medium	25 g/l LB-Base in VE-H ₂ O lösen und autoklavieren																		
M9-Minimalmedium	<table> <tr> <td>Na₂HPO₄ x 7 H₂O</td> <td>12,8 g/l</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>3 g/l</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>0,5 g/l</td> </tr> </table> <p>pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,4 einstellen und 20 min autoklavieren. Anschließend folgende sterile Lösungen zugeben:</p> <table> <tr> <td>1 M MgSO₄</td> <td>1 ml/l</td> </tr> <tr> <td>1 M CaCl₂ / 0,1 M FeCl₃</td> <td>1 ml/l</td> </tr> <tr> <td>20 mg/ml Thiaminhydrochlorid</td> <td>0,1 ml/l</td> </tr> <tr> <td>20 % (w/v) Glucose</td> <td>5 ml/l</td> </tr> <tr> <td>50 % (w/v) Glycerin</td> <td>5 ml/l</td> </tr> <tr> <td>NH₄Cl bzw. ¹⁵NH₄Cl</td> <td>1 g/l</td> </tr> </table> <p>ggf. Antibiotika (Amp: 100 μg/ml, Kan: 30 μg/ml) und mit sterilem Wasser auf das Endvolumen einstellen.</p>	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	12,8 g/l	KH ₂ PO ₄	3 g/l	NaCl	0,5 g/l	1 M MgSO ₄	1 ml/l	1 M CaCl ₂ / 0,1 M FeCl ₃	1 ml/l	20 mg/ml Thiaminhydrochlorid	0,1 ml/l	20 % (w/v) Glucose	5 ml/l	50 % (w/v) Glycerin	5 ml/l	NH ₄ Cl bzw. ¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	12,8 g/l																		
KH ₂ PO ₄	3 g/l																		
NaCl	0,5 g/l																		
1 M MgSO ₄	1 ml/l																		
1 M CaCl ₂ / 0,1 M FeCl ₃	1 ml/l																		
20 mg/ml Thiaminhydrochlorid	0,1 ml/l																		
20 % (w/v) Glucose	5 ml/l																		
50 % (w/v) Glycerin	5 ml/l																		
NH ₄ Cl bzw. ¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/l																		
LB-Agarplatten	Agar-Agar 1,5 % (w/v) zu LB-Medium zugeben, 20-30 min autoklavieren, ggf. Antibiotika erst bei ca. 56°C zugeben.																		

Antibiotische Stammlösungen (sterilfiltriert):

Ampicillin (1000-fach konz.):	100 mg/ml in 50% EtOH
Kanamycin (1000-fach konz.):	30 mg/ml in H ₂ O _{milli}
Chloramphenicol (1000-fach konz.):	20 mg/ml in 50% EtOH

2.4 Enzyme

Folgende Enzyme und mitgelieferte Puffer wurden bei der Firma New England Biolabs, Schwalbach, bestellt:

T4 DNA-Ligase, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), *Vent* Polymerase und Restriktionsenzyme (s. Tabelle 2).

Tabelle 2.2 Verwendete Restriktionsendonucleasen und Puffer

Restriktionsendonuclease	empfohlener Puffer	
<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT pH 7,9 + 100 µg/ml BSA
<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R I-Puffer	50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,025% Triton X-100, pH 7,5
<i>Hind</i> III	NEB-Puffer 2	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT pH 7,9
<i>Nde</i> I	NEB-Puffer 4	50 mM KOAc, 20 mM Tris-Ac, 10 mM MgAc ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9
<i>Pst</i> I	NEB-Puffer 3	100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT pH 7,9 + 100 µg/ml BSA

2.5 Standardmarker und Kits

Protein MW Marker (14,4 kb – 116 kb) MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Smart DNA ladder (100bp – 10 000bp) Eurogentec GmbH, Köln

Smart ladder SF (100bp – 1000 bp)

NucleoSpin Plasmid Kit,
NucleoBond AX Kit
NucleoTrap Kit
Macherey-Nagel GmbH & Co.KG,
Düren

JetSorb Gel-Extraktions-Kit Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

Taq DyeDesoxy Terminator Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

2.6 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2.3 Verwendete Bakterienstämme, relevanter Genotyp und Referenzen

<i>E. coli</i> -Stamm	relevanter Genotyp	Referenzen
DH5 α	F ⁻ <i>recA1 endA1 relA1 gyrA96 thi-1 supE44 deoR hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) lacZ ΔM15</i>	Hanahan, 1983
BL21 (DE3) ^a	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>hsdS gal ompT lon dcm</i> λ (DE3)	Studier & Moffat, 1986
BL21 (DE3) x pLysS ^a	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>hsdS gal ompT lon dcm</i> λ (DE3) [pLysS <i>cam</i> ^r]	Stratagene GmbH, Heidelb.
HMS 174 (DE3) ^a	<i>E. coli</i> K F ⁻ <i>recA1 hsdR rif^r</i> λ (DE3)	Campbell <i>et al.</i> , 1978
M15 x pRep4	F ⁻ <i>lac ara gal mtl</i> [pRep4 <i>lacI^q kan^r</i>]	Qiagen GmbH, Hilden
TOPP 2	kein <i>E. coli</i> K-Stamm, <i>rif^r proAB lacI^q lacZ ΔM15 TN10 (tet^r)</i>	Stratagene GmbH, Heidelb.
XL1	<i>recA1 endA1 relA1 gyrA46 thi-1 supE44 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) lac⁻ F['] [proAB⁺lacI^q lacZΔM15 TN10 (tet^r)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987

^a *E. coli* (DE3)-lysogene Stämme: Diese Stämme besitzen das Gen der T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV*-Promotors. Dies wurde durch stabile Integration des Phagen DE3 (ein Derivat des Phagen λ) am *int*-Gen des Wirtsgenom ermöglicht. Die Expression des Strukturgens der T7-RNA-Polymerase wird durch IPTG induziert (Stratagene, Studier & Moffat, 1986).

2.7 Expressionsvektoren

Tabelle 2.4 Verwendete Expressionsvektoren

Bezeichnung	Promotor	Verwendungszweck	Resistenz	Referenzen
pQE30	T5	N-terminale (His) ₆ -Fusion	Amp	Qiagen GmbH, Hilden
pQEGroES ^a	T5	N-terminale (His) ₆ -GroES-Fusion	Amp	F. Bernhard, J.W.-Goethe Univ., Frankfurt
pQE30-rcsA	T5	Template für PCR	Amp	F. Bernhard, J.W.-Goethe Univ., Frankfurt
pMal2-rcsA _{E.a.}	<i>lac</i>	Template für PCR	Amp	Kelm <i>et al.</i> , 1997
pAT037 ^a	T5	N-terminale (His) ₆ -Protein D-Fusion	Amp	Forrer und Jaussi, 1998
pET30-GBF1 ^b	T7	N-terminale Fusion des Proteins G (B1)	Kan	Studier <i>et al.</i> , 1990
pGro12 (CL33)	<i>lac</i>	Koexpression von groEL und gro ES nach IPTG-Induktion	Kan	Cole, 1996

^{a,b} s. Fußnoten Tabelle 2.5

Tabelle 2.5 Konstruierte Plasmide

Bezeichnung	Promotor	Klonierung	Überproduktion von	Resistenz	Referenzen
pQEgroES-rcsA ^a	T5	<i>rcsA</i> (Bg/B/H) ^c	(His) ₆ -GroES-RcsA	Amp	diese Arbeit
pQEgroES-rcsF ^a	T5	<i>rcsF</i> (B/H)	(His) ₆ -GroES-RcsF	Amp	diese Arbeit
pQEgroES-hha ^a	T5	<i>hha</i> (B/H)	(His) ₆ -GroES-Hha	Amp	diese Arbeit
pQEgroES-arsR ^a	T5	<i>arsR</i> (B/H)	(His) ₆ -GroES-ArsR	Amp	diese Arbeit
pAT037-rcsA ^a	T5	<i>rcsA</i> (B/H) ^c	GpHD-RcsA	Amp	diese Arbeit
pAT037-rcsF ^a	T5	<i>rcsF</i> (B/H)	GpHD-RcsF	Amp	diese Arbeit
pAT037-hha ^a	T5	<i>hha</i> (B/H)	GpHD-Hha	Amp	diese Arbeit
pAT037-arsR ^a	T5	<i>arsR</i> (B/H)	GpHD-ArsR	Amp	diese Arbeit
pET30-rcsA ^b	T7	<i>rcsA</i> (B/H) ^c	GB1-RcsA	Kan	diese Arbeit
pET30-rcsF ^b	T7	<i>rcsF</i> (B/H)	GB1-RcsF	Kan	diese Arbeit
pET30-hha ^b	T7	<i>hha</i> (B/H)	GB1-Hha	Kan	diese Arbeit
pET30-arsR ^b	T7	<i>arsR</i> (B/H)	GB1-ArsR	Kan	diese Arbeit

^a pQE30-Derivate: pQE30-Derivate besitzen einen Lac I-kontrollierten T5-Promotor, der von der eigenen RNA-Polymerase erkannt wird. Sie eignen sich zur Überproduktion von Proteinen mit N-terminalem (His)₆-Tag.

^b pET30-Derivate: pET-Plasmide eignen sich zur Expression rekombinanter Gene in geeigneten unter der stringenten Kontrolle eines T7-Promotors. Die Genexpression kann nach Transformation in einen (DE3)-lysogenen Stamm durch Zugabe von IPTG indiziert werden (Stratagene).

^c Vektoren wurden *Bam*H I / *Hind* III (B/H), Inserts *Bgl* II / *Hind* III (Bg/H) geschnitten, wodurch nach Ligation die Schnittstelle eliminiert wurde.

2.8 Technische Ausstattung

Agarose-Elektrophoreseapparatur GNA-100	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Amicon Druckfiltrationsapparatur	Millipore GmbH, Eschborn
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav FVS	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Badthermostat C1-W5P	Haake Messtechnik GmbH & Co., Karlsruhe
Biofuge RS 28 mit Rotor 3746	Haereus Sepatech GmbH, Osterode
Brutschrank BKE 40	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Consort E554	Bachofer GmbH, Reutlingen
Eppendorf Multipette Typ 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Response Typ 4850	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

FPLC GP-250 Plus	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Fraktionssammler SuperFrac	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
French Press	SLM-Aminco, Urbana, Illinois, USA
Geltrockner Model 543	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hochdrucksterilisator Getinge 44EN	Getinge AB, Getinge, Schweden
Inkubationsschüttler Gyrotory G76	New Brunswick Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Leitfähigkeitsdetektor	Amersham Bioscience GmbH, Freiburg
Membranpumpe MZ 2 C Synchro	Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim
Mikrowellengerät R-3V11(W)	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
NMR-Spektrometer DRX500	Bruker GmbH
NMR-Spektrometer DRX800	Bruker GmbH
PCR-Gerät DNA Engine PTC-200	MJ Research Inc., Watertown, MA, USA
pH-Meter	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipetten Gilson	AbiMed
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RC-28S mit Rotoren SS34, GSA, GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
RC-5B mit Rotoren SS34 und GS3	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Scanner	HP ScanJetIII Hewlett-Packard Co., Cal.
SDS- Elektrophoreseapparatur Mini- Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer Cary 3	Varian Ltd., Mulgrave, Victoria, Australien
Spektralphotometer U-1100	Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
Sterilwerkbank Danlaf VFS 1206	Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Ultraschallhomogenisator Labsonic mit Schwingsonden 5 T und 40 T	B. Braun Biotech GmbH, Melsungen

UV-Detektoren UV-M & UV-MII	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
UV-Transilluminator	Renner GmbH, Dannstadt
Vortexer MS1	Bender & Hobein AG, München
Waters LC260	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifuge Centricon H-401	Kontron Hermle AG, Esslingen

2.9 Sonstige Materialien

Chromatographische Materialien (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg):

Chromatographie-Leersäulen (XK16, XK26)

Säulenmaterial Superdex 75 (SEC)

Säulenmaterial Q- Sepharose (HP) (IEC)

Säulenmaterial SP-Sepharose (HP) (IEC)

Säulenmaterial Heparin-Sepharose CL-6B (IEC)

Säulenmaterial Chelating Sepharose FF (IMAC)

Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG , Melsungen
Einwegkonzentratoren CentriCon/-Präp 15 ml und 2 ml (MWCO: 3 kD)	Millipore GmbH, Eschborn
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Membranfilter, 0.2 µm und 0.45 µm	Sartorius AG, Göttingen
NMR-Probenröhrchen, Ø = 5 mm	Wilmad Glass, Buena, NY, USA
Petrischalen aus Polystyrol, Ø = 94 mm	Greiner & Söhne GmbH & Co. KG, Nürtingen
Pipetten-Spitzen	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen, 13 ml	Sarstedt GmbH, Nümbrecht
Shigemi-NMR-Röhrchen, Ø 4.2 mm	Shigemi Co., Tokyo, Japan
Sterilfilterhalter, 0.2 µm und 0.45 µm	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Ultrafiltrationsmembranen	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugenbecher für Sorvall- Rotoren SS34, GSA und GS3	Nalge Company, Rochester, NY, USA

2.10 Online-Datenbanken

<http://www-nbrf.georgetown.edu/>

National Biomedical Research Foundation, Protein Information Resource

<http://www.rcsb.org/databases.html>

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnology Information; National Library of Medicine

<http://research.bmn.com/>

BioMedNet – Medline

<http://www.neb.com/>

New England Biolabs

<http://www.stub.uni-frankfurt.de/>

Stadt- und Universitätsbibliothek, Frankfurt/a.M.

<http://www.expasy.org>

Expert Protein Analysis System des Swiss Institute of Bioinformatics

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

Zur Gewährleistung steriler Arbeitsbedingungen wurden, soweit nicht anders angegeben, die folgenden mikrobiologischen Methoden an einer Sterilbank oder an der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Die verwendeten Gefäße und Lösungen wurden bei 121°C und 2,5 bar 20 – 30 min hitzesterilisiert bzw. sterilfiltriert.

3.1.1 Lagerung und Kultivierung Bakterienstämmen

Mit einer Impföse wurden die *E. coli* Stämme auf LB-Agar-Platten, die eventuell zusätzlich Antibiotika in geeigneten Konzentration enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit den gewachsenen Einzelkolonien wurden 100 ml LB-Flüssigmedien, denen gegebenenfalls das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde, angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (150-200 rpm) inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden im weiteren zur Herstellung kompetenter Zellen oder zum Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur zur Langzeitlagerung verwendet. Hierfür wurden 900 µl dieser Übernachtskultur mit 500 µl steriler DB-Salzlösung versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Mit der selben Methode wurden auch die durch Transformation erhaltenen Stämme gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Stämme aus einer Glycerin-Dauerkultur auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Zellen wurden in zwei auf Eis vorgekühlte, zuvor mit H₂O_{milli} ausgespülte, 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (3000 x g, 4°C, 10 min), die Pellets in je 7,5 ml eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Vereinigung der Suspensionen wurde ein weiteres Mal unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert, bevor die Zellen in 100 µl Aliquots bei –80°C eingefroren und gelagert wurden (Hanahan, 1985).

3.1.3 Transformation nach der CaCl₂-Methode

Die Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972). Dazu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid-DNA (10-100 ng) bzw. 2 x 1 µl bei Kotransformation zweier Plasmide oder im Falle eines Ligationsansatzes 10 µl Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem 2-3minütigen Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad unterzogen, bevor sie für weitere 5 Minuten auf Eis gelagert wurden. Im Anschluß wurden die Zellen mit 400 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten, die entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2 Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

3.2.1 Expression im analytischen Maßstab

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit Hilfe einer Impföse von einer LB-Agar-Platte in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und für 2-3 Stunden bei 37°C im Luftschüttler inkubiert, bevor sie mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert wurden. Nach weiteren 3-4 Stunden wurden 1 ml dieser LB-Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 13000 rpm, RT, 1 min).

3.2.1.1 Kontrolle einer Klonierung durch Expressionsanalyse

Nach Transformation eines Ligationsansatzes wurden einzelne Bakterienkolonien auf Proteinproduktion hin untersucht. Hierfür wurde das Pellet (s. 3.2.1) in 150 µl H₂O resuspendiert, mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend 10 min bei 95°C aufgeköcht, bevor ein Aliquot von 12 µl auf ein 16,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurde. Durch Analyse dieses Gels erhielt man erste Anhaltspunkte einer erfolgreichen Klonierung, falls eine Bande des Überproduzierten Proteins zu sehen war. Weiterhin wurde die Rekombination durch Restriktionsanalyse und in einigen Fällen durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

3.2.1.2 Analyse der Löslichkeit überproduzierter Proteine

Um die Genexpression und die Löslichkeit des Genproduktes zu analysieren wurde das Pellet (s. 3.2.1) in 200 µl Phosphat-Puffer (50 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 8) aufgenommen und die Zellen per Ultraschall (5T Sonde, 3 x 10 Pulse, 0,7 s Zeitintervall, 40 W) aufgeschlossen. Von dem Zellaufschluß wurde eine Probe von 15 µl entnommen (Gesamtzellprotein), mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Der Rest des Zellaufschlusses wurde zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 13000 rpm, RT, 10 min) und vom Überstand vorsichtig eine Probe von 15 µl entnommen. Nach Zugabe von 5 µl SDS-Probenpuffer wurde die Probe 2 min bei 95°C aufgeköcht. Beide Proben wurden anschließend per SDS-PAGE analysiert.

3.2.1.3 Optimierung der Expressionsbedingungen

Im Falle nachweisbarer Genexpression wurde versucht, durch Variation der Inkubationstemperatur (25°C, 30°C, 37°C), der IPTG-Endkonzentration (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM) und des Induktionszeitpunktes (bei $OD_{600}=0,3$, $OD_{600}=0,5$, $OD_{600}=1,0$) die Proteinproduktion bzw. -löslichkeit zu optimieren. Darüber hinaus wurde die Expression in unterschiedlichen *E. coli* Expressionsstämmen und auch eine Koexpression der Chaperone Gro ES und Gro EL durchgeführt und analysiert. Bei einer präparativen Proteinproduktion wurde durch stündliche Probenentnahme und Bestimmung der Zelldichte, durch Messung der OD_{600} , das Wachstum der Bakterien verfolgt. Zusätzlich wurden die nach der Induktion mit IPTG entnommen Proben durch SDS-PAGE analysiert, um den Erntezeitpunkt zu optimieren.

3.2.2 Präparative Überproduktion von rekombinanten Proteinen

3.2.2.1 Fermentation von Bakterien in LB-Medium

Aus einer 100 ml ÜN-Kultur, wie in 3.1.1. beschrieben, wurden mit 10 ml zwei Erlenmeyer-Schüttelkolben (2 Liter) mit je 1 Liter LB-Medium angeimpft, das abhängig von der Antibiotikaresistenz der Expressionsstämme 100 µg/ml Amp bzw. 30 µg/ml Kan enthielt. Nach Erreichen einer geeigneten OD_{600} wurden die Zellen mit IPTG induziert und abhängig vom überproduzierten Protein nach entsprechender Induktionszeit geerntet. Dazu wurden die Zellen (5000 x g, 4°C, 10 min) zentrifugiert und das Präzipitat in 50 ml Puffer A1 (50 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 8) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen per French-Press (1200 psi, max. Vol. 50 ml) oder Ultraschall auf Eis aufgeschlossen (40T Sonde, 3 x 60 s, 0,7 s Zeitintervall, 200 W) und das überproduzierte Protein aufgereinigt.

3.2.2.2 ¹⁵N-Isotopenmarkierung eines Proteins

Nach Optimierung der Proteinproduktion und –aufreinigung wurde eine präparative Expression in M9-Minimalmedium durchgeführt, welches ¹⁵N-markiertes Ammoniumchlorid (¹⁵NH₄Cl) als einzige Stickstoffquelle enthielt. Die in diesem Medium produzierten Proteine wurden daher mit dem ¹⁵N-Isotop angereicht und konnten nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung durch NMR-spektroskopische Methoden analysiert werden.

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 Isolierung von DNA

3.3.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli*

Für die Amplifizierung der verwendeten Inserts durch PCR wurde bakterielle chromosomale DNA als Template eingesetzt. Zu ihrer Isolierung wurden 20 ml Übernachtskulturen 1 Minute bei 6000 g zentrifugiert, die sedimentierten Zellen einmal in 5 ml TE-Puffer gewaschen, ein weiteres Mal unter den selben Bedingungen zentrifugiert und wieder in 5 ml TE-Puffer resuspendiert. Dann wurden 500 µl Lysozym-Lösung (5 mg/ml) zugegeben und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, 500 µl einer 10%igen SDS-Lösung hinzugefügt und anschließend gewartet, bis die Lösung aufklarte (ca. 10 min). 500 µl mit TE-Puffer äquilibriertes Phenol wurde danach beigemischt, kräftig geschüttelt und die Emulsion zentrifugiert (10 000 rpm, 15 min, RT). Die proteinhaltige organische Phase wird mit Hilfe einer gebogenen Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, ohne die milchtrübe Interphase aufzuwühlen. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurde die Lösung dreimal mit 5 ml eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) extrahiert (s.o.), bevor die Lösung auf 0,2 M NaCl Endkonzentration eingestellt wurde. Durch Zugabe von doppeltem Volumen eiskaltem EtOH (100%) fiel die chromosomale DNA aus. Diese wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß übertragen, nochmals mit EtOH (70%) gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen erfolgte durch die Verwendung zweier DNA-Isolierungs-Kits nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers (Macherey-Nagel GmbH, Düren). DNA für die Restriktionsanalyse bzw. Sequenzierung von Plasmiden erhielt man mit Hilfe des „NucleoSpin Plasmid“-Kits in Mengen von etwa 5 µg/50 µl. Für den Erhalt von DNA-Mengen in präparativen Maßstäben (ca. 100 µg/400 µl) zur Präparation von Expressionsvektoren wurde das „NucleoBond AX“-Kit benutzt.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der *E. coli* Gene *rscF*, *hha* und *arsR* aus chromosomaler DNA des *E. coli*-Stammes XL1 kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Unter Verwendung hierfür geeigneter Primer wurde am 5'- und 3'-Ende des jeweiligen Gens eine *Bam*H I- bzw. *Hind* III-Restriktionsschnittstelle generiert. Im Falle von *rscA* wurden die Plasmide pEA 101, pMal2-rscA (E.a.) und pQE30-rscA als Template-DNA eingesetzt, und anstatt einer *Bam* HI- eine *Bgl* II-Schnittstelle eingeführt. In einer Standardreaktion wurden 10 µl *Vent*-Puffer, 1 µl Template-DNA, je 1 µl (up)- und (low)-Primer (100 pmol/µl), 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl *Vent*-Polymerase (2 U/µl), 2 µl MgSO₄-Lösung (100 mM), 7 µl Formamid zusammenpipettiert und schließlich auf 100 µl Endvolumen mit H₂O_{milli} aufgefüllt. Die PCR lief anschließend nach dem in Tab. 3.1 abgebildetem Reaktionsschema ab (nach Mullis *et al.*, 1986).

Tabelle 3.1 Verwendetes Standardprogramm für die PCR

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Reaktion
1	300	94	Denaturierung doppelsträngiger DNA, Vermeidung unspezifischer Bindung der Primer an Template-DNA, „Hot-Start“
2	60	94	Denaturierung doppelsträngiger DNA
3	30	47	Anlagerung (Annealing) der Primer
4	60	72	Elongation (Polymerisierung)
5			30 malige Wiederholung der Schritte 2, 3 und 4
6	300	72	Auffüllen überstehender Enden der Amplifikate
7	300	4	Ende der Reaktion

Nach Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Inserts) mit Hilfe des „NucleoTrap“-Kits (Macherey-Nagel

GmbH, Düren) aufgereinigt und anschließend durch Restriktionsenzyme für die Ligation präpariert.

3.3.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Die präparative Spaltung von Vektor- und Insert-DNA (ca. 10-20 µg DNA / 100 µl-Reaktionsvolumen) erfolgte durch einen Doppelverdau mit Restriktionsendonucleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Alle Vektoren und die Inserts *rcsF*, *hha* und *arsR* wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Hind* III, das Insert *rcsA* mit *Bgl* II und *Hind* III geschnitten.

Zur Durchführung wurden die entsprechenden 10-fach Puffer mit 1-2 Einheiten Restriktionsenzym(en) pro eingesetztem µg DNA und gegebenenfalls BSA (100 µg/ml) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Der Ablauf der Reaktion wurde nach 3 Stunden Inkubationszeit bei 37°C mit einem Aliquot durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, bevor Insert-DNA direkt aus der Lösung mit dem „NucleoTrap“-Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren) bzw. Vektor-DNA durch Extraktion nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt wurde.

Zum Zweck einer Restriktionsanalyse von neuen DNA-Konstrukten wurde je 1 µg der zu untersuchenden Plasmid-DNA in einer Reihe analytischer Ansätze (10 µl-Endvolumina) mit den dazu geeigneten Restriktionsenzymen einfach bzw. doppelt geschnitten. Die Auswertung erfolgte durch Größenanalyse der Spaltprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese fand zur analytischen Größen- und Mengenabschätzung von DNA-Fragmenten, aber auch zur präparativen Isolierung von Plasmid-DNA Verwendung. Da die verwendeten DNA-Fragmente in einem Bereich zwischen 200 und 5000 bp lagen, wurde eine Agarosekonzentration von 1% (w/v) gewählt. Die Vektor- bzw. Insert-DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen 6-fach-Probenpuffer versetzt, auf ein 1%iges Agarose-Gel, welches 0,1 µg Ethidiumbromid / ml enthielt, aufgetragen und bei einer angelegten Spannung von 100 V über 30-60 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Mengen- bzw. Größenabschätzung wurde die Intensität bzw. Bandenhöhe der durch Ethidiumbromid-Färbung fluoreszierenden DNA, mit der eines Standards verglichen.

Um restriktionsverdaute Vektor-DNA präparativ zu isolieren wurde auf einem UV-Transilluminator die entsprechende Bande, welche sich durch Vergleich mit ungeschnittener Vektor-DNA identifizieren ließ, ausgeschnitten und mit Hilfe des „JetSorb“-Kits (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) extrahiert. Die Konstruktion

neuer Plasmide wurde durch Restriktionsanalyse von aus Einzelkolonien isolierte Plasmid-DNA überprüft.

3.3.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Erhöhung der Klonierungseffizienz erfolgte vor der Ligation eine Behandlung der linearisierten Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Schrimps (SAP). Für einen 50 μl -Ansatz wurden etwa 5-8 μg DNA in 10-fach SAP-Puffer und entsprechende Menge SAP (1 U / μg DNA) 20 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß folgte eine Hitzedenaturierung der SAP durch Inkubation für 30 min bei 65°C. Durch diese Reaktion wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA entfernt und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Rezyklisierung minimiert.

3.3.6 Ligation

Für die Ligation der Vektoren und Inserts wurde die T4 DNA-Ligase verwendet, die freie 5'-Phosphatgruppen mit 3'-OH-Gruppen endständiger Desoxyribosyl-Reste von DNA-Strängen kovalent verknüpft. Dabei wurden die zu ligierenden Inserts und Vektoren in einem Konzentrationsverhältnis von etwa 3:1 bis 8:1 in einem 20 μl -Ansatz nach dem Schema in Tab. 3.2 zusammenpipettiert.

Tabelle 3.2 Verwendetes Pipettierschema für einen Ligationsansatz

	Ligationsansatz [μl]	Kontrolle [μl]
T4 DNA-Ligase-Puffer (10-fach)	2	2
Vektor-DNA	6	6
Insert-DNA	10	-
T4 DNA-Ligase	2	2
H ₂ O _{milli}	ad 20 μl	ad 20 μl

Anschließend erfolgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes über Nacht bei 18°C, bevor der Ligations- und Kontrollansatz in geeignete *E. coli*-Stämme transformiert, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht inkubiert wurde. Bei einem Verhältnis von etwa $\geq 2:1$ gewachsener Bakterienkolonien (Ligationsansatz : Kontrolle) wurde eine analytische Expression in LB-Medium und eine Restriktionsanalyse der DNA zur Identifizierung positiver Klone durchgeführt.

3.3.7 DNA-Sequenzierung

Ergänzend zur Expression im analytischen Maßstab und anschließender Identifikation eines positiven Klon durch SDS-PAGE und Restriktionsanalyse wurden Sequenzierungen von Plasmid-DNA durchgeführt. Hierfür wurde Plasmid-DNA aus dem entsprechenden Bakterien-Stamm im analytischen Maßstab isoliert und eine Sequenzierung nach der Didesoxynucleotid-Methode mit den (low)-Primern der einklonierten Inserts durchgeführt (nach Sanger *et al.*, 1977).

Die fluoreszenzmarkierten ddNTPs verursachen nach zufälligem Einbau in einer PCR einen Abbruch der Polymerisations-Reaktion, so daß Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Auf dem zur anschließenden Analyse eingesetzten Agarose-Gel wird dadurch ein charakteristisches Bandenmuster erzeugt, aus dem ausgehend vom eingesetzten Primer, die Sequenz abgeleitet werden kann. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von der Firma Scientific Research & Development GmbH, Oberurseler Str. 43, 61440 Oberursel durchgeführt.

3.3.8 Expressionsvektoren zur Überproduktion rekombinanter Proteine

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren pQEgroES und pAT037 handelt es sich um Derivate des IPTG-induzierbaren *E. coli* Vektors pQE30 (Qiagen, Hilden) der sich zur Überproduktion von Proteinen eignet, die mit einem (His)₆-Tag am N-Terminus versehen werden sollen (Abb. 3.1). Er steht unter der Kontrolle eines starken T5-Promotors mit *lac*-Opertor, der von der wirtseigenen RNA-Polymerase erkannt wird. Der Vektor enthält das Gen der β -Lactamase (Amp-Resistenz), wodurch eine einfache Selektionsmöglichkeit für plasmidtragende Bakterien gewährleistet ist. In diesen Vektor wurde hinter das (His)₆-Tag, das Gen des Chaperons GroES (F. Bernhard, J.W. Goethe-Universität Frankfurt) bzw. das Gen des Protein D des Phagen Lambda kloniert (P. Forrer, Universität Zürich).

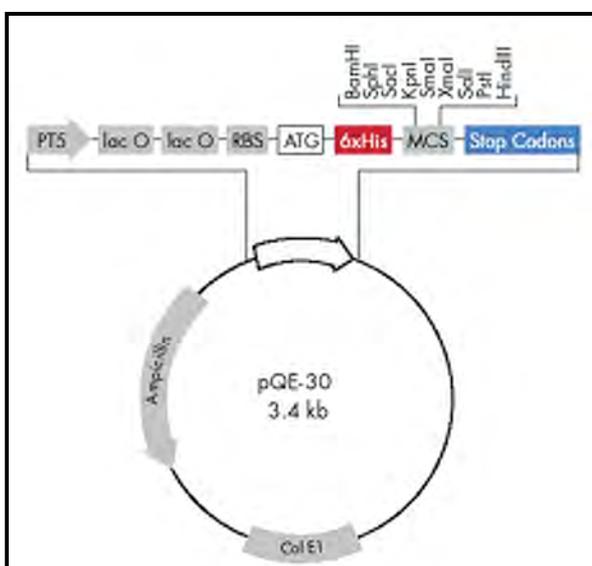


Abbildung 3.1 Schema des Vektors pQE30
Der Vektor pQE30 besitzt einen T5-Promotor (PT5) mit zwei hintereinander geschalteten *lac* Operatoren (*lac* O) vor der Ribosomen-Bindungsstelle (RBS). Nach dem Startcodon (ATG) folgt der (His)₆-Tag (6xHis), hinter den die Gene *groES* (pQEgroES) bzw. *gpHD* (pAT037) in die Multiple Cloning Site (MCS) kloniert wurden (verändert, nach Qiagen, Online-Manual für pQE30-Vektoren).

3.3.8.1 Konstruktion von Proteinen mit (His)₆-GroES als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pQEgroES

Durch die Klonierung von verschiedenen Genen in den Expressionsvektor pQEgroES wurden Proteine erhalten, die einen (His)₆-Tag sowie das aus *E. coli* stammende Chaperon GroES als N-terminalen Fusionspartner besitzen (Abb. 3.2). Dadurch bestand die Möglichkeit einer einfachen Aufreinigung der überproduzierten Fusionsproteine durch Metall-Chelat-Chromatographie.

3.3.8.2 Konstruktion von Proteinen mit dem Protein GpHD als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pAT037

Dieser ebenfalls auf dem Vektor pQE30 basierende Expressionsvektor diente zur Konstruktion von Proteinen mit einem (His)₆-getaggten Protein D des Phagen Lambda als Fusionspartner (Abb. 3.2).

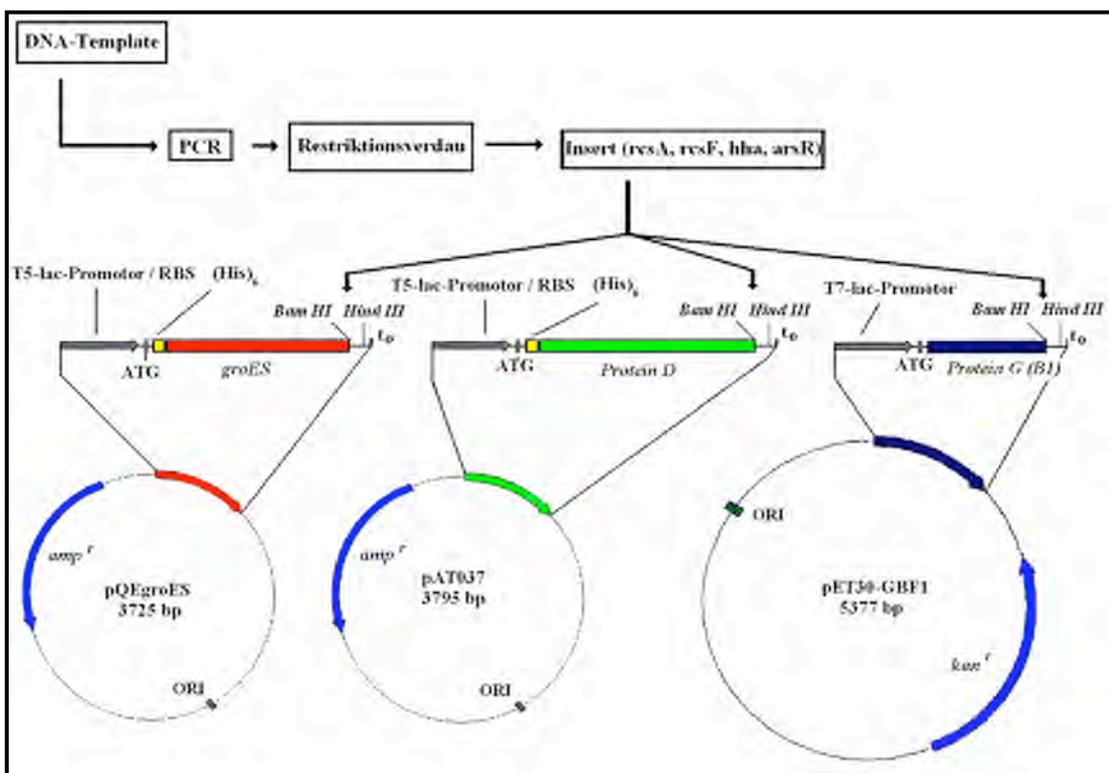


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der durchgeführten Klonierungen

Die aus DNA-Templates und PCR amplifizierten Gene (Inserts) konnten nach Restriktionsverdau in die Expressionsvektoren pQEgroES, pAT037 und pET30-GBF1 kloniert werden. Die Bereiche des T5- (pQEgroES, pAT037) bzw. T7-lac-Promotors (pET30-GBF1) mit Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) und des Startcodons (ATG) mit folgendem Fusionsprotein-Gen ((His)₆-groES, (His)₆-Protein D, Protein G (B1)) und Klonierungsregion (Bam HI / Hind III – Schnittstellen) sind vergrößert in linearer Darstellung hervorgehoben. Die Transkription endet an den mit t₀ bezeichneten Terminationsregionen.

3.3.8.3 Konstruktion von Proteinen mit dem Protein GB1 als Fusionspartner: Der Expressionsvektor pET30-GBF1

Zur Kontruktion von Proteinen mit dem Protein G (B1) als N-terminalen Fusionspartner, wurde der Expressionsvektor pET30-GBF1 verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Derivat des pET30-Vektors, der unter der stringenten Kontrolle des IPTG-induzierbaen T7-Promotors des Phagen T7 steht (Studier *et al.*, 1990). Da es sich bei der T7-Polymerase um kein in *E. coli* natürlich vorkommendes Protein handelt, wurden die konstruierten Vektoren ausschließlich in *E. coli*-Stämme transformiert, die λ (DE3)-lysogen sind, d.h. die genomische Information für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors enthalten, der ebenfalls durch IPTG induzierbar ist. Die basale Transkription am T7-Promotor wird zusätzlich durch das Gen *lac I* reduziert, das die Produktion ausreichender Mengen an *lac*-Repressor gewährleistet. Schließlich besteht noch eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Stringenz, indem ein Expressions-Stamm gewählt wird, der das Plasmid pLysS besitzt. Es trägt das Gen des T7-Lysozyms, dessen Produkt ein natürlicher Inhibitor der T7-Polymerase ist (Abb. 3.3). Plasmid-Instabilitäten wurden weitgehend vermieden, in dem die Klonierung in einem DH5 α -Stamm durchgeführt wurde, dem Information der T7-RNA-Polymerase fehlt, bevor zur Expression λ (DE3)-lysogene Stämme transformiert wurden.

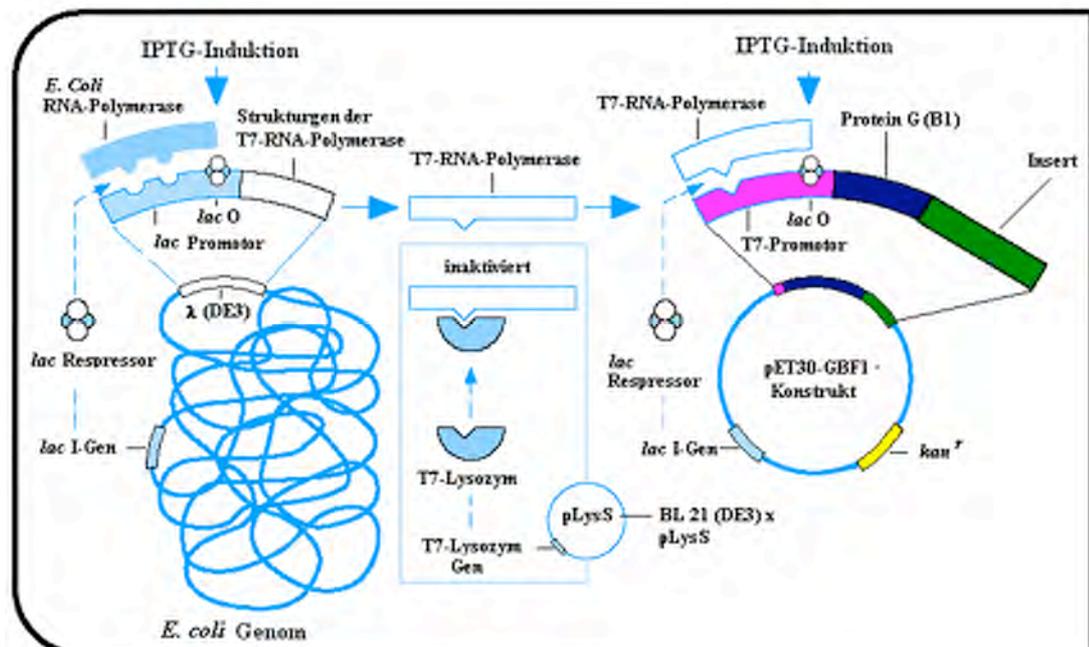


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des pET30-Systems

Das Produkt des *lac I*-Gens auf dem pET30-Derivat, der *lac*-Repressor, inhibiert sowohl die Transkription der T7-RNA-Polymerase am T7-lac-Promotor (rechts), als auch die Transkription ihres Strukturgens durch die wirtseigene *E. coli*-RNA-Polymerase auf der genomischen DNA (links). Der natürliche Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, das T7-Lysozym, ist auf dem Plasmid pLysS codiert. Bei Koexpression seines Strukturgens (mitte) wird die basale Transkription am T7-Promotor auf ein Minimum reduziert (verändert, nach Newsletter Vol. 1, No. 1, „*inNovations*“, Novagen, 1994).

3.4 Biochemische und chromatographische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Expressions-, Löslichkeits- und Reinheitsanalyse von Proteinen und zur Aufnahme einer Expressions-Kinetik eingesetzt. Sie beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von denaturierten Proteinen in einer auspolymerisierten Acrylamid-N,N'-Methylenbisacrylamid-Matrix. Dabei werden die Proteine maßgeblich nach ihrer Masse aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Die zu analysierenden Proben wurden wie in 3.1.4.1 beschrieben aufbereitet und auf einem 16,5%igem Trenngel (Sammelgel 4%ig) durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 15 min und danach 200 V für 60 min, aufgetrennt. Hierfür wurde das in Tab. 3.3 dargestellte Pipettierschema, TGS-Puffer als Laufpuffer und eine Mini-Protean II-Gelelektrophorese-Apparatur verwendet.

Tabelle 3.3 Verwendetes Pipettierschema für 2 Mini-Gele ¹

	Trenngel 16,5 % [ml]	Sammelgel 4% [ml]
H ₂ O _{milli}	-	1,5
50% Glycerin (v/v)	1	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	1
30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid	5,5	1
1% (w/v) SDS	1	0,5
TEMED	0,025	0,01
10% (w/v) APS	0,05	0,025

¹ verändert nach Sambrook, Russel, 2001

Nach 20-60 minütiger Färbung des Gels in Coomassie Blue Färbelösung wurde das Gel in eine Kunststoffschale mit Wasser überführt und der überschüssige Farbstoff bis zur deutlichen Erkennbarkeit der Proteinbanden durch Erhitzen in einer Mikrowelle entfernt. Anschließend wurden die Gele eingescannt und mit einem Geltrockener auf Blotting-Papier getrocknet. Die Größe und Menge der analysierten Proteine konnte durch Abschätzung der Bandenhöhe bzw. -stärke und Vergleich mit einem Protein-Standardmarker qualitativ bestimmt werden.

3.4.2 Aufreinigung von Proteinen

Nach Fermentation und Aufschluß der überexprimierenden Bakterienzellen wurde die Lösung durch Zentrifugation (SS-34, 10 000 – 18 000 rpm, 4°C, 30 min) und Filtration von nichtlöslichen Bestandteilen bzw. größeren Aggregaten befreit. Dazu wurde der Überstand, ohne das Pellet aufzuwirbeln, abgenommen und mit Sterilfiltern unterschiedlicher Porengröße (0,8 µm, 0,4 µm, 0,2 µm) filtriert. Anschließend wurde das überproduzierte Protein durch geeignete chromatographische Methoden bei 18°C aufgereinigt. Die hierzu verwendeten Puffer wurden vor Verwendung sterilfiltriert (0,2 µm) und 15 – 30 min entgast.

3.4.2.1 Metal-Chelat-Chromatographie (IMAC)

Im Falle von Proteinen, die einen (His)₆-Tag besaßen war die Aufreinigung durch Metal-Chelat-Chromatographie das Mittel der Wahl. Das Prinzip beruht auf der Affinitätsimmobilisierung durch Chelatbildung von Histidin-Seitenketten und mit Ni²⁺ beladenem IDA-Material und anschließende Elution durch kompetitive Verdrängung durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer. Zur Vorbereitung wurde die in 20% EtOH äquilibrierte Säule (Volumen 25 ml) nacheinander mit H₂O_{milli}, „Stripping“-Puffer (0,1 M EDTA, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7,6), H₂O_{milli}, 50 mM NiSO₄-Lösung, H₂O_{milli}, und anschließend mit Puffer A1 (50 mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄, pH 8) äquilibriert (Flußrate 2-3 ml / min). Diese Schritte wurden durch Leitfähigkeitsmessung kontrolliert und im letzten Schritt die UV-Absorption (280 nm) auf 0 (Basislinie) geeicht. Nun wurde die Proteinprobe, je nach Volumen, mit Hilfe eines 50 ml oder 150 ml Loops aufgetragen und so lange mit Puffer A1 gespült, bis die UV-Absorption wieder die Basislinie erreichte. Das Durchfluß-Eluat wurde in einem geeigneten Gefäß aufgesammelt. Anschließend wurde während kontinuierlich ansteigender Imidazol-Konzentration, durch Erhöhung des Anteils an Puffer B1 (Puffer A1 + 1M Imidazol), das Eluat mit einem Fraktionssammler aufgesammelt. Von den Fraktionen, bei denen eine UV-Absorption beobachtet wurde, wurde eine Probe entnommen und diese per SDS-PAGE zur Identifizierung und Bestimmung der Reinheit des Proteins analysiert.

3.4.2.2 Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Durch ihre ampholytische Eigenschaft besitzen Proteine, abhängig vom pH des Puffers in der sie gelöst sind, eine positive oder negative Nettoladung (Ausnahme: isoelektrischer Punkt). Das Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ionen, also auch von Proteinen in Lösung, mit Säulenmaterial entgegengesetzter Ladung. Durch kontinuierliche

Erhöhung der Ionenstärke im Elutionspuffer werden Proteine, die an das Säulenmaterial gebunden haben, kompetitiv verdrängt und somit eluiert. Zur Erstellung eines geeigneten Reinigungsschemas für ein Protein ohne (His)₆-Tag wurde das Bindungsverhalten zu Säulenmaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften überprüft. Dazu zählten eine Q-Sepharose-HP-Säule als Beispiel eines Anionenaustauschers und eine Heparin-HP- und SP-Sepharose-HP-Säule als Kationenaustauscher.

Im Falle der Benutzung einer Q-Sepharose-HP-Säule (Volumen 25 ml) wurde die in 20 % EtOH gelagerte Säule nacheinander mit H₂O_{milli} gespült, mit Puffer B2 (Puffer A1 + 1M NaCl) beladen und anschließend mit Puffer A1 äquilibriert. Nach Auftragen der Proteinprobe mit Hilfe eines geeigneten Loops wurde nachdem in 3.3.2.1 beschriebenen Verfahren (unter Verwendung des Puffers B2 anstelle des Puffers B1) eluiert. Bei Verwendung einer SP-Sepharose bzw. Heparin-Säule (beide 25 ml Säulenvolumen) wurde vor Auftragen der Proben der pH-Wert der Proteinlösung mit HCl auf 6,4 eingestellt und mit den Puffern A3 (Puffer A1 mit pH 6,4) und B3 (Puffer A3 + 1 M NaCl) äquilibriert bzw. eluiert.

3.4.2.3 Gelfiltrationschromatographie (SEC)

Um Proteine nach ihrer Masse aufzutrennen, macht man sich das Prinzip der Gelfiltrationschromatographie zu Nutze. Da das Auftrennungsvermögen dieser Säulen direkt vom Probenvolumen und der Säulenlänge abhängt, wurde diese Methode erst nach Ausschluß des Großteils an Proteinen durch IEC und darauffolgender Aufkonzentrierung der Probe angewandt. Die verwendete Superdex 75-Säule hatte ein Volumen von ca. 300 ml und wurde zunächst mit H₂O_{milli} und dann mit Puffer Puffer A3 äquilibriert. Mit Hilfe eines 5 ml Loops wurde die Proteinprobe aufgetragen und anschließend mit Puffer A3 eluiert (Flußrate: 1 ml/min). Die gesammelten Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert, vereinigt und schließlich aufkonzentriert.

3.4.3 Aufkonzentrieren und Überprüfung der Stabilität von Proteinen

Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die zielproteinhaltigen Fraktionen vereinigt und mit Hilfe einer Amicon-Druckfiltrations-, CentriPräp- oder CentriCon-Zelle aufkonzentriert. Zur Überprüfung der Stabilität wurde anschließend ein Aliquot der Proteinlösung bei Raumtemperatur gelagert, um sie auf Veränderung ihrer Konsistenz hin zu untersuchen. Auch der Zusatz unterschiedlicher Mengen NaCl zur Erhöhung der Stabilität wurde analysiert.

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 UV/Vis-Spektroskopie

3.5.1.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Verfahren, das erstmals von Bradford im Jahre 1976 beschrieben wurde. Dazu wurde 1 – 10 µl Proteinlösung auf 1 ml mit Bradfordreagenz aufgefüllt und nach 10 min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichgerade ermittelt, die auf Basis einer Standardmessungsreihe mit BSA-Lösungen erstellt wurde.

3.5.1.2 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA-Lösungen wurde in 500 µl Quarzküvetten durchgeführt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß die optische Dichte (OD_{260}) zwischen 0,1 und 1 lag. Es wurden folgende Näherungen angenommen:

doppelsträngige DNA: 1 OD_{260} = 50 µg/ml

Oligonucleotide DNA: 1 OD_{260} = 33 µg/ml

Der Reinheitsgrad der DNA-Lösung ergibt sich aus dem Quotienten von OD_{260} und OD_{280} und sollte idealerweise zwischen 1,8 – 2,0 liegen (Sambrook & Russel, 2001).

3.5.1.3 Bestimmung der Bakterienkulturdichte (OD_{600})

Die Bestimmung einer Bakterienkulturdichte erfolgte durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm. Dazu wurde die OD_{600} von 1 ml einer Bakterienkultur in einer Einwegküvette gegen eine Referenzzelle mit LB- bzw. M9-Medium gemessen.

3.5.2 NMR-Spektroskopische Methoden

3.5.2.1 Aufnahme eines homonuklearen ^1H -Spektrums

Eindimensionale ^1H -Spekren wurden aufgenommen, um erste Aussagen über den Faltungszustand eines Proteins machen zu können.

Die aufkonzentrierten Proben wurden zunächst auf einen pH von 6,4 umgepuffert, um möglichst viele Protonenresonanzen zu erfassen. Des weiteren wurde zur Einstellung des Deuterium-Locksignals 10% D_2O und 1 mM DSS (2,2-Dimethyl-2-sila-pentasulfonsäure) als Standard zur Kalibrierung der chemischen

Verschiebung der Protonen zugegeben. Die Aufnahme erfolgte bei einer Temperatur von 298 K in einem 500 bzw. 800 MHz-Spektrometer der Firma Bruker GmbH.

3.5.2.2 Aufnahme eines heteronuklearen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationspektrums

Die Anreicherung des NMR-aktiven Stickstoffisotops ^{15}N erlaubt die Aufnahme eines heteronuklearen Korrelationspektrums durch die Verwendung eines geeigneten Pulsprogrammes. Das für ein TROSY-Experiment (Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy) eingesetzte Pulsprogramm wurde entwickelt, um die Empfindlichkeit für $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen zu steigern. Durch die Anzahl der im TROSY-Spektrum enthaltenen Signale und dem Bereich in dem sie auftreten, konnten Aussagen über den Faltungszustand des untersuchten Proteins gemacht werden. Im Falle eines Fusionsproteins war die Zuordnung der Signale, die vom Zielprotein stammen durch den Vergleich eines Referenzspektrums des Fusionspartners mit dem des Fusionsproteins möglich.

Die Proteinprobe wurde mit 10% D_2O und 1 mM DSS versetzt und das TROSY-Spektrum in einem 800 MHz-Spektrometer der Firma Bruker GmbH bei einer Temperatur von 285 K aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der Gene *rcsA*, *rcsF*, *hha* und *arsR* in die Expressionsvektoren pQEgroES, pAT037 und pET30-GBF1

Zur Expressionsanalyse der rekombinanten Fusionsproteine mussten zunächst geeignete Genfusionen in den Expressionsvektoren pQEgroES, pAT037 und pET30-GBF1 konstruiert werden. Hierzu wurden zunächst die Vektoren pQEgroES, pAT037 und pET30-GBF1 isoliert, durch Restriktionsendonucleasen präpariert und mit den aus PCR-Reaktionen amplifizierten und ebenfalls mit Restriktionsenzymen geschnittenen Inserts ligiert. Um den Erfolg der Klonierung zu analysieren wurde nach anschließender Transformation geeigneter *E. coli*-Stämme eine Restriktionsanalyse mit den neu konstruierten Plasmiden durchgeführt. In einigen Fällen wurde die Kontrolle durch eine Sequenzierung des Plasmids ergänzt.

4.1.1 Präparation der Expressionsvektoren pQEgroES, pAT037 und pET30-GBF1

Die Vektoren pQEgroES und pET30-GBF1 wurden aus den Stämmen DH5 α bzw. HMS 174 isoliert. Das Plasmid pAT037 wurde mit je 1 μ l in die Stämme DH5 α , XL1 und M15 x pRep4 transformiert. Eine Expression im analytischen Maßstab zeigte wiederholt, daß im Gegensatz zu den Stämmen XL1 und M15 x pRep4, der Stamm DH5 α nicht geeignet ist, um das auf dem Plasmid pAT037 codierte Protein GpHD zu überproduzieren. Offensichtlich führt eine mangelhafte Reprimierung der Transkription am T5-lac-Promotor zu Instabilitäten des Plasmids, so daß sich Mutationen anreichern und dadurch die Überproduktion nicht mehr möglich ist. Dagegen wird in den beiden Stämmen XL1 und M15 x pRep4 eine stringente Kontrolle des T5-lac-Operons durch eine erhöhte *lac*-Repressor-Konzentration gewährleistet. Aus diesem Grund wurde das Plasmid pAT037 zukünftig aus dem Stamm XL 1 isoliert.

Die isolierten Vektoren wurden anschließend durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsendonucleasen *Bam*H I und *Hind* III im *Bam*H I-Puffer (+ 100 μ g/ml BSA) linearisiert (Tab. 4.1). Durch Einführen dieser Restriktionsschnitte wurde die Voraussetzung zur Rekombination der Zielprotein-Gene in 3'-Richtung zu den Fusionspartnern geschaffen (Abb. 4.1).

Tabelle 4.1 Zur Klonierung verwendete Expressionsvektoren

Expressionsvektor	Größe [bp]	isoliert aus <i>E. coli</i>	Restriktionsverdau ¹
pQEgroES	3725	DH5 α	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III
pAT037	3795	XL1	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III
pET30-GBF1	5377	HMS 174	<i>Bam</i> H I / <i>Hind</i> III

¹ Der Doppelverdau wurde im *Bam*H I-Puffer (+BSA) der Firma New England Biolabs durchgeführt

Um die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Rezyklisierung der Vektoren zu minimieren wurden die linearisierten Vektoren mit dem Enzym SAP (Shrimp-Alkaline-Phosphatase) behandelt, welche spezifisch die endständigen 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA abspaltet.

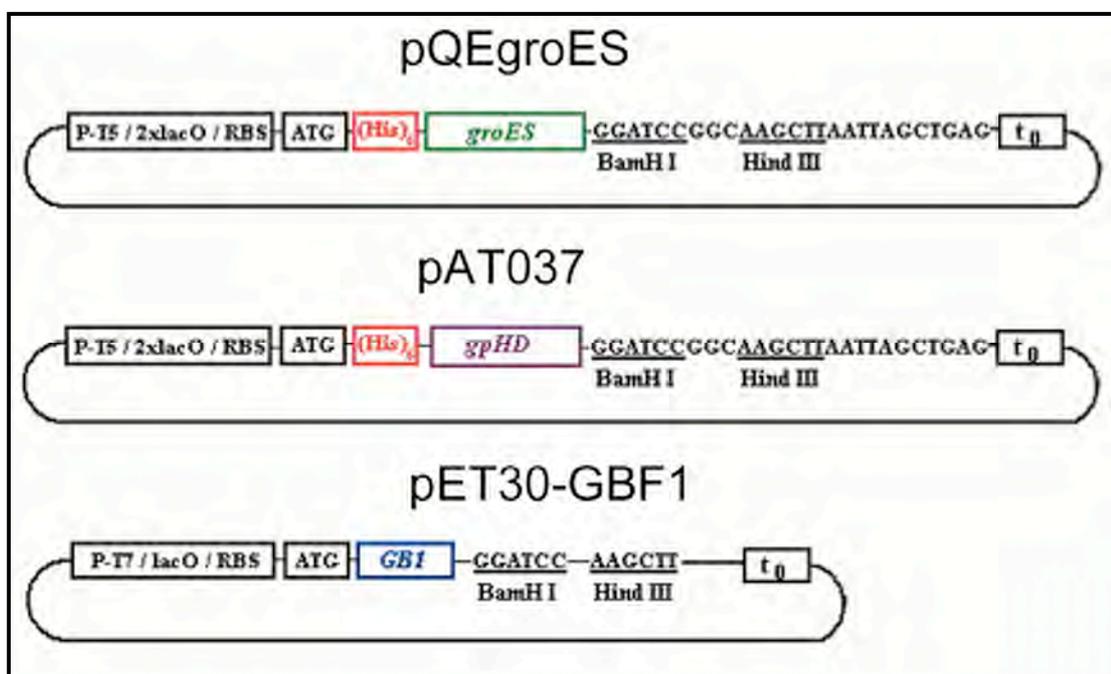


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsvektoren

Abgebildet sind die Expressionsvektoren pQEgroES (oben), pAT37 (mitte) und pET30-GBF1 (unten). Dargestellt sind die T5-(P-T5) bzw. T7-(P-T7) Promotoren mit *lac*-Operatoren (*lac* O) und Ribosomen-Bindungsstelle (RBS), das Startcodon (ATG) und die Fusionspartner GroES (*groES*), Protein D (*gpHD*) und Protein G (B1) (*GBI*). Direkt im Anschluß folgt die *Bam*H I-, wenig später die *Hind* III-Schnittstelle vor dem Transkriptionsterminations-Bereich (t₀).

4.1.2 Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate

Die Präparation der Inserts erfolgte, wie bereits im Methodenteil beschrieben, durch PCR und anschließenden Restriktionsverdau. Als Besonderheit sei hier erwähnt, daß das Insert *rcaSA_{E.a.}* *Bgl* II / *Hind* III geschnitten wurde. *Bam*H I- und *Bgl* II-geschnittene überhängende Enden sind kompatibel zueinander, wobei nach der

Ligation keine der beiden Restriktionsenzyme mehr in der Lage ist, diese Stelle zu spalten (Abb. 4.2).

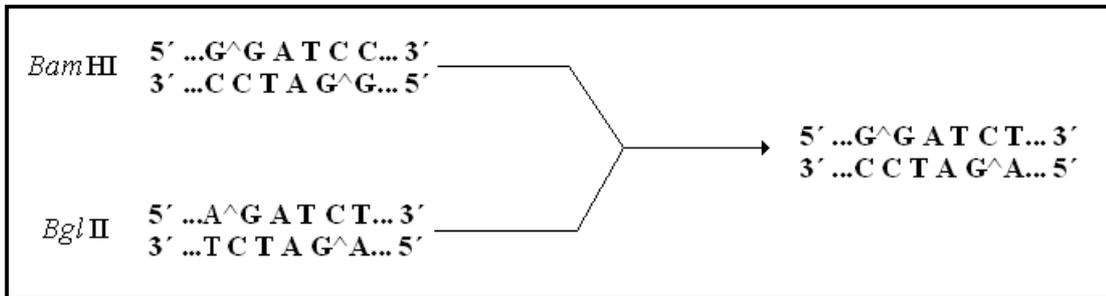


Abbildung 4.2 Kompatibilität der *BamH I* und *Bgl II* Schnittstellen

Nach Ligation von *BamH I* und *Bgl II* geschnittenen Enden ist die neu entstandene Hexanucleotid Sequenz nicht mehr durch die beiden Enzyme spaltbar.

4.1.3 Amplifikation der Ligationsprodukte in *E. coli*

Die Präparation von drei verschiedenen Vektoren und vier Inserts ergab 12 Kombinationsmöglichkeiten zur Konstruktion von neuen Plasmiden. Mit pQEgroES- und pET30-GBF1-Derivaten wurden DH5 α , im Falle von pAT037-Derivaten XL1 oder M15 x pRep4-Stämme transformiert und unter dem Selektionsdruck geeigneter Antibiotika auf LB-Agar-Platten kultiviert. Die Anzahl der bei den einzelnen Transformationen gewachsenen Klone sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2 Anzahl gewachsener Bakterienkolonien nach Transformation verschiedener *E. coli*-Stämme mit Ligationsansätzen

Expressionsvektor	Insert	Transformierter <i>E. coli</i> - Stamm	Bakterienkolonien Ligationsansatz	Bakterienkolonien Kontrolle
pQEgroES	rscA	DH5 α	40	0
	rscF	DH5 α	45	0
	hha	DH5 α	50	0
	arsR	DH5 α	9	1
pAT037	rscA	XL1	3	0
	rscF	XL1	16	5
	hha	M15 x pRep4	1	0
	arsR	M15 x pRep4	2	0
pET30-GBF1	rscA	DH5 α	1	0
	rscF	DH5 α	9	6
	hha	DH5 α	15	3
	arsR	DH5 α	13	2

Bevor mit den transformierten Bakterienstämmen weitergearbeitet wurde, musste sichergestellt sein, daß die Ligation erfolgreich verlaufen ist, d. h. das Insert korrekt in die Expressionsvektoren eingebaut wurde. Um positive Klone zu identifizieren wurden 1 - 10 gewachsene Bakterienkolonien einer Restriktionsanalyse unterzogen.

4.1.4. Restriktionsanalysen der konstruierten Plasmide

Die oben genannten Bakterienkolonien wurden zunächst auf geeignete LB-Agar-Platten umplattiert, um anschließend Plasmid-DNA zu isolieren. Alle Plasmide wurden mit unterschiedlichen Restriktionsschnitten behandelt und per Agarose-Gelelektrophorese analysiert, um den Einbau der Inserts in die Expressionsvektoren zu überprüfen (Abb. 4.3 bis 4.5). Dazu gehörten a.) eine Linearisierung durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym, welches das Plasmid nur einmal schneidet, b.) das Herausschneiden des gesamten Fusionsgens, bestehend aus dem Gen des Fusionspartners und dem des Zielproteins und c.) das Herausschneiden des Inserts (Zielprotein-Gens). Nur im Falle von *rcaA*-Konstrukten wurde aus dem in 4.1.2 beschriebenen Grund lediglich das Herausschneiden des gesamten Fusionsgens vorgenommen. Voraussetzung für diese Analyse ist die Kenntnis der zu erwartenden Fragmentgrößen, die in Tabelle 4.3 zusammengefasst sind.

Tabelle 4.3 Konstruierte Plasmide mit erwarteten Fragmentgrößen

Plasmid	Schnitt ¹	linearisiert	Schnitt ¹	Fusions-Gen	Schnitt ¹	Insert
pQEgroES-rcaA	H	4358 bp	E / H	990 bp	-	636 bp
pQEgroES-rcaF	E	4124 bp	E / H	770 bp	B / H	408 bp
pQEgroES-hha	E	3941 bp	E / H	579 bp	B / H	225 bp
pQEgroES-arsR	H	4076 bp	E / H	714 bp	B / H	360 bp
pAT037-rcaA	H	4404 bp	E / H	1038 bp	-	636 bp
pAT037-rcaF	H	4170 bp	E / H	810 bp	B / H	408 bp
pAT037-hha	H	3987 bp	E / H	627 bp	B / H	225 bp
pAT037-arsR	H	4122 bp	E / H	762 bp	B / H	360 bp
pET30-rcaA	H	5973 bp	N / H	811 bp	-	636 bp
pET30-rcaF	H	5739 bp	N / H	583 bp	B / H	408 bp
pET30-hha	H	5556 bp	N / H	400 bp	B / H	225 bp
pET30-arsR	H	5691 bp	N / H	535 bp	B / H	360 bp

¹ H=*Hind* III, E=*Eco*R I, N= *Nde* I, B=*Bam*H I

Die Abbildung 4.3 zeigt die Restriktionsanalyse der vier Plasmide, die auf dem Expressionsvektor pQEgroES basieren. In allen Fällen wurden die erwarteten DNA-Fragmente detektiert und somit die korrekte Rekombination verifiziert.

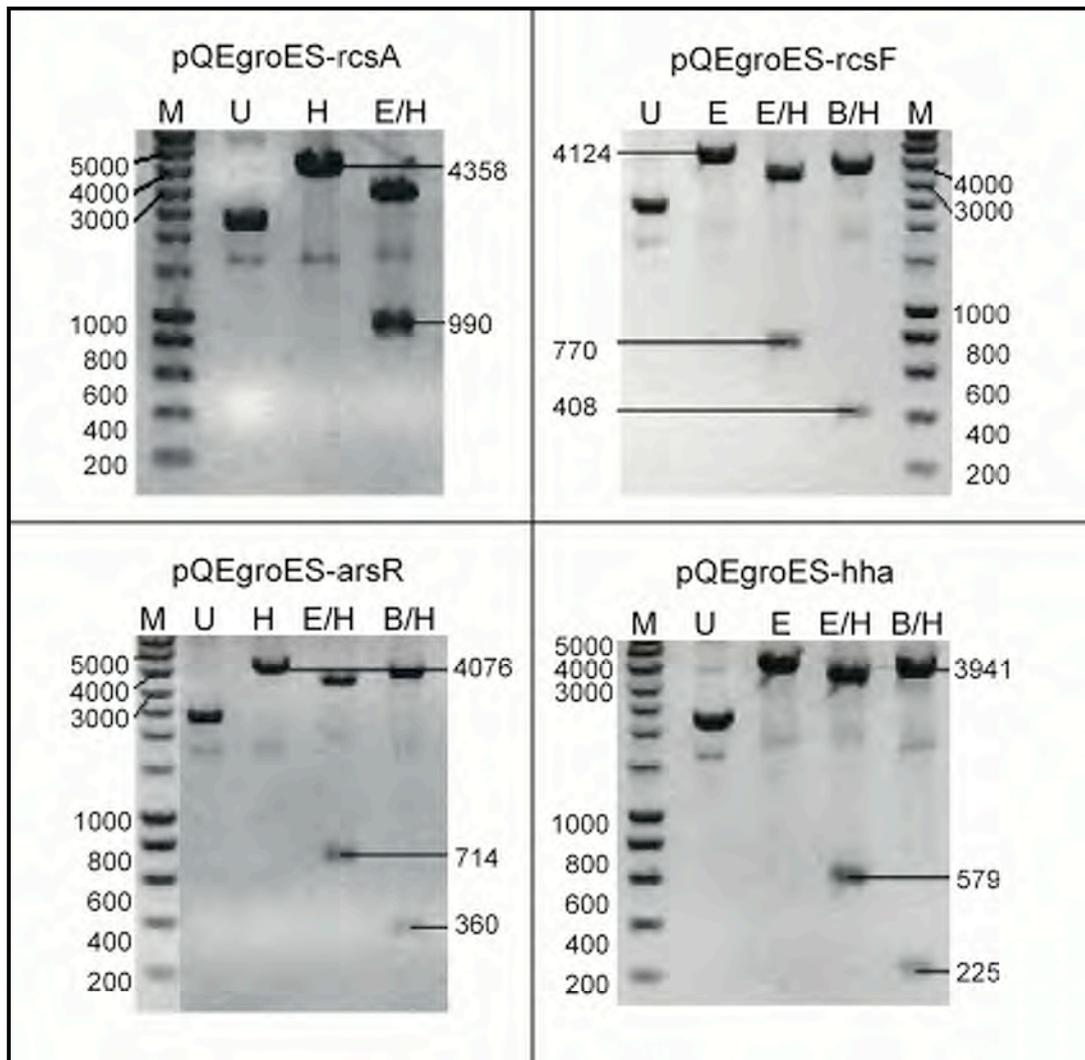


Abbildung 4.3 Restriktionsanalyse der pQEgroES-Derivate

Die Fragmente der Plasmid-DNA wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Links oben: pQEgroES-rcsA (linear 4358 bp, Fusionsgen 990 bp). Rechts oben: pQEgroES-rcsF (linear 4124 bp, Fusionsgen 770 bp, Insert 408 bp). Links unten: pQEgroES-arsR (linear 4076 bp, Fusionsgen 714 bp, Insert 360 bp). Rechts unten: pQEgroES-hha (linear 3941 bp, Fusionsgen 579 bp, Insert 225 bp). Verwendete Abkürzungen: Marker (M), ungeschnittenes Plasmid (U), *Hind* III-Verdau (H), *EcoR* I-Verdau (E), *EcoR* I/*Hind* III Doppelverdau (E/H), *BamH* I/*Hind* III- Doppelverdau (B/H).

Bis auf das Plasmid pAT037-hha konnten auch die vom Expressionsvektor pAT037 abgeleiteten Plasmide durch Restriktionsanalyse identifiziert werden (Abb. 4.4). Die Isolierung des Plasmids pAT037-arsR aus dem Stamm M15 x pRep4 sowie seine Restriktionsanalyse gestaltete sich durch das Auftreten verschmierter Banden auf dem Agarosegel relativ schwierig (rechtes Bild) und musste daher mehrere Male

wiederholt werden. Die Restriktionsanalyse des Plasmids pAT037-hha, ebenfalls aus dem Stamm M15 x pRep4 isoliert, ist aus demselben Grund nicht gelungen, weshalb in diesem Fall eine Sequenzierung des Plasmids durchgeführt wurde. In diesem Fall wäre es sinnvoller gewesen die Klonierung der Plasmide pAT037-arsR und pAT037-hha im Stamm XL1 durchzuführen.



Abbildung 4.4 Restriktionsanalyse der pAT037-Derivate

Die fragmentierte Plasmid-DNA wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Links: pAT037-rcsA (linear 4404 bp, Fusionsgen 1038 bp). Mitte: pAT037-rcsF (linear 4170 bp, Fusionsgen 810 bp, Insert 408 bp). Rechts: pAT037-arsR (linear 4122 bp, Fusionsgen 762 bp, Insert 360 bp). Verwendete Abkürzungen: Marker (M), ungeschnittenes Plasmid (U), *Hind* III-Verdau (H), *Eco*R I-Verdau (E), *Eco*R I/*Hind* III Doppelverdau (E/H), *Bam*H I/*Hind* III- Doppelverdau (B/H).

Alle pET30-GBF1-Derivate konnten ebenfalls identifiziert werden (Abb. 4.5).

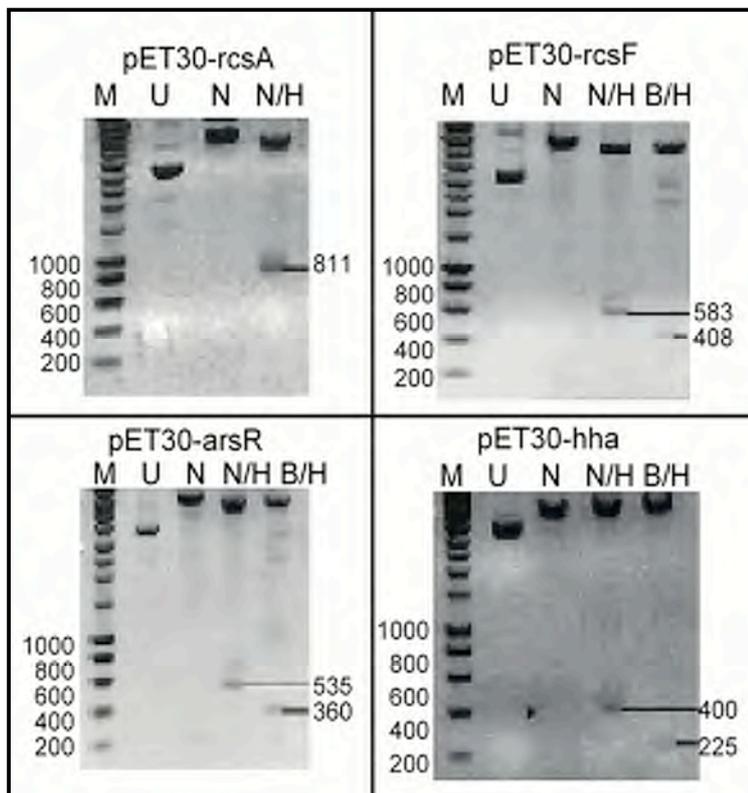


Abbildung 4.5 Restriktionsanalyse der pET30-GBF1-Derivate

Die geschnittene Plasmid-DNA wurde auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Links oben: pET30-rcsA (Fusionsgen 811 bp). Rechts oben: pET30-rcsF (Fusionsgen 583 bp, Insert 408 bp). Links unten: pET30-arsR (Fusionsgen 535 bp, Insert 360 bp) Rechts unten: pET30-hha (Fusionsgen 400 bp, Insert (225 bp). Verwendete Abkürzungen: Marker (M), ungeschnittenes Plasmid (U), *Hind* III-Verdau (H), *Nde* I-Verdau (N), *Nde* I/*Hind* III Doppelverdau (N/H), *Bam*H I/*Hind* III- Doppelverdau (B/H).

4.1.5 Sequenzanalyse der Plasmide pAT037-hha, pAT037-arsR, pET30-hha, pET30-arsR und pQEgroES-arsR

Da sich die Restriktionsanalyse der Plasmide pAT037-hha und pAT037-arsR schwierig gestaltete und die Banden auf dem Agarosegel nur schlecht zu erkennen waren wurde zusätzlich eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Plasmide pET30-hha und pET30-arsR codieren für die Fusionsproteine, bei denen die größten Ausbeuten an löslichem Protein erzielt werden konnten, weshalb die Restriktionsanalyse durch eine Sequenzierung ergänzt wurde. Das Plasmid pQEgroES-arsR wurde sequenziert, um zusätzlich festzustellen, ob es während der Klonierung zu einen Rasterschub des Leserahmens gekommen ist, da keine Überexpression des Fusionsgens beobachtet werden konnte (Abschnitt 4.2.1). Da ausgehend von den 5'-(low)-Primern der Inserts in 3' → 5'-Richtung des codogenen Stranges sequenziert wurde, konnte durch das Anlagern der Primer, als Voraussetzung der Sequenzierung, und zusätzlicher Kontrolle der Sequenz, der Erfolg der Klonierung bei jedem der oben genannten Plasmide bestätigt werden. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind im Anhang angefügt.

4.2 Überexpression der konstruierten Fusionsgene in *E. coli*

4.2.1 Analyse und Optimierung der Expressionsbedingungen

Bevor eine Überproduktion der Fusionsproteine in präparativen Maßstäben in Betracht kam, musste zunächst die Expression analysiert und das Fusionsprotein auf seine Löslichkeit hin untersucht werden. Da die Überproduktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* stark von dem genetischen Hintergrund der verwendeten Stämme abhängig ist, wurden die Derivate des Expressionsvektors pQEgroES in die Stämme DH5 α , XL1, M15 x pRep4 und TOPP 2 transformiert. Derivate des Expressionsvektors pET30-GBF1 wurden aus den DH5 α -Zellen, in denen die Klonierung stattfand, isoliert und zur Überexpression in die λ (DE3)-lysogenen Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) x pLysS und HMS 174 (DE3) transformiert. Da die Expression des Protein GpHD in XL1- bzw. M15 x pRep4-Zellen bereits erfolgreich war, wurden die pAT037-modifizierten Plasmide nicht mehr in andere Stämme transformiert. Zusätzlich konnte die Expression durch Variation der Inkubationstemperatur, der Induktionsstärke oder des Induktionszeitpunktes verändert bzw. optimiert werden.

Die Bezeichnung und das Molekulargewicht der auf den konstruierten Plasmiden codierten Fusionsproteine sind mit Angabe aller transformierten *E. coli*-Stämme in Tab. 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4 Fusionsproteine mit Molekulargewicht und transformierte *E. coli*-Stämme

Plasmid	Fusionsprotein	Größe	Transformierte <i>E. coli</i> - Stämme
pQEgroES-rcsA	(His) ₆ -GroES-RcsA	33 kD	DH5α, XL1, M15 x pRep4, TOPP 2
pQEgroES-rcsF	(His) ₆ -GroES-RcsF	24 kD	DH5α, XL1, M15 x pRep4, TOPP 2
pQEgroES-hha	(His) ₆ -GroES-Hha	18 kD	DH5α, XL1, M15 x pRep4, TOPP 2
pQEgroES-arsR	(His) ₆ -GroES-ArsR	23 kD	DH5α, XL1, M15 x pRep4, TOPP 2
pAT037-rcsA	GpHD-RcsA	37 kD	XL1
pAT037-rcsF	GpHD-RcsF	28 kD	XL1
pAT037-hha	GpHD-Hha	22 kD	M15 x pRep4
pAT037-arsR	GpHD-ArsR	27 kD	M15 x pRep4
pET30-rcsA	GB1-RcsA	29 kD	BL21(DE3), BL21 (DE3) x pLysS, HMS 174 (DE3)
pET30-rcsF	GB1-RcsF	20 kD	BL21(DE3), BL21 (DE3) x pLysS, HMS 174 (DE3)
pET30-hha	GB1-Hha	14 kD	BL21(DE3), BL21 (DE3) x pLysS, HMS 174 (DE3)
pET30-arsR	GB1-ArsR	19 kD	BL21(DE3), BL21 (DE3) x pLysS, HMS 174 (DE3)

4.2.2 Expressionsanalyse der pQEgroES abgeleiteten Plasmide in verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen

Das Co-Chaperon GroES ist an der korrekten Faltung von Proteinen durch das GroES / GroEL-System direkt beteiligt und durch seine geringe Größe (ca. 10 kD) eignet es sich potentiell für NMR-Messungen von Fusionsproteinen. *In vivo* könnte es samt fusioniertem Zielprotein mit dem Chaperon GroEL assoziieren und somit die korrekte Faltung des Zielproteins einleiten bzw. unterstützen.

In dieser Arbeit wurden die vier Zielproteine RcsA, RcsF, Hha und ArsR über einen kurzen Linker von 2 Aminosäuren C-terminal an (His)₆-GroES fusioniert. Vier verschiedene *E. coli*-Stämme wurden jeweils mit diesen vier Plasmiden transformiert. Der Stamm DH5α hat eine Mutation im Gen *recA* und wird üblicherweise zur Klonierung verwendet. Durch seine hohe Wachstumsrate wird er oft auch zum Zweck der Überproduktion von Proteinen eingesetzt. Die Stämme XL1 und M15 x pRep4 besitzen durch das Gen *lac* I^q eine erhöhte cytosolische *lac*-Repressor-Konzentration. Erst bei Induktion mit IPTG löst er sich von seiner Bindungsstelle, dem *lac*-Operator im T5-Promotr-Bereich, und gibt somit die Transkription der Fusionsgene durch die wirtseigene RNA-Polymerase frei. Beim

Stamm TOPP 2 handelt es sich um keinen *E. coli*-K-Stamm. Auch er exprimiert das Gen *lac I^q* und wird vom Hersteller Stratagene GmbH als Expressionsstamm beschrieben, der sich zur Überproduktion „schwieriger“ Proteine eignet.

Nach Inkubation bei 37°C wurden die Zellen bei einer $OD_{600} \approx 0,5$ mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert, nach weiteren 4 Stunden geerntet und mittels SDS-PAGE auf Expression hin untersucht (Abb. 6). Hierbei zeigte sich, daß die Überexpression aller vier Fusionsgene unter diesen Bedingungen in insgesamt 16 transformierten *E. coli*-Stämmen negativ ausfiel, d. h. keine Banden in zu erwartender Höhe zu sehen waren. Obwohl eine schwache Expression der Fusionsgene nicht ausgeschlossen werden kann, scheint jedoch das System mit GroES als N-terminaler Fusionspartner für eine Überproduktion im mg-Maßstab ungeeignet zu sein.

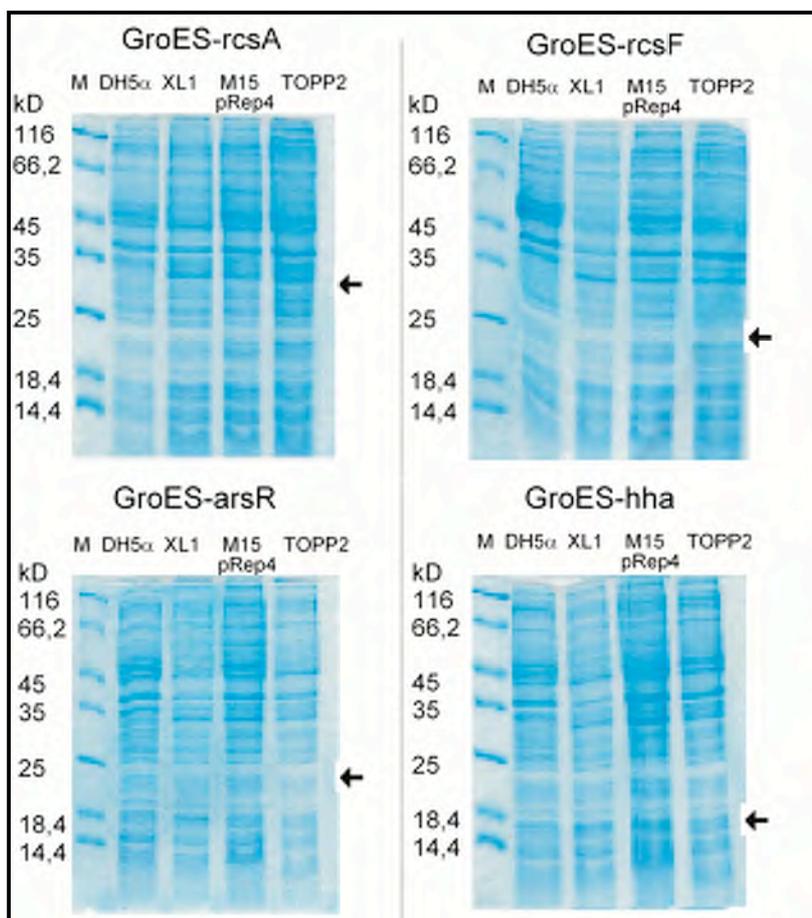


Abbildung 4.6 Expressionsanalyse der pQEGroES-Derivate

Unterschiedliche *E. coli*-Stämme wurden mit pQEGroES-Derivaten transformiert und auf Expression der Fusionsgene hin analysiert. Die Rohextrakte aus einer 1ml Kultur wurden auf einem 16,5%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pfeile markieren den Bereich, in der im Falle der Überproduktion eine deutliche Bande zu erwarten gewesen wäre (vgl. Tab. 4.4).

Da die Sequenzierung von pQEGroES-arsR keine Fehler auf DNA-Ebene zu erkennen gaben, scheint hier ein proteolytischer Abbau der Fusionsproteine am wahrscheinlichsten zu sein.

4.2.3 Koexpression von (His)₆-GroES-RcsF bzw. (His)₆-GroES-ArsR mit den Chaperonen GroES und GroEL

Die alleinige Überproduktion von (His)₆-GroES vom Vektor pQEgroES fiel in nur geringer Ausbeute aus. Jedoch wird GroES bei gleichzeitiger Überexpression der Chaperone GroEL und GroES mit dem Vektor pGro12 in großen Mengen produziert (F. Bernhard, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt). Um die mögliche Abhängigkeit der Überproduktion der (His)₆-GroES-Fusionsproteine von der Anwesenheit von GroEL zu überprüfen wurden die Plasmide pQEgroES-rcsF und pQEgroES-arsR mit dem Plasmid pGro12 in XL1-Zellen kotransformiert. Das Plasmid pGro12 besitzt die Gene der Chaperone GroEL und GroES als eine Transkriptionseinheit, die unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren *lac*-Promotors steht. Außerdem besitzt es das Resistenzgen für Kanamycin, so daß die transformierten XL1-Zellen unter dem Selektionsdruck von Ampicillin und Kanamycin auf LB-Platten ausgestrichen und auch in LB-Medien im analytischen Maßstab fermentiert werden konnten. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden sowohl die Plasmide pQEgroES-rcsF bzw. pQEgroES-arsR, als auch pGro12 durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert (Inkubationstemperatur: 37°C). Nach 3 - 4 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen und ihre anschließende Analyse durch SDS-PAGE (Abb. 4.7). Die Produktion der Chaperone GroES und GroEL ist deutlich zu erkennen, die der erwarteten Fusionsproteine allerdings nicht. Daher bleibt festzuhalten, daß auch durch die Anwesenheit von GroEL keine erfolgreiche Überproduktion der Proteine (His)₆-GroES-RcsF und (His)₆-GroES-ArsR gelungen ist.

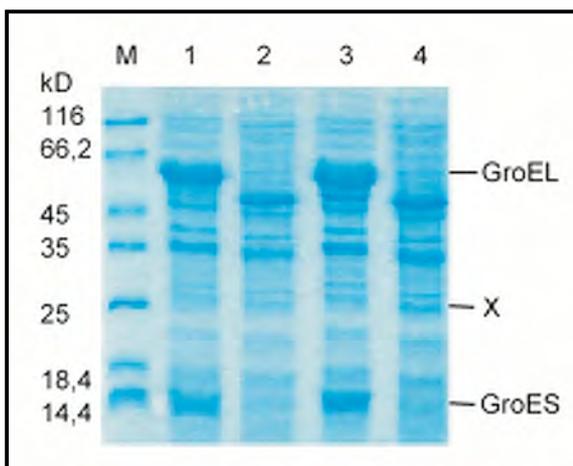


Abbildung 4.7 Koexpression von Chaperonen

Aus einer 1 ml Kultur wurden Rohextrakte des Stammes XL1 auf einem 16,5%igen SDS-Gel analysiert. Belegung der Bahnen: (1) XL1 x pQEgroES-rcsF x pGro12, (2) XL1 x pQEgroES-rcsF, (3) XL1 x pQEgroES-arsR x pGro12, (4) XL1 x pQEgroES-arsR. Die Überproduktion der Chaperone GroEL und GroES ist deutlich erkennbar und rechts markiert. Im Bereich, wo die Fusionsproteine (His)₆-Gro-RcsF bzw. (His)₆-Gro-ArsR zu erwarten waren (X) erkennt man jedoch keine Bande.

4.2.4 Expressions- und Löslichkeitsanalyse der pAT037 abgeleiteten Plasmide

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Expression der transformierten Bakterien (s. Tab. 4.4) bei folgenden Bedingungen: 3 ml-Ansatz, Inkubation bei 37°C, Induktion bei $OD_{600}=0,5$ (IPTG, Endkonzentration 1 mM) und Ernte der Zellen nach 4 Stunden. Diese wurden anschließend per Ultraschall aufgeschlossen, um die Proteine auf ihre Löslichkeit hin zu untersuchen. Die Analyse per SDS-PAGE ergab, daß mit Hilfe des Expressionsvektors pAT037 alle vier Fusionsproteine überproduziert und die Löslichkeit des Proteins GpHD-Hha gesteigert werden konnte.

Das in Abb. 4.16 gezeigte SDS-Gel zeigt, daß der lösliche Anteil des überproduzierten Proteins nur maximal 20% betrug, trotzdem konnte dies als erster Erfolg gewertet werden, so daß eine Produktion im präparativen Maßstab durchgeführt wurde. Zur ihrer Vorbereitung wurden zunächst weitere Analysen durchgeführt. Proben, die nach 2, 4, 6 und 16 Stunden Inkubation nach der Induktion durch IPTG genommen wurden zeigten, daß a.) die maximale Ausbeute bereits nach 4 Stunden erreicht war und b.) nach 16 Stunden das Fusionsprotein zwar im Gesamtzellprotein, jedoch nicht mehr im löslichen Anteil nachweisbar war (Abb. 4.8). Es ist zu vermuten, daß nach dieser Zeit das Protein in löslicher Form proteolytisch abgebaut wurde, oder vollständig als Inclusion-Body präzipitiert ist. Eine Senkung der Inkubationstemperatur zur Erhöhung des löslichen Anteils blieb erfolglos (nicht gezeigt). Daher wurde für die präparative Proteinproduktion eine Induktionszeit von 4 Stunden bei einer Temperatur von 37°C gewählt. Die Ergebnisse werden im Abschnitt 4.2.7 vorgestellt.

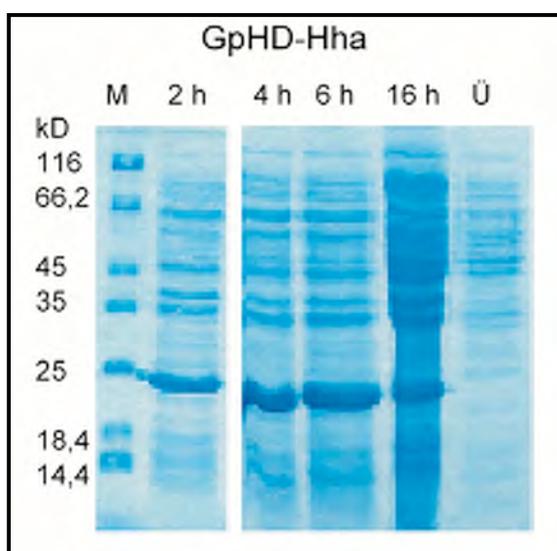


Abbildung 4.8 Expressionsanalyse des Proteins GpHD-Hha

Gezeigt ist die Analyse auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel von Rohextrakten aus 1 ml Proben, die nach 2, 4, 6, bzw. 16 Stunden Inkubation aus M15 x pRep4 x pAT037-hha-Zellen entnommen wurden. Den löslichen Anteil der Zellproteine (Ü) erhielt man aus dem Überstand nach Zentrifugation der per Ultraschall aufgeschlossenen Zellen. Die Intensität Bande des überproduzierten Proteins GpHD-Hha (vgl. Tab. 4.4) ändert sich nach 4 Stunden nicht mehr wesentlich. Nach 16 Stunden Inkubation ist im löslichen Überstand keine Bande des überproduzierten Proteins mehr zu erkennen.

Die Überproduktion und Löslichkeit des Proteins GpHD-ArsR wurde neben den oben genannten Standardbedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 30°C (Abb. 4.9) und 25°C (nicht gezeigt) überprüft. Hierbei stellte sich heraus, daß die N-terminale Fusionierung des Proteins GpHD keinen Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins ArsR hatte und auch die Senkung der Temperatur nicht zu seiner Anreicherung in der löslichen Fraktion der Gesamtzellproteine führte.

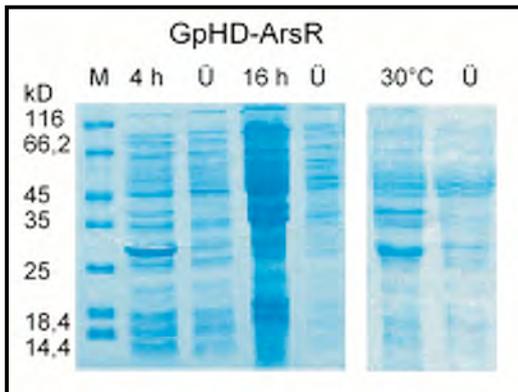


Abbildung 4.9 Expressionsanalyse des Protein GpHD-ArsR

Aus 1ml Kulturen wurden Rohextrakte von M15 x pRep4 x pAT037-arsR-Zellen auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Links: Probenentnahme bei Inkubationstemperatur von 37°C (links) nach 4 bzw. 16 Stunden. Rechts: Probenentnahme bei 30°C nach 4 Stunden. Die Bande des überproduzierten Proteins GpHD-ArsR (vgl. Tab. 4.4) ist im Gesamtzellprotein, jedoch nicht im löslichen Überstand (Ü) zu sehen. Auch eine Senkung der Temperatur auf 30°C führte zu keiner Zunahme der Löslichkeit.

Die Proteine GpHD-RcsA und GpHD-RcsF wurden ebenfalls nicht in löslicher Form überproduziert, wie man in Abb. 4.10 erkennen kann. Auf eine Expression bei niedrigeren Temperaturen wurde aus zeitlichen Gründen verzichtet.

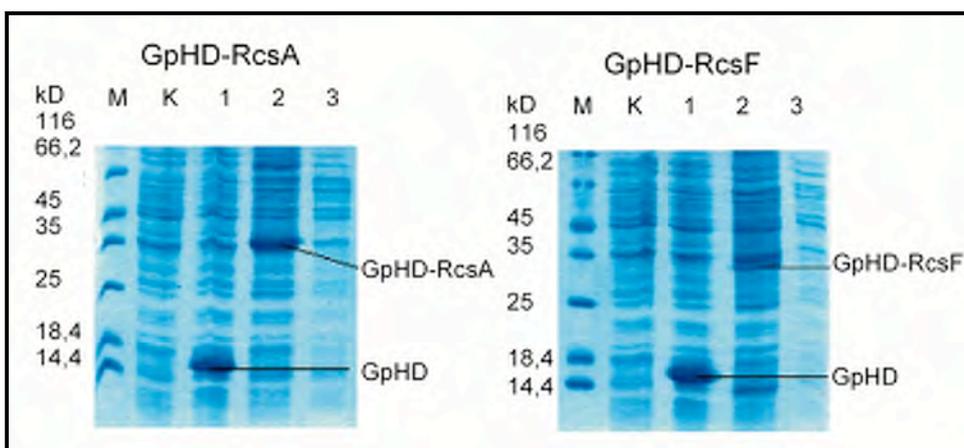


Abbildung 4.10 Expressionsanalyse der Proteine GpHD-RcsA und GpHD-RcsF

Rohextrakte von XL1-Zellen wurden auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel nach 4 Stunden Induktionszeit elektrophoretisch aufgetrennt. Belegung der Bahnen (links): Marker (M), nicht induzierte Kontrolle (K), XL1 x pAT037 (1), XL1 x pAT037-rcsA (2) mit löslichem Anteil der Zellproteine (3). Rechts: Marker (M), nicht induzierte Kontrolle (K), XL1 x pAT037 (1), XL1 x pAT037-rcsF (2) mit löslichem Anteil der Zellproteine (3). Die erwarteten Banden (vgl. Tab. X) sind deutlich zu erkennen, wobei das scheinbare Molekulargewicht von GpHD-RcsF etwas höher ist als das berechnete.

4.2.5 Expressions- und Löslichkeitsanalyse der pET30-GBF1 abgeleiteten Plasmide in λ (DE3)-lysogenen Wirtsstämmen

Wie im Methodenteil beschrieben wurden die λ (DE3)-lysogenen Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) x pLysS und HMS 174 (DE3) transformiert und eine Expressions- und Löslichkeitsanalyse per SDS-PAGE durchgeführt. Im Gegensatz zum *E. coli* K-Stamm HMS 174 handelt es sich bei BL21-Abkömmlingen um *E. coli* B-Stämme. Durch die Anwesenheit des zusätzlichen Plasmids wird im BL21 (DE3) x pLysS-Stamm der Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, das T7-Lysozym, produziert, um eine basale Transkription am T7-lac-Promotors zu minimieren.

Die Löslichkeit des Proteins ArsR konnte, im Gegensatz zum Versuch mit dem Protein GpHD, durch den Fusionspartner GB1 erhöht werden. Die Überproduktion gelang allerdings nur im Stamm BL21 (DE3) x pLysS (Abb. 4.11). Hier wird besonders deutlich welchen signifikanten Einfluß der unterschiedliche Genotyp des Wirtsstammes auf die Überexpression haben kann. Vermutlich erleidet das Plasmid pET30-arsR im *E. coli* K-Stamm HMS 174 (DE3), so wie im Stamm BL21 (DE3) auch, Instabilitäten in Form von Mutationen, wenn es zu einer basalen Transkription durch die T7-RNA-Polymerase kommt. In diesem Fall ist die stringente Kontrolle des T7-lac-Promotors durch die Inhibition der T7-Polymerase durch das T7-Lysozym essentiell.

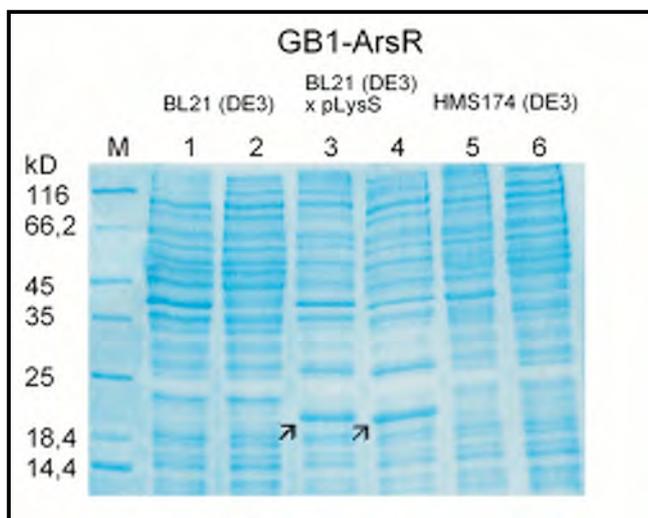


Abbildung 4.11 Expressions- und Löslichkeitsanalyse des Proteins GB1-ArsR

Die Zellrohextrakte einer 1ml Kultur wurden auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Belegung der Bahnen: Marker (M), BL21 (DE3) x pET30-arsR Gesamtzellprotein (1) und löslicher Anteil (2), BL21 (DE3) x pLysS x pET30-arsR Gesamtzellprotein (3) und löslicher Anteil (4), HMS174 (DE3) x pET30-arsR Gesamtzellprotein (5) und löslicher Anteil (6). Nur beim Stamm BL21 (DE3) x pLysS x pET30-arsR ist eine Bande des überproduzierten Proteins GB1-ArsR (vgl. Tab 4.4) im löslichen Zustand zu sehen.

Ähnlich scheint es sich im Fall der Überproduktion des Proteins GB1-Hha zu verhalten. Auch hier erleidet das Plasmid pET30-hha im *E. coli* B-Stamm BL21 (DE3) Schäden, wenn es zu keiner Inhibition der T7-Polymerase durch das T7-Lysozym kommt. Im Stamm HMS 174 (DE3) scheint die basale Transkription durch die T7-Polymerase keinen Einfluß auf die Plasmidstabilität zu haben, jedoch ist hier eine schwächere Expression als im Stamm BL21 (DE3) x pLysS zu beobachten (Abb. 4.12). Die Löslichkeit des Proteins GB1-Hha betrug, nach Abschätzung der Bandenintensität auf dem SDS-Gel, im Stamm BL21 (DE3) x pLysS etwa 50%, was durch Senkung der Inkubationstemperatur auf 30°C auf einen Wert von 100% gesteigert werden konnte (s. Abb. 4.20).

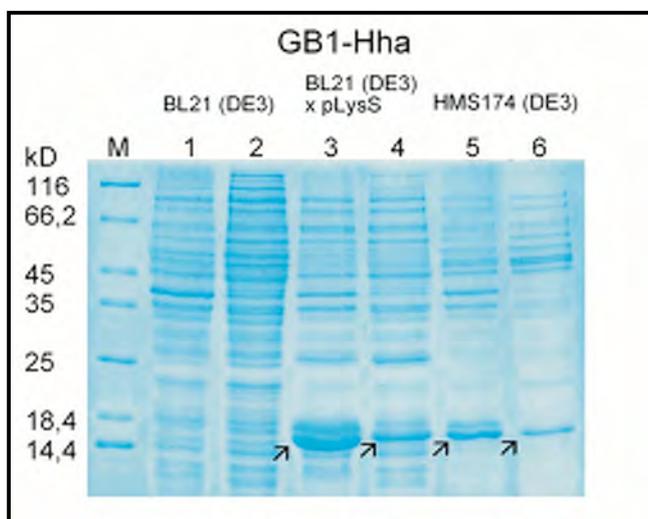


Abbildung 4.12 Expressions- und Löslichkeitsanalyse des Proteins GB1-Hha

Die Zellrohextrakte einer 1ml Kultur wurden auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Belegung der Bahnen: Marker (M), BL21 (DE3) x pET30-hha Gesamtzellprotein (1) und löslicher Anteil (2), BL21 (DE3) x pLysS x pET30-hha Gesamtzellprotein (3) und löslicher Anteil (4), HMS174 (DE3) x pET30-hha Gesamtzellprotein (5) und löslicher Anteil (6). Bei den Stämmen BL21 (DE3) x pLysS x pET30-arsR und HMS174 (DE3) ist eine Bande des überproduzierten Proteins GB1-Hha (vgl. Tab 4.4) im löslichen Zustand zu sehen. Dagegen wurde das Protein im Stamm BL21 (DE3) nicht signifikant überproduziert.

Die Überproduktion des Proteins GB1-RcsA ergab in den Stämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3) x pLysS eine vergleichsweise geringe Ausbeute nach einer Induktionszeit von 4 Stunden, die Banden in erwarteter Höhe sind dennoch sichtbar (Abb. 4.13). Die Löslichkeit konnte jedoch durch die N-terminale Fusion des Proteins GB1 nicht gesteigert werden. Analog verhielt es sich für die Überproduktion und Löslichkeit von GB1-RcsF. Während wiederum die Produktion im Stamm HMS174 (DE3) am höchsten war, konnte das Protein nie signifikant im löslichen Anteil der Zellproteine nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Wie durch die Fusionierung des Proteins GpHD blieb auch die Fusionierung von GB1 hinsichtlich der funktionellen Überproduktion der Proteine RcsA und RcsF erfolglos.

Eine Verbesserung durch Senkung der Inkubationstemperatur wurde als unwahrscheinlich eingeschätzt, weshalb auch aus zeitlichen Gründen darauf verzichtet wurde.

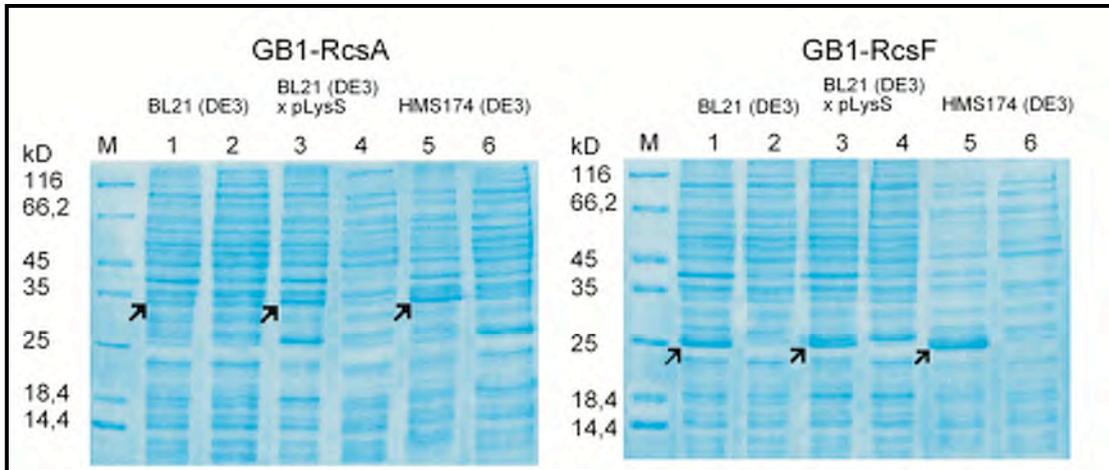


Abbildung 4.13 Expressions- und Löslichkeitsanalyse der Proteine GB1-RcsA und GB1-RcsF

Die Zellrohextrakte einer 1ml Kultur wurden auf einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Belegung der Bahnen: Marker (M), BL21 (DE3) x pET30-rcsA (links) bzw. pET30-rcsF (rechts) Gesamtzellproteine (1) und lösliche Anteile (2), BL21 (DE3) x pLysS x pET30-rcsA (links) bzw. pET30-rcsF (rechts) Gesamtzellproteine (3) und lösliche Anteile (4), HMS174 (DE3) x pET30-rcsA (links) bzw. pET30-rcsF (rechts) Gesamtzellproteine (5) und lösliche Anteile (6). Die Banden der überproduzierten Proteine sind mit Pfeilen markiert. In den löslichen Fraktionen ist jedoch in keinem der 6 Fälle eine Bande eines überproduzierten Fusionsproteins zu erkennen.

4.2.6 Zusammenfassung der Expressionsanalysen und Optimierungen

Während die N-terminale Fusionierung des Proteins (His)₆-GroES in keinem der transformierten *E. coli*-Stämme zu keiner Überexpression der schwerlöslichen Proteine RcsA, RcsF, Hha und ArsR führte, konnten sie als Fusionsprotein mit den Proteinen GpHD und GB1 überproduziert werden. Dabei fiel die Überexpression der Fusionsgene unter den Standardbedingungen: Inkubationstemperatur 37°C, Induktion bei OD₆₀₀=0,5 mit 1mM IPTG für 4 Stunden für die verschiedenen Fusionsproteine in unterschiedlichem Ausmaß aus, was durch Abschätzung der Bandenintensität auf den analysierten SDS-Gelen abgeschätzt wurde. Die Löslichkeit konnte nur im Falle der Fusionsproteine GpHD-Hha, GB1-ArsR und GB1-Hha erhöht werden. Der lösliche Anteil des Proteins GpHD-Hha betrug nur maximal 20% und konnte auch durch Senkung der Inkubationstemperatur nicht gesteigert werden. Nichtsdestotrotz erfolgte eine Optimierung des Erntezeitpunktes. Auch die Löslichkeit des Proteins GpHD-ArsR konnte auf diese Weise nicht erhöht werden. Für die Überproduktion der Proteine GB1-Hha und GB1-ArsR musste zunächst ein geeigneter Expressionsstamm gefunden werden, bevor eine Optimierung der Expressionsbedingungen durchgeführt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß durch

die Senkung der Inkubationstemperatur der lösliche Anteil des Proteins GB1-Hha von ca. 50% auf ca. 100% gesteigert werden konnte. Die Ergebnisse der Expressions-, bzw. Löslichkeitsanalyse sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5 Zusammenfassung der Expressions- und Löslichkeitsanalysen

Fusionsprotein	<i>E. coli</i> -Stamm	<i>E. coli</i> -Stamm	<i>E. coli</i> -Stamm	<i>E. coli</i> -Stamm		
	XL1	M15 x pRep4	DH5a	TOPP 2		
(His) ₆ -GroES-Fusionsproteine	keine Expression ¹					
Fusionsprotein	<i>E. coli</i> -Stamm	löslich ?	<i>E. coli</i> -Stamm	löslich?		
	XL1		M15 x pRep4			
GpHD-RcsA	sehr stark	nein	-	-		
GpHD-RcsF	schwach	nein	-	-		
GpHD-Hha	-	-	sehr stark	ja, ca. 20% ²		
GpHD-ArsR	-	-	stark	nein		
Fusionsprotein	<i>E. coli</i> -Stamm	löslich ?	<i>E. coli</i> -Stamm	löslich ?	<i>E. coli</i> -Stamm	löslich ?
	BL21 (DE3)		BL21 (DE3) x pLysS		HMS174 (DE3)	
GB1-RcsA	sehr schwach	nein	schwach	nein	schwach	nein
GB1-RcsF	schwach	nein	schwach	nein	stark	nein
GB1-Hha	keine Expression	-	sehr stark	ja, 50 % ³ 100% ⁴	schwach	ja, 50%
GB1-ArsR	keine Expression	-	schwach	ja, 100%	keine Expression	-

¹ auch die Koexpression der Chaperone GroEL und GroES führten zu keiner signifikanten Produktion der Proteine (His)₆-GroES-ArsR bzw. (His)₆-GroES-RcsF

² Inkubationstemperatur: 37°C, eine Senkung führte zu keiner Verbesserung

³ Inkubationstemperatur: 37°C

⁴ Inkubationstemperatur: 30°C

4.2.7 Präparative Produktion und Isolierung des Proteins GpHD-Hha

Wie im Methodenteil beschrieben wurden M15 x pRep4 x pAT037-hha Zellen in 2 Liter-LB-Medium (+ 100 µg Amp / ml) fermentiert, bei einer OD₆₀₀=0,5 mit IPTG (1mM Endkonzentration) induziert und auf der Basis des im analytischen Teil erhaltenen Ergebnis nach 4 Stunden geerntet. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, wobei die in 50 ml Puffer A resuspendierten Zellen beim ersten Mal per Ultraschall (40T Sonde, 3 x 60 s, 0,7 s Zeitintervall, 200 W) und beim zweiten Mal per French-Press (1200 psi) aufgeschlossen wurden. Im Anschluß folgte die Isolierung des Proteins mittels Metall-Chelat-Chromatographie an einer Ni-IDA-Säule mit einem Säulenvolumen von 25 ml. Dazu wurde die Probe mit Hilfe eines 150 ml Loops auf die zuvor mit Ni²⁺-Ionen beladene Säule aufgetragen und mit Puffer A1 (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 8) nachgespült (Flußrate 4 ml/min). Der

hierbei im Elutionsprofil (Abb. 4.14) auftretende erste Peak enthält Proteine, die nicht an die Säule gebunden haben. Nach weiterem Spülen bis zur Basislinie der UV-Detektion, erfolgte die Elution des Proteins mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A1 und Puffer B1 (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8 + 1 M Imidazol). Die maximale Imidazolkonzentration von 1 mol/l war nach 70 – 80 Minuten (Flußrate 4 ml/min) erreicht. Im Elutionsprofil tritt ein zweiter Peak bei einer Imidazol-Konzentration von etwa 10mM - 170mM auf, an den sich der Protein GpHD-Hha enthaltende dritte Peak direkt anschließt. Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde anschließend durch SDS-PAGE-Analyse ermittelt.

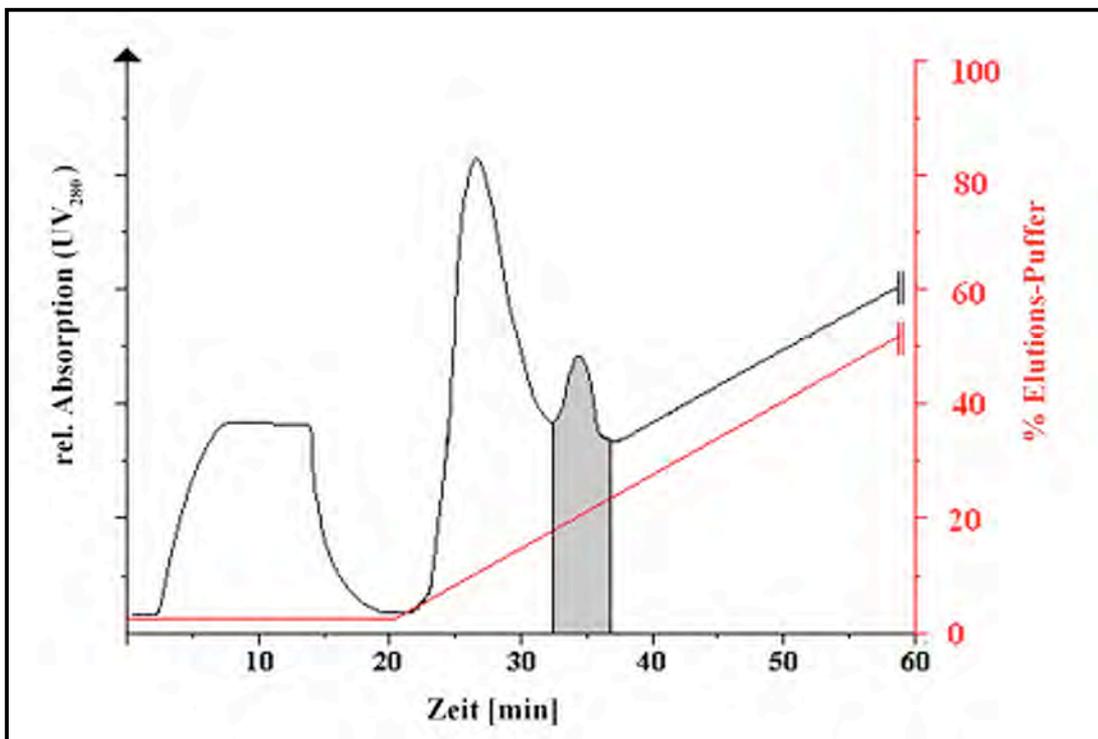


Abbildung 4.14 Elutionsprofil der Ni-IDA Metallchelatchromatographie

Im ersten Peak waren Proteine enthalten, die nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. Bei einer Imidazol Konzentration von ca. 10 – 170 mM folgt ein zweiter Peak, in denen schwachbindende Proteine eluierten. Direkt daran schließt sich der dritte Peak an (ca. 170 – 250 mM Imidazol), in dem das Protein GpHD-Hha bzw. GpHD (s. Text) enthalten war. Der grau markierte Bereich entspricht den vereinigten Fraktionen.

Die Fraktionen, in denen das Protein GpHD-Hha enthalten war, wurden auf ein Gesamtvolumen von 20 ml vereinigt und die Konzentration nach Bradford zu 800 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines CentriPräp- und CentriCon-Einwegkonzentrators auf ein Volumen von 1 ml eingengt, wonach eine Konzentration von 3,5 mg/ml gemessen wurde. Der Verlust durch das Aufkonzentrieren betrug somit knapp 80%, was teilweise auf die Absättigung der Membran, als auch auf die eingetretene Präzipitation des Proteins zurückzuführen war.

Die Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE ergab noch ein weiteres Ergebnis, denn offenbar wird das Fusionsprotein GpHD-Hha während der Aufreinigungs-Prozedur in zwei Domänen gespalten (Abb. 4.15). Ein Größenvergleich der auftretenden Banden läßt vermuten, daß es in seine einzelnen Bestandteile, d. h. die Proteine GpHD und Hha aufgespalten wurde. Auf dem Gel wäre somit das Fusionsprotein GpHD-Hha und das Protein GpHD zu sehen, während das unlösliche Protein Hha wahrscheinlich präzipitiert ist. Als mögliche Ursachen dieser Spaltung wären zu nennen:

- a.) spezifische proteolytische Spaltung durch periplasmatische Proteasen. Ein intrazellulärer Proteaseverdau ist unwahrscheinlich, da in der Gesamtprotein-Probe vor dem Aufschluß der Zellen (Abb. 4.15) kein Spaltprodukt auf dem Gel zu erkennen ist.
- b.) Spaltung des Proteins durch Ultraschall oder Druck beim Aufschluß durch die French-Press. Unter Umständen wurde dabei das Protein mehr oder weniger spezifisch in oder in der Nähe der hypothetisch labilen Linkerregion gespalten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Arbeit mit dem Protein GpHD-Hha an dieser Stelle eingestellt und als Alternative die Produktion und Isolierung des Proteins GB1-Hha durchgeführt.

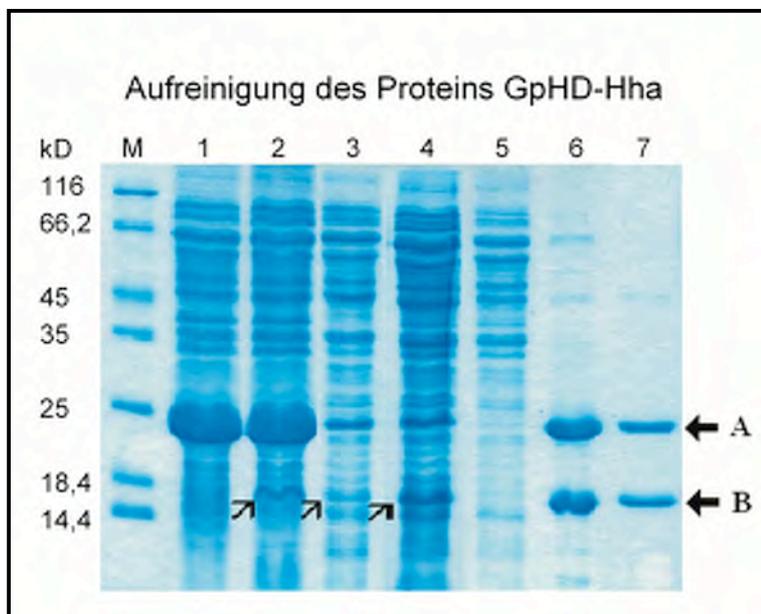


Abbildung 4.15 Aufreinigung des Proteins GpHD-Hha

Belegung der Bahnen: Gesamtzellproteine des Stammes M15 x pRep4 x pAT037-hha nach Ultraschall- (1) bzw. French-Press-Aufschluß (2) und die löslichen Überstände nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer (3) bzw. (4), Durchfluß (1. Peak) der Ni-IDA-Säulenchromatographie (5), Probe nach (6) und vor dem Aufkonzentrieren (7). Die höhere Bande der aufgereinigten Proteine (A) kann durch Vergleich mit den Bahnen 1-4 dem Protein GpHD-Hha zugeordnet, die tiefere (B) wahrscheinlich dem abgespaltenen Fusionspartner GpHD zugeordnet werden.

4.2.8 Präparative Produktion und Isolierung des Proteins GB1-Hha

Zur Überproduktion des Proteins GB1-Hha wurde der transformierte *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) x pLysS x pET30-hha gewählt. Eine Überproduktion bei den im analytischen Teil angewandten Bedingungen war erfolgreich verlaufen, doch um die Ausbeute zu erhöhen sollte noch der optimale Erntezeitpunkt ermittelt werden. Hierfür wurde eine Kinetik der Proteinproduktion aufgenommen, mit dem Ergebnis, daß die maximale Produktion 6 Stunden nach Induktion (1 mM IPTG) erreicht war und somit die Zellen unmittelbar nach Erreichen der stationären Phase (maximale Zelldichte) geerntet werden konnten (Abb. 4.16). Des weiteren konnte durch Senkung der Inkubationstemperatur nach Induktion auf 30°C die Löslichkeit des Überproduzierten Proteins deutlich gesteigert werden, wie man durch den Vergleich der Abbildungen 4.12 und 4.20 sehen kann. Daher erfolgte die Überproduktion unter den folgenden optimierten Bedingungen: Verwendeter *E. coli*-Stamm: BL21 (DE3) x pLysS x pET30-hha, Fermentation in 2 x 1-Liter LB-Medium, Anzuchtstemperatur 37°C bis $OD_{600}=0,7$, Induktion mit 1 mM IPTG, Senkung der Inkubationstemperatur auf 30°C, Ernte der Zellen nach Erreichen der stationären Phase, Aufnahme der Zellen in Puffer A1 (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4), Aufschluß derselben mittels French-Press (1200 psi). Diese Optimierung war auch notwendig, um die im Anschluß folgende ^{15}N -Markierung mittels $^{15}NH_4Cl$ möglichst effizient und kostengünstig zu gestalten.

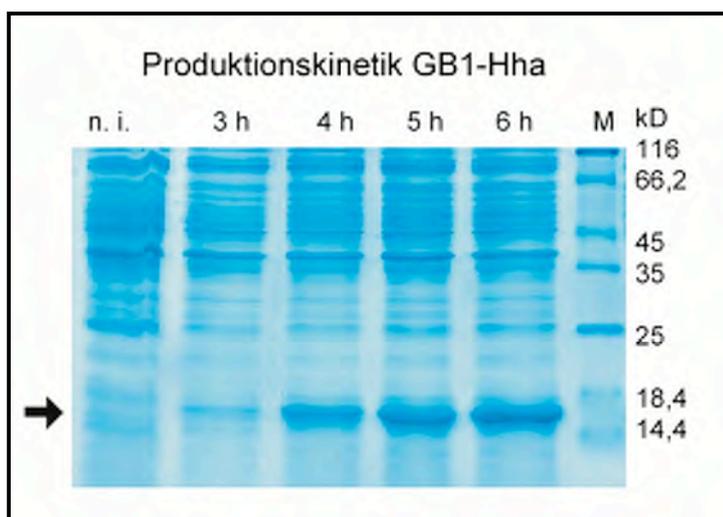


Abbildung 4.16 Kinetik der Produktion des Proteins GB1-Hha

Zellrohextrakte von 1ml Proben vom Stamm BL21 (DE3) x pLysS x pET30 wurden nach 0 (n. i.), 3, 4, 5 und 6 Stunden Induktionszeit auf einem 16,5%igem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Produktionsmenge des Proteins GB1-Hha konnte an der Intensität der Banden im durch den Pfeil markierten Bereich geschätzt werden.

Nach der Optimierung der Produktionsbedingungen wurde das Bindungsverhalten des Proteins an unterschiedlichen Säulenmaterialien untersucht. Dazu wurde vor dem Gebrauch der Kationenaustauscher-Säulen Heparin-Sepharose und SP-Sepharose (Säulenvolumina je 25 ml) der pH-Wert des Phosphatpuffers (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4) auf 6,4 eingestellt. In beiden Fällen ergab eine SDS-PAGE-Analyse (nicht gezeigt), daß das Protein GB1-Hha nicht an das Säulenmaterial gebunden hat und sich somit im Durchfluß befand.

Vor Verwendung einer Q-Sepharose-Säule (Volumen 25 ml) wurde der pH-Wert der Probe (40 ml) auf 8,0 eingestellt, mit Hilfe eines 150 ml-Loops auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und mit Puffer A1 (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8) nachgespült (Flußrate 4 ml/min). Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A1 und Puffer 2 (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8 + 1 M NaCl). Der Gradient wurde so gewählt, daß nach einer Zeit von 60 min die maximale NaCl-Konzentration von 1 mol/l nach 60 Minuten (Flußrate 4 ml/min) erreicht war. Das Elutionsprofil (Abb. 4.17) läßt sich in 3 charakteristische Bereiche unterteilen. Wie durch SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4.18) der gesammelten Fraktionen zu sehen ist befinden sich im ersten Peak Proteine, die nicht an die Säule gebunden haben. Ihm folgt ein Bereich bei NaCl-Konzentrationen von ca. 50 – 500 mM in dem die proteinhaltigen Fraktionen enthalten sind.

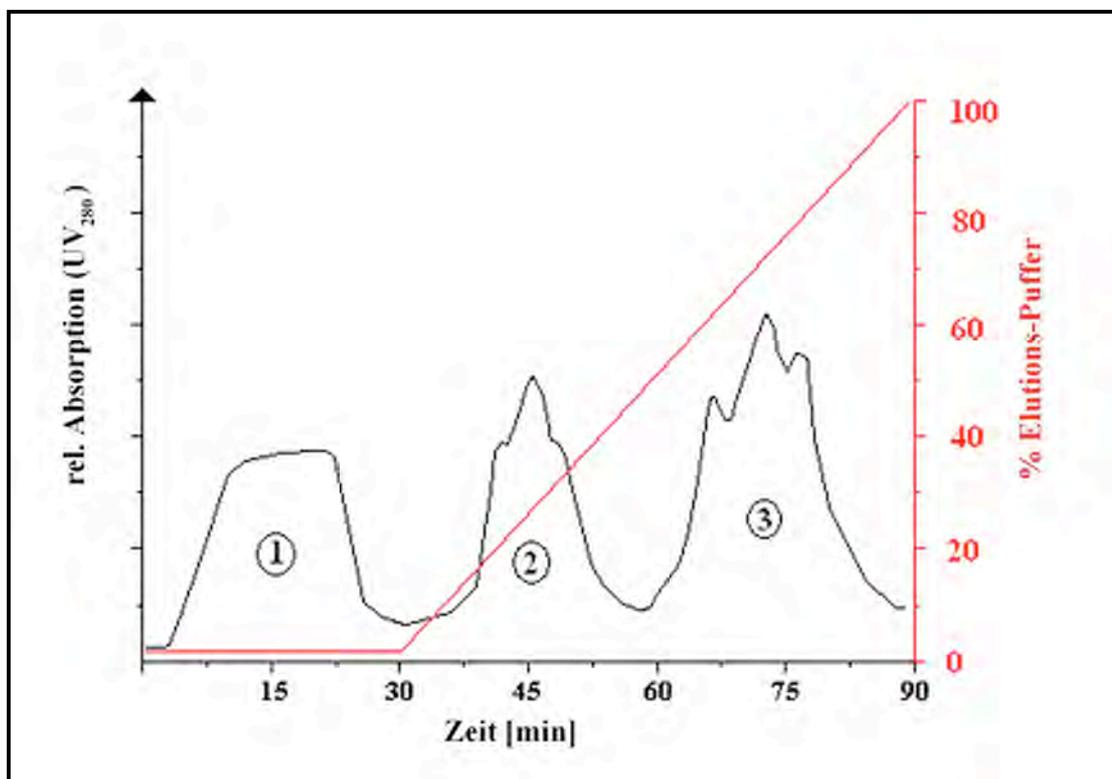


Abbildung 4.17 Elutionsprofil der Ionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose)

Der erste Peak enthält Proteine, die nicht an das Säulenmaterial Q-Sepharose gebunden haben. Der zweiten Peak (100-500 mM NaCl) entspricht den proteinhaltigen, der dritte Peak (500 – 1000 mM NaCl) den DNA- und RNA-haltigen Fraktionen.

Wie durch einen Bradford-Test gezeigt werden konnte, enthielt der dritte Peak (mit Schultern) keine Proteine, daher ist hier die UV-Detektion auf eine Absorption durch DNA- und RNA-Moleküle zurückzuführen.

Wie man anhand der SDS-PAGE Analyse (Abb. 4.18) der gesammelten Fraktionen sehen kann, konnte das Protein GB1-Hha, das sich im Durchfluß befindet, von den meisten löslichen Zellproteinen, die an das Säulenmaterial gebunden haben getrennt werden.

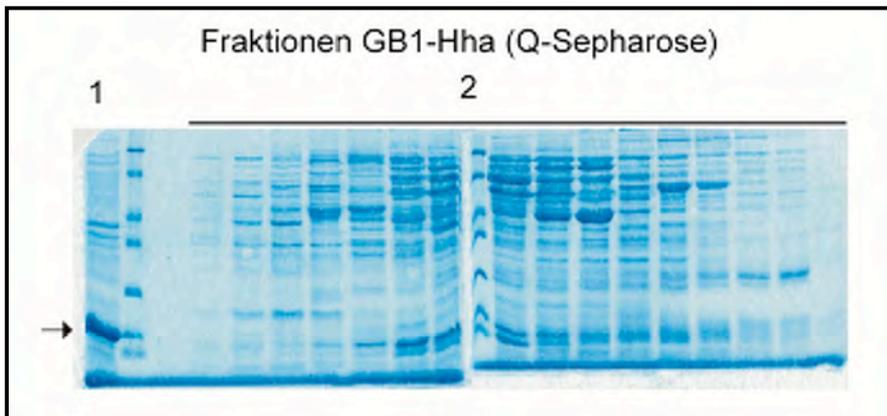


Abbildung 4.18 SDS-PAGE Analyse der gesammelten Fraktionen

10 μ l des Durchflusses (1) und je 10 μ l jeder zweiten Fraktion des proteinhaltigen Peaks im Elutionsprofil (2) wurden mittels SDS-PAGE (16,5%) analysiert. Das Protein GB1-Hha befindet sich im Durchfluß und wurde auf diese Weise von der Mehrzahl von Zellproteinen, die an das Säulenmaterial gebunden haben getrennt werden.

Der große Reinigungseffekt durch die hier gezeigte negative Chromatographie erlaubte den direkten Anschluß einer Größenfraktionierung mittels Gelfiltrationschromatographie mit dem Säulenmaterial Superdex 75. Da das Auflösungsvermögen dieser Methode von dem Volumen der aufgetragenen Probe und der Flußrate des Elutionspuffers abhängt, wurde die Probe (Durchfluß nach Q-Sepharose) von ca. 70 ml auf 10 ml aufkonzentriert, wobei ein Verlust von ca. 15% der Gesamtproteinmenge zu verbuchen war (Tab. 4.6). Mit Hilfe eines 10 ml-Loops wurde die Probe anschließend auf die Gelfiltrationschromatographie-Säule (Volumen 200 ml) aufgetragen und mit Puffer A1 eluiert (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8, Flußrate: 1 ml/min). Betrachtet man das Elutionsprofil (Abb. 4.19), so erkennt man, daß nach ca. 90 ml ein erster größerer Peak auftritt und nach 175 ml ein weiterer. Die darauffolgende SDS-PAGE-Analyse (nicht gezeigt) ergab, daß im zweiten Peak fast ausschließlich das Protein GB1-Hha zu finden war. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert.

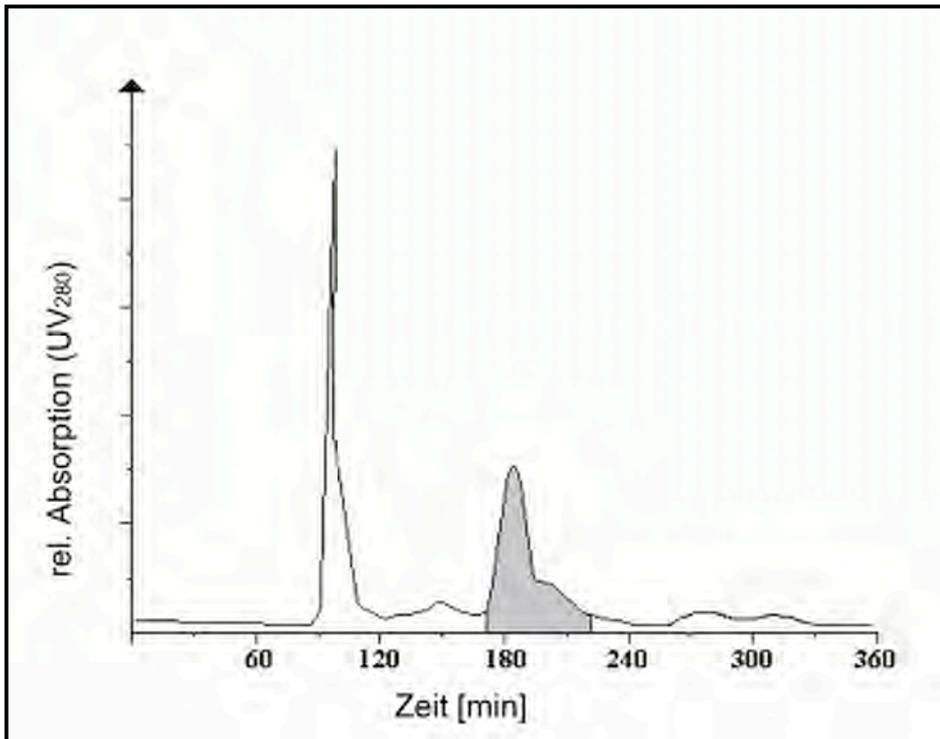


Abbildung 4.19 Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie (Superdex 75)

Im Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie treten im Wesentlichen zwei Peaks auf. Durch SDS-PAGE Analyse konnte gezeigt werden, daß sich das Protein GB1-Hha im zweiten Peak nach einer Elutionszeit von ca. 175 – 215 Minuten bzw. ml befand. Der Bereich der vereinigten GB1-Hha-haltigen Fraktionen ist grau markiert.

Mit den oben beschriebenen Methoden wurde somit ein Verfahren etabliert, das Protein GB1-Hha zu überproduzieren, und es erfolgreich aus dem löslichen Anteil des Gesamtzellprotein-Extrakts zu isolieren.

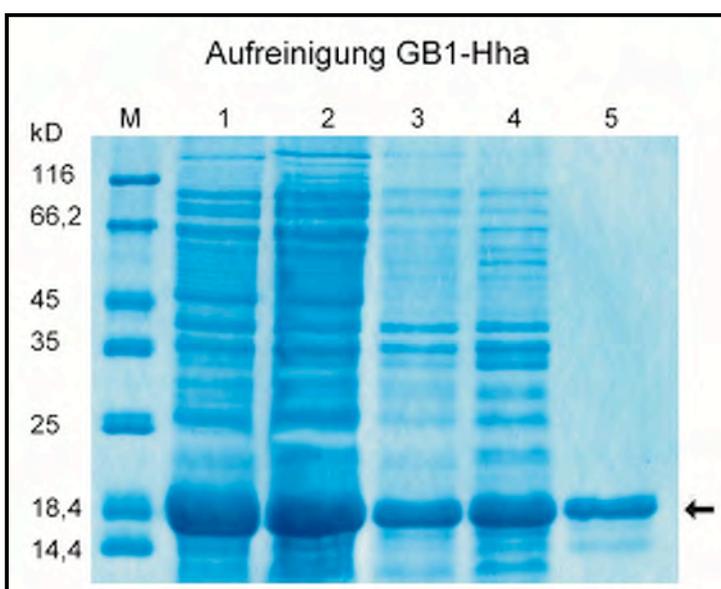


Abbildung 4.20 Aufreinigung des Proteins GB1-Hha

Eine 1ml Probe des Stammes BL21 (DE3) x pLysS x pET30-hha wurde vor (1) und nach (2) dem Aufschluß der Zellen auf ein 16,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Außerdem wurden 10 µl des Durchflusses der Q-Sepharose-Chromatographie vor (3) und nach dem Aufkonzentrieren (4) und schließlich 10 µl der vereinigten Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie (5) auf das Gel aufgetragen und analysiert. Der Pfeil markiert den Bereich, in dem sich die Bande des Proteins GB1-Hha befindet.

4.2.9 Stabilitätsanalyse des Proteins GB1-Hha

Die Gesamtproteinkonzentration der vereinigten Fraktionen (40 ml) der Gelfiltrationschromatographie betrug nach einem Bradford-Test 2,4 mg/ml. Diese Lösung wurde zunächst mit einer Amicon-Druckfiltrationsapparatur (MWCO: 10 kD), dann mit einem CentriPräp- (MWCO: 3 kD) und schließlich mit einem Centri-Con-Einwegkonzentrator (MWCO: 3 kD) bei einer Temperatur von 4°C aufkonzentriert. Dabei ist zu beachten, daß die verwendeten Membranen mit Glycerin beschichtet sind, dies jedoch zu einer unerwünschten Detektion bei der Aufnahme eines NMR-Spektrums führt. Daher war es wichtig, sie vor der Benutzung gründlich auszuspülen. Nach Umpuffern auf einen pH-Wert von 6,4 wurde die Probe auf ein Volumen von 800 µl eingengt, während die Proteinkonzentration durch mehrmalige Probenentnahme bestimmt wurde. Es zeigte sich, daß durch das Aufkonzentrieren ein geringer Anteil des gelösten Proteins in Form von weißen Flöckchen ausfällt, gravierender jedoch war der Verlust durch die Verwendung neuer Membranen, wobei insgesamt bis zu 85% der Gesamtproteinmenge verloren ging. Schließlich war eine Endkonzentration von etwa 9,5 mg/ml (~0,66 mM) erreicht (Tab. 4.6), wodurch die Aufnahme eines $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum möglich war.

Tabelle 4.6 Proteinmengen im Laufe der Aufreinigung des Proteins GB1-Hha ¹

Schritt der Aufreinigung	Proteinkonzentration [mg/ml]	Gesamtproteinmenge [mg]
nach Q-Sepharose-Säule	1	70
nach Aufkonzentrieren	3	60
nach Gelfiltrationschromatographie	1,2	48
nach Aufkonzentrieren	9,5	7,6

¹ 2 Liter-Ansatz

Zur Überprüfung der thermischen Stabilität wurde nach Spektrenaufnahme ein Aliquot bei Zimmertemperatur gelagert. Dabei wurde festgestellt, daß nach 1-2 Tagen eine Trübung der Lösung auftritt, was bei Lagerung bei 4°C erst nach ca. 1 Woche und in wesentlich geringerem Ausmaß zu beobachten war. Daher empfiehlt es sich die Proteinprobe unmittelbar nach dem Aufkonzentrieren zu analysieren und bei 4°C zu lagern. Auch die Zugabe von 50 mM NaCl hatte eine positive Auswirkung auf die Stabilität des Proteins.

4.2.10 ^{15}N -Isotopenanreicherung im Protein GB1-Hha

Die Überproduktion des Proteins GB1-Hha in ^{15}N -angereicherter M9-Medium im präparativen Maßstab wurde analog nach dem oben beschriebenen Ablauf durchgeführt und auch die Isolierung erfolgte mit der zuvor erarbeiteten Aufreinigungsstrategie. Um eventuelle Abweichungen im Wachstumsverhalten aufgrund der veränderten Mediumbedingungen zu analysieren wurde eine Kinetik des Bakterienwachstums über einen Zeitraum von 16 Stunden erstellt, wobei kein negativer Einfluß beobachtet werden konnte (Abb. 4.21). Die gelabelte Proteinprobe wurde zunächst auf einen pH-Wert von 6,4 umgepuffert, 50 mM NaCl zugegeben und auf eine Konzentration von ca. 8 mg/ml aufkonzentriert, wobei sich diese Ausbeute auf einen 1 Liter-Ansatz bezieht. Anschließend diente die Probe zur Aufnahme eines ^1H - und eines zweidimensionalen heteronuklearen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektrums.

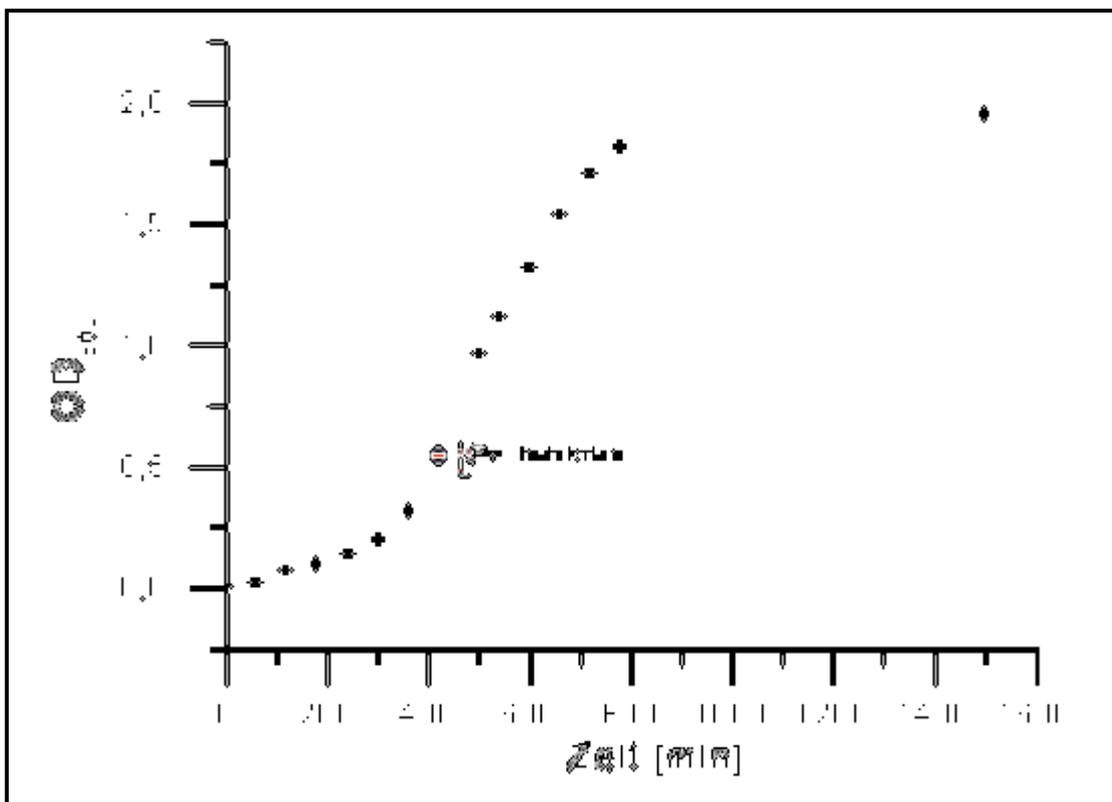


Abbildung 4.21 Kinetik des Bakterienwachstums in ^{15}N -gelabeltem M9-Medium

BL21 (DE3) x pLysS x pET30-hha Zellen wurden in 1 Liter ^{15}N -gelabeltem M9-Medium fermentiert, wobei nach jeder Stunde eine Bestimmung der OD_{600} erfolgte. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte nach den optimierten Bedingungen in der logarithmischen Phase bei einer OD_{600} von 0,7 (roter Punkt), die nach 7 Stunden Inkubationszeit erreicht war. Nach 6 Stunden Induktionszeit wurden die Zellen bei einer OD_{600} von ca. 1,9 geerntet. Ein 10 ml Aliquot wurde über Nacht weiter inkubiert, wobei die OD_{600} nicht mehr wesentlich gestiegen ist.

4.3 NMR-Spektroskopie

4.3.1 Eindimensionale ^1H -Spektren des Proteins GB1-Hha

Mit der ungelabelten Probe aus der Anzucht in LB-Medium wurde ein eindimensionales ^1H -Spektrum aufgenommen um erste Aussagen über den Faltungszustand des Proteins GB1-Hha machen zu können. Die aufkonzentrierte Probe (9,5 mg/ml) wurde mit einem 500 MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von 285 K vermessen, wobei die Anzahl der Scans 64 betrug.

Die deutliche Dispersion der Signale über den gesamten Spektrenbereich weist auf einen gefalteten Zustand des Proteins hin (Abb. 4.22 A), jedoch kann mit Hilfe dieses Experimentes nicht gezeigt werden, ob das gesamte Fusionsprotein oder nur ein Teil gefaltet vorliegt.

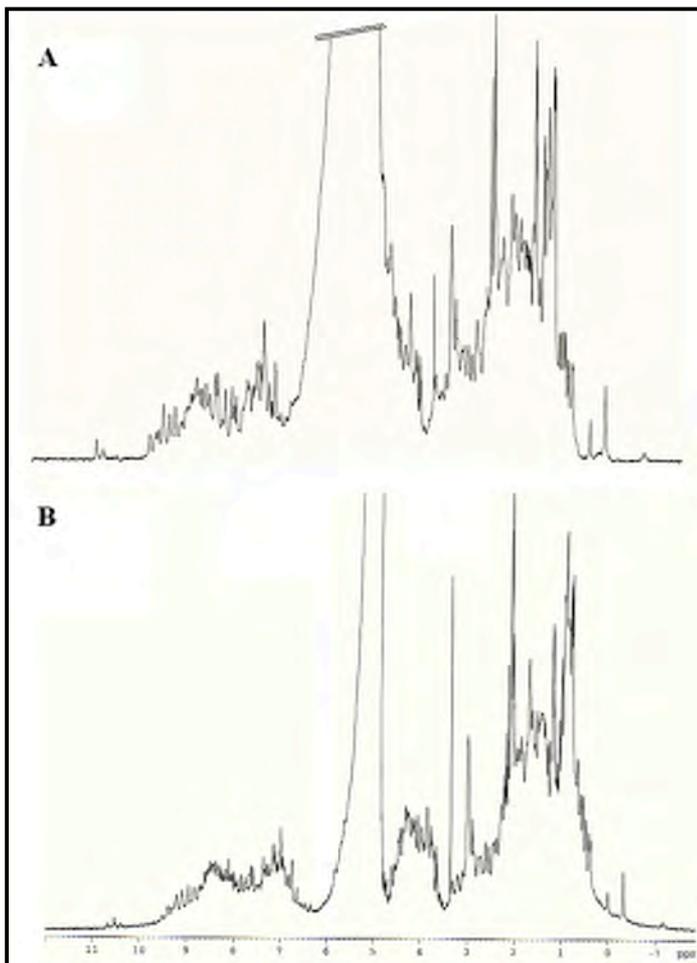


Abbildung 4.22 ^1H -Spektren des ungelabelten und ^{15}N -gelabelten Proteins GB1-Hha

Mit den aufkonzentrierten Proben des ungelabelten (A), sowie des ^{15}N -gelabelten (B) Proteins GB1-Hha wurden eindimensionale Protonenspektren aufgenommen. Bis auf die mangelhafte H_2O -Unterdrückung und höherer Signalintensität im Spektrum A sind die beiden Spektren im wesentlichen identisch. Die deutliche Dispersion der Signale über den gesamten Spektrenbereich deutet auf gefaltetes Protein hin.

Nach diesem Ergebnis erfolgte die Anzucht in M9-Minimalmedium mit ^{15}N -Ammoniumchlorid. Zuerst wurde mit der Probe (8 mg/ml) ein ^1H -Spektrum in einem 800 MHz-Spektrometer bei 285 K (128 Scans) aufgenommen (Abb. 4.22 B), bevor die Aufzeichnung eines $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektrums erfolgte. Zur Zeit, als die Vermessung der ungelabelten Probe erfolgte, gab es Probleme bei der Unterdrückung des H_2O -Signals (4 – 6 ppm), was jedoch bis zur Aufnahme des Spektrums der ^{15}N -gelabelten Probe wieder behoben war. In beiden Spektren ist eine große Anzahl von einzelnen Signalen geringer Linienbreiten sowohl im Bereich der Methygruppen-Protonen (1 – 2 ppm), als auch im Bereich der Amid-Protonen (ca. 8 ppm) vorhanden. Im Spektrum der ^{15}N -gelabelten Probe erkennt man darüber hinaus Signale im Bereich von 4 ppm, was auf α -helicale Strukturen im Protein hindeutet.

4.3.2 Analyse des Faltungszustandes des Proteins GB1-Hha durch Aufnahme eines heteronuklearen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektrums

Das TROSY-Spektrum des ^{15}N -gelabelten Proteins GB1-Hha wurde in einem 800 MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von 285 K aufgenommen. Es sollte untersucht werden, ob die im ^1H -Spektrum erkennbare gefaltete Struktur auf das gesamte Fusionsprotein, oder nur auf einen bestimmten Bereich zurückzuführen ist. Da es möglich ist, im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum Signale von NH-Gruppen bestimmter Aminosäuren einem charakteristischen Bereich zuzuordnen, wurde zunächst eine Auflistung der Aminosäurezusammensetzung des Fusionsproteins erstellt (Tab. 4.6). Zu den leicht identifizierbaren NH-Gruppen zählen unter anderem die der Seitenkette von Arginin (Arg- ϵ -NH), wie auch die NH-Gruppe im Indol-Ring des Tryptophans (Trp- ϵ -NH). Interessant ist vor allem das Fehlen der Aminosäure Arginin im Protein GB1, sowie das Vorhandensein von einem Tryptophan in jedem der beiden fusionierten Proteinen.

Tabelle 4.7 Aminosäurezusammensetzung des Fusionsproteins GB1-Hha

Aminosäure	GB1	Hha	GB1-Hha ¹
Ala	6	4	10
Arg	0	6	6
Asn	3	3	6
Asp	5	5	10
Cys	0	1	1
Gln	2	1	3
Glu	5	6	11
Gly	4	0	5
His	0	1	1

Fortsetzung Tabelle 4.7			
Ile	1	4	5
Leu	3	9	12
Lys	6	7	13
Met	1	3	4
Phe	2	2	4
Pro	0	2	2
Ser	0	5	6
Thr	10	5	15
Trp	1	1	2
Tyr	3	4	7
Val	4	3	7
gesamt	56	72	130

¹ Die Proteine GB1 und Hha sind über einen Gly-Ser-Linker verbunden

Des Weiteren stand ein ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum (aus Gronenborn und Clore, 1996), des Proteins GB1 zur Verfügung (Abb. 4.23 A), so daß die dort auftretenden Signale mit dem TROSY-Spektrum dieser Arbeit verglichen (Abb. 4.23 B) werden konnte. Das TROSY-Spektrum wurde auf zwei Ebenen geplottet, so daß in Abb. 4.23 B nur Signale hoher Intensität zu sehen sind. Aufgrund der Anzahl an Signalen, beim Vergleich dieses Spektrums (ca. 60) mit dem HSQC-Spektrum des Proteins GB1-Hha (53), mit Ausnahme der Signale, die von Seitenketten NH-Gruppen der Aminosäuren Glutamin und Asparagin stammen und im TROSY-Spektrum nicht zu sehen sind, ist anzunehmen, daß weitgehend alle Signale mit hoher Intensität dem Protein GB1 zuzuordnen sind.

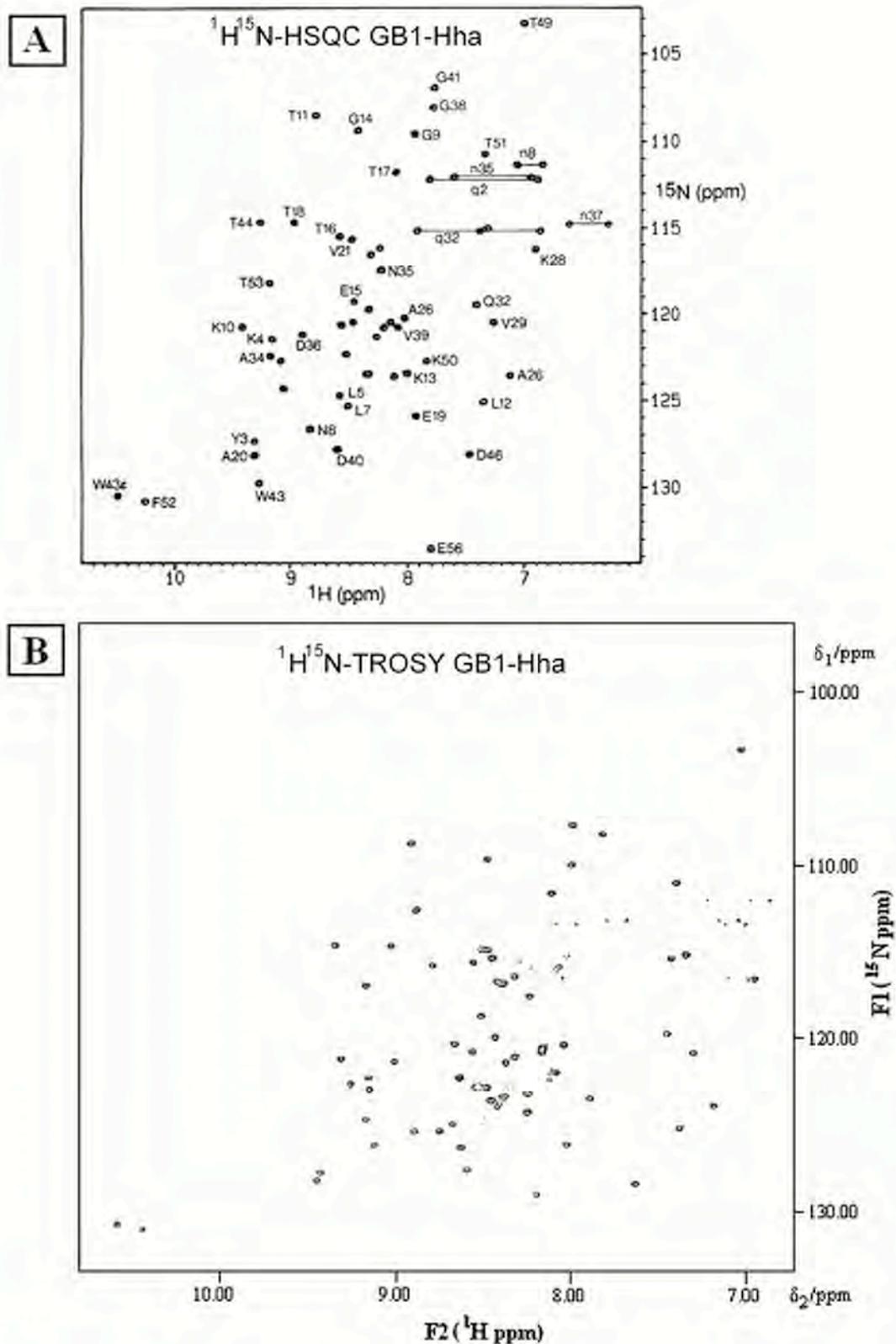


Abbildung 4.23 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Proteins GB1 und $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum des Proteins GB1-Hha (höhere Ebene)

Durch den Vergleich des HSQC-Spektrums des Proteins GB1 (A) mit dem TROSY-Spektrum des Proteins GB1-Hha (B), das auf einer hohen Ebene geplottet wurde, können die meisten Signale des Proteins GB1 mit den Signalen hoher Intensität im TROSY-Spektrum des Proteins GB1-Hha korreliert und somit die Signale des Proteins GB1 im Fusionsprotein identifiziert werden.

Im tiefer geplotteten Spektrum (Abb. 4.24) fällt zunächst die schwache Dispersion der Signale im Bereich von 7 - 8,8 ppm in der F2-Dimension bzw. 118 - 127 ppm in der F1-Dimension auf. Dies stellt typischerweise den Bereich dar, in dem Signale von Rückgrat NH-Amidgruppen unstrukturierter (random coil) Bereiche auftreten.

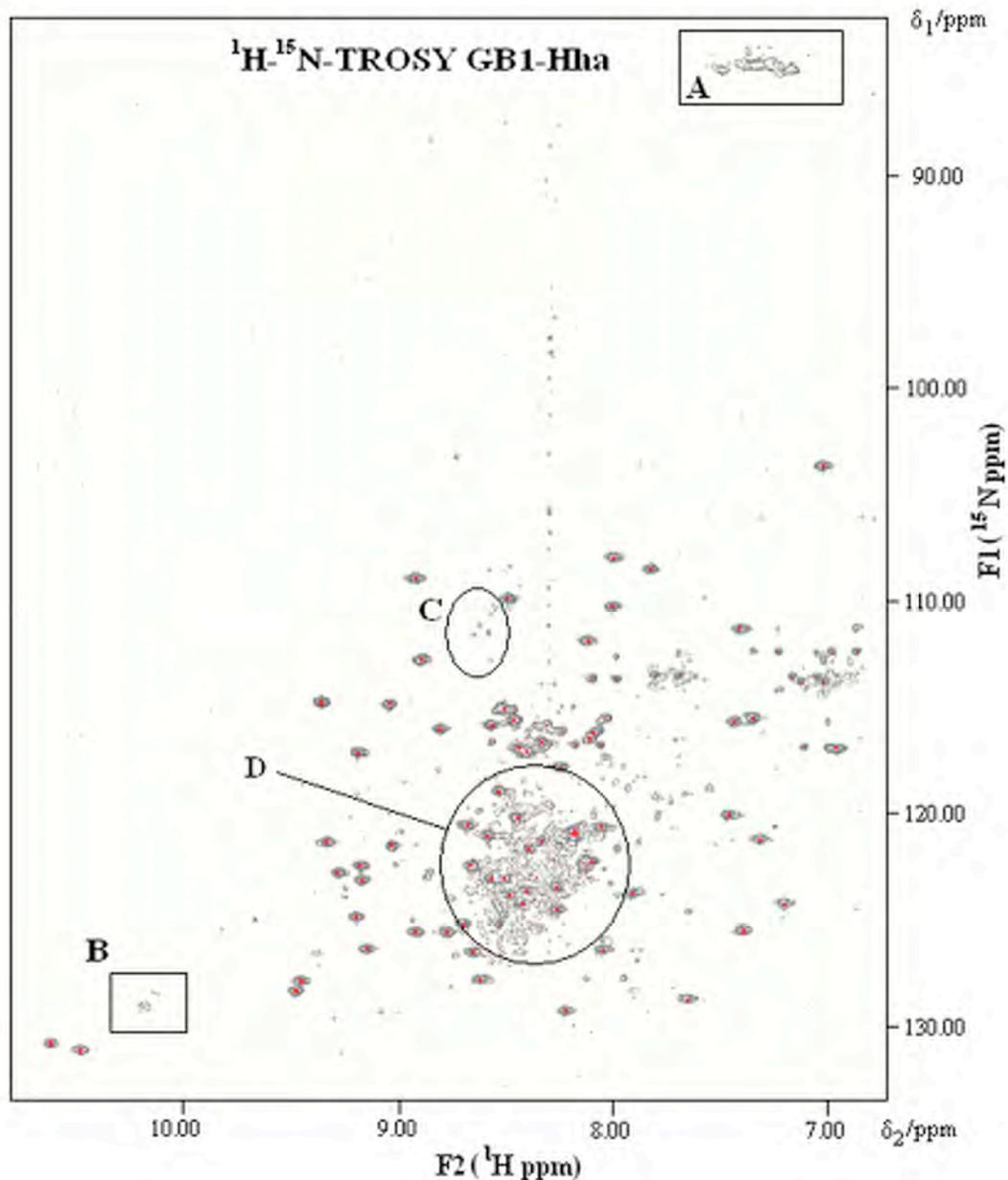


Abbildung 4.24 ¹H-¹⁵N-TROSY-Spektrum des Proteins GB1-Hha (tiefer Ebene)

Die Signale, die auch im höher geplotteten Spektrum (Abb. 4.23 B) zu sehen sind, sind rot markiert. Hervorgehobene Bereiche: A) Im Bereich, wo typischerweise Signale von Seitenketten NH-Gruppen der Aminosäure Arginin auftreten sind etwa 4-5 schwach dispersierte Signale zu erkennen. B) Das Signal der εNH-Gruppe des Tryptophan-Restes des Proteins Hha, liegt in einem charakteristischen Bereich, der auf eine random-coil-Struktur deutet, in der dieses Tryptophan liegt. C) Signale, die außerhalb des Bereiches, in dem solche aus random-coil-Strukturen liegen, zu finden sind, sprechen teilweise für das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen, die nicht vom Protein GB1 abstammen. D) Bereich, in dem Signale von Amid-NH-Gruppen des Proteinrückgrats in einem ungefalteten Zustand auftreten.

Aber auch außerhalb dieses Bereiches sind aufgelöste Signale schwacher Intensität sichtbar, was wenigstens für ein teilweise strukturiertes Proteins Hha spricht. Auch die Form der mindestens 4 ϵ NH-Signale der Arginin-Reste (F2: 7 - 7,5 ppm, F1: 85 ppm), die nur im Protein Hha vorhanden sind, sprechen weder für eine ordentlich gefaltete Struktur, noch für einen absolut ungefalteten Zustand der Bereiche in dem diese Arginin-Reste liegen. Dagegen liegt das ϵ NH-Signal des Tryptophans des Proteins Hha in einem Bereich, der für eine random coil-Struktur typisch ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß im Fusionsprotein GB1-Hha der GB1-Anteil in einem korrekt gefalteten Zustand vorliegt, während das Protein Hha entweder nur in wenigen Bereichen gefaltet ist oder ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand herrscht, so daß im zeitlichen Mittel der Messungen, sowohl Signale des einen als auch des anderen Zustandes gemessen wurden.

5. Diskussion

Die vermutlich größte Schwierigkeit bei der Bestimmung von Proteinstrukturen durch NMR-Spektroskopie liegt in der Notwendigkeit, das Zielprotein in einem löslichen, stabilen Zustand in hohen Konzentrationen zu erhalten. Viele Proteine neigen jedoch dazu während ihrer Überproduktion, die üblicherweise in Bakterien durchgeführt wird, als sogenannte „Inclusion-Bodies“ in unlöslicher Form zu aggregieren. Oft kann dieses Problem durch die Fusionierung des Zielproteins mit einem löslichkeitssteigernden Protein gelöst werden, wobei die geläufigsten unter diesen Fusionspartnern, wie z. B. das Maltose-Bindungs-Protein (MBP), zu groß sind (>40 kD), um Strukturuntersuchungen des gesamten Fusionsproteins durchzuführen. Zwar spielt für die Röntgenstrukturanalyse die Größe eines Proteins im Wesentlichen keine Rolle, doch der Erhalt geeigneter Kristalle ist durch die individuelle Mobilität des Fusionsproteins enorm erschwert und eine Wiederabspaltung des Zielproteins führt wiederum zum Problem der Unlöslichkeit bzw. Instabilität. Da jedoch für die NMR-Spektroskopie zunächst nur die Größe des Fusionspartners den limitierenden Faktor darstellt, wären durch den Einsatz von kleineren Proteinen zur Stabilisierung der Zielproteine Strukturuntersuchungen in Form eines Fusionsproteins möglich (Zhou *et al.*, 2001). Dies stellt bislang die hoffnungsvollste Perspektive für NMR-Strukturuntersuchungen schwerlöslicher Proteine dar.

Auch die schwerlöslichen Regulatorproteine RcsA, RcsF, ArsR und Hha (8-23 kD) konnten als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungs-Protein in löslicher Form überproduziert werden, doch die anschließende Abspaltung des MBPs führte wiederum zum Ausfall der unlöslichen Zielproteine (F. Bernhard, J.W.-Goethe Univ., Frankfurt). Aus diesem Grund wurden sie in der vorliegenden Arbeit mit den kleineren Proteinen GpHD (14 kD), GB1 (6 kD) und GroES (10 kD) fusioniert, um deren Funktion als löslichkeits- und stabilitätssteigernden Fusionspartner zu analysieren und zu optimieren. Um eine vorzeitige Aggregation oder Degradation der Fusionsproteine zu vermeiden, sollte die Translation des Fusionsproteins mit dem gutlöslichen Fusionspartner beginnen, weshalb es mit dem N-Terminus des Zielproteins fusioniert wurde. Dies steht auch im Einklang mit Versuchen, in denen die Löslichkeit eines Proteins durch N-terminale nicht aber durch C-terminale Fusionierung des MBPs erhöht werden konnte (Hayhurst, 2000).

Die Chaperone GroEL und GroES spielen eine wesentliche Rolle bei der Faltung von Proteinen zur nativen Struktur und ihre Interaktion beim eigentlichen Faltungsprozess wurde in einer Vielzahl von Experimenten bestätigt (Mogk *et al.*, 2001). Durch die N-terminale Fusionierung des kleinen Chaperons GroES (10 kD) an die schwerlöslichen Proteine RcsA, RcsF, Hha und ArsR könnte möglicherweise

die Affinität zum Chaperon GroEL gesteigert und dadurch die korrekte Faltung des Zielproteins gefördert werden. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß die Überproduktion der Fusionsproteine in DH5 α -Zellen zumindest unter den im Ergebnisteil beschriebenen Bedingungen zu keiner nennenswerten Anreicherung des Produkts führte. Die Ursache dafür auf DNA-Ebene zurückzuführen ist relativ unwahrscheinlich. Eine partielle Sequenzierung des Plasmids pQEGroES-arsR zeigte weder einen Rasterschub noch eine Punktmutation im sequenzierten Bereich von ca. 500 bp zwischen dem 3'-Ende des Fusionsgens und dem Promotorbereich. Eine Erklärungsmöglichkeit wären Instabilitäten der m-RNAs, so daß es zu Störungen bei ihrer Translation gekommen ist. *In vivo* gehören die Chaperone GroES und GroEL zu einer polycistronischen Transkriptionseinheit, daher sollte ihre intrazelluläre Kopienzahl etwa identisch sein. Dies läßt vermuten, daß die Stabilität von GroES von der Anwesenheit des GroEL abhängig ist, indem es beispielsweise von GroEL gefaltet wird oder eine gegenseitige Wechselwirkung GroES vor seinem proteolytischen Abbau schützt. Doch auch die Koexpression der beiden Chaperone führte zu keiner Anreicherung des Fusionsproteins (His)₆-Gro-ArsR bzw. (His)₆-Gro-RcsF. Vermutlich wurde aufgrund des Zielproteins die Assoziation der Chaperon-Untereinheiten sterisch behindert, so daß das Fusionsprotein vor proteolytischem Abbau ungeschützt blieb. Interessanterweise ermöglichte die N-terminale Fusionierung des mobilen S-Loops des GroES (Glu16 - Ala33), welche die natürliche Bindungsstelle für GroEL darstellt, die Überproduktion des toxischen Proteins Bax (Donnelly *et al.*, 2001). Zwar bleibt der Einfluß auf die Erhöhung der Löslichkeit noch zu untersuchen, doch da es sich bei diesem verkürzten GroES-Derivat um ein nur 18 Aminosäuren großes Peptid handelt, wäre sein Einsatz zur Fusionierung mit den schwerlöslichen Proteinen RcsA, RcsF, Hha und ArsR von besonders großem Interesse. Weitere Möglichkeiten wären eventuell eine C-terminale Fusionierung oder eine Expression in einem proteasedefizienten Stamm, was als Modifikation der hier durchgeführten Versuche noch denkbar wäre.

Das aus dem Bakteriophagen Lambda stammende Protein D wurde ursprünglich als Fusionspartner für die Technik des Phage-Displays eingesetzt (Yang *et al.*, 2000). Seine löslichkeitssteigernde Eigenschaft konnte am Beispiel der Proteine c-Crk (AS-Reste 120-304), cJun (AS-Reste 1-79), ATF2 (AS-Reste 1-99), JNK1 und JNK2 (Forrer und Jaussi, 1998) oder TonB (Chang *et al.*, 2001) gezeigt werden. Aufgrund der hohen Stabilität und relativ geringen Größe (14 kD) wurde es in dieser Arbeit eingesetzt, um die schwerlöslichen Proteine RcsA, RcsF, Hha und ArsR in Form eines Fusionsproteins zu überproduzieren. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß zwar die Überproduktion der Fusionsproteine möglich war, die Löslichkeit jedoch lediglich beim Protein Hha gesteigert werden konnte. Der lösliche Anteil betrug

allerdings nur etwa 20 % der Gesamtmenge des überproduzierten Proteins. Auch eine Senkung der Inkubationstemperatur, die im Falle von GpHD-ArsR und GpHD-Hha durchgeführt wurde, führte zu keiner Verbesserung der Ausbeute in löslicher Form. Außerdem kam es bei dem im Anschluß erfolgten Aufreinigungsverfahren zu einer Spaltung des Fusionsproteins, was für eine hohe Instabilität im Bereich der Linkerregion spricht. Unklar ist, ob die Spaltung auf einen spezifischen proteolytischen Verdau oder auf mechanische Instabilität dieses Bereiches zurückzuführen ist. Die beiden Spaltprodukte GpHD-Hha und GpHD, die durch Ni-IDA-Metallchelate-Chromatographie aufgereinigt wurden, hätte man nachfolgend durch Gelfiltrationschromatographie aufzutrennen versuchen können. Doch wegen der relativ geringen Ausbeute bei der Überproduktion und dem zusätzlichen Verlust durch die zwei chromatographischen Schritte wurde der Zeit- und Kostenaufwand für den potentiellen Erhalt einer geeigneten NMR-Probe als unverhältnismäßig eingeschätzt, so daß die Arbeit auf die Fusionierung mit dem zu diesem Zweck effizienteren Protein GB1 konzentriert wurde. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß sich das Protein D keinesfalls universell zur Erhöhung der Löslichkeit von rekombinanten Proteinen einsetzen läßt. Lediglich in einem von vier Fällen (GpHD-Hha) konnte die Löslichkeit um maximal 20 % erhöht werden und darüber hinaus stellte es sich als instabil heraus. Obwohl für das Protein D mit den oben erwähnten Beispielen vereinzelt Erfolge als löslichkeitssteigernder Fusionspartner zu verzeichnen sind, wird es sich bezüglich dieser Eigenschaft im Vergleich mit anderen Proteinen wahrscheinlich nicht behaupten können.

Das Protein G aus *Streptococcus* ist durch seine Eigenschaft, am F_c-Teil des menschlichen Immunglobulins IgG zu binden, bekannt geworden (Björk und Kronvall, 1984). Die dreidimensionale Struktur seiner 6 kD großen Bindungsdomäne B1 wurde durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Gronenborn *et al.*, 1991). Sein gezielter Einsatz zur Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität schwieriger Proteine wurde von Zhou *et al.* im Jahre 2001 vorgeschlagen, denen durch die Fusionierung von GB1 mit dem menschlichen DNA-Fragmentierungsfaktor 40 CIDE (DFF 40 CIDE) die Stabilisierung des heterodimeren Komplex aus DFF 40 CIDE und DFF 45 CIDE gelang. Zur Konstruktion von Proteinen mit dem Protein G (B1) als N-terminalen Fusionspartner wurde in dieser Arbeit das Expressionsplasmid pET30-GBF1 verwendet. Die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors des Phagen T7. Da es sich bei der T7-Polymerase um kein in *E. coli* natürlich vorkommendes Protein handelt, wurden die konstruierten Plasmide in *E. coli*-Stämme transformiert, die λ (DE3)-lysogen sind, d.h. die genomische Information für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines lacUV5-Promotors enthalten, der ebenfalls durch IPTG induzierbar

ist. Es ist bekannt, daß die basale Transkription der codierten Gene vor der Induktion zum Verlust der funktionellen Expression führen kann (Mertens *et al.*, 1994), was eine Erklärung dafür wäre, weshalb die Produktion des Proteins GB1-ArsR nur im Stamm BL21 (DE3) x pLysS, in dem die stringente Kontrolle des T7-Promotors durch die Expression des T7-Lysozyms erhöht ist, gelungen ist. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß neben der basalen Transkription die unterschiedlichen genetischen Hintergründe des Stammes BL 21 (*E. coli* B-Stamm) und HMS 174 (*E. coli* K-Stamm) zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Expression des Fusionsproteins GB1-Hha führten. Hier konnte die Überproduktion nur in den Stämmen BL21 (DE3) x pLysS und HMS 174 (DE3) durchgeführt werden. Analog zur Fusionierung mit dem Protein GpHD konnte die Löslichkeit der Proteine RcsA und RcsF auch durch Fusionierung des Proteins GB1 nicht erhöht werden, wohingegen die Proteine GB1-ArsR, bei einer Inkubationstemperatur von 37°C, und Protein GB1-Hha, nach Senkung der Inkubationstemperatur auf 30°C, vollständig in löslichem Zustand überproduziert werden konnten. Die Ausbeute des Proteins GB1-Hha lag bei 9,5 mg bei einer Anzucht in 2 Litern LB-, bzw. 8 mg bei einer Anzucht in 1 Liter ¹⁵N-markierten M9-Medium. Die Aufreinigung gestaltete sich durch den negativen Chromatographie-Schritt mit Q-Sepharose und der Größenfraktionierung mittels Gelfiltrationschromatographie relativ einfach. Ob die Verwendung einer IgG-Affinitätssäule zu höheren Ausbeuten mit nur einem Aufreinigungsschritt geführt hätte, bliebe noch zu untersuchen.

Die Vorteile der N-terminalen Fusionierung des Proteins GB1 zur Überproduktion rekombinanter Fusionsproteine für NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte an den Beispielen GB1-interleukin-1 beta (Gronenborn und Clore, 1996), GB1-GCN4 (AS-Reste 39 – 139), GB1-Fas (AS-Reste 210 – 304) und der DNA-Bindungsdomäne des Proteins HMG I (AS-Reste 50-75) gezeigt werden (Huth *et al.*, 1997). Durch die Kenntnis der Resonanzfrequenzen des kleinen Proteins GB1 (56 AS) im heteronuklearen ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum konnten in den Spektren der ¹⁵N-gelabelten Fusionsproteine die Signale, die vom Zielprotein stammen identifiziert und Aussagen über das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen gemacht werden. Die Aufnahme des ¹H¹⁵N-TROSY-Spektrums des Proteins GB1-Hha ergab, daß sich das Zielprotein Hha in einem größtenteils ungefalteten Zustand befand. Die Anhäufung von Signalen im Bereich zwischen 7,8 und 8,8 ppm, in dem typischerweise Signale von Amid-Protonen aus random coil-Strukturen zu finden sind, spricht zunächst für ein ungefaltetes Protein Hha. Doch auch außerhalb dieses Bereichs waren Signale vom Protein Hha erkennbar, was zumindest auf das temporäre Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen hindeutet. Die Intensität der Signale im Vergleich zu denen, die vom Protein GB1 stammen bekräftigen diese

Vermutung. Offensichtlich steht in diesem Fall die Löslichkeit des Fusionsproteins nicht mit einer stabilen Faltung des Zielproteins in Korrelation. Die Erhöhung der Stabilität könnte eventuell durch Optimierung der Pufferbedingungen oder noch besser, da es sich um ein DNA-bindendes Protein handelt, durch Zugabe eines DNA-Fragmentes mit seiner spezifischen Bindungsstelle erreicht werden. Der Faltungszustand des Proteins GB1-ArsR bleibt noch zu untersuchen. Für dieses Protein konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit kein effizientes Isolierungsprotokoll etabliert werden. In diesem Falle wäre die Untersuchung der Reinigung mittels einer IgG-Affinitätssäule angebracht.

In der Eigenschaft, die Löslichkeit eines Proteins durch einen N-terminalen Fusionspartner zu erhöhen, war das Protein GB1 dem Protein GpHD weit überlegen. Konnte die Löslichkeit durch GpHD nur im Falle von Hha (um ca. 20 %) erhöht werden, ist durch die Fusionierung von GB1 die vollständige Löslichkeit der Proteine ArsR und Hha erreicht worden. Hinsichtlich der Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden bietet es durch seine geringere Größe und Kenntnis der Resonanzfrequenzen weitere Vorteile gegenüber dem 14 kD großen Protein GpHD. Keines der beiden Fusionspartner erreichte jedoch die Universalität des Maltose-Bindungs-Proteins. Im Falle des Proteins GB1 ist die Erhöhung der Löslichkeit vermutlich nicht auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Fusionsprotein und Zielprotein zurückzuführen, wie es im Falle vom Maltose-Bindungs-Protein vorgeschlagen wurde (Kapust und Waugh, 1999). Vielmehr scheint seine eigene hohe Löslichkeit für den solubilisierenden Effekt verantwortlich zu sein. Auch andere kleine, gut lösliche Proteine, die in *E. coli* in hoher Kopienzahl vorhanden sind, wie zum Beispiel die Proteine YjbL, YggX oder HdeA, könnten eventuell als Fusionspartner die funktionelle Überproduktion unlöslicher Proteine ermöglichen.

6. Zusammenfassung (Deutsche Version / English version)

Deutsche Version:

Eine große Hürde bei der Strukturbestimmung durch NMR-Spektroskopie stellt die Bedingung dar, das zu untersuchende Protein in einem löslichen, stabilen Zustand in Konzentrationen bis zu 1 mM zu erhalten. Zudem kann das Größenlimit von z. Z. ca. 40 kD nur in Ausnahmefällen überschritten werden. Die meisten Proteine neigen dazu, bei ihrer Überproduktion, die gewöhnlich durch induzierte Überexpression des Zielgens auf einem rekombinanten high-copy Plasmid in *E. coli* durchgeführt wird, als sogenannte „Inclusion-Bodies“ in unlöslicher Form zu aggregieren. Dieses Problem kann in vielen Fällen durch die Fusionierung des Zielproteins mit einem Löslichkeitssteigernden Partner, wie z. B. dem Maltose-Bindungs-Protein, gelöst werden. Diese effiziente Technik kann allerdings für die NMR-Spektroskopie kaum genutzt werden, da die resultierenden Fusionsproteine das besagte Größenlimit weit überschreiten. Eine spezifische Spaltung des Fusionsproteins nach dessen Reinigung führt zudem oftmals zum Verlust des Löslichkeitssteigernden Effektes und zur unmittelbaren Präzipitation des Zielproteins. Jüngste Ansätze versuchten daher durch den Einsatz von deutlich kleineren Fusionspartnern, die Stabilisierung von Zielproteinen zu ermöglichen. Diese Strategie würde eine hoffnungsvolle Perspektive für die NMR-Strukturuntersuchung schwerlöslicher Proteine darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher unter Einsatz der rekombinanten DNA-Technik die schwerlöslichen DNA-Regulatorproteine RcsA, RcsF, ArsR und Hha mit dem IgG-bindenden Protein GB1, dem Chaperon GroES und dem Protein D aus dem Bakteriophagen λ fusioniert. Diese stellen zur Zeit die erfolgversprechendsten „Solubility-tags“ für schwerlösliche Proteine dar. Die Löslichkeits- bzw. Stabilitätssteigernde Funktion dieser relativ kleinen Fusionspartner wurde durch Überproduktion der rekombinanten Proteine in *E. coli*-Stämmen mit unterschiedlichen genetischen Eigenschaften evaluiert. Während sich das Chaperon GroES überraschenderweise als Fusionspartner ungeeignet erwies, konnten die Fusionsproteine GpHD-Hha, GB1-ArsR und GB1-Hha erstmals in löslicher Form überproduziert werden. Die Methoden zur Aufreinigung der Proteine GpHD-Hha und GB1-Hha wurden anschließend entwickelt und optimiert. Es gelang weiterhin das Protein Hha durch Fusionierung des Proteins GB1 ausreichend zu stabilisieren, um bei den erforderlichen Konzentrationen NMR-Messungen durchzuführen. Dadurch konnten in dieser Arbeit erste eindimensionale ^1H -Spektren bzw. heteronukleare $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren des Fusionsproteins GB1-Hha aufgenommen und analysiert werden.

English version:

A major challenge in the structural analysis of proteins is the requirement to obtain the protein of interest in a soluble, stable form at the concentrations necessary for NMR-spectroscopy. Additionally, exceeding the current size-limit of about 40 kD is the exception. Most recombinant proteins tend to form “inclusion bodies” while being overproduced in *E. coli*. This problem can often be eliminated by fusion to a solubility-enhancing protein, for example maltose-binding-protein. However, this efficient technique can rarely be used for NMR-spectroscopy since the resulting fusion protein exceeds the size-limit previously mentioned. A specific cleavage of the fusion protein after its isolation often leads to the loss of its solubilizing effect and instant precipitation of the target protein. Latest attempts include the utilization of small fusion partners to increase the stability of the target proteins. This strategy represents a promising outlook for NMR-structure analysis of poorly soluble proteins. This work describes how the insoluble DNA regulator proteins RcsA, RcsF, Hha and ArsR were fused to the IgG-binding Protein GB1, the chaperone GroES and finally the Protein D of bacteriophage λ , using recombinant DNA techniques. These proteins are believed to be the most promising candidates to act as a “solubility-tag”. Their potential to increase solubility was assessed by overproduction of the recombinant proteins in *E. coli*-strains with different genetic properties. Unexpectedly, the chaperone GroES turned out to be an inappropriate fusion partner, while the fusion proteins GpHD-Hha, GB1-Hha and GB1-ArsR could be obtained in soluble form for the first time. The strategies for isolating the proteins GpHD-Hha and GB1-Hha were developed and optimized. Furthermore, the stabilizing effect of GB1 was sufficient to perform NMR-measurements in the required concentrations. Therefore, it was possible to record both ^1H - and $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -correlation spectra for analyzing the structural integrity of the fusion protein GB1-Hha.

7. Literatur

F. Åslund und J. Beckwith

The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity and gray area genomics

J. Bacteriol., **181**, 1375-1379, 1999

F. Baneyx

Recombinant protein expression in *E. coli*

Current Opinion in Biotechnology, **10**, 411-421, 1999

L. Björk und G. Kronvall

Purification and some properties of *streptococcal* protein G, a novel IgG-binding reagent

J. Immunol., **133**, 969 - 974, 1984

P. Blum, M. Velligan, N. Lin, A. Matin

DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies

Biotechnology, **10**, 301-304, 1992

W. Boos, H. Shumann

Maltose/Maltodextrin System of *E. coli*: Transport, Metabolism and Regulation

Microbiology and Mol. Bio. Rev., **62**, 204-229, 1998

M. Bradford

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal. Biochem., **72**, 248-254, 1976

S. Cabilly

Growth at sub-optimal temperature allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *E. coli*

Gene, **85**, 553-557, 1989

N. Carrillo, E.A. Ceccarelli, A.R. Krapp, S. Boggio, R.G. Ferreyra

Assembly of plant ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in *E. coli* requires GroE molecular chaperones

J. Biol. Chem., **267**, 15537-15541, 1992

P.A. Cole

Chaperone-assisted protein expression

Structure, **4**, 239-242, 1996

C. Chang, A. Mooser, A. Plückthun, A. Wlodawer

Crystal Structure of the Dimeric C-terminal domain of TonB Reveals a Novel Fold

J. Biol. Chem., **276**, 29, 27535-27540, 2001

G.D. Davis, C. Elisee, D.M. Newham, R.G. Harrison

New fusion protein systems designed to give soluble expression in *E. coli*

Biotechnol. Bioeng, **65**, 382-8, 1999

J.R. Davie, R.M. Wynn, M. Meng, Y.S. Huang, G. Aalund, D.T. Chuang, K.S. Lau

Expression and characterization of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase from the rat. Is it a histidine kinase?

J. Biol. Chem., **270**, 19861-19867, 1995

H. Dalboge, E.B. Jensen, H. Tottrup, A. Grubb, M. Abrahamson, I. Olafson, S. Carlsen

High-level expression of human cystatin C in *E. coli*

Gene, **79**, 325-332, 1989

J.P. Derrick, I. Feavers, M.C. Maiden

Use of *streptococcal* protein G in obtaining crystals of an antibody Fab fragment in complex with a meningococcal antigen

Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., **55**, 314-6, 1999

M.I. Donnelly, P.W. Stevens, L. Stols, S.X. Su, S. Tollaksen, C. Giometti and A. Joachimiak

Expression of a Highly Toxic Protein, Bax, in *E. coli* by Attachment of a Leader Peptide Derived from the GroES Cochaperone

Protein Expression and Purification, **22**, 422-429, 2001

R.S. Donovan, C.W. Robinson, B.R. Glick

Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter

J. of Ind. Micorbiology, **16**, 145-154, 1996

X. Duan, J.A. Hall, H. Nikaido and F.A. Quiocho

Crystal Structures of the Maltodextrin/Maltose-binding Protein Complexed with Reduced Oligosaccharides: Flexibility of Tertiary Structure and Ligand Binding

J. Mol. Biol., **306**, 1115-1126, 2001

P. Forrer, R. Jaussi

High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *E. coli* by fusion to the bacteriophage Lambda head protein D

Gene, **224**, 45-52, 1998

G. Geroriou und P. Valax

Expression of correctly folded proteins in *E. coli*

Current Opinion in Biotechnology, **7**, 190-197, 1996

S. Gottesman

Proteases and their targets in *E. coli*

Annu. Rev. Genet., **30**, 465-506, 1996

A.M. Gronenborn, G.M. Clore

Rapid screening for structural integrity of expressed proteins by heteronuclear NMR spectroscopy

Protein Science, **5**, 174-177, 1996

A.M. Gronenborn, D.R. Filpula, N.Z. Essig, A. Achari, M. Whitlow, P.T. Wingfield, G.M. Clore

A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of *streptococcal* protein G

Science, **253**, 657-61, 1991

Hanahan

DNA cloning, Vol. I, IRL Press, 1985

A. Hayhurst

Improved Expression Characteristics of Single-Chain Fv Fragments When Fused Downstream of the *E. coli* Maltose-Binding-Protein or Upstream of a Single Immunoglobulin-Constant Domain

Protein Expression and Purification, **18**, 1-10, 2000

- C. Hermann, D. Thevenet, P. Bouloc, G.C. Walker, R. D'Ari
Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *E. coli* protease HflB (FtsH)
Genes Dev., **12**, 1348-1355, 1998
- S. Hottenrott, T. Schuhmann, A. Plückthun, G. Fischer, J-U. Rahfeld
The *E. coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-propyl cis/trans isomerase
J. Biol. Chem., **272**, 15697-15701, 1997
- J.R. Huth, C.A. Bewley, B.M. Jackson, G.M. Clore, A.M. Gronenborn
Design of an expression system for detecting folded protein domains and mapping macromolecular interactions by NMR
Protein Science, **6**, 2359-2364, 1997
- R.B. Kapust, D.S. Waugh
E. coli maltose binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused
Protein Science, **8**, 1668-1674, 1999
- O. Kelm, C. Kiecker, K. Geider, F. Bernhard
Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*
Mol. Gen. Genet., **256**, 72-83, 1997
- U.K. Laemmli
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, **227**, 680, 1970
- E.R. LaVallie, E.A. DiBlasio, S. Kovacic, K.L. Grant, P.F. Schendel, J.M. McCoy
A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm
Biotechnology, **11**, 187-93, 1993
- S.C. Lee und P.O. Olins
Effect of overproduction of heat shock chaperones GrbESL and DnaK on human procollagenase production in *E. coli*
J. Biol. Chem., **267**, 2849-2852, 1992

S.A. Lesley

High-Throughput Proteomics: Protein Expression and Purification in the Postgenomic World

Protein Expression and Purification, **22**, 159-164, 2001

H. Lilie, E. Schwarz, R. Rudolph

Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*

Current Opinion in Biotechnology, **9**, 497-501, 1998

H.J. Meerman und G. Georgiou

Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins

Bio. Technol., **12**, 1107-1110, 1994

N. Mertens, E. Remaut, W. Fiers

Tight Transcriptional Control Mechanism Ensures Stable High-Level Expression from T7 Promoter-Based Expression Plasmids

Bio. Technol., **13**, 175-179, 1995

A. Mogk, M.P. Mayer, E. Deuerling

Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential

Biologie in unserer Zeit, **3**, 182-192, 2001

M. Mourino, C. Madrid, B. Balsalobre, A. Prenafeta, F. Munoa, J. Blanco, M. Blanco, J.E. Blanco, A. Juarez

The Hha protein as a modulator of expression of virulence factors in *E. coli*

Infect. Immun., **64**, 2881-2884, 1996

A. Mukhopadhyay

Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms

Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., **56**, 61-109, 1997

K. Mullis et al.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **51**, 263-273, 1986

M. Murby, T.N. Nguyen, H. Binz, M. Uhlen, S. Stahl

Production and recovery of recombinant proteins of low solubility

Separations for Biotechnology, **3**, 336-344, 1994

M. Murby, M. Uhlen, S. Stahl

Upstream Strategies to Minimize Proteolytic Degradation upon Recombinant Production in *E. coli*

Protein Expression and Purification, **7**, 129-136, 1996

J.M. Nieto, C. Madrid, A. Prenafeta, E. Miquelay, C. Balsalobre, M. Carrascal, A. Juarez

Expression of the hemolysin operon in *E. coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS

Mol. Gen. Genet., **263**, 349-358, 2000

L.J. Roman, E.A. Sheta, P. Martasek, S.S. Gross, Q. Liu, B.S. Masters

High-level expression of functional rat neuronal Nitric Oxide Synthase in *E. coli*

Proc. Natl. Acad. Sci., **92**, 8428-8432, 1995

R. Rudolph

Successful protein folding on an industrial scale

Principles and Practice in Protein Folding, 1995

R. Rudolph, G. Böhm, H. Lilie, R. Jaenicke

Folding proteins

Protein Function, a practical approach, edn 2, 57-99, 1997

R. Rudolph, H. Lilie

In vitro folding of inclusion body proteins

FASEB, **10**, 49-56, 1996

D. Sachdev und J.M. Chirgwin

Solubility of Proteins Isolated from Inclusion Bodies Is Enhanced by Fusion to Maltose-Binding-Protein or Thioredoxin

Protein Expression and Purification, **12**, 122-132, 1998

F. Sanger, S. Nichlen, A.R. Coulson

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

Proc. Acad. Natl. Sci., **74**, 5463-5467, 1977

D.B. Smith, K.S. Johnson

Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with Glutathione S-Transferase

Gene, **67**, 31-40 1998

J.C. Spurlino, G.-Y. Lu, F.A. Quiocho

The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis

J. Biol. Chem., **266**, 5202-5219, 1991

G. Stoller, K.P. Rücknagel, K.H. Nierhaus, F.X. Schmid, G. Fischer, J-U. Rahfeld

A ribosome-associated peptidyl-propyl cis/trans isomerase associated as the trigger factor

EMBO, **14**, 4939-4948, 1995

J.C. Venter *et al.*

The sequence of the human genome

Science, **291**, 1304-1351, 2001

S. Wickner, S. Gottesman, D. Skwyra, J. Hoskins, K. MacKenney, M Maurizi

A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ

Proc. Natl. Acad. Sci., **91**, 12218-12222, 1994

J. Wu und B.P. Rosen

Metalloregulated Expression of the ars Operon

J. Biol. Chem., **268**, 24552-24558, 1993

M. Wunderlich und R. Glockshuber

In vivo control of redox potential during protein folding catalized by bacterial protein disulfide isomerase (DsbA)

J. Biol. Chem., **268**, 24547-24550, 1993

F. Yang, P. Forrer, Z. Dauter, J.F. Conway, N. Cheng, M.E. Cerritelli, A.C. Steven, A. Plückthun and A. Wlodawer

Novel fold and capsid-binding properties of the Lambda-phage display platform protein gpD

Nature Structural Biology, **7**, 3, 2000

Y. Zhang, D.R. Olsen, K.B. Nguyen, P.S. Olson, E.T. Rhodes, d. Mascarenhas

Expression of Eukaryotic Proteins in Soluble Form in *E. coli*

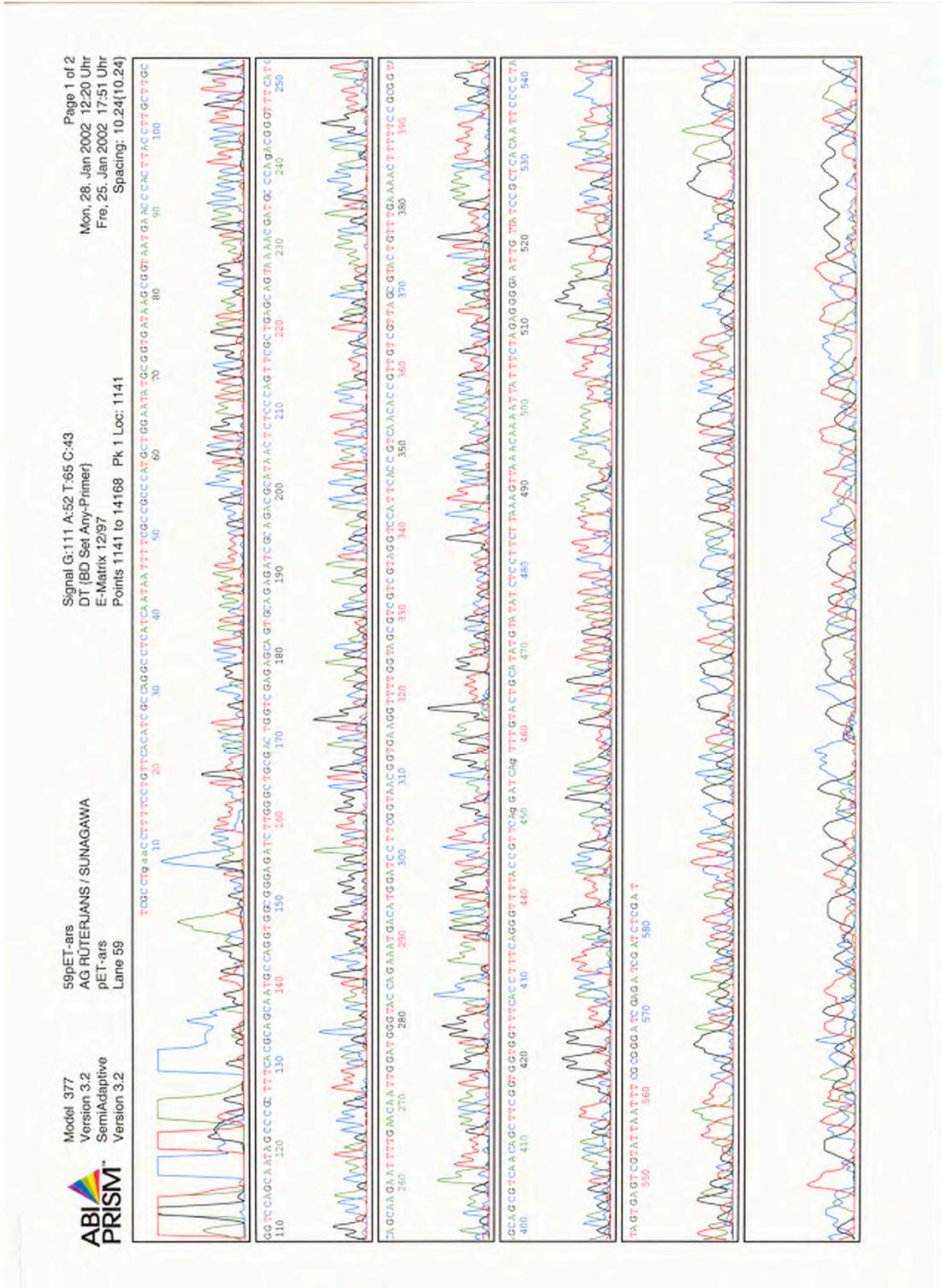
Protein Expression and Purification, **12**, 159-165, 1998

P. Zhou, A.A. Lugovskoy, G. Wagner

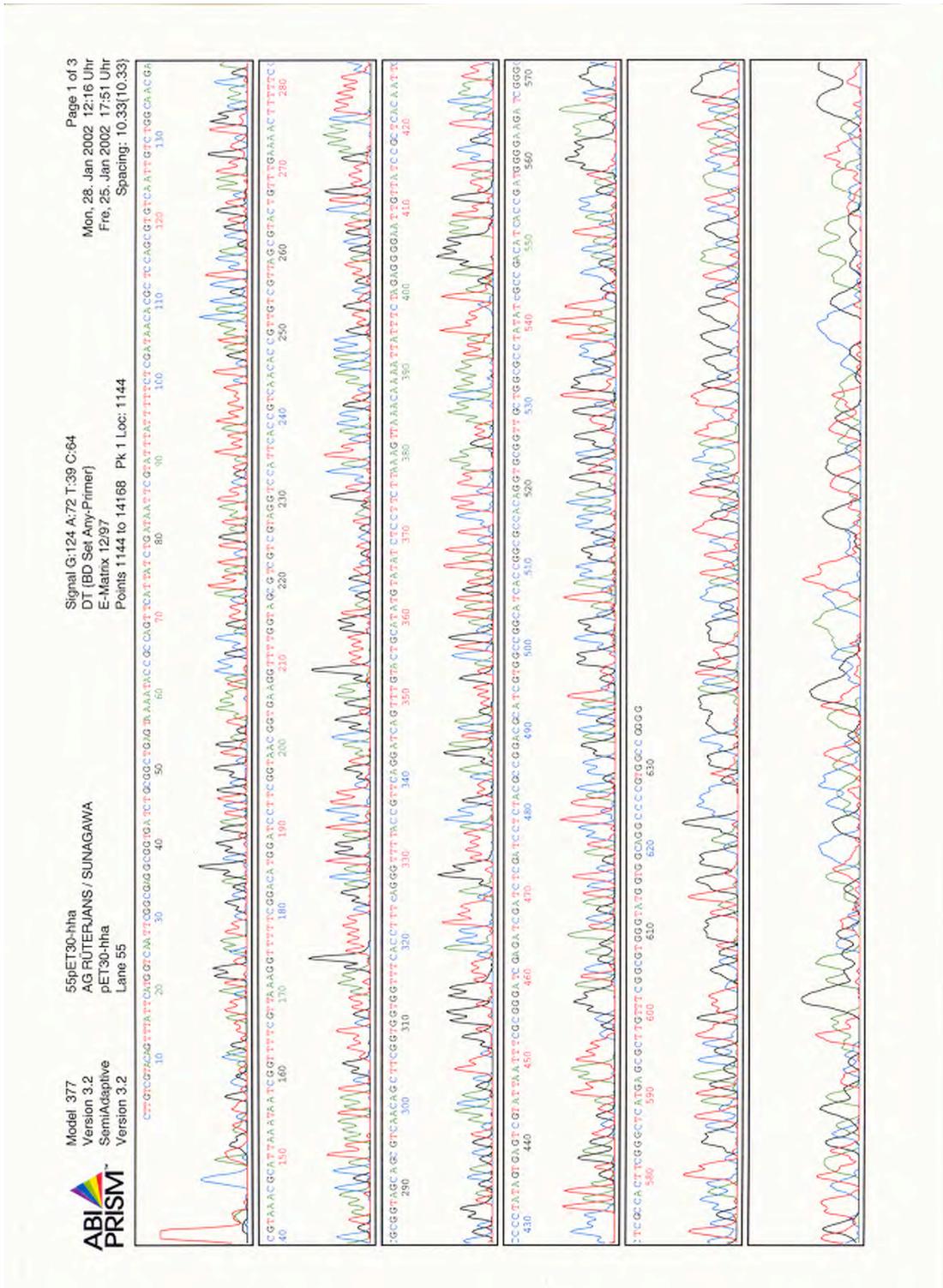
A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins

Journal of Biomolecular NMR, **20**, 11-14, 2001

Sequenzanalyse des Plasmids pET30-arsR



Sequenzanalyse des Plasmids pET30-hha



Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans möchte ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten, die Betreuung meiner Diplomarbeit und die Gesprächsbereitschaft während des gesamten Studiums sehr herzlich danken.

Meinem Betreuer Dr. Frank Bernhard danke ich herzlichst für die ausgezeichnete Betreuung meiner Diplomarbeit und für die wertvollen Gespräche bezüglich meiner beruflichen Zukunft. Seine ständige Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung trugen wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Die Aufnahme der NMR-Spektren wurde von Dr. Frank Löhr durchgeführt, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Meinen Arbeitskollegen, insbesondere Dirk Beilke, Alex Koglin, Dr. Christian Wolf, Dr. Gary Yalloway, Vicky Katsemi, Steffen Maurer, Carsten Mim und Daphne Strauß danke ich für die gute Stimmung und freundliche Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Birgit Schäfer, von deren langjähriger Laborpraxis ich bei vielen Experimenten profitieren konnte.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Rüterjans danke ich für die Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima im Laufe meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Studienkollegen und Freunden, im besonderen Nina Wolfrum, Christian Klammt und Robin Klemm. Durch sie wird die anspruchsvolle Studienzeit zugleich als eine schöne Zeit in Erinnerung bleiben.

Meiner Mutter Kayoko Sunagawa, meiner Schwester Kaneko Sunagawa und meinem Bruder Kazushiro Sunagawa danke ich für die finanzielle und persönliche Unterstützung, selbstverständlich nicht nur während meines Studiums.

Schließlich danke ich allen Menschen aus meinem privaten Umfeld für die unendliche Bereicherung meines Lebens und für die essentielle Ausgewogenheit zwischen Studium und Privatleben, ohne die ich nie soweit gekommen wäre.