

# Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung der EF-Tu Kinase



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Rouven Klug

Berlin, Mai 2008

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1999 bis Juli 2001 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

**1. Gutachter: Professor Dr. Volker A. Erdmann**  
**2. Gutachter: Professor Dr. Eberhard Riedel**

**Tag der Disputation: 09. Dezember 2008**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Molekulare Prinzipien des Lebens .....	1
1.2 Transkription .....	2
1.3 Translation (Proteinbiosynthese).....	3
1.3.1 Das Ribosom .....	4
1.3.2 Aminoacylierung von tRNAs .....	5
1.3.3 Initiation .....	6
1.3.4 Elongation.....	7
1.3.5 Termination .....	9
1.4 Elongationsfaktoren.....	9
1.4.1 EF-Tu.....	9
1.4.1.1 Expression von EF-Tu .....	10
1.4.1.2 Funktionelle Eigenschaften von EF-Tu.....	10
1.4.1.3 Antibiotika.....	12
1.4.1.4 Strukturen von EF-Tu .....	12
1.4.1.4.1 EF-Tu-GDP .....	13
1.4.1.4.2 EF-Tu-GTP .....	13
1.4.1.4.3 EF-Tu-GTP·Aminoacyl-tRNA.....	14
1.4.1.4.4 EF-Tu·EF-Ts.....	15
1.4.1.5 Posttranslationale Modifikationen von EF-Tu .....	18
1.4.1.6 Phosphorylierung von EF-Tu .....	18
1.4.2 EF-Ts .....	19
1.4.3 EF-G .....	20
1.4.4 EF-P.....	21
1.5 Proteinphosphorylierung in Prokaryonten.....	21
1.6 G-Proteine.....	22
1.7 Zielsetzung.....	24
<b>2 Material .....</b>	<b>25</b>
2.1 Geräte.....	25
2.2 Feinchemikalien, Lösungsmittel.....	26
2.3 Enzyme, Proteine.....	27
2.4 Kits, Fertigprodukte, Marker .....	27
2.5 Synthetische Oligonukleotide und Peptide.....	28
2.5.1 Oligonukleotide .....	28
2.5.2 Peptide .....	28
2.6 Bakterien-, Hefestämme und Vektoren .....	29
2.6.1 Bakterienstämme .....	29
2.6.2 Hefestämme .....	29
2.6.3 Vektoren .....	29
2.7 Nährmedien .....	30
2.7.1 <i>E. coli</i> Medien .....	30
2.7.2 <i>S. cerevisiae</i> Medien.....	31
<b>3 Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1 Mikrobiologische Methoden.....	32
3.1.1 Zellanzucht von <i>E. coli</i> in Flüssigkultur.....	32

3.1.2 Zellanzucht von Einzelkolonien .....	32
3.1.3 Anlegen von DMSO-Stocks .....	32
3.1.4 Herstellung superkompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	32
3.2 Molekularbiologische Methoden (Nukleinsäuren) .....	33
3.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	33
3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>E. coli</i> MRE600 .....	33
3.2.3 Restriktionsverdau .....	34
3.2.4 Agarosegelelektrophorese .....	34
3.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	34
3.2.6 Ethanolfällung .....	34
3.2.7 Dephosphorylierung .....	35
3.2.8 Ligation .....	35
3.2.9 Transformation .....	35
3.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	36
3.2.11 DNA-Sequenzierung .....	36
3.3 Proteinchemische Methoden .....	37
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
3.3.2 Proteinbestimmung .....	38
3.3.3 Ammoniumsulfatfällung .....	39
3.3.4 Proteinkonzentrierung durch Zentrifugation .....	39
3.3.5 Dialyse .....	39
3.3.6 Immuno Blot / Western Blot .....	39
3.4 Yeast Two Hybrid .....	40
3.4.1 Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40 .....	40
3.4.2 Herstellung von denaturierter Heringssperma DNA .....	40
3.4.3 Transformation von pHybLex- <i>tufA</i> in <i>S. cerevisiae</i> L40 .....	41
3.4.4 Aufschluß von Hefezellen .....	41
3.4.5 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay .....	42
3.4.6 Transformation von genomischer <i>E. coli</i> Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> L40 .....	42
3.4.7 Plasmid-Präparation aus Hefezellen .....	43
3.4.8 Kolonie-PCR aus Hefezellen .....	44
3.4.9 Sequenzierung der PCR-Produkte .....	44
3.5 Affinitätschromatographie .....	45
3.5.1 Vorbereitung der Substrateptidsäule .....	45
3.5.2 Aufreinigung von Proteinen aus Roh-Ribosomen .....	45
3.5.3 Affinitätschromatographie (Versuch 1) .....	46
3.5.4 Affinitätschromatographie (Versuch 2) .....	47
3.5.5 Identifizierung gebundener Proteine .....	47
3.6 Überexpression von Proteinen .....	48
3.6.1 Klonierungen zur Überexpression .....	48
3.6.2 Proteinbiosynthese <i>in vitro</i> .....	48
3.6.3 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen .....	50
3.7 EF-Tu Phosphorylierungsassay .....	51
3.7.1 Darstellung von 70S Ribosomen .....	51
3.7.2 EF-Tu Phosphorylierungsassay .....	51
3.7.3 Untersuchung der Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock .....	52
3.7.4 Überprüfung verschiedener Salzbedingungen bei der Aufarbeitung von 70S Rohribosomen .....	52
3.7.5 Untersuchung verschiedener überexprimierter Proteine auf ihre Beteiligung an der Phosphorylierung von EF-Tu .....	53

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1 Yeast Two Hybrid .....	54
4.1.1 Klonierung von <i>tufA</i> in pHybLex .....	56
4.1.2 Transformation von pHybLex- <i>tufA</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40 .....	57
4.1.3 Transformation der genomischen <i>E. coli</i> Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> L40 pHybLex- <i>tufA</i> .....	59
4.1.4 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay .....	59
4.1.5 Transformation der genomischen <i>E. coli</i> Bibliothek in <i>S. cerevisiae</i> L40 pHybLex- <i>tufA</i> 2 (Wiederholung) .....	60
4.1.6 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay 2 (Wiederholung).....	60
4.1.7 Plasmidisolierung aus den His <sup>+</sup> /LacZ <sup>+</sup> Hefezellen.....	61
4.1.8 Kolonie-PCR .....	61
4.1.9 Sequenzierung und Analyse der PCR-Produkte.....	62
4.2 Affinitätschromatographie.....	64
4.2.1 Vorbereitung der Substratpeptidsäule .....	65
4.2.2 Aufreinigung von Proteinen aus Rohribosomen .....	65
4.2.3 Affinitätschromatographie (Versuch 1).....	66
4.2.4 Affinitätschromatographie (Versuch 2).....	68
4.2.5 Identifizierung gebundener Proteine durch MALDI-MS .....	71
4.3 Untersuchung der Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock .....	71
4.4 Überexpression und Aufreinigung von zu untersuchenden Proteinen .....	73
4.4.1 Überexpression der ribosomalen Proteine S1, S2 und EF-P .....	73
4.4.2 Überexpression der ribosomalen ATPase RbbA.....	76
4.5 Untersuchungen zur Phosphorylierung von EF-Tu .....	77
4.5.1 Einfluß verschiedener Salzbedingungen bei der Aufarbeitung von 70S Rohribosomen auf die Phosphorylierung von EF-Tu .....	78
4.5.2 Einfluß verschiedener überexprimierter Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu.....	79
 <b>5 Diskussion.....</b>	 <b>83</b>
5.1 Yeast Two Hybrid .....	83
5.2 Affinitätschromatographie.....	87
5.3 Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock.....	91
5.4 Überexpression und Aufreinigung von zu untersuchenden Proteinen .....	92
5.5 Untersuchungen zur Phosphorylierung von EF-Tu .....	93
5.6 Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu.....	96
5.7 Ausblick.....	98
 <b>6 Zusammenfassung / Summary .....</b>	 <b>99</b>
 <b>7 Literatur .....</b>	 <b>101</b>
 <b>8 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	 <b>112</b>
 <b>9 Danksagung.....</b>	 <b>116</b>
 <b>10 Lebenslauf .....</b>	 <b>117</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Molekulare Prinzipien des Lebens<sup>1,2</sup>

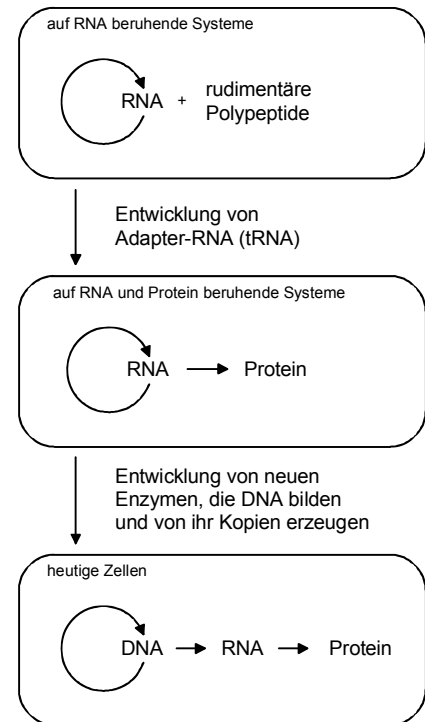
So verschiedene Lebewesen wie das Bakterium *Escherichia coli*, die Gemeine Mauerkresse (*Arabidopsis thaliana*) und der Mensch verwenden die selben molekularen Bausteine und Mechanismen zur Herstellung von Makromolekülen. In gleicher Weise ist der Mechanismus der Informationsübertragung von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) über die Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) zum fertigen Protein allen Organismen gemein.

In der Nukleotidsequenz der DNA ist das komplette Erbgut und alle darin enthaltenen Gene verschlüsselt. Die einzelnen Bausteine einer Nukleinsäure – die Nukleotide – bestehen aus einer Stickstoff-enthaltenden Base, einem 5-Kohlenstoff-Zucker und einer oder mehreren Phosphatgruppen. Bei der DNA sind dies die Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T), welche über eine N-glykosidische Bindung mit dem C1-Kohlenstoff der  $\beta$ -D-2-Desoxyribose verknüpft sind. Die einzelnen Nukleotide werden wiederum durch eine Phosphodiester-Bindung zwischen den 5'- und 3'-Kohlenstoffatomen zu Nukleinsäuren verknüpft, so daß eine lineare Sequenz entsteht. In den Zellen liegt die DNA größtenteils in Form einer doppelsträngigen Helix vor, wobei die einzelnen Stränge durch komplementäre Basenpaarungen der Basen A und T sowie G und C unter Ausbildung von zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden. Die Struktur der DNA bietet somit auch eine Erklärung für den Mechanismus der DNA-Replikation: Jeder der beiden Einzelstränge dient als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären DNA-Tochterstrangs, so daß jede der Tochterzellen eine identische Kopie der genomischen Informationen erhält. Da in jeder der dabei entstehenden DNA-Doppelhelices einer der ursprünglichen Stränge enthalten ist, wird dieser Mechanismus der DNA-Replikation als semikonservativ bezeichnet.

Die RNA unterscheidet sich in ihrer chemischen Zusammensetzung nur geringfügig von der DNA: Das Zuckerphosphat-Gerüst der RNA besteht aus Ribose anstelle von Desoxyribose, und statt der Base Thymin wird Uracil verwendet. Der größte Unterschied zur DNA besteht jedoch darin, daß die verschiedenen RNAs in der Zelle in der Regel als Einzelstrang vorliegen und sich dadurch zu komplexen dreidimensionalen Strukturen falten können. Bedingt durch die so gebildeten Tertiärstrukturen können RNAs neben der Informationsübertragung auch andere Funktionen übernehmen – z.B. wie die tRNA als Adaptermolekül fungieren oder als sogenanntes „Ribozym“ biochemische Reaktionen katalysieren. Auf Grund dieser Variabilität stellt sich natürlich die Frage nach der Rolle der RNA bei der Entstehung des Lebens. Vor-

stellbar ist z.B., daß anfänglich eine sogenannte RNA-Welt existierte, in der sich selbst replizierende RNAs auch einfache chemische Reaktionen katalysieren konnten. Ein Beispiel für eine mögliche Evolution von der RNA-Welt zur heutigen Form der Informationsübertragung ist in Abb. 1.1 dargestellt.

Im Gegensatz zu Nukleinsäuren bestehen Proteine aus 20 verschiedenen  $\alpha$ -Aminosäuren, von denen jede ihre eigenen chemischen Eigenschaften besitzt. Die einzelnen Aminosäuren sind dabei über eine Amidbindung, auch als Peptidbindung bezeichnet, miteinander verknüpft. So wären für eine typische Proteinlänge von 300 Aminosäuren über  $10^{390}$  verschiedene Proteine möglich. Diese hohe kombinatorische Vielfalt erklärt vermutlich, weshalb sich im Verlauf der Evolution Proteine statt RNA-Moleküle durchgesetzt haben, um die meisten Zellreaktionen zu katalysieren.



**Abb. 1.1** Vorschlag, wie sich die Evolution in Stufen aus einfachen sich selbst replizierenden Systemen von RNA-Molekülen zu jetzigen Zellen ereignet haben kann<sup>1</sup>.

## 1.2 Transkription<sup>3,4</sup>

Alle RNA-Moleküle werden von einer sogenannten RNA-Polymerase synthetisiert, welche anhand einer DNA-Matrize eine RNA-Kopie erstellt. Während bei Eukaryonten drei verschiedene RNA-Polymerasen (I - III) für die Synthese der verschiedenen RNAs zuständig sind, gibt es in Bakterien nur eine einzige, aus 5 Untereinheiten ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) mit einem Molekulargewicht von insgesamt 465 kDa bestehende, RNA-Polymerase. Die Transkription kann in die drei Stadien Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden.

Bei der Initiation bindet das komplette Enzym einschließlich des  $\sigma$ -Faktors an den stromaufwärts des zu transkribierenden Gens liegenden Promotor. Dieser besteht in der Regel aus zwei konservierten Sequenzen: dem -35 und dem -10 Bereich (Pribnow-Box), welche sich 35 bzw. 10 Basenpaare (Bp) stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden. Nach Bildung des „geschlossenen“ binären Enzym/DNA-Komplexes wird ein Bereich von mindestens 11 Bp der DNA (-9 bis +2) aufgeschmolzen, wodurch ein offener binärer Komplex entsteht. Nach der Initiation der RNA-Synthese durch Verknüpfung der ersten beiden Nukleotide wird ein



Oligonukleotid mit bis zu 9 Basen gebildet, bevor der inzwischen ternäre Komplex die Bindung zu seinem  $\sigma$ -Faktor verliert und in die Elongationsphase übergeht.

Während Elongationsphase werden weitere Nukleotide kovalent über Phosphodiesterbindungen an das 3'-Ende der RNA gebunden. Dies geschieht mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 30 Basen pro Sekunde. Während der Synthese der RNA besteht eine Hybridhelix aus RNA und DNA mit einer Länge von 9 Bp, welche sich durch das ständige Aufschmelzen und die Neusynthese mit der Transkriptionsblase fortbewegt.

Die Termination der Transkription kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen gibt es sogenannte intrinsische Terminatoren in der RNA-Sequenz, bei denen es sich um palindromische, meist GC-reiche Sequenzen, welche eine 7 bis 20 Basenpaare lange Haarnadelstruktur bilden, gefolgt von 7 bis 9 Uridinbasen handelt. Diese Sekundärstruktur innerhalb der RNA zwingt die Polymerase ihre Geschwindigkeit zu verlangsamen oder gar gänzlich zu pausieren, wodurch es aufgrund der schwachen Wechselwirkungen der folgenden Uridinbasen zu den Desoxyadenosinbasen der DNA zum Ablösen der fertigen RNA von dem Transkriptionskomplex kommt. Des Weiteren gibt es die sogenannte Rho-Faktor-abhängige Termination. Dabei bindet der Rho-Faktor – ein Hexamer aus sechs identischen Untereinheiten – an eine 80 bis 100 Basenpaare umfassende Bindungsstelle innerhalb der RNA, bewegt sich in 5'  $\rightarrow$  3' Richtung, bis er auf die pausierende RNA-Polymerase trifft und bewirkt unter Hydrolyse von ATP das Entwinden der RNA-DNA Hybridhelix und somit die Auflösung des Transkriptionskomplexes.

In jüngster Zeit wurden die Röntgenstrukturen von verschiedenen pro- und eukaryontischen RNA-Polymerasen mit und ohne Substratbindung gelöst. Dies ermöglicht natürlich ganz neue Einblicke in die Mechanismen der Transkription auf molekularer Ebene.

### 1.3 Translation (Proteinbiosynthese)

Bei der Übersetzung der genetischen Information in Polypeptidketten dient die mRNA als Matrize für die tRNAs, welche jeweils mit der passenden Aminosäure beladen sind. Da jedoch für die Kodierung aller 20 verschiedenen Aminosäuren mehrere Nukleotide notwendig sind, werden die einzelnen Informationseinheiten in Nukleotid-Triplets (Codons) zusammengefaßt. Zu jeder der 20 Standardaminosäuren gibt es mindestens eine tRNA und eine dazugehörige Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche in einer ATP-abhängigen Reaktion für die Beladung der tRNA zuständig ist. Aufgrund der 64 möglichen Kombinationen pro Codon, von denen 61 für Aminosäuren kodieren, ist der genetische Code degeneriert, d.h. für die meisten

Aminosäuren existieren mehrere verschiedene Codons. Die drei verbleibenden Nicht-Aminosäurecodons dienen dem Translationsapparat als sogenannte Stopcodons.

Die Translation kann wie die Transkription in die drei Stadien Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden.

### 1.3.1 Das Ribosom<sup>1,4</sup>

Um die 20 verschiedenen Aminosäuren in der auf der mRNA kodierten Reihenfolge korrekt miteinander zu verknüpfen, sind mehr als 100 unterschiedliche Makromoleküle notwendig. Die eigentliche Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen statt. Dabei handelt es sich um aus RNA und Proteinen zusammengesetzte Multienzymkomplexe. *E. coli* Ribosomen haben ein Molekulargewicht von 2520 kDa bei einem maximalen Durchmesser von ungefähr 250 Å, was einem Sedimentationskoeffizient von 70 Svedberg (S) entspricht. Die einzelnen Ribosomen setzen sich dabei aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten – der größeren 50S- und der kleineren 30S-Untereinheit – zusammen.

Die kleine Untereinheit besteht aus der 16S-rRNA<sup>5,6</sup> und 21 verschiedenen Proteinen<sup>7</sup>, während die große Untereinheit sich aus der 23S-rRNA<sup>8</sup>, der 5S-rRNA<sup>9,10,11</sup> und 34 Proteinen<sup>7</sup>, von denen eines (L7/L12) in vier Kopien vorliegt<sup>12,13</sup>, zusammensetzt (Tab. 1.1). Der Anteil der drei rRNAs an der Masse des Ribosoms beträgt 66%, wobei die rRNAs ~ 80% der Gesamt-RNA und die ribosomalen Proteine ~ 10% aller Proteine in *Escherichia coli* ausmachen. Ein Überblick über die Zusammensetzung von *E. coli* Ribosomen ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tab. 1.1 Zusammensetzung von *E. coli* Ribosomen<sup>4</sup>.**

	<i>Ribosom</i>	<i>Kleine Untereinheit</i>	<i>Große Untereinheit</i>
Sedimentationskoeffizient	70S	30S	50S
Masse (kDa)	2520	930	1590
<b>RNA</b>		16S, 1542 Nukleotide	23S, 2904 Nukleotide 5S, 120 Nukleotide
Masse (kDa)	1664	560	1104
Anteil der Masse	66%	60%	70%
<b>Proteine</b>		21 Proteine	34 Proteine
Masse (kDa)	857	370	487
Anteil der Masse	34%	40%	30%

Eukaryontische Ribosomen (80S) unterscheiden sich von prokaryontischen sowohl in Zusammensetzung als auch in der Größe der einzelnen Komponenten: Die kleine 40S-Untereinheit besteht aus der 18S-rRNA und ca. 33 Proteinen, während die große 60S-Untereinheit sich aus der 5S-, 5,8S- und der 28S-rRNA und ca. 49 Proteinen zusammensetzt. Daraus ergibt sich eine Gesamtmasse von 4200 kDa. Trotz der großen Unterschiede zu prokaryontischen Ribosomen, welche sich auch in den rRNA- und Proteinsequenzen niederschlagen, sind jedoch Form und Funktion sehr stark konserviert.

So besitzen alle Ribosomen mehrere Bindungsstellen für tRNAs. Während in dem klassischen Modell von Watson noch von zwei Bindungsstellen, der A- und der P-Stelle, ausgegangen wird, wurde von Nierhaus eine dritte t-RNA-Bindungsstelle, die E-Stelle, vorgeschlagen<sup>14</sup>. Hiernach wird die Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle und die Peptidyl-tRNA in der P-Stelle gebunden, während in der E-Stelle (für Exit) deacylierte tRNAs bis zur Ablösung vom Ribosom gebunden bleiben. Dabei liegt zwischen der A-Stelle und der E-Stelle eine allosterische Kopplung im Sinne der negativen Kooperativität vor, d.h. wenn die A-Stelle besetzt ist, wird die Affinität für tRNAs in der E-Stelle geringer, und umgekehrt wird die Affinität für tRNAs in der A-Stelle geringer, wenn die E-Stelle besetzt ist.

### 1.3.2 Aminoacylierung von tRNAs<sup>4</sup>

tRNAs sind kleine RNA-Moleküle, deren Länge meist zwischen 70 und 90 Nukleotiden liegt. In der zweidimensionalen Struktur erinnern tRNAs an ein Kleeblatt, weshalb diese auch als Kleeblattstruktur bezeichnet wird. In ihr gibt es vier Bereiche mit komplementären Basenpaarungen, von denen drei sogenannte Stiel-Schleifen (stem loops) bilden. Dies sind der Anticodon-Arm, der D-Arm und der T $\psi$ C-Arm, wobei die letzteren beiden nach den darin enthaltenen ungewöhnlichen Ribonukleotiden Dihydrouridin (D), Ribothymidin (T) und Pseudouridin ( $\psi$ ) benannt sind. Die Aminosäure ist in allen tRNA-Molekülen an das A-Nukleotid der Sequenz CCA am 3'-Ende der tRNA gebunden. In der Röntgenstruktur betrachtet, besitzt eine typische tRNA dagegen eher eine L-Form, an deren einem Ende sich das Anticodon befindet, und deren anderes Ende der Bindung der Aminosäure dient.

Für die Beladung einer tRNA mit der richtigen Aminosäure ist es notwendig, daß beide Moleküle korrekt erkannt werden. Dabei werden von den verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unterschiedliche strukturelle Merkmale, welche sich von tRNA zu tRNA unterscheiden können, erkannt. Dies kann das Anticodon selbst, Strukturen auf der inneren Oberfläche oder einzelne Basenpaare im Aminosäurebindenden-Arm, wie z.B. das G3-U70 Basenpaar in der

*E. coli* tRNA<sup>Ala</sup>, sein<sup>15</sup>. Die eigentliche Reaktion erfolgt in zwei Etappen. Zuerst wird die passende Aminosäure mit Hilfe von ATP zu dem energiereichen Zwischenprodukt Aminoacyl-AMP umgesetzt, bevor sie über die Carboxylgruppe mit der 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe der Ribose am 3'-Ende der tRNA verknüpft wird. Um dabei die Verwendung strukturell ähnlicher Aminosäuren zu verhindern, besitzen einige Aminoacyl-tRNA-Synthetasen eine sogenannte Proofreading-Funktion, welche die Hydrolyse des fehlerhaft hergestellten Aminoacyl-AMPs katalysiert.

### 1.3.3 Initiation<sup>4</sup>

Für die Initiation der Proteinbiosynthese werden sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten zusätzliche Proteine, die Initiationsfaktoren (IF), benötigt. Die Initiationsfaktoren 1 und 3 binden nacheinander an die 30S-Untereinheit eines inaktiven Ribosoms und bewirken die Dissoziation der beiden Untereinheiten. Anschließend binden die mRNA und ein ternärer Komplex aus IF-2, GTP und einer speziellen Initiator-tRNA, welche mit N-Formylmethionin beladen ist, in beliebiger Reihenfolge an die freie 30S-Untereinheit. Die Bindung der mRNA erfolgt dabei durch Basenpaarungen der Shine-Dalgarno-Sequenz mit einer komplementären Sequenz am 3'-Ende der 16S-rRNA. Bei der Shine-Dalgarno-Sequenz handelt es sich um eine purinreiche Region von 3-10 Nukleotiden, welche sich ungefähr 10 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons (meist AUG) befindet. Durch diese Positionierung liegt das Startcodon auf Höhe der P-Stelle, an der auch die Initiator-tRNA bindet. Unter Ablösung von IF-3 verbindet sich der 30S-Initiationskomplex mit der 50S-Untereinheit, so daß der 70S-Initiationskomplex entsteht. Dies bewirkt die Hydrolyse des durch IF-2 gebundenen GTPs, was wiederum zu einer Konformationsänderung des ganzen Ribosoms und zur Ablösung von IF-1 und IF-2 führt.

Die Initiation in Eukaryonten ähnelt größten Teils der in Prokaryonten, jedoch gibt es hier eine größere Anzahl an Initiationsfaktoren mit zum Teil mehreren Untereinheiten. Des Weiteren fehlt in der mRNA eine der Shine-Dalgarno-Sequenz entsprechende Bindungsstelle, und das Methionin der Initiator-tRNA ist nicht formyliert. Um ein geeignetes Startcodon zu finden, bindet der 40S-Initiationskomplex mit Hilfe von weiteren Initiationsfaktoren an der in eukaryontischen mRNAs vorhandenen 5'-Cap-Struktur und läuft entlang der mRNA bis zum ersten AUG-Startcodon, an dem die nächsten Initiationsschritte ähnlich wie in Prokaryonten stattfinden.

### 1.3.4 Elongation<sup>4,16</sup>

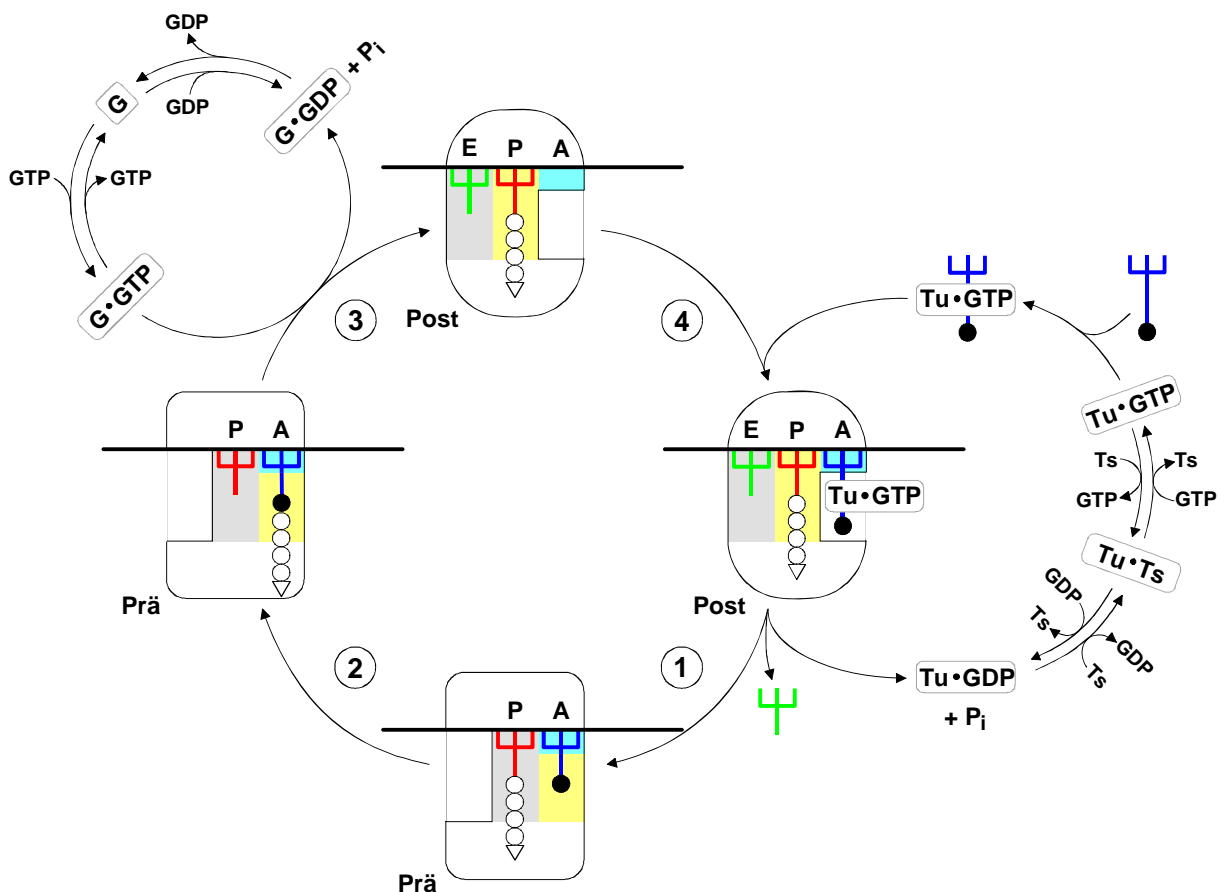
Die Elongation in der Proteinbiosynthese kann ebenfalls in drei Einzelschritte, die Positionierung der Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle, die Transpeptidierung und die Translokation, unterteilt werden. Im ersten Schritt bindet die tRNA an einen binären Komplex aus Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und GTP. Der daraus resultierende ternäre Komplex bindet an der A-Stelle des Ribosoms, und bei korrekter Wechselwirkung zwischen dem Anticodon der tRNA und dem Codon der mRNA erfolgt die Hydrolyse des von EF-Tu gebundenen GTPs zu GDP. Dies führt zu einer Konformationsänderung des EF-Tu von der GTP- in die GDP-Form und zur anschließenden Ablösung des EF-Tu-GDP-Komplexes vom Ribosom. Gleichzeitig erfolgt nach dem Modell von Nierhaus<sup>16</sup> eine deutliche Konformationsänderung innerhalb des Ribosoms, wobei das Ribosom von dem Post-Zustand in den Prä-Zustand übergeht. Damit EF-Tu für weitere Reaktionen wieder in der aktiven Konformation vorliegt, muß das von EF-Tu gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht werden. Für diese Reaktion wird ein weiterer Elongationsfaktor, EF-Ts, benötigt. EF-Ts bindet bei gleichzeitiger Verdrängung des GDP an EF-Tu und wird anschließend selbst wieder durch GTP verdrängt, so daß EF-Tu wieder in der GTP-Form vorliegt.

Im zweiten Schritt des Elongationszyklus wird die Polypeptidkette der an der P-Stelle gebundenen Peptidyl-tRNA auf die Aminosäure der an der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA übertragen. Mechanistisch gesehen handelt es sich dabei um einen nukleophilen Angriff der endständigen Aminogruppe an der A-Stelle auf das aktivierte Carboxy-Ende der Polypeptidkette an der P-Stelle. Katalysiert wird diese entscheidende Reaktion in der Proteinbiosynthese von der Peptidyltransferase. Neuere Versuche deuten darauf hin, daß es sich bei der Peptidyltransferase um einen spezifischen Abschnitt der 23S-rRNA handelt<sup>17,18</sup>. Das Ribosom wäre somit ein Ribozym, dessen Proteine nur zur Stabilisierung der Struktur dienen.

Im letzten Schritt schließlich wird die neue Peptidyl-tRNA von der A-Stelle in die P-Stelle verschoben, während die nun unbeladene tRNA von der P-Stelle in die E-Stelle verschoben wird. Dabei bewegt sich das Ribosom um genau drei Nukleotide an der mRNA entlang. Für diesen Prozeß wird ein weiterer Elongationsfaktor, EF-G, benötigt. EF-G bindet im Komplex mit GTP an das Ribosom und verursacht unter Hydrolyse des GTP zu GDP eine Folge von Konformationsänderungen in der 50S-Untereinheit, wodurch das Ribosom wieder in den Post-Zustand überführt wird. Durch diese Konformationsänderung wird die Affinität des Ribosoms zu EF-G und zu tRNAs in der E-Stelle deutlich geringer, was zum Abdissoziieren sowohl von EF-G als auch von der leeren tRNA führt. Damit steht das Ribosom wieder für einen neuen Elongationszyklus zur Verfügung. Aufgrund der geringen Affinität zu GTP oder

GDP benötigt EF-G im Gegensatz zu EF-Tu keinen weiteren Elongationsfaktor zur Regeneration. Eine schematische Darstellung des ribosomalen Elongationszyklus nach Nierhaus ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Synthesegeschwindigkeit in der Zelle liegt bei bis zu 40 Elongationszyklen pro Sekunde und dies bei einer recht geringen Fehlerrate von nur einer fehlerhaft eingebauten Aminosäure in 10000 Elongationszyklen.

Der eukaryontische Elongationszyklus ähnelt dem prokaryontischen sehr stark. Die Funktionen von EF-Tu und EF-Ts werden hier zwei verschiedenen Untereinheiten des Elongationsfaktors eEF-1 zugeordnet, während die Funktion von EF-G von dem Elongationsfaktor eEF-2 übernommen wird. Allerdings sind die einander entsprechenden eukaryontischen und prokaryontischen Elongationsfaktoren nicht zueinander kompatibel bzw. vertauschbar.



**Abb. 1.2 Der ribosomale Elongationszyklus nach Nierhaus<sup>16</sup>** Neben dem Elongationszyklus sind auch die beiden GTPase-Zyklen der Elongationsfaktoren EF-Tu (rechts, als Tu abgekürzt) und EF-G (links, als G abgekürzt) dargestellt. Die unterschiedlichen Konformationen des Ribosoms werden hier durch die eckige (Prä-Zustand) und durch die runde (Post-Zustand) Darstellung des Ribosoms gekennzeichnet. (4/1) Positionierung der Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle. (2) Transpeptidierung. (3) Translokation.

### 1.3.5 Termination<sup>4,19</sup>

Die Termination der Translation erfolgt an dem sogenannten Stopcodon, von dem es drei verschiedene, UAA, UAG und UGA, gibt. Weiterhin sind für die Termination die drei Freisetzungs- oder Terminationsfaktoren (release factors) RF-1, RF-2 und RF-3 erforderlich. Dabei ist RF-1 für die Erkennung der Signale UAA und UAG zuständig, während RF-2 an der Erkennung von UAA und UGA beteiligt ist. Wenn das Ribosom ein Stopcodon erreicht, bindet RF-1 bzw. RF-2 mit Hilfe eines Komplexes von RF-3 und GTP an der A-Stelle. Dies stimuliert die Peptidyltransferase, die Polypeptidkette auf Wasser statt wie gewöhnlich auf eine Aminoacyl-tRNA zu übertragen. Anschließend dissoziieren die beiden Terminationsfaktoren unter GTP-Hydrolyse wieder vom Ribosom. Für die Freisetzung der unbeladenen tRNA und der mRNA wird der sogenannte „Ribosome Recycling Factor“ (RRF) benötigt, der diese Reaktion zusammen mit EF-G ebenfalls unter GTP-Hydrolyse katalysiert. Das verbleibende inaktive 70S-Ribosom dissoziiert mit Hilfe von IF-3 in seine Untereinheiten und steht so für einen weiteren Translationsstart zur Verfügung.

Die Termination der Proteinbiosynthese in Eukaryonten verläuft wiederum sehr ähnlich zu der in Prokaryonten. Statt drei verschiedene Terminationsfaktoren gibt es jedoch nur einen, eRF, der im Komplex mit GTP an das Ribosom bindet.

## 1.4 Elongationsfaktoren

### 1.4.1 EF-Tu

EF-Tu wurde 1966 im Labor von Fritz Lipmann zuerst beschrieben<sup>20</sup>. Bei EF-Tu handelt es sich um ein monomeres Protein, welches in *E. coli* eine Länge von 393 Aminosäuren bzw. ein Molekulargewicht von 43,2 kDa besitzt<sup>21</sup>. Es ist mit ca. 70000 Kopien pro Bakterienzelle das häufigste Protein, dessen Masse ungefähr 5% der totalen Masse aller zellulären Proteine entspricht<sup>22</sup>. Dies sind nur geringfügig weniger EF-Tu-Moleküle als tRNA-Moleküle pro Zelle. Somit dürfte fast jede tRNA in Form eines ternären Komplexes mit EF-Tu vorliegen. Weiterhin beträgt das Verhältnis von EF-Tu : EF-Ts : EF-G : ribosomales Protein S1 unabhängig von der Wachstumsrate 4-5:1:1:1<sup>23</sup>. Die beteiligten Gene werden koordiniert exprimiert und unterliegen z.B. bei Nährstoffmangel der stringenten Kontrolle durch Guanosintetraphosphat (ppGpp)<sup>23,24</sup>.

#### 1.4.1.1 Expression von EF-Tu

Im Genom von *Escherichia coli* gibt es zwei verschiedene Gene, *tufA* (bei 73 min im *str*-Operon) und *tufB* (bei 88 min im tRNA-*tufB*-Operon), die für EF-Tu kodieren<sup>25</sup>. Die Nukleotidsequenzen der beiden Gene unterscheiden sich in 13 Positionen, die exprimierten Proteine jedoch nur in einer Aminosäure. So besitzt das Gen-Produkt von *tufA* am Carboxy-Terminus (Pos. 393) ein Glycin, während in *tufB* die selbige Position für ein Serin kodiert<sup>21</sup>. Funktionelle Unterschiede zwischen den beiden EF-Tu-Varianten sind nicht bekannt. Dies wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß jedes der beiden Gene inaktiviert werden kann, ohne die Lebensfähigkeit der Bakterienzelle zu verlieren. Jedoch resultiert die Deletion von *tufA* unter besten Wachstumsbedingungen in einer um 35% verlängerten Generationszeit, während die Deletion von *tufB* zu keinem Unterschied im Wachstumsverhalten führte<sup>32</sup>.

Das *tufA*-Gen wird zusammen mit den ribosomalen Proteinen S7 (*rpsG*) und S12 (*rpsL*), sowie dem Elongationsfaktor EF-G (*fusA*) in eine polycistronische mRNA transkribiert<sup>26</sup>. Trotz des ungewöhnlichen Startcodons GUG ist die Expression von *tufA* um das 3,5-fache höher als die der anderen Gene im *str*-Operon<sup>27</sup>. Die Translationskontrolle erfolgt dabei über einen „Feedback“-Inhibierungsmechanismus. Die polycistronische mRNA bildet in dem für S7 kodierenden Bereich eine 16S-rRNA-ähnliche Struktur, die von freiem überzähligem S7 gebunden wird, wodurch die eigene Translation und gleichzeitig die von S12 und EF-G reprimiert wird. Umgekehrt ist aber auch die Translation von S7 und der gesamte Feedbackmechanismus des Operons an die Translation von S12 gekoppelt<sup>28</sup>.

Das *tufB*-Gen wird zusammen mit vier verschiedenen tRNAs unter Kontrolle von zwei UAS-Elementen (Upstream Activator Sequence) vor dem Promoter des Operons transkribiert<sup>29</sup>. Der Transkriptionsfaktor FIS (Factor for Inversion Stimulation) bindet an diese UAS-Elemente und verstärkt die Transkription vermutlich durch Krümmung der DNA<sup>30</sup>. Auch bei der Expression von *tufB* wird über einen Feedback-Inhibierungsmechanismus sowohl auf Transkriptionsebene durch Bindung von EF-Tu an FIS als auch auf Translationsebene durch Bindung von EF-Tu an die eigene mRNA diskutiert<sup>31</sup>.

#### 1.4.1.2 Funktionelle Eigenschaften von EF-Tu

Wie schon in Kapitel 1.3.4 beschrieben, besteht die Funktion von EF-Tu darin, die Bindung der zum Codon auf der mRNA passenden Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms zu katalysieren. Durch den GTPase-Zyklus bedingt, kommt EF-Tu zwei verschiedenen Konformationen, der GTP- und der GDP-Form, vor, wobei nur die GTP-Form Aminoacyl-tRNAs binden und somit einen ternären Komplex bilden kann. Insgesamt gibt es in *E. coli* aufgrund



des genetischen Codes 41 verschiedene ternäre Komplexe, die von der A-Stelle des Ribosoms korrekt erkannt werden müssen<sup>42</sup>. Lediglich für die Aminosäure Selenocystein und die dazugehörige tRNA<sup>UCA</sup> gibt es einen eigenen, speziellen Faktor (SELB, 69 kDa), der wie EF-Tu ebenfalls einen ternären Komplex bildet<sup>43</sup>.

Wenn es um die genaue Funktion von EF-Tu geht, stellt sich die Frage, ob EF-Tu die bei der GTP-Spaltung freiwerdende Energie nutzt, um einen Proofreading-Mechanismus anzutreiben. Neuere Untersuchungen weisen jedoch eher auf einen Induced-Fit-Mechanismus ohne Proofreading hin. Dabei bindet der ternäre Komplex an die A-Stelle des Ribosoms, und nur bei korrekter Codon-Anticodon-Wechselwirkung kommt es zu Konformationsänderungen, welche die GTP-Hydrolyse und das Ablösen von EF-Tu beschleunigen. Eine Art Proofreading erfolgt anschließend, indem fehlerhaft gebundene Aminoacyl-tRNAs wieder von der A-Stelle des Ribosoms dissoziieren, bevor es zu einer Übertragung der Peptidkette kommt<sup>44,45</sup>.

Ein weiteres kontrovers diskutiertes Thema ist die Frage, wieviele GTP-Moleküle pro Elongationszyklus von EF-Tu hydrolysiert werden. Während die gängige Lehrbuchmeinung davon ausgeht, daß EF-Tu nur ein GTP pro Elongationszyklus hydrolysiert (s. Kapitel 1.3.4), zeigten Untersuchungen von Ehrenberg erste Hinweise auf die Hydrolyse von zwei GTP-Molekülen pro Elongationszyklus<sup>46</sup>. Ehrenberg erklärte dies mit der Bildung eines pentameren Komplexes, bei dem zwei EF-Tu-GTP Komplexe an einer Aminoacyl-tRNA binden<sup>47,48</sup>. Dem widersprechen jedoch Untersuchungsergebnisse aus dem Labor von Wintermeyer<sup>49</sup> bzw. die gelöste Struktur des ternären Komplexes<sup>50,51</sup>. Dagegen stützen Studien an einer besonderen EF-Tu Mutante (D138N) mit veränderter Nukleotidspezifität die Beobachtung, daß zwei GTP-Moleküle pro Elongationszyklus hydrolysiert werden. Statt des normalen GTPs verwendet diese Mutante Xanthinriphosphat (XTP), ohne daß sie in ihrer Funktion beeinträchtigt wird<sup>52</sup>. Im sogenannten Poly(Phe)-System, bei dem das Ribosom mit einer Poly(U)-mRNA programmiert wird, werden unter verschiedensten Versuchsbedingungen grundsätzlich zwei XTP pro Elongationszyklus hydrolysiert<sup>53</sup>. Allerdings ist weiterhin nicht ganz geklärt, ob es sich hierbei nicht um ein Artefakt des Poly(Phe)-Systems handelt<sup>49</sup>.

Neben der Funktion in der Proteinbiosynthese konnte noch die Beteiligung von EF-Tu an der RNA-Replikase des Phagen Q $\beta$  nachgewiesen werden. Der Phage mißbraucht hierbei mehrere zelleigene Proteine für eigene Zwecke. So besteht der RNA-Replikase Komplex aus je einer Kopie der Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts, des ribosomalen Proteins S1 und der vom Phagen kodierten Replikase<sup>54</sup>.

Auch der zu EF-Tu analogen eukaryontischen Elongationsfaktor EF-1 $\alpha$  besitzt vermutlich weitere Funktionen. So konnte die Interaktion von EF-1 $\alpha$  mit dem Cytoskelett, genauer die

Bindung an Actinfilamente<sup>55</sup> und Mikrotubuli<sup>56,57</sup>, nachgewiesen werden. Inzwischen wurden noch einige weitere Bindungspartner von EF-1 $\alpha$  wie z.B. das Zinkfinger-Protein ZPR1<sup>58</sup> und die Phospholipase C- $\gamma$ 1<sup>59</sup> identifiziert.

### 1.4.1.3 Antibiotika

In der Proteinbiosynthese gibt es mehrere spezifische Antibiotika, welche die Funktion von EF-Tu blockieren. Zu den am besten untersuchten gehören Kirromycin<sup>33</sup>, Pulvomycin<sup>34</sup>, GE2270A<sup>35</sup> und Enacyloxin IIA<sup>36</sup>. Die Wirkungsweise dieser Antibiotikafamilien, zu denen jeweils mehrere chemisch verwandte Verbindungen zählen, und deren Bindungsstellen am EF-Tu sind unterschiedlich. Kirromycin z.B. verhindert die Dissoziation des EF-Tu-GDP Komplexes vom Ribosom und blockiert somit den Fortlauf der Proteinbiosynthese. Der Komplex aus EF-Tu-GDP und Aurodox, einem Antibiotikum der Kirromycin-Familie, ähnelt in der Struktur sehr stark EF-Tu in der GTP-Form<sup>37</sup>. Trotz des hydrolysierten GTPs bleibt so die Affinität von EF-Tu zur ribosomalen A-Stelle bestehen. Es sind mehrere Mutationen in der Sequenz von EF-Tu (G316D, A375T, A375V, Q124K) bekannt, welche zu Kirromycinresistenz führen, indem sie die Bindung von Kirromycin an EF-Tu verhindern<sup>38</sup>. Alle liegen an der Kirromycinbindungsstelle in der Interdomäne I und III.

Sowohl Pulvomycin als auch GE2270A verhindern trotz unterschiedlicher Strukturen und Bindungsstellen beide die Bindung von Aminoacyl-tRNAs an EF-Tu-GTP<sup>34,35</sup>. Bei GE2270A geschieht dies durch kompetitive Bindung an die Aminoacyl-tRNA Bindungsstelle. Weiterhin blockiert GE2270A durch die Bindung an EF-Tu die Konformationsänderung von der GDP- zur GTP-Form<sup>39</sup>. Alle bisher entdeckten Mutationen (R230C, R333C, T334A), die zu Pulvomycinresistenz führen, liegen in dem Verbindungspunkt der drei EF-Tu Domänen<sup>40</sup>. Die beiden bekannten GE2270A-Resistenz Mutationen G257S und G275A liegen in der Domäne II von EF-Tu, verhindern aber interessanterweise nicht die Bindung von GE2270A an EF-Tu. Trotz des gebundenen Antibiotikums ist die EF-Tu Mutante jedoch in der Lage, einen stabilen ternären Komplex zu bilden<sup>41</sup>.

### 1.4.1.4 Strukturen von EF-Tu

Trotz anfänglicher Schwierigkeiten bei der Kristallisation gibt es inzwischen einige Röntgenstrukturen von EF-Tu in unterschiedlichen Konformationen zum Teil sogar aus mehreren verschiedenen Organismen. So gibt es Strukturen von EF-Tu im Komplex mit GDP, GTP, EF-Ts, verschiedenen Antibiotika, sowie als ternärer Komplex.

#### 1.4.1.4.1 EF-Tu·GDP

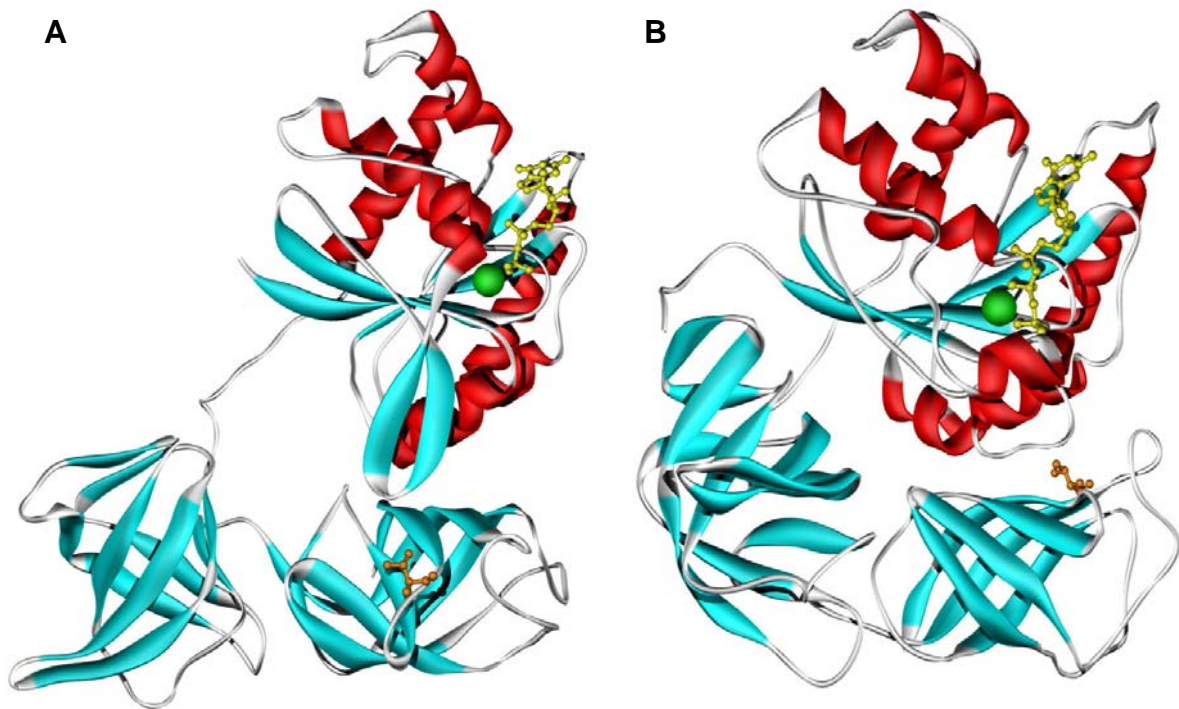
Anfänglich war es nur möglich, geeignete Kristalle zur Röntgenstrukturanalyse von einer mit Trypsin modifizierten Form des EF-Tu·GDP Komplexes, in der die Aminosäuren 45-58 fehlen, zu erhalten. So zeigt die erste gelöste Struktur von Journak 1985 nur die Domäne I bei einer Auflösung von 2,7 Å<sup>60</sup>. Die gesamte Struktur dieses Komplexes einschließlich der Domänen II und III wurde 1992 von Kjeldgaard und Nyborg bis zu einer Auflösung von 2,6 Å verfeinert<sup>61</sup>. Dank verbesserter Techniken in der Röntgenstrukturanalyse konnte inzwischen auch die vollständige Struktur des EF-Tu·GDP Komplexes sowohl aus *Thermus aquaticus*<sup>62</sup> als auch aus *Escherichia coli*<sup>62,63</sup> gelöst werden.

Wie bereits erwähnt, läßt sich die Gesamtstruktur von EF-Tu in drei globuläre Domänen unterteilen. Die Domäne I besteht aus den Aminosäuren 1-200, die mittlere Domäne II aus den Aminosäuren 205-298 und die Domäne III aus den C-terminalen Aminosäuren 299-393. Die N-terminale Domäne I, welche GTP bzw. GDP bindet und auch die Hydrolyse des GTPs katalysiert, ähnelt in der Struktur anderen bekannten GTP-bindenden Proteinen. Sie besteht aus einer sechssträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur sowie sechs  $\alpha$ -Helices, während die beiden anderen Domänen II und III jeweils nur eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen. Die einzelnen Domänen sind über flexible Peptidstücke miteinander verknüpft und werden durch polare und hydrophobe Wechselwirkungen untereinander in Position gehalten (Abb. 1.3).

Zwei weitere Röntgenstrukturen von EF-Tu·GDP stammen von Komplexen mit den Antibiotika Aurodox<sup>37</sup> und GE2270A<sup>39</sup>. Mir ihnen ist es möglich einen genaueren Einblick in die Wirkungsweise dieser Antibiotika zu gewinnen (siehe Kapitel 1.4.1.3).

#### 1.4.1.4.2 EF-Tu·GTP

Die ersten Strukturen von EF-Tu in der GTP-Form wurden 1993 fast gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen gelöst. Gewonnen wurden diese aus *Thermus thermophilus*<sup>64</sup> und aus *Thermus aquaticus*<sup>65</sup> mit einer Auflösung von 1,7 Å bzw. 2,5 Å. Die für die Lösung der Strukturen verwendeten Proteinkristalle enthielten zur Stabilisation des Komplexes jeweils statt GTP das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GDPNP. Die grundlegende Aufteilung des EF-Tu·GDPNP Komplexes in drei Domänen stimmt mit der EF-Tu·GDP Struktur überein. Im Vergleich zur GDP-Form besitzt EF-Tu in der GTP-Form jedoch eine deutlich kompaktere, globuläre Struktur. So sind die Domänen II und III als gemeinsame Einheit relativ zur Domäne I um etwa 91° gedreht. Verantwortlich für die verschiedenen Konformationen von EF-Tu ist die Helix B in Domäne I, welche auch als Schalt-Helix bezeichnet wird. Diese befindet sich in unmittelbarer Umgebung der GTP-Bindungsstelle zu



**Abb. 1.3 Tertiärstrukturen von EF-Tu<sup>62,65</sup>** Die dargestellten Strukturen zeigen EF-Tu aus *Thermus aquaticus* im Komplex mit GDP (A) und GDPNP (B). Bei der oberen Domäne handelt es sich um Domäne I, Domäne II und III sind jeweils links bzw. rechts unten zu sehen. GDP bzw. GDPNP sind gelb dargestellt, das Mg<sup>2+</sup>-Ion als grüne Kugel. Das phosphorylierbare Threonin 395 in Domäne III (entspricht Threonin 382 in *E. coli*) ist in Orange hervorgehoben.

Domäne III hin gewand. Die Abspaltung der Phosphatgruppe aufgrund der Hydrolyse des GTPs führt zu einer Verschiebung von wenigen Zehntel Nanometer an der GTP-Bindungsstelle. Diese winzige Bewegung verursacht einen Wechsel in der Orientierung der Schalt-Helix um 42°, was wiederum zu der grundlegenden Neuordnung der Domänen führt. Dabei scheint die Schalt-Helix die Funktion einer Sperrklinke zu erfüllen, die EF-Tu in der „Aus“-Konformation hält. Die Phosphorylierungsstelle von EF-Tu Threonin 382 ist ebenfalls von dieser Konformationsänderung betroffen. In der GDP-Form ist sie frei zugänglich an der Oberfläche von EF-Tu, während sie sich in der GTP-Form zwischen den Domänen I und III befindet und eine 2,5 Å lange Wasserstoffbrückenbindung zu Glutamat 117 in Domäne I ausbildet (siehe Abb. 1.3).

#### 1.4.1.4.3 EF-Tu·GTP·Aminoacyl-tRNA

Die Struktur des ternären Komplexes aus EF-Tu, GDPNP und einer Aminoacyl-tRNA wurde zuerst 1995 von Poul Nissen et al. mit einer Auflösung von 2,7 Å bestimmt<sup>50</sup>. Verwendet wurden dabei Kristalle aus *Thermus aquaticus* EF-Tu-GDPNP in einem Hybridkomplex mit

Hefe Phe-tRNA<sup>Phe</sup>. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde 1999 eine weitere Struktur von *Thermus aquaticus* EF-Tu-GDPNP im Komplex mit *E. coli* Cys-tRNA<sup>Cys</sup> mit einer Auflösung von 2,6 Å gelöst<sup>66</sup>. Durch den Vergleich dieser Strukturen war es möglich, die strukturellen Variationen in der Bindung verschiedener Aminoacyl-tRNAs an EF-Tu·GTP genauer zu untersuchen.

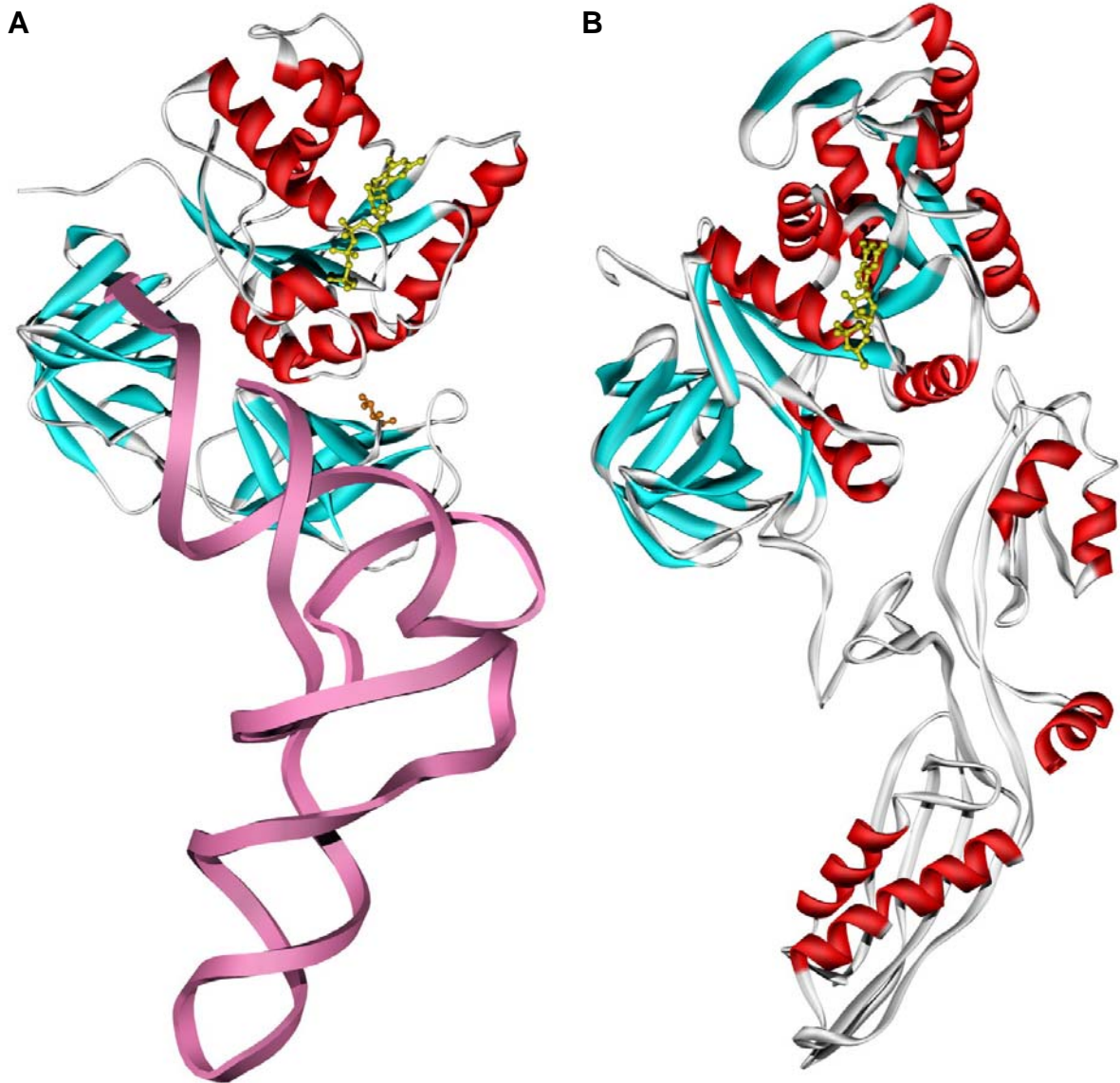
Der ternäre Komplex erinnert in seiner dreidimensionalen Struktur an einen Korkenzieher, dessen Griff EF-Tu zusammen mit der Akzeptorhelix und dessen Gewinde die Anticodonhelix bildet. An der Bindung der Aminoacyl-tRNA sind alle drei Domänen von EF-Tu beteiligt, wohingegen bei der tRNA nur das aminoacylierte CCA-Ende, die Akzeptorhelix und der T $\psi$ C-Arm mit EF-Tu interagieren. Das aminoacylierte CCA-Ende liegt in einer spezifischen Bindungstasche in der  $\beta$ -Faltblatt Domäne II. Die Seitenkette der an das Adenosin gekoppelten Aminosäure reicht dabei in einen Hohlraum zwischen Domäne I und II. Das phosphorylierte 5'-Ende der tRNA wird von einer positiv geladenen Vertiefung in der Intersektion aller drei Domänen von EF-Tu·GTP gebunden. Ein Bereich der Akzeptorhelix und das CCA-Ende (Nukleotide 1-3 und 73-75) werden von einem Teil der Effektorregion (Aminosäuren 51-64) und der N-terminalen Region der Schalt-Helix (Aminosäuren 83-100) erkannt. Schließlich bildet eine Seite des T $\psi$ C-Arms (Nukleotide 50-54 und 63-67) ein großes Interface mit der Oberfläche der Domäne III von EF-Tu. Der Anticodon- und der D-Arm weisen hingegen von Komplex weg, woraus sich die Gesamtlänge von 115 Å ergibt.

Erwartungsgemäß sind die beiden gelösten Strukturen bis auf einige Feinheiten einander sehr ähnlich. So ist die Gesamtarchitektur der beiden Komplexe zwar identisch, die Aminoacyl-tRNAs sind jedoch leicht gegeneinander verschoben, so daß die Anticodons in den Strukturen um etwa 10 Å versetzt sind.

Die eigentliche Überraschung war jedoch die strukturelle Ähnlichkeit des ternären Komplexes zu EF-G. Dabei scheinen die Domänen III, IV und V von EF-G die Aminoacyl-tRNA in ihrer räumlichen Ausdehnung nachzuahmen. Diese Art der Nachahmung auf molekularer Ebene wird auch als „Molekulares Mimikry“ bezeichnet. Die Strukturen von EF-G und dem ternären Komplex sind in Abb. 1.4 im Vergleich dargestellt.

#### 1.4.1.4.4 EF-Tu·EF-Ts

Die Struktur von EF-Tu·EF-Ts (Abb. 1.5) wurde 1996 von Kawashima et al. aus *E. coli* mit einer Auflösung von 2,5 Å bestimmt<sup>68</sup>. Ein Jahr später folgte die Struktur aus *T. thermophilus* von Wang et al<sup>69</sup>. Der *E. coli* Komplex besteht aus jeweils zwei Kopien der beiden Elongationsfaktoren. Die beiden EF-Ts Moleküle bilden dabei ein sehr festes Dimer, während die



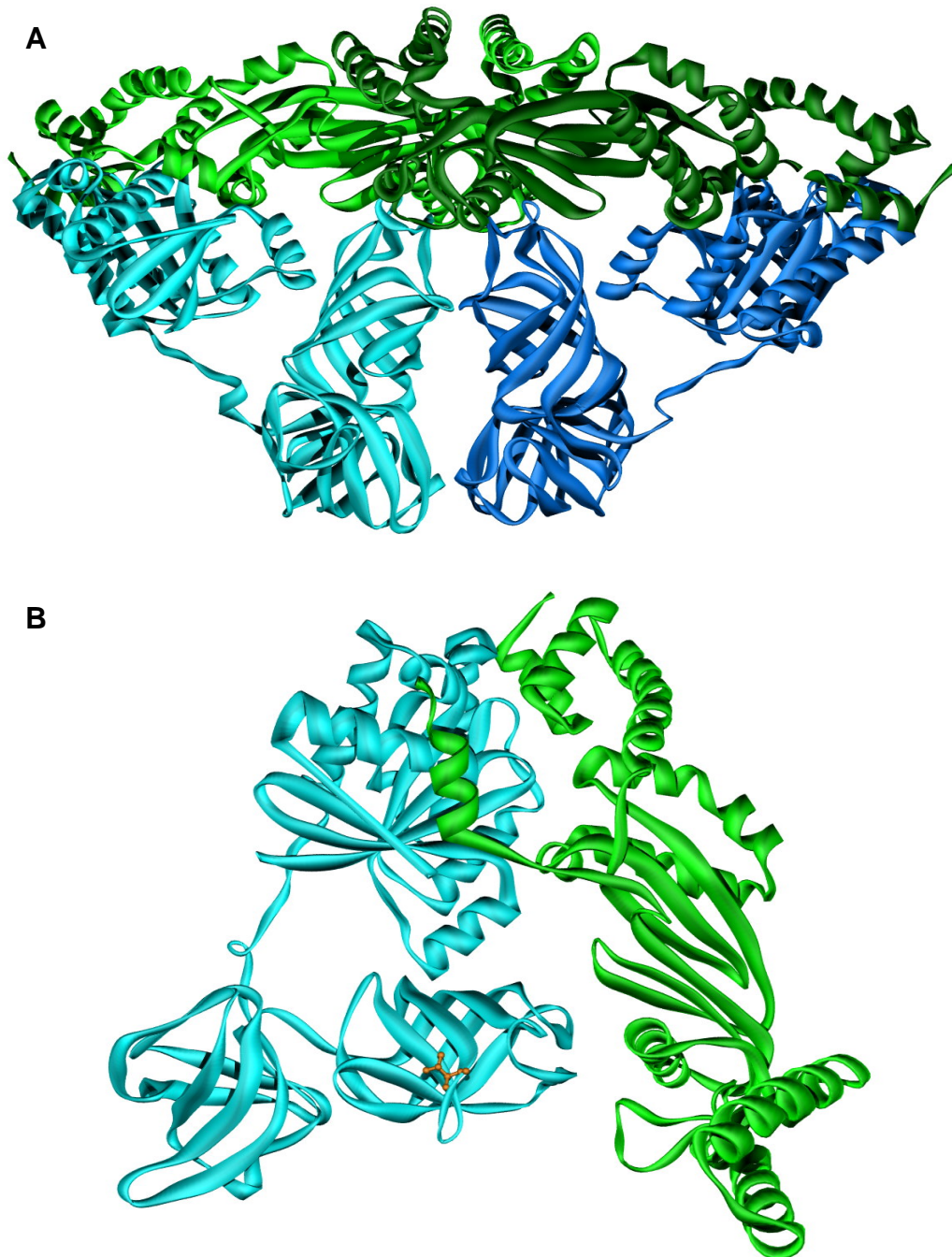
**Abb. 1.4 Vergleich zwischen ternärem Komplex und EF-G<sup>66,67</sup>** Die dargestellten Strukturen zeigen den ternären Komplex EF-Tu·GDPNP·Cys-tRNA<sup>Cys</sup> (A) aus *Thermus aquaticus* und EF-G·GDP (B) aus *Thermus thermophilus* in gleicher räumlicher Orientierung. Die tRNA ist als Bändermodell in violett dargestellt. GDPNP und GDP sind gelb, die Phosphorylierungsstelle Threonin 395 Orange hervorgehoben.

beiden EF-Tu Moleküle sich kaum berühren. Dieser Komplex kann somit als ein Heterotetramer der Form EF-Tu·EF-Ts<sub>2</sub>·EF-Tu beschrieben werden.

Die Interaktion zwischen EF-Tu und EF-Ts gibt einen guten Hinweis auf die Funktionsweise von EF-Ts als Guanin-Nukleotid-freisetzendes Protein (GNRP). So erfolgt die Bindung von EF-Ts an EF-Tu über die Domänen I und III. Dabei bindet eine hochkonservierte Peptidsequenz im C-terminalen Bereich von EF-Ts an der GDP-Bindungsstelle in Domäne I und verdrängt einen Teil der Wassermoleküle, die das Magnesiumion in EF-Tu koordinieren. Dies hat zwar kaum einen Einfluß auf die Bindung des GDP an EF-Tu, zerstört jedoch die Bindungsstelle des Mg<sup>2+</sup>-Ions. Der Verlust des Mg<sup>2+</sup>-Ions verringert die Stärke der Phosphat-



bindung deutlich, was zur Freisetzung des gebundenen GDPs führt. Dieses kann nun wieder durch GTP, welches in den Zellen in einer deutlich höheren Konzentration vorliegt, ersetzt werden.



**Abb. 1.5 Tertiärstruktur des EF-Tu-EF-Ts Komplexes aus *E. coli*** <sup>68</sup> Die Kristallstruktur von EF-Tu-EF-Ts (A) zeigt ein Dimer des Komplexes. Jedes EF-Tu (blau und dunkelblau) bindet an ein EF-Ts (grün und dunkelgrün). Letzteres ist wiederum für Dimerisierung verantwortlich. (B) zeigt einen einzelnen EF-Tu-EF-Ts Komplex im Ausschnitt. Deutlich sichtbar ist die Wechselwirkung von EF-Ts (grün) mit der Nukleotidbindungsregion von EF-Tu (blau). Das phosphorylierbare Threonin 382 (Orange) ist an der Bindung von EF-Ts nicht beteiligt und liegt frei zugänglich vor.

Besonders interessant an der Struktur von EF-Tu·EF-Ts ist die genaue Position der Phosphorylierungsstelle von EF-Tu (Threonin 382). Diese liegt wie in der GDP-Form solvens exponiert vor, d.h. sie ist frei zugänglich für die EF-Tu Kinase. Dies könnte eine Erklärung für die von Alexander et al.<sup>70</sup> beobachtete Verstärkung der Phosphorylierung von EF-Tu durch EF-Ts sein, die bei äquimolaren Konzentrationen von EF-Ts und EF-Tu am größten ist.

Die Struktur von EF-Tu·EF-Ts aus *T. thermophilus* unterscheidet sich bemerkenswert deutlich von der aus *E. coli*. Zwar liegt EF-Ts hier ebenfalls in Form eines Dimers vor, jedoch binden die zwei EF-Tu Moleküle im Gegensatz zu *E. coli* jeweils an beide EF-Ts Moleküle gleichzeitig<sup>69</sup>. Wie neuere Untersuchungen zeigen, ist diese Dimerbildung von EF-Ts in *T. thermophilus* für dessen Funktion als Nukleotidaustauschfaktor unabdingbar<sup>71</sup>, während in *E. coli* eine solche Dimerbildung nicht notwendig ist.

#### 1.4.1.5 Posttranslationale Modifikationen von EF-Tu

In *E. coli* sind mehrere verschiedene posttranslationale Modifikationen bekannt. Neben der Entfernung des N-terminalen formyl-Methionins und der anschließenden N-Acetylierung des nun endständigen Serins<sup>21,72</sup> ist auch die Mono- oder Dimethylierung von Lys<sup>56</sup> seit längerem bekannt<sup>73</sup>. So wird Lys<sup>56</sup> während des exponentiellen Wachstums der Zellen zuerst monomethyliert und mit dem Eintreten in die stationäre Phase allmählich zu N<sup>6</sup>-Dimethyllysin umgewandelt<sup>74</sup>. Die Methylierung von EF-Tu bewirkt eine Verringerung der tRNA-abhängigen GTP-Hydrolyserate, was zu einer Verlangsamung der Proteinbiosynthese führt und somit zu einer Erhöhung der Genauigkeit. Dieser Mechanismus wäre besonders hilfreich als Ergänzung in der stringenten Kontrolle.

Eine weitere bekannte Modifikation von EF-Tu ist die proteolytische Spaltung zwischen Gly<sup>59</sup> und Ile<sup>60</sup>. Verantwortlich dafür ist die „Killerprotease“ Lit (late inhibitor of T4), deren Expression durch die Infektion der Zelle mit dem Phagen T4 induziert wird. Die Spaltung von EF-Tu führt zu dessen Inaktivierung und bei ausreichender Konzentration von Lit zur Inhibierung der gesamten Proteinbiosynthese in der Zelle. Zusätzlich wird die Transkription weiterer Phagengene spezifisch inhibiert<sup>75,76</sup>.

#### 1.4.1.6 Phosphorylierung von EF-Tu

Neben diesen Modifikationen wurde 1991 von C. Lippmann die Phosphorylierung von EF-Tu beschrieben<sup>77</sup>. So konnte die Phosphorylierung von Threonin 382 in *E. coli* und von Threonin 394 in *T. thermophilus* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden<sup>78</sup>. Eine weitere Phosphorylierungsstelle am Threonin 297 bzw. Threonin 302 konnte dagegen nur *in vitro* nachgewiesen werden. Die Sequenz um das Threonin 382 ist in allen bekannten Sequenzen



von EF-Tu und EF-1 $\alpha$  hoch konserviert, wobei sich an der entsprechenden Position grundsätzlich ein Threonin befindet. Insgesamt sind in *E. coli* schätzungsweise 5-10% des zellulären EF-Tu Proteins phosphoryliert. Der prozentuale Anteil an phosphoryliertem EF-Tu bleibt unabhängig von der Anzahl an EF-Tu Molekülen in der Zelle konstant und wird zusätzlich durch eine hochaktive Phosphatase reguliert.

Strukturell gesehen liegt das phosphorylierbare Threonin 382 in Domäne III und ist je nach Konformation Domäne I zugewandt (GTP-Form; siehe Abb. 1.3 und 1.4) oder solvenzexponiert (GDP-Form; siehe Abb. 1.3 und 1.5). Dies bewirkt erwartungsgemäß, daß die Phosphorylierungsstelle von EF-Tu nur in der GDP-Form oder im Komplex mit EF-Ts für die EF-Tu-Kinase zugänglich ist. Daher ist anzunehmen, daß die Phosphorylierung von Threonin 382 die Konformationsänderung von der GDP- in die GTP-Form sterisch blockiert. Diese Hypothese wird durch verschiedene Experimente bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, daß EF-Tu mit phosphoryliertem Threonin 382 nicht in der Lage ist, einen ternären Komplex zu bilden oder das Antibiotikum Kirromycin zu binden. Umgekehrt inhibiert Kirromycin die Phosphorylierung von EF-Tu, während EF-Ts in äquimolarer Konzentration diese deutlich verstärkt<sup>70</sup>. Zielgerichtete Mutagenesestudien, in denen Threonin 382 durch Serin, Alanin, Aspartat und Tyrosin ersetzt wurde, erbrachten ebenfalls sehr interessante Ergebnisse. Zwar zeigten alle EF-Tu Mutanten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Bindung zu GDP, GTP sowie EF-Ts, jedoch waren diese bis auf die Serin-Mutante nicht in der Lage einen ternären Komplex auszubilden. Ebenfalls konnte nur bei der Serin-Mutante eine Phosphorylierung beobachtet werden, so daß es sich bei der EF-Tu-Kinase um eine Serin/Threonin-Kinase handeln muß. Neben der Serin-Mutante war auch die Alanin-Mutante kirromycinsensitiv, während die Aspartat- und die Tyrosin-Mutante keinen Komplex mit Kirromycin bilden konnten. Interessanterweise war bei allen Mutanten die GTP-Hydrolyserate deutlich erhöht, was den Einfluß von Threonin 382 auf die Funktion von EF-Tu verdeutlicht<sup>79</sup>.

#### 1.4.2 EF-Ts

Der Elongationsfaktor Ts (EF-Ts) besteht aus 282 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 30,2 kDa. EF-Ts ist wie EF-Tu absolut essentiell für das Überleben der Zelle<sup>80</sup>. Das für EF-Ts codierende Gen *tsf* liegt zusammen mit dem ribosomalen Protein S2 (*rpsB*) in einem gemeinsamen Operon, wobei beide Gene ungefähr gleich stark exprimiert werden<sup>81</sup>.

Die Funktion von EF-Ts besteht darin, den Nukleotidaustausch von EF-Tu zu katalysieren. Dabei bindet EF-Ts an den EF-Tu-GDP Komplex, wodurch die Affinität von EF-Tu zu dem

gebundenen GDP herabgesetzt wird. Das GDP kann nun durch freies GTP, welches in der Zelle in großem Überschuß vorliegt, ausgetauscht werden. Dieser Austausch erfolgt *in vivo* mit einer Geschwindigkeit von  $30 \text{ s}^{-1}$ , was in etwa der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese in der Zelle entspricht<sup>82</sup>. Die Struktur des EF-Tu·EF-Ts Komplexes und dessen funktionelle Deutung sind in Kapitel 1.4.1.4.4 behandelt.

### 1.4.3 EF-G

Der Elongationsfaktor G (EF-G) ist, wie bereits in Kapitel 1.3.4 beschrieben, für die Translokation des Ribosoms an der mRNA verantwortlich. Dabei wird durch die Hydrolyse des vom EF-G gebundenen GTPs eine Konformationsänderung innerhalb des Ribosoms induziert. Dies führt zu einer Bewegung der mRNA und der daran assoziierten tRNAs relativ zum Ribosom, so daß die Peptidyl-tRNA von der A- in die P-Stelle und die unbeladene tRNA von der P- in die E-Stelle des Ribosoms verschoben werden. Das Ribosom übernimmt hierbei ähnlich wie bei EF-Tu die Funktion des GTPase aktivierenden Proteins (GAP). Neuere Untersuchungen zeigten, daß die GTP-Hydrolyse durch das ribosomale Protein L7/L12 stimuliert wird<sup>83</sup>. Neben L7/L12 interagieren die Domänen IV und V von EF-G auch mit der  $\alpha$ -Sarcinschleife der 23S rRNA<sup>84</sup>. Die Bindungsstelle von EF-G am Ribosom überlappt hierbei teilweise mit denen von EF-Tu, IF2, RF1 sowie RF2.

Im Gegensatz zu EF-Tu besitzt EF-G jedoch keinen eigenen Nukleotidaustauschfaktor, wie es EF-Ts für EF-Tu darstellt. Diese Funktion wird vermutlich intramolekular von dem N-terminalen Bereich der GTP-bindenden Domäne I übernommen, welcher eine Struktur ähnlich der Interaktion zwischen EF-Tu und EF-Ts ausbildet.

Die Sequenz von EF-G Proteins aus *E. coli* besteht aus 703 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 77,5 kDa entspricht. Das für EF-G kodierende *fusA*-Gen liegt, wie bereits in Kapitel 1.4.1.1 beschrieben, innerhalb des *str*-Operons und wird zusammen mit EF-Tu und den ribosomalen Proteinen S7 und S12 exprimiert. Die Strukturen von EF-G ohne Nukleotid, sowie komplexiert mit GDP wurden 1994 parallel jeweils von Czworkowski et al.<sup>85</sup> und Aevansson et al.<sup>67</sup> aufgeklärt. Beide Strukturen sind einander sehr ähnlich. EF-G besteht aus fünf Domänen, von denen die Domänen I und II der Struktur von EF-Tu·GTP sehr ähnlich sind, während die Domänen III, IV und V in ihrer Form an eine tRNA erinnern (Abb. 1.4 B). Dies könnte ein Hinweis auf die reziproke Funktion der beiden Elongationsfaktoren Tu und G hindeuten, bei der EF-G umgekehrt zu EF-Tu den Konformationswechsel des Ribosoms vom Prä- in den Post-Zustand katalysiert.

#### 1.4.4 EF-P

Der Elongationsfaktor P ist ein weiterer Elongationsfaktor in der Proteinbiosynthese, dessen Funktionsweise jedoch noch nicht genau verstanden ist. Bekannt ist, daß EF-P die Peptidyltransferaseaktivität von vollständigen 70 S Ribosomen stimuliert und die Synthese von mit N-Formylmethionin initiierten Dipeptiden steigert<sup>86</sup>. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß EF-P für das Überleben der Zelle essentiell und für die Proteinbiosynthese unabdingbar ist<sup>87</sup>. Die Funktion von EF-P scheint bei allen Spezies konserviert zu sein und wird in eukaryontischen Zellen von eIF5A übernommen. EF-P aus *E. coli* besteht aus 188 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 20,5 kDa.

### 1.5 Proteinphosphorylierung in Prokaryonten

Für viele Jahre nach der Entdeckung der Proteinphosphorylierung galt diese auf Eukaryonten beschränkt. Erst Ende der siebziger Jahre konnte die Existenz von Proteinkinasen<sup>88</sup> und -phosphatasen<sup>89</sup> auch in Prokaryonten nachgewiesen werden. Vor allen Dingen in den letzten zehn Jahren erbrachte die Forschung auf diesem Gebiet unzählige Ergebnisse, was die Wichtigkeit der Proteinphosphorylierung in Prokaryonten unterstreicht.

Insgesamt besitzen in Bakterien mindestens drei verschiedene Phosphorylierungssysteme zur Modifizierung von Proteinen. Das erste System ist ATP/GTP-abhängig und ähnelt dem klassischen System in Eukaryonten, welches zur Phosphorylierung von Serin, Threonin- oder Tyrosinresten von Substratproteinen führt. Im Gegensatz zu früheren Vermutungen scheint es in den verschiedensten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien weit verbreitet zu sein<sup>90</sup>. *E. coli* besitzt mehrere Proteinkinaseaktivitäten, die zusammen ungefähr 130 verschiedene Proteine phosphorylieren<sup>91</sup>. Dabei werden die meisten Proteine an Serin-, sowie einige an Threonin phosphoryliert, und nur eines wird ausschließlich an einem Tyrosin modifiziert<sup>92</sup>. In normal wachsenden Zellen konnte nur ein kleiner Teil dieser Proteine identifiziert werden, u.a. die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH), das Hitzeschock-Protein DnaK, EF-Tu und das ribosomale Protein S1. Einige weitere Proteine, wie die Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3, die großen Untereinheiten der RNA-Polymerase oder EF-P, werden nach einer Infektion durch Phagen phosphoryliert, wobei die entsprechenden Kinasen auf dem Phagengenom kodiert sind<sup>93</sup>.

Das zweite, erst Mitte der achtziger Jahre entdeckte Phosphorylierungssystem ist das sogenannte Zweikomponentensystem<sup>94</sup>. In diesem System wird ein Protein, welches als Sensor-kinase oder auch als Histidinkinase bezeichnet wird, nach Stimulation z.B. durch veränderte

Umweltbedingungen an einem Histidinrest autophosphoryliert. Diese Reaktion ist ebenfalls ATP-abhängig. Anschließend wird die Phosphatgruppe auf eine Aspartatgruppe eines weiteren Proteins, dem Antwortregulator, übertragen. Dies bewirkt ein Umschalten in der Aktivität des Antwortregulators, was meist zu einer Veränderung im Stoffwechsel der Zelle führt. Allen Sensorkinasen und Antwortregulatoren ist eine konservierte C-terminale bzw. N-terminale Domäne gemein. Die Bezeichnung Zweikomponentensystem ist dabei nicht immer ganz korrekt. In einigen dieser Systeme sind beide Funktionen in einem Protein zusammengefaßt<sup>93</sup>.

Das dritte in Bakterien vorkommende Phosphorylierungssystem ist das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS). In diesem System wird eine von einem Phosphoenolpyruvat-Molekül stammende Phosphatgruppe über eine Kette reversibel phosphorylierbarer Proteine abschließend auf einen Zucker übertragen. Das PTS-System besteht in der Regel aus fünf Proteinen oder Proteindomänen: Enzym I und das HPr Protein phosphorylieren dabei spezifisch Proteine, während die Enzyme II A, II B und II C spezifisch für verschiedene Zucker sind. Die meisten dieser Proteine werden an einem Histidin phosphoryliert abgesehen von HPr, welches sowohl an einem Histidin als auch an einem Serin phosphoryliert wird<sup>93</sup>.

Genauer betrachtet scheinen die Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten geringer zu sein, als früher angenommen. So werden in Bakterien immer mehr Proteinkinasen gefunden, welche in ihrer Struktur und Aktivität eukaryontischen Enzymen ähneln. Außerdem konnten inzwischen auch diverse Zweikomponentensysteme in den verschiedensten eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden. Das PTS-System konnte hingegen bei Eukaryonten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, ob es in einigen niedrigeren eukaryontischen Organismen nicht doch seine Verwendung findet<sup>93</sup>.

## 1.6 G-Proteine

Unter den G-Proteinen versteht man die große Klasse der Guaninnukleotid-bindenden Proteine. Alle G-Proteine binden sowohl GDP als auch GTP und besitzen eine schwache intrinsische GTPase-Aktivität. Diese kann durch Interaktion mit einem für dieses G-Protein spezifischen GTPase-aktivierenden-Protein (GAP) stimuliert werden. Der durch die GTP-Hydrolyse verursachte Konformationswechsel beim Übergang von der GTP- in die GDP-Form bewirkt in der Regel eine Änderung in der Affinität des G-Proteins zu anderen Proteinen. Aufgrund der zwei unterschiedlichen Konformationen, die wie bei einem Schalter als „an“- oder „aus“-Konformation beschrieben werden können, wird dieser Mechanismus meist auch als Schaltermechanismus bezeichnet. Des weiteren besitzen die meisten G-Proteine ein dazugehöriges

Guanin-Nukleotid-freisetzendes Protein (GNRP), welches den Austausch des verbrauchten GDPs gegen frisches GTP katalysiert<sup>95</sup>.

Insgesamt gibt es drei verschiedene Superfamilien an G-Proteinen: Zum einen die Superfamilie der Initiations- und Elongationsfaktoren in der Proteinbiosynthese, wie z.B. IF-2, EF-Tu und EF-G. Dann die Superfamilie der heterotrimeren G-Proteine, die jeweils aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bestehen, sowie die Superfamilie der kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteine, die wiederum in die Familien Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran unterteilt werden kann<sup>96</sup>. Innerhalb der letzten Jahre wurde von vielen verschiedenen G-Proteinen aller Superfamilien die Röntgenstruktur gelöst. Dabei zeigte sich, daß, wie durch die relativ großen Sequenzhomologien angedeutet, die Tertiärstruktur der Nukleotid-bindenden Domänen bei allen G-Proteinen hoch konserviert ist<sup>97</sup>.

Allgemein spielen G-Proteine bei Eukaryonten eine sehr wichtige Rolle innerhalb der Signaltransduktion. So übertragen und verstärken viele Hormon-Rezeptoren von außen auf die Zelle einwirkende Signale mit Hilfe von heterotrimeren G-Proteinen in das Innere der Zelle. Dabei interagiert der durch ein äußeres Signal aktivierte Rezeptor mit einem passenden heterotrimeren G-Protein und katalysiert den GDP/GTP-Austausch in der Guaninnukleotid-bindenden  $G_\alpha$ -Untereinheit.  $G_\alpha$ -GTP dissoziiert vom  $G_\beta G_\gamma$ -Komplex ab und kann nun Effektoren wie die Adenylatcyclase oder Ionenkanäle regulieren. Diese dienen wiederum als GTPase-aktivierende-Proteine, wodurch es zur Hydrolyse des von  $G_\alpha$  gebundenen GTPs kommt.  $G_\alpha$ -GDP dissoziiert vom Effektor ab und bildet wieder den inaktiven  $G_\alpha$ -GDP- $G_\beta G_\gamma$ -Komplex. Der Zyklus kann nun wieder von neuem beginnen. Eine ähnlich wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Eukaryonten spielen auch die kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteine, wie z.B. Ras bei der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade.

## 1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die EF-Tu-Kinase aus *Escherichia coli* mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“ Systems zu identifizieren und gegebenenfalls zu charakterisieren. Dafür wird das für EF-Tu kodierende *tufA*-Gen zuerst in den pHybLex-Vektor (Invitrogen) kloniert, und das fertige Plasmid in die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. In einem Yeast Two Hybrid Ansatz soll das EF-Tu-Fusionsprotein dann gegen eine genomische Bibliothek aus *E. coli* (Clontech) auf Interaktionen getestet werden. Die daraus erhaltenen positiven Klone können anschließend mit Hilfe von PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte identifiziert werden. Wenn sich daraus sinnvolle Kandidaten für die EF-Tu-Kinase ergeben sollten, so werden diese kloniert und genauer charakterisiert bzw. auf die Phosphorylierung von EF-Tu hin getestet. Sollte dieser Ansatz, die EF-Tu-Kinase zu finden, erfolglos bleiben, dann besteht immer noch die Möglichkeit, einen anderen Ansatz zu deren Identifizierung auszuwählen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

<b>Gerät und Zubehör</b>	<b>Bezeichnung, Hersteller</b>
Autoklav	400 D, Sterico AG; Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Blot-Apparatur	2117-250 Novablot, LKB Bromma
Elektrophorese-Apparatur für Nukleinsäuren	Agagel Mini, Biometra
Elektrophorese-Apparatur für Proteine	Protean II, Minigel, BioRad
FPLC	FPLC System, Pharmacia
Geltrockner	Mididry, Biometra
Heizbad	U3, Julabo
Heizblock	Bioblock Scientific, Thermolyne
Heizrührer	RCT IKA-Combimag
Heizschränke	ST 5050 & B5042, Heraeus
Heizschüttler	G25, New Brunswick
Hybridisierungsöfen	Hybaid, Biometra
Kühl-Gefrier-Kombination	Sikafrost, Siemens
Netzgeräte	ECPS 3000/150, Pharmacia; Consort
PCR-Geräte	GeneAmp 2400, Perkin Elmer; Progene, Techne
pH-Meter	Cyberscan 500
Phosphoimager	Storm 840, Molecular Dynamics
Photometer	UV-1202, Shimadzu
Pipetten P2, 10, 20, 200, 1000, 5.000, 10.000	Gilson-Pipettman
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Rotoren	JA-10, JA-17, Beckman
Schüttler	Vortex Genie, Bender & Hobein AG; Celloshaker Variospeed
Szintillationszähler	LS 7500, LS 6000SC, Beckman
Transilluminator	Reprostar II, LAMAG
Ultraschallstab	Vibra Cell, Bioblock Scientific
Ultrazentrifuge	UZ L8 55M, Beckman; Airfuge, Beckman
Vakuumpumpen	Beta, Christ, MZ2C/1,7, Vakuubrand
Vakuumentrifuge	Speedvac Concentrator, Savant
Videosystem	GelDoc 2000, BioRad; CS1, Cybertech + Copy Processor
Video Printer	Mitsubishi P68 + P91
Waagen	AC 88 & PC 4400, Mettler
Zentrifugen	Biofuge A Heraeus Christ; Profuge A Stratagene; HF120 Capsule Tomy; J2-21 Beckman

## 2.2 Feinchemikalien, Lösungsmittel

Substanz	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Activated CH-Sepharose™ 4B	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Adenin	Roth, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
$\gamma$ - <sup>33</sup> P-Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Agar	Gibco, Paisley
Agarose, Seakem® LE	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Aluminiumoxid (Alcoa)	Serva, Heidelberg
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Caseinhydrolysat (Pepton 140)	Gibco BRL, Eggenstein
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chloroform/Isoamylalkohol 24:1	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithioerythritol (DTE)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerin (87 %, 99%, v/v)	Merck, Darmstadt
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	Roche, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)	Roche, Mannheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
HEPES	Merck, Darmstadt
IPTG, X-Gal	Roche, Mannheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
<sup>14</sup> C-Leucin	Amersham-Pharmacia, Freiburg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Minimal SD Base	Clontech, Palo Alto, USA
Minimal SD Agar Base	Clontech, Palo Alto, USA
Minimal SD, DO Supplement (vers.)	Clontech, Palo Alto, USA
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg



Nukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
Pefabloc® (AEBSF)	Roth, Karlsruhe
Phenol	Amresco, Solon, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, pH 5,2	Amresco, Solon, USA
1,4-Piperazin-bis-ethansulfonsäure (PIPES)	Calbiochem
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Roche & Promega, Mannheim
Szintillationsflüssigkeit	Beckman
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Pierce, Sankt Augustin
Xylencyanolblau	Serva, Heidelberg
YPD Medium	Clontech, Palo Alto, USA
YPD Agar Medium	Clontech, Palo Alto, USA
Zeocin	Invitrogen, Groningen, NL

## 2.3 Enzyme, Proteine

### Enzym, Protein

Alkalische Phosphatase (Shrimp)
DNase I
EF-Ts (aus <i>E. coli</i> MRE600)
EF-Tu (aus <i>E. coli</i> MRE600)
Klenow-Fragment
Lysozym
Pfu DNA Polymerase
Pfu Turbo DNA Polymerase
Restriktionsenzyme
Ribonuklease A
Rinderserum Albumin (BSA)
T4-DNA Ligase
Taq DNA Polymerase

### Hersteller

Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
Präparation von S. Lorenz
Präparation von C. Lippmann
Gibco BRL, Eggenstein
Serva, Heidelberg
Promega, Mannheim
Stratagene, Heidelberg
NEB, Schwalbach
Roche, Mannheim
Pierce, Sankt Augustin
Roche, Mannheim
Promega, Mannheim

## 2.4 Kits, Fertigprodukte, Marker

### Produkt

4x RotiLoad
BM Fast Stain
DNA Marker 1kb Leiter
DNA Marker 100bp Leiter
Filterpapier 3MM
GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit
Hybrid Hunter (Yeast Two Hybrid)
Immobilon-P (PVDF Membran)
Impact-CN System
Matchmaker genomische <i>E. coli</i> Bibliothek

### Hersteller

Roth, Karlsruhe
Roche, Mannheim
NEB, Schwalbach
NEB, Schwalbach
Whatman
Amersham-Pharmacia, Freiburg
Invitrogen, Groningen, NL
Millipore, Eschborn
NEB, Schwalbach
Clontech, Palo Alto, USA

Micro BCA Assay	Pierce, Sankt Augustin
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Pipettenspitzen Safe Seal	Biozym, Oldenburg
Protein Marker (Mid Range)	Roche, Mannheim
SYPRO Orange	BioRad, München
Amicon Ultrafree-DA	Millipore, Eschborn
Wizard DNA Clean-Up	Promega, Mannheim
Wizard Plus Minipreps	Promega, Mannheim

## 2.5 Synthetische Oligonukleotide und Peptide

### 2.5.1 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz: 5'-3'
Tu-F:	TAC AGC TGA TAG CCG TGT CTA AAG AAA AAT
Tu-R:	CTC TGC AGC GTG TAA TTA GCC CAG AAC TT
Gal4AD-SP:	TAC CAC TAC AAT GGA TG
Gad10-F:	CAG GGA TGT TTA ATA CCA CTA CAA TGG ATG
Gad10-R:	GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT A
IntRev:	AAC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC
S1-F:	GGT GGT CAT ATG ACT GAA TCT TTT GCT CAA CTC
S1-R:	GGT GGT TGC TCT TCC GCA CTC GCC TTT AGC TGC TTT GAA
S2-F:	GGT GGT CAT ATG GCA ACT GTT TCC ATG CG
S2-R:	GGT GGT TGC TCT TCC GCA CTC AGC TTC TAC GAA GCT TTC
EFP-F:	GGT GGT CAT ATG GCA ACG TAC TAT AGC AAC GAT TTT
EFP-R:	GGT GGT TGC TCT TCC GCA CTT CAC GCG AGA GAC GTA TTC A
YhiH-F:	GGT GGT CAT ATG AGC CAG CAT TAT GGA AAA ACC GTT GC
YhiH-R:	GGT GGT TGC TCT TCC GCA TCC CTC CTG TTT TTT CAG CAG CA

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von TIB-MolBiol (Berlin) oder IBA-NAPS (Göttingen) hergestellt.

### 2.5.2 Peptide

Bezeichnung	Sequenz:
Tu-Peptid:	Asp-Gly-Leu-Arg-Phe-Ala-Ile-Arg-Glu-Gly-Gly-Arg- <b>Thr</b> -Val-Gly-Ala-Gly-Val-Val-Lys
Synthese:	Neosystem Laboratoire; 26 mg, Reinheit: 77%

## 2.6 Bakterien-, Hefestämme und Vektoren

### 2.6.1 Bakterienstämme

*Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene):

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15*  
Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

*Escherichia coli* XL-10 Gold (Stratagene):

Tet<sup>r</sup>Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96*  
*relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15* Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

*Escherichia coli* BL21(DE3) (Stratagene):

*E. coli* B F– *dcm ompT hsdS*(rB– mB–) *gal* (DE3)

*Escherichia coli* MRE600:

Wildtyp (DSM 3901 Braunschweig)

### 2.6.2 Hefestämme

*Saccharomyces cerevisiae* L40 (*Invitrogen*):

*MATa his3 Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2:::(4lexAop-HIS3)*

*URA3:::(8lexAop-lacZ) GAL4*

Phänotyp: His-, Trp-, Leu-, Ade-

### 2.6.3 Vektoren

**Tabelle 2.1 Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide**

<i>Plasmid</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Quelle</i>
pGEX- <i>tufA</i>	GST/EF-Tu Wt	98 (Knudsen et al. 1992)
pHybLex/Zeo	Yeast Two Hybrid LexA-Fusionsvektor Zeo <sup>R</sup>	Invitrogen
pHybLex- <i>tufA</i>	<i>tufA</i> in pHybLex/Zeo	diese Arbeit
pGAD10-Lib	GAL4AD/genomische <i>E. coli</i> Bibliothek Amp <sup>R</sup> , <i>leu2</i>	Clontech
pTYB1	Intein-Fusionsvektor Amp <sup>R</sup>	NEB
pTYB1-S1	Ribosomales Protein S1 in pTYB1	diese Arbeit
pTYB1-S2	Ribosomales Protein S2 in pTYB1	diese Arbeit
pTYB1-EFP	Elongationsfaktor P in pTYB1	diese Arbeit
pTYB1- <i>yhiH</i>	Ribosomale ATPase ( <i>yhiH/rbbA</i> ) in pTYB1	diese Arbeit

## 2.7 Nährmedien

### 2.7.1 *E. coli* Medien

#### **LB-Medium:**

10 g/l Pepton 140  
5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
pH 7,0 (mit NaOH)

#### **Niedrig Salz LB-Medium:**

10g/l Pepton 140  
5 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
pH 7,0 (mit NaOH)

#### **SOB-Medium:**

20 g/l Pepton 140  
5 g/l Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
pH 6,7 – 7,0 (mit NaOH)

#### **SOC-Medium:**

SOB-Medium mit 20 mM Glukose

Alle Medien wurden für 20 min bei 120°C autoklaviert. Für Agarplatten wurden jeweils 12 g/l Agar dazugegeben. Folgende Antibiotikakonzentrationen wurden in LB- und SOB-Medien eingesetzt: 100 µg/ml Ampicillin; 25 µg/ml Zeocin.

### 2.7.2 *S. cerevisiae* Medien

#### **YPAD-Medium:**

50 g/l YPD-Medium bzw. 70 g/l YPD-Agar-Medium

0,1 g/l Adenin

#### **SD-Medium:**

26,7 g/l Minimal SD Base bzw. 46,7 g/l Minimal SD Agar Base

0,1 g/l Adenin

*0,62 g/l -Leu/-His DO Supplement* (für SD-LH-Medium)

*0,69 g/l -Leu DO Supplement* (für SD-L-Medium)

*0,77 g/l -His DO Supplement* (für SD-H-Medium)

Alle Hefe Medien wurden für 15 min bei 120°C autoklaviert. Für entsprechende Medien wurde Zeocin in einer Endkonzentration von 300 µl/ml zugegeben.

## **3 Methoden**

### **3.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **3.1.1 Zellanzucht von *E. coli* in Flüssigkultur**

Für die Anzucht von Bakterien wurden 10 ml LB Flüssigmedium mit einer Platin-Impföse aus einem DMSO-Stock bzw. mit einer einzelnen auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonie angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (225 rpm) wachsen gelassen. Zur besseren Durchlüftung wurden ausschließlich Kulturgefäße mit Schikanen verwendet. Die so erhaltenen Übernacht-Kulturen wurden für Plasmid-Minipräparationen oder zum Überimpfen für neue Kulturen verwendet. Um das Zellwachstum zu überprüfen, wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm bestimmt.

#### **3.1.2 Zellanzucht von Einzelkolonien**

Zur Vereinzelung von *E. coli* Zellen wurden 20 - 200 µl einer frisch gewachsenen Flüssigkultur auf LB Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Aufbewahrung konnten Agarplatten für mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

#### **3.1.3 Anlegen von DMSO-Stocks**

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden zu 1,6 ml einer frisch gewachsenen Flüssigkultur 400 µl DMSO gegeben, und diese bei -80°C eingefroren. Die so behandelten Zellen können über mehrere Jahre bei -80°C gelagert werden.

#### **3.1.4 Herstellung superkompetenter *E. coli* Zellen**

Eine 250 ml *E. coli* XL1-Blue Kultur wurde in SOB-Medium bei 18°C (225 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen gelassen und dann für 10 min auf Eis inkubiert. 70 ml davon wurden für 10 min bei 2500xg zentrifugiert, in 80 ml Transformationspuffer (10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7) aufgenommen und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurden die Zellen wieder für 10 min bei 2500xg zentrifugiert und in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO (7% Endkonzentration)

wurden die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in 400 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz dieser Zellen betrug  $1 \cdot 10^8$  cfu/µg bei pBR322 DNA.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden (Nukleinsäuren)**

### **3.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli***

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Zellen wurden verschiedene auf der alkalischen Lyse beruhenden Kits verwendet. Minipräparationen (3 ml) für Sequenzierung oder Klonierung wurden mit dem „Wizard Plus Minipreps DNA Purification System“ von Promega nach Standardprotokoll durchgeführt. Für *endA* positive Stämme wie *E. coli* BL21(DE3) wurde die doppelte Menge an Neutralisationslösung eingesetzt. Um größere Mengen an DNA aus 50 ml Kulturen aufzureinigen, wurde das „Jet Star Midi Kit“ von Genomed verwendet.

Zur schnellen Überprüfung von Klonierungen, konnte auch ein etwas einfacheres Protokoll ohne die Aufreinigung der DNA über eine Säule verwendet werden. Dafür wurden 3 ml einer Übernacht-Kultur zentrifugiert, und das Pellet in 100 µl Lösung I (0,9% Glukose, 0,01 M EDTA, 0,025 M Tris) resuspendiert. Dann wurden 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben, geschwenkt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III (3 M KOAc, 4,75% Ameisensäure) hinzugegeben, erneut geschwenkt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun wurde die Probe für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 450 µl Isopropanol gefällt, zentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl Wasser aufgenommen.

### **3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* MRE600**

Genomische DNA aus *E. coli* MRE600 wurde mit Hilfe des „DNA/RNA Minikits“ von Qia-gen isoliert. Dafür wurden 1 ml einer Übernacht-Kultur zentrifugiert, in 50 µl Lysozym-Lösung (400 µg/ml in TE-Puffer) aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden genomische DNA sowie Total-RNA nach Protokoll aufgearbeitet. Sowohl DNA als auch RNA wurden zum Abschluß in 200µl Wasser aufgenommen.

### 3.2.3 Restriktionsverdau

Für Restriktionsverdaus von Plasmiden oder PCR-Produkten wurden je nach DNA-Menge 20, 50 oder 100 µl Ansätze mit der entsprechenden Menge des jeweils empfohlenen 10x Restriktionspuffers verwendet. Pro µg DNA wurden 2 Units Restriktionsenzym und falls notwendig RNase oder BSA zugegeben. Die Restriktionsansätze wurden für 2 bis 4 Stunden oder, falls ein möglichst vollständiger Verdau erwünscht war, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach der erwarteten Fragmentgröße mit Hilfe von 0,8 oder 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Puffer wurde ein modifizierter 1x TAE-Puffer mit weniger EDTA (40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die Verwendung dieses Puffers bietet den Vorteil, daß die DNA nach erfolgter Gelextraktion direkt für weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt werden kann. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden pro Gel 2 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Für den Lauf des Gels wurde eine Spannung von 80 - 100V angelegt. Zur Auswertung wurden die Gele mit Hilfe eines Videodokumentationssystems unter UV-Licht aufgenommen.

### 3.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um ein DNA-Fragment aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurden die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Ultrafree-DA Filtergefäß von Millipore überführt und für 20 min bei -20°C eingefroren. Dann wurde das Filtergefäß für 20 min bei 11000 rpm (10000xg) zentrifugiert. Das Filtrat enthält die extrahierte DNA, welche durch Ethanolfällung oder durch Verwendung des „Wizard DNA Clean-Up Kits“ von Promega eingeeengt bzw. weiter aufgereinigt werden kann.

### 3.2.6 Ethanolfällung

Zu der DNA-Lösung wurden 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gegeben, gevortext, und das Gemisch für 20 min bei -20°C inkubiert. Dieses wurde dann für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und noch-



mals für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in 10 bis 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

### 3.2.7 Dephosphorylierung

Um bei einer Klonierung eine Religation von Vektoren mit zwei identischen Restriktionsschnittstellen zu vermeiden, können diese mit Hilfe der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert werden. Dafür wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps verwendet, welche im Gegensatz zu der normalerweise erhältlichen alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm durch Erhitzen auf 65°C vollständig inaktiviert werden kann.

Falls notwendig wurden in der Probe vorhandene Restriktionsenzyme durch Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert. Anschließend wurde die entsprechende Menge an 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 bis 2  $\mu$ l alkalische Shrimp Phosphatase hinzugegeben, und die Probe für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde die Probe nochmals für 15 min bei 65°C inkubiert.

### 3.2.8 Ligation

Ligationen wurden in 15  $\mu$ l Ansätzen mit 1,5  $\mu$ l 10x Ligationspuffer und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (Roche) durchgeführt. Dabei wurden pro Ansatz 100 ng Vektor und ein zwei- bis vierfacher Überschuß an Insert eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht je nach erwünschter Spezifität entweder bei 4°C oder bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle für Religanden dienten jeweils Ligationsansätze ohne Insert.

### 3.2.9 Transformation

Für die Transformation wurden die superkompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, und je 50 oder 100  $\mu$ l in ein 14 ml Falconröhrchen überführt. Zu den Zellen wurden jeweils 0,85 bzw. 1,7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben und unter gelegentlichem Durchmischen für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden ungefähr 100 ng der zu transformierenden DNA dazugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Transformationen für 45 sek bei *E. coli* XL-1 Blue bzw. 30 sek bei *E. coli* XL-10 Gold und BL21(DE3) in einem temperierten Wasserbad auf 42°C erhitzt und erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,9 ml vorgewärmtem SOC-Medium (42°C) wurden die Transformationen für eine Stunde bei

37°C auf dem Schüttler (225 rpm) inkubiert. Jeweils zwischen 20 und 200 µl der Transformationen wurden auf LB-Agarplatten mit Zeocin oder Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden jeweils zwei bis fünf pro Transformation gepickt und damit Übernacht-Kulturen angeimpft. Diese wurden anschließend mit Hilfe von Plasmid-Minipreps und Restriktionsverdaus überprüft.

### 3.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA wurde mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion in 50 µl Standardansätzen durchgeführt. Dafür wurden 10 bis 50 ng Template, je 40 pmol Primer, 6 µl dNTP-Gemisch (2,5 mM je dNTP), 5 µl 10x PCR-Puffer und 1 µl (2,5 U) *Pfu* DNA-Polymerase in ein 200 µl Reaktionsgefäß pipettiert und mit H<sub>2</sub>O bidest auf 50 µl aufgefüllt. Bei Verwendung von *Taq* DNA-Polymerase (1 U pro PCR) wurde MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM Endkonzentration) getrennt zugegeben. Für präparative PCRs wurden doppelte Ansätze (100 µl) verwendet und falls notwendig DMSO oder Formamid in einer Endkonzentration von 3% zugegeben. Die Reaktionen (30 Zyklen) wurden nach folgenden für die jeweilige DNA-Polymerase angepassten Temperaturprogrammen durchgeführt:

<b><i>Pfu</i> DNA-Polymerase</b>			<b><i>Taq</i> DNA-Polymerase</b>		
5 min	95°C	} 30 Zyklen	5 min	94°C	} 30 Zyklen
1 min	95°C		1 min	94°C	
45 sek	55°C		45 sek	55°C	
2 min/kb	74°C		1 min/kb	72°C	
7 min	74°C		7 min	72°C	
∞	4°C		∞	4°C	

### 3.2.11 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von SEQLAB in Göttingen nach der Dye-Terminator Methode durchgeführt. Als Proben wurden jeweils 3 µg aufgereinigte DNA (200 ng/µl) und 50 pmol Primer (10 pmol/µl) abgegeben.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgereinigte Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Es wurden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10 - 15% verwendet. Sammel- und Trenngel wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

<b>Sammelgel:</b>	Tris·HCl (pH 6,8)	0,125 M
	SDS	0,1% (w/v)
	Acrylamid	4,5% (w/v)
	(Acrylamid/Bis-Acrylamid 30:0,8)	
<b>Trenngel:</b>	Tris·HCl (pH8,8)	0,375 M
	SDS	0,1% (w/v)
	Acrylamid	10 - 15% (w/v)
	(Acrylamid/Bis-Acrylamid 30:0,8)	

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 1/100 Volumen 10% APS und 1/1000 Volumen TEMED gestartet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit 20% Ethanol überschichtet.

<b>Elektrophorese-Puffer:</b>	Tris·HCl (pH8,3)	0,025 M
	Glycin	0,192 M
	SDS	0,1% (w/v)
<b>Färbelösung:</b>	Coomassie Brilliant Blue	0,1% (w/v)
	Ethanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
<b>Entfärbelösung:</b>	Ethanol	20% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)

Es wurden zwei verschiedene Größen an Gelen verwendet. Für kleine Gele (8,5x7,5x0,1 cm) wurden Apparaturen des „Mini-Protean II Systems“ der Firma Biorad verwendet. Für große Gele (14x12x0,1 cm) wurden klassische Standardapparaturen und Gelkammern verwendet.

Die Proteinproben wurden vor dem Gellauf mit der entsprechenden Menge an 4x RotiLoad Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Front komplett aus dem Gel ausgetreten war.

Große Gele wurden für mindestens 30 min in Coomassie Färbelösung gefärbt und dann über Nacht in Entfärbelösung wieder entfärbt. Um das Entfärben weiter zu beschleunigen, wurde zusätzlich ein kleines Schaumstoffstück in die Entfärbelösung gegeben. Kleine Gele wurden je nach erwünschter Nachweisgrenze entweder mit dem ebenfalls auf Coomassie-Basis beruhenden BM Fast Stain von Roche oder dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange von BioRad gefärbt. Die Durchführung erfolgte dabei jeweils gemäß den Vorschriften des Herstellers. Zur Aufbewahrung bzw. Dokumentation wurden die Gele schließlich auf dem Vakuumgeltrockner getrocknet.

### 3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der „BCA Protein Assay“ von Pierce verwendet, welcher auf der Bildung eines stabilen chromophoren Bicinchoninsäure / Kupfer / Proteinkomplexes beruht, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Dafür wurden je 100 µl der ausreichend verdünnten Proteinprobe mit 2 ml der BCA-Reagenz vermischt, für 30 min bei 37°C inkubiert und bei 562 nm photometrisch vermessen. Als Standard wurde eine Eichreihe mit 0, 20, 50, 100, 150, 200 µg Rinderserum Albumin erstellt.

Zur schnellen Proteinbestimmung wurde die Absorption der Proteinprobe bei 280 nm bestimmt. Anhand der Absorption und des dazugehörigen spezifischen Absorptionskoeffizienten konnte die Proteinkonzentration näherungsweise berechnet werden. Dabei muß allerdings darauf geachtet werden, daß DNA, RNA, sowie einige andere in Puffern enthaltene Substanzen wie DTT ebenfalls bei 280 nm absorbieren.

### 3.3.3 Ammoniumsulfatfällung

Um Proteine aufzukonzentrieren bzw. umzupuffern, wurden diese durch Zugabe von Ammoniumsulfat gefällt. Zu je 100 ml Proteinlösung wurden 51,6 g festes Ammoniumsulfat gegeben, so daß eine 80%-ige Sättigung (bei 0°C) erreicht wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert und für 20 min bei 10000xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in so wenig Puffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) wie möglich gelöst.

### 3.3.4 Proteinkonzentrierung durch Zentrifugation

Bei zu geringen Proteinkonzentrationen konnten die Proteine auch mit Hilfe von Ultrafiltrations-Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert werden. Dafür wurden die Proben in Zentrifugenröhrchen mit passender Ausschlußgrenze bei 4000xg zentrifugiert, bis diese ausreichend eingengt waren.

### 3.3.5 Dialyse

Die Dialyse von Proteinlösungen wurde je nach Volumen in 1 oder 5 ml „QuixSep Dialyzer“ der Firma Membrane Filtration Products oder klassisch in einem verknoteten Dialyseschlauch durchgeführt. Als Membran wurden Spektrapor Dialyseschläuche mit einer Ausschlußgrenze von 3500 Dalton verwendet.

### 3.3.6 Immuno Blot / Western Blot

Zur Vorbereitung des Western Blots wurden jeweils eine Immobilon-P PVDF-Membran und sechs Whatman Filterpapiere auf Gelgröße (14,2 x 7,4 cm) zurechtgeschnitten. Vor dem Zusammenbau der Blotapparatur wurde die Membran zuerst für 30 sek in Methanol und anschließend für eine Minute in H<sub>2</sub>O eingelegt. Die Filterpapiere wurden ebenfalls vor der Verwendung in Blotpuffer (20% Methanol, 48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,037% SDS, pH 7,4) eingelegt, und die Blotapparatur mit Wasser benetzt. Die Apparatur wurde nun in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Anode, drei Filterpapiere, PVDF-Membran, Gel, drei Filterpapiere, Kathode. Der eigentliche Blotvorgang erfolgte für 2 h 15 min bei einem angelegten Strom von 105 mA (1 mA/cm<sup>2</sup>).

Um die Banden des Markers sichtbar zu machen, wurde der Blot für 5 min in Ponceau S Lösung (0,2% Ponceau S in 3% Essigsäure) gefärbt, in H<sub>2</sub>O wieder entfärbt, und die Banden des Markers mit einem Kugelschreiber markiert.

Für den Antikörpernachweis wurde der Blot zunächst über Nacht mit 10% Magermilchpulver in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH7,5) blockiert und anschließend 2x für 30 sek und 3x für 5 min mit TBS-T gewaschen. Nun wurde die Membran für 45 min mit dem ersten Antikörper (Anti-LexA aus Kaninchen, 1:5000 in TBS-T mit 1% Magermilchpulver) inkubiert und wieder wie oben beschrieben mit TBS-T gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper aus Esel (1:500 in TBS-T mit 1% Magermilchpulver) verwendet, und die Membran für 20 min darin inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugat (1:3000 in TBS-T mit 1% Magermilchpulver) inkubiert und noch einmal wie oben beschrieben mit TBS-T gewaschen.

Für die anschließende Färbung wurde die Membran zuerst mit 10 ml Detektionspuffer (Roche Mannheim) gewaschen, und die Färbelösung vorbereitet: je 100 µl 100x BCIP (75 mg BCIP in 5 ml DMF) und 100x NBT (150 mg NBT-Chlorid in 5 ml 70% DMF) in 10 ml Detektionspuffer. Die eigentliche Färbung erfolgte solange, bis die Signale deutlich sichtbar wurden, und die Reaktion durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt werden konnte.

### 3.4 Yeast Two Hybrid

#### 3.4.1 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* L40

*Saccharomyces cerevisiae* L40 Zellen wurden wie für *E. coli* in Kapitel 3.1.1 bzw. 3.1.2 beschrieben kultiviert. Im Unterschied zu *E. coli* wuchsen Hefekulturen jedoch im Inkubator bzw. im Schüttelinkubator bei 30°C. Als Medien dienten YPAD als Standardmedium und zur Selektion SD-Minimalmedium. Für die Aufarbeitung von Transformationen im Großmaßstab wurden große Agarplatten mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet.

#### 3.4.2 Herstellung von denaturierter Heringssperma DNA

Um Plasmide in Hefe transformieren zu können, benötigt man denaturierte Heringssperma DNA als Carrier. Dafür wurden 0,5 g Heringssperma DNA (Roche) unter Rühren über Nacht bei 4°C in 50 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Anschließend wurde die DNA 2x für 30 sek mit Ultraschall (Ultraschallstab mit 75% Leistung) behandelt,

welches in einer durchschnittlichen Fragmentlänge der DNA von 7 kb resultieren sollte. Für die Denaturierung wurde die DNA für 10 min bei 100°C gekocht und dann sofort bei -20°C eingefroren.

### 3.4.3 Transformation von pHybLex-*tufA* in *S. cerevisiae* L40

Um pHybLex-*tufA* in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 zu transformieren, wurden 50 ml YPAD-Medium mit Zellen einer Übernacht-Kultur so angeimpft, daß eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde. Die Zellen wurden für 3 h unter Schütteln (200rpm) bei 30°C wachsen gelassen, für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, mit 20 ml TE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 1x LiAc / 0,5x TE (100 mM Litiumacetat, 5 mM Tris·HCl, 0,5 mM EDTA, pH7,5) resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde ein Gemisch von 1 µg Plasmid-DNA mit 100 µg denaturierter Heringssperma DNA zu je 100 µl der vorbereiteten Hefe-Suspension gegeben und gut gemischt. Nun wurden 700 µl 1xLiAc / 40% PEG-3350 / 1x TE (100 mM Litiumacetat, 40% PEG-3350, 10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) zugegeben, wiederum gut gemischt, und die Transformationsansätze für 30 min bei 30°C (ohne Schütteln) inkubiert. Nach Zugabe von je 88 µl DMSO wurden die Transformationsansätze erneut gut gemischt und für 7 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen für 10 sek bei 13000 rpm abzentrifugiert, mit 1 ml TE-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Um einzelne Kolonien zu selektieren, welche das Plasmid pHybLex-*tufA* enthalten, wurden die Zellen auf YPAD-Z300-Agarplatten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C wachsen gelassen.

### 3.4.4 Aufschluß von Hefezellen

Um Proteine aus Hefezellen extrahieren und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel auftrennen zu können, mußten diese aufgeschlossen werden. Dafür wurden je 5 ml einer Hefekultur für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, und die Zellpellets für 20 min bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Pellets in je 100 µl auf 70°C vorgewärmten Cracking Buffer (5% SDS, 8 M Harnstoff, 40 mM Tris·HCl, 0,1 mM EDTA, 1% β-Mercaptoethanol, 0,4 mg/ml Bromphenolblau, pH 6,8) mit der Pipette resuspendiert und in neue Eppendorf-Gefäße mit je 100 µl Glasperlen (400-600 microns) überführt. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 70°C im Heizblock, und jede Probe wurde für mindestens eine Minute gründlich gevortext. Anschließend wurden die Zellreste und Glasperlen für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert,

und der Überstand (150 µl) mit 50 µl 4x RotiLoad Probenpuffer versetzt. Das so erhaltene Gesamtproteinextrakt aus Hefe konnte direkt auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots analysiert werden.

### 3.4.5 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay

Um eine Interaktion zwischen EF-Tu und einem potentiellen Bindungspartner zu überprüfen, konnte ein  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay durchgeführt werden. Dafür wurden je 52 zu untersuchenden Klone in einem Gitter pro Agarplatte ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C wachsen gelassen. Die frisch gewachsenen Zellen wurden nun durch Abklatschen auf einen Nitrocellulosefilter (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell) übertragen und vorsichtig auf ein „Boot“ aus Alufolie, welches in flüssigem Stickstoff schwimmt, gelegt. Nachdem das Boot mit Filter für 30 sek auf dem flüssigen Stickstoff abgekühlt ist, wurde es mitsamt Filter für 5 sek untergetaucht und anschließend aufgetaut. Dann wurde der Filter vorsichtig auf ein mit 1,5 ml Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0) + 30 µl X-Gal (50 mg/ml) getränktes Filterpapier ( $\varnothing$  = 90 mm, Schleicher & Schuell) in eine Petrischale gelegt und für 30 min bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die auf dem Nitrocellulosefilter auftretende Blaufärbung ist proportional zu der in den Hefezellen exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase und somit zur Stärke der Interaktion der beiden Bindungspartner.

### 3.4.6 Transformation von genomischer *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40

Die Transformation der genomischen *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 erfolgte ähnlich der Transformation von pHybLex-*tufA*, nur in einem deutlich größeren Maßstab. Dafür wurden zwei 500 ml YPAD-Kulturen mit einer über Nacht gewachsenen Kultur *S. cerevisiae* L40 (+ pHybLex*tufA*) so angeimpft, daß ein OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht wurde, und für 3 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, mit je 250 ml 1x TE-Puffer gewaschen und in je 10 ml 1x LiAc / 0,5x TE aufgenommen. Nun wurden die Zellen in einem sterilen 1 l Erlenmeyerkolben gepoolt, 10 mg denaturierte Heringssperma DNA und 500 µg der *E. coli* Bibliothek dazugegeben und gut durchmischt. Nach Zugabe von 140 ml 1x LiAc / 40% PEG-3350 / 1x TE und erneutem Durchmischen erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 30 °C. Anschließend wurden 17,6 ml DMSO zugegeben, wiederum gut gemischt und für 6 min bei 42°C inkubiert. Um den Transformationsansatz möglichst schnell abzukühlen, wurden 400 ml YPAD-Medium zu den



Zellen gegeben und in einem Wasserbad weiter bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Zellen für 10 min bei 500 rpm abzentrifugiert, mit 500 ml YPAD-Medium gewaschen, in 1 l YPAD-Medium resuspendiert und für 1 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) wachsen gelassen.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden nun 1 ml der Zellen abgenommen, abzentrifugiert und in 1 ml SD-L-Medium resuspendiert. Auf SD-L-Z300-Agarplatten wurden einmal 10  $\mu\text{l}$  ( $10^{-5}$ ) und einmal 1  $\mu\text{l}$  ( $10^{-6}$ ) davon ausgestrichen, für 3 Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert, und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Die restlichen Zellen wurden für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, mit 500 ml SD-L-Medium gewaschen, in 1 l SD-L-Z300-Medium resuspendiert und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, mit 500 ml SD-HL Medium gewaschen und in 10 ml SD-HL-Medium aufgenommen. Um erneut die Transformationseffizienz zu bestimmen bzw. zu überprüfen, wurden je 100  $\mu\text{l}$  von  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  Verdünnungen der Zellsuspension auf SD-L-Z300-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden für mehrere Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert, und die Kolonien ausgezählt. Für das eigentliche Screening nach Bindungspartnern von EF-Tu wurden je 5x 5, 10, 25 und 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension auf großen SD-HL-Z300-Agarplatten ( $\varnothing = 15 \text{ cm}$ ) mit oder ohne 1 mM 3-Aminotriazol ausplattiert und für mehrere Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. 3-Aminotriazol diente hierbei zur Unterdrückung von schwachen, unspezifischen Interaktionen, indem es die Imidazol-Glycerolphosphatdehydratase kompetitiv inhibiert. Die gewachsenen Kolonien wurden wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben je zwei mal auf SD-HL-Z300-Agarplatten zu je 52 Klonen anhand eines Gitters ausgestrichen, wobei je eine der Platten mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assays (3.4.5) auf Interaktionen untersucht wurde.

### 3.4.7 Plasmid-Präparation aus Hefezellen

Für die Identifizierung von Bindungspartnern mußte das Insert des Bibliotheks-Vektors mit Hilfe der PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert werden. Um dies zu erreichen, konnte das Insert direkt mit einer Kolonie-PCR amplifiziert werden, oder es mußte zuvor eine Plasmid-Präparation durchgeführt werden.

Zuerst wurden 10 ml über Nacht Kulturen der zu untersuchenden Klone für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, und die Pellets bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C eingefroren. Die Pellets wurden in 300  $\mu\text{l}$  Yeast Lysis Puffer (2,5 M LiCl, 50 mM Tris·HCl, 4% Triton X-100,

62,5 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, und die Zellsuspensionen in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zugabe von 150 µl Glasperlen (400-600 microns) und 300 µl Phenol / Chloroform (1:1) wurden die Proben für je 1 min gründlich gevortext und anschließend für 1 min bei 14000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde nun jeweils in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat und 1,5 Vol Ethanol versetzt, für 20 min bei -20°C inkubiert und für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und zum Schluß in je 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.4.8 Kolonie-PCR aus Hefezellen

Die Kolonie-PCR erfolgte ähnlich einer normalen PCR mit Taq DNA Polymerase, jedoch wurden statt der DNA direkt Hefezellen als „Template“ verwendet. Dafür wurden je 1 µl Zellsuspension aus dem Pellet einer über Nacht Kultur eingesetzt. GAD10-F und GAD10-R dienten hierbei als Primer. Weiterhin wurde die Magnesiumkonzentration gegenüber einer Standard-PCR von 1,5 mM auf 2,5 mM erhöht und der anfängliche Denaturierungsschritt auf 10 min verlängert. Das verwendete Temperaturprogramm ist im folgenden aufgeführt.

#### Temperaturprogramm der Kolonie-PCR:

10 min	94°C	} 35 Zyklen
1 min	94°C	
1 min	60°C	
2 min	72°C	
10 min	72°C	
∞	4°C	

Für PCRs von aus Hefezellen isolierten Plasmiden wurde dasselbe Temperaturprogramm verwendet, mit dem Unterschied, daß hier ein solch langer, anfänglicher Denaturierungsschritt nicht notwendig war. Bei zu geringen Produktmengen wurde eine weitere PCR von dem über ein Gel aufgereinigtem PCR-Produkt durchgeführt, so daß ausreichend Produkt für eine Sequenzierung zur Verfügung stand.

### 3.4.9 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte für die Sequenzierung aufzureinigen, wurden diese mit Hilfe des „GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kits“ von Amersham-Pharmacia von Nukleotiden,

Primern und Salzen befreit und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 1 µg pro PCR-Produkt wurden in einer Konzentration von 50 ng/µl zur Sequenzierung zu SEQLAB nach Göttingen geschickt. Gal4AD-SP (50 pmol pro Sequenzierung, 10 pmol/µl) wurde hierbei als Primer verwendet.

Die Auswertung der Sequenzen bzw. die Identifizierung der Bindungspartner erfolgte mit Hilfe von Datenbankrecherchen im Internet, z.B. mittels BLAST-Search:

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

### 3.5 Affinitätschromatographie

#### 3.5.1 Vorbereitung der Substratpeptidsäule

Für die Kopplung des EF-Tu Substratpeptids an das Säulenmaterial wurden 9 mg des Peptids zunächst in 2 ml Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,0) gelöst. 0,33 g des Säulenmaterials (Activated CH Sepharose 4B, Amersham-Pharmacia) wurden in einem 14 ml Falconröhrchen in 5 ml HCl-Lösung (1 mM, pH 3,0) suspendiert. Das aufgequollene Säulenmaterial, welches ungefähr einem Volumen von 1 ml entspricht, wurde fünf mal mit je 14 ml HCl-Lösung (1 mM, pH 3,0) gewaschen und kurz anzentrifugiert. Nach dem sorgfältigen Entfernen der HCl-Lösung wurde das Substratpeptid zu dem Säulenmaterial gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur auf einer Rollapparatur unter ständigem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Peptid durch zweimaliges Waschen mit 5 ml Kopplungspuffer vom Säulenmaterial entfernt. Um die verbleibenden aktiven Gruppen des Säulenmaterials zu blockieren, wurde es nun für 1 h bei Raumtemperatur in 5 ml 1 M Ethanolamin (pH 8,0) stehen gelassen. Zum Schluß wurde das Säulenmaterial noch jeweils drei mal abwechselnd mit 0,1 M Natriumacetat / 0,5 M NaCl (pH 4,0) und 0,1 M Tris-HCl / 0,5 M NaCl (pH 8,0) gewaschen. Die HR 5/5 Säule (Amersham-Pharmacia) konnte nun mit dem Säulenmaterial beladen und an die FPLC angeschlossen werden.

#### 3.5.2 Aufreinigung von Proteinen aus Roh-Ribosomen

Für die Affinitätschromatographie mußten zunächst die Proteine aus Roh-Ribosomen isoliert werden. Dafür wurden insgesamt 30 g *E. coli* MRE600 Zellen aus über Nacht gewachsenen Flüssigkulturen in je 3 g Portionen aufgeteilt, mit je 6 g Alcoa (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) versetzt und gründlich für 2 min in einem vorgekühlten Mörser auf Eis verrieben. Nach Zugabe von je 6 ml tico-Puf-

fer (20 mM HEPES, 6 mM MgAc, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,6) wurden die Zellen zum Resuspendieren für eine weitere Minute verrieben. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Corex tubes überführt, und das Aluminiumoxid durch Zentrifugieren für 10 min bei 8000 rpm (Beckman JA-17) abgetrennt. Um größere Zellbestandteile abzutrennen, wurde der Überstand erneut für 20 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der so erhaltene Zellrohextrakt S30 wurde in UZ-Röhrchen überführt und für 17 h bei 25000 rpm in einem 70 Ti-Rotor zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 1 ml tico-Puffer resuspendiert, und die Lösung zum Abtrennen eventueller unlöslicher Aggregate nochmals für 10 min bei 10000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurden zu dem Überstand jeweils 0,1 Vol 1 M MgAc und 2,2 Vol Eisessig gegeben, die Proben gut durchmischt, für 45 min auf Eis (0°C) im Kältelabor inkubiert und anschließend für 30 min bei 8000 rpm (JA-17) zentrifugiert. Zur Fällung der Proteine wurden die Überstände in 30 ml Corex tubes überführt, jeweils 5 Vol Aceton zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 min bei 8000 rpm (JA-17) wurden die Pellets für 5 min in der Lyophylle getrocknet und dann in insgesamt 25 ml Rek-4-6U-Puffer (20 mM Tris·HCl, 4 mM MgAc, 0,2 mM EDTA, 4 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 6 M Harnstoff, pH 7,8) resuspendiert, so daß eine optische Dichte von 30 A<sub>230</sub>/ml erreicht wurde. Nun wurden die ribosomalen Proteine in einen Dialyseschlauch (Spectrapor 3500) überführt und über Nacht gegen Rek-4-6U-Puffer (50faches Volumen) dialysiert. Anschließend wurden die Proteine noch drei weitere mal für jeweils 2 h gegen ein 100faches Volumen an Rek-4-Puffer (20 mM Tris·HCl, 4 mM MgAc, 0,2 mM EDTA, 4 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,5) dialysiert, wobei die dritte Dialyse nach 30 min abgebrochen wurde, als die Proteinlösung begann, trüb zu werden. Zum Schluß wurden die in Lösung gebliebenen ribosomalen Proteine durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm (JA-17) von dem Präzipitat befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5.3 Affinitätschromatographie (Versuch 1)

Zur Vorbereitung wurde die Substratpeptidsäule an die FPLC (Pharmacia) angeschlossen und mit 200 ml Puffer A (20 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 2 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4) gespült, bis keine Veränderung der Absorption bei 280 nm (A<sub>280</sub>) mehr zu erkennen war. Weiterhin wurden 10 ml der aufgereinigten ribosomalen Proteine (siehe 3.5.2) mit Puffer A auf ein Endvolumen von 200 ml verdünnt. Dabei ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4000xg abgetrennt.

Die Beladung der Säule erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min, wobei das Probenreservoir dazu direkt an die FPLC-Pumpe (Pharmacia FPLC System) angeschlossen wurde. Anschließend wurde die Säule erneut solange mit Puffer A gewaschen, bis keine Abnahme der Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) mehr zu erkennen war. Die eigentliche Elution erfolgte mit Hilfe eines Salzgradienten, welcher durch Mischen von Puffer A mit Puffer B (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,5 M NaCl, pH 7,4) im richtigen Verhältnis zueinander erzeugt wurde. Dabei wurde der Salzgehalt über 30 ml von 0 M auf 1,5 M (0 auf 100% Puffer B) gleichmäßig erhöht und anschließend für weitere 10 ml konstant auf 1,5 M gehalten. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt, wobei die Fließgeschwindigkeit 1 ml/min betrug.

Zur Regenerierung wurde die Säule zuerst mit 200 ml Puffer B und dann mit 100 ml Puffer A gespült. Um eine längere Lagerung zu ermöglichen, wurde die Säule mit Puffer A + 0,05% Na-Azid gefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

### 3.5.4 Affinitätschromatographie (Versuch 2)

Die Durchführung der zweiten Affinitätschromatographie erfolgte größtenteils, wie in 3.5.3 beschrieben. Jedoch wurde an die FPLC zusätzlich ein Entgaser angeschlossen, um eine Bläschenbildung im UV-Meßgerät zu verhindern. Weiterhin wurden diesmal 15 ml der ribosomalen Proteine eingesetzt, und die Elution erfolgte in einem Stufengradienten:

Elutionsvolumen	Salzkonzentration	Anteil von Puffer B
0 – 5 ml	0 M NaCl	0%
5 – 10 ml	0 – 0,3 M NaCl	0 – 20%
10 – 15 ml	0,3 M NaCl	20%
15 – 35 ml	0,3 – 1,5 M NaCl	20 – 100%
35 – 50 ml	1,5 M NaCl	100%

### 3.5.5 Identifizierung gebundener Proteine

Um mögliche Bindungspartner identifizieren zu können, mußten die Proteine zuerst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dabei wurden sowohl kleine als auch große Gele verwendet, und die Proteine, wie in 3.3.1 beschrieben, mit verschiedenen geeigneten Methoden angefärbt. Die interessanten Proteinbanden wurden aus den Gelen ausge-

schnitten und zur MALDI-Analyse an Mathias Dreger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hucho übergeben.

Bei dieser Methode wird der Analyt mit einer Matrix vermischt, welche durch einen Laser rasch angeregt wird, mit der Folge, daß Matrix- und Analytionen bzw. dessen Fragmente in die Gasphase übergehen (MALDI = Matrix-assisted laser desorption/ionization). Im nachfolgenden TOF- (time of flight) Massenanalysator werden die Ionen gemäß ihrem Ladungs-Masseverhältnis aufgetrennt und vom Detektor registriert und damit die zugehörigen Peptidfragmente identifiziert. Mit den erhaltenen Werten lassen sich Datenbanken durchsuchen und das zugehörige Protein identifizieren, sofern die Sequenz bereits bekannt ist. Die Identifizierung der Proteine mittels der Peptidmassen erfolgte mit Hilfe des Programms ProFound auf der folgenden Internetseite:

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

### **3.6 Überexpression von Proteinen**

#### **3.6.1 Klonierungen zur Überexpression**

Um Proteine in *E. coli* überexprimieren zu können, mußten die dazugehörigen Gene zuerst aus genomischer DNA in einen Überexpressionsvektor kloniert werden. Dafür wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen direkt aus genomischer *E. coli* DNA (3.2.2) mittels PCR vervielfältigt (3.2.10), wobei der Forward-Primer grundsätzlich eine *NdeI*- und der Reverse-Primer eine *SapI*-Schnittstelle enthielt. Somit war es möglich, diese Gene in den *NdeI/SapI* geschnittenen Überexpressionsvektor pTyb1 zu ligieren, in *E. coli* zu transformieren, und das Überexpressionskonstrukt zu amplifizieren. Um die so erhaltenen Klone zu überprüfen, wurden diese entweder sequenziert (3.2.11) oder mit Hilfe der Proteinbiosynthese *in vitro* auf ihre Tauglichkeit zur Überexpression getestet. Als Sequenzierprimer wurden T7-Standard- und IntRev-Primer verwendet.

#### **3.6.2 Proteinbiosynthese *in vitro***

Da die Sequenzierung der pTyb1-Überexpressionskonstrukte sich als recht schwierig erwies, wurden einige Konstrukte der Proteinbiosynthese *in vitro* unterzogen. Dadurch konnte recht einfach festgestellt werden, ob das erwünschte Protein bzw. Fusionsprotein auch vollständig in den Zellen exprimiert wird.

Die Proteinbiosynthese *in vitro* erfolgte wie in der Arbeitsgruppe üblich in einer gekoppelten Transkription-Translation im zellfreien *E. coli* S30-System, bei dem zuerst die unter Kontrolle eines T7-Promotors stehende DNA in mRNA umgeschrieben wird, und diese anschließend zu einem Protein übersetzt wird. Die eigentliche Reaktion erfolgte in 25  $\mu$ l Ansätzen:

<b>Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
prä-Mix S (1/99)	7,5 $\mu$ l
Prä-Mix T (12/99)	7 $\mu$ l
E-Mix D (12,5x)	2 $\mu$ l
T7 RNA Polymerase	0,25 $\mu$ l
<sup>14</sup> C-Leucin (1 mM)	1,25 $\mu$ l
DNA (1 nM)	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l

Die Reaktionsansätze wurden für 90 min bei 37°C inkubiert, je 75  $\mu$ l 0,5% SDS hinzugegeben und nochmals für 30 min bei 50°C inkubiert. Zur Überprüfung der Effizienz wurden zweimal 20  $\mu$ l pro Ansatz abgenommen und jeweils mit TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Dazu wurden je 50  $\mu$ l 0,5% BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) und je 3 ml 10 % TCA / 50 mM Natriumpyrophosphat / 2% Pepton zugegeben, und die entstandene Suspension zuerst für 15 min bei 90°C und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die gut durchmischte Suspension über einen mit 5% TCA angefeuchteten Glasfilter abgesaugt, das Reaktionsgefäß zweimal und die Wände der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5% TCA nachgespült, und der Filter durch zweimaliges Spülen mit 3 ml Aceton getrocknet. Nun wurde der Filter in ein Szintillationsgefäß überführt, 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und für eine Stunde leicht geschwenkt. Die darin enthaltene Radioaktivität wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Als Kontrolle wurden zweimal 5  $\mu$ l des Vormixes (Ansatz ohne DNA) mit Szintillationscocktail vermischt und direkt gemessen.

Um zu überprüfen, ob auch das vollständige Protein synthetisiert wurde, wurden je 40  $\mu$ l der Reaktionsansätze mit 160  $\mu$ l (4 Volumen) Aceton versetzt, für 30 min bei -20°C inkubiert und für 10 min in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 20  $\mu$ l 1x Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95°C inkubiert, so daß die Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden konnten. Um die mit <sup>14</sup>C markierten Syntheseprodukte nachzuweisen, wurde das Gel mit dem Phosphoimager eingelezen.

### 3.6.3 Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

Für die eigentliche Überexpression von Proteinen mußten die pTyb1-Konstrukte zuerst in einen dafür geeigneten Zellstamm transformiert (3.2.9) werden. In dieser Arbeit wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen verwendet, welche OmpT- und Lon-Protease defizient sind.

Zwei Erlenmeyerkolben mit je 500 ml LB-Flüssigmedium (Amp) wurden mit je 5 ml einer Übernacht-Kultur, welche aus einer einzelnen Kolonie des Überexpressionsstammes angezogen wurde, angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 (ungefähr 3 h) wachsen gelassen. Damit die folgende Induktion nicht über einen zu langen Zeitraum erfolgte, wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden durch Zugabe von je 0,048 g IPTG (Isopropylthio-β-D-galactose; 0,4 mM Endkonzentration) induziert und für 10 h bei 18°C geschüttelt (225 rpm). Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 5000xg abzentrifugiert, und die Pellets für mindestens 20 min bei -80°C eingefroren.

Währenddessen wurde die Chitinsäule vorbereitet, indem eine Glassäule mit 17,5 ml Chitin-Beads gefüllt und dann mit 200 ml Column Buffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 8,0, 4°C) gewaschen wurde.

Zum Aufschließen wurden die Zellen durch Vortexen in je 25 ml Cell Lysis Buffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 8,0, 4°C) resuspendiert und 8 x für 1 min auf Eis mit dem Ultraschallstab (4x 5 sek bei voller Leistung) behandelt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß die Zellen ständig gut gekühlt und nicht zu stark erwärmt wurden. Falls notwendig wurde zum besseren Aufschluß zusätzlich Lysozym in einer Endkonzentration von 15 µg/ml zugegeben, und die Zellen für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysate für 30 min bei 12000xg zentrifugiert, wobei vorher und danach jeweils 40 µl als Probe für die Gelelektrophorese abgenommen wurden.

Nun wurde die Chitinsäule im Kühlraum mit dem Überstand bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min beladen. Danach wurde die Säule mit 200 ml Column Buffer mit 2 ml/min gewaschen. Sowohl beim Durchfluß als auch beim Waschen wurden wiederum jeweils 40 µl Probe für die Elektrophorese abgenommen. Um das Abspalten des überexprimierten Proteins von dem Intein-Tag zu induzieren, wurde die Säule mit 60 ml Cleavage Buffer (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 40 mM DTT, pH 8,0) mit maximaler Fließgeschwindigkeit geflusht, wobei ebenfalls wieder 40 µl Probe abgenommen wurde, und anschließend für 48 h bei 4°C inkubiert. Die Elution erfolgte mit Column Buffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Dabei wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt und deren jeweilige Absorption bei 280 nm gemessen. Da die Aufreinigung des überexprimierten Proteins durch die Chitinsäule für die meisten Zwecke ausreichte, war nur ein Austausch des Puffers notwendig. Daher wurden die



gepoolten Proteine mit Hilfe von Ammoniumsulfat gefällt (3.3.3) und anschließend in 20 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA (pH 7,4) wieder gelöst.

### 3.7 EF-Tu Phosphorylierungsassay

#### 3.7.1 Darstellung von 70S Ribosomen

Um 70S Rohribosomen aufzureinigen, wurden *E. coli* MRE600 Zellen (10 ml Flüssigkultur) in der logarithmischen Phase durch Zentrifugation geerntet und in 500 µl Puffer A (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, 1 mM Pefabloc, 2% Lysozym, pH 7,4) gelöst. Das Lysieren der Zellen erfolgte durch 20 x 10 sek Behandlung mit Ultraschall (Sonopuls HD60; Cycle 50, Power 90), wobei die Zellen dazwischen jeweils für 30 sek auf Eis gekühlt wurden. Nicht-lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4000xg abgetrennt, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und erneut für 20 min bei 13000xg zentrifugiert. 400 µl des Überstands (S13) wurden in ein Mini-UZ-Röhrchen überführt und für 20 min in der Airfuge bei 178000xg (95000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet mit den 70S Roh-Ribosomen wurde einmal mit 35 µl Puffer B (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, 1 mM Pefabloc, pH 7,4) gespült und dann in 35 µl Puffer B resuspendiert. Sowohl von dem Überstand als auch von den resuspendierten Ribosomen wurde die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen.

#### 3.7.2 EF-Tu Phosphorylierungsassay

Für den Phosphorylierungsassay wurden verschiedene Stammlösungen angesetzt: Die 70S Ribosomen wurden mit Puffer B auf eine Konzentration von 0,01  $A_{260}/\mu\text{l}$  eingestellt. Die radioaktive ATP-Lösung wurde durch vorsichtiges Mischen von 1,5 mM „kaltem“ ATP in 2x Puffer B und frischer  $\gamma[^{33}\text{P}]$ -ATP-Lösung (10 mCi/ml) im Verhältnis 1:1 hergestellt. Für die EF-Tu-Stammlösung (0,5 mg/ml) wurden 2 µl EF-Tu (10 µg/µl) mit 38 µl Puffer C (60 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTE, 10 µM GDP, 1 mM Pefabloc, 10% Glycerin, pH 7,4) und für die EF-Ts-Stammlösung (0,7 mg/ml) 10 µl EF-Ts (2,6 µg/µl) mit 27 µl Puffer B gemischt. Die eigentliche Phosphorylierung erfolgte in 10 µl Ansätzen, wobei die Reaktion durch Zugabe der ATP-Lösung gestartet wurde:

	<b>Ansatz</b>	<b>Volumen</b>
	10x Puffer B	0,25 $\mu$ l
	EF-Tu-Stammlösung (0,5 mg/ml)	2 $\mu$ l
	EF-Ts-Stammlösung (0,7 mg/ml)	1 $\mu$ l
	70S Rohribosomen (0,01 A <sub>260</sub> /ml)	2,5 $\mu$ l
	ATP- $\gamma$ [ <sup>33</sup> P]-ATP-Lösung	2 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	2,25 $\mu$ l

Die Phosphorylierungsreaktionen wurden für 20 min bei 30°C inkubiert, anschließend sofort auf Eis gestellt und jeweils 10  $\mu$ l 4x Probenpuffer zugegeben. Nun wurden die Proben kurz anzentrifugiert, für 5 min bei 95°C gekocht und nochmals für 60 sek zentrifugiert. Die phosphorylierten und somit radioaktiv markierten Proteine wurden auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe des Phosphoimagers dargestellt.

### 3.7.3 Untersuchung der Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock

Um festzustellen, ob die Phosphorylierung von EF-Tu durch Hitzeschock verstärkt wird, wurden drei 10 ml LB-Kulturen mit einer Übernacht-Kultur *E. coli* MRE600 Zellen angeimpft. Zwei Kulturen davon wurden für 2 h bei 30°C und die dritte bei 37°C unter Schütteln (225 rpm) wachsen gelassen. Anschließend wurde eine der 30°C Kulturen für 20 min bei 42°C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung und der Phosphorylierungsassay erfolgte wie unter 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben.

### 3.7.4 Überprüfung verschiedener Salzbedingungen bei der Aufarbeitung von 70S Rohribosomen

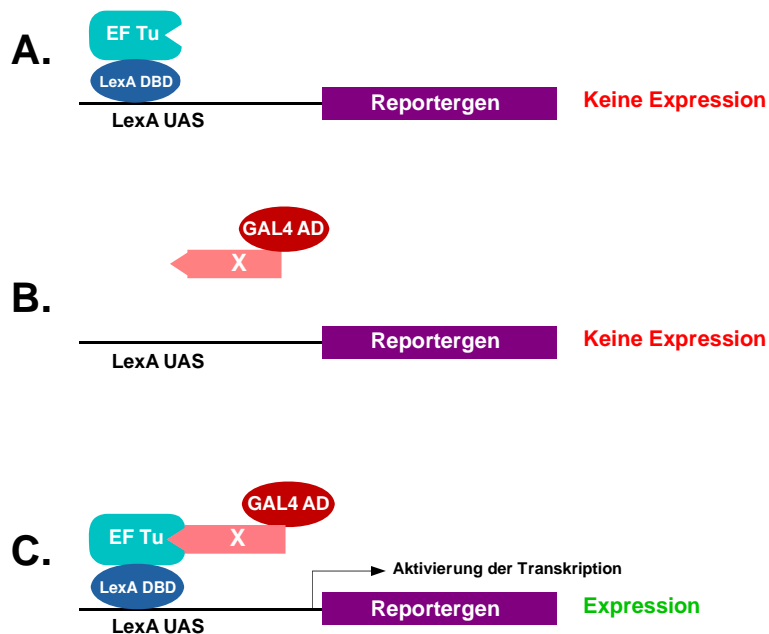
Um die Bindung der EF-Tu-Kinase an das Ribosom bei der Aufreinigung unter verschiedenen Salzbedingungen zu untersuchen, wurde der in der Ribosomenaufarbeitung (3.7.1) verwendete Puffer A entweder durch den Puffer A<sub>M</sub> ohne Mg<sup>2+</sup>-Ionen (20 mM Tris·HCl, 10 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTE, 1 mM Pefabloc, 2% Lysozym, pH 7,4) oder durch den Hochsalz-Puffer A<sub>H</sub> (20 mM Tris·HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM DTE, 1 mM Pefabloc, 2% Lysozym, pH 7,4) ersetzt. Die restliche Durchführung des EF-Tu Phosphorylierungsassays erfolgte wie in den Kapiteln 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben.



## 4 Ergebnisse

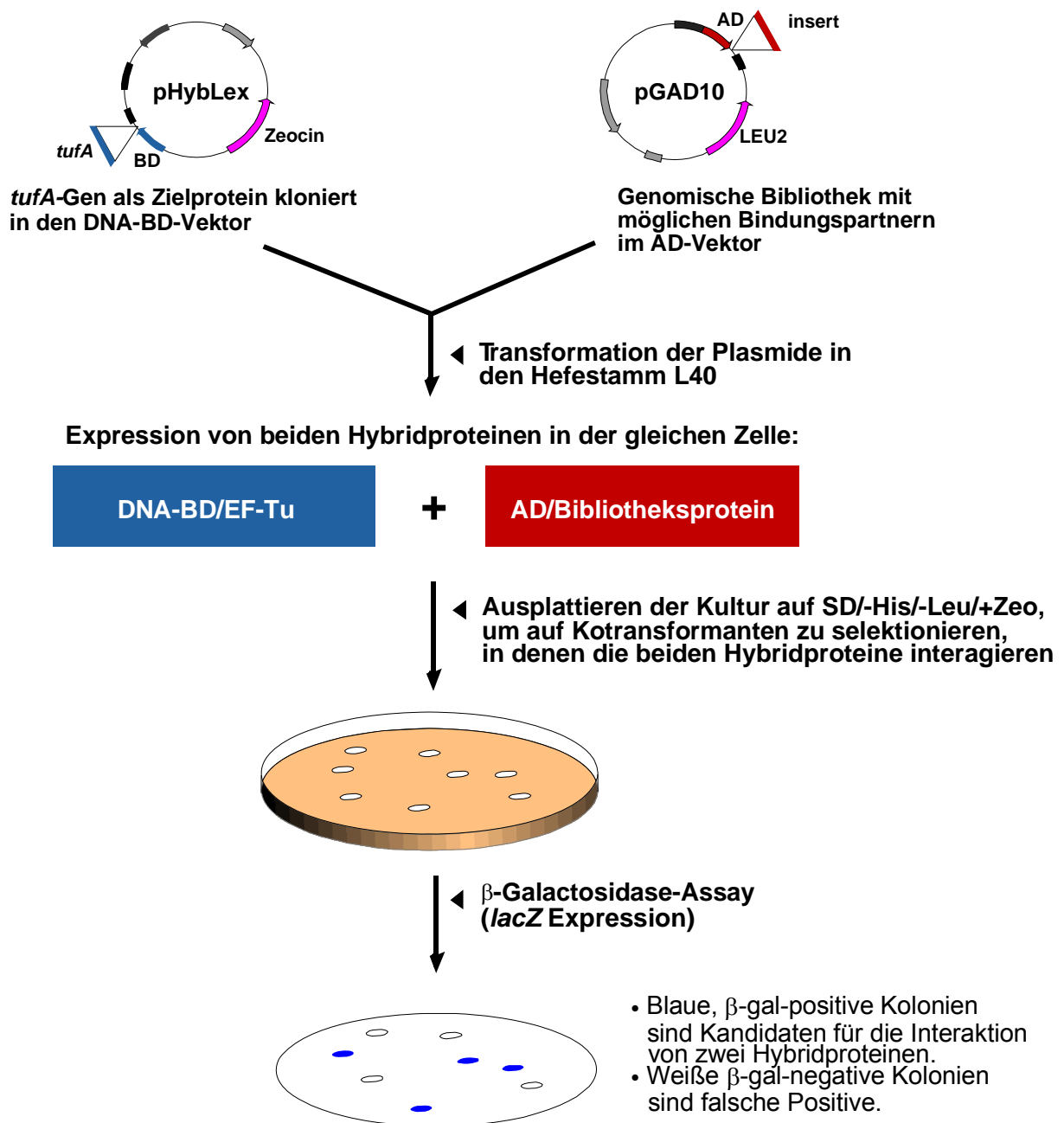
### 4.1 Yeast Two Hybrid

Das sogenannte „Yeast Two Hybrid“ System ermöglicht es, eine Bindung zwischen zwei verschiedenen Proteinen *in vivo* in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* nachzuweisen. Bei diesem System macht man es sich zu Nutze, daß Transkriptionsfaktoren modular aus zwei funktionellen Domänen – einer DNA-bindenden Domäne (DNA-BD), die spezifisch an eine sogenannte Enhancersequenz innerhalb des Promotors bindet, und einer Aktivierungsdomäne (AD), die an den RNA-Polymerase II Komplex bindet und so die Transkription aktiviert – zusammengesetzt sind. So können in einem Two Hybrid Experiment zwei unterschiedliche Proteine auf eine Interaktion hin untersucht werden, indem sie mit jeweils einer der beiden Domänen fusioniert und gemeinsam in einer Zelle exprimiert werden. Und nur, wenn die beiden Fusionsproteine miteinander interagieren, erfolgt eine Expression des durch den Transkriptionsfaktor regulierten Reportergens. Dabei ist es auch möglich, eines der beiden Proteine durch eine ganze Bibliothek zu ersetzen, um neue, noch unbekannte Bindungspartner für ein bekanntes Protein zu finden.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Yeast Two Hybrid Systems.** (A/B) Sowohl der EF-Tu/LexA-DNA-BD Hybrid als auch der Zielprotein/GAL4-AD Hybrid sind alleine nicht in der Lage die Expression des Reportergens zu aktivieren. (C) Nur wenn das Zielprotein mit EF-Tu interagiert, kann die GAL4-AD über die LexA-DNA-BD an dem LexA-Promotor binden und die Transkription des Reportergens aktivieren.

In diesem Fall soll mit Hilfe des Yeast Two Hybrid Systems, eine genomische Bibliothek aus *E. coli* auf neue Bindungspartner von EF-Tu hin untersucht werden. Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Systems ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Für die Durchführung muß zunächst das Gen des zu untersuchenden Proteins – in diesem Fall *tufA* –

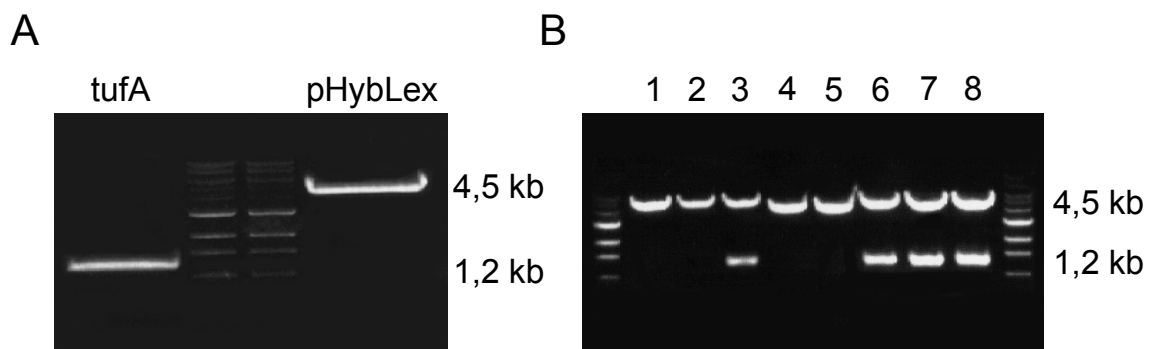


**Abb. 4.2 Übersicht über die Yeast Two Hybrid Versuchsdurchführung.** Als erstes muß das *tufA*-Gen so in den DNA-BD-Vektor (pHybLex / Invitrogen) kloniert werden, daß ein EF-Tu/LexA-DNA-BD-Fusionsprotein korrekt exprimiert wird. Anschließend wird dieses Plasmid zusammen mit einer fertigen genomischen Bibliothek (in pGAD10 / Clontech) in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 transformiert. Die Selektion der Kotretransformanten erfolgt auf Agarplatten mit SD-Minimalmedium ohne Histidin (Selektion auf mögliche Bindungspartner von EF-Tu), ohne Leucin (Selektion auf pGAD10) und mit dem Antibiotikum Zeocin (Selektion auf pHybLex). Zur Überprüfung der so erhaltenen Klone werden die Zellen auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, aufgeschlossen und mit Hilfe eines  $\beta$ -Galaktosidase-Assays genauer untersucht. Die dabei auftretende Blaufärbung ist proportional zur Expression der  $\beta$ -Galaktosidase und somit zur Stärke der Interaktion der beiden Hybridproteine. Bei weißen Kolonien bzw. fehlender Blaufärbung handelt es sich um sogenannte „falsche Positive“, bei denen keine Interaktion zwischen den beiden Hybridproteine stattfindet.

in den DNA-BD-Vektor (pHybLex) kloniert werden. Anschließend wird der Vektor zusammen mit der genomische Bibliothek (kloniert in pGAD10) in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 transformiert. Die Selektion auf die beiden Vektoren erfolgt mit dem Antibiotikum Zeocin (pHybLex) bzw. auf Minimalmedium ohne Leucin (pGAD10). Zur Identifizierung von möglichen Bindungspartnern besitzt der Hefestamm L40 zwei verschiedene Reportergene unter der Kontrolle des LexA-Promotors: *HIS3*, welches ein Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin erlaubt, und *lacZ*, dessen Aktivität mit Hilfe eines  $\beta$ -Galaktosidase-Assays bestimmt werden kann. So kann man einerseits auf die Klone, in denen eine Interaktion stattfindet, selektionieren, während die Intensität der Blaufärbung beim  $\beta$ -Galaktosidase-Assay einen Hinweis auf die Stärke der Bindung gibt. Ein Überblick über die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

#### 4.1.1 Klonierung von *tufA* in pHybLex

Zur Klonierung von EF-Tu in pHybLex mußte zuerst das dafür kodierende Gen *tufA* mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Diese erfolgte in einem Standardansatz mit Pfu-Polymerase. Als Primer wurden Tu-F (forward) und Tu-R (reverse) bei einer Annealingtemperatur von 55°C verwendet. Das PCR-Produkt zeigte auf einem 0,8%-igen Agarosegel, wie erwartet, eine Größe von ~1,2 kb. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe eines präparativen Agarosegels. Anschließend wurden sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor pHybLex einem Doppelverdau mit PstI und PvuII unterzogen. Vektor und Insert wurden wiederum über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt (Abb. 4.3A) und bei einem Überschuß des Inserts von 3:1 in einer Standardligation eingesetzt. Die folgen-



**Abb. 4.3 Klonierung von *tufA* in pHybLex.** (A) Präparatives Agarosegel zur Aufreinigung von Insert (1,2 kb) und Vektor (4,5 kb) nach erfolgtem PstI/PvuII-Verdau. (B) Analytisches Agarosegel zur Überprüfung der Plasmide auf korrekte Inserts. Der Verdau erfolgte ebenfalls mit PstI und PvuII. Von den acht verdauten Plasmiden zeigten vier die erwartete Bande von 1,2 kb und wurden anschließend sequenziert.

de Transformation in superkompetente *E. coli* XL1 blue ergab ausreichend viele Klone. Zur Überprüfung wurde von acht dieser Klone eine Plasmid-Minipräparation gemacht und einem Restriktionsverdau mit PstI und PvuII unterzogen (siehe Abb. 4.3B). Vier davon enthielten ein Insert in der passenden Größe und wurden zur weiteren Kontrolle zusätzlich sequenziert. Alle vier Sequenzen zeigten jedoch einen identischen Einschub von fünf Basen (TACAG) innerhalb der 5'-Klonierungsstelle, welcher den Leserahmen des Hybridgens zerstört.

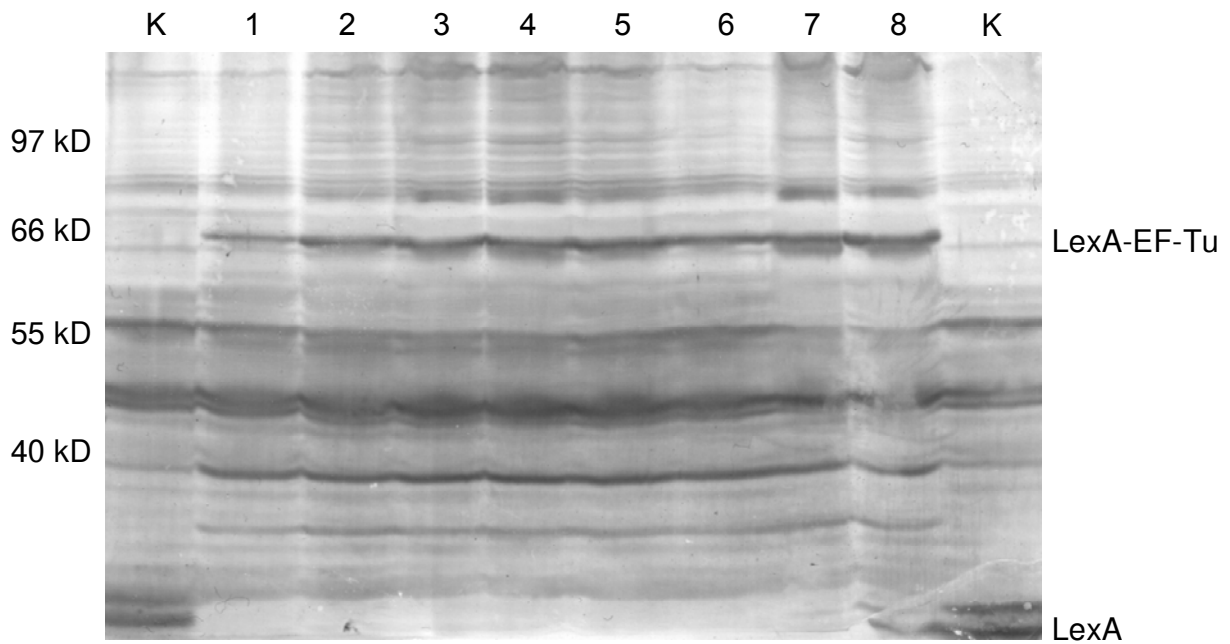
So war es notwendig, das Insert auf einem der Klone mit PstI und PvuII wieder auszuschneiden und auf gleiche Weise wie zuvor erneut in pHybLex zu klonieren. Die Transformation in *E. coli* XL1 blue ergab ausreichend viele Klone, von denen wiederum sechs überprüft wurden. Alle sechs Klone enthielten das Insert in korrekter Länge. Drei davon wurden zur Überprüfung sequenziert, wobei diesmal alle drei Sequenzen in Ordnung waren.

#### **4.1.2 Transformation von pHybLex-*tufA* in *Saccharomyces cerevisiae* L40**

Bei der Transformation von pHybLex-*tufA* in den Hefestamm L40 wurde zuerst versucht, die denaturierte Heringssperma DNA durch denaturierte genomische DNA aus *E. coli* zu ersetzen. Jedoch konnten auf diese Weise keine positiven Klone gewonnen werden.

Unter Verwendung von denaturierter Heringssperma DNA funktionierte die Transformation ohne Probleme. Dabei wurden zwei verschiedene Klone der zuvor erzeugten pHybLex-*tufA* Plasmide und zusätzlich pHybLex ohne Insert als Kontrollplasmid in *S. cerevisiae* L40 transformiert. Bei diesem Ansatz funktionierte die Transformation ohne Probleme, so daß jeweils ungefähr 500 Kolonien pro Agarplatte gewachsen sind.

Anschließend mußte noch überprüft werden, ob die transformierten Hefezellen auch, wie erwartet, das LexA-EF-Tu Fusionsprotein exprimieren. Dafür wurden von den jeweils 500 gewachsenen Kolonien je vier, sowie zwei aus der Kontrolltransformation gepickt und davon Übernacht-Kulturen angesetzt. Die Zellen wurden in Cracking Buffer aufgeschlossen, die so erhaltenen Gesamtproteinextrakte auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf das Vorhandensein des LexA-EF-Tu Fusionsproteins hin untersucht. Sowohl mit Anti-EF-Tu als auch mit Anti-LexA (jeweils aus Kaninchen) als primärem Antikörper waren auf dem Western Blot starke Hintergrundsignale zu erkennen, so daß LexA-EF-Tu und LexA nur anhand ihrer Größe identifiziert werden konnten. Dabei zeigten alle acht untersuchten Klone die korrekte Größe des LexA-EF-Tu Fusionsproteins von ca. 68 kDa (Abb. 4.4), sowie die beiden LexA Klone die erwartete Größe von ca. 26 kDa.



**Abb. 4.4 Western Blot zur Überprüfung der Transformation von pHybLex-*tufA* in *S. cerevisiae* L40.** Die beiden äußeren Spuren (K) zeigen die zur Kontrolle mit pHybLex transformierten Hefeextrakte, während auf den Spuren 1-8 die Extrakte der mit pHybLex-*tufA* transformierten Klone 1 bis 8 zu sehen sind. Alle acht mit pHybLex-*tufA* transformierten Klone zeigen das gleiche Bandenmuster: So ist das Fusionsprotein LexA-EF-Tu als Bande bei ungefähr 66 kDa zu erkennen. Des weiteren sind Fragmente des Fusionsproteins bei 35 und 40 kDa zu sehen. Die Kontrolle zeigt jeweils die Bande von LexA bei ungefähr 26 kDa. Als primärer Antikörper wurde hier Anti-LexA (polyklonal) aus Kaninchen verwendet.

Des weiteren mußte noch überprüft werden, ob die LexA-EF-Tu produzierenden Hefezellen aufgrund einer zufälligen Mutation auf dem Selektionsmedium (ohne Histidin) wachsen. Dafür wurden von jedem Klon 100 µl der Übernacht-Kultur auf SD-H Z300 Medium ausplattiert und für mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Von den acht Klonen wuchsen bei zweien (Klon 1 und Klon 5) jeweils zwei Kolonien und bei einem (Klon 3) eine Kolonie. Bei den anderen Klonen war kein oder nur äußerst geringes Wachstum zu erkennen, in keinen Fall jedoch war eine Koloniebildung zu beobachten.

Als letztes mußte noch überprüft werden, ob die Zellen bei dem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eine unerwartete Blaufärbung zeigen. Hierfür wurde jeweils ein Nitrocellulosefilter auf Kolonien der einzelnen Klone gelegt, die Zellen so abgeklatscht und einem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay unterzogen. Bei keinem der acht untersuchten Klonen, sowie bei den Kontrollzellen war eine Blaufärbung zu erkennen.

Für die Fortführung des Yeast Two Hybrid Ansatzes wurde Klon 4 ausgewählt, da dieser das geringste Wachstum auf dem Selektionsmedium aufwies, sowie auf dem Western Blot eine ausreichend starke LexA-EF-Tu Bande zeigte.



### 4.1.3 Transformation der genomischen *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA*

Für die Transformation der genomischen *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA* mußte das Transformationsprotokoll dem größeren Maßstab angepaßt werden. Um dabei eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, wurden die Zellen nach erfolgter Transformation zur Regeneration für eine Stunde in YPAD-Vollmedium und anschließend zur ersten Selektion über Nacht in SD-L Z300 Medium wachsen gelassen. Zur Überprüfung der Transformation wurde vor und nach der ersten Selektion jeweils eine Verdünnung der Zellen von  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  bzw.  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  auf SD-L Z300 Agarplatten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. So konnte durch Auszählung der Kolonien die Transformationsrate, sowie die Teilungsrate bei der Übernacht-Inkubation genau bestimmt werden (siehe Tab. 4.1). Bei dieser Transformation betrug die Gesamtanzahl an Transformanten, welche ein pGAD10 Plasmid der genomischen Bibliothek aufgenommen hatten, ca.  $6 \cdot 10^7$ , wobei sich die Zellen über Nacht ungefähr verzwanzigfacht hatten. Die eigentliche Selektion auf positive Klone erfolgte durch Ausplattieren der Zellen auf SD-HL Z300 Agarplatten mit bzw. ohne den Zusatz von 3-Aminotriazol, welches das Wachstum bei schwachen oder unspezifischen Interaktionen zwischen den beiden Hybridproteinen unterdrückt. Nach mehreren Tagen Inkubation bei 30°C wuchsen insgesamt 156 His<sup>+</sup> Kolonien, die mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays weiter untersucht wurden. Im Gegensatz dazu wuchsen auf den Agarplatten mit 3-Aminotriazol keine Kolonien.

**Tab. 4.1 Auszählung der Transformanten.**

Verdünnung	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Transformanten
Kolonien vor ÜN-Inkubation	ca. 500	61	n.d.	$6,1 \cdot 10^7$
Kolonien nach ÜN-Inkubation	n.d.	120	8	$1,2 \cdot 10^9$

### 4.1.4 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay

Um sogenannte falsch-positive Klone, die z.B. durch zufällige Mutationen entstehen können, ausschließen zu können, mußte die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assays nachgewiesen werden. Durch die Intensität der bei dem Assay entstehenden Blaufärbung kann so auch die Stärke der Interaktion zwischen den beiden Hybridproteinen abgeschätzt werden. Für den Assay wurden je 52 der zu untersuchenden Klone in einem Gitter auf jeweils zwei SD-HL Z300 Agarplatten ausgestrichen. Die zweite Agarplatte diente

dabei als Sicherheit für weitere Untersuchungen bzw. für die anschließende Plasmidisolierung oder Kolonie-PCR.

Die ausgestrichenen Zellen wiesen jedoch nach längerem Wachstum eine rötliche Färbung, sowie eine zähe Konsistenz auf. Dadurch war es nicht möglich, alle Klone auf Nitrocellulosemembran zu übertragen und so ein auswertbares Ergebnis zu erzielen. Insgesamt konnten nur 52 der 156 His<sup>+</sup> Klone mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay untersucht werden, von denen wiederum nur 15 eine deutliche Blaufärbung zeigten. Klone, die eine schwächere Blaufärbung zeigten, wurden dabei nicht berücksichtigt. Die 15 His<sup>+</sup>/LacZ<sup>+</sup> Klone wurden anschließend auf ein in dem pGAD10-Vektor enthaltenes Insert hin untersucht (siehe 4.1.7).

#### 4.1.5 Transformation der genomischen *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA* 2 (Wiederholung)

Aufgrund der Probleme bei der Auswertung des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays im ersten Versuch, wurde die Transformation der genomischen Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA* zur Sicherheit wiederholt. Das Durchführungsprotokoll wurde im Vergleich zur ersten Transformation nur geringfügig verändert. Es wurde lediglich auf die Verwendung von 3-Aminotriazol in den Selektionsplatten verzichtet. Die bei diesem Versuch bestimmten Transformationsraten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. An den Werten ist zu erkennen, daß die Transformation bei diesem Ansatz mit  $1,2 \cdot 10^7$  Transformanten nicht so effizient verlief wie im ersten Versuch. Bei der Übernacht-Inkubation haben sich die Zellen wie bei der ersten Transformation ungefähr verzwanzigfacht. Die Selektion auf SD-HL Z300 Agarplatten ergab dieses Mal insgesamt 122 His<sup>+</sup> Kolonien.

**Tab. 4.2 Auszählung der Transformanten.**

Verdünnung	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Transformanten
Kolonien vor ÜN-Inkubation	122	26	n.d.	$1,2 \cdot 10^7$
Kolonien nach ÜN-Inkubation	n.d.	27	3	$2,7 \cdot 10^8$

#### 4.1.6 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay 2 (Wiederholung)

Um die Probleme bei der Übertragung der Zellen auf Nitrocellulosemembran durch die zähe Konsistenz nach längerem Wachstum zu vermeiden, wurde dieses Mal darauf geachtet, daß die Zellen rechtzeitig, spätestens nach zwei bis drei Tagen Wachstum bei 30°C auf die Membran übertragen wurden. So konnten fast alle His<sup>+</sup> Klone auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität getestet werden. Von diesen Klonen zeigten 65 eine sichtbare Blaufärbung, während in die-

sem Fall auch Klone berücksichtigt wurden, deren Blaufärbung etwas schwächer ausgeprägt war.

In den beiden durchgeführten Yeast Two Hybrid Ansätzen wurden somit insgesamt 80 verschiedene His<sup>+</sup>/LacZ<sup>+</sup> Klone gefunden. Von diesen Klonen mußte nun das pGAD10-Plasmid extrahiert und dessen Insert identifiziert werden.

#### **4.1.7 Plasmidisolierung aus den His<sup>+</sup>/LacZ<sup>+</sup> Hefezellen**

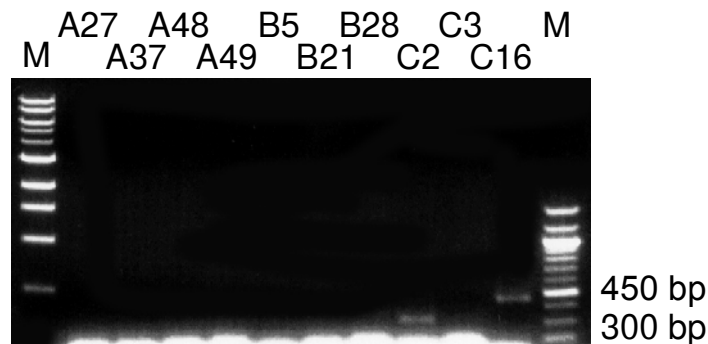
Um das für die Interaktion mit EF-Tu verantwortliche Fusionsprotein identifizieren zu können, mußte zuerst das in dem pGAD10-Plasmid enthaltene Insert, welches für das Fusionsprotein kodiert, vervielfältigt werden. Dafür wurden zuerst von 12 der positiven Klone Übernachtskulturen angesetzt und aus den Zellen mit Hilfe eines Standardprotokolls für Hefen (3.4.7) Plasmidpräparationen durchgeführt. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte klassisch mit einer Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung.

Da es sich bei den isolierten DNAs um eine Mischung zweier Plasmide verunreinigt mit genomischer DNA handelte, mußten die jeweiligen Inserts mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt werden. Als Primer wurden pGAD10-F und pGAD10-R (2.5.1) verwendet, die in der Sequenz identisch zu den von Clontech für die Amplifizierung des Inserts angegebenen PCR-Primern sind. Trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen und Magnesium-Konzentrationen konnte von keiner der 12 verschiedenen DNA-Präparationen ein PCR-Produkt gewonnen werden. Da diese Methode für das weitere Vorgehen nicht sonderlich erfolgsversprechend erschien, wurde eine direktere Methode zur Amplifizierung des Inserts ausgesucht – die Kolonie-PCR.

#### **4.1.8 Kolonie-PCR**

Aufgrund der Schwierigkeiten ein PCR-Produkt von der aus den positiven Klonen gewonnenen Plasmid-DNA zu gewinnen, sollte mit der Kolonie-PCR eine direktere Methode zum Erfolg führen. In der Kolonie-PCR werden statt der aufgereinigten DNA Zellen bzw. eine „Kolonie“ als Template eingesetzt. Durch eine deutlich längere Denaturierungsphase zu Beginn der PCR werden hier die Zellwände aufgebrochen, so daß die in den Zellen enthaltene DNA freigesetzt wird und für die PCR-Reaktion zur Verfügung steht. Das PCR-Programm wurde zusätzlich auf die verwendeten Primer – pGAD10-F und pGAD10-R – angepaßt, die Magnesiumkonzentration leicht erhöht, sowie die Anzahl der Zyklen auf 35 erhöht.

In diesem Fall wurden alle 80 His<sup>+</sup>/LacZ<sup>+</sup> Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR untersucht. Allerdings konnten nur von 10 dieser 80 Klone PCR-Produkte erhalten werden. Um zu überprüfen, ob das Ergebnis reproduzierbar war, wurden 30 der Klone erneut einer Kolonie-PCR unterzogen. Dabei wurde die Annealingtemperatur auf 55°C gesenkt, und die Anzahl der Zyklen weiter auf 40 erhöht, so daß eigentlich weitere PCR-Produkte zu erwarten waren. Trotzdem konnten keine weiteren PCR-Produkte aus den Klonen erzeugt werden, die bisher vervielfältigten Inserts konnten dafür ohne Probleme reproduziert werden. Ein Beispiel für ein Agarosegel, auf dem 10 der Kolonie-PCRs aufgetragen wurden, ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die gewonnenen PCR-Produkte besaßen jeweils eine Größe zwischen 300 bp und 1100 bp.



**Abb. 4.5 Beispiel für ein Agarosegel zur Überprüfung von Kolonie-PCRs.** Aufgetragen wurden 10 verschiedene Kolonie-PCRs, von denen nur zwei ein Produkt ergaben: Klon C2 mit ca. 300 bp und Klon C16 mit ca. 450 bp.

#### 4.1.9 Sequenzierung und Analyse der PCR-Produkte

Um die in 4.1.8 erhaltenen PCR-Produkte sequenzieren zu können, mußte von diesen zuerst mehr Material gewonnen werden. Dafür wurden die PCR-Produkte über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und jeweils mit einer erneuten PCR weiter vervielfältigt. Die neuen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Aufreinigungs-Kits von störenden Salzen befreit und zum Sequenzieren zu SEQLAB nach Göttingen geschickt. Als Primer für die Sequenzierung wurde Gal4AD-SP verwendet.

Die Auswertung der Sequenzen bzw. die Identifizierung der potentiellen Bindungspartner erfolgte im Internet auf der Seite des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit Hilfe des „blastn“ Programms. Weiterhin mußte natürlich bestimmt werden, ob die identifizierten Gene auch im richtigen Leserahmen liegen. Abhängig von den Leserahmen konnten dann auch die exprimierten Fusionsproteine bestimmt und mit dem „blastp“ Programm im

Internet gegen eine Datenbank abgeglichen werden. Das Ergebnis der Auswertung ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Von den 10 sequenzierten Klonen sind jedoch nur zwei der kodierten Proteine innerhalb des richtigen Leserahmens mit der GAL4-AD fusioniert, so daß ein korrektes Fusionsprotein exprimiert wird. Das Insert von Klon C4 konnte als *yggP* identifiziert werden, welches anhand von Sequenzvergleichen vermutlich für eine L-Sorbose-1-phosphatreduktase – einem Enzym des L-Sorbose-Metabolismus – kodiert. Die Sequenz des Inserts von Klon B43 liegt innerhalb eines Insertionselements IS5 und scheint nicht für ein spezifisches Gen zu kodieren. Ein Sequenzvergleich des theoretisch exprimierten Proteins mit der Datenbank zeigte jedoch, daß es sich hier wahrscheinlich um ein 40 Aminosäuren langes Protein (*b2191*) ohne bekannte Funktion handelt.

Die Sequenzen der restlichen Klone konnten ohne Probleme jeweils einem entsprechenden Gen zugeordnet werden. Allerdings besitzen sie entweder einen Frameshift im Leserahmen des Fusionsproteins oder sitzen in der verkehrten Richtung im Fusionsvektor, so daß das exprimierte Fusionsprotein nicht dem von diesem Gen kodierten Protein entspricht. So konnte nur noch überprüft werden, ob nicht aus Zufall eine interessante Protein- oder Peptidsequenz exprimiert wird. Überraschenderweise zeigte eine dieser Proteinsequenzen im Datenbankvergleich eine Ähnlichkeit zu einem anderen Protein: Das von Klon C7 exprimierte Protein besitzt eine sehr starke Übereinstimmung (89%) mit einem möglichen Genprodukt (Z3962) von *Escherichia coli* O157:H7, dessen Funktion jedoch ebenfalls unbekannt ist.

Von den identifizierten Genen kommt genauer betrachtet keines für die Funktion der EF-Tu-Kinase in Frage. Daher mußte eine andere Möglichkeit gefunden werden, die EF-Tu-Kinase zu identifizieren.

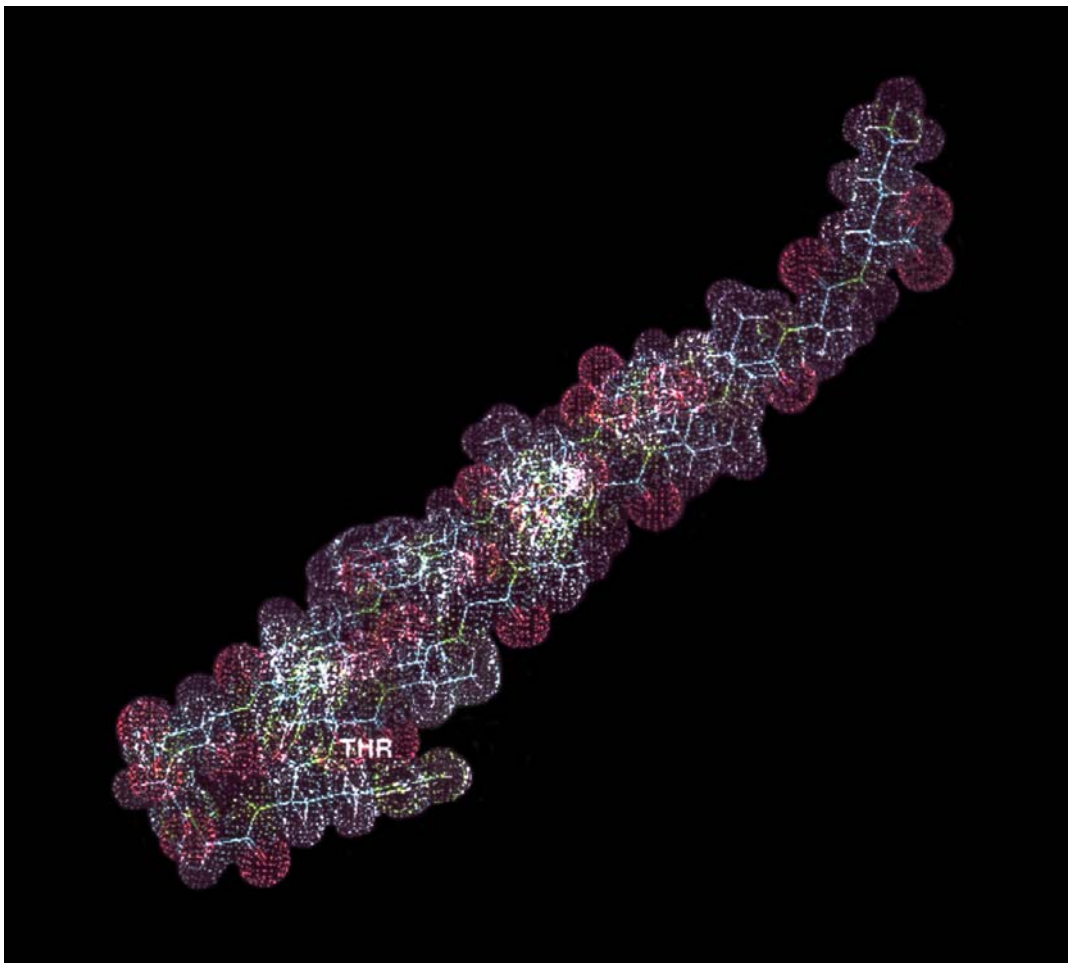
**Tab. 4.3 Auswertung der Sequenzen der PCR-Produkte.** Von den 10 sequenzierten Klonen sind drei – B11, C2 und C6 – identisch. Nur die Inserts der Klone B43 und C4 liegen innerhalb des richtigen Leserahmens (+) und werden korrekt exprimiert. Bei den Klonen S3, S4 und C7 existiert ein Frameshift um zwei Basen (+2) innerhalb Fusionsproteins. Dagegen sitzen die Inserts der Klone B11, C2, C6, C10 und C16 in verkehrter Richtung (–) im AD-Vektor pGAD10 liegen.

Klon	Gen	Größe	Funktion	RF
S3	<i>phoQ</i>	600 bp	Sensorkinase	+2
S4	<i>yehU</i>	500 bp	mögliche Sensorkinase	+2
B11	<i>b2931</i>	300 bp	mögliche NAD(P) bindende Dehydrogenase	–
B43	<i>is5/b2191</i>	1000 bp	unbekannt	+
C2	<i>b2931</i>	300 bp	identisch mit Klon B11	–
C4	<i>yggP</i>	650 bp	mögliche L-Sorbose-1-phosphatreduktase	+
C6	<i>b2931</i>	300 bp	identisch mit Klon B11	–
C7	<i>gabP</i>	900 bp	Gamma-Aminobutyrat-Permease	+2
C10	<i>mfd</i>	1050 bp	Transcription-repair coupling factor	–
C16	<i>cycA</i>	450 bp	Serin/Alanin/Glycin APC Transporter	–

## 4.2 Affinitätschromatographie

Der Versuch die EF-Tu-Kinase mit Hilfe des Yeast Two Hybrid Systems zu identifizieren, erbrachte nicht das erhoffte Ergebnis, d.h. einen potentiellen Kandidaten, der für die Phosphorylierung von EF-Tu in Frage kommt. Daher sollte ein neuer Ansatz mehr Erfolg versprechen. Eine vielversprechende Methode zur Isolierung der EF-Tu-Kinase ist die Affinitätschromatographie über ein auf eine Säule gebundenes Substratpeptid. Literaturrecherchen im Internet ergaben mehrere Beispiele für die Aufreinigung von Proteinkinasen über Substratpeptide<sup>99,100</sup>. Für die Aufreinigung der EF-Tu-Kinase wurde in diesem Fall ein Protokoll zur Aufreinigung der p70-S6-Kinase aus einer neueren Veröffentlichung<sup>101</sup> adaptiert.

Um diesen Versuch durchführen zu können, müssen jedoch einige Vorbereitungen getroffen werden. Ein für die Affinitätschromatographie geeignetes Substratpeptid war durch vorhergehende Experimente von Thomas Plath (nicht veröffentlicht) bereits vorhanden. Bei dem Sub-



**Abb. 4.6 Dreidimensionale Struktur des Substratpeptids (371-389).** Die am Computer berechnete Struktur des Substratpeptids der EF-Tu-Kinase. Es besteht aus den Aminosäuren 371 bis 389 von EF-Tu ergänzt um ein Leucin. Das phosphorylierbare Threonin 383 ist gekennzeichnet.

stratpeptid handelt es sich um ein 20-mer der Aminosäuren 371 bis 389 von EF-Tu ergänzt um ein Lysin. Eine theoretisch berechnete Struktur des Substratpeptids ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Im Rahmen der von Thomas Plath durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, daß dieses Peptid an die EF-Tu-Kinase bindet und die Phosphorylierung von EF-Tu kompetitiv inhibiert. Um die Affinitätschromatographie durchführen zu können, muß das Substratpeptid zuerst an ein geeignetes Trägermaterial gekoppelt, und damit dann eine passende Säule gepackt werden. Da die Interaktion zwischen einer Kinase und einem an diese bindenden Substratpeptid mit einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10 bis 30  $\mu\text{M}$  nicht besonders stark ist, muß die EF-Tu-Kinase vorher möglichst weit aufgereinigt werden. Bisher ist es nicht gelungen, die EF-Tu-Kinase weiter aufzureinigen als an Rohribosomen assoziiert, ohne daß dessen Funktion verloren geht. Daher soll eine Proteinextraktion aus Rohribosomen als Probe zum Auftrag auf die Affinitätssäule dienen. Außerdem muß die Elution der gebundenen Proteine über einen exakten Salzgradienten erfolgen, damit die Proteine ihrer Bindungsstärke entsprechend eluiert werden. Die gefundenen Proteine sollen dann auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden.

#### **4.2.1 Vorbereitung der Substratpeptidsäule**

Um die Affinitätschromatographie durchführen zu können, mußte zuerst das Substratpeptid auf das Säulenmaterial gekoppelt werden. Als Säulenmaterial wurde aktivierte CH-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) verwendet, da es eine Kopplung unter sehr milden Reaktionsbedingungen (pH 8,0) zuläßt. Außerdem wird hier das Peptid über einen Spacer aus acht Atomen (6-Aminohexansäure) mit der Sepharose kovalent gebunden, so daß das Peptid für bindende Proteine frei zugänglich bleibt. Insgesamt wurden für 1 ml Säulenmaterial 9 mg des Substratpeptids eingesetzt. Um die verbliebenen reaktiven Gruppen nach der Kopplung zu inaktivieren, wurden diese mit Ethanolamin blockiert (3.5.1). Anschließend wurde mit dem fertigen Säulenmaterial eine HR 5/5 FPLC-Säule (1 ml) beladen.

#### **4.2.2 Aufreinigung von Proteinen aus Rohribosomen**

Um die Proteine aus Rohribosomen aufzureinigen zu können, mußten zuerst komplette 70S Ribosomen durch differentielle Zentrifugation aus den Zellen gewonnen werden. Dafür wurden insgesamt 30 g *E. coli* MRE600 Zellen durch Verreiben mit Aluminiumoxid aufgeschlossen und zum Abtrennen des Aluminiumoxids und der Zellreste zwei mal mit 8000xg zentrifugiert.

Die Ribosomen wurden über Nacht mittels Ultrazentrifugation bei 40000xg abzentrifugiert und anschließend wieder in Puffer resuspendiert. Um die ribosomalen RNAs von den Proteinen abzutrennen, wurden sie durch Zugabe von Essigsäure und Magnesiumacetat ausgefällt und abzentrifugiert. Für die weitere Aufreinigung wurden die Proteine mit Aceton gefällt und in einem Puffer mit 6 M Harnstoff aufgenommen. Da diese Aufarbeitung eine Denaturierung der Proteine bewirkt, mußten diese vor der Affinitätschromatographie wieder renaturiert werden. Dies geschah durch dreimalige Dialyse gegen eine Puffer ohne Harnstoff. Als die Proteinlösung begann, trüb zu werden, wurde die Dialyse abgebrochen, und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert. Die aufgereinigten Proteine wurden in zwei Proben aufgeteilt und in der Affinitätschromatographie eingesetzt.

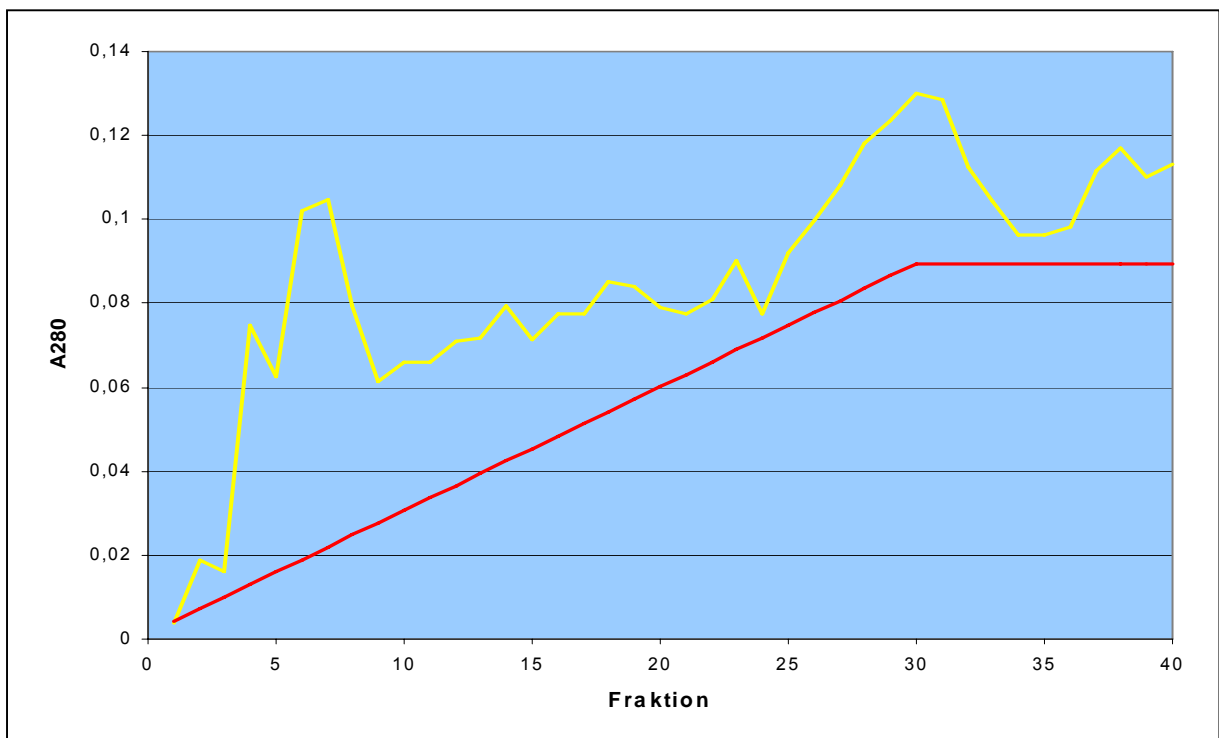
#### 4.2.3 Affinitätschromatographie (Versuch 1)

Bevor die Probe auf die Säule aufgetragen werden konnte, mußte die Säule mit 200 ml Niedrigsalz-Puffer A (0 M NaCl) gespült werden, um restliches ungebundenes Substratpeptid wegzuwaschen, und die Säule zu äquillibrieren. Als Probe wurden 10 ml der aufgereinigten Proteine verdünnt in 200 ml Puffer A auf die Säule aufgetragen und solange mit Puffer A gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm sich nicht mehr änderte. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen Salzgradienten, bei dem die Salzkonzentration über ein Volumen von 30 ml langsam von 0 M auf 1,5 M erhöht wurde. Dabei werden die Proteine entsprechend ihrer Bindungsstärke eluiert, d.h. je höher die Salzkonzentration bei der Elution desto stärker die Bindung des eluierten Proteins.

Über den gesamten Lauf hinweg wurde die Absorption bei 280 nm der von der Säule eluierten Fraktionen aufgezeichnet. So war es prinzipiell möglich, die Elution der gebundenen Proteine genau zu verfolgen. Jedoch wurde die Aufzeichnung der Absorption durch Luftblasen in der Meßzelle des Photometers gestört, so daß kein auswertbares Elutionsprofil aus diesem Lauf erhalten werden konnte. Aus diesem Grund mußten die gesammelten Fraktionen zusätzlich in einem externen Photometer von Hand vermessen werden. Das so erhaltene Elutionsprofil ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Über die gesamte Elution hinweg ist hier ein leichter Anstieg der Absorption zu erkennen, der von einer leicht höheren Absorption des für den Gradienten verwendeten Hochsalz-Puffers B (1,5 M NaCl) herrührt. Des weiteren sind zwei deutliche Peaks zu erkennen: zum einen ein Peak zwischen 0 und 0,5 M NaCl (Fraktionen 4 bis 9) und zum anderen ein etwas schwächerer Peak zwischen 1,25 und 1,5 M NaCl (Fraktionen 25 bis 30).



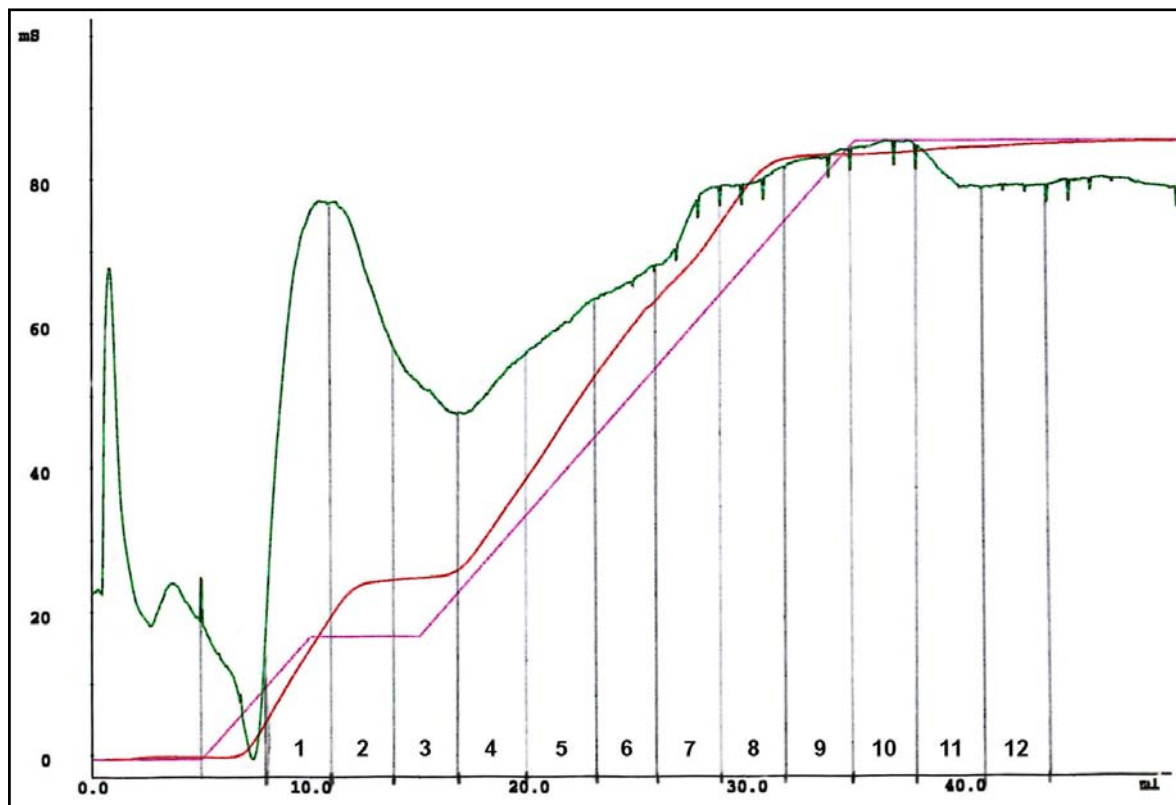
Um die in den eluierten Fraktionen enthaltenen Proteine identifizieren zu können, wurden je 20 µl der Fraktionen 7, 11, 15, 19, 23, 27, 30, 31 und 38 auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (nicht abgebildet). Jedoch waren die Proteinkonzentrationen in den Proben zu gering, um durch Anfärbung des Gels mit Coomassie deutliche sichtbare Banden zu erzeugen. Nur bei Fraktion 7 waren mehrere sehr schwache Banden zu erkennen. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen 25 bis 28, 29 bis 31 und 32 bis 35 jeweils gepoolt, und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe von Aceton gefällt. Anschließend wurden die gefällten Proteine in je 30 µl Probenpuffer wieder resuspendiert und auf einem 10%igen SDS-Minigel (nicht abgebildet) aufgetrennt. Die Färbung des Gels mit Coomassie zeigte in diesem Fall bei allen drei Proben zwei schwache Banden mit Größen von ungefähr 26 kDa und 95 kDa, wobei die Banden bei dem Pool der Fraktionen 25 bis 28 am stärksten waren. Da die Banden für die Dokumentation zu schwach waren, wurden sie ausgeschnitten und zur Identifizierung mittels MALDI-MS an Dr. Mathias Dreger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hucho übergeben.



**Abb. 4.7 Elutionsprofil der Affinitätschromatographie.** Die gelbe Kurve zeigt die Absorption bei 280 nm der von Säule eluierten Fraktionen. In rot ist die theoretische Basislinie des Salzgradienten von 0 bis 1,5 M NaCl über die Fraktionen 1 bis 30 dargestellt. Der Anstieg in der Absorption des Elutionspuffers begründet sich in der geringfügig höheren Absorption des für die Elution verwendeten Hochsalzpuffers B (1,5 M NaCl):  $A_{280} \approx 0,89$ . Im dem hier dargestellten Elutionsprofil (gelb) sind zwei deutliche Peaks zu erkennen: (1) Fraktion 4 – 9; (2) Fraktion 25 – 35.

#### 4.2.4 Affinitätschromatographie (Versuch 2)

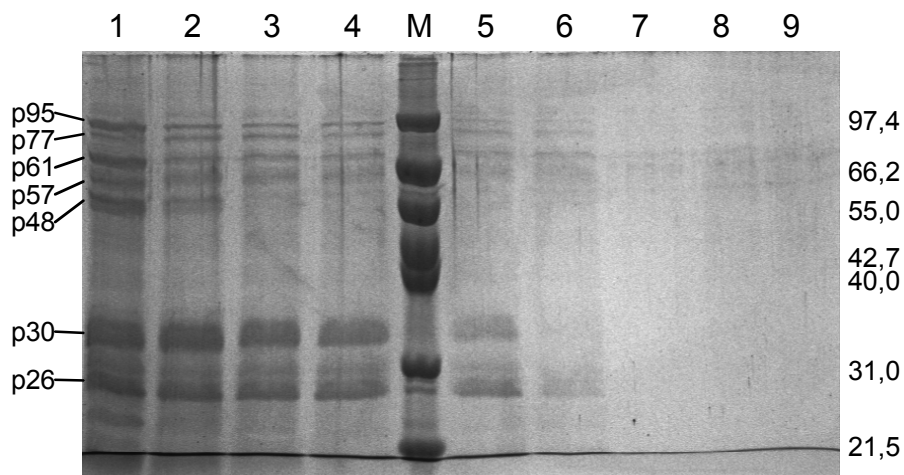
Beim ersten Versuch der Affinitätschromatographie zeigten sich mehrere kleine Probleme in der Durchführung. Daher wurden im zweiten Versuch einige Modifikationen zur Optimierung vorgenommen. Aufgrund der Probleme mit den Luftblasen in der Meßzelle des Photometers wurde ein Entgaser an die FPLC angeschlossen, so daß beide für den Gradienten verwendete Puffer vor der Einspeisung entgast werden. Zusätzlich wurde in diesem Lauf die aufgetragene Probenmenge auf 15 ml erhöht, um so möglichst eine größere Menge an Proteinen auf der Säule binden zu können. Gleichzeitig erfolgte die Elution in diesem Versuch über einen Stufengradienten. Dabei wurde die Salzkonzentration wie im ersten Versuch über ein Volumen von 30 ml von 0 M auf 1,5 M erhöht, bei einer Konzentration von 0,3 M NaCl jedoch über ein Volumen von 5 ml konstant gehalten. Durch die Stufe innerhalb des Gradienten sollen unspezifisch gebundene Proteine verstärkt von der Säule gewaschen, und so die Auftrennung verbessert werden.



**Abb. 4.8 Elutionsprofil der zweiten Affinitätschromatographie.** In grün ist die Absorption bei 280 nm dargestellt. Zusätzlich ist der Gradient in rosa, sowie die Leitfähigkeit des Puffers in rot dargestellt. Der Anstieg der Absorption (grün) über die Elution hinweg liegt wie in 4.2.3 an der unterschiedlichen Absorption der beiden verwendeten Puffer. Zu erkennen sind wiederum zwei deutliche Peaks: (1) 8 – 16 ml; (2) 28 – 38 ml. Die Leitfähigkeit (rot) zeigt wie erwartet einen Verlauf, welcher dem Anstieg der Salzkonzentration und somit dem Gradienten (rosa) entspricht. Weiterhin ist die Einteilung der gepoolten Fraktionen (1 – 12), bei der jeweils drei Fraktionen gepoolt, und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe von Aceton aufkonzentriert wurden.

Im Gegensatz zum ersten Versuch verlief die Affinitätschromatographie dieses Mal ohne größere Probleme, so daß alle Parameter vollständig aufgezeichnet werden konnten. Das Elutionsprofil (siehe Abb. 4.8) entspricht im Verlauf ungefähr dem der ersten Affinitätschromatographie. Es sind erneut zwei deutliche Peaks zu erkennen: zum einen zwischen 0 und 0,4 M (Fraktionen 4-12), sowie zwischen 1 und 1,5 M (Fraktionen 23-35) NaCl. Dabei ist der zweite Peak allerdings etwas flacher und breiter als bei der ersten Affinitätschromatographie. Neben der Absorption bei 280 nm wurde auch die Leitfähigkeit des Eluats aufgezeichnet. Wie erwartet stimmt der Verlauf der Leitfähigkeit recht genau mit dem Gradienten überein (Abb. 4.8). Daher kann davon ausgegangen werden, daß der Salzgradient bei der Elution ungefähr dem geplanten Verlauf entsprach.

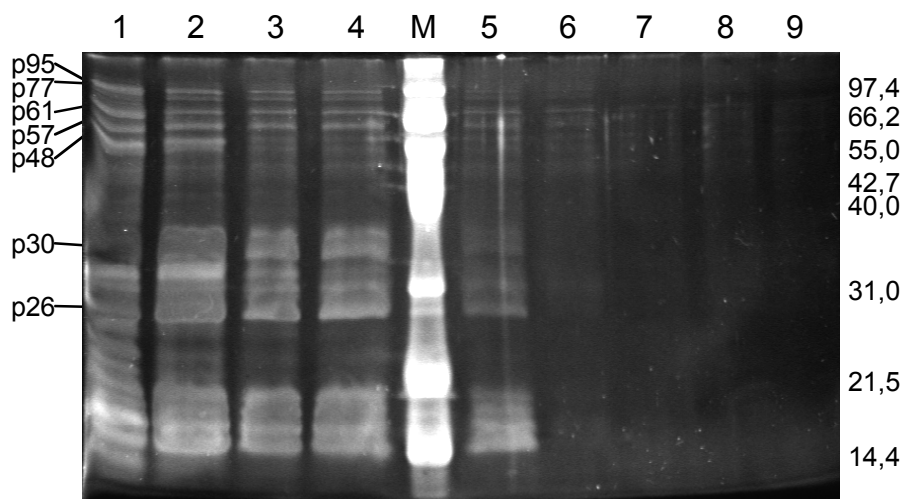
Aufgrund der durch den vorherigen Versuch anzunehmenden geringen Proteinkonzentrationen in den eluierten Fraktionen, wurden in diesem Fall jeweils 3 Fraktionen sofort gepoolt und mit Hilfe einer Acetonfällung auf jeweils 100 µl aufkonzentriert: Die Fraktionen 4 bis 6 wurden zu Pool 1 vereinigt, die Fraktionen 7 bis 9 zu Pool 2, usw. Von den aufkonzentrierten Pools wurden jeweils 30 µl als Probe auf ein normales 10%iges SDS-Polyacrylamidgel und zur Dokumentation parallel auf ein 10%iges SDS-Minigel aufgetragen. Nach dem Lauf wurden beide Gele mit Coomassie angefärbt und ausgewertet. Das dokumentierte Minigel ist in Abb. 4.9 dargestellt.



**Abb. 4.9 SDS-Minigel zur Affinitätschromatographie (Coomassie).** Aufgetragen wurden je 30 µl Probe der aufkonzentrierten Pools 1 bis 9 aus Abb. 4.8. Die Proben 1 bis 6 zeigen in etwa das gleiche Bandenmuster mit stetig abnehmender Intensität. Auf der linken Seite sind die Banden gekennzeichnet, die aus dem normalen SDS ausgeschnitten und zur Identifizierung mittels MALDI-MS analysiert wurden. Auf der rechten Seite sind die Größen der Markerbanden in kDa angegeben.

Wie erwartet zeigten beide Gele ein fast identisches Bandenmuster mit dem Unterschied, daß bei dem Minigel die Banden etwas deutlicher zu erkennen waren, während die Auftrennung der Banden bei dem normalen SDS-Gel etwas besser war. Im Gegensatz zum ersten Versuch zeigten die beiden Gele bei den Proben 1 bis 6 ein deutliches Bandenmuster, welches von Probe 1 bis 6 immer schwächer wird. Dabei verändert sich das Bandenmuster von Probe zu Probe kaum. Neben den beiden bereits im ersten Versuch identifizierten Banden von 26 und 95 kDa sind auf den Gelen einige weitere Banden zu erkennen: bei 30, 48, 57, 61 und 77 kDa. Wie zuvor wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und zur weiteren Identifizierung an Dr. Mathias Dreger übergeben.

Zusätzlich zu diesen Banden sind aber noch einige weitere schwächere, zum Teil überlagerte Banden zu erahnen, die aufgrund der schwachen Intensität nicht durch MALDI-MS zu identifizieren sind. Um diese schwache Banden deutlicher hervorzuheben, sollten die gleichen Proben auf ein weiteres 12%iges SDS-Minigel aufgetragen, und das Gel anschließend mit einer im Vergleich zu Coomassie empfindlicheren Färbemethode behandelt werden. Hierfür wurde das Minigel mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange von BioRad gefärbt und anschließend unter UV-Licht dokumentiert (Abb. 4.10). Tatsächlich zeigte das fluoreszenzgefärbte Gel mehr Banden als das mit Coomassie gefärbte Gel: So sind einige sehr feine, zum Teil überlagerte Banden zu erkennen. Außerdem ist ersichtlich, daß es sich bei einigen Banden im Coomassie-Gel in Wirklichkeit um mehrere überlagerte Banden handelt.



**Abb. 4.10 SDS-Minigel zur Affinitätschromatographie angefärbt mit SYPRO-Orange.** Aufgetragen wurden wie in Abb. 4.9 je 30 µl Probe der aufkonzentrierten Pools 1 bis 9, wobei die Färbung des Gels mit SYPRO-Orange erfolgte. Das Bandenmuster ist ähnlich wie in dem mit Coomassie gefärbten Gel (Abb. 4.9), jedoch sind einige weitere sehr feine, sowie überlagerte Banden zu erkennen. Wie in Abb. 4.9 sind auf der linken Seite die untersuchten Banden und auf der rechten Seite die Markergrößen in kDa gekennzeichnet.

#### 4.2.5 Identifizierung gebundener Proteine durch MALDI-MS

Die Identifizierung der in 4.2.3 und 4.2.4 ausgeschnittenen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der „Matrix-assisted laser desorption/ionization“-Massenspektrometrie (MALDI-MS) durch Dr. Mathias Dreger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hucho. Hierfür wurden die Proteinbanden zuerst mit Trypsin verdaut, und die Massen der so entstandenen Peptide anschließend durch MALDI-MS bestimmt. Anhand dieser Peptidmassen konnten nun durch Vergleich mit einer Internetdatenbank die zu den ausgeschnittenen Banden zugehörigen Proteine identifiziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

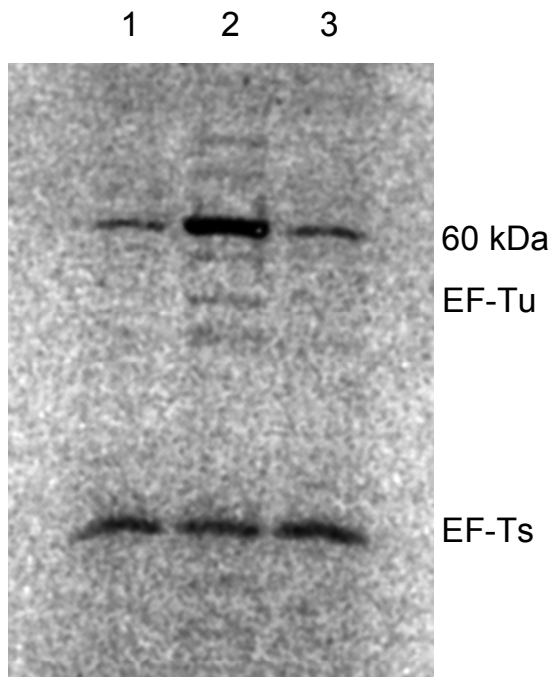
**Tab. 4.4 Identifizierung der Proteinbanden mittels MALDI-MS.** Aufgeführt sind die identifizierten Proteine der Größe nach geordnet. Alle Proteine entsprechen ungefähr der auf dem SDS-Gel erkennbaren Größe der ausgeschnittenen Banden. Weiterhin ist jeweils die minimale Sequenzübereinstimmung der durch die MALDI-MS identifizierten Peptide mit der Datenbank in Prozent angegeben. Abgesehen von der Polynukleotid-Phosphorylase zeigen alle Proteine eine ausreichend hohe Sequenzübereinstimmung, so daß von einer sicheren Identifizierung ausgegangen werden kann.

Bande	Größe	Gen	Protein	Sequenz %
p26	26,7 kDa	RpsB	Ribosomales Protein S2	36 %
p30	29,7 kDa	RplL	Ribosomales Protein L7/L12	57 %
p48	48,2 kDa	Tig	Trigger Factor	44 %
p57	57,3 kDa	GroL	Chaperon GroEL (Hsp60)	35 %
p61	61,0 kDa	RpsA	Ribosomales Protein S1	37 %
p77	77,0 kDa	Pnp	Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase)	13 %
p95	95,5 kDa	ClpB	ATPase ClpB (Hsp100)	28 %

#### 4.3 Untersuchung der Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock

In den vorhergehenden Versuchen wurden mit dem Chaperon GroEL, dem Trigger Factor und der ATPase ClpB drei verschiedene Proteine identifiziert, die zu den Hitzeschockproteinen zählen. Genaugenommen handelt es sich hierbei um Chaperone, deren Funktion in der korrekten Faltung bzw. Rückfaltung denaturierter Proteine liegt. Da diese Proteine verstärkt nach einem Hitzeschock von den *E. coli* Zellen exprimiert werden, sollte überprüft werden, ob die Phosphorylierung von EF-Tu durch Hitzeschock verstärkt wird bzw. allgemein mit der Wachstumstemperatur der Zellen korreliert.

Dafür wurde je eine *E. coli* MRE600 Kultur bei 30°C und bei 37°C im Schüttelkolben bis kurz vor dem Ende der logarithmischen Phase wachsen gelassen. Die Hälfte der bei 30°C gewachsenen Zellen wurden anschließend für 20 min bei 42°C hitzegeschockt, so daß den Zellen ausreichend Zeit zur Verfügung stand, Hitzeschockproteine zu exprimieren. Aus den frisch geernteten Zellen wurden jeweils die Rohribosomen extrahiert, und von jeder Aufarbeitung eine identische Menge an Ribosomen (0,025 A<sub>260</sub>) in einem leicht modifiziertem EF-Tu-Standardphosphorylierungsassay, wie zuvor beschrieben<sup>70,78</sup>, eingesetzt. Im Gegensatz zu frü-



**Abb. 4.11 Untersuchung der Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock bei 42°C.** Das Autoradiogramm des SDS-Gels zeigt die im Assay phosphorylierten Proteine nach Wachstum der Zellen bei 30°C (1), 37°C (2) sowie nach Hitzeschock für 20 min bei 42°C (3). Die Phosphorylierung von EF-Tu ist nur äußerst schwach bei der 37°C Probe zu erkennen. Bei 30°C, sowie nach Hitzeschock bei 42°C ist keine oder höchstens eine äußerst schwache Phosphorylierung von EF-Tu vorhanden. Weiterhin sind bei allen Proben noch zwei stärker phosphorylierte Proteine, zum einen bei 60 kDa und zum anderen exakt auf der Höhe von EF-Ts, sichtbar. Zusätzlich sind bei 37°C noch einige weitere schwache Banden zu erkennen. Allgemein ist die Phosphorylierung der Proteine bei 37°C abgesehen von einer Bande stärker als bei 30°C. Zwischen der Probe bei 30°C und der nach Hitzeschock bei 42°C besteht kein Unterschied in Phosphorylierungsmuster und -stärke.

heren Assays wurde der einfacheren Handhabung wegen  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP statt  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP zur Phosphorylierung von EF-Tu verwendet. Die Auswertung des Assays erfolgte durch Auftragen der gesamten Reaktionsansätze auf ein SDS-Polyacrylamidgel und anschließende Analyse des getrockneten Gels mit Hilfe eines Phosphoimagers. Das zugehörige Autoradiogramm ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

Von den drei aufgetragenen Proben zeigen zwei ein identisches Phosphorylierungsmuster. So ist bei 30°C kein Unterschied in der Phosphorylierung zu der Probe nach Hitzeschock bei 42°C zu erkennen. Bei 37°C hingegen ist die Phosphorylierung der meisten Banden signifikant stärker als bei den anderen beiden Proben. Im Gegensatz zu früher veröffentlichten Phosphorylierungsassays ist die Phosphorylierung von EF-Tu jedoch äußerst schwach ausgeprägt. So ist nur bei 37°C eine schwache Bande an phosphoryliertem EF-Tu sichtbar. Bei den beiden anderen Proben ist die Phosphorylierung von EF-Tu dagegen zu schwach, um sie mit Hilfe des Phosphoimagers detektieren zu können. Neben EF-Tu sind noch zwei deutlich stärker phosphorylierte Proteine zu erkennen: zum einen eine Bande bei 60 kDa und zum anderen eine Bande exakt auf Höhe von EF-Ts. Bei letzterer ist die Phosphorylierung bei 37°C als einzige nicht stärker als bei 30°C oder nach Hitzeschock bei 42°C.

Aus diesem Versuch läßt sich schließen, daß die Bildung von Hitzeschockproteinen nach Hitzeschock bei 42°C mit einiger Sicherheit keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von EF-Tu besitzt. Dagegen ist die Phosphorylierung von EF-Tu, sowie einiger weiterer Proteine bei Wachstum der Zellen bei 37°C signifikant stärker ist als bei 30°C.

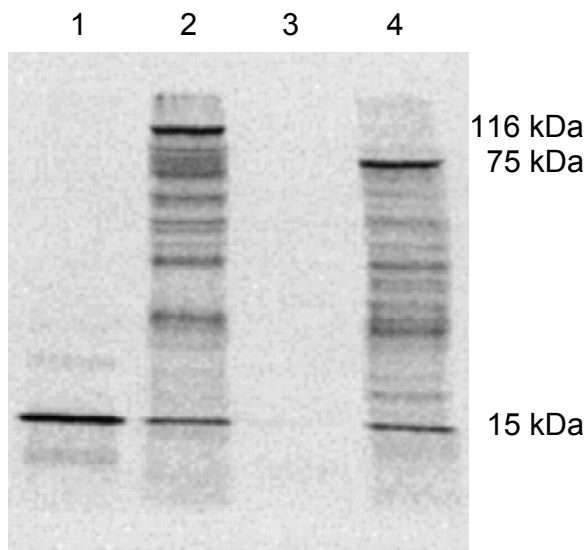
## 4.4 Überexpression und Aufreinigung von zu untersuchenden Proteinen

Im nächsten Versuch soll der Einfluß von verschiedenen Proteinen auf die Phosphorylierung von EF-Tu untersucht werden. Hierfür mußten diese zuerst mit Hilfe des Impact CN Expressionssystems von New England Biolabs überexprimiert und aufgereinigt werden. Der Vorteil dieses Expressionssystems liegt in der Verwendung eines hochaffinen Tags (Intein-Tag), der sich nach Induktion mit Dithiothreitol (DTT) selbst von dem exprimierten Protein abspaltet. Des weiteren bietet es die Möglichkeit, das Zielprotein entweder mit einem N-terminalen oder mit einem C-terminalen Tag zu versehen.

### 4.4.1 Überexpression der ribosomalen Proteine S1, S2 und EF-P

Von den mit Hilfe der Affinitätschromatographie identifizierten Proteinen, sollten die beiden am stärksten bindenden, die ribosomalen Proteine S1 und S2 (siehe Abb. 4.9), überexprimiert und auf ihre Beteiligung an der Phosphorylierung von EF-Tu hin untersucht werden. Aus besonderem Interesse heraus – wegen der bisher nicht genau bekannten Funktion<sup>86,87</sup> – sollte zusätzlich der Elongationsfaktor P (EF-P) überexprimiert, und weiter analysiert werden.

Um die drei Proteine überexprimieren zu können, mußten diese zuerst in den Vektor pTyb1, welcher für einen C-terminalen Intein-Tag kodiert, kloniert werden. Hierfür wurden die zugehörigen Gene mit Hilfe einer Standard-PCR unter Verwendung von Pfu-Polymerase direkt aus genomischer DNA amplifiziert. Als Primer dienten S1-F und S1-R für S1, S2-F und S2-R für S2, sowie EFP-F und EFP-R für EF-P (siehe 2.5.1). Die daraus resultierenden PCR-Produkte entsprachen auf einem 0,8%-igen Agarosegel (nicht dargestellt) jeweils den zu erwartenden Größen von 1,7 kb (S1), 730 bp (S2) und 570 bp (EF-P). Anschließend wurden die über ein präparatives Agarosegel aufgereinigten PCR-Produkte mit NdeI und SapI verdaut, erneut aufgereinigt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vektors pTyb1 kloniert. Restriktionsanalysen ergaben für jede Klonierung mindestens einen positiven Klon, die dann zur Sequenzierung zu SEQLAB nach Göttingen geschickt wurden. Jedoch konnten von keinem der eingesandten Klone vollständige Sequenzen gewonnen werden, so daß zur schnellen Überprüfung der Klone eine andere Methode eingesetzt werden mußte: Der T7-Promotor von pTyb1 ermöglichte es, die Klone mit Hilfe der Proteinbiosynthese *in vitro* auf eine vollständige Expression der Proteine mitsamt der fusionierten Tags hin zu untersuchen. Hierfür wurden die aufgereinigten Plasmide direkt in einer gekoppelten Transkriptions-, Translations-Reaktion im zellfreien *E. coli* S30-System<sup>102,103</sup> eingesetzt, wobei die Markierung der synthetisierten Proteine durch Zugabe von <sup>14</sup>C-Leucin in den Reaktions-Mix erfolgte. An-



**Abb. 4.12 Proteinbiosynthese *in vitro* zur Überprüfung der Klonierung.** Gezeigt ist das dazugehörige Autoradiogramm. Aufgetragen wurde jeweils ein Teil der Synthesereaktion mit Aceton gefällt: Kontrollvektor pFA (1), pTyb-S1 (2), pTyb-S2 (3) und pTyb-EFP (4). Die Produkte von pTyb-S1 und pTyb-EFP zeigen jeweils die zu erwartenden Größen von 116 bzw. 75 kDa. Zusätzlich sind einige Abbruchprodukte zu erkennen. Bei pTyb-S2 sind hingegen überhaupt keine Syntheseprodukte zu erkennen. Das durch den Kontrollvektor pFA synthetisierte fettsäurebindende Protein (FABP) ist bedingt durch das hier verwendete 10%ige SDS-Gel innerhalb der Lauffront migriert.

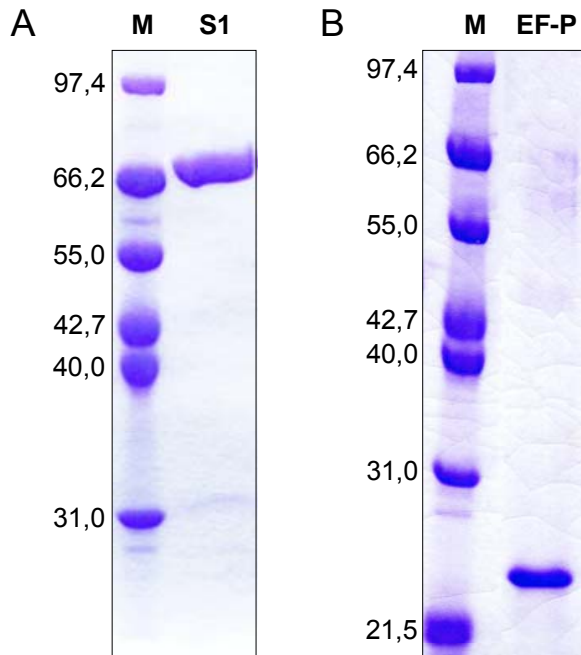
schließlich wurden die synthetisierten Proteine eines Teils des Reaktionsgemischs jeweils mit Aceton gefällt und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Das dazugehörige Autoradiogramm ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Zusätzlich wurden die synthetisierten Proteine quantifiziert, indem ein weiterer Teil des Reaktionsansatzes mit Trichloressigsäure gefällt, das Präzipitat über einen Glasfilter von der löslichen Radioaktivität abgetrennt und in einer Doppelbestimmung mit einem Szintillationszähler vermessen wurde.

Von den drei untersuchten Plasmiden exprimierten nur pTyb-S1 und pTyb-EFP das jeweilige Fusionsprotein in der korrekten Größe: 61 kDa (S1) + 55 kDa (Intein) und 20 kDa (EF-P) + 55 kDa (Intein). Bei pTyb-S2 ist hingegen überhaupt kein Syntheseprodukt zu erkennen. Der zur Kontrolle eingesetzte Vektor pFA, welcher für das fettsäurebindende Protein (FABP) aus Rinderherz kodiert, zeigt wie erwartet nur eine einzige Bande (15 kDa), die sich jedoch aufgrund des niederprozentigen SDS-Gels in der Lauffront befindet. Die Quantifizierung der synthetisierten Proteine mit Hilfe des Szintillationszähler bestätigte ungefähr die Intensitäten der auf dem Autoradiogramm sichtbaren Banden. Die Meßwerte sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

**Tab. 4.5 Quantifizierung der synthetisierten Proteine durch Bestimmung der TCA-fällbaren Radioaktivität.**

Vektor	dpm [Ø]	Fehler [%]
pFA	9537	0,2
pTyb-S1	12769	3,8
pTyb-S2	168	20,9
PTyb-EFP	9623	3,2



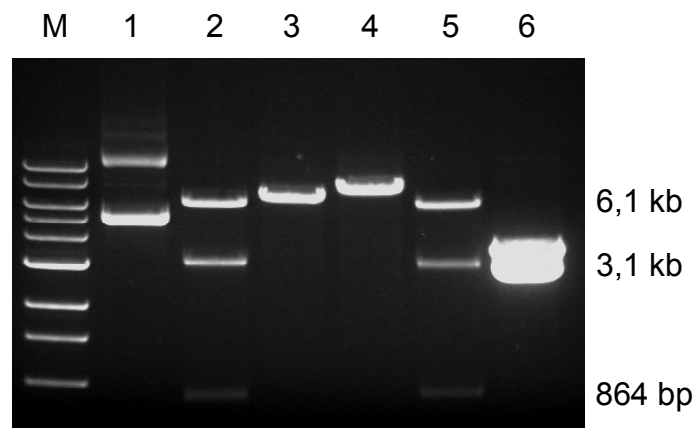


**Abb. 4.13 SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Aufreinigung des ribosomalen Proteins S1 und des Elongationsfaktors P.** Die SDS-Gele zeigen die nach der Spaltung von dem Intein-Tag von der Säule eluierten Proteine ohne weitere Aufreinigung. Auf Gel A wurden ca. 5  $\mu$ g ribosomales Protein S1 aufgetragen, auf Gel B ca. 3  $\mu$ g Elongationsfaktor P. Die Reinheit der Proteine, abgeschätzt anhand des Gels, ist jeweils größer als 95%. Ein Vergleich mit den Größenstandards des Markers zeigt, daß beide Proteine auf dem Gel langsamer als der Größe entsprechend gelaufen sind: S1 bei 67 kDa statt bei 61 kDa, EF-P bei ungefähr 24 kDa statt bei 20 kDa.

Da die Proteinbiosynthese *in vitro* bei Tyb-S2 kein Produkt erbrachte, wurden zunächst nur das ribosomale Protein S1, sowie EF-P überexprimiert. Dafür wurden die Plasmide pTyb-S1 und pTyb-EFP jeweils in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die eigentliche Expression erfolgte anschließend in Schüttelkolben, wobei die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur mit IPTG induziert wurden. Für die Aufreinigung der Proteine wurden die Zellen mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen, die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt, und das Zellysat direkt auf eine Säule mit Chitin Beads aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule wurde die Spaltung des Tags mit DTT eingeleitet, und das Ganze für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend konnten die aufgereinigten Proteine einfach von der Säule eluiert werden, wobei der Tag auf der Säule gebunden blieb. Für die Konzentrationsbestimmung mußten die aufgereinigten Proteine noch umgepuffert und aufkonzentriert werden. Hierfür wurden diese mit Ammoniumsulfat gefällt und in einem geeigneten Puffer ohne DTT wieder resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte als Doppelbestimmung mit dem „BCA Protein Assay“ von Pierce. Die Auswertung des Assays anhand einer Eichgerade ergab für S1 eine Konzentration von 1,5 mg/ml und für EF-P eine Konzentration von 3,5 mg/ml bei einem Gesamtvolumen von je 10 ml. Zur abschließenden Kontrolle wurde von beiden Proteinen eine Probe auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abb. 4.13). Anhand der beiden Gele konnte die Reinheit von S1 und EF-P abgeschätzt werden. Diese war jeweils größer als 95%. Somit eigneten sich beide aufgereinigten Proteine für den Einsatz in weiteren Experimenten.

#### 4.4.2 Überexpression der ribosomalen ATPase RbbA

Literaturrecherchen ergaben einen weiteren, besonders interessanten Kandidaten für die Funktion der EF-Tu Kinase: die ribosomale ATPase RbbA, die zuerst 1999 von M.C. Kiel et al. beschrieben wurde<sup>104</sup>. Dabei handelt es sich um ein 99 kDa großes, an das 70S-Ribosom bzw. an die 30S-Untereinheit assoziiertes Protein, welches für den größten Teil der ATPase-Aktivität des Ribosoms verantwortlich ist. Die Proteinsequenz der ribosomalen ATPase besitzt eine 40%ige Homologie mit dem C-Terminus des in Hefen und Pilzen vorkommenden Elongationsfaktors 3 (EF-3), der ebenfalls eine Ribosom-abhängige ATPase-Aktivität besitzt<sup>104</sup>. In einer weiteren Veröffentlichung konnte die gleiche Arbeitsgruppe die Bindung von RbbA an EF-Tu·GDP, sowie in einem Crosslinking-Experiment die Interaktion von RbbA mit dem ribosomalen Protein S1 nachweisen<sup>105</sup>. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluß die ribosomale ATPase auf die Proteinbiosynthese besitzt. Tatsächlich stimuliert RbbA bei Anwesenheit von EF-Tu, EF-G, GTP und ATP die Poly-(U)-abhängige Polyphenylalanin-Synthese um mehr als das Dreifache. Ohne Zugabe von ATP ist hingegen keine Stimulation der Synthese festzustellen<sup>104,105</sup>. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß das Antibiotikum Hygromycin B die ATPase-Aktivität von RbbA zu mehr als 75% inhibiert<sup>105,106</sup>. Die hier dargestellten Daten weisen alle darauf hin, daß es sich bei der ribosomalen ATPase RbbA um die gesuchte EF-Tu Kinase handeln könnte. Aus diesem Grund sollte RbbA überexprimiert und dessen Einfluß auf die Phosphorylierung von EF-Tu untersucht werden. Hierfür wurde das zugehörige Gen *yhiH* (2,7 kb) unter Verwendung der Primer YhiH-F und YhiH-R mit der Pfu-Polymerase direkt aus genomischer DNA amplifiziert und, wie in 4.4.1



**Abb. 4.14** Klonierung von *yhiH* (*rbbA*) in pTyb1. Analytisches Agarosegel zur Überprüfung der Klonierung von *yhiH* in pTyb1. Der Verdau der Plasmide erfolgte mit EcoRV. Die Klone 2 und 5 zeigten das erwartete Bandenmuster (6152 bp, 3053 bp und 864 bp) und enthielten somit das korrekte Insert.

für S1 und EF-P beschrieben, in die NdeI/SapI-Schnittstellen von pTyb1 kloniert. Die Plasmide der erhaltenen Klone wurden zur Überprüfung mit EcoRV verdaut und auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei sollte EcoRV den Vektor pTyb1 einmal, sowie das Insert *yhiH* dreimal schneiden. Von sechs überprüften Klonen zeigten zwei das korrekte Bandenmuster (Abb. 4.14): drei Banden mit den Größen 6152 bp, 3053 bp und 864 bp. Ein viertes Fragment von 42 bp ist aufgrund der kleinen Größe auf dem Gel nicht sichtbar. Aus zeitlichen Gründen wurde auf eine weitere Überprüfung der Klone, wie Sequenzierung oder Proteinbiosynthese *in vitro*, verzichtet, und das Protein schnellstmöglich überexprimiert.

Die Überexpression und Aufreinigung der ribosomalen ATPase erfolgte in gleicher Weise wie bereits für S1 und EF-P in 4.4.1 beschrieben. Eine Auftragung des aufgereinigten Proteins auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel ergab jedoch nur eine äußerst schwache Bande bei ungefähr 100 kDa. Selbst nach einer Aufkonzentrierung von 200 µl Probe durch eine Acetonfällung war die Bande auf dem Gel kaum stärker. Aus diesem Grund wurde eine weitere Expression mit dem zweiten Klon durchgeführt. Doch auch dieser Versuch brachte keine stärkere Expression von RbbA. Da die Proteinkonzentration der aufgereinigten Proteine nicht für eine Ammoniumsulfatfällung ausreicht, wurden diese durch Zentrifugation in Ultrafiltrations-Zentrifugenröhrchen mit einer Ausschlußgrenze von 30 kDa auf ein Volumen von ca. 2 ml aufkonzentriert und anschließend dialysiert. Eine Analyse der aufkonzentrierten Probe auf dem SDS-Gel zeigte wiederum nur eine schwache Bande bei 100 kDa, wobei die Bande wie bei den anderen Gelen zu schwach für die Geldokumentation (Scannen) war. Die Konzentration der ribosomalen ATPase ließ sich deshalb nur sehr grob anhand des Gels abschätzen. Da bei Auftrag von 40 µl Probe die Bandenstärke in etwa der Nachweisgrenze der Coomassiefärbung entspricht, dürfte die Proteinkonzentration im Bereich von 1 ng/µl liegen. Für weitere Versuche zur Überexpression von RbbA oder für die Umklonierung in ein anderes Expressionssystem stand jedoch keine Zeit mehr zur Verfügung, so daß das hier aufgereinigte Protein trotz der geringen Konzentration für die weiteren Experimente eingesetzt werden mußte.

#### 4.5 Untersuchungen zur Phosphorylierung von EF-Tu

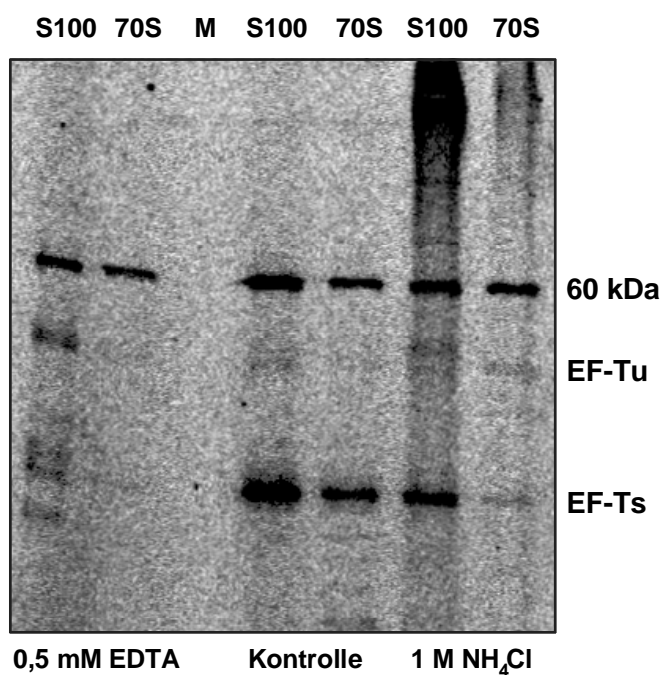
In den abschließenden Experimenten sollte die Phosphorylierung von EF-Tu genauer untersucht werden. Zum einen sollte überprüft werden, welchen Einfluß die in 4.4 überexprimierten Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu besitzen. Und in einem weiteren Experiment sollte die Bindung der EF-Tu Kinase am Ribosom unter verschiedenen Salzbedingungen untersucht werden.

#### 4.5.1 Einfluß verschiedener Salzbedingungen bei der Aufarbeitung von 70S Rohribosomen auf die Phosphorylierung von EF-Tu

In diesem Versuch sollte festgestellt werden, unter welchen Bedingungen die EF-Tu Kinase am Ribosom gebunden ist, bzw. ob sich diese unter Hochsalzbedingungen vom Ribosom abwaschen läßt. Hierfür sollte ein Puffer mit 1 M Ammoniumchlorid verwendet werden, bei dem sich schwächer gebundene Proteine wie z.B. die ribosomale ATPase RbbA, S1 und sogar L7/L12 vom Ribosom ablösen. Zusätzlich sollte durch Verwendung eines Puffers mit EDTA und EGTA statt Magnesium überprüft werden, ob ein Entzug von Magnesium- und Calcium-Ionen einen Einfluß auf die Bindung der EF-Tu Kinase am Ribosom besitzt.

Da die EF-Tu Kinase nach bisherigen Erkenntnissen innerhalb von kurzer Zeit ihre Aktivität verliert, wurden die Zellen direkt in den jeweiligen Puffern aufgeschlossen, und daraus, wie in 4.3 bzw. 3.7 beschrieben, die 70S Rohribosomen isoliert. Um feststellen zu können, in welcher Fraktion sich die EF-Tu Kinase befindet, wurden sowohl der S100 Überstand als auch die isolierten Rohribosomen in einem EF-Tu-Phosphorylierungsassay untersucht. Anschließend wurden die Proben auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe des Phosphorimagers ausgewertet. Das dazugehörige Autoradiogramm ist in Abb. 4.15 dargestellt.

Die Auswertung des Autoradiogramms ergab sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Aufarbeitung mit EDTA eine stärkere EF-Tu Kinaseaktivität im S100 Überstand als im 70S Pellet. Umgekehrt ist die Kinaseaktivität in den mit Hochsalzpuffer isolierten 70S Rohribosomen stärker als im S100 Überstand. Neben EF-Tu sind wie in 4.3 die zwei weiteren Phosphory-



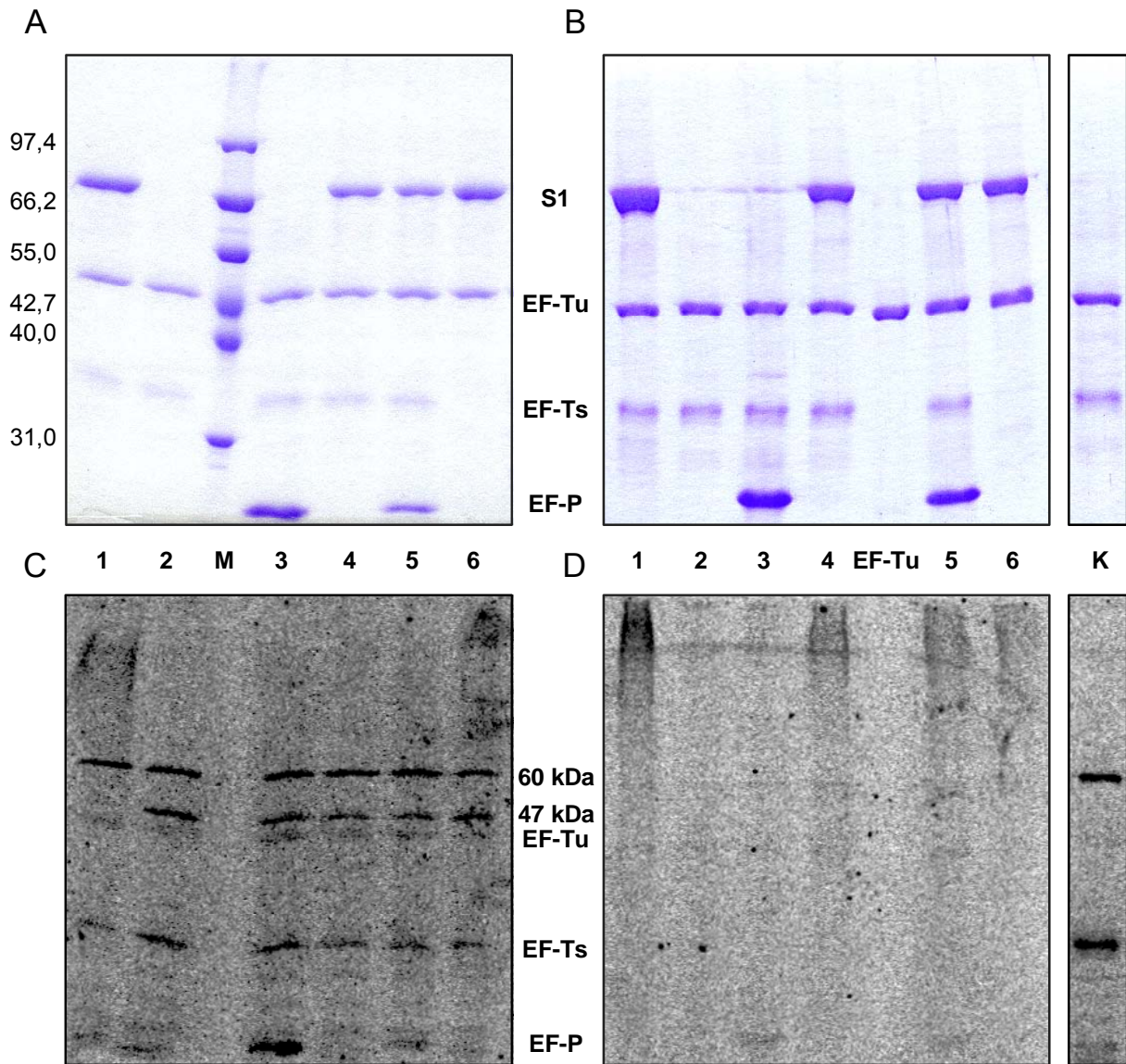
**Abb. 4.15 Einfluß verschiedener Salzbedingungen auf die Bindung der EF-Tu Kinase am Ribosom.** Das Autoradiogramm des SDS-Gels zeigt jeweils die Phosphorylierung von EF-Tu durch den S100 Überstand, sowie durch die isolierten 70S Rohribosomen. Bei den linken Proben erfolgte der Aufschluß der Zellen mit Puffer A<sub>M</sub> (0,5 mM EDTA und 10 mM EGTA), bei den mittleren Proben mit Standardpuffer A und bei den rechten Proben mit Hochsalzpuffer A<sub>H</sub> (1 M NH<sub>4</sub>Cl). Die Phosphorylierung von EF-Tu ist bei 0,5 mM EDTA wie auch bei der Kontrolle im Überstand stärker als in der Ribosomen-Fraktion. Umgekehrt ist die Phosphorylierung von EF-Tu unter Hochsalzbedingungen in der 70S Fraktion stärker als im Überstand. Weitere Phosphorylierungen sind wie in 4.3 auf Höhe von EF-Ts, sowie bei 60 kDa zu erkennen.

lierungen bei 60 kDa und auf Höhe von EF-Ts zu erkennen, wobei diese jeweils im S100 Überstand stärker sind als im 70S Pellet. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Stärke der Phosphorylierung auf Höhe von EF-Ts bei den beiden anderen Proben deutlich schwächer (1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) oder kaum vorhanden (0,5 mM EDTA / 10 mM EGTA).

#### **4.5.2 Einfluß verschiedener überexprimierter Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu**

Im letzten Experiment sollte überprüft werden, welchen Einfluß die in 4.4 überexprimierten Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu haben, insbesondere, ob die Phosphorylierung durch Zugabe eines oder mehrerer Proteine verstärkt wird. Hierfür wurden, wie in 4.3 bzw. 3.7 bereits beschrieben, 70S Rohribosomen aus frisch gewachsenen *E. coli* MRE600 Zellen extrahiert und in einem leicht modifiziertem EF-Tu-Phosphorylierungsassay eingesetzt. Zu diesen Phosphorylierungsassays wurden pro Ansatz jeweils 1,5  $\mu\text{l}$  der überexprimierten Proteine gegeben: Einerseits wurden ribosomales Protein S1, EF-P und die ribosomale ATPase RbbA jeweils einzeln eingesetzt und zusätzlich S1 und RbbA, sowie alle drei Proteine in Kombination. Um festzustellen, ob EF-Ts einen Einfluß auf eine der Phosphorylierungen besitzt, wurde noch ein weiterer Phosphorylierungsassay mit S1 und RbbA jedoch ohne EF-Ts angesetzt. Gleichzeitig sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob eine Zugabe von S1, EF-P oder RbbA zu mit 1 M Ammoniumchlorid gewaschenen 70S Ribosomen eine oder mehrere Phosphorylierungen verstärkt bzw. wieder herstellt. Hierfür wurden EF-Tu-Phosphorylierungsassays mit den in 4.5.1 aus Hochsalzpuffer aufgearbeiteten Rohribosomen durchgeführt, wobei die gleichen Mengen an überexprimierten Proteinen (s.o.) zugegeben wurden. Um eine Autophosphorylierung der überexprimierten Proteine ausschließen zu können, wurden zusätzlich identische Phosphorylierungsassays ohne 70S Rohribosomen durchgeführt. Aufgrund der Anzahl an Proben wurden die Phosphorylierungsassays auf zwei verschiedenen 12%igen SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Phosphoimagers ausgewertet. Die dazugehörigen Autoradiogramme sind in den Abbildungen 4.16 und 4.17 dargestellt.

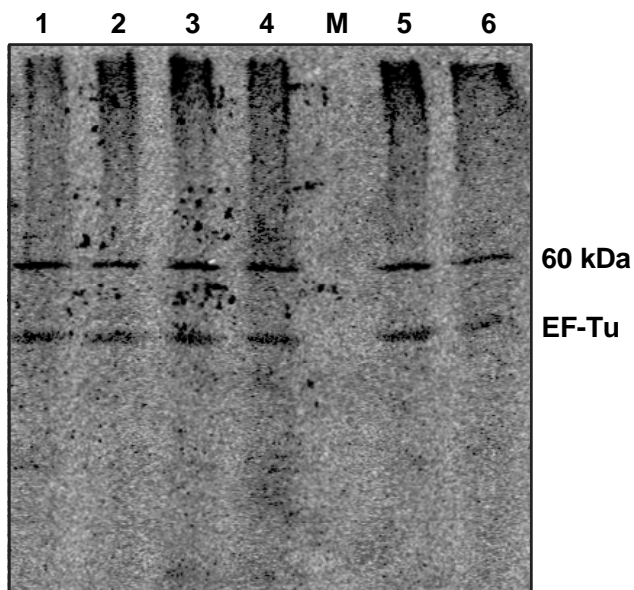
Das Autoradiogramm des ersten Versuchs mit normal aufgearbeiteten Rohribosomen zeigt bei allen untersuchten Proben ein im Vergleich zur Kontrolle verändertes Phosphorylierungsmuster (Abb. 4.16 C). Von den sichtbaren Phosphorylierungen ist nur die Bande bei 60 kDa bei allen Proben sowie bei der Kontrolle ungefähr gleich stark. Die Phosphorylierung von EF-Tu scheint hingegen bei allen Proben geringfügig stärker zu sein als bei der Kontrolle, ist jedoch



**Abb. 4.16 EF-Tu Phosphorylierungsassay zur Untersuchung verschiedener überexprimierter Proteine.** Dargestellt sind die Coomassie gefärbten Gele (A und B) und die dazugehörigen Autoradiogramme (C und D) nach Auftrennung der kompletten Phosphorylierungsassays auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel. Zu den Phosphorylierungsassays wurden folgende überexprimierte Proteine hinzugegeben (siehe auch 3.7.4): (1) + S1; (2) + RbbA; (3) + EF-P; (4) + S1 und RbbA; (5) + S1, RbbA und EF-P; (6) + S1 und RbbA, – EF-Ts; (K) Standardphosphorylierungsassay als Kontrolle. Die überexprimierten Proteine wurden zum einen zu Standardphosphorylierungsassays mit 70S Rohribosomen (A bzw. C) und zur weiteren Überprüfung zu Phosphorylierungsassays ohne Ribosomen (B bzw. D) gegeben. Die Kontrolle (K) zeigt wie in 4.3 in der Autoradiographie nur zwei deutliche Banden: eine bei 60 kDa und eine exakt auf Höhe von EF-Ts. Eine Phosphorylierung von EF-Tu ist hingegen nur zu erahnen. Bei den Phosphorylierungsassays ohne 70S Ribosomen (D) ist als einzigstes eine äußerst schwache Phosphorylierung von EF-P zu erkennen (Spur 3 und 5). Das Phosphorylierungsmuster der Assays mit Ribosomen (C) unterscheidet sich je nach zugegebenem Protein mehr oder weniger deutlich von der Kontrolle: Sowohl die Phosphorylierung bei 60 kDa als auch die auf Höhe von EF-Ts sind bei allen Proben vorhanden, wobei letztere je nach zugegebenen Proteinen unterschiedlich stark ist. Die Phosphorylierung von EF-Tu scheint bei allen Proben geringfügig stärker zu sein als bei der Kontrolle, ist jedoch nur bei EF-P (Spur 3) etwas deutlicher ausgeprägt. Zusätzlich zu diesen Banden sind noch weitere vorher noch nicht beobachtete Phosphorylierungen zu erkennen. Zum einen ist in den Proben mit EF-P (Spur 3 und 5) eine recht starke Phosphorylierung von EF-P sichtbar. Zum anderen ist eine weitere Bande bei ungefähr 47 kDa knapp oberhalb von EF-Tu zu sehen. Diese ist in allen Assays, die RbbA und / oder EF-P enthalten (Spur 2 bis 6), vorhanden, nicht jedoch in der Probe mit ribosomalem Protein S1.



wie in Experiment 4.3 nur äußerst schwach ausgeprägt. Da die Kontrolle in diesem Fall auf ein anderes Gel aufgetragen wurde als die untersuchten Proben, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Verstärkung der Phosphorylierung signifikant ist. Einzig bei dem Assay mit EF-P läßt sich im Vergleich zu den anderen Proben eine etwas stärkere Phosphorylierung von EF-Tu vermuten. Wie in Versuch 4.3 ist im Autoradiogramm jeweils eine Bande auf Höhe von EF-Ts zu sehen, welche je nachdem, welches Protein zugegeben wurde, unterschiedlich stark ist. Dabei fällt auf, daß diese Phosphorylierung bei den Assays mit ribosomalem Protein S1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich schwächer ausfällt, während bei Zugabe von EF-P und RbbA ohne S1 dieser Effekt weniger stark ausgeprägt oder nicht vorhanden ist. Besonders interessant ist jedoch, daß auch bei der Probe ohne EF-Ts (Spur 6) eine deutliche Phosphorylierung auf dieser Höhe sichtbar ist. Zusätzlich zu diesen bereits zuvor beobachteten Banden sind noch zwei weitere Banden auf dem Autoradiogramm zu erkennen. Zum einen ist eine Phosphorylierung von EF-P (Spur 3 und 5) zu sehen, deren Stärke ungefähr mit der aufgetragenen Proteinmenge korreliert. Und eine weitere Bande mit einer ungefähren Größe von 47 kDa taucht knapp oberhalb von EF-Tu auf. Die Phosphorylierung von EF-P ist dabei als einzige auch in der Kontrolle ohne 70S Ribosomen sichtbar (Abb. 4.16 D), allerdings ist diese nur äußerst schwach. Im Gegensatz zu EF-P kann die Bande bei 47 kDa nicht so einfach einem der zugegebenen Proteine zugeordnet werden. Ungewöhnlicherweise ist diese Phosphorylierung in allen Phosphorylierungsassays, welche EF-P oder RbbA bzw. beide Proteine zusammen enthalten, vorhanden, während in dem Assay mit S1 ohne EF-P und RbbA (Spur 1) keine solche Phosphorylierung zu sehen ist. Die Stärke der Phosphorylierung korreliert dabei ungefähr mit der Menge an EF-P oder RbbA, die zugegeben wurde.



**Abb. 4.17 Untersuchung verschiedener überexprimierter Proteine im EF-Tu-Phosphorylierungsassay mit gewaschenen 70S Ribosomen (Autoradiogramm).** Die Auftragung der Proben bzw. die Zugabe der überexprimierten Proteine entspricht der in Abb. 4.16: (1) + S1; (2) + RbbA; (3) + EF-P; (4) + S1 und RbbA; (5) + S1, RbbA und EF-P; (6) + S1 und RbbA, – EF-Ts. Der einzige Unterschied besteht in der Verwendung von mit 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aufgearbeiteten 70S Ribosomen (4.5.1). Die Phosphorylierung von EF-Tu ist bei allen Proben in etwa gleich stark. Nur in der Probe ohne EF-Ts (Spur 6) scheint diese etwas schwächer auszufallen. Eine weitere Phosphorylierung ist bei 60 kDa zu erkennen, die bei allen Proben ebenfalls ungefähr gleich stark ist.

---

Im Gegensatz zum ersten Versuch ist bei Verwendung von Ribosomen, die mit Hochsalzpuffer aufgearbeitet wurden, keine Veränderung im Phosphorylierungsmuster der verschiedenen Proben zu erkennen (Abb. 4.17). So sind bei allen Proben unabhängig davon, welches Protein zugegeben wurde, immer nur zwei Phosphorylierungen sichtbar: die von EF-Tu, sowie die Bande bei 60 kDa. Und auch in der Stärke der Phosphorylierungen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Proben zu erkennen. Nur bei der Probe ohne EF-Ts (Spur 6) scheint die Phosphorylierung von EF-Tu etwas schwächer zu sein als bei den Proben mit EF-Ts (Spur 1 bis 5). Wenn man allerdings die Stärke der Phosphorylierungen mit denen im vorherigen Versuch vergleicht, so ist die von EF-Tu deutlich stärker, während die Bande bei 60 kDa in beiden Versuchen ungefähr gleich stark ist (Abb. 4.17 und Abb. 4.16 C).



## 5 Diskussion

Die Identifizierung der EF-Tu Kinase erwies sich in den vorhergehenden Arbeiten als ein äußerst schwieriges Unterfangen. Dabei hat sich gezeigt, daß die Aktivität der Kinase im 70S Pellet am größten ist, während jeglicher Versuch, sie mit klassischer Proteinchemie darüber hinaus aufzureinigen, fehlschlug. Dies läßt vermuten, daß die Bindung der Kinase am Ribosom absolut essentiell für die Phosphorylierung von EF-Tu ist, was aber deren Identifizierung deutlich erschwert. Somit mußte eine andere Möglichkeit gefunden werden, die EF-Tu Kinase zu identifizieren. Eine recht vielversprechende Möglichkeit bestand in der Identifizierung von Proteinen, die an EF-Tu binden bzw. mit EF-Tu interagieren. Hierfür kamen verschiedene Methoden wie z.B. das „Yeast Two Hybrid“ System oder auch die Affinitätschromatographie in Frage. Die Wahl fiel auf das „Yeast Two Hybrid“ System, da mit dieser Methode selbst schwache Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden können, wobei man gleichzeitig durch einen  $\beta$ -Galaktosidase-Assay einen Hinweis auf die Stärke der Bindung erhält.

### 5.1 Yeast Two Hybrid

Bevor der Yeast Two Hybrid Versuch durchgeführt werden konnte, mußten einige Vorbereitungen getroffen werden. Zuerst wurde das für EF-Tu kodierende Gen *tufA* in den Bindungs-Domänen-Vektor pHybLex kloniert, und anschließend das fertige Konstrukt in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40 transformiert. Die Überprüfung von acht der so erzeugten Klone mittels Western Blot zeigte, daß alle das LexA-EF-Tu Fusionsprotein in korrekter Größe exprimierten (Abb. 4.4). Allerdings sind bei allen acht Klonen zusätzlich noch zwei identische Abbruchprodukte des Fusionsproteins zu erkennen. Im Prinzip sollten diese zwar keinen großen Einfluß auf das Gelingen des Yeast Two Hybrid Versuchs haben, jedoch könnte es dadurch zu unspezifischen Interaktionen mit anderen Proteinen und somit zur Selektion von falsch-positiven Klonen kommen. Alle anderen sichtbaren Banden, die sowohl in den verschiedenen Klonen als auch in der Kontrolle zu sehen sind, beruhen dagegen auf unspezifischer Bindung des polyklonalen anti-LexA Antikörpers. Bei einer weiteren Überprüfung der Klone zeigten drei eine schwache Koloniebildung auf dem Selektionsmedium SD-H Z300 und waren somit nicht die folgenden Versuche geeignet. Von den restlichen fünf Klonen wurde Klon 4 für die Verwendung im Yeast Two Hybrid Versuch ausgewählt, da dieser eine recht starke Expression des LexA-EF-Tu Fusionsproteins zeigte und weder ein Wachstum auf

dem Selektionsmedium noch eine falsch-positive Blaufärbung beim  $\beta$ -Galaktosidase-Assay aufwies.

Für den eigentlichen Yeast Two Hybrid Versuch wurde die genomische *E. coli* Bibliothek in den zuvor ausgewählten *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA* Klon transformiert. Die Auswertung der Transformation ergab eine Anzahl von insgesamt  $6,1 \cdot 10^7$  Transformanten, während die eingesetzte Bibliothek nach Herstellerangaben eine garantierte Anzahl von mindestens  $1 \cdot 10^6$  unabhängigen Klonen besitzt. Somit sollte jedes Plasmid der Bibliothek theoretisch in ungefähr 60 Hefezellen transformiert worden sein. Da sich die Hefezellen bei der Inkubation über Nacht zusätzlich verzwanzigfacht hatten, sollten vor der eigentlichen Selektion im gesamten Ansatz bis zu 1200 Zellen pro Plasmid vorhanden gewesen sein. Aber selbst wenn die Anzahl an Zellen in Wirklichkeit deutlich geringer war als dieser Wert, sollten bei der Selektion mehrere Klone von jedem Plasmid auf Selektionsmedium ausgestrichen worden sein. Insgesamt wuchsen auf den Selektionsplatten 156 His<sup>+</sup> Kolonien, jedoch keine einzige auf Agarplatten mit 3-Aminotriazol. Dies deutet allgemein auf eher schwache Interaktionen in den hier selektierten Klonen hin, während in der gesamten Bibliothek anscheinend kein einziges Fusionsprotein vorhanden ist, welches stärker an EF-Tu bindet und so ein Wachstum auf Selektionsmedium mit 3-Aminotriazol ermöglicht.

Bei dem anschließend durchgeführten  $\beta$ -Galaktosidase-Assay zeigten die ausplattierten Zellen wider erwarten eine rötliche Färbung, die mit der Zeit immer stärker wurde. Wie sich später zeigte, trat diese Färbung bei allen auf Selektionsmedium ausplattierten Zellen auf. Eine anfänglich vermutete Kontamination konnte zum Glück jedoch nicht nachgewiesen werden. Verantwortlich für die rötliche Färbung war hingegen die *ade2* Mutation des eingesetzten Hefestamms, welche bei Adenin-Mangel zur Synthese eines roten Pigments führt. Da das Selektionsmedium eine definierte Menge an Adenin enthielt, zeigte sich dieser Phänotyp erst nach längerem Wachstum, sobald das vorhandene Adenin aufgebraucht war. Gleichzeitig wiesen die Zellen eine zähe Konsistenz auf, was deren Übertragung auf Nitrocellulosemembran erschwerte. So konnten im ersten Versuch nur 52 der 156 His<sup>+</sup> Klone mit Hilfe des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays überprüft werden, von denen wiederum nur 15 Klone eine deutlichere Blaufärbung zeigten und anschließend genauer untersucht wurden.

Aufgrund der beschriebenen Probleme wurde die Transformation der genomischen *E. coli* Bibliothek in *S. cerevisiae* L40 pHybLex-*tufA* wiederholt, wobei dieses Mal auf die zusätzliche Selektion mit 3-Aminotriazol verzichtet wurde. Die Auswertung der zweiten Transformation ergab mit  $1,2 \cdot 10^7$  nur ein Fünftel der Transformanten des ersten Versuchs und dies, obwohl die Durchführung im Vergleich zum ersten Versuch nicht verändert wurde. Vermut-

lich führten hier geringste Veränderungen in der Handhabung der Zellen zu der geringeren Transformationseffizienz. Trotzdem wuchsen nach der Selektion 122 His<sup>+</sup> Kolonien, von denen 65 bei dem anschließenden  $\beta$ -Galaktosidase-Assay eine Blaufärbung zeigten. Allerdings wurden im Gegensatz zum ersten Ansatz auch die Klone berücksichtigt, die eine schwächere Blaufärbung und somit eine schwächere Interaktion aufwiesen.

Die Identifizierung der mit EF-Tu interagierenden Fusionsproteine war schwerer als vermutet. So konnten unabhängig von der Methode nur von 10 der insgesamt 80 selektierten Klone die jeweiligen Inserts des Bibliotheks-Vektors pGAD10 amplifiziert und sequenziert werden. Dabei zeigte eine erneute Überprüfung von 30 Klonen, daß dieses Ergebnis reproduzierbar war. Somit handelte es sich bei den restlichen 70 isolierten Klonen mit großer Wahrscheinlichkeit um sogenannte falsch-Positive. Hierfür kommen mehrere Erklärungen in Frage: Zum einen ist bekannt, daß es bei Religanden des Bibliotheks-Vektors pGAD10 zu schwachen Interaktionen zwischen der exprimierten Aktivierungsdomäne und dem Zielprotein des DNA-BD-Vektors und somit zu einem Wachstum auf Selektionsmedium, sowie zu einer schwachen Blaufärbung beim  $\beta$ -Galaktosidase-Assay kommen kann. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, daß es durch eine zufällige Mutation oder Rekombination im Genom der Hefezelle zu einer verstärkten Expression der Reportergene kommt.

Die Analyse der zehn amplifizierten Inserts ergab, daß nur zwei der identifizierten Gene innerhalb des korrekten Leserahmens mit der GAL4-AD liegen. Genauer betrachtet kommt jedoch keines der beiden Gene für die Funktion der EF-Tu Kinase in Frage. Weder *yggP* noch *b2191* besitzen anhand von Sequenzvergleichen eine ATP-Bindungsstelle, noch zeigen sie irgendeine Homologie zu anderen Kinasen. Zudem handelt es sich bei *yggP* vermutlich um eine Zink-bindende Dehydrogenase, genauer um eine L-Sorbose-1-phosphatreduktase. Im Gegensatz dazu ist bei *b2191* eine Zuordnung der Funktion nicht so einfach möglich. *b2191* liegt im Genom von *E. coli* innerhalb eines Insertions-Elements 5 (IS5) direkt neben der zugehörigen Transposase *trs5\_8*, wobei Sequenzvergleiche mit anderen Insertions-Elementen dieser Familie darauf hindeuten, daß es sich hierbei um einen zufällig durch Rekombination entstandenen ORF handelt.

Die anderen acht identifizierten Gene besitzen entweder einen Frameshift im Leserahmen des Fusionsproteins oder sitzen in verkehrter Richtung im Fusionsvektor pGAD10, so daß bei diesen Klonen nur zufällige Peptide exprimiert werden. Eine Analyse dieser Peptide ergab interessanterweise für eines eine Homologie zu einem möglichen Genprodukt mit unbekannter Funktion (Z3962). Da das zugehörige Gen Z3962 jedoch nur im Genom von *E. coli*

O157:H7 und nicht im Wildtyp vorhanden ist, kommt dieses ebenfalls nicht für die Funktion der EF-Tu Kinase in Frage.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß der hier durchgeführte Yeast Two Hybrid Assay im Prinzip funktioniert hat, jedoch nicht für die Identifizierung der EF-Tu Kinase geeignet ist. So konnte in diesem Versuch weder die EF-Tu Kinase identifiziert werden, noch bereits bekannte Bindungspartner von EF-Tu wie EF-Ts oder die ribosomale ATPase RbbA nachgewiesen werden, wobei letzteres eine Positiv-Kontrolle für das Gelingen des Versuchs wäre. Statt dessen handelt es sich bei den hier identifizierten Bindungspartnern um Proteine bzw. Peptide, die nur unspezifisch an LexA-EF-Tu binden. Hierfür kommen mehrere Erklärungen in Frage. Zum einen wird zur Herstellung der hier verwendeten genomischen *E. coli* Bibliothek partiell verdaute genomische DNA verwendet. Da im Gegensatz zu eukaryontischen cDNA Bibliotheken die hierin enthaltenen Gene zufällig in allen sechs möglichen Leserahmen des Vektors (drei pro Richtung) liegen können, exprimieren statistisch nur ein sechstel der Klone ein korrektes Hybridprotein. Dadurch ist allerdings noch nicht sicher gestellt, ob das entsprechende Gen auch vollständig oder nur als Fragment im Vektor enthalten ist. Dies hat zur Folge, daß nur ein Bruchteil der  $1 \cdot 10^6$  Klone der Bibliothek ein sinnvolles, richtig gefaltetes Hybridprotein exprimieren, welches in der Lage ist, mit einem Bindungspartner zu interagieren. Trotz der hohen Anzahl an unterschiedlichen Klonen ist somit eine ausreichende Abdeckung des *E. coli* Proteoms für einen solchen Versuch nicht garantiert. Neben der Bibliothek kann aber auch das LexA-EF-Tu Fusionsprotein für den Mißerfolg des Yeast Two Hybrid Versuchs verantwortlich sein. Obwohl dieses im hier verwendeten Klon vollständig exprimiert wird, besteht natürlich die Möglichkeit, daß es in der Zelle nicht korrekt gefaltet vorliegt und daher nicht mit potentiellen Bindungspartnern interagieren kann. Andererseits könnte die Bindungsstelle der EF-Tu Kinase am Fusionsprotein durch LexA sterisch blockiert sein, oder EF-Tu liegt im Fusionsprotein in der „falschen“ GTP-Konformation vor, was jeweils die Bindung der EF-Tu Kinase an LexA-EF-Tu verhindern würde.

Die einzige Möglichkeit, eine Verbesserung an diesem Yeast Two Hybrid Assay vorzunehmen, wäre die Verwendung einer cDNA Bibliothek aus *E. coli*. Die Herstellung einer solchen cDNA Bibliothek wäre jedoch äußerst aufwendig. Hierfür müßte der aus *E. coli* isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase ein Poly(A)-Schwanz angefügt werden, damit die reverse Transkription der RNA und die anschließende Klonierung der cDNA erst möglich wird. Da die Erfolgsaussichten bei einem solchen Versuch jedoch wegen der bereits genannten Gründe nicht besonders vielversprechend erschienen, sollte eine andere Methode zur Identifizierung der EF-Tu Kinase verwendet werden.

## 5.2 Affinitätschromatographie

Literaturrecherchen zeigten einen anderen, erfolgsversprechenden Weg auf, die EF-Tu Kinase aufzureinigen und zu identifizieren: durch eine Affinitätschromatographie gegen ein spezifisches Substratpeptid<sup>99-101</sup>. Da Kinasen im allgemeinen nur eine sehr schwache Affinität für ihr Substrat besitzen, war es notwendig, die EF-Tu Kinase vor der Affinitätschromatographie möglichst weit aufzureinigen. Daher wurde für diesen Versuch ein Protokoll adaptiert, welches zur Isolierung ribosomaler Proteine für Rekonstitutionsexperimente dient (3.5.2). Allerdings wurden die Rohribosomen vor der weiteren Aufreinigung nicht gewaschen, so daß die EF-Tu Kinase auf jeden Fall an den Ribosomen gebunden bleibt. Die aufgereinigten Proteine wurden in zwei verschiedenen Läufen auf die Peptidsäule aufgetragen, und die auf der Säule gebundenen Proteine, wie in 3.5 beschrieben, über einen definierten Salzgradienten eluiert.

Das Elutionsprofil zeigt in beiden Läufen einen fast identischen Verlauf (Abb. 4.7 und 4.8). So steigt Absorption bei 280 nm jeweils mit dem Salzgradienten an, was durch eine leicht höhere Absorption des für die Elution verwendeten Hochsalzpuffers bedingt ist. Trotzdem sind bei beiden Läufen jeweils zwei deutliche Peaks zu sehen: zum einen ein Peak bei niedriger Salzkonzentration (0,3 M NaCl), was eher auf eine unspezifische Bindung schließen läßt, und zum anderen ein etwas schwächerer Peak bei hoher Salzkonzentration (1,4 M NaCl). Aufgrund der stärkeren Bindung an das Substratpeptid ist die Identifizierung der im zweiten Peak enthaltenen Proteine von besonderem Interesse. Tatsächlich ergab die Auftragung der Proben auf ein SDS-Gel zwei schwache Banden mit Größen von 26 und 95 kDa, welche mit Hilfe der MALDI-MS dem ribosomalen Protein S2 und der ATPase ClpB zugeordnet werden konnten.

S2 ist zusammen mit S3 und S14 auf der äußeren Seite des Kopfes der 30S Untereinheit positioniert und liegt direkt auf der gegenüberliegenden Seite von L7/L12 an der A-Stelle des Ribosoms (siehe Abb. 5.1). S2 dient dabei insbesondere als Bindungsstelle für das ribosomale Protein S1<sup>115</sup>. In verschiedenen Experimenten wurden Crosslinks von S2 mit S1, S3, S5, S8, L1 und L7/L12 nachgewiesen<sup>107</sup>. Eine Interaktion mit EF-Tu konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden, ist jedoch aufgrund der räumlichen Entfernung von S2 zu der Bindungsstelle des ternären Komplexes am Ribosom auch nicht zu erwarten<sup>108-110</sup>.

Bei der ATPase ClpB (Hsp100) handelt es sich um ein Chaperon, welches in der Lage ist, durch Hitze aggregierte Proteine unter Verwendung von ATP wieder zu reaktivieren. Die Funktionsweise von ClpB unterscheidet sich insofern deutlich von anderen bekannten Chaperonen, die die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine unterstützen und die Aggregation von Proteinen nach Hitzeschock verhindern.

Wegen der vermutlich geringen Affinität zum Substratpeptid besteht auch die Möglichkeit, daß die EF-Tu Kinase bei niedrigeren Salzkonzentrationen von der Säule eluiert. Deshalb wurden beim zweiten Lauf alle eluierten Fraktionen und besonders die Proteine im ersten Peak genauer untersucht (Abb. 4.9). So konnten weitere Banden mit den Größen von 30, 48, 57, 61 und 77 kDa durch MALDI-Analyse entsprechend der Reihenfolge als ribosomales Protein L7/L12, Trigger Factor, GroEL, ribosomales Protein S1 und Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) identifiziert werden.

Bei L7 und L12 handelt es sich um ein und dasselbe Protein mit dem einzigen Unterschied, daß der N-Terminus von L7 acetyliert ist. L7/L12 ist in Form von zwei Dimeren, d.h. insgesamt vier Kopien, indirekt über das ribosomale Protein L10 an der 50S Untereinheit des Ribosoms gebunden, wobei der gesamte Komplex, der auch als L8 bezeichnet wird, direkt an der A-Stelle lokalisiert ist. Das Ganze bildet eine Art flexiblen Stiel an der Oberfläche der 50S-Untereinheit, was auch die Crosslinks mit einer ganzen Reihe an anderen ribosomalen Proteinen erklärt<sup>107</sup>. Besonders interessant sind jedoch stärkere Crosslinks zu L2, L5, L10, L11, S2, S3 und S14 (siehe Abb. 5.1)<sup>112</sup>. Die Funktion von L7/L12 liegt in der Bindung der Elongationsfaktoren Tu und G und nach neueren Erkenntnissen auch in der Stimulation der GTPase-Aktivität beider Elongationsfaktoren<sup>111</sup>. Die Interaktion von EF-Tu mit L7/L12 erfolgt dabei ausschließlich über die GTPase Domäne I<sup>113</sup> genau auf der gegenüberliegenden Seite von der phosphorylierbaren Domäne III.

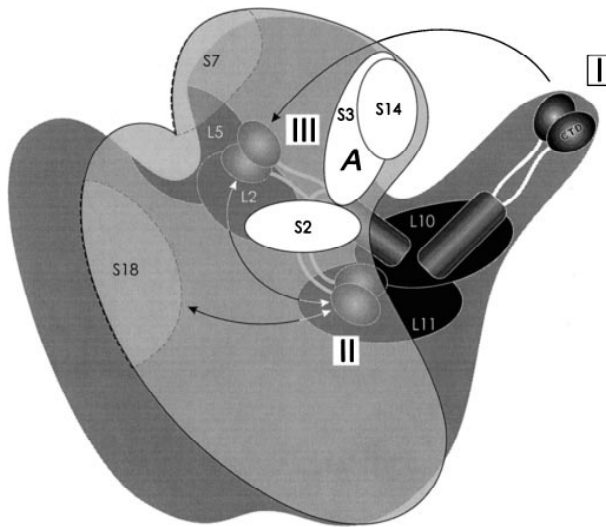
Der Trigger Factor ist ein ATP-unabhängiges an das Ribosom gebundenes Chaperon, welches vermutlich die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen unterstützt<sup>114</sup>. Und auch bei GroEL (Hsp60) handelt es sich um ein Chaperon. Allerdings benötigt GroEL im Gegensatz zum Trigger Factor ATP für dessen Funktion. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Chaperonen ist, daß GroEL ähnlich wie ClpB die Aggregation von denaturierten Proteinen nach einem Hitzeschock verhindert. Daher handelt es sich bei ClpB und GroEL auch um sogenannte Hitzeschockproteine (Hsp's), die nach einem Hitzeschock in den Zellen verstärkt exprimiert werden und so das Überleben der Zellen sicherstellen sollen.

S1 ist nicht wie die meisten anderen ribosomalen Proteine fest am Ribosom gebunden, sondern kann vom Ribosom abdissoziieren und anschließend wieder daran binden. Die Bindungsstelle von S1 an der 30 S-Untereinheit befindet sich, wie bereits zuvor erwähnt, in der direkten Umgebung von S2. Neben S2 interagiert S1 direkt mit S11, S18 und S21, jedoch dürften auch einige weitere, umgebende Proteine, wie S6 und S9, einen Einfluß auf die Bindung von S1 am Ribosom besitzen<sup>116</sup>. Die Hauptfunktion von S1 liegt in der Bindung und der korrekten Positionierung der mRNA an der 30S-Untereinheit des Ribosoms, wobei S1 mit

11 Nukleotiden der mRNA direkt stromaufwärts von der Shine-Dalgarno-Sequenz interagiert<sup>116</sup>. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, daß S1 zusammen mit EF-Tu und SmpB für die Bindung von tmRNA an das Ribosom benötigt wird<sup>116</sup>. Neben diesen mit dem Ribosom assoziierten Funktionen wurde S1 auch als Bestandteil des Replikationskomplexes des Bakteriophagen Q $\beta$  identifiziert<sup>117</sup>. Eine direkte Bindung von S1 an EF-Tu konnte aber bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Bei der PNPase handelt es sich um eine von zwei bekannten 3'-5'-Exoribonukleasen in *E. coli*, die mRNA unter der Verwendung von Phosphat degradiert. Überraschenderweise konnte nachgewiesen werden, daß die PNPase *in vivo* auch umgekehrt als Poly(A)-Polymerase fungieren kann<sup>118</sup>.

Die hier identifizierten Proteine können abgesehen von der PNPase in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen in Chaperone bzw. Hitzeschockproteine, die die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen, und zum anderen in ribosomale Proteine, die alle um die A-Stelle des Ribosoms herum lokalisiert sind. Die Bindung der Chaperone an das Substratpeptid läßt sich durch deren Affinität für hydrophobe Peptidabschnitte, die normalerweise durch die Chaperone vor Aggregation oder falscher Faltung geschützt werden, erklären. Aufgrund der ungewöhnlich hohen Stabilität des phosphorylierten EF-Tu gegenüber Degradation<sup>78</sup> stellt sich natürlich die Frage, ob die Phosphorylierung von EF-Tu durch Hitzeschock induziert wird, um so EF-Tu vor Degradation zu schützen. Dies läßt sich aber recht einfach mit Hilfe eines Phosphorylierungsassays mit Ribosomen aus hitzegeschockten Zellen überprüfen (siehe 5.3). Die Bindung der ribosomalen Proteine kann dagegen am ehesten durch die Bindung eines ganzen Komplexes aus mehreren Proteinen erklärt werden. Da die EF-Tu Kinase wie der ternäre Komplex vermutlich an der A-Stelle des Ribosoms bindet, ist es durchaus wahrscheinlich, daß die EF-Tu Kinase mit einem oder mehreren der hier identifizierten ribosomalen Proteine interagiert. In diesem Fall könnte ein Komplex aus EF-Tu Kinase, S1, S2, L7/L12 und möglicherweise noch weiteren Proteinen auf der Säule gebunden haben und so aufgereinigt worden sein. Ob es sich bei einem dieser ribosomalen Proteine um die EF-Tu Kinase handelt, ist dagegen eher fraglich. Da die EF-Tu Kinase nach den bisherigen Erkenntnissen vom Ribosom abdissoziieren kann, kommt somit allerhöchstens S1 für diese Funktion in Frage, während S2 und L7/L12 aufgrund der Struktur des Ribosoms eher als Bindungsstelle für die EF-Tu Kinase in Frage kommen<sup>108-110</sup>. Die Positionen von S2 und L7/L12 am Ribosom sind zur Verdeutlichung in Abb. 5.1 dargestellt. Die Bindung der PNPase läßt sich hingegen nicht so einfach erklären. Eine mögliche Erklärung ist, daß die PNPase in der Form eines RNA-Protein Komplexes mit einem anderen RNA-bindenden Protein wie z.B. S1 aufgereinigt



**Abb. 5.1 Modell des 70S Ribosoms mit einer Darstellung der Interaktionen von L7/L12 zu anderen ribosomalen Proteinen nach Dey et al.<sup>112</sup>.** Deutlich zu erkennen sind L7/L12 (I) und S2, sowie die dazwischen liegende A-Stelle des Ribosoms, wo sich auch die Bindungsstelle von EF-Tu befindet. S1 bindet abgewandt von der A-Stelle an S2. Die Beweglichkeit des „L7/L12-Stiels“ erklärt die in Crosslinking Experimenten festgestellten weitreichenden Interaktionen von L7/L12.

wurde. Hierfür besitzt die PNPase wie S1 eine sogenannte S1-Domäne, die für die Bindung von RNA verantwortlich ist. Allerdings ist aufgrund der geringen Sequenzübereinstimmung in der MALDI-MS nicht gesagt, ob es sich bei der hier untersuchten Bande auch tatsächlich um die PNPase handelt.

Neben den hier identifizierten Proteinbanden waren auf den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen noch weitere feine Banden sichtbar. Um eine noch höhere Sensitivität bei der Färbung des SDS-Gels zu erhalten, wurde zusätzlich ein weiteres Gel mit SYPRO Orange, dessen Nachweisgrenze wie bei der Silberfärbung bei ungefähr 1-2 ng Protein liegt, angefärbt (Abb. 4.10). Tatsächlich sind auf diesem Gel deutlich mehr Banden zu erkennen als auf den mit Coomassie angefärbten Gelen. So sind mindestens 13 teilweise überlagerte Banden zusätzlich zu den sieben zuvor identifizierten Proteinbanden sichtbar. Dabei könnte es sich um unspezifisch bindende Proteine, aber auch um weitere ribosomale Proteine oder gar die EF-Tu Kinase handeln. Eine Identifizierung dieser Banden mittels MALDI-MS war jedoch aufgrund der zu geringen Proteinmenge bzw. der Überlagerungen nicht möglich.

Das Ergebnis der Affinitätschromatographie zeigt, daß die Spezifität des hier verwendeten Substratpeptids nicht ausreicht, um die EF-Tu Kinase eindeutig zu identifizieren. Dies erklärt sich aus der recht geringen Affinität von Kinasen für ihr Substrat, die mit einer Dissoziationskonstante von 10 bis 30  $\mu\text{M}$  im Bereich von unspezifischen Bindungen liegt. Eine weitere Verbesserung der Affinitätschromatographie kann somit nur durch die Verwendung eines Substratpeptids erreicht werden, welches die EF-Tu Kinase stärker bindet. Eine Möglichkeit zur Herstellung eines solchen Substrats zeigt eine aktuelle Veröffentlichung von Loog et al.<sup>119</sup> auf, in der ein hochaffines Bisubstrat, bestehend aus einem ATP-Analogon und einem Substratpeptid verknüpft über einen C6-Spacer, zur Aufreinigung der Proteinkinase A (PKA)



direkt aus rohem Zellextrakt verwendet wurde. Durch die mehr als hundertfach stärkere Bindung einer Kinase an ein solches Bisubstrats mit einer Dissoziationskonstante von unter  $0,1 \mu\text{M}$  müßte es ohne Probleme möglich sein, die EF-Tu Kinase in einem Schritt aufzureinigen und anschließend zu identifizieren.

### 5.3 Phosphorylierung von EF-Tu nach Hitzeschock

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von EF-Tu durch Hitzeschock induziert wird, mußten einige Dinge beachtet werden. Da bei  $37^\circ\text{C}$  wachsende *E. coli* Zellen ständig leicht Hitzeschock-induziert sind, d.h. Hitzeschockproteine exprimieren, wurden die Zellen vor dem Hitzeschock bei  $30^\circ\text{C}$  wachsen gelassen, damit keine ungewollte Verfälschung der Ergebnisse eintrat. Um eine ausreichende Expression der Hitzeschockproteine zu gewährleisten, erfolgte der Hitzeschock für 20 min bei  $42^\circ\text{C}$ .

Die Auswertung des Phosphorylierungsassays ergab sowohl bei  $30^\circ\text{C}$  als auch nach Hitzeschock bei  $42^\circ\text{C}$  keine oder eine kaum sichtbare Phosphorylierung von EF-Tu, wobei zwischen den beiden Proben kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist (Abb. 4.11). Bei  $37^\circ\text{C}$  ist hingegen eine schwache Phosphorylierung von EF-Tu zu erkennen. Daraus läßt sich mit einiger Vorsicht schließen, daß die Phosphorylierung von EF-Tu nicht durch Hitzeschock induziert wird bzw. durch eines der Hitzeschockproteine erfolgt, sondern eher mit der Aktivität der Proteinbiosynthese in den Zellen korreliert. So ist es durchaus wahrscheinlich, daß die EF-Tu Kinase bei  $37^\circ\text{C}$  stärker exprimiert wird oder eine höhere Aktivität besitzt als bei  $30^\circ\text{C}$ . Warum allerdings die Phosphorylierung im Vergleich zu vorhergehenden Experimenten<sup>77-79</sup> so schwach ausgefallen ist, kann nicht so einfach gedeutet werden. Eine mögliche Erklärung könnten aber die Ergebnisse in 4.5 aufzeigen, welche in Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert werden.

Von den weiteren auf dem Autoradiogramm sichtbaren Phosphorylierungen (Abb. 4.11) ist die Bande bei 60 kDa besonders interessant. Bei diesem Protein dürfte es sich aufgrund der Größe um das Chaperon GroEL handeln, dessen Phosphorylierung bzw. Autophosphorylierung bereits 1992 von Sherman et al. nachgewiesen wurde<sup>120,121</sup>. Und wie bereits in 4.2 aufgezeigt, wird GroEL bei der Isolierung von Ribosomen mit aufgereinigt. Allerdings läßt sich nicht sagen, ob es sich hier um eine Phosphorylierung durch eine Kinase oder um eine Autophosphorylierung handelt.

Neben EF-Tu und GroEL ist noch eine weitere Phosphorylierung exakt auf Höhe von EF-Ts ( $\sim 34$  kDa) sichtbar (Abb. 4.11), die als einzige unabhängig von der Temperatur gleich stark

ausfällt. Zwar wurde vor kurzem die Phosphorylierung von EF-Ts innerhalb der Proteinbiosynthese *in vitro* nachgewiesen<sup>122</sup>, jedoch ist es aufgrund der Ergebnisse in 4.5 eher fraglich, ob es sich bei dieser Bande wirklich um EF-Ts handelt. Statt dessen könnte es sich auch um ein ganz anderes Protein handeln.

#### 5.4 Überexpression und Aufreinigung von zu untersuchenden Proteinen

Um den Einfluß von S1, S2, EF-P und der ribosomalen ATPase RbbA auf die Phosphorylierung von EF-Tu zu untersuchen, mußten diese vorher überexprimiert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden die entsprechenden Gene zunächst mit einer PCR vervielfältigt und in den Überexpressionsvektor pTyb1 kloniert. Die Klonierung von S2 und EF-P verlief dabei problemlos, während für S1 und die ribosomale ATPase RbbA mehrere Versuche bzw. Strategien bei PCR und Klonierung notwendig waren. Ein weiteres Problem zeigte sich bei der Sequenzierung: So konnte von keinem der Klone eine auswertbare Sequenz erhalten werden. Allgemein ließen sich die Inserts von pTyb1 nur äußerst schwer zu sequenzieren. Aus diesem Grund wurden die Klone von S1, S2 und EF-P zusätzlich mit Hilfe der Proteinbiosynthese *in vitro* überprüft. Dadurch ist es zwar nicht möglich, einzelne Mutationen nachzuweisen, aber es kann zumindest festgestellt werden, ob die gewünschten Proteine auch vollständig exprimiert werden. Tatsächlich exprimierten sowohl pTyb-S1 als auch pTyb-EFP ein Fusionsprotein mit der korrekten Größe, während bei pTyb-S2 überhaupt kein Produkt zu erkennen ist (Abb. 4.12). Bemerkenswert dabei ist, daß selbst das mit 116 kDa für die Proteinbiosynthese *in vitro* sehr große S1-Intein-Fusionsprotein eine deutlich sichtbare Bande erzeugte. Die bei S1 und EF-P erkennbaren Abbruchprodukte stellen für die Expression und die anschließende Aufreinigung kein Problem dar. Durch die Verwendung des C-terminalen Intein-Tags (pTyb1) können nur vollständig exprimierte Proteine aufgereinigt werden. Bei pTyb-S2 liegt dagegen vermutlich entweder eine Mutation vor, die eine Expression von S2 verhindert, oder die Expression von S2 wird durch einen Regulationsmechanismus auf Transkriptions- oder Translationsebene reprimiert. Da Literaturrecherchen mit der ribosomalen ATPase RbbA einen vielversprechenden Kandidaten für die Funktion der EF-Tu Kinase ergaben, sowie S2 eigentlich hierfür nicht in Frage kommt (siehe 5.2), wurde im weiteren Verlauf auf die Expression von S2 verzichtet und statt dessen die ribosomale ATPase RbbA überexprimiert und aufgereinigt.

Die Überexpression und Aufreinigung von S1 und EF-P verlief problemlos. So konnte jeweils eine für die weiteren Experimente ausreichende Menge an Protein mit einer geschätzten Rein-

heit von über 95% (siehe Abb. 4.13) gewonnen werden. Die Überexpression der ribosomalen ATPase erbrachte dagegen nur eine äußerst geringe Proteinmenge. Eine auf ein SDS-Gel aufgetragene Probe zeigte zwar eine Bande mit der zu erwartenden Größe, jedoch war diese so schwach war, daß keine Dokumentation des Gels möglich war. Auch eine Überexpression mit einem weiteren, vollständig unabhängig hergestellten Klon erbrachte das gleiche Ergebnis. Dies deutet darauf hin, daß die Expression von RbbA streng reguliert ist und bei Überexpression reprimiert wird. Da eine Regulation auf Translationsebene meist durch Codons im N-terminalen Bereich gesteuert wird, könnte die Expression von RbbA vermutlich durch Verwendung eines N-terminalen Tags verbessert werden. Dies zeigen auch die Veröffentlichungen von Kiel et al.<sup>104-106</sup>, in denen die erfolgreiche Überexpression von RbbA unter Verwendung eines N-terminalen His-Tags beschrieben ist. Eine hierfür notwendige Umklonierung konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden. Statt dessen wurde die ribosomale ATPase geringfügig aufkonzentriert und ohne weitere Aufarbeitung im folgenden Phosphorylierungsexperiment eingesetzt.

## 5.5 Untersuchungen zur Phosphorylierung von EF-Tu

Um verschiedene Fragen, die sich im Laufe dieser Arbeit gestellt haben, zu beantworten, wurden mehrere Phosphorylierungsexperimente parallel durchgeführt. Im ersten Experiment wurde die Lokalisation der EF-Tu Kinase bei der Aufarbeitung der 70S-Ribosomen unter verschiedenen Salzbedingungen untersucht.

Bisher wurde vermutet, daß die EF-Tu Kinase eher schwach am Ribosom gebunden ist und vom Ribosom abdissoziieren kann. Dem widerspricht jedoch die stärkere Phosphorylierung von EF-Tu bei Zugabe der mit Ammoniumchlorid gewaschenen Ribosomen im Vergleich zu „normal“ aufgearbeiteten Ribosomen (Abb. 4.15). Dieser Verhalt läßt sich eigentlich nur dadurch erklären, daß die EF-Tu Kinase entweder ein Bestandteil des Ribosoms oder zumindest äußerst fest am Ribosom gebunden ist, wobei die EF-Tu Kinase bei normal aufgearbeiteten Ribosomen vermutlich durch andere am Ribosom gebundene Proteine inhibiert oder sterisch blockiert wird. Dagegen scheint die stärkere Phosphorylierung von EF-Tu im S100-Überstand der Kontrolle und der mit EDTA aufgearbeiteten Probe wiederum eher für eine vom Ribosom unabhängige Kinase zu sprechen. Wenn man allerdings das hier verwendete Protokoll zur Aufarbeitung der Rohribosomen genauer betrachtet, zeigt sich, daß bei der Ultrazentrifugation nur Partikel mit einem Sedimentationskoeffizient von über 55 Svedberg abgetrennt werden. Unter diesen Bedingungen sedimentieren nur vollständige Ribosomen, während einzelne

ribosomale Untereinheiten im Überstand verbleiben. Bei solch niedrigen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ( $\leq 1$  mM), wie sie bei der Aufarbeitung mit EDTA vorherrschen, dissoziieren die Ribosomen jedoch größtenteils in ihre Untereinheiten, was folglich die hohe EF-Tu Kinase-Aktivität im S100-Überstand erklärt. Des weiteren scheint die EF-Tu Kinase im S100-Überstand im Gegensatz zum 70S-Pellet der Kontrolle nicht inhibiert oder blockiert zu sein.

Somit sprechen diese Ergebnisse durchaus dafür, daß die EF-Tu Kinase ein Bestandteil des Ribosoms ist. Literaturrecherchen hierzu ergaben eine Veröffentlichung von Ogata et al.<sup>123</sup>, in der eine intrinsische ATPase- und GTPase-Aktivität des Ribosoms beschrieben wird, welche selbst durch mehrfaches Waschen mit Ammoniumchlorid nicht vom Ribosom abgewaschen werden kann. Interessanterweise ist von der EF-Tu Kinase bekannt, daß sie sowohl ATP als auch GTP als Substrat zur Phosphorylierung von EF-Tu verwenden kann<sup>70</sup>. Daher könnte es sich bei dieser intrinsischen ATPase/GTPase tatsächlich um die EF-Tu Kinase handeln. Dafür spricht auch das Vorhandensein einer ähnlichen ATPase- und GTPase-Funktion innerhalb der 40S-Untereinheit eukaryontischer Ribosomen<sup>124-126</sup>, was auf eine ähnlich starke Konservierung in der Evolution hindeutet wie bei der EF-Tu Kinase.

Im Gegensatz zu EF-Tu ist die Phosphorylierung von GroEL (60 kDa) unabhängig von der Art der Aufarbeitung bei allen Proben ungefähr gleich stark (Abb. 4.15). Da es sich hierbei vermutlich um eine Autophosphorylierung von GroEL handelt, scheinen die verschiedenen Salzkonzentrationen bei der Aufarbeitung keinen großen Einfluß auf die Bindung von GroEL am Ribosom bzw. auf dessen Lokalisation zu haben. Dagegen zeigt die Bande auf Höhe von EF-Ts je nach verwendetem Puffer deutliche Unterschiede in der Stärke der Phosphorylierung. Hier wird die zugehörige Kinase bzw. möglicherweise auch deren Substrat bei hohen Salzkonzentrationen vom Ribosom gewaschen. Des weiteren geht deren Aktivität nach der Aufarbeitung mit EDTA größtenteils verloren.

Im zweiten Versuch wurde der Einfluß der in Kapitel 4.4 überexprimierten Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu untersucht. Die Ergebnisse zeigen jedoch, daß eigentlich keines der Proteine für die Funktion der EF-Tu Kinase in Frage kommt. Zwar ist bei Zugabe von EF-P zu normal aufgearbeiteten Ribosomen eine schwache Verstärkung der Phosphorylierung von EF-Tu zu erkennen (Abb. 4.16 C). Falls EF-P direkt mit der EF-Tu Kinase interagieren sollte, müßte auch bei Verwendung von unter Hochsalzbedingungen aufgearbeiteten Ribosomen eine Veränderung zu erkennen sein, was aber nicht der Fall ist (Abb. 4.17). Dies spricht eher für einen indirekten Einfluß von EF-P auf die EF-Tu Kinase, wie z.B. durch eine von EF-P induzierte Konformationsänderung des Ribosoms, welche die EF-Tu Kinase aktiviert. Tatsächlich gibt es in der Literatur Hinweise darauf, daß die Bindung von EF-P am Ribosom

zu einer solchen Konformationsänderung innerhalb der rRNA führt<sup>127</sup>. Wenn man andererseits den Phosphorylierungsassay der gewaschenen (Abb. 4.17) mit dem der normal aufgearbeiteten Ribosomen (Abb. 4.16 C) vergleicht, ist wie im vorhergehenden Versuch (Abb. 4.15) bei allen Proben eine Verstärkung der Phosphorylierung von EF-Tu zu erkennen, wobei der Unterschied sogar noch deutlicher sichtbar ist als in Abb. 4.15. Folglich sprechen auch diese Ergebnisse eher für eine im Ribosom integrierte Kinase-Funktion als für eine frei lösliche, nur locker am Ribosom gebundene Kinase.

Von den zusätzlich in Abb. 4.16 C sichtbaren Banden fällt sofort die Phosphorylierung von EF-P auf. Bisher ist nur bekannt, daß EF-P in mit Bakteriophagen T7 infizierten *E. coli* Zellen phosphoryliert wird. Somit handelt es sich hier um eine neue, bisher noch nicht beschriebene *in vitro* Phosphorylierung von EF-P. Da die Phosphorylierung sowohl in der Kontrolle ohne Ribosomen (Abb. 4.16 D) als auch bei Verwendung gewaschener Ribosomen (Abb. 4.17) kaum sichtbar ist, dürfte es sich bei der zugehörigen Kinase im Gegensatz zur EF-Tu Kinase um eine lösliche, nur locker am Ribosom assoziierte Kinase handeln. Eine Autophosphorylierung ist dagegen eher unwahrscheinlich. Die schwache Phosphorylierung von EF-P in der Kontrolle ohne Ribosomen deutet darauf hin, daß eine geringe Menge der EF-P Kinase zusammen mit EF-P aufgereinigt wurde.

Die Phosphorylierung bei 47 kDa (Abb. 4.16 C) scheint ebenfalls mit EF-P in Zusammenhang zu stehen. Anhand der Literatur kommt eigentlich nur ein Protein in Frage, welches eine Rolle in der Proteinbiosynthese spielt und die passende Größe besitzt: Faktor W. Der Faktor W wurde 1995 von Ganoza et al. beschrieben und ist, wie sich bei Rekonstitutionsexperimenten herausstellte, unabdingbar für eine funktionierende Proteinbiosynthese<sup>128</sup>. Inzwischen konnte interessanterweise nachgewiesen werden, daß es sich bei Faktor W um ein 47 kDa großes Fragment der ribosomalen ATPase RbbA handelt<sup>127</sup>. Dies erklärt auch die 47 kDa Bande in den Proben mit RbbA. Warum diese Bande jedoch ebenfalls in den Proben mit EF-P zu sehen ist, läßt sich nicht so einfach erklären. Am Wahrscheinlichsten ist vielleicht, daß RbbA bzw. Faktor W an EF-P bindet, und so eine geringe Menge bei der Aufreinigung von EF-P mitaufgereinigt wurde. Eine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial kann dagegen ausgeschlossen werden, da die Bande ansonsten auch in der Probe mit ribosomalem Protein S1 sichtbar sein sollte. Ebenso wie bei EF-P ist die Phosphorylierung von Faktor W bei Verwendung von gewaschenen Ribosomen nicht vorhanden. Somit dürfte es sich auch hier vermutlich um eine locker am Ribosom assoziierte Kinase handeln, wobei allerdings aufgrund der ATPase-Funktion von Faktor W bzw. RbbA eine Autophosphorylierung nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Eine andere Frage ist, welche Rolle die Phosphorylierungen von EF-P

und Faktor W innerhalb der Proteinbiosynthese spielen. Da aber die genaue Funktion der beiden Proteine immer noch unbekannt ist, müssen in der Zukunft noch einige biochemische Experimente durchgeführt werden, bevor eine Aussage darüber gemacht werden kann.

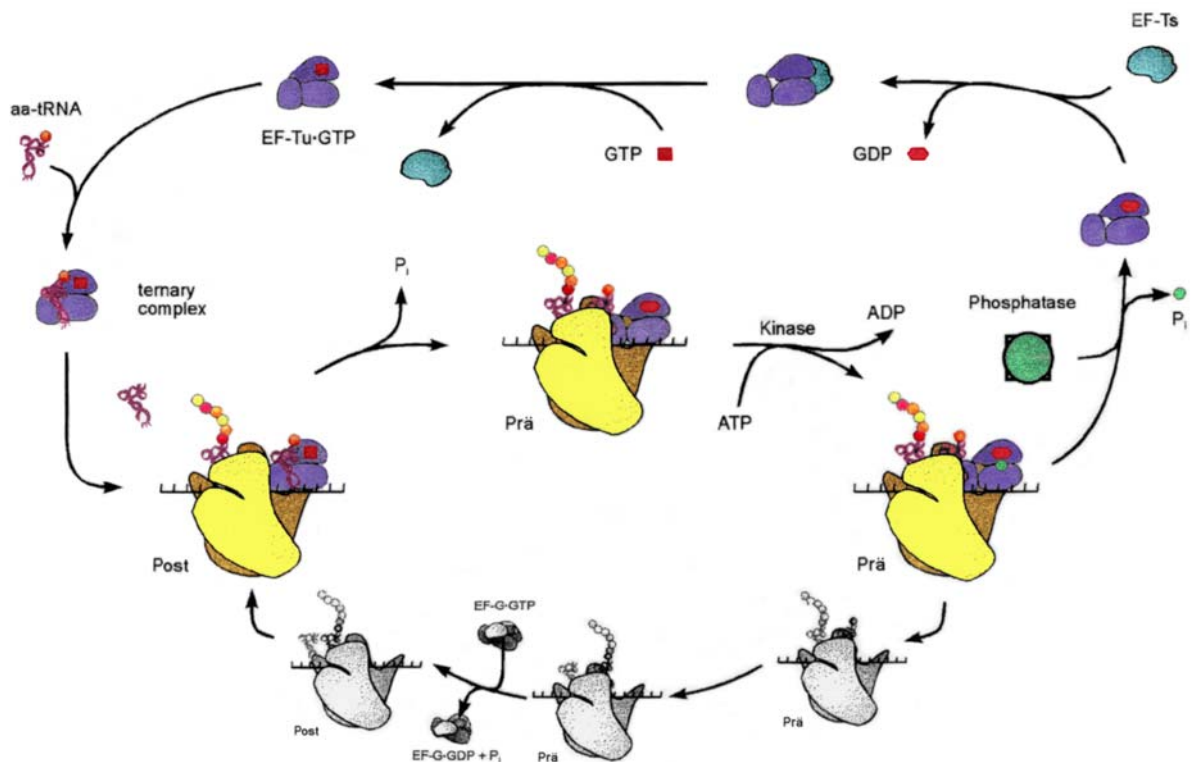
Während die Phosphorylierung von GroEL durch keines der zugegebenen Proteine beeinflusst wird, ist die Bande auf Höhe von EF-Ts in den Proben mit ribosomalem Protein S1 signifikant schwächer als in den anderen Proben. Wahrscheinlich bindet hier S1 kompetitiv an der Kinase oder an ihrem Substrat und blockiert dadurch die Phosphorylierung. Obwohl die Bande sich exakt auf Höhe von EF-Ts befindet, dürfte es sich dabei nicht um EF-Ts handeln, da ansonsten zumindest ein schwacher Unterschied in der Phosphorylierung zwischen den Proben mit und ohne EF-Ts (Abb. 4.16 C, Spuren 4 und 6) zu sehen sein müßte. Die Identifizierung der Bande könnte in zukünftigen Experimenten mit Hilfe der MALDI-MS erfolgen.

## 5.6 Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu

In dem von Corinna Lippmann aufgestellten Modell<sup>79,129</sup> bindet der ternäre Komplex an der A-Stelle des Ribosoms, und bei korrekter Wechselwirkung zwischen Codon und Anticodon erfolgt die Hydrolyse des von EF-Tu gebundenen GTPs zu GDP. Durch die damit einhergehende Konformationsänderung von EF-Tu wird das Threonin 382 für die Kinase frei zugänglich und noch am Ribosom phosphoryliert. Der phosphorylierte EF-Tu besitzt eine geringere Affinität zum Ribosom und kann so leichter abdissoziieren. Bisher wurde jedoch davon ausgegangen, daß es sich bei der EF-Tu Kinase um eine nur locker am Ribosom assoziierte, lösliche Kinase und nicht um eine integrierte Funktion des Ribosoms handelt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit sprechen allerdings eher für eine im Ribosom integrierte oder zumindest sehr fest am Ribosom gebundene EF-Tu Kinase.

Die in den letzten Experimenten verwendeten mit Ammoniumchlorid gewaschenen Ribosomen – sogenannte „Loose Couples“ – besitzen noch eine weitere äußerst interessante Eigenschaft. Im Gegensatz zu normalen Ribosomen („Tight Couples“) ist die Konformation der Loose Couples weniger dicht gepackt<sup>130</sup>, was sich unter anderem auch in unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften widerspiegelt. In einem von D.P. Burma aufgestellten Modell entspricht die Loose Couple Konformation dem in Kapitel 1.3.4 beschriebenen Prä-Zustand und die Tight Couple Konformation dem Post-Zustand des Ribosoms (siehe Abb. 1.2)<sup>131</sup>. Dabei stützt sich das Modell vor allen Dingen darauf, daß Loose Couples mit Hilfe von EF-G·GTP in Tight Couples und umgekehrt Tight Couples durch EF-Tu·GTP·Phe-tRNA<sup>Phe</sup> in Loose Couples umgewandelt werden können<sup>132,133</sup>. Wenn man nun die Ergebnisse der Phos-

phorylierungsassays in diesem Zusammenhang betrachtet, so stimmen diese recht gut mit dem von Corinna Lippmann aufgestellten Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu überein. In Folge dessen ist es möglich, ein leicht modifiziertes Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu aufzustellen (Abb. 5.2): Darin bindet der ternäre Komplex an das Ribosom und bei korrekter Wechselwirkung zwischen Codon und Anticodon erfolgt die Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP. Die damit einhergehende Konformationsänderung von EF-Tu bewirkt den Übergang des Ribosoms von Post- in den Prä-Zustand, wodurch gleichzeitig die EF-Tu Kinase innerhalb des Ribosoms aktiviert wird. Durch die Phosphorylierung wird die Affinität von EF-Tu für das Ribosom verringert, was zu dessen Ablösung vom Ribosom führt. Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 5.2 dargestellt.



**Abb. 5.2 Modifiziertes Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu im Elongationszyklus nach C. Lippmann<sup>79</sup>.** Darstellung der Komponenten: 30S-Untereinheit (gelb); 50S-Untereinheit (braun); EF-Tu (violett); EF-Ts (türkis); Phosphatase (grün); tRNA (bordeaux); GTP/GDP (rot); Pi (hellgrün)

## 5.7 Ausblick

Wie bereits zuvor diskutiert, deuten die Ergebnisse in dieser Arbeit auf eine im Ribosom integrierte EF-Tu Kinase hin. Für einen endgültigen Beweis müssen jedoch noch einige Experimente durchgeführt werden.

Zuerst sollte durch mehrfaches Waschen der Ribosomen mit 1 M Ammoniumchlorid getestet werden, ob die EF-Tu Kinase nicht doch vom Ribosom abgewaschen werden kann. In einem zweiten Versuch könnte durch die Zugabe von mit Ammoniumchlorid gewaschenen ribosomalen 30S- bzw. 50S-Untereinheiten überprüft werden, ob sich die EF-Tu Kinase auf eine der Untereinheiten eingrenzen läßt, oder ob sie nur in kompletten 70S-Ribosomen aktiviert ist. Eine weitere örtliche Eingrenzung der Kinase-Aktivität, z.B. auf einzelne ribosomale Proteine, ließe sich gegebenenfalls durch Rekonstitutionsexperimente erreichen.

Sollte sich die EF-Tu Kinase wider erwarten doch vom Ribosom ablösen lassen, könnte sie, wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, durch Affinitätschromatographie über eine Bisubstrat-Säule aufgereinigt und anschließend mit Hilfe der MALDI-MS identifiziert werden. In diesem Fall sollte auch die ribosomale ATPase RbbA noch einmal genauer untersucht werden.

Durch die hier beschriebenen Experimente müßte es möglich sein, die EF-Tu Kinase auf das Ribosom bzw. eine ribosomale Untereinheit einzugrenzen oder sogar zu identifizieren.



## 6 Zusammenfassung

Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), welcher zur Superfamilie der GTPasen gehört, ist das am häufigsten in Prokaryonten vorkommende Protein. Seine genaue Funktion liegt in der Beladung der A-Stelle des aktiven Ribosoms mit der korrekten Aminoacyl-tRNA. Dabei interagiert EF-Tu mit verschiedenen Komponenten der Proteinbiosynthese und liegt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. Eine besonders interessante Eigenschaft von EF-Tu ist dessen reversible Phosphorylierung während des Elongationszyklusses.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in mehreren verschiedenen Ansätzen versucht, das für die Phosphorylierung von EF-Tu verantwortliche Enzym – die EF-Tu Kinase – zu identifizieren und genauer zu charakterisieren. Ein erster Versuch, die EF-Tu Kinase mit Hilfe eines Yeast Two Hybrid Assays gegen eine genomische *E. coli* Bibliothek zu „fangen“, erwies sich als nicht erfolgreich. Dabei wurde festgestellt, daß diese Methode hierfür ungeeignet ist.

Als nächstes Experiment wurde eine Affinitätschromatographie gegen ein Substratpeptid der EF-Tu Kinase durchgeführt. Von den derart aufgereinigten Proteinen konnten mehrere ribosomale Proteine, die an der A-Stelle des Ribosoms positioniert sind, sowie diverse Chaperone bzw. Hitzeschockproteine als potentielle Bindungspartner von EF-Tu identifiziert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden verschiedene Phosphorylierungsassays durchgeführt, um die EF-Tu Kinase genauer zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Versuche konnte eine Beteiligung von Chaperonen an der Phosphorylierung von EF-Tu nahezu ausgeschlossen werden. Statt dessen stellte sich heraus, daß die EF-Tu Kinase entweder ein Bestandteil des Ribosoms oder zumindest sehr fest am Ribosom gebunden ist.

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluß verschiedener an der Proteinbiosynthese beteiligter Proteine auf die Phosphorylierung von EF-Tu untersucht werden. Hierfür wurden das ribosomale Protein S1, der Elongationsfaktor P (EF-P) sowie die ribosomale ATPase RbbA überexprimiert, aufgereinigt und anschließend zu einem Phosphorylierungsassay gegeben. Allerdings konnte bei keinem dieser Proteine ein Einfluß auf die Phosphorylierung von EF-Tu festgestellt werden. Dafür wurde zum ersten Mal die *in vitro* Phosphorylierung von EF-P unabhängig von einer Phageninfektion nachgewiesen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stimmen größtenteils mit dem von Corinna Lippmann postulierten Modell zur Phosphorylierung von EF-Tu im Elongationszyklus überein. Jedoch wird darin noch von einer löslichen, nur locker am Ribosom assoziierten EF-Tu Kinase ausgegangen. Abschließend wurde in diesem Zusammenhang ein leicht modifiziertes Modell mit einer im Ribosom integrierten EF-Tu Kinase aufgestellt.

## Summary

The elongation factor Tu (EF-Tu) belonging to the superfamily of GTPases is the most abundant protein in prokaryotic cells. In protein biosynthesis EF-Tu is responsible for delivering the correct aminoacyl-tRNA to the A site of the active ribosome. Thereby it interacts with several components of the translation apparatus and exists in two different conformations. Most interestingly EF-Tu gets reversibly phosphorylated during the elongation cycle.

In this work several different approaches were made to identify and to characterize the EF-Tu kinase, the enzyme responsible for the phosphorylation of EF-Tu. A first attempt to identify the EF-Tu kinase using a yeast two-hybrid system against a genomic library from *E. coli* wasn't successful. Thereby it became apparent that the yeast two hybrid system is unsuitable for this intention.

In a second experiment, an affinity chromatography against a substrate peptide of the EF-Tu kinase was carried out. Among the purified proteins a couple of ribosomal proteins all positioned at the A site of the ribosome and some chaperones respectively heat shock proteins could be identified as potential binding partners of EF-Tu.

Based on these results several phosphorylation assays were done to further characterize the EF-Tu kinase. According to the findings of these experiments a contribution of chaperones to the phosphorylation of EF-Tu could be considered as very unlikely. Instead, it could be demonstrated that the EF-Tu kinase is either a part of the ribosome or at least very tightly bound to the ribosome.

In another experiment, the influence of several proteins involved in protein biosynthesis on the phosphorylation of EF-Tu was examined. Therefore the ribosomal protein S1, the elongation factor P (EF-P) and the ribosomal ATPase RbbA were overexpressed, purified and then added to a phosphorylation assay. In this case, none of the proteins showed an effect on the phosphorylation of EF-Tu. Apart from that, the *in vitro* phosphorylation of EF-P independent of phage infection could be observed for the first time.

For the most part, the insights obtained in this work correspond with the model of the phosphorylation of EF-Tu within the elongation cycle postulated by Corinna Lippmann. However, herein it was assumed that the EF-Tu kinase is soluble, only loosely bound to the ribosome. Concluding, a slightly modified model with the EF-Tu kinase integrated into the ribosome was set up.

## 7 Literatur

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts und Watson, J.D. (1995) Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Weinheim: VCH.
2. Stryer, L. (1995) Biochemistry, 4th edition, New York: W.H. Freeman.
3. Lewin, B. (1997) Genes VI, New York: Oxford University Press.
4. Voet, D. und Voet, J.G. (1995) Biochemistry, 2nd edition, New York: Wiley.
5. Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.L. und Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4801-4805.
6. Carbon, P., Ehresmann, P., Ehresmann, B. und Ebel, J.P. (1978) The sequence of *Escherichia coli* ribosomal 16 S RNA determined by new rapid gel methods. *FEBS Lett.*, **94**, 152-156.
7. Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G. (1970) Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1276-1282.
8. Brosius, J., Dull, T.J. und Noller, H.F. (1980) Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 201-204.
9. Brownlee, G.G., Sanger, F. und Barrell, B.G. (1968) The sequence of 5 s ribosomal ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, **34**, 379-412.
10. Erdmann, V.A., Huysmans, E., Vandenberghe, A. und de Wachter R. (1983) Collection of published 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 105-133.
11. Specht, T., Wolters, J. und Erdmann, V.A. (1991) Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 2189-2230.
12. Pettersson, J., Hardy, S.J.S. und Liljas, A. (1976) The ribosomal protein L8 is a complex L7/L12 and L10. *FEBS Lett.*, **64**, 135-138.
13. Lee, C.C., Cantor, C.R. und Wittmann-Liebold, B. (1981) The number of copies of ribosome-bound proteins L7 and L12 required for protein synthesis activity. *J. Biol. Chem.*, **256**, 41-48.
14. Nierhaus, K.H. (1990) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: Features and future. *Biochemistry*, **29**, 4997-5008.
15. Hou, Y.M., Francklyn, C. und Schimmel, P. (1989) Molecular dissection of a transfer RNA and the basis for its identity. *TIBS*, **14**, 233-237.

16. Nierhaus, K.H. (1996) Die Tricks der ribosomalen Elongationsfaktoren. *Angew. Chem.*, **108**, 2342-2345.
17. Noller, H.F. (1993) Peptidyl transferase: protein, ribonucleoprotein, or RNA? *J. Bacteriol.* **175**, 5297-5300.
18. Nitta, I., Ueda, T. und Watanabe, K. (1998) Possible involvement of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA in peptide bond formation. *RNA*, **3**, 257-267.
19. Hirokawa, G., Kiel, M.C., Muto, A., Selmer, M., Raj, V.S., Liljas, A., Igarashi, K., Kaji, H. und Kaji, A. (2002) Post-termination complex disassembly by ribosome recycling factor, a functional tRNA mimic. *EMBO J.*, **21**, 2272-2281.
20. Lucas-Lenard, J. und Lipmann, F. (1966) Separation of three microbial amino acid polymerization factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1562- 1566.
21. Arai, K., Clark, B.F., Duffy, L., Jones, M.D., Kaziro, Y., Laursen, R.A., L'Italien, J., Miller, D.L., Nagarkatti, S., Nakamura, S., Nielsen, K.M., Petersen, T.E., Takahashi, K. und Wade, M. (1980) Primary structure of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1326-1330.
22. Furano, A.V. (1975) Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4780-4784.
23. Miyajima, A. und Kaziro, Y. (1978) Coordination of levels of elongation factors Tu, Ts, and G, and ribosomal protein S1 in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **83**, 453-462.
24. Shibuya, M. und Kaziro, Y. (1979) Studies on stringent control in a cell-free system. Regulation by guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate of the synthesis of elongation factor Tu. *J. Biochem.*, **86**, 403-411.
25. Jaskunas, S.R., Lindahl, L. und Nomura, M. (1975) Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu in *E. coli*. *Nature*, **257**, 458-462.
26. Yokota, T., Sugisaki, H., Takanami, M. und Kaziro, Y. (1980) The nucleotide sequence of the cloned *tufA* gene of *Escherichia coli*. *Gene*, **12**, 25-31.
27. Pedersen, S. und Reeh, S. (1978) Functional mRNA half lives in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **166**, 329-336.
28. Saito, K., Mattheakis, L.C. und Nomura, M. (1994) Post-transcriptional regulation of the *str* operon in *Escherichia coli*. Ribosomal protein S7 inhibits coupled translation of S7 but not its independent translation. *J. Mol. Biol.*, **235**, 111-124.
29. An, G. und Friesen, J.D. (1980) The nucleotide sequence of *tufB* and four nearby tRNA structural genes of *Escherichia coli*. *Gene*, **12**, 33-39.

30. Verbeek, H., Nilsson, L. und Bosch, L. (1991) FIS-induced bending of a region upstream of the promoter activates transcription of the *E. coli thrU(tufB)* operon. *Biochimie*, **73**, 713-718.
31. Van Delft, J.H., Talens, A., De Jong, P.J., Schmidt, D.S. und Bosch, L. (1988) Control of the tRNA-tufB operon in *Escherichia coli*. 2. Mechanisms of the feedback inhibition of tufB expression studied in vivo and in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **175**, 363-374.
32. Zuurmond, A.M., Rundlof, A.K. und Kraal, B. (1999) Either of the chromosomal tuf genes of *E. coli* K-12 can be deleted without loss of cell viability. *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 603-607.
33. Wolf, H., Chinali, G. und Parmeggiani, A. (1974) Kirromycin, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4910-4914.
34. Wolf, H., Assmann, D. und Fischer, E. (1978) Pulvomycin, an inhibitor of protein biosynthesis preventing ternary complex formation between elongation factor Tu, GTP, and aminoacyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5324-5328.
35. Anborgh, P.H. und Parmeggiani, A. (1991) New antibiotic that acts specifically on the GTP-bound form of elongation factor Tu. *EMBO J.*, **10**, 779-784.
36. Cetin, R., Krab, I.M., Anborgh, P.H., Cool, R.H., Watanabe, T., Sugiyama, T., Izaki, K. und Parmeggiani, A. (1996) Enacyloxin IIa, an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu and the ribosome. *EMBO J.*, **15**, 2604-2611.
37. Voageley, L., Palm, G.J., Mesters, J.R. und Hilgenfeld, R. (2001) Conformational change of elongation factor Tu (EF-Tu) induced by antibiotic binding. Crystal structure of the complex between EF-Tu.GDP and aurodox. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17149-17155.
38. Mesters, J.R., Zeef, L.A., Hilgenfeld, R., de Graaf, J.M., Kraal, B. und Bosch, L. (1994) The structural and functional basis for the kirromycin resistance of mutant EF-Tu species in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **13**, 4877-4885.
39. Heffron, S.E. und Jurnak, F. (2000) Structure of an EF-Tu complex with a thiazolyl peptide antibiotic determined at 2.35 Å resolution: atomic basis for GE2270A inhibition of EF-Tu. *Biochemistry*, **39**, 37-45.
40. Zeef, L.A., Bosch, L., Anborgh, P.H., Cetin, R., Parmeggiani, A. und Hilgenfeld, R. (1994) Pulvomycin-resistant mutants of *E. coli* elongation factor Tu. *EMBO J.*, **13**, 5113-5120.
41. Zuurmond, A.M., Martien de Graaf, J., Olsthoorn-Tieleman, L.N., van Duyl, B.Y., Morhle, V.G., Jurnak, F., Mesters, J.R., Hilgenfeld, R. und Kraal, B. (2000) GE2270A-

- resistant mutations in elongation factor Tu allow productive aminoacyl-tRNA binding to EF-Tu-GTP-GE2270A complexes. *J. Mol. Biol.*, **304**, 995-1005.
42. Nierhaus, K.H. (1993) Solution of the ribosome riddle: how the ribosome selects the correct aminoacyl-tRNA out of 41 similar contestants. *Mol. Microbiol.*, **9**, 661-669.
43. Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J. und Baron, C. (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 463-467.
44. Pape, T., Wintermeyer, W. und Rodnina, M. (1999) Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.*, **18**, 3800-3807.
45. Rodnina, M.V. und Wintermeyer, W. (2001) Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 415-435.
46. Ehrenberg, M., Rojas, A.M., Weiser, J. und Kurland, C.G. (1990) How many EF-Tu molecules participate in aminoacyl-tRNA binding and peptide bond formation in *Escherichia coli* translation? *J. Mol. Biol.*, **211**, 739-749.
47. Bilgin, N. und Ehrenberg, M. (1995) Stoichiometry for the elongation factor Tu aminoacyl-tRNA complex switches with temperature. *Biochemistry*, **34**, 715-719.
48. Dincbas, V., Bilgin, N., Scoble, J. und Ehrenberg, M. (1995) Two GTPs are consumed on EF-Tu per peptide bond in poly(Phe) synthesis, in spite of switching stoichiometry of the EF-Tu aminoacyl-tRNA complex with temperature. *FEBS Lett.*, **357**, 19-22.
49. Rodnina, M.V. und Wintermeyer, W. (1995) GTP consumption of elongation factor Tu during translation of heteropolymeric mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 1945-1949.
50. Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F. und Nyborg, J. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science*, **270**, 1464-1472.
51. Bilgin, N., Ehrenberg, M., Ebel, C., Zaccari, G., Sayers, Z., Koch, M.H., Svergun, D.I., Barberato, C., Volkov, V., Nissen, P. und Nyborg, J. (1998) Solution structure of the ternary complex between aminoacyl-tRNA, elongation factor Tu, and guanosine triphosphate. *Biochemistry*, **37**, 8163-8172.
52. Hwang, Y.W. und Miller, D.L. (1987) A mutation that alters the nucleotide specificity of elongation factor Tu, a GTP regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13081-13085.
53. Weijland, A., Parlato, G. und Parmeggiani, A. (1994) Elongation factor Tu D138N, a mutant with modified substrate specificity, as a tool to study energy consumption in protein biosynthesis. *Biochemistry*, **33**, 10711-10717.

- 
54. Brown, S. und Blumenthal, T. (1976) Function and structure in ribonucleic acid phage Qbeta ribonucleic acid replicase. Effect of inhibitors of EF-Tu on ribonucleic acid synthesis and renaturation of active enzyme. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2749-2753.
55. Condeelis, J. (1995) Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends. Biochem. Sci.*, **20**, 169-170.
56. Durso, N.A. und Cyr, R.J. (1994) A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *Plant Cell*, **6**, 893-905.
57. Moore, R.C. und Cyr, R.J. (2000) Association between elongation factor-1alpha and microtubules in vivo is domain dependent and conditional. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, **45**, 279-292.
58. Gangwani, L., Mikrut, M., Galcheva-Gargova, Z. und Davis, R.J. (1998) Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. *J. Cell. Biol.*, **143**, 1471-1484.
59. Chang, J.S., Seok, H., Kwon, T.K., Min do, S., Ahn, B.H., Lee, Y.H., Suh, J.W., Kim, J.W., Iwashita, S., Omori, A., Ichinose, S., Numata, O., Seo, J.K. und Oh, Y.S. und Suh, P.G. (2002) Interaction of elongation factor-1alpha and pleckstrin homology domain of phospholipase C-gamma 1 with activating its activity. *J. Biol. Chem.*, **277**, 19697-19702.
60. Jurnak, F. (1985) Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins. *Science*, **230**, 32-36.
61. Kjeldgaard, M. und Nyborg, J. (1992) Refined structure of elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **223**, 721-742.
62. Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C. und Nyborg, J. (1996) Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. *Structure*, **4**, 1141-1151.
63. Song, H., Parsons, M.R., Rowsell, S., Leonard, G. und Phillips, S.E. (1999) Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1245-1256.
64. Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. und Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature*, **365**, 126-132.
65. Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S. und Nyborg, J. (1993) The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, **1**, 35-50.

- 
66. Nissen, P., Thirup, S., Kjeldgaard, M. und Nyborg, J. (1999) The crystal structure of Cys-tRNA<sup>Cys</sup>-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure Fold. Des.*, **7**, 143-156.
67. Aevansson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L.A. und Liljas, A. (1994) Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.*, **13**, 3669-3677.
68. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. und Leberman, R. (1996) The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu·EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature*, **379**, 511-518.
69. Wang, Y., Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Sprinzl, M. und Sigler, P.B. (1997) Crystal structure of the EF-Tu·EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 650-656.
70. Alexander, C., Bilgin, N., Lindschau, C., Mesters, J.R., Kraal, B., Hilgenfeld, R., Erdmann, V.A. und Lippmann, C. (1995) Phosphorylation of elongation factor Tu prevents ternary complex formation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14541-14547.
71. Nesper, M., Nock, S., Sedlak, E., Antalik, M., Podhradsky, D. und Sprinzl, M. (1998) Dimers of *Thermus thermophilus* elongation factor Ts are required for its function as a nucleotide exchange factor of elongation factor Tu. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 81-86.
72. Jones, M.D., Petersen, T.E., Nielsen, K.M., Magnusson, S., Sottrup-Jensen, L., Gausing, K. und Clark, B.F. (1980) The complete amino-acid sequence of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **108**, 507-526.
73. L'Italien, J.J. und Laursen, R.A. (1981) The amino acid sequence of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. The large cyanogen bromide peptides. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8092-8101.
74. Van Noort, J.M., Kraal, B., Sinjorgo, K.M., Persoon, N.L., Johanns, E.S. und Bosch, L. (1986) Methylation in vivo of elongation factor EF-Tu at lysine-56 decreases the rate of tRNA-dependent GTP hydrolysis. *Eur. J. Biochem.*, **160**, 557-561.
75. Yu, Y.T. und Snyder, L. (1994) Translation elongation factor Tu cleaved by a phage-exclusion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 802-806.
76. Georgiou, T., Yu, Y.N., Ekunwe, S., Buttner, M.J., Zuurmond, A., Kraal, B., Kleantous, C. und Snyder, L. (1998) Specific peptide-activated proteolytic cleavage of *Escherichia coli* elongation factor Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 2891-2895.



- 
77. Lippmann, C., Lindschau, C., Buchner, K. und Erdmann, V.A. (1991) Phosphorylation of elongation factor Tu *in vitro* and *in vivo*. *Cellular regulation by protein phosphorylation.*, 56. Auflage, Heidelberg: Springer-Verlag, 441-445.
78. Lippmann, C., Lindschau, C., Vijgenboom, E., Schroder, W., Bosch, L. und Erdmann, V.A. (1993) Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 601-607.
79. Plath, T. (1997) Mutagenesestudien zur Phosphorylierung des Elongationsfaktors Tu in *Escherichia coli*. Dissertation am Fachbereich Chemie, FU-Berlin.
80. Hwang, Y.W., Sanchez, A. und Miller, D.L. (1989) Mutagenesis of bacterial elongation factor Tu at lysine 136. A conserved amino acid in GTP regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8304-8309.
81. An, G., Bendiak, D.S., Mamelak, L.A. und Friesen, J.D. (1981) Organization and nucleotide sequence of a new ribosomal operon in *Escherichia coli* containing the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4163-4172.
82. Gromadski, K.B., Wieden, H.J. und Rodnina, M.V. (2002) Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry*, **41**, 162-169.
83. Savelsbergh, A., Mohr, D., Wilden, B., Wintermeyer, W. und Rodnina, M.V. (2000) Stimulation of the GTPase activity of translation elongation factor G by ribosomal protein L7/12. *J. Biol. Chem.*, **275**, 890-894.
84. Savelsbergh, A., Matassova, N.B., Rodnina, M.V. und Wintermeyer, W. (2000) Role of domains 4 and 5 in elongation factor G functions on the ribosome. *J. Mol. Biol.*, **300**, 951-961.
85. Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A. und Moore, P.B. (1994) The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.*, **13**, 3661-3668.
86. Aoki, H., Adams, S.L., Turner, M.A. und Ganoza, M.C. (1997) Molecular characterization of the prokaryotic efp gene product involved in a peptidyltransferase reaction. *Biochimie*, **79**, 7-11.
87. Aoki, H., Dekany, K., Adams, S.L. und Ganoza, M.C. (1997) The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32254-32259.
88. Wang, J.Y. und Koshland, D.E. Jr. (1978) Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7605-7608.

89. Wang, J.Y. und Koshland, D.E. Jr. (1980) The identification of distinct protein kinases and phosphatases in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 4640-4648.
90. Cozzone, A.J. (1993) ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cell. Biochem.*, **51**, 7-13.
91. Manai, M. und Cozzone, A.J. (1979) Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 819-826.
92. Cortay, J.C., Rieul, C., Duclos, B. und Cozzone, A.J. Characterization of the phosphoproteins of *Escherichia coli* cells by electrophoretic analysis. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 227-237.
93. Cozzone, A.J. (1998) Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie*, **80**, 43-48.
94. Stock, J.B., Ninfa, A.J. und Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**, 450-490.
95. Wittinghofer, A. (1993) From EF-Tu to p21<sup>ras</sup> and back again. *Current Biology*, **3**, 874-876.
96. Hepler, J.R. und Gilman, A.G. (1992) G proteins. *TIBS*, **17**, 383-387.
97. Wittinghofer, A. (1994) The structure of transducin G<sub>at</sub>: more to view than just ras. *Cell*, **76**, 201-204.
98. Knudsen, C.R., Clark, B.F., Degn, B. und Wiborg, O. (1992) One-step purification of *E. coli* elongation factor Tu. *Biochem. Int.*, **28**, 353-362.
99. Woodgett, J.R. (1989) Use of peptide substrates for affinity purification of protein-serine kinases. *Anal Biochem.*, **180**, 237-241.
100. Kemp, B.E. und Pearson, R.B. (1991) Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Methods Enzymol.*, **200**, 121-134.
101. Ferrari, S. (1998) A rapid purification protocol for the mitogen-activated p70 S6 kinase. *Protein Expr. Purif.*, **13**, 170-176.
102. Erdmann, V.A., Fuchs, U. und Stiege, W. (1994) The Protein-Bioreactor: Its Potentials for the synthesis of proteins in biotechnology, medicine and molecular biology. *Biotech 2000*, Seoul, Korea, 57-70.
103. Stiege, W. und Erdmann, V.A. (1995) The potentials of the *in vitro* protein biosynthesis system. *J. of Biotechnology*, **41**, 81-90.
104. Kiel, M.C., Aoki, H. und Ganoza, M.C. (1999) Identification of a ribosomal ATPase in *Escherichia coli* cells. *Biochimie*, **81**, 1097-1108.

- 
105. Kiel, M.C. und Ganoza, M.C. (2001) Functional interactions of an *Escherichia coli* ribosomal ATPase. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 278-286.
106. Kiel, M.C. und Ganoza, M.C. (2001) A ribosomal ATPase is a target for hygromycin B inhibition on *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2813-2819.
107. Database of Ribosomal Crosslinks (DRC):  
[http://www.molgen.mpg.de/~ag\\_ribo/ag\\_brimacombe/drc/](http://www.molgen.mpg.de/~ag_ribo/ag_brimacombe/drc/)
108. Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M. Jr, Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. und Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327-339.
109. Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **407**, 340-348.
110. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**, 557-572.
111. Mohr, D., Wintermeyer, W. und Rodnina, M.V. (2002) GTPase activation of elongation factors Tu and G on the ribosome. *Biochemistry*, **41**, 12520-12528.
112. Dey, D., Bochkariov, D.E., Jokhadze, G.G. und Traut, R.R. (1998) Cross-linking of selected residues in the N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* protein L7/L12 to other ribosomal proteins and the effect of elongation factor Tu. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1670-1676.
113. Kothe, U., Wieden, H.J., Mohr, D. und Rodnina, M.V. (2004) Interaction of helix D of elongation factor Tu with helices 4 and 5 of protein L7/12 on the ribosome. *J. Mol. Biol.*, **336**, 1011-1021.
114. Mogk, A., Mayer, M.P. und Deuerling, E. (2002) Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *ChemBiochem.*, **3**, 807-814.
115. Sengupta, J., Agrawal, R.K. und Frank, J. (2001) Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 11991-11996.
116. Wower, I.K., Zwieb, C.W., Guven, S.A. und Wower, J. (2000) Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome. *EMBO J.*, **19**, 6612-6621.
117. Wahba, A.J., Miller, M.J., Niveleau, A., Landers, T.A., Carmichael, G.G., Weber, K., Hawley, D.A. und Slobin, L.I. (1974) Subunit I of G beta replicase and 30 S ribosomal

- protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3314-3316.
118. Mohanty, B.K. und Kushner, S.R. (2001) Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 11966-11971.
119. Loog, M., Uri, A., Jarv, J. und Ek, P. (2000) Bi-substrate analogue ligands for affinity chromatography of protein kinases. *FEBS Lett.*, **480**, 244-248.
120. Sherman, M.Yu. und Goldberg, A.L. (1992) Heat shock in *Escherichia coli* alters the protein-binding properties of the chaperonin groEL by inducing its phosphorylation. *Nature*, **357**, 167-169.
121. Sherman, M. und Goldberg, A.L. (1994) Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31479-31483.
122. Schindler, P.T. (2000) Proteomics und molekularbiologische Analyse der zellfreien Proteinbiosynthese. Dissertation an der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften, Universität Stuttgart.
123. Ogata, K., Ohno, R., Terao, K., Iwasaki, K. und Endo, Y. (2000) Studies on ATPase(GTPase) intrinsic to *E. coli* ribosomes. *J. Biochem. (Tokyo)*, **128**, 309-313.
124. Ogata, K., Ohno, R., Terao, K., Iwasaki, K. und Endo, Y. (2000) Some properties and the possible role of intrinsic ATPase of rat liver 80S ribosomes in peptide bond elongation. *J. Biochem. (Tokyo)*, **127**, 221-231.
125. Rodnina, M.V., Serebryanik, A.I., Ovcharenko, G.V. und El'Skaya, A.V. (1994) ATPase strongly bound to higher eukaryotic ribosomes. **225**, 305-310.
126. Ogata, K., Ohno, R., Terao, K. und Endo, Y. (2000) An ATPase center of rat liver 30S-5SRNP particles. *J. Biochem. (Tokyo)*, **128**, 1-9.
127. Ganoza, M.C., Kiel, M.C. und Aoki, H. (2002) Evolutionary Conservation of Reactions in Translation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 460-485.
128. Ganoza, M.C., Cunningham, C. und Green, R.M. (1995) A new factor from *Escherichia coli* affects translocation of mRNA. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26377-26381.
129. Kraal, B., Lippmann, C. und Kleanthous, C. (1999) Translational Regulation by Modifications of the Elongation Factor Tu. *Folia Microbiol.*, **44**, 131-141.
130. Bonincontro, A., Nierhaus, K.H., Onori, G. und Risuleo, G. (2001) Intrinsic structural differences between "tight couples" and Kaltschmidt-Wittmann ribosomes evidenced by dielectric spectroscopy and scanning microcalorimetry. *FEBS Lett.*, **490**, 93-96.

- 
131. Agrawal, R.K. und Burma, D.P. (1996) Sites of ribosomal RNAs involved in the subunit association of tight and loose couple ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21285-21291.
  132. Burma, D.P., Srivastava, A.K., Srivastava, S. und Dash, D. (1985) Interconversion of tight and loose couple 50 S ribosomes and translocation in protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10517-10525.
  133. Srivastava, S. und Burma, D.P. (1985) Conformational change of 50 S ribosomes on enzymatic binding of phenylalanyl-tRNA. *FEBS Lett.*, **186**, 17-20.
  134. Stark, H., Rodnina, M.V., Wieden, H.J., Zemlin, F., Wintermeyer, W. und van Heel, M. (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 849-854.
  135. Valle, M., Sengupta, J., Swami, N.K., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., Agrawal, R.K. und Frank J. (2002) Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.*, **21**, 3557-3567.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A <sub>x</sub>	Absorption bei Wellenlänge x
Å	Ångström, 1 Å = 10 <sup>-8</sup> cm
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AMP	Adenosin-5-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytidin
°C	Temperatur in Celsius
cfu	colony forming units, Koloniebildende Einheiten
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 <sup>6</sup> Becquerel)
cpm	counts per minute, gemessene Impulse pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
D	Dihydrouridin
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpm	disintegrations per minute, Zerfälle pro Minute
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EF	Elongationsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	und andere
FABP	Fettsäurebindendes Protein
FIS	Factor for Inversion Stimulation
FPLC	Fast protein liquid chromatography
g	Gramm
xg	Gravitation, Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GAP	GTPase aktivierenden Proteins
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GNRP	Guanin-Nukleotid-freisetzendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Initiationsfaktor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionselement
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol/l
MALDI-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization
min	Minute(n)
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
N	beliebige Base, in Sequenzen deren Monophosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
$\psi$	Pseudouridin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

---

PEP	Phosphoenolpyruvat
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PIPES	1,4-Piperazin-bis-ethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A
PNPase	Polynukleotid-Phosphorylase
PTS	Phosphotransferasesystem
RF	Freisetzungsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	time of flight, Laufzeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Uridin
U	Unit, Einheit enzymatischer Aktivität
UAS	Upstream Activator Sequence
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	volume per volume, Volumenprozent
w/v	weight per volume, Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
XTP	Xanthin-5'-triphosphat



## Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

**Präfixe für Einheiten:** **f**, Femto ( $10^{-15}$ ); **p**, Pico ( $10^{-12}$ ); **n**, Nano ( $10^{-9}$ ); **μ**, Mikro ( $10^{-6}$ ); **m**, Milli ( $10^{-3}$ ); **k**, Kilo ( $10^3$ )

Weiterhin wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Volker A. Erdmann für die Möglichkeit, in einem seiner sehr schönen und gut ausgestatteten Labore seiner Arbeitsgruppe forschen zu dürfen.

Bei meiner Betreuerin Frau Dr. Corinna Lippmann bedanke ich für dieses äußerst interessante Thema und für das in meine Arbeit gesetzte Vertrauen, wodurch es mir möglich war, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Herrn Dr. Mathias Dreger danke ich für die Identifizierung der gebundenen Proteine durch MALDI-MS.

Dr. Helmut Merk, Dr. Michael Gerrits, Dr. Thorsten Lamla und Dr. Marco Vallaza möchte ich für den regen Austausch von Tips und Tricks und für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen danken. Dr. Patrick Schneider, Iris Reker und Thi Bich Thao Nguyen, sowie allen anderen in der Arbeitsgruppe danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Steffen Barz für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. Eberhard Riedel für die Bereitschaft, diese Dissertation zu begutachten.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, ohne deren immerwährender Unterstützung mein Biochemiestudium und auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Und abschließend bedanke ich mich natürlich bei meiner Freundin Steffi für die schöne gemeinsame Zeit und für das Korrekturlesen bei der Zusammenfassung.

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten