

Lehrstuhl III für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Molekularbiologische und spektroskopische Untersuchung
von Protein-RNA-Wechselwirkungen im Antiterminationskomplex
der ribosomalen RNA-Operons von *Escherichia coli***

René Daniel Mühlberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher
2. apl. Prof. Dr. Luis Moroder

Die Dissertation wurde am 26. Februar 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20. März 2002 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von November 1998 bis Januar 2002 am Lehrstuhl III für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher danke ich für die interessante Themenstellung. Insbesondere über die abwechslungsreiche Vielfalt an Methoden und Techniken sowie die Betreuung und Förderung dieser Arbeit habe ich mich sehr erfreut.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Gerald Richter danke ich für die fachliche Begleitung und Betreuung der einzelnen Projekte. Die hilfreichen und anregenden Diskussionen haben mir sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Kessler und Herrn Dipl.-Chem. Alexander Dehner danke ich für die umfangreiche Kooperation auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie in Zusammenhang mit den Projekten NusB- und NusG-Protein.

Meinem Teamkollegen im Antiterminations-Duo, Herrn Dipl.-Chemiker Rudolf Robelek möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Jahre gemeinsamen Strebens nach Erkenntnis danken. Mit seiner freundschaftlichen und kameradschaftlichen Art ermöglichte er eine sehr angenehme Atmosphäre. Die zahlreichen gemeinsamen Diskussionen haben mir oft neue Impulse und Anregungen gegeben.

Meiner lieben Laborkollegin Heidi Hofner und meinen Kollegen Dr. Erik Schleicher, Werner Römisch sowie Johannes Kaiser und nicht zuletzt Herrn Dr. Nicholas Schramek möchte ich für die freundliche Atmosphäre sowie die interessanten Fachgespräche sehr herzlich danken.

Weiter bin ich folgenden Personen sehr dankbar:

Herrn Dr. Wolfgang Eisenreich für die Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie,

Herrn Richard Feicht für die kompetente Hilfe bei der Proteinreinigung,

Herrn Fritz Wendling für seine Hilfe bei der HPLC oder bei Computerproblemen sowie

Herrn Dr. H. Lüttgen für seine Unterstützung bei verschiedenen Fermentationen.

Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich für ihre kollegiale Unterstützung und ihrer stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern

Ein Teil dieser Arbeit ist veröffentlicht in

- Lüttgen, H.; Robelek, R.; Mühlberger, R.; Diercks, T.; Schuster, S. C.; Köhler, P., Kessler, H.; Bacher, A.; and Richter, G. (2002) Transcriptional regulation by antitermination. Interaction of RNA with NusB protein and NusB/NusE protein complex of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **316**, 873-883.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Transkriptionsregulation in Prokaryoten	1
1.2 Transkriptionstermination in Prokaryoten	1
1.2.1 Rho-unabhängige Termination	2
1.2.2 Rho-abhängige Termination	3
1.3 Antitermination und der <i>Bakteriophage</i> λ	4
1.4 Antitermination in rRNA Operons (<i>rrn</i>) von <i>E. coli</i>	8
1.4.1 Die Organisation der ribosomalen RNA Operons	8
1.4.2 Die Architektur der <i>nut</i> -site in den <i>E. coli</i> <i>rrn</i> Operons	10
1.4.3 Die Nus-Proteine in der <i>rrn</i> Antitermination	12
1.5 Eukaryotische Regulation der Transkriptionstermination	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Geräte	18
2.2 Chemikalien und Enzyme	20
2.3 Puffer und Lösungen	22
2.4 Kulturmedien	25
2.5 Mikroorganismen	28
2.5.1 Stämme und Plasmide	28
2.5.2 Bakterienanzucht	29
2.5.3 Stammhaltung	29
2.6 Molekularbiologische Methoden	29
2.6.1 Plasmidisolierung	29
2.6.1.1 Schnellisolierung durch Hitzeschock	29

2.6.1.2 Plasmidisolierung mittels CyclePure-Kit	30
2.6.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	30
2.6.2.1 Photometrie	30
2.6.2.2 Fluorometrie	31
2.6.3 Reinigung von DNA	31
2.6.4 Agarosegelelektrophorese	32
2.6.5 Kompetente Zellen und Transformation	33
2.6.5.1 Elektrokompente Zellen	33
2.6.5.2 Elektrotransformation	34
2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.6.7 Restriktion und Ligation	36
2.6.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	36
2.6.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.7 Anzucht	38
2.7.1 Fermentation in Vollmedium in Schüttelkolbenkultur	38
2.7.2 Fermentation in Minimalmedium im BIOFLO3000	38
2.7.3 Fermentation in deuteriertem Minimalmedium im BIOFLO3000	39
2.8 Proteinchemische Methoden	39
2.8.1 Expressionstest	39
2.8.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	40
2.8.3 Proteinbestimmung	41
2.9 Proteinreinigung	42
2.9.1 Aufschluß	42
2.9.2 Anionenaustauscher-Chromatographie	42
2.9.3 Farbstoff-Affinitätschromatographie	43
2.9.4 Chromatographie mit Hydroxylapatit	43
2.9.5 Gelfiltrations-Chromatographie	43
2.9.6 Proteinkonzentration durch Ultrafiltration	44
2.10 Western-Blotting	44
2.11 Stabile RNA/Protein-Proben für NMR-Spektroskopie	45
2.12 NMR-Spektroskopie	46
2.13 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	47
2.14 Isolierung und Reinigung von Ribonucleosiden	49

3 Ergebnisse	51
3.1 Molekularbiologische und proteinchemische Vorarbeiten	51
3.1.1 Arbeiten mit NusG Protein aus <i>Escherichia coli</i>	51
3.1.1.1 Umklonierung des <i>nusG</i> -Gens aus <i>E. coli</i>	51
3.1.1.2 Reinigung von stabilem NusG Protein	52
3.1.2 Arbeiten mit NusA Protein aus <i>E. coli</i>	53
3.1.2.1 Expression und Reinigung von N- und C-terminaler NusA-Domäne	53
3.1.2.2 NusA- λ N-Mini-Operon	56
3.1.2.3 Umklonierung und Reinigung von NusA Protein aus <i>Escherichia coli</i>	57
3.1.3 Arbeiten mit Rho Protein aus <i>Escherichia coli</i>	58
3.1.3.1 Konstruktion des Expressionsklons pNCO113- <i>rho</i>	58
3.1.3.2 Reinigung von Rho Protein aus <i>E. coli</i>	60
3.1.4 Konstruktion des Klons pNCO113-<i>yhbC</i> aus <i>E. coli</i>	61
3.2. NMR-Spektroskopie am NusB/<i>boxA</i> Komplex	62
3.2.1. Fermentation zur Darstellung von schwerisotopmarkierten NusB Protein	62
3.2.2 Darstellung stabiler Proben von NusB Protein/<i>boxA</i> RNA	64
3.2.2.1 RNA-Stabilitätsassay	64
3.2.2.2 Modifizierung der NusB-Proteinreinigung	66
3.2.2.3 Zusammensetzung stabiler Protein/RNA-Proben	71
3.2.3 Struktur von NusB Protein im Komplex mit <i>boxA</i> RNA	73
3.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	79
3.3.1 Die Methode und ihre Anwendung	79
3.3.2 Messungen von N- und Nus-Proteinen mit <i>box</i>-Motiven aus <i>E. coli</i> und λ	83
3.3.3 Wechselwirkung von <i>rrn boxA</i>-Mutanten mit NusB und NusB/NusE	88
3.3.3.1 Basen-Mutationen an der <i>rrn boxA</i> RNA	88
3.3.3.2 Mutationen an der 2'-Hydroxylgruppe der <i>rrn boxA</i> RNA	92
3.4 NMR-Spektroskopie	94
3.4.1 Basen-Mutationen an der <i>rrn boxA</i> RNA aus <i>E. coli</i>	94
3.4.2 Mutationen an der 2'-OH-Position der <i>rrn boxA</i> RNA	99
3.5 Darstellung von ^{15}N-markierten Ribonucleosiden aus <i>E. coli</i>	102
3.5.1 Hochdichte Fermentation von <i>Escherichia coli</i>-Zellen	102
3.5.2 Extraktion der Ribonucleosidmonophosphate	106
3.5.3 Separation der Ribonucleosidmonophosphate	106
3.5.4 Umsetzung zu den Nucleosiden und Reinigung	109

3.6 NusG Protein aus <i>Escherichia coli</i>	110
3.6.1 NMR-Spektroskopie von großen Proteinen	110
3.6.2 Darstellung von schwerisotopmarkierten NusG Protein aus <i>E. coli</i>	111
3.6.3 Rückgrat-Zuordnung von NusG Protein	112
4 Diskussion	118
4.1 Struktur von NusB Protein komplexiert mit <i>boxA</i> RNA	118
4.1.1 Stabile Protein/RNA-Proben zur NMR-Spektroskopie	118
4.1.2 Sekundärstruktur des NusB-Proteins im Komplex mit <i>rrn boxA</i> RNA	121
4.2 SPR-Messungen von Nus-Proteinen und <i>boxA/B</i>-Elementen	124
4.3 Untersuchungen zur <i>boxA</i> RNA-Sequenz von <i>E. coli</i>	128
4.4 Darstellung ¹⁵N-markierter Ribonucleoside	133
4.6 Strukturaufklärung von NusG Protein	138
5 Zusammenfassung	140
6 Literaturverzeichnis	143
Anhang A	159
Anhang B	160
Anhang C	161

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin-Trihydrat
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARM	Arginine-Rich-Motiv
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATZ	Anilinothiazolinon
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaare
COSY	Correlation Spectroscopy
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetat
FPLC [®]	Fast-Protein Liquid Chromatography [®] (Pharmacia, Inc.)
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazid- <i>N'</i> -2-ethan
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Homonuclear Single Quantum Coherence
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycinsulfat
kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
<i>lacI</i>	Repressorprotein
LTR	Long-Terminal-Repeat
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA

NBT	Nitrotetrazoliumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
Nus	N utilization substance
<i>nut</i>	N utilization
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
OD	Optische Dichte
<i>ori</i>	Origin
PMSF	Perfluormethansulfonsäure
Rev	Regulation of expression of virion
RNA	Ribonucleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RRE	Rev-Response-Element
<i>rrn</i>	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomale Bindungsstelle)
SPR	Surface Plasmon Resonance: Oberflächen Plasmon Resonanz
Tab.	Tabelle
TAR	Trans-Activation-Response
Tat	trans activator
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

1.1 Transkriptionsregulation in Prokaryoten

In Prokaryoten und auch in Eukaryoten existieren verschiedene Strategien zur Kontrolle der Genexpression. Die Transkription von DNA in RNA nimmt dabei eine wichtige Rolle ein. Für Prokaryoten wurden vor allem durch intensive Studien der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*, dem zentralen Enzym im Transkriptions-Mechanismus, wichtige Informationen gewonnen (VON HIPPEL *et al.*, 1984; MCCLURE, 1985; GROSS *et al.*, 1996). Der dreiphasige Prozeß – Initiation, Elongation und Termination - wird im ersten Schritt, dem Transkriptionsstart, durch die Bindung der RNA-Polymerase an einen Promotor initiiert. Dazu bedarf die Core-Einheit der RNA-Polymerase, bestehend aus zwei α - und je einer β - und β' -Untereinheit, eines Initiationsfaktors σ und wird zum Holoenzym (BURGESS *et al.*, 1969). Ein wichtiger Vertreter des Bakteriums *Escherichia coli* ist der Initiationsfaktor σ^{70} (FERGUSON *et al.*, 2000). Die Art dieses Faktors und die des Promotors bedingen die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation und sind für die flexible Anpassung des Organismus an die Umgebung von enormer Bedeutung. Während der Elongationsphase, in der die RNA-Polymerase 40 bis 50 Ribonucleotide pro Sekunde an das 3'-Ende der naszierenden RNA anhängt, besitzt der ternäre Komplex aus RNA, DNA und RNA-Polymerase eine hohe Dissoziationsstabilität. Aus *in vitro*-Untersuchungen ist aber bekannt, dass einige Operons im zellfreien System unvollständig transkribiert werden, die Transkription also vorzeitig terminiert wird. Dieser Vorgang wird durch sog. Terminator(sequenz)en ausgelöst. An anderen Terminatoren wird dagegen dieser vorzeitige Abbruch verhindert und die Sequenz durch die RNA-Polymerase vollständig transkribiert. Dieser Vorgang wird als Antitermination bezeichnet, da er die Termination unterdrückt. Der Abbruch oder die Fortführung der Transkription durch die RNA-Polymerase an bestimmten DNA-Abschnitten stellen somit eine Kontrolle der Genexpression dar.

1.2 Transkriptionstermination in Prokaryoten

Die Stabilität des ternären Transkriptionskomplexes aus DNA, RNA und RNA-Polymerase ist für die effiziente Vervielfältigung von Gensequenzen wichtig. Für eine ordentliche Genexpression ist die Fähigkeit von Enzymen zur Verlängerung der RNA und zur Freisetzung des

Transkripts am Genende von Bedeutung. Die Wechselwirkungen zwischen RNA-Polymerase, DNA und der naszierenden RNA ermöglicht eine Transkription nahezu aller Sequenzen bakterieller DNA, ohne dass die wachsende Kette vorzeitig vom Komplex gelöst wird. Allerdings existieren Sequenzmotive, wo die Wahrscheinlichkeit der RNA-Ablösung mit der Kettenverlängerung konkurrieren kann (WILSON *et al.*, 1994). Trifft die RNA-Polymerase auf einen dieser Terminatoren, so hört sie auf, Ribonucleotide an die wachsende RNA-Kette anzuhängen, und die RNA wird aus dem Komplex mit der DNA freigesetzt.

Escherichia coli-Zellen besitzen zwei Arten der Transkriptionstermination, die man daran unterscheidet, ob die RNA-Polymerase zur *in vitro*-Termination noch einen zusätzlichen Faktor benötigt. Dabei handelt es sich um den Rho-Faktor, weshalb die erste Art als Rho-unabhängige, die zweite als Rho-abhängige Termination bezeichnet wird (PLATT, 1986; YAGER, 1987).

1.2.1 Rho-unabhängige Termination

DNA-Sequenzen, an denen die *E. coli*-RNA-Polymerase die Transkription ohne Hilfe des Rho-Faktors terminiert, werden als Rho-unabhängige Terminationsstellen oder intrinsische Terminatoren bezeichnet (BRENDDEL *et al.*, 1987; CARAFA *et al.*, 1990; ROSENBERG *et al.*, 1979). Diese haben zwei charakteristische Merkmale, nämlich eine Reihe von T-Resten, vor denen sich ein GC-reicher, selbstkomplementärer Bereich mit mehreren dazwischen liegenden Nucleotiden befindet. Das entsprechende RNA-Transkript weist einen 20-50 Basen langen, GC-reichen Abschnitt mit C_2 -Symmetrie auf, der in der Mitte durch 7-9 Basen unterbrochen ist. Es folgen in 3'-Richtung 7-9 Basen und anschließend ca. sechs Uridinreste am 3'-Ende der RNA (Abbildung 1.1). Wenn ein solcher selbstkomplementärer Bereich in einer wachsenden RNA-Kette synthetisiert wird, gehen die komplementären Sequenzen miteinander Basenpaarungen ein, wobei sich eine haarnadelförmige Struktur mit einer Schleife ausbildet. Die symmetrischen Abschnitte bilden den Stiel der Haarnadelschleife, der an der Basis meist GC-reich ist und eine Länge von 7-20 Basenpaaren aufweist; diejenigen Basen, die zwischen den komplementären Sequenzen liegen, formieren sich zu einer Schleife von 5-10 Basen. Mutanten, welche die Anzahl der gepaarten Basen am Stiel der Haarnadelschleife verändern, beeinflussen die Effizienz der Terminatoren (CHENG *et al.*, 1991; LYNN *et al.*, 1988).

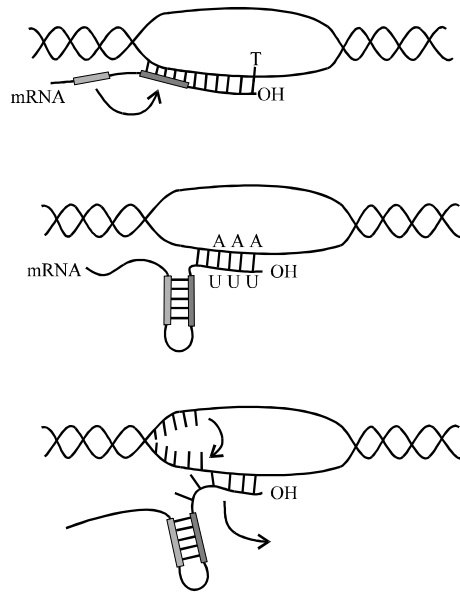


Abb. 1.1 Modell für Rho-unabhängige RNA-Kettentermination (PLATT, 1981)

Ferner gibt es eine Korrelation zwischen der Stabilität der RNA-Struktur und der Wirksamkeit der Terminatoren, die an ihrem Stiel verändert wurden. Schließlich vermindert die bloße Anwesenheit von DNA-Oligonucleotiden, die zum 5'-Strang der Haarnadelschleife komplementär sind, die Termination an intrinsischen Terminatoren (FISHER *et al.*, 1983). Haarnadelförmige, GC-reiche RNA-Strukturen gehen mit der Oberfläche der RNA-Polymerase Wechselwirkungen ein, wodurch während der Transkription Pausen entstehen, deren Dauer von der Anzahl der Basen zwischen dem Stiel und den Uridinresten abhängt. Die rU-dA-Basenpaare zwischen dem 3'-Ende der naszierenden RNA-Kette und dem Matrizenstrang der DNA in der Transkriptionsblase sind im Vergleich zu anderen Watson-Crick-Basenpaarungen instabil (FARNHAM *et al.*, 1980; MARTIN *et al.*, 1980). Es erfordert nur einen geringen Energieaufwand für die Dissoziation des $(rU)_n$ - $(dA)_n$ -Hybrids. Während die RNA-Polymerase pausiert, trennt sich das RNA-DNA-Hybrid im locker gebundenen rU-dA-Endabschnitt. Die Bedeutung beider Strukturelemente, der Haarnadelschleife und der Uridinreste, für die Termination wird durch Mutationen deutlich, die die Anzahl der Uridinreste oder den Stiel der Haarnadel verkürzen.

1.2.2 Rho-abhängige Termination

Rho-abhängige Terminationsstellen wurden zuerst bei *in vitro*-Transkriptionsversuchen mit *Bakteriophage λ*-DNA und gereinigter *E. coli*-RNA-Polymerase entdeckt (PLATT *et al.*, 1993).

Es wurde entdeckt, dass in Anwesenheit eines im Extrakt nichtinfizierter *E. coli*-Zellen vorhandenen Faktors die *in vitro*-Transkription an bestimmten Terminationsstellen endet, ebenso, wie dies für die *in vivo*-Transkription zutrifft. Das für die Termination an diesen Stellen auf der λ -DNA notwendige Protein wurde gereinigt und als Rho-Faktor bezeichnet (ROBERTS, 1969; BRENNAN *et al.*, 1987).

Rho-abhängige Terminatoren bestehen aus zwei verschiedenen, sich teilweise überlappenden Abschnitten, die zusammen ca. 150-200 bp DNA umfassen (LAU *et al.*, 1984; RICHARDSON, 1990). Der erste Abschnitt ist der Bereich, an dem die Transkription abbricht, der sog. *Transcription stop point* (tsp); der andere Abschnitt befindet sich stromaufwärts davon und wird *rut* genannt, nach *Rho utilization*. Die *rut*-Sequenz stellt die Bindungssequenz für das Rho-Protein dar und hat mindestens eine Größe von 85 bp (HART *et al.*, 1994). Die eigentlichen Terminationspunkte können bei Rho-abhängigen Terminatoren über einen Bereich von bis zu 100 bp gestreut sein; im Gegensatz dazu läßt er sich bei intrinsischen Terminatoren auf 2-3 Basen einengen (MORGAN *et al.*, 1982). Als allgemeine Regel kann gelten, dass die Effizienz eines Rho-abhängigen Terminators mit der Länge des C-reichen- und G-armen Abschnittes ansteigt.

Das 47 kDa schwere Rho-Protein, eine RNA abhängige ATPase und Helikase, bindet als Homohexamer an unstrukturierte RNA und bewegt sich, verknüpft mit einer ATP-Hydrolyse, in Richtung 3'-Ende fort. Das Rho-Protein entwindet den DNA-RNA-Komplex und spaltet den Transkriptionskomplex (RICHARDSON *et al.*, 1993). Ein wesentliches Merkmal der Rho-unabhängigen Termination ist, dass die Sekundärstruktur der mRNA bestimmt, ob die RNA-Polymerase einen Rho-unabhängigen Terminationsort erkennen kann. Bei der Rho-abhängigen Termination ist dagegen wichtig, dass keinerlei Sekundärstrukturen vorhanden sind. Sie ist von zentraler Bedeutung für die Regulation während der λ -Phageninfektion von *E. coli*.

1.3 Antitermination und der *Bakteriophage* λ

Die Antitermination wird neben den bakteriellen Operons auch in Phagen als Regulativ der Genexpression benutzt. Das Phänomen der Antitermination wurde anhand der Infektion des *Escherichia coli*-Bakteriums durch den *Bakteriophagen* λ entdeckt. Er zählt zu den temperenten Phagen, d.h. er besitzt zwei Möglichkeiten sich zu vermehren. Im **lysogenen Zyklus** wird die λ -DNA in das Genom des Wirtsorganismus integriert. Ohne seinen Wirt zu beeinträchti

gen, wird die Prophagen-DNA über viele Generationen hinweg bei jeder Zellteilung repliziert. Das Bakterium lebt als sogenannte lysogene Zelle weiter. Im **lytischen Zyklus** existiert die λ -DNA als ein unabhängiges, ringförmiges Makromolekül im infizierten Bakterium. Es werden alle Virusgene nacheinander exprimiert, was zur Produktion von etwa 100 Phagen nachkommen und letztendlich zur Lyse des infizierten Bakteriums führt.

Um eine verbesserte Kontrolle der Gene funktionsverwandter Proteine zu ermöglichen, sind sie zu Operons zusammengefaßt und werden aufgrund dieser Organisation gemeinsamen transkribiert. Das λ -Genom besteht aus 48 kb doppelsträngiger DNA und läßt sich in drei Gengruppen unterteilen, in die frühen, die verzögert frühen und die späten Gene. Unter diesen codiert das frühe Gen *N* für ein Antiterminationsprotein, das die Transkription in die dahinterliegenden verzögert frühen Gene ermöglicht. Das N-Protein besitzt zentrale Bedeutung für die Steuerung der lytischen oder lysogenen Phase im Phagenvermehrungszyklus (REES *et al.*, 1996; OBUCHOWSKI *et al.*, 1997).

Wenn λ -DNA in eine neue Wirtszelle gelangt, verläuft die Entwicklung für den lytischen und den lysogenen Weg zuerst analog über die Expression der frühen und der verzögert frühen Gene. In Abbildung 1.2 ist eine vereinfachte genetische Karte des λ -Phagen wiedergegeben, die die Abfolge der lytischen Entwicklung des λ -Phagen darstellt.

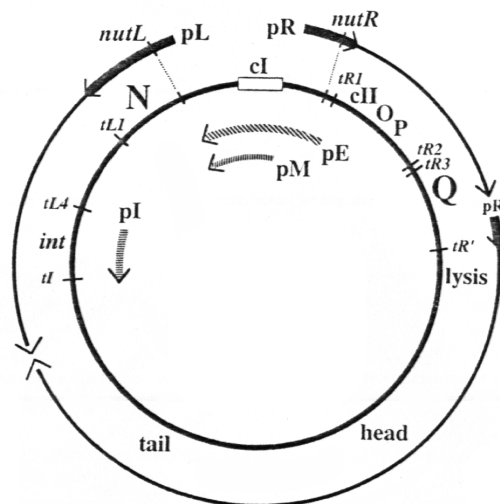


Abb. 1.2 Zeitliche Kontrolle der Transkription des λ -Genoms. Die Gen-Karte zeigt das zirkuläre λ -Genom mit relevanten Genen, Promotoren und Terminatoren (DAS *et al.*, 1996). Die verschiedenen Phasen der Transkription sind inner- und außerhalb des Kreises markiert.

Bei der λ -Phageninfektion von *E. coli* werden zunächst die frühen Gene *N* und *cro*, von der bakteriellen Wirts-RNA-Polymerase transkribiert, die von den dahinter liegenden verzögert frühen Genen jeweils durch eine Terminationssequenz, *tR1* bzw. *tL1*, getrennt sind. λ -N-Protein, Produkt eines frühen Gens, verhindert die Termination an den beiden Terminatoren *tR1*

oder *tL1* am Ende der frühen Gene. Die *E. coli*-RNA-Polymerase transkribiert über die Terminationssequenzen hinaus die dahinterliegenden verzögert frühen Gene und bewirkt einen Übergang von der Expression der frühen Gene zu der der verzögert frühen Gene.

Das λ -N-Protein modifiziert als Antiterminationsprotein die *E. coli*-RNA-Polymerase, so daß sie gegenüber Terminatoren resistent wird (Übersichtsartikel: GREENBLATT *et al.*, 1993). Dadurch wird die Transkription längerer DNA-Sequenzen ermöglicht (REES *et al.*, 1996). Diese Modifikation bedarf einer spezifischen cis-aktiven Sequenz, der *nut*-site, die nach *N-utilization* benannt ist. Sie ist zwischen dem Promotor und dem ersten Terminator eines jeden Operons gelegen (DECROMBRUGGHE *et al.*, 1979; OLSON *et al.*, 1982) und ermöglicht dem λ -N-Protein die Expression eines Reportergens zu aktivieren, das hinter dem Terminator liegt (PELTZ *et al.*, 1985).

Die *nut*-site besteht aus zwei charakteristischen genetischen Elementen, *boxA* und *boxB*, die beide für die Antitermination von Bedeutung sind. Die *boxA* befindet sich am 5'-Ende der jeweiligen *nut*-site und umfaßt jeweils 12 Basen (Tabelle 1.1).

RNA-Motiv	Sequenz
Consensus-Sequenz lambdoider Phagen	5'-CGCUCUUUAACA-3'
λ <i>nutL boxA</i>	5'-CGCUCUUACACA-3'
λ <i>nutR boxA</i>	5'-CGCUCUUAAAAA-3'
<i>boxA</i> aus <i>rrn</i> -Operons von <i>E. coli</i>	5'-UGCUCUUUAACA-3'
λ <i>nutL boxB</i>	5'- <u>GCCCU</u> G <u>AAAA</u> A <u>AGGGC</u> -3'
λ <i>nutR boxB</i>	5'- <u>GCCCU</u> G <u>AAGA</u> A <u>AGGGC</u> -3'

Tab. 1.1 Sequenzen der *boxA* und *boxB*-Elemente von λ , von lambdoiden Phagen und ribosomalen RNA-Operons aus *E. coli*.

Die *boxA*-Segmente der lambdoiden Bakteriophagen sind untereinander sehr ähnlich (FRANKLIN, 1985) und ihre Consensus-Sequenz (FRIEDMAN *et al.*, 1990) ist nahezu identisch mit der *boxA*-Sequenz aus den ribosomalen RNA-Operons (*rrn*) aus *E. coli* (Kapitel 1.4). Die *boxB*-Elemente befinden sich am 3'-Ende der jeweiligen *nut*-site. Im Fall des λ -Phagen umfaßt die λ *nut boxB* 15 Basen (Tabelle 1.1).

Sie weist die charakteristische dyadische Symmetrie auf, die zur Ausbildung einer Haarnadelschleife in der naszierenden RNA führt. Die zueinander symmetrischen Basen sind unterstrichen und bilden den Stiel von 5 bp; die 5 Basen in der Mitte bilden die Schleife und sind fett gedruckt. Chimäre Proteine aus N^λ , $N^{\phi 21}$ und N^{P22} erkennen diese Haarnadelschleife spezifisch aufgrund ihrer arginin-reichen Region am Amino-Ende (LAZINSKI *et al.*, 1989).

Ältere bakteriengenetische Arbeiten haben gezeigt, dass die Genprodukte von *nusA*, *nusB*, *nusE*, *nusG* sowie mindestens ein weiteres, noch nicht identifiziertes Protein an der Phagenregulation beteiligt sind. Später wurde gezeigt, dass das Produkt des *nusE*-Gens identisch ist mit dem ribosomalen S10 Protein (MOGRIDGE *et al.*, 1995; DEVITO and DAS, 1994). Die Proteine NusA, NusB, NusE und NusG des Wirtbakteriums werden durch das N-Protein in den Dienst der Phagenregulation gestellt („recruiting“). Sie stabilisieren den Komplex aus DNA, RNA, RNA-Polymerase und λ -N-Protein durch vielfältige RNA-Protein- sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Das promotor-proximale *nut*-Kontrollsignal liegt in der naszierenden RNA, die wiederum durch eine RNA-Schleife mit der elongierenden RNA-Polymerase verbunden ist. Die *nut*-site bildet eine Stiel-Schleifen-Struktur aus, welche das katalytisch aktive Zentrum der RNA-Polymerase mit dem Komplex aus dem λ N-Protein und den *E. coli* Nus-Proteinen auf der Oberfläche der RNA-Polymerase in enger räumlicher Nachbarschaft hält (GREENBLATT *et al.*, 1984). Enthält ein solcher Komplex nur die Proteine λ -N, NusA sowie RNA-Polymerase, so geht der klammernde Effekt der *nut*-site-RNA mit fortschreitender Transkription verloren und der Komplex zerfällt (NODWELL *et al.*, 1991). Die Dissoziation unterbleibt, wenn NusB, S10 und NusG den Komplex stabilisieren (MASON *et al.*, 1991).

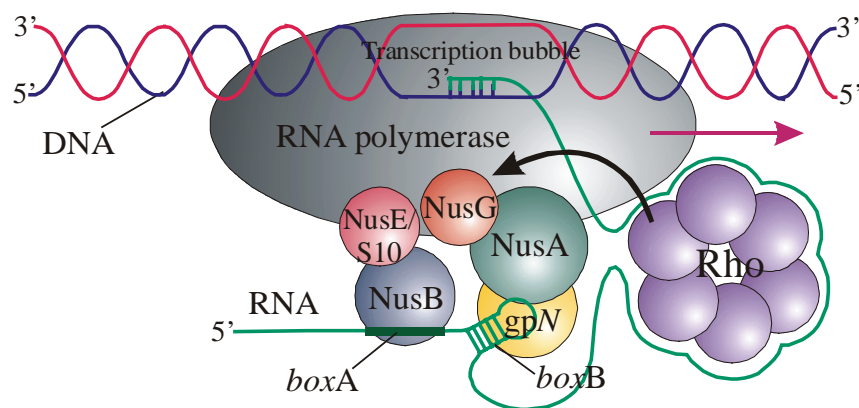


Abb. 1.3 Antitermination durch das N-Protein des λ -Phagen und weitere zelluläre Proteine (GREENBLATT *et al.*, 1993).

NusA, NusG und NusE stehen alle in direktem Kontakt mit der RNA-Polymerase (MASON *et al.*, 1991). Alle diese Wechselwirkungen sind bedeutend für die stabile Assoziation des N-abhängigen Antiterminationskomplexes mit RNA-Polymerase *in vitro*. Ein „minimaler“ N-abhängiger Transkriptionskomplex, der nur aus den unbedingt notwendigen Bestandteilen λ *nutR* RNA, RNA-Polymerase, λ -N und NusA Protein besteht, ist zwar imstande, Rho-abhängig

ige und Rho-unabhängige Terminatoren zu überlesen, wenn diese nur eine kurze Distanz unterhalb der *nut*-site platziert sind (WHALEN *et al.*, 1990). Für eine prozessive Antitermination, sowohl *in vivo* wie *in vitro*, die sich über mehrere Terminatoren und einige Kilobasen stromabwärts des *nut*-Signals erstreckt, sind das λ *boxA*-Element (OLSON *et al.*, 1982; LI *et al.*, 1992) und auch die Hilfsproteine NusB, S10 und NusG unverzichtbar. Ein solcher Prozeß erfordert alle Bestandteile des Antiterminationskomplexes, der sich durch hohe Stabilität auszeichnet (Abbildung 1.3). Eine Übersicht über die wechselseitigen Beziehungen im λ -Antiterminationssystem sind bei DAS (1992) und ROBERTS (1993) zu finden.

1.4 Antitermination in rRNA Operons (*rrn*) von *E. coli*

1.4.1 Die Organisation der ribosomalen RNA Operons

In der Natur müssen Zellen von *Escherichia coli* auf eine fortwährende Veränderung ihres sie umgebenden Lebensraums reagieren können. In diesem Zusammenhang haben die Bakterien rRNA-Kontrollen entwickelt, die fest auf die Erfordernisse des Wachstums abgestellt sind. Ein großer Teil der Regulation spielt sich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation ab. Im allgemeinen ist die rRNA-Synthese in *E. coli* proportional zum Proteinbedarf der Zellen.

Etwa 50 % der metabolischen Leistung in wachsenden Bakterienzellen wird allein durch die Biosynthese von Ribosomen beansprucht (BREMER and DENNIS, 1987). Damit der Organismus aus einer nährstoffreichen Umgebung physiologisch einen Vorteil ziehen kann, verfügt er über Mechanismen, die rRNA-Syntheserate sehr schnell zu steigern. Dadurch wird die Proteinsynthese und damit das Wachstum entsprechend beschleunigt. Umgekehrt existieren für den Fall einer Limitierung der Nährstoffversorgung Strategien, belastende rRNA-Synthesen rasch einzugrenzen. Dazu müssen unter anderem die Syntheseraten der zahlreichen Strukturkomponenten des Ribosoms exakt aufeinander abgestimmt werden. Dies wird in *E. coli* unter anderem durch Organisation der Gene für ribosomale RNA in großen Operons erreicht.

Die ribosomale RNA von *E. coli* wird aus sieben unabhängigen Operons (*rrnA-E* und *rrnG-H*) synthetisiert, welche asymmetrisch um den Origin (*oriC*) auf einer Hälfte des circulären Chromosoms verteilt sind (ELLWOOD *et al.*, 1982). In Abbildung 1.4 ist eine grafische Übersicht wiedergegeben. Drei Typen von rRNA werden in der Reihenfolge Promotor – 16S RNA – 23S RNA – 5S RNA synthetisiert. In der Spacer Region zwischen der 16S und der 23S

rRNA und am distalen Ende einiger *rrn* Operons befinden sich mehrere verschiedene tRNA Gene. Die globalen Strukturen der sieben Operons sind nicht vollkommen identisch.

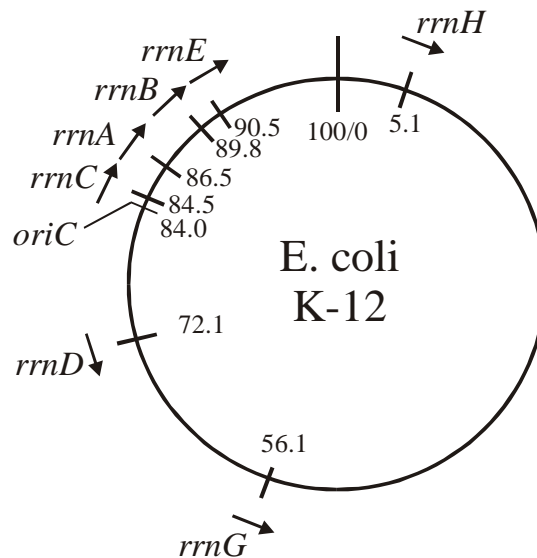


Abb. 1.4 Verteilung der sieben *rrn* Operons auf dem circüären Chromosom von *E. coli*, angegeben in Minuten. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an. Bei 84.0 Minuten ist der Replikationsursprung *oriC* lokalisiert.

Die Organisation der 16S, 23S und 5S Gene in polygenetischen Operons stellt die Produktion äquimolarer Mengen der drei RNA-Spezien sicher. Diese Gruppierung der rRNA Gene ist trotz weiter Verbreitung nicht universal gültig. Es sind einige Beispiele in Bakterien und Archaea entdeckt worden, in denen nicht alle rRNA-Gene verknüpft sind. Sequenzvergleiche legen nahe, dass einige der sieben *E. coli* *rrn* Operons funktionell unterscheidbar sind. Erkenntnisse aus umfangreichen Hybridisierungsexperimenten weisen neben kleineren Abweichungen auch auf größere Unterschiede hin (MORGAN *et al.*, 1977). Die Operons von *rrnB* und *rrnG* enthalten eine 106 Nucleotide lange Sequenz mit einer Sekundärstruktur, die als ribosomaler Spacer-Loop bezeichnet wird. In den *rrnC*, *rrnE* und in *rrnB*-Operons einiger K12-Abkömmlinge (*rrnB1*) fehlt dieser Loop in der Spacerregion; in letzteren ist er durch eine kürzere Sequenz von 20 Nucleotiden ersetzt (HARVEY *et al.*, 1988). Einige Operons weichen in den Genen an ihrem distalen Ende von einander ab. So besitzt das *rrnD* Operon als einziges zwei distale 5S RNA Sequenzen (DUESTER *et al.*, 1980).

Multiple *rrn* Operons sind im Genom zahlreicher Organismen zu finden und obwohl die Vorteile aus der Redundanz der *rrn* Operons nur teilweise verstanden wird, ist dieses Phänomen ganz eindeutig überlebenswichtig für *Escherichia coli* und viele andere Arten von Bakterien. Experimente in welchen die mehrfachen *rrn* Operons von *E. coli* inaktiviert wurden, konnten zeigen, dass beinahe optimales Wachstum mit nur fünf intakten *rrn* Operons möglich ist. Für die rasche Adaption an bestimmte Nahrungs- und Temperaturveränderungen sind aber alle

sieben *rrn* Operons erforderlich. Daraus folgt, dass eine der Hauptaufgaben der mehrfachen *rrn* Operons ein schnellerer Anstieg der Ribosomensynthese ist, wenn sich die Wachstumsbedingungen verbessern (CONDON *et al.*, 1995).

Die Operons für ribosomale RNA von *E. coli* werden in einem Ausmaß transkribiert, welches fast der Hälfte der Gesamtsynthese an RNA unter raschen Wachstumsbedingungen entspricht. Die Promotorregionen der sieben Operons zeigen alle die gleiche Grundstruktur. Jedes Operon verfügt über Tandem- σ^{70} Promotoren *P1* und *P2*, getrennt durch 100 bp. Der *P2*-Promotor ist seinerseits durch eine 200 bp lange Region vom Beginn der 16S rRNA getrennt. Keine der Promotor-Kernsequenzen hat eine perfekte Konsensussequenz eines σ^{70} -Promotors in Bezug auf die -35 bzw. die -10 Position oder dem Bereich dazwischen. Die Promotor-Kernsequenz ist als Bereich zwischen -41 und +1 bezogen auf die Transkriptionsinitiations-Stelle definiert (BARTLETT and GOURSE, 1994). Im allgemeinen scheinen diese Abweichungen von der konservierten Sequenz auf eine Abschwächung der *rrn* Kern-Promotoren hinzuweisen. Trotzdem sind einige für eine verstärkte Kontrolle der *rrn*-Synthese verantwortlich (DICKSON *et al.*, 1989). ROSS und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die außergewöhnliche Stärke der *rrn P1* Promotoren durch eine Sequenz außerhalb der Kernregion der Promotoren, vornehmlich in den stromaufwärts flankierenden Sequenzen verursacht wird. Diese Aktivierung der *rrn* Promotorregionen durch flankierende Sequenzbereiche wird als „Upstream-Aktivierung“ bezeichnet (ROSS *et al.*, 1993).

Circa 1000 Basen stromaufwärts von *rrnB* wurden von BOROS *et al.* (1983) die zwei Promotoren *P3* und *P4* entdeckt. Es wurde vermutet, dass Moleküle der RNA-Polymerase von diesen Promotoren in *rrnB* transkribieren können. Die mRNA von den Promotoren *P3* und *P4* codiert für ein 289 Aminosäuren großes Protein, das in den Vitamin B₁₂ Metabolismus involviert ist (AUFRERE, *et al.* 1986). Ein eindeutiges Anzeichen für eine Transkription in den Bereich von *rrnB* wurde nicht gefunden.

1.4.2 Die Architektur der *nut*-site in den *E. coli rrn* Operons

Beim größten Teil der mRNA in *Escherichia coli* ist die Translation an die Transkription gekoppelt, das heißt, die Translation der mRNA beginnt, bevor die RNA-Polymerase das 3'-Ende der Transkriptionseinheit erreicht und sich vom Transkript gelöst hat. Es ist zu vermuten, dass die Ribosomen dabei beteiligt sind, einen Zugriff von dem Transkriptionsterminationsfaktor Rho auf die mRNA zu unterbinden. Dadurch wird ein vorzeitiger Transkriptionsab-

bruch verhindert. Beobachtung von Nonsense-Mutationen, welche eine vorzeitige Translationstermination bewirken und ein Ablösen der Ribosomen von der mRNA zur Folge haben, ergab, dass auch eine verminderte Transkription der Regionen stromabwärts der Mutationen vorliegt. Dieses Phänomen wird als Polarität bezeichnet (ADHYA and GOTTESMAN, 1978; PLATT and BEAR, 1983). Sollten die untranslatierten tRNA Transkripte auch dieser Polarität unterliegen, würden die Untereinheiten nicht zu gleichen Anteilen produziert werden.

Die *rrn* Operons sind jedoch vor einer vorzeitigen Transkriptionstermination geschützt, obwohl gezeigt werden konnte, dass ein Rho-abhängiger Terminator im 16S Gen vorhanden ist (MORGAN *et al.*, 1978; MORGAN und NOMURA, 1979). Es wurde beobachtet, dass transponable Elemente, die bei einer Insertion in translatierte Operons streng polar sind, in *rrn* Operons nur noch partiell polar sind. Es existiert in den ribosomalen Operons von *E. coli* offensichtlich ein Antiterminationsmechanismus der vorhandenen Transkriptionsterminatoren entgegen wirkt und dabei den Effekt der Polarität über eine Länge von 5.5 kb unterdrückt (FRIEDMAN und COURT, 1995; AKSOY *et al.*, 1984; HOLBEN *et al.*, 1985).

Von den in den *rrn* Operons homologen Sequenzen zur λ *nut* site (OLSON *et al.*, 1982) konnte gezeigt werden, dass sie Antitermination von rRNA *in vivo* unterstützen (LI, *et al.*, 1984). Diese Sequenzen treten etwa 10 Basenpaare stromabwärts der *rrn* P2 Promotoren auf und theoretisch kann jede Transkription von diesen Promotoren aus antiterminiert werden. Ein weiteres *nut* ähnliches Element tritt in der Spacer-Region zwischen den 16S und 23 S Genen auf (BERG *et al.*, 1989; MORGAN, 1986).

Die Elemente werden in zwei Untereinheiten, die bereits erwähnte *boxA* und *boxB* unterteilt, obwohl die Reihenfolge dieser Einheiten im λ Phagen vertauscht ist. (BERG *et al.*, 1989; LI *et al.*, 1984) Die *rrn boxA* ist eine konservierte Sequenz, UGCUCUUUAACA, während die *boxB* RNA eine Haarnadelschleifen-Struktur ohne eine erkennbare Sequenz-Konservierung aufweist. Die Bedeutung dieses *rrn boxA-boxB* Motivs wird durch das hohe Maß der Konservierung dieser Konfiguration in Leader- und Spacersequenzen der *rrn* Operons in den meisten Bakterien-Stämmen und in einigen Archaea unterstrichen. Deletions-Analysen der *rrn nut* Sequenzen von GOURSE *et al.* (1986) haben gezeigt, dass im Gegensatz zur *boxA* (und eventuell zur *boxC* – ein drittes konserviertes Element zwischen den *rrn* Operons und der *nut* site) die *boxB* für *rrn* Antitermination *in vivo* nicht zwingend erforderlich ist. Interessanterweise ist die *boxB* für die N-vermittelte Antitermination im λ -Phagen erforderlich, wohingegen hier die *boxA* verzichtbar erscheint (PATTERSON *et al.*, 1994; ZUBER *et al.*, 1987). Mit einem Testsystem zur Promotorfusion konnten BERG und Mitarbeiter (1989) die für die *rrn*-

Antitermination *in vivo* wichtigen Bereiche durch Mutagenese der *nut*-analogen Regionen präziser definieren. In Übereinstimmung mit den Befunden von GOURSE und Mitarbeiter wurde es durch eine Wildtyp *rrn boxA* ermöglicht, einen stark Rho-abhängigen Terminator zu überlesen. In *boxC* konnten keine Antiterminations-Mutationen isoliert werden. Im Gegensatz zu den Daten von GOURSE (1986) erniedrigten aber einige Mutationen in der *boxB*-RNA die *rrn* Antitermination in diesem System.

1.4.3 Die Nus-Proteine in der *rrn* Antitermination

Die erforderlichen Sequenzen für die *rrn* Antitermination läßt vermuten, dass dieses System einige Faktoren des λ Systems ebenfalls verwendet. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung unterbindet die Überproduktion der λ *nutL* Sequenz die rRNA Synthese *in vivo*, möglicherweise durch eine Verdünnung der für die *rrn* Antitermination benötigten Faktoren (SHARROCK *et al.*, 1985a).

Erste Versuche, die zeigten, dass einige der Nus Faktoren ganz spezifisch für die *rrn* Antitermination gebraucht würden, wurden auch von SHARROCK (1985b) durchgeführt. So fand innerhalb der *rrn* Operons in einer *nusB5* Mutante und einer Kälte-sensitiven *nusA* Mutante eine vorzeitige Termination statt. Eine weitere NusA Mutante, *nusA1* und die *nusE*-Mutante *nusE71* haben keinen Effekt auf die *rrn* Antitermination.

Da diese Mutationen auf der Basis von defizientem Lambda-Wachstum selektiert wurden, könnte die Allelspezifität der *nusA*-Mutante und möglicherweise auch der *nusE*-Mutante ein Indiz für die qualitativen Unterschiede zwischen der Antitermination in ribosomalen RNA Operons und im λ Phagen sein. Die teilweise Aufhebung der Effekte von *rrn boxA* Mutationen *in vivo* durch eine Überproduktion von NusB sind ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung dieses Proteins an der *rrn* Antitermination.

SQUIRES *et al.* (1993) konnten zeigen, dass eine Zugabe von NusB zu einem NusB-freiem Zellextrakt für die *rrn* Antitermination erforderlich ist. In den letzten Jahren konnte die Struktur in Lösung von NusB aufgeklärt werden (BERGLECHNER *et al.*, 1997; ALITERI *et al.*, 2000). In Ergänzung zu diesen Experimenten, die *boxA* RNA und NusB-Protein eine Schlüsselrolle in der *rrn* Antitermination zuweisen gibt es Fakten die auf eine mögliche Interaktion dieser beiden Komponenten hindeuten (FRIEDMAN, 1990; HORWITZ *et al.*, 1987). Durch Affinitätschromatographie konnte die biochemische Wechselwirkung zwischen NusB und NusE gezeigt

werden (MANSON und GREENBLATT, 1992). Dieses Heterodimer ist in der Lage an *rrn boxA* RNA zu binden, wobei es an die Mutanten der *boxA*, die nachweislich die *rrn* Antitermination *in vivo* stören, nicht bindet (BERG *et al.*, 1989). Darüber hinaus soll es auch nicht an die λ *boxA* binden. Wie NODWELL und GREENBLATT vermuten, könnte N als Stabilisator für die Wechselwirkung von NusB/NusE mit der λ *boxA* RNA fungieren (NODWELL und GREENBLATT, 1993). Die gleiche Gruppe hat auch Hinweise darauf gefunden, dass das ribosomale S1 Protein mit einer Sequenzspezifität an *boxA* RNA bindet und dabei die Bindung des NusB/E Heterodimers an die RNA verhindert. Somit kann S1 als möglicher Antiterminationsinhibitor wirken. Bisher konnte aber kein nachweisbarer Effekt auf die λ - oder *rrn*-Antitermination von S1 *in vitro* gezeigt werden.

Diverse erwiesene Wechselwirkungen zwischen der RNA Polymerase und den verschiedenen Komponenten des λ -Antiterminationskomplexes könnten auch eine Relevanz für die Antitermination in ribosomalen RNA Operons haben. NusA, NusE und auch NusG-Protein (MANSON und GREENBLATT, 1991) können an das Core-Enzym der Polymerase binden. Für NusA wird ein Austausch gegen den Sigma-Faktor angenommen, der kurz nach der Transkriptionsinitiation von der Polymerase abgespalten wird (GREENBLATT und LI, 1981a).

Sowohl NusA als auch NusG spielen eine wichtige Rolle bei den Transkriptionspausen, der Termination. Sie können somit auch in Bindung mit der RNA Polymerase an der nicht antiterminierten Transkription wesentlich beteiligt sein. Das 56 kDa-Protein NusA ist essentiell für *E. coli*, wie durch eine Reihe von Mutationen gezeigt werden konnte (CRAVEN *et al.*, 1991). Nur bei einer geringen Rho-Aktivität wird die Abwesenheit von NusA durch *E. coli* toleriert (ZHENG *et al.*, 1994). NusA kann an nascierende RNA in Transkriptionskomplexen binden (LIU und HANNA, 1995) und verlängert Pausen an natürlichen „Haltestellen“ der RNA-Polymerase. Es übt einen inhibitorischen Effekt auf die Kettenverlängerung der RNA aus. Dadurch wird eine stärkere Anbindung der Transkription an die Translation erreicht. Reines NusA bindet reversibel an das Core-Enzym der RNA-Polymerase, entweder als Dimer oder als Teil eines ternären Transkriptionskomplexes. Weiter bindet NusA an das N-Protein (GREENBLATT und LI, 1981b), das seinerseits den Stamm und die spezifischen Nucleotide im Loop der *boxB* RNA erkennt (COMAI *et al.*, 1992; LAZINSKI, *et al.*, 1989). Dieses Wechselwirkungs-Konglomerat von *boxB*, N Protein, NusA und RNA-Polymerase kann für eine eingeschränkte Antitermination im λ -System als für ausreichen (WHALEN *et al.*, 1988).

Im *E. coli*-Rohextrakt wurde eine Aktivität gefunden, die *in vitro*-Transkription im λ -N-System zusammen mit *boxA*-NusB/NusE-RNAP erheblich steigert (LI *et al.*, 1992), und die eine

Langstrecken-Antitermination über mehrere Kilobasen stromabwärts der *nut*-Sequenz erlaubt (DAS, 1992; DEVITO und DAS, 1994; MASON and GREENBLATT, 1994). Dieses Protein wurde gereinigt und als NusG bezeichnet (SULIVAN *et al.*, 1992; BUROVA *et al.*, 1995 a). Das 20,5 kDa schwere NusG fördert als Elongationsfaktor die Transkription, wobei es einen zu NusA gegenteiligen Effekt zeigt (BUROVA *et al.*, 1995 b; BURNS, 1998). Es zeigt unter anderem seine Bedeutung bei der Förderung der Rho-abhängigen Termination, wo es an die RNA-Polymerase bindet, während Rho als Hexamer die freie RNA komplexiert. Beide Wechselwirkungen von Rho und NusG verstärken sich zu einem stabilen und somit effektiveren Terminationskomplex (LI *et al.*, 1993; NEHRKE *et al.*, 1994). Eine Modellvorstellung ist, dass der Antiterminationskomplex Rho-Protein abkapselt und am Erreichen der Terminationsposition hindert. Eine weitere Vorstellung ist, dass durch die Bindung von Rho an NusG der ATPase abhängige Translokationsschritt inhibiert wird, der für die Antitermination wichtig ist. Dennoch ist NusG in einigen Fällen für die Rho abhängige Termination *in vivo* essentiell (BURNS und RICHARDSON, 1995; SULLIVAN und GOTTESMAN, 1992) und ermöglicht den Transkriptionsabbruch *in vitro* teilweise früher, als es Rho allein vermag (NEHRKE *et al.*, 1993).

Für eine maximale Stimulation der Antitermination durch einen S100 Zellextrakt *in vitro* ist die Zugabe von NusA, NusB, NusG und NusE erforderlich (SQUIRES *et al.*, 1993), in Übereinstimmung mit dem λ Phagen. Für *E. coli* sind aber noch zusätzlich unbekannte Faktoren für die *rrn* Antitermination von Bedeutung. Neben S1 Protein konnte gezeigt werden, dass möglicherweise weitere ribosomale Proteine wie S4 und L13 eine Rolle spielen könnten (TORRES, 2001). S1 konkurriert mit dem NusB/NusE Komplex um die *boxA* RNA, S4 bindet ähnlich NusA an die RNA Polymerase. Diese Proteine könnten analog zum N Protein des λ Phagen die Wechselwirkungen im Komplex stabilisieren, vergleichbar der NusB/NusE Wechselwirkung mit *boxA* RNA.

Eine Erklärung für den Mechanismus der Antitermination ist, dass durch die Bildung des Antiterminationskomplexes die Geschwindigkeit der Transkriptionselongation stark erhöht wird. Entweder durch erhöhte Affinität der RNA Polymerase für Nucleotide oder durch verringerten Zugriff von ppGpp auf die Polymerase. Dieser Effekt würde die kinetische Kopplung zwischen Rho und der Polymerase unterbrechen und zu einer Verringerung der Rho-abhängigen Termination führen (JIN *et al.*, 1992). RNA Polymerase *rpoB* Mutanten mit einer veränderten Affinität zu Nucleosidtriphosphaten haben *in vivo* Defekte bei Rho-abhängiger und Rho-unabhängiger Termination gezeigt. Ergänzend dazu haben VOGEL und JENSEN (1994, 1995)

dass die hohe Rate der Transkriptionselongation der rRNA Operons mit mehr als 80 Nucleotiden pro Sekunde (normal für mRNA sind 40 nt/s) der Antitermination zugeschrieben werden kann. Und NusG Protein kann die Elongationsrate sowohl *in vivo* als auch *in vitro* steigern (BUROVA *et al.*, 1995). Termination und Antitermination scheinen als eng mit der Elongationsgeschwindigkeit verknüpft zu sein.

Eine unkontrollierte Transkription durch die antiterminierte RNA-Polymerase in stromabwärts gelegene Genbereiche könnte für die Bakterienzelle schädlich sein. Das ist ein Grund dafür, dass Rho ein essentielles Protein für *E. coli* ist (DAS *et al.*, 1976). Untersuchungen mit den *rrn* Antiterminator und Tandemterminatoren auf Plasmiden ergaben, dass nicht alle RNA-Polymerase-Moleküle resistent gegen Termination werden. Ein Grund könnte die Überproduktion des Antiterminationssystems durch das Plasmid sein, wohingegen zelluläre Faktoren wie z.B. NusB limitierend werden. Die Polymerasen jedoch, die durch das Antiterminationssystem modifiziert wurden, behalten ihre Resistenz über mehrere Terminatoren hinweg bei (ALBRECHTSEN *et al.*, 1990). Das rRNA Antiterminationssystem ist gegen Rho abhängige Terminatoren gerichtet, aber die λ Antiterminationskomplexe sind gegen Rho-abhängige und Rho-unabhängige Terminatoren hochresistent (ADHYA und GOTTESMAN, 1978; GHOSH *et al.*, 1991). Die Anwesenheit eines starken rho-unabhängigen Terminators am Ende der *rrn* Operons kann dafür geeignet sein, um über die unterschiedliche Ausrichtung der antiterminierenden Wirkung, den *E. coli* Antiterminationskomplex zu stoppen.

1.5 Eukaryotische Regulation der Transkriptionstermination

Das *human immunodeficiency Virus* (HIV) ist das zur Zeit am besten verstandene Beispiel für eukaryotische Regulation der Transkriptionstermination. Es ist ein humanes Lentivirus, das zwei Möglichkeiten der Vermehrung besitzt. Zum einen kann es sich als Provirus in das Zellgenom integrieren und ist damit nur latent vorhanden. Andererseits kann es durch Aktivierung der Transkription vom latenten in den virulenten Zustand übergehen.

Eine zentrale Rolle bei Aktivierung des Provirus spielt das regulatorische *Transactivator*-Protein (Tat-Protein), das zwei Funktionen besitzt, nämlich an naszierende RNA zu binden und die Transkription zu aktivieren (CULLEN, 1990; SHARP *et al.*, 1989). Das Tat-Protein stimuliert die Transkription vom *Long-Terminal-Repeat* Promotor (LTR) aus, indem es durch den Regulationsmechanismus der Antitermination zu einer effizienten Elongation der mRNA

führt (LASPIA *et al.*, 1989). Wie das λ -N Protein ist Tat ein sequenzspezifisches, RNA-bindendes Protein (Abb. 1.4). Es bindet an das Transkript der *Trans-Activation-Response-Region* (TAR-Region), die nahe des 5'-Endes (LTR) von HIV lokalisiert ist. Für die Erkennung der TAR-RNA durch das Tat-Protein ist von besonderer Bedeutung, dass sich die TAR-RNA zu einer Haarnadelschleifen-Struktur faltet, die am oberen Ende des Stiels eine uridinreiche Ausbuchtung aufweist. Das Tat-Protein bindet über ein sog. *Arginine-Rich-Motive* (ARM), die sich in der Mitte des Proteins befindet und sechs Arginine umfaßt, spezifisch an diese Ausbuchtung (CALNAN *et al.*, 1991).

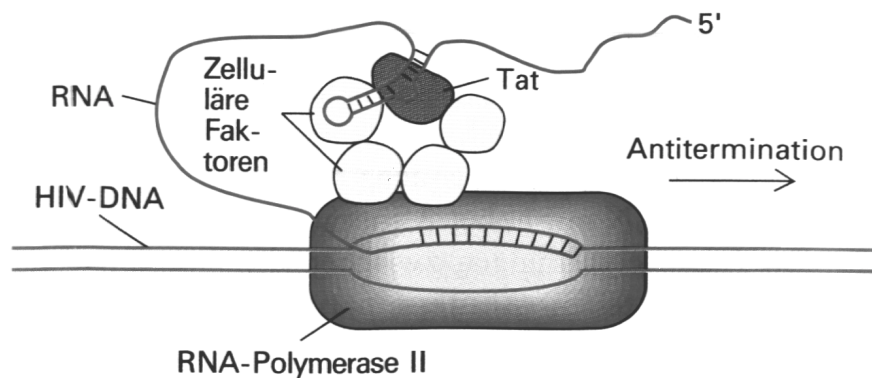


Abb. 1.4 Antitermination durch das Tat-Protein von HIV (GREENBLATT *et al.*, 1993).

Eine wichtige Rolle bei der zeitlichen Regulation der Expression viraler Gene spielt das Rev-Protein (*Regulator of expression of the virion*), ein 13 kDa-Phosphoprotein. Es ist unbedingt notwendig für die Replikation des HI-Virus (HOPE *et al.*, 1995) und besitzt eine sequenzspezifische RNA-Bindestelle, mit dem es an eine insgesamt ca. 240 Basen umfassende komplexe RNA-Sekundärstruktur bindet, die *Rev-Response-Element* (RRE) genannt wird. Die RNA-Bindestelle ist, wie entsprechend beim HIV-Tat- und λ -N- sowie den *E. coli* Nus-Proteinen, eine argininreiche Domäne (LAZINSKI *et al.*, 1989; CALNAN *et al.*, 1991).

Die beiden HIV Regulatorproteine Tat und Rev mit ihren entsprechenden RNA-Zielsequenzen TAR und RRE beruhen in ihrer Wirkung auf dem Prinzip der Antitermination und zeigen damit in gewisser Weise eine Remineszenz an die λ N-gestützte Antitermination zum Befall von *E. coli*, das durch den Bakteriophagen λ infiziert wird (HARADA *et al.*, 1996; CHENG *et al.*, 1991; KARN *et al.*, 1992). Das Phage λ /*E. coli* System kann als Modellsystem dienen, um die Regulationsprinzipien des HI-Virus besser zu verstehen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Unterdrückung des vorzeitigen Transkriptionsabbruchs durch Antiterminationsfaktoren wird in Bakterien, aber auch in humanpathogenen Viren für die Transkriptions-Regulation bestimmter Gene benutzt. Das Antiterminationssystem des Bakteriums *Escherichia coli* beruht auf Wechselwirkungen der Komponenten NusA, NusB, NusG, NusE, *boxA*- und *boxB*-RNA, RNA-Polymerase und möglicherweise weiteren Faktoren. Detaillierte Kenntnisse über den Mechanismus des Antiterminationsvorgangs in *rrn* Operons von *E. coli* existieren noch nicht. Zentrale Aspekte der Antitermination sind aber die verschiedenen Protein-Protein- und Protein-RNA-Wechselwirkungen, die für die Stabilisierung des Komplexes und seine Funktion verantwortlich sind.

Mögliche Wechselwirkungen diverser Antiterminationsproteine zu den RNA-Motiven *boxA* und *boxB* aus *E. coli* und λ werden mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie näher bestimmt und als Affinität quantifiziert. In diesem Zusammenhang soll vor allem die Beziehung zwischen der *boxA*-RNA der *rrn* Operons aus *E. coli* und dem Protein NusB bzw. dem Proteinkomplex NusB/NusE als ein Kernbereich des Antiterminationskomplexes näher untersucht werden. Unkomplexiertes NusB Protein weist mit seiner rein helikalen Sekundärstruktur eine deutlich andere Faltungstopologie auf, als sie von RNA-bindenden Proteinen bekannt ist. Neben dem klassischen Zugang zur Struktur von RNA-komplexiertem NusB Protein in Lösung durch NMR-Spektroskopie, sollte die Funktionalität der *boxA* RNA im Komplex mit NusB und NusB/NusE durch Affinitäts-Studien, basierend auf einer Kombination von NMR- und SPR-Experimenten, analysiert werden.

Für die NMR-Spektroskopie wird schwerisotopmarkiertes NusB-Protein verwendet. Um die RNA-Sequenz einer NMR-spektroskopischen Strukturanalytik zugänglich zu machen, sind auch entsprechende Isotop-Markierungen der RNA erforderlich. In diesem Zusammenhang wird dafür die stoffliche Voraussetzung geschaffen, um mit ^{15}N -markierten Ribonucleosiden definiert markierte Oligoribonucleotide synthetisieren zu können.

Neben NusB ist NusG Protein ein weiterer Faktor, der durch zahlreiche Wechselwirkungen in den Antiterminationskomplex integriert ist. Neben der Komplexbildung mit dem Transkriptionsterminations-Faktor Rho soll NusG direkt mit der RNA-Polymerase wechselwirken. Ein Zugang zur Lösungsstruktur des 21 kDa großen Proteins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie soll weitergehende Untersuchungen zum *rrn* Antiterminationskomplex ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklaven:	20 L Sanoklav (Wolf, Geislingen), VST 50/70 E (Zirbus, Bad Grund)
Blot-Apparatur:	Transblot SD (Biorad, München)
Brutschrank:	Thermoinkubator (Heraeus, Frankfurt am Main)
Elektroporator:	EQUIBIO EasyjecT Optima (PeQLab, Erlangen)
Fermenter	BioFlo 3000 BENCH-TOP Fermentor (New Brunswick Sci.)
Fluorometer	TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Gelelektrophorese	Elektrophoresekammer und Gelträger für PAGE Mighty Small
Acrylamidgel	II (Hoefer Scientific, San Francisco, USA)
Agarosegel	Kammer und Gelträger (Appligene, Heidelberg)
	Spannungsversorgung (Pharmacia, Freiburg)
Heizblock	TECHNE DRI - Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim)
HPLC	Analytisches System: Autosampler Model AS100 HPLC Auto- matik Sampling System (Biorad), Pumpe K1001, UV-Detektor K2600, Solvent Organizer K1500, Degasser, Interface-Box zu PC- System mit ChromGate 2.55 HPLC-Software (Knauer, Berlin) Präparatives System: Präparative Pumpe K-1800 mit 100 ml Pump- enkopf, UV-Detektor K-2501, Autosampler FoxyJn. Collector, Interface-Box mit PC-System und Knauer ChromGate 2.55 Steue- rungssoftware (Knauer, Berlin)
Küvetten	Hellma-Quarzküvetten QS 1 cm (Hellma, Müllheim in Baden)
Leuchttisch	für SDS-Gele (DESAGA GmbH, Heidelberg)
Lyophyllen	Alpha1-4 und Gamma1-20 (Christ, Osterode am Harz)
NMR-Spektrometer	Avance DRX 500 (Bruker GmbH, Karlsruhe)
pH-Meter	E 603, Standard-Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

Proteinreinigung	FPLC: Controller LCC-501 Plus, Fraktionssammler FRAC-100, optische und Kontroll-Einheit Monitor UV-1, Conductivity Monitor, Pumpen P-500, Mixer 0,6 ml, Gradientenventil PSV-50, Motor Valve MV-7 und Zweikanalschreiber REC 112, (Pharmacia, Freiburg) <i>GradiFrac</i> : Fraktionssammler und Steuereinheit, Monitor UV-1 optische Einheit, Monitor UV-1 Kontrolleinheit, Schlauchpumpe P-1, Mixer 0,6 ml, Gradientenventil PSV-50, Zweikanalschreiber REC 102
Proteinsequenzierung	Protein Sequenzer Modell 471 A (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Schüttelinkubator	PsycroTherm Controlled Environment Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick, USA)
Schütteltisch	IKA-Vibrax-VXR (Goeddecke, Ingolstadt)
Spektralphotometer	Novaspec II und Ultrospec Plus (Pharmacia, Freiburg)
Thermocycler	GeneAmp PCR-System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) MWG Thermocycler Primus (MWG, Ebersberg)
Ultrafiltration	Rührzellen 10 ml und 50 ml (Amicon, Witten a.d. Ruhr)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250 (Branson SONIC Power Company, Danbury, USA)
UV - Leuchttisch	312 nm (Bachhofer, Reutlingen)
Vakuumentrifuge	Roto-Vac3 (Biotech-Fischer, Reiskirchen)
Videodokumentation	Kamera: Kaiser RA1 und RS 1 BioPrint und Mitsubishi Video Copy Processor (Fröbel Labortechnik, Wasserburg)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge A14 (Jouan, Unterhaching), Tischkühlzentrifuge GS-15R mit den Rotoren F2402 und S4180 (Beckman, München), Kühlzentrifugen Sorvall Superspeed RC-2B und RC5B Plus mit den Rotoren GS3, GSA, SS34 und SE12 (Sorvall Inc., Newton, Connecticut, USA), Ultrazentrifuge Beckman Optima LE70 mit Rotoren 70 Ti, 70.1 Ti und SW27.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien:	Aldrich Chemie (Steinheim)
	Fluka Feinchemikalien (Neu-Ulm)
	E. Merk (Darmstadt)
	Novagen (Schwalbach)
	Carl Roth (Karlsruhe)
	Serva Feinbiochemika (Heidelberg)
	Sigma-Chemie (Deisenhofen)
Stabilisotope:	Promochem (Wesel)
Restriktionsendonucleasen	Gibco-BRL (Eggenstein)
und andere Enzyme	New England Biolab (Frankfurt am Main)
	Eurogentec (Belgien)
	Roche (Mannheim)
DNA-Molekulargewichtsmarker:	PeQLab (Erlangen)

DNA-Oligonucleotide für PCR (siehe Anhang A) wurden von den Firmen ThermoHyaid (Ulm) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

RNA-Oligonucleotide (Anhang B) mit diversen deoxy-Modifikationen, mit und ohne Biotinylierung für SPR und NMR wurden von der Firma Xeragon (Zürich, Schweiz) bezogen.

Für chromatographische Trennungen wurden folgende Materialien verwendet:

DOWEX 50W×8 (200-400 mesh, Kationenaustauscher, H⁺-Form, Serva, Heidelberg)

H⁺-Form: 500 g des Kationenaustauschers wurden zuerst mit 400 ml 2 M Natronlauge für 3 Stunden unter gelegentlichem Schütteln der Suspension behandelt und nach Absaugen der Flüssigkeit mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Anschließend wurde das Material in 400 ml 3 M HCl suspendiert. Während drei Stunden wurde die Suspension gelegentlich geschüttelt. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen und erneut in 400 ml 3 M HCl suspendiert. Nach dem wiederholten Neutralwaschen mit Wasser wurde der Kationenaustauscher verwendet.

NH_4^+ : 500 g DOWEX 50W×8 Kationenaustauscher in der H^+ -Form wurden in 400 ml 2 M Ammoniumformiat-Lösung über Nacht suspendiert und vor Gebrauch mehrmals abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen.

DOWEX-1 X-10 (200-400 mesh, Anionenaustauscher, Formiat-Form, Serva Heidelberg)

Das stark basische Anionenaustauscherharz Dowex 1 wurde durch mehrmaliges Aufschlänmen und Dekantieren mit Wasser von den feinsten Partikeln befreit und als wässrige Suspension in eine große Säule eingefüllt. Dort wurde es abwechselnd mit 2 M Salzsäure und 2 M Natronlauge gewaschen, bis keine gefärbten oder im UV absorbierenden Verunreinigungen mehr extrahiert wurden. Anschließend wusch man das Harz mit Wasser, bis das Eluat neutral war. Die Überführung der Chlorid-Form in die Formiat-Form erfolgte, indem mit 3 M Natriumformiat nachwusch, bis kein Chlorid mehr eluiert wurde und anschließend mit Wasser spülte. Dann wurde das 5 bis 10-fache des Säulenvolumens eines Gemisches von 6 M Ameisensäure und 1 M Natriumformiat durchgepumpt, dann mit mehreren Säulenvolumina 88%iger Ameisensäure und schließlich mit viel Wasser zur Neutralität nachgewaschen. Das Waschen mit konzentrierter Ameisensäure entfernte gefärbtes Material vom Harz und verringerte die UV-Absorption im Chromatogramm.

ECTEOA 23-Cellulose Servacel: Kondensationsprodukt aus Epichlorhydrin, Triethanolamin und Cellulose als Anionenaustauscher. 200 g des Materials mit einer Partikelgröße von 50-200 μm wurden in 1000 ml 0,5 M HCl suspendiert und während 2 Stunden gelegentlich geschüttelt. Der Ionenaustauscher wurde abgesaugt, mit Wasser neutral gewaschen und kurz in 0,5 M NaOH resuspendiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die sedimentierte Cellulose mit Triethylammoniumacetat-Puffer versetzt, filtriert und mit dem selben Puffer nachgewaschen. Nach Waschen mit 1000 ml Wasser wurde abgesaugt und der Feststoff im Startpuffer Triethylammoniumacetat aufgenommen. Die dünnflüssige Suspension wurde unter Pufferfluss in entsprechende Säulenkörper gefüllt.

HPLC: Reversed Phase Nucleosil 10C₁₈ (250 × 4,6 mm), YMC ODS AQ 120 Å, 250 × 4,6 mm, YMC ODS AQ, 120 Å, S-11 μm , 250 × 40 mm (YMC Europe, Schermbeck) sowie Anionenaustauscher NUCLEOGEL SAX 1000-8/46, 50 × 4,6 (Macherey-Nagel).

2.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf einen Liter.

<u>Lösung bzw. Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Bradford-Puffer	2,0 g Na ₂ HPO ₄ 0,6 g KH ₂ PO ₄ 7,0 g NaCl 0,2 g NaN ₃ Die Salze wurden in einem Liter entionisierten Wasser gelöst.
Bradford-Färbelösung	0,1 g Serva blue G in 100 ml 16 M H ₃ PO ₄ und 46,7 ml Ethanol gelöst, auf 1 l mit H ₂ O aufgefüllt, über Nacht gerührt, anschließend filtriert und bei 4°C gelagert
Ethidiumbromid-Lösung:	1 µg/ml
Probenpuffer für DNA-Gele:	50 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer
Saline:	0,9 % (w/v) NaCl in entionisiertem Wasser
STET-Puffer für Minipreps:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA-Na ₂ 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X-100
TAE-Puffer (50 x) für Agarosegelelektrophorese:	2 M Tris-Acetat, pH 8,2 0,1 M EDTA-Na ₂

TE-Puffer (10x):	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA-Na ₂ pH 8,0 mit HCl einstellen
TNE-Puffer (10x) für Fluorometrie:	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM EDTA-Na ₂ 1 M NaCl

Lösungen und Puffer für die Proteingelektrophorese (Glycin-System):

Alle Lösungen, die für das Gel verwendet werden, sind zu filtrieren und zu entgasen.

Acrylamid-Lösung (40/3) (T = 40 %; C = 3 %):	194 g Acrylamid 6 g <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid auf 500 ml Wasser
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Färbelösung:	2,5 g Coomassie-Blue R-250 454 ml Methanol 454 ml H ₂ O 92 ml Essigsäure
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat pH 8,3
Entfärber:	500 ml Methanol 100 ml Essigsäure 400 ml H ₂ O

Aufbewahrungslösung:	50 ml Methanol 75 ml Essigsäure 875 ml H ₂ O
Probenpuffer für SDS-Gele (3x):	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat 30 % (w/v) Glycerin 10 % (w/v) Saccharose 3 % (w/v) β-Mercaptoethanol 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer (2x):	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
Trenngel-Puffer (4x):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat
<u>Lösungen und Puffer für Western-Blotting:</u>	
Transfer-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 15 % (v/v) Methanol pH von 8,2 bis 8,4
Wasch-Puffer(20x):	0,4 M Tris-HCl, pH 7,4 3 M NaCl 1 % (v/v) Tween 20
Substratpuffer für alkalische Phosphatase:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM Magnesiumchlorid autoklavieren und steril aufbewahren

Stopplösung:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 25 mM EDTA-Na ₂
NBT-Lösung:	100 mg Nitroblautetrazoliumchlorid in 1 ml 70 % Dimethylformamid lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren
BCIP-Lösung:	50 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 1 ml 25 % Dimethylsulfoxid lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren

2.4 Kulturmedien

Die einzelnen Bestandteile beziehen sich jeweils auf einen Liter. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar (20 g/l) zugesetzt. Pro Liter Medium wurden 150 mg Ampicillin oder 15 mg Kanamycinsulfat eingesetzt.

<u>Luria-Bertani Medium (LB):</u>	10 g Caseinhydrolysat (1 % w/v) 5 g Hefeextrakt (0,5 % w/v) 5 g NaCl (0,5 % w/v) auf 1 l Wasser
-----------------------------------	--

<u>LB-Medium/Glycerin:</u>	10 g Caseinhydrolysat (2 % w/v) 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 500 ml Glycerin auf 1 l Wasser
----------------------------	---

<u>SOC-Medium:</u>	20 g Caseinhydrolysat (2 % w/v)
	5 g Hefeextrakt (0,5 % w/v)
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

Die Bestandteile wurden in entionisiertem Wasser gelöst und bei 121 °C und 1,2-1,5 bar Überdruck 20 Minuten autoklaviert.

<u>M9- Salzkonzentrat (10x):</u>	120 g Na ₂ HPO ₄
	30 g KH ₂ PO ₄
	5 g NaCl
	Mit KOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

<u>Spurenelement-Konzentrat (1000x):</u>	50 g EDTA, freie Säure
	8,5 g FeSO ₄ · 7H ₂ O
	13,5 g MnCl ₂ · 4H ₂ O
	0,9 g ZnSO ₄ · 7H ₂ O
	0,2 g CuCl ₂ · 2H ₂ O
	0,2 g NiCl ₂ · 6H ₂ O
	0,1 g CoCl ₂ · 6H ₂ O
	0,1 g H ₃ BO ₃
	auf 1 l Wasser, mit 50%iger NaOH auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren

<u>Vitamin-Konzentrat (250x):</u>	20 mg Pyridoxamin-Hydrochlorid
	40 mg Thiamin-Hydrochlorid
	20 mg Riboflavin
	20 mg <i>p</i> -Aminobenzoessäure
	20 mg Calcium-Pantothentat

5 mg Biotin
10 mg Folsäure
15 mg Nicotinsäureamid
100 mg Cyanocobalamin
(1:1000 Mannit-Verreibung)
auf 1 l Wasser, unter Erwärmen lösen,
sterilfiltrieren,
aliquotiert bei - 20 °C lagern

M9-Minimalmedium für Fermenter:

- 100 ml M9-Salzkonzentrat (10x)
- 2 ml MgSO₄ (1 M)
- 2 ml CaCl₂ (25 mM)
- 1 ml Spurenelement-Konzentrat (1000x)
- 4 ml Vitamin-Konzentrat (250x)
- 5 ml NH₄Cl-Lösung (10 %)
- 4 ml Glucoselösung (50%)

Die M9-Salzlösung wird zu 900 ml entionisiertem Wasser gegeben und autoklaviert. Dann werden die jeweils getrennt autoklavierten oder sterilfiltrierten Komponenten hinzupipettiert.

Fedbatch-Nährlösung:

- 500 g Glucose
- 100 g NH₄Cl
- 1 g MgSO₄ 7H₂O

M9-Minimalmedium für markierte Anzucht: Die Vorgehensweise war dieselbe wie bei unmarkiertem M9-Minimalmedium; das Ammoniumchlorid wurde durch 2 g ¹⁵NH₄Cl ersetzt, das in 20 ml Wasser gelöst, separat autoklaviert und dem Medium beigegeben wurde.

2.5 Mikroorganismen

2.5.1 Stämme und Plasmide

Für molekularbiologische Arbeiten wurden Derivate des Stammes *Escherichia coli* K-12 verwendet (Tabelle 2.1).

Wirtsstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, nsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene (BULLOCK, 1987)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F' <i>omp gal dmc lon hsdS_B (r_B m_B) λDE3::T7-Pol</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pRep4]	F' <i>omp gal dmc lon hsdS_B (r_B m_B) λDE3::T7-Pol</i> , [pREP4: <i>lacI, kana^r</i>]	diese Arbeit
<i>E. coli</i> M15	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺</i> , [pREP4: <i>lacI, kana^r</i>]	(STÜBER, 1990)

Tab. 2.1 Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pNCO113	Expressionsvektor	(STÜBER, 1990)
pRep4	Repressorplasmid	(STÜBER, 1990)
pNCO113- <i>nusA</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> NusA	MÜHLBERGER, 1998
pNCO113- <i>nusB</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> NusB	(BERGLECHNER, 1997)
pNCO113- <i>nusG</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> NusG	MÜHLBERGER, 1998
pNCO113- <i>rho</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> Rho	diese Arbeit
pNCO113 <i>nusA349</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> NusA NTD	diese Arbeit
pNCO113 <i>nusA350</i>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> NusA CTD	diese Arbeit

Tab. 2.2 Übersicht von eingesetzten Expressionsvektoren.

Für diese Arbeit stand chromosomale DNA von *E. coli* Stamm RR28 zur Verfügung.

Stamm	Genotyp	Herkunft oder Referenz
RR28	F-, <i>thi, pro, lac, gal, ara, mtl, xyl, supE44, endA, hsd (r⁻, m⁻), pheS, recA</i>	(HENNECKE <i>et al.</i> , 1982; RICHTER, 1995)

Tab. 2.3 Chromosomale DNA von *E. coli* RR28

2.5.2 Bakterienanzucht

Zur Anzucht auf Agarplatten wurden die Zellen entweder als Zellsuspensionen ausplattiert oder mit der Impföse von einer anderen Platte übertragen. Anschließend wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet. Durch Verdünnung der Suspension oder Verdünnungsausstrich ergaben sich Einzelkolonien. Flüssigkulturen bis 5 ml wurden im Reagenzglas, bei größeren Volumina im Erlenmeyerkolben (100 ml - 2 l) über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Die größeren Kulturen wurden mit Übernachtskulturen im Verhältnis 1:30 bis 1:50 beimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen steriles Medium bzw. Wasser verfolgt. Die Ernte der Kulturen erfolgte mit Kühlzentrifugen bei 4 °C und 5000 g während 15 Minuten.

2.5.3 Stammhaltung

Bakterienkulturen auf Agarplatten wurden nach dem Bebrüten über Nacht bei 4 °C gelagert. Alle vier Wochen wurden sie auf frisches Medium überimpft. Die Kulturen wurden dabei durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums unter ständigem Selektionsdruck gehalten.

Die Langzeitlagerung erfolgte als Glycerin-Kultur in flüssigem Stickstoff. 5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml einer autoklavierten Mischung von LB-Medium mit 40 % Glycerin resuspendiert, in sterile Kryotubes abgefüllt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor der Verwendung wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Plasmidisolierung

2.6.1.1 Schnellisolierung durch Hitzeschock

Diese Methode (HOLMES und QUIGLEY, 1981) wurde bevorzugt herangezogen, um frisch transformierte Bakterienzellen auf das Vorhandensein des Plasmids zu überprüfen. Die isolierte DNA

kann für Transformationen sowie zur Identifizierung des Plasmids, für Restriktionsanalysen und Gelelektrophoresen eingesetzt werden.

Transformierte Zellen wurden auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bebrütet. Eine Spatelspitze dieser Kultur wurde von der Platte abgenommen und in 300 µl STET-Puffer suspendiert. 10 µl frisch bereitete Lysozymlösung (10 mg/ml) wurden zugegeben, 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 90 Sekunden im Wasserbad gekocht. Zelltrümmer und Proteine wurden 15 Minuten lang in der Eppendorf-Zentrifuge (14.000 UpM) abzentrifugiert und der Überstand in ein anderes Reaktionsgefäß dekantiert. Um die DNA zu fällen, wurde der Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14.000 UpM. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und für 20 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.6.1.2 Plasmidisolierung mittels CyclePure-Kit

Die Isolation von Plasmiden aus Bakterienzellen wurde mit den E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kits I und II der Firma PeQLab (Erlangen) durchgeführt. Die beiden Kits unterscheiden sich in der Menge isolierter DNA. Die HiBind-Säulchen aus Kit I liefern aus 5 ml Übernachtskultur in der Regel 15 bis 25 µg Plasmid. Kit II ergibt aus 15 ml Kultur 40 bis 75 µg DNA. Die Isolation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

2.6.2.1 Photometrie

Diese Methode ist geeignet, um die Konzentration von Oligonucleotiden zu messen. Die starke UV-Absorption der Purine und Pyrimidine bei Wellenlängen von 250 bis 280 nm wird zur Konzentrationsbestimmung mit dem UV-Photometer ausgenutzt. Bei 260 nm wurde die Extinktion einer DNA- oder RNA-Lösung gegen den Nullwert von Wasser gemessen. Für eine

Berechnung der Konzentration ist die Kenntnis des Extinktionskoeffizienten nötig, der sich bei bekannter Sequenz für einzelsträngige DNA wie folgt abschätzen lässt (HANAHAN, 1985):

$$\epsilon_{260} = (A \cdot 15200) + (G \cdot 12012) + (C \cdot 7050) + (T \cdot 8400) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

A, G, C und T geben die Anzahl der entsprechenden Nucleotide in der Sequenz an; als Einheit für den Extinktionskoeffizienten ergibt sich [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]. Für RNA-Oligonucleotide wurde folgende Abschätzung verwendet:

$$\epsilon_{260} = (A \cdot 15300) + (G \cdot 11700) + (C \cdot 7400) + (U \cdot 9900) \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

2.6.2.2 Fluorometrie

Zur Bestimmung geringer Mengen DNA bietet sich eine fluorometrische Messung an. Hierbei wird die Lichtemission aus dem Farbstoff 2-(4-Hydroxyphenyl)-5'-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bisbenzimidazol (Hoechst 33258) in Gegenwart von DNA ausgenutzt. Die Komplexe werden bei 365 nm, ihrem Absorptionsmaximum angeregt. Bei 460 nm wird das emittierte Fluoreszenzlicht detektiert (Emissionsmaximum bei 458 nm). Proteine und RNA stören die Bestimmung nicht, während Ethidiumbromid zu einer Löschung der Fluoreszenz führt.

Für die Messung wurde der Nullpunkt des Fluorometers mit 2 ml TNE-Puffer, der 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Bisbenzimidazol enthält, eingestellt. Eine Eichung des Gerätes mit 2 μl Standard-DNA ist vor jeder Messreihe nötig. Bevor 2 μl der zu bestimmenden DNA-Lösung in 2 ml TNE-Puffer mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid gegeben werden, überprüft man mit der Pufferlösung erneut den Nullpunkt.

2.6.3 Reinigung von DNA

Um DNA-Fragmente nach enzymatischen Reaktionen, wie PCR-Ansätzen, Restriktions- oder Ligationsreaktionen zu reinigen, wurde mit dem CyclePure Kit der Firma PeQLab (Erlangen) gearbeitet. Für die Reinigung wurde zunächst das fünffache Volumen CP-Bindungspuffer zu dem Ansatz gegeben. Diese Lösung wurde auf HiBind Säulchen gegeben und für eine Minute mit der Tischzentrifuge bei 14.000 UpM in ein 1,5 ml-Auffanggefäß zentrifugiert und der

Durchlauf verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Waschpuffer beladen, der bei 14.000 UpM durchzentrifugiert wurde. Nach dem Entleeren des Auffanggefäßes wurde nochmals zentrifugiert, um letzte Reste des Puffers zu entfernen, und dann ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß unter die Säule gegeben. Anschließend wurden je nach erwarteter DNA-Menge 30-50 µl bidestilliertes Wasser auf die Säule aufgetragen, 5 Minuten inkubiert und die DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM eluiert.

Um DNA-Lösungen aufzukonzentrieren wurde die DNA gefällt. Dazu wurde das dreifache Volumen der Lösung an Ethanol und 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,5) zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und in der Tischkühlzentrifuge 30 Minuten bei 14.000 UpM und 20 °C zentrifugiert. Die DNA fiel während der Zentrifugation aus und sedimentierte. Das Pellet wurde kurz mit eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und dann in wenig bidestilliertem Wasser aufgenommen.

2.6.4 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten, Bestimmung ihrer Größe, Mengenabschätzung oder Reinheitsüberprüfung, auch von Plasmidpräparationen, dient die Agarosegelelektrophorese. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegt sich die DNA im elektrischen Feld auf die Anode zu, wobei kleinere Moleküle schneller wandern als größere. Eine Bestimmung der Fragmentgröße wird durch die Verwendung eines Standards (DNA-Molekulargewichtsstandard, PeQLab Biotechnologie GmbH) möglich.

Der Molekulargewichtsmarker zeigt folgende Fragmente in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

Zur Herstellung des Gels wurde die auf eine Endkonzentration von 0,8-2,0% eingewogene Agarose in TAE-Puffer unter Rühren gekocht, bis eine klare, schlierenfreie Lösung entstanden war. Nach Abkühlung auf etwa 60 °C wurde die Agarose-Lösung in einen vorbereiteten, mit einem Kamm versehenen Gelträger gegossen. Nach 20 Minuten war die Lösung zum Gel verfestigt. Der Gelträger wurde in die Elektrophorese-Kammer plaziert und mit TAE-Puffer überschichtet.

Die DNA-Proben wurden inzwischen vorbereitet, indem sie mit 10 Vol.% Probenpuffer vermischt wurden, der das Befüllen der Geltaschen erleichtert. Nach Entfernen des Kammes konnten DNA-Proben von 5-20 µl Auftragsvolumen in die Geltaschen pipettiert werden. Die angelegte

Spannung lag zwischen 80 und 120 Volt. Bei 100 V Spannung und vollständiger Ausnutzung der Trennstrecke von ca. 10 cm erfordert die Elektrophorese ca. 90 Minuten. Die im Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol machen den Fortschritt der Elektrophorese sichtbar. Das Gel wurde 20 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung mit der Konzentration 1 µg/ml unter Lichtausschluß gefärbt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Ethidiumbromid geht eine Interkalationsverbindung mit DNA ein, deren Fluoreszenz es ermöglicht, die Banden im UV-Licht zu detektieren.

2.6.5 Kompetente Zellen und Transformation

Beim Elektroporationsverfahren (DOWER *et al.*, 1988) wurden Zellen zunächst kompetent gemacht, dann aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für eine Transformation wurde ein Aliquot entnommen und langsam auf Eis aufgetaut. Die Zellen dürfen nicht wärmer als 4 °C werden, um Einbußen bei der Transformationsrate zu vermeiden. Alle hierfür benötigten Puffer wurden vorgekühlt oder auf Eis gelagert.

2.6.5.1 Elektrokompente Zellen

1 l Medium wurde mit 50 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bebrütet. Sobald die optische Dichte (600 nm) einen Wert von 0,5-0,7 erreicht hatte, was der mittleren logarithmischen Wachstumsphase entspricht, wurde sie für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Kultur in eisgekühlte, sterile GS3-Zentrifugenbecher gefüllt und im auf 4 °C gekühlten Rotor GS3 bei 4.000 UpM 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert und das Pellet in 1 Liter 10 %igem eiskalten, sterilen Glycerin resuspendiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei das Pellet das erste Mal in 500 ml, das zweite Mal in 20 ml 10 %igem, eiskalten, sterilen Glycerin resuspendiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in einem endgültigen Volumen von 2 ml 10%igem eiskalten, sterilen Glycerin suspendiert. Die Zellenkonzentration sollte $1-3 \times 10^{10}$ Zellen/ml betragen. Die Suspension wurde zu 50 oder 100 µl in sterile Kryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Transformationsrate betrug ca. 3×10^7 Transformanten/µg DNA.

2.6.5.2 Elektrotransformation

Für die Elektrotransformation wurde ein Elektroporator der Firma PeQLab, Erlangen verwendet, dessen Parameter auf folgenden Bedingungen eingestellt waren:

Kapazität:	15 μ F
Widerstand:	335 Ω
Spannung:	2,5 kV bei Küvetten mit 2 mm Spaltbreite 1,8 kV bei Küvetten mit 1 mm Spaltbreite

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut; die Elektroporationsküvette wurde auf Eis vorgekühlt. 40 μ l der Zellsuspension wurden mit 10 pg - 100 ng Plasmid-DNA vermischt, wobei das zugefügte Volumen 2 μ l nicht überstieg. Dann wurde die Mischung aus kompetenten Zellen und DNA in die Elektroporationsküvette überführt, durch Schütteln der Suspension auf den Küvettenboden gebracht und die Küvette samt dem Küvettenhalter so in die Elektroporationskammer eingeschoben, dass Kontakt zu den Elektroden bestand. Anschließend wurde die Entladung des Kondensators mit den oben genannten Parametern ausgelöst. Die Zellen wurden aus der Küvette sofort in 1 ml SOC-Medium suspendiert. Zur phänotypischen Expression wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf selektivem Medium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde eingesetzt, um bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* exponentiell zu amplifizieren. Die doppelsträngige DNA wurde zunächst thermisch 5 Minuten bei 94 °C denaturiert. An die nunmehr einzelsträngige DNA lagern sich synthetische Oligonucleotide von 20-35 Basen an die Stelle des DNA-Stranges an, die zu ihrer eigenen Sequenz komplementär ist. Dies wird als Primer-Annealing bezeichnet und erfolgt in Abhängigkeit von der Sequenz und Länge des Primers bei einer Temperatur von 45-55 °C.

Eine DNA-Polymerase synthetisiert, ausgehend von dem kurzen Primer-Matrizen-Hybrid, den komplementären Strang. Thermostabile DNA-Polymerasen erlauben es, diese Temperaturabfolge mehrfach zu wiederholen, da sie den Denaturierungsschritt bei 95 °C ohne Aktivitäts-

verlust überstehen. Die optimale Arbeitstemperatur der hier verwendeten DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* liegt bei 72 °C. Die Dauer des Polymerisationsschrittes richtet sich nach der Länge des Amplifikates; für 1.000 Nucleotide wird ca. 1 Minute benötigt.

Durch mehrmaliges Durchlaufen des PCR-Zyklus - Denaturieren, Primer-Annealing, Polymerisation - ist eine Amplifikation der gewünschten Zielsequenz möglich, die durch die Auswahl der Primer bestimmt wird. Abschließend werden durch eine einmalige achtminütige Inkubation bei 72 °C eventuell noch unvollständige Amplifikate durch die Polymerase vervollständigt. Falls Primer zum Einsatz kamen, die nur zum Teil komplementär zu ihrer Zielsequenz waren und Veränderungen einbrachten oder ein Stück DNA anfügen sollten, wurde die Annealing-Temperatur herabgesetzt. Ein typischer PCR-Reaktionsansatz enthielt:

10 µl	Reaction-Puffer (10fach-Konzentrat, incl. MgCl ₂)
4 µl	dNTPs Promega (40 µmol)
5 µl	je Primer (10 pmol)
1 µl	DNA-Templat
1 µl	Taq DNA Polymerase,
auf 100 µl	bidest. Wasser

Folgendes Programmschema wurde verwendet:

<u>Funktion</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	
Aufschmelzen der DNA	94° C	240 s	
Primer-Annealing	45-55 °C	30 s	30
Primer-Verlängerung	72° C	60 s	Zyklen
Komplementierung	72° C	8 min	

Nach der Reaktion wurden die Ansätze, wenn das erhaltene Fragment in enzymatische Reaktionen eingesetzt werden sollte, mit CyclePure-Kit (PeQLab, Erding) gereinigt (siehe 2.6.3). Diente die PCR rein analytischen Zwecken, so wurde der Ansatz direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

Touch-Down-PCR

Um bei Problemen mit dem Primer-Annealing die richtige Temperatur eingrenzen zu können, wurde eine sog. Touch-Down-PCR durchgeführt. Dabei wurde von ca. 60°C ausgehend die Annealing-Temperatur in Schritten von 2-3°C nach jedem dritten Zyklus abgesenkt. Nach vier bis fünf Abstufungen wurden bei ca. 48-50°C 25 Zyklen angefügt und abschließen für 8 Minuten bei 72°C die Synthese komplettiert.

PCR-Screening

Um Klone auf eine bestimmte Zielsequenz zu untersuchen, ohne DNA isolieren zu müssen, wurden ganze Zellen in die Reaktion eingesetzt, indem sie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und im vorbereiteten PCR-Reaktionsgemisch suspendiert wurden. Dem 25fachen Wiederholen des Temperaturzyklus wurde in diesem Falle eine einmalige, fünfminütige Inkubation der Ansätze bei 95 °C vorgeschaltet, um die Zellen aufzuschließen und die DNA so für die Reaktion verfügbar zu machen. Das Reaktionsvolumen war 20 µl. Nach der Reaktion wurde der komplette Ansatz mit 2 µl Probenpuffer versetzt und je 10 µl davon auf einem Agarosegel analysiert. Plasmide konnten so auf das Vorhandensein eines Inserts getestet werden.

2.6.7 Restriktion und Ligation

2.6.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Es wurden Restriktionsendonucleasen (Tabelle 2.4) mit den mitgelieferten Inkubationspuffern der Firmen Gibco-BRL und New England Biolabs (Frankfurt a. Main) verwendet. Für einen analytischen DNA-Verdau wurden typischerweise 100-300 ng DNA in 5 µl Lösung, 2 µl Puffer (10x) und 2 U Restriktionsendonuclease eingesetzt. Mit Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde bei 37 °C. Die präparativen Ansätze wurden mit 1 µg DNA, 10 Vol.% Puffer (10x) und 10 U Restriktionsendonuclease über 3 Stunden durchgeführt. Der Gesamtansatz betrug 100 µl. Restriktionen mit zwei Enzymen, die den gleichen Puffer tolerieren, wurden gleichzeitig durchgeführt.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Bam</i> HI	5'-G GATCC-3'	REact 3 Gibco
<i>Eco</i> RI	5'-G AATTC-3'	REact 3 Gibco
<i>Hind</i> III	5'-A AGCTT-3'	REact 2 Gibco
<i>Mfe</i> I	5'-C AATTG-3'	NEB 4
<i>Nco</i> I	5'-C CATGG-3'	NEB 4
<i>Pst</i> I	5'-CTGCA G-3'	REact 2 Gibco
<i>Xho</i> I	5'-C TCGAG-3'	NEB 2

Tab. 2.4 Verwendete Restriktionsenzyme mit ihren Erkennungssequenzen und Puffern.

2.6.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationen wurden mit dem „Rapid DNA“-Ligationskit der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. DNA-Ligase aus dem *Bacteriophagen T4* katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle. Es werden sowohl überhängende als auch stumpfe Enden miteinander verbunden. Intermolekulare und intramolekulare Reaktionen sind gleichermaßen möglich. Die zu ligierenden DNA-Fragmente Vektor und Insert wurden im molekularen Verhältnis von 1:3 in die Ligation eingesetzt.

Ein typischer Ligationsansatz enthielt:

- 1-2 µl Vektor, entsprechend 50 ng DNA
- 1-2µl Insert, entsprechend 150 ng DNA
- auf 8µl bidest. Wasser
- 2 µl Puffer 2 (DNA Dilutions-Puffer)
- 10 µl Puffer 1 (T4 DNA Ligations-Puffer)
- 1 µl Ligase (5 U/µl)

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 bis 20 Minuten inkubiert.

2.7 Anzucht

2.7.1 Fermentation in Vollmedium in Schüttelkolbenkultur

Die rekombinanten Stämme wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert bis zu einer Absorption der Zellsuspension von 0,8 bei 600 nm. Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosid wurde in wässriger Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die Kulturen wurden weitere fünf Stunden bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation (Rotor GS 3, 5.000 UpM, 4 °C 20 min) geerntet. Zur Abtrennung von Medienresten wurden die Kulturen in Saline (NaCl 0,9 %) suspendiert und erneut abzentrifugiert. Die möglichst trockenen Pellets wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Fermentation in Minimalmedium im BIOFLO3000

Die Gewinnung größerer Zellmengen erfolgte durch Fermentation im 1 l oder 2 l Fermenter in Minimalmedium. Der Fermenter wurde mit dem M9 Phosphatkonzentrat und Wasser (1:10) autoklaviert. Die jeweils getrennt sterilisierten Bestandteile des Minimalmediums wurden eingefüllt und im Verhältnis 1:50 mit Übernachtskultur angeimpft. Der pH des Mediums wurde während der Fermentation auf 6,9 mit 5 M NaOH-Lösung reguliert. Zu Beginn der Fermentation erfolgte keine zusätzliche Fütterung von Glucose. Nach Verbrauch der durch die Starterlösung zugeführten Glucose (absinken der O₂-Sättigung im Medium) wurde rechnergesteuert die Fütterlösung entweder in exponentiell ansteigender Weise oder feedback-gesteuert in Form einer Pulsfütterung (Kapitel 3.5.1) zugeführt. Typischer Weise wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 10 mit 5 mM IPTG induziert und nach Beendigung der Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor bei 4°C, 4000 UpM geerntet und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die so erhaltenen Zellen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.3 Fermentation in deuteriertem Minimalmedium im BIOFLO3000

Die Gewinnung teildeuterierter Zellmasse (ca. 75 % ^2H) erfolgte durch Fermentation im 1,5 l Fermenter in deuteriertem Minimalmedium mit protonierter Glucose und Ammoniumchlorid. Der Fermenter wurde leer autoklaviert. Alle Komponenten des Mediums bis auf die Vitamine und die Spurenelemente wurden in D_2O aufgenommen und zum Medium gegeben. 1000 ml sterilfiltriertes Minimalmedium wurde eingefüllt und mit Zellen einer LB-Übernachtskultur (in H_2O) im Verhältnis 1:50 angeimpft. Der pH des Mediums wurde während der Fermentation auf 6,9 mit ca. 5 M NaOH-Lösung reguliert. Da die C- und N-Quellen keine Teildeuterierung aufwiesen, wurde dem durch einen höheren D_2O -Anteil am Medium Rechnung getragen. Nach Erreichen einer OD von ca. 4 wurde mit 2,5 mM IPTG induziert und nach Beendigung der Wachstumsphase geerntet.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor bei 4°C , 4000 Upm geerntet und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die so erhaltenen Zellen wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8 Proteinchemische Methoden

2.8.1 Expressionstest

Durch Beimpfen von 1 ml LB-Medium mit Klonen transformierter Zellen stellte man eine Vorkultur her, die man über Nacht bei 37°C wachsen ließ. Alle Medien wurden dabei mit den entsprechenden Antibiotika versehen: *E. coli* XL1-Blue mit Ampicillin, *E. coli* M15 zusätzlich mit Kanamycin. Am folgenden Tag impfte man zweimal 1,25 ml LB-Medium mit jeweils 25 μl dieser Vorkultur an und ließ 3 Stunden aufwachsen. Zu einem der beiden Reagenzgläser wurden 25 μl 100 mM IPTG-Lösung gegeben, so dass dessen Endkonzentration 2 mM IPTG betrug. Dann ließ man beide Kulturen weitere 5 Stunden bei 37°C wachsen. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 UpM und 20°C geerntet und mit 0,9% Saline gewaschen. Die Zellen wurden in 150 μl SDS-Probenpuffer suspendiert und für 5 Minuten im Heizblock bei 100°C gekocht. Noch unlösliche Bestandteile wurden durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Diese

Art des Zellaufschlusses erfaßt das gesamte Zellprotein, das durch Natriumdodecylsulfat in der Hitze solubilisiert wird; es ist keine Differenzierung in einen löslichen und unlöslichen Proteinanteil möglich.

2.8.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteingemische wurden durch Gelelektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (LÄMMLI, 1970). Es wurde ein diskontinuierliches System, bestehend aus Trenn- und Sammelgel, in Kammern Mighty Small II der Firma Hoefer Scientific (San Francisco, USA) verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Kammer gegossen. Ein 15 %iges Trenngel setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

3,75 ml	Acrylamidlösung (40 %)
2,5 ml	Trenngelpuffer
3,75 ml	H ₂ O
75 µl	10 %ige (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung
5 µl	TEMED

Nach halbstündiger Polymerisation wurde darauf das dreiprozentige Sammelgel aufgebracht, das aus folgenden Komponenten besteht:

0,5 ml	Acrylamidlösung (40 %)
2,5 ml	Sammelgelpuffer
2 ml	H ₂ O
50 µl	10 %ige (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung
5 µl	TEMED

Nach weiteren 30 Minuten war das Gel auspolymerisiert, die Proben konnten aufgetragen werden.

Etwa 15 µl der Proteinproben wurden mit 1 mg SDS und 5 µl Mercaptoethanol versetzt und fünf Minuten lang gekocht, um die Proteine vollständig zu denaturieren und mit Ladungsanteilen ihrer Masse entsprechend zu versehen. Anschließend wurden sie mit etwa 1 mg Saccharose und 5 µl Bromphenolblau versetzt. Dadurch wurden die Proben beschwert, was den Auftrag erleichtert und angefärbt, um den Fortschritt der Elektrophorese sichtbar zu machen.

Bei konstanter Stromstärke von 20 mA/Gel, dauerte ein Lauf etwa eine Stunde. Die Gele wurden in Coomassie-Färbelösung mindestens 30 Minuten gefärbt und danach in Entfärbelösung 60 Minuten entfärbt und in Aufbewahrungslösung überführt.

Für Proteingelelektrophoresen am Phast-System von Pharmacia wurden Fertig-Gele und Pufferstreifen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Färbung der Proben nach dem Lauf erfolgte im Gerät. Aufgrund der größeren Empfindlichkeit wurde mit Silbernitratlösung gefärbt.

Als Marker wurde Proteine folgender Größen verwendet: 66 kDa, 44 kDa, 36kDa, 29 kDa, 24kDa, 20 kDa, 14kDa.

2.8.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinmengen wurde in einer modifizierten Form nach READ und NORTHCOTE (1981) durchgeführt. 950 µl Bradford-Färbelösung wurden mit 40 µl Bradford-Puffer und 10 µl Rohextrakt für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Am Photometer wurde bei 595 nm (Coomassieblau) die Extinktionsänderung gegen einen Leerwert, der 950 µl Färbelösung und 50 µl Puffer enthält, gemessen. Die Eichkurve wurde mit einer Lösung von Rinderserumalbumin in Bradford-Puffer hergestellt.

Protein (<i>E. coli</i>)	E (280 nm) bei 1mg/ml
NusA	0,56
NusA NTD	0,57
NusA CTD	0,53
NusB	0,98
NusG	0,75
Rho	0,31

Tab. 2.5 Abschätzungen der Extinktion von Proteinlösungen bei einem Gehalt von 1 mg/ml.

Die Konzentration gereinigter Proteinlösungen wurde anhand der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion der Proteinlösung für eine Konzentration von 1 mg Protein pro Milliliter und eine Wellenlänge von 280 nm mit dem Computerprogramm Omega (Mollecular Oxford, UK) abgeschätzt; dabei ging die Aminosäuresequenz inkrementweise in die Berechnung ein (Tabelle 2.5). Der Puffer ohne Protein diente als Nullwert; durch Verwendung

derselben Küvette fiel die Schichtdicke als Einflußgröße weg. Dann ließ sich durch Dreisatz die Konzentration der Probe berechnen.

2.9 Proteinreinigung

2.9.1 Aufschluß

Zur Gewinnung des löslichen Anteils zellulärer Proteine aus Expressionsklonen oder für die Proteinreinigung wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Die feuchte Bakterienzellen wurden im entsprechenden Puffer im Verhältnis 1:5 (w/v) aufgetaut. Zur Inhibierung von Proteasen wurde standardmäßig Phenylmethylsulfonylfluorid (1mM) zugesetzt. In besonderen Fällen wurde der wasserlösliche Inhibitor Pefabloc SC (Roche) in einer Gesamtkonzentration von 1 mM verwendet. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Sorval SS34 Rotor, 14000 UpM, 20 Minuten) abgetrennt.

2.9.2 Anionenaustauscher-Chromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie wurden Proteine, deren pI-Wert unter dem pH-Wert des Auftragspuffer liegt, an das Säulenmaterial gebunden. Als Säulenmaterialien dienten QSepharoseFF (Pharmacia, Freiburg) und Source15Q (Pharmacia, Freiburg). Durch hochmolare Salzlösungen können die Proteine wieder von der Säule verdrängt werden. Bei Anlegen eines Salzgradienten können Proteine abhängig von ihrem pI-Wert nacheinander von der Säule eluiert werden. Die Säule (Säulenvolumen zwischen 50 und 100 ml) wurde, wie angegeben mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde in Niedrigsalzpuffer auf die Säule aufgetragen und wie angegeben eluiert. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 2 Säulenvolumina Hochsalzpuffer regeneriert. Alle Puffer wurden vor Gebrauch filtriert und entgast. Die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde aufgezeichnet und diente der Ermittlung der proteinhaltigen Fraktionen.

2.9.3 Farbstoff-Affinitätschromatographie

Bei der Farbstoff-Affinitätschromatographie wird die Interaktion von Farbstoffen mit Proteinregionen ausgenutzt, die zumeist für die Bindung von Cofaktoren wie ATP, NADH, NADPH, DHF verantwortlich sind. Da die Wechselwirkungen mit der Salzkonzentration abnehmen, kann mit einem steigendem Salzgradienten Protein von der Säule eluiert werden.

Die Säule mit dem blauen Farbstoff Cibacron blue 3 GA (Typ 3000 CL) wurde zunächst mit der angegebenen Menge Puffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde in demselben Puffer auf die Säule aufgetragen und dann mit einem steigenden Salzgradienten wie angegeben eluiert. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 5 Säulenvolumina 20 mM Tris-HCl, 2000 NaCl pH 8,5 regeneriert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt.

2.9.4 Chromatographie mit Hydroxylapatit

Proteine können an die Oberfläche von Hydroxylapatit, einer kristallinen Form von Calciumphosphat, adsorbieren. Die Effekte, die bei dieser Art der Proteinreinigung auftreten sind nicht mit einfachen Ionenaustausch-Vorgängen vergleichbar. Das Trennprinzip ist von der Basizität oder Acidität der jeweiligen Proteine abhängig. Stark saure Biopolymere können eventuell nur sehr schwer wieder eluiert werden. Zur Chromatographie wurden die Säulen CHT2-I, und CHT5-I (10 µm) sowie HA MacroPrep (40µm) der Firma Biorad (München) mit keramischem Hydroxylapatit verwendet. Die Säulenvolumen reichten von 2, 5 bis 30 ml. Äquilibriert wurde mit 20 mM Kaliumphosphat bei pH 7,0. Nach dem Probenauftrag und Waschen mit 1-2 Säulenvolumen wurde wie angegeben ein aufsteigender Kaliumphosphatgradient bis zu einer Endkonzentration von 1 M entwickelt. Die Flußrate lag bei 4 ml/min. Die Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei der Wellenlänge 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Fraktionen wurden zu 10 ml gesammelt, proteinhaltige Fraktion wurden vereinigt.

2.9.5 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltration dient der Entfernung von niedermolekularen Bestandteilen und Salzen. Die Fraktionen aus vorangegangenen Chromatographieschritten wurden durch Ultrafiltration (2.9.6) konzentriert. Das Retentat wurde in Portionen von je 3 bis 5 ml auf eine HiLoad 26/60

SuperdexG75 oder SuperdexG200 Säule (Vol.: 320 ml; 2,6 × 60 cm; Pharmacia, Freiburg) aufgetragen, die zuvor mit 1-2 Säulenvolumina des angegebenen Puffers äquilibriert wurde. Der Auftrag wurde durch konstanten Fluß von 3 ml/min Puffer eluiert; die Fraktionen wurden in Aliquots von 3 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert und die Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Zur Lagerung wurde die Säule unter 20 % Ethanol aufbewahrt.

2.9.6 Proteinkonzentration durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente der Konzentration von Proteinen. Es wurden Rührzellen der Fa. Amicon (Witten/Westfalen) mit einem Volumen von 10 ml bzw. 50 ml verwendet. Das Prinzip besteht darin, daß die proteinhaltige Lösung unter Rühren mit 5 bar Stickstoffüberdruck durch eine Membran gepresst wird. Die Ausschlußgrenze der Membran betrug in diesem Fall 5 bis 10 kDa; sie war so gewählt, daß die Proteine zurückgehalten wurden, Wasser, niedermolekulare Substanzen und kleinere Proteine als 5 bzw. 10 kDa aber ungehindert hindurchtreten konnten.

2.10 Western-Blotting

Zum immunspezifischen Nachweis von NusB-Protein aus Zellextrakten wurden Immunoblots, sog. „Western-Blots“, durchgeführt. Dazu wurden die Zellextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann im elektrischen Feld auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membran) übertragen, d.h. geblottet. Die Detektion erfolgte durch zwei hintereinander geschaltete Antikörperreaktionen. Polyklonales Antiserum, das meist aus einem Kaninchen gewonnen wird, und das gegen das entsprechende Antigen gerichtet ist, wurde als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein Antikörper, der aus der Ziege stammt, gegen den konstanten Anteil des ersten Antikörpers gerichtet ist und kovalent mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert ist. Die so gebundenen Enzyme wurden durch Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) unter Verwendung des Redoxmediators Nitrotetrazoliumchlorid (NBT) detektiert, die beide wasserunlösliche, blaue Farbstoffe liefern und auf der Membran haften.

Der Transfer von Proteingemischen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen wurde mittels Elektroblothing in einem „Semi-Dry-Blotter“ (Transblot SD, Biorad, München)

durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Menge des pro Spur aufgetragenen Proteins wurde dabei von 0,1 µg bis 5,0 µg variiert; dies entspricht nur ca. 0,1 bis 1 % dessen, was bei einer normalen SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung erforderlich ist. Nach beendeter Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (ImmobilonTM Folie Typ P, Millipore, Eschborn) übertragen und damit immobilisiert. Dazu wurde pro Gel je zwei Filterpapiere (Whatman, Maidstone, England) und eine Membran auf Gelgröße zurecht geschnitten und Gel, Membran und Filterpapier 5 Minuten lang in Transfer-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Blot-Apparatur entsprechend der Bedienungsanleitung zusammengesetzt. Wichtig ist, dass die Membran dabei zwischen Gel und Anode zu liegen kommt, da die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung durch das SDS zur positiven Anode wandern und dabei an der Membran haften bleiben. Die Stromstärke pro Gel wurde auf einen konstanten Strom von 3 mA/cm² oder 105 mA/Gel eingestellt. Das Blotting dauerte eine Stunde; in diesem Zeitraum stieg die Spannung von anfänglich 4 - 5 V auf 15 V an. Nach Beendigung des Blot-Vorgangs wurde die Membran mit einer Pinzette sorgfältig entnommen, in Aluminiumfolie eingewickelt und bei 4 °C gelagert. Die Membranen konnten in diesem Zustand mehrere Tage bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

2.11 Stabile RNA/Protein-Proben für NMR-Spektroskopie

Für die Reinigung der NusB-Chargen gelten die nachfolgend beschriebenen Bedingungen, wenn bei der Reinigung nichts anderes angegeben wird: Die Chromatographie-Säulen wurden an einer FPLC-Station der Firma Pharmacia betrieben. Die Anlage mit den beiden Kolbenpumpen wurde vorher mit 0,5 M Natronlauge und mit DEPC-Wasser gespült. DEPC-Wasser ist bidestilliertes Wasser mit 1 ‰ DEPC versetzt und nach 12 Stunden Lagerung bei 37°C für 20 Minuten bei 121°C und 1,2 bar autoklaviert. Das Material der Ionenaustauscher- und Gelfiltrationssäulen wurde ebenfalls mit einem Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge gespült und mit DEPC-Wasser neutral gewaschen, bevor sie mit den entsprechenden Laufpuffern äquilibriert wurden.

Die Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser, das man als weitgehend RNase-frei betrachten kann und unter Verwendung RNase-freier Salze angesetzt. Alle Puffer mit Ausnahme von Tris-haltigen wurden mit 1 ‰ DEPC versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Für die Fraktionssammler wurden Glasröhrchen verwendet, die, wie alle eingesetzten Glasgeräte zuvor

maschienengeschpült und für 6 Stunden bei 180°C sterilisiert wurden. Alle weiteren Gerätschaften wurden mit RNaseZAP[®] der Firma Ambion vorbehandelt und mit DEPC-Wasser abgewaschen. NMR-Röhrchen von Shigemi wurden nach Verwendung zuerst mit Chromschwefelsäure, RNaseZAP[®] und mit DEPC-Wasser gespült. Zum Pipettieren wurden RNase-freie Spitzen mit Aerosolfilter von Sorenson BioScience, Inc. verwendet. Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Einweghandschuhen durchgeführt.

2.12 NMR-Spektroskopie

Die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren wurden an einem DMX-600 Spektrometer der Firma Bruker Instruments, Karlsruhe, bei 600,39 MHz (^1H); 60,83 MHz (^{15}N) und 243,04 MHz (^{31}P) aufgenommen. Zur Bestimmung des pH-Werts von Proteinlösungen wurden Phosphorspektren aufgenommen und die Verschiebung des Phosphatsignal mit dem pH-Wert der Lösung korreliert.

$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQCs wurden mit dem Pulsprogramm `tdhsqcse` aufgenommen. Zuvor wurde der 90°-Puls in einem 1D Experiment bestimmt. In der Regel wurden pro Transiente 8 FIDs akkumuliert, was einer Gesamtdauer von 20 Minuten entspricht. Wenn nicht anders angegeben, wurden ca. 0,5 mM ^{15}N -markierte Proteinlösungen in 70 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurden die Softwarepakete XWinNMR und Aurelia (Bruker, Karlsruhe) verwendet.

Daneben wurden ^{15}N -HSQC Experimente an einem Vierkanal Avance DRX 500 Spektrometer (Bruker Instruments, Karlsruhe Deutschland), ausgerüstet mit einem inversen Tripelresonanz-Probenkopf bei 500,13 MHz (^1H) bzw. 50,68 MHz (^{15}N) durchgeführt.

Die Spektren wurden bei 310 K in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O , 70 mM Kaliumphosphat bei pH 7,0 in 5 mm Shigemi NMR-Röhrchen gemessen. Die Daten wurden mit dem Pulsprogramm `invi prtpri f3` aufgenommen und mit der Bruker Standardsoftware WIN NMR Version 3.0 prozessiert. Die Datenanalyse erfolgte mit Bruker AURELIA Version 2.8.11. Die chemische Verschiebung der Protonen wurde durch einen externen Natrium-3-trimethylsilylpropionat-Standard geeicht.

2.13 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Wenn Oberflächen-Plasmon-Wellen an der Grenzschicht Flüssigkeit/Metall angeregt werden, dann tritt das Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz auf. Dies kann durch Bestrahlung der flüssigkeitsabgewandten Metallfläche mit polarisiertem Licht erfolgen. Das Licht wird dabei unter dem so. Refraktärwinkel in Abhängigkeit vom Brechungsindex der Oberfläche reflektiert. Durch die Anregung der Oberflächen-Plasmon-Wellen im Metall wird die Intensität des eingestrahnten Lichts reduziert und seine Wellenlänge verschoben. Werden auf der Seite der Grenzschicht Flüssigkeit/Metall Moleküle an die Oberfläche gebunden, so führt das zu einer geringen Änderung des Brechungsindex in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche. Eine verstärkte Plasmonresonanz und damit eine stärkere Reduzierung der Lichtintensität sind die Folgen. Dadurch ergibt sich auch eine größere Verschiebung der Wellenlänge des Reflexionsmaximums. Diese Veränderungen werden meßtechnisch erfaßt und in Form eines sog. Sensorgramms aufgezeichnet. Die verwendete Einheit zur Auftragung des Resonanzsignals gegen die Zeit sind Response Units (RU), wobei einem RU die Bindung von einem Picogramm Substanz auf einem Quadratmillimeter der Sensoroberfläche entspricht.

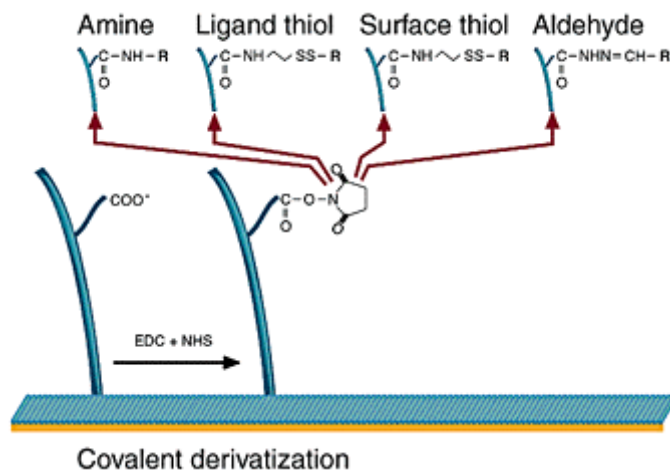


Abb. 2.1 Variationsmöglichkeiten bei der Immobilisierung auf der CM-5-Chip-Oberfläche.

Für die Bestimmung von kinetischen Konstanten zwischen zwei Bindungspartnern muß eine der Komponenten auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden Sensorchips vom Typ CM5 *research grade* von BIAcore (Schweden) mit einer funktionalisierten Dextranoberfläche verwendet. Methoxy-Carbonyl-

Gruppen sind auf der Oberfläche verankert, an die auf chemischen Weg zahlreiche Komponenten gebunden werden können (Abbildung 2.1).

Die erforderlichen Schritte wurden über die BIAcore2000 Meßeinrichtung durchgeführt. Der Sensor-Chip wurde im Gerät an eine Flußzelle und die optische Einheit angedockt. Durch die Flußzelle und die Chipoberfläche werden 4 kleine Kanälchen ausgebildet, die über die Systemsoftware ansteuerbar sind. Alle Komponenten zum Konditionieren, Waschen, Immobilisieren oder zu Messung werden über eine Probenauftragseinheit auf die vorgewählten Kanäle oder Spuren geleitet.

Zur Durchführung der Messungen wurden Ribonucleotidoligomere auf dem Sensorchip fixiert. Zu diesem Zweck wurden RNA-Oligomere verwendet, die am 5'-Ende über einen Linker (Abbildung 2.2) biotinyliert waren. Die Sequenzen der eingesetzten Ribonucleotidoligomere sind in Anhang B angegeben. Auf der Chipoberfläche wurde als Bindungspartner zu Biotin Streptavidin chemisch immobilisiert. Dazu wurden mit 50 µl 0,1 M *N*-Hydrosuccinimid-Lösung (NHS) und 50 µl 0,1 M *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Lösung (EDC) die auf dem Chip verankerten Carboxymethylgruppen aktiviert. Anschließend wurde Streptavidin über Amidbindungen an die Oberfläche kovalent gebunden (Abbildung 2.2). Noch freie Carboxylgruppen wurden anschließend mit 1 M Ethanolamin-Lösung blockiert. An die mit Streptavidin belegte Oberfläche konnten nun die biotinylierten RNA-Oligonucleotide fixiert werden. Die untersuchten Biopolymere oder die diversen Waschschrte wurden mit HBS-EP-Puffer, bestehend aus 10 mM HEPES bei pH 7,4 mit 150 mM NaCl, 3 mM EDTA und 0,005 % Tween20 durchgeführt.

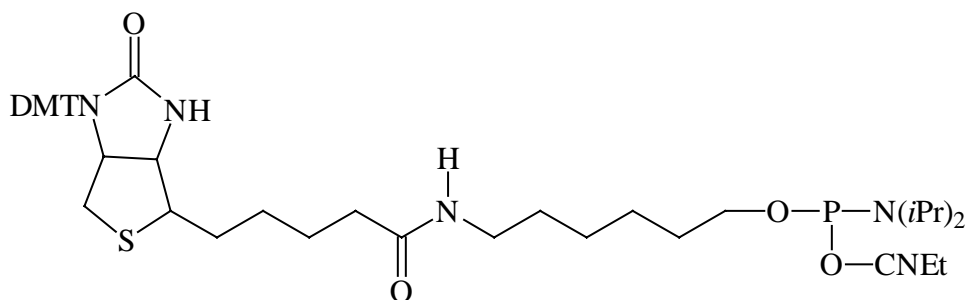


Abb. 2.2 Struktur des Biotin-Linkers am 5'-terminalen Ende der Ribonucleotidoligomere. DMT: Dimethoxytrityl, CNEt: Cyanoethyl.

2.14 Isolierung und Reinigung von Ribonucleosiden

Die Zellmasse aus der Fermentation wurde nach Zwischenlagerung bei -20°C zu den Ribonucleosidmonophosphaten aufgearbeitet.

Zur Gefriertrocknung wurden die bei -20°C gelagerten Zellpellets von *Escherichia coli* M15 wurden in flachen Teller ausgestrichen, um eine möglichst große Oberfläche zu erzeugen. Die Teller wurden in einer Alpha Christ Gefriertrocknungsanlage über 2 Tage getrocknet. Die Ausbeute an feuchter Zellmasse betrug durchschnittlich 100 g pro Liter Kulturvolumen, davon waren nach der Trocknung circa 20 g Zelltrockenmasse übrig. Der Wassergehalt in den feuchten Zellen betrug also gute 80% der Gesamtmasse

Die Lipidextraktion nach BLIGH und DYER wurde mit einem Extraktionssystem aus Methanol, Dichlormethan und Wasser im Verhältnis 2 : 1 : 0,8 durchgeführt. Die Aufschlämmung wurde mit Wasser und Dichlormethan versetzt, bis das Verhältnis Methanol : Dichlormethan : Wasser wie 2 : 2 : 1,8 war, wobei sich eine Phasentrennung einstellte. Die Suspension wurde durch Zentrifugation getrennt. Es bildete sich ein „zweiphasiges“ System mit den Zellen als Grenzschicht aus. Der Überstand wurde abgetrennt und die Zellpellets in Kolben überführt und gefriergetrocknet. Die zweite DCM-Phase wurde getrennt gesammelt und ebenso wie die Wasserphase einrotiert.

Die entfetteten und erneut getrockneten Zellen wurden in 1 M Natronlauge resuspendiert und bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Durch die alkalische Hydrolyse wurde eine Spaltung der RNA zu 2',3'-Nucleotidmonophosphaten erreicht. Der Hydrolyseansatz wurde mit konzentrierter Salzsäure und Trichloressigsäure versetzt. Es bildete sich ein weißer Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit 25 %igem Ammoniak auf pH 8 eingestellt. Die abgetrennten Proteine wurden für eine spätere Aminosäurengewinnung bei -20°C gelagert.

Für die Fällung der Ribonucleosidmonophosphate wurde der Überstand mit dem 6,5 fachen Volumen an auf 4°C gekühltem Ethanol versetzt. Es bildete sich ein weißer Niederschlag, der abzentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde bei 4°C mit 50 mg in Wasser gelöstem Bariumacetat versetzt und über Nacht gerührt, wobei sich wiederum ein weißer Niederschlag bildete. Dieser wurde ebenfalls abzentrifugiert. Die beiden gefällten Fraktionen wurden getrennt aufgearbeitet. Beide wurden in 50 mM Salzsäure aufgenommen und die Fällung der Bariumribonucleate mit 1-2 ml gesättigter Natriumsulfat-Lösung versetzt und gefälltes Bariumsulfat abzentrifugiert.

Für die Trennung und Reinigung markierter Ribonucleotide wurde die Analytik mittels Reversed Phase HPLC durchgeführt. Auf eine YMC-Pack Säule vom Typ ODS AQ in den Dimensionen $250 \times 4,6$ mm, $S-5 \mu\text{m}$, 120 \AA wurden $10 \mu\text{l}$ Analysenmischung aufgetragen. Als Elutionssystem wurde 100 mM HCOOH , $100 \text{ mM NH}_4\text{COOH}$ mit einer Flußrate von 2 ml/min genommen. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 254 \text{ nm}$. Die Retentionszeiten für die jeweiligen Standardverbindungen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt. Der Schreibervorschub betrug 2 mm pro Minute .

Die getrennten Ribonucleotide wurden mit alkalischer Phosphatase zu den Ribonucleosiden dephosphoryliert. Zu den in einem Nucleosidpuffer ($0,5 \text{ mM Magnesiumchlorid}$, $0,1 \text{ M Ammoniumhydrogencarbonat}$ bei $\text{pH } 10,4$ mit 1 mM ZnCl_2) aufgenommenen Ribonucleotiden wurden im Falle von CMP, UMP und GMP 30 Units von alkalischer Phosphatase Grad II (Roche), im Falle von AMP 100 Units einer alkalischen Phosphatase für Molekularbiologie (Roche) gegeben. Die Ansätze wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 7 Stunden inkubiert und anschließend über eine Lichrosorb RP18 Säule an einer präparativen HPLC-Anlage mit Wasser als mobile Phase gereinigt. Die abreagierten Dephosphorylierungsansätze wurden über einen 10 ml-Loop auf die Säule aufgetragen und mit entgastem und entionisiertem Wasser mit einer Flußrate von ca. 16 ml pro Minute über mehrere Säulenvolumen gespült. Die Reinigung sollte zum einen die alkalische Phosphatase mit dem Puffer entfernen, außerdem sollte eine Trennung von eventuell noch vorhandenem Monophosphat erreicht werden.

Ribonucleotid	Retentionszeit
2',3'-UMP	5 min 30 s; 7 min
2',3'-CMP	5 min
2',3'-AMP	18 min 30 s; 47 min 30 s
2',3'-GMP	11 min; 30 min
Cytidin	5 Minuten 15 Sekunden
Uridin	9 Minuten
Guanosin	28 Minuten
Adenosin	50 Minuten 30 Sekunden

Tab. 2.6 Analytische HPLC: Retentionszeiten von Ribonucleotiden und Ribonucleosiden nach HPLC über eine YMC-Pack Säule vom Typ ODS AQ in den Dimensionen $250 \times 4,6$ mm, $S-5 \mu\text{m}$, 120 \AA mit $30 \text{ mM HCOOH/NH}_4\text{COOH}$. Flußrate: 2 ml min^{-1} .

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische und proteinchemische Vorarbeiten

3.1.1 Arbeiten mit NusG Protein aus *Escherichia coli*

3.1.1.1 Umklonierung des *nusG*-Gens aus *E. coli*

Zur Verfügung stand ein Expressionsklon pNCO113-*nusG* von *E. coli* NusG-Protein der Stämme *E. coli* M15 und XL1-Blue (MÜHLBERGER, 1998). Bei der Proteinreinigung stellte sich heraus, dass das Protein in zwei Fragmente der Größen 14 und 7 kDa zerfällt. Wie von WASHBURN *et al.* 1996 erkannt und durch Edman-Abbau bestätigt (MÜHLBERGER, 1998), wird das Protein zwischen dem Arginin56 und Arginin57 durch *ompT*⁺-Zellen gespalten. OmpT ist eine Serin-Protease mit hoher Spezifität für zweibasige Protein-Bereiche, wie das erwähnte Arginin-Arginin-Motiv in NusG-Protein (SUGIMURA and HIGASHI, 1988). Beim Aufschluß der Zellen mit Ultraschall wird die Protease *ompT* freigesetzt und zersetzt NusG Protein im Rohextrakt. Um dies auszuschließen wurde das Expressionsplasmid pNCO113-*nusG* parallel mit dem Repressor-Plasmid pREP4 in Zellen von *E. coli* BL21 DE3 transformiert. BL21 ist ein *ompT*-defizienter *E. coli* Stamm. Des Repressorplasmid pREP4 trägt das Gen *lacI*, welches für das *lac*-Repressorprotein codiert. Wirtsstämme ohne ein solches Plasmid sind auf die durch chromosomale *lacI* Expression gebildete Menge an *lac*-Repressor angewiesen. Bei Expressionsvektoren mit hoher Kopiezahl wie dem pNCO113 reicht diese Menge eventuell nicht aus, um sämtliche Kopien zu reprimieren. Es kommt zu einer niedrigen Basalexpression auch ohne Induktion mit IPTG. Im *E. coli* XL1 Stamm, der über kein solches Repressorplasmid verfügt, konnte keine Überexpression von NusG Protein erreicht werden.

Die erhaltenen Kolonien von *E. coli* BL21 wurden auf LB Platten mit Ampicillin und Kanamycinsulfat selektioniert und auf positive Klone getestet. Aus mehreren Einzelkolonien wurde Plasmid isoliert und analytisch mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* restringiert. Kolonien, deren Plasmide, die *nusG*-Bande von 543 bp zeigten, wurden zur Expression gebracht. Durch die gute Repression und Anzucht bei 30 °C konnte eine hohe Überexpression und gute Löslichkeit von rekombinantem NusG-Protein erreicht werden. Die Banden des 21 kDa-Proteins sind in Abbildung 3.1.1 deutlich erkennbar.

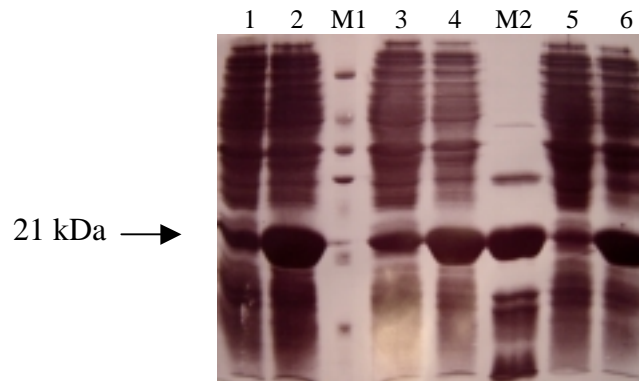


Abb. 3.1.1 SDS-PAGE: Spur 1, 3 und 5 zeigen Proben vor und 2, 4, und 6 nach der Induktion mit IPTG. M1 ist der Proteinmarker, M2 eine NusG-Vergleichsprobe aus *E. coli* M15.

3.1.1.2 Reinigung von stabilem NusG-Protein

Feuchte Bakterienmasse mit NusG Protein wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 (230 mM NaCl, 10% Glycerin, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 4 mM Proteaseinhibitor PefablocSC[®], Roche) mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf 100 ml mit 25 mM Tris-HCl-Puffer aufgefüllt, um die NaCl-Konzentration zu erniedrigen. Für den Aufschluß hat sich eine höhere Salzkonzentration als positiv für die Stabilität von NusG Protein erwiesen. Vor dem Auftrag auf den Anionenaustauscher QSepharoseFF (Pharmacia, Freiburg) muss aber der Salzgehalt unter dem Elutionsbereich von 120 mM NaCl liegen. Die Säule wurde nach Waschen mit 4 Säulenvolumina Tris-Puffer mit einem Gradienten von 0 bis 350 mM NaCl über 500 ml Eluat und bis 1 M NaCl in weiteren 250 ml Eluat mit 4 ml/min Flußrate entwickelt. Das NusG Protein wurde bei 120 bis 190 mM NaCl vom Anionenaustauscher verdrängt und eluierte in einem Volumen von 160 ml (Abbildung 3.1.2).

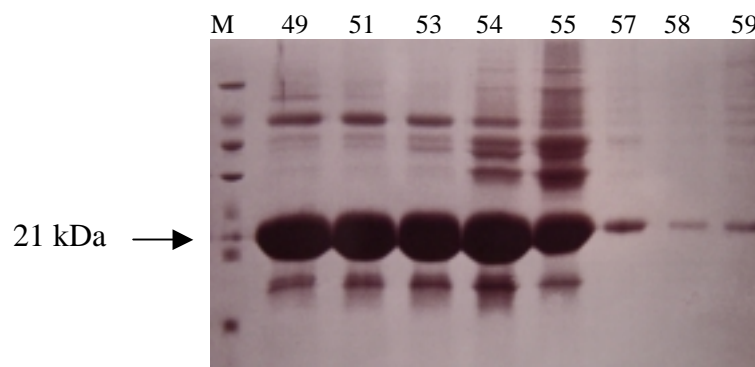


Abb. 3.1.2 SDS-PAGE: NusG-Fractionen nach Anionenaustauscher-Chromatographie; Marker M und die Hauptfraktionen 49-55.

Die NusG-haltigen Fraktionen wurden gepoolt, durch Ultrafiltration auf 10 ml eingengt und über eine HighPrep 16/10 Desalting Säule (Pharmacia) auf 20 mM Kaliumphosphat mit pH 7,0 umgepuffert. Die Säule wurde mit einer Flußrate von 5 ml/min an einer FPLC-Station von Pharmacia betrieben. Das NusG Protein wurde in einem Gesamtvolumen von 20 ml eluiert und direkt auf eine Hydroxylapatit-Säule HA-MacroPrep (Biorad) aufgetragen. Die Säule wurde bei einem Fluß von 4 ml pro Minute mit einem Säulenvolumen 20 mM Kaliumphosphat-Puffer gewaschen und mit einem Gradienten bis 500 mM Kaliumphosphat-Puffer über 200 ml Elutionsvolumen entwickelt. In weiteren 10 ml Eluat wurde auf 1 M Kaliumphosphat erhöht und mit 10 ml Puffer nachgespült. Das NusG Protein wurde in drei Fraktionen in einem Gesamtvolumen von 25 ml zwischen 120 und 150 mM Kaliumphosphat eluiert.

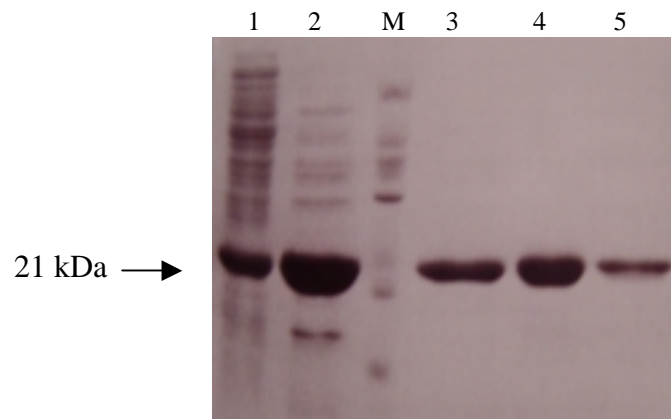


Abb. 3.1.3 SDS-PAGE mit Reinigungsstufen von NusG-Protein: Spur 1 zeigt Rohextrakt, 2 das Protein nach Q-Sepharose FF, die Spuren 3-5 sind die Hauptfraktionen von der Hydroxylapatit-Säule.

Eine Kontrolle mit SDS-PAGE (Abbildung 3.1.3) zeigt bei 21 kDa die prominente Bande von homogenem NusG Protein. Es wird durch Ultrafiltration auf eine Konzentration von 1 mM Protein gebracht, kontrolliert über Messung im UV-Bereich bei 280 nm Wellenlänge und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Arbeiten mit NusA Protein aus *E. coli*

3.1.2.1 Expression und Reinigung von N- und C-terminaler NusA-Domäne

Die beiden NusA-Domänen NusA-NTD (NT) und NusA-CTD (CT) wurden in den Expressionsvektor pNCO113 kloniert, in dem sie dann unter der Kontrolle des T5-Promotors und *lac*-Operators exprimiert werden konnten. Um die für die Ligation erforderliche Erkennungsse-

quenzen für die Restriktionsendonucleasen zu generieren, ohne dabei die ideale Vektorsequenz zwischen Promotor und Startcodon zu verlieren, wurde eine zweistufige PCR-Strategie angewandt (RICHTER *et al.*, 1997), die in Abbildung 3.1.4 am Beispiel der N-terminalen Domäne schematisch dargestellt ist. Es wurden Primer verwendet, die am 5'-Ende ca. 15 neu einzufügende Nucleotide besaßen, während sie am 3'-Ende ca. 20 matrizingleiche Nucleotide aufwiesen, um eine gute Hybridisierung an die Matrize zu gewährleisten. Die Primer sind in Anhang A aufgeführt.

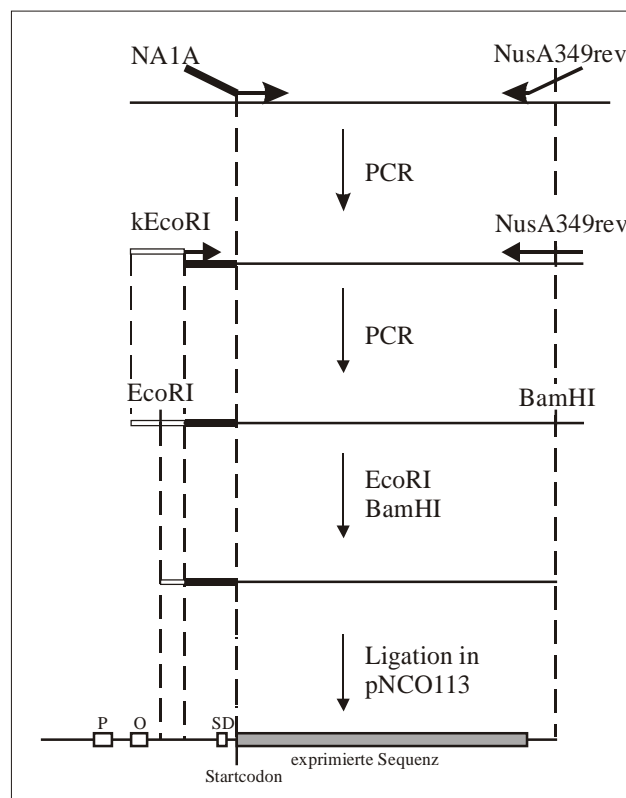


Abb. 3.1.4 Konstruktionsstrategie des Expressionsvektors pNCO113nusA-NTD. P: Promotor (T5), O: *lac* Operator, SD: Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindungsstelle).

Um den Expressionsvektor der N-terminalen Domäne von NusA pNCO113nusA-NTD mit den Aminosäuren 1 bis 349 aufzubauen, wurden die Primer NA1A und NusA349rev verwendet. Für den Vektor pNCO113nusA-CTD der C-terminalen NusA-Domäne (Aminosäure 350 bis 495) wurde das Primerpaar NusA350for und NA1B eingesetzt.

In der ersten PCR wurde für beide Konstrukte durch die Vorwärts-Primer NA1A (N-terminale Domäne) und NusA350for (C-terminale Domäne) am 5'-Ende ein kurzer Bereich des Primers kEcoRI und durch die Rückwärts-Primer NusA349rev (NT) und NA1B (CT) am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt. Durch die zweite PCR mit kEcoRI als Vorwärts-Primer und die

bereits verwendeten Rückwärts-Primer wurde 5'-terminal in beiden Konstrukten eine *EcoRI*-Schnittstelle erzeugt.

Die PCR-Produkte und der Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* restringiert und mit CyclePure[®]-Säulchen, wie in Kapitel 2.6.3 erläutert, gereinigt. Die beiden Gen-Inserts und der Vektor wiesen nun kohäsive Enden auf, die nur eine Ligation in der richtigen Orientierung des Gens erlaubten. Die Ligation wurde mit T4-Ligase durchgeführt.

Die Expressionsvektoren wurden in elektrokompente Zellen von *E. coli* BL21 pREP4 transformiert. Dieser Stamm ist gut reprimiert und es gelang beide Domänen zu exprimieren. Beide Protein-Domänen wurden mit guter Löslichkeit erhalten. Die Rohextrakte der beiden Domänen sind in Abbildung 3.1.5 gezeigt. In Spur 1 in Höhe von 39,6 kDa die Bande der N-terminalen NusA-Domäne, in Spur 2 bei 16,4 kDa die Bande für die C-terminale Domäne.

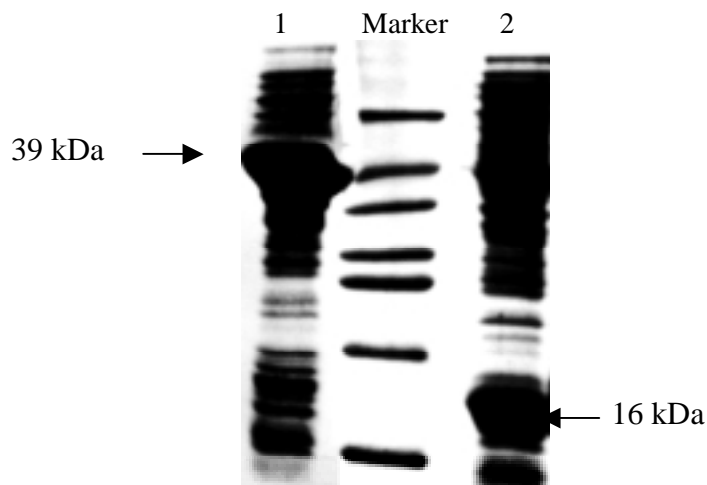


Abb. 3.1.5 SDS-PAGE: Rohextrakte der beiden NusA-Domänen: Spur 1 zeigt die N-terminale Domäne mit 39,6 kDa, die C-terminale Domäne mit 16,4 kDa ist in Spur 2 aufgetragen.

Zur Reinigung der N-terminalen NusA-Domäne wurden Bakterienzellen mit dem rekombinanten Protein in 20 mM Kaliumphosphat mit Lysozym und DNase bei pH 7,0 40 Minuten gerührt und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde an eine Hydroxylapatit HA MacroPrep gebunden. Die Säule wurde mit einem aufsteigenden Kaliumphosphatgradienten bis 1 mol/Liter in 10 Säulenvolumen entwickelt. NusA-NTD wurde bereits bei 40 mM Phosphat von der Säule verdrängt. Die proteinhaltigen Hauptfraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und über eine Gelfiltrationschromatographie mit einer SuperdexG200 26/60 in 20 mM Kaliumphosphat und 100 mM Kaliumchlorid bei pH 7,0 zur Homogenität gereinigt. Das Protein eluierte nach 150 ml in einem Volumen von 21 ml. Aus 8 g feuchten *E. coli* Zellen konnten 150 mg N-terminale NusA-Domäne erhalten werden (Abbildung 3.1.6). Es wurde in Portionen zu 30 mg/ml (1 mM) in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Reinigung der 16,4 kDa schweren C-terminalen NusA-Domäne wurden feuchte Zellen analog zur NTD aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde in zwei Chromatographieschritten zuerst über eine Hydroxylapatit-Säule gereinigt. Die NusA-CTD hat nicht an das Säulenmaterial gebunden, im Gegensatz zu einem Großteil des zellulären Fremdproteins. Für den zweiten Schritt wurden die NusA-CTD-haltigen Fraktionen ultrafiltriert und durch Gelfiltration mit einer SuperdexG75 26/60 (Pharmacia) (Abbildung 3.1.6) bis zur Homogenität aufgereinigt. Aus 8 g Zellen konnten 59,5 mg Protein gewonnen werden; es wurde in Fraktionen zu 17 mg pro Milliliter (1 mM) in 70 mM Kaliumphosphat und 100 mM Kaliumchlorid bei pH 7,0 im flüssigen Stickstoff zwischengelagert.

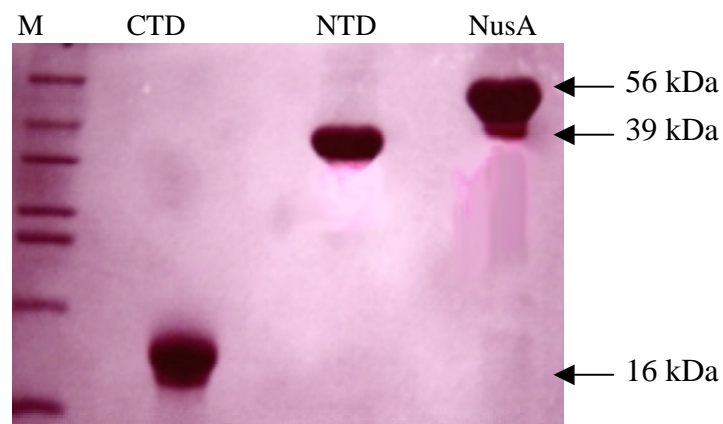


Abb. 3.1.6 SDS-PAGE der gereinigten NusA-Domänen: Spur 1: Marker, Spur 2 C-terminale NusA-Domäne, Spur 3 N-terminale NusA-Domäne, Spur 4: NusA-Protein.

Beide Proteine wurden mit dem Edman-Verfahren am N-Terminus ansequenziert. Die ersten 10 Aminosäuren, die überprüft wurden, waren mit der entsprechenden Datenbank-Sequenzen (Accessions Nummer P03003) identisch. Das N-terminale Startmethionin bei der N-terminalen Domäne ist erhalten.

3.1.2.2 NusA- λ N-Mini-Operon

Das N-Protein des λ Phagen spielt für dessen Lebenszyklus über die Steuerung der Antitermination unter Einbeziehung der Nus-Proteine aus *Escherichia coli* eine zentrale Rolle. N Protein konnte in *Escherichia coli* mit dem Expressionsvektor pNCO113-gpN (ILLARIONOVA, unveröffentlicht) zur Expression gebracht werden. Leider lag das Protein aber nur in Form von Einschlusskörpern vor. Für weitere Untersuchungen mußten zeit- und arbeitsintensive De- und Renaturierungsschritte durchgeführt werden.

Von dem in Lösung unstrukturierten N Protein ist bekannt, dass es eine Bindungsbeziehung zu NusA Protein eingehen kann und dabei im Bindungsbereich eine Teilkonfiguration einnimmt (VAN GILST und VON HIPPEL, 1997). Es wurde versucht, N Protein aus dem λ Phagen in einem Minioperon mit vorgeschaltetem NusA-Gen auf einem Expressionsvektor zu kombinieren. Durch die vorausgehende NusA-Expression und eine mögliche Wechselwirkung mit translatiertem N könnte letzteres möglicherweise in lösliche Form gebracht werden.

Das *nusA*-Gen wurde aus dem Expressionsvektor pNCO113*nusA* mit den Primern kEcoRI und NusA1N amplifiziert und 5'-terminal eine *MfeI*-Schnittstelle eingeführt. Für die Überexpression von N Protein wurde der Vektor pNCO113-N von Frau DR. ILLARIONOVA freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das NusA-Amplifikat wurde mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *MfeI* restringiert. Der N-Expressionsvektor wurde mit *EcoRI* geschnitten und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Ein mit *MfeI*-Enzym restringiertes Insert kann mit einem *EcoRI*-geschnittenen Vektor ligiert werden. Diese Schnittstelle geht allerdings verloren, da weder *EcoRI* noch *MfeI* die resultierende Sequenz 5'-GAATTG-3' erkennen. Das Konstrukt wurde in Zellen von *E. coli* BL21 elektrotransformiert und mit Antibiotika auf positive Klone selektioniert.

Da der Vektor an beiden Enden einen *EcoRI*-Überhangsequenz aufweist, ist die Orientierung des Inserts im Vektor nicht determiniert und in der Hälfte der Fälle falsch. Tests auf Expression und Löslichkeit von positiven Klonen ergaben aber, dass N Protein weiterhin nur als Einschlußkörper vorlag.

3.1.2.3 Umklonierung und Reinigung von NusA Protein aus *Escherichia coli*

Aus dem Expressionsklon *E. coli* M15 pNCO113*nusA* wurde der Expressionsvektor für NusA Protein aus *E. coli* isoliert und für eine verbesserte Expression und zur Vermeidung von Proteasen in elektrokompente Zellen von *E. coli* BL21 DE3 [pREP4] transformiert. Durch Selektion mit Ampicillin und Kanamycinsulfat konnten positive Klone erhalten werden. NusA-Protein wurde in gute Ausbeute und Löslichkeit zur Expression gebracht. Die Reinigung wurde in zwei Stufen mit Anionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration durchgeführt (MÜHLBERGER, 1998). In Abbildung 3.1.6 ist in Spur 3 die 56 kDa-Bande von NusA Protein gezeigt. Aus 10 g Zellen konnte 150 mg Protein dargestellt werden.

3.1.3 Arbeiten mit Rho Protein aus *Escherichia coli*

3.1.3.1 Konstruktion des Expressionsklons pNCO113-*rho*

Der Aufbau des Expressionssystems für Rho-Protein wurde nach der schon in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen zweistufigen PCR-Strategie durchgeführt. Das *rho*-Gen wurde durch PCR aus chromosomaler DNA vom *E. coli* Stamm RR28 amplifiziert (RICHTER, 1997), wobei die DNA-Oligonucleotide RHOV und RHOH als Primer verwendet wurden (Anhang A). Durch den Einsatz von Primer RHOV wurde am 3'-Ende ein Sequenzmotiv des Primers *kMfeI* und durch den Primer RHOH am 5'-Ende eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Eine Agarosegelelektrophorese ergab das erwartete Amplifikat bei 1298 bp. In einer zweiten PCR wurde der *kEcoRI*-Primer und wiederum der Primer RHOV eingesetzt. Der Primer *kEcoRI* enthält einen Bereich aus dem Vektor pNCO113 mit *EcoRI*-Schnittstelle und ribosomaler Bindungsstelle, die nun am 5'-Ende des Amplikons erzeugt wurden. Das nachfolgende Schema 3.1.1 zeigt das 1315 bp große Amplikon der zweiten PCR-Reaktion. Der doppelt unterstrichene Bereich markiert den Primer RHOV aus der ersten PCR. Der Primer *kEcoRI* mit der *EcoRI*-Schnittstelle ist durch den ersten Kursivdruck dargestellt; der zweite Kursivdruck markiert den Primer RHOH mit der *HindIII*-Schnittstelle. Die senkrechten Striche stellen die Spaltstellen der Restriktionsenzyme dar.

5' - AC ACA G|AA TTC ATT AAA GAG GAG AAA TTA ACT **ATG AAT CTT ACC**
GAA TTA AAG-*rho*-Sequenz-ATG ATG AAA CGC TCA TAA ATT TGT CTT A|AG
 CTT AAA AC -3'

Schema 3.1.1 Amplifikat der zweiten PCR mit Template aus der ersten Reaktion und den Primern *kEcoRI* und RHOH. Die Sequenz vom Gen *rho* ist fett gedruckt.

Das Amplikon aus der zweiten PCR weist demnach zwei im Gen nicht vorhandene Restriktionsschnittstellen auf. Das Fragment wurde mit den Restriktionsendonucleasen *MfeI* und *HindIII* verdaut. Der Vektor pNCO113 wurde mit *EcoRI* und *HindIII* restringiert. Dieser Expressionsvektor pNCO113 (3420 bp) enthält neben einem starken, synthetischen Promotor T5 eine Operatorsequenz, die die Repression durch *lacI*-Protein ermöglicht (Abbildung 3.1.9).

Dieser Expressionsvektor pNCO113-*rho* wurde in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Die Selektionierung erfolgte durch Ausplattieren auf LB-Platten mit Ampicillin. Nach Plasmidextraktion durch Minipräparation und Restriktionsverdau mit *XhoI* und *HindIII* wurde in der Gelelektrophorese das erwartete Fragment mit 1302 bp erhalten. Transformierte *E.*

coli Zellen mit dem Plasmid pNCO113-*rho* wurden in einem Expressionstest (Kapitel 2.8.2) untersucht und zeigten auf dem SDS-Gel bei 47 kDa eine deutliche Bande von Rho-Protein.

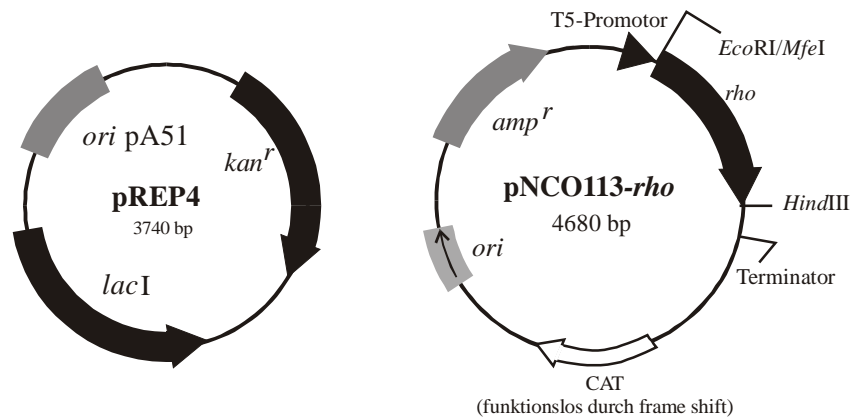


Abb. 3.1.9 Genkarte der Plasmide pREP4 mit Kanamycin-Resistenz und pNCO113-*rho* mit dem Gen des Terminationsfaktors ρ aus *E. coli*.

Zur Absicherung der korrekten Klonierung wurde das im Vektor pNCO113 integrierte *rho*-Gen durch DNA-Sequenzierung überprüft. Mit den Sequenzierprimer pNCO-100 und pNCO+80 konnte zudem der regulatorische Bereich von Promotor, Operator und Genstart als einwandfrei bestätigt werden. Die im Anhang C aufgeführte Sequenz stimmt vollständig mit der in der Literatur (PINKHAM and PLATT, 1983) publizierten überein.

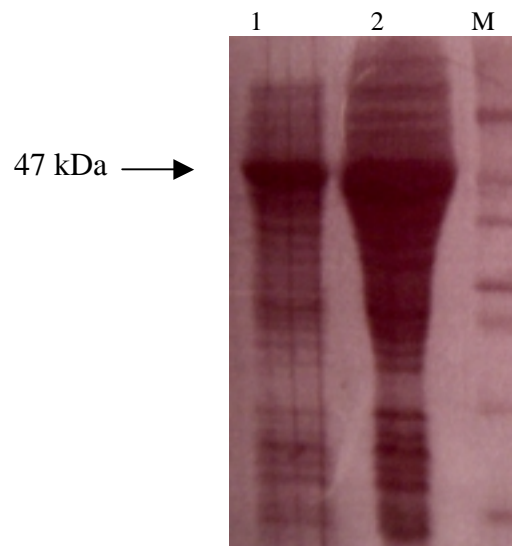


Abb. 3.1.10 SDS-PAGE von Rho-Protein bei 47 kDa (Monomer): Spur 1 löslicher Rohextrakt, Spur 2: Gesamtzellpellet, M Marker.

Für die Entwicklung einer Reinigungsstrategie des Rho-Proteins wurde der Vektor pNCO113-*rho* in *E. coli* BL21 pREP4 transformiert. Durch das Plasmid pREP4 (Abbildung 3.1.9) ist eine ausreichende Menge an Repressorprotein (*lacI*-Protein) vorhanden. Dadurch zeichnen sich die

Klone von *E. coli* BL21 durch eine stabilere Repression als die von *E. coli* XL1-Blue aus. Nach der Transformation und Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Zellen auf Mediumplatten mit den Antibiotika Ampicillin und Kanamycinsulfat ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Expressionstest und SDS-PAGE lieferten das in Abbildung 3.1.10 gezeigte Ergebnis. Das Monomer des hexameren Rho-Protein ist in Höhe der 47 kDa-Bande deutlich erkennbar.

3.1.3.2 Reinigung von Rho Protein aus *E. coli*

Die Zellen von *Escherichia coli* BL21 DE3 wurden in 20 mM Tris-HCl mit 1 mM DTT und DNase bei pH 7,0 mit Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 2.9.1) und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zuerst auf eine Anionenaustauschersäule QSepharoseFF aufgetragen. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 0 bis 1 M Kaliumchlorid in 700 ml Elutionsvolumen entwickelt. Das homohexamere Rho-Protein wurde in einem Volumen von 90 ml bei einer Konzentration von 260 mM KCl von der QSepharoseFF verdrängt. Die SDS-PAGE-Auswertung der Chromatographie zeigte deutlich eine Abreicherung von Fremdprotein im Bereich unter 35 kDa in den Rho-haltigen Fraktionen.

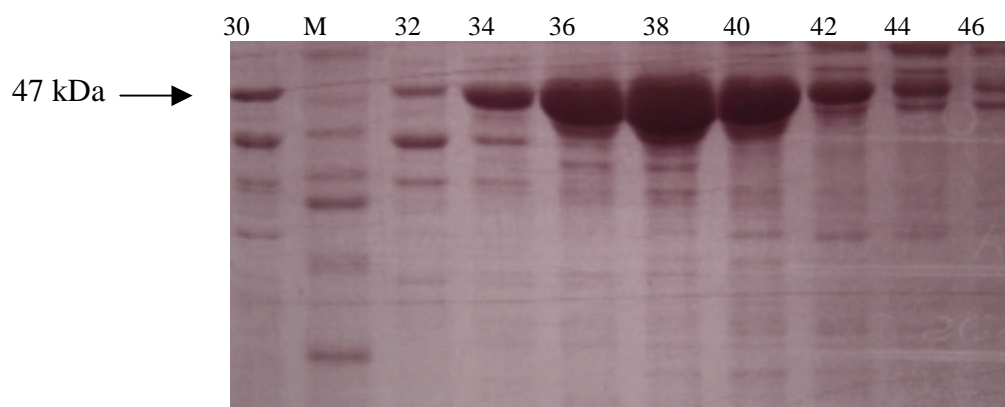


Abb. 3.1.11 SDS-PAGE mit Fraktionen von Rho-Protein nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Für den nächsten Reinigungsschritt wurde keramisches Hydroxylapatit verwendet. Die Säule HA MacroPrep wurde mit 20 mM Kaliumphosphat und 1 mM DTT bei pH 7,0 mit einem Gradienten auf 1 M Kaliumphosphat in einem Volumen von 400 ml entwickelt. Das Protein eluierte ab 130 mM Kaliumphosphat in einem Volumen von 30 ml nahezu homogen. Nur durch die starke Überladung der SDS-PAGE in Abbildung 3.1.12 waren noch feine Banden von Verunreinigungen erkennbar.

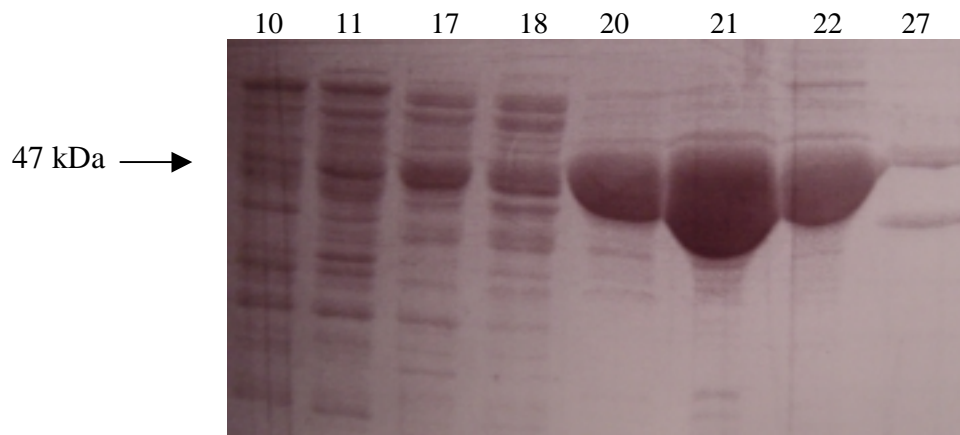


Abb. 3.1.12 SDS-PAGE mit Fraktionen von Rho-Protein nach Hydroxylapatit-Chromatographie.

Das gereinigte Protein wurde durch Edman-Abbau N-terminal sequenziert. Die ersten 10 Aminosäuren, die überprüft wurden, waren mit der Datenbank-Sequenz des Transkriptions-Terminationsfaktors Rho aus *Escherichia coli* (Accessions Nummer P03002) identisch. Das N-terminale Startmethionin ist erhalten.

3.1.4 Konstruktion des Klons pNCO113-*yhbC* aus *E. coli*

Nach der bereits beschriebenen Zwei-PCR-Klonierungsstrategie (RICHTER, 1997) wurde auch ein Vektor pNCO113 mit dem Gen *yhbC* aus *Escherichia coli* konstruiert. Es kodiert für ein hypothetisches 15,5 kDa Protein das auf der chromosomalen DNA von *Escherichia coli* unmittelbar vor dem *nusA*-Gen lokalisiert (ISHII *et al.*, 1984) ist.

Mit dem Primerpaar *yhbC*_{for} und *yhbC*_{rev} wurde in der ersten PCR 5'-terminal eine *EcoRI* und 3'-terminal eine *BamHI*-Restriktionssequenz eingeführt, im zweiten Schritt wurde 5'-terminal mit dem Primer *kEcoRI* der dem Vektor pNCO113 entsprechende Abschnitt ergänzt. Das 441 bp große Gen-Insert wurde mit den beiden Restriktionsendonucleasen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den analog restringierten Vektor pNCO113 mit T4-Ligase eingefügt.

Durch Selektion mit Ampicillin konnten positive Transformanten von *E. coli* XL1-Blue Zellen erhalten werden. Durch Plasmidisolierung und analytischem Verdau mit *EcoRI* und *BamHI* wurde die richtige Insertgröße wieder gefunden.

Leider konnte keine Expression von einem Protein *yhbC* erzielt werden. Auch eine Transformation des Plasmids pNCO113-*yhbC* in elektrokompente Zellen von *Escherichia coli* BL21 pREP4 führte nicht zum Erfolg. Trotz Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 30 und 37° C war mit SDS-PAGE keine Überexpression bei 15 kDa erkennbar.

Das Konstrukt wurde DNA-sequenziert, das Ergebnis stimmte mit dem erwarteten Aufbau von Vektor- und Gensequenz überein; im Operonbereich gab es keine Mutationen. Die erhaltene Sequenz ist in Anhang C angegeben und entspricht der in der Genbank unter der Accessions Nummer P03843 aufgeführten Sequenz. In der Gensequenz war an Position 303 Thymin durch Cytosin ersetzt, das mutierte Basentriplett codiert aber für die selbe Aminosäure Arginin. An Position 398 bewirkte die Mutation von Adenin in Thymin einen Codonwechsel; Asparagin wurde durch Isoleucin ersetzt.

3.2. NMR-Spektroskopie am NusB/*boxA* Komplex

3.2.1. Fermentation zur Darstellung von schwerisotopmarkierten NusB Protein

In früheren Arbeiten zum NusB Protein (BERGLECHNER *et al.*, 1998) wurde die Gewinnung von NusB-exprimierenden Zellen in Schüttelkulturen bei 37 °C durchgeführt. Um aber für NMR-Spektroskopie NusB Protein in großer Menge zur Verfügung zu haben, war eine Übertragung der Zellanzucht auf ein Fedbatch-Fermentersystem naheliegend. Zudem sollten die kostenintensiven Stickstoff- und Kohlenstoffquellen ¹⁵N-Ammoniumchlorid und U-¹³C-Glucose für die Schwerisotop-Markierung optimal eingesetzt werden. Die Zellausbeute für eine typische Kultur im Schüttelkolben betrug aus Erfahrungswerten ca. 3 g pro Liter. Mit einer prozessgesteuerten Fermentation unter Überwachung wichtiger Parameter, wie pH-Wert und Sauerstoffsättigung des Mediums, konnten deutlich höhere Zellausbeuten erzielt werden. Ein wichtiges Kriterium bei der Produktion von Zellmasse mit rekombinantem Protein im Bioreaktor ist neben der Kohlenstoffquelle die Wachstumsrate. Beide Faktoren haben einen nachhaltigen Einfluß auf die Ausbeute an Zellmasse und auch an exprimiertem Protein (LEE, 1996). Wird Glucose verwendet, kann bei Zufuhr im Überschuß auch unter aeroben Bedingungen eine erhebliche Acetatbildung auftreten (RIESENBERG *et al.*, 1991). Durch die Glucosefütterung werden auch hohe Wachstumsraten um 0,4 h⁻¹ erreicht. Die daraus resultierenden Acetat-Konzentrationen um 5g /Liter reduzieren durch Absenkung der Wachstumsrate die Ausbeute an Biomasse. Zudem wird die Produktion des rekombinanten Proteins signifikant inhibiert (JENSEN und CARLSEN, 1990). Um dem entgegen zu wirken, kann durch eine künstliche Mangelversorgung mit Glucose die Wachstumsrate bewusst abgesenkt werden, idealerweise unter 0,2 h⁻¹. Die unerwünschte Acetatbildung wird zurückgedrängt. Zu diesem Zweck wurde mit exponentiell ansteigender Zellzahl die Zufuhr der Kohlenstoffquelle mittels PC-Steuerung exponentiell über eine Pumpe erhöht. Die notwendige

Versorgung mit Stickstoff wurde manuell sichergestellt. Verwiesen wird in Zusammenhang mit der Computer-gestützten Fedbatch-Fermentation auch auf Kapitel 3.5.1 zur Darstellung hochdichter Zellmasse. Die Fermentationen zur Darstellung isotopmarkierten NusB-Proteins wurden typischerweise auf Minimalmedium M9 (MANIATIS *et al.*, 1982) in einem Kulturvolumen von 1 oder 2 Liter bei 37 °C durchgeführt. Als Bioreaktor stand ein Model BIOFLO3000 der Firma NewBrunswick Scientific (Nürtingen) zur Verfügung. Die Medienzusammensetzung und die Durchführung ist in den Kapiteln 2.4 und 2.7 beschrieben.

Um die Wachstumsfähigkeit des *E. coli* NusB-Klons auf Minimalmedium M9 zu testen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Eine 100 ml Kolbenkultur wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet und nach 3 Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Die Überexpression von löslichem NusB Protein konnte nach 4 Stunden Induktionszeit mit SDS-PAGE bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde mit unmarkierten Stickstoff- und Kohlenstoff-Quellen im 1L-Maßstab ein weiterer Vorversuch unternommen, um das Verhalten der Zellen bei exponentieller Glucoseversorgung zu studieren. Als Inokkumat wurde eine Vorkultur auf LB Medium im Verhältnis 1:50 verwendet. Nachdem auch im Fermenter eine Überexpression bei guter Löslichkeit erhalten wurde, konnte nun ¹⁵N- und ¹³C/¹⁵N-markiertes NusB Protein auf diesem Weg dargestellt werden. Die Fermentation für ¹⁵N-markierte Zellen im 2-Liter-Maßstab wurde vor der Induktion auf 30 °C gesenkt, wodurch die Proteinlöslichkeit noch deutlich gesteigert werden konnte. In Tabelle 3.2.1 sind Eckdaten zu den einzelnen Produktionen von markiertem NusB aufgeführt.

Markierung NusB	Glucose [g]	NH ₄ Cl [g]	OD ₆₀₀ bei Induktion	IPTG [mM]	OD ₆₀₀ bei Ernte	Zellmasse, feucht [g]	Protein [mg]
ohne	¹² C 4	¹⁴ N: 1,5	1,5	2,5	2,7	6	---
¹⁵ N	¹² C:--	¹⁵ N: 5	10	5	16,8	35	113,9
¹³ C/ ¹⁵ N	¹³ C: 4,5	¹⁵ N: 1,6	1,4	3	2,7	7,5	30

Tab. 3.2.1 Übersicht über wichtige Fermentationsdaten zur Darstellung von rekombinantem NusB Protein in verschiedenen N- und C-Markierungen. Die unmarkierte Kultur diente als Vorversuch. Das Kulturvolumen betrug ohne Markierung und bei der Doppelmarkierung 1 Liter, bei der ¹⁵N-Markierung 2 Liter. Letztere wurde zudem ab der Induktion bei 30°C inkubiert.

Das ¹⁵N-markierte Protein wurde neben der Strukturaufklärung des NusB Proteins im Komplex mit *rrn boxA* RNA auch für Affinitäts-Studien mit *boxA*-analogen RNA-Oligonucleotiden verwendet.

3.2.2 Darstellung stabiler Proben von NusB-Protein/*boxA* RNA

3.2.2.1 RNA-Stabilitätsassay

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bedingungen geschaffen werden, um eine NMR-basierende Aufklärung der NusB-Proteinstruktur im Komplex mit der *boxA*-RNA aus *E coli* zu ermöglichen. Aus früheren NMR-Experimenten war bekannt, dass die zugegebene RNA nach relativ kurzer Zeit abgebaut wird und in einem HSQC-Experiment die Signalsätze von komplexiertem und unkomplexiertem NusB-Protein ineinander überlagern. Eine Reinigung der Proteinprobe unter denaturierenden Bedingungen konnte die Stabilität zwar verbessern (HUENGES, 1999) führte aber zu hohen Verlusten bei der anschließenden Renaturierung. Da für die Strukturaufklärung NusB Protein mit komplexer Isotopmarkierung verwendet werden sollte, wurde von dieser Methode abgesehen.

Ribonucleinsäure ist in der Handhabung ein äußerst anspruchsvolles Biopolymer. Neben alkalischen Bedingungen, die zur Hydrolyse führen würden, sind vor allem Ribonucleasen zu nennen, vor allem die ubiquitäre RNaseA aus Plazentagewebe, die zu einem unerwünschten Abbau von RNA führen können. Die Voraussetzung für die NMR-Messungen waren also stabilisierende Bedingungen für möglichst ribonucleasefreies NusB-Protein im Komplex mit *boxA* RNA. Das NusB Protein wurde dabei in verschiedenen Markierungsmustern mit ^{15}N -Stickstoff und ^{13}C -Kohlenstoff eingesetzt.

Zuerst mußte eine Methode entwickelt werden, um den Grad der RNase-Kontamination von NusB Protein bestimmen zu können. Es wurde ein Detektionssystem mittels HPLC zur Quantifizierung der nach einer bestimmten Zeit in einer NusB-Probe noch vorhandenen RNA etabliert. Der RNA-Verlust in einer Mischung mit Protein pro Zeiteinheit war dadurch zugänglich und ergab für die vermessen Probe eine Vorstellung von deren RNA-schädigendem Potential. Die Erkenntnisse aus diesen Experimenten dienten dann im weiteren Projektverlauf dazu, eine Bewertung der Haltbarkeit von NMR-Proben vornehmen zu können. Darüber hinaus wurden im Rahmen der Proteinreinigung die einzelnen Schritte mit Hilfe des Assays auf ihre Stabilitätsförderung untersucht.

Die Analysen wurden mit einer Gradienten-HPLC-Anlage und einem Anionenaustauscher NUCLEOGEL SAX 1000-8/46 durchgeführt. Als Puffersystem wurde 20 mM Kaliumphosphat bei pH 6,5 mit 5 M Harnstoff verwendet. NusB Protein sowie eventuell vorhandene Ribonucleasen wurden dadurch denaturiert und störten im Assay nicht. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 0 bis 1 M Natriumchlorid über 30 ml mit einer Flußrate von 1 ml/min entwickelt

und die RNA bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Das aufgetragene Probevolumen betrug 10 µl. Chargen von NusB Protein, die auf mögliche RNA-schädigende Nebenbestandteile hin untersucht werden sollen, wurden mit *boxA* RNA gemischt.

Um den zu erwartenden Peak der *boxA*-RNA identifizieren zu können, wurden folgende Vorarbeiten durchgeführt: Es wurde ein Chromatogramm mit einem Kaliumphosphatpuffer aufgenommen, der schon in früheren NusB/RNA-Messungen (BERGLECHNER, 1998; HUENGES, 1999) verwendet worden war: 70 mM Kaliumphosphat bei pH 7,0 mit 0,02% Natriumazid. Dieser NMR-Puffer wurde, wie unter 2.11 beschrieben, mit Diethylpyrocarbonat vorbehandelt, um Ribonucleasen zu entfernen. Im zweiten Lauf wurde nur NusB Protein in NMR-Puffer chromatographiert, um Aufschluß über Protein-Signale im Chromatogramm zu erhalten.

Im dritten Schritt wurde nur *boxA* RNA eingesetzt. Die *boxA* RNA wurde von der Firma Xeragon (Zürich) nach der Phosphoramidit-Methode an fester Phase synthetisiert und als Lyophilisat ausgeliefert. Das Oligonucleotid umfasste die dodecamere *boxA*-Sequenz. Die RNA wurde in 70 mM Kaliumphosphat bei pH 7,0 und 0,02% Natriumazid als Protein/RNA-Probenpuffer (NMR-Puffer) aufgenommen. Die Konzentration wurde mit UV-Photometrie bei 254 nm Wellenlänge zu 14 mM bestimmt und für eine sparsame Verwendung in einer Verdünnung von 1:50 in den Analyseproben eingesetzt. Bei 490 mM NaCl wurde *boxA* RNA in einer Fraktion von der Säule verdrängt.

Zuerst mußte ein Zusammenhang zwischen Höhe oder Integral des RNA-Signals in Abhängigkeit von der Konzentration unbeschädigter *boxA* RNA in der Lösung gefunden werden. Dazu wurde von der RNA-Stocklösung eine Verdünnungsreihe angesetzt, die in Tabelle 3.2.2 gezeigt wird. Von jeder RNA-Verdünnung wurden 10 µl als Probe mit HPLC untersucht und das bei 254 nm Wellenlänge detektierte Signale ausgewertet. Nach 10 Minuten eluierte die *boxA* RNA in einer Fraktion von der Säule. Das Signal wurde mit Knauer ChromGate Software integriert.

Verdünnung	Integral	Prozent von 1:50	theoretischer Wert
1:50	13346981	100 %	100 %
1:75	10448505	78,3 %	75 %
1:100	6989393	52,4 %	50 %
1:200	4166214	31,2 %	25 %
1:250	2978809	22,32 %	20 %

Tab. 3.2.2 Verdünnungsreihe von deoxy-*boxA* RNA in Beziehung zum Signalintegral, detektiert bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Als nächste Stufe wurden Proben von RNA/Protein-Mischungen chromatographiert. Um einen ersten Überblick über das Testverfahren zu erhalten wurden diverse vorhandene NusB Proben untersucht.

Die Proben wurde analog einer NMR-Probe mit 1 mM NusB Protein, 1mM RNA in NMR-Puffer angesetzt. Sofort nach dem Mischen wurden 10 µl als Nullwert vermessen und dann nach einer und zwei Stunden sowie nach 2 Tagen. Ausgefallenes Protein wurde für 10 Minuten bei 14000 UpM abzentrifugiert, um keine festen Bestandteile auf die HPLC-Säule zu injizieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.3 dargestellt.

	Nullwert	1 Stunde	2 Stunden	2 Tage
RNA	100 %	100 %	96 %	45 %
RNA/Protein	100 %	82%	70 %	11 %

Tab. 3.2.3 Assay von *boxA* RNA und *boxA* RNA/NusB Mischung. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Höhe des ursprünglichen RNA-Signals im Chromatogramm.

Die RNA-Zerstörung durch die NusB-haltigen Lösungen war wesentlich stärker als im reinen NMR-Puffer, der eine längere Lagerung von RNA bei Raumtemperatur ermöglichte. Für eine mehrdimensionale NMR-Messung über mehrere Tage wäre in der NusB Probe spätestens am dritten Tag keine RNA mehr vorhanden gewesen. Die Anteil von RNase oder anderen RNA-schädigenden Substanzen war demnach zu hoch. Das Protein zeigte bei starker Überladung bei der SDS-PAGE noch Begleitbanden.

3.2.2.2 Modifizierung der NusB-Proteinreinigung

Um eine Kontamination von NusB Protein mit RNasen für die NMR-Experimente zu vermeiden, wurde die Reinigung nach BERGLECHNER (1997) modifiziert. Bakterienzellen von *Escherichia coli* M15 [pNCO113-*nusB*] wurden im Bioreaktor, wie unter 2.7 und 3.2.1 beschrieben, kultiviert und ¹⁵N- oder ¹⁵N/¹³C-markiertes NusB Protein überexprimiert.

Die *E. coli* M15 Zellen mit NusB Protein wurden nach Lagerung bei -20°C auf Eis aufgetaut und in dem entsprechenden Säulenpuffer für den ersten Schritt resuspendiert. Der Aufschluß wurde mit Ultraschall wie unter 2.9.1 beschrieben durchgeführt. Ein Vergleich mit dem French-Pressverfahren brachte keinen verbesserten Zellaufschluß. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Rohextrakt verschiedenen chromatographischen Methoden unterzogen, die im folgenden beschrieben werden. Die Zielsetzung dabei war, NusB Protein in maximaler Homogenität und weitgehend frei von RNA-schädigenden Bestandteilen zu erhalten. Über den RNA-Stabilitäts-Assay wurden die Informationen gewonnen, ob der jeweilige Reinigungsschritt eine Verbesserung bewirkte oder nicht. Alle Schritte zur Proteinreinigung wurde unter besonder-

en Bedingungen zur Vermeidung von RNasen durchgeführt, die in Kapitel 2.11 näher erläutert sind.

Feuchte Zellen mit NusB Protein wurden in einem 25 mM Tris-Puffer bei pH 8,5 resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde auf eine QSepharoseFF Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wurde über ein Volumen von 700 ml mit einem Natriumchlorid-Gradienten von 0 bis 750 mM entwickelt. NusB Protein wurde bei 120 mM NaCl in einem Volumen von 60 ml vom Anionenaustauscher verdrängt. NusB-haltige Fraktionen wurden mittels Assay untersucht. Die untersuchten Fraktionen wurden durch Verdünnung mit NMR-Puffer auf die gleiche Konzentration an Gesamtprotein eingestellt. Dadurch konnte eine Relation zwischen Proteingehalt und RNase-Aktivität oder allgemein der Geschwindigkeit des RNA-Abbaus aufgestellt werden. Es zeigte sich, dass in Proben mit hohem NusB-Anteil die RNA-Instabilität auch am größten war. Die Leerprobe ohne Protein war unmittelbar nach dem Mischen und nach 2 Stunden im RNA-Gehalt nahezu unverändert. In den Fraktionen mit dem größten NusB-Gehalt fand in den ersten 120 Minuten ein vollständiger Abbau der RNA statt, wohingegen in späteren Fraktionen mit niedrigerem NusB-Anteil noch nach 3 Tagen RNA nachweisbar war. Die RNA-schädigende Wirkung konnte direkt mit den NusB-haltigen Fraktionen korreliert werden.

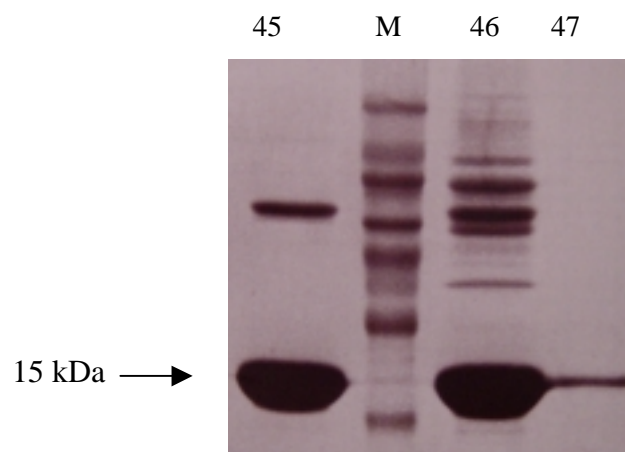


Abb. 3.2.1 SDS-PAGE: Hauptfraktionen nach Anionenaustauscher-Chromatographie mit Source 15Q.

Das NusB-haltige Eluat wurde ultrafiltriert und über Source 15Q, einem starken Anionenaustauscher mit höherem Auflösungsvermögen, gereinigt. Als Puffer wurde 25 mM Natriumborat bei pH 8,5 mit 0,02% Natriumazid verwendet. Diesen Puffer konnte man im Gegensatz zu einem Tris-System mit 1 ‰ DEPC behandeln.

Die Säule wurde in 14 Säulenvolumen mit einem Gradienten von 0 bis 750 mM Natriumchlorid entwickelt. Bei einer Natriumchloridkonzentration von 80 mM wurde NusB Protein vom Säulenmaterial verdrängt und eluierte in einem Volumen von 20 ml.

Die Fraktion 45 aus dem Source 15Q-Lauf zeigte nur zwei Banden, die stärkere von NusB Protein, eine schwächere bei 30 kDa. Die andere Fraktion des NusB Protein war nach Prüfung durch SDS-PAGE immer noch durch einige Banden im Bereich von 25 bis 45 kDa verunreinigt (Abbildung 3.2.1). Eine Überprüfung der Chromatographie mit dem Stabilitätsassay (Tabelle 3.2.4) ergab eine erhöhte Stabilität für NusB-haltiges Eluat im Gegensatz zu dem stärker RNA-schädigenden Durchlauf.

	Nullwert	2 Stunden	1 Tag
Durchlauf	100 %	----	7.1 %
Fraktion 45	100 %	76.5 %	42.1 %
Fraktion 46	100 %	77.6 %	37.2 %

Tab. 3.2.4 Assay von NusB-Proteinfractionen nach Anionenaustausch mit Source 15Q.

Die NusB-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und auf ein Volumen von 2×5 ml konzentriert auf eine Gelfiltrationssäule **SuperdexG75** (Pharmacia) aufgetragen. Das Protein wurde in 33 ml pro Lauf eluiert und zeigte neben der prominenten Proteinbande bei 15,6 kDa nur noch eine weitere, weniger ausgeprägte bei ca. 30 kDa.

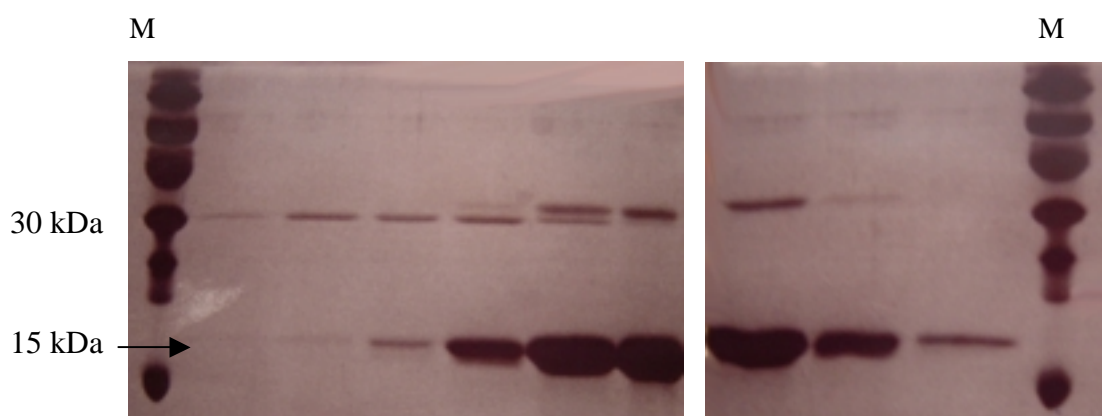


Abb. 3.2.2 SDS-PAGE: Gelfiltration über SuperdexG75 mit NusB Protein. Die zwei Banden im Bereich von 30 kDa wurden beide durch Edman-Abbau als NusB Protein identifiziert.

In Abbildung 3.2.2 ist das Ergebnis einer SDS-PAGE nach der Gelfiltration gezeigt. NusB Protein ist nahezu bis zur Homogenität gereinigt und nur noch von zwei Banden in Höhe von 30 kDa begleitet. Durch Edman-Abbau konnten die Sequenzen der ersten 10 Aminosäurereste

beider Banden ermittelt und als die von NusB Protein identifiziert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen Gelartefakt bei der Konditionierung mit SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.3) handeln muß. Die scheinbare Koelution von Proteinen mit 15 und 30 kDa ist eher unwahrscheinlich, auch wenn für das Prinzip der Gelfiltration neben dem Molekulargewicht auch die Morphologie der zu trennenden Substanzen von Bedeutung ist. Das Protein wurde ultrafiltriert, auf eine Endkonzentration von 1 mM eingestellt und in flüssigem Stickstoff deponiert. Ein Aliquot des Proteins wurde für weitere Einzelmaßnahmen herangezogen, um weitere Methoden zu studieren, die eventuell noch eine deutliche Erhöhung der RNA-Stabilität bewirken könnten.

Als weitere Reinigungsvariante wurde eine Ammoniumsulfatfällung mit NusB Protein durchgeführt. Der geeignete Prozentsatz an Ammoniumsulfat wurde in einer Fällungsreihe ermittelt. Ein Milliliter NusB-Protein wird mit kaltgesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entsprechend den Angaben in Tabelle 3.2.5 versetzt und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem nächsten Volumen Ammoniumsulfat-Lösung aufgefüllt.

Prozent	10	20	30	40	50	60	70	80
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,11 ml	0,14 ml	0,18 ml	0,24 ml	0,33 ml	0,5 ml	0,63 ml	1,04 ml
Volumen	1,11 ml	1,25 ml	1,43 ml	1,67 ml	2,0 ml	2,5 ml	3,13 ml	4,17 ml

Tab. 3.2.5 Ammoniumsulfatreihe zur Fällung von NusB Protein.

Ab 60% Ammoniumsulfat bildete sich durch das Zentrifugieren ein Pellet aus. Eine Untersuchung mit dem RNase-Assay ergab keine nennenswerte Verbesserung der RNA-Stabilität. Auch durch Chromatographie mit hydrophober Interaktion mit absteigendem Ammoniumsulfatgradienten konnten keine Fortschritte erzielt werden.

Ein Teil der NusB-Lösung wurde auf eine **MonoS**-Säule (Pharmacia), einem starken Kationenaustauscher, aufgetragen, die Säule mit 20 mM Puffer bei pH 7,4 und 1 mM EDTA sowie 0,02% Natriumazid gewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl in einem Volumen von 30 ml entwickelt. Es wurden Proben nach einem und zwei Tagen genommen. Das RNA-Signal in den Auftragsproben vor der MonoS-Säule war bereits nach einem Tag völlig verschwunden. Für die Hauptfraktion nach dem Kationenaustauscher war nach einem Tag noch 87,2 %, am zweiten Tag noch 85,9 % des RNA-Peaks vorhanden. Das von einzelnen Nucleotiden erzeugte Signal, das eine Minute nach Chromatographie-Start eluierte, nahm über die drei MonoS-Proben stetig zu. Auf die MonoS-Säule konnte allerdings nur eine geringe Menge

Protein aufgetragen werden, so dass die Konzentration von NusB niedriger lag als in anderen Assay-Ansätzen.

Als nächstes wurde eine Chromatographie mit einer analytischen **Hydroxylapatit-Säule** mit 20 mM Kaliumphosphat bei pH 6,9 und 2 mM DTT und Natriumazid geprüft. Mit einer Flußrate von 2 ml/min und einem Gradienten über 35 Säulenvolumen von 0 bis 1 M Kaliumphosphat bei pH 6,9 wurden 4 ml NusB auf die Säule aufgetragen. Das Protein wurde vollständig gebunden, bei 145 mM Kaliumphosphat von der Hydroxylapatit-Säule verdrängt und eluierte in einem Volumen von 3 ml. Die Dimerbande, die bei ca. 30 kDa in der SDS-PAGE präsent war, konnte abgetrennt werden (Abbildung 3.2.3).

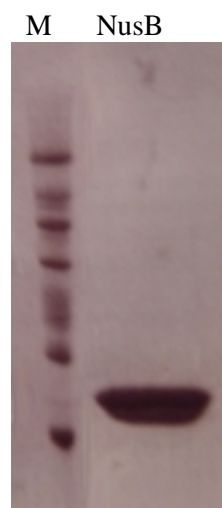


Abb. 3.2.3 SDS-PAGE: NusB Protein nach Chromatographie mit Hydroxylapatit: Die Banden bei 30 kDa konnten entfernt werden.

Die Auswertung der Fraktion mit dem Assay ergab allerdings keine Verbesserung der RNA-Stabilisierung. Damit wurde bestätigt, dass eine Probe die nach SDS-PAGE zwar sauberes Protein enthielt, nicht frei von RNA-abbauenden Substanzen sein mußte. Vor allem Ribonucleasen zeigen in Konzentrationen, die deutlich unter der Auflösungsgrenze der SDS-PAGE liegen, noch erhebliche Aktivität.

Die letzte Chromatographie wurde mit einer Affinitätssäule an **Blauer Sepharose** Cibacron blue 3 GA (Typ 3000 CL) mit 20 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM EDTA bei pH 6,9 durchgeführt. Es wurden 3,2 mg NusB in einem Volumen von 2 ml (0,1 mM) aufgetragen. In Fraktion 3 wurde das NusB-Dimer bei 30 kDa ebenfalls abgetrennt.

Der Auftrag zeigte im Stabilitäts-Test nach einem Tag keine RNA mehr, das Puffersystem selbst verringerte die in der Probe enthaltene RNA nicht. In Tabelle 3.2.6 ist das Ergebnis für die NusB-Hauptfraktion angegeben. Nach 2 Tagen ist nach über 50 % der RNA-Menge in der Probe vorhanden.

	Nullwert	1 Tag	2 Tage
Fraktion 1	100 %	74,05	57,8 %

Tab. 3.2.6 RNA-Assay mit NusB Protein nach Chromatographie mit Blauer Sepharose.

Bei allen Reinigungsversuchen war festzustellen, dass die NusB-Protein enthaltenden Fraktionen immer einen stärkeren RNA-Abbau bewirkten als zum Beispiel der Puffer in den Durchlauf- und Waschfraktionen oder eine Pufferprobe nach der Proteinelution. Daher wurde untersucht, ob diese RNA-Degenerierung bei NusB Protein besonders ausgeprägt war oder ob auch andere Proteine diese Wirkung gegenüber *boxA* RNA zeigen. Ein Vergleich zwischen NusB und NusG Protein wurde durchgeführt. Nach einem Tag ist in der NusB/*boxA*-Mischung keine *boxA*-RNA mehr detektierbar. In der NusG-Probe sind noch 31 % der ursprünglichen RNA-Menge vorhanden. Dabei waren die Proben in der Proteinkonzentration und dem Reinheitsgrad vergleichbar.

3.2.2.3 Zusammensetzung stabiler NMR-Proben von Protein/RNA-Komplex

Um ein geeignete Zusätze zur Stabilisierung der RNA in der Probenlösung zu finden, wurden eine Reihe von Additive mit dem RNA-Assay untersucht. Zur Auswahl standen EDTA, DTT und RNasin, ein Ribonuclease-Inhibitor für eukaryotische RNase A. Als Protein-Charge wurde NusB Protein nach drei Chromatographie-Schritten verwendet, dass auch in starker Überladung in der SDS-PAGE keine Begleitproteine mehr aufwies. Dennoch waren die Proben, wie oben ausgeführt, nicht frei von RNA-degenerierenden Anteilen.

Zuerst wurde die Wirksamkeit des RNaseA-Inhibitors RNasin geprüft. Eine Mischung von NusB Protein und *boxA* RNA wurde mit 5 ng RNase A versetzt und jeweils mit und ohne Inhibitor (1%) bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einer Stunde sind in der ungeschützten Probe noch 65 % der ursprünglichen RNA nachzuweisen. Die Probe mit Inhibitor ist dagegen im RNA-Gehalt unverändert bei 100%. Trotzdem konnten sowohl RNasin als auch DEPC über einen längeren Zeitraum keinen ausreichenden Schutz vor RNA-Abbau bieten. Versuche mit 5 mM EDTA in den Proben bewirkte auch keine längere Haltbarkeit, nach einem Tag war keine *boxA* RNA mehr nachweisbar.

In einer anderen Strategie wurde versucht, die Stabilität der RNA selbst zu erhöhen. Dazu wurde geprüft, ob eine Komplexierung von *boxA* RNA-Analoga durch NusB Protein möglich ist. In den bisherigen Versuchen wurde als *boxA*-Motiv eine dodecamere RNA-Sequenz eingesetzt. Um gegen RNasen, die als Exoribonucleasen von den Strang-Enden her die RNA abbauen eine mögliche Blockierung zu bewirken, wurde die *boxA*-RNA als RNA-DNA-Hybrid synthetisiert. Am 5'- und 3'-Terminus wurden je zwei Deoxyribonucleotiden entsprechend der *rrn* Operonsequenz eingefügt. Dabei übertraf die gecappte RNA die ungeschützte RNA deutlich in der Haltbarkeit. Im Rahmen des Assays wurden folgende Daten erhalten: nach einem Tag sind noch 69,3 %, nach

2 Tagen noch 58,5 % der ursprünglichen RNA-Menge vorhanden. Mit diesem *boxA*-Analogon wurden bereits Stabilitäts-Assays mittels HSQC-NMR-Messungen durchgeführt. In den NMR-Messungen wurde für einen Zeitraum von 65 Stunden nur eine marginale Degeneration der RNA-DNA *boxA* verzeichnet. Für diese Messungen wurde ein Probenansatz von 0,5 mM NusB Protein mit 0,7 mM deoxy-*boxA* RNA gewählt. Eine Veränderung des Spektrums wird aber erst eintreten, wenn die RNA um Unterschluß gegenüber dem Protein vorliegt, erkennbar am Signalsatz von teilkomplexiertem Protein, der als verschobenes Spektrum auftritt. Eine RNA-Degeneration bis zu diesem 1 : 1-Verhältnis NusB/*boxA* konnte bereits vorliegen, ohne dass sie aus dem NMR-Experiment erkennbar war. Aus dieser Überlegung wurde eine Proteinprobe mit der im Verhältnis zum Protein doppelten Menge an *boxA* RNA versetzt und über HPLC analysiert. Nach drei Tagen waren, wie in Tabelle 3.2.7 aufgeführt, noch ungefähr 80 % der zugesetzten RNA vorhanden, obwohl es sich nicht um die deoxy-gecappte Version handelte. Solange für die Aufrechterhaltung des Komplexverhältnisses von Protein zu RNA = 1 : 1 genügend *boxA* RNA vorhanden ist, sollten daher strukturelle Untersuchungen mittels NMR möglich sein.

Probe	Retentionszeit RNA	Integral	Prozent
Nullwert	10,3 Minuten	22935522	100 %
1 Tag	10,1 Minuten	20636871	92,4 %
2 Tage	10,2 Minuten	18839592	82,1 %
3 Tage	10,1 Minuten	18301641	79,8 %

Tab. 3.2.7 NusB-Protein (0,7 mM) mit 1,4 mM *boxA* RNA im RNA-Assay.

Für die Zubereitung einer ausreichend stabilisierten NusB/*boxA*-NMR-Probe wurden nun alle verfügbaren und sinnvollen Additive zu einer Rezeptur zusammengestellt, die einen ausreichenden Zeitrahmen für mehrdimensionale heteronucleare NMR-Pulsprogramme bot. Das Protein selbst wurde in einer Konzentration um 1,3 mM vorgelegt, ein Wert der aus Erfahrung einen vernünftigen Kompromiss zwischen erwünschter Auflösung der Spektren und Stabilität des Proteins gegen Denaturierung darstellte. Die RNA wurde als RNA-DNA-Hybrid im Verhältnis zum Protein in drei-vierfachem Überschuß zugegeben, um aufwendige mehrdimensionale NMR-Experimente mit Meßzeiten über mehrere Tage zu ermöglichen. Zudem wurde 1 % des Ansatzvolumens an RNase-Inhibitor RNasin[®] eingesetzt, da es nachweislich einen Schutz gegen RNase A bot, die trotz entsprechender Handhabung der Proben nie völlig auszuschließen war. Zudem wurden EDTA und DTT in millimolaren Konzentrationen verwendet um die Synergieeffekte aller Maßnahmen nutzen zu können (Tabelle 3.2.8).

Stocklösung	Bezeichnung	Endkonzentration	Volumen
2,08 mM	NusB Protein (^{15}N)	1,33 mM	250 μl
30 mM	<i>boxA</i> RNA (deoxy)	5,43 mM	67 μl
200 mM	DTT	5 mM	10 μl
100 mM	EDTA	1.6 mM	6 μl
99,9 %	D ₂ O	10 %	33 μl
100 %	RNasin [®]	1 %	4 μl
-----	Gesamtvolumen	-----	370 μl

Tab. 3.2.8 Zusammensetzung einer NMR-Probe am Beispiel von ^{15}N -markiertem NusB Protein.

Von dieser Komposition wurde ebenfalls Proben analysiert. Nach einem Tag waren noch über 85 % der RNA vorhanden. Der Wert liegt deutlich niedriger als für den Ansatz von Tabelle 3.2.7. Es ist aber zu berücksichtigen, dass im Probenansatz der Tabelle 3.2.8 selbst ein Rest von 25 % der ursprünglichen RNA-Menge immer noch eine vollständige Komplexierung des NusB Proteins garantiert und im NMR zu keinen Veränderungen führen wird. Die Proben hielten über zwei Wochen diversen 3D-NMR-Messungen stand und zeigten keine Veränderungen des Signalsatzes in kontrollweise gemessen ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren.

3.2.3 Struktur von NusB-Protein im Komplex mit *boxA* RNA

Für die Strukturaufklärung großer Proteine werden unter anderem ^{15}N - und ^{13}C -isotopenmarkierte Proteine verwendet. Diese Spin $\frac{1}{2}$ -Kerne werden über die Fütterung von Bakterien mit entsprechend markierten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen ins Protein eingeführt. Für die NMR-Spektroskopie eröffnet sich dadurch ein weiter Bereich an heteronuclearen Kopplungsexperimenten. Mit den ^1J -Kopplungen stehen zusätzlich wesentlich größere Kopplungskonstanten als die homonuclearen Konstanten zwischen Wasserstoffatomen zur Verfügung. Aus dem deutlich effizienteren Magnetisierungstransfer ergeben sich für ^{15}N - und ^{13}C -markierte Proteine viel geringere Zeitspannen $\tau = \frac{1}{J}$ für einen vollständigen Kohärenztransfer. Heteroatome relaxieren zudem deutlich langsamer als die Protonen. Während der Dauer der Pulssequenz lässt sich so viel mehr Kohärenz bis zur Detektion erhalten. Durch die Aufspaltung in einer Dimension über die Heterokerne können Signalüberlagerungen reduziert werden.

Markierung	Anzahl der Proben	Menge [mg]
^{15}N	4	60
$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$	4	60

Tab. 3.2.9 Stabilisotopmarkierung von NusB mit den jeweils dargestellten Mengen an Protein.

Für die Zuordnung des NusB/*boxA*-Komplexes wurden am Lehrstuhl von Prof. Kessler zahlreiche 2D- und 3D-Experimente an verschiedenen schwerisotop-markierten NusB-Proben im Komplex mit unmarkierter *boxA*-RNA aufgenommen. Eine Übersicht über die verwendeten Markierungen ist in Tabelle 3.2.9 gegeben.

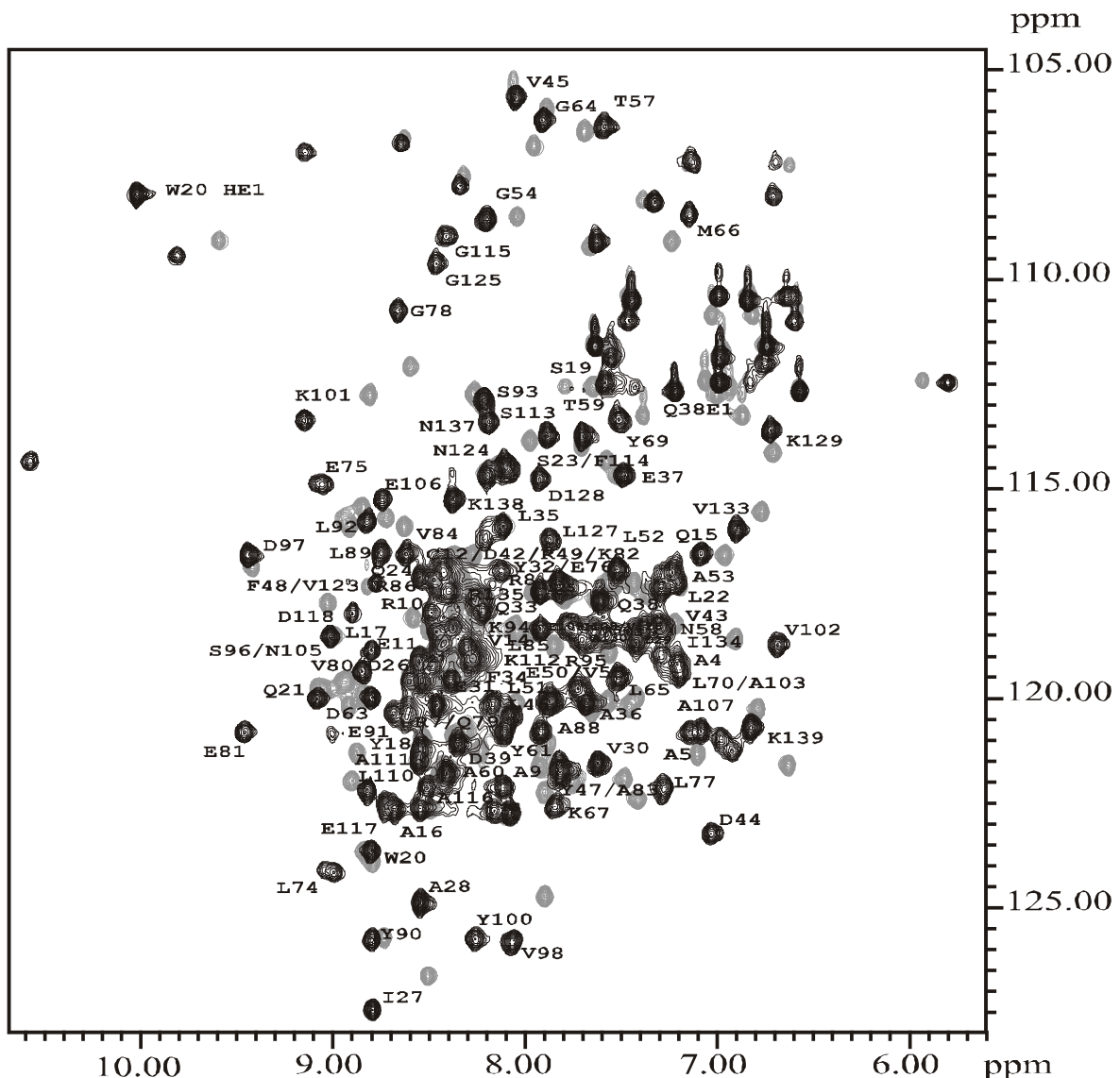


Abb. 3.2.4 ^{15}N -HSQC von NusB und NusB/*rnr boxA* mit Zuordnung der Amidresonanzen. Messung und Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurden am Lehrstuhl von PROF. DR. KESSLER durchgeführt.

Da sich im ^{15}N -HSQC-Datensatz des komplexierten NusB Proteins, der in Abbildung 3.2.4 in schwarz dargestellt ist, deutliche Unterschiede gegenüber dem Spektrum des freien NusB Proteins (in Abbildung 3.2.4 grau eingefärbt) ergaben, war eine vollständig neue Zuordnung erforderlich. Die Struktur von freiem NusB-Protein ist gekennzeichnet durch sieben α -Helices. Da die Mehrzahl der NMR-Signale durch Komplexbildung mit *boxA*-RNA erhebliche Änderungen

der chemischen Verschiebung erfahren, galt es abzuklären, ob sich die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins bei der Komplexbildung tief greifend verändert.

Für die sequenzielle Zuordnung wurden starke $\text{HN}_i\text{-HN}_{i+1}$ Kreuzsignale in HNH- und NNH-NOESY Spektren herangezogen. Aus dem HNH-NOESY (^{15}N -HSQC-NOESY) wurden Beziehungen von allen ^{15}N -gebundenen Protonen zu allen Protonen gewonnen. Durch das NNH-NOESY (^{15}N -HSQC-NOESY- ^{15}N -HSQC) wurden HN-HN-Kontakte analysiert.

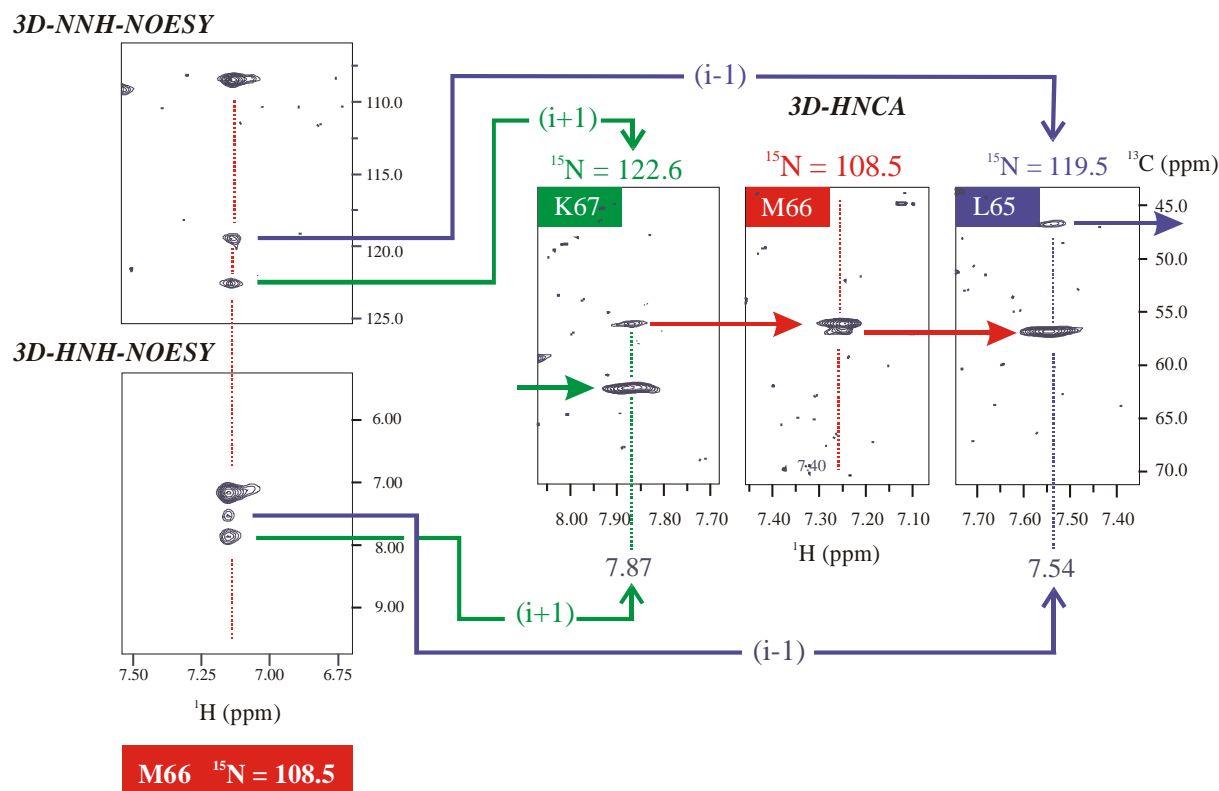


Abb. 3.2.5 Rückgrat-Zuordnung am Beispiel von Methionin66; über das 3D-HNCA-Experiment erhält man die $\text{C}\alpha$ von der eigenen und vorhergehenden Aminosäure. Im NNH-NOESY findet man die zum ^{15}N von M66 koppelnden Stickstoffverschiebungen der sequenziellen Aminosäuren $i+1$ und $i-1$. Über das zum HNH-NOESY die Amidprotonen zu den sequenziellen ^{15}N -Kernen von M66.

In Kombination mit einem HNCA und einem HNCOC Spektren konnten 93% aller Backbone-Resonanzen zugeordnet werden (Abbildung 3.2.5). Durch das HNCOC-Experiment können zum Amidsignal $\text{HN}(i)\text{-H}(i)$ der eigenen Aminosäure des Proteinrückgrats der Carbonylkohlenstoff $\text{CO}(i-1)$ der vorhergehenden Aminosäure zugeordnet werden. Das HNCA-Spektrum korreliert die $\text{HN}(i)\text{-H}(i)$ -Verschiebungen der Amidfunktion der eigenen Aminosäure mit der $\text{C}\alpha$ -Verschiebung der eigenen $\text{C}\alpha(i)$ und der vorhergehenden $\text{C}\alpha(i-1)$ Aminosäure.

Die ^1H - und ^{13}C -Signale der Seitenketten- Spinsystem wurden mit einem HCCH-TOCSY-Experiment (^{13}C -HSQC-TOCSY- ^{13}C -HSQC) zugeordnet. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen mit einer $\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ markierten Probe gemessen und miteinander korreliert

(FESIK *et al.*, 1990). Für benachbarte HC-Kontakte wurde ein HCCH-COSY-Experiment (^{13}C -HSQC-COSY- ^{13}C -HSQC) aufgenommen. Da es bei den Seitenkettensignalen zu zahlreichen Überlagerungen kam, war eine Auswertung der entsprechenden Spektren schwierig. Eine Lösung dieser Problematik konnte durch Korrelation der ^1H - und ^{13}C -Seitenkettensignale mit den H_N und N-Signalen des Proteinrückgrats erreicht werden. Die Zahl der Stickstoffe im Rückgrat ist wesentlich geringer und ihre Dispersion relativ gut (LOGAN *et al.*, 1992, GRZESIEK *et al.*, 1993). Mit einem H(CCCO)NH-Experiment (^{13}C -HSQC-TOCSY- ^{15}N -HSQC) wurde die Datenanalyse wesentlich erleichtert. Die chemischen Verschiebungen der Seitenketten konnten anhand der chemischen Verschiebungen der Amidsignale der nachfolgenden Aminosäure ermittelt werden. Die Auswertung der aufgenommenen 3D-NMR-Spektren ermöglichte die Zuordnung der "Backbone"-Signale des Proteins mit einer Vollständigkeit von 92 % und 78 % in Bezug auf alle Protonen inklusive der Seitenketten.

Für die Ermittlung der Sekundärstruktur können nach der Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats die chemischen Verschiebungen der verschiedenen Atomtypen (C^α , C^β , CO und H^α) analysiert werden. Die „Chemical Shift Index“ Methode wurde als grundlegender Indikator für die Bestimmung der Sekundärstrukturelemente von NusB verwendet. Innerhalb von α -Helices oder β -Faltblättern erfahren die chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats charakteristische Hoch- oder Tieffeldverschiebungen. Als Standard der chemischen Verschiebung wird hierfür der „random coil-Wert“ der entsprechenden Aminosäure verwendet. So wird in α -helikalen Bereichen eine Verschiebung der H^α - und, etwas weniger ausgeprägt der C^β -Resonanzen zu tieferen Werten beobachtet, die C^α - und die CO-Signale sind jedoch zu höheren Werten verschoben. Verglichen mit den α -Helices zeigen β -Faltblätter umgekehrte Abweichungen, wobei die Effekte bei C^β hier deutlich ausgeprägter sind als bei C^α . Auf Basis der chemischen Verschiebung der C^α -Atome zeigte das an *boxA* RNA gebundene NusB Protein eine helicale Sekundärstruktur, die sieben Helices enthält. Damit ergeben sich gegenüber dem unkomplexierten NusB Protein keine tief greifenden strukturellen Veränderungen. Die Bindung an die RNA bewirkt aber eine Erweiterung der Helix α_1 in den Bereich der Reste 5 bis 10 (Abbildung 3.2.6).

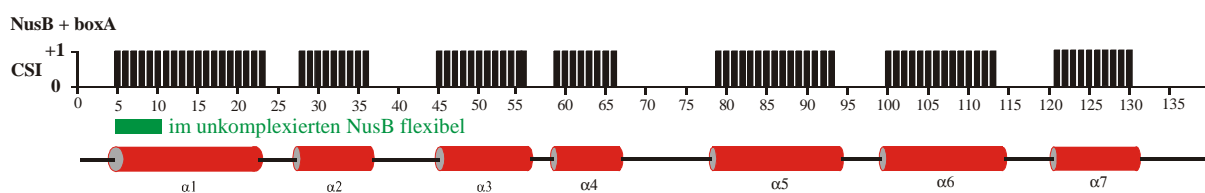


Abb. 3.2.6 C^α -CSI Werte von NusB Protein gebunden an *rrn boxA* RNA.

Wie bereits erwähnt traten durch die Bindung von NusB Protein an die *boxA* RNA zahlreiche Veränderungen im ^{15}N -HSQC Spektrum auf. Die intensivsten Unterschiede liegen im Bereich der C-terminalen Domäne des Proteins. In Abbildung 3.2.7 sind die Abweichungen der Signalintensitäten im HSQC-Spektrum zwischen freiem und komplexiertem NusB Protein dargestellt. Sie geben einen Hinweis auf die unterschiedliche Dynamik der beiden NusB-Untereinheiten in Bezug auf die Bindung an die *boxA* RNA.

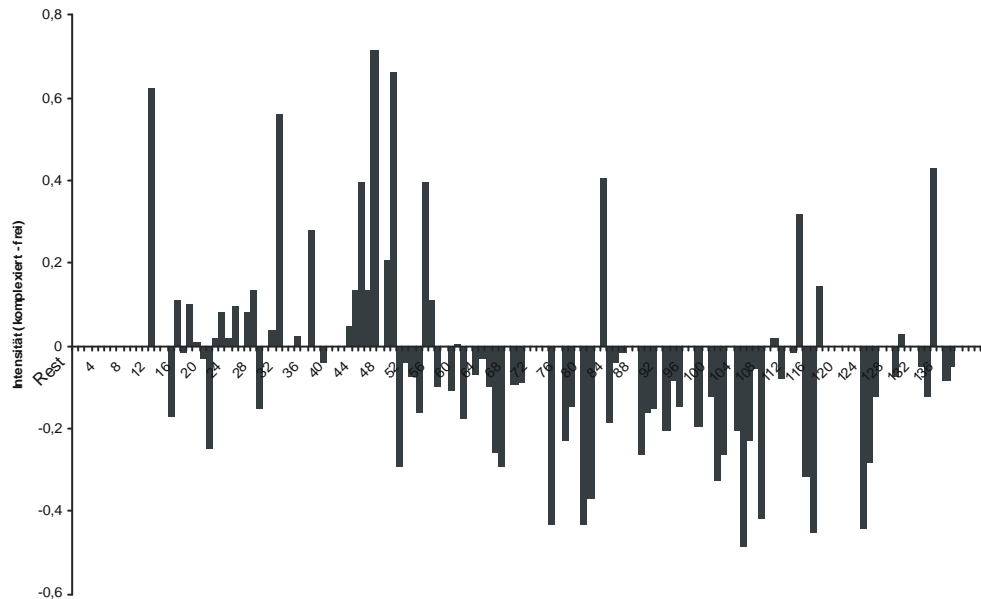


Abb. 3.2.7 Graphische Darstellung der Unterschiede der ^{15}N -HSQC Intensitäten im NusB/*boxA* Komplex verglichen mit unkomplexiertem NusB.



Abb. 3.2.8 Lokale *root-mean-square* Abweichungen (RMSD) zwischen voraussichtlicher Komplexstruktur und unkomplexiertem NusB Protein. Die Abweichungen zwischen den beiden Strukturen steigen in den Farben Blau, Violett und Rot an.

Erste strukturelle Berechnungen auf Grundlage einer quantitativen Evaluierung der HNH, NNH und CNH-NOESY-Spektren deuten klar darauf hin, dass die globale Faltung von NusB/*boxA* in einem Bereich von 3 Å des Backbones unverändert bleibt (Abbildung 3.2.8). Die Reste K82 und R86 sind deutlich besser zugänglich, was auf eine mögliche RNA-Exposition hinweisen könnte.

3.3 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

3.3.1 Die Methode und ihre Anwendung

Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (SPR) können Änderungen im Brechungsindex an einer Grenzschicht zwischen einem Leitermaterial und einer Flüssigkeit detektiert werden. Da Biomoleküle im Vergleich zu wässrigen Systemen einen unterschiedlichen Brechungsindex haben, kann die Adsorption von solchen Molekülen an leitenden Oberflächen beobachtet werden (FIVASH *et al.*, 1998, GREEN *et al.*, 2000). Das Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz tritt immer dann auf, wenn Oberflächen-Plasmon-Wellen an einer Kontaktzone zwischen Flüssigkeit und Metalloberfläche angeregt werden. Mit Oberflächenplasmon bezeichnet man kollektive Vibration von Elektronen an der Oberfläche eines elektrischen Leiters. Diese Ladungs-Fluktuationen entwickeln sich als longitudinale Wellen entlang des Materials. Dadurch wird ein transversales elektrisches Feld induziert, das senkrecht zur Oberfläche abfällt. Diese Ladungsänderungen werden in einer gewissen Distanz abgeschwächt, die von der Wellenlänge des anregenden Lichts abhängt. Das elektrische Feld senkrecht zur Oberfläche nimmt exponentiell mit der charakteristischen Länge ab, die zur Wellenlänge des angeregten Lichts proportional ist. Um Plasmonen durch Licht anzuregen müssen Energie und Impuls des Plasmons und des Photons abgestimmt sein, mit anderen Worten, die Dispersionsfunktionen von Licht und Plasmon müssen sich schneiden. Das ist nur der Fall, wenn die Leiteroberfläche mit einem Medium versehen wird, dessen Brechungsindex $n > 1$ ist und wenn das Licht parallel zur Ebene des Einfalls polarisiert ist. Für die Anregung eines Oberflächen-Plasmons wird die Seite der Metalloberfläche, die nicht in Kontakt mit der Flüssigkeit steht, mit polarisiertem Licht bestrahlt. Das Licht wird dabei an einem dünnen leitenden Film unter dem Refraktär-Winkel, der vom Brechungsindex der Oberfläche abhängt reflektiert. Dies kann durch die KRETSCHMANN-RAETHER Konfiguration erreicht werden (KURIHARA und SUZUKI, 2002). In diesem Aufbau ist der leitende Film auf einem Glasprisma angebracht (Abbildung 3.3.1). Wenn der Brechungsindex vom Glas größer ist als der des Probenmediums kann ein Plasmon an der Grenzschicht zwischen Leiter und Probe angeregt werden.

Bei einem definierten Einfallswinkel sind die Impulse des Lichts und des Oberflächen-Plasmons bei Photonenfrequenz gleich und Plasmonen werden angeregt. Dadurch wird Energie absorbiert und die Intensität des reflektierten Lichts wird minimal. Da die Dispersion des Oberflächen-Plasmons vom Brechungsindex der auf den Leiter aufgetragenen Substanz abhängt, werden Änderungen im Brechungsindex der Leiteroberfläche direkt durch eine Änderung des Winkels θ_{\min} an-

gezeigt. Aus diesem Grund können Adsorptionsvorgänge von Biomolekülen aus wässrigen Lösungen an die leitende Oberfläche durch eine Änderung des Winkels θ_{\min} detektiert werden, zumal Biomoleküle und die wässrige Lösung verschiedene Brechungsindices haben.

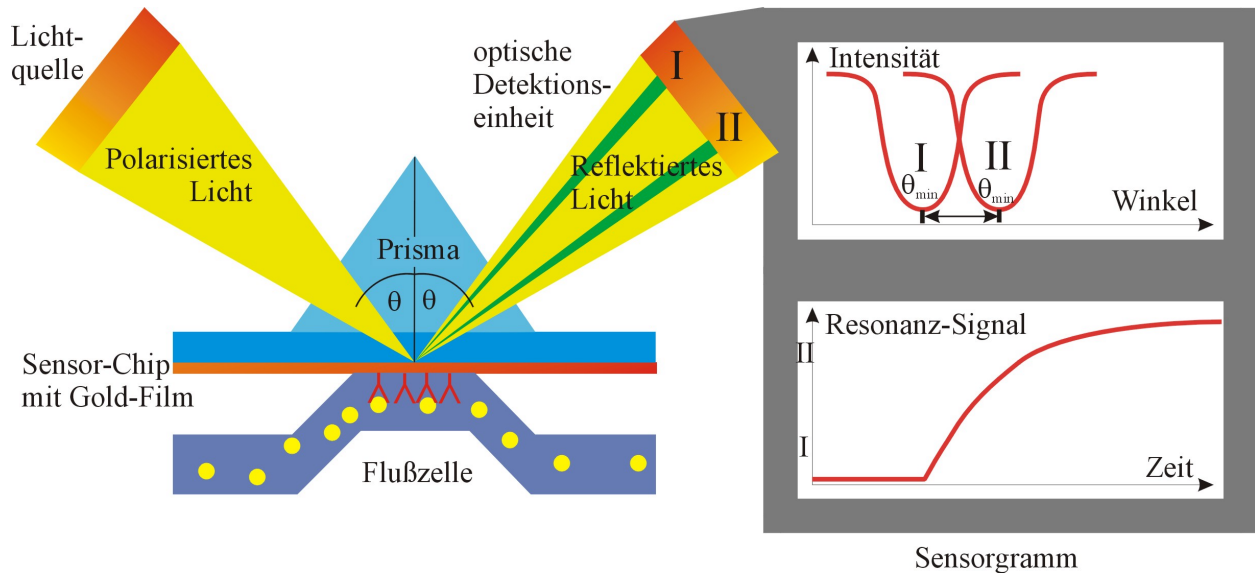


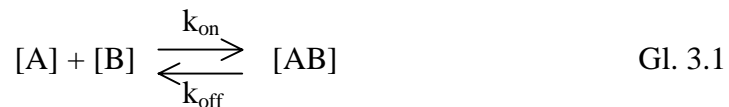
Abb. 3.3.1 Schematische Darstellung des BIAcore-Meßsystems. Der Sensorchip mit der optischen Einheit (Lichtquelle, Prisma, Detektor) wird auf der Unterseite der Goldfläche von einer Flußzelle abgedeckt. Über ein System von 4 kleinen Kanälen können Stoffe, symbolisiert als **Y**, an der Goldoberfläche fixiert und mit potentiellen Bindungspartnern (\bullet) in Kontakt gebracht werden. Die Änderungen in der Lichtreflexion werden detektiert und in einem Sensorgramm wiedergegeben. Die Intensitätsminima liegen bei dem Winkel θ_{\min} .

Die Verwendung optischer Biosensoren für die Analyse von Wechselwirkungen hat es ermöglicht, kinetische Daten von einer großen Zahl von Protein-Protein, Protein-Peptid und Protein-Nucleinsäure-Systemen zu erhalten. Besonders die Möglichkeit der direkten Betrachtung von Wechselwirkungen ohne Einsatz von Markierungen hat die kinetische Analytik stark verbessert. In Abbildung 3.3.1 ist der meßtechnische Aufbau wiedergegeben. Die Flußzelle unter der optischen Einheit gliedert sich in vier Kanälchen, die in bestimmten Kombinationen ansteuerbar sind. So können unterschiedliche RNA-Oligomere immobilisiert werden und parallel mit dem selben Protein vermessen werden. Eine Referenzspur ohne RNA-Belegung wird hinsichtlich möglicher unspezifischer Wechselwirkungen des jeweiligen Proteins mit dem Untergrund zu weiteren Auswertung herangezogen. Wenn Bindungseigenschaften unterschiedlicher Faktoren verglichen werden, stellt die Auswertung der Daten oft kein Problem dar. Oft ist die visuelle Betrachtung der Bindungskurven ausreichend. Eine quantitative Darstellung ist aber ebenso möglich und die Raten und Affinitätskonstanten einer 1:1 Kinetik sind leicht zu berechnen (O'SHANNESY *et al.*, 1993)

Diese kinetischen Konstanten wie die Assoziationskonstante k_{on} und die Dissoziationskonstante k_{off} werden aus dem Sensorgramm durch Analyse der Adsorptions- und Desorptionsphase ermittelt.

Assoziationsphase

Wenn man eine 1:1 Wechselwirkung zwischen der immobilisierten Komponente, in diesem Falle einer Nucleinsäure, und dem mobilen Partner, einem RNA-bindendem Protein voraussetzt, gilt folgender Zusammenhang für das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation:



A und B stehen dabei für die RNA- bzw. die Proteine. Gehorcht die Wechselwirkung einer Kinetik erster Ordnung, so kann folgendes Ratengesetz formuliert werden:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{on}[A][B] - k_{off}[AB] \quad \text{Gl. 3.2}$$

Übertragen auf die Änderung des Resonanzsignals des Oberflächen-Plasmons lautet dieser Zusammenhang:

$$\frac{dR}{dt} = k_{on}CR_{max} - (k_{on}C + k_{off})R \quad \text{Gl. 3.3}$$

oder in integrierter logarithmischer Form:

$$\ln \frac{dR}{dt} = \ln(k_{on}CR_{max}) - (k_{on}C + k_{off})t \quad \text{Gl. 3.4}$$

Dabei ist:

dR/dt	Rate der Änderung des Oberflächen-Plasmon-Resonanzsignals;
C	Konzentration des mobilen Bindungspartners, der Proteine.
R_{max}	maximales Signal der Oberflächen-Plasmon-Resonanz in Response Units (RU) bei der Messung
R	Signal der Oberflächen-Plasmon-Resonanz zum Zeitpunkt t

Diesem kinetischen Modell zufolge liefert eine Auftragung von dR/dt gegen R bzw. von $\ln(dR/dt)$ gegen t im Bereich der Assoziationsphase des Sensorgramms eine Gerade mit der Steigung $-(k_{on}C + k_{off})$.

Dissoziationsphase

Um die Assoziationsrate k_{on} nach dem obigen Modell ermitteln zu können, ist jedoch zunächst die Bestimmung der Dissoziationsrate k_{off} erforderlich. Sie kann aus dem Sensorgramm nach folgendem Zusammenhang ermittelt werden:

$$\frac{dR}{dt} = -k_{off} R \quad \text{Gl. 3.5}$$

In integrierter logarithmischer Schreibweise wird dieser Zusammenhang zu:

$$\ln \frac{R_0}{R_t} = k_{off} (t - t_0) \quad \text{Gl. 3.6}$$

Dabei entspricht R_0 dem Signal der Oberflächen-Plasmon-Resonanz bei Meßbeginn und R_t dem zum Zeitpunkt t . Durch Auftragung von $\ln(R_0/R_t)$ gegen $t-t_0$ wird eine Gerade erhalten, aus deren Steigung die Dissoziationskonstante $-k_{off}$ ermittelt werden kann.

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} aus den verschiedenen Messungen zwischen den *box*-Elementen und den Antiterminationsproteinen wurde jeweils die Adsorption- und Desorptionsphase in den einzelnen Sensorgrammen analysiert. In Abbildung 3.3.2 ist ein Sensorgramm mit den interessierenden Bereichen und die molekularen Vorgänge auf der Chipoberfläche dargestellt. Zu Beginn der Messung liegt eine modifizierte Oberfläche vor, in diesem Fall an Streptavidin immobilisierte biotinylierte RNA-Oligomere auf der Goldfläche. Die Assoziationsphase wird durch die Auftragung des Bindungspartners, z. B. verschiedene Nus-Proteine, eingeleitet. Die Kurve steigt in Abgängigkeit von der Affinität an und geht bei ausreichender Konzentration des Bindungspartners in ein Stättigungsplateau über. Die Höhe des Meßsignals ist abhängig von der Größe und Konzentration der bindenden Moleküle der mobilen Phase. Wenn die Zugabe beendet ist, erfolgt der Übergang in die Desorptionsphase, das Signal fällt ab. Der Abfall hängt von der Stärke der Wechselwirkung ab. Aus diesen beiden kritischen Zonen, dem Anstiegsbereich und dem Abklingen des Resonanzsignals werden die kinetischen

Daten, die On- und Off-Raten ermittelt. Um für weitere Meßreihen die RNA-Oberfläche erneut verwenden zu können, ist bei hohen Affinitäten ein Regenerationsschritt mit SDS obligat. Der Protein-Bindungspartner wird durch Denaturierung entfernt.

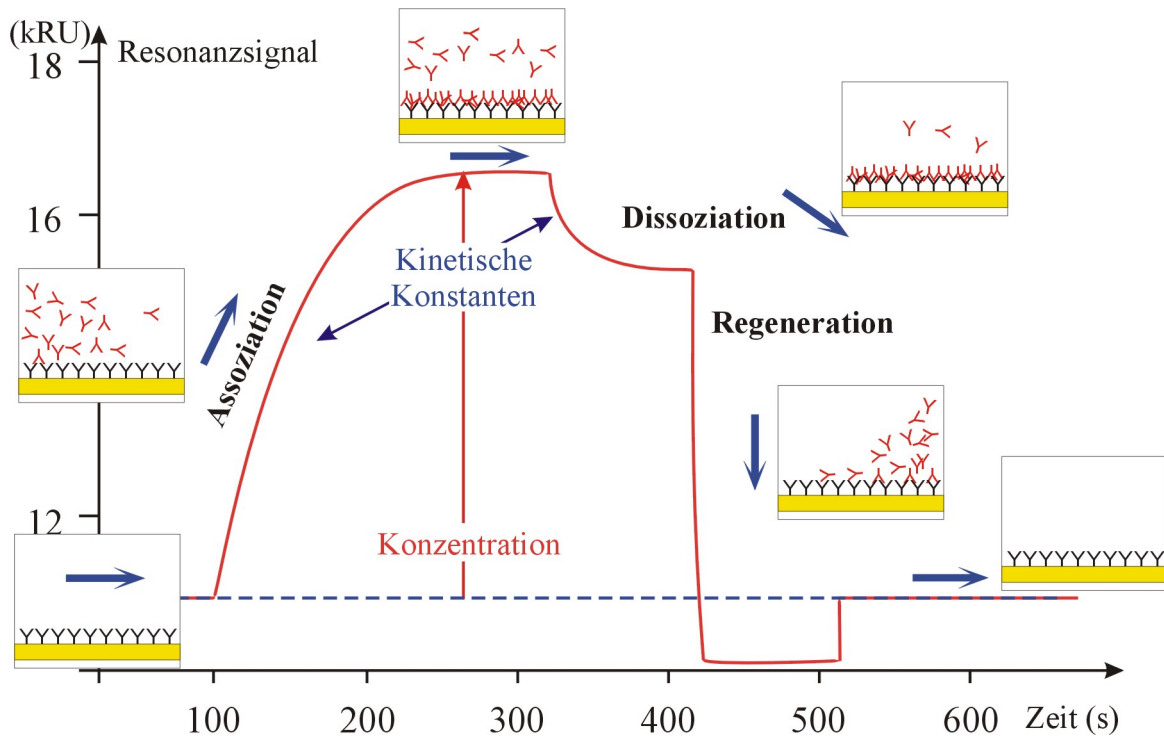


Abb. 3.3.2 Sensorgramm mit dem SPR-Meßsignal (rot). Auf der Ordinate sind die Einheiten in kRU (1 kRU = 1000 RU) aufgetragen, auf der Abszisse der zeitliche Verlauf des Experiments. Die Höhe des Signals steht in Relation zur Konzentration der zugeführten Bindungskomponente. Aus dem steilen Kurvenanstieg wird k_{on} , aus dem Abfall der Kurve k_{off} ermittelt.

3.3.2 Messungen von N- und Nus-Proteinen mit *box*-Motiven aus *E. coli* und λ Phage

Der Antiterminationskomplex der rRNA Operons von *E. coli* wie auch des Phagen λ ist als Multiproteinsystem äußerst vielschichtig hinsichtlich der Beziehungen der einzelnen Bestandteile untereinander. Ein zentraler Bereich ist sicher die RNA-Polymerase, die durch Mediatoren wie z.B. N Protein aus dem λ Phagen terminatorresistent werden kann. N Protein kann seinerseits Wechselwirkungen mit dem *boxB*-RNA-Motiv eingehen. Ein weiteres Protein ist NusB, das einerseits eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit NusE, dem ribosomalen S10 Protein, zum anderen eine Protein-RNA-Beziehung mit der *boxA* RNA unterhalten kann. Um quantitative Aussagen über die Bindungsstärke in den unterschiedlichen Beziehungspaaren zu gewinnen und wichtige Verknüpfungsstellen innerhalb des Antiterminationssystems lokalisieren

zu können, wurden die verschiedenen Nus-Proteine aus *Escherichia coli* zusammen mit dem λ N Protein in SPR-Messungen mit unterschiedlichen box-Elementen untersucht.

Auf einem Sensorchip CM5 wurden die RNA-Oligonucleotide *rrn boxA*, λ *boxA* und λ *boxA/boxB* (*nutL*) über ein Biotin-Streptavidin-System immobilisiert. Über die Flußzelle wurden die verschiedenen Nus Proteine NusA, NusB, NusB/E, NusG sowie Rho Protein aus *E. coli* und N-Protein aus dem λ Phagen an die fixierte RNA adsorbiert. Die Messungen wurden in Zusammenarbeiten mit Herrn DIPL.-CHEM. R. ROBELEK durchgeführt. Proben von NusB sowie NusB/NusE Protein wurden von ihm zur Verfügung gestellt. N Protein stand von Frau DR. V. ILLARIONOVA zur Verfügung.

Im ersten Schritt wurden auf der mit Streptavidin belegten Chipoberfläche, wie in Kapitel 2.12 erläutert, die verschiedenen RNA-Oligomere immobilisiert. Abbildung 3.3.3 zeigt das Sensorgramm der Bindung von *rrn boxA* RNA über den Biotinlinker an Streptavidin.

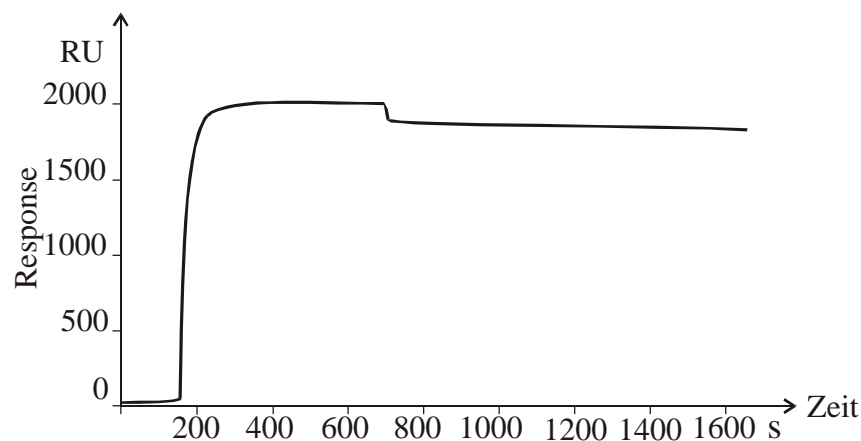


Abb. 3.3.3 Sensorgramm der Immobilisation von RNA *boxA* an der Streptavidin-Oberfläche auf dem Chip.

Zuerst ein sprunghafter Anstieg mit schnellem Übergang in die Sättigungsphase. Die Bindung von Biotin an Streptavidin ist einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-15} M eine äußerst feste Bindung. Der geringe Signalabfall in der Desorptionsphase ist auf die RNA-Oligonucleotide zurückzuführen, die nicht auf der Oberfläche gebunden haben und mit Waschlösung entfernt wurden.

In einer Meßreihe wurden verschieden konzentrierte Lösungen vom Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus *E. coli* mit *rrn boxA* RNA vermessen. Die erhaltenen Sensorgramme sind in Abbildung 3.3.4 dargestellt. Das homohexamere, 282 kDa große Protein mit Helikase- und ATPase-Aktivität bindet vornehmlich an C-reiche Sequenzbereiche. Dabei wandert Rho entlang der mRNA auf der Verfolgung des Elongationskomplexes. Wird er erreicht, kann es zur Termination des Transkriptionsvorgangs kommen. In diesem Zusammenhang spielt auch die

Komplexbildung mit NusG-Protein eine Rolle. In einer weiteren Messung wurde daher Rho-Protein mit NusG Protein im Monomerenverhältnis 6 : 1 gemischt und mit *boxA* RNA vermessen.

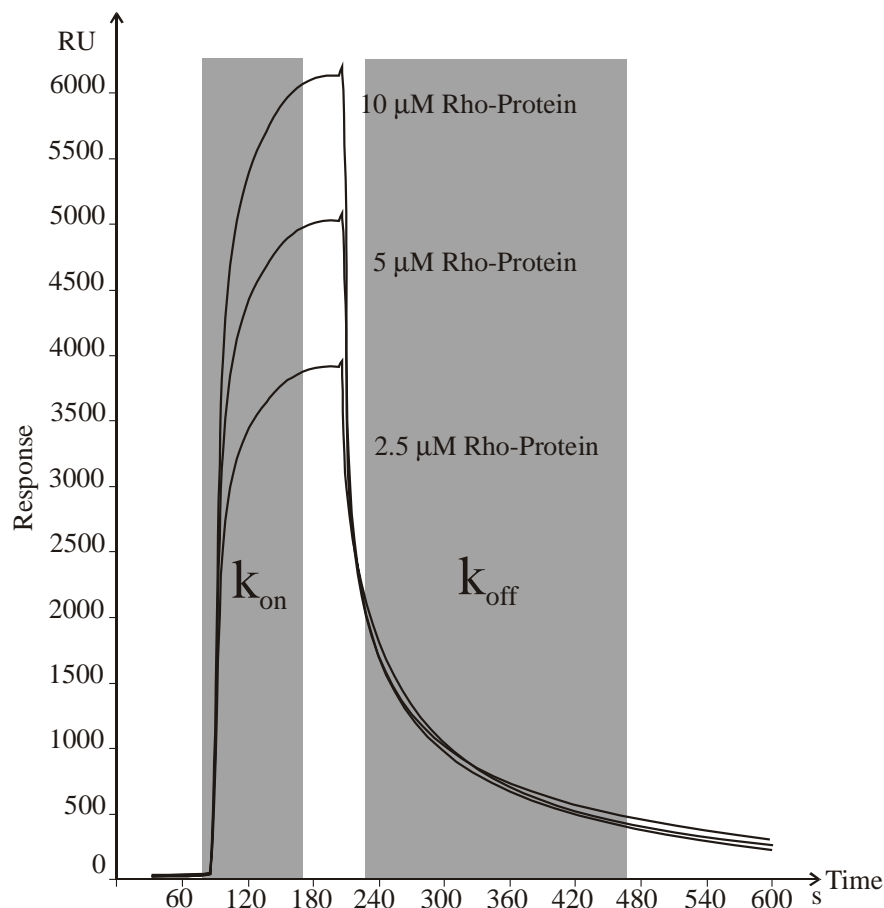


Abb. 3.3.4 Sensorgramme für verschiedene Konzentrationen von Rho-Protein adsorbiert an *rrn boxA*-RNA. Die grau unterlegten Kurvenbereiche gehen in die mathematische Auswertung für k_{on} und k_{off} ein.

Durch die Auftragungen von $\ln\left(\frac{dR}{dt}\right)$ gegen t und $\ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right)$ gegen $t-t_0$ werden im idealen Fall zwei Geraden erhalten, aus denen die Konstanten k_{on} und k_{off} , wie in Kapitel 3.3.1 dargelegt, errechnet werden. Dabei werden die Daten aus den in Abbildung 3.3.4 grau unterlegten Bereichen des Resonanzsignals zu Grunde gelegt. Über den Zusammenhang

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad \text{Gl. 3.7}$$

kann daraus die Dissoziationskonstante K_D ermittelt werden. Die Werte der durchgeführten Messungen sind in Tabelle 3.3.1 angegeben.

Messung	Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_{D} [μM]
Rho	10	$1,2 \cdot 10^4$	$9,97 \cdot 10^{-3}$	0,85
Rho	5	$2,2 \cdot 10^4$	$8,97 \cdot 10^{-3}$	0,42
Rho	2,5	$2,8 \cdot 10^4$	$8,9 \cdot 10^{-3}$	0,32
Rho/NusG	10	$9,7 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^{-3}$	0,64

Tab. 3.3.1 Kinetische Konstanten zur Wechselwirkung zwischen Rho Protein und *boxA* RNA.

Für die Verdünnungsreihe des Rho-Proteins wurde eine Assoziationsrate $k_{\text{on}} = 2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und eine Off-Rate $k_{\text{off}} = 9,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Die daraus berechnet sich K_{D} nach Gleichung 3.7 zu 0,5 μM , was eine hohe Affinität von Rho-Protein zur *rrn boxA* bedeutet. Die Messung in Anwesenheit von NusG zeigte keine signifikante Abweichung von den obigen Ergebnissen.

Mit den bereits erwähnten Nus-Proteinen und dem λ -Protein N wurden vergleichende Messungen mit verschiedenen *box*-Elementen aus *E. coli* und dem λ -Phagen durchgeführt. Eine Übersicht zu den gefundenen K_{D} -Werten ist in der Tabelle 3.3.2 gegeben.

	<i>E. coli boxA</i> K_{D} [μM]	$\lambda boxA$ K_{D} [μM]	$\lambda boxB$ K_{D} [μM]	$\lambda boxA\text{-}boxB$ K_{D} [μM]
NusB	20	10	----	90
NusB/NusE	0,2	0,4	----	0,5
N	10	20	0,1	0,2
N und NusG	40	70	90	-----
N und NusB	3	5	0,5	0,7
N und NusB/NusE	0,3	0,4	0,5	0,1
N und NusA	----	-----	0,09	0,04

Tab 3.3.2 Vergleich der K_{D} -Werte von Wechselwirkungen einzelner Nus-Proteine und ihren Mischungen mit unterschiedlichen RNA *box*-Motiven aus *E. coli* und λ Phage.

Für die Messung von NusB bzw. von mit NusE komplexierten NusB konnte keine Wechselwirkung mit dem $\lambda boxB$ Element nachgewiesen werden. Ebenso bindet weder NusG-Protein noch NusA Protein an eines der vier RNA-Motive. Dagegen konnten für die N-terminale Domäne von NusA kinetische Konstanten für die Adsorption an *rrn boxA* $k_{\text{on}} = 4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für die Desorption $k_{\text{off}} = 1,3 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Daraus ergab sich eine Dissoziationskonstante K_{D} von 2,8 μM .

N-Protein kommt als Mediator in der λ -Antitermination eine zentrale Rolle zu. Neben der Bindungsaffinität zur λ -*boxB* RNA bindet N Protein auch an NusA Protein aus *E. coli*. Erst durch diese Verknüpfungen soll das zuerst relativ unstrukturierte N Protein (VAN GILST & VON HIPPLE, 1997) eine definierte räumliche Form annehmen. Bei den Messungen mit N Protein konnte für alle vier *box*-Elemente eine Wechselwirkung nachgewiesen werden, für die λ *boxB* RNA und die λ *boxA/boxB* RNA war sie mit einer K_D von 0,1 μ M bzw. 0,2 μ M um zwei Größenordnungen stärker als für die *boxA*-Motive aus *E. coli* und dem λ Phagen. Durch die Zugabe von NusG wurde die Bindung von N an die RNA offensichtlich beeinträchtigt. Neben einer deutlich schwächeren Bindung an die λ *boxB* war für die Doppel-*boxA/boxB* keine Wechselwirkung mehr nachweisbar.

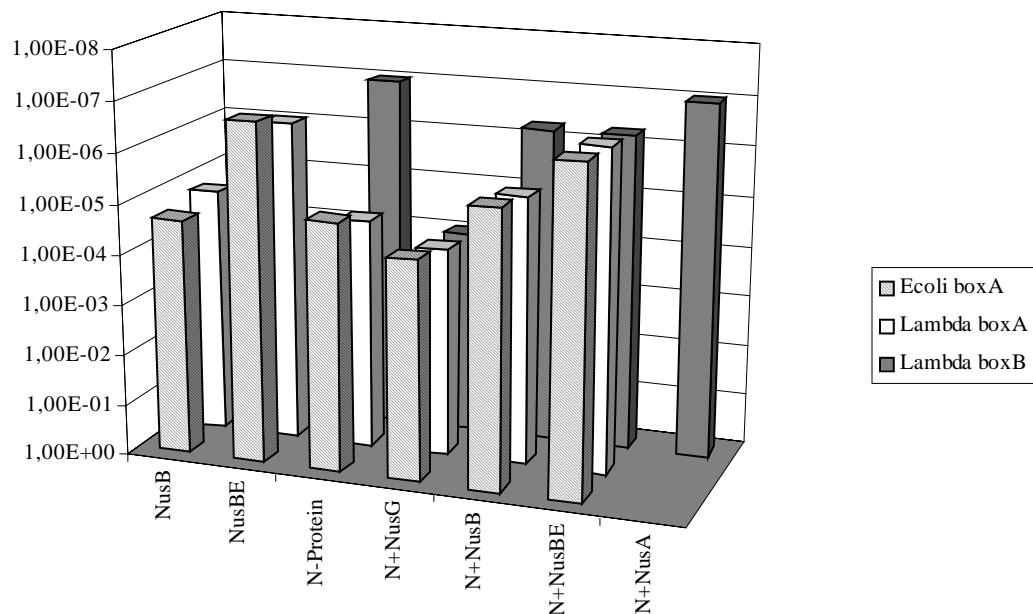


Abb. 3.3.5 Grafische Darstellung der K_D -Werte aus SPR-Messungen von Proteinen und *box*-RNA-Elementen des Antiterminationskomplexes aus *E. coli* und λ Phage.

In weiteren Messungen wurden Mischungen von N Protein mit NusB oder NusB/NusE Komplex hergestellt an die verschiedenen RNA-Elemente adsorbiert. Die erhaltenen kinetischen Daten liegen im Wertebereich der jeweiligen Einzelbeziehungen von N Protein, NusB und dem NusB/NusE Komplex. So wurde bei den *boxA*-Motiven aus *E. coli* und λ für N/NusB eine K_D im Bereich von 10 μ M erhalten, die Affinität von N/NusB/NusE Komplex lag mit 0,3 μ M wiederum um zwei Größenordnungen darüber. Analog wurde bei der λ *boxB* die Dissoziationskonstante von N Protein im Bereich von 0,7 μ M für N/NusB und 0,1 μ M für N/NusB/NusE wiedergefunden.

Weiter wurden mit SPR die Bindungskonstanten zwischen einer Mischung N/NusA und den λ *nut* sites *boxA* und *boxB* bestimmt. Während N allein neben einer hohen Affinität zur λ *boxB* auch eine Spezifität für die *rrn* oder auch die λ *boxA* RNA zeigt, geht durch die Anwesenheit von *E. coli* NusA Protein die Affinität von N Protein zur den *boxA* Motiven völlig verloren. Die zur λ *boxB* RNA bleibt aber unverändert erhalten. Durch NusA wird damit die Selektivität des N Proteins gegenüber der λ *boxB* deutlich verstärkt. In Abbildung 3.3.5 ist eine graphische Darstellung der Dissoziationskonstante K_D gegeben. Auf der Hochwertachse ist K_D angegeben. Die verschieden schraffierten Säulen zu einem Protein oder einer Proteinnischung symbolisieren die verschiedenen *box*-Elemente, *boxA* aus *E. coli* und λ sowie λ *boxB* RNA. Die *boxA-boxB* Sequenz aus dem λ Pagen ist in der Abbildung nicht aufgeführt.

3.3.3 Wechselwirkung von *rrn boxA*-Mutanten mit NusB und NusB/NusE

3.3.3.1 Basen-Mutationen an der *rrn boxA* RNA

Das 12 Basen lange *boxA*-Element, das an NusB Protein bindet, ist 40 Basen stromabwärts der Promotorregion der sieben rRNA Operons lokalisiert. Diese Operons verteilen sich über das circulaire Chromosom von *E. coli* bei 5.1 min (*rrnH*), 56.1 min (*rrnG*), 72.1 min (*rrnD*) und zwischen 84.5 und 90.5 min (*rrnC*, -A, -B, -E). Die *boxA* Segmente des λ Phagen, die stromabwärts der rechten und linken Promotoren angeordnet sind unterscheidet sich in einer bzw. drei Basen (OLSON, 1982) von der *rrn boxA* RNA.

Der Einfluß von Sequenz-Variationen im 12 Basen langen *boxA* RNA Motiv auf die Affinität zum NusB/NusE Komplex wurde von NODWELL und GREENBLATT bereits 1993 untersucht. In Gelmobilitäts-Assays konnten sie mit wenigen Ausnahmen zeigen, dass einzelne Nucleotid-Austausche in der *boxA* RNA die Affinität zum NusB/NusE Komplex auslöschen.

Mit Hilfe der Oberflächenplasmon Resonanz wurden kinetische und thermodynamische Daten zur Wechselwirkung zwischen *boxA* RNA und NusB Protein sowie dem NusB/NusE Komplex gewonnen.

Proben biotinylierter RNA Oligonucleotide (Anhang B) wurden nicht-kovalent auf die Streptavidin-beschichtete Oberfläche des optischen Sensors fixiert. Der Biotin-Tag ist am 5'-Ende der *boxA*-Sequenz über einen 5 Ribonucleotide langen Linker kovalent gebunden. Das dient dazu, die sterische Hinderung zwischen den Proteinen NusB bzw. NusB/NusE Komplex und der Streptavidin-Beschichtung der Sensoroberfläche zu minimieren. Der verwendete Linker ist eine

Fortsetzung der Sequenz des *boxA* Motivs der rRNA Operons im *E. coli* Chromosom. Der Biotin-Tag wurde am 5'-terminalen Adenosinrest gebunden.

Die Bindung der biotinylierten RNA-Oligomere auf die mit Streptavidin beschichtete optische Oberfläche konnte direkt durch das Plasmon-Resonanzsignal beobachtet werden. Die Sensoroberfläche wurde dann mit einer Lösung des jeweiligen Proteins (2,5 bis 10 μM) gespült und die Bildung des RNA/Protein Komplexes in einem Sensorgramm aufgezeichnet (Abbildung 3.3.6). Anschließend wurde die Oberfläche mit proteinfreiem Puffer nachgewaschen, um die Desorption des Proteins und damit die Dissoziation des Proteins von der RNA zu beobachten. Um unspezifische Wechselwirkungen des NusB Proteins mit der Chipmatrix ausschließen zu können, wurde jede Messung im direkten Vergleich mit einer Referenzlinie ohne immobilisierte RNA durchgeführt. Die Ermittlung kinetischer Konstanten durch SPR ist unabhängig von der auf dem Chip immobilisierten Menge an *boxA* RNA. Um das zu zeigen, wurde die Menge an *boxA* RNA zur Belegung der Oberfläche durch Mischungen mit biotinylierter polyT-DNA (18mer) verringert und auf den Chip injiziert, was zu einer Verdünnung der *boxA* RNA führt. PolyT DNA wechselwirkt weder mit NusB Protein noch mit dem Komplex von NusB und NusE Protein (Abb. 3.3.6 D). Die Daten in Tabelle 3.3.3 belegen, dass die Konzentration von *boxA* RNA auf der Chipoberfläche keinen Effekt auf die Größe der kinetischen Konstanten hat.

	<i>boxA</i>			<i>boxA</i> + polyT (2:1)			<i>boxA</i> + polyT (1:1)		
	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_{D} [μM]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_{D} [μM]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_{D} [μM]
NusB	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-1}$	20	$9 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^{-2}$	10	$4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-2}$	9
NusB/E	$4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-3}$	0,2	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-3}$	0,2	$9 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-3}$	0,3

Tab. 3.3.3 Die kinetischen Konstanten sind von der Menge der auf dem Chip fixierten RNA unabhängig.

Der NusB/NusE Komplex bindet sehr rasch an *rrn boxA* RNA von *E. coli* (Abb. 3.3.6 B). Die Bindungsphase wird durch eine hyperbolische Sättigungskurve charakterisiert, die sich über eine Zeitspanne von annähernd 3 Sekunden erstreckt. Die Dissoziation des Proteinkomplexes von der mit *boxA* RNA belegten Oberfläche dauert mehrere Minuten. Der Prozeß zeigte eine hyperbolische Charakteristik, erreichte aber innerhalb der Messzeit nicht die Basislinie. Eine typische Situation für SPR-Experimente mit hochaffinen Bindungspartnern. Die Ratenkonstanten für die Bindung und die Dissoziation betragen $k_{\text{on}} = 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Das Verhältnis der Ratenkonstanten (Tabelle 3.3.4) ergibt eine Dissoziationskonstante K_{D} von 0,2 μM .

RNA	NusB			NusBE		
	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [\mu M]$	$k_{on} [M^{-1}s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [\mu M]$
<i>rrn boxA</i> ^{a)}	$2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-1}$	20	$4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-3}$	0,2
<i>rrn boxA</i> C5G ^{a)}	$4 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^{-2}$	100	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^{-3}$	3
<i>rrn boxA</i> U8GA10C ^{a)}	$2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^{-1}$	13	$5 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^{-3}$	0,6
<i>nutR boxA</i> ^{b)}	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-1}$	10	$4 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,4
<i>nutR boxB</i> ^{b)}	n.a.	n.a.	>1000	n.a.	n.a.	>1000

Tab. 3.3.4 Sequenz-Spezifität der RNA-Protein Wechselwirkung. a) von ribosomalen RNA Operons von *E. coli*, b) von λ Phage (n.a. nicht auswertbar).

Um den Einfluß von Sequenzmodifikationen des *boxA* Motivs auf die Bindungsaffinität zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche RNA-Oligomere verwendet. Sie weichen von der konservierten *boxA* RNA durch Unterschiede in bis zu drei Basen ab: die Punktmutation C5G, die Doppelmutation U8G/A10C und das *nutR* Motiv des λ Phagen, welches sich von der *E. coli boxA* durch die Substitutionen U1C, U8G und C11A unterscheidet.

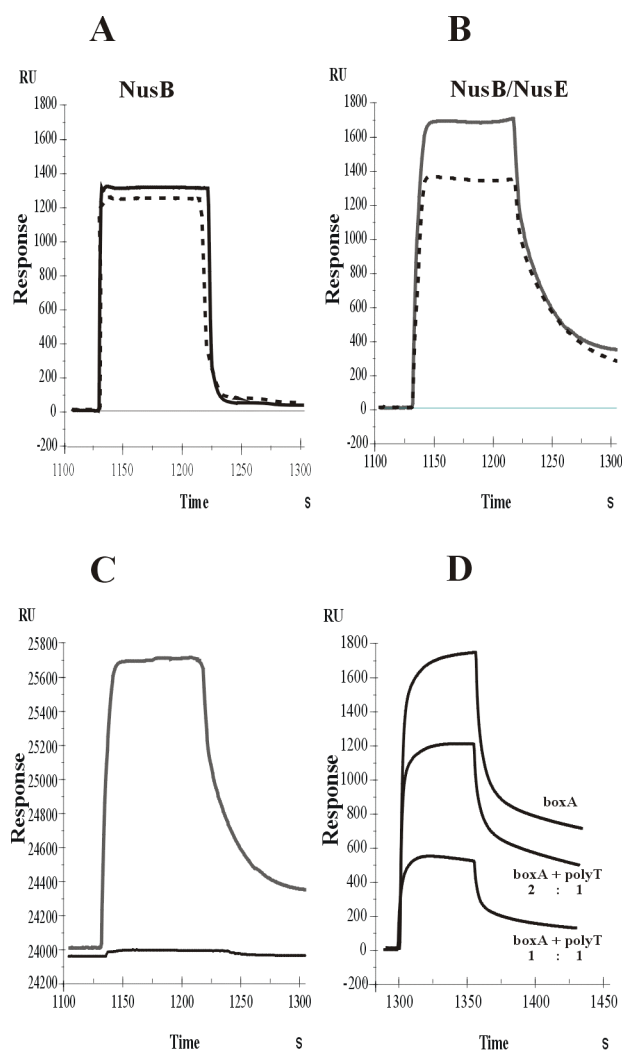


Abb. 3.3.6 Sensorgramme aufgenommen mit Oberflächen-Plasmonresonanz - Spektroskopie: Wechselwirkung von (A) NusB-Protein, (B) NusB/NusE Proteinkomplex mit *Escherichia coli boxA* RNA (fette Linie) und λ *boxA* RNA (gestrichelte Linie).

Für die doppelmutierte RNA U8G/A10C wurde bereits durch Gelmobilitäts-Assays ein positives Ergebnis gefunden (NODWELL and GREENBLATT, 1993). Die Adsorptionsrate für dieses Oligonucleotid war um den Faktor 9 im Vergleich zur *boxA* RNA reduziert. Da die Dissoziationsgeschwindigkeit ebenfalls bis zu einem gewissen Grad verringert wurde, erhöhte sich die Dissoziationskonstante nur um einen Faktor 3 im Vergleich mit der *boxA* RNA.

Das zu *boxA* analoge Motiv der *nutR* Sequenz des λ Phagen verhält sich gegenüber NusB/NusE Protein vergleichbar zur *E. coli boxA* RNA. Die entsprechenden thermodynamischen und kinetischen Daten aus den Bindungsexperimenten belegen dies, wogegen in früheren Gel-Mobilitäts-assays die λ *nutR boxA* RNA keine Affinität zum NusB/NusE Komplex zeigte (NODWELL und GREENBLATT, 1993). Die C5G Mutation, die nahezu mittig in der *boxA*-Sequenz liegt, ist nach den Gelshift-Assays von NODWELL nichtbindend. Hier wurde eine 15fach höhere Dissoziationskonstante für die NusB/NusE-Wechselwirkung im Vergleich zur Konsensus-*boxA* RNA von *E. coli* gefunden. Die Erhöhung von K_D ist überwiegend auf die Verringerung des k_{on} -Wertes zurückzuführen.

Von zahlreichen Arbeitsgruppen konnte bereits die Wechselwirkung von λ *boxB* RNA mit λ N Protein, das als zentrales Steuerprotein für den Lebenszyklus des Phagen dient, gezeigt werden (OLSON *et al.*, 1982; LAZINSKI *et al.*, 1989; GREENBLATT *et al.*, 1993). *BoxB* weist keinerlei sequenzielle Übereinstimmung mit der *boxA* RNA auf und hat laut früheren Untersuchungen von NODWELL und GREENBLATT (1993) keine Bindungsbeziehungen zum NusB/NusE Proteinkomplex. Durch SPR konnte ebenfalls keine Bindung der *boxB* RNA mit dem NusB/NusE Komplex nachgewiesen werden. Auf Basis der Signalhöhen (Amplitude) kann ein Wert für die Dissoziationskonstante größer 1 mM angenommen werden.

Die Bindungsuntersuchungen wurden mit NusB Protein wiederholt (Tabelle 3.3.4). Die Ergebnisse entsprechen im wesentlichen den oben genannten.

Die Dissoziationskonstante für die *boxA* RNA, respektive die Konstanten der mutierten Homologen übersteigen die für den NusB/NusE Komplex beobachteten Werte um den Faktor 25 im Falle der λ *nutR boxA* und der *rrn boxA* U8G/A10C. Für die *rrn boxA* C5G liegt der Faktor bei 33, für die *rrn boxA* sogar bei 100. Erhöhte Off-Raten sowie erniedrigte On-Raten führen zu den allgemein niedrigeren K_D Werten für NusB gegenüber dem NusB/NusE Komplex. Die Daten stehen in guter Übereinstimmung mit dem Fehlerbereich der Gelmobilitäts-Assays mit NusB Protein aus früheren Arbeiten (NODWELL und GREENBLATT, 1993). Aus dem Datenpool kann nicht entschieden werden, ob die stärkere Bindung von NusB/NusE Komplex im Vergleich zum NusB Protein auf zusätzlichen RNA-Kontakten durch das NusE Protein beruht. Oder das NusE Protein bewirkt eine Konformationsänderung von NusB Protein, mit der Folge einer erhöhten RNA-Affinität.

3.3.3.2 Mutation der 2'-Hydroxylgruppe der *rrn boxA* RNA

Nach der Untersuchung der Affinität von RNA für NusB Protein bei einzelnen oder mehrfachen Basen-Austauschen wurde in den folgenden Messungen die Diskriminierung zwischen DNA und RNA näher betrachtet. Es erscheint plausibel, dass NusB Protein zwischen RNA und DNA unterscheiden kann, um im Antiterminationskomplex gezielt auf die nascierenden RNA zu fokussieren. Mit kinetischen und thermodynamischen Analysen unter Verwendung von SPR und NMR (siehe Kapitel 3.4.2) wurde versucht diese Hypothese zu untermauern.

Die SPR-Messungen wurden nach dem bereits beschriebenen experimentellen Ansatz durchgeführt. Als Oligonucleotide wurden analog zu Kapitel 3.3.2 konstruierte biotinylierte Hexadecamere verwendet. Von Interesse war die alternierende Einführung eines Deoxyribonucleotids in das *boxA*-Motiv. Das ergab eine Bibliothek von 12 *boxA* RNA Oligonucleotiden mit jeweils einer reduzierten Position ohne 2'-Hydroxylgruppe an der Ribose. Zusätzlich wurden zwei Oligonucleotide gewählt, bei denen zum einen die geraden (RD), zum anderen die ungeraden Positionen (DR), also jeweils sechs Ribonucleotide durch entsprechende Deoxyribonucleotide ersetzt wurden. Um über Affinitäten von NusB zu DNA Informationen zu erhalten, wurden zwei Deoxyribonucleotidstränge der *boxA* vermessen. Zum einen direkt die DNA-Sequenz zur *boxA* RNA, zum anderen in einer modifizierten Form mit Uracil-Substitution der Thyminpositionen (Tabelle 3.4.2 und Anhang B).

RNA-Oligo	NusB			NusB/NusE		
	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [μ M]	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [μ M]
<i>boxA</i> -RNA	$4,7 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^{-2}$	13	$1,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	0,11
<i>boxA</i> -DNAdU	—	—	—	$1,2 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^{-2}$	40
<i>boxA</i> -DNA	—	—	—	—	—	—
C3dC	$6,6 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^{-1}$	18	$1,6 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	0,17
U4dU	$7,1 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^{-2}$	14	$1,1 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	0,29
U6dU	$6,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-1}$	19	$9,3 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	0,28
A9dA	$3,6 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-1}$	6,1	$8,8 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	0,26
A10dA	$1,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	14	$8,5 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	0,22
C11dC	$4,6 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-1}$	27	$9,4 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	0,36
RD	$4,36 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	25	$2,7 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	0,19
DR	$2,1 \cdot 10^2$	$9,5 \cdot 10^{-2}$	452	$1,8 \cdot 10^4$	$8,1 \cdot 10^{-2}$	4,5

Tab. 3.3.5 Mit SPR gemessene kinetische Konstanten der Wechselwirkung zwischen NusB oder NusB/NusE Komplex und diversen *boxA*-analogen Oligonucleotiden. Die Nucleinsäuren sind in Anhang B aufgeführt sind.

Die entsprechenden kinetischen Daten sind in Tabelle 3.3.5 wiedergegeben. Die Messung von *boxA* DNA zeigte keinerlei Wechselwirkung mit NusB Protein oder mit dem Proteinkomplex NusB/NusE. Anhand der instrumentellen Sensitivität kann geschätzt werden, dass unter den Versuchsbedingungen die Dissoziationskonstanten für beide Proteine größer als 1 mM sind.

Wie bereits beschrieben, führte die Änderung von U in m^5U an der Position 4 zu einer Abnahme der Affinität zu NusB oder NusB/NusE Komplex. Um die Bedeutung der Methylgruppe des Thymins bei der Nicht-Bindung von DNA an NusB Protein näher zu erfassen, wurde die DNA mit Uracil statt Thymin vermessen. Der Meßansatz mit NusB Protein zeigte wiederum keine detektierbare Bindung, wogegen der NusB/NusE-Komplex eine Dissoziationskonstante von 40 μM ergab (Abbildung 3.3.6). Die Methylgruppe nimmt offensichtlich an einer Differenzierung zwischen RNA und DNA teil, wenn sie auch nicht eine tragende Funktion ausübt. Den wesentlichen Einfluß muß demnach die 2'-OH-Funktion der RNA bewirken.

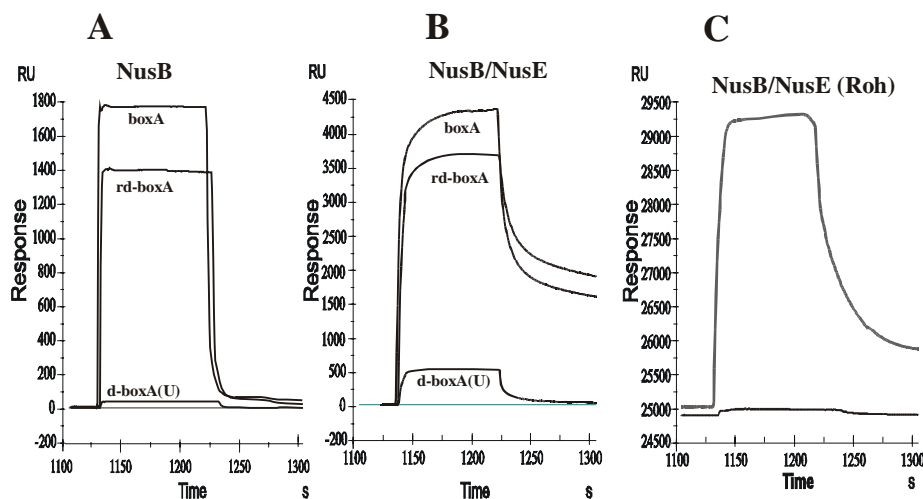


Abb. 3.3.6 SPR-Sensorgramme zur Wechselwirkung von (A) NusB Protein, (B) NusB/NusE Protein Komplex mit *rrn boxA* RNA, RD-*boxA* RNA und DNA(dU)-*boxA*. Die Daten in A und B sind korrigiert in Bezug auf die unspezifische Wechselwirkung der Proteine mit der Chip-Matrix während der Messung. Sensorgramm C zeigt die unkorrigierten Rohdaten einer Messung von NusB/NusE Komplex mit *rrn boxA* RNA und die unspezifische Wechselwirkung des Protein Komplexes mit der Chip-Matrix.

Bei den singulären Deoxynucleotid-Insertionen war gegenüber dem Proteinkomplex NusB/NusE eine um zwei Größenordnungen höhere Affinität als gegenüber dem NusB Protein zu verzeichnen. Durchschnittlich lag die K_D für NusB Protein um 16,4 μM , für den NusB/NusE Komplex wurde eine Dissoziationskonstante K_D um 0,25 μM ermittelt. Damit liegen die Werte in den jeweiligen Größenordnungen zu den Komplexen mit der Wildtyp-*boxA*. Innerhalb der Reihe für NusB bzw. NusB/NusE waren die Schwankungen der kinetischen Konstanten im Bereich der Meßgenauigkeit der SPR-Methode. Die wertemäßigen Grenzen im Fall von NusB

Protein werden durch A9dA *boxA* mit 6,1 μM und C3dC mit 27 μM aufgespannt. Die Affinitäten von NusB/NusE zu den *boxA*-Variationen liegen enger um den Mittelwert.

Zu einem anderen Resultat führte die Untersuchung der mehrfach-substituierten RNA-Oligonucleotide RD- und DR-*boxA*. RD reiht sich mit Dissoziationskonstanten von 25 μM für die Bindung zu NusB Protein und 0,19 μM für die zum Komplex NusB/NusE in die oben beschriebenen Ergebnisse wertemäßig gut ein. Für die DR-*boxA* dagegen wurde zu NusB Protein eine um den Faktor 10 niedrigere Affinität erhalten, analog für die Wechselwirkung mit dem NusB/NusE Komplex. Die betreffenden Dissoziationskonstanten K_D heben sich mit 452 μM für NusB und 4,5 μM für den NusB/NusE Komplex stark von den anderen Werten ab. Die betreffenden Sensorgramme von RD in Abbildung 3.3.6 zeigen aber keine atypischen Verläufe oder Artefakte im Bereich der Adsorptions- oder Desorptionsphase.

3.4 NMR-Spektroskopie

3.4.1 Basen-Mutationen an der *rrn boxA* RNA aus *E. coli*

Um die Wechselwirkung von Antiterminationsproteinen mit verschiedenen RNA Sequenzen detaillierter zu studieren, wurde der Einfluß von RNA auf die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Amidresonanzen von Protein/RNA Komplexen durch NMR untersucht.

Zuerst wurde versucht, ^{15}N markierten NusB/NusE Komplex einzusetzen. Die Qualität der Signale in den HSQC Experimenten war niedrig. Es konnten weniger als 10 % der erwarteten $^1\text{H},^{15}\text{N}$ Korrelationssignale beobachtet werden. Dagegen wurden mit NusB Protein sehr gut aufgelöste $^1\text{H},^{15}\text{N}$ Korrelationsspektren aufgenommen (HUENGES *et al.*, 1998; ALTIERI *et al.*, 2000), welche aus diesem Grund für die systematische Untersuchung der RNA Sequenzvariation herangezogen wurden. Mit ^{15}N markiertem NusB Protein wurde die chemische Verschiebung von ^1H und ^{15}N der Amidgruppen bei 295 K mittels 2D-HSQC gemessen. Die Proben enthielten: 0,5 mM ^{15}N markiertes NusB Protein und zwischen 0,7 und 1 mM RNA in 70 mM Kaliumphosphat-Puffer bei pH 7,0.

Um die experimentellen Bedingungen so reproduzierbar wie möglich zu gestalten, wurde routinemäßig das pH-abhängige ^{31}P NMR Signal des Phosphatpuffers detektiert. Darüber hinaus konnte man zeigen, dass die chemische Verschiebung des Proteins im Komplex mit der RNA wertemäßig nicht durch eventuelle Temperaturschwankungen beeinflusst wurde.

Frühere Experimente haben gezeigt, dass die ^1H und ^{15}N Verschiebungen durch den Komplexbildungsvorgang von NusB Protein mit RNA verschoben werden. Darauf basierend wurde eine Reihe von HSQC Spektren mit unterschiedlichen Oligonucleotiden aufgenommen (Tabelle 3.4.1).

C	G	G	C	A	C	U	G	C	U	C	U	U	U	A	A	C	A	A	T	T	<i>rrn boxA</i>	
						u	g	c	u	c	u	u	u	a	a	A	a				C11A	
						u	g	G	u	c	u	u	u	a	a	c	a				C3G	
						u	g	c	u	c	u	u	m⁵U	a	a	c	a				U8m ⁵ U	
						m⁵U	g	c	u	c	u	u	u	a	a	c	a				U1m ⁵ U	
						u	g	c	u	c	m⁵U	u	u	a	a	c	a				U6m ⁵ U	
						u	g	c	m⁵U	c	u	u	u	a	a	c	a				U4m ⁵ U	
						u	g	c	u	c	u	m⁵U	u	a	a	c	a				U7m ⁵ U	
						u	g	c	u	c	u	u	G	a	C	c	a				U8GA10C	
							C	g	c	u	c	u	u	A	a	a	A	a			<i>nutR</i>	
							C	g	c	u	c	u	u	A	C	a	c	a			<i>nutL</i>	
			c	a	c	u	g	c	u	c	u	u	u	a							Δ 10-12	
									u	c	u	u	u	a	a	c	a	a	t	t		Δ 1-3
c	g	g	c	a	c	u	g	c	u	c	u										Δ 7-12	
						u	g	c	u	G	u	u	u	a	a	c	a				C5G	
						u	g	c	G	c	u	u	u	a	a	c	a					U4G

Tab. 3.4.1 RNA-Oligonucleotide, die für $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Messungen mit NusB Protein verwendet wurden.

Alle verwendeten Oligonucleotide waren Dodecamere, um die strukturellen Änderung zu minimieren. Folgende Kriterien wurden für das Design der Oligonucleotide zugrundegelegt, wobei ein Bogen von der strukturellen Vergleichbarkeit zu deutlicher Abweichung von der *rrn boxA* RNA gespannt wurde (Tabelle 3.4.1).

(I) Um den Einfluß kleiner struktureller Veränderungen zu studieren, wurden diverse Uracilreste durch 5-Methyluracil-Reste ersetzt.

(II) Größere strukturelle Änderungen wurden durch Austausch einzelner Basen wie T gegen C, A gegen C, U gegen G oder C gegen G, eingeführt.

(III) Bei der Auswahl von Oligonucleotiden mit 2 bis 3 ersetzten Basen wurde die Diversität auf die Kombinationen beschränkt, von denen eine Wechselwirkung mit NusB Protein *in vivo* und/oder *in vitro* bereits bekannt ist. Es wurde das *boxA* Motiv der *nut site* der rechten und linken Phagen-Promotoren *nutR* und *nutL* sowie die doppelmutierte RNA U8G/A10C untersucht, von denen eine Bindung mit NusB/NusE Komplex durch Gelmobilitäts-Assays bereits gezeigt werden konnte (NODWELL und GREENBLATT, 1993).

(IV) Um die Relevanz von peripheren Bereichen des *rrn boxA* Motivs zu prüfen, wurden Oligonucleotide mit partiellen Deletionen am 3'- bzw. am 5'-Ende synthetisiert. Um dabei die Gesamtlänge konstant zu halten, wurden die fehlenden Basen am gegenüberliegenden Ende ergänzt, wobei jeweils die in den sieben *rrn* Operons hochkonservierten Basen stromauf- oder stromabwärts der *boxA*-Sequenz verwendet wurden.

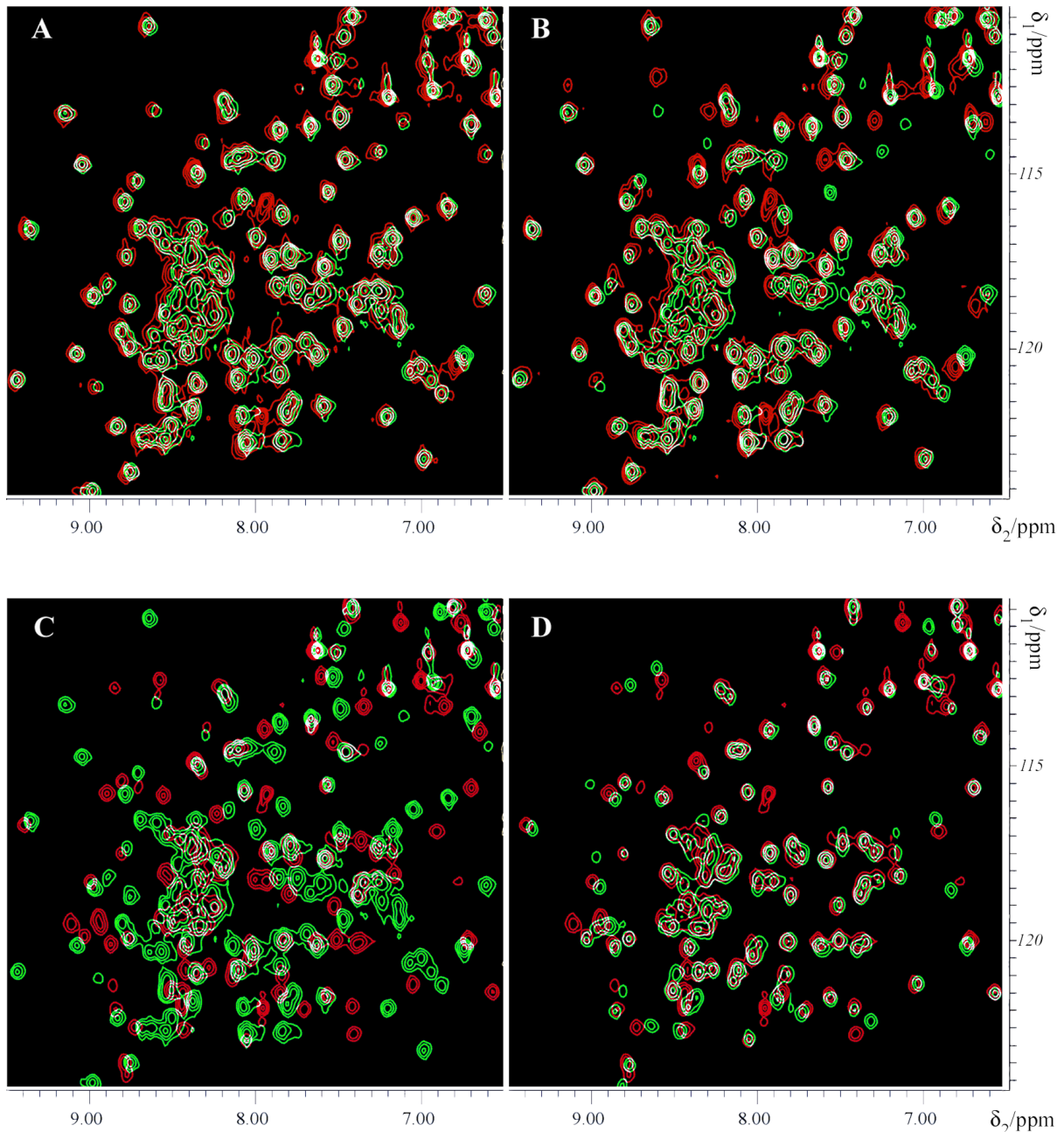


Abb. 3.4.1 Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren von (A) NusB/*rrn boxA* mit NusB/C11A, (B) NusB/*rrn boxA* mit NusB/U4T, (C) NusB/*rrn boxA* mit NusB/U4G und (D) NusB mit NusB/U4G.

Jedes in Abbildung 3.4.1 aufgeführte RNA Oligonucleotid hat wenigstens ein paar Amidgruppen in der chemischen Verschiebung verändert. Alle untersuchten Oligonucleotide zeigten, wenn auch schwache und kurzlebige, Wechselwirkungen mit dem Protein. Wenn die Protein/RNA-

Mischungen über einen längeren Zeitraum aufbewahrt wurden, veränderte sich das HSQC-Spektrum zu dem des ungebundenen Proteins. Das ist auf die Degenerierung der RNA zurückzuführen, verursacht durch spontane Hydrolyse oder durch Spuren von RNase aus der NusB Proteinpräparation. Erneute Zugabe von RNA führte wieder zum Signalsatz des RNA/Protein-Komplexes, ein Beweis dafür, dass das Protein weiterhin intakt war. Diese Erkenntnisse wurden für die Präparation „langzeit-stabiler“ Protein/RNA-Proben zur NMR-Spektroskopie verwertet (Kapitel 3.2). Wenn man die Titration von NusB Protein mit *rrn boxA* RNA mittels HSQC Spektren beobachtete, konnte man stufenweises Verschwinden bestimmter Signale des unkomplexierten Proteins und ihren Ersatz durch Signale des neu formierten Komplexes erkennen. Weder konnte man eine zwischenzeitliche Linienverbreiterung noch eine Signalwanderung während der Titration feststellen. In Übereinstimmung mit den kinetischen Daten aus Tabelle 3.3.4 legen diese Beobachtungen nahe, dass die Dissoziation des Komplexes aus RNA und Protein für die NMR Zeitskala zu langsam ist. Daher war eine Signalzuordnung des Komplexes durch Titrationsexperimente nicht möglich.

Der Ersatz von Basen in der Peripherie der *rrn boxA* Sequenz oder der Ersatz von Uracil durch 5-Methyluracil beeinflusste eine begrenzte Zahl der chemischen Verschiebungen von Amidprotonen. In Abbildung 3.4.1 ist beispielhaft ein Vergleich zwischen einem Ausschnitt aus dem $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC von *boxA* (grün) und der C11A Mutation (rot) gezeigt. Überlagerte Signale erscheinen in weiß, was anzeigt, dass nur wenige Korrelationspeaks verschoben wurden. Die Zahl der verschobenen Signale ist beim Vergleich zwischen NusB Protein komplexiert mit *rrn boxA* zum Komplex mit der U4m⁵U RNA etwas größer. Die mutierte RNA unterscheidet sich von der *boxA* durch eine einzelne Methylgruppe in der 5-Position am Uracilrest 4. Dennoch bleibt der größte Teil der Signale weiß, sie sind also überlagert (Abbildung 3.4.1).

Der Austausch von Uracil 4 durch Guanin hat einen großen Einfluß. Nur eine kleine Zahl von Amidresonanzen (weniger als 20%) verbleiben im wesentlichen unverändert (Abbildung 3.4.1). Das Spektrum mit der U4G Mutation zeigt mehr Ähnlichkeit mit einem von freiem NusB Protein. So werden in der Abbildung 3.4.1 D ca. 80% Überlappung der Signale gefunden. Überlagert ist das Spektrum von NusB Protein ohne RNA (grün) mit dem Spektrum vom NusB/RNA Komplex mit der U4G Mutation (rot).

Um diese Daten detaillierter zu analysieren, wurde ein allgemeiner Algorithmus für den Spektren-Vergleich von NusB Protein komplexiert mit unterschiedlichen Oligonucleotiden entwickelt (LÜTTGEN, 1999). Der Algorithmus lieferte eine Ähnlichkeitsmatrix aller betrachteten Spektren durch fortschreitende Bestimmung der numerisch optimalen Superposition zwischen zwei Spektren. Grundlage des Vergleichs waren die ^1H -Verschiebungs-Datensätze. Aus der Matrix

wurde nach der „unweighted pair-group method with arithmetic mean“ Methode (UPGMA) ein Dendrogramm erstellt (SOKAL and MICHENER, 1957). Es korreliert die Spektren der 16 verschiedenen RNA-Oligomere im Komplex mit NusB Protein in enger Übereinstimmung mit den obigen Ausführungen und ist in der Abbildung 3.4.3 gezeigt. Die Einführung einer Thymin-analogen Methylgruppe in die 5-Position von U1, U4, U6 oder U7 der *boxA* RNA führte nur zu leichten Veränderungen in den jeweiligen Spektren.

Eine größere Änderung wird durch die Einführung einer Methylgruppe in Uracil 8 der *boxA* RNA beobachtet. Modifikationen der drei Nucleotide am 3'-Ende der *boxA* werden ebenso mit minimalen Änderungen in den Spektren toleriert. So hat der Ersatz von Cytidin an Position 11 durch Adenosin nur einen geringen Einfluß auf die chemische Verschiebung der Amidsignale. Ersatz von U4 oder C5 gegen Purine verursacht größere Unterschiede der Verschiebungen. Die Spektren haben größere Ähnlichkeit mit ungebundenem NusB Protein, dennoch besteht kein Zweifel, dass eine gewisse Komplexierung stattfindet. Dasselbe findet man für Oligonucleotide mit Deletionen von drei Basen vom 5'- oder bis zu 6 Basen vom 3'-Terminus.

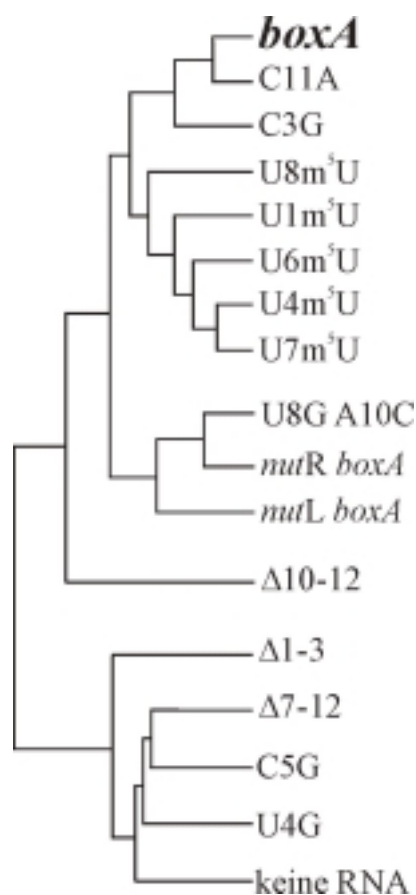


Abb. 3.4.2 Dendrogramm mit einem Vergleich der Verwandtschaft von ¹H,¹⁵N HSQC-Spektren aller 16 Oligonucleotide aus Tab. 3.4.1

3.4.2 Mutationen an der 2'-OH-Position der *rrn boxA* RNA

Parallel zu den SPR-Messungen mit den *boxA* RNA/DNA-Hybridsequenzen wurden auch NMR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt, analog zu HSQC-Spektren des mit Basen-modifizierten *boxA*-Elementen komplexierten NusB Proteins. Die verwendeten *boxA*-Sequenzen sind in Tabelle 3.4.2 mit der jeweiligen Mutation aufgeführt. Dabei bezeichnet **dN** den Ersatz des betreffenden Ribonucleotids durch das entsprechende Deoxyribonucleotid. Die Messungen wurden nach dem im Kapitel 3.4.1 erläuterten experimentellen Ansatz durchgeführt.

<i>rrn boxA</i>	Sequenz	
U1dU	5'- d UGCUCUUUAACA-3'	
G2dG	5'-U d GCUCUUUAACA-3'	
C3dC	5'-UG d CUCUUUAACA-3'	*
U4dU	5'-UGC d UCUUUAACA-3'	
C5dC	5'-UGC d CUUUUAACA-3'	
U6dU	5'-UGCUC d UUUAACA-3'	*
U7dU	5'-UGCUCU d UAACA-3'	
U8dU	5'-UGCUCUU d UAACA-3'	
A9dA	5'-UGCUCUUU d AACA-3'	*
A10dA	5'-UGCUCUUU d AACA-3'	*
C11dC	5'-UGCUCUUU d AACA-3'	*
A12dA	5'-UGCUCUUUA d ACA-3'	
RD <i>boxA</i>	5'-U d GC d UC d UU d U d Ad d Ad d A-3'	*
DR <i>boxA</i>	5'- d UG d C d U d C d UU d A d Ad d CA-3'	*
DNA d U <i>boxA</i>	5'-d(UGCUCUUUAACA)-3'*	
DNA <i>boxA</i>	5'-d(TGCTCTTTAACA)-3'	*

Tab. 3.4.2 Für ^{15}N -HSQC-Messungen verwendete RNA/DNA-Hybride von *rrn boxA*. Die Zahl bezeichnet die veränderte Position in der Sequenz, dN symbolisiert den Ersatz von riboN durch deoxyN. Mit * markierte Oligonucleotide wurden auch mit SPR untersucht.

Laut den HSQC-Datensätze für die beiden DNA-Sequenzen DNA-*boxA* und DNA(dU)-*boxA* konnte zu NusB Protein keine Komplexierung festgestellt werden. Das Spektrum **A** in Abbildung 3.4.3 zeigt die bereits bekannten deutlichen Signal-Abweichungen in der Überlagerung der Datensätze von unkomplexierten NusB Protein (grün) mit NusB/*rrn boxA*-RNA (rot). In Abbildung 3.4.3 B hingegen wurde freies NusB mit NusB/*rrn boxA* DNA verglichen. Bis auf wenige Ausnahmen sind beiden Spektren mit einem hohen Weißanteil identisch. Das NusB Protein verhält sich in Gegenwart der *boxA*-DNA mehr wie unkomplexiertes Protein, was auf keine bedeutende Interaktion schließen läßt.

In den nächsten beiden Spektren wurden die Sechsfach-Mutationen DR (C) und RD (D) in grün gegenübergestellt. Beide HSQC-Spektren wurden jeweils mit dem Datensatz von NusB/*rrn boxA* RNA (rot) überlagert. Der Weißanteil für Spektrum **C** bewegt sich in dem Bereich von Bild **A**,

was den Rückschluß auf „Nicht-binden“ für die DR-*boxA* bedeutet. Für das komplementäre Oligonucleotid RD-*boxA* ist der Deckungsgrad deutlich höher.

Wie an dem Spektrum **B** ersichtlich, sind trotz guter Deckung mit dem von Wildtyp-*boxA* komplexierten NusB Protein oft einige abweichende Signale erkennbar. Es wurde nun versucht typische Vertreter dieser Abweichungen zu finden und über die 16 unterschiedlichen mutierten *boxA*-Sequenzen zu verfolgen.

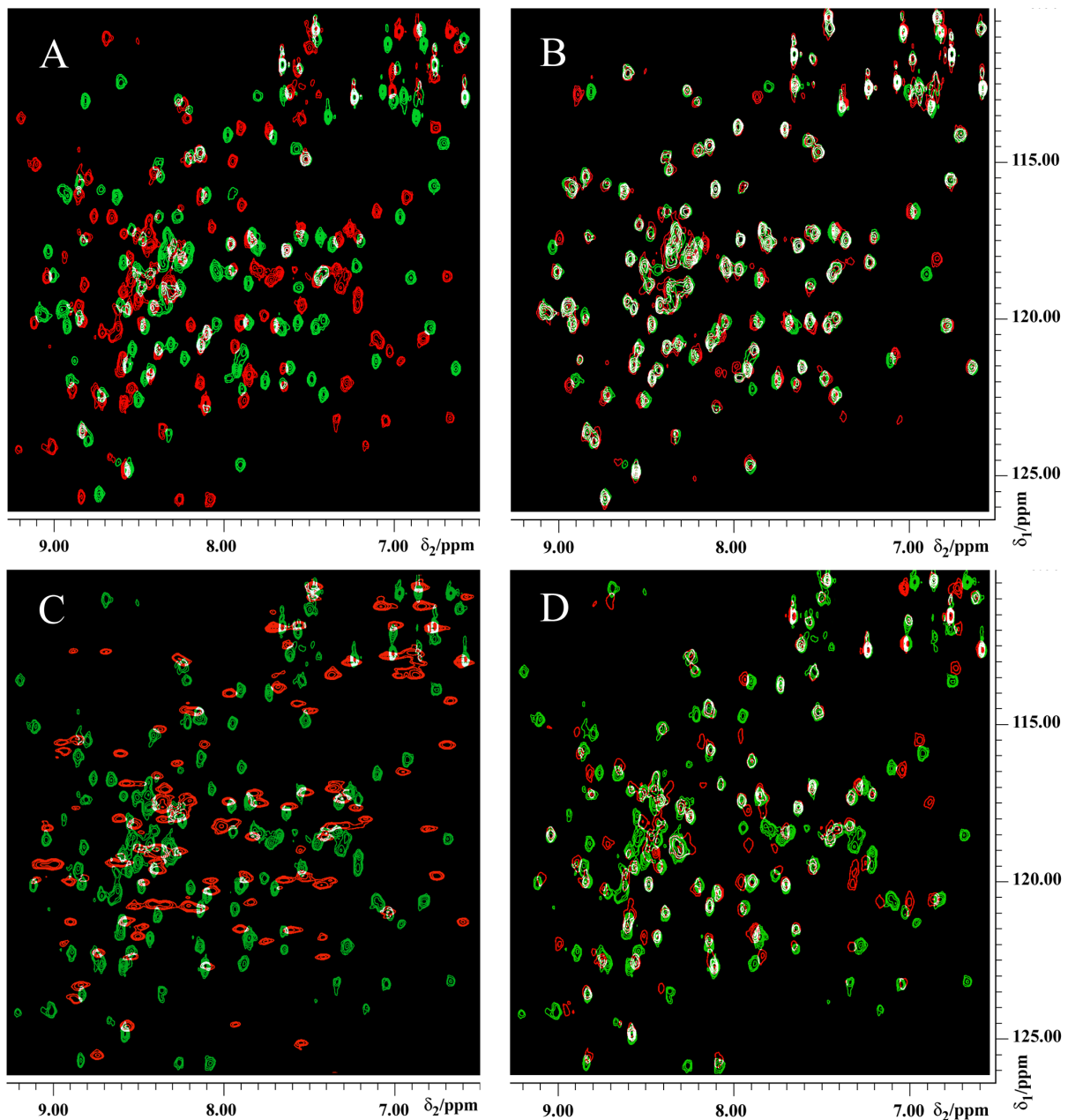


Abb. 3.4.3 Überlagerung von ^{15}N HSQC-Spektren von (A) NusB (frei) mit NusB/*rrn boxA* RNA, (B) NusB (frei) mit NusB/*rrn boxA* DNA, (C) NusB/DR-*boxA* RNA mit NusB/*rrn boxA* RNA und (D) NusB-/RD-*boxA* RNA mit NusB/*rrn boxA* RNA.

In Abbildung 3.4.4 ist rechts ein Ausschnitt aus der Überlagerung von NusB/*rrn boxA* (grün) mit NusB/C3dC (rot) angegeben. Die drei umrahmten Signalgruppen zeigen trotz fast vollständiger

Weißüberlagerung eine voneinander abweichende chemische Verschiebung. In der linken Abbildung sind diese drei Signalgruppen in einer fortlaufenden Reihe der Deoxy-Insertionen aufgeführt, dabei ist das rote Signal vom jeweiligen deoxy-Oligonucleotid.

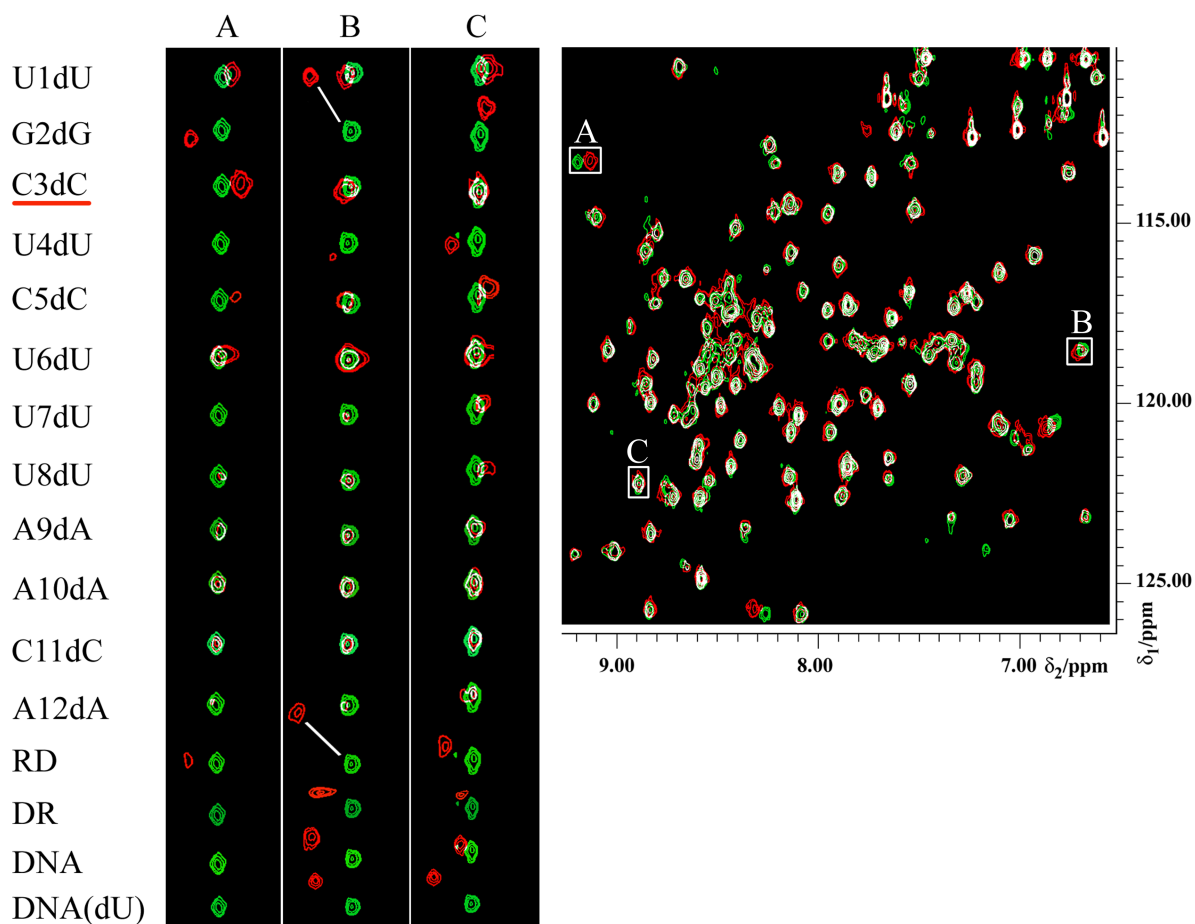


Abb. 3.4.4 Ausgewählte Signalgruppen aus einer ^{15}N -HSQC-Spektrenüberlagerung (rechts) von NusB/*rrn boxA* mit NusB/C3dC. Bei den Signalen handelt es sich um A = Lysin101, B = Valin102, und C = Lysin110. Im linken Bild sind diese drei Signale aus allen deoxy-Tauschen gegenübergestellt.

In den ersten sechs Positionen sind teilweise deutliche Differenzen in den Amidresonanzen erkennbar. Dagegen treten in der zweiten Hälfte der Sequenz keine wesentlichen Unterschiede in der chemischen Verschiebung der drei exemplarisch ausgewählten Signalgruppen auf. Anhand der NMR-basierenden Rückgratuordnung des NusB/*rrn boxA*-Komplexes, die im Rahmen einer Kooperation am Lehrstuhl von PROF. DR. KESSLER durchgeführt wurde (DEHNER *et al.*, 2001), konnten die drei Gruppen den Aminosäuren Lysin 101 (A), Valin 102 (B) und Lysin110 (C) zugeordnet werden. Sie liegen damit in räumlicher Nähe zueinander, was für die simultane Veränderung der betreffenden Amidresonanzen des NusB Proteins durch den Bindungspartner RNA spricht. Die beiden DNA-Varianten zeigen für die drei Signalgruppen naturgemäß eine starke Abweichung, da sie keine Wechselwirkung mit dem NusB Protein unterhalten.

3.5 Darstellung von ^{15}N -markierten Ribonucleosiden aus *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von RNA-komplexiertem NusB-Protein und zur Ermittlung der essentiellen Strukturbereiche der *rrn boxA* RNA für die Wechselwirkung mit NusB Protein durchgeführt. Bei all diesen Messungen wurde stets isotopmarkiertes Protein und unmarkierte Nucleinsäure eingesetzt. Die Strukturaufklärung zum NusB/*boxA*-Komplex ist also immer „blind“ in Bezug auf die RNA-Struktur und dessen Anordnung auf der Proteinoberfläche. Selbst NMR-Experimente mit selektivem NOE-Transfer auf die Ribose-Fünfringe der Ribonucleinsäure konnten bei einem so großen Liganden wie die 12 Basen lange *boxA*-Sequenz keine Anhaltspunkte über mögliche Aminosäurenachbarn des Proteins liefern.

Um die Zuordnung der RNA zur räumlichen Proteinstruktur zu erleichtern, besteht die Möglichkeit selektive Markierungen in die Sequenz der RNA einzuführen. In der Vergangenheit wurden schon erfolgreich solche Markierungsexperimente durchgeführt und zur NMR-Spektroskopie von RNA und DNA eingesetzt. Die durch *in vitro*-Transkription gewonnenen Ribonucleotidoligomere waren je nach eingesetzten Monomeren vollständig oder nur in einer oder mehreren Sorten von Nucleobasen markiert. Wenn in der Sequenz also mehrere Guanosinreste vertreten waren, so lagen sie alle in den entsprechenden Schwerisotopmarkierungen vor.

Für eine starke Vereinfachung des NMR-experimentellen Anspruchs wäre aber eine gezielte Einfachmarkierung in der Sequenz, also z.B. nur eines bestimmten Guanosins von großem Vorteil. Dazu müssen die Ribonucleotidoligomere auf chemischen Weg über Synthese an fester Phase mit der Phosphoramidit-Methode dargestellt werden. An der gewünschten Position in der Sequenz können dann entsprechend ^{15}N - oder $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ - markierte Ribonucleoside eingebaut werden. Voraussetzung ist also die kostengünstige Beschaffung von entsprechend markierten Ribonucleosiden durch Extraktion aus markierter Bakterienzellmasse.

3.5.1 Hochdichte Fermentation von *Escherichia coli*-Zellen

Um isotopmarkierte Zellmasse in großer Menge zu produzieren wurde eine Fedbatch-Fermentation mit PC-gesteuerter Substratzufuhr gewählt. Diese Art der Fermentation hat sich schon zur Darstellung isotopmarkierter Proteine (siehe 3.2.1 und 3.4.3) bewährt. Die Vorteile wie besserer Sauerstoffeintrag und pH-Wertkontrolle wurden bereits genannt. Durch die sukzessive Zugabe von Glucose als alleinige Kohlenstoff kann die Zellausbeute beträchtlich gegenüber einer Schüt-

telkolbenkultur gesteigert werden. Die Fedbatch-Kultur kann mit verschiedenen Arten der Fütterung gesteuert werden. Von zentraler Bedeutung ist dabei immer die Zugabe der Kohlenstoffquelle; man unterscheidet eine lineare, gepulste oder exponentielle Fütterung. Bei der ersten Methode wird die C-Quelle meist Glucose oder auch Glycerin mit einem fest definierten Volumenstrom ständig in das Kulturvolumen gegeben. Bei der Pulsfütterung wird eine Regelung in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung aufgebaut. Wenn die Glucosezugabe ausreichend ist, sinkt der Sauerstoffgehalt aufgrund des gesteigerten Stoffwechsels ab. Steigt die Sauerstoffsättigung wieder an und überschreitet einen definierten Schwellenwert, liegt ein Glucosemangel vor, der durch eine erneute Zugabe von Glucose behoben wird. Dieser Zugabepuls ist dabei bezüglich der Menge Glucose pro Zeiteinheit festgelegt. Wenn daraufhin die Sauerstoffsättigung den Schwellenwert wieder unterschreitet, wird die Glucosezufuhr eingestellt. Ein Vorteil bei dieser Art der Steuerung ist, dass die Glucosezufuhr sich dem tatsächlich vorliegenden Wachstumsverhältnissen im Fermenter anpaßt. Durch eine exponentielle Erhöhung der Glucose-Zugabe (YANG *et al.*, 1992) über den Fermentationsverlauf kann das exponentielle Wachstum der Zellen unter die maximale Wachstumsrate gesenkt werden. Durch eine Zugaberate der Glucose, die kleiner ist als die maximale Rate; in Minimalmedium M9 liegt sie bei $0,55 \text{ h}^{-1}$ (KOH *et al.*, 1992), wird eine Limitierung bewirkt. Raten unter $0,14 \text{ h}^{-1}$ haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen, da wenig störende Metaboliten in das Medium sezerniert werden (FIESCHKO, 1989).

Die hochdichte Anzucht der ^{15}N -markierten Zellen erfolgte im 2-Liter-Maßstab in einem Fermenter BIOFLO3000 (NewBrunswick, UK) als Fed-Batch-System. Zur Prozeßsteuerung verfügt das Gerät über eine von der Sauerstoffsättigung abhängige Regelung des Rührers, Kontroll-einrichtungen für die Kulturtemperatur, den pH-Wert und die Füllstandshöhe. Zudem konnte über einen Massflow-Controller Luft mit definiertem Volumenstrom und bei Bedarf mit erhöhtem Sauerstoffgehalt in den Bioreaktor geleitet werden. Als Medium wurde M9-Minimalmedium (MANIATIS *et al.*, 1982) verwendet. Die PC-gestützte Substratzufuhr und die Aufzeichnung der relevanten Daten wurde mit der Steuerungssoftware Ferment 1.21 (LÜTTGEN, 2000) verwirklicht. Das Medium wurde wie unter Kapitel 2.4 und 2.7 angegeben zubereitet. Verschiedene Bestandteile, wie Stickstoff und Sulfat können in der für hohe Zelldichten erforderlichen Konzentration nicht vorgelegt werden, da sonst die Gefahr einer Wachstumsinhibierung gegeben ist (RIESENBERG, 1991). Diese Komponenten wurden zusammen mit der Glucoselösung zugefüttert. Dabei ist ein ausgewogenes Verhältnis zueinander wichtig. Die Stocklösung, die über den Fermentationsverlauf in einem exponentiell ansteigenden Volumenstrom zugegeben wird, soll die Bestandteile in möglichst hoher Konzentration enthalten, um die Zunahme des Gesamtvolumens möglichst gering zu halten. Um das Verhältnis der in der Stocklösung enthaltenen Stoffe ab-

schätzen zu können ist die Ausbeutebeziehung jeder Komponente von Bedeutung. In Tabelle 3.5.1 ist angegeben, welche optische Dichte pro Liter Medium mit einem Gramm Substanz erreichbar ist.

Komponente	OD/Liter pro g	OD/Liter pro mmol
Glucose	1.5 g ⁻¹	0.3 mmol ⁻¹
Ammoniumchlorid	5 g ⁻¹	0.27 mmol ⁻¹
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	36 g ⁻¹	9 mmol ⁻¹

Tab. 3.5.1 Ausbeutebeziehung einzelner Medienkomponenten.

Für die Versorgung der Kultur mit den in Tabelle 3.5.1 angegebenen Bestandteilen wurde eine Stocklösung hergestellt (Tabelle 3.5.2). Bei Stickstoff war darauf zu achten, dass Konzentrationen über 2 g/Liter eine Inhibierung des Wachstums verursachen (RIESENBERG, 1991). Magnesium wurde in höherer Konzentration verwendet, als es die Ausbeutebeziehung erfordert, weil Mg-Ionen die Zellwände stabilisieren dadurch die Zell-Lyse unterdrücken (YEE und BLANCH, 1993).

Komponente	Masse	Stoffmenge
Glucose	500 g	2,77 M
Ammoniumchlorid	100 g	1,86 M
Magnesiumsulfat	1 g	4 mM

Tab. 3.5.2 Stocklösung zugeführter Komponenten, Angaben pro Liter.

In Tabelle 3.5.3 sind die Eckdaten zu zwei Fermentationen angegeben. Für die unmarkierte Kultur wurde im späteren Stadium zusätzlich die Luftzufuhr mit Sauerstoff angereichert, um die Sauerstoffsättigung im Medium konstant zu halten. Bei den anschließenden Extraktionen hat sich aber gezeigt, dass eine zu hohe Zelldichte sich nachteilig im RNA-Gehalt pro Gramm Zelltrockenmasse auswirkt.

Anzucht	unmarkiert	¹⁵ N-markiert
Kulturvolumen	2,7 Liter	2,3 Liter
Bakterienfeuchtmasse	527,79 g	238,28 g
Zelltrockenmasse	98,87 g	48,33 g
Optische Dichte (600 nm)	>100	71,7

Tab.3.5.3 Eckdaten zweier hochdichter Fermentationen von *E. coli* M15-Zellen.

Die Zellen müssen im Bereich eines exponentiellen Wachstums geerntet werden, um einen hohen Anteil an mRNA in den Zellen zu erhalten. Daher wurde die ^{15}N -markierte Kultur bei niedrigerer Zelldichte geerntet.

In Abbildung 3.5.1 ist der zeitliche Ablauf mit den wesentlichen Kenndaten einer Fermentation dargestellt. Nach einer gewissen *lag*-Phase am Anfang, in der erst eine Adaption an das Medium stattfindet, geht die Sauerstoffsättigung deutlich nach unten. Bei 30% als Grenzwert wird die exponentielle Fütterung gestartet und durch Erhöhung der Rührerdrehzahl die Sauerstoffsättigung konstant gehalten. Der exponentielle Anstieg der Bakterienzellemasse ist in der blauen Kurve gut zu erkennen. Die Meßdaten zur optischen Dichte wurden aber extern aufgenommen und in die Software der Prozeßsteuerung manuell eingegeben. Die Zellen wurde nach der Ernte bei -20°C zwischengelagert. Die Aufarbeitung zu den Ribonucleosidmonophosphaten erfolgte wie in Kapitel 2.14 angegeben.

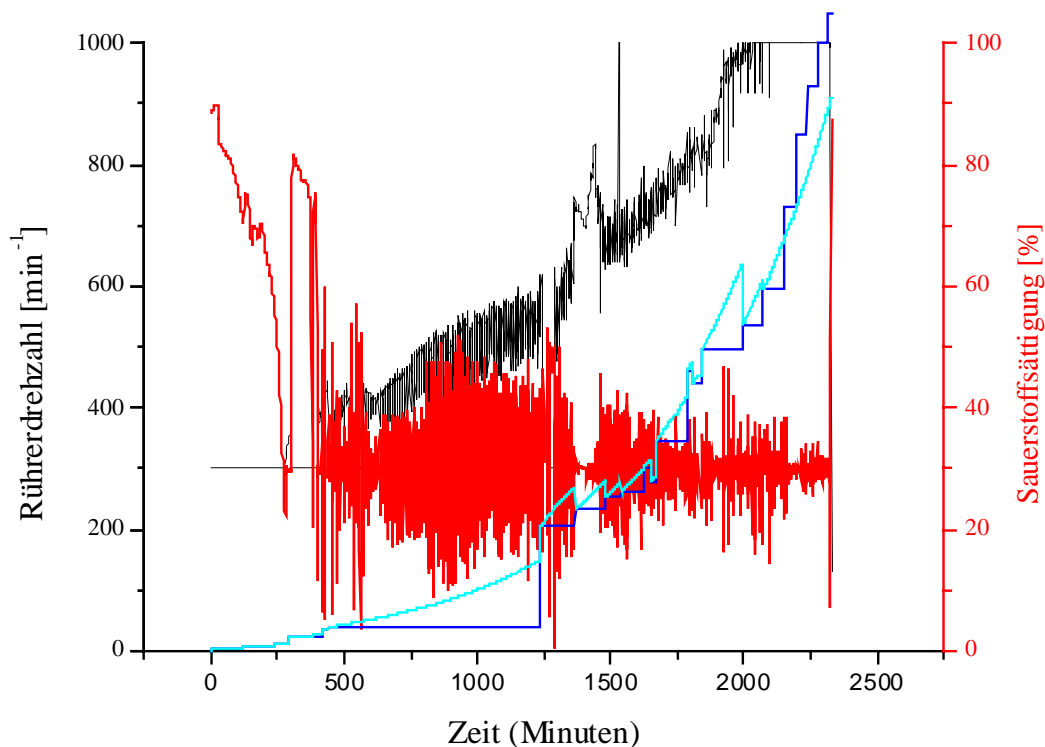


Abb. 3.5.1 Zeitlicher Verlauf einer exponentiell geführten Fermentation im Fed-Batch-Fermenter. In **rot** ist die Abnahme der Sauerstoffsättigung eingezeichnet. Die ansteigende Rührerdrehzahl bis maximal 1000 UpM ist in schwarz wiedergegeben. Die **blaue** Kurve stellt die gemessene optische Dichte, die Kurve in **Cyan** die theoretische optische Dichte dar.

3.5.2 Extraktion der Ribonucleosidmonophosphate

Zuerst wurde den Zellen das Wasser durch Gefriertrocknung entzogen. Der Wassergehalt betrug durchschnittlich rund 80% der Gesamtmasse, aus 100 g feuchten Zellen konnten 20 g Zelltrockenmasse erhalten werden. Vor der Aufarbeitung der RNA wurde den Zellen die Lipide entzogen durch ein Extraktionsverfahren nach BLIGH und DYER. Die Zellmasse wurde anschließend erneut getrocknet und anschließend mit Natronlauge alkalisch hydrolysiert. Da die Hydrolyse über die 2'-Hydroxylgruppe verläuft, wird die DNA nicht zerstört. Aus dem cyclischen Zwischenprodukt der Hydrolyse bildet sich ein Isomerengemisch aus 2'- und 3'-Ribonucleosidmonophosphat. Für die spätere Trennung der Nucleotide sind also acht Komponenten zu betrachten. Aus dem Hydrolyseansatz wurde das zelluläre Protein sauer gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit Ammoniak auf pH 8 eingestellt. In Tabelle 3.5.4 sind die Ausbeuten für die einzelnen Teilschritte angegeben.

	unmarkierte Anzucht		¹⁵ N-markierte Anzucht	
Zelltrockenmasse	41,1 g	100%	48,3 g	100 %
Lipidfraktion	5,8 g	14,1 %	7,3 g	15,1 %
Restmasse	32,2 g	78,4 %	41,0 g	84,9 %
Hydrolysat	8,8 g	21,4 %	8,8 g	18,2 %

Tab. 3.5.4 Mengenverteilung in den einzelnen Extraktionsschritten.

Die Ribonucleosidmonophosphate wurden mit Bariumacetat als Ribonucleate gefällt. Bei der zuerst erfolgten Zugabe von gekühltem Ethanol konnte aber bereits schwerlösliches Guanosinmonophosphat abgetrennt werden, welches aber noch stark mit den anderen Ribonucleotiden vergesellschaftet war. Aus der zweiten Fällung wurde das Barium dann als Sulfat abgetrennt. Bei der Extraktion der ¹⁵N-markierten Zellen wurden 4,13 g in der ersten Fraktion und 4,65 g mit Bariumacetat gefällt. Insgesamt wurden ca. 8,8 g Hydrolysat aus 48 g Zellen, als ungefähr 18 %, erhalten.

3.5.3 Separation der Ribonucleosidmonophosphate

Das Hydrolysat wurde vor einer weiteren Trennung in die einzelnen Ribonucleotide mit Reversed Phase HPLC analysiert (siehe 2.14). In Abb. 3.5.2 ist ein HPLC-Chromatogramm mit den 2',3'-Isomeren der Ribonucleotide gezeigt, für das Standardverbindungen verwendet wurden.

Über die Signalhöhen und die den einzelnen Peaks zugrundeliegende Stoffmenge konnten die Ausbeuten aus dem Trennverfahren bilanziert werden.

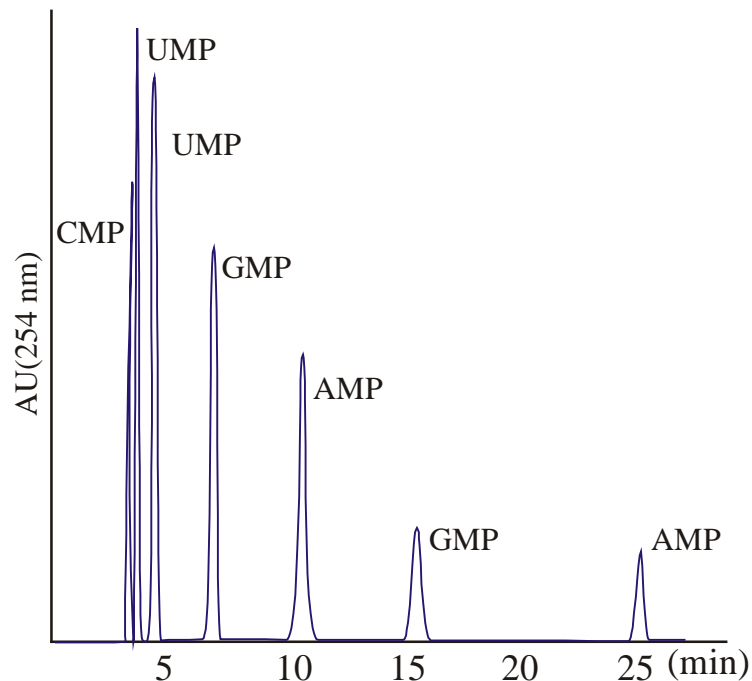


Abb. 3.5.2 Chromatogramm von 2',3'-Ribonucleosidmonophosphaten nach Reversed Phase HPLC mit 100 mM HCOOH/NH₄COOH über eine ODS-AQ Hypersil-Säule.

Für den ersten Schritt wurde der Kationenaustauscher Dowex 50 W × 8 in der H⁺-Form (200-400 mesh) eingesetzt. Die Konditionierung des Materials wurde wie unter 2.14 angegeben durchgeführt und das Material in einen Säulenkörper mit 2 cm × 34 cm gefüllt. Die Kationenaustauscher-Säule, welche üblicherweise unter dem Einfluß der Schwerkraft mit Laufpuffer entwickelt wird, wurde aus praktischen Gründen mit einer niedriger Flußrate von 1.6 ml/min an einem GradiFrac-System (Pharmacia) verwendet. Die Chromatographie wurde mit einem UV-Detektor bei 254nm Wellenlänge verfolgt. Nach dem Auftrag des gelösten Hydrolysat in einem Volumen von typischerweise 10 ml wurde zuerst mit 160 ml 50 mM Salzsäure und dann mit 2 Liter Wasser eluiert. Die gesammelten Fraktionen zu 25 ml wurden auf den pH-Wert geprüft und bei Bedarf auf 7-8 eingestellt.

Die Trennung der Komponenten erfolgt aufgrund des Ionenausschluß auf dem Kationenaustauscher. Beim Ionenausschluß werden ionisierte Substanzen durch Ionenabstoßung getrennt, wobei die Verbindungen in verschiedenem Grade ionisiert sind. Die Art der Ladung ist identisch mit der Ladung der Festionen an der organischen Harzmatrix des Austauschers. Der Grad der Ionisation der geladenen Stoffe kann durch geeignete Parameter, wie pH-Wert, Ionenstärke, org. Lösungsmittel oder Temperatur kontrolliert werden.

Der anionische Charakter der Nucleotide bei saurem pH-Wert ist auf Differenzen in der kationischen Ladung der Basen und der anionischen Ladung der Phosphatgruppen am Riboserest zurückzuführen. Daraus ergeben sich Unterschiede in der Nettoladung der einzelnen Nucleotide, die während der Chromatographie zu einer unterschiedlich großen Abstoßung von den identisch geladenen Festionen der stationären Phase führt. Ribonucleotide können somit an Kationenaustauschern durch Anionenausschluß getrennt werden. In der Tabelle 3.5.5 sind die Retentionsvolumina für die vier 2',3'-isomeren Ribonucleosidmonophosphate aufgeführt. Zuerst eluierte 2',3'-Uridinmonophosphat in einem Volumen von 275 ml, die nächste große Fraktion bildet Guanosinmonophosphat. Zuletzt erschien Adenosinmonophosphat, das erst nach einem Volumen von 2 Liter von der Säule verdrängt wurde. Die ersten AMP-Fraktionen waren mit 2',3'-CMP überlagert.

Ribonucleotid	Fraktionen	Retentionsvolumen	Elutionsvolumen
2',3'-UMP	3-13	50 ml	275 ml
2',3'-GMP	15-36	350 ml	750 ml
2',3'-CMP	55-80	1350 ml	500 ml
2',3'-AMP	70-105	1725 ml	900 ml

Tab. 3.5.5 Retentionsvolumina der 2',3'-Ribonucleosidmonophosphate nach Ionenausschluß durch den Kationenaustauscher DOWEX 50 W \times 8 in der H⁺-Form.

Die beiden isomeren UMP konnten bereits quantitativ abgetrennt werden. Es mussten aber sowohl die Guanosin- als auch die Adenosinmonophosphate von CMP getrennt werden. Dazu wurde das Anionenaustauscherharz ECTEOLA23 Cellulose von Serva in einer 30 \times 4.8 cm großen Säule verwendet und mit einem Gradienten von 0 bis 0,6 M Tetraethylammoniumacetat bei pH 5,5 in einem Volumen von 2000 ml entwickelt. Die Säule wurde zuvor mit 1 M Pufferlösung konditioniert und mit Wasser nachgespült. Die Flußrate lag bei 1.5 ml/min, die Fraktionsgröße betrug 25 ml. In einem vorher durchgeführten Testlauf mit 200 mg einer Standard-Mischung aller vier 2',3'-NMP in 5 ml Auftragsvolumen wurden zwei Fraktionen erhalten. Die erste Fraktion mit einem Volumen von 225 ml enthielt UMP und CMP und eluierte nach 550 ml. Die zweite wurde nach 825 ml Elutionsvolumen von der Säule verdrängt und enthielt in 225 ml GMP und AMP. Unter diesen Bedingungen konnten CMP und AMP voneinander getrennt werden. Vereinzelt wurden von der ersten Säule, dem DOWEX 50 W \times 8 Kationenaustauscher GMP-Fraktionen erhalten, die ebenfalls mit CMP verunreinigt waren. Auch diese beiden Komponenten konnte mit ECTEOLA23 Cellulose getrennt werden.

3.5.4 Umsetzung zu den Nucleosiden und Reinigung

Die getrennten Ribonucleotide wurden mit alkalischer Phosphatase zu den Ribonucleosiden dephosphoryliert. Dabei bildete sich im Falle von Guanidinmonophosphat ein weißer Niederschlag von Guanosin. Durch die Entfernung des Produkts aus dem Reaktionsgleichgewicht, lief diese Phosphatabspaltung quantitativ ab. Der Niederschlag wurde gewaschen und gefriergetrocknet. Bei Cytidin- und Uridinmonophosphat bildete sich nur ein schwacher Niederschlag, das Produkt blieb in Lösung. Die Umsetzung von Adenosinmonophosphat erwies sich als äußerst problematisch. Analysen mit HPLC ergaben weder die für 2',3'-AMP noch die für Adenosin zu erwartende Retentionszeit. Ansätze von AMP mit verschiedenen alkalischen Phosphatasen lieferten kein verwertbares Ergebnis. Zur Reinigung der umgesetzten Ribonucleoside wurde an einer präparativen HPLC eine Reversed Phase Lichrosorb RP18 (250 × 20 mm) verwendet. Die zu erwartenden Retentionszeiten bei einem Volumenstrom von 16 ml/min wurden vorher mit Ribonucleosidstandards ermittelt.

Ribonucleosid	Retentionszeit	Elutionsvolumen
Uridin	7 Minuten	128 ml
Cytidin	7 Minuten	144 ml
Guanosin	9 Minuten 45 Sekunden	112 ml

Tab. 3.5.6 Reinigung der umgesetzten ^{15}N -Ribonucleoside mit Lichrosorb RP 18 (250 x 20 m) bei einer Flußrate von 16 ml/min eluiert mit Wasser.

Der Ansatz von Uridin, Cytidin und Guanosin wurden in mehreren Portionen zu je 5 ml über die HPLC gereinigt. Die sich entsprechenden Fraktionen der Läufe wurden vereinigt, gefriergetrocknet und über die analytische HPLC auf Reinheit geprüft. Die ^{15}N -markierten Ribonucleoside wurden bei -20°C gelagert. In Tabelle 3.5.7 sind die Ausbeuten angegeben.

Ribonucleosid	Menge
Cytidin	207,9 mg
Guanosin	481,1 mg
Uridin	461,8 mg
Summe	1150.8 mg

Tab. 3.5.7 Übersicht über die Ausbeute an ^{15}N -markierten Ribonucleosiden.

3.6 Struktur-Untersuchung von NusG Protein aus *E. coli*

3.6.1 NMR-Spektroskopie von großen Proteinen

Bis zum Jahr 2002 wurden gegenüber 17350 Röntgenstrukturen (Brookhaven Database, 2002) immerhin über 1800 Strukturen von Proteinen in Lösung veröffentlicht. Eine besondere Stärke der NMR-Spektroskopie gegen über der Röntgenstrukturanalyse ist zudem, dass Biopolymere in ihrer physiologischen Umgebung untersucht werden können.

Vor allem in den letzten 10 Jahren hat die NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Proteinstrukturanalytik beachtliche Fortschritte gemacht. Proteine bis zu einer Größe von 20 kDa sind inzwischen relativ gut zugänglich (OSCHKINAT *et al.*, 1984). Eine sehr wesentliche Voraussetzung dazu war die 2D-Spektroskopie (ERNST, 1992), welche unter anderem den Zugang zur experimentellen Bestimmung der chemischen Verschiebung der Kerne, Kopplungskonstanten und Kern-Overhauser-Effekte an komplexen Verbindungen eröffnete. Zum anderen konnten auf der gerätetechnischen Seite immer stärkere Magnetfelder bis hin zu 18,8 Tesla (800 MHz Protonenresonanz) erzeugt werden.

Mit steigender Molekülgröße ergeben sich immer mehr Signalüberlagerungen. Die Weiterentwicklung zu 3D und 4D-NMR-Techniken hat hier eine Lösung gebracht. Auf der biochemischen Seite war die Einführung der rekombinanten Expression stabilisotopmarkierter Proteine (BAX, 1994; GARDENER und KAY, 1998) ein bedeutender Durchbruch. Durch die ^{13}C , ^{15}N Doppelmarkierung von Proteinproben wurden Tripelresonanzexperimente (BAX *et al.*, 1993) möglich, die zumindest theoretisch die zweifelsfreie Bestimmung der Konnektivität zwischen den einzelnen Aminosäuren zulassen. Zudem basieren diese Experimente auf schnellen Kohärenztransfers über ^1J -Kopplungen mit einer hohen Frequenz, so dass die Relaxation die Empfindlichkeit und Signalbreite der Experimente nicht so stark beeinflusst. Ein weiterer Vorteil dieser Markierung ist die Möglichkeit, die chemische Verschiebung der Heterokerne als zusätzliche Dimension zu den detektierten Protonen in das Spektrum mit aufzunehmen. Aufgrund der guten Dispersion der chemischen Verschiebung von C_α , CO und N ist die Signalüberlagerung weitgehend verringert. Mit zunehmender Größe des Proteins stößt man aber wieder an die Grenze des Machbaren, die Zahl der Signale steigt an, gleichzeitig sinkt die transversale Relaxationszeit, was zur Signalverbreiterung führt. Mit den Methoden ist es aber möglich Proteine mit bis zu 280 Aminosäuren zuzuordnen (WÜTHRICH, 1998).

Durch eine partielle Deuterierung kann die Signalverbreiterung durch Relaxation via dipolarer H-H-Kopplung deutlich verringert werden (LEMASTER, 1994). Die NH-Protonen tauschen ent-

weder bei physiologischem pH komplett aus oder können durch Denaturierung und Rückfaltung vollständig ausgetauscht werden. Somit sind Tripelresonanzexperimente zur Proteinrückgratzuordnung mit „volldeuterierten“ Proben möglich. Um aber auch die Zuordnung der Seitenketten mit einzubeziehen, werden oft nur teildeuterierte Proben verwendet um die Seitenkettenprotonen nicht zu stark zu „verdünnen“. Der Kompromiß zwischen Signalintensität und –breite liegt bei 75% Deuterierungsgrad (GARDENER und KAY, 1997).

3.6.2 Darstellung von schwerisotopmarkierten NusG Protein aus *E. coli*

Zur Strukturanalyse des 181 Aminosäure langen NusG Proteins wurden verschiedene Schwerisotop-Markierungen verwendet. Die Darstellung auf molekularbiologischem Weg entsprach im wesentlichen der Gewinnung von NusB-Protein in Kapitel 3.2. In Tabelle 3.6.1 ist eine Übersicht zu den generierten NusG-Proben gegeben.

Markierung NusG	Glucose [g]	NH ₄ Cl [g]	OD ₆₀₀ bei Induktion	IPTG [mM]	OD ₆₀₀ bei Ernte	Zellmasse, feucht [g]	Protein [mg]
¹⁵ N	¹² C: ---	¹⁵ N: 3	8,5	5	13,8	21	82
¹³ C/ ¹⁵ N	¹³ C: 5	¹⁵ N: 1,5	2,1	2,5	4,2	8	27,3
² H/ ¹³ C/ ¹⁵ N	¹³ C: 6	¹⁵ N: 1	2	2,5	3,7	7	37,5

Tab. 3.6.1 Übersicht über wichtige Fermentationsdaten zur Darstellung von rekombinantem NusG Protein in verschiedenen H-, N- und C-Markierungen. Das Kulturvolumen betrug bei der ¹⁵N-Markierung 2 Liter, bei den übrigen Markierungen jeweils 1 Liter pro Fermentation. Der Deuterierungsgrad für ²H/¹³C/¹⁵N-NusG lag bei ca. 75%.

Für die teildeuterierte Anzucht wurde ¹³C-Glucose und ¹⁵N-Ammoniumchlorid in D₂O aufgenommen, beide Verbindungen lagen selbst aber nicht in deuterierter Form vor. Um die fehlende Teildeuterierung der C- und N-Quellen auszugleichen, wurde ein Anteil von D₂O im Medium von 95% gewählt. Die Vitamine, Spurenelemente und die Vorkultur im Verhältnis 1:50 wurden jeweils in H₂O zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH konstant gehalten.

Bei der ¹³C/¹⁵N-Anzucht wurde vor der Induktion mit ¹²C-Glucose gestartet und bis zu einer OD von 2 fermentiert. Die Glucosezufuhr wurde abgestellt und der vollständige Verbrauch noch vorhandener ¹²C-Glucose abgewartet, erkennbar an einer Sauerstoffsättigung um 90%. War dieser Wert erreicht, wurden 100 mg ¹³C-Glucose zugegeben und erneut ein Glucosemangel abgewartet. Nach wiederholter Zugabe von ¹³C-Glucose wurden die Zellen mit IPTG induziert. Der Einsatz von unmarkierter Glucose in der ersten Wachstumsphase erwies sich, anhand der gemess-

senen Spektren der Probe, als ohne Einfluß auf den Markierungsgrad. Durch diese Strategie lässt sich der Einsatz der sehr teuren ^{13}C -Quelle effektiv reduzieren.

3.6.3 Rückgrat-Zuordnung von NusG Protein

Die Klärung der NusG-Proteinstruktur mittels NMR-Spektroskopie und darauf aufbauende Struktur-Bindungs-Studien sollten dazu beitragen können, den komplexen Mechanismus im Antiterminationskomplex weiter aufzuklären. Sämtliche NMR-Spektren wurden im Rahmen einer Kooperation am Lehrstuhl für Organische Chemie von PROF. DR. KESSLER (TU München, Garching) aufgenommen. NusG Protein aus *Escherichia coli* setzt sich aus 181 Aminosäuren zusammen. Bei Molekülgrößen in diesem Bereich kommt es in den NMR-Spektren zu sehr weitreichenden Überlagerungen. Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie hoch die Auflösung von NusG-NMR-Spektren ist und damit die generelle Machbarkeit einzuschätzen, wurde zunächst eine ^{15}N -NusG Probe hergestellt. Dazu wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 pNCO113-*nusG* in Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle fermentiert wie in Kapitel 2.7 erläutert und das Protein nach den Angaben von Kapitel 3.1.1.2 gereinigt.

Diese Probe wurde dahingehend untersucht, ob alle für die Sekundärstruktur notwendigen Resonanzen der Amidprotonen detektierbar sind. Aus diesem Grund wurde ein ^{15}N -HSQC -Spektrum aufgenommen.

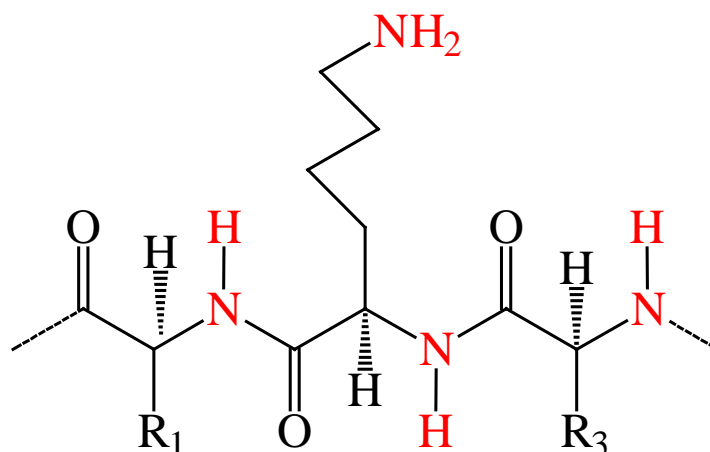


Abb. 3.6.1 Durch ^{15}N -HSQC-Spektrum bestimmbare Atome innerhalb des Proteins sind in rot dargestellt.

Durch diese Messungen können Korrelationen zwischen Kernen unterschiedlicher Art (in diesem Fall H und N) über chemische Bindungen bestimmt werden (Abb. 3.6.1). Das Spektrum von NusG-Protein zeigte eine relativ gute Dispersion im Bereich von 100 bis 134 ppm für die Stickstoffdimension. Aufgrund der NusG-Sequenz würde man theoretisch um 206 Amidsignale

erwarten. Davon waren mit ca. 130 Amidresonanzen im ^{15}N -HSQC-Spektrum in Abbildung 3.6.2 nur 68 % nachweisbar, wenn man die ϵ -NH-Gruppen der Arginine außer Acht läßt. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei dem gemessenen Signalsätzen um den eines Monomers handeln dürfte. Zudem sind aber offensichtlich Bereiche des Proteins spektroskopisch nicht zugänglich. Die Auflösung des Spektrums war für ein Protein dieser Größe befriedigend.

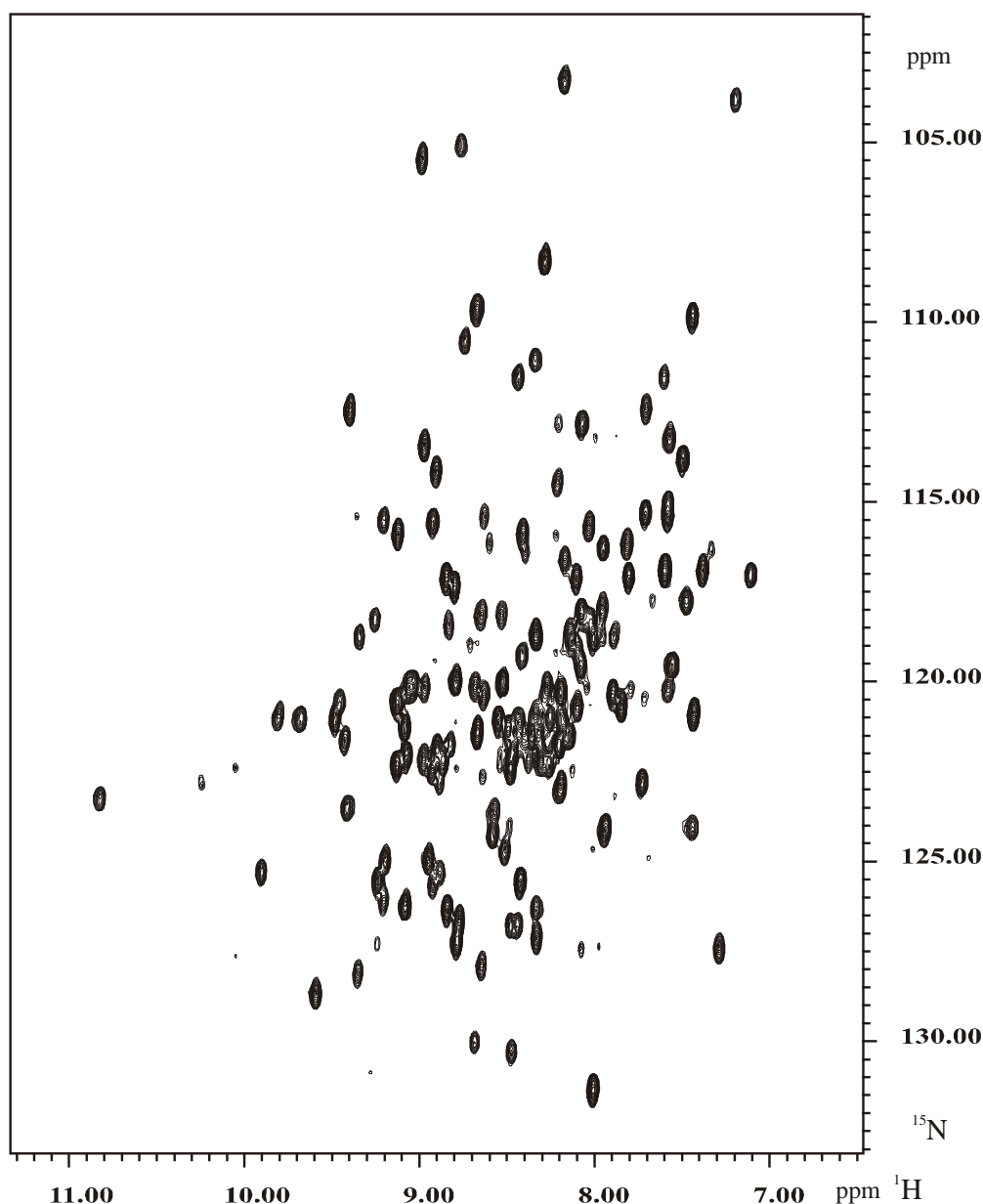


Abb. 3.6.2 ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -NusG aufgenommen von der Arbeitsgruppe Kessler (TU München, Garching).

Da die Zuordnung der Signale bei einem Protein von der Größe oft erst durch die teilweise (*random*) Deuterierung des Proteins möglich wird, war der nächste Schritt die partielle Deuterierung von NusG Protein. Deuterium hat einen deutlich niedrigeren gyromagnetischen Wert als

^1H und dadurch auch deutlich weniger Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Dadurch sinkt die Relaxationsrate im Protein während der NMR-Messung und die Signale werden schärfer.

Würde ein Protein unter 99,9% ^2H -Bedingungen angezogen, so würden die Protonen der Seitenketten, die nicht austauschen, deuteriert vorliegen. Anders verhält es sich mit den Amidprotonen und den Protonen am $\text{C}\alpha$, die je nach ihrer Umgebung in $^1\text{H}_2\text{O}$ wieder gegen ^1H austauschen könnten. Unter den Bedingungen der Proteinreinigung und Protein-NMR-Messung, d.h. im pH-Wert-Bereich von 7-7,5 geschieht dieser Austausch aber nur sehr langsam, z. T. über Wochen oder Monate, und abhängig von der jeweiligen Umgebung des Deuteriumatoms. Für Experimente, die die Seitenketten mit einschließen ist aber eine statistische Verteilung der ^1H -Protonen über das Protein notwendig, da an allen Protonenpositionen ein Anteil an ^1H notwendig ist, um eine Detektion im Spektrum möglich zu machen. Aus diesem Grund wurde ein ^2H -Gehalt von 75% für die $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Fermentation von NusG Protein angestrebt.

Mit diesem Markierungsmuster wurden verschiedene 3D-Experimente aufgenommen, darunter HNCA, HNCOC, HNCACO und HNCACB. Dabei wurde versucht anhand der Aminosäuresequenz eine Zuordnung von Signalen entlang des Proteinrückgrats vorzunehmen. Die aus dem aufgenommenen TROSY-HNCA-Spektrum mit ^2H -Entkopplung bestimmbar Atome sind in Abbildung 3.6.3 schematisch dargestellt.

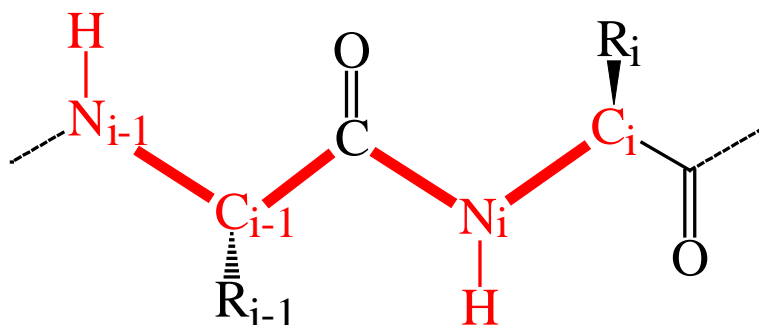


Abb. 3.6.3 Durch Spektren des HNCA bestimmbare Atome innerhalb des Peptids sind rot markiert.

Im HNCOC-Experiment erfolgt eine Korrelation zwischen dem Amidproton- $\text{HN}_{(i)}$ und Stickstoff $\text{N}_{(i)}$ einer Aminosäure und dem $\text{CO}_{(i-1)}$ der vorhergehenden Aminosäure. Im HNCACO-Experiment wird zusätzlich das eigene $\text{CO}_{(i)}$ -Signal erhalten, neben den Signalen von $\text{C}^{\alpha}_{(i)}$ und $\text{C}^{\beta}_{(i)}$. Im HNCACB-Experiment erfolgt eine Korrelation der Amidprotonen- $\text{HN}_{(i)}$ und -Stickstoffatome $\text{N}_{(i)}$ einer Aminosäure mit den C^{α} und C^{β} -chemischen Verschiebungen sowohl der eigenen ($\text{C}^{\alpha}_{(i)}$; $\text{C}^{\beta}_{(i)}$) als auch der vorhergehenden Aminosäure ($\text{C}^{\alpha}_{(i-1)}$; $\text{C}^{\beta}_{(i-1)}$). Mit diesen Experimenten konnten trotz teils hervorragender Qualität in Bezug auf die Auflösung der Signale, vor allem im 3D-HNCA-Spektrum, nur 32% der Sequenz zugeordnet werden. In Abbildung 3.6.4 ist ein Ausschnitt aus dem HNCA-Spektrum von 75% $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NusG Protein wiedergegeben. Die An-

gaben zur Sequenz sind aufgrund des geringen Zuordnungsgrades mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanzen im HNCA sind hervorragend aufgelöst, liegen aber unter der zu erwartenden Anzahl von Signalen. Auch in den anderen Spektren sind die Datensätze deutlich unter den theoretischen Erwartungen.

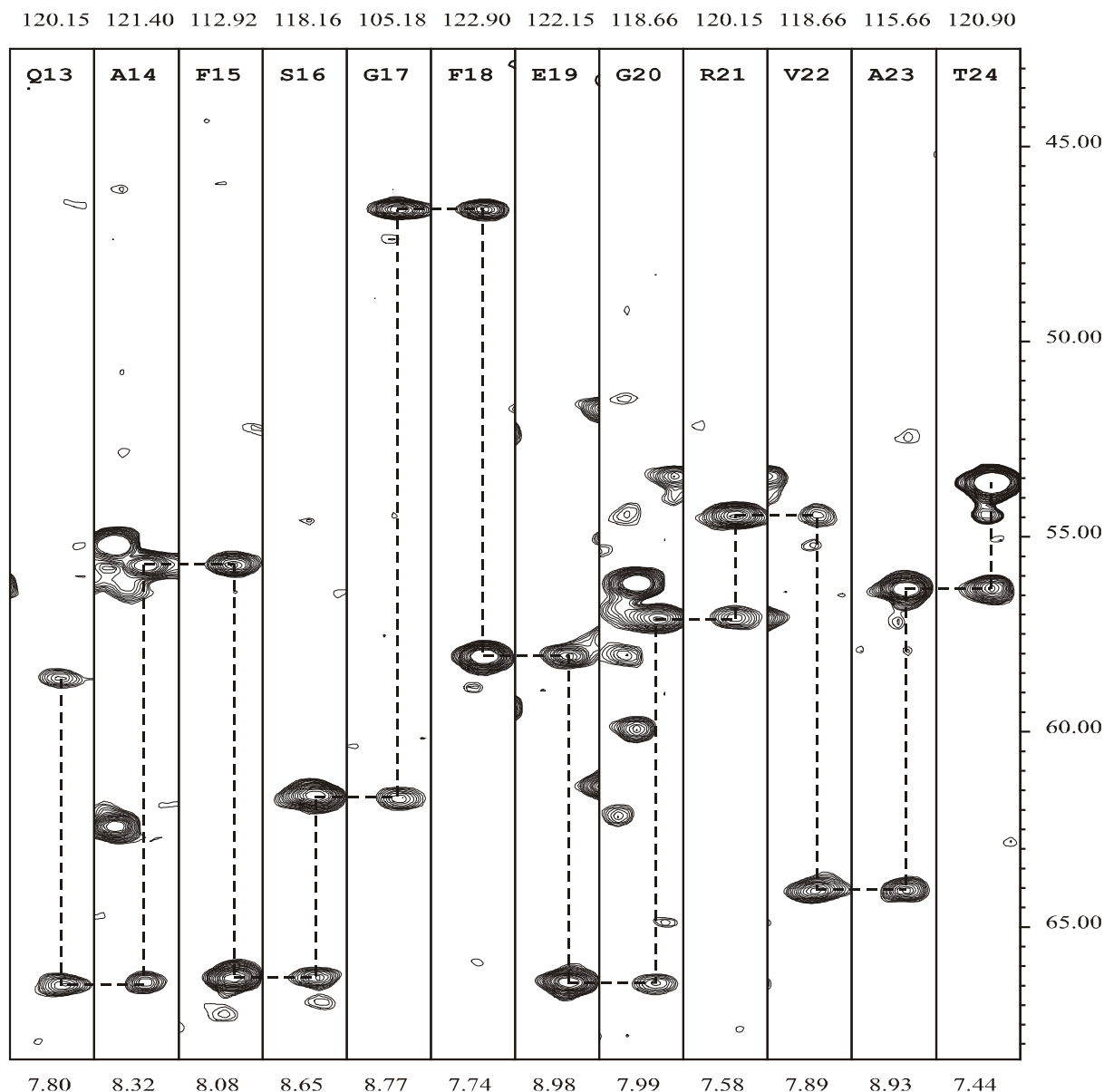


Abb. 3.6.4 Zuordnung von $^{13}\text{C}^\alpha$ -Resonanzen des Proteinrückgrats. Gezeigt sind Streifen aus dem TROSY-HNCA-Spektrum (^2H -Entkopplung) des 75% $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten NusG Proteins.

Um für die zugeordneten Sequenzabschnitte von NusG Protein eine Abschätzung zu Sekundärstrukturelementen zu erhalten, wurde das CSI-Verschiebungsmuster der betroffenen Aminosäuren für H^α , C^α , CO und C^β wie in Abbildung 3.6.5 angegeben aufgetragen. Wie bereits im Fall des NusB/RNA-Komplex erwähnt, übt die Sekundärstruktur als eine äußere chemische Umgebung einen statistisch relevanten Einfluß auf die chemische Verschiebung der Aminosäuren

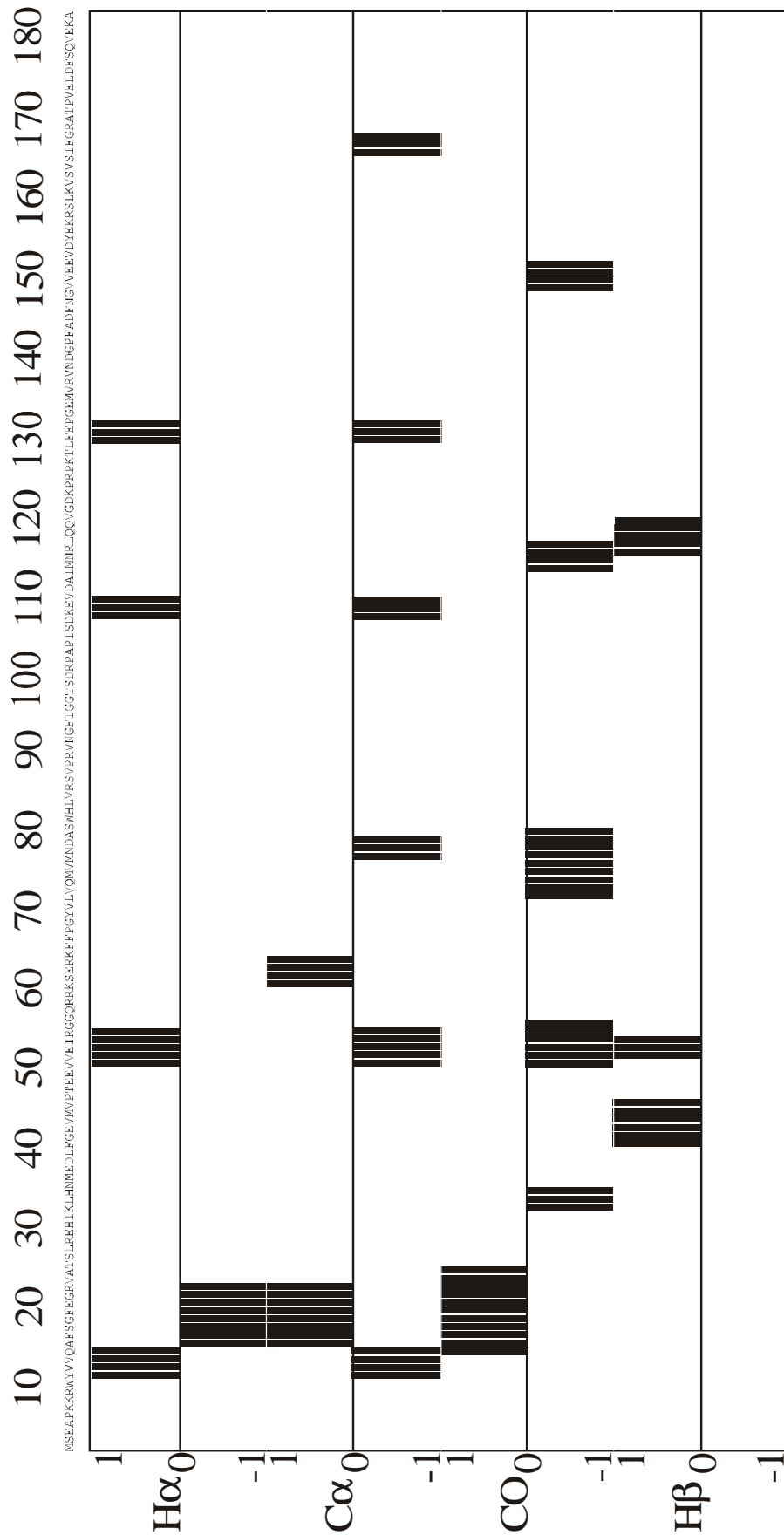


Abb. 3.6.5 Graphische Darstellung der Abweichung der chemischen Verschiebung von jedem zugeordneten Aminosäurerest gegenüber den *random coil*-Werten. Positive Verschiebungen entsprechen dabei einer Tieffeldverschiebung.

aus. In α -helikalen Bereichen wird eine Verschiebung der H^α - und etwas weniger ausgeprägt, der C^β -Resonanzen zu tieferen Werten beobachtet, die C^α - und die CO-Signale sind jedoch zu höheren Werten verschoben. β -Faltblattstrukturen zeigen ein umgekehrtes CSI-Muster, wobei die Effekte bei C^β hier deutlich weniger ausgeprägt sind als bei C^α . Da die Verschiebungsbereiche der C^β für α -Helices und β -Faltblätter eine deutliche Überlappung aufweisen, werden sie in Verbindung mit H^α , C^α und CO für die Bestimmung von β -Faltblätter herangezogen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6.6 zusammengefasst. Die Proteinsequenz ist an den Bereichen mit einer ersten Rückgratzuordnung gelb unterlegt. Über der Sequenz sind in rot Sekundärstrukturelemente angegeben. Die schwarzen Symbole sind von untergeordneter Bedeutung. Unter der Sequenz ist eine hypothetische Sekundärstruktur angegeben.

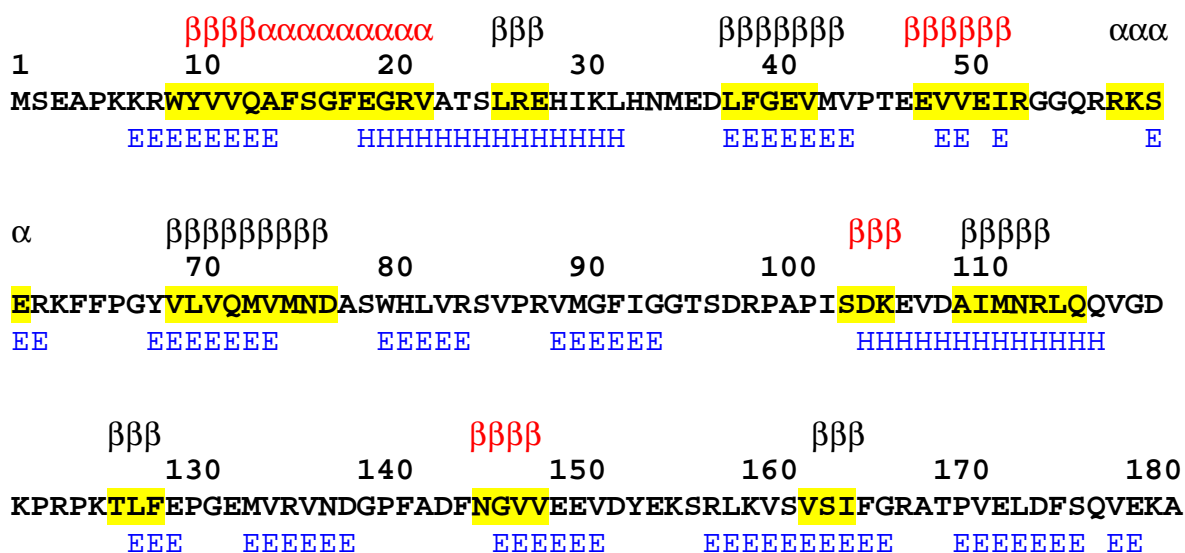


Abb. 3.6.6 Proteinsequenz von NusG aus *Escherichia coli* mit 181 Aminosäuren. In den Zeilen darüber sind in **rot** und **schwarz** Sekundärstrukturelemente aus dem CSI-Muster angegeben. Die roten Motive sind als Consensus aus dem CSI-Vergleich hervorgegangen. Unter der Sequenz sind in **blau** hypothetische Sekundärstrukturelemente nach GASCUEL (H: Helix, E: Extended) angegeben.

4 Diskussion

4.1. Struktur von mit *boxA*-RNA komplexierten NusB Protein

4.1.1 Stabile Protein/RNA-Proben zur NMR-Spektroskopie

Eine Grundvoraussetzung für die teils zeitintensive NMR-Spektroskopie ist die ausreichende Stabilität und die Löslichkeit des Proteins oder der Protein/RNA Probe. Im Rahmen der Strukturaufklärung von mit *rrn boxA* RNA komplexiertem NusB Protein mit NMR war die Probenstabilität ein wesentliches Problem. In ersten Messungen war bereits nach wenigen Stunden unkomplexiertes NusB im HSQC-Spektrum erkennbar, was die Anwendung mehrtägiger 3D-Experimente unmöglich machte. Der Verlust von RNA-Oligonucleotiden in den Proben war auf die Anwesenheit RNA-degenerierender Agentien zurückzuführen.

NusB-Protein war bis zu einer Konzentration von 1 mM stabil und gut zu handhaben. Bei vielen Proteinen bilden sich bei höheren Konzentrationen unlösliche Aggregate, die keine NMR-Spektroskopie ermöglichen. Die Aggregation von Proteinen ist zumeist auf hydrophobe Kontakte an der Oberfläche zurückzuführen und ist irreversibel. Erst bei Konzentrationen über 1,3 mM wurde die Probe durch die Bildung eines unlöslichen Proteinniederschlags wesentlich beeinträchtigt.

Der Abbau der RNA in der Probe konnte mit NMR gut verfolgt werden. Allerdings war die Methode für eine detaillierte Analyse der Probeninstabilität aufgrund des zeitlichen und finanziellen Aufwands nicht geeignet. Für jede Messung hätte eine Probe mit den für NMR üblichen Konzentrationen an Protein und an RNA eingesetzt werden müssen. Es wurde daher mittels HPLC ein Testverfahren entwickelt, um den RNA-Gehalt in einer Protein/RNA-Mischung in Abhängigkeit von der Zeit zu bestimmen. Mit diesem Assay wurden die als ungeeignet erkannten Protein-Chargen überprüft. Der äußerst schnelle Abbau der *boxA* konnte verifiziert werden.

Neben der Empfindlichkeit gegenüber stark alkalischem Milieu könnten vor allem die aus den Bakterienzellen bei der Proteindarstellung verschleppten Ribonucleasen für die RNA-Schädigung verantwortlich sein. Ribonuclease I war die erste bekannte Endoribonuclease aus *E. coli* mit sehr breiter Spezifität gegenüber RNA. Es wurde zuerst vermutet, dass das Enzym hauptsächlich für den Zerfall von mRNA in Zellextrakten verantwortlich ist (MEADOR III and

KENNEL, 1990; MEADOR III *et al.*, 1990). Eine weiterer Vertreter mit einer breiten Spezifität für RNA war die RNase M (CANNISTRARO and KENNEL, 1989), die darin der Ribonuclease A aus dem Pankreas ähnlich ist. Die Überlegungen gingen nun dahin, in der RNase M das für den Zerfall von mRNA hauptverantwortliche Enzym zu sehen. Exoribonuclease II ist am Abbau von mRNA durch Hydrolyse des Einzelstrangs in 3'-5'-Richtung involviert (NOSSAL and SINGER, 1968). Ribonuclease III schneidet doppelsträngige RNA. Sie bewirkt eine endonucleolytische Abtrennung von 5'-Ribonucleosidmonophosphaten im Rahmen der Prozessierung ribosomaler RNA Precursoren (ROBERTSON, 1990). Daneben sind die RNasen HI und HII für RNA-Abbau in RNA/DNA-Hybridstrukturen verantwortlich. Weitere Ribonucleasen von *E. coli* wie D, P, BN, und T prozessieren vor allem tRNA (CUDNY and DEUTSCHER, 1980; STARK *et al.*, 1978; DEUTSCHER *et al.*, 1985). Die RNase E bewirkt die Prozessierung der 5S rRNA von der naszierenden RNA (ROY und APIRION, 1983).

Neben den RNasen II und H sind also vor allem die beiden Ribonucleasen I und M im Zell-extrakt von *E. coli* für den Verlust von RNA verantwortlich. Für die Probenstabilität von NusB/*boxA* wird dabei die RNase H mit ihrer Spezifität für RNA/DNA-Hybridstrukturen weniger eine Rolle spielen. Dagegen müssen die anderen drei Ribonucleasen I, II und M für eine stabile NMR-Probe möglichst bei der NusB-Präparation entfernt werden.

RNase I und M sind beide ca. 27 kDa groß und auch in den physikalischen Parametern sehr ähnlich. Durch Arbeiten von MEADOR III und Mitarbeiter (1990) wurde erkannt, dass vor allem RNase I an MonoS, einem starken Anionenaustauscher, gut bindet und erst bei 450 mM Natriumchlorid eluiert. In Studien von COBURN (1996) konnte gezeigt werden, dass RNase II an eine Affinitätsäule Affi-Gel blue, und auch an Hydroxylapatit bindet, von dem es mit 75 mM Kaliumphosphat bei pH 7,5 verdrängt werden kann. Diese Säulentypen MonoS, Blaue Sepharose und Hydroxylapatit wurden daher auf ihre Tauglichkeit zur Entfernung der RNA-schädigenden Begleitsubstanzen getestet. Dabei war natürlich zu berücksichtigen, dass keine Chromatographie eine absolute Abtrennung von Fremdprotein ohne Rückstände leisten kann, wenn auch die Restkonzentration äußerst niedrig sein mag. Die NusB-Proben waren nach Anwendung der genannten Säulen-Materialien laut SDS-PAGE absolut homogen. Im RNA-Stabilitäts-Assay war jedoch in den NusB-haltigen Fraktionen immer noch eine RNA-schädigende Aktivität nachweisbar. Daher war zu vermutet, dass NusB Protein nach wie vor mit fremden Protein vergesellschaftet war, wenn auch in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich. In Anbetracht der hohen Aktivitäten der RNasen genügen jedoch bereits Spuren einer Kontamination um die Stabilität der NusB/RNA nachhaltig zu stören. In diesem Zusammenhang wäre auch eine hypothetische RNase-Aktivität von NusB Protein zu disku-

tieren, wenn auch mit sehr niedrigem Umsatz. Das Protein bindet relativ fest an das *boxA*-Motiv; eventuell wird die Abtrennung bei der Auflösung des Antiterminationskomplexes durch eine solche Funktion von NusB erreicht.

Zu der aufwendigen Chromatographie, bei der natürlich durch entsprechende Dekontamination ein zusätzlicher Eintrag vor allem von RNase A vermieden wurde, mussten parallel Maßnahmen erschlossen werden. Dabei wurde auch versucht, die Stabilität der RNA selbst zu erhöhen. Eine Modifikation der *boxA*-Sequenz durch Einführung eines zweibasigen „Deoxy-Caps“ am 3'- und 5'-Terminus erhöhte die Stabilität bereits in den Bereich von 60 Stunden. Allerdings können dadurch nur Endoribonucleasen wirksam inhibiert werden. Ein essentieller Prozeß war auch die Vorbehandlung von sämtlichen Puffern und Lösungen mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat mit Ausnahme bei Tris-Systemen (EHRENBERG *et al.*, 1966), da DEPC mit Aminfunktionen reagiert. Nach einer gewissen Inkubationszeit wurde DEPC durch Autoklavieren entfernt. Die Verwendung von RNasin, einem aus humaner Plazenta isoliertem Protein (BLACKBURN and JAILKHANI, 1979), an das verschiedenen RNasen sehr stark binden, erwies sich als sinnvoll gegen RNase A. Zudem wurde neben EDTA standardmäßig Dithiothreitol als Oxidationsschutz verwendet. Bei allen Hilfsstoffen war wichtig, daß die Probenzusammensetzung immer den Erfordernissen von Physiologie und NMR-Spektroskopie gerecht wurde. So schieden denaturierende Bedingungen, wie die Verwendung von Guanidiniumthiocyanat naturgemäß aus. Zusatz von Macaloid, einer lehmartigen Substanz oder von Vanadylribonucleosid-Komplexen war ebenso nicht zu verwirklichen.

Durch die Erhöhung des Anteils von *boxA*-RNA auf ein Verhältnis zum Protein von 3:1 in der Probe konnte in Ergänzung zu den oben beschriebenen Maßnahmen der entscheidende Erfolg erzielt werden. Die Proben mit NusB-Protein in verschiedenen Markierungsmustern waren gut 15 Tage in NMR-Experimenten verwendbar und ermöglichten die Aufnahme mehrerer 3D-Spektren. Die RNA-Schädigung konnte zwar nicht vollständig reduziert werden, aber es stand über den genannten Zeitraum ausreichend RNA für eine 1:1 Komplexierung des NusB Proteins zur Verfügung. Der Verlust von überschüssigen RNA-Oligonucleotiden hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die NMR-Experimente. Die Anreicherung von Mononucleotiden in der Probenlösung mag zudem eine Produktlimitierung der noch vorhandenen Ribonucleasen bewirkt haben.

4.1.2 Sekundärstruktur des NusB Proteins im Komplex mit *rrn boxA* RNA

In den letzten Jahren wurden die räumlichen Strukturen einiger RNA bindender Proteine veröffentlicht. Drei Faltungsmotive dieser Proteine, Ribonucleoprotein RNP (NAGAI *et al.*, 1990), K-Homologie-Domäne KH (MUSCO *et al.*, 1996) und die doppelsträngige RNA-Bindedomäne dsRBD (BYCROFT *et al.*, 1995), weisen eine gemischte Faltungstopologie aus α -Helices und β -Faltblättern auf. Sie bilden kompakte globuläre Strukturen und besitzen alle ein $\alpha\beta$ -Faltungsmotiv mit einem antiparallelem β -Faltblatt auf einer Seite des Proteins, das über ein hydrophobes Zentrum an eine Schicht aus α -Helices gebunden ist. Dieses $\alpha\beta$ -Strukturmotiv ist in vielen RNA-bindenden Proteinen konserviert, obwohl sie keinerlei Sequenzhomologie zu anderen Proteinen aus dieser Strukturklasse aufweisen. Beispiele sind ribosomale Proteine (LILJAS *et al.*, 1995) und Translationsfaktoren (Biou *et al.*, 1995). Daraus wurde geschlossen, dass die $\alpha\beta$ -Faltungstopologie eine besonders günstige Struktur für die RNA-Erkennung darstellt (VARANI, 1997). In letzter Zeit wurden RNA-bindende Proteine mit ausschließlich α -helikaler Struktur beschrieben, z. B. das ribosomale Protein S15 (BERGLUND *et al.*, 1997) sowie die C-terminale RNA-Bindedomäne des ribosomalen Proteins L11, die in ihrer Konformation sehr flexibel ist und erst nach Bindung der entsprechenden RNA eine definierte Struktur zeigt (MARKUS *et al.*, 1997). Ebenso verhält sich N Protein aus dem λ Phagen, das erst nach Bindung an die λ *boxB* RNA eine strukturell geordnete Konformation einnimmt (VAN GILST und VON HIPPEL, 1997).

Im Vergleich zu diesen RNA-bindenden Proteinen weist NusB Protein mit seiner helikalen Faltungstopologie mit sieben Helices eine ungewöhnliche Sekundärstruktur auf und kann daher in eine neuartige Faltungsklasse von überwiegend α -helikalen RNA bindenden Proteinen eingeordnet werden (XING *et al.*, 1997).

Homologe von NusB Protein aus *Escherichia coli* sind in verschiedenen Organismen vorhanden. Ein mit FASTA3 erstelltes Alignment von hypothetischen NusB Proteinen wird in Abbildung 4.1 gezeigt. Die aus der NMR-Analyse ermittelten Helixbereiche sind durch schwarze Balken oberhalb der Sequenz dargestellt. In Bezug auf NusB von *E. coli* konservierte Aminosäuren sind farblich unterlegt und in der Zeile *consensus* aufgeführt. Die Farbgebung weist auf die Zugehörigkeit der jeweiligen Aminosäure zu den positiv oder negativ geladenen oder denen mit aromatischer oder aliphatischer Seitenkette hin. Der Arginin-reiche Abschnitt einschließlich Helix $\alpha 1$ ist in allen Sequenzen gut konserviert. Zudem liegt für die C-terminale Untereinheit, Helix $\alpha 5$ bis $\alpha 7$, bei den gezeigten Vertretern eine gute Übereinstimmung vor.

NusB Alignment

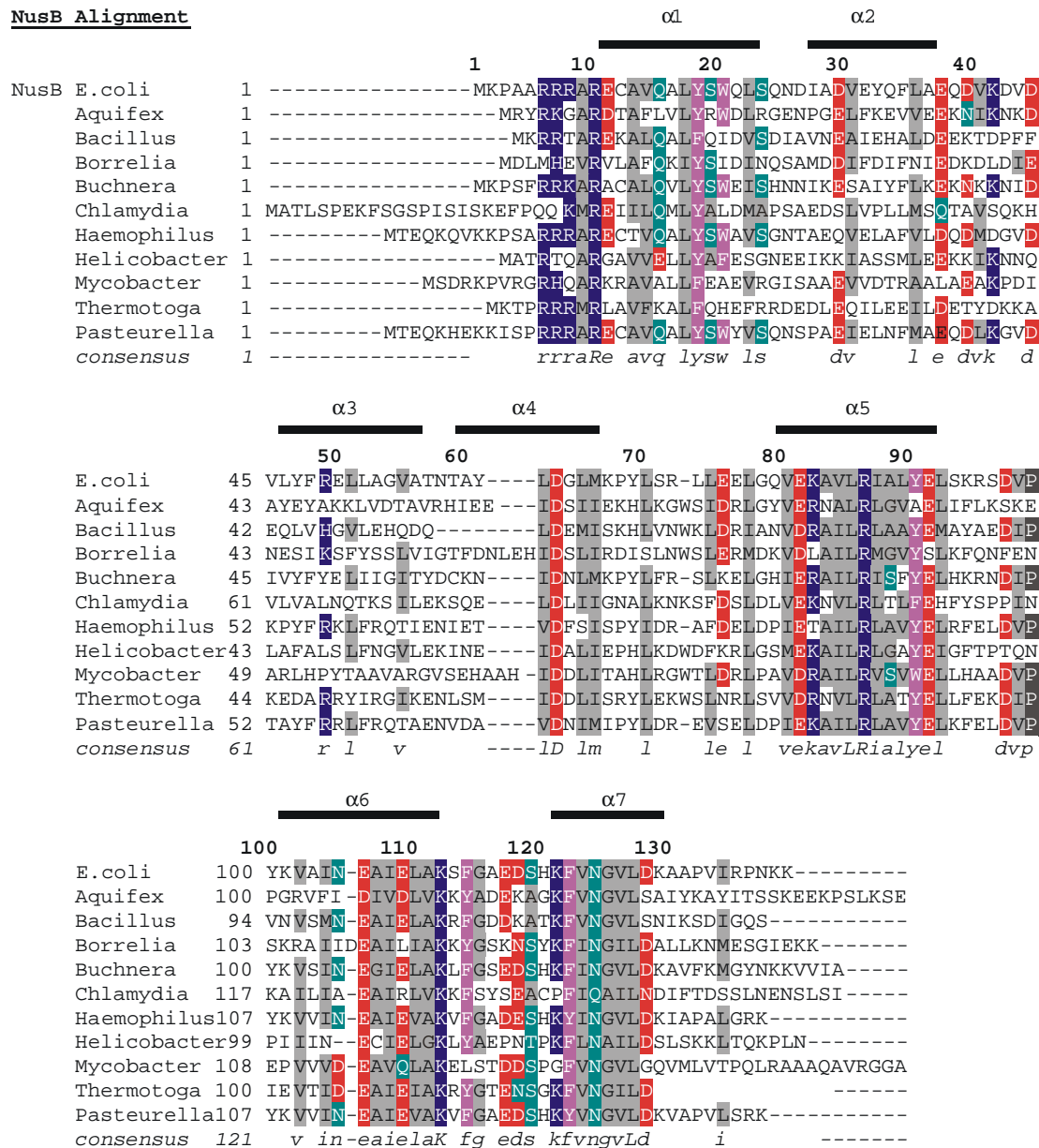


Abb. 4.1 Aminosäuresequenzen von potentiellen NusB-Proteinen aus verschiedenen Bakterien erstellt mit FASTA3. Die aus der NMR-Analyse ermittelten Helixbereiche sind durch schwarze Balken oberhalb der Sequenz dargestellt. In Bezug auf NusB von *E. coli* konservierte Aminosäuren sind farblich unterlegt und in der Zeile *consensus* aufgeführt. Die Farbgebung weist auf die Zugehörigkeit der jeweiligen Aminosäure zu den **positiv** oder **negativ** geladenen, oder denen mit **aromatischer** oder **aliphatischer** Seitenkette hin.

Die konservierten Bereiche sind zur besseren räumliche Übersicht in Abbildung 4.2 noch einmal in einem Bänder-Modell dargestellt. Die Struktur von NusB Protein in Lösung wurde von zwei NMR-Gruppen bearbeitet. 1998 wurde die Sekundärstruktur mit einem neuen helicalen Faltungsmodell gefunden (BERGLECHNER *et al.*, 1998). Die von HUENGES *et al.* (1998) veröffentlichte NusB-Raumstruktur wurde 2000 von ALTIERI und Mitarbeitern in Teilen widerlegt.

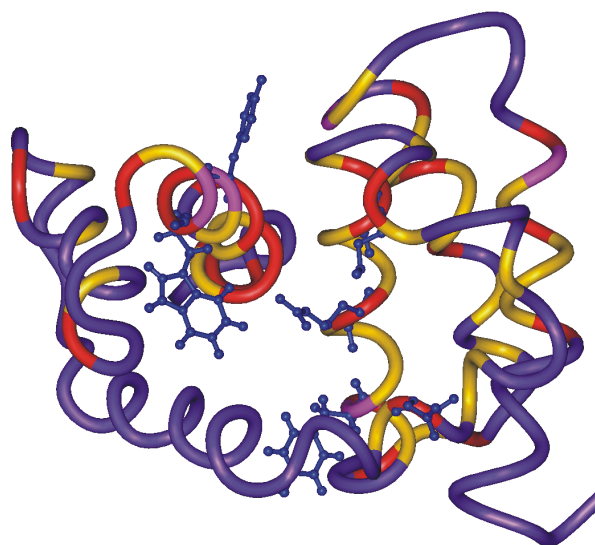


Abb. 4.2 Konservierte Aminosäurereste sind auf die Rückgratstruktur des unkomplexierten NusB-Proteins montiert.

Das Protein setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen. Die Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 3$ bilden die N-terminale, die Helices $\alpha 4$ bis $\alpha 7$ die C-terminale Domäne. Die beiden Untereinheiten sind in einem Winkel von 130° zueinander angeordnet, gemessen zwischen den Helices $\alpha 1$ und $\alpha 5$. Die Helix $\alpha 4$ ist in Nähe von $\alpha 7$ lokalisiert. Der größte Teil der hydrophilen Reste ist auf der Proteinoberfläche orientiert. Lysin82 und Arginin86 bilden eine positiv geladene Einbuchtung aus. Dieses Motiv ist stark konserviert, wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist. Die Reste, die bei den homologen Vertretern hochkonserviert sind, stabilisieren auch den Kernbereichs des Proteins.

In einigen Helix-Helix-Kontakten besteht Übereinstimmung zwischen den beiden NMR-Strukturen, die dreidimensionalen Strukturen weichen aber deutlich voneinander ab. Die zentralen Helices sind nach den Ergebnissen von ALTIERI $\alpha 1$ und $\alpha 5$, nicht $\alpha 3$ und $\alpha 6$.

Von NusB Protein sind mehrere Mutanten, unter anderem NusB5 und NusB101 bekannt, die den Transkriptionskomplex des λ Phagen beeinträchtigen. Die betroffenen Aminosäuren Tyrosin18 und Aspartat118 sind auf der Oberfläche positioniert und daher eventuell bei der Beeinträchtigung von Protein-Protein- oder Protein-RNA-Wechselwirkungen beteiligt. Die Sensitivität gegenüber Kälte der Mutante *nusB5* wird oft auf Fehler in der Ribosomenarchitektur zurückgeführt. Die Struktur von NusB aus *Escherichia coli* ähnelt der Kristallstruktur von NusB aus *Mycobacterium tuberculosis* (GOPAL *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt wird durch die Komplexbildung mit *rrn boxA* RNA die Mehrzahl der ^1H - ^{15}N - und ^{13}C -Signale von NusB-Protein stark verschoben. Die Auswertung der aufgenommenen 3D-NMR-Spektren ermöglichte die Zuordnung der Rückgrat-Signale des Proteins mit

einer Vollständigkeit von 92 % und in Bezug auf alle Protonen inklusive der Seitenketten von 78 %. Die 3D-Struktur des Proteins im RNA-Komplex unterscheidet sich jedoch nach den bisherigen Ergebnissen nicht nennenswert von der Struktur des freien Proteins. Die beobachteten, umfangreichen Verschiebungen der Aminosäuresignale resultieren aus der Protein/RNA-Wechselwirkung und den damit einhergehenden Änderungen der Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkung. Erste strukturelle Berechnungen auf Grundlage einer quantitativen Evaluierung der HNH, NNH und CNH-NOESY-Spektren deuten klar darauf hin, dass die globale Faltung von NusB/*boxA* in einem Bereich von 3 Å des Backbones unverändert bleibt. Die hochkonservierten Reste K82 und R86 sind deutlich besser zugänglich, was auf eine mögliche RNA-Exposition hinweisen könnte.

4.2 SPR-Messungen von Nus-Proteinen und *boxA/B*-Elementen

Der Komplex, der die RNA-Polymerase im Bereich der ribosomalen RNA Operons von *E. coli* oder im λ -Phagen terminationsresistent macht, ist ein Multiprotein-Konglomerat (Abbildung 4.3) fixiert an definierten RNA-Sequenzen, den *boxA*- und im λ Phagen zusätzlich den *boxB*-Motiven. Mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie wurden die zahlreichen Bindungsbeziehungen zwischen den beteiligten Proteinen, den Nus-Faktoren und den RNA-Elementen, den *nut*-sites, hinsichtlich ihrer Affinität zueinander untersucht.

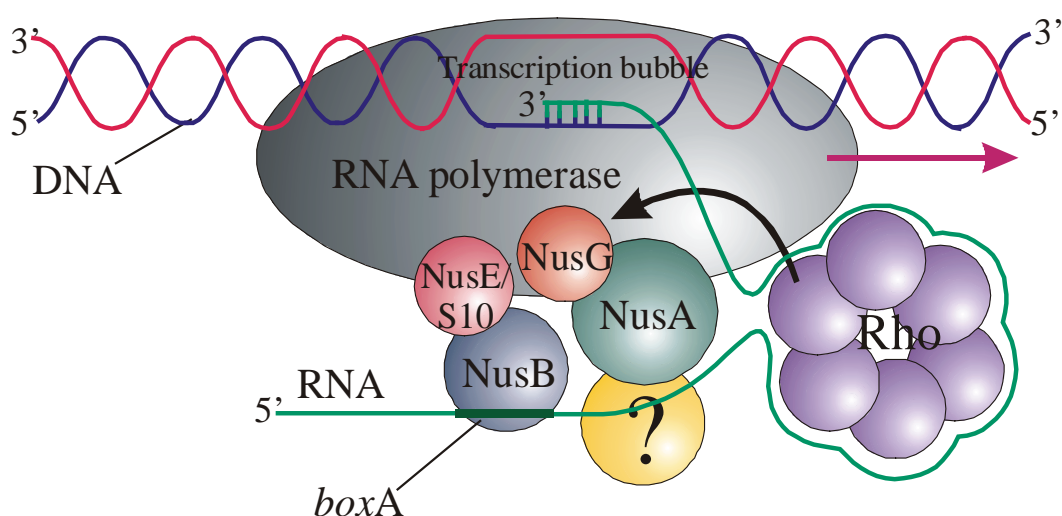


Abb. 4.3 Antiterminationskomplex der ribosomalen RNA Operons von *Escherichia coli* (GREENBLATT, 1993). Der mit ? markierte Faktor symbolisiert die Beteiligung weiterer Proteine, eventuell ribosomale Proteine wie S1, S4 etc. (TORRES *et al.*, 2001).

Im *E. coli*-Antiterminationssystem spielt dabei der Terminationsfaktor der Transkription, das hexamere Rho-Protein, eine wesentliche Rolle (ROBERTS, 1969). Es bindet an die naszierende RNA, es wandert in 5'-3'-Richtung in einer ATP-abhängigen Reaktion und es bewirkt die Abtrennung des RNA-Transkripts bei Erreichen des Elongationskomplexes. Der letzte Schritt in der Wirkungsweise von Rho ist bis jetzt noch weitgehend ungeklärt, wenn auch die RNA-DNA-Helikase-Aktivität des Rho-Proteins dabei von Bedeutung ist (BRENNAN *et al.*, 1987). Hexameres Rho, ein Ringsystem aus Trimeren von Dimeren, bindet an RNA ohne Vorzug für eine bestimmte Konsensussequenz. Neben drei Positionen mit hoher RNA-Affinität ($K_D = 0,33 \mu\text{M}$) mit einem Bindungsbereich von 11 bis 13 Positionen auf der RNA, gibt es drei mit niedriger RNA-Affinität ($K_D = 3,3 \mu\text{M}$) und einem 5 bis 6 Basen langen Bindungsbereich (GEISELMANN und VON HIPPEL, 1992). Die Bindung findet vornehmlich an C-reiche RNA-Sequenzen (MORGAN *et al.*, 1983) statt. Die Bindung an poly(rU) ist um den Faktor 20 schwächer, die an poly(rA) um zwei Größenordnungen gegenüber der Affinität an poly(rC) (GALLUPPI and RICHARDSON, 1980; MCSWIGGEN *et al.*, 1988).

Das Rho-Monomer ist aus insgesamt zwei Domänen aufgebaut (DOLAN *et al.*, 1990), die N-terminale aus den ersten 130 Aminosäuren ist für die RNA-Bindung verantwortlich. Die Domäne Rho130 ist in isolierter Form gefaltet und zeigt analoge Affinität zu RNA wie das gesamte Protein. Die Domäne wurde neben Röntgenstrukturanalyse (ALLISON *et al.*, 1998) mit NMR-Spektroskopie aufgeklärt (BRIERCHECK *et al.*, 1996, 1998). Die Sekundärstruktur weist nach drei N-terminalen α -Helices fünf β -Faltblatt-Motive auf, die zwischen dem dritten und vierten Faltblatt durch eine weitere kurze Helix unterbrochen werden. Durch Bindungsstudien wurde der Sequenzbereich von 50 bis 120 als primäre RNA-Bindungsstelle ermittelt. Da in diesem Bereich β -Faltblatt als Sekundärstruktur auftritt, weist die Domäne Rho130 kein RRM (RNA recognition motif) auf. Mit der CS-Domäne in Kälteschock-Proteinen besteht dagegen eine gute Übereinstimmung. Darüber hinaus bindet hexameres Rho mit einer K_D im Bereich von 15 nM an monomeres NusG Protein (PASMAN und VON HIPPEL, 2000).

Rho-Protein konnte durch Methoden der Molekularbiologie in ausreichender Menge dargestellt werden. Die Reinigung wurde in zwei chromatographischen Schritten zur Homogenität von hexameren Rho Protein durchgeführt. Aus der SPR-Messung mit *boxA* RNA wurde eine K_D von $0,5 \mu\text{M}$ gefunden, die gut mit dem von GEISELMANN und VON HIPPEL (1992) gefundenen Wert für die hochaffinen Bindungsstellen übereinstimmt. Die *boxA*-Sequenz deckt auch mit ihrem 12 Basen langen Motiv den Bindungsbereich am Rho-Protein vollständig ab. Allerdings kann nur jeweils eine der drei affineren Bindungsstellen belegt werden.

Um alle sechs Bindungsstellen zu belegen, ist eine 80 Nucleotide umfassende Sequenz erforderlich. Die *rrn boxA*-Sequenz weist zwar nur 2 RK-Positionen auf, aber nahezu 50 % rU, davon drei Reste in direkter Folge. Diese Sequenzbeschaffenheit spricht für die starke Wechselwirkung die zwischen Rho und der *boxA* RNA besteht. Daraus kann jedoch keine Vorzugsbindung speziell an das *boxA*-Motiv abgeleitet werden. Die Anwesenheit von NusG Protein hat nachweislich keinen verstärkenden oder inhibierenden Einfluß auf die RNA-Affinität von hexameren Rho-Protein. Die Dissoziationskonstante liegt mit $K_D = 0,64 \mu\text{M}$ in der selben Größenordnung wie für eine Rho-*boxA*-Wechselwirkung ohne NusG Protein. Das entspricht auch den Befunden von PASMANN und VON HIPPEL (2000), dass NusG trotz der starken Komplexbildung mit Rho-Protein eher durch eine direkte Interaktion mit der RNA Polymerase auf die Wirkung der Rho-abhängigen Transkriptionstermination einen Einfluß nimmt. NusG Protein selbst bindet an keine der untersuchten *box*-Elemente.

Für *E. coli* NusA-Protein war ebenfalls keine mit SPR nachweisbare Interaktion mit den *boxA*- und *boxB*-Sequenzen aus *E. coli* und λ Phage festzustellen. NusA-Protein aus *E. coli* ist in der Lage mit verschiedenen anderen für Elongation, Termination und Antitermination verantwortlichen Faktoren zu wechselwirken. Die Bindung an die α -Untereinheit der RNA-Polymerase in *Escherichia coli* führt zum Beispiel zu einer höheren Terminationseffizienz (GREENBLATT und LI, 1981a). Darüber hinaus spielt NusA Protein auch eine Rolle im λ -N kontrollierten Antiterminationssystem (DAS und WOLSKA, 1984; CRAVEN, 1994). MAH *et al.* legte 1999 einen Vorschlag zur Architektur des NusA Proteins vor (Abbildung 4.4). Von Aminosäure 1 bis 349 enthält der N-terminale Teil die Protein-Motive S1 und KH, die für die Bindung an RNA bekannt sind (GIBSON, 1993; BYCROFT, 1997). S1-Protein wurde bereits als potentieller zusätzlicher Antiterminationsfaktor in den *rrn* Operons diskutiert. (MOGRIDGE and GREENBLATT, 1998). Die C-terminale Domäne (350-495) weist die Regionen AR1 und AR2 auf, die neben den ersten 132 Aminosäuren der N-terminalen Domäne für Wechselwirkungen mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase von *Escherichia coli* notwendig sind.

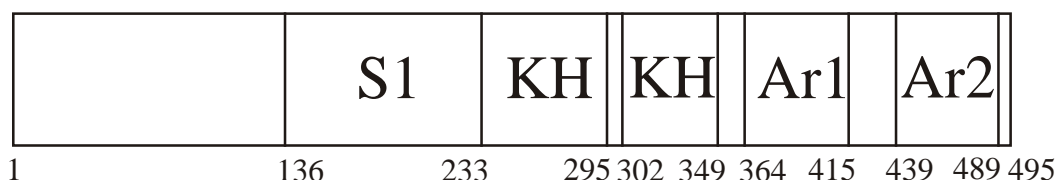


Abb. 4.4 Schematischer Aufbau Bereiche der NusA-Domänen (MAH *et al.*, 1999).

Die beiden Nus-Domänen NTD und CTD konnten beide in guter Ausbeute dargestellt werden. Sie werden für Kristallisationsversuche verwendet. Für die N-terminale Domäne konnte für die Bindung an die *rrn boxA* RNA eine Dissoziationskonstante von 2,8 μM mittels SPR bestimmt werden. Von NusA aus *E. coli* ist bekannt, dass es nach Kontakt zur α -Untereinheit der RNA Polymerase in der Lage ist, auch an RNA zu binden (LIU and HANNA, 1995, MAH *et al.*, 1999). Daraus kann gefolgert werden, dass der C-Terminus eine sterische Hinderung der RNA-Bindungsfähigkeit darstellt. Durch die Anlagerung an die RNAP wird möglicherweise die Topologie von NusA so verändert, dass die RNA-Bindungsmotive S1 und KH am N-Terminus zugänglich werden. In diese Überlegung fügen sich auch Untersuchungsergebnisse von WORBS *et al.* (2001). In diesen Arbeiten wurde die Kristallstruktur von NusA-Protein aus *Thermotoga maritima* aufgeklärt. Dieses Protein ist homolog zur N-terminalen Domäne, ist also um den C-terminalen Anteil gegenüber *E. coli* NusA verkürzt und bindet nachweislich an RNA.

N-Protein kommt als Mediator in der λ -Antitermination eine zentrale Rolle zu. Neben der Bindungsaffinität zur λ -*boxB* RNA bindet N Protein auch an NusA Protein aus *E. coli*. Erst durch diese Verknüpfungen soll das zuerst relativ unstrukturierte N Protein (VAN GILST & VON HIPPLE, 1997) eine definierte räumliche Form annehmen. N Protein mußte durch aufwendige Denaturierung-Renaturierung über absteigende Harnstoff-Gradienten rückgefaltet werden, da es bei der Präparation nur in unlöslicher Form vorlag. Eine Verbesserung der Löslichkeit durch Coexpression mit NusA Protein schlug fehl.

Die kinetischen Konstanten die in Mischungen mit NusB und NusB/NusE gefunden wurden, legen die Vermutung nahe, dass jeweils die Bindungsverhältnisse der bereits bekannten Gruppierungen beobachtet wurden. So sind die Werte für N/NusB gegenüber *boxA* im gleichen Größenordnungsbereich wie für N oder NusB Protein alleine. Bei der Interaktion von N/NusB mit der *boxB* RNA, die für NusB allein nicht nachgewiesen werden konnte, findet man aber in sehr guter Näherung die Dissoziationskonstante von N Protein. Analog gilt die Feststellung für die Kombination N/NusB/NusE, die für die *boxA*-Motive die hohen Affinitäten von NusB/NusE wiedergibt.

Weiter wurden mit SPR die Bindungskonstanten zwischen einer Mischung N/NusA und den λ *nut sites boxA* und *boxB* bestimmt. Während N allein neben einer hohen Affinität zur λ *boxB* auch eine Spezifität für die *rrn*- oder auch die λ *boxA* RNA zeigt, geht durch die Anwesenheit von *E. coli* NusA Protein die Affinität von N Protein zur den *boxA* Motiven völlig verloren. Die zur λ *boxB* RNA bleibt aber unverändert erhalten. Durch NusA wird damit die Selektivität des N Proteins gegenüber der λ *boxB* deutlich verstärkt.

4.3. Untersuchungen zur *boxA* RNA-Sequenz von *E. coli*

Die Rolle der Nus-Proteine aus *E. coli* in der Regulation des Bakteriophagen λ und seiner Entwicklungszyklen war für mehr als zwei Jahrzehnte Inhalt intensiver *in vivo* Studien. Die molekularen Details der Protein/Protein/RNA Interaktionen im Antiterminationskomplex sind nach wie vor nur unzureichend verstanden. Die Architektur der RNA-Zwischensequenzen, den so genannten *box*-Elementen, ist in allen sieben *rrn* Operons analog. Abbildung 4.5 zeigt am Beispiel von *rrnB* die Anordnung der RNA-Motive *boxA*, *boxB* und *boxC*.

```

ATGCTTGACT CTGTAGCGGG AAGGCGTATT ATGCACACCC
CGCGCCGCTG AGAAAAAGCG AAGCGGACT GCTCTTTAAC
AATTTATCAG ACAATCTGTG TGGGCACTCG AAGATACGGA
TTCTTAACGT CGCAAGACGA AAAATGAATA CCAAGTCTCA
AGAGTGAACA CGTAATTCAT TACGAAGTTT AATTCTTTGA
GCGTCAAAACT TTT|aaattga agagtttgat catggctcag

```

Abb. 4.5 Sequenz der *rrnB* Promotor-Region ab P_2 Promotor mit den drei *box*-Elementen **B**, **A**, und **C**. Die beiden unterstrichenen Bereiche der *boxB* markieren die Symmetrie im Stammbereichs der Loop-Sekundärstruktur. Der Promotor P_2 ist unterstrichen, die fett gedruckten Bereiche heben die -10 und -35 Regionen hervor. Ab | beginnt die 16 S RNA-Sequenz (in Kleindruck).

Die *boxA* RNA ist hochkonserviert und kommt neben den sieben *rrn* Operons in vier weiteren Bereichen auf der chromosomalen DNA von *E. coli* vor. In Tabelle 4.1 sind die Bereiche der chromosomalen DNA angegeben. Die Sequenz von *boxA* findet sich im Gen *yoeE*, das für ein hypothetisches Protein (Accession Number P7626) codiert. Dabei handelt es sich möglicherweise um ein integrales Membran-Protein mit zwei CBS Domänen (ITOH *et al.*, 1996). Im Gen *aceK*, welches für eine Isocitratdehydrogenase-Kinase/Phosphatase (E.C. 2.7.1.116) codiert. Sie bewirkt die Aktivierung und Deaktivierung von IDH durch Dephosphorylierung oder Phosphorylierung in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (CORTAY *et al.*, 1988). Zwischen den Genen *ygcF* und *ygcE*. Das Gen *ygcF* (P55139) codiert für ein hypothetisches 25 kDa-Protein (223 Aminosäuren), das eine Ähnlichkeit zu HI1189 aus *H. influenzae* aufweist. Das Gen *ygcE* (P55138) codiert für eine hypothetische Zucker-Kinase (Fucokinase, Gluconokinase-Familie). Im Gen *recC*, das für die 128,8 kDa schwere γ -Untereinheit der

Exodeoxyribonuclease V codiert, ist das Uracil der ersten Position des *boxA*-Motivs durch Adenin ersetzt. Die Domäne zeigt ATP-abhängige Exonuclease-, Endonuclease-, Helikase- und DNA-abhängige ATPase-Aktivität (FINCH *et al.*, 1986). Eine funktionelle Bedeutung dieser wahrscheinlich eher zufälligen Motiv-Bildung ist aber bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erkennbar.

Bezeichnung	Sektion	Basen
<i>rrnA</i>	350	8127 – 8138
<i>rrnB</i>	361	3100 – 3111
<i>rrnC</i>	342	8666 – 8677
<i>rrnD</i>	296	7665 – 7654
<i>rrnE</i>	364	133 – 144
<i>rrnG</i>	235	8664 – 8653
<i>rrnH</i>	19	3603 – 3614
<i>aceK</i>	364	10980 – 10969
<i>ygcE/ygcF</i>	251	5085 – 5074
<i>yoaE</i>	166	1738 – 1749
<i>recC</i>	256	2633 – 2622

Tab. 4.1 Elf *boxA* RNA Sequenzen und ihr Vorkommen auf der chromosomalen DNA von *E. coli*. Die letzte *boxA*, die im Gen *recC* liegt, hat an der 1. Position eine Mutation von U in A.

Um neben der klassischen Strukturuntersuchung des NusB-Proteins im Komplex der *rrn boxA* mit NMR mehr über die Natur der RNA-Struktur zu erfahren, wurden Bindungsstudien mit einer Kombination von Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie und 2D-NMR-Experimenten entwickelt.

Die Untersuchungen zur dynamischen Ligandenbindung konnten mit einem hohen Grad an Reproduzierbarkeit durch SPR Experimente verwirklicht werden. Die Daten zeigen, dass die Affinität von NusB/NusE Proteinkomplex zu spezifischen RNA-Oligomeren die Affinität von isoliertem NusB Protein zu RNA um ein bis zwei Größenordnungen übertrifft. Hauptsächlich ist dies durch die langsamere Dissoziation der RNA vom NusB/NusE Komplex verglichen mit NusB Protein begründet. Der Einfluß von Sequenzmodifikationen auf die Komplexbildung ist für NusB und den NusB/NusE Komplex vergleichbar.

Die Dissoziation des *boxA*/NusB/NusE Komplexes verläuft auf der Zeitskala im Bereich von Minuten. Bemerkenswert ist, dass der zeitlichen Rahmen mit dem Zeitbedarf für die Transkription eines *rrn* Operons vergleichbar ist. In schnell wachsenden Zellen synthetisiert die RNA-Polymerase rRNA mit einer Geschwindigkeit von bis zu 90 Nucleotiden pro Sekunde (VOGEL and JENSEN, 1994). Die Entstehung eines Transkripts benötigt daher wenigstens eine Minute (MOLIN, 1976).

Der Einfluß der lokalen Veränderungen der Basensequenz der *rrn boxA* auf die ^1H und ^{15}N Verschiebungen von gebundenem NusB Protein ist überraschend groß. Verglichen dazu zeigen bestimmte Sequenzveränderungen auf die kinetischen Daten und Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung relativ kleine Effekte. Sogar die Einführung einer einzelnen Methylgruppe in die 5-Position vom Uracilrest kann die chemische Verschiebung substantiell verändern, bis zu 15% der Amidsignale des NusB Proteins sind davon betroffen. Sequenzmodifikationen wie der Austausch U4G beeinflussen mehr als 50% der Amid-Verschiebungen und das Spektrum des *boxA*/NusB Komplexes nähert sich deutlich dem von unkomplexierten NusB Protein an. Es ist auch anzumerken, dass sogar modifizierte RNA-Sequenzen, die in Gelshift-Assays als negativ getestet wurden, wenigstens ein paar der Amidsignale in ihrer chemischen Verschiebung verändert haben. Die unterschiedlichen Befunden sind möglicherweise auf die 10- bis 100fach höhere Konzentration an Protein in den vorliegenden Experimenten zurückzuführen. Aber eine gewisse Komplexierung, wenn auch kurzlebiger Art, findet somit statt.

Die Differenzierung von NusB Protein zwischen einzelsträngiger DNA und RNA konnte durch die vergleichende Messung des *boxA*-Motivs untermauert werden. Sowohl die SPR-Daten als auch die Überlagerung der entsprechenden $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren liesen keine Anhaltspunkte für eine Wechselwirkung zwischen Deoxyribonucleinsäure und NusB Protein erkennen. Dagegen zeigte der NusB/NusE-Komplex, dessen Bindungsverhalten nur mit SPR-Messungen untersucht wurde, gegenüber der mit deoxyUracil synthetisierten *boxA*-DNA eine schwache Affinität. Das Heterodimer NusB/NusE zeigte auch bei den verschiedenen Einzelaustauschen gegen Deoxynucleotide eine durchwegs höhere Affinität. Das Arrangement von NusB zusammen mit NusE, dem ribosomalen S10 Protein, ist sicher auch die physiologisch entscheidende Konfiguration. Das S10 Protein ist seinerseits in der 30S Untereinheit des Ribosoms verankert. Dadurch gewinnen Überlegungen zu weiteren potentiellen Antiterminationsfaktoren eine umfassendere Perspektive. Zahlreiche ribosomale Proteine wurden für eine mögliche Beteiligung an dem noch weitgehend unverstandenen Prozeß der Terminationsinhibition diskutiert.

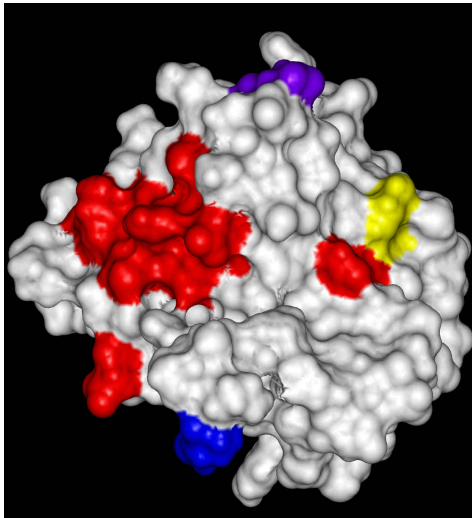
Bei den sukzessiven Mutationen an der 2'-Hydroxylgruppe wurde eine gute Übereinstimmung der kinetischen Verhältnisse mit den Befunden aus der NMR-Spektroskopie festgestellt. Die beiden hybriden Oligonucleotide mit sechs 2'-OH Fehlstellen, DR und RD zeigten deutlich von einander abweichende Resultate. Während sich die kinetischen Konstanten zu RD bei NusB und NusB/NusE in die Resultatreihe der Einzelmutationen relativ gut einfügten, deuteten die SPR- und NMR-Ergebnisse bei DR-*boxA* auf ein eher ungebundenes NusB-Protein hin. Es ist überraschend, dass die *boxA*-Sequenz mit 2'-OH-Defizit an den geraden

Positionen ein beinahe *rrn boxA*-analoges Bindungsverhalten zeigen soll und bei Manipulation an den ungeraden Stellen sehr schwache Wechselwirkung auftritt. Das würde einen hohen Synergieeffekt der beteiligten Ribose-Einheiten von r(U-C-C-U-A-C-) in RD bedeuten, die andere Hälfte als quasi-DNA-Struktur leistet dann keinen Beitrag mehr. Jetzt ist aber die Affinität von RD an NusB nicht ganz so hoch wie im Fall der Wildtyp-*boxA*, wenn die Abweichung auch nur einen Faktor 2 groß ist. Auch das NMR-Spektrum von RD zeigt keine totale Weißüberdeckung. Die schwächere Wechselwirkung kann aber nach Datenlage nicht durch die fehlenden sechs 2'-OH-Gruppen verursacht sein, da sie im umgekehrten Fall von DR gar keinen Bindungsbeitrag leisten.

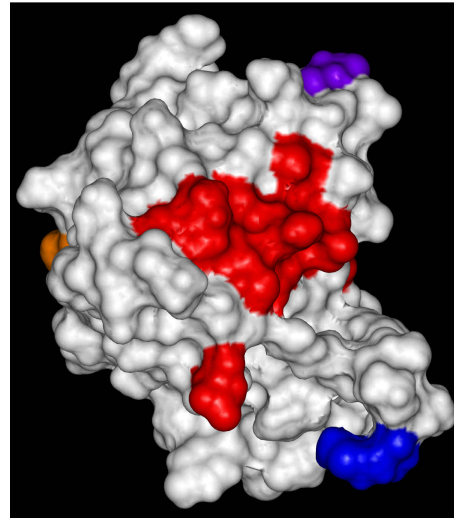
Für die zwölf Einzelmutationen der *boxA* RNA wurden in Bezug auf die Affinität zu NusB oder NusB/NusE die Größenordnungen der Wildtyp *boxA* wiedergefunden. Der Protein-komplex zeigte eine wesentlich größere Bindungsstärke an die verschiedenen Oligonucleotide als NusB Protein alleine. Bei der Auswertung der verschiedenen HSQC-Datensätze der NMR-Spektren wurden keine globalen Abweichungen innerhalb des einzelnen Datensatzes verzeichnet. Es wurden aber in mit NusB/*boxA* RNA überlagerten Spektren mit global hohem Weißanteil, also guter Übereinstimmung, lokale Abweichungen in definierten Amidresonanzen detektiert. Die betroffenen Signalgruppen bildeten über die zwölf Mutationen betrachtet zwar keine fortlaufende „Spur“ von Änderungen, die sozusagen als Abdruck der RNA auf dem Protein interpretiert werden könnte. Es zeigten sich aber in Abhängigkeit von der mutierten Position im *boxA*-Motiv deutliche Unterschiede zwischen den Spektren. In Abbildung 4.6 sind 3D-Modelle von unkomplexiertem NusB-Protein dargestellt. Zur besseren Orientierung ist das N-terminale Start-Methionin blau eingefärbt. Auf der Oberfläche sind für drei exemplarische ^1H , ^{15}N -HSQC-Überlagerungen von deoxymutierter *boxA* mit Wildtyp-*boxA*, die den differierenden Signalgruppen entsprechenden Aminosäuren rot markiert. Die roten Bereiche auf dem Strukturmodell von freiem NusB stehen für die Abweichungen zwischen dem NusB/*boxA*-Komplex und dem NusB-Komplex mit Oligoribonucleotiden, die in der im Namen genannten Position keine 2'-OH-Gruppe aufweisen. Die Modellierung der NMR-Verschiebungen auf die Oberfläche war durch die Zuordnung der Amidsignale (DEHNER *et al.*, 2001) möglich. Bei den drei *boxA*-Vertretern G2dG, C3dC und C5dC sind zum Teil die selben aber auch jeweils andere Amidresonanzen verschoben. In allen Überlagerungen ist K101 betroffen, zudem haben vor allem im G2dG-Spektrum (Abbildung 4.6. a, b) alle Aminosäuren von Y100 bis E109 vom Wildtyp-Datensatz abweichende Werte. In allen Abbildungen sind die Positionen Tyrosin18 gelb und Asparaginsäure118 violett gefärbt. Dabei handelt es sich um die Mutationsstellen in *nusB5* und *nusB101*. Die beiden Amino

NusB/G2dG-*boxA*

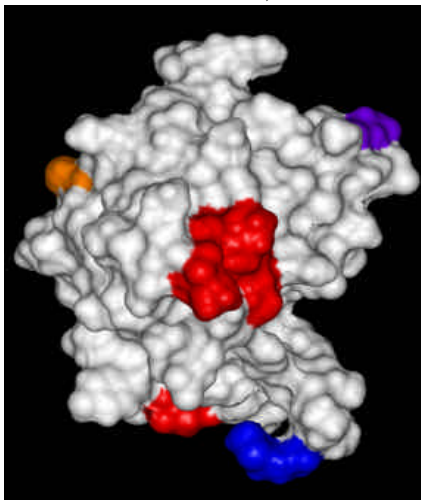
a)



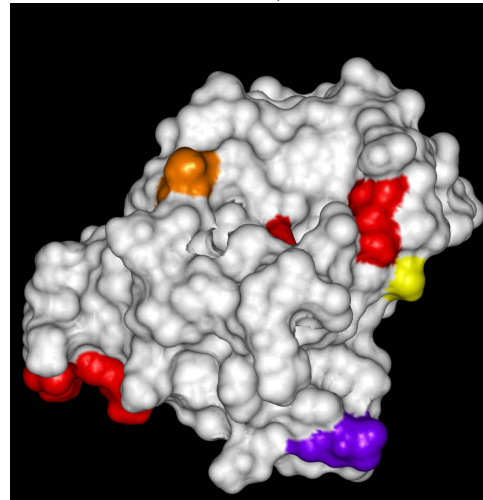
b)

NusB/C3dC-*boxA*

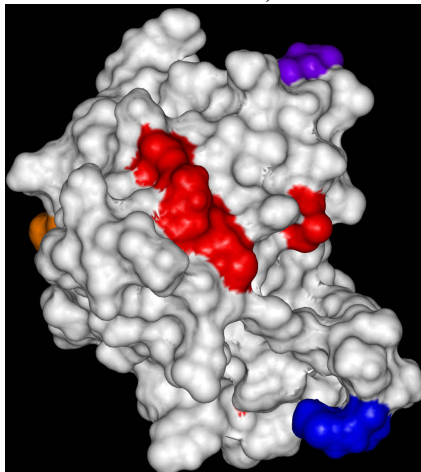
c)



d)

NusB/C5dC-*boxA*

e)



f)

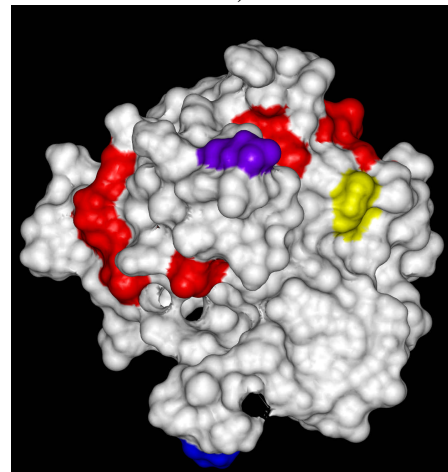


Abb. 4.6 3D-Struktur von freiem NusB-Protein (ALTIERI *et al.*, 2000; PDB-Accessions-Code 1EY1), dargestellt mit dem Programm InsightII. Auf der Oberfläche sind die Aminosäuren **rot** markiert, die im $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von NusB mit G2dG (a, b), C3dC (c, d) sowie C5dC-*boxA* (e, f) gegenüber dem von NusB/*rrn boxA* eine abweichende Amid-Verschiebung aufwiesen. Das **Start-Methionin**, **Tyrosin18** und **Aspartat118**, sowie **Alanin60** als Scharnierbereich zwischen den beiden Protein-Untereinheiten sind separat markiert.

säuren sind zwar nicht direkt von einer Änderung der chemischen Verschiebung betroffen, es sind aber Gruppen in unmittelbarer Nähe, die Abweichungen aufweisen. So weisen in G2dG (Abbildung 4.6 a) Glutaminsäure¹⁵ und Alanin¹⁶ und in C3dC (Abbildung 4.6 d) Glutamin²¹ eine andere Amidresonanz auf als im Wildtypkomplex.

Der Sequenzbereich um Alanin⁶⁰ kann als eine Art Scharnier betrachtet werden, das zwischen N- und C-terminaler Domäne liegt. Der überwiegende Anteil der Signaländerungen ist im Bereich der C-terminalen Untereinheit ab Helix $\alpha 4$ zu finden. Die Anordnung der RNA auf der Proteinoberfläche in der von C- und N-terminaler Untereinheit gebildeten Furche mit stärkerer Präferenz zum C-terminalen Bereich vor allem der Helix $\alpha 6$ ist also aufgrund dieser Datenlage durchaus möglich. Zudem kann aus den Einzelaustauschen eine stärkere Bedeutung des vorderen Bereichs der box-Sequenz abgelesen werden. Die Mutationen ab U7dU zeigen keinen wesentlichen Einfluß auf die chemische Verschiebung der Amidsignale.

4.4 Darstellung ¹⁵N-markierter Ribonucleoside

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und RNA stellen einen interessanten Bereich biochemischer Forschung dar. In dieser Arbeit wurde die Bindung von NusB Protein aus *E. coli* mit *nut* site-Elementen der *rrn* Operons von *E. coli* und aus dem λ Phagen, die *boxA* RNA untersucht. Dabei wurde unter anderem in NMR-Experimenten der Einfluß der Proteinkomplexierung durch die RNA auf Signaldaten in zweidimensionalen Spektren sowie die Struktur des komplexierten Proteins in Lösung näher untersucht. Alle diese Versuche wurden mit schwerisotopmarkiertem NusB Protein, typischerweise mit ¹⁵N oder ¹³C/¹⁵N, durchgeführt. Die RNA war jeweils unmarkiert und daher jeder Aufklärung bezüglich ihrer Struktur oder ihrer Orientierung auf der Proteinoberfläche entzogen. Um hier einen Versuchsansatz zu ermöglichen, wurde die stoffliche Voraussetzung geschaffen, markierte RNA zu generieren und NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Die Präparation von ¹⁵N- und ¹³C-markierter RNA für heteronucleare mehrdimensionale NMR-Studien ist bereits in Arbeiten durchgeführt worden (BATEY *et al.*, 1992; NIKONOWICZ *et al.*, 1992; NYHOLM *et al.*, 1995). Dabei wurden durch *in vitro*-Synthese mit Ribonucleosidtriphosphaten mehrbasige Sequenzen mit Markierungen dargestellt. Aus Fermentation von *E. coli* Zellen wurden markierte NTPs gewonnen und nach Reinigung über *in vitro* Transkription zur gewünschten RNA umgesetzt. Das erhaltene Markierungsmuster hängt natürlich vom Einsatz der entsprechenden Nucleosidtriphosphate ab. Da ergeben sich aber bereits gewisse Grenzen der Markierungsvariation.

Neben der Entscheidung zwischen dem Kern (^{15}N , ^{13}C) kann nur noch zwischen den einzelnen Nucleotiden gewählt werden. Wenn ^{15}N -markiertes UTP in die *in vitro*-Transkription eingeht, sind auch alle Uridinbasen in der Sequenz entsprechend markiert.

Soll aber z. B. nur ein bestimmtes Uridin im Sequenzmotiv ein Schwerisotop tragen, so muß durch chemische Synthese das Oligoribonucleotid schrittweise aufgebaut werden. Dann kann bei jedem neuen Synthesesyklus über die gewünschte Markierung entschieden werden. Ausgangsstoffe zur Synthese sind dabei Phosphoramidite der vier Ribonucleoside, die an den Basenstickstoffen geeignete Schutzgruppen tragen. Der Substanzbedarf ist allerdings deutlich höher als bei der biochemischen Variante, was auf der hohen Zahl an Synthesestufen und der schlechten Ausbeute beruht.

Aus *E. coli* Zellmaterial, das über hochdichte Fermentation im Fed-Batch-Verfahren gewonnen wurde, konnte RNA durch alkalische Hydrolyse und Fällung extrahiert werden. Für die Fermentation hat sich eine optische Dichte um einen Wert von 70 als guten Kompromiß zwischen Zellausbeute und RNA-Gehalt pro Gramm Zelltrockenmasse erwiesen. Bei ersten Versuchen mit optischen Dichten über 100, erzielt durch zusätzliche Sauerstoffanreicherung der Luftzufuhr, mußte ein niedrigerer relativer RNA-Gehalt verzeichnet werden. Der Wachstumsverlauf war bereits nicht mehr im exponentiellen Bereich sondern in einem Sättigungsplateau. In Tabelle 4.5.1 ist eine Statistik zu wichtigen Inhaltsstoffen von *Escherichia coli*-Zellen angegeben. Der Wert für das RNA-Hydrolysat aus ^{15}N -markierten Zellen liegt mit 18 % gut im angegeben Bereich.

Komponente	Anteil an Trockenmasse	Menge pro Zelle
Protein	55,0 %	$156 \cdot 10^{-15} \text{ g}$
RNA	20,5 %	$58 \cdot 10^{-15} \text{ g}$
DNA	3,1 %	$8,8 \cdot 10^{-15} \text{ g}$
Lipid	9,1 %	$25,9 \cdot 10^{-15} \text{ g}$
Rest	12,3 %	$36 \cdot 10^{-15} \text{ g}$

Tab. 4.1 Zusammensetzung einer *E. coli* B/r Zelle (NEIDHARDT und UMBARGER, 1996). Die Zellen wuchsen auf Minimalmedium mit Glucose bei 37 °C und einer Generationszeit von 40 Minuten.

Eine große Herausforderung war die chromatographische Separation der vier Ribonucleotide. In der Literatur sind diverse Methoden zur Separation von Nucleinsäuremonomeren von DNA und RNA beschrieben. COHN *et al.* hat in den 50iger Jahren umfangreiche Untersuchungen

zur Problematik der Nucleotid-Trennung von RNA-Hydrolysaten angestellt (1950, 1953, 1955, 1975; CARTER und COHN, 1950; COHN und VOLKIN, 1952).

Klassische Trennungsmethoden für Substanzmischungen beruhen auf der Präzipitation, die aufgrund der Einschränkungen durch Löslichkeitsprodukt und Copräzipitation nicht den quantitativen Anforderung genügen können, wie dies vom Ionenaustausch erfüllt wird. Da Nucleotide und ihre Abbauprodukte saure und basische Gruppen enthalten, könnten sowohl Anionen- als auch Kationenaustauscher eingesetzt werden. Unterschiede in den pK-Werten der Verbindungen könnten als Einflußgröße für die organische Trennung dienen.

Um ionische Substanzen über Ionenaustausch zu trennen sind Bedingungen zu finden, unter denen jeder Bestandteil der Mischung eine unterschiedliche Affinität zum Austauscher, also einen anderen Verteilungskoeffizient aufweist. Diese Affinität wird durch eine Reihe von Parametern bestimmt. Bei einer Gruppe stark verwandter Substanzen wie den Ribonucleosidmonophosphaten, spielt die Nettoladung pro Molekül eine wichtige Rolle. Da die Nucleotide sowohl saure (Phosphat-) als auch basische (Amino-)Gruppen enthalten, wird der pH-Wert des Puffers durch die Einstellung des Dissoziationsgrades an diesen Gruppen die Nettoladung des amphoteren Moleküls beeinflussen. Die Reihenfolge bei ansteigender negativer Nettoladung ist CMP, AMP, GMP, UMP. CMP und AMP besitzen positive Nettoladung und sind im pH-Bereich unter 2,5 Kationen, GMP ist unter pH 1,5 kationisch und UMP ist anionisch bis pH 0. Bei pH-Werten über 5 sind alle NMPs stark negativ geladen. Es scheint einfach zu sein, die Mischung bei pH-Werten von 6 oder höher am Säulenmaterial zu adsorbieren und in der Reihenfolge CMP, AMP, GMP, UMP herunter zu waschen, indem der pH-Wert schrittweise abgesenkt wird. Dabei kann durch Zugabe von Salz die Anionenkonzentration gesteigert werden, um am Ende ein zu stark saures Eluat zu vermeiden, da die Verbindungen hydrolyseempfindlich sind.

Die Trennung der Ribonucleosidmonophosphate ist aber doch mit Problemen verknüpft. So zeigen weder UMP noch AMP basische und CMP keine sauren Eigenschaften. Die durch alkalische Hydrolyse gebildeten NMP liegen als 2'- und 3'-Isomerengemisch vor. Die Trennung der Nucleotide ist aufgrund ihrer Eigenschaften sehr schwierig. Die pK-Werte der Phosphoestergruppen sind zwar relativ ähnlich, aber die große Variation der pK-Werte der Nucleobasen bewirkt eine beträchtliche Vielfalt in der Nettoladung der Moleküle in Abhängigkeit vom pH-Wert. Diese Ladung variiert in einem pH-Bereich zwischen 2 und 3.

Die Elutionsfolge der einzelnen Verbindungen sollte durch die Gesamtladung bestimmt sein, doch in der Praxis entspricht sie oft nicht den Erwartungen. Der reine Ionenaustauschvorgang wird durch einen Adsorptionsvorgang am Ionenaustauscher überlagert. Die Nucleotide

werden als starke Säuren (pK 1 – 6) fest an die Anionenaustauscher gebunden und lassen sich erst im Bereich von pH 3 bis 1 daraus eluieren. Purine wie AMP und GMP werden im allgemeinen stärker adsorbiert als Pyrimidine (UMP, CMP). Uracil-Derivate werden vor Guanin-Derivaten eluiert, obwohl aufgrund der Gesamtladung dieser Verbindung die umgekehrte Reihenfolge zu erwarten ist.

Ein weiteres Problem stellt die Skalierung der zu trennenden Stoffmengen dar. Sämtliche in der Literatur gefundenen Stellen beschreiben analytische Verfahren, die Mengen im unterem Milligrammbereich verarbeiten. Für eine Verwendung zur chemischen Synthese sind aber Mengen im Bereich von mehreren Hundert Milligramm erforderlich.

Da aus der alkalischen Hydrolyse von jedem Monophosphat ein Isomerengemisch aus 2'- und 3'-Derivat vorlag, erhöhte sich das Trennproblem auf acht Komponenten. Eine direkte Umsetzung des Hydrolysats mit alkalischer Phosphatase und eine anschließende Aufarbeitung auf die vier Nucleoside war aber auch keine Erleichterung. Erstens gelang die Reaktionsführung der Dephosphorylierung bei Anwesenheit aller 2',3'-NMP nicht quantitativ, was die anschließende Chromatographie deutlich erschweren würde. Zudem sind die vier Nucleoside ebenfalls nicht trivial zu trennen.

Für eine erste Auftrennung wurde das Ionenausschlußverfahren mit einem Kationenaustauscher DOWEX 50 W×8 in protonierter Form verwendet. Das RNA-Hydrolysat konnte dadurch in vier Fraktionen getrennt werden, wobei aber die Fraktionen von AMP und teilweise auch GMP von Cytidinmonophosphat überlagert wurden. Uridinmonophosphat konnte vollständig abgetrennt werden. Ein weiteres Problem war auch die stark verzögerte Elution von AMP, das aufgrund seiner Säurelabilität an der N-glycosidischen Bindung nicht zu lange am aciden Harz verweilen sollte. Durch sukzessive Elution konnte die Ausbeute aber erhöht werden.

Das Material für die zweite Trennstufe, die ECTEOLA Cellulose wurde bereits von PETERSON und SOBER (1956a, 1956b) sowie von BENDICH *et al.* (1955, 1958) für die Trennung von DNA, RNA und Nucleotiden verwendet. MICHELSON (1959) verwendete das schwach basische Material zur Trennung diverser Adenosinmonophosphate. Dieses Cellulose-Anionenaustauscher-Harz, ein Kondensationsprodukt aus Epichlorhydrin und Triethanolamin mit Cellulose, wurde mit einem Gradienten von Triethylammoniumacetat entwickelt (NILSSON und SJUNNESSON, 1961). Der Eluent soll in einem milden pH-Bereich verwendbar sein, wegen der Säurelabilität der Ribonucleotide. Und er sollte bei Raumtemperatur gut durch Rotationsverdampfung oder Gefriertrocknung zu entfernen sein. Beide Anforderungen werden durch die mobile Phase erfüllt.

Die getrennten Ribonucleosidmonophosphate wurden anschließend enzymatisch dephosphoryliert und mit Reversed Phase HPLC aufgereinigt. Um für die nachfolgende Gefrier-trocknung keine Schwierigkeiten mit der Entfernung von Ammoniumformiat/Ameisensäure zu bekommen, wurde die Säule mit Wasser entwickelt. Prinzipiell ist es für ein hydrophobes System von langen Alkylgruppen (C₁₈-Einheiten) wie es in Reversed Phase Säulen verwendet wurde, nicht günstig, wenn längere Zeit mit niedrigem oder gar keinen Anteil an Salzen im Säulenpuffer gearbeitet wird, da sonst die Trennwirkung durch den hydrophoben Effekt der Octadecylgruppen abnimmt. Die Säule wurde in gewissen Zeitabständen mit 100 mM Ameisensäure/Ammoniumformiat gewaschen und erst vor weiteren Reinigungsschritten auf Wasser umgestellt. Die relativ geringe Ausbeute der Ribonucleoside aus 8 g Hydrolysat be- ruht auf erheblichen Verluste bei den Trenn- und Aufarbeitungsschritten.

Bei der Umsetzung von Adenosinmonophosphat konnte keine vernünftige Ausbeute von Adenosin erhalten werden. Aus der markierten Zellmasse von *E. coli* konnten Uridin, Cytidin und Guanosin im 100 mg-Maßstab dargestellt werden.

4.6 Strukturaufklärung von NusG Protein

NusG-Protein aus *Escherichia coli* ist neben seiner Wirkung als Terminationsfaktor im Komplex mit Rho-Protein auch essentiell für eine prozessive Antitermination in den *rrn* Operons von *E. coli*. Das NusG Protein ist in der Lage, eine kinetische Limitierung von dem Terminationsfaktor Rho an bestimmten Terminatorsequenzen auszugleichen (BURNS and RICHARDSON, 1995). Dabei nimmt es aber keinen Einfluß auf die Fähigkeit von Rho-Protein RNA zu komplexieren, bindet aber an den homohexameren Terminationsfaktor (PASMAN und VON HIPPEL, 2000).

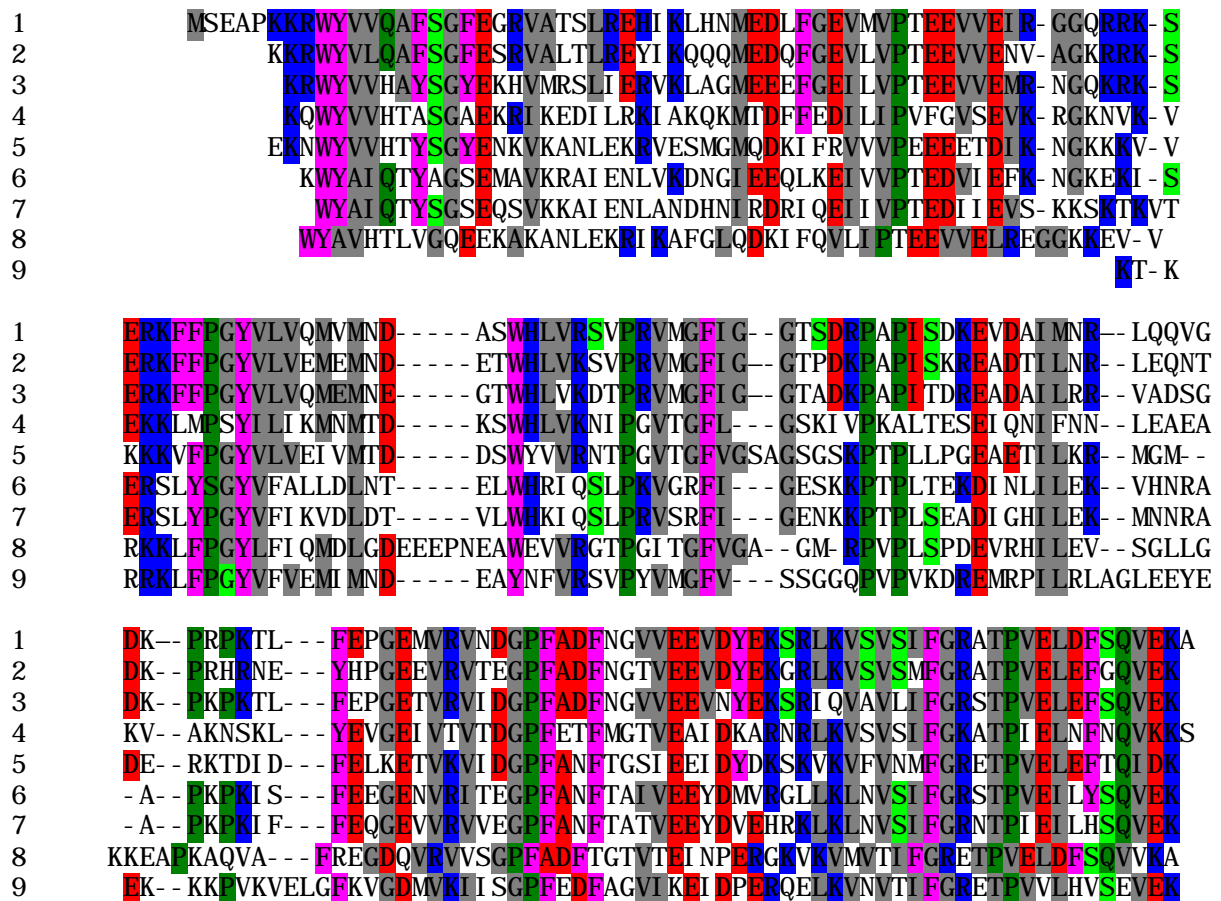


Abb. 4.7 Alignment von hypothetischen NusG Proteinen. 1 *Escherichia coli*, (P16921) 2 *Haemophilus influenzae*, (P43916) 3 *Pseudomonas aeruginosa* (Q9HWC4) 4 *Rickettsia prowazekii*, (P50056) 5 *Bacillus subtilis*, (Q06795) 6 *Campylobacter jejuni*, (Q9PI36) 7 *Helicobacter pylori*, (P55976) 8 *Thermus thermophilus*, (P35872) 9 *Thermotoga maritima* (P29397). Die Farbgebung bedeutet: Aminosäuren mit aliphatischer, aromatischer, positiv oder negativ geladener Seitenkette. Prolin, Serin. In Klammern ist die jeweilige Accessions Nummer angegeben.

Darüber hinaus bindet NusG an die RNA-Polymerase (MASON und GREENBLATT, 1991). Es ist dabei auch für eine Stimulation der Elongationsrate, durch Unterdrückung von bestimmten

Synthesepausen der RNA-Polymerase verantwortlich (BUROVA *et al.*, 1995). Diese Wirkung könnte unmittelbar von Bedeutung für NusG als Antiterminationsfaktor sein, da eine deutlich erhöhte Elongationsrate oder wenig Haltepunkte für eine Terminations-resistente RNA-Polymerase sprechen würden.

Das 21 kDa schwere Protein mit 181 Aminosäuren wurde ersten NMR-spektroskopischen Experimenten mit dem Ziel der Strukturaufklärung unterzogen. Zu diesem Zweck wurde NusG Protein in verschiedenen Schwerisotop-Markierungen dargestellt und für verschiedene Tripelresonanzexperimente verwendet. Es wurden unter anderem HNCA- und HNCO-Spektren sehr hoher Auflösung erhalten. Allerdings wurde die Anzahl der erwarteten Signale nicht erreicht.

In Abbildung 4.7 ist ein Alignment von hypothetischen NusG Proteinen aus verschiedenen Organismen wiedergegeben. Konservierte Aminosäuren sind je nach Seitenkette farblich markiert. Es sind viele teils hochkonservierte Abschnitte, vor allem in der C-terminalen Hälfte des Proteins, erkennbar.

```

MSEAPKKRWYVVQAFSGFEGRVATSLREHI KLHNMEDLFGEVMVP
TEEVVEI RGGQRKSERKFFPGYVLVQVMNDASWHLVRSVPRVM
GFI GGTSDRPAPI SDKEVD AI MNRLQQVGDKPRPKTLFEPGEMVR
VNDGPFADFNGVVEEVDYEKSRLKVS VSI FGRATPVELDFSQVEKA

```

Abb. 4.8 Von den 181 Aminosäuren der NusG-Sequenz konnten mit 58 Resten lediglich 32 % zugeordnet werden. Die gelb unterlegten Sequenzbereiche markieren diesen Anteil.

Die gelb unterlegten Sequenzabschnitten in Abbildung 4.8 markieren die Bereiche, die für das Proteinrückgrat zugeordnet werden konnten. Beim Vergleich mit dem Alignment ist festzustellen, dass die zugeordneten Sequenzabschnitte in Bereichen hoher Konservierung liegen.

Die Auswertung der gewonnen Datensätze führte lediglich zu einer Zuordnung von 58 Aminosäuren, also 32 %. Die Sekundärstruktur scheint nach Auswertung des Chemical-Shift-Index im aufgeklärten Sequenzbereich überwiegend aus β -Faltblatt-Motiven zu bestehen, mit einem helikalen Bereich in der Region des N-Terminus. Offensichtlich ist das Protein nicht vollständig strukturiert und entzieht sich so in weiten Bereichen einer räumlichen Aufklärung. Ursache dafür könnten hochflexible Proteinabschnitte mit einer entsprechend starken Dynamik sein.

5 Zusammenfassung

Die Transkriptionsantitermination in den ribosomalen RNA Operons von *Escherichia coli* ist schon seit längerer Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (CONDON *et al.*, 1995). Die Bildung dieses Elongations-Komplexes erfordert eine promotor-proximale Sequenz auf der RNA, die als *nut* site bekannt ist und zugleich den Kernbereich des Komplexes darstellt. Vom 5'-Ende dieser Kennungssequenz wird vermutet, dass es an der RNAP gebunden bleibt, während diese in 3'-Richtung zum Ende des Templates transkribiert. Wie dieser Komplex gegen Rho-abhängige Terminatoren resistent wird ist allerdings nicht vollständig geklärt.

Unter den zahlreichen Interaktionen der am Antiterminationskomplex beteiligten Proteine und RNA-Elemente wird der Wechselwirkung von NusB-Protein mit der *boxA* RNA aus *E. coli* bzw. der physiologisch bedeutenderen Beziehung von NusB/NusE-Komplex zu *boxA* RNA eine zentrale Rolle zugemessen.

Die Sekundärstruktur von NusB Protein im Komplex mit der *rrn boxA* RNA konnte aufgeklärt werden. Stabilitätsprobleme mit Protein/RNA-Mischungen, die anfangs allenfalls 2-dimensionale, aber nicht die zur Strukturaufklärung erforderlichen 3-dimensionalen Spektren ermöglicht hätten, wurden durch drei Maßnahmen beseitigt. Erstens wurde das stabilisotop-markierte NusB-Protein durch mehrere Chromatographie-Schritte bis zur maximalen Homogenität gereinigt. Die Stabilität der *boxA*-RNA wurde durch jeweils 2 Desoxynucleotide am 3'- und 5'-Ende erhöht. Das Verhältnis von RNA zu Protein wurde 3:1 gewählt und ein Ensemble an Additiven zugegeben. Dadurch war die Herstellung von Proben mit einer Haltbarkeit von 1-2 Wochen möglich. Es wurden mehrere NMR-Proben von *boxA*-RNA mit ^{15}N -sowie $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertem NusB-Protein dargestellt und zur Strukturaufklärung des komplexierten Proteins verwendet. Das NusB Protein im Komplex mit der *rrn boxA* RNA zeigt eine helikale Grundstruktur mit sieben Helices. Damit weicht es nicht erheblich von der Sekundärstruktur des freien Proteins ab. Die Abweichung vom Rückgrat liegt im Bereich von 3 Å.

Zur detaillierten Untersuchung der diversen Protein-RNA-Interaktionen im Antiterminationskomplex wurden mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz kinetische Konstanten zu den zahlreichen Bindungsereignissen mit RNA in diesem Multiproteinsystem bestimmt. Neben der klaren Präferenz von NusB gegenüber *boxA*-RNA im $\mu\text{molaren}$ Bereich, die von NusB/NusE noch um zwei Größenordnungen übertroffen wird, konnte auch für das homohexamere Terminations-Protein Rho eine vergleichbare Dissoziationskonstante zur Wechselwirkung mit *boxA* RNA gemessen werden. Für den Antiterminationsfaktor N aus λ Phage konnte neben einer guten Komplexbildung mit λ *boxB* RNA eine Wechselwirkung mit *boxA*-Motiven aus *E.*

coli und λ Phage nachgewiesen werden. In Anwesenheit des mit λ N ein Heterodimer bildenden NusA-Proteins war eine erheblich gesteigerte Selektivität zu *boxB*-RNA erkennbar. Für NusG und NusA waren keine Interaktionen mit *box*-Elementen festzustellen, eine verkürzte Form von NusA-Protein, die N-terminale Domäne zeigt dagegen eine Affinität zur *rrn boxA* RNA. Das Fehlen des sterisch anspruchsvollen C-Terminus macht die RNA-bindenden Motive S1 und KH besser zugänglich. Bestätigt wird diese Annahme durch das zur N-terminalen Domäne homologe NusA von *Thermotoga maritima*, das ebenfalls an RNA bindet.

Neben diesen Protein-RNA-Beziehungen war eine nähere Bestimmung funktionell essentieller Bereiche der *rrn boxA* RNA Gegenstand von kombinierten Studien mit SPR und NMR. Zusammenfassend kann man feststellen, dass die chemische Verschiebung der Amidgruppen des NusB Proteins einen hochempfindlichen Sensor für Sequenzmodifikationen der konservierten RNA darstellt. Die Größe des RNA Motivs, das mit NusB Protein wechselwirkt wurde *in vitro* durch Mutationsanalyse untersucht. Die präsentierten Daten stehen in guter Übereinstimmung mit dem beschriebenen dodecameren Motiv. So haben Sequenzänderungen nahe des 5'- oder 3'-Endes der *boxA* RNA einen Effekt auf die ^1H , ^{15}N Amidresonanzen, wenn auch die Zahl der verschobenen Amidgruppen klein ist. Ein generischer Algorithmus wurde für die Bestimmung der Ähnlichkeit der NusB/RNA Spektren etabliert. Der entscheidende Faktor zur Protein/RNA Erkennung ist der zentrale Bereich mit den Resten 4 bis 8 des *boxA* RNA Motivs. NusB Protein differenziert zwischen RNA- und DNA-*boxA*. Auch bei deoxy-Uracil-Substitution von Thymin konnte via SPR oder NMR keine Wechselwirkung nachgewiesen werden. Durch Einflußnahme auf einzelne 2'-Hydroxylgruppe am Ribose-Ring im *boxA*-Motiv wurde gezeigt, dass zum einen bei Veränderungen im Bereich der ersten sechs Reste veränderte Amidresonanzen auftreten. Zum anderen sind diese vor allem im Bereich der C-terminalen NusB-Untereinheit konzentriert, mit Präferenz für die Helix $\alpha 6$.

In den NMR-basierenden Strukturanalysen war stets das Protein im Mittelpunkt der Betrachtung. Um aber die räumliche Struktur der RNA oder eine exakte Lokalisierung des Liganden auf der Protein-Oberfläche NMR-spektroskopisch zugänglich zu machen, sind schwerisotopmarkierte RNA-Sequenzen eine wesentliche Voraussetzung. Zu diesem Zweck wurde die stoffliche Grundlage geschaffen, durch RNA-Synthese an fester Phase mit der Phosphoramiditmethode definierte Einzelmarkierungen in eine RNA-Sequenz einzuführen. Durch hochdichte Zell-Fermentation wurde schwerisotopmarkierte Biomasse generiert. Nach Extraktion der Ribonucleosidmonophosphate wurden sie mit Methoden der Ionenaustausch-

Chromatographie separiert und enzymatisch zu Ribonucleosiden umgesetzt. Mit Substanzmengen im 100 mg-Bereich können nun einzelne Basen in markierter Form in eine Sequenz eingebaut werden. Diese Methode hat damit einen Vorteil gegenüber der *in vitro*-Transkription, bei der immer alle Ribonucleotide einer Sorte markiert sind.

NusG-Protein aus *Escherichia coli* ist neben seiner Wirkung als Terminationsfaktor im Komplex mit Rho-Protein auch essentiell für eine prozessive Antitermination in den *rrn* Operons. Das 21 kDa schwere Protein mit 181 Aminosäuren wurde ersten NMR-spektroskopischen Experimenten mit dem Ziel der Strukturaufklärung unterzogen. Zu diesem Zweck wurde NusG Protein in verschiedenen Schwerisotop-Markierungen dargestellt und für verschiedene Tripelresonanzexperimente verwendet. Es wurden unter anderem HNCA-, HNCACO und HNCO-Spektren sehr hoher Auflösung erhalten. Allerdings wurde die Anzahl der erwarteten Signale nicht erreicht. Die Auswertung der gewonnen Datensätze führte so lediglich zu einer Rückgratzuordnung von 58 Aminosäuren, also 32 %. Die Sekundärstruktur scheint überwiegend aus β -Faltblatt-Motiven zu bestehen mit einem helikalen Bereich in der Region des N-Terminus. Offensichtlich ist das Protein nicht vollständig strukturiert und entzieht sich so in weiten Bereichen einer räumlichen Aufklärung.

6 Literaturverzeichnis

- Adhya, S. and Gottesman, M. (1978) Control of transcription termination. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 967-996.
- Aksoy, S.; Squires, C. and Squires, C. (1984) Evidence for Antitermination in *Escherichia coli* rRNA transcription. *J. Bacteriol.*, **159**, 260-264.
- Albrechtsen, B.; Squires, C. L.; Li, S. and Squires, C. (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J. Mol. Biol.*, **213**, 123-134.
- Allison, T. J.; Wood, T. C.; Briercheck, D. M.; Rastinejad, F.; Richardson, J. P. and Rule, G. S. (1998) Crystal structure of the RNA-binding domain from transcription termination factor rho. *Natural Struct. Biology*, **5**, 352- 356.
- Altieri, A. S.; Mazulla, M. J.; Zhou, H.; Costantino, N.; Court, D. L. and Byrd, R. A. (1997) Sequential assignments and secondary structure of the RNA-binding transcriptional regulator NusB, *FEBS Lett.*, **415**, 221-226.
- Altieri, A. S.; Mazzulla, M. J.; Horita D. A.; Heath Coats, R.; Wingfield, P. T.; Das, A., Court, D. L. and Byrd, A. R. (2000) The structure of the transcriptional antiterminator NusB from *Escherichia coli*. *Nature Struct. Biol.* **7**, 470-474.
- Aufrere, R.; Tempete, M. and Bohin, J. P. (1986) Overlapping reading frames in *Escherichia coli*: the two promoters and the first 65 nucleotides of a gene related to the *rrnB* operon are localized in the coding sequence of *btuB*. *C.R. Acad. Sci. Ser. III*, **303**, 49-54.
- Bartlett, M. S. and Gourse, R. L. (1994) Growth rate-dependent control of the *rrnB* P1 core promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **176**, 5560-5564.
- Bax, A. (1994) Multidimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 738-744.
- Bax, A. and Grzesiek, S. (1993) Methodological Advances in Protein NMR. *Acc. Chem. Res.*, **26**, 131-138.
- Berg, K. L.; Squires, C. and Squires C. L. (1989) Ribosomal operon antitermination. Function of leader and spacer region and spacer *boxB-boxA* sequences and their conservation in diverse microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **209**, 345-358.
- Berglechner, F.; Richter, G.; Fischer, M.; Bacher, A.; Gschwind, R. M.; Huenges, M.; Gemmecker, G. and Kessler, H. (1997) Studies on the NusB protein of *Escherichia coli* Expression and determination of secondary-structure elements by multinuclear NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **248**, 338-346.

- Blackburn, P. and Jaikhani, B. L. (1979) Ribonuclease inhibitor from human placenta: Interaction with derivatives of Ribonuclease A. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12488-12493.
- Blattner, F. R.; Burland, V. D.; Plunkett, G. III.; Sofia, H. J. and Daniels D. L. (1993) Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5408-5417.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Boros, I.; Csordas-Toth, A.; Kiss, I.; Kiss, I., Torok, I., Udvardy, A., Udvardy, K. and Venetianer, P. (1983) Identification of two new promoters probably involved in the transcription of a ribosomal RNA gene of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **739**, 173-180.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and selective method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bremer, H. and Dennis, P. P. (1987) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate: in *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*. In Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaecher, M. and Umberger, H. E. (eds.), *Cellular and molecular biology*, **2**, American Society for Microbiology, Washington, USA, pp. 1527-1542.
- Brendel, V.; Hamm, G. H. and Trifonov, E. N. (1986) Terminators of transcription with the RNA polymerase from *Escherichia coli*: what they look like and how to find them. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **3**, 705-723.
- Brennan, C. A.; Dombroski, A. J. and Platt, T (1987) Transcription termination factor Rho is an RNA-DNA helicase. *Cell*, **48**, 945-952.
- Brookhaven Database (2002) <http://www.rcsb.org/pdb/holdings.html>.
- Bullock, W. O.; Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* with beta galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-379.
- Burgess, R. R.; Travers, A. A.; Dunn, J. J. and Bautz, E. K. F. (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase, *Nature*, **221**, 43-44.
- Burns, C. M. and Richardson, J. P. (1995) NusG is required to overcome a kinetic limitation to Rho function at an intragenic terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4738-4742.
- Burns, M. C.; Richardson, L. V. and Richardson, J. P. (1998) Combinatorial effects of NusA and NusG on transcriptional elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **278**, 307-316.

- Burova, E. and Gottesmann, M. E. (1995a) NusG overexpression inhibits Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **17**, 633-641.
- Burova, E.; Hung, S. C.; Sagitov, V.; Stitt, B. L. and Gottesman, M. E. (1995b) *Escherichia coli* NusG protein stimulates transcription elongation rates *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.*, **177**, 1388-1392.
- Bycroft, M.; Hubbard, T. J.; Proctor, M.; Freund, S. M. and Murzin, A. G. (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, **88**, 235-242.
- Calnan, B. J.; Tidor, B.; Biancalana, S.; Hudson, D. and Frankel, A. (1991) Arginine mediated RNA recognition: the Arginine fork. *Science*, **254**, 1167-1171.
- Cannistraro, V. J. and Kennell, D. (1989) Purification and characterization of ribonuclease M and mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **181**, 363-370.
- Carafa, Y. D.; Brody, E. and Thermes, C. (1990) Prediction of Rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators: a statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J. Mol. Biol.*, **216**, 835-858.
- Cheng, S. W.; Lynch, E. C.; Leason, K. R.; Court, D. L.; Shapiro, B. A. and Friedmann, D. I. (1991) Functional importance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science*, **254**, 1205-1207.
- Coburn, G. A. and Mackie, G. A. (1996) Overexpression, purification, and properties of *Escherichia coli* Ribonuclease II. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1048-1053.
- Cohen, W. E. (1950) The anion-exchange separation of ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1471-1478.
- Cohen, W. E. (1953) The separation of biochemically important substances by ion exchange chromatography. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **57**, 204-224.
- Cohen, W. E. (1955) The separation of nucleic acid derivatives by chromatography on ion-exchange columns in *The Nucleic Acids: Chemistry and Biology*, **1**, 212-241.
- Cohen, W. E. und Volkin, E. (1953) On the structure of ribonucleic acids, *J. Biol. Chem.*, **203**, 319-332.
- Cohen, W. E. (1975) Column chromatography of nucleic acids and their constituents in *Chromatography* (Heftmann, E. ed.), 714-743.
- Cohen, W. E. (1961) Chromatography and desalting of nucleotides with ammonium bicarbonate on anion-exchange columns. *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 588-590.

- Comai, L.; Tanese, N. and Tjian, R. (1992) The TATA binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, **68**, 965-976.
- Condon, C.; Liveris, D.; Squires, C.; Schwartz, I. and Squires, C. L. (1995) rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bacteriol.*, **177**, 4152-4156.
- Cortay J.-C.; Bleicher F.; Rieul C.; Reeves H.C. and Cozzone A. J. (1988) Nucleotide sequence and expression of the *aceK* gene coding for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 89-97.
- Craven, M. G. and Friedman, D. I. (1991) Analysis of the *Escherichia coli nusA10*(Cs) allele: relating nucleotide changes to phenotypes. *J. Bacteriol.*, **173**, 1485-1491.
- Craven, M. G.; Granston, A. E.; Schauer, A. T.; Zheng, C.; Gray, T. A. and Friedman, D. I. (1994) *Escherichia coli*-*Salmonella typhimurium* hybrid *nusA* gene: identification of a short motif required for action of the lambda N transcription antitermination protein. *J. Bacteriol.*, **176**, 1394-1404.
- Cudny, H. and Deutscher, M. P. (1980) Apparent involvement of ribonuclease D in the 3'-processing of RNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **77**, 837-841.
- Cullen, B. R. (1992) Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol. Rev.*, **56**, 375-394.
- Das, A. (1992) How the phage lambda N gene product suppresses transcription termination; communication of RNA polymerase with regulatory proteins mediated by signals in nascent RNA. *J. Bacteriol.*, **174**, 6711-6716.
- Das, A.; Court, D. and Adhya, S. (1976) Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1959-1963.
- Das, A.; Pal, M.; Mena, J. G.; Whalen, W.; Wolska, K.; Crossley, R.; Rees, W.; von Hippel, P. H.; Costantino, N.; Court, D.; Mazzula, M.; Altieri, A. S.; Byrd, R. A.; Chattopadhyay, S.; DeVito, J. and Ghosh, B. (1996) Components of multiprotein-RNA complex that controls transcription elongation in *Escherichia coli* phage Lambda. *Methods Enzymol.*, **274**, 374-402.
- DeCrombrughe, B.; Mudryi, M.; Dilauro, R. and Gottesman, M. (1979) Specificity of the bacteriophage lambda N gene product (pN): *nut* sequences are necessary and sufficient for antitermination by N. *Cell*, **18**, 1145-1151.

- Dehner, A.; Gemmecker, G., Coles, M.; Diercks, T.; Robelek, R.; Mühlberger, R.; Richter, G.; Bacher, A.; Kessler, H. (2001) Sequential Assignment and Secondary Structure of the Antitermination Protein NusB Bound to the RNA *boxA* Motif, *poster presentation*.
- Deutscher, M. P.; Marlor, C. W. and Zaniewski, R. (1985) RNase T is responsible for the end-turnover of tRNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6427-6430.
- DeVito, J. and Das, A. (1994) Control of transcription processivity in phage λ : Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by N antiterminator. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, **91**, 8660-8664.
- Downing, W. L.; Sullivan, S. L.; Gottesman, M. E. and Dennis, P. P. (1990) Sequence and transcriptional pattern of essential *Escherichia coli* *secE-nusG* operon. *J. Bacteriol.*, **172**, 1621-1627.
- Dower, W. J.; Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Duester, G. L. and Holmes, W. M. (1980) The distal end of the ribosomal RNA operon *rrnD* of *Escherichia coli* contains a tRNA^{Thr1} gene, two 5S rRNA genes and a transcription terminator. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3793-3807.
- Ehrenberg, L.; Fedorcsak, I., and Solymosy, F. (1976) Diethylpyrocarbonate in nucleic acid research. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **16**, 189-262
- Ellwood, M. and Nomura, M. (1982) Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **143**, 1077-1080.
- Ernst, R. R. (1992) Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, **104**, 817-836.
- Fägerstam, L. G.; Frostell-Karlsson, A.; Karlsson, R.; Persson, B. and Rönnerberg, I. (1992) Biospecific interaction analysis surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatog.* **597**, 397-410.
- Farnham, P. J. and Platt, T. (1980) A model for transcription termination suggested by studies on the *trp* attenuator *in vitro* using base analogs. *Cell*, **20**, 739-748.
- Fesik, S. W.; Eaton, H. L.; Olejniczak, E. T. and Zuiderweg, E. R. P. (1990) 2D und 3D NMR spectroscopy employing ¹³C-¹³C-magnetization transfer via isotropic mixing. Spin system identification in large systems. *J. Amer. Chem. Soc.*, **112**, 86-888.
- Finch P. W.; Wilson R. E.; Brown K.; Hickson I. D.; Tomkinson A. E. and Emmerson P. T. (1986) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *recC* gene and of the *thyA-recC* intergenic region. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4437-4451.

- Fischko, J. C.; Rhem, H. J. and Reed, G. (eds.) (1989) Fermentation Technology using Recombinant Microorganisms. In *Biotechnology*, **7b**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 117-140.
- Fisher, R. F and Yanofsky, C. (1983) A complementary DNA oligomer release a transcription pause complex. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9208-9212.
- Fivash, M.; Towler, E. M. and Fisher, R.J. (1998) BIAcore for macromolecular interaction. *Curr Opin Biotechnol.*, **9**, 97-101
- Franklin, N. C. (1985) Conservation of genome form but not sequence in the transcription antitermination determinants of bacteriophage λ , ϕ 21 and P22. *J. Mol. Biol.*, **181**, 75-84.
- Friedman, D. I. and Baron, L. S. (1974) Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage lambda. *Virology*, **58**, 141-148.
- Friedman, D. I.; Baumann, M. and Baron, L. S. (1976) Cooperative effects of bacterial mutations affecting lambda N gene expression. I. Isolation and characterization of a *nusB* mutant. *Virology*, **73**, 119-127.
- Friedmann, D. I. and Court, D. L. (1995) Transcription antitermination, the λ paradigm updated. *Mol. Microbiol.*, **18**, 191-200.
- Friedman, D. I.; Olson, E. R.; Johnson, L. L.; Alessi, D. and Craven, M. G. (1990) Transcription-dependent competition for a host factor: the function and optimal sequence of the phage λ *boxA* transcription antitermination signal. *Genes Dev.*, **4**, 2210-2222.
- Ferguson, A. L.; Hughes, A. D.; Tufail, U.; Baumann, C. G.; Scott, D. J. and Hoggett, J. G. (2000) Interaction of σ^{70} with *Escherichia coli* RNA polymerase core enzyme studied by surface plasmon resonance. *FEBS Lett.*, **481**, 281-284.
- Gallupi, G. R. and Richardson, J. P. (1980) ATP-induced changes in the binding of RNA synthesis termination protein rho to RNA. *J. Mol. Biol.*, **138**, 513-539.
- Gardener, K. H. and Kay, L. E. (1997) Production and Incorporation of ^{15}N , ^{13}C , ^2H (^1H -signal-Methyl)-Isoleucine into Proteins for Multidimensional NMR Studies. *J. Am. Soc.*, **119**, 7599-7600.
- Gardener, K. H. and Kay, L. E. (1998) The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 357-406.
- Gascuel, O. and Golmard, J. L. (1988) Gascuela and Golmard Basic Statistical Method, *CABIOS*, **4**, 357-365.
- Geiselman, J. and von Hippel, P. H. (1992) Functional interactions of ligand cofactors with *Escherichia coli* transcription factor rho. I. Binding of ATP. *Protein Sci.*, **1**, 850-860.

- Georgopoulos, C. P.; Swindle, F.; Keppel, M.; Ballivet, H.; Bisig, H. and Eisen, H. (1980) Studies on the *E. coli groNB (nusB)* gene which affects bacteriophage λ N gene function. *Mol. Gen. Genet.*, **179**, 55-61.
- Gibson, T.J.; Thompson, J.D.; Heringa J. (1993) The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett*, **324**, 361-366.
- Gopal, B., Haire, L. F., Cox, R. A., Colston, M. J., Major, S., Brannigan, J. A., Smerdon, S. J. and Dodson, G. (2000) The crystal structure of NusB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 475-478.
- Ghosh, B.; Grzadzilska, E.; Bhattacharya, P.; Peralta, E.; DeVito, J. and Das, A. (1991) Specificity of antitermination mechanisms: suppression of the termination cluster T1-T2 of *Escherichia coli* ribosomal RNA operon, *rrnB*, by phage antiterminators. *J. Mol. Biol.*, **222**, 59-66.
- Gourse, R. L.; deBoer, H. A. and Nomura, M. (1986) DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback, inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell*, **44**, 197-205.
- Green, R. J.; Frazier, R. A.; Shakesheff, K. M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J. and Tendler, S. J. (2000) Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, **21**, 1823-1835.
- Greenblatt, J. and Li, J. (1981a) Interaction of the sigma factor and the *nusA* gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell*, **24**, 421-428.
- Greenblatt, J. and Li, J. (1981b) The NusA protein of *Escherichia coli*: its identification and a demonstration that it interacts with the gene N transcription anti-termination protein of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, **147**, 11-23.
- Greenblatt, J.; Li, J.; Adhya, S.; Friedman, D. I.; Baron, L. S.; Redfield, B.; Kung, H.-F. and Weissbach, H. (1980) L factor that is required for β -galactosidase synthesis is the *nusA* gene product involved in transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1991-1994.
- Greenblatt, J.; Nodwell, J. R. and Mason, S. W. (1993) Transcriptional antitermination. *Nature*, **364**, 401-406.
- Greenblatt, J. (1984) Regulation of transcription termination in *E. coli*. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**, 79-88.

- Gross, C.A.; Chan, C. L. and Lonetto, M. A. (1996) A structure/funktion analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Philos. Trans. R: Soc. London Ser. Biol. Sci.*, **351**, 475-482.
- Grzesiek, S.; Anglister, J. and Bax, A. (1993) Correlation of backbone amide and aliphatic side-chain resonance in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins by isotropic mixing of ^{13}C -magnetization. *J. Magn. Res. B*, **101**, 114-119.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*: in DNA Cloning, Glover, D. M. (ed.), **1**, Irl. Press, Oxford, Washington DC, 109-135.
- Harada, K.; Martin, S. S. and Frankel, A. D. (1996) Selection of RNA binding peptides *in vivo*. *Nature*, **380**, 175-179.
- Hart, C. M. and Roberts, J. W. (1994) Deletion analysis of the lambda tR1 terminator region: effect of sequences near the transcript release sites, and the minimum length of Rho-dependent transcripts. *J. Mol. Biol.*, **237**, 255-265.
- Harvey, S.; Hill, C. W.; Squires, C. and Squires, C. L. (1988) Loss of the spacer loop sequence from the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K-12 subline that bears the *relA1* mutation. *J. Bacteriol.*, **170**, 1235-1238.
- Hjertén, S. (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **Suppl. 1**, 147.
- Hennecke, H. I.; Günther, I. and Binder, F. (1982) A novel cloning vector for the direct selection of recombinant DNA in *Escherichia coli*. *Gene*, **19**, 231-234.
- Holben, W. E.; Prasad, S. M. and Morgan, E. A. (1985) Antitermination by both the promotor and the leader regions of an *Escherichia coli* ribosomal RNA operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5073-5077.
- Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Horwitz, R. J.; Li, J. and Greenblatt, J. (1987) An elongation control particle containing the N gene transcriptional antitermination protein of bacteriophage lambda. *Cell*, **51**, 631-641.
- Huenges, M.; Rölz, C.; Gschwind, R. M.; Peteranderl R.; Berglechner, F.; Richter G.; Bacher, A.; Kessler, H. and Gemmecker, G. (1998) Solution structure of the antitermination protein NusB of *Escherichia coli*: a novel all-helical fold for an RNA binding protein. *EMBO J.*, **17**, 4092-4100.
- Huenges, M. (1998) Strukturbestimmung biologisch aktiver Peptide und Untersuchung der Struktur und Funktion des NusB-Proteins von *Escherichia coli* mit Methoden der NMR-Spektroskopie, *Dissertation*, TU München.
- Illarionova, V. (2000) Persönliche Kommunikation.

- Ishii, S.; Ihara, M.; Maekawa, T.; Nakamura, Y.; Uchida, H. and Imamoto, F. (1984) The nucleotide sequence of the cloned *nusA* gene and its flanking region of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 3333-3342.
- Itoh, T.; Aiba, H.; Baba, T.; Fujita, K.; Hayashi, K.; Inada, T.; Isono, K.; Kasai, H.; Kimura, S.; Kitakawa, M.; Kitagawa, M.; Makino, K.; Miki, T.; Mizobuchi, K.; Mori, H.; Mori, T.; Motomura, K.; Nakade, S.; Nakamura, Y.; Nashimoto, H.; Nishio, Y.; Oshima, T.; Saito, N.; Sampei, G.; Seki, Y.; Sivasundaram, S.; Tagami, H.; Takeda, J.; Takemoto, K.; Wada, C.; Yamamoto, Y. and Horiuchi, T. (1996) A 460-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 40.1-50.0 min region on the linkage map. *DNA Res.*, **3**, 379-392.
- Jensen, E. B. and Carlsen, S. (1990) Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*: Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetat and Salts. *Biotechn. Bioeng.*, **36**, 1-11.
- Jin, D. J.; Burgess, R. R.; Richardson, J. P. and Gross, C. A. (1992) Termination efficiency at Rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1453-1457.
- Karn, J. and Graeble, A. (1992) New insights into mechanism of HIV-1 activation. *Trends Genet.*, **8**, 365-368.
- Keppel, F.; Georgopoulos, C. and Eisen, H. (1974) Host interference with expression of the lambda *N* gene product. *Biochimie*, **56**, 1503-1509.
- Koh, B. T.; Nakashimada, U.; Pfeifer, M. and Yap, M. G. S. (1992) Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechn. Lett.*, **14**, 1115-1118.
- Kurihara, K. and Suzuki, K. (2002) Theoretical understanding of an absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretschmann's theory. *Anal. Chem.*, **74**, 696-701.
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lau, L. F.; Roberts, W. J.; Wu, R.; Georges, F. and Narang, S. A. (1984) A potential stem-loop structure and the sequence CAAUCAA in the transcript are insufficient to signal ρ -dependent transcription termination at λ tR1. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 1287-1299.
- Laspias, M. F.; Rice, A. P. and Mathews, M. B. (1989) HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*, **59**, 283-292.

- Lazinski, D.; Grzadzielska, E. and Das, A. (1989) Sequence-specific recognition of RNA-hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine rich motif. *Cell*, **59**, 207-218.
- Lee, S. Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *TIBTECH*, **14**, 98-105.
- LeMaster, D. M. (1994) Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. *Progr. NMR Spectr.*, **26**, 371-419.
- Li, J.; Horwitz, R.; McCracken, S. and Greenblatt, J. (1992) NusG, a new *Escherichia coli* elongation factor involved in transcriptional antitermination by the N protein of phage λ . *J. Biol. Chem.*, **267**, 6012-6019.
- Li, J.; Mason, S. W. and Greenblatt, J. (1993) Elongation factor NusG interacts with termination factor ρ to regulate termination and antitermination of transcription. *Genes Dev.*, **7**, 161-172.
- Li, S. C.; Squires, C. L. and Squires, C. (1984) Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda *nut*-like sequences. *Cell*, **38**, 851-860.
- Liu, K. and Hanna, M. M. (1995) NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* transcription complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5012-5016.
- Logan, T. M.; Olejniczak, E. T., Xu, R. X. and Fesik, S. W. (1992) Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from two heteronuclear triple resonance experiments, *FEBS Lett.*, **314**, 413-418.
- Lüttgen, H. (2000) NMR-spektroskopische Untersuchung von Ligand-Protein-Komplexen, *Dissertation*, TU München.
- Lüttgen, H.; Robelek, R.; Mühlberger, R.; Diercks, T.; Schuster, S. C.; Köhler, P., Kessler, H.; Bacher, A.; and Richter, G. (2002) Transcriptional regulation by antitermination. Interaction of RNA with NusB protein and NusB/NusE protein complex of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **316**, 873-883.
- Lynn, S. P.; Kasper, L. M. and Gardner, J. F. (1988) Contributions of RNA secondary structure and length of the thymidine tract to transcription termination at the *thr* operon attenuator. *J. Biol. Chem.*, **263**, 472-479.
- Mah, T.-F.; Li, J.; Davidson, A. R.; Greenblatt, J. (1999) Functional importance of regions in *Escherichia coli* elongation factor NusA that interact with RNA polymerase, the bacteriophage λ N protein and RNA. *Mol. Microbiol.*, **34**, 528-537.

- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martin, F. H. and Tinoco, I. (1980) DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo (dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 2295-2299.
- Mason, S. and Greenblatt, J. (1991) Assembly of transcription elongation complexes containing the N protein of phage λ and the *Escherichia coli* elongation factors NusA, NusB, NusG and S10. *Genes Dev.*, **5**, 1504-1512.
- Mason, S. W.; Li, J. and Greenblatt, J. (1992) Direct interaction between two *Escherichia coli* transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *J. Mol. Biol.*, **223**, 555-566.
- McClure, W. R. (1985) Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 171-204.
- McDowell, J. C.; Roberts, J. W.; Jin, J. and Gross, C. (1994) Determination of intrinsic transcription termination efficiency by RNA polymerase elongation rate. *Science*, **266**, 822-825.
- McSwiggen, J. A.; Bear, D. G. and von Hippel, P. H. (1988) Interaction of *Escherichia coli* transcription termination factor rho with RNA. I. Binding stoichiometries and free energies. *J. Mol. Biol.*, **199**, 609-622.
- Meador III, J.; Cannon, B.; Cannistraro, V. J. and Kennell, D. (1990) Purification and characterisation of *Escherichia coli* RNase I. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 549-553.
- Meador III, D. and Kennell, D. (1990) Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. *Gene*, **95**, 1-7.
- Mogridge, J.; Mah, T.-F. and Greenblatt, J. (1995) A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the λ N protein. *Genes Dev.*, **9**, 2831-2844.
- Mogridge, J. and Greenblatt, J. (1998) Specific binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to *boxA* transcriptional antiterminator RNA. *J. Bacteriol.*, **180**, 2248-2252.
- Molin, S. (1976) Ribosomal RNA chain elongation rates in *Escherichia coli*. In *Control of Ribosome Synthesis* (Kjeldgaard, N. und Maaloe, O., eds), pp. 333-339, Alfred Benzon Symposium IX, Academic Press, New York.

- Morgan, E. A.; Ikemura, T. and Nomura, M. (1977) Identification of spacer tRNA genes in individual ribosomal RNA transcription units of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2710-2714.
- Morgan, E. A.; Ikemura, T.; Lindahl, L.; Fallon, A. and Nomura, M. (1978) Some rRNA operons in *E. coli* have tRNA genes at their distal ends. *Cell*, **13**, 335-344.
- Morgan, E. A. (1986) Antitermination mechanisms in rRNA operons of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **168**, 1-5.
- Morgan, W. D.; Bear, D. G. and von Hippel, P. H. (1983) Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from bacteriophage λ P_R promoter. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9553-9564.
- Morgan, E. A. and Nomura, M. (1979) Deletion analysis of the expression of rRNA genes and associated tRNA genes carried by a lambda transducing bacteriophage. *J. Bacteriol.*, **137**, 507-516.
- Mühlberger, R. (1998) Expression und Reinigung der Antiterminationsproteine NusA und NusG aus *Escherichia coli*. *Diplomarbeit*, TU München.
- Nehrke, K. and Platt, T. (1994) A quaternary transcription termination complex: reciprocal stabilization by Rho factor and NusG protein. *J. Mol. Biol.*, **243**, 830-839.
- Nehrke, K.; Zalatan, W. F. and Platt, T. (1993) NusG alters rho-dependent termination complex – reciprocal stabilization by rho factor and NusG protein. *J. Mol. Biol.*, **243**, 830-839.
- Nodwell, J. R. and Greenblatt, J. (1991) The *nut* site of bacteriophage λ is made of RNA and is bound by transcription antitermination factors on the surface of RNA polymerase. *Genes Dev.*, **5**, 2141-2151.
- Nodwell, J. R. and Greenblatt, J. (1993) Recognition of *boxA* antitermination RNA by *E. coli* antitermination factors NusB and ribosomal protein S10. *Cell*, **72**, 261-268.
- Nossal, N. G. and Singer, M. F. (1968) The processive degradation of individual polyribonucleotide chains I. *Escherichia coli* Ribonuclease II. *J. Biol. Chem.*, **243**, 913-922.
- Obuchowski, M.; Wegrzyn, A.; Szalewska-Palasz, A.; Thomas, M. S. and Wegrzyn, G. (1997) An RNA polymerase α subunit mutant impairs N-dependent transcriptional antitermination in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **23**, 211-222.
- Olson, E. R.; Flamm, E. L. and Friedman, D. I. (1982) Analysis of *nutR*: a region of phage lambda required for antitermination of transcription. *Cell*, **31**, 61-70.

- O'Shannessy, D. J.; Brigham-Burke, M.; Soneson, K.K.; Hensley, P. and Brooks, I. (1993) Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal Biochem.*, **212**, 457-468.
- Oschkinat, H.; Müller, T. und Dieckmann, T. (1994) Proteinstrukturaufklärung mit drei- und vierdimensionaler NMR-Spektroskopie. *Angew. Chem.*, **106**, 284-300.
- Patterson, T. A.; Zhang, Z.; Baker, T.; Johnson, L. L.; Friedman, D. I. and Court, D. L. (1994) Bacteriophage lambda N-dependent transcription antitermination: competition for an RNA site may regulate antitermination. *J. Mol. Biol.*, **236**, 217-228.
- Pasman, Z. and von Hippel, P. H. (2000) Regulation of Rho-Dependent Transcription Termination by NusG is specific to the *Escherichia coli* Elongation Complex. *Biochemistry*, **39**, 5573-5585.
- Platt, T. (1981) Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operons of *E. coli.*, *Cell*, **24**, 10-23.
- Platt, T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 339-372.
- Platt, T. and Bear, D. G. (1983) Role of RNA polymerase, ρ factor, and ribosomes in transcription termination: in Beckwith, J., Davies, J. and Gallant, J. A. (ed.), *Gene function in prokaryotes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 123-161
- Platt, T. and Richardson, J. P. (1992) *Escherichia coli* Rho factor: protein and enzyme of transcription termination: in McKnight, S. L.; Yamamoto, K. R. (ed.), *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 365-388.
- Pinkham J. L. and Platt T.; (1983) The nucleotide sequence of the *rho* gene of *E.coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3531-3545.
- Peltz, S. W.; Brown, A. L.; Hasan, N.; Podhajska, A. J. and Szybalski, W. (1985) Thermo-sensitivity of a DNA recognition site: activity of a truncated *nutL* antiterminator of coliphage lambda. *Science*, **228**, 91-93.
- Read, S. M. and Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dyebinding assay for proteins. *Anal. Biochem.*, **116**, 53-64.
- Rees, W. A.; Weitzel, S. E.; Yager, T. D.; Das, A. and von Hippel, P. H. (1996) Bacteriophage λ N protein alone can induce transcription antitermination *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 342-346.

- Richardson, J. P. (1990) Rho-dependent transcription termination. *Biochim. Biophys. Acta*, **1048**, 127-138.
- Richardson, J. P. (1993) Transcription termination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 1-30.
- Richter, G. (1995) Klonierung und Expression von Genen der Riboflavinbiosynthese aus *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. *Dissertation*, TU München, S. 18.
- Richter, G.; Fischer, M.; Krieger, C.; Eberhardt, S., Lüttgen, H.; Gerstenschläger, I. and Bacher, A. (1997) Biosynthesis of Riboflavin: Characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **179**, 2022-2028.
- Riesenberg, D. (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2**, 380-384.
- Roberts, J. W. (1969) Termination factor for RNA synthesis. *Nature*, **224**, 1168-1174.
- Roberts, J. W. (1993) RNA and protein elements of *E. coli* and λ transcription antitermination complexes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6205-6210.
- Robertson, H. D. (1990) *Escherichia coli* Ribonuclease III., *Methods in Enzymol.*, **181**, 189-202.
- Rosenberg, M. and Court, D. (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.*, **13**, 319-353.
- Ross, W.; Gosink, K. K.; Salomon, J.; Igarashi, K.; Zou, C.; Ishihama, K.; Severinov, K. and Gourse, R. L. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α -subunit of RNA polymerase. *Science*, **262**, 1407-1413.
- Roy, M. K. and Apirion, D. (1983) Purification and properties of Ribonuclease E, an RNA-processing enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **747**, 200-208.
- Saito, M.; Tsugawa, A.; Egawa, K. and Nakamura, Y. (1986) Revised sequence of the *nusA* gene of *Escherichia coli* and identification of *nusA11(ts)* and *nusA1* mutations which cause changes in a hydrophobic amino acid cluster. *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 380-382.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5468.
- Schauer, A. T.; Cheng, S.-W. C.; Zheng, C.; St Pierre, L.; Alessi, D.; Hidayetoglu, D. L.; Costantino, N.; Court, D. L. and Friedmann, D. I. (1996) The alpha subunit of RNA polymerase and transcription antitermination. *Mol. Microbiol.*, **21**, 839-851.
- Sharp, P. A. and Marciniak, R. A. (1989) HIV TAR: an RNA enhancer? *Cell*, **59**, 229-230.

- Sharrock, R. A.; Gourse, R. L. and Nomura, M. (1985a) Inhibitory effect of high-level transcription of the bacteriophage λ *nutL* region on transcription of rRNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **163**, 704-708.
- Sharrock, R. A.; Gourse, R. L. and Nomura, M. (1985b) Defective antitermination of rRNA transcription and depression of rRNA and tRNA synthesis in the *nusB5* mutant of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5275-5279.
- Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1957) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci. Bull.* **28**, 1409-1438.
- Stark, B. C.; Kole, R.; Bowman, E. J. and Altman, S. (1978) Ribonuclease P: An enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3717-3721.
- Squires, C. L.; Greenblatt, J.; Li, J.; Condon, C. and Squires, C. L. (1993) Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one more unidentified cellular components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 970-974.
- Stüber, D.; Matile, H. and Garotta, G. (1990) System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunol. Methods*, **4**, 121-152.
- Sugimura, K. and Higashi, N. (1988) A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3650-3654.
- Sullivan, S. L. and Gottesman, M. E. (1992) Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell*, **68**, 989-994.
- Torres, M.; Condon, C.; Balada, J.-M.; Squires, C. and Squires, C. L. (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J.*, **20**, 3811-3820.
- Vogel, U. and Jensen, K. F. (1994) The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J. Bacteriol.* **176**, 2807-2813.
- Vogel, U. and Jensen, K. F. (1995) Effects of the antiterminator *boxA* on transcription elongation kinetics and ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18335-18340.
- von Hippel, P. H.; Bear, D. G.; Morgan, W. D. and McSwiggen, J. A. (1984) Protein nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. *J. Mol. Biol.*, **229**, 1101-1124.

- Whalen, W. and Das, A. (1990) Action of an RNA site at a distance: role of the *nut* genetic signal in transcription antitermination by phage λ *N* gene product. *New Biol.*, **2**, 975-991.
- Wahlen, W.; Ghosh, B. and Das, A. (1988) NusA protein is necessary and sufficient *in vitro* for phage λ *N* gene product to suppress a Rho-independent terminator placed downstream of *nutL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2494-2498.
- Wilson, K. S. and von Hippel, P. H. (1994) Stability of *Escherichia coli* transcription complexes near an intrinsic terminator. *J. Mol. Biol.*, **244**, 36-51.
- Worbs, M.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Wahl, M.C. (2001) An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol. Cell*, **7**, 1177-1189.
- Wüthrich, K. (1998) The second decade – into the third millenium. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 492.
- Yager, T. D. and von Hippel, P. H. (1987) Transcript elongation and termination in *Escherichia coli*: in *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*. In Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaecher, M. and Umberger, H. E. (eds.), *Cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, USA, **2**, 1241-1275.
- Yang, X.-M.; Xu, L. and Eppstein, L. (1992) Production of recombinant human interferon alpha 1 by *Escherichia coli* using computer controlled cultivation process. *J. Biotechnology*, **23**, 291-301.
- Yee, L. and Blanch, H. W. (1993) Defined Media Optimization for Growth of Recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotech. Bioeng.*, **41**, 212-230.
- Zamenhof, P. J. and Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **110**, 171-178.
- Zheng, C. and Friedman, D. I. (1994) Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7543-7547.
- Zuber, M.; Patterson, T. A. and Court, D. L. (1987) Analysis of *nutR*, a site required for transcription antitermination in phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4514-4518.

Anhang A

DNA-Oligonukleotide für die diversen Klonierungen (siehe unter Kapitel 3.1 ff.) und DNA-Sequenzierungen.

NA1A:	5'-GAGGAGAAATTA ACTATGAACAAAGAAATTTGGCTG-3'	
NA1B:	5'-ATCTGTCATGCGGATCCTTCCTGC-3'	
NusA349rev:	5'-TATATAGGATCCTTACTGATGCTTAGCCTG-3'	
NusA350for:	5'-GAGAAATTA ACTATGGCGGAAGCGC-3'	
NusA1N:	5'-GCAGGTCGACAATTGCTTCCTGC-3'	
RHOH2:	5'-GTTTTAAGCTTAAGACAAATTTATGAGCGTTTCATCAT-3'	
RHOV2:	5'-GAGGAGAAATTAACCATGAATCCTTACCGAATTAAAG-3'	
yhbCfor:	5'-GAGGAGAAATTA ACTATGATCACCGCTCCGGTT G-3'	
yhbCrev:	5'-GCTTTTCACCGGATCCAGACTATTA AAAAGTGGG-3'	
kMfeI:	5'-ACACACAATTGATTAAAGAGGAGAAATTAACCATG-3'	
kEcoRI:	5'-ACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATG-3'	
pNCO+80:	5'-GTGAGCGGATAACAATTTACACAC-3'	Sequenzierprimer
pNCO-100:	5'-CTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG-3'	Sequenzierprimer

Anhang B

RNA-Oligonukleotide mit Mutationen an Basen und der 2'-Hydroxylgruppe für NMR- und SPR^(*)-Spektroskopie. Mit „d“ bezeichnete Nukleotide liegen als Deoxynukleotide vor. Der Fettdruck weist auf die jeweilige Mutation hin.

<i>rrn boxA</i>	5'-UGCUCUUUAACA-3'	*
λ <i>nutR boxA</i>	5'-CGCUCUUAAAAA-3'	*
λ <i>nutL boxA</i>	5'-CGCUCUUACACA-3'	
λ <i>nutR boxB</i>	5'-GCCCUGAAGAAGGGC-3'	*
U1m ⁵ U	5'-m ⁵ UGCUCUUUAACA-3'	
U4m ⁵ U	5'-UGCm ⁵ UCUUUAACA-3'	
U6m ⁵ U	5'-UGCUCm ⁵ UUUAACA-3'	
U7m ⁵ U	5'-UGCUCUm ⁵ UUAACA-3'	
U8m ⁵ U	5'-UGCUCUUm ⁵ UAACA-3'	
C3G	5'-UGGUCUUUAACA-3'	
U4G	5'-UGCUCUUUAACA-3'	
C5G	5'-UGCUGUUUAACA-3'	*
C11A	5'-UGCUCUUUAAAA-3'	
U8GA10C	5'-UGCUCUUGACCA-3'	*
Δ 10-12	5'-CACUGGUCUUUA-3'	
Δ 1-3	5'-UCUUUAACAATT-3'	
Δ 7-12	5'-CGGCACUGCUCU-3'	
U1dU	5'-dUGCUCUUUAACA-3'	
G2dG	5'-UdGCUCUUUAACA-3'	
C3dC	5'-UGdCUCUUUAACA-3'	*
U4dU	5'-UGCdUCUUUAACA-3'	
C5dC	5'-UGCdUCUUUAACA-3'	
U6dU	5'-UGCUCdUUUAACA-3'	*
U7dU	5'-UGCUCUdUUUAACA-3'	
U8dU	5'-UGCUCUdUAACA-3'	
A9dA	5'-UGCUCUUdAACA-3'	*
A10dA	5'-UGCUCUUAdACA-3'	*
C11dC	5'-UGCUCUUAAAdCA-3'	*
A12dA	5'-UGCUCUUUAACdA-3'	
RD <i>boxA</i>	5'-UdGCdUCdUdUAdACdA-3'	*
DR <i>boxA</i>	5'-dUGdCUdCUdUUdAAAdCA-3'	*
DNA <i>boxA</i>	5'-d(UGCUCUUUAACA)-3'	*
DNAdU <i>boxA</i>	5'-d(TGCTCTTTAACA)-3'	*

Anhang C

DNA- und Protein-Sequenzen der in Kapitel 3.1 ff. beschriebenen Gen-Klonierungen.

rho

M N L T E L K N T P V S E L I T L atgaatcttaccgaattaaagaatacgccggtttctgagctgatcactct	50
G E N M G L E N L A R M R K Q D I cggcgaaaat atggggctggaaaacctggctcgtatgcgt aagcaggaca	100
I F A I L K Q H A K S G E D I F ttatTTTTGCCATCCTGAAGCAGCACGCAAAGAGTGGCGAAGATATCTTT	150
G D G V L E I L Q D G F G F L R S ggtgatggcgtactggagatattgcaggatggatttggtttcctccggttc	200
A D S S Y L A G P D D I Y V S P S cgcagacagctcctacctcgccggtcctgatgacatctacgtttccccta	250
Q I R R F N L R T G D T I S G K gccaaatcgccggtttcaacctccgcactggtgataccatctctggtaag	300
I R P P K E G E R Y F A L L K V N attcgcccgccgaaagaaggatgaacgctattttgcgctgctgaaagttaa	350
E V N F D K P E N A R N K I L F E cgaagttaacttcgacaaacctgaaaacgcccgcaacaaaatcctctttg	400
N L T P L H A N S R L R M E R G agaacttaaccccgctgcacgcaaactctcgtctgcgtatggaacgtggt	450
N G S T E D L T A R V L D L A S P aacggttctactgaagatttaactgctcgcgtactggatctggcatcacc	500
I G R G Q R G L I V A P P K A G K tatcggtcgctggcagcgtggctctgattgtggcaccgccgaaagccggtat	550
T M L L Q N I A Q S I A Y N H P aaaccatgctgctgcagaacattgctcagagcattgcttacaaccacccg	600
D C V L M V L L I D E R P E E V T gattgtgtgctgatggttctgctgatcgacgaacgtccggaagaagtaac	650
E M Q R L V K G E V V A S T F D E cgagatgcagcgtctggtaaaaggatgaagttggttgcttctacctttgacg	700

P A S R H V Q V A E M V I E K A aaccgcgcatctcgccacggttcaggttgcggaaatggtgatcgagaaggcc	750
K R L V E H K K D V I I L L D S I aaacgcctgggttgagcacaagaaagacggttatcattctgctcgactccat	800
T R L A R A Y N T V V P A S G K V cactcgtctggcgcgcgcttacaacaccggttggtccggcgtcaggtaaag	850
L T G G V D A N A L H R P K R F tggtgaccgggtgggtgtggatgccaacgcctgcatcgtccgaacgctatc	900
F G A A R N V E E G G S L T I I A tttgggtgcggcgcgtaacgtggaagagggcgggcagcctgaccattatcgc	950
T A L I D T G S K M D E V I Y E E gacggcgcttatcgataccggttctaaaatggacgaagtatatctacgaag	1000
F K G T G N M E L H L S R K I A agtttaaaggtagaggcaacatggaactgcacctctctcgtaagatcgct	1050
E K R V F P A I D Y N R S G T R K gaaaaacgcgctctcccggctatcgactacaaccggttctggtagccgtaaa	1100
E E L L T T Q E E L Q K M W I L R agaagagctgctcacgactcaggaagaactgcagaaaatgtggatcctgc	1150
K I I H P M G E I D A M E F L I gcaaaatcattcacccgatgggcgaaatcgatgcaatggaattcctcatt	1200
N K L A M T K T N D D F F E M M K aataaactggcaatgaccaagaccaatgacgatttcttcgaaatgatgaa	1250
R S * acgctcataa	1263

DNA- und Proteinsequenz von Rho-Protein aus *Escherichia coli*. Das Protein mit 420 Aminosäuren und einer Größe von 47 kDa bildet ein Hexamer.

yhbC

M I T A P V E A L G F E L V G I E atgattactgcgccagttgaggccctgggttttgaactggttggcatcga	50
F I R G R T S T L R I Y I D S E D atatttcgcggtcgcacatccacactgcgcatctatattgatagtgaag	100
G I N V D D C A D V S H Q V S A atggcatcaatgttgatgattgtgctgatgtgagccaccaggt aagt gct	150
V L D V E D P I T V A Y N L E V S gtgctggatgttgaagatcccatcacggttgcttataacctggaagtctc	200
S P G L D R P L F T A E H Y A R F ctcaccgggtctcgatcgcccactgttcacggctgaacactacgcccgtt	250
V G E E V T L V L R M A V Q N R ttgtcggagaagaggtgactctggttctccgtatggcgggtacaaaaccgt	300
R K W Q G V I K A V D G E M I T V cgtaaatggcagggcgttatcaaagcggtagacggtgaaatgatcacagt	350
T V E G K D E V F A L S N I Q K A taccgtcgaaggtaaagatgaagtgttcgcgctgagtaatatccagaagg	400
N L V P H F * cgaacctggttccccacttttaa	423

DNA- und Proteinsequenz von *yhbC* aus *Escherichia coli*. Das Gen codiert für ein hypothetisches, 15,5 kDa schweres Protein mit 140 Aminosäuren.