

**Entwicklung einer schaltbaren Protease und eines  
fluoreszenten Reporters mittels Intein-kassetten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**Tim Sonntag**

aus Maintal

Dortmund 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Henning D. Mootz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Engelhard

Tag der Abgabe:

Tag der Disputation:

Truth comes out of error more readily than out of confusion.

Sir Francis Bacon

## Zusammenfassung

Gespaltene Inteine haben sich in den letzten Jahren als biochemisches und molekularbiologisches Werkzeug zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen etabliert. Die Inteinhälften werden dabei separat auf zwei getrennten Fusionsgenen kodiert. Die Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) beginnt nach der Assoziation und Faltung der Inteinhälften in den aktiven Komplex und verknüpft die fusionierten Sequenzen des Zielproteins durch eine native Peptidbindung. Ein kritischer Punkt dieser Reaktion ist die Abhängigkeit der Inteine von der Primärstruktur des Zielproteins und insbesondere von den an das Intein angrenzenden Aminosäuren. Diese können die Spleißreaktion beeinträchtigen oder sogar inhibieren. Um diese Effekte möglichst schnell und mit geringem Arbeitsaufwand für die Generierung von Inteinfusionsproteinen zu erkennen und zu umgehen, wurden in dieser Arbeit auf Inteinkassetten basierende Ansätze entwickelt. Der Vorteil dieser Inteinkassetten gründet sich auf der in einem Schritt stattfindenden „spurlosen“ Integration aller Inteinkomponenten in ein Zielgen durch homologe Rekombination oder restriktionsfreie PCR. Dabei ist die freie Wahl der flankierenden Aminosäuren über die zur Amplifikation gewählten Primer möglich. Letztendlich entfallen sowohl aufwendige Klonierungsarbeiten als auch die Addition von Restriktionsschnittstellen an die Inteingene, wobei letztere zu zusätzlichen Aminosäurecodons führen würden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit generierte Inteinkassette verwendet, um konditionale Kontrolle über die Tabakäzvirus-(TEV)-Protease auszuüben. Diese Kontrolle ist möglich, weil das verwendete, künstlich gespaltene *Saccharomyces cerevisiae* VMA-Intein nur in Verbindung mit dem Heterodimerisierungssystem FRB/FKBP und unter Zugabe des Liganden Rapamycin die Spleißreaktion effizient durchführen kann. Die so induzierte PTS-Reaktion wird als konditionales Proteinspleißen (CPS) bezeichnet. Nach der Integration der Inteinkassette an neun unterschiedlichen Positionen des TEV-Proteasesgens in Hefe wurden zwei Positionen identifiziert, die in einer schaltbaren TEV-Protease resultierten und zur selektiven Spaltung von Reporterproteinen mit einer TEV-Erkennungssequenz verwendet werden konnten. Dabei konnte die Spleißproduktbildung bereits nach 30 Minuten in Western-Blot-Analysen nachgewiesen und die Spaltungsaktivität der schaltbaren TEV-Proteasen mittels Konfokalmikroskopie in einzelnen Zellen verfolgt werden. Erste Experimente in Säugerzellen wiesen auch in diesem Modellsystem die Aktivität einer der beiden konditionalen Proteasen nach.

Innerhalb eines zweiten Projektes wurden drei auf den gespaltenen *Ssp* DnaB, *Npu* DnaE und *Mxe* GyrA Inteinen basierende *trans*-Inteinkassetten entwickelt, die alle spontane Aktivität in der PTS-Reaktion zeigten. Dabei variierten die einzelnen Kassetten sowohl in ihrer Sequenzpräferenz als auch in den verschiedenen Aminosäuren, die nach der abgelauften Spleißreaktion im ligierten Zielprotein als Reste übrig blieben. Die Kassetten wurden so konzipiert, dass die nach der Zielgen-Integration entstandenen Fusionsgene selektiv in *Escherichia coli* exprimiert werden konnten. Für das Modellprotein gpD-Trx wurde zuerst die Funktionalität des Integrationsprozesses der *Ssp* DnaB- und *Npu* DnaE-Inteinkassetten gezeigt und anschließend die selektive Spleißproduktbildung mittels Western-Blot-Analyse verfolgt. Außerdem wurde die *Npu* DnaE-Inteinkassette in das CobA-Enzym - eine Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase - integriert. Infolgedessen konnte rekonstituiertes CobA durch die Produktion von fluoreszierenden Tetrapyrrol-Derivaten als Biosensor für erfolgreiches Proteinspleißen verwendet werden. Die Aktivität des Proteins wurde über selektive Expression der Inteinfusionsgene in *E. coli* gesteuert. In der Übertragung dieses Systems auf Säugerzellen konnte die PTS-Reaktion sowie die Aktivität des CobA-Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

## Summary

In the last couple of years, split inteins were established as a biochemical and molecular biology tool for the posttranslational modification of proteins. To this end, the intein halves are expressed as two separate intein fusion genes. The actual protein *trans*-splicing (PTS) reaction takes place after the association and folding of the intein halves into an active complex. Eventually the process leads to the formation of a native peptide bond between both target protein sequences which were fused to the intein halves. A critical step in this reaction is the dependence of the intein on the primary structure of the fused target protein and in particular on the amino acids in direct contact with the intein. These flanking amino acids can impair or even inhibit the protein splicing reaction. The chosen way to recognize and to get rid of these intein related effects and additionally to streamline the fusion gene generation was based on intein cassettes. The advantage of the intein cassette is due to the one-step “traceless” integration process which inserts all intein related components into the gene of interest either via homologous recombination or restriction-free cloning. Even the free selection of the flanking amino acids is possible by simply varying the primers used in the amplification step. Moreover, tedious cloning efforts and the addition of restriction sites, which result in additional amino acid codons, are skipped.

In the first part of this work, an intein cassette which was generated during my diploma thesis was used to exercise conditional control upon the Tobacco Etch Virus (TEV) protease. This control is possible, because the artificially split *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein can only perform the protein splicing reaction if utilized in combination with the FRB/FKBP heterodimerizer system and by addition of the small molecule rapamycin. The induced PTS reaction is called conditional protein splicing (CPS). After the integration procedure of the intein cassette at nine different positions in the TEV gene in yeast, two switchable proteases were identified, all of which had the ability to cleave a reporter protein. For those conditional proteases the formation of splice product could be identified within 30 minutes after the addition of rapamycin in western blot analysis. Additionally, the cleavage events could be followed on a single cell basis by confocal microscopy. First experiments in cell culture even indicated activity of one of the CPS proteases in this model system.

In a second project, three different intein cassettes were developed that were based upon the *Ssp* DnaB, *Npu* DnaE, and *Mxe* GyrA split inteins and all showed spontaneous activity in the PTS reaction. Thus, the intein cassettes differ in their sequence preference as well as in the persisting amino acid, which is the only remnant of the splicing reaction within the ligated target protein. Another feature of the intein cassette integration is that the resulting fusion genes can be selectively expressed in *Escherichia coli*. By using a model protein (gpD-Trx) and the *Ssp* DnaB and *Npu* DnaE cassettes, the functionality of the integration procedure was demonstrated and subsequently the selective formation of the splice product was detected in western blot analysis. Furthermore, the *Npu* DnaE intein cassette was integrated into the CobA enzyme, a uroporphyrinogen III methyltransferase. The reconstituted CobA generates fluorescent tetrapyrrole derivatives which is why it could be used as a biosensor for successful protein splicing. The activity of the protein was controlled via selective expression of the intein fusion genes in *E. coli*. After the final transfer of this system to cell culture, the PTS reaction, as well as the resulting CobA activity was detected by fluorescence microscopy.

## **Publikationen**

Der Hauptteil dieser Arbeit wird in den folgenden Publikationen veröffentlicht werden:

### **Tim Sonntag and Henning D. Mootz**

Generation of a conditional split TEV protease using an intein cassette based approach  
(manuscript in preparation)

### **Joachim Zettler\*, Tim Sonntag\*, Simone Eppmann, Alena Busche, Volker Dötsch and Henning D. Mootz**

A PCR-based method to determine the splice activity of split inteins in target proteins  
(manuscript in preparation; \* equally contributing authors)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	I
<b>Summary</b> .....	II
<b>Publikationen</b> .....	III
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
<b>1 Einleitung</b> .....	7
<b>1.1 Inteine</b> .....	8
1.1.1 Mechanismus des Proteinspleißens .....	10
1.1.2 Das Protein- <i>trans</i> -Spleißen .....	14
1.1.3 Evolution der Inteine .....	16
1.1.4 Anwendung von Inteinen .....	19
<b>1.2 Genexpressionskontrolle auf der DNA-Ebene</b> .....	23
1.2.1 Konditionale Genexpression .....	24
1.2.2 Konditionale Gen-Knockout Strategien .....	26
<b>1.3 Genexpressionkontrolle auf der RNA-Ebene</b> .....	27
1.3.1 RNA-Interferenz .....	28
1.3.2 Riboswitches .....	30
<b>1.4 Proteinfunktionskontrolle auf der Ebene der Proteine</b> .....	31
1.4.1 Die direkte Aktivierung & Inaktivierung von Proteinen mit Hilfe von „small molecules“ .....	32
1.4.2 Lokalisationskontrolle von Proteinen .....	34
1.4.3 Kontrolle der Degradation von Proteinen .....	37
1.4.4 Inteinassoziierte Proteinfunktionskontrolle .....	40
<b>1.5 Aufgabenstellung</b> .....	42
<b>2 Material</b> .....	44
<b>2.1 Geräte</b> .....	44
<b>2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien</b> .....	45
<b>2.3 Vektoren</b> .....	47
2.3.1 pET16b .....	47
2.3.2 pBAD/His A .....	47
2.3.3 pRSFDuet .....	47
2.3.4 pTS13 .....	48
2.3.5 p41X / p42X .....	48
2.3.6 pFA6a-HIS3MX6 .....	49
2.3.7 pcDNA3 .....	49
2.3.8 pEGFP-N1 / pmCherry-N1 .....	50
<b>2.4 Mikroorganismen und Zelllinien</b> .....	50

2.4.1	<i>E. coli</i> -Stämme .....	50
2.4.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	51
2.4.3	Eukaryotische Zelllinien .....	52
<b>2.5</b>	<b>Wachstumsmedien</b> .....	<b>52</b>
2.5.1	<i>E. coli</i> -Medien .....	52
2.5.2	<i>S. cerevisiae</i> -Medien .....	53
2.5.3	Medium für eukaryotische Zelllinien .....	55
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>58</b>
3.1.1	Restriktionsfreie PCR .....	58
3.1.2	Konstruktion der TEV-Protease-Plasmide .....	59
3.1.3	Konstruktion der SPLICEFINDER-Plasmide .....	62
3.1.4	Konstruktion der CobA-Plasmide .....	65
<b>3.2</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3</b>	<b><i>E. coli</i>-Methoden</b> .....	<b>67</b>
3.3.1	Genexpression in <i>E. coli</i> .....	67
3.3.2	Zellaufschluss .....	68
3.3.3	Proteinreinigung .....	68
3.3.4	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration .....	68
3.3.5	SPLICEFINDER Testexpressionen in <i>E. coli</i> .....	68
3.3.6	Herstellung und Reinigung segmentell isotopenmarkierter ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> -Proteine .....	70
3.3.7	CobA-Aktivitätsbestimmung in <i>E. coli</i> -Zellen .....	71
3.3.8	Western-Blot-Analyse von <i>E. coli</i> -Zellen .....	72
<b>3.4</b>	<b><i>S. cerevisiae</i>-Methoden</b> .....	<b>72</b>
3.4.1	Genexpression in <i>S. cerevisiae</i> .....	72
3.4.2	ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay .....	73
3.4.3	Western-Blot-Analyse von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	74
3.4.4	Präparation & mikroskopische Beobachtung der Hefezellen .....	75
<b>3.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>75</b>
3.5.1	Kultivierung und Passage von Zellkulturen .....	75
3.5.2	Transfektion eukaryotischer Zellen .....	76
3.5.3	Western-Blot-Analyse von eukaryotischen Zellen .....	77
3.5.4	Präparation & mikroskopische Beobachtung eukaryotischer Zellen .....	77
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Generierung einer schaltbaren Protease</b> .....	<b>78</b>
4.1.1	Das Prinzip der konditional gespaltenen Intein-Kassette .....	79
4.1.2	Integration der CPS-Kassette in die TEV-Protease .....	81
4.1.3	Charakterisierung der schaltbaren TEV-Proteasen 118 und 206 .....	87
4.1.4	Entwicklung eines Reportersystems für die CPS-Proteasen basierend auf GAL4 .....	94



4.1.5	Die selektive Spaltung von GFP von der Plasmamembran.....	98
4.1.6	Die Verwendung der schaltbaren Proteasen in Säugerzellen.....	102
<b>4.2</b>	<b>Generierung von <i>trans</i>-Inteinkassetten zur schnellen Identifikation von aktiven gespaltenen Inteinen in Zielproteinen.....</b>	<b>106</b>
4.2.1	Das SPLICEFINDER-Prinzip.....	107
4.2.2	Aktivitätsbestimmung der Inteinkassetten anhand eines Modellproteins .....	109
4.2.3	Integration und Funktionalisierung des Zielproteins CobA mit Hilfe einer <i>trans</i> -Inteinkassette .....	116
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
5.1	Die generelle Anwendbarkeit und die Probleme des CPS-Ansatzes ...	125
5.2	Die CPS-Reaktion der TEV-Protease.....	127
5.3	Die Verwendung der TEV-Protease zur Proteinfunktionskontrolle...	129
5.4	Anwendungs- und Verbesserungsmöglichkeiten der entwickelten schaltbaren Protease .....	133
5.5	Der Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Spleißreaktion	136
5.6	Modifikationen und Verbesserungsmöglichkeiten von SPLICE- FINDER.....	141
5.7	CobA als Zielprotein von SPLICEFINDER .....	144
5.8	Anwendungs- und Verbesserungsmöglichkeiten von CobA .....	146
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>154</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>159</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BF	Hellfeldmikroskopie (engl. bright field microscopy)
<i>bla</i>	$\beta$ -Lactamase-Gen
C'	C-terminale Hälfte
CBD	chitinbindende Domäne
CPS	konditionales Proteinspleißen (engl. conditional protein splicing)
CMV	Cytomegalovirus
CobA	Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase aus <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
Da	Dalton
DIC	Differentialinterferenzkontrast Mikroskopie (engl. differential interference contrast microscopy)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DnaB-Intein	Intein aus der DnaB-Helikase
DnaE-Intein	Intein aus der $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKBP	humanes FK506-Bindeprotein von 12 kDa
FRB	FKBP-Rapamycin bindende Domäne von mTOR
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
(e)GFP	(verbessertes) grün fluoreszierendes Protein (engl. (enhanced) green fluorescent protein)
gpD	Kopfprotein D des Bakteriophagen $\lambda$
GOI	Zielgen (engl. gene of interest)
GST	Glutathion-S-Transferase
GyrA-Intein	Intein aus der DNA Gyrase A
HA	Hämagglutinin
His <sub>6</sub>	Hexahistidinsequenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
<i>lacI</i>	Gen des Lac-Repressors

## Abkürzungsverzeichnis

---

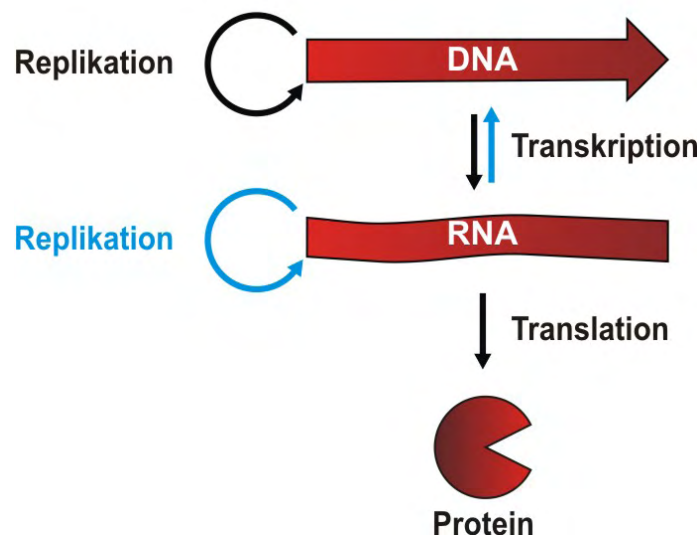
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Mol pro Liter
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. matrix assisted laser desorption ionisation)
MBP	Maltose-bindendes Protein aus <i>Escherichia coli</i>
N'	N-terminale Hälfte
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ORF	offene Leseraster (engl. open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFK	Protein-Fragment-Komplementation
POI	Zielprotein (engl. protein of interest)
PTS	Protein- <i>trans</i> -Spleißen
RF-PCR	restriktionsfreie PCR
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecylsulfate)
TEV	Tabakätzvirus (engl. Tobacco Etch Virus)
TEV 118/206	gespaltene und modifizierte CPS-TEV-Proteasen der Position 118/206
TOR	engl. target of rapamycin
mTOR	TOR aus Säugetieren (engl. mammalian)
TSP	gewebespezifischen Promotor (engl. tissue specific promoter)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin aus <i>Escherichia coli</i>
VMA-Intein	Intein aus der Untereinheit A der vakuolären ATPase V1 Domäne aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. weight per volume)

**Tabelle 1: Aminosäuren: Abkürzungen und Molekulargewichte**

<b>Aminosäure</b>	<b>3-Buchstabencode</b>	<b>1-Buchstabencode</b>	<b>MW (g/mol)</b>
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

# 1 Einleitung

Seit der Begründung der Molekularbiologie vor über 50 Jahren ist es ihr Ziel, die Moleküle des Lebens - DNA, RNA und Proteine - zu manipulieren. Wenn diesen Molekülen eine verallgemeinerte Funktion zugewiesen werden soll, ist DNA die Erbsubstanz, RNA ein Informationsträger und Proteine, mit ihren mannigfaltigen katalytischen Aktivitäten, sind die Hauptakteure der enzymatischen Prozesse in der Zelle. Resultierend aus diesen anfänglichen Erkenntnissen formulierte Francis Crick 1970 das zentrale Dogma der Molekularbiologie, das den grundsätzlichen Informationsfluss in biologischen Systemen beschreibt (Abbildung 1) [1].



**Abbildung 1. Zentrales Dogma der Molekularbiologie**

Die Abbildung zeigt die generellen (schwarz) und speziellen (blau) Mechanismen des sequenziellen Informationsflusses in biologischen Systemen. In generellen Fall, der in allen Lebewesen stattfindet, startet die Sequenzinformation auf Ebene der DNA, wird durch die Transkription in RNA umgeschrieben und wird im finalen Schritt, dem Prozess der Translation, in Proteine umgewandelt. Die speziellen Mechanismen kommen im Großteil der Fälle nur in infektiösen Elementen wie Viren und Transposons vor.

Heutzutage ist es möglich, fast alle Proteine in den verschiedensten Modellorganismen bereits auf der genetischen Ebene zu verändern. Von den Bakterien bis zu den Säugetieren können Genommanipulationen unter Ausnutzung des Prozesses der homologen Rekombination durchgeführt werden. Auch führte die breite Anwendbarkeit der RNA-Interferenz (RNAi), ein Prozess zur Gen-Stummschaltung auf Transkriptionsebene, in den letzten Jahren zu einem ganz neuen und einfach anzuwendenden Kontrollmechanismus. Auf der Proteinebene wurden ebenfalls verschiedenste Techniken entwickelt, um Proteinfunktionen zu kontrollieren und zu manipulieren, jedoch konnten keine so allgemeingültigen

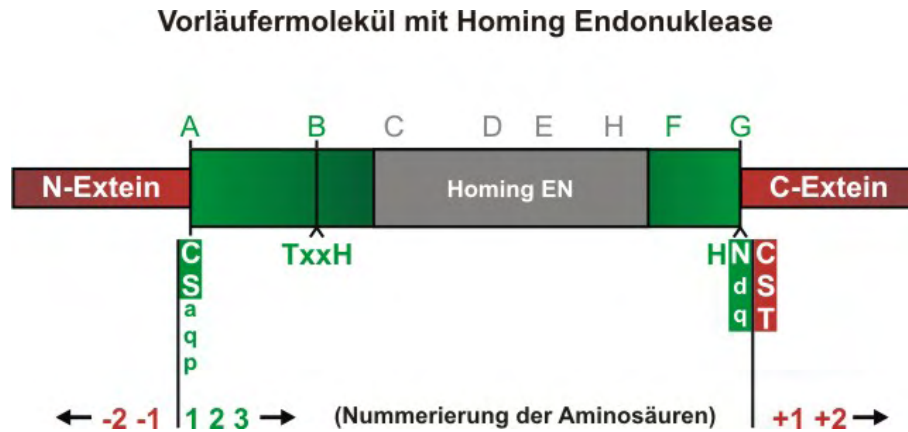
Methoden wie auf DNA- oder RNA-Ebene entwickelt werden. Der Hauptgrund liegt im molekularen Aufbau der Proteine und der damit verbunden höheren Komplexität als bei DNA und RNA.

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz zur Proteinfunktionskontrolle bedient sich der sogenannten Inteine und greift direkt auf der Proteinebene an. Zur Übersicht sollen hier die grundsätzlichen Erkenntnisse über Inteine und einige Methoden zur Funktionskontrolle auf den Ebenen der DNA, RNA und Proteine beschrieben werden. Da der Rahmen dieser Arbeit begrenzt ist, wird der Fokus auf Techniken gelegt, die eine möglichst generelle Anwendbarkeit in höheren Organismen erlauben.

### 1.1 Inteine

Vor ca. 20 Jahren wurde eine besondere Art der posttranslationalen Prozessierung des VMA1-Proteins, der vakuolären ATPase von *Saccharomyces cerevisiae*, entdeckt. Bei diesem Prozess, dem sogenannten Proteinspleißen, wird ein *in frame* insertiertes 50 kDa großes VDE-Element (engl. Vma1-derived element) mit DNA-Endonukleaseaktivität [2] autokatalytisch und unabhängig von anderen zellulären Prozessen aus einem Vorläuferprotein herausgeschnitten [3, 4]. Während dieses Prozesses werden die getrennten Hälften der vakuolären ATPase zum funktionsfähigen Protein verknüpft. Seit dieser ursprünglichen Entdeckung wurden über 450 Inteine in allen drei Domänen des Lebens - Prokarya, Eukarya und Archaea - identifiziert (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>, [5]). Die Verbreitung in allen drei Domänen des Lebens impliziert, dass es sich bei ihnen zwar um eine weit verbreitete Gruppe von Proteindomänen handelt, sie aber nur sporadisch auftreten (Kapitel 1.1.3). Ebenso sind bis jetzt noch keine Inteine mit einem positiven Selektionseffekt für ihren Wirt bekannt, weswegen sie auch als „molekularen Parasiten“ bezeichnet werden.

Inteine werden überdies als „single-turnover“-Enzyme beschrieben, welche die einmalige Verknüpfung ihrer flankierenden Bereiche, der Exteine, durch eine native Peptidbindung in vier nukleophilen Substitutionsreaktionen katalysieren. Die direkten Übergangspunkte zwischen Extein und Intein werden auch als N- bzw. C-terminale Spleißregion bezeichnet. Allgemein besitzen Inteine eine geringe Ähnlichkeit in ihrer Gesamtsequenz, beim genauen Vergleich der unterschiedlichen Inteine treten indes einige konservierte Bereiche und vor allem Aminosäuren auf (Abbildung 2).



**Abbildung 2. Schematische Abbildung eines Vorläufermoleküls des Proteinspleißens**

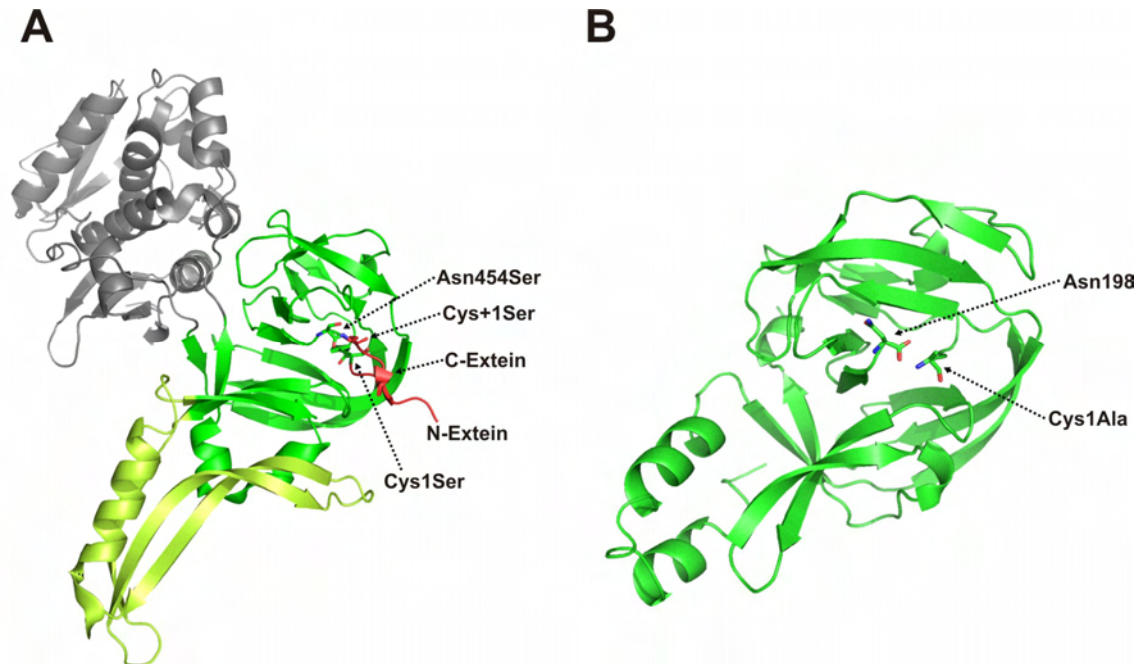
In dieser Abbildung ist das eigentliche Intein (grün) von seinen Exteinen (rot) umgeben und wird von einer optionalen Homing-Endonuklease (Homing EN, grau) unterbrochen. In Großbuchstaben oberhalb des Inteins sind die konservierten Blöcke benannt, und unterhalb des Vorläufermoleküls die konservierten und katalytisch aktiven Aminosäuren des Inteins bzw. des C-Exteins. Die konservierten Aminosäuren der Inteine, die dem generellen Spleißmechanismus folgen (Klasse I Inteine, Kapitel 1.1.1), sind in Großbuchstaben dargestellt, abweichende Aminosäuren in anderen Inteinen in Kleinbuchstaben. X steht für eine unkonservierte Aminosäure. Unterhalb der Abbildung ist die am weitesten verbreitete Nummerierung der Extein- und Inteinamino-säuren verdeutlicht.

Wie schon erwähnt, besitzen einige Inteine in ihrer für den Spleißprozess katalytisch aktiven Region eine eingebettete Homing-Endonuklease (Block C-H). Dabei handelt es sich um Doppelstrang-spezifische DNasen, die einen großen Sequenzerkennungsbereich haben (12-40 bp) und damit auch hochspezifisch sind [6]. Homing-Endonukleasen katalysieren den horizontalen Gentransfer zwischen Organismen, falls einer von diesen noch keine Intein mit Endonuklease besitzt.

Durch Sequenzanalysen der katalytisch aktiven Region der Inteine wurden verschiedene Motive mit den dazugehörigen konservierten Aminosäuren identifiziert [7, 8] (Abbildung 2). Diesen Blöcken A, B und F, G lassen sich generelle Funktionen im Proteinspleißmechanismus zuweisen. Essentiell für das Ablaufen der Spleißreaktion sind die Aminosäuren an Position 1 (Cys/Ser), das C-terminale Asn und an Position +1 Cys/Ser/Thr [9-11]. Der Mechanismus des Proteinspleißens wird ausführlicher an einer anderen Stelle behandelt (siehe Kapitel 1.1.1).

Allen Inteinen ist nicht nur die Konservierung einzelner Bereiche und Aminosäuren gemein, sondern auch die ihrer Faltung. Eine ganze Überfamilie an Domänen, als Hedgehog/Intein (Hint) Klasse [12] bezeichnet, besitzt die gleiche Tertiärstruktur. Bei allen bis jetzt aufgeklärten Strukturen werden die N-terminalen und C-terminalen Exteinsequenzen in räumliche Nähe zueinander gebracht (Abbildung 3 A). Darüber hinaus befinden sich

weitere konservierte und katalytisch aktive Aminosäuren in dieser Region, so z.B. das essentielle C-terminale Asparagin.



**Abbildung 3. Struktur der Inteine**

A) Die Abbildung zeigt das *Sce* VMA-Intein (grün) mit der Homing-Endonuklease (grau) und einigen N-terminalen und C-terminalen Exteinamino-säuren (rot) (PDB Code 1JVA) [13]. Ebenso ist eine zusätzliche DNA-bindende Region (gelbgrün) in dem Intein vorhanden. B) Die Struktur zeigt das *Mxe* GyrA-Miniintein (grün) aus *Mycobacterium xenopi* (PDB Code 1AM2) [14]. Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt (Schrödinger).

In Falle des VMA-Inteins besteht das VDE-Element aus zwei unabhängigen Strukturen: der Homing-Endonuklease und der autokatalytischen Inteindomäne [15]. Falls Inteine eine Endonuklease tragen, werden sie auch als Maxiinteine bezeichnet. Die Aktivität der Endonuklease ist allerdings, wie schon aus den eigenständig gefalteten Domänen in der Struktur hervorgeht, unabhängig von der Inteinaktivität. Ein Vertreter der sogenannten Miniinteine, Inteine die keine Endonuklease besitzen, ist das *Mxe* GyrA-Intein (Abbildung 3 B).

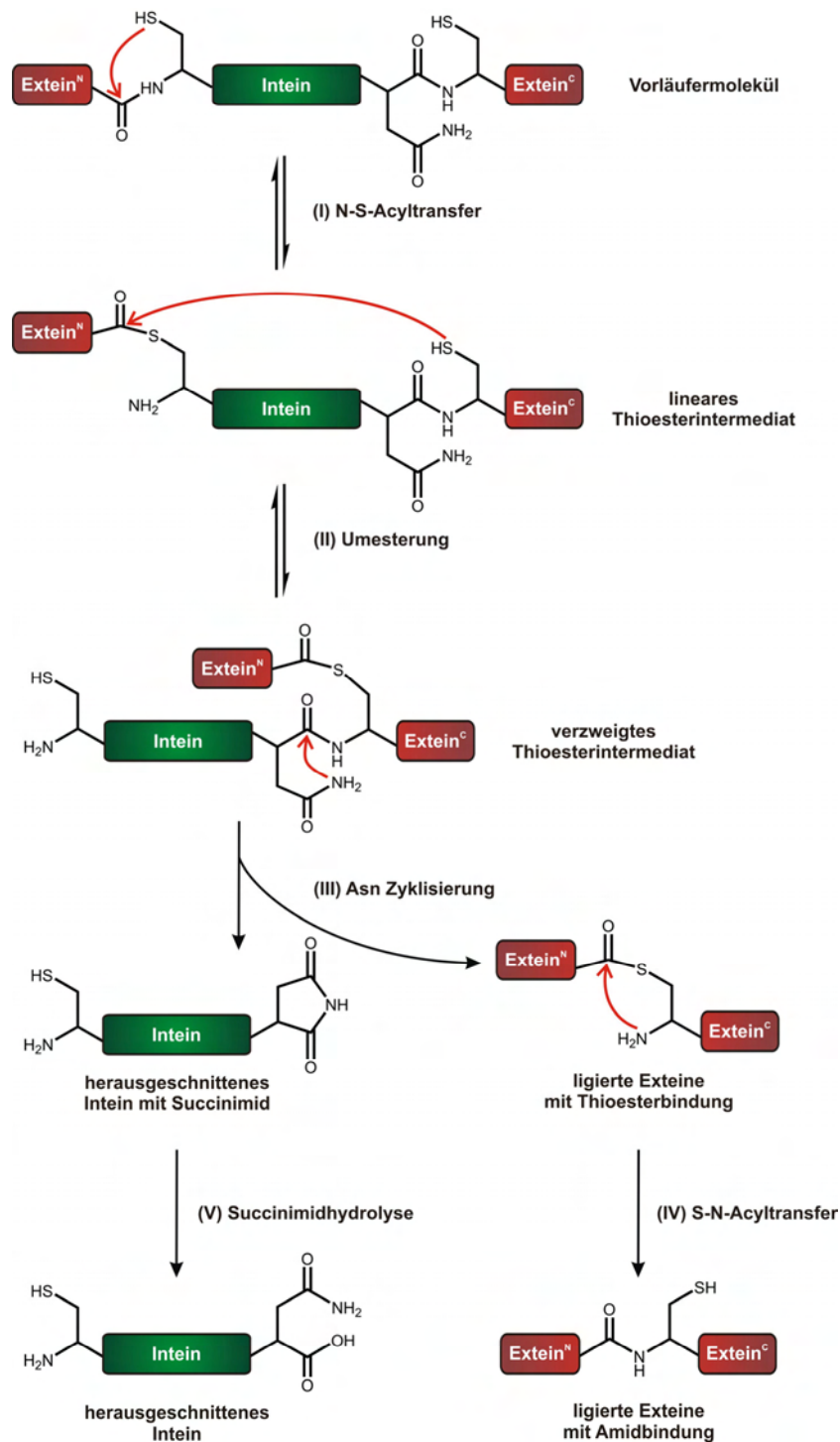
Im folgenden Kapitel soll der Mechanismus des Proteinspleißens näher erläutert werden.

### 1.1.1 Mechanismus des Proteinspleißens

Bis zum heutigen Tag wurden drei unterschiedliche mechanistische Klassen von Inteinen beschrieben. Das Resultat der ablaufenden Proteinspleißreaktion ist bei allen Inteinklassen gleich: Die Exteinsequenzen werden über eine native Peptidbindung verknüpft. Gleichwohl



differieren die Klassen am Anfang des Mechanismus allerdings in einigen Schritten. Der Großteil der bekannten und charakterisierten Inteine gehören zur Klasse I und folgt dem Standardspleißmechanismus, der aus vier aufeinander folgenden nukleophilen Substitutionsreaktionen besteht (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Mechanismus des Proteinspleißens**

Hier abgebildet ist der Standardspleißmechanismus (Klasse-I-Inteine) mit einem Cystein an beiden Spleißregionen. Die Nebenreaktionen wurden zur Vereinfachung nicht abgebildet.

Der Standardspleißmechanismus beginnt mit einem nukleophilen Angriff der Thiol- oder Hydroxylgruppe der Aminosäure an Position 1 des Inteins (Cys oder Ser) auf die Carbonylgruppe der benachbarten Peptidbindung. Durch diesen N-S- bzw. N-O-Acyltransfer bildet sich an der N-terminalen Spleißregion eine Thioester- bzw. Esterbindung (Abbildung 4 I). Die zurzeit favorisierte Theorie, um diese eigentlich energetisch ungünstige Umlagerung zu erklären, geht von einer Grundzustanddestabilisierung (engl. ground state destabilization) aus. Das Intein und vor allem Aminosäuren in den Blöcken A und B führen dazu, dass sich eine gespannte und spaltbare Peptidbindung an der N-terminalen Spleißregion ausbildet. So konnte bei zwei Inteinen entweder *cis*- oder deformierte *trans*-Konfigurationen an der besagten Peptidbindung nachgewiesen werden [14, 16]. Andere Kristallstrukturen zeigten dagegen die planare *trans*-Konfiguration [13, 17, 18], was aber möglicherweise nur Effekte von in die Inteine eingeführte Mutationen sind, welche eine Kristallisation erst ermöglichen. Die Studien, deren Ergebnisse dem natürlichen Zustand bisher am nächsten kommen, sind kernspinresonanzspektroskopische (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) Untersuchungen mit dem *Mxe* GyrA-Intein. In diesem Fall wurde nach der selektiven Isotopenmarkierung der N-terminalen Spleißregion eine hochpolarisierte Amidbindung gefunden. Auch konnte nachgewiesen werden, dass ein konserviertes Histidin in Block B eine essentielle Rolle in dem Spleißprozess spielt und zur Reorganisation der Tertiärstruktur beiträgt [19]. Diese Untersuchungen stellen auch die größte Unterstützung der Theorie der Grundzustanddestabilisierung dar.

Im zweiten Schritt erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff der Thiol- bzw. Hydroxylgruppe der Aminosäure an Position +1 des C-Exteins (Cys, Ser od. Thr) auf die Carbonylgruppe an der N-terminalen Spleißregion. Durch diese Reaktion entsteht ein verzweigtes Intermediat, dessen Exteine über eine Thioester- bzw. Esterbindung miteinander verbunden sind (Abbildung 4 II). Mutationsstudien konnten schon relativ früh zeigen, dass ohne eine dieser +1-Aminosäuren kein nukleophiler Angriff und somit auch keine Spleißreaktion stattfinden kann [11].

Im nächsten Schritt wird das Intein durch die Zyklisierung seines C-terminalen Asparagins irreversibel gespalten. Bei diesem Prozess entstehen zwei Moleküle: Das Intein, das am C-Terminus ein Succinimid trägt und die über eine Thioester- bzw. Esterbindung verknüpften N- und C-terminalen Exteine (Abbildung 4 III). Bei einer Mutation des Asparagins ist keine Spaltung des Inteins möglich [9], allerdings sind auch Inteine bekannt, die an dieser Position ein Glutamin oder Aspartat besitzen [20]. Eine für verschiedene Inteine beschriebene Gemeinsamkeit der Spaltungsreaktion ist die wichtige Funktion des Block G

Histidins bei der Zyklisierungsreaktion [18, 21-23]. Im Falle des *Psp* GBD-Pol-Inteins war sogar dessen Mutation ausreichend, um die Spleißreaktion zu inhibieren [22]. Anderen Inteinen, wie allen DnaE-Inteinen oder auch dem *Methanococcus jannaschii* KlbA-Intein, fehlt das Histidin an dieser Position [17, 24, 25]. Die Strukturanalysen einiger Inteine gaben auch Hinweise auf die Beteiligung von koordinierten Wassermolekülen an der Spaltungsreaktionen [17, 18, 26, 27]. Zusammenfassend deuten somit die zurzeit vorhandenen Ergebnisse auf einen inteinspezifischen Katalysemechanismus der Reaktion hin.

Im letzten Schritt der Proteinspleißreaktion greift die freie Aminogruppe am Verknüpfungspunkt zwischen N- und C-terminalen Extein die Thioester- bzw. Esterbindung an und im folgenden S-N- bzw. O-N-Acytransfer wird eine native Peptidbindung zwischen den Exteinen gebildet (Abbildung 4 IV). Diese Umwandlung in die thermodynamisch stabilere Peptidbindung findet spontan statt. Unabhängig von dieser Reaktion wird auch das Succinimid durch langsam stattfindende Hydrolyse in ein Asparagin umgewandelt (Abbildung 4 V). Einzig im Falle des *Sce* VMA-Inteins wurde eine Beteiligung des Block-G-Histidins bei der Hydrolyse des Succinimids postuliert [13].

Neben den direkt an der Reaktion beteiligten Aminosäuren wurde auch öfters ein signifikanter Einfluss der flankierenden Aminosäuren der Exteinhälften auf die Protein-Spleißreaktion bzw. auf Neben- und Teilreaktionen beobachtet, z.B. die -1 Position sowohl für das *Sce* VMA-Intein [21] als auch für das *Mxe* GyrA-Intein [28]. Des Weiteren ist die Wahl der +2 bis +3 Position bei den DnaE-Inteinen limitiert [29-32]. Diese Beeinflussung der Spleißreaktion kommt vor allem zum Tragen, wenn sich das Intein in unnatürlicher Extein-Umgebung befindet.

Außer den Hauptprodukten des Spleißmechanismus wurden in unnatürlichen Exteinkontexten bzw. unter nichtphysiologischen Bedingungen auch Nebenprodukte beschrieben [9, 11, 33, 34]. Eine mögliche Nebenreaktion ist die verfrühte Zyklisierung des Asparagins, die zur Abspaltung des C-terminalen Exteins führt (C-terminale Spaltung). Bei der N-terminalen Hydrolyse hingegen wird einer der gebildeten Thioester oder Oxoester durch ein Nukleophil angegriffen (lineares bzw. verzweigtes Intermediat) und spaltet das N-terminale Extein ab.

Der hier beschriebene Mechanismus bezieht sich auf die am häufigsten vorkommenden mechanistischen Klasse-I-Inteine. Es gibt bisher noch zwei weitere identifizierte und charakterisierte Klassen von Inteinen, die sich im Ablauf bis zur Asparaginzyklisierung unterscheiden. Ab diesem Punkt (Abbildung 4 III) ist die Spleißreaktion identisch.

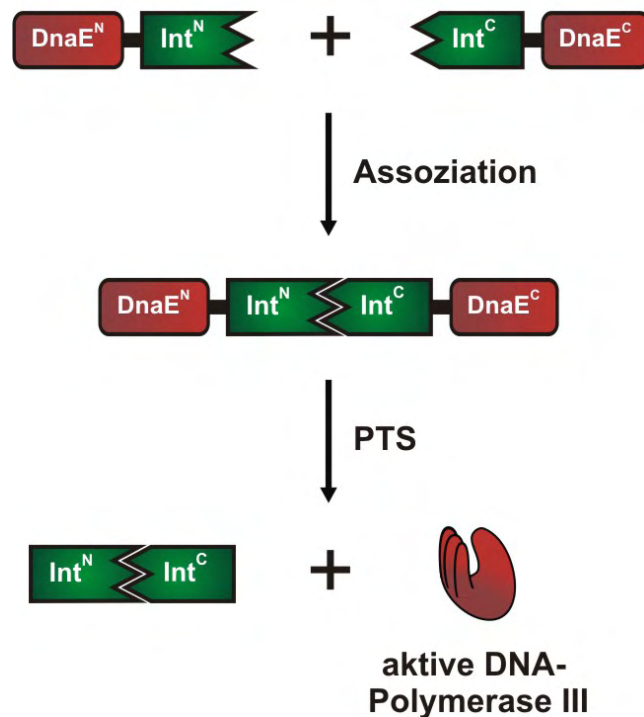
Die Klasse-II-Inteine, wie das *Mja* KlbA-Intein, besitzen an Position 1 ein Alanin, was die anfängliche Thioester- bzw. Esterbildung unmöglich macht. In diesen Fällen bildet sich direkt das verzweigte Intermediat durch einen nukleophilen Angriff der +1 Aminosäure auf die N-terminale Spleißregion [25].

Die Inteine der Klasse III, wie das Mycobacteriophage Bethlehem DnaB-Intein, beginnen mit einem Prolin an Position 1 und besitzen an +1 ein Threonin oder Serin [35]. In dieser Klasse startet der Mechanismus mit dem nukleophilen Angriff eines konservierten Cysteins, das sich in Block F des Inteins befindet, auf die N-terminale Spleißregion. Anschließend bildet sich das verzweigte Intermediat durch eine Umesterung mit dem Threonin oder Serin an Position +1 [36].

### 1.1.2 Das Protein-*trans*-Spleißen

Neben den erwähnten Inteinen, die *in cis* auf nur einer Polypeptidkette mit beiden Exteinhälften vorliegen, ist auch noch eine andere Organisationsform bekannt. Diese gespaltenen Inteine sind in zwei Hälften zerteilt und mit jeweils einem Exteinfragment verbunden. In diesem Fall wird die stattfindende Spleißreaktion als Protein-*trans*-Spleißen (PTS) bezeichnet. Die beiden erzeugten Proteine müssen also in Lösung (in der Zelle oder *in vitro*) erst miteinander assoziieren und die Aktivität des Inteins durch Konformationsänderung rekonstituiert werden (Abbildung 5).

Bis jetzt wurden zwei unterschiedliche natürlich vorkommende Typen von gespaltenen Inteinen identifiziert: die DnaE-Inteine der DNA-Polymerase III, mit mehreren Vertretern in unterschiedlichen Spezies der Cyanobakterien [37], und das Intein aus der *Nanoarchaeum equitans* B-Typ DNA-Polymerase (*Neq* DNA-Polymerase) [38]. Im Falle der bakteriellen  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III aus *Synechocystis sp.* PCC6803 sind 774 Aminosäuren (AS) der N-terminalen Region des DnaE-Proteins mit dem 123 AS großen N-Terminus des *Ssp* DnaE-Intein fusioniert. Das komplementäre Protein besteht aus der 36 AS großen C-terminalen *Ssp* DnaE-Inteinhälfte und dem 436 AS des DnaE-Proteins (Abbildung 5). Die geteilten Gene des *Ssp dnaE*-Inteins sind im Genom 745 kbp voneinander entfernt [39], können aber auch über 3 Mbp auseinander liegen [37]. Interessant ist, dass in allen Fällen die Genorganisation bei den DnaE-Inteinen gleich ist und sie sogar einen konservierten Integrationsort besitzen [37]. Kürzlich wurden aus einer globalen Ozean-Gendatenbank 26 potentielle neue gesplattene Inteine identifiziert, die eine freistehende Endonuklease besitzen [40] (Kapitel 1.1.3). Allerdings hat noch keine funktionelle Charakterisierung stattgefunden.



**Abbildung 5. Schema des Protein-trans-Spleißens am Beispiel des DnaE-Proteins**

Vom zwei unterschiedlichen Regionen auf dem Genom von *Synechocystis sp.* werden zwei Proteine synthetisiert, die jeweils aus einer Fusion einer Hälfte des DnaE-Proteins (N- und C-terminales DnaE) und dem DnaE-Intein (N- und C-terminales Int) bestehen. Nach der schnellen Assoziation der Inteinfragmente wird die Aktivität des Inteins wieder hergestellt und die Protein-trans-Spleißreaktion (PTS) kann stattfinden. Das Produkt der PTS-Reaktion ist die funktionale  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III, was den Zusammenbau der aktiven DNA-Polymerase III im Bakterium ermöglicht.

Noch vor der Entdeckung der natürlich gespaltenen Inteine wurde erkannt, dass sich gesplattene Inteine auch artifiziell erzeugen lassen [41]. In den meisten seither beschriebenen Fällen teilte man die Inteine dazu zwischen den Blöcken B und F, der Bereich, in dem bei den Maxiinteinen die Endonuklease inseriert ist. In einigen Fällen, z.B. beim *Sce* VMA-Intein, verlieren die Inteine durch diesen Spaltungsprozess ihre natürliche Aktivität.

Der Mechanismus, der es den Inteinhälften ermöglicht, sich in Lösung zu finden und die PTS-Reaktion durchzuführen, ist im Detail noch nicht bekannt, jedoch läuft die Assoziation der Fragmente generell sehr schnell ab. Im Falle des DnaE-Inteins wurde z.B. eine niedrige nanomolare Affinität der Fragmente zueinander gemessen [42], wobei eine Theorie besagt, dass die lokalen Ladungsunterschiede in den Inteinhälften des *Ssp* DnaE ihre Assoziation begünstigen [43]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wäre demnach die Protein-trans-Spleißreaktion selbst, was sich ebenfalls auf die Reaktionsgeschwindigkeiten von natürlich und künstlich gespaltenen Inteinen niederschläge (Tabelle 2).

**Tabelle 2. PTS-Reaktionsraten von gespaltenen Inteinen**

<b>Intein</b>	<b>T / °C</b>	<b>k / s<sup>-1</sup></b>	<b>Referenz</b>
<i>Natürlich gespaltene Inteine</i>			
<i>Npu</i> DnaE	37	1,1 x 10 <sup>-2</sup>	[44]
<i>Ssp</i> DnaE	23	6,6 x 10 <sup>-5</sup>	[45]
<i>Ssp</i> DnaE	23	3,3 x 10 <sup>-4</sup>	[46]
<i>Künstlich gespaltene Inteine</i>			
<i>Sce</i> VMA	25	9,4 x 10 <sup>-4</sup>	[47]
<i>Sce</i> VMA	25	1,9 x 10 <sup>-4</sup>	[48]
<i>Ssp</i> DnaB (Endo)	25	7.1 x 10 <sup>-4</sup>	[47]

(Endo) steht für eine Spaltung an der Endonukleaseposition.

Inzwischen finden natürlich und künstlich gespaltene Inteine mannigfaltige Anwendungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Synthese und Semisynthese von Proteinen (siehe Kapitel 1.1.4) oder als Werkzeug zur Proteinfunktionskontrolle (siehe Kapitel 1.4.3).

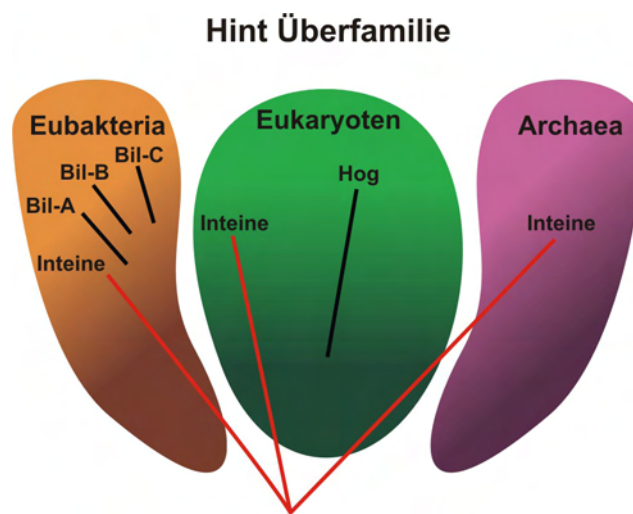
### 1.1.3 Evolution der Inteine

Inteine kommen in allen drei Domänen des Lebens vor und besitzen unter anderem einige konservierte Aminosäuren und eine ähnliche Struktur. Ein Vergleich ihrer Gesamtsequenz untereinander führt zu einer sehr hohen Sequenzdiversität. Diese Beobachtung wird zurzeit mit dem phylogenetisch sehr alten Ursprung der Inteine erklärt und der daraus resultierenden Zeit, die es den Inteinen ermöglichte, sich zu verändern und zu spezialisieren. Das vermutete Vorläuferprotein soll schon vor der Teilung von Prokaryoten und Eukaryoten existiert haben (Abbildung 6).

Eine Untersuchung über die Verbreitung noch vorhandenen Inteine entdeckte einige, die eine identische Integrationsposition in homologen Genen unterschiedlicher Organismen besitzen. Diese Intein-Allele, die sich untereinander stärker ähneln als andere (nichtallelische) Inteine, können auf ein gemeinsames Vorläufergen zurückgeführt werden [7]. Im Falle der DnaE-Inteine von Cyanobakterien ist nicht nur die Genorganisation, sondern auch der Integrationsort konserviert [37].

Bei den nichtallelischen Inteinen fallen zwei Dinge auf: Zum einen ist ihre Phylogenese stark unterbrochen (<http://www.neb.com/neb/inteins.html>, [5]) und zum anderen kommen sie sehr häufig an hochkonservierten Sequenzmotiven in essentiellen Genen vor [49-51]. Im Kontext dieser zwei Beobachtungen stellt sich zusätzlich die Frage, warum Inteine überhaupt noch existieren, da sie keine bekannte Funktion für ihren Wirtsorganismus erfüllen.

Inteine werden deshalb fernerhin als parasitäre genetische Elemente bezeichnet [52]. Eine Folge davon, dass sie dem Organismus keinerlei evolutionären Vorteil verschaffen, ist ihre ständige Bedrohung durch selektionsbedingte Ausrottung. Dieser Prozess führt auch zu der phylogenetisch sehr großen Distanz der Inteine. Die Entfernung noch vorzufindender Inteine gestaltet sich aber wegen ihres Vorkommens in hochkonservierten proteinkodierenden Regionen, die häufig aktiven Zentren, Liganden-Bindungsstellen, etc. entsprechen [53], relativ schwierig. Deshalb muss, wenn das Intein entfernt werden soll, dies überaus sequenzspezifisch geschehen, dass sowohl der Leserahmen des Gens intakt bleibt als auch keine Deletion oder Insertion in einer essentiellen Region entsteht.



**Abbildung 6. Ursprung der Inteine und das Vorkommen der Hint Überfamilienmitglieder**

Das Schema zeigt das Vorkommen der Hint Überfamilienmitglieder in den drei Domänen des Lebens. Die roten Linien deuten die wahrscheinliche Evolution der Inteine an.

Neben den Inteinen gibt es noch weitere Klassen von Proteindomänen, die alle Gemeinsamkeiten in ihrer Sequenz, Struktur und ihren mechanistischen Eigenschaften besitzen. In der Hint Überfamilie wurden bisher die autoprozessierenden Domänen der Hog-Proteine und die bakteriellen inteinähnlichen Domänen (engl. bacterial intein-like, BIL) (Abbildung 6) charakterisiert.

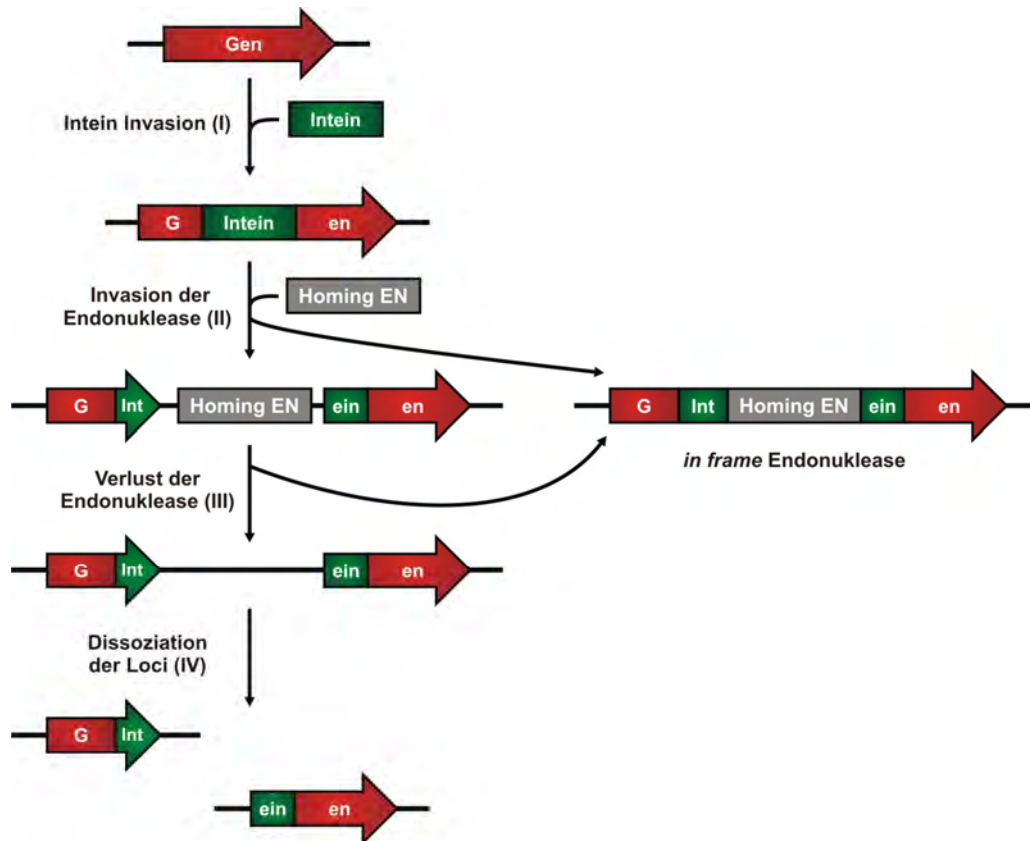
Die prominentesten Vertreter der Hog-Proteine sind die Hedgehog-Proteine (Hh), die einen essentiellen Signalweg in der Entwicklung von Eukaryoten kontrollieren. Sie besitzen eine N-terminale (Hh-N) und C-terminale (Hh-C) Domäne. Die erste Domäne Hh-N, auch Hedge genannt, ist die Region, die über die eigentliche biologische Signalaktivität verfügt. Die Hh-C-Domäne (Hog) besteht aus zwei Teilen, der Hint-Domäne, die autokatalytisch ihre flankierenden Bereiche miteinander ligiert, und einer zweiten Region (engl. sterol-recognition region, SSR), die spezifisch Cholesterin erkennt und bindet. Die carboxyterminale auto-

proteolytische Domäne ähnelt in ihrer Sequenz den Inteinen [54]. Seit der Lösung der Kristallstruktur der autokatalytischen Hh-C-Region von *Mus musculus* wird diese als Hint-Domäne bezeichnet [12].

Ebenso zur Hint Überfamilie gehören die bakteriellen inteinähnlichen Domänen (BIL), von denen bis jetzt drei verschiedene Klassen (BIL A-C) identifiziert wurden [55, 56]. Sie führen entweder gezielt Proteinspleißen oder N- und C-terminale Hydrolyse durch, kommen jedoch im Gegensatz zu Inteinen in unkonservierten Regionen vor [50, 55]. In den BIL-A-Proteinen wird am C-terminalen Ende His-Asn gefunden, das auch bei den Inteinen konserviert ist. Dafür ist aber die folgende Aminosäure an der +1 Position unkonserviert. Bei den BIL-Proteinen konnte ferner eine positive Selektion festgestellt werden, was nahe legt, dass sie auch eine Funktion erfüllen. Spekulationen gehen von einem Mechanismus aus, der Variabilität und Diversität von Proteinen erzeugt und damit für die Regulation, Adhäsion und Lokalisation von Proteinen von Bedeutung sein könnte (BIL A und B) [55]. BIL-C-Proteine kommen in räuberisch lebenden Bakterien vor und bei ihnen wird über eine Funktion in der Wechselwirkung zwischen Räuber und Opfer spekuliert [56].

Ein weiterer Faktor, der bei der Verbreitung und Evolution der Inteine in Betracht gezogen werden muss, ist die Homing-Endonuklease. Die Ähnlichkeit von Inteinallelen rührt möglicherweise von der vertikalen Transmission während der Speziation und der horizontalen Transmission zwischen Spezies und Stämmen. Die horizontale Transmission von Inteinen ist aus Fällen abzulesen, in denen die Sequenzähnlichkeit zwischen den Inteinallelen größer ist als die zwischen ihren Wirtsorganismen und die „Codon Usage“ und der GC-Gehalt der Inteinallele von dem des Wirtsorganismus differieren [57, 58]. Die Homing-Endonukleaseaktivität ist hochspezifisch mit sehr langen und seltenen, den Insertionspunkt umgebenden Erkennungssequenzen [6]. Damit können sie sich ohne Probleme in Stämmen verbreiten, welche noch kein Intein besitzen. Es wird spekuliert, dass Inteine Homing-Endonukleasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Evolution erworben haben, da sowohl verschiedene Typen von Homing-Endonukleasen existieren als auch Miniinteine auftreten, denen sie gänzlich fehlt [59]. Neuerdings wurde sogar in Phagen eine Organisationsform von fraktionierten Genen identifiziert, in der eine frei stehende Homing-Endonuklease ein Intein in zwei Hälften teilt [40]. Im Gegensatz zu der Anordnung der gespaltenen Inteine sind in diesen Fällen die umliegenden Gene noch in ihrer richtigen Orientierung im Genom erhalten. Diese Identifikation einer postulierten Zwischenform unterstützt die Hypothese, dass die Inteine sich vor und ohne Benötigung einer Endonuklease in Gene integriert haben [60] (Abbildung 7).





**Abbildung 7. Modell der Evolution der verschiedenen Inteinformen**

Jede der dargestellten genomischen Organisationsformen konnte in verschiedenen Organismen nachgewiesen werden. Die angenommene Reihenfolge der schrittweisen Evolution bis zu den gespaltenen Inteinen ist in römischen Zahlen markiert.

Im Folgeschritt findet eine Integration der Homing-Endonuklease in dieses Intein tragende Gen statt (Abbildung 7 II). Dabei entsteht im Falle einer *in-frame*-Integration ein Maxiintein oder ein fraktionierter Locus, wie er auch in den Phagen beobachtet wird [40]. Bei letzterer Form der Integration der Homing-Endonuklease müssten diese Signale für sowohl die 5'-Transkriptions- und Translationstermination als auch am 3'-Ende ein Translationsstartsignal in die unterbrochenen Genregionen einbringen. In den folgenden Schritten könnte dann die Homing-Endonuklease verloren gehen (Abbildung 7 III) und die Genfragmente voneinander getrennt werden (Abbildung 7 IV). Diese Abfolge würde die Entstehung der gespaltenen Inteine, wie die DnaE-Inteine und das *Neq* DnaPol, erklären.

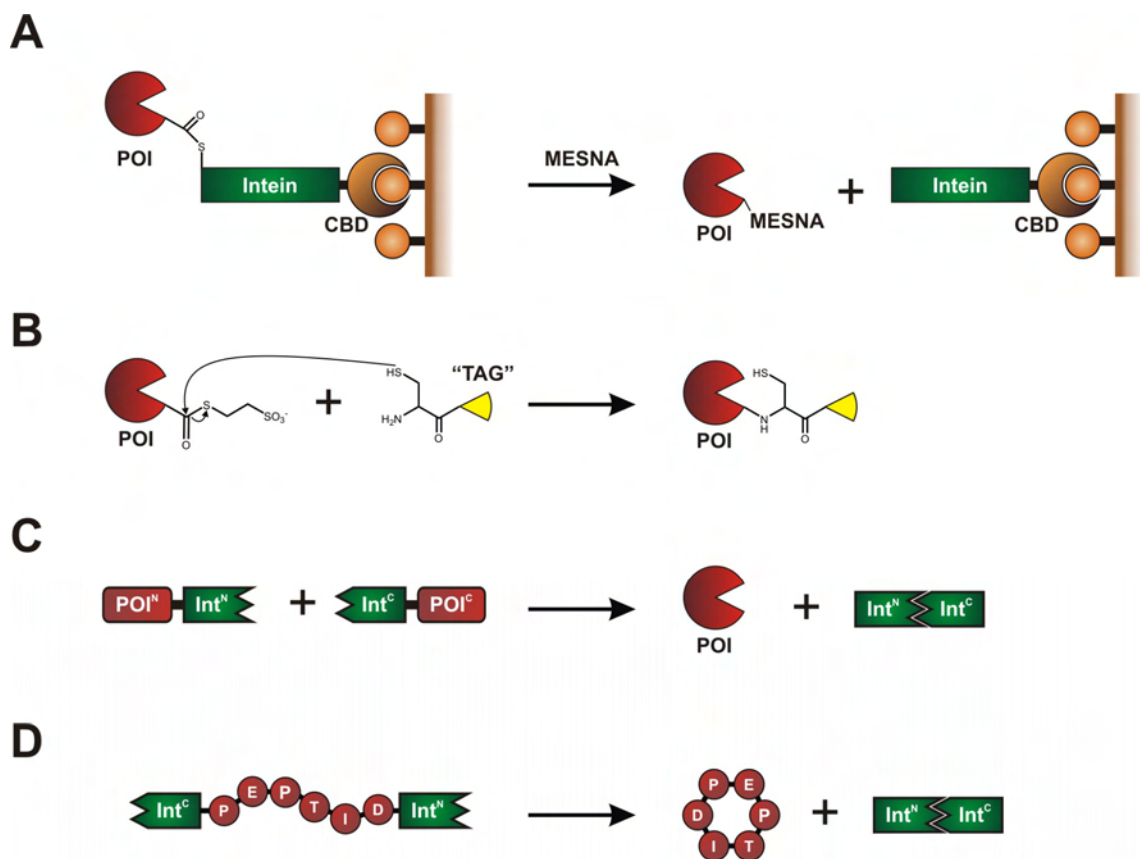
### 1.1.4 Anwendung von Inteinen

In den letzten Jahren haben sich Inteine als weit verbreitete Werkzeuge in der Biochemie und Molekularbiologie etabliert. Neben ihrer klassischen Anwendung für die Reinigung von Zielproteinen nutzen neue Methoden hauptsächlich gesplante Inteine und ihre besonderen Fähigkeiten zur Proteinligation.

Inteine fanden ihre erste weit verbreitete Anwendung in verschiedenen Reinigungsstrategien für Proteine, die auf dem einzigartigen Mechanismus des Proteinspleißens basieren. Inzwischen gibt es die kommerziellen IMPACT-System-Vektoren von *New England Biolabs*, die auf dem *Sce* VMA-Intein [61, 62] und dem *Mxe* GyrA-Intein [28] basieren. Abhängig von der Inteinfusion an die N- oder C-Termini können die Zielproteine (engl. protein of interest, POI) auf verschiedene Arten mit Hilfe von Bindedomänen aufgereinigt werden. In den meisten Fällen findet hier die chitinbindende Domäne (CBD) ihre Verwendung. Allen Systemen ist gemein, dass mutierte Inteine verwendet werden, welche die Spleißreaktion verhindern und somit eine gezielte Spaltung des Zielproteins von der Matrix erlauben. Im Falle der induzierten N-terminalen Spaltung mittels des *Sce* VMA-Inteins reicht eine Mutation im C-terminalen Asparagin aus, um ein vollständiges Abfließen der Proteinspleißreaktion zu verhindern, aber die Bildung des Thioesters durch den N-S-Acyltransfer zu erlauben. Die Spaltung der Fusion von Zielprotein mit dem mutierten Intein kann durch Zugabe von Thiolen, z.B. DTT [61], aber auch MESNA [63] und Thiophenol [64], eingeleitet werden (Abbildung 8 A). Die verwendeten Substanzen zeigen zeitlich bedingte Hydrolyseeigenschaften, was eine Herstellung von unmodifizierten Proteinen erlaubt. Es wurden auch andere Inteine entwickelt, die eine Spaltung allein durch pH-Verschiebung [65, 66] und Temperaturverschiebung [28, 63, 65, 66] ermöglichen.

Eine häufige Verwendung von Inteinvektoren ist die Herstellung von Vorläufermolekülen für die „Expressed Protein Ligation“ (EPL), die Proteine mit einem  $\alpha$ -Thioester benötigt. EPL basiert auf der Methode der Nativen Chemischen Ligation (NCL), bei welcher ein vollständig synthetisches Peptid mit  $\alpha$ -Thioester mit einem anderen Peptid, das ein N-terminales Cystein trägt, konzentrationsgetrieben reagiert [67]. Weil zur Generierung des Thioesters auch Inteine benutzt werden können, spricht man hier von EPL [64] bzw. von „Intein Protein Ligation“ (IPL) [68]. Der  $\alpha$ -Thioester wird hierbei mittels Inteinfusionen z.B. mit dem *Mxe* GyrA-Intein und MESNA erzeugt. Durch Zugabe eines Peptids mit N-terminalen Cystein, das mittels Festphasenpeptidsynthese (engl. solid phase peptide synthesis, SPPS) hergestellt wurde, kann die anschließende Thiolyse ablaufen (Abbildung 8 B). Bei der Größenlimitierung des Peptids durch SPPS stellen inzwischen 50 AS keine große experimentelle Herausforderung mehr da. Ebenso ist die Präsenz von Detergentien während der Thiolyse [69, 70] und die effiziente Rückfaltung des Inteins möglich [70]. Bei der Verwendung eines Ligationspartners, der ein N-terminales Cystein trägt, findet natürlich keine Limitierung auf SPPS-Peptide statt, stattdessen kann dieser Partner auch rekombinant in Zellen mittels Inteinen oder Proteasen hergestellt werden. Die Ligationsreaktion an sich

benötigt hohe Konzentrationen (mM) an Peptid bzw. dem Partner bei einem pH von 7 bis 8 in der Anwesenheit von Thiolen wie MESNA oder Thiophenol, was kompetitierenden Oxidation- und Hydrolysereaktionen entgegenwirkt [67]. Ein möglicher Nachteil, der sich aus den optimalen Reaktionsbedingungen der EPL ergibt, sind die sehr hohen Konzentrationen der verwendeten Partner. Da die Menge des rekombinant erzeugten Zielproteins aufgrund von Fehlfaltung limitiert werden kann, führt die Verringerung seiner Konzentration zu einer geringeren Effizienz der EPL-Reaktion. Auch kann das im Protein eingeführte Cystein, durch die nicht ganz spurlos verlaufende Ligationsreaktion, ein Problem darstellen. Bei Cystein handelt es sich um die zweitseltenste Aminosäure [71] und ihr Einbau in Proteine kann diese teilweise in ihrer Funktion beeinträchtigen. Die EPL ist trotz allem ein effizientes Werkzeug für die biophysikalische Analyse von Proteinen und ermöglicht z.B. eine segmentelle Isotopenmarkierung, den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, posttranslationalen Modifikationen und auch Fluorophoren.



**Abbildung 8. Anwendung von Inteinen**

Die Abbildung zeigt schematische einige der Anwendungen von Inteinen. A) Intein vermittelte Reinigungsstrategie: Das Fusionsprotein, bestehend aus Zielprotein (POI), Intein und einer Bindedomäne (CBD), wird mittels MESNA (2-Mercaptoethansulfonat) von einer Säule eluiert. B) EPL-Reaktionsschema: C-terminalen Thioester tragende Zielproteine werden mit einem N-terminalen Cystein modifizierten Peptid („TAG“) ligiert. C) Verwendung von Protein-*trans*-Spleißen, um Zielproteine semisynthetisch oder rekombinant herzustellen. D) Herstellung von zyklischen Peptiden oder Proteinen durch Inteine.

Neben dem EPL- oder dem IPL-Ansatz, der nur für die Herstellung eines Ligationspartners ein Intein benötigt, können auch gespaltene Inteine zur direkten Ligation von Zielproteinen verwendet werden (Abbildung 8 C). Inteine erzeugen nach der Spleißreaktion eine native Peptidbindung zwischen den ligierten Exteinsequenzen in einer meist schnelleren Reaktion als EPL, da sie vollständig vom Intein katalysiert wird. Aus diesem Grund ist die Reaktion nicht konzentrationsgetrieben und kann auch bei kleinen Mengen der Ligationspartnern effizient ablaufen [72]. So konnten Protein-*trans*-Spleißsysteme zur regioselektiven *in-vitro*-Markierung von Proteinen entweder mit einer für Cystein-Biokonjugation zugänglichen C-terminalen Region [73, 74] oder mittels eines kleinen N-terminalen Peptids, das durch SPPS funktionalisiert werden kann [75, 76], verwendet werden. Es wurde auch ein System entwickelt, welches das gespaltene *Ssp* DnaE-Intein zur segmentellen Isotopenarkierung *in vivo* mittels zweier selektiv ansteuerbaren Promotor/Operatorpaaren benutzt [77]. Diese markierten Proteine dienen der Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie. Ein Problem dieses Expressionssystems ist ein als „isotope-scrambling“ bekannter Effekt während der NMR-Messung, d.h. es lag eine nicht vollständige und selektive Markierung der unterschiedlichen Proteinhälften vor. Der Effekt entsteht durch die nacheinander erfolgenden Synthesen beider Proteinhälften in der gleichen Zelle, weil bei dem Wechsel in ein isotopenmarkiertes Medium ein Rest von unmarkierten Aminosäuren in der Zelle verbleibt, die zur Synthese von Proteinen verwendet werden können. Generell treten bei der Anwendung von gespaltenen Inteinen auf neue Zielproteine mit den Inteinfusionen verbundene Probleme wie Instabilität, Missfaltung und Aggregation auf, die teilweise durch löslichkeitserhöhende Fusionsproteine umgangen werden können [48, 78]. Ebenso gibt es für jedes Intein bestimmte Restriktionen in den Exteinsequenzen (-3 -2 -1 und +2 +3) (Kapitel 1.1.1) für ein effizientes Ablaufen der PTS-Reaktion, die zurzeit noch durch systematisches Testen für jedes neue Zielprotein festgestellt werden müssen. Ebenso wie bei der EPL bleibt auch beim PTS eine Aminosäure als Rest an der Ligationstelle, die von den natürlichen Anforderungen des verwendeten Inteins an der Position +1 bestimmt wird und Cys, Ser oder Thr sein kann (Abbildung 2). Aufgrund dieser Limitationen gehen die Bestrebungen dahin, die gespaltenen Inteine zu optimieren. Zum einen wird versucht, sie in ihrer Größe zu reduzieren und damit auch zugänglich für die Semisynthese zu machen und zum anderen Inteine zu identifizieren, die toleranter gegenüber verschiedener Exteinsequenzen sind.

Eine weitere Anwendung ist die Möglichkeit mittels Inteinen zyklische biologisch aktive Peptide, aber auch ganze Proteine herzustellen [79-83]. Dazu wird die Sequenz für ein kleines Peptid oder Protein am 5'-Ende mit dem N-terminalen Inteing fusioniert und am 3'-

Ende mit dem C-terminalen Intein (Abbildung 8 D). Die nach der PTS-Reaktion erzeugten zyklisierten Peptide oder Proteine besitzen generell eine erhöhte Thermostabilität und sind resistenter gegenüber Proteasen [80, 83]. Die von Scott *et al.* entwickelte Methode kann nicht nur dazu verwendet werden, um zyklisierte Proteine herzustellen, sondern auch zur Generierung von *in-vivo*-Bibliotheken kleiner zyklischer Peptide. Damit ist die Methode eine Alternative zur SPPS, um biologisch aktive zyklische Peptide zu erhalten. Der größte Nachteil liegt erneut beim verwendeten *Ssp* DnaE-Intein, dass nur unter einer bestimmten Sequenzabhängigkeit und damit auch strukturellen Ansprüchen die Proteinspleißreaktion und Zyklisierung erlaubt [84].

Neben den bisher dargestellten Anwendungen können Inteine außerdem zur Generierung von Proteinchips [85] und Biosensoren [81, 86] genutzt werden. Darauf soll aber im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Die Möglichkeiten, Inteinen zur Proteinfunktionskontrolle zu nutzen, werden in Kapitel 1.4.3 diskutiert.

## 1.2 Genexpressionskontrolle auf der DNA-Ebene

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um ein von der Zelle synthetisiertes Zielprotein in seiner Herstellung oder seinen Eigenschaften zu beeinflussen. Die erste Ebene, auf der dies bewerkstelligt werden kann, ist die Ebene der Erbinformation selbst, nämlich der DNA. Es gibt einen grundsätzlichen Unterschied zwischen Eukaryoten und Prokaryoten in der Organisationsform ihrer DNA. Im Gegensatz zu prokaryotischer DNA ist die DNA im Zellkern der eukaryotischen Zellen um DNA bindende Proteine, die Histone, gewickelt. Diese Organisationsform wird als Chromatin bezeichnet. Als Konsequenz ist die DNA grundsätzlich unzugänglich für RNA-Polymerasen, auch wenn starke Promotoren enthalten sind [87]. Für Eukaryoten sind des Weiteren zwischengeschaltete Transkriptionsfaktoren unerlässlich, da erst sie die Zugänglichkeit der DNA ermöglichen. In Prokaryoten ist dagegen fast jeder Promotor für RNA-Polymerasen frei zugänglich, was in vielen Fällen eine einfache und direkt stimulluspezifische Form der Regulation, wie z.B. durch Kohlenstoffquellen oder Antibiotika, durch eigene Repressoren bzw. Aktivatoren ermöglicht. Durch das Regulationsprinzip in höheren Eukaryoten wird die konditionale und stimulluspezifische Kontrolle von Zielgenen (engl. gene of interest, GOI) immens erschwert, was zur Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Genexpressionskontrolle führte. Häufig übertragen diese Methoden Regulationselemente von Bakterien und Phagen, die schon stimulluspezifisch sind, auf höhere Organismen.

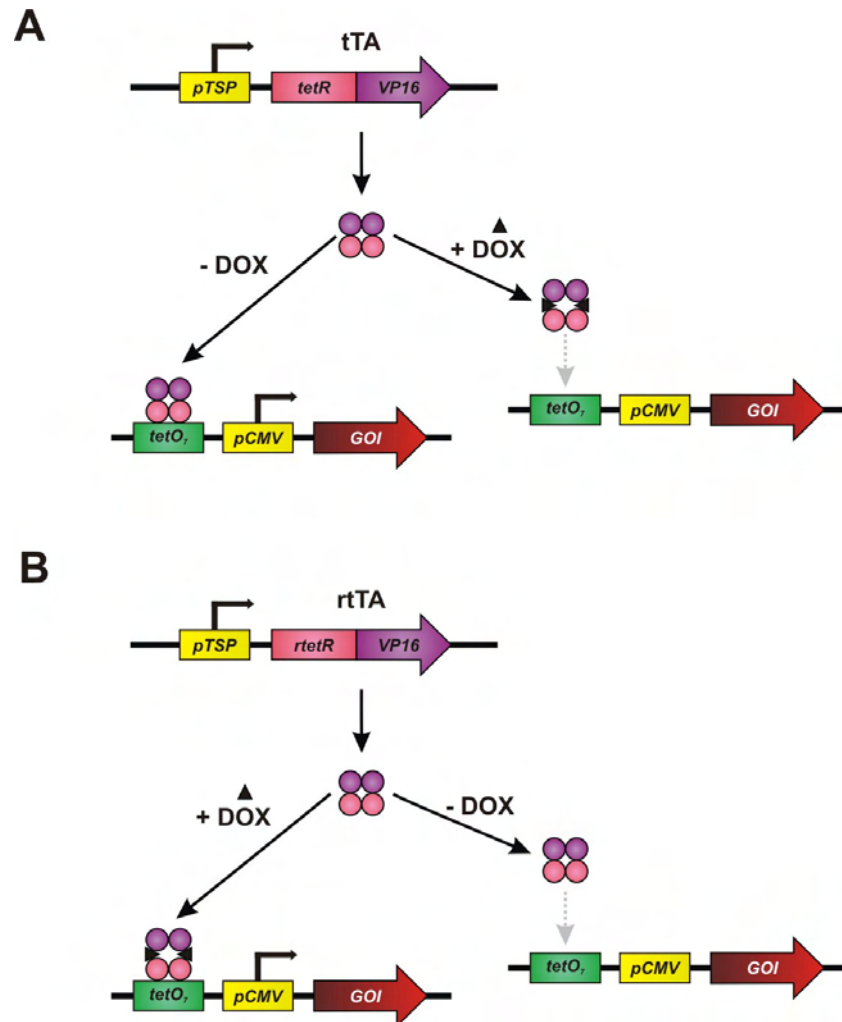
Es sollen hier zwei Beispiele zur konditionalen Kontrolle von Genprodukten vorgestellt werden, die ebenfalls in komplexen Organismen wie Mäusen Verwendung finden.

### 1.2.1 Konditionale Genexpression

Die in höheren Eukaryoten vorhandene Organisationsform der DNA erschwert die Generierung eines idealen Überexpressionssystems, das die Expression von Transgenen in einer schnellen und reversiblen Art und Weise erlaubt. In Säugerzellen war der Ausgangspunkt für die Entwicklung eines solchen Systems ein *E. coli*-Signalweg, der die Expression des Tetracyclin-Resistenzgens kontrolliert. Dieses Gen wird durch den Tetracyclin-Repressor (TetR) konstitutiv reprimiert, einem Protein das spezifisch an die Sequenz des Tetracyclin-Operators (*tetO*) innerhalb des Promotors bindet und damit das Gen transkriptionell stummschaltet. Die Repression wird aufgehoben, indem TetR an Tetracyclin bindet und dadurch eine Konformationsänderung bewirkt. Dieser Mechanismus führt zur Kontrolle der Tetracyclinresistenz durch einen einfachen An/Aus-Schalter, der auf die Konzentration von Tetracyclin reagiert.

Da TetR und *tetO* spezifisch miteinander interagieren und sich nicht mit eukaryotischen Regulationssystemen überschneiden, werden viele Probleme umgangen, die bei vorherigen Versuchen der Regulation von Transgenexpression aufgetreten sind. Allerdings hemmt Tetracyclin in einem gewissen Umfang die Proteinbiosynthese in Eukaryoten, was zu toxischen Effekten führt. Das System wurde an zwei Punkten modifiziert, um ein orthogonales Regulationssystem für Säugerzellen zu schaffen. Zuerst wurde TetR durch die Fusion mit der Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus VP16 in einen transkriptionellen Aktivator verwandelt. Dieses Hybridprotein wird auch als Tetracyclin abhängiger transkriptioneller Transaktivator (tTA) bezeichnet. Die zweite Modifikation ist die Verwendung des Cytomegalovirus- (CMV) -Minimalpromotors, der mit *tetO*-Sequenzen fusioniert in der Lage ist, die Transgenexpression in Säugetieren zu kontrollieren. Dieser Chimärenpromoter ist unter basalen Konditionen transkriptionell stumm und wird bei der tTA-Inaktivierung nach Bindung von Tetracyclin bzw. Doxycyclin (ein Tetracyclinanalogon) angeschaltet (Abbildung 9 A) [88]. Da der Grundzustand dieses Systems ohne die Präsenz von Tetracyclin oder Doxycyclin keine Expression erlaubt, wird das System auch als „Tet-Off“ bezeichnet. Doxycyclin besitzt sowohl höhere Hybridrepressorbindeaffinität als auch eine geringere Toxizität als Tetracyclin [89]. Das „Tet-Off“-System zeigt zudem große Nachteile durch die ständige Zugabe des Doxycyclin-Liganden, um die Expression zu reprimieren und vor allem durch die langsamen Antwortraten der Induktion der

Genexpression. Dieser Effekt beruht auf der zeitlich bedingten Entfernung von Doxycyclin durch Verstoffwechslung, die abhängig vom Zielgewebe von einem Tag bis zu Wochen dauern kann [90].



**Abbildung 9. Tetracyclinabhängiges Regulationssystem für die Transgenexpression**

A) Im „Tet-Off“-System ist der Effektor der tetracyclinabhängige Transaktivator (tTA) der Transkription, welcher ein chimäres Fusionsgen aus dem *tetR*-Gen (rosa) und der *VP16*-Transaktivierungsdomäne (lila) darstellt. In der Abwesenheit des Liganden Doxycyclin (Dox) binden Dimere von tTA spezifisch an sieben Tandemwiederholungen der *tetO*-Sequenz, was die Transkription vom Cytomegalovirus Minimalpromotor (*pCMV*) aktiviert und zur Expression des Zielgens (engl. gene of interest, GOI) führt. B) In dem „Tet-On“-System wurde das *tetR*-Gen so mutiert, dass sich die Bindeeigenschaften von tTA umgekehrt haben (engl. reverse tTA, rtTA) und er nur noch unter der Anwesenheit von Dox an die *tetO*-Sequenzen binden kann. (engl. tissue specific promoter, *pTSP*)

Um die langsame Reaktionszeit des „Tet-Off“-Systems zu umgehen, wurde der umgekehrt tetracyclinabhängige transkriptionelle Transaktivator entwickelt (engl. reverse TetR, rTetR), der *tetO* nur noch in der Anwesenheit von Doxycyclin binden kann (Abbildung 9 B) [91]. Das „Tet-On“-System besitzt somit eine umgekehrte Ligandenabhängigkeit. Der größte Vorteil ist die schnelle Transgenexpression, weil nur sehr geringe Mengen an

Doxycyclin für die transkriptionelle Aktivierung erforderlich sind [92]. Nachteil des rTetR-Proteins ist eine noch vorhandene Restaffinität zu *tetO*, was zu einer geringen basalen Expression führte [93]. Durch Generierung von TetR-Mutanten wurde versucht dieses Problem zu reduzieren bzw. zu umgehen [94].

Die Expression von *tTA* und *rtTA* unter gewebespezifischen Promotoren (engl. tissue specific promoter, TSP) erlaubt sogar die selektive Expression von Transgenen in einzelnen Organen der Maus.

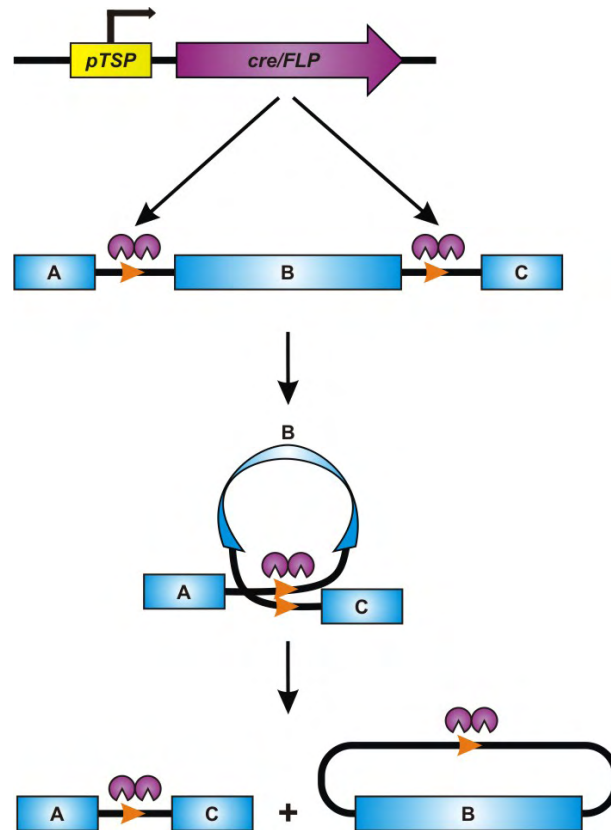
### 1.2.2 Konditionale Gen-Knockout Strategien

In höheren Organismen gibt es einige essentielle Gene, deren Deletion zu embryonaler Letalität und schweren Krankheiten führt, wodurch die Untersuchung der Genfunktion in älteren Individuen verhindert oder stark beeinträchtigt wird. Eine Möglichkeit diese Probleme zu umgehen und Gene spezifisch und permanent zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung zu inaktivieren, ist die Verwendung von Rekombinasen. Zu diesem Zweck werden gegenwärtig zwei Mitglieder der Integrasefamilie der sequenzspezifischen Rekombinasen verwendet: Cre aus dem Bakteriophagen P1 [95] und FLP aus *S. cerevisiae* [96]. Mit ihnen wird die Kontrolle der Genexpression in einer konditionalen Weise mittels ortgerichteter DNA-Rekombination möglich. Cre- und FLP-Rekombinasen katalysieren ein konservatives DNA-Rekombinationsereignis zwischen zwei 34-bp-Erkennungssequenzen (*loxP* und *FRT*), bestehend aus zwei 13 bp langen Palindromen, die von einem asymmetrischen 8-bp-Kern getrennt werden. Weil diese Rekombinasen weder Hilfsproteine noch energetisch aktivierende Kofaktoren benötigen, eignen sie sich zur heterologen Expression (Abbildung 10).

Um eine generelle Anwendung zur Aktivierung und Stummschaltung der Genexpression in endothermen Zellen und Organismen, wie z.B. Mäusen, zu ermöglichen wurden inzwischen einige Modifikationen und Optimierungen an den Rekombinasen vorgenommen. So wurde durch Proteinevolution eine Cre-Rekombinase generiert, die ein Temperaturoptimum bei 37 °C besitzt [97]. Ein Nachteil der Rekombinasen ist die *in vivo* und *in vitro* nachgewiesene Rekombinationsereignisse zwischen degenerierten *loxP/FRT*-Sequenzen. So führten hohe Expressionslevel der *cre*-Rekombinase in Säugerzellen zu Wachstumsstillstand und DNA-Schäden [98]. Abschließend soll noch angemerkt werden, dass sich dieses sequenzspezifische Rekombinationsystem natürlich auch beliebig mit anderen Elementen zur weiteren lokalen und zeitlichen Kontrolle kombinieren lässt. Die Genexpression von *cre/FLP* kann z.B. unter der Kontrolle von gewebespezifischen



Promotoren (TSP) stehen oder mit dem Tet-System gekoppelt werden (Kapitel 1.2.1). In diesem Fall führt die zeitlich frei wählbare Zugabe von Doxycyclin zur Expression der Cre-Rekombinase und anschließender Zielgendeletion [99].



**Abbildung 10. Konditionale Gendisruption mittels der Cre/FLP-Systeme**

Dimere von Cre/Flp (violett) katalysieren die *in cis* stattfindende konservative Rekombination zwischen direkt benachbarten *loxP/FRT*-Sequenzen (orangefarbene Pfeilspitzen). Die Folge ist die Bildung einer gebogenen DNA-Struktur, das Ausschneiden der Region B und die Verknüpfung von A und C. Die Entfernung von einer essentiellen Region (B) aus einem Gen führt nach dem Rekombinationsereignis zur Geninaktivierung. Rekombinationsereignisse können auch Gene aktivieren, indem z.B. durch Entfernung einer Polyadenylierungssequenz (B) ein Promotor (A) ein Zielgen in C erreichen kann.

### 1.3 Genexpressionkontrolle auf der RNA-Ebene

Der Informationsfluss in allen Zellen läuft von der DNA über RNA zum Protein. Das Transfermolekül RNA überführt dabei den Informationsgehalt der DNA an das finale Protein. Im Gegensatz zur DNA ist die RNA sowohl durch die 2'OH-Gruppe als auch durch ihre temporären Aufgaben in der Zelle ein instabiles Molekül. Dafür ist die RNA aber auch flexibler in Struktur und Funktion als DNA, denn sie kann auch katalytische Aktivität aufweisen und regulatorische Aufgaben erfüllen.

Im folgenden Kapitel sollen zwei Fälle von prokaryotischen und eukaryotischen Formen der Genexpressionskontrolle auf Ebene der RNA vorgestellt werden.

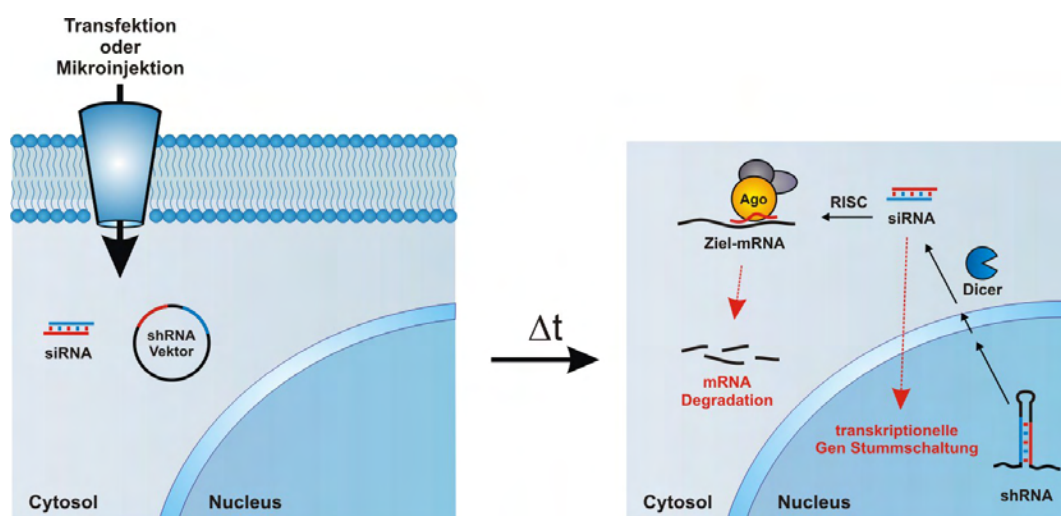
### 1.3.1 RNA-Interferenz

Im Jahre 1998 wurde das grundsätzliche Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi) in *Caenorhabditis elegans* entdeckt, und zwar dass doppelsträngige RNA (dsRNA) die Fähigkeit besitzt, Gene in Zellen stummzuschalten [100]. Schon drei Jahre später konnte auch der sequenzspezifische „Gen-Knockdown“ durch synthetische „small-interfering“ RNAs (siRNA) in einer menschlichen Zelllinie bewirkt werden [101]. Inzwischen wurden einige der hochkonservierten eukaryotischen Mechanismen entschlüsselt, die durch kleine RNA-Moleküle kontrolliert werden, um sowohl endogene Gene zu regulieren als auch die Expression von parasitären und pathogenen Eindringlingen wie Transposons und Viren einzuschränken. Im Jahre 2006 wurde für die Entdeckung von RNAi der Nobelpreis vergeben, die mittlerweile die am häufigsten verwendete Methode darstellt, um schnell und unkompliziert Gen-Knockdown- bzw. Gen-Knockout-Phänotypen in Säugerzellen zu erzeugen. Ebenso gibt es große Anstrengungen auf RNAi basierende Therapeutika für verschiedene Krankheiten zu entwickeln, vor allem für Krebs und virale Infektionen.

RNAi ist ein nahezu universell vorkommender und fundamentaler Prozess bei Eukaryoten zur Spaltung und Degradation komplementärer mRNA. Auslöser dieses Prozesses sind lange doppelsträngige RNA-Moleküle in der Zelle, die durch das Enzym Dicer in kleine RNA-Fragmente von 21-23 Nukleotiden, auch als siRNAs bekannt, geschnitten werden. Es ist ebenfalls möglich synthetische siRNA-Moleküle direkt in die Zellen einzubringen und damit den Reifungsprozess zu umgehen oder aber kleine doppelsträngige Haarnadelstruktur-RNA-Moleküle (engl. small hairpin RNA, shRNA) in den Zellen mittels Vektoren zu exprimieren (Abbildung 11). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Vorgehensweise ist das Umgehen einer möglichen angeborenen Immunreaktion, die beim Einbringen von langen dsRNAs (>30 Nukleotide) in die Zellen die globale Proteinexpression herunterreguliert. [102].

Im Falle der shRNAs beginnt die Biogenese und Prozessierung schon im Nucleus durch das Enzym Drosha und endet mit dem Export eines kleinen doppelsträngigen RNA-Moleküls durch Exportin 5. Im Cytoplasma werden alle kleinen RNAs, unabhängig ihres Ursprungs, durch die eine hochkonservierte Ribonuklease III (RNase III), genannt Dicer, modifiziert. Dicer besitzt eine Doppelstrang-RNA-Bindedomäne (dsRBD) und zwei Tandem-RNase-III-Domänen (RIIIDs), die es ihm ermöglichen, als intramolekulares Dimer zu interagieren und zwei Nukleotid-3'-Überhänge an den siRNAs zu erzeugen.[103]. Im nächsten Schritt der Reifung der siRNAs nimmt eine einzigartige Klasse von Proteinen, die Argonauten (Ago), eine dominierende Rolle ein. Die ~ 22 Nukleotid großen siRNAs werden durch einen Ladekomplex, dem neben Dicer auch andere Proteine angehören, auf AGO2

beladen. Der aktive Effektorcomplex, als RISC (engl. RNA-Induced Silencing Complex) bezeichnet, integriert nur einen siRNA-Strang, den sogenannten „guide strand“. Der komplementäre Strang, der „passenger strand“, wird während der Beladung degradiert. Diesem Komplex ist es durch die PIWI-Domäne der Ago-Proteine möglich, mRNA, die komplementär zum „guide strand“ ist, zu degradieren [102]. Der einmal aktivierte RISC-Komplex kann multiple mRNA-Moleküle zerstören, was seine Fähigkeit Gene stummzuschalten vergrößert. Dadurch kann ein therapeutischer Effekt für drei bis sieben Tage in sich schnell teilenden Zellen und bis zu einigen Wochen in sich langsam teilenden Zellen erhalten bleiben.



**Abbildung 11. Mechanismus der RNA-Interferenz in Säugerzellen**

Im ersten Schritt der RNAi werden aktive siRNAs bzw. shRNAs oder shRNA-Expressionsvektoren durch Transfektion oder Mikroinjektion in die Zelle eingebracht. Anschließend werden die shRNAs im Nucleus prozessiert und nach dem Export ins Cytoplasma und der finalen Modifikation durch Dicer zu aktiven siRNAs. SiRNAs können auch zur transkriptionellen Gen-Stumschaltung durch DNA-Methylierung oder Modifikation der Histone führen. Nur ein Strang der siRNAs, der „guide strand“, wird in den RISC-Komplex eingebaut, der bei fast perfekter Komplementarität vom „guide strand“ zur mRNA zu deren Degradation führt.

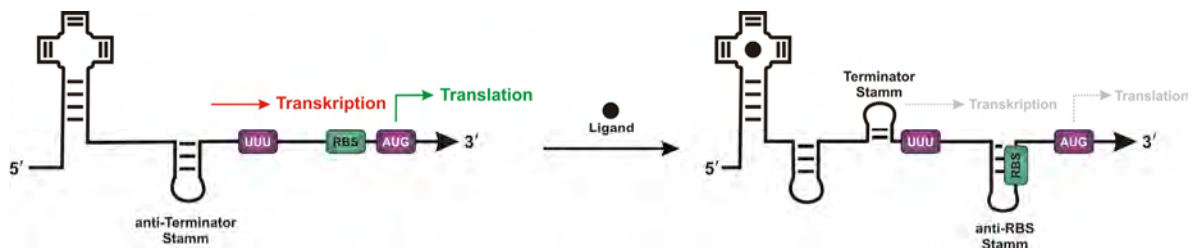
Nachdem der Signalweg ursprünglich artifiziell ausgelöst wurde, konnten inzwischen auch eine Vielzahl von natürlich vorkommenden Klassen von kleinen RNAs entdeckt werden. Eine Klasse davon sind die nicht-kodierenden microRNAs, die eine essentielle Funktion in der Entwicklung durch posttranslationale Genregulation bekleiden [104]. Eine die Keim- und Stammzellen vor mobilen genetischen Elementen (Transposons) schützende Klasse stellen die „PIWI-interacting RNAs“ (piRNAs) [105] dar.

Ein Problem in der Therapie und Applikation von siRNAs in Zellkultur und lebenden Individuen ist die Bestimmung der optimalen wirksamen Konzentration. Andere häufig auftretende Nebeneffekte sind die besagte angeborenen Immunreaktionen und Fehlreaktionen

(engl. off-targeting), die wegen unvollständiger Komplementarität der siRNAs zu anderen Zielmolekülen auftreten. Die therapeutische Zukunft von RNAi liegt vor allem in der ortsgebundenen Freisetzung von siRNAs in Geweben und Organen, um so spezifisch Krankheiten behandeln zu können und potentielle „off-target“-Effekte zu verhindern.

### 1.3.2 Riboswitches

Riboswitches sind sekundäre RNA-Strukturen, die über die Bindung von Liganden und damit verbundene Konformationsänderungen die Genexpression kontrollieren. Sie wurden in allen Domänen des Lebens identifiziert, kommen aber am häufigsten in 5'-nicht-translatierten Bereichen (engl. untranslated region, UTR) bakterieller mRNA vor. Dort regulieren sie typischerweise Gene der Metabolitbiosynthese oder des Transports. Der bakterielle Riboswitch funktioniert durch die Bindung des Metaboliten an die Aptamerregion (~ 70 - 200 Nukleotide), eine hochspezifische Bindetasche. Nach der Komplexbildung mit dem Metaboliten werden in der nahe liegenden Expressionsplattform Konformationsänderungen ausgelöst, die entweder die Termination der Transkription, Inhibition der Translation oder mRNA-Selbstspaltung initiiert [106]. Anabolische bakterielle Gene sind in den häufigsten Fällen Ausschalter (Abbildung 12), während es sich bei katabolischen Genen um Anschalter handelt, wodurch die eine effektive Feedback-Kontrolle der Stoffwechselwege möglich wird.



**Abbildung 12. Transkriptions- und Translationskontrolle durch den Coenzym-B<sub>12</sub>-Riboswitch**

Die Abbildung zeigt schematisch die Konformationsänderungen des *btuB*-Riboswitch von *E. coli*. Dieser Riboswitch erlaubt in der Abwesenheit des Liganden die Transkription und Translation des Porins BtuB, das aktiv ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Analogon (Cyanocobalamin) über die äußere Membran von *E. coli* transportiert. Falls die Aptamerregion dieses Riboswitches den Liganden Coenzym B<sub>12</sub> (Adenosylcobalamin) binden kann, finden mehrere Konformationsänderungen in der Expressionsplattform statt, die sowohl Transkription als auch Translation unterbinden [107]. (RBS = Ribosomenbindestelle)

Erste Ansätze zur Generierung von synthetischen Riboswitches bestanden z.B. darin, *in vitro* selektierte Aptamerregionen in bakterielle oder eukaryotische mRNAs einzuführen [108]. Allerdings stellt es häufig ein Problem dar, Aptamere zu generieren, welche die für den Zielliganden wünschenswerten physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften besitzen [109].

In letzter Zeit gibt es deshalb Bestrebungen natürliche Riboswitche zu manipulieren [110-112]. Dixon *et al.* erhielten nach Mutagenese und anschließender genetischer Selektion des Adenin- (*add*) -Riboswitches, eine Aptamerregion, die selektiv den „unnatürlichen“ Liganden Ammeline (ein Triazin) binden kann. Gleichzeitig verlor der *add*-Riboswitch dabei seine Binde- und Regulationsfunktion für den natürlichen intrazellulären Liganden [110]. Das größte Problem bei der Modifikation von natürlichen Riboswitches für potentielle Anwendung in Prokaryoten und Eukaryoten ist ihre signifikante evolutionäre Konservierung. Die Aptamerregion entstand durch Koevolution mit der Expressionsplattform und ist damit auch mit dieser und ihren kodierten Genen assoziiert, wodurch ein Austausch der Aptamerregion erschwert wird.

### **1.4 Proteinfunktionskontrolle auf der Ebene der Proteine**

Die direkteste Möglichkeit, um Proteinfunktionskontrolle auszuüben, stellt ein Ansatz auf der Ebene der synthetisierten Proteine dar. Auf dieser Ebene haben die Prozesse der Transkription und Translation schon stattgefunden, wodurch dieser Ansatzpunkt die schnellste Antwortzeit in lebenden Systemen erzielt. Überdies bietet die direkte Kontrolle von Proteinen und ihrer spezifischen und katalytischen Aktivitäten viel mehr Möglichkeiten, gezielt und dosiert Prozesse in der Zelle zu beeinflussen und zu modifizieren, als einfache An/Ausschalter auf DNA- und RNA-Ebene. Im Falle der gezielten Aktivierung von Proteinen muss sichergestellt werden, dass das Zielprotein in einer möglichst inaktiven Form in der Zelle vorliegt, die dann schnell und spezifisch in eine aktive Form verwandelt werden kann. Ein Vorteil der gerichteten Inaktivierung von Zielproteinen in lebenden Systemen ist die Unabhängigkeit von der natürlich stattfindenden und zeitlich variablen Degradation zellulärer Proteine. Diese Form der Kontrolle ermöglicht also grundsätzlich schnellere Reaktionsraten als die Unterbrechung der Genexpression auf DNA- oder RNA-Ebene.

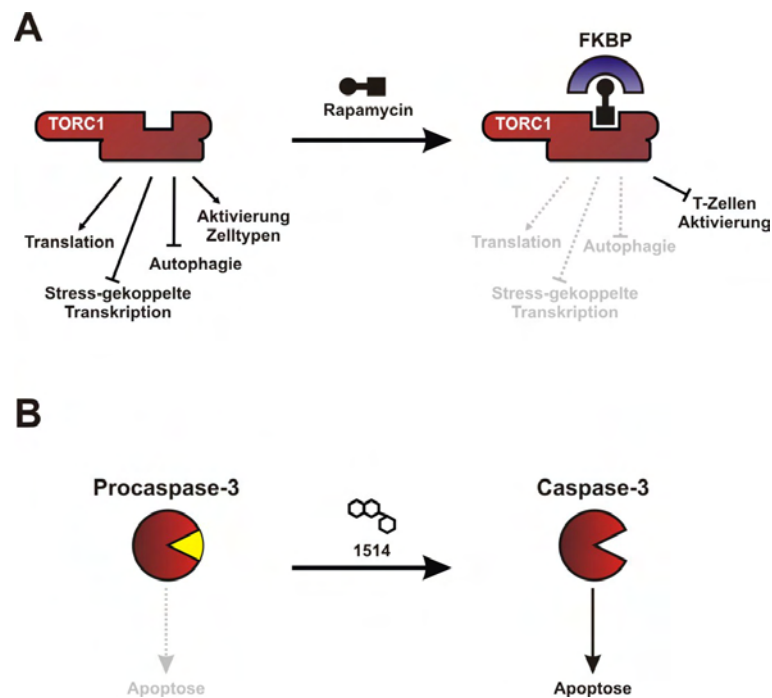
In diesem Teil werden sowohl proteinspezifische als auch generell anwendbare Formen der Proteinfunktionskontrolle vorgestellt. Der Schwerpunkt soll hierbei auf allgemeinen Techniken und Ansätzen liegen, die relevant für das Verständnis dieser Arbeit sind.

### **1.4.1 Die direkte Aktivierung & Inaktivierung von Proteinen mit Hilfe von „small molecules“**

Der direkteste Ansatz, um Proteine in ihrer Funktion und Aktivität zu beeinflussen, beruht auf der Verwendung von niedermolekularen Verbindungen (engl. small molecules). Dieser Ansatz dominiert seit den Theorien von Paul Ehrlichs magischen Kugeln (engl. magic bullets) die therapeutische Entwicklung und ist auch das pragmatische Kriterium der rationalen Medikamentenentwicklung (engl. drug design) [113]. Drei große Probleme treten bei diesem Ansatz auf; das erste ist die Identifikation von neuen Wirkstoffen, die einen Effekt auf das Zielprotein besitzen. Das zweite Problem ist die mögliche Applikation des Wirkstoffs. Ein großes Hindernis ist z.B. Substanzen zu finden oder zu entwickeln, welche die Barriere der Zellmembran in einer geringen Konzentration überwinden können. Das letzte Problem sind ungewollte (engl. off target) Effekte, die entweder von zu geringer Spezifität der eingesetzten Moleküle herrühren oder durch die Inhibition zusätzlicher Komponenten des Proteininteraktionsnetzwerks, in die das Zielprotein eingebunden ist, ausgelöst werden. So führte eine computerbasierte Untersuchung von fast 4.000 schon bekannten und von der FDA zugelassenen Medikamenten in den USA zur Identifikation von tausenden neuen Assoziationen mit bis dahin unbekanntem Zielproteinen [114]. Von diesen wurden 30 auf Interaktionen getestet, unter ihnen so prominente und weit verbreitete Medikamente wie Prozac. Dabei zeigten 23 eine Medikament-Ziel-Wechselwirkung und fünf davon sogar potente Interaktion (<100 nM). Inzwischen ist klar, dass sowohl die auf genetischer Ebene als auch Proteinebene stattfindenden Interaktionen in eukaryotischen Zellen hochkomplex sind und eindimensionale Signalwege eher eine Seltenheit darstellen [115]. Solche Verzweigungen und Interaktionen der Signalwege erschweren natürlich die Entwicklung spezifischer Medikamente immens.

Hier soll anhand von zwei Beispielen, einem Inhibierungs- und Aktivierungsbeispiel, die Komplexität und Schwierigkeiten bei der Verwendung von „small molecules“ zur Proteinfunktionskontrolle verdeutlicht werden.

Beim ersten Beispiel handelt es sich um Rapamycin, welches das sogenannte „target of rapamycin“ (TOR), eine Serine/Threonin Proteinkinase und einen zentralen Regulator verschiedenster Wachstumssignalwege in Eukaryoten inhibiert [116]. In der Medizin wird Rapamycin vor allen Dingen als Immunsuppressivum eingesetzt, da die Inhibierung von menschlichem TOR (mTOR) auf verschiedenen Stufen die Signaltransduktionswege zur T-Zellen Aktivierung unterbricht [117] (Abbildung 13 A).



**Abbildung 13. Proteinfunktionskontrolle mittels „small molecules“**

Schematische Darstellung der Auswirkungen von A) Rapamycin induzierter TOR-Komplex 1 (TORC1) Inhibition und von B) der aktivierenden Wirkung von Verbindung 1514 auf die Procaspase-3. (FKBP = FK506-Bindeprotein, eine Prolylisomerase).

Ein anderer Effekt von Rapamycin, der in den letzten Jahren Aufsehen erregte, ist die Verlängerung der Lebenszeit. So konnte Rapamycin zur einer erhöhten Lebenspanne unter Laborbedingungen von sowohl Hefen, Würmern, Fliegen und sogar Nagetieren [118] führen. Dieser Effekt rührt daher, dass die Inhibition von TOR mit dem Auftreten von Hungerbedingungen im lebenden Organismus gleichzusetzen ist und sich eine gewisse Nahrungsrestriktion grundsätzlich positiv auf die Lebenserwartung von Lebewesen auswirkt [119]. Allerdings ist fraglich, ob Rapamycin jemals beim Menschen zu Lebensverlängerung genutzt werden kann, da es, wie bereits erwähnt, als Immunsuppressivum wirkt.

Die gezielte Aktivierung eines Enzyms oder Proteins ist noch schwieriger als dessen Inaktivierung, da es weniger aktive Konformationen eines Proteins gibt als inaktive. Das „small molecule“ muss also das Enzym durch seine Bindung spezifisch in dessen aktiver Konformation stabilisieren. Ein Beispiel dieser Art ist der von Wolan *et al.* identifizierte Procaspase-3-und-6-Aktivator [120]. Caspasen sind Cysteinproteasen und zentrale Elemente des Apoptosemechanismus (programmierter Zelltod) und liegen als inaktive Procaspasen in den Zellen vor. Als Folge bestimmter intrinsischer oder extrinsischer Stimuli, wie z.B. DNA-Schäden, wird der Apoptose-Signalweg eingeleitet und im finalen Schritt findet die Autoprozessierung der „Henker“-Caspasen (3,6 und 7) durch Abspalten einer Prodomäne statt, was zu ihrer Aktivierung und dem Zelltod führt. Das von Wolan *et al.* durch einen

Screen identifizierte Molekül 1514 aktiviert spezifisch Procaspasen 3 und 6 (Abbildung 13 B). Die Theorie der Autoren besagt, dass die Caspasen auch ohne Stimulus in unterschiedlichen Zuständen vorliegen. Das Gleichgewicht dieser Zustände, aktiv und inaktiv, ist unter Normalbedingungen zur inaktiven Form hin verschoben. Das identifizierte kleine Molekül soll nun das Gleichgewicht zur aktiven Form hin verschieben, die zur Autoprocessing der Caspasen führt und darauffolgend die Caspase-Aktivierungskaskade auslöst.

### 1.4.2 Lokalisationskontrolle von Proteinen

Für Organismen ist nicht nur die Aktivität von Proteinen von immenser Bedeutung, sondern auch ihre Lokalisation. Schon Bakterienzellen besitzen eine organisierte interne Struktur, wobei die spezifische Lokalisation von Proteinkomplexen und allen an der Teilungsmaschinerie beteiligten Proteinen eine besonders große Rolle spielt. Bei *Caulobacter crescentus*, einem Bakterium mit spezifischen Zellzyklus und Zelldifferenzierung, wurde festgestellt, dass mindestens 10 % der vorausgesagten Proteine eine spezifische subzelluläre Lokalisation besitzen [121]. Je höher die Entwicklungsstufe von Organismen ist, desto komplexer ist auch ihre subzelluläre Organisation. GFP-Markierungsexperimente des gesamten Proteoms im einzelligen Eukaryoten *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass mindestens 30 % aller Proteine in subzellulären Regionen lokalisieren und davon ca. 20 % im Nucleus [122]. Alleine diese Daten verdeutlichen die Wichtigkeit der Proteinlokalisierung und ihren Einfluss auf die Proteinaktivität.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Lokalisation von Proteinen in Eukaryoten zu kontrollieren, wobei eine Beschränkung auf das in dieser Arbeit verwendete Heterodimerisierungssystem FKBP12/FRB/Rapamycin stattfinden wird. Wie im vorherigen Kapitel schon beschrieben, ist Rapamycin ein „small molecule“, das durch spezifische Bindung an die TOR-Kinase Wachstumsprozesse in der Zelle inhibiert (Abbildung 13 A). Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Bildung dieses inhibitorischen Komplexes noch einen dritten Bindepartner, das FK506-Bindeprotein (FKBP), einschließt. Bei FKBP handelt es sich um eine endogene Prolylisomerase, die eine Funktion als Chaperon begleitet. Im ersten Schritt dringt der zweizählige Ligand Rapamycin über die Zellmembran ein und bildet mit monomerem FKBP einen Komplex. Der zweite Schritt besteht aus der Bindung dieses Komplexes an FRB (FKBP12-Rapamycin-Bindedomäne), die einen Teil der TOR-Kinase darstellt [123, 124]. Aus diesem Prozess wird der größte Nachteil des Dimerisierungssystems offensichtlich: Sobald Rapamycin in lebende Zellen eindringt, wird der zentrale



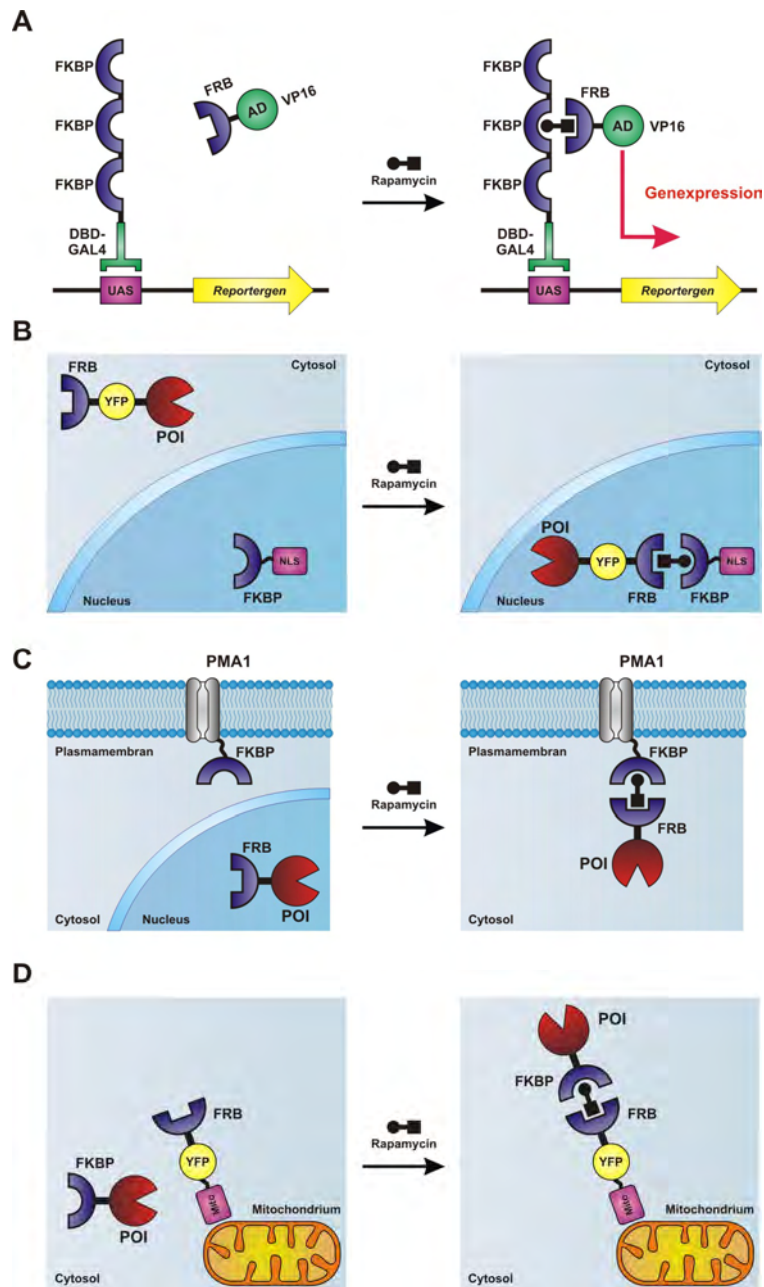
Wachstumsregulator TOR gestört, was zum Wachstumsarrest oder Hungereffekten führen kann. Eine Möglichkeit diese Effekte zu umgehen ist die Mutation der Bindestelle des FKBP12/Rapamycin-Komplexes in FRB. In Hefen konnte auf diese Weise in einem genetischen Screen Mutationen in den Genen der TOR-Kinasen identifiziert werden, welche die negativen Auswirkungen auf das Wachstum aufheben [125, 126]. Eine andere Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung von nichttoxischen Rapamycin Analoga, denen die Bindestelle für endogenes FRB fehlt [127, 128].

Das FKBP/FRB-Dimerisierungssystem findet häufig Verwendung zur Proteinfunktionskontrolle, indem es dazu verwendet wird, Hybridproteine dosisabhängig zu dimerisieren. Die hier vorgestellten Kontrollmöglichkeiten der Lokalisation sollen sowohl die ursprünglichen Experimente als auch neu entwickelte generelle Methoden zur Beeinflussung von Zielproteinen beinhalten.

Schon kurz nach seiner Entdeckung wurde das Potential des ligandenabhängigen Dimerisierungssystems erkannt und ausgenutzt. So wurde FKBP/FRB unter anderem dazu benutzt, die Transkription zu aktivieren [129-131], einzelne Proteine spezifisch an die Plasmamembran von Zellen zu lokalisieren [129] oder aber Oberflächenrezeptoren zu aktivieren [132]. Die erste Art der Proteinfunktionskontrolle durch Rapamycin war die gezielte Induktion der Genexpression in Säugerzellen durch die Fusion einer DNA-Bindedomäne mit FKBP und FRB mit einer Aktivierungsdomäne [128, 130, 131] (Abbildung 14 A).

Durch die Erkenntnisse über die Wichtigkeit der Lokalisation von Proteinen und ihrem Beitrag zur Proteinaktivität, wurden auch mehrere Systeme entwickelt, um Zielproteine durch Fehllokalisierung zu inaktivieren und damit konditionale funktionslose Mutanten zu erzeugen. Diese Systeme erlauben somit auch die Untersuchung von essentiellen Genen, die für klassische genetische Ansätze wegen ihren letalen Phänotypen unzugänglich sind. Der andere große Vorteil der auf Rapamycin basierenden Systeme ist die äußerst schnelle Reaktionszeit. Die Dimerisierung kann, abhängig vom Organismus und den unterschiedlichen Fusionsproteinen, innerhalb einiger Minuten oder sogar Sekunden vollständig stattgefunden haben. Der Ansatz von Geda *et al.* basiert darauf, markierte Zielproteine entweder in den Nucleus von Hefen hinein oder aus ihm heraus zu fehllokalisieren (Abbildung 14 B) [133]. Ein dazu komplementäres System wurde gleichzeitig von Haruki *et al.* entwickelt und erlaubt eine Lokalisation von Zielproteinen entweder an die Plasmamembran (Abbildung 14 C) oder an ein ribosomales Protein, was zur Depletion des Nucleus führt [134]. Das System von Robinson *et al.* funktioniert dagegen in Säugerzellen und inaktiviert Fusionsproteine durch

deren Lokalisation an Mitochondrien (Abbildung 14 D) [135]. Die unterschiedlichen Hefesysteme ermöglichen es, neue Zielproteine auf unterschiedliche Weise und abhängig von ihrem Wirkungsort zu lokalisieren, wenn z.B. ein effizienter Nucleus-Im- und -Export des Zielproteins nicht möglich ist.



**Abbildung 14. Rapamycin induzierte Fehllokalisierung von Zielproteinen**

A) Schematische Darstellung wie Rapamycin dazu verwendet werden kann, eine DNA-Bindedomäne (DBD) und eine Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe zu bringen und damit die Genexpression in Säugerzellen anzuschalten [128]. B) Rapamycin basierte Fehllokalisierung von einem Zielprotein (POI) in den Nucleus einer Hefezelle mit Hilfe eines Fusionsproteins bestehend aus FKBP mit einer nuklearen Lokalisierungssequenz (NLS). C) Der von Haruki *et al.* entwickelte Ansatz zur Depletion des Nucleus von Zielproteinen (POI) basierend auf der Kolokalisation des POI an die membranständige H<sup>+</sup> ATPase (PMA1). D) Die Umorientierung von Zielproteinen (POI) an die Mitochondrien durch die Komplexbildung mit einem Partner, der das Importsignal eines äußeren Mitochondrienmembranproteins aus Hefe Tom70p (Mito) trägt. (gelb-fluoreszierendes Protein (YFP))

Ein grundsätzliches Problem aller Lokalisationsansätze stellt die Fusion mit einem Teil des Dimerisierungssystem dar, die das Zielprotein in seiner natürlichen Aktivität beeinflussen kann. Auch führt die Fusion des schaltbaren Systems mit dem Zielprotein auf molekularer Ebene in einigen Fällen zu Fehlfaltungseffekten. Darüber hinaus kann der induzierende Stimulus für die Dimerisierung, z.B. das „small molecule“, die Zelle anderweitig beeinflussen und muss damit auch bei der Evaluierung des Experiments in Betracht gezogen werden.

Ansätze dieser Art werden in Bezug auf die Systembiologie wegen ihrer extrem schnellen Reaktionszeit an Bedeutung gewinnen, da sie es ermöglichen zelluläre Prozesse im Sekundenmaßstab zu beeinflussen. Vor allen Dingen in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie ergeben sich viele Möglichkeiten, komplexe Signalnetzwerke genauer zu studieren und charakterisieren.

### 1.4.3 Kontrolle der Degradation von Proteinen

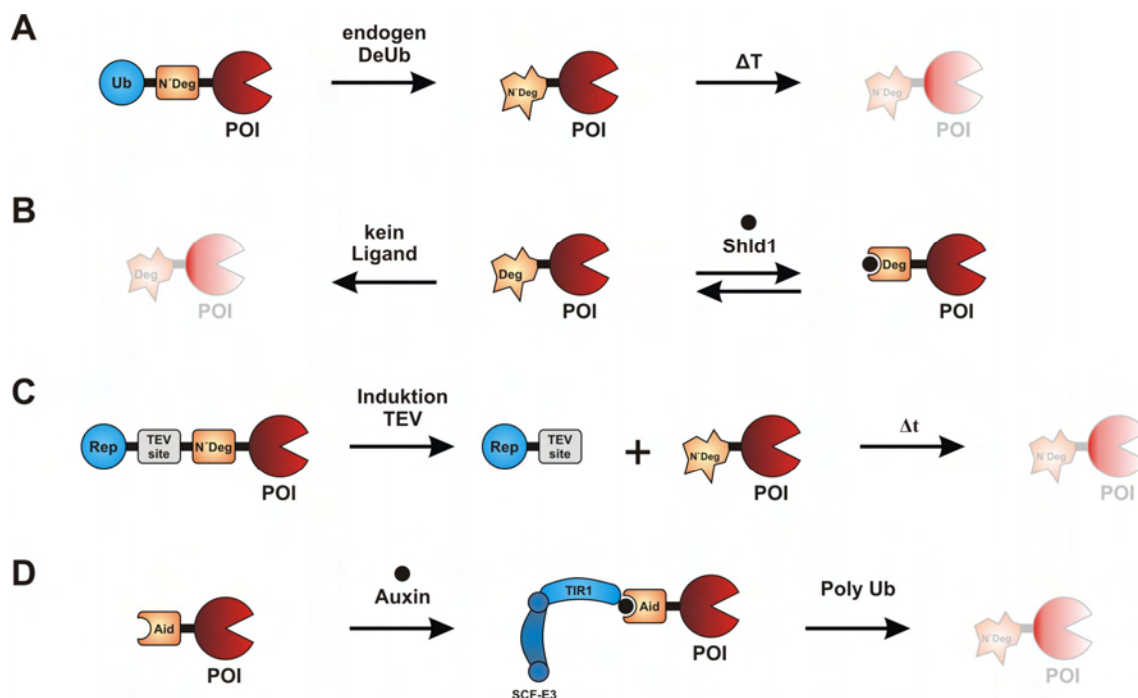
Die selektive Degradation der meisten instabilen Proteine in eukaryotischen Zellen wird durch das Ubiquitinsystem geregelt. In diesem Signalweg werden Proteine an an ihren Lysinseitenketten mit dem kleinen Protein Ubiquitin kovalent modifiziert, was die selektive Degradation durch das Proteasom bewirkt [136].

Ein spezifischer Prozess zur Regulation der *in-vivo*-Lebensdauer von Proteinen in sowohl Prokaryoten [137] und Eukaryoten [138, 139] wird durch die N-terminale Aminosäure eines Proteins eingeleitet. Dieser Prozess wird auch als „N-end rule“ bezeichnet. So führt z.B. ein Arginin am N-Terminus eines Proteins in Hefe innerhalb von wenigen Minuten zu einer effizienten Ubiquitin-vermittelten Degradation des Proteins. Ein weiterer Kontrollmechanismen beruht anscheinend auf dem N-terminalen Acetylierungszustand von Proteinen in Eukaryoten, der abhängig von der acetylierten N-terminalen Aminosäure, wie z.B. Met, die Lebensdauer von Proteinen verkürzt [140].

Die induzierte Degradation findet als Ansatz zur Proteinfunktionskontrolle weite Verbreitung, da sie ein Zielprotein aktiv und teilweise sogar dosisabhängig aus der Zelle entfernt. Der Vorteil sind die grundsätzlich schnelleren Reaktionszeiten als bei Methoden, die auf Transkriptions- oder Translationsinhibition abzielen und sich auf den natürlichen Abbau der Restproteine aus der Zelle verlassen. Da die N-terminale Aminosäure einen so profunden Einfluss auf die Stabilität des Zielproteins hat, wurde ihre Freilegung in verschiedenen Ansätzen dazu ausgenutzt, ein Protein zu destabilisieren. Proteine oder kleine Proteindomänen, die fusionierte Zielproteine in ihrer Stabilität beeinflussen, werden als

Degron bezeichnet und in vielen Ansätzen der Degradationskontrolle verwendet. Bei den hier vorgestellten Beispielen soll der Focus auf generellen Ansätzen zur konditionalen Degradation von Zielproteinen in Eukaryoten liegen.

Der erste Ansatz, um ein übertragbares konditionales Degron in Hefe zu entwickeln, wurde mit Hilfe eines temperatursensitiven N-terminalen Degrons erreicht. Durch die Fusion von Ubiquitin (Ub) vor eine destabilisierende Aminosäure der Dihydrofolatreduktase (DHFR), kann diese effizient durch endogene Deubiquitinasen, die Ub abspalten, freilegt werden. In einem genetischen Screen wurde ein temperatursensitives Allel (DHFR<sup>TS</sup>) identifiziert, das es erlaubt, fusionierte Zielproteine bei 23 °C zu stabilisieren und bei 37 °C zu degradieren. (Abbildung 15 A) [141].



**Abbildung 15. Konditionale Degradation**

Schematische Darstellung verschiedener konditionaler Degradationsmethoden. A) Kontrolle der Degradation von Zielproteinen (POI) aus Hefe mittels eines temperatursensitiven N-terminalen Degrons, einer Variante der Dihydrofolatreduktase (N'Deg). (Ub = Ubiquitin, DeUb = Deubiquitinasen) B) Banaszynski *et al.* konditionaler und reversibler Ansatz zur Kontrolle der Proteinestabilität in Säugerzellen: Die Zugabe von Shld1 führt zur Stabilisierung des Fusionsproteins, bestehend aus der FKBP\*-Degradationsdomäne (Deg) und dem POI. C) Die effiziente Freilegung eines N-terminalen Degrons (N'Deg) durch die TEV-Protease in Hefe, was im Abbau des POIs resultiert. (Reporter = Rep) D) Die in verschiedenen nicht-pflanzlichen Organismen funktionierende Auxin-vermittelte Degradation: Nach der Bindung von Auxin an das Auxin-induzierte-Degron (Aid) können die Proteine „transport inhibitor response 1“ (TIR1) und eine SCF-E3-Ubiquitin-Ligase rekrutiert werden. Dies leitet letztendlich die Polyubiquitinierung ein und degradiert das POI.

Die von Banaszynski *et al.* entwickelte Methode ermöglicht eine schnelle und reversible Kontrolle der Stabilität von Zielproteinen in Säugerzellen. Dies gelingt mit der

Verwendung eines zellpermeablen „small molecule“ Shld1, das spezifisch ein übertragbares Degron stabilisiert. Dieses Degron stammt aus einem zellbasierenden Screen, um N-terminale Fusionen von humanen FKBP12 in eine destabilisierende Domäne (FKBP\*) umzuwandeln (Abbildung 15 B). Dieses System zeigt eine extreme Dosisabhängigkeit von Shld1 und reagierte durch messbare Stabilisierung oder Destabilisierung von fluoreszenten Testproteinen innerhalb einiger Stunden [142]. Inzwischen konnte sogar die Anwendbarkeit des Systems in lebenden Mäusen aufgezeigt werden [143].

Der Ansatz von Taxis *et al.* beruht auf der konditionalen Proteindegradation durch die Entschützung eines übertragbaren N-terminalen Degrons in Hefe. Die Entschützung erfolgt mit einer optimierten Protease des Tabakätzvirus (engl. Tobacco Etch Virus, TEV), deren Genexpression selektiv durch Galactose induziert werden kann. Eine zusätzliche Affinitätssteigerung vom Zielfusionsprotein und der TEV-Protease wurde durch den Einbau miteinander interagierender Spleißosom-Komponenten erreicht. Gleichzeitig mit der Fusion des Degrons an das Zielprotein erfolgte noch die Einführung eines N-terminalen fluoreszenten Reporterproteins, das es ermöglichte, seine Spaltung zu beobachten. (Abbildung 15 C). Die Proteininaktivierung an sich war innerhalb von drei Stunden vollständig abgelaufen und konnte zur Erzeugung von konditionalen Mutanten essentieller Zellzyklusproteine benutzt werden [144].

Von Nishimura *et al.* wurde ein Degradationssystem entwickelt, das auf einem einzigartigen Signalweg von Pflanzen beruht. In *Arabidopsis thaliana* ist das Phytohormon Auxin direkt an der schnellen Degradation von Auxin-Transkriptions-Repressoren (AUX) beteiligt. Dies geschieht mit Hilfe vom „transport inhibitor response 1“-Protein (TIR1), indem ein Komplex gebildet wird, der eine Interaktion mit den SCF-E3-Ubiquitin-Ligasen ermöglicht. Diese SCF-E3-Ubiquitin-Ligasen rekrutieren E2-Ligasen, was zur Polyubiquitinierung und dem Abbau des Repressors durch das Proteasom führt. Da anderen Eukaryoten zwar die Auxinantwort fehlt, sie aber den SCF-Degradationsweg besitzen, war es möglich ein Auxin-induziertes-Degron (Aid) zu generieren. Dazu wurde IAA17 (ein AUX) als Degron verwendet und mit Zielproteinen fusioniert, während *TIR1* heterolog in den Zellen koexprimiert wurde. Nach der Expression und Zugabe von Auxin bildet sich der Komplex mit einigen zusätzlichen *A. thaliana*-homologen Proteinen und die Degradation findet statt (Abbildung 15 D). Diese Methode ermöglicht eine Degradation von Zielproteinen innerhalb einer Stunde und funktionierte in Hefen, Vogelzellen und verschiedenen Säugerzelllinien [145].

Die Nachteile all dieser Systeme zur konditionalen Degradation sind grundsätzlich die gleichen wie bei der Lokalisationskontrolle. Zum einen gibt es Effekte, die von der Fusion des Degradationssystems mit einem neuen Zielprotein herrühren. Die Fusion des Degrons mit dem Zielprotein kann dieses möglicherweise in seiner natürlichen Funktion beeinträchtigen, die eigentlich untersucht werden soll. Allerdings kann auch noch zu viel Hintergrundaktivität des Zielproteins zurückbleiben, weil die Stärke des Degrons nicht ausreicht, um diese komplett zu inaktivieren. Andere nachteilige Effekte beruhen oft auf dem induzierenden Stimulus, der lebende Systeme beeinflussen oder sogar toxische Effekte haben kann.

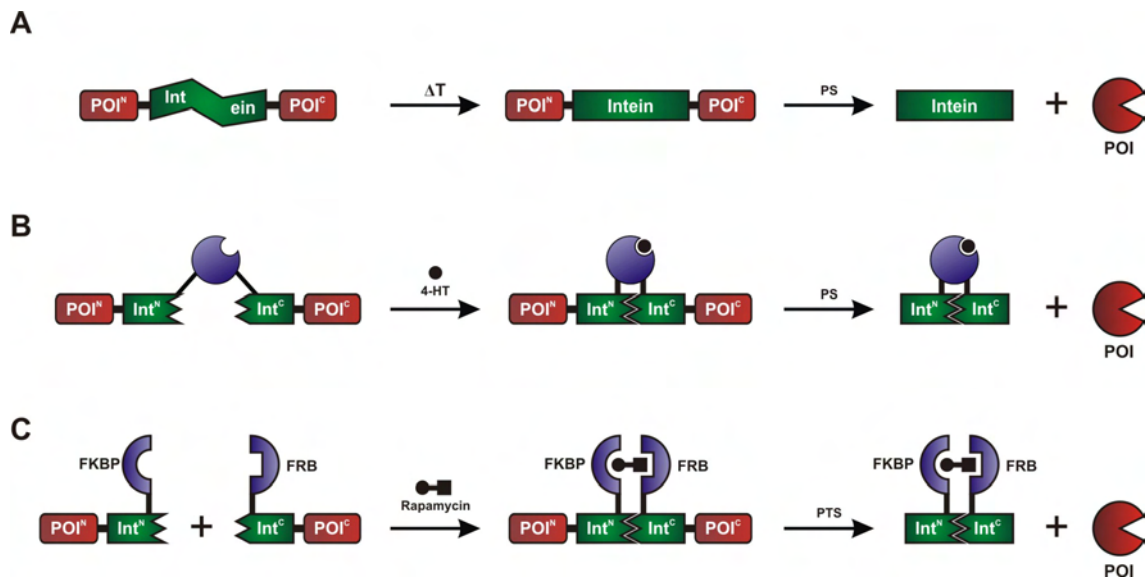
### 1.4.4 Inteinassozierte Proteinfunktionskontrolle

Neben den in Kapitel 1.1.4 besprochenen Anwendungen von Inteinen können sie auch für die Proteinfunktionskontrolle verwendet werden. Erneut sind die theoretisch schnelleren Antwortraten der potentielle Hauptvorteil dieser auf Proteinebene stattfindenden Kontrollmöglichkeit.

Eine der klassischen Formen der Proteinfunktionskontrolle konnte ebenfalls erfolgreich bei Inteinen angewendet werden: Die Erzeugung von temperatursensitiven (ts) Mutanten durch Mutagenese und genetische Screens [146-148]. Sie können dazu benutzt werden, Zielproteine bei einer permissiven Temperatur durch Protein-*trans*-Spleißen zu erzeugen und ihre konditionale Degradation bei einer Temperaturveränderung einzuleiten (Abbildung 16 A). Die Inteine sind also steuerbar, wenngleich, wie fast alle ts-Proteine, innerhalb von Stunden oder Tagen. Ihr größter Nachteil ist die sehr schlechte Übertragbarkeit von identifizierten ts-Inteinen, da ihre Entwicklung nach der *cis*-Insertion des Inteins in ein Zielprotein stattfand und sie an diesen speziellen Exteinkontext adaptiert sind. Auch können sie natürlich nur in Organismen Verwendung finden, die solche Temperaturveränderungen tolerieren, z.B. *E. coli* [146], *S. cerevisiae* [147, 148] und *Drosophila melanogaster* [148].

Die nächste Form der Kontrollmöglichkeit ist die Kopplung von Inteinen mit dem „small molecule“-Ansatz. So konnte durch die *cis*-Insertion einer Bindungsdomäne für einen Liganden ein schaltbares Intein erzeugt werden. Die Insertion führt in diesem Fall zur Inaktivierung des Inteins und nur durch Zugabe des Liganden ändert es seine Konformation, was die Aktivität des Inteins wiederherstellt. Es wurden unabhängig voneinander zwei Systeme entwickelt, die beide das *Mycobacterium tuberculosis* RecA-Intein verwenden, eines mittels rationalen Proteindesigns in *E. coli* [149] und das zweite durch einen mehrere Runden umspannenden Selektionsprozess in *S. cerevisiae* [150]. Das von Buskirk *et al.* entwickelte System verwendet als Insertion in das Intein die Liganden-Bindungsdomäne des

menschlichen Östrogenrezeptors, zu dessen Konformationsänderung die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) genutzt werden kann (Abbildung 16 B). In einer Weiterentwicklung dieses Ansatzes schafften es die Autoren um Yuen die Spleißreaktion sowohl von GFP als auch von zwei Transkriptionsfaktoren Gli1 und Gli3 in Säugerzellen zu kontrollieren [151]. Das größte Problem dieser *cis*-Kontrollansätze stellt nicht nur das Auffinden einer verwendbaren Insertionsstelle in neuen Zielproteinen, sondern auch die unerlässliche Optimierungsarbeit für jedes Intein in einem neuen Exteinkontext dar.



**Abbildung 16. Kontrolliertes Proteinspleißen**

A) Die Proteinfunktionskontrolle über temperatursensitive (ts) Inteine erlaubt nur bei einer permissiven Temperatur die Erzeugung des aktiven Zielproteins (POI). B) Die Insertion der Liganden-Bindungsdomäne des menschlichen Östrogenrezeptors in ein Intein ermöglicht dessen Kontrolle über 4-Hydroxytamoxifen (4-HT). C) Das konditionale Proteinspleißen beginnt mit der Spaltung eines POI in zwei Hälften, die dadurch keine natürliche Affinität zueinander besitzen. Nur wenn die Zugabe von Rapamycin erfolgt, werden die Hälften durch das Dimerisierungssystem (FKBP/FRB) in räumliche Nähe gebracht, die Inteinaktivität rekonstituiert und die Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) ermöglicht. (PS = Proteinspleißen)

Ein anderer genereller Ansatz zur konditionalen Proteinfunktionskontrolle, der auch das FKBP/FRB/Rapamycin-System verwendet (Kapitel 1.4.2), ist das sogenannte konditionale Proteinspleißen (engl. conditional protein splicing, CPS) [48]. Am Beginn der Methode steht die funktionale Inaktivierung des Zielproteins durch dessen Spaltung und die Fusion der entstandenen Fragmente mit den korrespondierenden Hälften des gespaltenen *Sce* VMA-Inteins sowie des Dimerisierungssystems. Es ist von enormer Bedeutung, dass die resultierenden Vorläufermoleküle keine natürliche Affinität mehr zueinander aufweisen und damit keine ungewollte und unregulierbare Protein-*trans*-Spleißreaktion stattfinden kann. Die Zugabe von Rapamycin führt dann zu der Bildung des FKBP/FRB/Rapamycin-Komplexes und bringt dabei die Inteinhälften in räumliche Nähe zueinander, was ihre Aktivität

rekonstituiert. Bei der nun ablaufenden Protein-*trans*-Spleißreaktion wird das aktive Zielprotein gebildet (Abbildung 16 C). Anfänglich konnte diese Methode erfolgreich auf Modellproteine *in vitro* [48] und *in vivo* in Säugerzellen [152] angewendet werden. Außerdem sind inzwischen auf diese Weise aktive Enzyme in lebenden Tauflieden generiert worden [153]. Der Aufwand, der aufgebracht werden muss, um aktive Insertionspositionen in neuen Zielproteinen zu identifizieren, die ihre konditionale Kontrolle erlauben, ist ein Hauptnachteil, welcher der breiten Anwendung dieses Systems im Wege steht.

Ferner existiert noch ein weiterer Ansatz, der die Inaktivität der gespaltenen *Sc* VMA-Inteinhälften ausnutzt. Diese Methode verwendet ein rekombinant exprimiertes Dimerisierungssystem von Phytochromrezeptoren aus *A. thaliana*, die eine lichtabhängige PTS-Reaktion in *S. cerevisiae* erlaubt [154].

## 1.5 Aufgabenstellung

Gespaltene Inteine haben sich zu einem weit verbreiteten Werkzeug mit verschiedenen Anwendungen in der Biochemie und Chemischen Biologie entwickelt. Das größte Problem, das bei ihren *in-vivo*- und *in-vitro*-Anwendungen auf neue Zielproteine auftritt, ist die Identifikation von geeigneten Insertionsstellen. Bis heute ist es nicht genau vorhersagbar, ob eine Insertionsstelle an einer bestimmten Position im Zielprotein zum effizienten Abläufen der Proteinspleißreaktion der resultierenden Inteinhälften führt oder nicht. Unter Umständen ist deshalb sehr viel Arbeitsaufwand nötig, um eine optimale Insertionsstelle für ein Intein mit den notwendigen Anpassungen der angrenzenden Aminosäuren in den Exteinregionen zu identifizieren. Gleichzeitig darf das Zielprotein nach dem Abläufen der Protein-*trans*-Spleißreaktion nicht zu stark durch die eingeführten Mutationen in seiner natürlichen Aktivität beeinträchtigt sein.

In dieser Arbeit sollte das Problem der Insertionsstellenidentifikation durch zwei verschiedene Arten von Inteinkassetten angegangen werden. Erstens sollte eine während meiner Diplomarbeit entwickelte konditionale gespaltene Inteinkassette genutzt werden, um parallel verschiedene Positionen in einer Protease auf ihre Spleißaktivität zu untersuchen. Die durch die Fusion mit den Inteinhälften und dem FKBP/FRB-Dimerisierungssystem entstehende schaltbare Protease sollte dann gezielt für die *in-vivo*-Proteinfunktionskontrolle einsetzbar sein.

In einem zweiten Projekt sollten flexible, gespaltene Inteinkassetten entwickelt werden, welche die Anwendung von gespaltenen Inteinen auf neue Zielproteine signifikant vereinfachen. Im Detail sollte eine gleichzeitige und parallele Untersuchung verschiedener



Inteine und unterschiedlicher flankierender Aminosäuren an einer beliebigen Insertionsstelle im Zielprotein mit geringem zeitlichen und experimentellen Aufwand ermöglicht werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräteliste

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
-80 °C Gefrierschrank	<i>New Brunswick Scientific</i> ultra low temperature freezer
-152 °C Tiefkühltruhe	<i>SANYO</i> Ultra-low Temperature Freezer MDF-1156
Agarose-Gelelektrophoresekammer	<i>PEQLAB</i> Perfect Blue Gelsystem M und L
Analysenwaagen	<i>Mettler</i> PM400 <i>Sartorius</i> Basic
Autoklav	<i>H+P Labortechnik</i> Varioklav 135 S
Chromatographiesystem	<i>GE Healthcare</i> ÄKTA prime plus
CO <sub>2</sub> -Inkubator	<i>Thermo Scientific Heraeus</i> Heracell 150
Dokumentation von DNA-Agarosegelen und SDS-PAGE Gelen	<i>Canon</i> PowerShot G5
Elektroporator	<i>Bio-Rad</i> MicroPulser
Emulsifier	<i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5
Heizblock	<i>Eppendorf</i> ThermoStat plus <i>Eppendorf</i> Thermomixer comfort
Horizontal-Schüttelgerät	<i>Heidolph</i> Promax 1020
Inkubations-Schrank	<i>Memmert</i> INE 800
Inkubations-Schüttler	<i>Infors HT</i> Aerotron <i>New Brunswick Scientific</i> I26, TC-7
Mikroskope	<i>Olympus</i> IX-81 <i>Leica</i> TCS SP5
PCR-Gerät	<i>Biometra</i> TPersonal Combi
pH-Meter	<i>HANNA instruments</i> pH211
Pipetten	<i>Eppendorf</i> Reference
Reinstwasser Anlage	<i>Millipore</i> Milli-Q
Scanner	<i>Cannon</i> CanoScan 8400F
SDS-PAGE Apparatur	<i>BioRad</i> Mini-PROTEAN 3 Cell <i>BioRad</i> PowerPac Basic Netzgerät

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
Sicherheitswerkbank	<i>Nuair</i> NU 440-500E
UV-Schirm	<i>H. Saur</i> Transilluminator IL-200M
UV/VIS - Spektrophotometer	<i>GE Healthcare</i> Ultrospec 3100 <i>pro</i> <i>Varian Cary</i> 100 Bio
Vortexer	<i>LMS</i> VTX 300
Wasserbad	<i>P-D Industriegesellschaft</i> WB20
Western-Blot-Apparatur	<i>BioRad</i> Mini Trans-Blot Cell
Zelldichte Messgerät	<i>GE Healthcare</i> Ultrospec 10
Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415 D <i>Eppendorf</i> Centrifuge 5804 R <i>Sorvall</i> Evolution

## 2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die in der nachfolgenden Tabelle nicht gesondert aufgelistet sind, wurden von den Firmen *AppliChem* (Darmstadt), *Carl Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma-Aldrich* (St. Louis, USA) in p.a. Qualität bezogen. Der Großteil der Verbrauchsmaterialien wurde von der Firma *Sarstedt* bezogen (Nümbrecht).

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien**

Hersteller	Produkt(e)
<i>Agilent Technologies</i> (Santa Clara, USA)	PfuUltra II Fusion HotStart DNA-Polymerase
<i>AppliChem GmbH</i> (Darmstadt)	Glycin, IPTG, Tris
<i>Ariad Pharmaceuticals</i> (Massachusetts, USA)	AP23102
<i>Becton, Dickinson and Company</i> (New Jersey, USA)	Bacto™ Agar, Bacto™ Peptone, Hefeextrakt, Hefe Stickstoff Basis (ohne Aminosäuren & Ammoniumsulfat)
<i>Biolegio</i> (Nijmegen, Niederlande)	Oligo-Nukleotide
<i>Carl Roth</i> (Karlsruhe)	Acrylamid-Lsg. für SDS-PAGE, Agar Nr. 1, Ampicillin, APS, L-Arabinose, Brom- phenolblau, BSA, Concanavalin A, Coomassie Brilliant Blue R 250, Chloramphenicol, DMSO, Ethanol, Ethidium- bromid, Glucose, $\beta$ -Mercaptoethanol, Milch- pulver, SDS, TCA, TEMED, Triton X-100, Tween-20, Visking-Dialysierschlauch

Hersteller	Produkt(e)
<i>Covance</i> (Princeton, USA)	Anti-GFP Antikörper (für Säugerzellen), Anti-HA Antikörper
<i>Eurogentech</i> (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Eurofins MWG Operon</i> (Ebersberg)	Oligo-Nukleotide
<i>Fermentas</i> (Burlington, Canada)	CIAP, Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), Dithiothreitol, DNA- und Protein-Marker, DTT, T4-DNA-Ligase, Restriktionsendonukleasen
<i>Finnzymes</i> (Espoo, Finnland)	Phusion™ DNA Polymerase
<i>GE Healthcare</i> (Little Chalfont, Großbritannien)	ECL & ECL Advance Western Blotting Detektionsreagenzien, Hyperfilm™ ECL, Whatman GB005 Blotting Papier
<i>IBA</i> (Göttingen)	Strep-Tactin Sepharose, Desthiobiotin
<i>Life Technologies</i> (Carlsbad, USA)	PBS-Puffer
<i>MatTek Corporation</i> (Ashland, USA)	35-mm-Glasboden-Schälchen
<i>Merck KGaA</i> (Darmstadt)	KOD Hot Start DNA-Polymerase
<i>Millipore</i> (Billerica, USA)	Sterilfilter (45 nm)
<i>New England Biolabs</i> (Ipswich, USA)	Anti-MBP Antikörper, Restriktionsendonukleasen
<i>PAN Biotech GmbH</i> (Aidenbach)	Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur
<i>PKC Pharmaceuticals</i> (Massachusetts, USA)	Rapamycin
<i>Qiagen</i> (Hilden)	QIAquick PCR-Purification & Gel-Extraction Kit, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Superflow, Penta-His Antikörper
<i>Roche Applied Science</i> (Penzberg)	Anti-GFP Antikörper (für Hefe)
<i>Santa Cruz Biotechnology</i> (Santa Cruz, USA)	Anti-Actin Antikörper
<i>Sigma-Aldrich</i> (St. Louis, USA)	5-Aminolävulinsäure, Anti-GST Antiserum, DNA-Natrium-Salz aus Lachshoden, EDTA, ONPG, Phenol, Polyethylenglykol 3350, Raffinose

## 2.3 Vektoren

### 2.3.1 pET16b

Der pET16b-Vektor (5711 bp) der Firma *Novagen* verfügt über die Sequenzen für einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag mit anschließender Faktor Xa-Protease Schnittstelle. Die Expression des Zielgens wird durch einen T7-Promotor reguliert und das *lacI<sup>q</sup>*-Gen reprimiert eine Genexpression bis zur Zugabe von IPTG. Außerdem wird dem Plasmid durch das *bla*-Gen eine Ampicillin-Resistenz verliehen und die Vervielfältigung geschieht über den ColE1-Replikationsursprung aus dem pBR322-Plasmid [155].

### 2.3.2 pBAD/His A

Der pBAD/His A (4102 bp) Vektor der Firma *Invitrogen* erlaubt die L-Arabinose abhängige Expression eines Zielgens. Die Kontrolle der Genexpression wird sowohl durch die *araBAD*-Promotorsequenz vor dem 5'-Ende des Zielgens erreicht als auch durch den *araC*-Repressor im Vektorgrundgerüst gewährleistet. Zusätzlich zur Bindung von L-Arabinose an den AraC-Repressor wird für eine maximale Expression des Zielgens der Komplex aus cAMP und dem cAMP-Aktivatorprotein (CAP) benötigt. Die Zugabe von Glucose führt damit zusätzlich, über den Prozess der Katabolitrepression, zur Verringerung einer unerwünschten Transkription des Zielgens. Am 5'-Ende vor der Zielgenesequenz kodiert der Vektor für einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag gefolgt von einer Enterokinase-Schnittstelle. Der Vektor verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch das  $\beta$ -Lactamase-Gen (*bla*) und repliziert sich in *E. coli* durch den ColE1-Replikationsursprung aus dem pBR322-Plasmid.

### 2.3.3 pRSFDuet

Der pRSFDuet Vektor (3829 bp) der Firma *Novagen* wurde zur Koexpression von zwei Zielgenen entwickelt. Er enthält zwei multiple Klonierungsstellen die jeweils vor ihrem 5'-Ende eine T7/*lac* Promotor/Operator Sequenz, sowie eine Ribosomenbindestelle besitzen. Außerdem enthält der Vektor das Kanamycin-Resistenzgen (*kan*), die *lac*-Repressorsequenz und den vom RSF1030-Plasmid abgeleiteten RSF-Replikationsursprung [156]. In dieser Arbeit wurde keine duale Koexpression durchgeführt, sondern der Vektor wurde nur zur Expression eines einzelnen Zielgens verwendet.

### 2.3.4 pTS13

Der pTS13 Vektor (6174 bp) ist der ursprüngliche die CPS-Kassette tragende Vektor [157], aus dem ihre Amplifikation für die Integration in das TEV-Proteasegen erfolgte. Das Grundgerüst von pTS13 stammt aus dem pBluescript II KS(-) Plasmid [158]. Während der Klonierung wurden die Elemente für die Genexpression in *E. coli* deletiert, weshalb das Plasmid nur als Templat für PCR-Reaktionen dienen kann. Die Fusionsgene der CPS-Kassette bestehen aus *N'VMA-FKBP* und *pMET25-FRB-C'VMA-His<sub>6</sub>*. Die Gene werden durch die *HIS3*-Kassette, die aus dem Plasmid pFA6a-HIS3MX6 stammt (Kapitel 2.3.6), räumlich voneinander getrennt. Der Vektor verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch die Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens (*bla*) und repliziert sich in *E. coli* durch den ColE1-Replikationsursprung, der aus dem pBR322-Plasmid stammt.

### 2.3.5 p41X / p42X

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefe-Expressionsvektoren basieren auf den p41X / p42X Shuttlevektoren [159]. In der in sich kohärenten Nomenklatur steht die 1 für einen CEN6/ARSH4-Replikationsursprung und die 2 für den 2-Micron-Replikationsursprung. Um multiple Plasmide miteinander im selben Hefestamm koexprimieren zu können, wurden Plasmide generiert, die verschiedene Auxotrophiemarkergene (X) besitzen (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Verwendete Auxotrophiemarker in den p41X / p42X Plasmiden**

Plasmidname (X)	Markergen
3	<i>HIS3</i>
4	<i>TRP1</i>
5	<i>LEU2</i>
6	<i>URA3</i>

Ebenso existieren verschiedene Versionen der Plasmide in Bezug auf den Promotor, der die Stärke der Expression des Zielgens kontrolliert (Tabelle 6). Teilweise lagen die generierten Plasmide vor oder sie wurden aus den vorhandenen Vektorgrundgerüsten durch deren Kombination erzeugt.

Tabelle 6. Verwendete Promotoren in den p41X / p42X Plasmiden

Promotor	Eigenschaften	Referenz
<i>GAL1</i>	sehr stark, induzierbar	[160]
<i>GPD</i>	sehr stark, konstitutiv	[161]
<i>MET25</i>	schwach, reprimierbar bis auf ein basales Level	[160]
<i>TDH1</i>	stark, konstitutiv	[162]

Als Selektionsmarker für *E. coli* besitzen die p41X / p42X Vektoren das  $\beta$ -Lactamase-Gen (*bla*) und ihrer Amplifikation dient ein pMB1-Replikationsursprung.

### 2.3.6 pFA6a-HIS3MX6

Der pFA6a-HIS3MX6 Vektor (3763 bp) ist ein Shuttle-Vektor, der als Templat für die auf PCR-basierende Gendeletion (engl. PCR-mediated gene disruption) in *S. cerevisiae* konzipiert wurde [163]. Die sich im Vektor befindliche *HIS3*-Kassette kann eine *his3*-Mutation in *S. cerevisiae* komplementieren. Sie besteht aus der Fusion des starken *TEF*-Promotors und *TEF*-Terminators des filamentösen Pilzes *Ashbya gossypii* mit dem *his5*-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe*.

### 2.3.7 pcDNA3

Der pcDNA3 Vektor (5446 bp) der Firma *Invitrogen* ist ein Shuttle-Vektor für die Expression von Zielgenen in Säugerzellen. Nach der Klonierung des Zielgens in die multiple Klonierungsstelle, kann die Expression über den *CMV*-Promotor stattfinden. Das Rinder-Wachstumshormon (engl. bovine growth hormone, BGH) Polyadynyierungssignal am 5'-Ende des Zielgens, sorgt für die notwendige Prozessierung der entstehenden mRNA. Das Vektorgrundgerüst besitzt den SV40-Replikationsursprung, durch dessen synthetisiertes SV40-T-Antigen die Vermehrung in Säugerzellen erlaubt wird. Eine Neomycin-Resistenzkassette erlaubt zusätzlich die stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels G418. Ebenfalls besitzt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen (*bla*), dass in Kombination mit dem ColE1-Replikationsursprung der selektiven Vermehrung in *E. coli* dient.

### 2.3.8 pEGFP-N1 / pmCherry-N1

Der pEGFP-N1 Shuttle-Vektor (4733 bp) der Firma *Clontech* wurde zur Expression von „enhanced GFP“ (eGFP) Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen verwendet. Bei dem eGFP-Fluorophor handelt es sich um eine in den roten Fluoreszenz-Bereich verschobene GFP-Variante, die stärkere Fluoreszenz und ein höheres Expressionslevel in eukaryotischen Zellen besitzt (Anregungsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm). Die Klonierung des Zielgens in die multiple Klonierungsstelle resultiert in seiner *CMV*-Promotor abhängigen Expression. Dabei befindet sich das Zielprotein am N-Terminus und das eGFP am C-Terminus des Fusionsproteins. Das Rinder-Wachstumshormon (BGH) Polyadynyierungs-signal am 5'-Ende vom *eGFP*-Gen, sorgt für die notwendige Prozessierung der entstehenden mRNA. Das Vektorgrundgerüst besitzt den SV40-Replikationsursprung, der das SV40-T-Antigen für die Vermehrung in Säugerzellen synthetisiert. Eine Neomycin-Resistenzkassette erlaubt zusätzlich die stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels G418. Ebenfalls besitzt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen (*kan*), das in Kombination mit dem pMB1\*-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli* dient.

Im Falle des pmCherry-N1 Vektors (4722 bp) ist *eGFP* durch das *mCherry*-Gen ersetzt worden (Anregungsmaximum = 587 nm; Emissionsmaximum = 610 nm.) [164]. Dieses ging durch gerichtete Proteinevolution aus dem monomeren rot-fluoreszenten Protein mRFP1 hervor.

## 2.4 Mikroorganismen und Zelllinien

### 2.4.1 *E. coli*-Stämme

#### DH5 $\alpha$

Dieser Stamm hitzekompetenter *E. coli*-Zellen (Subcloning Efficiency<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>) wurde von der Firma *Invitrogen* bezogen.

Genotyp: F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>)  
*phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup>

#### XL10-Gold

Dieser Stamm wurde zur Herstellung elektrokompenter Zellen für Klonierungszwecke eingesetzt und stammte von der Firma *Stratagene*.



Genotyp: Tet<sup>r</sup>  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1$   
*gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>*].

### **BL21-Gold(DE3)**

Dieser *E. coli*-Stamm der Firma *Stratagene* wurde für die Herstellung von hitzekompetenten Zellen benutzt, die zur Herstellung der Expressionsstämme verwendet wurden.

Genotyp: F' *ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte*

## **2.4.2 S. cerevisiae-Stämme**

Die Nummerierung der Hefestämme in der Stammsammlung (TSXXX) steht bei nicht selbst erzeugten Stämmen in Klammern, bei selbst generierten entspricht sie dem Namen des Stammes.

### **Y03883 (TS022)**

Der Stamm wurde von EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functinal analysis) bezogen. In dem Stamm ist das *TFP1*-Gen deletiert, dass für die Untereinheit A der vakuolären ATPase V1 Domäne inklusive dem *Sce* VMA-Intein kodiert.

Genotyp: *MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; tfp1Δ::kanMX4*

### **SBFB4 (TS051)**

Der von Binkowski *et. al* erzeugte Hefestamm wurde in einem Liganden kontrollierten Protein-Peptid-Interaktionssystem verwendet [165]. Durch die *tor2-1* Mutation ist der Stamm resistent gegenüber Rapamycin. Das *FPR1*-Gen ist die natürliche Prolylisomerase von *S. cerevisiae* mit dem höchsten Expressionslevel, deswegen erhöht seine Deletion unspezifische Bindungen mit heterolog exprimierten *FRB*-Fusionsgenen.

Genotyp: *MATa; trp1-901; leu2-3,112; ura3-52; his3-200; gal4Δ; gal80Δ; GAL2-ADE2;*  
*LYS2::GAL1-HIS3; met2:: GAL7-lacZ; tor2-1; Δfpr1::kanMX4*

### **W303 (TS117)**

Der W303-Stamm wurde zur Generierung von Stamm TS302 verwendet [166].

Genotyp: *MATα, ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11, leu2-3*

## **TS302**

In den CPS-Experimenten war TS302 der am häufigsten verwendete Hefestamm. Er wurde erzeugt durch Einführung der *tor2-1*-Mutation durch die Transformation des amplifizierten *tor2-1*-Gens aus der genomischen DNA des SBFB4-Stammes (Primern: oTS25 & oTS26). Anschließend wurde das *FPR1*-Gen mit Hilfe der amplifizierten *HIS3*-Kassette (Kapitel 2.3.6) deletiert (Primer: oTS140 & oTS141) [163].

Genotyp: *MAT $\alpha$ , ura3-1, ade2-1, trp1-1, his3-11, leu2-3, tor2-1, fpr1 $\Delta$ ::HIS3*

## **2.4.3 Eukaryotische Zelllinien**

### **HeLa**

Die Zellen stammen aus einem menschlichen Gebärmutterhalskrebs [167]. Ihre Morphologie entspricht Epithel-ähnlichen Zellen, die in einer einlagigen Schicht (Monolayer) wachsen.

DSMZ Nr.: ACC 57

### **COS-7**

Die Zellen wurden aus der Niere der äthiopischen Grünmeerkatze gewonnen [168]. Ihre Morphologie entspricht Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die in einem Monolayer wachsen.

DSMZ Nr.: ACC 60

## **2.5 Wachstumsmedien**

### **2.5.1 *E. coli*-Medien**

Zur Sterilisation wurden alle Medien vor dem Gebrauch für 30 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Als Vollmedium zur Anzucht von *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium benutzt. Im Falle der <sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung wurde M9-Minimalmedium zur Anzucht der *E. coli*-BL21-Gold(DE3)-Zellen verwendet.

<b>LB-Medium</b>	10 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	5 g/L	NaCl
für Platten	15 g/L	Agar Nr.1

<b>M9-Minimalmedium</b>	45 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	25 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	8,5 mM	NaCl
	0,1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,03 g/mL	Thiamin (steril filtriert)
	0,1 %	NH <sub>4</sub> Cl oder <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl (steril filtriert)
	0,2 %	Glucose (steril filtriert)
	22 nM	FeCl <sub>3</sub> (steril filtriert)

Hitzeempfindliche Substanzen, wie z.B. Antibiotika, wurden den Medien nach dem Autoklavieren in folgenden Konzentrationen zugegeben: Ampicillin (100 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL) und Tetracyclin (10 µg/mL).

## 2.5.2 *S. cerevisiae*-Medien

### YPD-Medium

Als Vollmedium zur Anzucht von *S. cerevisiae*-Zellen wurde YPD-Medium verwendet.

<b>YPD-Medium</b>	20 g/L	Bacto™ Peptone
	10 g/L	Hefeextrakt
	für Platten	20 g/L Bacto™ Agar

Hitzeempfindliche Substanzen, wie z.B. Glucose, wurden dem Medium als sterilfiltrierte Lösungen erst kurz vor Beginn des Experimentes zugegeben.

### SD-Medium

Als Minimalmedium zur Anzucht von *S. cerevisiae*-Zellen wurde SD-Medium (engl. Synthetic Defined Medium) benutzt [169].

<b>SD-Medium</b>	5 g/L	Hefe Stickstoff Basis (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)
	1,7 g/L	Ammoniumsulfat
	100 mL/L	10x Dropout-Lösung (Zusammensetzung folgt später)
	für Platten	30 g/L Bacto™ Agar

## Material

---

Nach der Zugabe aller Lösungen und Chemikalien wurde der pH auf 5,8 eingestellt und das Medium autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen, wie z.B. Glucose, wurden dem Medium als sterilfiltrierte Lösungen erst kurz vor Beginn des Experimentes zugegeben:

<b><u>Stammlösung</u></b>	<b><u>Endkonzentration</u></b>
Glucose 50 %	2 %
Galactose 20 % / Raffinose 10 %	2 % / 1 %
Rapamycin 1 mM in DMSO	variabel

Falls nötig wurde danach das Medium mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf das finale Volumen von 1 L gebracht.

### **10x Dropout-Lösung**

Um z.B. ein SD-Medium (-His) herzustellen, wurde eine 10x Dropout-Lösung (-His) angesetzt die alle Nährstoffe in ihren angegebenen Konzentrationen enthielt, außer Histidin.

<b><u>Nährstoff</u></b>	<b><u>10x Konzentration</u></b>
L-Adenin Hemisulfat Salz	200 mg/L
L-Arginin HCl	200 mg/L
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/L
L-Isoleucin	300 mg/L
L-Leucin	1.000 mg/L
L-Lysin HCl	300 mg/L
L-Methionin	200 mg/L
L-Phenylalanin	500 mg/L
L-Threonin	2.000 mg/L
L-Tryptophan	200 mg/L
L-Tyrosin	300 mg/L
L-Uracil	200 mg/L
L-Valin	1.500 mg/L

Jede Dropout-Lösung wurde nach dem Ansetzen autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.5.3 Medium für eukaryotische Zelllinien

Für eukaryotische Zellen wurde ein steriles DMEM-Nährmedium (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) von der Firma *PAN Biotech GmbH* bezogen [170].

<b>DMEM-Medium</b>	4,5	g/L	Glucose
<b>(einschließlich)</b>	4	mM	L-Glutamin
	1	mM	Natriumpyruvat
	3,7	g/L	NaHCO <sub>3</sub>

Vor der Verwendung wurde es mit folgenden sterilfiltrierten Substanzen versetzt und bei 4 °C gelagert.

<b>Zusätze des DMEM-Mediums</b>	10 %	(v/v)	FBS
	100	U/mL	Penicillin
	100	µg/mL	Streptomycin
	2	mM	L-Glutamin

### 2.6 Puffer und Lösungen

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	40 %	(v/v)	Ethanol
	10 %	(v/v)	Essigsäure
	2,5	g/L	Coomassie Brilliant Blue R 250

<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	40 %	(v/v)	Ethanol
	10 %	(v/v)	Essigsäure

<b>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup></b>	0,2	g/L	KCl
	0,2	g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<b>(PBS-Puffer)</b>	8	g/L	NaCl
	2,2	g/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

<b>EB-Puffer</b>	10	mM	Tris-HCl, pH 8,5
------------------	----	----	------------------

## Material

---

<b>HU-Puffer</b>	8 M Harnstoff
<b>(SDS-Probenpuffer für Hefe)</b>	5 % (w/v) SDS
	200 mM Tris/HCl pH 6,8
	1 mM EDTA
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	1,5 % (w/v) DTT
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-Puffer A</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	300 mM NaCl
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-Puffer B</b>	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol
<b>NMR-Puffer</b>	25 mM Tris/HCl pH 7,0
	50 mM NaCl
<b>ONPG-Lösung</b>	4 g/L o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (ONPG) gelöst in Z-Puffer
<b>SDS-Gel Laufpuffer</b>	50 mM Tris
	250 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS
<b>4x SDS-Probenpuffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 6,8
	8 % (w/v) SDS
	40 % (v/v) Glycerin
	20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
	5 mg/L Bromphenolblau
<b>Strep-Tag Puffer W</b>	100 mM Tris/HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA

## Material

---

<b>Strep-Tag Puffer E</b>	100 mM Tris/HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	2,5 mM Desthiobiotin
<b>TBST-Puffer</b>	50 mM Tris/HCl pH 7,0
	150 mM NaCl
	0,1 % (v/v) Tween-20
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 mM EDTA
<b>Trypsin-Lösung</b>	0,25 % (w/v) Trypsin
	0,02 % (w/v) EDTA
	in PBS-Puffer mit Phenolrot
<b>Stripping-Puffer (Western Blot)</b>	2 % (w/v) SDS
	63 mM Tris/HCl pH 6,7
	0,686 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Z-Puffer</b>	16,1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	5,5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	0,75 g/L KCl
	0.246 g/L $\text{MgSO}_4$ ; pH 7,0
<b>Z-Puffer mit <math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>	0,27 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol in Z-Puffer

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Molekularbiologie (z.B. Klonierung von Plasmiden, PCR, Transformation von *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Zellen) wurden nach Sambrook [171] und Rose [172] durchgeführt und werden hier nicht weiter beschrieben (siehe auch [169] und [157]). Die Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Primer (siehe Tabelle 18) und eine Liste der benutzten aber nicht näher beschriebenen Plasmide (siehe Tabelle 17) können dem Anhang entnommen werden.

#### 3.1.1 Restriktionsfreie PCR

Die restriktionsfreie PCR (RF-PCR) ist eine spezielle Form der PCR zur zielgerichteten Integration von großen DNA-Fragmenten in Zielplasmide [173, 174]. Die RF-PCR besteht dabei aus zwei separaten, aufeinander folgenden PCR-Reaktionen. Während der ersten Reaktion wird ein beliebiges DNA-Fragment oder Zielgen durch die Amplifikation mit den Primern am 5'- und 3'-Ende mit 20-40 bp langen Sequenzen, die homolog zur Integrationsposition sind, versehen. In der folgenden PCR-Reaktion, einer linearen Amplifikationsreaktion, wird das verlängerte Amplifikat der ersten PCR-Reaktion als eine Art Primer zusammen mit einem zirkulären Plasmid eingesetzt. So findet in der zweiten PCR-Reaktion die Integration des DNA-Fragmentes in die Insertionsposition nach der Paarung der homologen Sequenzen und der Amplifikation durch die Polymerase statt. Im Gegensatz zur zielgerichteten Mutagenese mittels der QuickChange Methode [175], ist es also möglich ganze Gene in Zielvektoren in einer „spurlosen“ Art und Weise einzufügen, d.h. ohne die Notwendigkeit von Restriktionsschnittstellen oder ungewollten Baseninsertionen.

Für die erste PCR-Reaktion wurden Standardbedingungen verwendet. In der zweiten PCR-Reaktion, der linearen Amplifikation, wurde eine Polymerase mit sehr hoher Genauigkeit verwendet (*PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase* von *Stratagene*). Der Zielvektor, in den die Integration stattfinden sollte, wurde wie auch das amplifizierte DNA-Fragment mittels Spin-Säulchen (*Qiagen*) gereinigt. Die finalen DNA-Konzentrationen in der linearen Amplifikationsreaktion betragen 1 ng/μL für den Zielvektor und 6 ng/μL für das amplifizierte DNA-Fragment. Die Bedingungen der linearen Amplifikationsreaktion sind in Tabelle 7 dargestellt.



**Tabelle 7. PCR Programm der linearen Amplifikationsreaktion der RF-PCR**

<u>Denaturierung</u>	2 min bei 95 °C	} 35x
Denaturierung	30 s bei 95 °C	
Annealing	60 s bei 55 °C	
<u>Extension</u>	60 s/kbp bei 68 °C	
Extension	8 min bei 68 °C	
Stop	∞ bei 4 °C	

### 3.1.2 Konstruktion der TEV-Protease-Plasmide

#### Die Positivkontrollen

Die Zielplasmide für die Integration und damit auch die ersten verwendeten Positivkontrollen waren pTS44 und pTS55. Für die Erzeugung von pTS44 (*His10-TEV(S219V)*) wurde zuerst die TEV-Protease aus pET19b-TEV(S219V) (erhalten von Prof. Kirill Alexandrov) mit den Primern oTS73 & oTS74 amplifiziert. Nach dem Verdau von sowohl dem Amplifikat als auch von p426-GAL1 (pTS35) mit *Bam*HI and *Eco*RI wurden beide Fragmente miteinander ligiert. Die Generierung von pTS55 erfolgte durch die Umklonierung der kodierenden Region *His<sub>6</sub>-GST-TEV(S219V)* aus pGAT-TEV(S219V) (erhalten von Prof. Kirill Alexandrov) in p426-GAL1 (pTS35) über die Restriktionsenzyme *Spe*I (bzw. *Xba*I für das Amplifikat von pGAT-TEV(S219V)) und *Xho*I.

Bei der modifizierten Positivkontrolle, die in den Wachstumsexperimenten eingesetzt wurde, handelte es sich um pTS168 (*His<sub>6</sub>-GST-TEV(S219V)-HA*). Zuerst wurde *His<sub>6</sub>-GST-TEV(S219V)* aus pGAT-TEV(S219V) mit den Primern oTS186 & oTS187 amplifiziert. Anschließend erfolgte die Klonierung in p424-TDH über *Spe*I (bzw. *Nhe*I für das Amplifikat von pGAT-TEV(S219V)) und *Xho*I.

#### Die Integrationsplasmide

Die Integrationsplasmide wurden durch den Einbau der CPS-Inteinkassette (pTS13, Kapitel 2.3.4) in die Plasmide pTS44 und pTS55 erzeugt. Dieser sequenzspezifische Prozess fand über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* statt. Nachdem die CPS-Inteinkassette am 5'- und 3'-Ende mit jeweils ca. 40 bp homologen Sequenzen zur Insertionsposition im *TEV*-Proteasegen mittels der PCR-Primer verlängert wurde, erfolgte die Transformation des Amplifikats in einen pTS44 oder pTS55 tragenden Hefestamm (Y03883, Kapitel 2.4.2). Alle erzeugten Integrationsplasmide sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. Die mittels der CPS-Kassetten erzeugten Integrationsplasmide in *His<sub>10</sub>-TEV* und *GST-TEV*

Insertionsposition in der TEV-Protease	Verwendete Primer	Integrationsplasmid [ <i>His<sub>10</sub>-TEV</i> (pTS44)]	Integrationsplasmid [ <i>GST-TEV</i> (pTS55)]
16	oTS130 & oTS131	pTS117	pTS111
97	oTS128 & oTS129	pTS109	pTS99
110 (I)	oTS121 & oTS122	pTS103	pTS118
110 (A)	oTS123 & oTS122	pTS115	pTS119
118	oTS095 & oTS096	pTS77	pTS90
130	oTS093 & oTS094	pTS74	pTS95
135	oTS126 & oTS127	pTS98	pTS114
151	oTS091 & oTS092	pTS79	pTS89
206	oTS124 & oTS125	pTS100	pTS110

### **Die gespaltenen TEV-Proteasen 118 und 206**

In den Wachstumsexperimenten wurden modifizierte Versionen der Integrationsplasmide der Positionen 118 und 206 eingesetzt, da nur die aus ihnen resultierenden Fusionsproteine die CPS-Reaktion durchführen konnten. Für TEV 118 wurde pTS90 mit den Primern oTS186 & oTS187 amplifiziert und das lineare Fragment mit *NheI* und *XhoI* geschnitten. Die anschließende Ligation in den mit *SpeI* und *XhoI* verdauten p424-TDH Vektor ergab pTS165. Bei TEV 206 verliefen alle Schritte identisch, nur diente pTS110 als Templat in der PCR-Reaktion. Das resultierende Plasmid war pTS170.

Zur zusätzlichen Charakterisierung der gespaltenen Protease wurden Konstrukte hergestellt in denen TEV 118 und 206 eine Cys1Ala Mutation trugen. Diese Mutation bewirkt, dass die Spleißreaktion nicht ablaufen kann. In beiden Fällen wurden die Mutation durch das QuikChange-Protokoll eingeführt [175]. Die dazu verwendeten Primer waren bei TEV 118 (pTS165) oTS182 & oTS183 und bei TEV 206 (pTS170) oTS184 & oTS185. Bei den erhaltenen Spleißmutanten-Plasmiden pTS184 (TEV 118 mut) und pTS187 (TEV 206 mut), wurde der Primereinbau durch Sequenzierung verifiziert.

### **Die Reporterplasmide**

Bei dem ersten verwendeten TEV-Protease-Reporter handelte es sich um pTS69, der für MBP-TEVsite-eGFP kodierte. Das Plasmid wurde durch Umklonierung des vollständigen Fusionsgens aus pTS68 (*MBP-TEVsite-eGFP*) in pTS40 (p425-TDH Vektorgrundgerüst) über die Enzyme *EcoRI* und *HindIII* erhalten. In den Experimenten mit TEV 118 und TEV 206 wurde ebenfalls ein Reporterplasmid mit dem *MBP-TEVsite-eGFP*-Gen verwendet, allerdings mit einem CEN6/ARSH4-Replikationsursprung. Dazu wurden zwei Fragmente aus pTS69,

zum einen das *SacI* und *NdeI* Fragment (*TDH*-Promotor) und zum anderen das *NdeI* und *XhoI* Fragment (*MBP-TEVsite-eGFP*) in ein mit *SacI* und *XhoI* geschnittenes p415-MET25 Plasmid kloniert. Das Ergebnis war pTS169, das *MBP-TEVsite-eGFP* unter der Kontrolle des *TDH*-Promotors exprimiert.

Die nächsten generierten Reporterplasmide wurden für den ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay benötigt (Kapitel 3.4.2). Zur Verfolgung der Lokalisation an der Plasmamembran wurde das Fusionsgen *PMA1-TEVsite-eGFP* kloniert. Im ersten Schritt wurde von der chromosomalen DNA des W303-Stammes (Kapitel 2.4.2) das *PMA1*-Gen mit den Primern oTS210 & oTS211 amplifiziert. Bevor das Fragment in den Vektor pTS201 (basiert auf p415-MET25) über *SpeI* und *NdeI* kloniert werden konnte, wurde dieser noch mittels inverser PCR mit den Primern oTS208 & oTS209 amplifiziert. Das finale Konstrukt wurde pTS224 genannt. Um das Reporterplasmid für den ONPG-Assay zu erzeugen, musste *eGFP* mit *GAL4* ausgetauscht werden. Dazu wurde *GAL4* aus dem Plasmid ssTM-PARPD-GAL4 [176] mit den Primern oTS201 & oTS205 amplifiziert und über *NcoI* und *HindIII* in pTS224 kloniert, dass das Plasmid pTS215 erzeugte.

Zur mikroskopischen Betrachtung des fehllokalisierten eGFPs wurde das Plasmid pTS229 (*STE2-TEVsite-eGFP*) generiert (Kapitel 3.4.4). Nach der PCR des *STE2*-Gens von der chromosomalen DNA des W303-Stammes (Kapitel 2.4.2) mit den Primern oTS221 & oTS222 wurde es über *SpeI* und *NdeI* in pTS224 kloniert.

### **Die Expressionsplasmide der N- oder C-terminalen TEV-Hälften**

Die Plasmide die nur für die N- oder C-terminalen Hälfte der TEV 118 und 206 Protease kodierten, wurden zum Ausschluss einer Restaktivität der einzelnen Proteasehälften benötigt. pTS142 (*FRB-C'VMA-C'TEV118-HA*) wurde durch eine Amplifikation von pTS90 mit den Primern oTS160 & oTS161 und nachfolgender Klonierung in p426-GPD über *BamHI* und *XhoI* erhalten. Das entsprechende Plasmid der C-terminale Hälfte von TEV 206, pTS144, wurde durch eine identische Vorgehensweise erzeugt, allerdings diente pTS110 als Templat in der PCR-Reaktion. Die N-terminale Hälfte von TEV 118 und 206 (*His<sub>6</sub>-GST-N'TEV-N'VMA-FKBP*) wurde mit den Primern oTS162 & oTS163 aus pTS90 (TEV 118) und pTS110 (TEV 206) amplifiziert und über *EcoRI* und *XhoI* in p424-TDH kloniert. Die erhaltenen Plasmide waren pTS156 (Gen von TEV 118) und pTS158 (Gen von TEV 206).

### **Die Säugerzellen-Plasmide**

Bei der Positivkontrolle (*MBP-TEV*) der Säugerzellenexperimente handelt es sich um pTS162. Zu seiner Erzeugung wurde das *TEV*-Proteasegen aus pET19b-TEVS219V mit den Primern oTS177 & oTS178 amplifiziert und über *EcoRI* und *XhoI* in pEB04 (pcDNA3 Vektorgrundgerüst [152]) kloniert.

Die Expression der N-terminalen Hälften von TEV 118 und 206 erfolgte in Säugerzellen durch das *MBP-N'TEV-N'VMA-FKBP*-Fusionsgen. Die respektiven Plasmide entstanden durch eine drei-Fragment-Ligation. Das *MBP*-Fragment stammte dabei aus pHM45 [152] und wurde zuerst mit den Primern oTS188 & oTS192 amplifiziert und anschließend mit *HindIII* und *NcoI* verdaut. Die *N'TEV-N'VMA-FKBP*-Fragmente stammten aus den mit *NcoI* and *BamHI* geschnittenen Plasmiden pTS90 und pTS110. Als Vektorgrundgerüst diente das mit *HindIII* and *BamHI* verdaute pcDNA3 Plasmid. Aus der Ligation resultierten pTS175 (für TEV 118) und pTS176 (für TEV 206). Die C-terminalen Hälften von TEV 118 und 206 wurden durch das Fusionsgen *FRB-C'VMA-C'TEV-HA* kodiert. Es konnte für beide gespaltenen Proteasen aus den Plasmiden pTS90 und pTS110 mit den Primern oTS160 & oTS161 amplifiziert werden. Nach der Klonierung in den pcDNA3 Vektor über *BamHI* und *XhoI* wurden die Plasmide pTS144 (TEV 206) und pTS146 (TEV118) erhalten.

Als Reporterplasmid der Säugerzelleexperimente wurde pTS137 (*mCherry-TEVsite-eGFP*) verwendet. Um pTS137 zu erzeugen wurde nach der PCR von pmCherry-N1 mit dem Primern oTS152 & oTS153 das *mCherry*-Gen über *XhoI* und *KpnI* in den pEGFP-N1 Vektor kloniert.

### **3.1.3 Konstruktion der SPLICEFINDER-Plasmide**

#### **Das Helferplasmid pRSFara**

Das Helferplasmid pRSFara kodiert für die Repressoren LacI und AraC. Um es zu erzeugen wurden in dem pRSFDuet Vektor (*Novagen*) beide multiplen Klonierungsstellen durch das *araC*-Gen inklusive seiner Promotorregion ausgetauscht. Der Austausch erfolgte mittels RF-PCR, wobei das Insert vom pBAD/His A (*Invitrogen*) Plasmid stammte und mit den Primern oJZ69 & oJZ70 amplifiziert wurde.

### **Die *trans*-Inteinkassetten**

Alle *trans*-Inteinkassetten basierten auf dem Plasmid pTS13 (Kapitel 2.3.4). In den folgenden Schritten wurden jeweils die 5'- und 3'-kodierenden Bereiche des *Scd* VMA-Inteins mittels RF-PCR mit den Inteinfusionsgenen der unterschiedlichen gespaltenen Inteine ausgetauscht.

Für das künstlich an der Position der Endonuklease gesplattene *Ssp* DnaB-Intein wurde das C-terminale Inteinfusionsgen von pAU04 mit den Primern oTS158 & oTS159 amplifiziert. Das PCR-Produkt enthielt den *araBAD*-Promotorbereich aus dem kommerziell erhältlichen pBAD-Expressionssystem (*Invitrogen*) und wurde als Insert in einer RF-PCR mit pTS13 als Templat verwendet. Das erhaltene Plasmid wurde pCasDnaB1 genannt und in einer zweiten RF-PCR erfolgte der Austausch der 5'-kodierenden Region. Hierzu wurde das N-terminale *dnaB*-Insert über eine PCR von pJZ28 und den Oligonukleotiden oTS156 & oTS157 amplifiziert. Das vollendete Plasmid der *Ssp* DnaB-*trans*-Inteinkassette wurde pCasDnaB2 genannt.

In zwei weiteren RF-PCRs wurde die *Npu* DnaE-Inteinkassette hergestellt. Zuerst erfolgte der Austausch der 5'-kodierenden Region durch das Amplifikat der PCR von pAU08 mit den Primern oJZ62 & oJZ63 (pCasDnaE1). Anschließend wurde die 3' kodierende Region durch das C-terminale *dnaE*-Insert ersetzt, das aus der Amplifikation von pAU07 mit den Primern oJZ64 & oJZ65 stammte. Das resultierende Plasmid der *Npu* DnaE-*trans*-Inteinkassette wurde als pCasDnaE2 bezeichnet.

Analog zu der Generierung der anderen *trans*-Inteinkassetten wurde auch die *Mxe* GyrA-*trans*-Inteinkassette über zwei aufeinander folgende RF-PCRs ausgehend von pCasDnaE2 hergestellt. Der 5'-kodierende Bereich der GyrA-Inteins wurde von pAI13 (erhalten von Dr. Thomas Kurpiers) mit den Primern oJZ91 & oJZ92 amplifiziert. Das generierte Plasmid pCasGyrA1 diente als Templat in der zweiten RF-PCR. Hier wurde durch eine PCR von pDK01 (erhalten von Dania Kendziora) mit den Primern oJZ93 & oJZ94 das C-terminale Inteinfusionsgen amplifiziert, was nach dem Einbau über RF-PCR das Plasmid pCasGyrA2 ergab.

### **Das Modellgen und die Integrationsplasmide**

Die Integration der *Ssp* DnaB- und der *Npu* DnaE-*trans*-Inteinkassetten sollte in das Modellgen *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>* erfolgen. Dazu wurden zu Beginn zwei Zielvektoren konzipiert, ein Hefe-Shuttlevektor (pSE01) und ein *E. coli*-Expressionsvektor (pTS209). Dabei ermöglichte pSE01 sowohl die Integration über homologe Rekombination als auch zusätzlich die Expression in *E. coli*.

Zuerst wurde ein geeigneter Hefe-Zielvektor durch einen Austausch der Hefe-spezifischen, die Genexpression kontrollierenden, Elemente erreicht. Dazu wurde der Promoter, die multiple Klonierungsstelle und der Terminator mittels inverser PCR mit dem Primern oTS175 & oTS176 von p425-TDH deletiert, und über *Bgl*III und *Hind*III mit den entsprechenden Elementen für *E. coli* aus pET16b (*Novagen*) ersetzt. Das erzeugte Plasmid wurde als pTS160 bezeichnet. Mit diesem Plasmid als Vektorgrundgerüst erfolgte die Generierung des Zielvektors pSE01 über eine drei-Fragmentligation. Der Verdau von pJZ42 mit *Nco*I und *Eco*RI führte zum *ST-gpD*-Fragment. Das *Trx-His<sub>6</sub>*-Fragment wurde über eine PCR von pCL20 [76] mit den Primern oJZ85 & oJZ55 und einem anschließenden Verdau mit *Eco*RI und *Xho*I erhalten. Durch oJZ85 wurde zusätzlich die Glycin-Linkersequenz eingeführt. Die Ligation der Fragmente in den *Nco*I und *Xho*I geschnittenen pTS160 Vektor ergab pSE01.

Um den *E. coli*-Zielvektor mit dem Modellgen zu erhalten (pTS209), wurde die kodierende Region aus pSE01 über *Nco*I und *Xho*I in pET16b (*Novagen*) kloniert. Um die bei NMR-Untersuchungen benötigten hohen Expressionsausbeuten zu erreichen, wurde das Modellgen aus pSE01 über *Nco*I und *Xho*I in pET28a (*Novagen*) kloniert (pSE02).

Die in dieser Arbeit untersuchten Integrationsplasmide basieren alle auf der Integration der *Ssp* DnaB- und der *Npu* DnaE-*trans*-Inteinkassetten in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>*. Dafür wurde pTS209 als Templat in der RF-PCR mit den amplifizierten Kassetten verwendet, die erzeugten Plasmide können Tabelle 9 entnommen werden.

**Tabelle 9. Die mittels der *trans*-Inteinkassetten erzeugten Integrationsplasmide**

Kombination	<i>trans</i> - Inteinkassette	Linkersequenz nach PTS	Verwendete Primer	Integrationsplasmid
Modellgen	-	GGG-GGG	-	(pTS209)
ssp1	<i>Ssp</i> DnaB	GGG-SGGG	oSE03 & oSE01	pTS216
ssp2	<i>Ssp</i> DnaB	GGG-SIEQ	oSE03 & oSE02	pTS217
ssp3	<i>Ssp</i> DnaB	ESG-SGGG	oSE04 & oSE01	pTS218
ssp4	<i>Ssp</i> DnaB	ESG-SIEQ	oSE04 & oSE02	pTS219
npu1	<i>Npu</i> DnaE	GGG-CGGG	oSE05 & oSE07	pTS210
npu2	<i>Npu</i> DnaE	GGG-CFNK	oSE05 & oSE08	pTS211
npu3	<i>Npu</i> DnaE	AEY-CGGG	oSE06 & oSE07	pTS212
npu4	<i>Npu</i> DnaE	AEY-CFNK	oSE06 & oSE08	pTS213

### **Die Expressionsplasmide der N- oder C-terminalen Modellgen-Hälften**

Zur Durchführung von *in-vitro*-Spleißreaktionen mit gereinigten Proteinen wurden die individuellen N- und C-terminalen *Npu* DnaE-Inteinfusionsgene aus den Integrationsplasmiden in Expressionsvektoren kloniert.

Die N-terminalen Inteinfusionsgene stammten aus pSE07 (*ST-gpD-GGG-N'dnaE*) oder von pSE08 (*ST-gpD-AEY-N'dnaE*) und wurden über einen *Nco*I und *Hind*III Verdau in pRSFDuet (*Novagen*) kloniert, was zu den Plasmiden pSE13 und pSE14 führte.

Die C-terminalen Inteinfusionsgene wurden ebenfalls aus pSE07 (*C'dnaE-CGGG-Trx-His<sub>6</sub>*) und aus pSE08 (*C'dnaE-CFNK-Trx-His<sub>6</sub>*) erhalten und über einen *Nde*I und *Bgl*II Verdau in pBAD/His A (*Invitrogen*) kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden als pSE11 und pSE12 bezeichnet.

### **3.1.4 Konstruktion der CobA-Plasmide**

#### **Die CobA-Positivkontrolle und ihre Integrationsplasmide**

Das *cobA*-Gen stammte ursprünglich aus dem pISA417-Plasmid [177] und wurde mit dem Strep-Tag II (ST) und einem His<sub>6</sub>-Tag versehen. Zur Expression in *E. coli* wurde *ST-cobA(WT)-His<sub>6</sub>* aus pSE15 über *Nhe*I und *Xho*I in pTS220 (pET16b Vektorgrundgerüst) kloniert. Das resultierende Konstrukt, pSE21, stellte den Zielvektor für die Integrationen und die Positivkontrolle des CobA-Aktivitätstests dar.

Die in dieser Arbeit verwendeten CobA-Integrationsplasmide wurden mittels RF-PCR erzeugt. Zur Integration der *Npu* DnaE-*trans*-Inteinkassete in *cobA* wurden zwei Positionen ausgewählt (109 und 159). Gleichzeitig mit der Integration fand an beiden Positionen eine Variation der C-terminalen flankierenden Aminosäuren statt (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10. Die mittels der *Npu* DnaE-*trans*-Inteinkassetten erzeugten CobA-Integrationsplasmide**

Integrationsposition in CobA	Verwendete Primer	Integrationsplasmid
109 (CFN)	oES11 & oSE12	pSE25
109 (CAE)	oES11 & oSE13	pSE26
159 (CFVP)	oJZ102 & oJZ103	pSE35
159 (CFNK)	oJZ102 & oJZ104	pSE36

Für die Position 109CFN wurde auch die entsprechende Mutante der Positivkontrolle erzeugt, d.h. das Plasmid pSE33 exprimiert vollständiges *ST-cobA(110FN)-His<sub>6</sub>*. Die Mutation wurde über eine Fusions-PCR eingeführt [178] (für die genaue Durchführung siehe

auch [157]). Dazu wurde der eine Teil des Fusionsgens mit den Primern oSE09 & oSE14 amplifiziert und der zweite Teil mit oSE15 & oSE10, wobei in beiden PCR-Reaktionen pTS21 als Templat diente. Die Fusions-PCR erfolgte mit beiden gereinigten PCR-Fragmenten mit den Primern oSE09 & oSE10 und anschließend wurde das Amplifikat über *NheI* und *SpeI* in pSE21 kloniert.

### **Die Expressionsplasmide der N- oder C-terminalen CobA-Hälften**

Zur Kontrolle der CobA-Aktivität wurden Konstrukte hergestellt, die für nur eine CobA-Hälfte kodieren. Die N-terminale Hälfte der Position 109 (*ST-N'cobA109-N'dnaE109*) stammte aus pSE25. Sie wurde über *NcoI* und *NotI* in pET28a (Novagen) kloniert, das das Plasmid pSE22 ergab. Die C-terminalen Hälften *C'dnaE-C'cobA109CFN-His<sub>6</sub>* und *C'dnaE-C'cobA109CAE-His<sub>6</sub>* wurden aus den Plasmiden pSE25 und pSE26 durch einen *BamHI* Verdau erhalten. Dabei enthielt das generierte Fragment die Sequenz des *araBAD*-Promotors. Es folgte eine Klonierung in den ebenfalls mit *BamHI* verdauten Vektor pAU07, was zu den Plasmiden pSE23 (109CFN) und pSE24 (109CAE) führte.

### **Die Säugerzellen-Plasmide**

Für die CobA-Experimente in Säugerzellen wurden zwei Positivkontrollen generiert. Zum einen ein Vektor der nur für *cobA(WT)* (pSE27) kodierte und zum anderen ein Vektor der das Fusionsgen *MBP-cobA(WT)* (pSE28) trug. Die Klonierung von pSE27 begann mit der Amplifikation des *cobA*-Gens über oJZ98 & oJZ99 aus pISA417 [177]. Anschließend wurde das erhaltene Fragment mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut und in den mit den gleichen Enzymen inkubierten pcDNA3 Vektor ligiert. Das bei der Klonierung von pSE27 eingesetzte geschnittene *cobA*-Fragment wurde zusätzlich in einer Ligation mit dem *EcoRI* und *XhoI* verdauten pTS162 (*MBP-TEV*) Plasmid eingesetzt, was pSE28 erzeugte.

Es wurden zwei Expressionsplasmide der N-terminalen *cobA*-Hälfte erzeugt, ohne Fusionsprotein (pSE29: *N'cobA109-N'dnaE*) und mit MBP (pSE32: *MBP-N'cobA109-N'dnaE*). In beiden Fällen stammte das mit oJZ98 & oJZ100 amplifizierte Fusionsgen *N'cobA109-N'dnaE* aus pSE25 und wurde mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Bei der Ligation wurden zwei verschiedene, aber mit *EcoRI* und *XhoI* behandelte, Plasmide eingesetzt zum einen pcDNA3 (ergab pSE29) und zum anderen pTS162 (ergab pSE32). Die C-terminalen *cobA*-Hälften wurden aus den Integrationsplasmiden pSE25 (*C'dnaE-C'cobA109CFN*) und pSE26 (*C'dnaE-C'cobA109CAE*) mit den Primern oJZ99 & oJZ101 amplifiziert. Nach dem



Verdau der PCR-Produkte und des pcDNA3 Vektors mit *EcoRI* und *XhoI* wurden nach der Ligation die Plasmide pSE30 (109CAE) und pSE31 (109CFN) erhalten.

### 3.2 Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (z.B. SDS-PAGE, Coomassie-Färbung der SDS-PAGE Gele, Proteinextraktion aus *E. coli* und *S. cerevisiae* und Western-Blot-Analyse) wurden nach Sambrook [171] und Rose [172] durchgeführt und werden hier nicht weiter beschrieben (siehe auch [169] und [157]).

### 3.3 *E. coli*-Methoden

#### 3.3.1 Genexpression in *E.coli*

Zur heterologen Herstellung von Zielproteinen wurde der *E. coli*-Expressionsstamm BL21-Gold(DE3) mit den gewünschten Plasmiden transformiert. Testexpressionen wurden im 4 mL Maßstab durchgeführt und die Gesamtzellextraktproben vor und nach der Induktion der Zielgenexpression durch SDS-PAGE analysiert.

Im Falle der präparativen Herstellung der Zielproteine wurden 300 – 800 mL LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,7 wurde die Temperatur auf 20 - 28 °C abgesenkt und die Genexpression durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG oder durch die Zugabe von 0,02 - 0,2 % Arabinose induziert. Die Expression erfolgte für weitere drei bis vier Stunden. Für die segmentelle Isotopenmarkierung, d.h. den Einbau der <sup>15</sup>N-Isotope, wurde beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,7 die Kultur zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, RT) und anschließend das Pellet in M9-Minimalmedium resuspendiert. Dabei enthielt das Medium <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle. Vor der Induktion der Genexpression fand ein Präinkubationsschritt unter Schütteln (250 rpm, 15 min, 20-28 °C) statt. Falls die Induktion mit L-Arabinose erfolgte, wurde auf Glucose im Minimalmedium verzichtet. Die Expression in isotopenmarkiertem Medium erfolgte meistens über Nacht.

Nach dem Ende der Expression wurden die Zellen zentrifugiert (7.000 rpm, 15 min, 4 °C), das Pellet in einem geeigneten Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (EmulsiFlex<sup>®</sup>-C5 High pressure homogenizer) der Firma *Avestin* aufgeschlossen. Dabei wurden sie einem großen Druckunterschied von etwa 6,9 Megapascal ausgesetzt, der die Zellwände durch die resultierenden Scherkräfte aufbrach und das Zellinnere freisetzte. Um einen möglichst kompletten Aufschluss zu erreichen, wurde die Zellsuspension zwei- bis dreimal durch das Gerät geführt. Zur Trennung des Zelllysats von den unlöslichen Zelltrümmern wurde die Suspension zentrifugiert (17.000 rpm, 4 °C, 30 min). Der klare Überstand wurde direkt für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

### 3.3.3 Proteinreinigung

Für die präparativ hergestellten Zielproteine erfolgte eine Reinigung über N- oder C-terminale Affinitätstags. Verwendung fanden in dieser Arbeit die Hexahistidinsequenz (His<sub>6</sub>) und der Strep-Tag II (ST). Dabei erfolgte die Reinigung der His<sub>6</sub>-Tag tragenden Proteine mittels der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Superflow-Matrix (*Qiagen*) und die Reinigung der Proteine mit Strep-Tag II erfolgte mit Hilfe des Strep-Tactin-Sepharose-Material (*IBA*). Die genaue Abfolge der Schritte richtete sich dabei nach der Angabe der Hersteller. Bei der nacheinander folgenden Reinigung über beide Affinitätstags wurde nach der Elution von der ersten Chromatographiesäule ein Dialyseschritt in den Auftragspuffer des zweiten Chromatographieschrittes (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Puffer A oder Strep-Tag-Puffer W) durchgeführt. Nach der erfolgreichen Reinigung der Proteine wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

### 3.3.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration eines gereinigten Proteins wurde photometrisch (280 nm) in Lösung ermittelt [179]. Dabei erfolgte die Berechnung des Extinktionskoeffizienten unter Verwendung des Programms Protean (*DNASTAR*). Die photometrischen Messungen wurden mit einem Ultrospec<sup>™</sup> 3100 pro UV/Vis Spektrophotometer (*GE Healthcare*) in Quarzküvetten durchgeführt.

### 3.3.5 SPLICEFINDER Testexpressionen in *E. coli*

Bei der SPLICEFINDER-Methode dienten Testexpressionen in *E. coli* mit nachfolgender Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes zur Bestimmung der Inteinaktivität im

variablen Exteinkontext der Modellproteine gpD-Trx und MBP-His<sub>6</sub>. Um eine selektive Expression der N- und C-terminalen Inteinfusionsgene zu ermöglichen, wurden zwei Repressoren, LacI und AraC, durch das pRSFara Helferplasmid (Kapitel 3.1.3) synthetisiert. Zur Vereinfachung der Transformation wurden hitzekompetente BL21-Gold(DE3)-Zellen hergestellt, die schon das Helferplasmid trugen. In nächsten Schritt wurden die Zellen dann mit den Plasmiden zur Untersuchung der PTS-Reaktion transformiert (Tabelle 11).

Die Testexpressionen fanden alle in Amp/Kan statt und begannen mit der Inokulation einer Expressionskultur (4 mL) bis auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 aus einer Übernachtskultur. Diese Expressionskultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 0,7 inkubiert (250 rpm, 37 °C) und anschließend mit 0,2 % Arabinose induziert. Nach der Expression des C-terminalen Fusionsgens (250 rpm, 2 h, 37 °C) erfolgten zwei Waschschriffe (5.000 rpm, 1 min, RT) mit frischem Amp/Kan LB-Medium. Für die *Npu* DnaE-Inteinkassetten wurden die Zellen vor-inkubiert (250 rpm, 37 °C, 15 min), bevor die Expression des N-terminalen Fusionsgens mit 1,2 mM IPTG induziert wurde (250 rpm, 37 °C, 4,5 h). Bei den *Ssp* DnaB-Inteinkassetten und der *Mxe* GyrA-Inteinkassette wurde die Expressionstemperatur auf 25°C abgesenkt. Ferner erfolgte die Induktion bei der *Mxe* GyrA-Inteinkassette mit nur 0,4 mM IPTG. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde Proben für SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Analyse entnommen.

**Tabelle 11. Plasmide zur Untersuchung der PTS-Reaktion von Modellproteinen**

Das mittels PTS hergestellte Modellprotein und seine Sequenz in der Linkerregion	<i>trans</i> -Inteinkassette	Kombination	Plasmid
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : GGG-GGG (WT)	-	-	pTS209
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : GGG-SGGG	<i>Ssp</i> DnaB	ssp1	pTS216
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : GGG-SIEQ	<i>Ssp</i> DnaB	ssp2	pTS217
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : ESG-SGGG	<i>Ssp</i> DnaB	ssp3	pTS218
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : ESG-SIEQ	<i>Ssp</i> DnaB	ssp4	pTS219
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : GGG-CGGG	<i>Npu</i> DnaE	npu1	pTS210
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : GGG-CFNK	<i>Npu</i> DnaE	npu2	pTS211
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : AEY-CGGG	<i>Npu</i> DnaE	npu3	pTS212
ST-gpD-Trx-His <sub>6</sub> : YEY-CFNK	<i>Npu</i> DnaE	npu4	pTS213
MBP-His <sub>6</sub>	<i>Mxe</i> GyrA	-	pCasGyrA2

### 3.3.6 Herstellung und Reinigung segmentell isotopenmarkierter ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>-Proteine

#### <sup>15</sup>N(ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>)

Die Expression des komplett markierten <sup>15</sup>N(ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>)-Proteins fand in *E. coli*-BL21-Gold(DE3)-Zellen mit dem pSE02 Plasmid statt. Dazu wurden 300 mL M9-Minimalmedium mit <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, verwendet. Nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und gegen NMR-Puffer dialysiert (2 - 3 Tage mit 4 – 5-maligem Pufferwechsel). Anschließend wurde die Proteinlösung mit VivaSpin-Säulen (MWCO 5.000 Da, Sartorius) auf eine Konzentration von 500 µM gebracht. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Kapitel 3.3.4).

#### ST-gpD-<sup>15</sup>N(Trx-His<sub>6</sub>)

Die segmentelle Markierung des C-terminalen Fragmentes Trx-His<sub>6</sub> wurde mit gereinigten Proteinen durch *in-vitro*-Spleißen mit dem *Npu* DnaE-Intein erreicht. Die separaten Synthesen der Proteine ST-gpD-GGG-N'DnaE (pSE13) und C'DnaE-CFNK-Trx-His<sub>6</sub> (pSE12) erfolgten in Ansätzen mit BL21-Gold(DE3)-Zellen. Im Falle der C-terminalen Hälfte erfolgte die Expression in 600 mL M9-Minimalmedium mit <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle. Die Reinigung der Proteine erfolgten nach Kapitel 3.3.3. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen Spleißpuffer in einem Verhältnis von 1,5:1 (N- zu C-terminalen Fusionsprotein) bei 4°C über Nacht. Die Konzentration des C-terminalen Fusionsproteins betrug in dieser Reaktion 20 µM. Durch den Überschuss am N-terminalen Fusionsprotein sollte eine vollständige Umsetzung des markierten C-terminalen Fusionsproteins in der PTS-Reaktion erreicht werden. Die Reaktionsmischung wurden nach der Spleißreaktion gegen Ni<sup>2+</sup>-NTA-Puffer A dialysiert und anschließend über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Chromatographiesäule gereinigt. Neben dem Spleißprodukt wurde zusätzlich das C-terminale Spaltprodukt gereinigt, das mit einer nachfolgenden StrepTag-II-Chromatographiesäule abgetrennt werden konnte. Im letzten Schritt erfolgte die Dialyse gegen NMR-Puffer und die Ankonzentration mittels VivaSpin-Säulen (MWCO 5.000 Da, Sartorius) auf ca. 200 µM.

#### <sup>15</sup>N(ST-gpD)-Trx-His<sub>6</sub>

Das N-terminale ST-gpD Fragment konnte durch *in-vivo*-PTS mit dem *Ssp* DnaB-Intein segmentell markiert werden. Dafür wurden *E. coli*-BL21-Gold(DE3)-Zellen mit dem Integrationsplasmid der Kombination *ssp3*, pTS218, und dem Helferplasmid pRSFara

kotransformiert. Die Kombination *ssp3* erzeugt die Aminosäuresequenz ESG-SGGG in der Linkerregion des Spleißproduktes. Die Zellen wurden in 300 mL LB-Medium bis 37°C zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 0,6$  angezogen, dann erfolgte die Synthese des C-terminalen Fusionsproteins nach Zugabe von 0,2 % L-Arabinose (250 rpm, 2 h, 37°C). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) pelletiert und zur Entfernung von überschüssiger L-Arabinose in 100 mL unmarkiertem M9-Minimalmedium gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 300 mL M9-Minimalmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle resuspendiert und für 15 min bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Die Synthese des N-terminalen Fusionsproteins erfolgte nach der Zugabe von 1,2 mM IPTG (250 rpm, 4 h, 25 °C). Da unter diesen Expressionsbedingungen die vollständige Umsetzung des C-terminalen Fusionsproteins durch PTS stattfand, konnte das für die NMR-Messungen geeignete Spleißprodukt in einem einzigen Reinigungsschritt über den His<sub>6</sub>-Affinitätstag erhalten werden. In den Elutionsfraktionen fanden sich Spuren des C-terminalen Spaltproduktes, welche gegen NMR-Puffer dialysiert wurden. Über VivaSpin-Säulen (MWCO 5.000 Da, Sartorius) konnte die Konzentration des Spleißproduktes auf  $\sim 500 \mu\text{M}$  erhöht werden.

### 3.3.7 CobA-Aktivitätsbestimmung in *E. coli*-Zellen

Zum Beginn der CobA-Aktivitätsbestimmung wurden bei allen zu untersuchenden *E. coli*-Stämmen von einer Übernachtskultur eine Expressionskultur auf eine  $OD_{600} = 0,2$  inokuliert. Dabei handelte es sich um die Positivkontrollen (pTS21, 33), die Negativkontrollen (leerer Stamm, pSE22, 23) und die Stämme, die das gespaltene *cobA* exprimieren (pSE25, 26, 35, 36). Nach der anfänglichen Inkubation (250 rpm, 90 min, 37 °C) wurde die Temperatur auf 25 °C abgesenkt und allen Kulturen 1 mM Aminolävulinsäure (ALA) zugesetzt. Dem Mischen der Kulturen durch vortexieren folgte die Teilung in „induziert“ und „nicht-induzierte“ Proben. Die Kulturen, die die Plasmide des gespaltene *cobA* koexprimierten, wurden zu diesem Zeitpunkt mit 0,1 % Arabinose induziert. Danach erfolgte die Inkubation aller Proben für 3,5 h unter schütteln. Anschließend fand eine weitere Absenkung der Temperatur auf 20 °C statt. Nun wurden alle Kulturen durch die Zugabe der geeigneten Substanzen (0,1 % Arabinose oder 0,05 mM IPTG) induziert, d.h. im Falle der das gespaltene *cobA* exprimierenden Kulturen erfolgte die Doppelinduktion. Nach der Expression (250 rpm, 48 h, 20 °C) erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der *E. coli*-Zellen an einem Cary 100 Bio Spektrophotometer (Varian) (Anregung 357 nm, Emission = 605 nm). Zu

diesem Zweck wurde ein Kulturvolumen entsprechend einer  $OD_{600} = 1$  pelletiert, in PBS-Puffer gewaschen und danach in 2 mL PBS-Puffer resuspendiert.

### 3.3.8 Western-Blot-Analyse von *E. coli*-Zellen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots von *E. coli*-Gesamtzellextrakten wurde das ECL Western Blotting Kit (*GE Healthcare*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Verdünnungen der Primärantikörper waren wie folgt: Anti-His (*Qiagen*) 1:2.000, Anti-ST (*IBA*) 1:2.000, Anti-MBP (*Fermentas*) 1:10.000. Bei allen Western Blots wurde ein Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“ HRP) markierter Anti-Maus Sekundärantikörper (*GE Healthcare*) in einer Verdünnung von 1:4.000 verwendet.

## 3.4 *S. cerevisiae*-Methoden

### 3.4.1 Genexpression in *S. cerevisiae*

Die Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-Expressionen können Tabelle 12 entnommen werden. Für Vorkulturen wurden 5 oder 10 mL von spezifischem SD-Medium mit den entsprechenden Hefestämmen, die sich auf Platten befanden, angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ca. 15-18 h) bei 30 °C in einem Schikanekolben, der bei 235 rpm geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurden frische Expressionskulturen mit den entsprechenden Vorkulturen inokuliert. Die eingestellten  $OD_{600}$ -Werte der Expressionskulturen können ebenfalls Tabelle 12 entnommen werden.

**Tabelle 12. Expressionsbedingungen der TEV-Protease Experimente in Hefe**

Experiment	Hefe-stamm	Vorkultur	$OD_{600}$ bei 0 min	Expressions-dauer	Rapamycin-konzentration	Kapitel
His <sub>10</sub> -TEV	TS302	Nein	~ 0,1	über Nacht	1 µM	<b>4.1.2</b>
GST-TEV	TS302	Nein	~ 0,1	über Nacht	1 µM	<b>4.1.2</b>
TEV118/206 (Charakterisierung)	TS302	Ja	0,3	variabel	variabel	<b>4.1.3</b>
TEV118/206 (ONPG)	SBFB4	Ja	0,15	6 h	2 µM	<b>4.1.4</b>
TEV118/206 (Fehllokalisierung)	SFBFB4	Ja	0,15	8 h	2 µM	<b>4.1.5</b>

( $OD_{600}$  bei 0 min = Die  $OD_{600}$  auf die die Expressionskultur eingestellt wurde; teilweise erfolgte im Anschluss ein Präinkubationsschritt vor der Rapamycin-Zugabe (siehe Text))

Nach der vollständigen Resuspension der Zellen in dem neuen Medium durch vortexieren, erfolgte die Teilung jeder Kultur. Von den zwei identischen Kulturen wurde eine mit Rapamycin (siehe Tabelle 12) und die andere mit dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt. In einigen Experimenten ging der Zugabe von DMSO/Rapamycin ein Präinkubationsschritt (235 rpm, 30 °C) voraus, der im Falle der Charakterisierung der TEV 118 und 206 Proteasen ca. drei Stunden dauerte, bis die Zellen eine OD<sub>600</sub> von ~0,5 erreicht hatten, und im Falle des ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assays 60 min andauerte.

Die Auflistung aller Plasmide, die in den TEV-Protease-Experimenten in Hefe eingesetzt wurden, können Tabelle 13 entnommen werden.

**Tabelle 13. Auflistung der in den TEV-Protease-Experimenten eingesetzten Plasmide**

Experiment	Reporter-plasmid	Positiv-kontrolle	Negativ-kontrolle(n)	Gespaltene TEV-Proteasen	Spleißmutanten (Cys1Ala)	Kapitel
His <sub>10</sub> -TEV	pTS69	pTS44	p426-GAL1 (pTS35)	pTS74,77,79,98,100,103,109,115,117	-	4.1.2
GST-TEV	pTS69	pTS55	p426-GAL1 (pTS35)	pTS89,90,95,99,110,111,114,118,119	-	4.1.2
TEV118/206 (Charakterisierung)	pTS169	pTS168	p424-TDH; pTS142,144,156,158	pTS165, 170	pTS184, 187	4.1.3
TEV118/206 (ONPG)	pTS215 (pTS224)	pTS168	p424-TDH	pTS165, 170	pTS184, 187	4.1.4
TEV118/206 (Fehllokalisation)	pTS229	pTS168	p424-TDH	pTS165, 170	pTS184, 187	4.1.5

### 3.4.2 ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay

Für den ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay in Hefe [169, 180] wurden Expressionsbedingungen wie in Kapitel 3.4.1 dargelegt verwendet. Insgesamt wurden für jeden zwei Plasmide tragenden Hefestamm mindestens drei unabhängige ONPG-Wachstumsexperimente durchgeführt.

Von den Expressionskulturen wurden nach sechs Stunden 1,5 mL Kultur abgenommen und bei 15.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes, wurden die Zellen in 1,5 mL Z-Puffer durch vortexieren gelöst und erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes werden die Zellen in 300  $\mu$ L Z-Puffer gelöst, was in einem fünffachen Konzentrationsfaktor resultiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ L der Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und für ca. 0,5 – 1 min in flüssigem

Stickstoff eingefroren. Nach dem ca. 0,5 – 1 min dauerndem Auftauen im Wasserbad bei 37 °C wurde der Einfrier- und Auftauschritt zwei weitere Male wiederholt. Zusätzlich zu den Zellproben wird eine Blindprobe, bestehend aus 100 µL Z-Puffer, verwendet. Zu allen Proben wurde nun 700 µL Z-Puffer mit β-Mercaptoethanol gegeben. Nach der Addition von 160 µL ONPG in Z-Puffer erfolgte der Start der Inkubationsdauerermessung, und die Proben wurden bei 30 °C inkubiert. Nach der Gelbfärbung der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und die vergangene Zeit gemessen. Nach der Zentrifugation der Proben bei 15.000 rpm für 10 min erfolgte die Überführung des Überstandes in Küvetten. Nach der Kalibrierung des Spektrophotometers gegen die Blindprobe bei OD<sub>420</sub>, wurden die Werte für alle Zellproben gemessen.

Um die β-Galactosidase Einheiten (Miller Units) zu kalkulieren wurde folgende Formel verwendet:

$$\beta\text{-Galactosidase Einheiten} = 1.000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

mit t = die Inkubationsdauer mit der ONPG-Lösung

V = 0,1 ml x 5 (der Konzentrationsfaktor)

OD<sub>600</sub> = zum Zeitpunkt der Bestimmung der Miller Units

Dabei ist eine Einheit β-Galactosidase als die Menge Enzym definiert, die 1 µmol ONPG zu o-Nitrophenol und D-Galactose pro Minute und pro Zelle hydrolysiert [181].

### 3.4.3 Western-Blot-Analyse von *S. cerevisiae*-Zellen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots von *S. cerevisiae*-Gesamtzellextrakten wurde das ECL Western Blotting Kit (*GE Healthcare*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Verdünnungen der Primärantikörper waren wie folgt: Anti-His 1:2.000 (*Qiagen*), Anti-GST 1:1.000 (*Sigma Aldrich*), Anti-GFP 1:2.000 (*Roche*) / Anti-GFP 1:4.000 (*Covance*), Anti-HA (*Covance*) 1:1.000 und Anti-MBP (*Fermentas*) 1:10.000. Bei den HRP markierten Sekundärantikörpern handelte es sich entweder um einen Anti-Maus oder um einen Anti-Kaninchen Antikörper (beide *GE Healthcare*), der in einer Verdünnung von 1:4.000 verwendet wurde.

Bei dem Strippen von Western-Blot-Membranen wurden diese nach der erfolgreichen Entwicklung zuerst dreimal in ca. 10 mL TBST-Puffer gewaschen (50 rpm, 3 min, RT). Danach erfolgte die Inkubation der Membran in 50 mL Stripping-Puffer bei 50 °C für 30 Minuten und unter gelegentlichem Schütteln. Nach dem Entfernen des Stripping-Puffers folgte fünfmaliges Waschen der Membran in TBST-Puffer (50 rpm, 3 min, RT). Auf das



erneute Blocken der Membran (50 rpm, 1 h, RT) erfolgte die anschließende Rehybridisierung. Alle gestrippen Western Blots wurden mit dem Anti-Actin sc-1616 Antikörper (*Santa Cruz Biotechnology*) in einer Verdünnung von 1:500 reinkubiert. Der Western Blot erfolgte mit dem ECL Advanced Kit (*GE Healthcare*), wobei eine 1:40.000 Verdünnung eines Anti-Kaninchen Sekundärantikörpers eingesetzt wurde.

### 3.4.4 Präparation & mikroskopische Beobachtung der Hefezellen

Bevor die eigentliche Beobachtung der Zellen stattfinden konnte, mussten die 35 mm *MatTek*-Kulturschalen vorbehandelt werden, so dass die Hefezellen auf ihnen arretierten. Dazu wurde die Glasoberfläche der Schalen kurz mit 75 µL 1 M NaOH durch dreimaliges auf- und abpipettieren inkubiert. Die gleiche Vorgehensweise wurde für 75 µL Ethanol wiederholt. Nach einem Waschschrift mit H<sub>2</sub>O wurde die Glasoberfläche mit 100 µL einer einprozentigen Lösung aus Concanavalin A (*Carl Roth*) in PBS-Puffer für mehrere Stunden bei RT inkubiert. Die fertig behandelten *MatTet*-Kulturschalen wurden nach der Entfernung der Lösung und zweimaligen Waschen mit PBS-Puffer erhalten.

Nachdem der Zeitpunkt der mikroskopischen Betrachtung erreicht worden war (Expressionsbedingungen siehe Kapitel 3.4.1), wurde ein Kulturvolumen entsprechend einer OD<sub>600</sub> = 0,5 pelletiert und in 200 µL PBS-Puffer mit 2 % Glucose resuspendiert. Die Hälfte dieser Lösung wurde auf die Concanavalin A *MatTet*-Kulturschalen gegeben. Zur Betrachtung der Zellen diente ein *Leica* TCS SP5 Konfokal-Mikroskop mit einem HCX PL APO 63x Ölimmersionsobjektiv. Zur Anregung wurde ein Argonlaser (488 nm) verwendet und die eGFP-Fluoreszenz wurde von 504 - 530 nm detektiert. Für jeden unterschiedliche Plasmide tragenden Hefestamm wurde von mindestens 200 Einzellzellen die Lokalisation von eGFP bestimmt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der *Leica* LAS AF Software und sie wurden in ImageJ und Photoshop (*Adobe Systems*) bearbeitet.

## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Kultivierung und Passage von Zellkulturen

Die Arbeiten mit Säugerzellen erfolgten immer unter einer Sicherheitswerkbank (*NuAire*). Die Kultivierung der Zellen fand bei 37 °C in einer 5-prozentigen (v/v) CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert, nachdem sie eine Konfluenz von ca.

80 % erreicht hatten. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um adhären wachsende Zelllinien, d.h. sie mussten mittels Trypsin von den Zellkulturschalen gelöst werden. Falls nötig, wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer (*Brand*) bestimmt. Die genaue Durchführung der Protokolle wurde von Freshney übernommen [182].

Die Zellen, die in Mikroskopieexperimenten untersucht werden sollten, wurden in 35 mm Durchmesser *MatTek*-Kulturschalen mit Glasboden ausgesät. Die Zellen wurden für mindestens einen Tag kultiviert, danach erfolgte die Transfektion.

### 3.5.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die transiente Transfektion der Säugerzellen wurde das Transfektionsreagenz Genejuice (*Novagen*) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Alle in Transfektionen eingesetzten Plasmide wurden mittels Spin-Säulchen (*Qiagen*) gereinigt.

In den TEV-Protease-Experimenten wurden für alle Transfektionen 12-Well-Platten (*Sarstedt*) verwendet. Falls eine Transfektion mit dem Reporterplasmid (pTS137) erfolgte, wurden immer 200 ng DNA eingesetzt. Sowohl für die Plasmide der Positiv- (pTS162) und Negativkontrollen (pcDNA3) als auch die Plasmide der N-terminalen (pTS175, 176) und C-terminalen (pTS146, 148) TEV-Proteasefragmente wurden jeweils 600 ng DNA eingesetzt. Bei den gespaltenen TEV-Proteasen wurden von den komplementären Plasmiden jeweils 300 ng DNA eingesetzt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das DMEM-Medium gewechselt und die Zellen mit 500 nM Rapamycin oder 0,5 % DMSO versetzt. Nach der angegebenen Inkubationsdauer wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit SDS-Probenpuffer versetzt.

In den CobA-Experimenten wurden zur mikroskopischen Betrachtung die COS-7 Zellen in 35 mm *MatTek*-Kulturschalen mit Glasboden kultiviert. In allen Einzeltransfektionen wurden 1 µg Plasmid-DNA verwendet und bei den Doppeltransfektionen jeweils 500 ng DNA pro Plasmid. Die Negativkontrollen stellten ein pEGFP-N1-Vektor und der nur die N-terminale Hälfte codierende pSE32-Vektor dar. Als CobA-Positivkontrollen fungierten pSE27 (*cobA(WT)*) und pSE28 (*MBP-cobA*). Die für das gesplattene CobA kodierenden Plasmide waren pSE32 und pSE30 bzw. pSE32 und pSE31. Die Zellen wurden für mindestens 24 Stunden inkubiert, danach erfolgte die mikroskopische Betrachtung (Kapitel 3.5.4.)

### 3.5.3 Western-Blot-Analyse von eukaryotischen Zellen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots von Säugerzellen-Gesamtzellextrakten wurde das ECL Advanced Kit (*GE Healthcare*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Verdünnungen der Primärantikörper waren wie folgt: Anti-GFP (*Covance*) 1:2.000, Anti-HA (*Covance*) 1:500 und Anti-MBP (*Fermentas*) 1:5.000. Bei dem HRP markierten Sekundärantikörper handelte es sich um einen Anti-Maus Antikörper (*GE Healthcare*), der in einer Verdünnung von 1:40.000 verwendet wurde.

Bei dem Strippen von Western-Blot-Membranen wurden diese nach der erfolgreichen Entwicklung zuerst dreimal in ca. 10 mL TBST-Puffer gewaschen (50 rpm, 3 min, RT). Danach erfolgte die Inkubation der Membran in 50 mL Stripping-Puffer bei 50 °C für 30 Minuten und unter gelegentlichem Schütteln. Nach dem Entfernen des Stripping-Puffers folgte fünfmaliges Waschen der Membran in TBST-Puffer (50 rpm, 3 min, RT). Es folgte das erneute Blocken der Membran (50 rpm, 1 h, RT) und anschließend ihre Rehybridisierung. Alle gestrippen Western Blots wurden mit dem Anti-Actin sc-1616 Antikörper (*Santa Cruz Biotechnology*) in einer Verdünnung von 1:500 reinkubiert. Der Western Blot erfolgte mit dem ECL Advanced Kit (*GE Healthcare*), wobei eine 1:40.000 Verdünnung eines Anti-Kaninchen Sekundärantikörpers eingesetzt wurde.

### 3.5.4 Präparation & mikroskopische Beobachtung eukaryotischer Zellen

Vor der mikroskopischen Betrachtung der COS-7 Zellen wurde das Wachstumsmedium durch farbloses Imaging-Medium (Wachstumsmedium ohne farbigen pH-Indikator, *Pan Biotech*) ersetzt.

Zur Betrachtung von Säugerellen wurde das Olympus IX 81 Mikroskop mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv PlanApo N für Weitfeld-Experimente verwendet. Das Mikroskop verfügt über Filtersysteme zur gezielten Anregung und Beobachtung von rot und grün fluoreszierenden Proteinen. Für den GFP-Kanal wurde für die Anregung der Filter BrightLine HC 474/23 und für die Emission der Filter BrightLine HC 520/35 verwendet. Für den roten-Kanal (CobA-Experimente) wurden die Filter BrightLine HC 370/36 (Anregung) und BrightLine HC 629/53 (Emission) benutzt, alle von der Firma *Semrock*. Als Lichtquelle für Widefield-Mikroskopie wurden die Lampe MT-20 verwendet. Mit Hilfe einer Electron Multiplier CCD Digital Camera C9100-12 von *Hamamatsu* wurden Bilder von den Zellen aufgenommen. Das Mikroskop wurde über die Software cell<sup>^</sup>R (*Olympus*) gesteuert und die Bilder wurden weiter bearbeitet in ImageJ und Photoshop (*Adobe Systems*).

## 4 Ergebnisse

Bei der Anwendung von gespaltenen Inteinen auf neue Zielproteine ist es bis zum heutigen Tag nicht genau vorherzusehen, ob eine gewählte Insertionsposition zu einer effizienten Protein-*trans*-Spleißreaktion der Inteininfusionsproteine führen wird. Deshalb wurden in dieser Arbeit Intein-kassettenstrategien eingesetzt und entwickelt, um geeignete Positionen schnell und mit geringem Klonierungsaufwand zu identifizieren. Zum einen wurde eine konditionale Intein-kassette, die der Proteinfunktionskontrolle des Zielproteins dient, verwendet. Nach der Integration der Kassette besteht eine direkte Abhängigkeit der Spleißreaktion von der Präsenz des „small molecule“ Rapamycin. Mithilfe der in früheren Arbeiten generierten Kassette [157] wurde eine schaltbare TEV-Protease erzeugt und anschließend ihre Anwendbarkeit zur Proteinfunktionskontrolle durch Reporterproteinspaltung *in vivo* in Hefe und Zellkultur aufgezeigt (siehe Kapitel 4.1). Zum anderen wurden gemeinsam mit Joachim Zettler und Simone Eppmann drei gesplaltene Intein-kassetten entwickelt, die zur Proteinsynthese von Zielproteinen genutzt werden können (siehe Kapitel 4.2). Dabei erlauben die Kassetten eine schnelle und parallele Aktivitätsbestimmung der insertierten gespaltenen Inteine in den Zielproteinen. Neben einem Modellprotein wurde diese Methode darüber hinaus auf ein Enzym angewendet und die Rekonstitution seiner Aktivität durch Proteinspleißen mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Die entwickelten Kassetten sollen in Zukunft die Applikation von gespaltenen Inteinen vereinfachen und beschleunigen und somit zu einer höheren Attraktivität der Verwendung von Inteinen beitragen.

### 4.1 Generierung einer schaltbaren Protease

Neuere Erkenntnisse auf genetischer Ebene als auch auf Proteinebene zeigen, dass annähernd alle Akteure komplexer Signalwege Interaktionen mit multiplen Partnern eingehen [115, 183, 184]. Überdies begleiten Gene und Proteine häufig mehrere Funktionen, weshalb einfache eindimensionale Signalwege eher die Ausnahme darstellen. Ein wichtiger Faktor bei der Funktion und Aktivitätsvermittlung von Proteinen stellt die Lokalisation dar. So zeigten Proteom-Markierungsexperimente in Hefe, dass ungefähr 30 % aller Proteine subzellulär lokalisiert sind und davon über 20 % im Nucleus zu finden sind [122]. Somit können die resultierenden Protein-Interaktionsnetzwerke ferner nur zuverlässig untersucht werden, wenn ein spezifischer Partner möglichst präzise in räumlicher und zeitlicher Weise kontrollierbar ist.

In den letzten Jahren gab es große Vorschritte, Zielgene und damit verbunden deren Genprodukte, auf Ebene der DNA und RNA zu kontrollieren. In Säugetieren wurde dies zum Beispiel durch konditionale Knockouts mittels des Cre/loxP-Systems (Kapitel 1.2.2) und durch den konservierten Mechanismus der RNA-Interferenz (Kapitel 1.3.1) erreicht. Allerdings fehlt diesen Ansätzen die Kontrollmöglichkeit proteinspezifischer Komponenten wie Lokalisation und direkte Proteinaktivität. Ein Nachteil stellt ferner die Reaktionszeit dar, denn die Prozesse der Transkription bzw. Translation werden nur unterbrochen, wodurch es unmöglich ist, innerhalb von Sekunden oder Minuten einen Effekt zu erzielen.

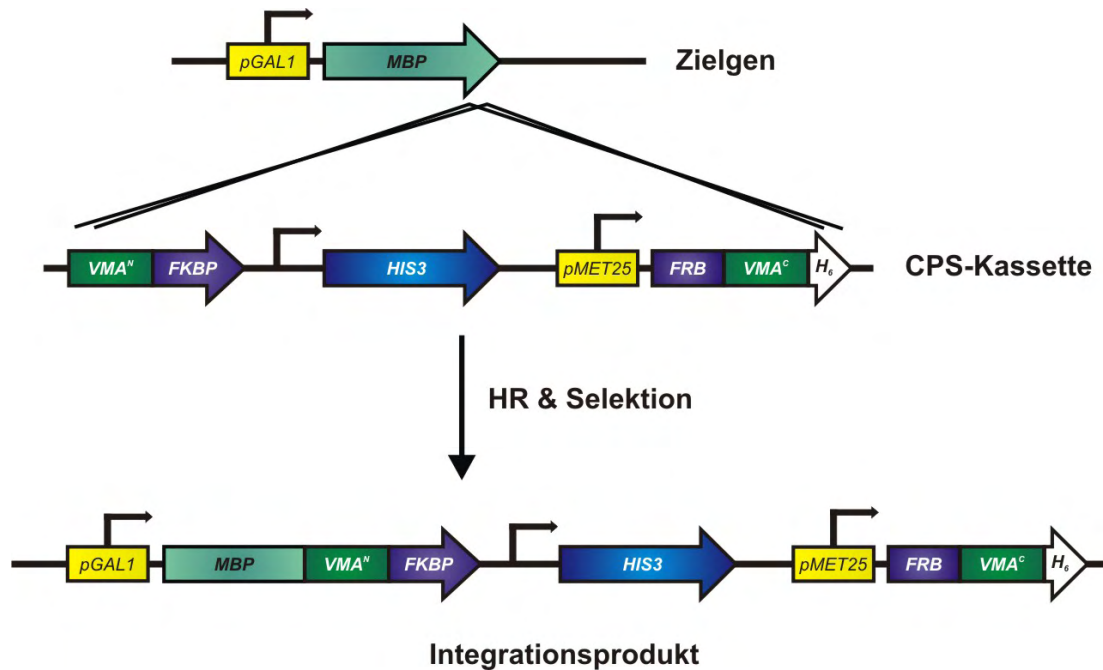
Ein Projekt innerhalb dieser Arbeit zielte darauf ab eine schaltbare TEV-Protease generiert werden, die es ermöglichen sollte Zielproteine durch definierte Spaltung in ihrer Aktivität oder Lokalisation zu beeinflussen. Das gewählte System zur Erzeugung der konditionalen Protease basiert auf dem FKBP/FRB/Rapamycin-Heterodimerisierungssystem (Kapitel 1.4.2) das in Verbindung mit dem künstlich gespaltenen *Sce* VMA-Intein dazu verwendet werden kann, die konditionale Proteinspleißreaktion (engl. conditional protein splicing, CPS) spezifisch durch Rapamycin zu kontrollieren (Kapitel 1.4.4). Der Einsatz von Rapamycin bringt allerdings auch negative Auswirkungen auf eukaryotische Zellen mit sich, da der essentielle Wachstumsregulator TOR inhibiert wird (Kapitel 1.4.1). Diese können aber durch nichttoxische Rapaloge [127, 128] oder zumindest in Hefe durch Mutationen in den TOR-Genen [125, 126] umgangen werden.

Das Problem eine gespalte TEV-Protease mit konditional aktivem VMA-Intein zu identifizieren, wurde mit einem in meiner Diplomarbeit entwickelten Kassettensystem gelöst [157]. Dieses System erlaubt es, schnell und parallel Intein-Insertionspositionen in beliebigen Zielgenen zu erzeugen. Die zeitliche und arbeitstechnische Ersparnis ist deshalb von Bedeutung, da ein Großteil der getesteten Positionen aufgrund des Einflusses des Exteinkontextes zur Inaktivität des Inteins führt (siehe Kapitel 4.2).

### **4.1.1 Das Prinzip der konditional gespaltenen Inteinkassette**

Die konditional gespalte Inteinkassette (CPS-Kassette) basiert auf dem künstlich gespaltenen *Sce* VMA-Intein. Entscheidend ist, dass die N- und C-terminalen Inteinhälften (N' und C'VMA) keine oder nur geringe natürliche Affinität zueinander aufweisen, aber durch die fusionierten Dimerisierungsdomänen FKBP und FRB sowie die Zugabe von Rapamycin in räumliche Nähe gebracht und damit zum aktiven Intein rekonstituiert werden können (Kapitel 1.4.4). In meiner Diplomarbeit wurde die CPS-Kassette aus den drei DNA-Fragmenten für *N'VMA-FKBP*, dem *HIS3*-Auxotrophiemarker, und *FRB-C'VMA*, das unter

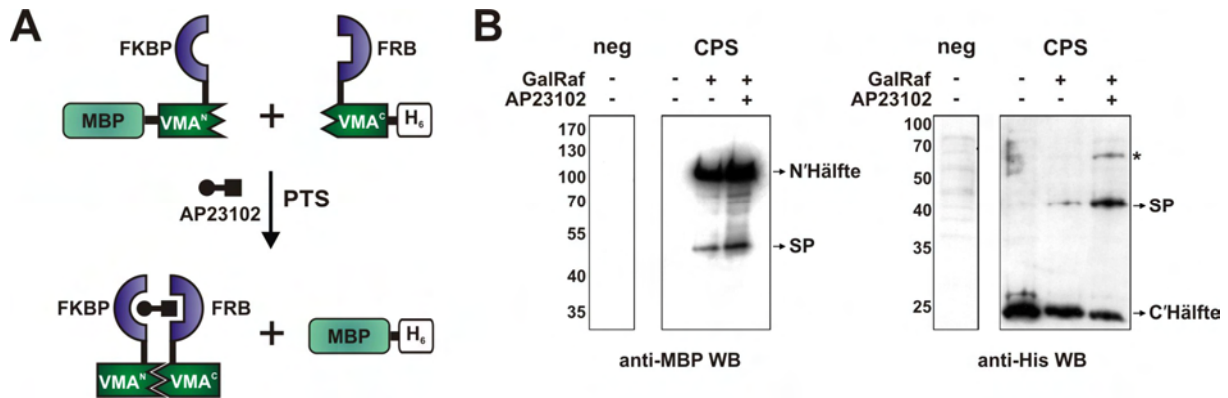
der Kontrolle des schwachen, induzierbaren *MET25*-Promotors steht, zusammengefügt. Nach PCR-Amplifikation mit geeigneten Oligonukleotiden, die der Kassette die benötigten homologen Sequenzen für die Integration in das Modellgen *MBP* (Maltose-bindendes Protein) verliehen, fand ihre Integration über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* statt [157] (Abbildung 17).



**Abbildung 17. Das Integrationsprinzip der konditionalen Inteinkassette**

Die Abbildung zeigt die ursprünglich generierte CPS-Kassette und ihre in *S. cerevisiae* stattfindende Integration in das unter der Kontrolle vom *GALI*-Promotor stehende Modell-Zielgen *MBP*. Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Amplifikation der CPS-Kassette mit speziellen Oligonukleotiden, die jeweils 40 bp homologe Sequenzen zu der Integrationsposition im Zielgen am 5'- und 3'-Ende des PCR Produkts addieren. Anschließend kann das ungereinigte PCR-Produkt in einen das Zielgen enthaltenden Hefestamm transformiert werden, der nach stattgefundener homologer Rekombination (HR) eine Selektion auf den *HIS3*-Marker zulässt.

Nach erfolgreicher Selektion im Minimalmedium auf den *HIS3*-Marker konnte die prinzipielle Funktionalität der Inteinhälften durch den Nachweis des Spleißproduktes *MBP*-*His<sub>6</sub>* mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden (Abbildung 18). Die Aktivität des Inteins ließ sich durch Zugabe von Rapamycin oder dem Rapalog AP23102 in das Wachstumsmedium steigern, allerdings wurde Protein-Spleißen darüber hinaus auch in Abwesenheit des „small molecule“ beobachtet.



**Abbildung 18. Die konditionale Spleißreaktion von Reporterproteinen**

A) Schematische Darstellung der Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) *in vivo*. Die beiden Proteine resultieren aus der Expression der zwei entstandenen ORFs auf dem Integrationsplasmid. Durch die Zugabe des nichttoxischen Rapalogs AP23102 bildet sich der FKBP/FRB-Komplex, was zum Ablauf der PTS-Reaktion und der Bildung des Spleißproduktes MBP-His<sub>6</sub> führt. B) Western Blots (WB) des Gesamtzell-extraktes, welche die über Nacht dauernde konditionale Proteinspleißreaktion (CPS) unter der Zugabe von AP23102 zeigen. Sowohl MBP-N<sup>N</sup>VMA-FKBP (N<sup>N</sup>Hälfte = 77,5 kDa), FRB-N<sup>N</sup>VMA-His<sub>6</sub> (C<sup>N</sup>Hälfte = 21,2 kDa) als auch das gebildete Spleißprodukt MBP-His<sub>6</sub> (SP = 45,2 kDa) konnten nachgewiesen werden. Das Wachstumsmedium enthielt entweder 2 % Glucose (GalRaf -), um dem *GAL1*-Promotor stummzuschalten, oder 2 % Galactose und 1 % Raffinose (GalRaf +), um ihn zu induzieren. Eine finale Konzentration von 0,2 μM AP23102 wurde benutzt um die CPS-Reaktion zu induzieren. Die Negativkontrolle (neg) enthielt einen leeren Vektor.

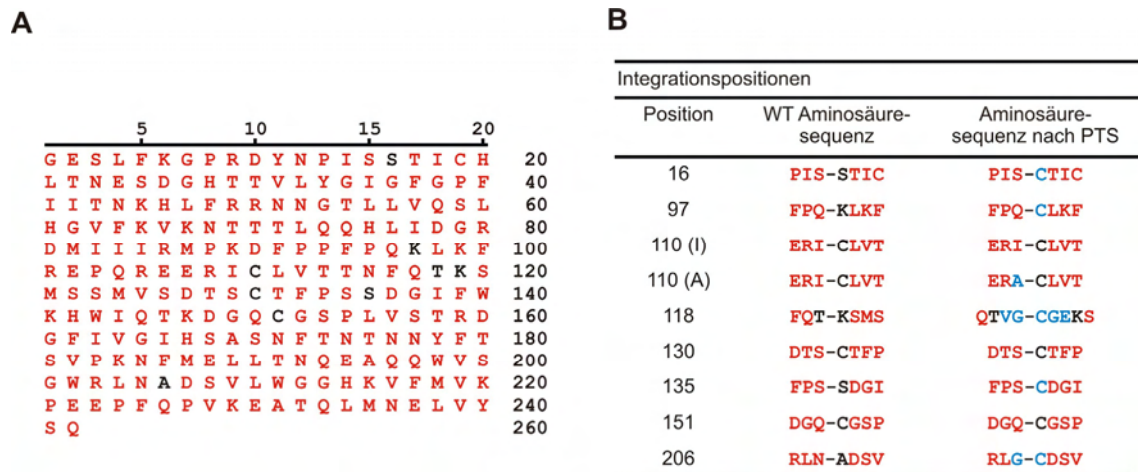
In weiteren Experimenten wurde versucht leicht nachweisbare, essentielle Selektionsmarker-Proteine (LEU2, KanMX4) schaltbar zu machen. Allerdings konnten keine geeigneten Insertionspositionen identifiziert werden, um die Proteine qualitativ zu kontrollieren und einen sichtbaren Phänotyp zu erzeugen [157]. Eventuell ermöglicht das nachweisbare Hintergrundspießen das Wachstum der Zellen, wenngleich bei einer sehr geringen Konzentration an Selektionsmarker-Proteinen. Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals die Schwierigkeit bzw. den notwendigen Aufwand, geeignete Intein-Insertionsstellen in Zielproteinen zu identifizieren.

#### 4.1.2 Integration der CPS-Kassette in die TEV-Protease

Die Protease des Tabakätzvirus (engl. Tobacco Etch Virus, TEV) ist eine hochspezifische virale Protease, die breite Anwendung in der Proteinreinigung findet [185]. Diese 242 Aminosäuren große Cysteinprotease besitzt eine hochkonservierte, und außerordentlich selten in Eukaryoten vorkommende Erkennungssequenz Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln | (Gly/Ser). Die Spaltung der Peptidbindung erfolgt nach dem Glutamin, wenn entweder Glycin oder Serin als C-terminaler Rest vorliegt [186]. Heterologe Expressionen der TEV-Protease in *S. cerevisiae* [187] und Säugerzellen [188] sind ohne toxische Nebeneffekte möglich. In dieser Arbeit wurde eine autoproteolyseresistente Variante der TEV-Protease verwendet TEV(S219V), für

die *in vitro* eine Wechselzahl  $k_{cat}$  von  $0,19 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde [189]. Damit zeigt die TEV-Protease zwar eine geringe Geschwindigkeit bei der Spaltung von Substraten, aber dafür verläuft dieser Prozess durch die Erkennungssequenz hochspezifisch.

Im ersten Schritt wurden nun unterschiedliche, auf dem *GALI*-Promotor basierende Hefe-Expressionsvektoren generiert, welche die Fusionsgene der TEV-Protease trugen (*His<sub>10</sub>-TEV* und *His<sub>6</sub>-GST-TEV*). Für die Integration der CPS-Kassette wurden 9 verschiedene Positionen im Proteasegen ausgewählt (Abbildung 19).



**Abbildung 19. Auswahl der Integrationspositionen in der TEV-Protease**

A) Die Primärsequenz der TEV-Protease ist in rot und die ausgewählten Integrationspositionen für die CPS-Kassette in schwarz dargestellt B) In dieser Tabelle werden die Integrationspositionen in ihrer Wildtypsequenz (WT) und der Sequenz nach dem Ablauf der Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) aufgeschlüsselt. Dabei sind die Aminosäuren, die von der Wildtypsequenz abweichen, in blau hervorgehoben.

Ein Auswahlkriterium der Insertionspositionen waren natürlich vorkommende Cysteine oder Serine in der Primärsequenz der TEV-Protease. Nach dem VMA-Intein vermittelten Protein-*trans*-Spleißen (PTS), dessen einziges Überbleibsel ein Cystein darstellt, sollte damit eine der Wildtypsequenz möglichst ähnliche, vollständig aktive TEV-Protease erzeugen werden. In zwei Fällen wurden über die Integrationsprimer Adaptionen in den Codons der -1 Position vorgenommen. Die Veränderung dieser Aminosäuren wurde aufgrund anderer Studien mit dem *in cis* verwendeten VMA-Intein vorgenommen, die eine Inhibition der *in-vivo*-Spleißreaktion für Ile und Asn an -1 feststellte [21] (Abbildung 19 B). Für die anderen Integrationspositionen wurden, basierend auf der Kristallstruktur einer inaktiven TEV(C151A)-Mutante, Schlaufenregionen in der TEV-Protease ausgewählt (Abbildung 20).

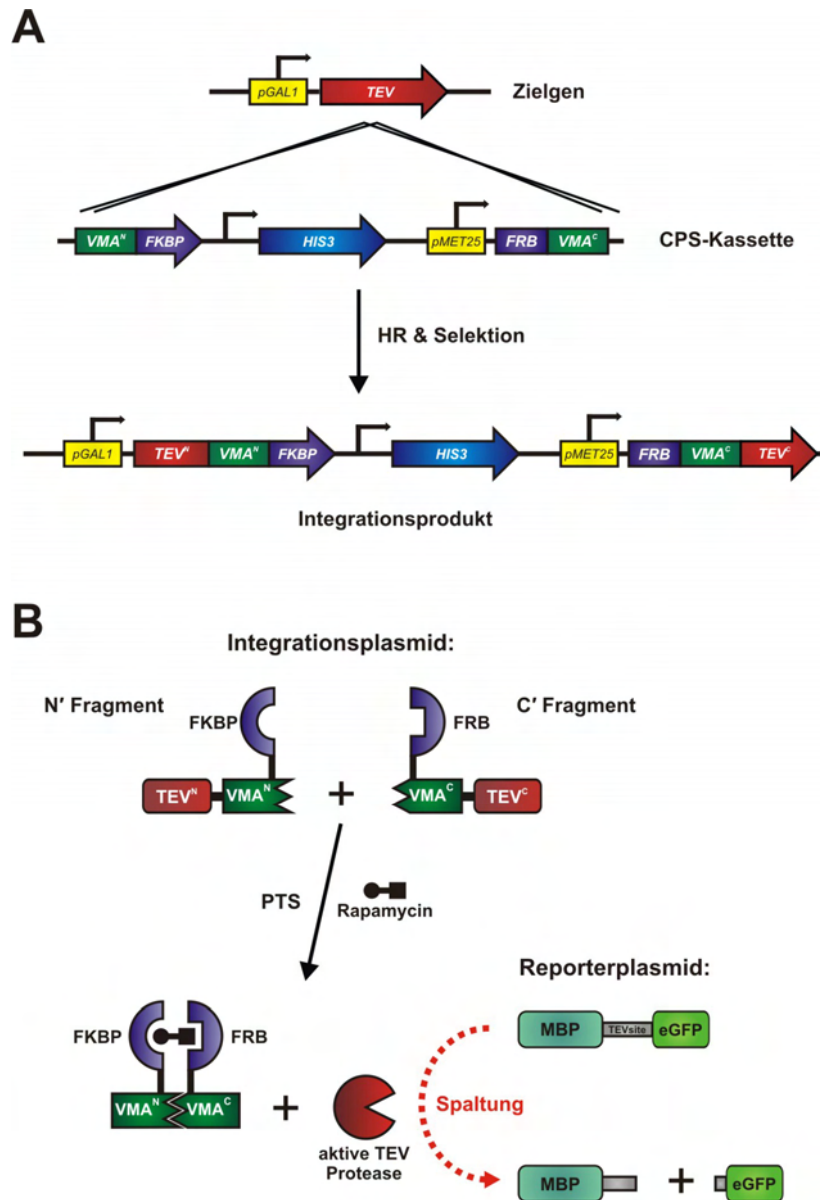




**Abbildung 20. Struktur der TEV-Protease mit den ausgewählten Integrationspositionen**

Diese Kristallstruktur zeigt die TEV(C151A)-Mutante (PDB ID: 1Q31 [190]). Alle ausgewählten Integrationspositionen wurden hervorgehoben und beschriftet. Die Abbildung wurde generiert mit PyMOL (*Schrödinger*).

Die Auswahl dieser Positionen sollte zu möglichst stabilen Proteinfragmenten führen und damit eine durch Fehlfaltungen ausgelöste Beeinflussung sowohl der Komponenten des Dimerisierungssystems als auch der VMA-Inteinhälften auf ein Minimum reduzieren. Eine der ausgewählten Positionen (118) wurde bereits als funktionale Spaltposition der TEV-Protease in der Literatur beschrieben [188]. In dieser Position erfolgte eine Insertion der Wildtyp-Aminosäuren des VMA-Inteins von Position -2 bis +3 (Abbildung 19 B). Nach der Integration der amplifizierten CPS-Kassetten an allen besagten Positionen erfolgte die Analyse der Protein-*trans*-Spleißreaktion und der TEV-Proteaseaktivität (Abbildung 21).

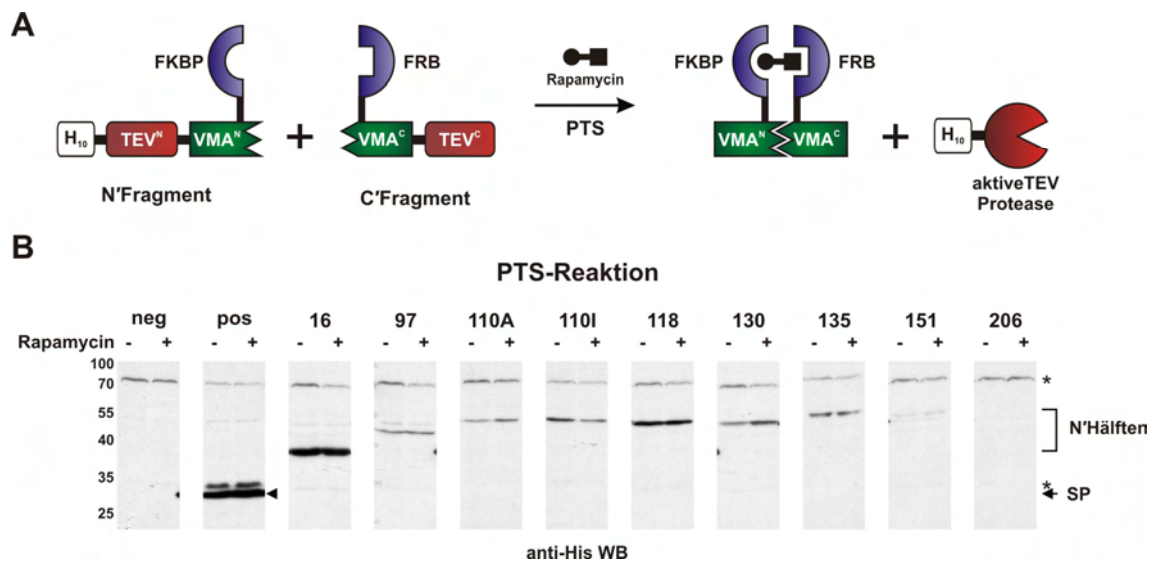


**Abbildung 21. Integration und PTS-Reaktion der TEV-Protease**

(A) Das Schema zeigt die zielgerichtete Integration einer PCR amplifizierten CPS-Kassette in das TEV-Proteasegen. Nach homologer Rekombination (HR) und Selektion auf den *HIS3*-Auxotrophiemarker entsteht ein Integrationsprodukt, bei dem das TEV-Proteasegen in zwei Fragmente geteilt ist. Diese Fragmente sind mit den korrespondierenden Elementen des CPS-Systems fusioniert und ihre Genexpression wird über zwei individuelle Promotoren kontrolliert. B) Hier wird die in Hefe stattfindende *in vivo* Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) schematisch dargestellt. Nach der Zugabe des „small molecule“ Rapamycin in das Wachstumsmedium bildet sich der FKBP/FRB/Rapamycin-Komplex, der die VMA-Inteinhälften in räumliche Nähe bringt und dadurch ihre Aktivität rekonstituiert. In der nachfolgenden PTS-Reaktion werden die N- und C-terminalen TEV-Protease-Fragmente (N'TEV und C'TEV) durch eine native Peptidbindung miteinander verknüpft und damit die aktive TEV-Protease gebildet. Sowohl das Stattfinden der PTS-Reaktion als auch die Aktivität der TEV-Protease kann mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Im Falle der Proteaseaktivität gelingt dies durch die Spaltung des Reporterproteins MBP-TEVsite-eGFP in seine einzelnen Proteinfragmente.

Zuerst wurde die Integration der CPS-Kassette in den *His<sub>10</sub>-TEV*-Gen tragenden Vektor untersucht. Durch eine über Nacht dauernde Koexpression der Inteinfusionsgene von

den generierten Integrationsplasmiden in Verbindung mit dem Reporterplasmid konnten die PTS-Reaktionen (Abbildung 22) und die Aktivität der TEV-Protease untersucht werden. Die Genexpression fand in einem Rapamycin-resistenten Stamm statt und wurde durch die Anwesenheit von Galactose/Raffinose im Medium induziert. Das in hoher Kopienzahl vorliegende Reporterplasmid kodierte hierbei für ein Fusionsprotein aus dem Maltosebindenden Protein (MBP) aus *E. coli* und dem verbesserten grün fluoreszierenden Protein (engl. enhanced green fluorescent protein, eGFP), die über die Erkennungssequenz der TEV-Protease (TEVsite) miteinander verknüpft wurden.

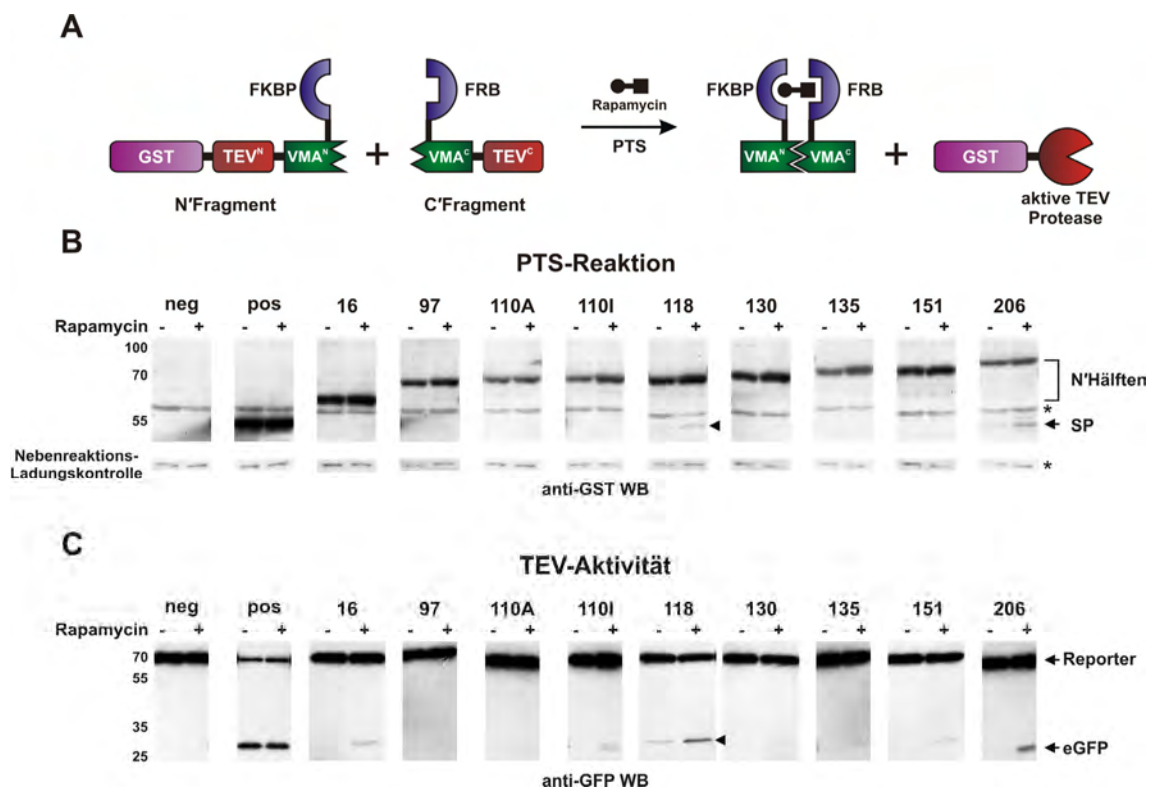


**Abbildung 22. Die PTS-Reaktion von His<sub>10</sub>-TEV**

A) Schematische Darstellung der rapamycinabhängigen PTS-Reaktion, dessen Ablaufen zur Bildung des Spleißproduktes (SP) His<sub>10</sub>-TEV führt. B) Western Blot des Gesamtzellextrakt nach Expression über Nacht in Anwesen- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M Rapamycin. Die Negativkontrolle (neg) enthält nur einen leeren Vektor, während die Positivkontrolle (pos = 30,7 kDa) hingegen das gesamte His<sub>10</sub>-TEV-Gen exprimiert. Durch die Expression der Integrationsplasmide werden N-terminale Fusionsproteine (N'Hälften = 39,0 kDa - 60,6 kDa) unterschiedlicher Größen gebildet. Bei keiner der untersuchten Insertionspositionen konnte das Spleißprodukt (SP = 30,7 kDa) nachgewiesen werden.

Die Expression der Gene der His<sub>10</sub>-TEV-Integrationsplasmide führte trotz der Inkubation mit 1  $\mu$ M Rapamycin in keinem der Fälle zur Bildung des Spleißproduktes (Abbildung 22 B). Diese Beobachtung spricht für womöglich fehlgefaltete Fusionsproteine, die durch die CPS-Kassettenintegration erzeugt wurden. Schon die Synthese der N-terminalen Fusionsproteine (His<sub>10</sub>-N'TEV-N'VMA-FKBP) führte zu einer sehr variablen Ausbeute der Proteinmengen. Die Destabilisierung der Hälften war für Position 151 und 206 am stärksten, bei 206 waren sogar nur geringste Mengen im Western Blot detektierbar. Ebenfalls konnte bei keiner der gespaltenen TEV-Proteasen Reporterspaltung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Damit korrelierte diese Beobachtung mit der Abwesenheit des Spleißproduktes.

Um die Probleme mit der Destabilisierung der N-terminalen His<sub>10</sub>-TEV-Hälften zu lösen, war der nächste Schritt die Integration der CPS-Kassette in einen *GST-TEV*-kodierenden Vektor (Abbildung 23 A). Die Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* ist ein gut charakterisiertes Fusionsprotein, welches die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen erhöhen kann [191]. Erneut erfolgte eine Koexpression der generierten Integrationsplasmide mit dem Reporterplasmid über Nacht in einem Galactose/Raffinose-Medium mit anschließender Untersuchung der Spleißreaktion (Abbildung 23 B) und der TEV-Proteaseaktivität (Abbildung 23 C) mittels Western Blot.



**Abbildung 23. Die PTS-Reaktion von GST-TEV und seine Proteaseaktivität**

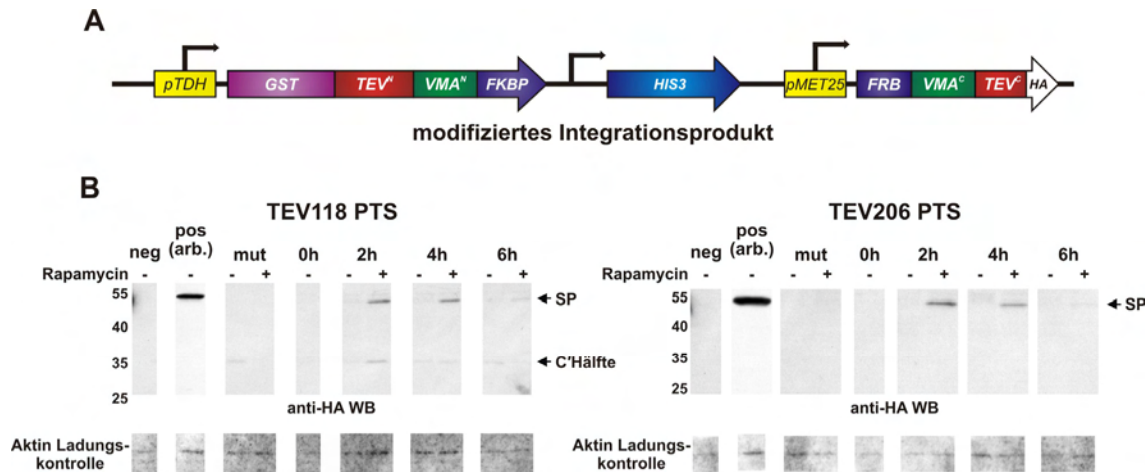
A) Schematische Darstellung der rapamycinabhängigen PTS-Reaktion, dessen Ablauf zur Bildung des Spleißproduktes GST-TEV führt. B) und C) Western Blots des Gesamtzellextraktes nach Expression über Nacht in Anwesen- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M Rapamycin. Die Negativkontrolle (neg) enthält nur einen leeren Vektor, während die Positivkontrolle (pos = 55,7 kDa) hingegen das gesamte *GST-TEV*-Gen exprimiert. Die Expression der Integrationsplasmide führte zur Synthese der N-terminalen Fusionsproteine (N-Hälften = 64,1 kDa - 85,7 kDa) unterschiedlicher Größe und in zwei Fällen bildete sich das Spleißprodukt (SP = 55,7 kDa). Die TEV-Proteaseaktivität konnte durch Spaltung des MBP-TEVsite-eGFP-Reporterproteins (71,1 kDa) nachgewiesen werden (eGFP = 27,2 kDa).

Im Gegensatz zu den His<sub>10</sub>-TEV-Fusionsproteinen konnte eine vergleichbare Intensität der GST-Fusionsproteine im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 23 B). Damit zeigten die N-terminalen TEV-Hälften das erwünschte gleiche Expressionslevel und die gleiche Stabilität. In dem Anti-GST-Western-Blot konnte in zwei Fällen, Position 118 und

206, die Bildung von Spleißprodukt detektiert werden. Ferner konnte ohne die Zugabe von Rapamycin an diesen Positionen geringe Mengen von Spleißprodukt beobachtet werden. Dieser Prozess wird als Hintergrundspießen bezeichnet und wurde darüber hinaus schon in vorhergehenden PTS-Experimenten *in vivo* beobachtet [152, 157]. Entscheidend war, dass die Spleißproduktbildung mit der durch Reporterspaltung zu eGFP detektierten TEV-Aktivität, in diesen zwei Positionen korrelierte (Abbildung 23 C). Dies deutete darauf hin, dass aktive und CPS-abhängige TEV-Proteasen generiert wurden. Ferner führte die Zugabe von Rapamycin bei weiteren Integrationsplasmiden in nachweisbarer TEV-Aktivität. Die rapamycinabhängige Proteaseaktivität lässt sich entweder auf geringste, nicht mittels Western Blot detektierbare Mengen von gebildetem Spleißprodukt oder auf vom Proteinspleißen unabhängige Protein-Fragment-Komplementation zurückführen.

### 4.1.3 Charakterisierung der schaltbaren TEV-Proteasen 118 und 206

Die Integration der CPS-Kassette in GST-TEV führte zur Identifikation von zwei Integrationspositionen, bei denen sich nicht nur das Spleißprodukt bildete, sondern ferner zusätzlich konditionale TEV-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Im nächsten Schritt wurden zunächst die kodierenden Bereiche der entsprechenden integrierten Intein-kassetten in ein konstitutives, schwächeres Expressionssystem überführt, das kein Galactose/Raffinose-Medium zu dessen Induktion benötigte. Zugleich wurde am 3'-Ende des für die C-terminale Hälfte kodierenden Fusionsgens eine HA-Epitop-Tag kodierende Sequenz addiert, um sowohl das entstehende Spleißprodukt als auch die C-terminale Hälfte detektieren zu können (Abbildung 24 A). Diese finalen Konstrukte werden von nun an als TEV 118 und TEV 206 abgekürzt. Um die TEV-Aktivität direkt mit der Bildung von Spleißprodukt zu verknüpfen, wurden zur Kontrolle Spleißmutanten der VMA-Inteine von TEV 118 und 206 erzeugt. In diesen Plasmiden (TEV118 mut und TEV206 mut) wurde das Codon für das Cystein an Position 1 des Inteins in ein Alanin-Codon mutiert, um das Ablaufen der Spleißreaktion zu verhindern (Kapitel 1.1.1). Zusätzlich wurde, um die Expression des Reportergens zu vermindern, der 2 $\mu$ -Replikationsursprung des Reporterplasmids gegen einen ARS/CEN-Ursprung ausgetauscht. In den folgenden Experimenten sollte nun eine zeitliche Charakterisierung sowohl der Spleißproduktbildung als auch der Spaltung des Reporterproteins erfolgen. Die Probenentnahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Rapamycin (Abbildung 24 B). In allen folgenden Experimenten wuchsen die Hefestämme über Nacht; die jeweilige Kultur wurde anschließend geteilt und entweder mit DMSO oder mit Rapamycin versetzt (für Details der Durchführung siehe Kapitel 3.4.1).



**Abbildung 24. Die PTS-Reaktion der modifizierten TEV-Proteasen 118 & 206**

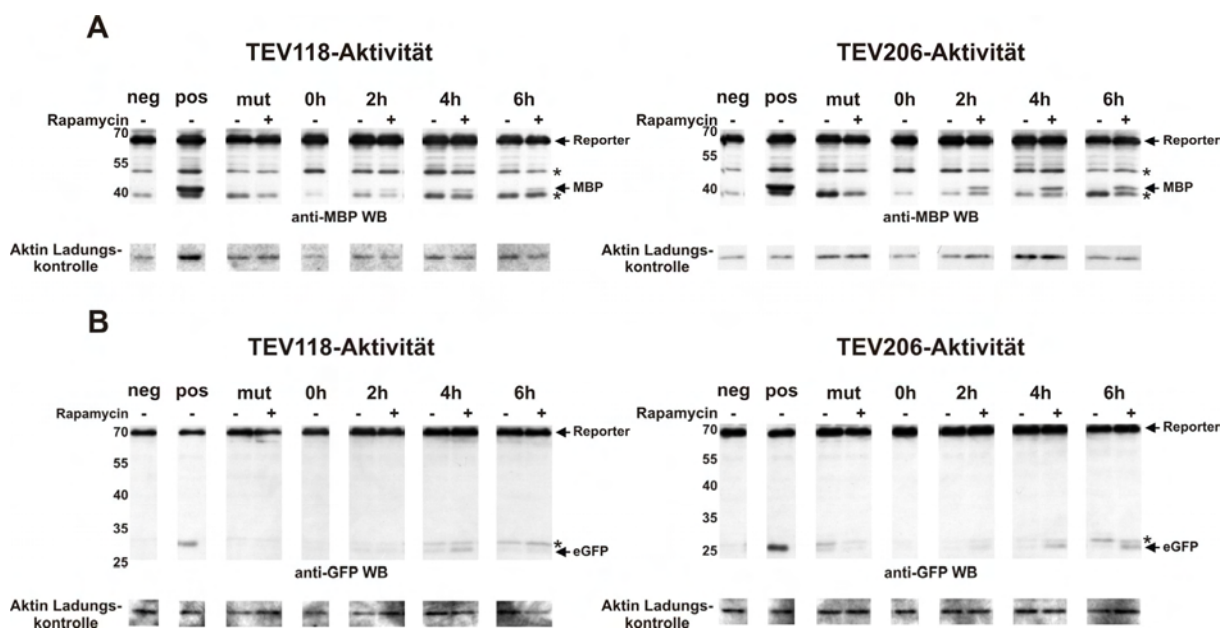
A) Schematische Darstellung der modifizierten Integrationsplasmide 118 und 206. Der *GAL1*-Promotor wurde durch den *TDH*-Promotor ersetzt, der eine konstitutive Expression ohne Mediumswechsel erlaubt. Zusätzlich wurde die Sequenz für einen HA-Epitop-Tag an das 3'-Ende addiert, der die Detektion des C-terminalen TEV-Proteasefusionsproteins ermöglicht. B) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes. Alle Zellen koexprimieren zwei Plasmide, von denen eines immer das für *MBP-TEVsite-eGFP* kodierende Reporterplasmid ist. Für die an Position 118 und 206 gespaltenen TEV-Proteasen wurde das Spleißprodukt (SP 118 = 57,0 kDa, SP 206 56,5 kDa) zu unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert. Im Falle von TEV 118 wurde ferner das C-terminale Fusionsprotein (C'Hälfte = 34,3 kDa) nachgewiesen. Die erzeugten Spleißmutanten (mut) von TEV 118 und 206 zeigten keine SP-Bildung. Das Wachstum der nur einen leeren Vektor tragenden Negativkontrolle (neg), der *GST-TEV-HA*-Positivkontrolle (pos = 56,5 kDa) und der Spleißmutanten fand für sechs Stunden statt. (arb. = kurze Belichtungszeit, - = DMSO und + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

Schon zwei Stunden nach der Zugabe von Rapamycin bildeten TEV 118 und 206 das Spleißprodukt, welches in den DMSO-Kontrollproben nicht detektiert werden konnte (Abbildung 24 B). Die relative Menge an Spleißprodukt nahm mit der Zunahme der Inkubationsdauer (vier und sechs Stunden) ab. Überdies konnte für TEV 118 das C-terminale Fusionsprotein nachgewiesen werden, dessen zeitabhängige Intensität bei Zugabe von Rapamycin abnahm und ohne Rapamycin zunahm. Rapamycin scheint zusätzlich die Stabilität des C-terminalen Fusionsproteins zu stabilisieren. Bei beiden gespaltenen Proteasen TEV 118 und 206 konnte kein Hintergrundspießen beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die geänderte und verringerte Expressionsmenge innerhalb der kürzeren Experimentdauer zurückzuführen. Entsprechend der Analyse der Bildung des Spleißproduktes folgte des Weiteren die Untersuchung auf TEV-Aktivität (Abbildung 25).

Die Aktivität von TEV 118 und 206 konnte schon nach zwei Stunden durch sowohl den Anti-MBP- als auch den Anti-GFP-Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 25 A & B). Das Maximum der Spaltreaktion zu MBP und eGFP lag aber zwischen vier und sechs Stunden. Dieses verschobene Maximum der beobachtbaren Spaltreaktion zum Maximum der durch die PTS-Reaktion gebildeten aktiven TEV-Protease beruht wahrscheinlich auf der



geringen Geschwindigkeit der TEV-Protease bei der Umsetzung ihrer Substrate [189]. Die mit DMSO oder Rapamycin inkubierten Stämme der Spleißmutanten zeigten im Anti-MBP-Western-Blot keine detektierbare TEV-Aktivität. Damit kann eine induzierte Protein-Fragment-Komplementation ausgeschlossen werden (Abbildung 25 A). Dagegen war im Anti-GFP-Western-Blot bereits in der Negativkontrolle, die das Reporterplasmid mit einem leeren Vektor koexprimiert, eine sehr schwache Doppelbande detektierbar war, die darüber hinaus das spezifisch gespaltene eGFP miteinschloss (Abbildung 25 B). Eine Erklärung gestaltet sich als schwierig, da dieses potentiell unspezifische Spaltungsprodukt nur vom Anti-GFP- und nicht vom Anti-MBP-Western-Blot erkannt wurde.

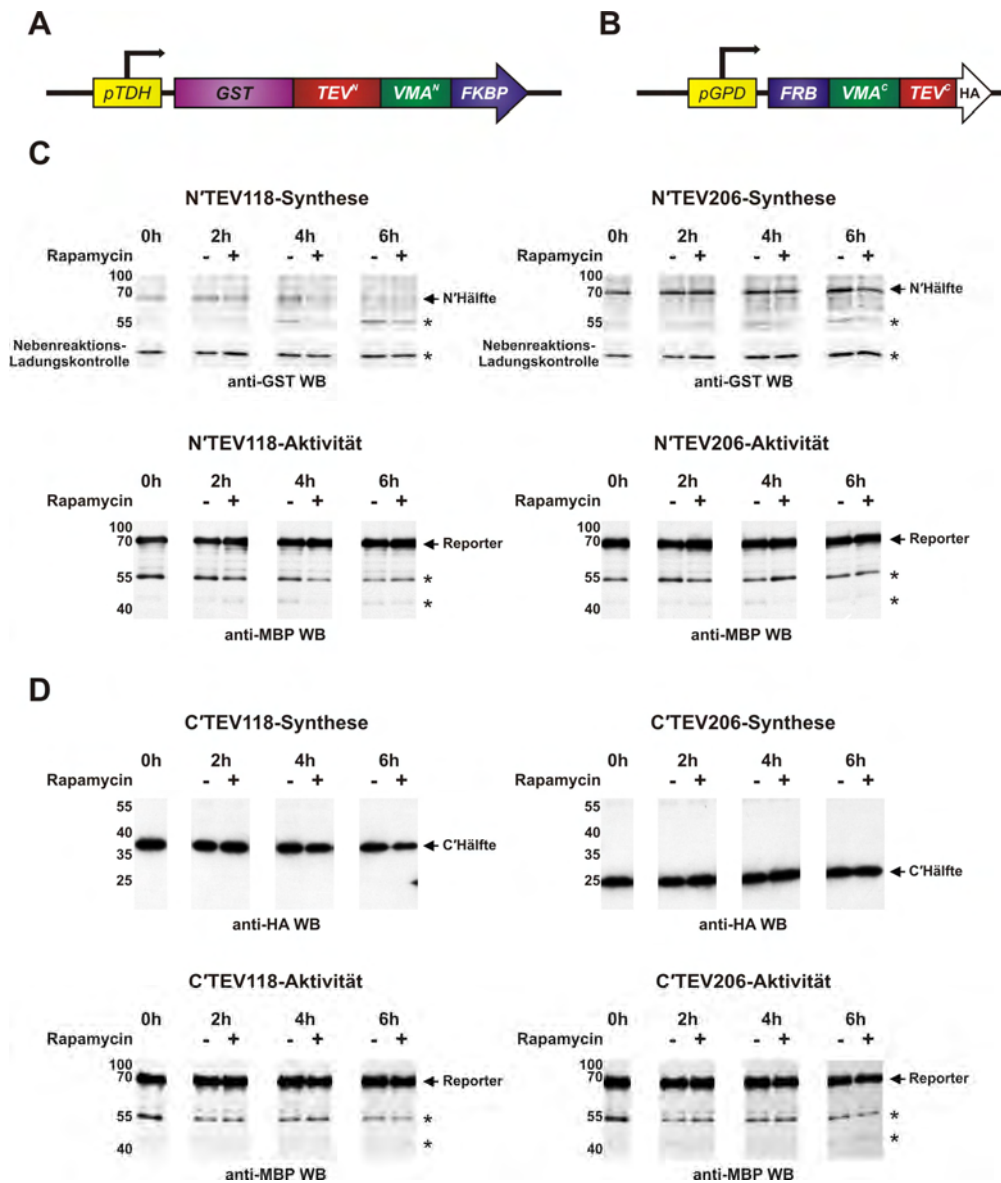


**Abbildung 25. Die Aktivität der modifizierten TEV-Proteasen 118 & 206**

Die Abbildung zeigt den A) Anti-MBP- und B) Anti-GFP-Western-Blot des Gesamtzell-extraktes der untersuchten Stämme. Alle Zellen koexprimierten zwei Plasmide, von denen eines immer das für *MBP-TEVsite-eGFP* kodierende Reporterplasmid war. Die Positivkontrolle *GST-TEV-HA* (pos) und auch TEV 118 und 206 zeigen Reporterprotein-Spaltung (71,1 kDa) zu eGFP (27,2 kDa) und MBP (43,9 kDa). Für die Spleißmutanten (mut), die Negativkontrolle mit leerem Vektor (neg) und die Positivkontrolle erfolgte das Wachstum für sechs Stunden. (- = DMSO und + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

Eine densitometrische Auswertung der Intensitäten der Proteolysebanden (Photoshop) ergab, dass die mittels CPS generierten TEV-Proteasen im Vergleich mit der Positivkontrolle bis maximal ein Fünftel der Spaltungsmenge erzeugen konnten. Der Aktivitätsunterschied lässt sich auf die konstitutive Expression der *GST-TEV-HA*-Positivkontrolle durch den *TDH*-Promotor zurückführen, die schon vor dem eigentlichen Start des Experiments durch Zugabe von Rapamycin stattfindet. Um vollständig auszuschließen, dass keine der alleinigen N- oder C-terminalen TEV-118- oder TEV-206-Hälften noch Proteaseaktivität aufweisen, wurden die

Fusionsgene in einzelne Vektoren umklontiert und ihre Genexpression unter den gleichen Bedingungen wie zuvor TEV 118 und 206 analysiert (Abbildung 26).



**Abbildung 26. Kontrolle der Aktivität der N- und C-terminalen TEV-Proteasehälften**

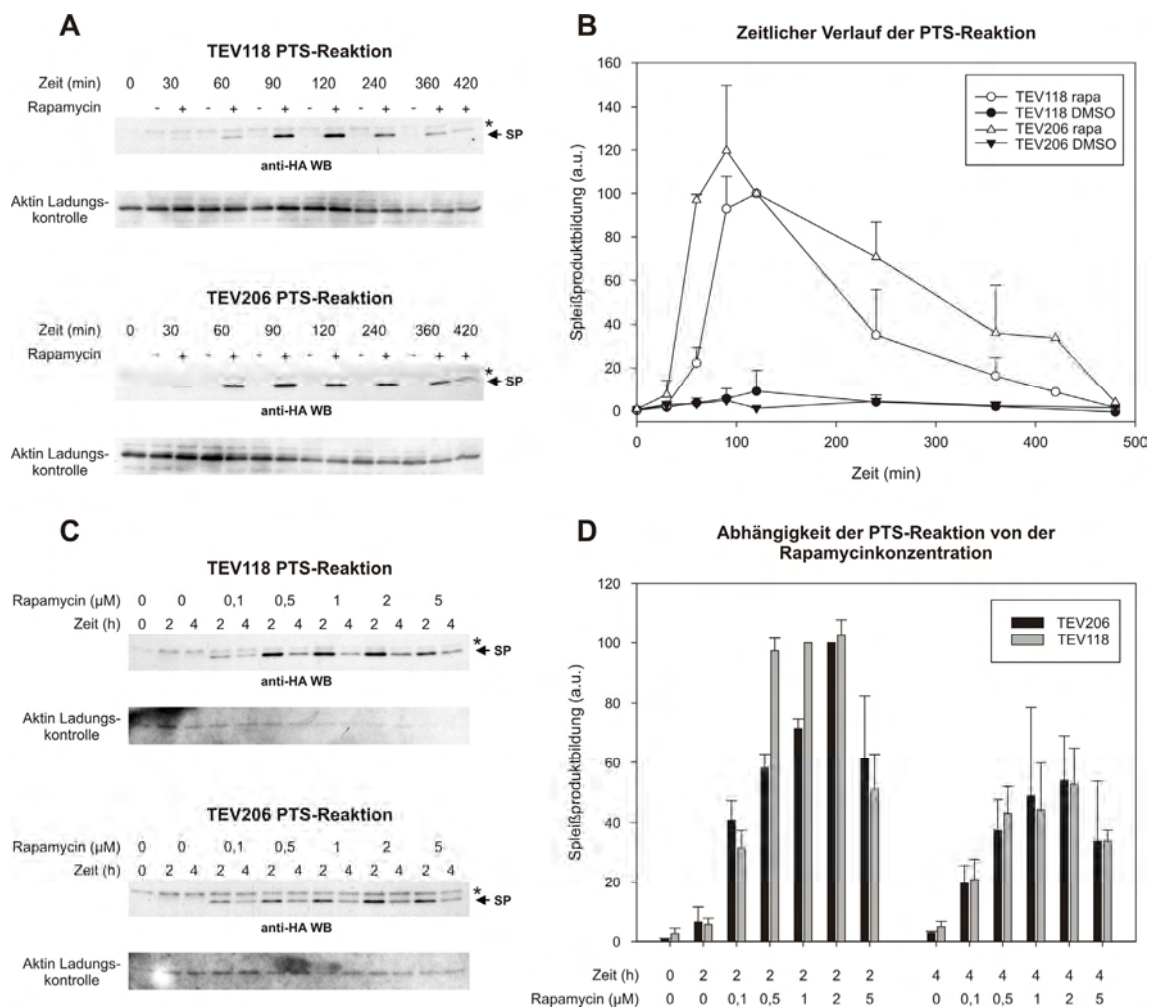
Schematische Darstellung der kodierenden Plasmidbereiche des A) N-terminalen (*GST-NTEV-NVMA-FKBP*) und B) C-terminalen (*FRB-CVMA-CTEV-HA*) Fragments. Im Falle des Fusionsgens, das die C-terminale Hälfte synthetisiert, ersetzte der starke, konstitutive *GPD*-Promotor den schwachen *MET25*-Promotor. C) Western Blots des Gesamtzellextraktes, die sowohl die Expression der N-terminalen Fusionsgene von TEV 118 und 206 als auch die Aktivität der Fusionsproteine untersuchen. (N'Hälfte 118 = 76,1 kDa, N'Hälfte 206 = 85,7 kDa, Reporter = 71,1 kDa) D) Western Blots des Gesamtzellextraktes, welche die Synthese der C-terminalen Fusionsproteine von TEV 118 und 206 und dessen Proteaseaktivität untersuchen. (C'Hälfte 118 = 34,3 kDa, C'Hälfte 206 = 24,3 kDa, Reporter = 71,1 kDa) (- = DMSO and + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

Die einzelnen N- und C-terminalen TEV-118- und TEV-206-Genfragmente wurden durch starke konstitutive Promotoren exprimiert und es war möglich alle resultierenden Fusionsproteine in den Western Blots nachzuweisen (Abbildung 26 C & D). Die einzelnen



TEV-Proteasehälften zeigten keine proteolytische Aktivität, da in den Anti-MBP-Western-Blots keine Spaltprodukte detektiert werden konnten. Dies bestätigt die zuvor gezogene Schlussfolgerung, dass die beobachtete Aktivität von TEV 118 und TEV 206 auf das über CPS gebildete GST-TEV-Spleißprodukt zurückgeht und nicht Folge der Restaktivität einzelner Proteinhälften ist.

In der finalen Charakterisierung von TEV 118 und TEV 206 sollte die Abhängigkeit der Spleißproduktbildung sowohl von der Inkubationsdauer mit Rapamycin als auch von der Rapamycinkonzentration möglichst genau bestimmt werden (Abbildung 27).



**Abbildung 27. Einfluss der Zeit und der Rapamycinkonzentration auf die PTS-Reaktion**

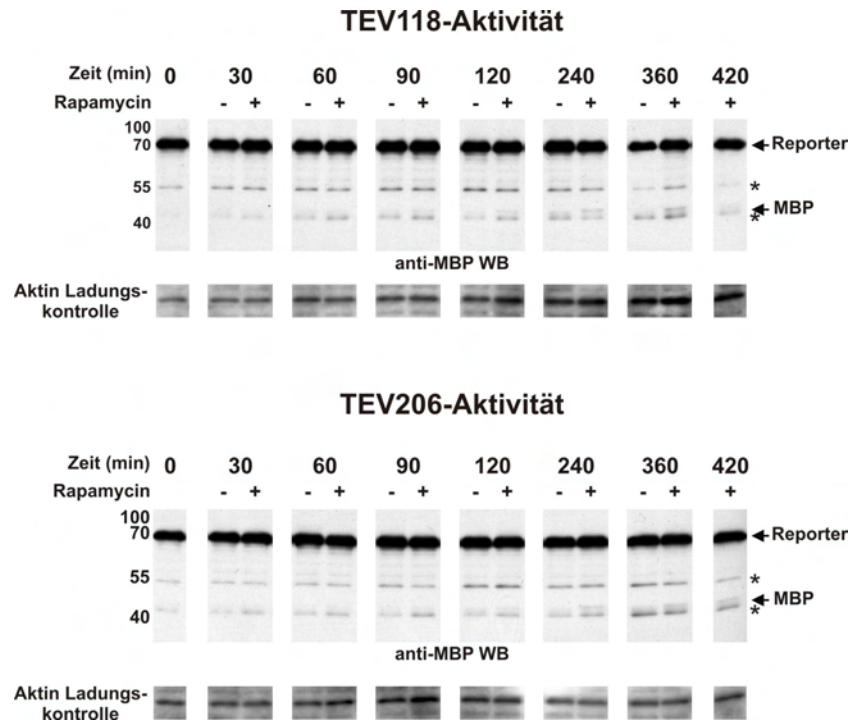
Die Abbildung zeigt den Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration von Rapamycin auf die PTS-Reaktion der zwei gespaltenen TEV-Proteasen 118 & 206. A) Western Blot der zeitabhängigen Bildung des Spleißproduktes (SP) in der An- und Abwesenheit von 2 µM Rapamycin. B) Normierte zeitabhängige Analyse der Spleißproduktbildung von TEV 118 und 206, diese wurde mittels densitometrischer Analyse der Spleißproduktbande der Western Blots ausgewertet. C) Western Blot zur Untersuchung der Abhängigkeit der Spleißproduktbildung (SP) von der Rapamycinkonzentration. D) Densitometrische Analyse und Auswertung der Intensität der Spleißproduktbande bei verschiedenen Rapamycinkonzentrationen nach zwei und vier Stunden Inkubationszeit. (engl. arbitrary units, a.u. = willkürliche Einheiten)

Die zeitliche Untersuchung der Protein-*trans*-Spleißreaktion der TEV-118-Protease zeigte ein Maximum der Spleißproduktbildung nach 90 bis 120 Minuten (Abbildung 27 A & B). Im Vergleich dazu zeigte TEV 206 insgesamt eine etwas schneller stattfindende Reaktion und ein steileres Maximum zwischen 60 und 120 Minuten. Die Hintergrund-Spleißaktivität war in diesen Experimenten für beide gespaltenen Proteasen sehr gering und betrug weniger als 10 %.

Die Inkubation mit Rapamycinkonzentrationen von 0,5 bis 2  $\mu\text{M}$  führte bei TEV 118 nach zwei Stunden zu einem relativ breiten Maximum (Abbildung 27 C & D). Bei TEV 206 war dagegen eine lineare Abhängigkeit von der Rapamycinkonzentration bei zwei Stunden Inkubationsdauer zu beobachten und die maximale Bildung an Spleißprodukt erfolgte bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ . Nach vier Stunden Inkubation mit variablen Konzentrationen von Rapamycin verhielten sich beide gespaltenen Proteasen vergleichbar und zeigten eine unmittelbare Abhängigkeit der PTS-Reaktion von der Rapamycinkonzentration. Möglicherweise führt die Zugabe von Rapamycin bei den gespaltenen Proteasen zu einer Stabilisierung der C-terminalen Hälften und beeinflusst so zusätzlich zu der FKBP/FRB-Dimerisierung die Abhängigkeit der PTS-Reaktion von der Rapamycinkonzentration (Abbildung 24 B). Sowohl nach zwei als auch nach vier Stunden fiel auf, dass eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Rapamycin die Spleißproduktbildung nicht weiter erhöhte. Dies lässt sich auf die bei dieser Konzentration verstärkt auftretenden, negativen Effekte auf das Wachstum der Hefezellen zurückführen.

Neben der zeitabhängigen Bildung des Spleißproduktes wurde gleichzeitig die katalysierte Spaltungsreaktion der gebildeten TEV-Protease untersucht (Abbildung 28).

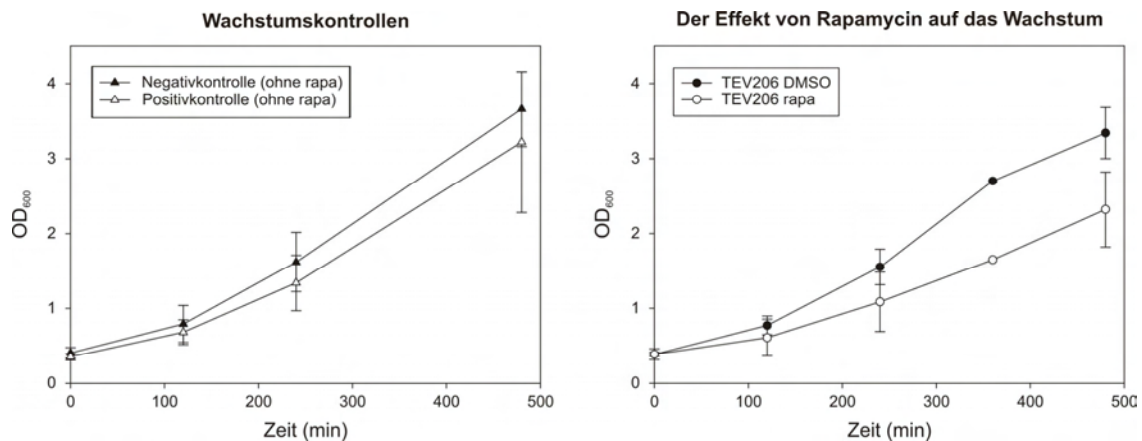
Die Charakterisierung bestätigt die anfängliche Beobachtung, dass das Maximum der Spleißproduktbildung von dem der Reporterproteinspaltung zeitlich verschoben ist. Für beide gespaltenen Proteasen war ein Maximum der auftretenden MBP-Spaltproduktbande nach vier bis sechs Stunden zu beobachten. Neben der zeitabhängigen Steigerung der Reporterspaltung konnte darüber hinaus eine alleinig mit der Inkubationsdauer korrelierende Zunahme einer unspezifischen Degradationsbande des Reporters bei ca. 42 kDa festgestellt werden (siehe Abbildung 28: Vergleich 0 min mit 360 min mit DMSO).



**Abbildung 28. Zeitabhängigkeit der gespaltenen TEV-Proteaseaktivität**

Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes, welche die zeitabhängige Spaltung des MBP-TEVsite-eGFP-Reporters (71,1 kDa) zu MBP (43,9 kDa) in der An- und Abwesenheit von 2  $\mu$ M Rapamycin untersucht.

Bei hohen Rapamycinkonzentrationen konnte, trotz der Verwendung eines Hefestamms mit Rapamycinresistenz verleihender Mutation im *TOR2*-Gen, ein negativer Effekt auf das Wachstum beobachtet werden. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, um zu bestimmen, ob die verwendete Konzentration von 2  $\mu$ M einen signifikant negativen Effekt auf das Hefewachstum hat (Abbildung 29).



**Abbildung 29. Der Effekt von Rapamycin auf das Wachstum von Hefezellen**

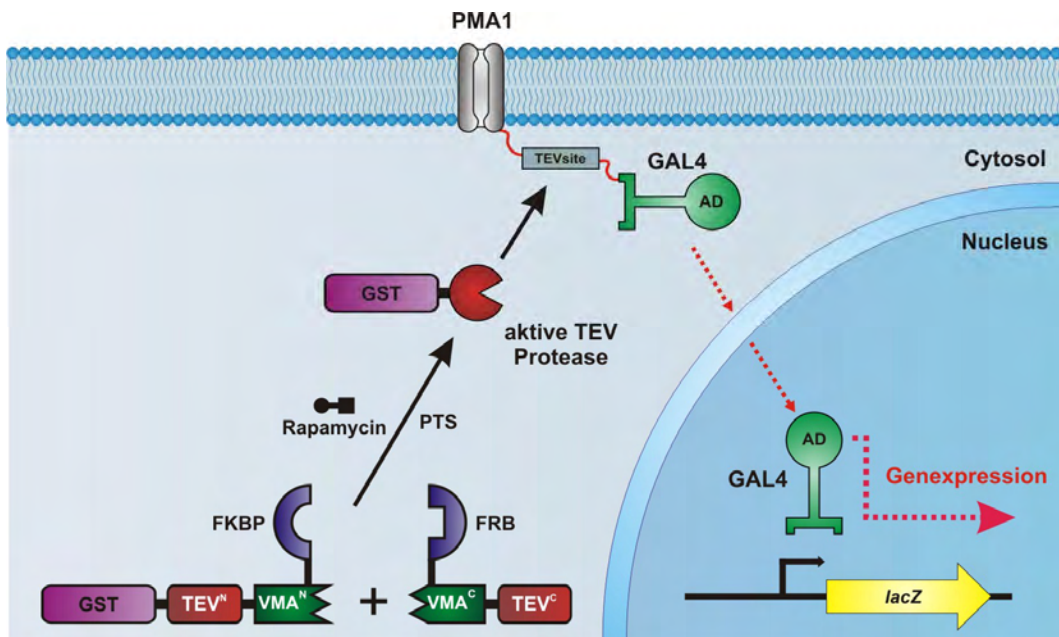
Die Abbildung zeigt das Wachstum der verschiedenen Hefestämme. Alle Kulturen wurden über Nacht angezogen, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt und für ca. drei Stunden wachsen gelassen. Im Anschluss wurde die gemeinsame Kultur von TEV 206 geteilt und entweder DMSO oder 2  $\mu$ M Rapamycin (rapa) addiert (0 min). Als Positivkontrolle wurde erneut *GST-TEV-HA* und als Negativkontrolle ein leerer Vektor verwendet.

Ein Vergleich der ohne Rapamycin inkubierten Positivkontrolle (*GST-TEV-HA*) und der Negativkontrolle (leerer Vektor) zeigte nur einen minimalen Unterschied. Diese beinahe identischen Wachstumskurven belegen die bekannten Beobachtungen, dass die TEV-Protease für Hefen nicht toxisch ist [187]. Die minimalen Differenzen ihres Wachstums könnten auf den Energieaufwand zurückgeführt werden, den die Hefezellen aufwenden müssen, um das Protein GST-TEV-HA zu synthetisieren. Die mit DMSO inkubierte, gespaltene Protease TEV 206 zeigt einen fast identischen Wachstumsverlauf zur Positivkontrolle, so dass kein negativer Einfluss auf die Teilungsrate des Hefestamms festzustellen war. Die Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Rapamycin führte zu einer Erhöhung der Verdopplungsrate auf 145 Minuten im Vergleich zu 120 Minuten bei DMSO. Im Vergleich zu früheren Arbeiten waren diese Werte leicht erhöht. So ermittelten Haruki *et al.* in einem plasmidfreien, Rapamycin-resistenten Hefestamm, der die Komponenten des FKBP/FRB-Dimerisierungssystems im Genom integriert hatte, Werte von 100 Minuten ohne Rapamycin und 103 Minuten mit einer Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$  Rapamycin [134]. Jedoch kann abschließend geschlussfolgert werden, dass Rapamycin in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  zwar einen messbaren Effekt auf die Hefestämme besitzt, aber das exponentielle Wachstum der Hefestämme nicht zum Stillstand bringt. Somit konnte diese Konzentration in weiteren Experimenten mit TEV 118 und 206 verwendet werden.

Nachdem die PTS-Reaktion, die TEV-Proteaseaktivität und der Effekt von Rapamycin auf die Hefezellen detailliert charakterisiert worden waren, wurden die schaltbaren Proteasen in weiteren Experimenten zur Proteinfunktionskontrolle eingesetzt.

#### **4.1.4 Entwicklung eines Reportersystems für die CPS-Proteasen basierend auf GAL4**

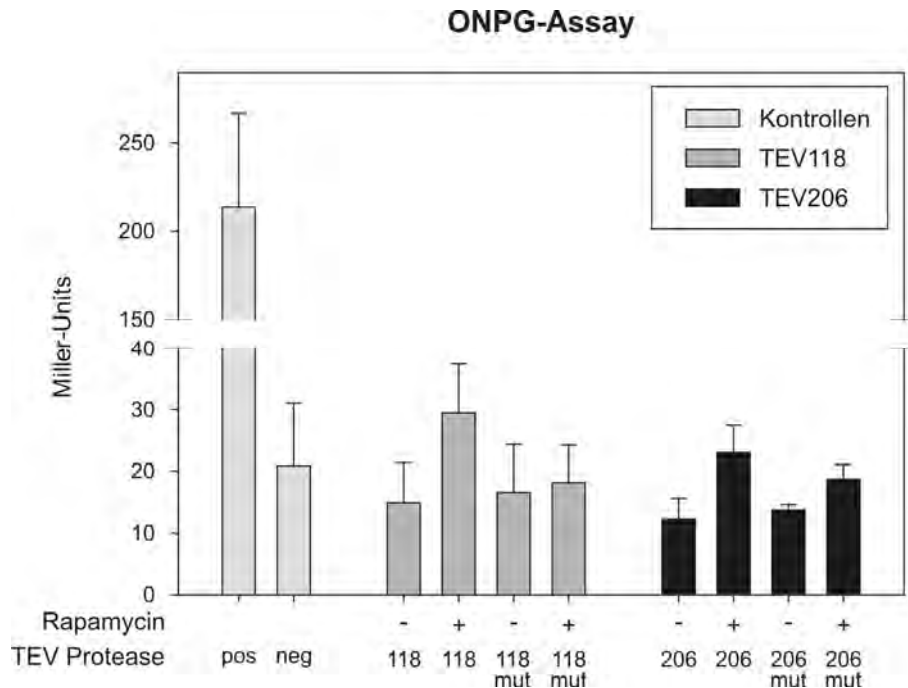
Das erste Reportersystem, das die konditionalen TEV-Proteasen nutzen sollte, basierte auf der Kopplung ihrer induzierbaren Spaltung an einen komplexen enzymatischen Aktivitätsnachweis. Am Beginn des Versuchsaufbaus stand die Fehllokalisierung des GAL4-Transkriptionsfaktors an die Plasmamembran von Hefezellen und damit verbunden seine Inaktivierung. Diese gezielte Lokalisation wurde durch die Fusion von GAL4 mit der essentiellen Plasmamembran  $\text{H}^+$ -ATPase PMA1 erreicht [134] (Abbildung 30). Allerdings führte die Überexpression des eine hohe Kopienzahl besitzenden  $\text{H}^+$ -ATPase-Reporterplasmids zu toxischen Effekten in den Hefestämmen (Daten nicht gezeigt), weshalb fortan ein ARS/CEN-Reporterplasmid mit einem schwachen *MET25*-Promoter verwendet wurde.



**Abbildung 30. Induktion der Genexpression von *lacZ* durch die schaltbaren TEV-Proteasen**

Im ersten Schritt führt die Zugabe von Rapamycin zur *in-vivo*-PTS-Reaktion in Hefezellen, welche die TEV-Protease generiert. Diese aktive Protease spaltet daraufhin den durch die H<sup>+</sup>-ATPase (PMA1) an die Plasmamembran lokalisierten Transkriptionsfaktor GAL4 von dieser ab. GAL4 kann nun in den Nucleus der Hefezellen gelangen und die Expression des Reportergens *lacZ* induzieren, welches für die  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Das Auslesen dessen enzymatischer Aktivität geschieht anschließend durch den ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assay.

Die beiden Proteine, PMA1 und GAL4, wurden durch die kurze TEV-Protease-Erkennungssequenz (TEVsite) miteinander verbunden. Auf diese Weise sollte in der Anwesenheit von aktiver TEV-Protease GAL4 von der Plasmamembran abgespalten werden und daraufhin in den Nucleus der Hefezelle gelangen können. Im Nucleus aktiviert GAL4 die Transkription des  $\beta$ -Galactosidase-Gens *lacZ*, welches unter der Kontrolle des *GAL7*-Promotors steht. Ein ähnliches System wurde schon für die Protease Caspase-3 etabliert [176], allerdings führte die direkte Übertragung der Lokalisierungssequenz von Steiner *et al.* zu keiner Rekrutierung an die Plasmamembran (Daten nicht gezeigt). In dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz fand die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsbestimmung mittels des häufig eingesetzten ONPG-Assays statt [180] (siehe Kapitel 3.4.2). In diesen Assay wurden die Proteasen TEV 118 und 206 in Kombination mit dem ARS/CEN-Reporterplasmid, das unter Kontrolle des schwachen *MET25*-Promotors *PMA1-TEVsite-eGFP* exprimiert, untersucht (Abbildung 31).



**Abbildung 31. Messung der TEV-proteaseabhängigen  $\beta$ -Galactosidaseaktivität**

Graphische Darstellung der Ergebnisse des ONPG- $\beta$ -Galactosidase-Assays, zur Bestimmung der GAL4-abhängigen Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase nach sechs Stunden Expressionszeit. In allen Hefestämmen erfolgte eine Koexpression mit dem Reporterplasmid *PMA1-TEVsite-GAL4* (neg = Negativkontrolle leerer Vektor, pos = Positivkontrolle *GST-TEV-HA*, mut = Spleißmutante, - = DMSO und + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

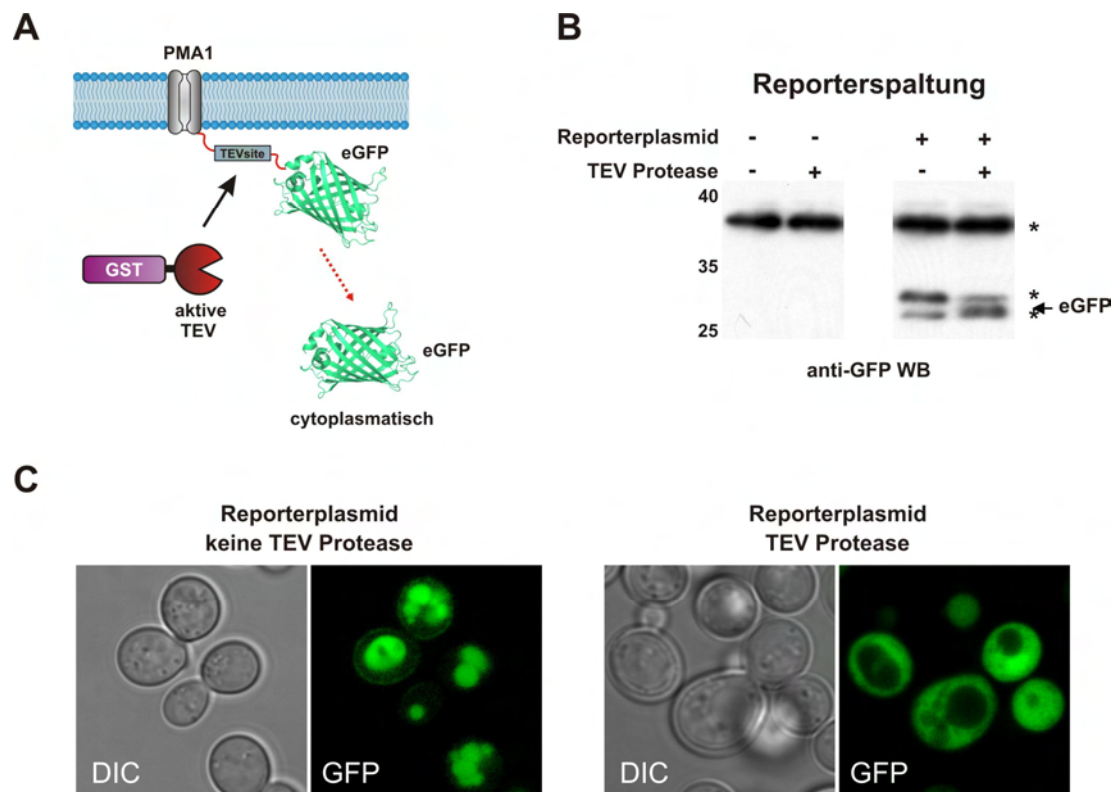
Der Vergleich der Positivkontrolle (*GST-TEV-HA*) mit der Negativkontrolle (nur das Reporterplasmid) zeigte eine Steigerung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität um den Faktor zehn. Damit konnte überdies gezeigt werden, dass eine Messung der TEV-Proteaseaktivität mit dem verwendeten Versuchsaufbau grundsätzlich möglich ist. Für beide gespaltenen Proteasen war eine Zunahme der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität in der Anwesenheit von Rapamycin messbar, im Falle von TEV 118 bis zu einem Faktor von zwei. Die Aktivität der Positivkontrolle ist bis zu neunmal höher als TEV 118 und 206 unter der Addition von Rapamycin. Dies beruht höchstwahrscheinlich erneut auf dem konstitutiven Promotor der Positivkontrolle, der aktive TEV-Protease während der gesamten Dauer des Experiments erzeugt, mithin schon während des Wachstums der gemeinsamen Hefekultur über Nacht. Des Weiteren zeigten die Spleißmutanten beider gespaltenen Proteasen unter Rapamycinzugabe eine leichte Steigerung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (bis zu einem Faktor von 1,3). Dieser Effekt spricht entweder für Protein-Fragment-Komplementation der TEV-Protease-Fragmente oder für einen Rapamycin-spezifischen Effekt. Neben dem insgesamt relativ hohen Hintergrundwert des Reporterproteins von 20 Miller-Units zeigte sich im Vergleich bei den mit DMSO inkubierten TEV-Proteasen (TEV 118, 206 und TEV 118 mut, 206 mut) eine etwas geringere  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (12-17 Miller-Units). Eine mögliche Erklärung wäre eine vom

Expressionslevel abhängige Instabilität und Degradation des Reporterproteins PMA1-TEVsite-GAL4. Dieser Effekt würden dann zu einem gewissen Teil GAL4 in das Cytoplasma freisetzen und zu einer unbeabsichtigten Genexpression der  $\beta$ -Galactosidase führen. Die Koexpression der TEV-Inteinfusionsgene könnte in einer Reduktion der Expressionsrate von PMA1-TEVsite-GAL4 in der Zelle resultieren, wodurch die an die Überexpression gekoppelte Degradation und Freisetzung von GAL4 reduziert würde.

Um den Einfluss der Fusion von Zielproteinen mit PMA1 mikroskopisch beobachten und evaluieren zu können, wurde das GAL4-Gen durch *eGFP* ausgetauscht. Mit dem entstandenen Reporterprotein PMA1-TEVsite-eGFP konnte sowohl die Vollständigkeit der Lokalisation an die Plasmamembran als auch mögliche Degradationseffekte beobachtet werden. Im anschließenden Experiment wurde das Verhalten des Reporterproteins mit und ohne koexprimierte TEV-Protease fluoreszenzmikroskopisch und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 32).

Der Anti-GFP-Western-Blot der Zellen mit dem Reporterplasmid ohne TEV-Protease zeigte eine intensive Doppeldegradationsbande (Abbildung 32 B). Die entscheidende Schlussfolgerung bezüglich der Lokalisation des PMA1-TEVsite-eGFP in Hefezellen konnte aber aus den konfokalen Mikroskopiebildern gezogen werden. Hier zeigten Zellen, die nur das Reporterplasmid exprimierten, in 90 % der Fälle eine sehr starke Lokalisation des fluoreszenten Proteins in der Vakuole (Abbildung 32 C). Zusätzlich fand die PMA1-vermittelte Lokalisation von eGFP an der Plasmamembran in allen beobachteten Zellen statt. Die große Menge von lokalisierten eGFP in der Vakuole in Kombination mit den Western-Blot-Untersuchungen spricht für häufig stattfindende Endocytose und Degradation des PMA1-TEVsite-eGFP-Reporters. Ein vergleichbares Degradationsverhalten des GAL4-Reporters würde zur ungerichteten Freisetzung von GAL4 führen und dies könnte die hohen Hintergrundwerte im ONPG-Assay erklären. Bei der Koexpression der TEV-Protease mit dem Reporterplasmid konnte eine Zunahme entweder der Intensität einer der Degradationsbanden oder das Auftreten einer neuen Bande zwischen den Degradationsbanden beobachtet werden (Abbildung 32 B). Die mikroskopische Untersuchung zeigte in 50 % der TEV-Protease exprimierenden Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation von eGFP (Abbildung 32 C).





**Abbildung 32. Untersuchung der PMA1 gekoppelten Lokalisation von eGFP an die Plasmamembran**

A) Schematische Darstellung der Spaltung des durch PMA1-fehllokalisierten eGFP (PDB ID: 1w7s [192]) von der Plasmamembran. B) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von Zellen, die mit und ohne Reporterplasmid (*PMA1-TEVsite-eGFP*) und TEV-Proteaseplasmid (*GST-TEV-HA*) transformiert wurden. Der Anti-GFP-Western-Blot zeigt nur den Ausschnitt der Degradationsbanden und der eGFP-Spaltungsbande (27,2 kDa), da es nicht möglich war, das vollständige Reporterprotein (128,3 kDa) zu detektieren. C) Die konfokalen Mikroskopiebilder zeigen die Lokalisation von eGFP in lebenden Hefezellen in der An- und Abwesenheit der TEV-Protease.

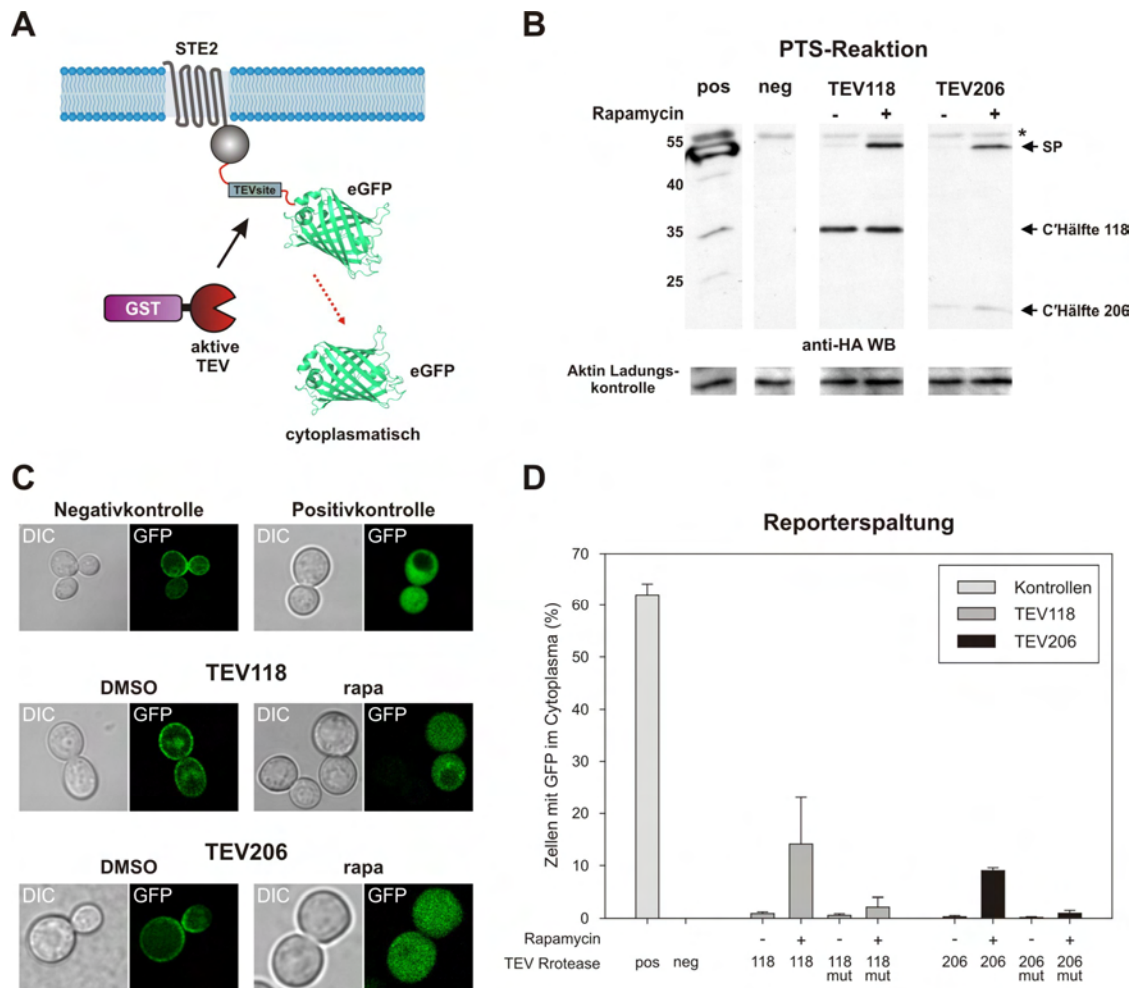
#### 4.1.5 Die selektive Spaltung von GFP von der Plasmamembran

Durch die Experimente mit dem eGFP-Reporter konnte auf die Ineffizienz eines auf PMA1 basierenden Systems zur spezifischen Lokalisation und Inaktivierung von Zielproteinen an der Plasmamembran geschlossen werden. Deshalb wurde zuerst nach einem möglichst nichttoxischen, aber zugleich stabilen Lokalisations-Fusionsprotein gesucht, das mittels konfokaler Mikroskopie überprüft werden konnte. Die Wahl fiel auf den  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor STE2 [193, 194]. STE2 ist ein sieben Transmembrandomänen besitzender, G-Proteingekoppelter Rezeptor, der mit dem  $\alpha$ -Faktor Pheromon interagiert. Das  $\alpha$ -Faktor-Pheromon, das von  $\alpha$ -Zellen abgesondert wird, leitet die Paarung von haploiden a- und  $\alpha$ -Hefezelle ein, wobei nur a-Zellen den  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor STE2 produzieren. In den hier gezeigten Experimenten spielt dieser Prozess keine Rolle, weil nur ein a-Stamm verwendet wurde. Ferner waren keine STE2-Überexpressionseffekte auf das Wachstum der Hefezellen aus der Literatur bekannt. STE2 ist zusätzlich stabil in der Plasmamembran lokalisiert und ohne den



gebundenen  $\alpha$ -Faktor ist darüber hinaus die Ubiquitin vermittelte Endocytose und vakuoläre Degradation moderat [195].

Der erzeugte Reporter bestand aus STE2, das C-terminal mit der TEV-Erkennungssequenz und eGFP fusioniert wurde. Das STE2-Protein sollte das Fusionsprotein an die Plasmamembran der Hefezellen lokalisieren. Analog zu den vorangegangenen Experimenten sollte bei vorhandener TEV-Aktivität eGFP von der Membran abgespalten werden und ins Cytoplasma freigesetzt werden (Abbildung 33 A).

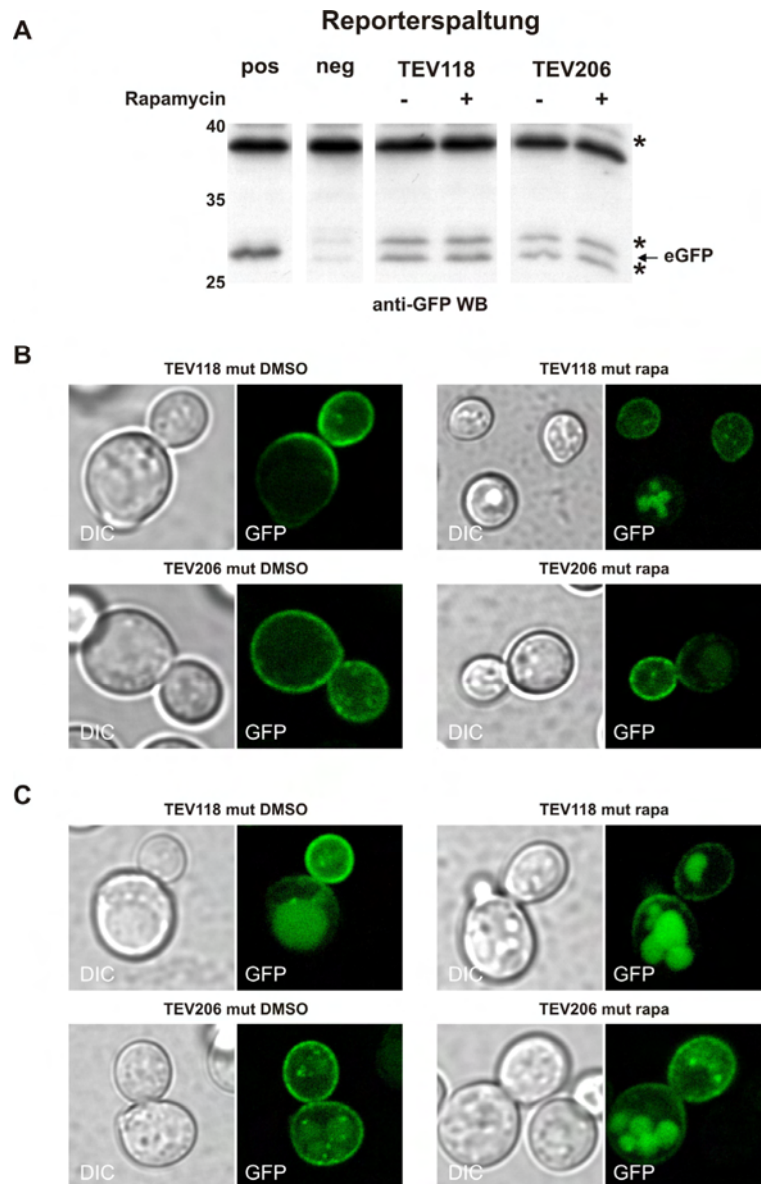


**Abbildung 33. Die TEV-proteasevermittelte Abspaltung von Plasmamembran lokalisiertem eGFP**

A) Schematische Darstellung der TEV-abhängigen Abspaltung von eGFP (PDB ID: 1w7s [192]) von der Plasmamembran. Die Membran-Lokalisation von eGFP wurde durch den  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor STE2 erreicht. B) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von Zellen, die das Reporterplasmid (*STE2-TEVsite-eGFP*) und ein zusätzliches Konstrukt koexpressieren. Es war möglich die GST-TEV-HA-Spleißprodukte (SP 118 = 57,0 kDa, SP 206 = 56,5 kDa) und die C-terminalen TEV-Hälften (C'Hälfte 118 = 34,3 kDa, C'Hälfte 206 = 24,3 kDa) FRB-C'VMA-C'TEV-HA nach acht Stunden nachzuweisen. C) Die konfokalen Mikroskopiebilder zeigen die Lokalisation von eGFP in lebenden Hefezellen. Die Zellen koexprimierten *GST-TEV-HA* (Positivkontrolle), einen leeren Vektor (Negativkontrolle), und die gespaltenen TEV-Proteasen 118 und 206 für acht Stunden. Nur im Falle von TEV 118 und 206 wurde die Expression in An- und Abwesenheit von 2  $\mu$ M Rapamycin durchgeführt. D) Statistische Auswertung der eGFP-Lokalisation nach acht Stunden Expressionszeit. (neg = Negativkontrolle, pos = Positivkontrolle, mut = Spleißmutante, - = DMSO und + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

Der Anti-HA-Western-Blot verifiziert erneut das hohe Expressionslevel der GST-TEV-HA Positivkontrolle (Abbildung 33 B). Darüber hinaus bestätigte die Auswertung der konfokalen Mikroskopiebilder der Negativ- und Positivkontrollen, dass mit dem STE2-System eine Analyse der TEV-Proteaseaktivität in Hefezellen möglich war (Abbildung 33 C). Die Hefezellen, die nur das *STE2-TEVsite-eGFP*-Reporterplasmid besaßen, zeigten in >99 % der aufgenommenen Bildern eine Lokalisation der fluoreszenten Proteine an der Plasmamembran. Eine Kolokalisation von eGFP in der Vakuole war bei diesen Negativkontrollen in weniger als 5 % der Zellen zu beobachten. Damit ist der STE2-TEVsite-eGFP-Reporter besser geeignet, um die Aktivität der TEV-Protease in Einzellzellen zu bestimmen als der PMA1-TEVsite-eGFP-Reporter. Durch die konstitutive Expression von *GST-TEV-HA* war es möglich in ca. 60 % der beobachteten Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation von eGFP zu erreichen (Abbildung 33 D). Diese Reporterspaltung der Positivkontrolle konnte auch in einem Anti-GFP-Western-Blot detektiert werden (Abbildung 34 A).

Bei der Koexpression mit dem Reporterprotein STE2-TEVsite-eGFP konnte für TEV 118 und 206 in Abhängigkeit von der Präsenz von Rapamycin das Spleißprodukt GST-TEV-HA im Anti-HA-Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 33 B). Nach acht Stunden Wachstumsdauer waren für TEV 118 und 206 geringe Mengen an Hintergrund-Spleißaktivität im Western Blot nachweisbar. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der TEV 118 und 206 koexprimierenden Hefezellen zeigte unter Rapamycinzugabe bei ca. 10 % der Zellen den erwarteten Phänotyp einer cytoplasmatischen Lokalisation (siehe Abbildung 33 C und für die Auswertung Abbildung 33 D). Die Kontrollstämme, die nur mit DMSO inkubiert wurden, zeigten nur bei weniger als 1 % der Zellen eine eGFP-Lokalisation im Cytoplasma. Durch das Reporterprotein STE2-TEVsite-eGFP ist es also möglich konditional induzierte TEV-Proteaseaktivität in einzelnen Hefezellen nachzuweisen. Jedoch war es nicht möglich, die korrespondierende eGFP-Spaltbande für TEV 118 und 206 im Western Blot zu detektieren (Abbildung 34 A). Der Western Blot zeigt eine schwache Degradation des Reporterproteins in der Negativkontrolle, obgleich die Intensität der eGFP-Degradationsbanden im Vergleich zum PMA1-Reporterprotein minimal ist (siehe Abbildung 32 A). Die Spleißmutanten von TEV 118 und 206 zeigten nach der Inkubation mit Rapamycin eine leicht erhöhte eGFP-Lokalisation im Cytoplasma von bis zu 2 % bei TEV 118 (siehe Abbildung 34 B und für die Auswertung Abbildung 33 D). Diese Beobachtung spricht erneut für das Auftreten von Protein-Fragment-Komplementation durch die induzierte Dimerisierung der TEV-Proteasehälften.



**Abbildung 34. Kontrollen der TEV-induzierten Reporterspaltung**

A) Western-Blot-Analyse des Gesamtextraktes von Zellen, die das Reporterplasmid (*STE2-TEVsite-eGFP*) und ein zusätzliches Konstrukt koexprimieren. Es war nicht möglich bei TEV 118 und 206 unter Zugabe von 2  $\mu$ M Rapamycin die eGFP-spezifische (27,2 kDa) Spaltbande zu detektieren. Erneut war es nicht möglich, das ungespaltene Reporterprotein (76,5 kDa) im Western Blot zu identifizieren. B) und C) Die konfokalen Mikroskopiebilder zeigen die Lokalisation von eGFP in lebenden Hefezellen, die zusätzlich zu dem Reporterplasmid (*STE2-TEVsite-eGFP*) ein weiteres Plasmid für acht Stunden koexprimierten. B) In diesen Hefezellen werden die Spleißmutanten koexprimiert. C) In diesen Bildern wird die DMSO- und rapamycinassoziierte Fehllokalisierung von eGFP abgebildet. Bis zu 10 % der Zellen zeigten diesen starken Phänotyp. (Negativkontrolle = leerer Vektor, Positivkontrolle = *GST-TEV-HA*, mut = Spleißmutante, - = DMSO und + = 2  $\mu$ M Rapamycin in DMSO)

An diesem Punkt sei darauf hingewiesen, dass bis zu 10 % der Zellen, die entweder mit DMSO oder Rapamycin inkubiert wurden, einen starken Phänotyp der vakuolären Lokalisation von eGFP zeigten (Abbildung 34 C). Diese Beobachtung korreliert mit der des Western Blots, da die Intensität der Doppeldegradationsbande der Negativkontrolle im Vergleich mit DMSO inkubierten Spleißmutanten ca. um den Faktor zehn geringer ist

(Abbildung 34 A). Es wurde bereits dokumentiert, dass Rapamycin trotz des verwendeten resistenten Stammes das Wachstum der Hefezellen beeinflusst (Abbildung 29). Die Steigerung der vakuolären eGFP-Lokalisation in den einzelnen Hefezellen lässt sich in Verbindung mit einem anderen Effekt von Rapamycin, der Induktion der Macroautophagie durch Inhibition von TOR [116] (Kapitel 1.4.1), erklären. Überdies kann schon die alleinige Inkubation von Hefezellen mit DMSO zu erhöhter Vesikelbildung und vergrößerten Vakuolen führen [196].

Um die Endocytose des STE2-TEVsite-eGFP-Reporters weiter zu reduzieren, wurde das für die Ubiquitin-vermittelte Endocytose verantwortliche Sequenzmotiv in STE2 deletiert [195]; doch die Reportermutante wies eine erhöhte vakuoläre Lokalisation von eGFP auf (Daten nicht gezeigt).

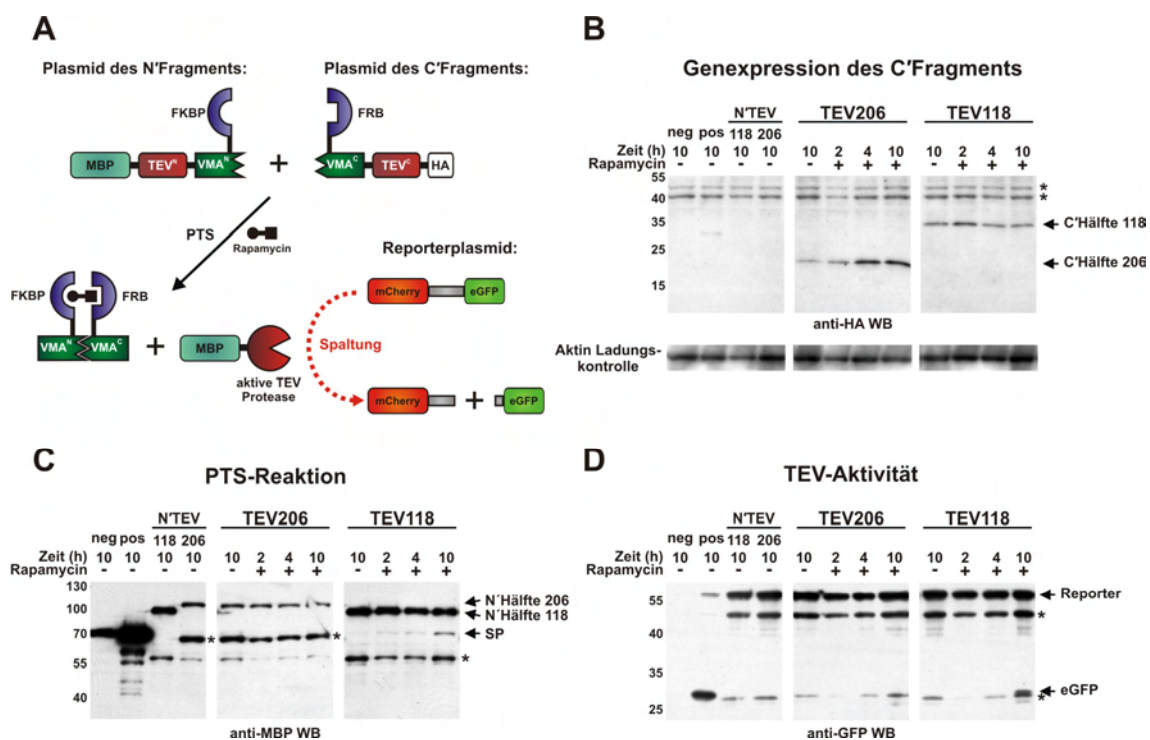
Zusammenfassend ist es gelungen, ein auf STE2 basierendes System zu generieren, welches Zielproteine selektiv an die Plasmamembran fehllokalisieren kann. Mittels der schaltbaren TEV-Proteasen können die Zielproteine selektiv in das Cytoplasma freigesetzt werden. Die Fusion eines neugewählten Zielproteins mit eGFP als Reporterprotein würde eine Bestimmung der Zellen erlauben, die ausreichend TEV-Proteaseaktivität besitzen, um die Spaltung von der Plasmamembran durchzuführen.

### 4.1.6 Die Verwendung der schaltbaren Proteasen in Säugerzellen

Nachdem die Aktivität und Funktionalität der gespaltenen TEV-Proteasen in Hefen hinreichend charakterisiert wurde, war der nächste Schritt die Übertragung des Systems auf einen anderen Organismus. Es war bekannt, dass sowohl die TEV-Protease als auch eine gesplattene Version in Säugerzellkultur angewendet werden können [188]. Deshalb wurde versucht, die generierten N- und C-terminalen *TEV*-Proteasefusionsgene in unterschiedliche Säuger-Expressionsvektoren zu klonieren und in HeLa-Zellen zu exprimieren. Interessanterweise konnte keine Expression der *GST*-Fusionsgene in Säugerzellkultur nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Gleichwohl führte der Austausch von *GST* durch *MBP* zu einer stabilen Expression der Fusionsgene. *MBP* wurde bereits häufiger in Zellkultur in Verbindung mit dem VMA-Intein verwendet [152] und behinderte in keiner Weise die Spleißreaktion. Als Reporter wurde eine Fusion aus dem rot fluoreszierenden Protein mCherry [164], der TEV-Protease-Erkennungssequenz und eGFP verwendet (siehe Abbildung 35 A). Das Reporterplasmid basierte auf dem pEGFP-N1-Vektor (*Clontech*) und alle übrigen Plasmide auf pcDNA3 (*Invitrogen*). Die Expression der Zielgene erfolgte in beiden Vektoren über den starken Cytomegalovirus-Promotor. Das Einbringen aller Plasmide

in COS-7-Zellen erfolgte über transiente Transfektion und nach 24 Stunden Expression wurde die PTS-Reaktion durch die Zugabe von 500 nM Rapamycin gestartet.

Die Western-Blot-Analyse zeigte für alle generierten Plasmide eine Expression der N- und C-terminalen Fusionsgene der TEV-Protease (Abbildung 35 B & C). TEV 206 zeigte allerdings beim N-terminalen Fusionsprotein (MBP-N<sup>'</sup>TEV-N<sup>'</sup>VMA-FKBP) eine starke Degradationsbande, die sowohl unabhängig von der Präsenz der C-terminalen Hälfte (FRB-C<sup>'</sup>TEV-C<sup>'</sup>VMA-HA) als auch von der Zugabe von Rapamycin war (Abbildung 35 C). Diese Instabilität des Fusionsproteins ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass keine Bildung von Spleißprodukt und keine Spaltung des Reporterproteins zu beobachten war (Abbildung 35 C & D). Im Falle von TEV 118 führt die Zugabe von Rapamycin bereits nach zwei Stunden zur Bildung von Spleißprodukt (Abbildung 35 C). Das Maximum wurde nach zehn Stunden Inkubation mit Rapamycin erreicht und nach dieser Zeitspanne war es darüber hinaus möglich, eine Spaltung des Reporters zu eGFP zu detektieren (Abbildung 35 D).

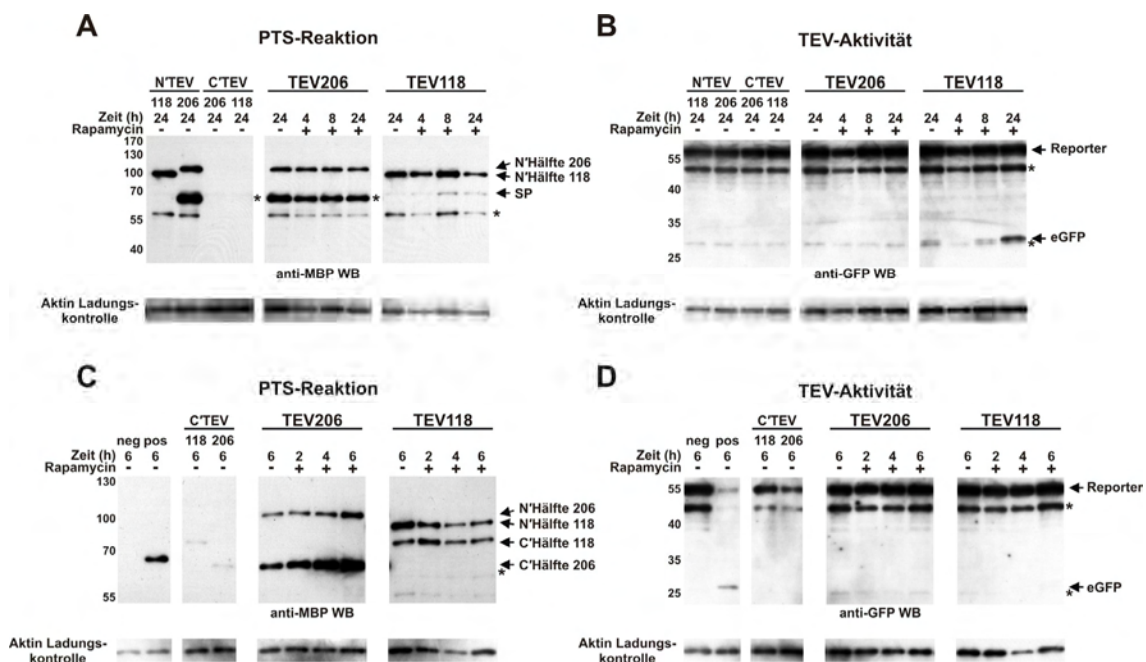


**Abbildung 35. Verwendung der schaltbaren TEV-Protease in Säuger-Zellkultur**

A) Schematische Darstellung des auf drei Plasmiden basierenden TEV-Protease-Reportersystems in Säugerzellen. Die Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) führt zur aktiven TEV-Protease, die anschließend das Reporterprotein spaltet. B) Anti-HA-Western-Blot des Gesamtzellextraktes von COS-7-Zellen, der die Expression des C-terminalen Fusionsgens untersucht (C' Hälfte 118 = 34,7 kDa, C' Hälfte 206 = 24,7 kDa). C) Der Anti-MBP-Western-Blot detektiert sowohl das N-terminale Fusionsprotein (N' Hälfte 118 = 90,8 kDa, N' Hälfte 206 = 100,3 kDa) als auch im Falle von TEV 118 das Spleißprodukt (SP = 72,0 kDa). D) Der Nachweis der TEV-Aktivität erfolgte über den der Spaltung des Reporterproteins mCherry-TEVsite-eGFP (55,9 kDa) im Anti-GFP-Western-Blot (eGFP = 28,2 kDa). (neg = Negativkontrolle: nur ein leerer Vektor, pos = MBP-TEV-Positivkontrolle = 70,7 kDa, N' TEV 118 & 206 stehen für Plasmide mit den alleinigen N-terminalen Fusionsgenen, - = DMSO und + = 500 nM Rapamycin in DMSO)



Eine Charakterisierung der PTS-Reaktion über einen längeren Zeitraum sollte den Zeitpunkt der maximalen Spleißproduktbildung und Spaltungsaktivität des Reporterproteins bestimmen. Auch nach 24 Stunden zeigten die N- oder C-terminalen Fusionsproteine keine Spaltungsaktivität (Abbildung 36 A & B). Damit sprechen auch die Ergebnisse in Säugerzellen, wie schon in Hefe, für einen vollständigen Aktivitätsverlust der einzelnen gespaltenen TEV-Proteasehälften. Für TEV 206 konnte darüber hinaus nach 24 Stunden weder PTS noch Spaltungsaktivität des Reporterproteins festgestellt werden (Abbildung 36 A & B). Bei TEV 118 lag das Maximum der Spleißproduktbildung bei acht Stunden (Abbildung 36 A). Eine weitere Erhöhung der Rapamycin-Inkubationsdauer auf 24 Stunden führte nur zu einer Verringerung der Spleißproduktmenge. In der nach 24 Stunden Inkubationszeit genommenen Probe von TEV 118 trat zudem ohne die Zugabe von Rapamycin geringes Hintergrundspießen auf. Überdies resultierte das Hintergrundspießen in einer Spaltungsaktivität des Reporterproteins (Abbildung 36 B). Die maximale Aktivität der gespaltenen TEV-Protease 118 lag zwischen acht und 24 Stunden, wobei bei längeren Inkubationszeiten das Hintergrundspießen zur Erhöhung der Spaltungsaktivität beitragen konnte.



**Abbildung 36. Charakterisierung der Zellkultur PTS-Reaktion und Versuch ihrer Optimierung**

A) Der Anti-MBP-Western-Blot des Gesamtzellextraktes von COS-7 Zellen, der die N-terminalen Fusionsproteine (N'Hälfte 118 = 90,8 kDa, N'Hälfte 206 = 100,3 kDa) und das Spleißprodukt (SP = 72,0 kDa) bis 24 Stunden nach der Addition von Rapamycin detektiert. B) Der Anti-GFP-Western-Blot weist die Aktivität der TEV-Proteasen durch das bei der Spaltung des mCherry-TEVsite-eGFP-Reporterproteins (55,9 kDa) entstehende eGFP (28,2 kDa) nach. C) und D) Nach dem Einfügen von MBP vor das C-terminale FRB-C'VMA-C'TEV-HA-Fragment (C'Hälfte 118 = 77,9 kDa, C'Hälfte 206 = 67,8 kDa), erfolgte die Untersuchung des Einflusses auf die PTS-Reaktion und Proteaseaktivität mittels Western-Blot-Analyse (- = DMSO und + = 500 nM Rapamycin in DMSO)

Desweiteren wurde versucht, die Löslichkeit des C-terminalen Fusionsproteins durch das Einfügen von MBP zu erhöhen, was sich positiv auf die PTS-Reaktion auswirken sollte (Abbildung 36 C & D). Die Fusion von MBP vor FRB-C'VMA-C'TEV-HA war erfolglos, denn weiterhin konnte bei TEV 206 keine Spleißproduktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 36 C). Überraschenderweise kam es bei TEV 118 nach der Fusion mit MBP zur vollständigen Inhibierung der Spleißreaktion und darüber hinaus zum Verlust der TEV-Proteaseaktivität (Abbildung 36 C & D).

Es lässt sich also festhalten, dass in Zellkultur zumindest eine der gespaltenen Proteasen ihre Rapamycin-induzierbare Spleißaktivität konservierte. Der nächste Schritt wäre die Untersuchung der TEV-Proteaseaktivität auf Einzelzellbasis, die sich schon in Hefe nachweisen lies.

## 4.2 Generierung von *trans*-Inteinkassetten zur schnellen Identifikation von aktiven gespaltenen Inteinen in Zielproteinen

Die grundsätzliche Voraussetzung für die Verwendung von Inteinen *in vitro* und *in vivo* Experimenten ist der Erhalt ihrer Protein-Spleißaktivität in einem neuen Zielprotein (siehe Kapitel 1.1.4 und 1.4.4). Bis zum heutigen Tage ist nicht genau vorhersagbar, welches Intein die optimale Wahl für einen spezifischen Exteinkontext darstellt und ob nach seiner Integration in das Zielprotein die Spleißreaktion ungehindert ablaufen kann. Neben den essentiellen Aminosäuren, die an den nukleophilen Substitutionsreaktionen beteiligt sind, haben vor allem ihre flankierenden Aminosäuren an den Spleißregionen einen beträchtlichen Einfluss auf die vom Intein katalysierte Reaktion. Dieser Effekt wurde durch Mutationsstudien sowohl für zwei Inteine an der -1 Position [21, 28] als auch für die +2 bzw. +3 Position der DnaE-Inteine [29-31] explizit nachgewiesen. Allerdings kann selbst die Verwendung von flankierenden Aminosäuren, die als Spleißaktivität erhaltend beschrieben worden sind, bei einer Übertragung auf neue Zielproteine zu Komplikationen und Inaktivität führen. Wahrscheinlich beruht dabei die individuell unterschiedliche Toleranz der Inteine gegenüber Mutationen auf ihrer jeweiligen Koevolution mit den differierenden Exteinbereichen der Wirtsproteine.

Bei der Anwendung von gespaltenen Inteinen auf neue Zielproteine sollten zwei Dinge beachtet werden: Erstens sollten die durch das Intein eingefügten Mutationen sich auf ein Minimum beschränken, um keine Auswirkung auf die Aktivität des Zielproteins zu haben. Zweitens sollten die flankierenden Aminosäuren an der Integrationsposition möglichst ähnlich der Wildtypsequenz des Inteins sein, um die Spleißreaktion nicht zu beeinflussen. Häufig führt nur ein Kompromiss aus beiden Richtlinien zur erwünschten Protein-*trans*-Spleißaktivität und Aktivität des Zielproteins.

Um möglichst schnell unterschiedliche Integrationspositionen in einem parallelen Ansatz zu untersuchen, wurde deshalb in Zusammenarbeit mit Joachim Zettler und Simone Eppmann das SPLICEFINDER-System entwickelt. Basierend auf der Integration einer Inteinkassette werden nicht nur Klonierungsschritte gespart, sondern es können gleichzeitig die Codons der flankierenden Aminosäuren über die für die Amplifikation verwendeten Primer beliebig variiert werden. Alle Inteinkassetten enthalten Elemente aus dem von Iwai und Mitarbeitern entwickeltem dualen *E. coli*-Expressionsystem [77, 197]. Das erlaubt einen sofortigen Einsatz der durch SPLICEFINDER generierten Integrationsplasmide für die segmentelle *in-vivo*-Isotopenmarkierung von Zielproteinen für NMR-Untersuchungen. Der Einbau dieser NMR-aktiven Kerne trägt wesentlich zur Verbesserung der Auflösung bei und



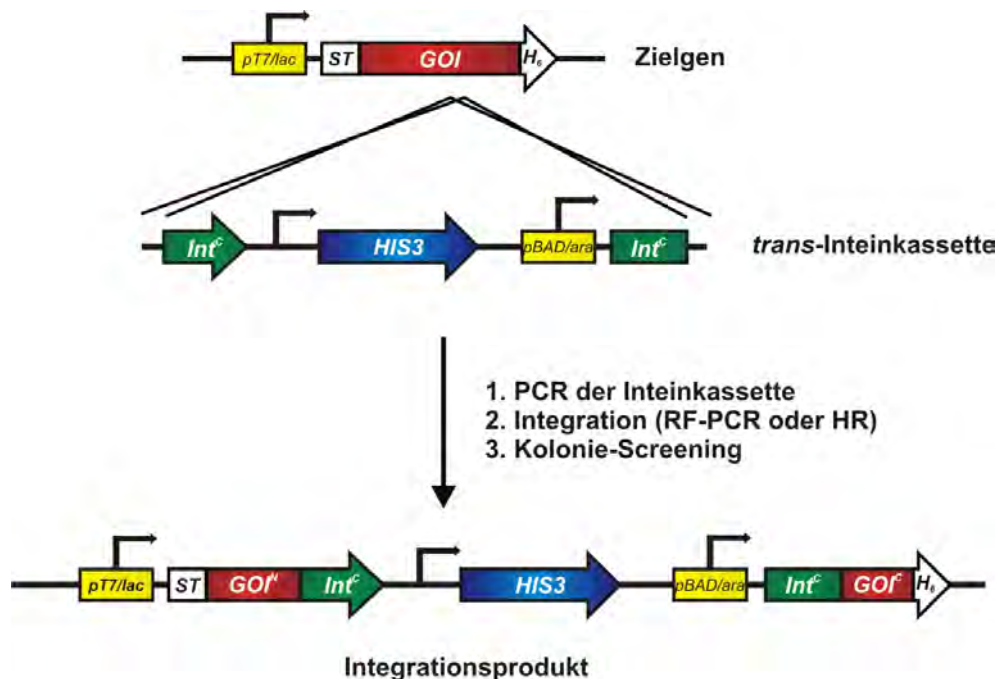
ermöglicht damit die Strukturaufklärung von Proteinen. Zusätzlich kann das System dazu genutzt werden, mit möglichst geringem Klonierungsaufwand gespaltene Inteine in Zielproteine zu insertieren und diese im Folgeschritt auf ihre PTS-Aktivität zu testen. Das SPLICEFINDER-Prinzip sollte zuerst an einem gut löslichen Modellprotein demonstriert werden. Anschließend sollte durch die Anwendung auf CobA, eine Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase, ein fluoreszenter Biosensor für erfolgreiches Proteinspleißen generiert werden.

### 4.2.1 Das SPLICEFINDER-Prinzip

Bei SPLICEFINDER (engl. split-intein cassette integration to find active insertion positions with determination of the optimal flanking residues) handelt es sich wie auch schon bei der CPS-Kassette (Kapitel 4.1.1), um eine auf Intein<sup>1</sup>kassetten basierende Strategie. Diese Kassetten ermöglichen eine sequenzspezifische Integration gespaltener Inteine in Zielgene ohne die Notwendigkeit von aufwendigen und schrittweisen Klonierungen (Abbildung 37).

Die Klonierung beginnt mit einem selektiv induzierbaren Zielgen in einem pET-Vektor (*Novagen*) oder einem speziell erzeugten Hefe-Shuttlevektor. Zur späteren Identifikation und Reinigung der Intein<sup>1</sup>infusionsproteine und des Spleißproduktes ist das Zielgen mit entsprechenden Tag-Sequenzen versehen. Im nächsten Schritt erfolgt eine PCR der *trans*-Intein<sup>1</sup>kassette, während der jeweils am 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts 20-40 bp homologe Sequenzen zur Integrationsposition des Zielgens addiert werden. Die anschließende Integration der amplifizierten *trans*-Intein<sup>1</sup>kassetten kann entweder über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* oder über RF-PCR, eine restriktionsfreie PCR-Methode [173, 174] (Kapitel 3.1.1), erfolgen. Während dieses Integrationsprozesses wird das Zielgen durch die Kassette in zwei Hälften geteilt und an den entstehenden N- und C-terminalen Spleißregionen mit den jeweiligen Intein<sup>1</sup>fragmenten fusioniert. Die nach Selektion und Isolation entstandenen Integrationsplasmide besitzen durch das Einbringen der Kassetten eine Transkriptions- und Translations-Terminatorregion für das resultierende N-terminale Fusionsgen sowie einen zusätzlichen Promotor für das C-terminale Fusionsgen. Für das hier entwickelte System ist es von größter Wichtigkeit, dass beide verwendeten Promotoren zueinander orthogonal sind. Dazu wurde im ursprünglichen Zielgenvektor der T7-Promotor in Kombination mit dem *lac*-Operator verwendet und durch die Kassette der *BAD*-Promotor mit der dazugehörigen *ara*-Operatorsequenz eingebracht. Das resultierende selektiv induzierbare System exprimiert durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) das N-terminale und bei Anwesenheit von Arabinose im Medium das C-terminale Fusionsgen.

Damit eine selektive Expression stattfinden kann, muss in allen Anwendungen eine Kotransformation von *E. coli*-Stämmen mit einem Helferplasmid (pRSFara) erfolgen, das die für die Operatorsequenzen *LacI* und *AraC* bindenden Repressoren kodiert. Dieses Helferplasmid basiert auf dem pRSFDuet-1-Vektor (Novagen) und besitzt damit einen anderen Replikationsursprung (RSF-Replikationsursprung) und auch eine unterschiedliche Antibiotikaresistenz als der verwendete pET-Vektor (pBR322-Replikationsursprung) bzw. Hefe-Shuttlevektor (pMB1-Replikationsursprung). Die anfängliche Bestimmung der PTS-Aktivität der erzeugten Inteininfusionsproteine kann mittels Expressionen der Integrationsplasmide im kleinen Maßstab (3-4 ml) und anschließender Western-Blot-Analyse gegen die Epitop-Tags des Spleißproduktes durchgeführt werden.



**Abbildung 37. Die SPLICEFINDER-Methode**

Ausgangspunkt für SPLICEFINDER ist ein zielgenkodierender (engl. gene of interest, GOI) Vektor, der bereits Tag-Sequenzen (*ST* & *His<sub>6</sub>*) für die spätere Detektion und Reinigung der Fusionsproteine enthält. Die Integration der amplifizierten und mit homologen Sequenzbereichen versehenen *trans*-Inteinkassetten geschieht sequenzspezifisch, entweder mittels homologer Rekombination (HR) in Hefe oder mittels *in-vitro*-RF-PCR und anschließender Transformation in *E. coli*. Im Falle der Integration über HR muss ein Hefe-Shuttlevektor verwendet werden, bei der Integration über RF-PCR ein beliebiger *E. coli*-Expressionsvektor. Am Ende erhält man ein Integrationsplasmid, das über *pT7/lac* und *pBAD/ara* und die Zugabe von IPTG und Arabinose die selektive Expression beider Fusionsgene ermöglicht.

Im Laufe dieser Arbeit wurden drei verschiedene *trans*-Inteinkassetten erzeugt, die sich durch die verwendeten gespaltenen Inteine und deren nucleophile Aminosäuren an der +1 Position unterscheiden (Tabelle 14). Nach der PTS-Reaktion verbleibt dieser essentielle Rest im Spleißprodukt bestehen und es sind Cys, Ser und Thr an dieser Position möglich.

Anhängig von der Aminosäuresequenz der Insertionsposition im Zielprotein kann damit eine Inteinkassette gewählt werden, die ein Spleißprodukt erzeugt, welches der Wildtypsequenz sehr ähnlich ist bzw. dieser entspricht.

**Tabelle 14. Übersicht der hergestellten *trans*-Inteinkassetten**

<b>Inteinkassette</b>	<b>N'Int-Hälfte</b>	<b>C'Int-Hälfte</b>	<b>+1 Position</b>	<b>Referenz</b>
<i>Ssp</i> DnaB	DnaB(1-104)	DnaB(107-154)	Ser	[47]
<i>Npu</i> DnaE	DnaE(1-102)	DnaE(103-138)	Cys	[31]
<i>Mxe</i> GyrA	GyrA(1-119)-FKBP	gpD-GyrA(120-199)	Thr	[74]

In den folgenden Experimenten sollten zunächst die Durchführbarkeit der aufgestellten Integrationsmethodik und die Funktionalität der generierten *trans*-Inteinkassetten mit einem sterisch nicht anspruchsvollen Modellprotein gezeigt werden.

#### **4.2.2 Aktivitätsbestimmung der Inteinkassetten anhand eines Modellproteins**

Das erste Modellprotein, um das SPLICEFINDER-System zu testen, bestand aus zwei stabil gefalteten monomeren Proteindomänen, dem Kopfprotein des Bakteriophagen Lambda (gpD) und dem Thioredoxin (Trx) aus *E. coli*. Beide Proteine wurden über eine kurze Linkersequenz von sechs Glycinen miteinander verbunden, in welche die Integration der *Npu* DnaE- und *Ssp* DnaB-*trans*-Inteinkassetten erfolgen sollte. Für die Reinigung und Detektion der durch die Integration entstehenden Fragmente wurden der N- und C-Terminus des Modellproteins noch zusätzlich mit einem Strep-Tag II (ST-Tag) und ein His<sub>6</sub>-Tag versehen. Für beide Kassetten wurden während der Integrationsprozesse jeweils vier unterschiedliche Variationen der Spleißregion generiert, wobei die minimale Veränderung nur die Insertion der nucleophilen Aminosäure der +1 Position in den Linker darstellte (*ssp1* & *npu1*) (Tabelle 15). Die in den anderen Fällen eingefügten Veränderungen an den Positionen -3 bis -1 und +2 bis +4 entsprach den Wildtyp-Exteinsequenz der jeweiligen Inteine. In Tabelle 15 ist für die Integration mittels RF-PCR (Kapitel 3.1.1) zusätzlich der prozentuale Erfolg der Klonierungen gezeigt.

Die Erfolgsrate von über 50 % bei der Erzeugung der Integrationsplasmide zeigt, dass die RF-PCR eine funktionale und zuverlässige Klonierungsmethode unter den hier

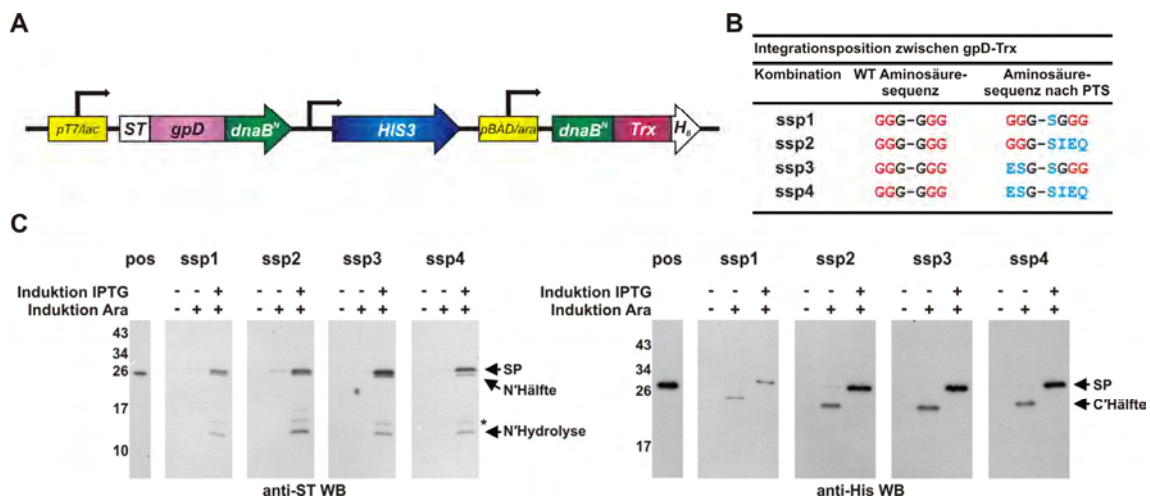
verwendeten Bedingungen darstellt [173, 174]. Außerdem belegt die Integration in den aus sechs Glycin-Codons bestehenden Linker die, trotz der großen Sequenzähnlichkeit dieser Region, hohe Sequenzspezifität der Methode. Eine Integration der *trans*-Inteinkassetten in den Hefe-Shuttlevektor über homologe Rekombination war zwar möglich, aber aufgrund der schlechteren Expressionsraten der resultierenden Integrationsplasmide verglichen mit den auf pET-Vektoren basierenden RF-PCR-Konstrukten wurde diese Methodik für SPLICEFINDER nicht weiter verfolgt (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 15.** Übersicht der in dieser Arbeit mit SPLICEFINDER hergestellten Integrationen in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>*

Kombination	Verwendete Inteinkassette	N-terminale AS	C-terminale AS	Untersuchte Kolonien	Positive Kolonien	Prozentualer Erfolg / %
WT	-	GGG	GGG	-	-	-
ssp1	<i>Ssp</i> DnaB	GGG	SGGG	3	1	33,3
ssp2	<i>Ssp</i> DnaB	GGG	SIEQ	3	3	100
ssp3	<i>Ssp</i> DnaB	ESG	SGGG	11	1	9,1
ssp4	<i>Ssp</i> DnaB	ESG	SIEQ	3	2	66,7
npu1	<i>Npu</i> DnaE	GGG	CGGG	3	3	100
npu2	<i>Npu</i> DnaE	GGG	CFNK	3	2	66,7
npu3	<i>Npu</i> DnaE	AEY	CGGG	3	3	100
npu4	<i>Npu</i> DnaE	AEY	CFNK	3	3	100
				∑ 32	∑ 18	56,3

Mit den generierten Integrationsplasmiden konnte nun die Fragestellung angegangen werden, welche der Aminosäurekombinationen an den Spleißregionen entscheidend zum Ablauf der PTS-Reaktion und zur Bildung des Spleißproduktes beitragen. Dazu wurde ein *E. coli*-BL21-Gold-Stamm mit jeweils einem Integrationsplasmid zusammen mit dem Helferplasmid kotransformiert und eine Testexpression in kleinem Maßstab (4 ml) durchgeführt. Die selektive Expression der *E. coli*-Kulturen begann bei einer OD<sub>600</sub> ~ 0,6 mit der Addition von 0,2 % Arabinose für 2 h bei 37 °C. Abschließend folgten ein Waschschrift, der die im Medium vorhandenen Arabinose entfernte, und eine Inkubation mit 1,2 mM IPTG für 4,5 h. Die Temperatur für die IPTG Induktion orientierte sich an den optimalen Aktivitätsbedingungen der verwendeten Inteine, d.h sie betrug für das *Ssp* DnaB-Intein 25 °C [47] und beim *Npu* DnaE-Intein 37 °C [44]. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch Aufkochen in Probenpuffer aufgeschlossen und die Proben einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

Die Analyse der PTS-Reaktion der *Ssp* DnaB-Integrationsplasmiden erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 38). Sowohl der ST-Tag- als auch der His<sub>6</sub>-Tag-Western-Blot zeigte bei allen vier Kombinationen eine Bildung des Spleißprodukts (Abbildung 38 C). Sogar die Kombination mit der alleinigen Insertion des +1 Serins in die Linkerregion (*ssp1*, Abbildung 38 B) war spleißaktiv. Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Toleranz des DnaB-Inteins gegenüber glycinreichen Sequenzen in der Insertionstelle. Die Anpassung der N- oder C-terminalen Spleißregion an die Wildtyp-Exteinsequenz führte zu einer erwarteten Erhöhung der gebildeten Spleißproduktmenge. Außerdem konnte für alle Kombinationen das N-terminale Hydrolyseprodukt im Anti-ST-Western-Blot nachgewiesen werden (Abbildung 38 C). Damit war diese Nebenreaktion unabhängig von den flankierenden Aminosäuren an der Spleißregion und scheint somit eine inhärente Eigenschaft des DnaB-Inteins zu sein.

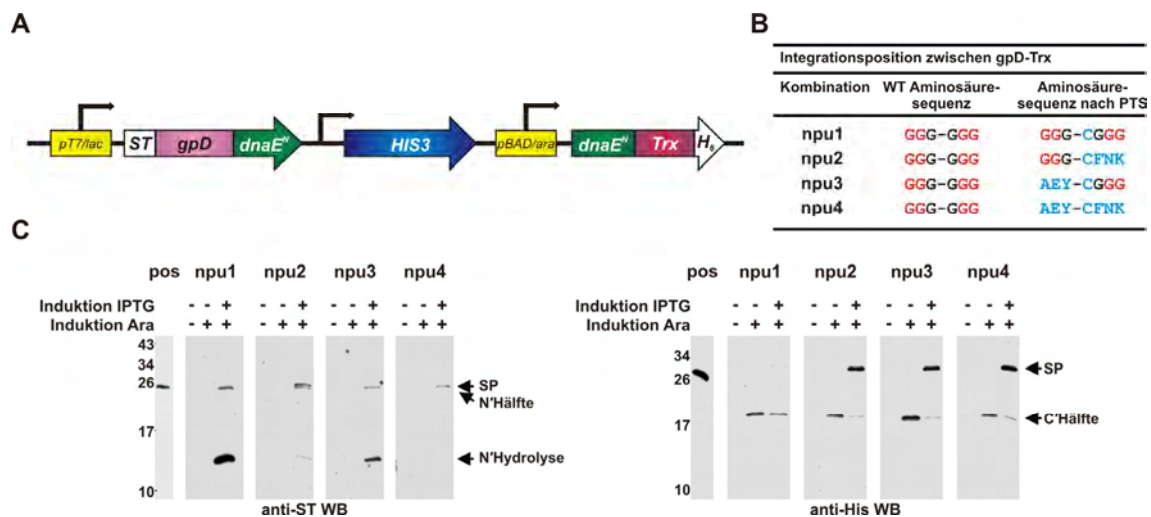


**Abbildung 38. Integration der *Ssp* DnaB-Kassette in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>***

A) Schematische Darstellung der generierten Integrationsplasmide nach der Integration der *Ssp* DnaB-Kassette in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>*. B) Aufschlüsselung der Aminosäuresequenz an der Spleißregion für die erzeugten Kombinationen. Die von der Linkerregion (rot) und der direkten Insertionsposition (schwarz) abweichenden Aminosäuren wurden in blau hervorgehoben. C) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von Stämmen, die die verschiedenen Integrationsplasmide und das Helferplasmid koexprimierten und alle selektiv, zuerst mit Arabinose (Ara) und danach mit IPTG, induziert wurden. Alle vier Kombinationen sind zudem in der Lage das Spleißprodukt (SP = 26,5 - 26,8 kDa) aus den N-terminalen und C-terminalen Fusionsproteinen (N' Hälften = 24,9 - 25,0 kDa, C'Hälften = 18,8 - 19,0 kDa) zu bilden. Ebenfalls konnte in allen Kombinationen das N-terminale Hydrolyseprodukt (N'Hydrolyse = 13,2 - 13,3 kDa) detektiert werden. (pos = Positivkontrolle *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>* = 26,4 kDa)

Bei den *Npu* DnaE-Integrationsplasmiden (Abbildung 39 A) zeigte die Untersuchung der PTS-Reaktionen für eine Kombination (*npu1*, Abbildung 39 B) keine Spleißproduktbildung im Anti-ST- und Anti-His<sub>6</sub>-Western-Blot (Abbildung 39 C). Diese Kombination, die Insertion des +1 Cysteins in den Glycinlinker ohne Anpassung weiterer Aminosäuren, führte zu einer Inhibition der PTS-Reaktion und einem erhöhten Auftreten von N-terminaler Hydrolyse. Die Anpassung der Aminosäuren der N-terminalen Spleißregion zu

AEY (*npu3*) erzeugte ebenfalls N-terminale Hydrolyse, inaktivierte aber nicht vollständig das Intein (Abbildung 39 C). Die Beobachtung, dass die *npu3*-Position die Spleißreaktion durchführen kann, ist bemerkenswert, da vorherige Studien mit dem homologen *Ssp* DnaE-Intein immer das CFN-Motiv an der C-terminalen Spleißregion als Voraussetzung zum erfolgreichen Ablaufen der Spleißreaktion beschrieben haben [31, 32]. Das hier erzielte Ergebnis ist ein gutes Beispiel für die Schwierigkeit der Vorhersage der Inteinaktivität in einem spezifischen Exteinkontext. Die endgültige Klärung dieser Fragestellung kann zurzeit nur experimentell beantwortet werden kann. Beide Kombinationen mit der an CFN angepassten C-terminalen Spleißregion (*npu2* & *npu4*) waren spleißaktiv. Zusätzlich wurde hier die Bildung des N-terminalen Hydrolyseproduktes sehr stark reduziert bzw. vollständig aufgehoben.

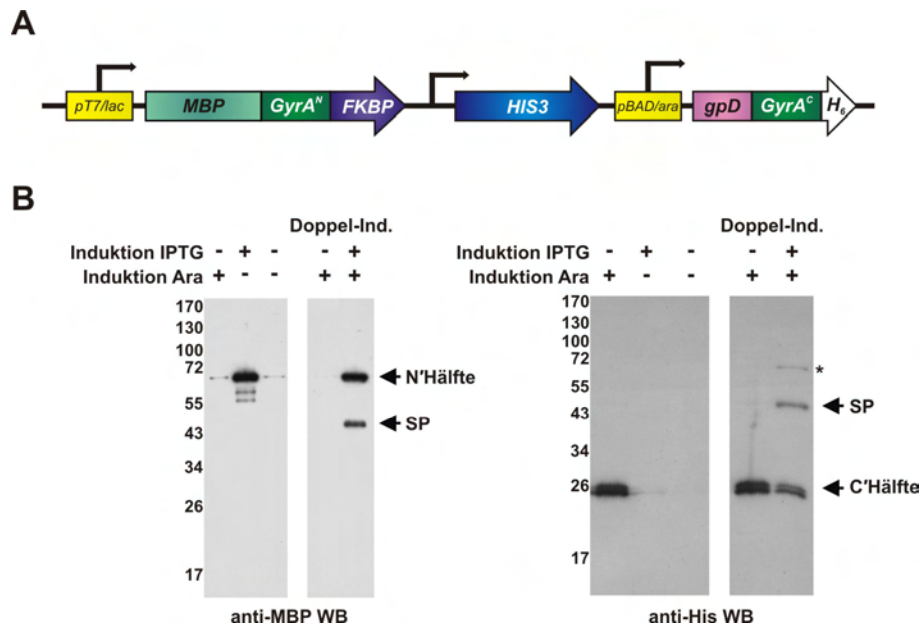


**Abbildung 39. Integration der *Npu* DnaE-Kassette in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>***

A) Schematische Darstellung der generierten Integrationsplasmide nach der Integration der *Npu* DnaE-Kassette in *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>*. B) Aufschlüsselung der Aminosäuresequenz an der Spleißregion für die erzeugten Kombinationen. Die von der Linkerregion (rot) und der direkten Insertionsposition (schwarz) abweichenden Aminosäuren wurden in blau hervorgehoben. C) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von Stämmen, welche die verschiedenen Integrationsplasmide und das Helferplasmid koexprimierten und alle selektiv, zuerst mit Arabinose (Ara) und danach mit IPTG, induziert wurden. Bis auf Kombination *npu1* sind alle dazu in der Lage das Spleißprodukt (SP = 26,5 - 26,9 kDa) aus den N-terminalen und C-terminalen Fusionsproteinen (N'Hälften = 25,0 - 25,2 kDa, C'Hälften = 17,4 - 17,6 kDa) zu bilden. Ebenfalls war es möglich, das N-terminale Hydrolyseprodukt (N'Hydrolyse = 13,2 - 13,4 kDa) im Anti-ST-Western-Blot zu detektieren. (pos = Positivkontrolle *ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>* = 26,4 kDa)

Im Falle der *Mxe* GyrA-*trans*-Inteinkassette erfolgte nur ein funktionaler Nachweis der Spleißaktivität mit den aus ihrer ursprünglichen Klonierung resultierenden Modellproteinen (Abbildung 40). Am 5'-Ende wurde *MBP* und am 3'-Ende die Sequenz für einen *His<sub>6</sub>*-Tag addiert, was die Bildung des Spleißproduktes *MBP-His<sub>6</sub>* zur Folge hatte. Durch die besonderen Voraussetzungen des künstlich gespaltenen *Mxe* GyrA-Inteins war es

unerlässlich zur Erhaltung seiner Aktivität hinter die Sequenz des N-terminalen Inteinfragments *FKBP* und vor die C-terminale Hälfte des Inteins *gpD* zu setzen. Wahrscheinlich fördert und stabilisiert die Addition dieser monomeren Proteindomänen die korrekte Faltung der Inteinhälften [74].



**Abbildung 40. Die *Mxe* GyrA-Kassette**

A) Schematische Darstellung der generierten und auf ihre PTS-Aktivität untersuchten *Mxe* GyrA-Kassette. B) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von Stämmen, welche die GyrA-Kassette und das Helferplasmid koexprimieren. Die selektive Induktion der resultierenden Fusionsgene erfolgte entweder mit 0,2 % Arabinose (Ara) oder 0,4 mM IPTG für jeweils 4 h bei 37 °C oder bei der Doppelinduktion (Doppel-Ind.) zuerst mit 0,2 % Arabinose für 2 h bei 37 °C und anschließend 0,4 mM IPTG für 4 h bei 25 °C. Bei der Doppelinduktion kommt es zur Bildung des Spleißproduktes (SP = 44,7 kDa) aus den N-terminalen und C-terminalen Fusionsproteinen (N'Hälfte = 69,3 kDa, C'Hälfte = 22,2 kDa).

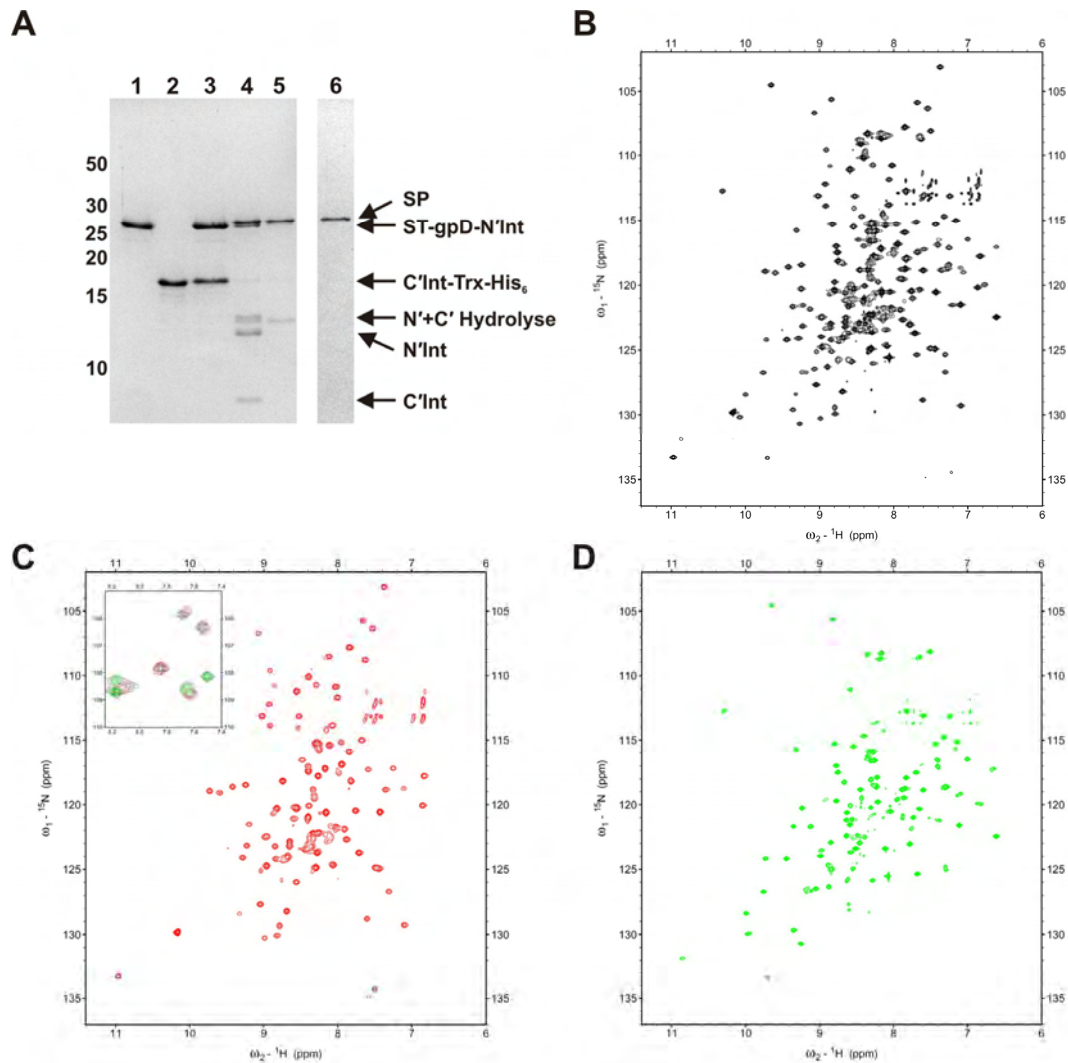
Das Ergebnis der Western-Blot-Analysen zeigte die PTS-Aktivität des *Mxe* GyrA-Inteins in diesem unveränderten Exteinkontext. Somit kann die GyrA-Kassette in dem SPLICEFINDER-System dazu genutzt werden, um diese gespaltenen Inteine an variablen Integrationspositionen in beliebigen Zielgenen einzufügen und die dabei entstehenden Inteinfusionsgene selektiv zu induzieren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *trans*-Inteinkassetten *in vivo* in *E. coli* aktiv waren, sollte deren Aktivität *in vitro* verifiziert werden. Dafür wurden die gereinigten N- und C-terminalen Fusionsproteinen des *Npu* DnaE-Inteins verwendet. Die *in-vitro*-PTS-Reaktion bestätigte die qualitativen Ergebnisse der Western-Blot-Analysen (Daten nicht gezeigt bzw. siehe [198]). Alle Kombinationen bis auf *npu1* (Abbildung 39 B) waren des Weiteren *in vitro* spleißaktiv. Nur die Kombination mit drei Glycinen an beiden Spleißregionen führte zum Verlust der PTS-Aktivität.

Desweiteren wurde nun die segmentelle Isotopenmarkierung von Proteinen für NMR-Messungen anhand des Modellproteins ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub> sowohl mittels *in-vitro*- als auch *in-vivo*-PTS demonstriert. Dadurch sollte bewiesen werden, dass die durch SPLICEFINDER erzeugten Integrationsplasmide direkt zur Strukturaufklärung des gespaltenen Zielproteins eingesetzt werden können. Unter der *in-vitro*-Verwendung des *Npu* DnaE-Inteins sollte die Isotopenanreicherung des C-terminalen Trx-Teils des Spleißproduktes von ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub> erreicht werden. Dazu wurden die N- und C-terminalen Fusionsgene (*ST-gpD-GGG-N'Int* und *C'Int-CFNK-Trx-His<sub>6</sub>*) einzeln in *E. coli* exprimiert, wobei die Expression des C-terminalen Fusionsgens dabei in <sup>15</sup>N-Minimalmedium erfolgte. Nach der Reinigung beider Proteine wurden sie für die *in-vitro*-PTS-Reaktion eingesetzt (Abbildung 41 A). Damit die Vollständigkeit der ablaufenden PTS-Reaktion gewährleistet werden konnte, wurde das N-terminale Fusionsprotein im Überschuss eingesetzt (1,5 Äquivalente). Die während der Reaktion entstandenen N-terminalen Hydrolyseprodukte und C-terminalen Spaltprodukte sowie die herausgeschnittenen Inteinhälften wurden von dem segmentell markierten Spleißprodukt in zwei affinitätschromatographischen Schritten abgetrennt.

In der *in-vivo*-PTS-Reaktion ist für die stattfindende Isotopenanreicherung eine hoch selektive Expression der Fusionsgene essentiell, um so genanntes „isotope scrambling“, den Einbau von Isotopen an unerwünschten Positionen, zu verhindern. Zur Demonstration, dass die entwickelten *trans*-Inteinkassetten zur *in-vivo*-Isotopenanreicherung geeignet sind, wurde eine Isotopenmarkierung der N-terminalen Hälfte des Spleißproduktes ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub> durch selektive Induktionen und gleichzeitiger *in-vivo*-PTS-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurde das DnaB-Integrationsplasmid, welches die Kombination *ssp3* (ESG-SGGG) an den N- und C-terminalen Spleißregionen kodiert, für die Expression verwendet (siehe Abbildung 38). Zunächst erfolgte die Expression des C-terminalen Fusionsgens durch die Zugabe von Arabinose in das LB-Medium; nach dem Wechsel in das als einzige Stickstoffquelle <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid enthaltende Minimalmedium wurde das N-terminale Fusionsprotein selektiv synthetisiert (siehe auch Kapitel 3.3.6). Für die Reinigung des gebildeten Spleißproduktes war nur eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie notwendig, weil ein vollständiger Verbrauch der C-terminalen Inteinhälfte in der PTS-Reaktion unter den gewählten Bedingungen stattfand. Das in Spuren vorhandene, mitgereinigte C-terminale Hydrolyseprodukt (Trx-His<sub>6</sub>) musste nicht zusätzlich abgetrennt werden (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 41. Segmentelle Isotopenmarkierung des durch PTS hergestellten Modellproteins ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>**

A) Das SDS-PAGE-Gel zeigt die gereinigten Inteininfusionsproteine und die präparative Reinigung des segmentell markierten Spleißprodukts ST-gpD-<sup>15</sup>N(Trx-His<sub>6</sub>) nach der *in-vitro*-PTS-Reaktion mit dem *Npu*-DnaE-Intein. (1 = gereinigtes N-terminales Fusionsprotein (ST-gpD-GGG-N'Int = 25,0 kDa); 2 = gereinigtes C-terminales Fusionsprotein <sup>15</sup>N(C'Int-CFNK-Trx-His<sub>6</sub>) (17,6 kDa); 3 = Nullstundenprobe der PTS-Reaktion; 4 = PTS-Reaktion nach 16 h bei 4 °C (SP = 26,7 kDa); 5 = Elutionsfraktionen der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie; 6 = Elutionsfraktionen der Strep-Tag-II-Affinitätschromatographie) Es konnten ferner Nebenprodukte der Reaktion nachgewiesen werden: Die N- und C-terminalen Hydrolyseprodukte (N' & C' Hydrolyse = 13,2-13,5 kDa) und das N- und C-terminale Inteinfragment (N'Int = 11,9 kDa, C'Int = 4,1 kDa) B-D) <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-TROSY Spektren von dem komplett markierten Protein <sup>15</sup>N(ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>) (schwarz, B) sowie von den *in vivo* <sup>15</sup>N(ST-gpD)-Trx-His<sub>6</sub> (rot, C) und *in vitro* ST-gpD-<sup>15</sup>N(Trx-His<sub>6</sub>) (grün, D) segmentell durch PTS markierten Proteinen; die Vergrößerung in C) zeigt eine Überlagerung der drei Spektren und demonstriert die Reduktion der Signalüberlappung durch segmentelle Isotopenmarkierung.

Die *in vitro* und *in vivo* isotopenmarkierten Spleißprodukte wurden analog zu dem vollständig <sup>15</sup>N-markierten Modellprotein (ST-gpD-GGGGGG-Trx-His<sub>6</sub>) gegen NMR-Puffer dialysiert und konzentriert. Anschließend erfolgte die Aufzeichnung der <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-TROSY-Spektren aller drei Proteine durch Alena Busche und Dr. Frank Löhr vom Max-Planck-Institut

für Biophysik in Frankfurt (Abbildung 41 B-D). In der zusätzlichen Vergrößerung in Abbildung 41 C ist die durch segmentelle Isotopenmarkierung erwartete Reduktion der Komplexität der Spektren zu erkennen. Diese verminderte Signalüberlagerung erleichtert eine Zuordnung der Signale.

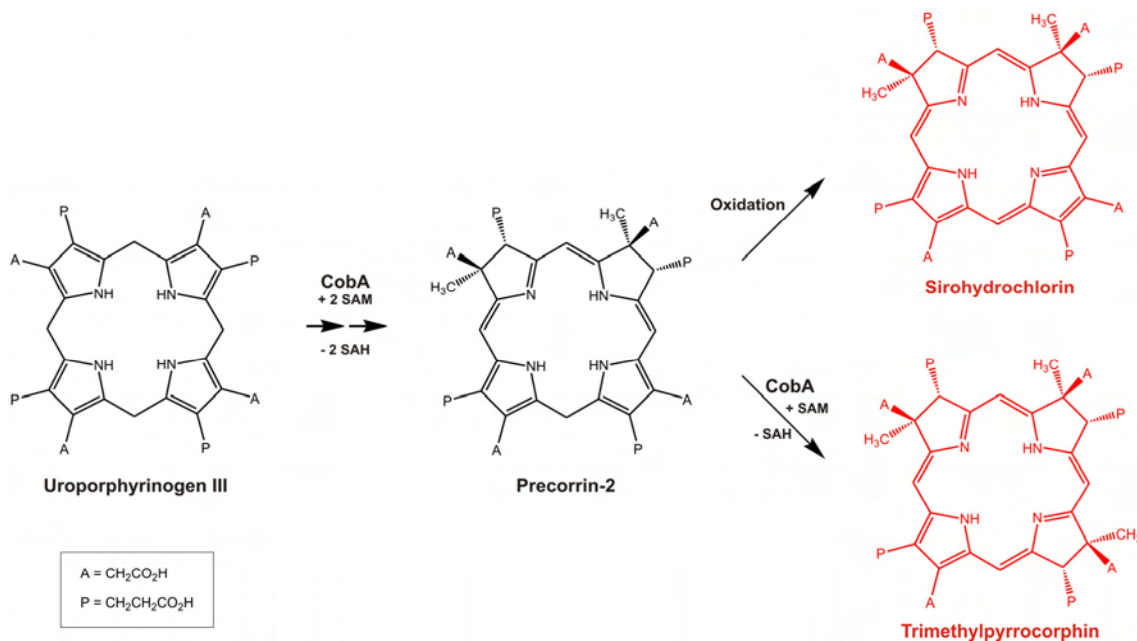
Für die *in vitro* und *in vivo* erzeugten Spleißprodukte (ST-gpD-Trx-His<sub>6</sub>) erfolgte außerdem eine Überprüfung der segmentellen Isotopenmarkierungseffizienz mittels tryptischen In-Gelverdaus der Spleißproduktbande mit anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse. Das Ergebnis für das *in vitro* hergestellte Spleißprodukt zeigte eine Anreicherung der <sup>15</sup>N-Isotope im N-terminalen Teil von unter 1 % und im C-terminalen Teil von 95 %. Für das *in-vivo*-Spleißprodukt wurde die Anreicherung der <sup>15</sup>N-Isotope im N-terminalen Teil mit 83 % und im C-terminalen Teil von unter 1 % bestimmt. Diese leichte Reduktion der Isotopenanreicherung des *in vivo* erzeugten Spleißproduktes lässt sich auf vorhandene unmarkierte Aminosäuren und Vorläuferproteine zum Zeitpunkt der IPTG-Induktion zurückführen. Die genaue Durchführung dieser Experimente und Kalkulation der Ergebnisse ist der Dissertation von Joachim Zettler zu entnehmen [198].

Mit der SPLICEFINDER-Methode war es also möglich ein selektiv induzierbares Inteinkassettensystem zu generieren, mit dem neue Intein-Insertionspositionen in Zielproteinen identifiziert und diese Proteine zugleich segmentell isotopenmarkiert werden können.

### **4.2.3 Integration und Funktionalisierung des Zielproteins CobA mit Hilfe einer *trans*-Inteinkassette**

Um die breite Anwendbarkeit von SPLICEFINDER zu untersuchen, wurde nach einem funktionalen Enzym gesucht, um eine der *trans*-Inteinkassetten direkt in dieses zu integrieren. Dieser Prozess sollte das Enzym in zwei inaktive Hälften spalten, dessen Aktivität nur durch die PTS-Reaktion rekonstituiert werden kann. Bei dem ausgewählten Zielprotein handelte es sich um die Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase (CobA) aus *Propionibacterium freudenreichii* [177, 199]. Diese Klasse von Enzymen ist an der Tetrapyrrol-Biosynthese diverser Organismen beteiligt, wobei es als mutmaßliches Dimer die Umwandlung von Uroporphyrinogen-III in Precorrin-2 katalysiert [177, 199, 200]. In den zwei aufeinanderfolgenden Methylierungsreaktionen am Tetrapyrrolring dient S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonator (Abbildung 42). Die Überproduktion von CobA führt zur Akkumulation von rot fluoreszierenden Nebenprodukten, die entweder durch die Oxidation von angesammeltem Precorrin-2 zu Sirohydrochlorin oder aber durch die zusätzliche

Methylierung von Precorrin-2 zu Trimethylpyrrocorphin entstehen, möglicherweise sogar auf tetramethylierte Tetrapyrrole zurückzuführen sind [177].



**Abbildung 42. Die von CobA-katalysierten Reaktionen**

Die Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase CobA katalysiert die Umwandlung von Uroporphyrinogen-III zu Precorrin-2 durch den schrittweisen Verbrauch von zwei S-Adenosylmethionin-Molekülen (SAM). Eine Überproduktion von CobA führt zu der Anreicherung von rot fluoreszierenden Sirohydrochlorin und Trimethylpyrrocorphin.

Aufgrund dieser Eigenschaft wurde CobA schon als rot fluoreszierender Transkriptions-Reporter in *E. coli*, Hefen und Säugerzellen [201] oder als Gesamtzellen-Biosensor in *E. coli* [202] eingesetzt. Das Enzym CobA benötigt keine zusätzlichen exogenen Substrate für seine Aktivität, allerdings führte die Zugabe von  $\delta$ -Aminolävulinsäure („ $\delta$ -aminolevulinic acid“ ALA), einem Vorläufer der Tetrapyrrol-Biosynthese, zu stabileren und reproduzierbareren Ergebnissen [202].

Durch die Integration einer *trans*-Inteinkassette in *cobA* sollte zuerst ein zellulärer Biosensor für eine erfolgreiche PTS-Reaktion in *E. coli* erzeugt werden. Die Wahl der *trans*-Inteinkassette fiel aufgrund seiner hohen Reaktionsgeschwindigkeit auf das *Npu* DnaE-Intein [44]. Das *Npu* DnaE-Intein besitzt an Position +1 ein Cystein, das den einzigen zwingend erforderlichen Rest der PTS-Reaktion im Spleißprodukt darstellt. In der CobA-Wildtypsequenz befindet sich nur an Position 109 ein natürlich vorkommendes Cystein, das deshalb als erste Integrationsposition ausgewählt wurde (Abbildung 43). Das Kriterium zur Auswahl weiterer Integrationspositionen waren unkonservierte Regionen des Proteins, da in diesen Bereichen von einer höheren Toleranz gegenüber Aminosäure-Substitutionen

ausgegangen werden kann. Nach dem Sequenzalignment von CobA aus *P. freudenreichii* mit zwölf homologen Proteinen wurde ein Serin an Position 159 für die Integration ausgesucht.

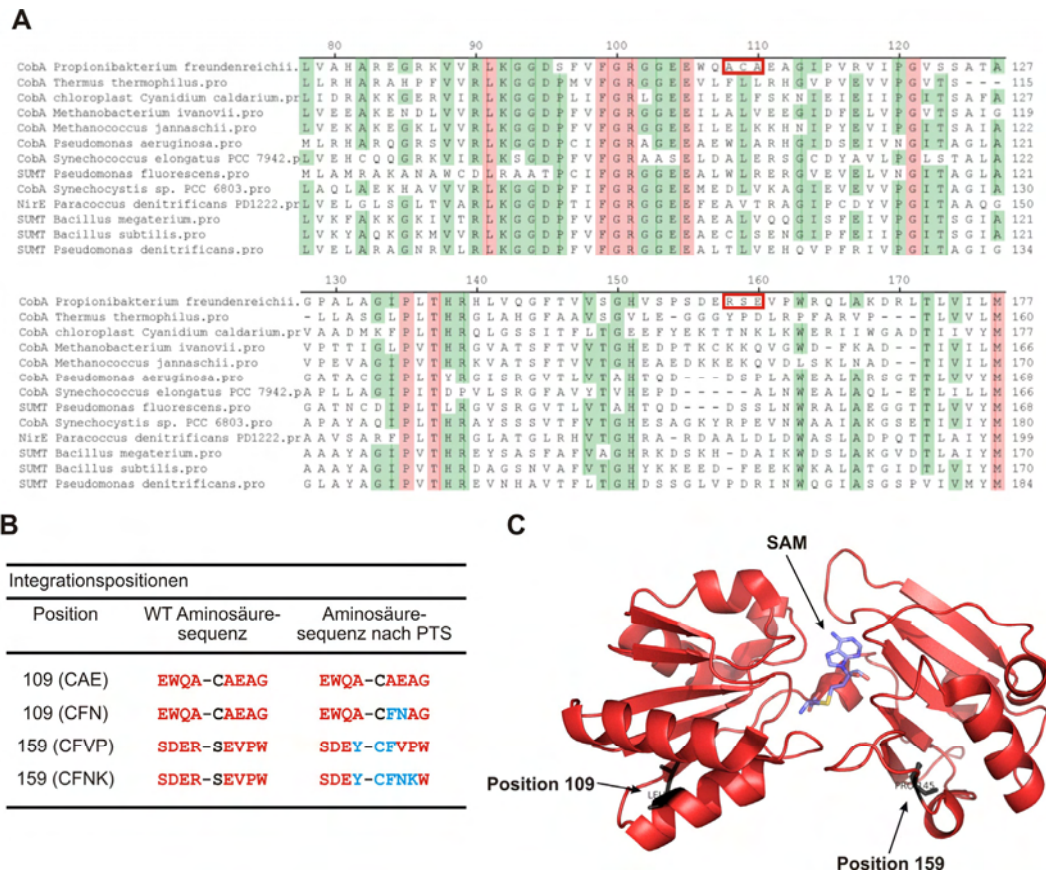


Abbildung 43. Integrationspositionswahl für SPLICEFINDER in CobA

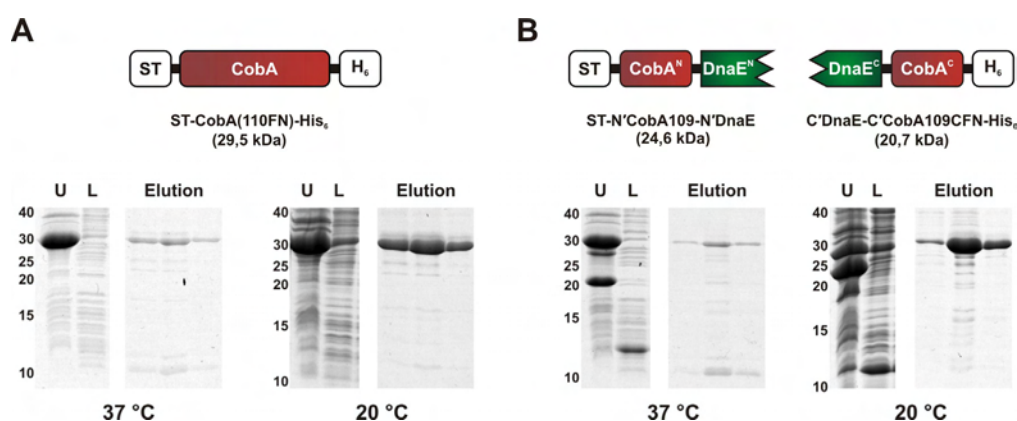
A) Aligment der Primärsequenzen von CobA aus *P. freudenreichii* mit Uroporphyrinogen-III-Methyltransferasen aus verschiedenen Organismen. Die invarianten Aminosäuren sind in rot und die bei acht von dreizehn Organismen konservierten Aminosäuren sind in grün markiert. Die zwei roten Kästen weisen auf die Insertionspositionen der *Npu* DnaE-Kassette hin. B) Aufschlüsselung der Integrationspositionen nach ihrer Wildtypsequenz (WT) und der Sequenz nach dem Ablauf der Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS). Dabei sind die Aminosäuren, die von der Wildtypsequenz (schwarz = Integrationsposition und rot = flankierende Bereiche) abweichen, in blau hervorgehoben. C) Kristallstruktur des *Thermus Thermophilus* CobA-Proteins (PDB ID 1V9A [203]) mit dem gebundenen Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM). Nach dem Sequenzalignment mit *P. freudenreichii* wurden die den Integrationspositionen entsprechenden Aminosäuren in schwarz markiert.

Die Integration der *Npu* DnaE-Kassette in die gewählten Positionen erfolgte in einem auf dem pET16b-Vektor basierenden und für *ST-cobA-His<sub>6</sub>* kodierenden Plasmid. Während des über RF-PCR ablaufenden Integrationsprozesses wurden vier unterschiedliche Kombinationen erzeugt, wobei vor allem auf eine Adaption der Aminosäuren an der C-terminalen Spleißregion Wert gelegt wurde (Abbildung 43 B). Die PTS-Reaktion der beiden Kombinationen an Position 109 würde zum einen zum Wildtyp ST-CobA-His<sub>6</sub> führen und zum anderen zur Anpassung der +2 und +3 Position an die Wildtyp-Exteinsequenzen des *Npu* DnaE-Inteins (FN). In den Kombinationen an der Integrationsposition 159 fand in beiden

Fällen eine Mutation der Positionen -1 bis +2 zu denen des *Npu* DnaE-Wildtypeteins statt. In der letzten Kombination wurde noch zusätzlich die +3 und +4 Position angepasst.

Durch sowohl *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Experimente bei 37 °C konnte in ersten Versuchen die Spleißaktivität aller Kombinationen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität der erzeugten CobA-Proteine sollte fluoreszenz-spektroskopisch untersucht werden, da bei aktiven CobA eine Akkumulation der rot fluoreszierenden Verbindungen zu erwarten wäre. Dazu wurden *E. coli*-Zellen nach dem Ende der Expression in PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert und mit einem CARY-100 BIO UV-VIS-Spektrophotometer (Anregung bei 357 nm und Emission bei 605 nm, *Varian*) untersucht. Bei der Expression bei 37 °C traten jedoch folgende Probleme auf: Toxizität für die *E. coli*-Zellen, geringe bzw. Hintergrundaktivität der nicht-induzierten Proben und geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die beobachteten Effekte ließen die Schlussfolgerung zu, dass eine Überexpression bei 37 °C zu Löslichkeits- und Faltungsproblemen des CobA-Proteins führt. Deshalb wurde nach und nach die Expressionstemperatur gesenkt, die Expressionsdauer erhöht und verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme getestet.

Um die Hypothese des Einflusses der Expressionstemperatur auf die Löslichkeit von CobA zu überprüfen, wurde das Fusionsgen *ST-cobA(110FN)-His<sub>6</sub>* und das dazu korrespondierende Integrationsplasmid, welches das identische Protein während der PTS-Reaktion bildet, bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (20 und 37 °C) für vier Stunden in BL21-Gold(DE3) synthetisiert und nach Zellaufschluss die löslichen Fraktion mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 44).



**Abbildung 44. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der CobA-Expression und der PTS-Reaktion**

Die SDS-PAGE-Analyse zeigt die Synthese und die anschließende Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie des ungespaltenen und durch PTS hergestellten ST-CobA(110FN)-His<sub>6</sub>-Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen aus der löslichen Fraktion. (U = unlösliche Fraktion nach Zellyse, L = lösliche Fraktion nach Zellyse, Elution = die ersten drei Elutionsfraktionen der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie) A) Reinigung der 110FN-Mutante des ST-CobA-His<sub>6</sub>-Proteins. B) Reinigung des CobA-Spleißproduktes (entspricht ST-CobA(110FN)-His<sub>6</sub>) nach selektiver Doppelinduktion (0,2 % Arabinose für 2,5 h bei 37/25 °C und danach 0,4 mM IPTG für 4 h bei 37/20 °C).

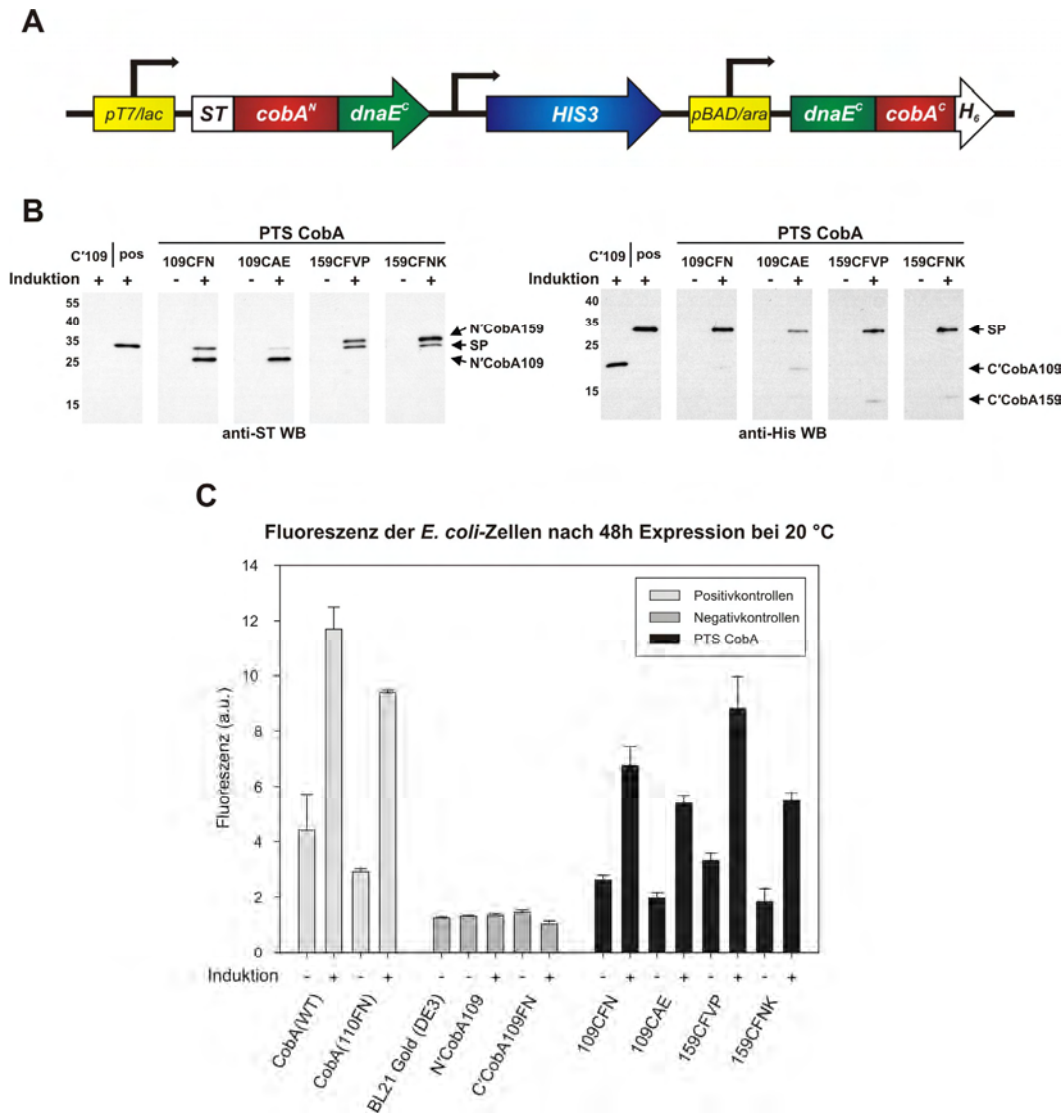
Sowohl beim ungespaltenen (Abbildung 44 A) als auch beim über PTS hergestellten ST-CobA(110FN)-His<sub>6</sub> (Abbildung 44 B) fand eine beträchtliche Verbesserung der Reinigungsmenge bei 20 °C gegenüber 37 °C um mindestens den Faktor 10 statt. Interessanterweise war es weder bei 37 °C noch 20 °C möglich das C-terminale CobA-Fusionsprotein (C'DnaE-C'CobA-His<sub>6</sub>) über den His<sub>6</sub>-Tag zu reinigen, was zumindest auf die völlige Unzugänglichkeit bzw. Fehlfaltung dieses Teils des Proteins hinweist. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass Fehlfaltungen und der Einfluss der Temperatur eine große Rolle bei der Expression von *cobA* spielen.

Unter diesen optimierten Expressionsbedingungen wurde die Bestimmung der fluoreszenz-spektroskopischen CobA-Aktivität wiederholt. Dazu erfolgte die selektive Expression der verschiedenen CobA-Integrationsplasmide bei 20 °C für 48 Stunden in BL21-Gold(DE3)-Zellen (genau Durchführung siehe Kapitel 3.3.7) (Abbildung 45).

Nach der Veränderung der Bedingungen ließen sich in allen generierten Kombinationen sowohl das Spleißprodukts als auch die N- und C-terminalen Fusionsproteine mittels Anti-ST- und Anti-His-Western-Blot-Analysen detektieren (Abbildung 45 B). Ferner fand über den langen Zeitraum von 48 Stunden ein fast vollständiger Verbrauch der durch Arabinose induzierten C-terminalen Inteinhalbte statt. Nur die Kombination 109 (CAE) zeigte im Vergleich zu den übrigen eine reduzierte Bildung des Spleißproduktes. Dieses Verhalten wurde ebenfalls bei einer Expressionstemperatur von 37 °C beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Fluoreszenzmessung der CobA-Positivkontrolle wies auf einen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-induzierten und den induzierten Proben (Abbildung 45 C) hin. Diese CobA-Restaktivität der nicht-induzierten Zellen ist jedoch geringer als die der Zellen, die bei 37 °C exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Aktivität basiert womöglich auf dem undichten T7-Promotor während der langen Expressionsdauer, obwohl kein ST-CobA-His<sub>6</sub> in der nicht-induzierten Probe nachgewiesen werden konnte (Abbildung 45 B). Die Einführung der Mutationen von Phe-Asn an Position 110 und 111 in ST-CobA-His<sub>6</sub> reduzierte seine Aktivität um ca. 20 %. Dieses Ergebnis ist deshalb von Bedeutung, weil die Kombination 109 (CFN) nur das entsprechende mutierte CobA durch PTS herstellen kann und schon aus diesem Grund eine Aktivitätsverminderung im Vergleich zum Wildtyp-CobA besteht. Die anderen drei CobA-Mutanten wurden nicht auf einen möglichen Aktivitätsverlust hin untersucht. Alle gemessenen Negativkontrollen zeigten keine CobA-Restaktivität, unabhängig davon, ob es sich um plasmidlose BL21-Gold(DE3)-Zellen oder um Stämme handelte, die nur das N- oder C-terminale CobA-Fusionsprotein synthetisierten. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten waren in allen Fällen geringer als die nicht-induzierten Positivkontrollen und die nicht-



induzierten Integrationsplasmide. Damit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass keine der erzeugten N- oder C-terminalen CobA-Hälften eine enzymatische Restaktivität besaß.



**Abbildung 45. Die CobA-PTS-Reaktion und Aktivität in *E. coli***

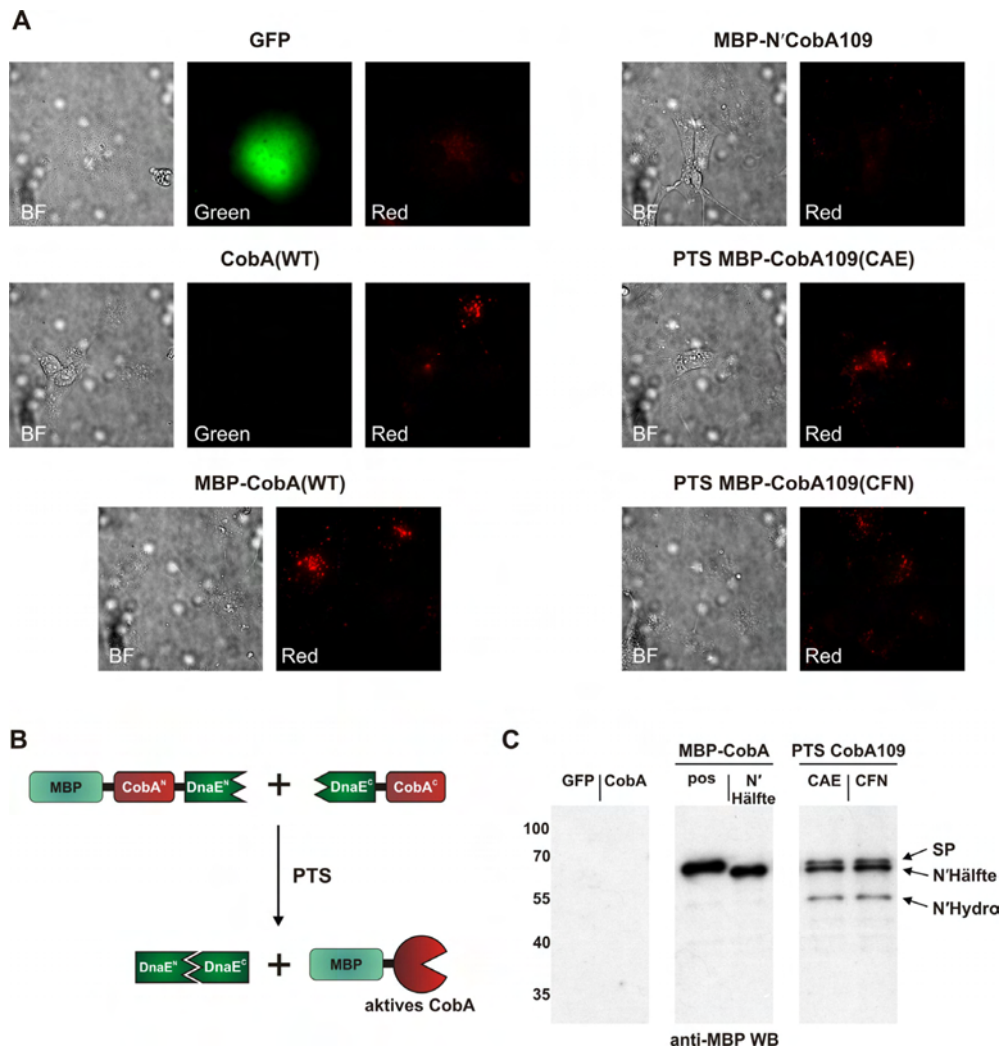
A) Schematische Darstellung der durch RF-PCR erzeugten Integrationsplasmide. B) Western-Blot-Analyse des Gesamtzellextraktes von BL21-Gold(DE3)-Zellen, welche die Integrationsplasmide und das Helferplasmid koexprimieren. Der Zellextrakt wurde zum exakten Zeitpunkt der Aktivitätsmessung präpariert. Es war möglich das ST-CobA-His<sub>6</sub>-Splicingprodukt (SP = 29,5 kDa) und alle N- und C-terminalen CobA-Fusionsproteine (N'CobA 109 = 24,7 kDa, N'CobA 159 = 29,7 kDa, C'CobA 109 = 20,7 kDa, C'CobA 159 = 15,7 - 15,8 kDa) nachzuweisen. Als Kontrollen wurde ST-CobA-His<sub>6</sub> (pos = 29,5 kDa) und ein C-terminales CobA-Fusionsprotein (C'109 = 20,7 kDa) verwendet C) Fluoreszenzintensität der *E. coli*-Zellen nach 48 h Expressionsdauer bei 20 °C (Anregung bei 357 nm und Emission bei 605 nm). Alle Zellen wuchsen in der Anwesenheit von 1 mM ALA im Medium und die selektive Doppelinduktion der Integrationsplasmide fand mit 0,1 % Arabinose bei 25 °C für 3,5 h und 0,05 mM IPTG bei 20 °C für 48 h statt. Des Weiteren wurde als eine der Negativkontrollen ein plasmidloser BL21-Gold(DE3)-Stamm verwendet.

Die Messung der Fluoreszenzintensität der *E. coli*-Zellen zeigte für die von allen Kombinationen erzeugten ST-CobA-His<sub>6</sub>-Splicingprodukte eine fortbestehende enzymatische

Aktivität (Abbildung 45 C). Die induzierten PTS-Proben der Kombination 109 (CAE) und 159 (CFNK) erreichten ungefähr die Hälfte der Fluoreszenzintensität des Wildtyps und die Kombinationen 109 (CFN) und 159 (CFVP) bis 75 %. Darüber hinaus zeigten die nicht-induzierten Kombinationen 109 und 159 eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität als die Negativkontrollen, was sich wahrscheinlich erneut auf undichte Promotoren zurückführen lässt. Allerdings war es in keiner der nicht-induzierten Kombination möglich, im Anti-ST- oder Anti-His<sub>6</sub>-Western-Blot die N- oder C-terminalen Fusionsproteine oder das Spleißprodukt nachzuweisen (Abbildung 45 B). Da für alle generierten Kombinationen keine spleißinaktiven Mutanten erzeugt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beobachtete Aktivität alleinig aus dem Proteinspleißen herrührt oder aber ob zwischen den erzeugten CobA-Hälften Protein-Fragment-Komplementation stattfinden kann.

Schon in der ursprünglichen Publikation, in der CobA als Transkriptions-Reporter verwendet wurde, konnte dessen Verwendung in Säugerzellen demonstriert werden [201]. Dabei konnte, abhängig von den verwendeten Zelllinien, eine Anreicherung der rot fluoreszierenden Verbindungen in den Mitochondrien beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde versucht, die in *E. coli* ablaufende PTS-Reaktion und die Aktivität von CobA nach dem Proteinspleißen in Zellkulturexperimenten zu reproduzieren. Dazu mussten zuerst die Fusionsgene der Integrationsplasmide einzeln in jeweils einen neuen Expressionsvektor (pcDNA3) umkloniert werden, wobei aber auf die Übertragung der ST- und His<sub>6</sub>-Tags verzichtet wurde. Teilweise wurde *cobA* anstelle der Tags mit dem *MBP*-Gen fusioniert, das der Löslichkeitsförderung und dem Nachweis der Spleißreaktion diene (Abbildung 46 B). Nach der Transfektion der Kombinationen für die Integrationsposition 109 in COS-7 Zellen wurden diese fluoreszenzmikroskopisch zum Nachweis der CobA-Aktivität und zur Analyse der PTS-Reaktion mittels Western Blot untersucht (Abbildung 46). Fünf Stunden nach Transfektion der Zellen wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und dabei 1 mM ALA hinzugefügt. Nach weiterer Inkubation für 24 Stunden wurden die Zellen analysiert.





**Abbildung 46. Die CobA-Aktivität in COS-7-Zellen**

A) Die Mikroskopiebilder lebender COS-7-Zellen zeigen im roten Kanal (Red) rot fluoreszierenden Teilstrukturen. Als Positivkontrollen dienten das Wildtyp-CobA (WT) ohne Tags und eine mit MBP fusionierte Version. Die Negativkontrollen bestanden aus dem pEGFP-N1-Vektor (GFP) und der mit MBP fusionierten N'CobA-N'DnaE (N'Hälfte). (Red = roter Kanal = Anregung bei 370/36 nm und Emissionsmessung bei 629/53 nm) B) Schematische Darstellung der Protein-*trans*-Spleißreaktion (PTS) von CobA in Säugerzellen. C) Western Blot des Gesamtzellextraktes von COS-7 Zellen zum Zeitpunkt der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung. Der Western Blot zeigt sowohl die Bildung des N-terminalen Fusionsproteins MBP-N'CobA109-N'DnaE (N'Hälfte = 66,4 kDa) als auch die Bildung des Spleißproduktes (SP = 70,1 - 70,2 kDa) im Vergleich zur Positivkontrolle MBP-CobA (70,1 kDa) und den Plasmiden, die nur eGFP und CobA(WT) synthetisierten. Im Falle der PTS-Reaktionen von CobA 109 ließ sich zusätzlich das N-terminale Hydrolyseprodukt nachweisen (N'Hydro = 54,6 kDa).

Analog zu den Positivkontrollen (CobA, MBP-CobA) konnte auch bei den Zellen, die PTS durchführen können, MBP-CobA(110FN) und MBP-CobA(110AE), eine rote Fluoreszenz subzellulärer Strukturen der COS-7-Zellen, detektiert werden (Abbildung 46 A). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die schon von Wildt *et al.* beobachteten Mitochondrien [201]. Diese organellspezifische Fluoreszenz hängt wahrscheinlich mit der Häm-Biosynthese in Säugerzellen zusammen, die zum größten Teil in den Mitochondrien

abläuft [204], so dass es dort zu einer Akkumulation der von CobA erzeugten Produkte kommen könnte. Die rote Fluoreszenz konnte nicht in den Negativkontrollen, dem pEGFP-N1-Vektor oder der alleinigen N-terminalen Hälfte nachgewiesen werden. Zusätzlich zur roten Fluoreszenz zeigten MBP-CobA(110FN) und MBP-CobA(110AE) die Bildung von Spleißprodukt und N-terminaler Hydrolyse im Western Blot (Abbildung 46 C). Diese Korrelation unterstützt die Zurückführung der CobA-Aktivität auf das Proteinspleißen.

In allen durchgeführten Säuger-Zellkulturexperimenten, auch in den Positivkontrollen, zeigte eine große Anzahl der Zellen nur Autofluoreszenz. Ob es sich dabei um ein transfektions- oder expressionsbedingtes Problem handelt, wurde nicht bestimmt. In zukünftigen Experimenten könnte durch Verwendung eines optimalen Anregungsfilters für das Mikroskop (370 nm statt 357 nm) das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Zusätzlich konnten in den Mikroskopieexperimenten relativ schlechte Fluoreszenzeigenschaften der von CobA erzeugten Moleküle festgestellt werden. Zum einen musste mit sehr hoher Sensitivität gemessen werden und zum anderen konnte dieselbe Zelle maximal zwei- bis dreimal fotografiert werden. Danach war ein vollständiges Photobleaching eingetreten.

Dennoch kann auch zum jetzigen Zeitpunkt das gespaltene CobA in *E. coli* und in Säugerzellen als Biosensor für Proteinspleißen verwendet werden. Die Steigerung der Aktivität von CobA in beiden Anwendungsbereichen wäre der nächste Ansatzpunkt für weitere Studien.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die generelle Anwendbarkeit und die Probleme des CPS-Ansatzes

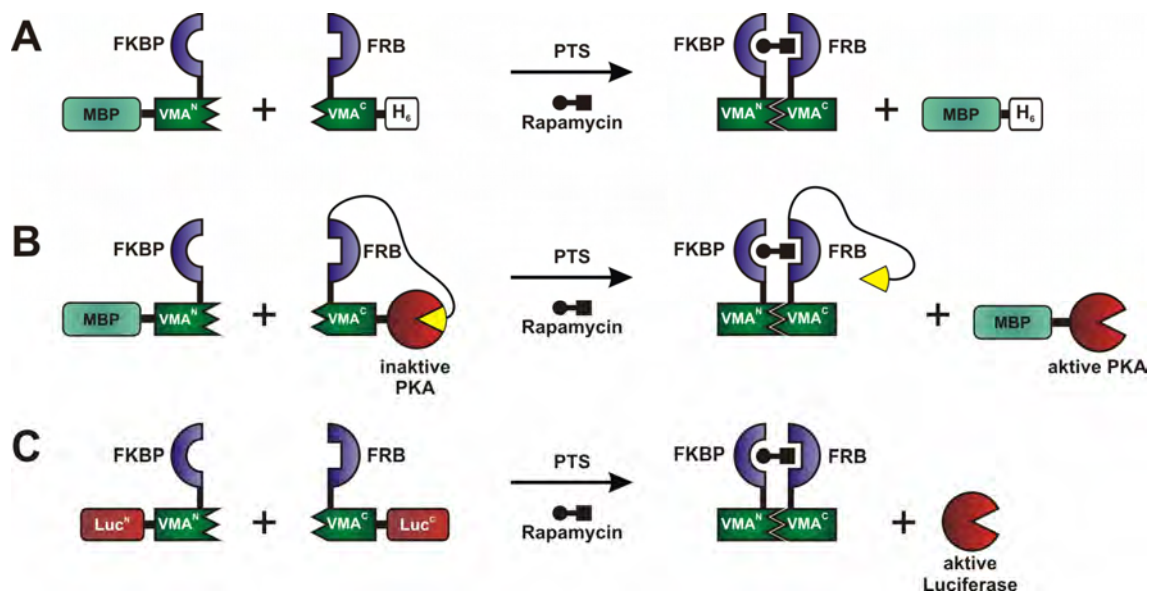
Das konditionale Proteinspleißen (engl. conditional protein splicing, CPS) stellt eine Methode zur Proteinfunktionskontrolle auf der Ebene der Proteine dar (Kapitel 1.4). Zu Beginn der CPS-Vorgehensweise werden beliebige Zielproteine mit den N- und C-terminalen Hälften des gespaltenen *Sce* VMA-Inteins fusioniert. Das Besondere an diesem künstlich gespaltenen Intein ist die Tatsache, dass es nur in Verbindung mit einem Dimerisierungssystem, das die Inteinhälften in räumliche Nähe zueinander bringt, die PTS-Reaktion effizient durchführen kann. Dazu wurde schon während der ursprünglichen Entwicklung das FKBP/FRB-System verwendet [48]. Die Spleißreaktion ist durch die Zugabe von Rapamycin kontrollierbar und funktioniert sowohl *in vitro* [48] als auch *in vivo* [152]. In den ersten CPS-Experimenten wurden Exteine eingesetzt, die aus gut löslichen und eigenständig faltenden Proteinen oder Tags bestanden (Abbildung 47 A). Mit diesen Inteinfusionsproteinen fand die Bildung des Spleißproduktes in verschiedenen Säugerzelllinien bereits zehn Minuten nach der Rapamycinzugabe statt [152].

Der nächste Schritt war die Erweiterung des Ansatzes auf die Kontrolle von enzymatisch aktiven Proteinen. Im ersten Beispiel wurde dazu die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) in Kombination mit einer inhibitorischen Pseudosubstratsequenz verwendet (Abbildung 47 B) [205], was eine ständige Inaktivierung des Vorläuferproteins zur Folge hatte. Während der *in-vitro*-CPS-Reaktion kam es bei der Spleißproduktbildung zur Abspaltung der PKA von ihrer Inhibitorsequenz. Die freigesetzte PKA konnte in Western-Blot-Analysen nachgewiesen sowie ihre Aktivität durch *in-vitro*-Phosphorylierung eines Substrat-Peptides verfolgt werden.

Die experimentell schwierigste, aber auch die interessanteste Anwendung vom CPS stellt die Aktivierung von gespaltenen und damit funktional inaktivierten Zielproteinen dar. Dieser Ansatz ähnelt prinzipiell einer konditionalen, nicht reversiblen Form der Protein-Fragment-Komplementation, da durch die Bildung des Spleißproduktes das ungespaltene und aktive Zielprotein entsteht. Auch im Fall des CPS ist der entscheidende Schritt die Identifikation geeigneter Spaltpositionen in Zielprotein. Im Vergleich mit einfachen Komplementationssystemen ist der CPS-Ansatz allerdings sterisch noch anspruchsvoller, da sowohl eine Fusion des FKBP/FRB-Dimerisierungssystems als auch der gespaltenen *Sce*

VMA-Inteinhälften erfolgen muss [206]. Dabei kann neben der Destabilisierung einer der Proteinhälften schon alleine die Fehlfaltung einer der Inteinhälften zum Verlust der Spleißfähigkeit und damit zur Inaktivität des Zielproteins führen.

Das erste gesplattene Enzym, das durch CPS kontrolliert werden konnte, war die Luciferase aus *Photinus pyralis* (Abbildung 47 C) [153]. In Experimenten mit *D. melanogaster*-Zellen wurde nach vier Stunden Inkubationszeit mit Rapamycin eine selektive Rekonstitution der Luciferaseaktivität erreicht, was sogar in lebenden transgenen Fliegen gelang. Damit ist das CPS-System schneller als die FKBP/FRB-Dimerisierungssystem basierende Rekonstitution eines gesplatteten Transkriptionsfaktorkomplexes, bei dem die Auswirkung auf die Proteinbiosynthese nach einem Tag oder länger detektiert werden konnte [128, 207].



**Abbildung 47. Bisherige Anwendungen des CPS-Ansatzes**

Schematische Darstellung: A) Bildung des Spleißproduktes MBP-His<sub>6</sub> durch CPS *in vivo*. B) Durch CPS *in vitro* aktivierte Proteinkinase A (PKA). Die Aktivierung erfolgt über eine räumliche Trennung der Inhibitorsequenz (gelbes Dreieck) von der PKA während der Spleißreaktion. C) CPS-vermittelte Bildung von aktiver Luciferase *in vivo* in *D. melanogaster* aus zwei inaktiven Luciferasehälften.

Es gibt zwei Nebeneffekte, die bei der erfolgreichen Anwendung des CPS-Ansatzes auftreten können: zum einen die Nebenreaktion des Hintergrundspleißens und zum anderen unbeabsichtigte Protein-Fragment-Komplementation (PFK) des gesplatteten Zielproteins. Beide Reaktionen sind dabei abhängig von der Wahl der Spaltposition. Das Hintergrundspleißens resultiert aus einer vorhandenen Restaffinität der *Sce* VMA-Inteinhälften zueinander, welche das Abflauen der Spleißreaktion ohne die Zugabe von Rapamycin ermöglicht [152,

157]. Ein Auftreten von PFK der erzeugten Zielproteinhälften kann darüber hinaus zur enzymatischen Aktivität des gespaltenen Zielproteins beitragen.

Die Nebeneffekte des CPS-Ansatzes erklären auch die Schwierigkeit, essentielle Zielproteine in Zellen schaltbar zu machen, weil von diesen bereits sehr geringe Konzentrationen ausreichend sein können, um einen Phänotyp zu erzeugen [157]. Bei essentiellen Proteinen beschränken sich nämlich häufig die auftretenden Phänotypen auf lebend/tot, weshalb schon Hintergrundspießen zum Überleben der Zellen ausreichend sein kann. Dagegen besitzen viele Transkriptionsfaktoren, Enzyme und Proteasen eine sehr gut quantifizierbare Aktivität und stellen damit generell geeignetere Ziele für die CPS-vermittelte Kontrolle dar. Natürlich sollten auch bei diesen Zielproteinen die Nebeneffekte möglichst minimiert werden.

## 5.2 Die CPS-Reaktion der TEV-Protease

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten gespaltenen TEV-Protease handelt es sich zum jetzigen Zeitpunkt um das zweite Beispiel eines durch CPS kontrollierbaren gespaltenen Enzyms und die erste regulierbare Protease. Das bereits bekannte Problem des CPS-Ansatzes, die Destabilisierung eines Inteininfusionsproteins, trat im Falle des Proteins His<sub>10</sub>-TEV auf. Die nach der Integration resultierenden Fusionsproteine mit der N-terminalen VMA-Inteinhälfte zeigten variable Stabilität und an keiner der neun Integrationsstellen konnte Spleißprodukt nachgewiesen werden. Das Problem der Instabilität konnte durch das löslichkeitsfördernde Fusionsprotein GST umgangen werden. Dabei bildete der Großteil der generierten GST-TEV-Inteininfusionen kein Spleißprodukt, was entweder auf eine Fehlfaltung der Intein Komponente oder auf Sequenzintoleranz des Inteins an der Integrationsposition hinweist. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich weder die Stabilität der Inteininfusionsproteine noch deren mögliche Schaltbarkeit durch Rapamycin zuverlässig voraussagen. Zwar ist es möglich durch Wissen über die Struktur des Zielproteins Abschätzungen über eine höhere Toleranz bei der Spaltung eines Proteins in Schlaufenregionen vorzunehmen, jedoch verdeutlicht das Beispiel der TEV-Protease sehr gut die Unvorhersagbarkeit des Einflusses der Wahl verschiedener Spaltpositionen auf die Aktivität (Kapitel 4.1.2 und siehe auch [188, 208]).

Das TEV-Protease-Spleißprodukt war in Hefe nach 30 Minuten nachweisbar (siehe Kapitel 4.1.3 für die Charakterisierung der CPS-TEV-Protease). Damit war die CPS-Reaktion etwas langsamer als in Säugerzellen, in denen die Spleißproduktbildung mit Modellproteinen schon nach zehn Minuten nachgewiesen werden konnte [152]. In *S. cerevisiae* zeigten die gespaltenen TEV-Proteasen ein Maximum der Spleißproduktbildung nach ca. zweistündiger

Induktion der PTS-Reaktion durch Rapamycin. Eine längere Inkubationsdauer mit Rapamycin führte nur zu einer Reduktion der Spleißproduktmenge. Diese Abnahme konnte bis jetzt noch in keinem anderen CPS-System beobachtet werden [152, 153]. Über die Gründe dieser inkubationszeitlich bedingten Spleißproduktabnahme kann nur spekuliert werden. So nähern sich die Hefezellen im Verlauf der Wachstumsexperimente an die stationäre Phase an, was zur globalen Reduktion der Transkription und Translation führt [209]. In Kombination mit dem schwachen *MET25*-Promotor können diese Veränderungen zur Limitation der Vorläuferproteine führen, wodurch auch die Bildung von Spleißprodukt vermindert werden kann. Die Konzentrationsabnahme der C-terminalen TEV-118-Hälfte konnte über die Dauer der Wachstumsexperimente verfolgt werden. Ebenfalls ließ die zeitliche Analyse der Menge des C-terminalen Fusionsproteins (FRB-C'VMA-C'TEV118-HA) den Schluss zu, dass Rapamycin stabilisierend auf die N-terminale FRB-Domäne wirkt, welcher mit Ergebnissen aus der Literatur korreliert [210]. Somit kann Rapamycin die vorhandene Menge des Vorläuferproteins in der Zelle beeinflussen. Die Spleißproduktbildung der TEV-Protease 118 in Säugerzellen war nach zwei Stunden Inkubationsdauer mit Rapamycin feststellbar und erreichte nach ungefähr zehn Stunden ihr Maximum. Damit war die Spleißreaktion in Säugerzellen signifikant langsamer als in Hefe. Ferner führte eine Verlängerung der Experimentdauer, wie vormals schon in Hefe, zu einer Reduktion der Spleißproduktmenge. Weder in Hefe noch in Säugerzellen wurde untersucht, ob die Aktivität der ungespaltenen TEV-Protease durch die Einführung der aus der CPS-Reaktion resultierenden Mutationen beeinträchtigt wurde (siehe Abbildung 19, Position 118 und 206 vor und nach PTS). Diese Untersuchung hätte einen Rückschluss auf eine im Vergleich zur Wildtyp-Protease möglicherweise verminderte Aktivität der durch die CPS-Reaktion gebildeten, mutierten Protease erlaubt.

Die in Säugerzellen untersuchte TEV-Protease 118 bildete mit zunehmender Inkubationszeit rapamycinunabhängiges Spleißprodukt und zeigte nach dieser Zeit ebenfalls enzymatische Spaltungsaktivität. Die in Hefe entwickelten und auf Transkription und Fluoreszenz basierenden Reporterassays zeigten nach der Zugabe von Rapamycin eine Steigerung der TEV-Aktivität der nicht zur Spleißproduktbildung befähigten Mutanten. Mithin belegen beide Beobachtungen die am schwierigsten zu unterdrückenden Nebeneffekte des CPS-Ansatzes, nämlich dass über einen längeren Zeitraum sowohl Hintergrundspleiß als auch durch Protein-Fragment-Komplementation eine Zunahme der Hintergrundaktivität auftreten kann. Da beide Prozesse konzentrationsabhängig sind, führte die Erhöhung der

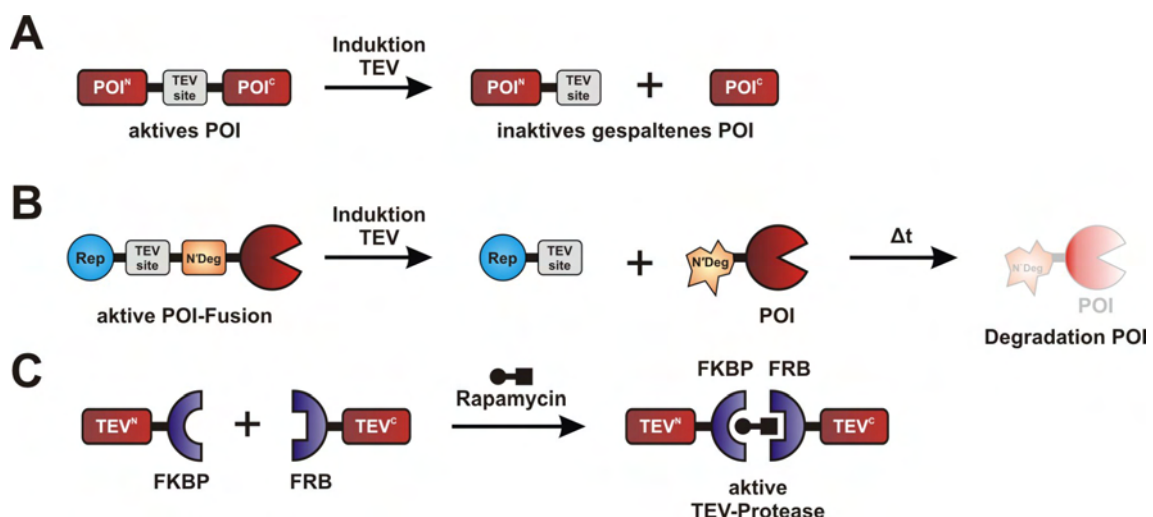
Expressionslevel der C-terminalen TEV-118- und TEV-206-Fragmente zu keiner Verbesserung des Systems (Daten nicht gezeigt).

### **5.3 Die Verwendung der TEV-Protease zur Proteinfunktionskontrolle**

Die TEV-Protease aus dem Tabakäzavirus findet in der Molekularbiologie ihre häufigste Anwendung in der Reinigung von Zielproteinen. Dabei liegen die Vorteile ihrer Verwendung in der hohen Spezifität, der Aktivität in einem breiten Temperaturbereich (auch bei 4 °C) und in der relativen Einfachheit ihrer Herstellung im Labor, wodurch der kommerzielle Erwerb von alternativen Proteasen umgangen werden kann. Neben dieser Verwendung wurde die TEV-Protease schon einige Male wegen ihrer Spezifität und der nicht vorhandenen Toxizität bei heterologen Expressionen in Systemen zur Proteinfunktionskontrolle eingesetzt. Dabei wird in den meisten Fällen die Expression der TEV-Protease zu einem spezifischen Zeitpunkt induziert, so dass die Spaltung des Zielproteins, in das vorher die TEV-Erkennungssequenz eingeführt wurde, ermöglicht wird. Diese *in-vivo*-Anwendungen der TEV-Protease konnten schon in *E. coli* [211, 212], *S. cerevisiae* [187], *D. melanogaster* [213] und in Säugerzellen [188] gezeigt werden. Förderlich für die Verwendung der TEV-Protease ist ihre sehr hohe Temperaturtoleranz, denn beispielsweise konnte in Zellkultur zwischen 33 °C und 37 °C kein Aktivitätsunterschied gemessen werden [208], obwohl einige kommerzielle Anbieter ein Temperaturoptimum von 30 °C für eine rekombinant hergestellte TEV-Protease bestimmt haben [214]. Ein weiterer Vorteil bei der *in-vivo*-Anwendung ist die hohe Toleranz der TEV-Protease gegenüber verschiedensten Fusionsproteinen, die sie nicht in ihrer Aktivität einschränken. So konnten MBP, GST [213, 215] sowie GFP [144] und weitere kleine Tags und Aminosäuresequenzen mit der Protease fusioniert werden [189, 216].

Einer der ersten generellen Ansätze, die TEV-Protease zur Proteinfunktionskontrolle *in vivo* einzusetzen, war das von Ehrmann und Mitarbeitern entwickelte System der zielgerichteten Proteolyse (engl. Target-directed proteolysis, TDP) in *E. coli*. In diesem System wird ein Zielprotein durch die TEV-proteasevermittelte Spaltung spezifisch und konditional inaktiviert (Abbildung 48 A) [211, 213]. Die gezielte Induktion der TEV-Protease in *E. coli* geschah über den *tet*-Promotor und die Zugabe von Anhydrotetrazyklin in das Wachstumsmedium [212]. Die Probleme des TDP-Ansatzes beginnen bei der Identifikation einer geeigneten Insertionsstelle der TEV-Erkennungssequenz im Zielprotein. Die Autoren haben zu diesem Zweck zufällig integrierende Mini-Transposons entwickelt [217]. Allerdings

hinterlassen die Mini-Transposons neben der sieben Codons umfassenden TEV-Erkennungssequenz auch transposonspezifisch überlappende Enden. Damit muss das Zielprotein an der zufälligen Integrationsposition eine Gesamt-Insertion von 24 Aminosäuren tolerieren können. Als Alternative der Bestimmung einer geeigneten Insertionsposition für die TEV-Erkennungssequenz bleibt nur die Klonierung übrig. Wenn der TDP-Ansatz zur funktionalen Untersuchung von Zielproteinen verwendet werden soll, ist ferner die Inaktivierung des Wildtypproteins vonnöten. Eine Möglichkeit, in einem Schritt Deletionen chromosomaler Gene in *E. coli* zu generieren, ist durch die Verwendung der Phage- $\lambda$ -Red-Rekombinase gegeben [211, 218]. In der Charakterisierung des TDP-Systems wurde erneut die geringe Aktivität der TEV-Protease festgestellt. So fand für ein cytoplasmatisches Zielprotein nur 50 % der Spaltung nach fünfstündiger Expression des TEV-Proteasegens statt [211]. Durch eine an das Ribosom lokalisierte TEV-Protease und der damit verbundenen fast kotranslational erfolgenden Spaltung des Zielproteins konnte die Spaltungsrate auf über 90 % erhöht werden.



**Abbildung 48. Verwendung der TEV-Protease zur Proteinfunktionskontrolle**

Schematische Darstellung: A) Zielgerichtete Proteolyse durch die induzierte TEV-Protease in *E. coli*. B) Erzeugung von konditionalen Mutanten durch TEV-proteaseinduzierte Freilegung eines N-terminalen Degrons. C) Rapamycin abhängige Protein-Fragment-Komplemenation der TEV-Protease.

Ein weiteres System verwendet die TEV-Protease zur Depletion beliebiger Zielproteine in Hefe (Abbildung 48 B) (siehe auch Kapitel 1.4.3) [144]. In diesem System ist der entscheidende Vorgang die Freilegung eines N-terminalen Degrons durch das koexprimierte TEV-Proteasegen, was zur Degradation des Zielproteins führt. Dazu muss das Zielgen mit den Sequenzen für ein Reporterprotein, der TEV-Erkennungsstelle und dem N-terminalen Degron fusioniert werden. Dies gelingt in *S. cerevisiae* in einer zielgerichteten Art



und Weise über homologe Rekombination. Über den sehr starken *GALI*-Promotor findet die Induktion der Expression des *TEV*-Proteases statt, die in Verbindung mit dem Ubiquitin-vermittelten Degradationsweg innerhalb von ein bis drei Stunden das Zielprotein abbaut.

Von Wehr *et al.* stammt die erste Anwendung der *TEV*-Protease zur Proteinfunktionskontrolle, die nicht auf der induzierten Expression einer ungespaltenen Protease basiert [188, 219]. Die Zielsetzung der Autoren war es, ein System in Säugerzellen zu entwickeln, mit dem Protein-Protein-Wechselwirkungen detektiert werden können. Dabei sollte die Interaktion von zwei Zielproteinen, von denen jedes mit einer Hälfte der gespaltenen *TEV*-Protease fusioniert ist, zur Rekonstitution der Proteaseaktivität durch Protein-Fragment-Komplementation führen. Diese Rekonstitution konnte durch auf Luciferase basierende proteolyse- und transkriptionsgekoppelte Reporter nachgewiesen werden. Eines der untersuchten Dimerisierungssysteme stellte auch FKBP/FRB dar (Abbildung 48 C). In den Luciferase-gekoppelten Assays waren schon 10 nM Rapamycin ausreichend, um ein Maximum an Aktivität zu erreichen. In einigen Experimenten erhöhten die Autoren die lokale Konzentration der *TEV*-Hälften und teilweise des Reporters, indem die Komponenten an die Plasmamembran lokalisiert wurden. Diese Konzentrationserhöhung führte zu einer Steigerung der Luciferase-Aktivität. Die wenigen von den Autoren gezeigten Western-Blot-Analysen unterstützen wiederum das Bild der relativ geringen *TEV*-Aktivität, da selbst mit der ungespaltenen Protease nur ca. 60 % Spaltung des Reporterproteins zu erreichen war [188].

Es folgten darauf aufbauende Experimente, die nur die FKBP/FRB-fusionierte Version der gespaltenen *TEV*-Protease verwendeten. Williams *et al.* konnte mit der PFK-Protease ein FRET-Reporter (Förster-Resonanzenergietransfer-Reporter) innerhalb von drei Stunden selektiv spalten, was in Einzelzellmessungen analysiert wurde [208]. Die Autoren um Gray *et al.* nutzten die PFK-*TEV*-Protease zur gezielten Einleitung der Apoptose in Säugerzellen, die binnen sechs Stunden durch die Spaltung einer *TEV*-Erkennungssequenz tragenden Procaspase-3 oder -7 erfolgte [220].

Der Vergleich zwischen der mittels CPS erzeugten *TEV*-Protease und der induzierten Synthese der ungespaltenen *TEV*-Protease zeigt den aktivitätsbezogenen Vorteil der direkten Induktion. So war bei Taxis *et al.* die vollständige Degradation eines Reporterproteins nach drei Stunden möglich [144], während die durch CPS erzeugte Protease in Hefe nach vier bis sechs Stunden maximal 10 % spalten konnte (siehe Kapitel 4.1.3). Die Erklärung für die höhere Aktivität beruht zum einen darauf, dass die ungespaltene Protease sofort nach ihrer Synthese aktiv ist und nicht noch zusätzlich die Spleißreaktion ablaufen muss. Zum anderen

ist durch die direkte Synthese eine viel höhere intrazelluläre Konzentration an TEV-Protease möglich als durch die CPS-Reaktion. Allerdings ist es bei den Ansätzen der direkten Induktion der TEV-Protease erforderlich, dass starke und selektiv induzierbare Promotoren in den Zielorganismen verfügbar sind. Der höchste Organismus, in dem dies für die TEV-Protease gezeigt werden konnte, war *D. melanogaster*, bei der die fünfständige Expression über einen Hitzeschock-Promotor für eine fünfzigprozentige Spaltung des Zielproteins ausreichte [216]. Im Falle von Säugerzellen wäre dies nicht möglich, da die existierenden induzierbaren Promotoren wie das Tet-System (Kapitel 1.2.1) nur eine Induktionssteigerung um das Zehnfache nach 24 Stunden erreichen [94]. Induzierbare Promotoren werden häufig durch Medienwechsel oder veränderte Wachstumsbedingungen aktiviert, ein Umstand, der die funktionale Charakterisierung des zu untersuchenden Zielproteins erschwert, weil die Zelle großem Stress ausgesetzt wird.

Ein Vergleich der auf PFK-basierenden und der mittels CPS-Reaktion erzeugten TEV-Protease würde grundsätzlich für eine höhere Proteaseaktivität der letzteren sprechen. Denn in der CPS-Reaktion wird eine ungespaltene und damit auch konstant aktive Protease erzeugt, der sogar die fusionierten Komponenten des Dimerisierungssystems und die Inteinhälften fehlen. Der Vergleich von Western-Blot-Analysen in Säugerzellen zeigte bei der ursprünglichen PFK-Protease, die mit einem Homodimerisierungspaar fusioniert wurde, eine Spaltungsproduktbildung von bis zu 5 % 40 Stunden nach der Transfektion [188]; dagegen waren bei der CPS-Protease nach zehn und 24 Stunden bis zu 10 % Spaltungsprodukt nachweisbar. Mit beiden gespaltenen Proteasen, die auf PFK als auch auf CPS basierte, war es möglich Spaltungsaktivität der Protease auf Einzelzellniveau nachzuweisen [208, 220]. Ein Nachteil der PFK-TEV-Protease kann die bei hohen Konzentrationen zu beobachtende uninduzierte Aktivität darstellen [208, 220], jedoch trat auch im Falle der CPS-kontrollierbaren TEV-Proteasen eine von Rapamycin unabhängige Proteaseaktivität auf: Zum einen führte eine Konzentrationserhöhung der Inteinmutterproteine in Hefe zum Hintergrundspießen und der damit verbundenen Spaltungsaktivität (Daten nicht gezeigt) und zum anderen kam es bei der Induktion der Dimerisierung von den spleißinaktiven Inteinmutanten zur Steigerung der Spaltungsaktivität. Durch die zweite Beobachtung konnte somit gezeigt werden, dass PFK einen geringen Anteil an der Aktivität der CPS-kontrollierbaren Proteasen hat. Im Falle von TEV 118 war diese Beobachtung zu erwarten, da die Spaltposition der TEV-Protease der von Wehr *et al.* entspricht (Kapitel 4.1.2) [188]. In der Anwendungsmöglichkeit in Säugerzellen liegt der größte Vorteil der hier entwickelten CPS-abhängigen TEV-Protease. Sie benötigt keinen starken induzierbaren Promotor und die

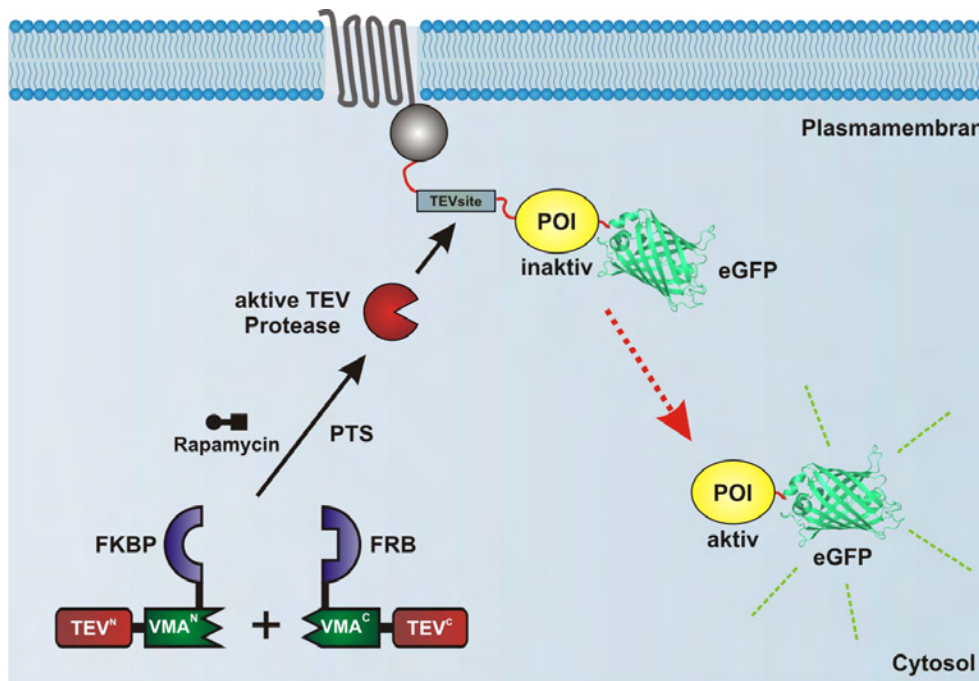
Reaktion wird lediglich, gleich der PFK-Protease, durch die Zugabe von membrangängigen Rapamycin induziert.

Falls in Säugerzellen eine funktionale Charakterisierung von Zielproteinen mittels der TEV-Protease vorgenommen werden soll, ist es vor der Inaktivierung durch die Proteolysereaktion notwendig, das Wildtypprotein aus der Zelle zu entfernen. Dabei muss bedacht werden, dass die bis jetzt bestehenden Methoden, um die TEV-Erkennungsstelle einzuführen, nicht in Säugerzellen funktionieren bzw. unpraktikabel sind. Die in einem Schritt ablaufende gezielte Integration ins Genom mittels Kassetten, wie es in Hefe möglich ist, kann nicht angewendet werden. Eine mögliche Vorgehensweise würde mit der Identifikation einer geeigneten Insertionsstelle in einem anderen Organismus beginnen. Im nächsten Schritt würde dann, nach dem Knockdown bzw. Knockout des Wildtypgens mittels RNAi oder Cre/loxP (Kapitel 1.3.1 und 1.2.2), das mit der TEV-Erkennungssequenz modifizierte Zielgen in die Zellen oder den Organismus eingebracht werden. Für eine erfolgreiche Anwendung müsste jedoch zuerst eine ausreichende TEV-Proteaseaktivität festgestellt werden, um die Zielproteine durch Proteolyse zu inaktivieren.

### **5.4 Anwendungs- und Verbesserungsmöglichkeiten der entwickelten schaltbaren Protease**

In dieser Arbeit wurde eine schaltbare Protease entwickelt, deren Aktivität fast ausschließlich auf dem erfolgreichen Abläufen der CPS-Reaktion beruht. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es durch die konditionale Protease möglich, an der Plasmamembran fehllokalisierte Zielproteine durch die Zugabe von Rapamycin gezielt freizusetzen. Diese Reaktion konnte in einzelnen Hefezellen mikroskopisch verfolgt werden, wobei die Aktivität der durch CPS erzeugten TEV-Protease nach acht Stunden in bis zu 10 % der beobachteten Zellen nachgewiesen werden konnte. Es gibt sehr unterschiedliche Zielproteine für ein System, bei dem eine Fehllokalisation zum Aktivitätsverlust und die Freisetzung ins Cytosol zur Aktivierung führen würden. Aus solchen Experimenten wäre es möglich, einen Informationsgewinn über die Zielproteine mit Bezug auf systembiologische Fragestellungen und damit über ihre Einbindung und Interaktionen in den Netzwerken der Zelle zu gewinnen. Somit ließen sich Komponenten von Signalwegen untersuchen, die zur Aktivitätsentfaltung in den Nucleus eintreten müssen wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder einige Kinasen. Prinzipiell können mit der Methode alle Proteine analysiert werden, die eine spezifische subzelluläre Lokalisation besitzen. Im Falle von *S. cerevisiae* wären davon mindestens 30 % aller Gene betroffen [122].

Der Versuchsaufbau wäre identisch mit den in dieser Arbeit durchgeführten Fehllokalisations-Experimenten, wobei sich das neue Zielprotein zwischen dem Lokalisationsprotein und dem fluoreszenten Reporterprotein befinden müsste (Abbildung 49). Dadurch könnte in jeder einzelnen Zelle die quantitative Aktivierung des Zielproteins zeitlich verfolgt werden, weil zur selben Zeit die Freisetzung von eGFP in das Cytoplasma erfolgt. Darüber hinaus wäre es möglich, morphologische Veränderungen der Zellen durch die Mikroskopie zu beobachten.



**Abbildung 49. Aktivierung eines Zielproteins durch die schaltbare Protease**

Schema der Aktivierung eines durch Fehllokalisierung inaktivierten Zielproteins durch die TEV-Protease. Die Bildung der aktiven TEV-Protease findet dabei durch die CPS-Reaktion statt.

Der nächste Schritt wäre die direkte Übertragung dieses Systems auf Säugerzellen. Das Interesse dafür begründet sich auf dem grundsätzlichen Mangel an konditionalen und gut dosierbaren Systemen in Säugetieren. Ebenso sind Methoden mit schnellen Reaktionsraten von Interesse, da erst auf diese Weise eine zeitabhängige und phänotypische Auswertung mit dem Mikroskop gewährleistet wird. Bis jetzt konnte in dieser Arbeit nur die Spaltungsreaktion eines Reporterproteins in Säugerzellen mittels Western Blot verfolgt werden. Allerdings sollte der entsprechende Experimentaufbau zu bewältigen sein, weil das grundsätzliche Prinzip der CPS-kontrollierbaren TEV-Protease in Säugerzellen funktioniert.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode der CPS-aktivierbaren gespaltenen TEV-Protease ließe sich an verschiedenen Ansatzpunkten verbessern. Die meisten Modifikationen, die zur Beschleunigung und Effektivitätssteigerung der Spaltungsreaktion führen sollten,

basieren auf vorausgegangenen Erkenntnissen über die CPS-Reaktion und die TEV-Protease. Zunächst wäre eine Beeinflussung der stattfindenden CPS-Reaktion denkbar, welche die aktive TEV-Protease bildet. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass zusätzliche Kopien der FKBP/FRB-Domänen einen positiven Effekt auf die Dimerisierung [132] und damit verbunden auch auf die Spleißreaktion haben können [153]. Die gesteigerte Affinität könnte ferner die CPS-Reaktionszeit verkürzen, ein beträchtlicher Vorteil insbesondere für Säugerzellenanwendungen. Mit anderen Modellproteinen waren in Säugerzellen Reaktionszeiten im Minutenbereich möglich [152]. Damit besteht keine grundsätzliche Limitation des CPS-Systems in diesem Organismus. Eine weitere Option zur Verbesserung wäre die Möglichkeit, die globale und lokale Konzentration der gespaltenen TEV-Protease zu erhöhen. In Experimenten mit der auf PFK-basierenden gespaltenen TEV-Protease wurden bis zu einem Verhältnis von 12:1 von DNA-Menge der Plasmide der gespaltenen TEV-Protease zu Reporterplasmid eingesetzt [208, 220], in den Experimenten dieser Arbeit wurde hingegen nur ein Verhältnis von 1,5:1 verwendet (siehe Kapitel 3.5.2). Die Erhöhung des Verhältnisses würde zur globalen Konzentrationserhöhung der TEV-Protease führen. Durch eine Rekrutierung an die Plasmamembran könnte dagegen eine lokale Konzentrationserhöhung erfolgen [188, 208, 211]. Die Voraussetzung für dieses Vorgehen ist ebenfalls, dass das Reporterprotein an der Membran fehllokalisiert wird und die relative Konzentrationserhöhung somit ermöglicht wird. In beiden Szenarien der Konzentrationserhöhung könnten indessen die erwähnten Nebeneffekte wie das Hintergrundspießen und eine unbeabsichtigte Protein-Fragment-Komplementation auftreten. Für die auf PFK basierende TEV-Protease wurde beschrieben, dass eine Deletion des C-terminalen Bereichs der Protease zu einer gesteigerten Induktionsfähigkeit durch Rapamycin und einer geringeren uninduzierten Proteolyseaktivität führt [220]. Diese mutierte Protease könnte im CPS-Ansatz verwendet werden, um sowohl die Reaktionszeiten in Säugerzellen zu verbessern als auch die rapamycinunabhängige Proteolyse zu verringern. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, ein zusätzliches Affinitätssystem in den CPS-Ansatz zu integrieren, wie es schon von Taxis *et al.* für eine ungespaltenen TEV-Protease entwickelt worden ist [144]. Dieses System nutzt die Dimerisierung des Proteins SF3b155 an die Spleißosom-Untereinheit p14. Die Autoren setzten das SF3b155-Protein intern in das zu spaltende Reporterprotein ein und fusionierten die p14-Untereinheit an die TEV-Protease. Das Affinitätssystem erhöht dann die Wahrscheinlichkeit, dass die modifizierte TEV-Protease ihr Substrat bindet. Bei der Übertragung auf das gesplattene TEV-Proteasesystem würde die p14-Untereinheit nur an eine Hälfte der gespaltenen Proteasen fusioniert werden, was zu keiner Erhöhung der Affinität der gespaltenen TEV-Hälften

untereinander führen würde. Das ist von Bedeutung, weil deshalb eine Steigerung der Hintergrundspleißreaktion und der PFK der gespaltenen TEV-Protease weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Die bedeutendste Beeinträchtigung von TEV-Protease-verwendenden Systemen besteht in ihrer geringen inhärenten Wechselzahl. Es wäre das entscheidende Ziel, die Aktivität der TEV-Protease durch Proteinevolution zu verbessern. Die hier verwendete TEV-Protease besitzt zwar eine Mutation, um ihre Autoproteolyse zu verringern [189], aber nach grundsätzlich aktivitätssteigernden Mutanten der Protease ist noch nicht systematisch gesucht worden. Taxis *et al.* konnten durch Zufall eine Mutation in der an die TEV-Protease fusionierte p14-Spleißosom-Untereinheit identifizieren, welche die Aktivität der Protease signifikant erhöhte [144]. Beide identifizierten Mutanten bestätigen die theoretische Verbesserungsmöglichkeit der Protease. Der Experimentaufbau für die Identifikation einer aktivitätssteigernden Mutante könnte zuerst mit der zufälligen Mutagenese des Proteasegens beginnen. Im zweiten Schritt müsste ein Selektionssystem entwickelt werden, mit dem eine Identifikation der erwünschten Mutanten möglich wäre. So könnte unter anderem ein koexprimierter Reporter, der aus zwei FRET-Partnern besteht, Verwendung finden. Durch die Messung der FRET-Effizienz könnte die von der der TEV-Protease katalysierte Spaltungsreaktion detektiert werden, da sich die fluoreszenten Proteine voneinander trennen würden. Auf diese Weise wäre eine Selektion von TEV-Proteasen mit gesteigerter Aktivität möglich.

### **5.5 Der Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Spleißreaktion**

Die Aktivität von Inteinen hängt stark von ihrer richtigen Faltung ab, wird aber auch von ihren flankierenden Exteinregionen beeinflusst. Sowohl bei *cis*- als auch *trans*-Inteinen kann die Änderung des Exteinkontextes zur völligen Inaktivierung des Inteins oder aber zum Auftreten von Nebenreaktionen der Proteinspleißreaktion führen (Kapitel 1.1.1). Allerdings können nicht nur ganze Domänen oder Proteine die Inteinaktivität beeinflussen, sondern auch bereits einzelne Aminosäuren, die direkt an die katalytisch invarianten Aminosäuren des Inteins angrenzen. Der Einfluss dieser flankierenden Aminosäuren auf die Proteinspleißreaktion ist am besten für die Position -1 charakterisiert. Für die *cis*-Inteine *Sce* VMA, *Mxe* GyrA und *Mtu* RecA fand die vollständige Untersuchung in einem unnatürlichen

Exteinkontext mit allen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren an Position -1 statt (Tabelle 16) [21, 28, 221].

**Tabelle 16. Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen an der Position -1 auf die Proteinspleißreaktion *in vivo***

Aminosäure an -1	Proteinspleißen VMA Intein	Proteinspleißen GyrA Intein	Proteinspleißen RecA Intein
Gly (WT VMA)	++	-	+
Ala	++	-	+
Val	-	-	+
Leu	-	+	+
Ile	-	-	-
Ser	++	-	+
Thr	++	-	+
Cys	++	-	+
Asp	++	-	-
Glu	++	-	-
Asn	-	-	+
Gln	++	+	+
Lys (WT RecA)	++	+	+
Arg	++	+	+
His	++	-	+
Phe	++	++	+
Tyr (WT GyrA)	++	++	+
Trp	++	++	+
Pro	-	-	+
Met	++	+	+

Das VMA-Intein befand sich zwischen MBP und der T4-Polynukleotidkinase, das GyrA-Intein lag zwischen MBP und dem Paramyosin aus *Dirofilaria immitis* vor und das RecA-Intein wurde umgeben von MBP und einem His<sub>6</sub>-Tag. (- = <15 % Spleißproduktbildung, + = Spleißproduktbildung 15-50 %, ++ = Spleißproduktbildung >50 %)

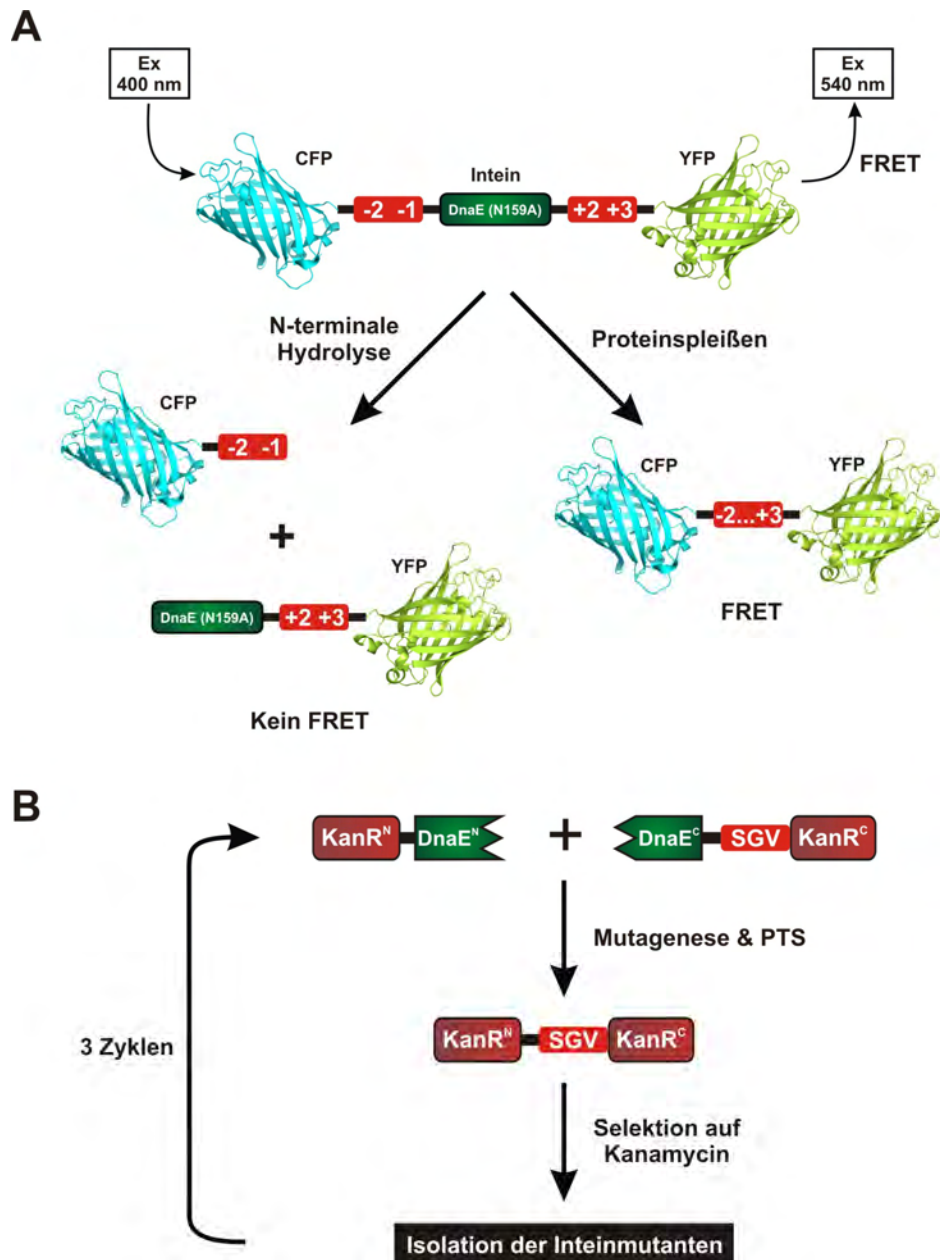
Die Untersuchung der jeweiligen Inteine zeigte bei bis zu 60 % aller getesteten Aminosäuren eine Inhibition der Spleißreaktion *in vivo*. Dabei wurden als Exteine eigenständig faltende und gut lösliche Proteine wie z.B. MBP verwendet. Im Falle von Prolin an -1 ist die Inhibition des *Sce* VMA- und *Mxe* GyrA-Inteins aufgrund der Beeinflussung der Struktur in direkter Nähe der katalytischen ersten Aminosäure des Inteins nicht weiter verwunderlich. Die Toleranz des *Mtu* RecA-Inteins stellt eine Ausnahme gegenüber dieser Substitution dar, allerdings gibt es auch natürlich vorkommende Inteine mit Prolin an -1 [63]. Der Vergleich der drei Inteine zeigt häufig eine differierende Toleranz für die gleichen Mutationen an der -1 Position, so z.B. bei Serin und Histidin. Im Falle vom GyrA-Intein ist eine spezifische Präferenz für aromatische Aminosäuren zu erkennen. Von großer Bedeutung bei der Bestimmung der Spleißfähigkeit von Inteinen ist, ob die Experimente *in vivo* oder *in*

*in vitro* durchgeführt werden. Für das *Sce* VMA-Intein konnten nur drei Mutanten bestimmt werden, bei denen die Proteinspleißreaktion *in vitro* ablief [21]. Selbst bei einem Glycin an der -1 Position, das der Wildtypsequenz entspricht, war es dem Vorläuferprotein *in vitro* nicht mehr möglich, die Spleißreaktion effizient durchzuführen. Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf einen gesteigerten strukturellen Anspruch an die Faltung des gesamten Inteininfusionsproteins zurückzuführen sein, falls es sich in einem unnatürlichen Puffer ohne Chaperone und andere zelluläre Stabilisatoren befindet. Neben der -1 Position besitzen auch die +2 bis +3 Regionen einen Einfluss auf das Intein. So wurde für das *Ssp* DnaE-Intein mehrfach die Notwendigkeit der Wildtypsequenz an diesen Positionen beschrieben, um seine Spleißaktivität zu erhalten [30, 31]. Grundsätzlich ist es bis heute trotz vorhandener Strukturdaten nicht vorhersagbar, welche Aminosäuresubstitutionen durch ein bestimmtes Intein toleriert werden können und welche nicht.

Die erste große Mutationsstudie zum Einfluss multipler flankierender Aminosäuren auf die N-terminale Hydrolyse und die Spleißreaktion wurden mit dem DnaE-Intein durchgeführt. Amitai *et al.* benutzten einen *in-vitro*- und *in-vivo*-FRET-Assay, um die Beeinflussung der N-terminalen Hydrolysereaktion durch die flankierenden Aminosäuren zu charakterisieren [29]. Die beiden verwendeten Fluorophore waren CFP (engl. cyan fluorescent protein) und YFP (engl. yellow fluorescent protein), zwischen welche *in cis* das *Ssp* DnaE-Intein inklusive seiner natürlichen flankierenden Aminosäuren gesetzt wurde (Abbildung 50 A). In dem Experiment wurde die Mutante Asn159Ala des Inteins verwendet, um die Spleißreaktion zu inhibieren. Bei stattfindender Hydrolyse sinkt aufgrund des Verlustes der räumlichen Nähe der beiden Fluorophore die FRET-Effizienz ab. Nach der Überprüfung der generellen Funktionalität des Systems wurden Mutanten-Bibliotheken von den Positionen -2, -1 und +2, +3 erzeugt und ihr Einfluss auf die N-terminale Hydrolysereaktion bestimmt. Den Autoren gelang es Mutationen zu identifizieren, welche die N-terminale Hydrolyse sowohl bis zu viermal schneller als auch 1.000-fach langsamer durchführten. Die am häufigsten identifizierten Mutanten, die zu einer Reduktion der FRET-Effizienz führten, waren Asp oder Arg an Position -1. Interessanterweise führte das Aspartat schon im Falle vom *Sce* VMA- und dem *Mxe* GyrA-Intein zu einer sehr starken Erhöhung der N-terminalen Hydrolysereaktion [21, 28]. Durch Prolin und Valin an Position -1 wurde die N-terminale Hydrolysereaktion negativ beeinflusst, was mit dem Analyseergebnis der Proteinspleißreaktion des VMA- und GyrA-Inteins korrelierte (siehe Tabelle 16). In ihrem letzten Experiment übertrugen die Autoren die identifizierten Mutanten auf das spleißkompetente Intein. Dabei zeigte sich insgesamt ein uneinheitliches Bild, weil sowohl



eine Steigerung der Spleißaktivität als auch ihre Verringerung zu beobachten war. Mit der entwickelten Methode war es also möglich, verbesserte Inteine in Bezug auf ihre N-terminale Hydrolysereaktion zu generieren und zu identifizieren, allerdings war sie ungeeignet, um eine Verbesserung der inteinvermittelten Proteinspleißreaktion zu erreichen.



**Abbildung 50. Untersuchung der Exteinabhängigkeit von Inteinen**

A) Schematische Darstellung der Untersuchung der Abhängigkeit der N-terminalen Hydrolysereaktion von der Exteinsequenz an den Positionen -2, -1 und +2, +3 [29]. Die eigentliche Untersuchung geschah über die Messung der FRET-Effizienz zwischen dem N- und C-terminalen Exteinen CFP (PDB code = 10XD [222]) und YFP (PDB Code = 1YFP [223]). B) Schematische Darstellung der Selektion von aktiven Inteinmutanten, die neue Sequenzmotive an Position +1 bis +3 tolerieren [32]. Ausgehend von der PTS-inhibierenden „SGV“-Veränderung des C-terminalen *Npu* DnaE-Inteins gelang es den Autoren, Mutanten in den Inteinhälften zu isolieren, welche die Selektion auf Kanamycin durch die Wiederherstellung der Spleißfähigkeit erlaubten.

Das von Lockless *et al.* entwickelte Selektionsverfahren nimmt sich dem Problem der flankierenden Aminosäuren in Bezug auf die eingeführten Sequenzveränderung im Zielprotein an [32]. Die Herstellung eines Zielproteins mittels Proteinspleißens sollte im idealen Fall spurlos stattfinden, d.h. seine Wildtypsequenz sollte erhalten bleiben. Nur so kann sicher gewährleistet werden, dass es zu keiner Aktivitätsreduktion des Zielproteins kommt. Die Schwierigkeit hierbei ist es nun, ein Intein zu identifizieren, das genau diese Sequenz in den flankierenden Sequenzen toleriert und die Spleißreaktion effizient durchführen kann. Das von den Autoren ausgewählte Intein ist ein Hybrid des DnaE-Inteins, wobei die N-terminale Hälfte aus dem *Npu* DnaE-Intein und die C-terminale Hälfte aus dem *Ssp* DnaE-Intein stammt. Das Zielprotein für die Entwicklung des Inteins war das Crk-II-protoonkogene Adaptorprotein, das in der ausgewählten Intein-Insertionsstelle das Aminosäuremotiv „SGV“ besaß. Somit sollte ein Intein identifiziert werden, das anstatt des invarianten C-terminalen „CFN“-Motives Spleißfähigkeit für „SGV“ aufwies (Abbildung 50 B). Das ausgewählte Selektionssystem basierte auf der Insertion des Inteins in das Kanamycin-Resistenzgen, so dass die Resistenz der *E. coli*-Zellen auf der erfolgreichen PTS-Reaktion basiert. Zuerst wurde die potentielle Spleißfähigkeit des „CFN“-Inteins in der gewählten Position verifiziert. Es folgte die auf PCR basierte Mutation der N- und C-terminalen Inteininsertionsgene und die Kanamycinselektion. Nach drei Runden konnte ein Intein mit vier Mutationen identifiziert werden (E15D, L25I und L92M in der N-terminalen *Npu* Hälfte und D23Y in der C-terminalen *Ssp* Hälfte), bei dem die Kanamycinresistenzsteigerung zum größten Teil motivspezifisch war. Die Anwendung des so identifizierten mutierten Inteins auf das Crk-II-Protein zeigte *in vivo* eine fünffach schnellere Spleißreaktion im Vergleich zum Wildtypintein. Interessanterweise sind drei der vier identifizierten Mutationen über die gesamte Struktur des Inteins verteilt und zeigen in der Kristallstruktur keine direkten Interaktionen mit den aktiven Zentren des Inteins. Dieses Ergebnis wird durch eine andere Mutationsstudie mit dem *Mtu* RecA-Intein bestätigt, die ebenfalls die meisten aktivitätssteigernden Mutanten an der Oberfläche des Inteins lokalisieren konnten [224]. Mit dieser Methode kann somit ein Intein selbst von einem unnatürlichen, ursprünglich inhibitorischen Exteinkontext zur Spleißfähigkeit hin evolviert werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Intein-kassetten stellen einen rationellen Weg der Anwendung von Inteinen auf neue Zielproteine dar. Sie sind grundsätzlich dazu geeignet, schnell und effizient aktive Insertionsstellen ohne beträchtlichen Klonierungsaufwand in Zielproteinen zu identifizieren. Jedoch kann durch die Abwesenheit eines Selektionssystems

keine gezielte Verbesserung des Inteins stattfinden. Die Verwendung von RF-PCR und homologer Rekombination ermöglicht darüber hinaus die „spurlose“ Klonierung. Dadurch entfällt die Einführung zusätzlicher Aminosäuren an der Integrationsstelle des Inteins, die aus der Verwendung von Restriktionsschnittstellen resultieren würden. Eine Möglichkeit, um die Proteinevolution von Inteinen in einem spezifischen Kontext zu beschleunigen, wäre die Kombination des SPLICEFINDER-Ansatzes mit der von Lockless *et al.* entwickelten Selektionsmethode. Dazu würde für die Identifikation von geeigneten Insertionsstellen die *trans*-Inteinkassetten verwendet werden. Nach der Bestimmung der Spleißfähigkeit des Wildtypinteins würde für die aussichtsreichste Position die Optimierung und Verbesserung des Inteins unter den gewünschten Anwendungsbedingungen über Mutagenese und Kanamycinselektion nach Lockless *et al.* erfolgen.

## 5.6 Modifikationen und Verbesserungsmöglichkeiten von SPLICE-FINDER

Das SPLICEFINDER-System ist eine vielseitig einsetzbare Methode zur Identifikation von Insertionsstellen aktiver Inteine in beliebigen Zielproteinen. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, ohne viel Aufwand die Probleme zu umgehen, die aus dem Einfluss der flankierenden Aminosäuren auf die Spleißfähigkeit des Inteins resultieren. Zudem wurde SPLICEFINDER so konzipiert, dass es direkt zur segmentellen Isotopenmarkierung benutzt werden kann (Kapitel 4.2.1). Diese kann in Verbindung mit anschließender NMR-Spektroskopie in Lösung zur Strukturaufklärung von Proteinen verwendet werden. Bei der segmentellen Isotopenmarkierung *in vivo* in *E. coli* wird das Prinzip selektiv induzierbarer Promotoren ausgenutzt [77]. Die in dieser Arbeit verwendeten Promotoren waren durch IPTG oder Arabinose induzierbar, was einen Mediumswechsel zur Expressionsinduktion des zweiten Inteinfusionsgens notwendig machte. Der Zeitpunkt des Mediumswechsels, an dem die segmentelle Markierung startet, ist die kritischste Stelle des Experiments, da eine eventuelle unselektive Induktion zu ungewolltem Isotopeneinbau führt. Die so hergestellten Proteine führen zu Problemen bei der Analyse der NMR-Spektren [77]. Trotz multipler Waschschritte, welche die Reste vom unmarkierten Medium entfernen sollten, war nur eine Markierungseffizienz von 83 % für das Modellprotein gpD-Trx *in vivo* messbar. Diese Effizienz ist vermutlich auf Rückstände von unmarkierten Aminosäuren im Cytoplasma der *E. coli*-Zellen während der Expression des zweiten Fusionsgens zurückzuführen. Die Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Selektivität der Promotorinduktion in den

Experimenten mit gpD-Trx gewährleistet blieb. Möglicherweise kann das durch nicht vollständig markierte Proteine hervorgerufene „isotopic scrambling“ unter optimal gewählten Expressionsbedingungen noch weiter reduziert werden. So könnte eine kürzere Expressionsdauer des ersten Inteininfusionsgens und die Verlängerung der darauf folgenden Waschschritte die Menge an vollständig markierten Zielproteinen weiter erhöhen. Allerdings werden die optimalen Expressionsbedingungen aufgrund der Differenzen in der Effizienz der Proteinspleißreaktion von Zielprotein zu Zielprotein variieren. Mit gpD-Trx konnte die segmentelle Isotopenmarkierung für ein Modellprotein gezeigt werden, jedoch ist noch unklar, inwiefern ihre Markierungseffizienz durch unvollständige Spleißreaktionen in komplexen Zielproteinen beeinträchtigt wird. Inzwischen wurde aber für verschiedene Inteine sowohl ihre Einsetzbarkeit für die segmentelle Isotopenmarkierung gezeigt als auch die markierten Proteine zur Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie verwendet [225, 226]. Diese Resultate unterstreichen damit die Praktikabilität des segmentellen Markierungs-Aspektes des SPLICEFINDER-Ansatzes.

Der hier entwickelte Kassettenansatz lässt sich auf alle in der Zukunft identifizierten und mit interessanten biochemischen Eigenschaften ausgestatteten, gespaltenen Inteinen ausweiten. Interessant sind dabei vor allem Inteine, die eine sehr schnelle Reaktionsgeschwindigkeit zeigen oder aber besonders robust im Bezug auf die Variation der flankierenden Extein-Aminosäuren sind. Einer der limitierenden Faktoren für die Anwendung von Inteinen ist die teilweise auftretende Unlöslichkeit von Inteininfusionsproteinen (Kapitel 1.1.4). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, sind löslichkeitsfördernde Fusionsproteine, die entweder am Zielprotein oder an den Inteinhälften angebracht werden können. Die entwickelten *trans*-Inteinkassetten sind mit allen denkbaren Fusionsproteinen am Zielprotein kompatibel, da die für die Integration wichtige Insertionsstelle im Zielgen liegt. Im Falle von zusätzlichen Fusionsproteinen an den Inteinhälften müssten die *trans*-Inteinkassetten selbst modifiziert werden und anschließend in einem ersten Schritt der Erhalt ihrer Spleißfähigkeit nachgewiesen werden.

Eine besondere Form der segmentellen Isotopenmarkierung stellt die selektive Markierung einzelner Segmente von Multidomänenproteinen dar, weil diese Vorgehensweise die Auflösung einzelner Signale in den NMR-Spektren erhöht und dadurch theoretisch auch größere Proteine untersucht werden können. Bei großen Proteinen treten zwei Probleme auf: Zum einen rotieren diese Moleküle langsamer, was eine Linienverbreiterung der Signale zur Folge hat. Zum anderen kommt es durch die Zunahme der Protonenzahl zu einer Signalüberlappung. Durch die segmentelle Isotopenmarkierung kann das zuletzt genannte

Problem umgangen werden, da sie eine genaue Zuordnung der Signale erlaubt. Eine Möglichkeit, die Anwendung in das SPLICEFINDER-System zu integrieren, wäre die Generierung einer zusätzlichen komplementären Intein-Kassette (Intein-Kassette II) (Abbildung 51 A). Diese Intein-Kassette müsste ein neues oder ein zu der zuerst benutzten *trans*-Intein-Kassette (Intein-Kassette I) orthogonales Intein besitzen, so dass eine zielgerichtete selektive Drei-Fragment-PTS-Reaktion möglich ist (Abbildung 51 B). Der Integrationsprozess der zweiten *trans*-Intein-Kassette wäre identisch zu dem der ersten und würde entweder durch RF-PCR oder mittels homologer Rekombination ablaufen. Im Falle einer homologen Rekombination müsste aber bei der Selektion ein anderer Auxotrophiemarker verwendet werden. Außerdem ist die Auswahl des Promotor/Operator-Paares der zweiten Intein-Kassette (Intein-Kassette II) von Bedeutung. Das Paar muss komplementär zu dem bereits vorhandenen Paar gewählt werden und sollte eine selektive Induktion gewährleisten. Zu diesem Zweck könnte zum Beispiel das Promotor/Operator-Paar für die Tetrazyklinresistenz verwendet werden [212, 227]. In diesem Fall wäre allerdings eine Adaption des Helferplasmids oder des verwendeten *E. coli*-Stammes notwendig, um die selektive Induktion der Expression durch die Synthese des Tetrazyklin-Repressorproteins sicherzustellen. In dem finalen Doppelintegrationsprodukt (Integrationsprodukt II) wären alle entstehenden Fusionsgene selektiv induzierbar und eine gerichtete Markierung einzelner Regionen des Zielproteins könnte stattfinden. Eine Alternative für die Verwendung von drei unterschiedlichen Promotoren wäre die Erzeugung einer Integrationskassette mit *pT7/lac* Promotor/Operator-Paar in Kombination mit einem auf *pT7/lac*- und *pBAD/ara*-basierenden Expressionsvektor für das Zielgen. Dadurch wäre zwar keine selektive Expression aller entstanden Fusionssegmente möglich, aber sowohl die selektive Expression eines einzelnen Fusionsgens als auch die gleichzeitige Synthese der beiden restlichen Proteinsegmente. Somit wäre die Möglichkeit gegeben jedes Fragment selektiv zu markieren, allerdings wäre der Nachteil die Herstellung mehrerer Integrationsplasmide.

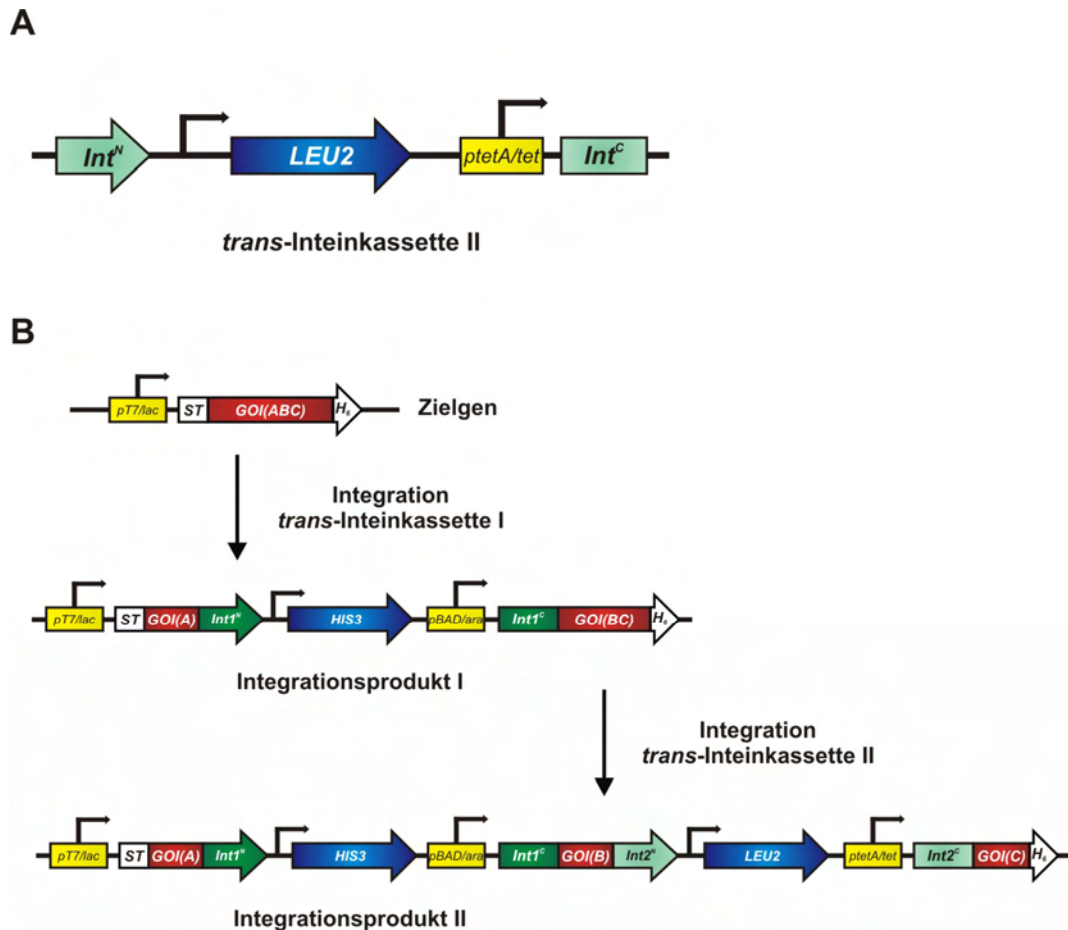


Abbildung 51. Erweiterung des SPLICEFINDER-Ansatzes

A) Schematische Darstellung einer neu entwickelten *trans*-Inteinkassette (II). Diese Kassette besitzt ein indizierbares Operator/Promotor-Paar und ein orthogonales Intein. B) Doppel-Integrationschema von zwei komplementären Inteinkassetten, die im finalen Integrationsprodukt (II) das gezielte und selektive Drei-Fragment-Proteinspleißen ermöglichen.

## 5.7 CobA als Zielprotein von SPLICEFINDER

Das erste komplexe Anwendungsbeispiel für das SPLICEFINDER-System war die Uroporphyrinogen-III-Methyltransferase CobA aus *P. freudenreichi* (siehe Kapitel 4.2.3). Dieses Protein konnte schon in früheren Arbeiten aufgrund der enzymatischen Bildung von fluoreszenten Molekülen als Transkriptions-Reporter und Biosensor in *E. coli*, *S. cerevisiae* und Säugerzellen verwendet werden [201, 202]. Nach Integration der auf dem *Npu* DnaE-Intein basierenden *trans*-Inteinkassette in *cobA* war es möglich, die Bildung des Spleißproduktes durch die selektive Synthese der Proteinhälften zu kontrollieren. Die Identifikation der optimalen Bedingungen für die CobA-Aktivität war mit größerem experimentellen Aufwand verbunden, aber nach 48 Stunden Inkubationsdauer bei 20 °C war eine Korrelation zwischen CobA-Synthese und CobA-Aktivität feststellbar. Insgesamt war die katalytische Aktivität von CobA in den hier durchgeführten Experimenten jedoch geringer als in der Literatur beschrieben. Wildt *et al.* konnten in *E. coli* schon nach vier Stunden

Fluoreszenz nachweisen [201]. Ferner ist die Voraussetzung einer abgesenkten Expressionstemperatur für CobA-Aktivität zuvor noch nicht beschrieben worden [177, 201, 202]. Einer der Gründe, die zu einer Reduktion der Aktivität führten, könnte die Fusion des CobA-Proteins mit den Tags zur Reinigung gewesen sein. Vorangegangene Experimente verwendeten nur das CobA-Wildtypprotein [201, 202]. Auch der Aktivitätsvergleich zwischen dem CobA-Wildtypprotein und einem mutierten Protein, das in seiner Sequenz einem der Spleißprodukte entsprach, zeigte eine Beeinträchtigung der Aktivität aufgrund der eingeführten Mutationen um ca. 20 %. Der Aktivitätsunterschied zwischen dem synthetisierten mutierten Protein und dem durch die *in-vivo*-PTS-Reaktion hergestellten CobA-Protein war erneut eine um ca. 20 % verminderte Fluoreszenz. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf einer partiellen Unlöslichkeit der Inteinhälften, welche die Bildung von aktiven CobA in der PTS-Reaktion verlangsamt oder reduziert. Aufgrund der Tatsache, dass keine Spleißmutanten für beide Integrationspositionen hergestellt wurden, kann keine Aussage über einen möglichen Anteil von PFK an der gebildeten CobA-Aktivität getroffen werden. Allerdings liegt der maximal erreichbare Wert für optimierte PFK-Systeme von gespaltenen Enzymen wie der  $\beta$ -Lactamase und der *Renilla* Luciferase bei ca. 10 % der Aktivität des Wildtypenzym [228, 229]. In den hier durchgeführten Messungen mit dem durch PTS hergestellten CobA wurden Werte von 50 % bis 75 % der Wildtypaktivität erreicht.

Die Bildung der fluoreszenten Moleküle ist an die CobA-Überexpression gekoppelt und spricht damit für eine Art Schwellenwertreaktion. Bei der beabsichtigten Methylierung oder Oxidation des Precorrin-2 handelt es sich nämlich um eine Nebenreaktion von CobA [177], deren Produkt unter physiologischen Bedingungen in *P. freudenreichi* weder auftrat noch eine Funktion zugeordnet werden konnte. So wurde das dreifach methylierte Trimethylpyrrocorphin im Vergleich zum zweifach methylierten Precorrin-2 erst nach der dreifachen Expressionsdauer (insgesamt 15 Stunden) nachgewiesen [177]. Dieser Umstand könnte die Varianz in der Anzahl der fluoreszierenden Einzelzellen bei den Experimenten mit CobA in Zellkultur erklären, da erst eine kritische Menge von CobA gebildet werden muss, damit die sekundäre Reaktion effizient ablaufen kann.

Ein spezifisches Problem der von CobA hergestellten Moleküle Sirohydrochlorin und Trimethylpyrrocorphin sind ihre inhärent schlechten fluoreszenten Eigenschaften. In den Mikroskopieexperimenten zeigte sich neben der erforderlichen sehr hohen Sensitivität die stark limitierte Fähigkeit, multiple Bilder derselben Zelle aufzunehmen, da vollständiges Photobleaching der Moleküle nach zwei bis drei Aufnahmen eingetreten war. Diese

Beobachtung ist zuvor noch nicht beschrieben worden, obwohl CobA synthetisierende Einzelzellen mikroskopisch untersucht worden sind [201].

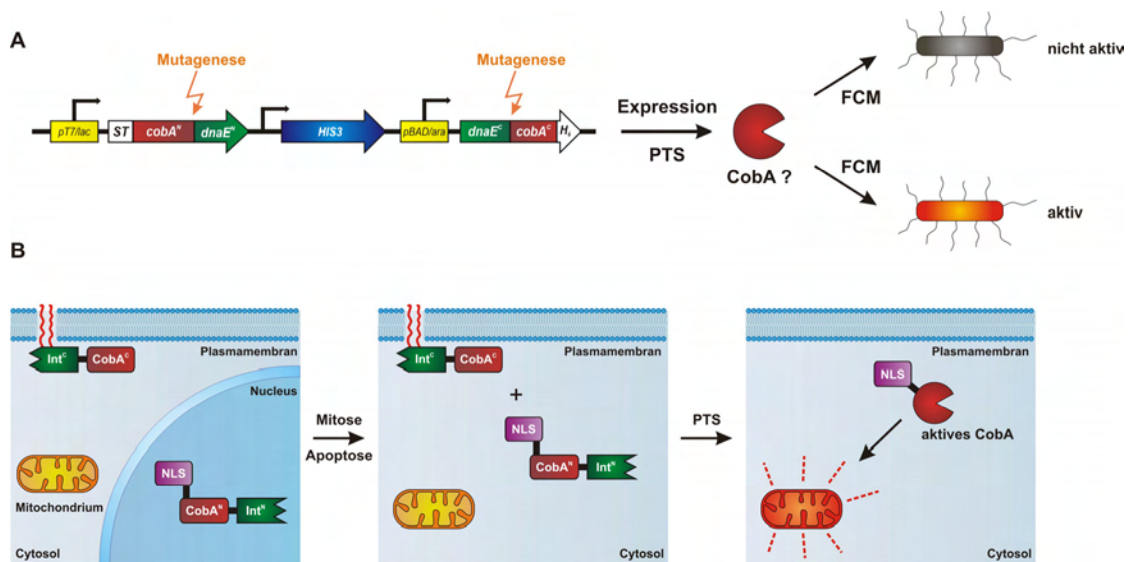
### 5.8 Anwendungs- und Verbesserungsmöglichkeiten von CobA

Der limitierende Faktor für die Anwendung von CobA in Zellkultur und *E. coli* ist der langsame Aufbau der erforderlichen Menge fluoreszenter Moleküle. Eine Möglichkeit, CobA in seinen Eigenschaften für diese Experimente zu verbessern, wäre die Proteinevolution. Dabei ist der entscheidende Schritt die Selektion, um optimierte CobA-Proteine zu identifizieren. In diesem Fall läge der Aufbau des Testsystems durch die Verwendungsmöglichkeit von CobA als fluoreszenten Biosensor für intakte Zellen auf der Hand [202]. Ein Experiment könnte wie folgt aussehen: Durch PCR werden die N- und C-terminalen Genhälften von *cobA* mutiert und nach ihrer Expression die CobA-Aktivität mittels Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry, FCM) charakterisiert (Abbildung 52 A). Sollte während der Expressionsdauer durch die *in-vivo*-PTS-Reaktion aktives CobA rekonstituiert werden, kann dies mittels FCM gemessen und quantifiziert werden. An die so identifizierten CobA-Mutanten würde sich eine Charakterisierung durch Sequenzierung der *cobA*-Genhälften anschließen. Nach der Optimierung und Erhöhung der CobA-Aktivität wäre es sogar möglich, ein zweites Evolutionssystem zu etablieren, mit dem das *Npu* DnaE-Intein in seinen Eigenschaften verbessert werden könnte. Der Aufbau wäre bei diesem System grundsätzlich identisch mit dem der Verbesserung des CobA-Proteins. Durch Mutagenese der Inteingene gefolgt von Selektion auf CobA-Aktivität wäre es möglich, aktivitätssteigernde Mutanten in beiden Inteinhälften zu identifizieren. In Säugerzellen könnten optimierte *Npu* DnaE-Inteine mittels kürzerer Inkubationszeit nach der Transfektion identifiziert werden, da unter diesen Bedingungen Inteine selektiert werden, die die PTS-Reaktion schneller durchführen können. Das entstehende Selektionssystem würde damit eine Alternative zu dem von Lockless *et al.* entwickelten Verfahren zur Inteinevolution darstellen. (siehe Kapitel 5.5) [32].

Eine weitere Biosensoranwendung von CobA ergibt sich aus der Möglichkeit, die inaktiven gespaltenen CobA-Hälften in zwei unterschiedliche zelluläre Kompartimente zu lokalisieren. So könnte zum Beispiel eine Hälfte an die Plasmamembran oder im Cytosol lokalisiert sein und die andere spezifisch in den Nucleus transportiert werden (Abbildung 52 B). Falls nun ein Ereignis eintritt, bei dem die Kernmembran auflöst wird, wie Apoptose oder Mitose, können die beiden Hälften im Cytoplasma assoziieren und die PTS-Reaktion kann stattfinden. Dadurch würde aktives CobA produziert und in den Mitochondrien der Zellen



würden sich rot fluoreszierende Moleküle akkumulieren. In beiden theoretischen Sensormöglichkeiten könnten Probleme auftreten, wobei das wahrscheinlichste die zeitliche Limitierung dieser Prozesse darstellt. Die Zeit spielt deshalb eine essenzielle Rolle, da die Zellen ausreichend Zeit besitzen müssen, um genügend fluoreszierende Produkte für die mikroskopische Detektion zu generieren. Das Auflösen der Kernhülle findet erst in den späten Phasen der Apoptose statt [230], was nur ein sehr kleines Zeitfenster bis zur Detektion übrig ließe. Des Weiteren sollten Apoptosesensoren möglichst am Beginn des Prozesses in der Lage sein diese zu detektieren. Eine weitere Anwendung für CobA als Sensor für die Auflösung der Kernhülle ist während der unterschiedlichen Phasen im Zellzyklus denkbar. Diese Möglichkeit wäre deshalb von Bedeutung, da es eine Vielzahl von Experimenten gibt, die in einer spezifischen Phase arretierte Zellen verwenden [231, 232]. Mit dem auf CobA basierenden Biosensor könnten in der Metaphase arretierte Zellen sichtbar gemacht werden, weil in der Prometaphase die Auflösung der Kernhülle erfolgt [233]. Dabei stellt eine Arretierungsdauer von zehn Stunden und mehr in HeLa-Zellen kein Problem dar [234], um so der Rekonstitution der CobA-Aktivität ein größeres Zeitfenster einzuräumen. Ein zusätzlicher Vorteil von CobA ist die Tatsache, dass es sich um einen nicht-invasiven, fluoreszenten Biosensor handelt, der die Zellen nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt. Somit könnten die identifizierten arretierten Zellen in Folgeexperimente weiterverwendet werden.



**Abbildung 52. Anwendungsmöglichkeiten des CobA-Systems**

A) Schematische Darstellung des Proteinevolutionsansatzes zur Aktivitätssteigerung von CobA oder des *Npu* DnaE-Inteins. Nach anfänglicher *in-vitro*-Mutagenese werden die Inteinkassetten in *E. coli* exprimiert und die Aktivität von CobA mittels Durchflusszytometrie (FCM) untersucht. B) Schematische Darstellung der Verwendung von CobA als Biosensor für die Dynamik von subzellulären Kompartimenten. Bei Apoptose oder Mitose wird die Kernhülle aufgelöst, wodurch das N-terminale CobA-Fusionsprotein freigesetzt wird. Nach anschließender PTS-Reaktion bildet sich aktives CobA, das durch Bildung von fluoreszenten Molekülen die Mitochondrien rot fluoreszieren lässt. (NLS = nucleares Lokalisationssignal)

## 6 Literatur

1. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
2. Gimble, F.S. and J. Thorner, *Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 1992. **357**(6376): p. 301-6.
3. Kane, P.M., et al., *Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase*. Science, 1990. **250**(4981): p. 651-7.
4. Hirata, R., et al., *Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 6726-33.
5. Perler, F.B., *InBase: the Intein Database*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 383-4.
6. Belfort, M. and R.J. Roberts, *Homing endonucleases: keeping the house in order*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3379-88.
7. Perler, F.B., G.J. Olsen, and E. Adam, *Compilation and analysis of intein sequences*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1087-93.
8. Pietrokovski, S., *Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins*. Protein Sci, 1994. **3**(12): p. 2340-50.
9. Chong, S., et al., *Protein splicing involving the Saccharomyces cerevisiae VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22159-68.
10. Kawasaki, M., et al., *Identification of three core regions essential for protein splicing of the yeast Vma1 protozyme. A random mutagenesis study of the entire Vma1-derived endonuclease sequence*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15668-74.
11. Davis, E.O., et al., *Protein splicing in the maturation of M. tuberculosis recA protein: a mechanism for tolerating a novel class of intervening sequence*. Cell, 1992. **71**(2): p. 201-10.
12. Hall, T.M., et al., *Crystal structure of a Hedgehog autoprocessing domain: homology between Hedgehog and self-splicing proteins*. Cell, 1997. **91**(1): p. 85-97.
13. Mizutani, R., et al., *Protein-splicing reaction via a thiazolidine intermediate: crystal structure of the VMA1-derived endonuclease bearing the N and C-terminal propeptides*. J Mol Biol, 2002. **316**(4): p. 919-29.
14. Klabunde, T., et al., *Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(1): p. 31-6.
15. Duan, X., F.S. Gimble, and F.A. Quijcho, *Crystal structure of PI-SceI, a homing endonuclease with protein splicing activity*. Cell, 1997. **89**(4): p. 555-64.
16. Poland, B.W., M.Q. Xu, and F.A. Quijcho, *Structural insights into the protein splicing mechanism of PI-SceI*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16408-13.
17. Sun, P., et al., *Crystal structures of an intein from the split dnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803 reveal the catalytic model without the penultimate histidine and the mechanism of zinc ion inhibition of protein splicing*. J Mol Biol, 2005. **353**(5): p. 1093-105.
18. Ding, Y., et al., *Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39133-42.
19. Romanelli, A., et al., *Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6397-402.
20. Amitai, G., B. Dassa, and S. Pietrokovski, *Protein splicing of inteins with atypical glutamine and aspartate C-terminal residues*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3121-31.
21. Chong, S., et al., *Modulation of protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae vacuolar membrane ATPase intein*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10567-77.
22. Xu, M.Q. and F.B. Perler, *The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation*. Embo J, 1996. **15**(19): p. 5146-53.
23. Mills, K.V., D.M. Dorval, and K.T. Lewandowski, *Kinetic analysis of the individual steps of protein splicing for the Pyrococcus abyssi PolIII intein*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2714-20.
24. Oemig, J.S., et al., *Solution structure of DnaE intein from Nostoc punctiforme: structural basis for the design of a new split intein suitable for site-specific chemical modification*. FEBS Lett, 2009. **583**(9): p. 1451-6.
25. Johnson, M.A., et al., *NMR structure of a KlbA intein precursor from Methanococcus jannaschii*. Protein Sci, 2007. **16**(7): p. 1316-28.
26. Shemella, P., et al., *Mechanism for intein C-terminal cleavage: a proposal from quantum mechanical calculations*. Biophys J, 2007. **92**(3): p. 847-53.
27. Van Roey, P., et al., *Crystallographic and mutational studies of Mycobacterium tuberculosis recA mini-inteins suggest a pivotal role for a highly conserved aspartate residue*. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 162-73.
28. Southworth, M.W., et al., *Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein*. Biotechniques, 1999. **27**(1): p. 110-4, 116, 118-20.
29. Amitai, G., et al., *Modulation of intein activity by its neighboring extein substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(27): p. 11005-10.
30. Evans, T.C., Jr., et al., *Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of Synechocystis species PCC6803*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9091-4.
31. Iwai, H., et al., *Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1853-8.
32. Lockless, S.W. and T.W. Muir, *Traceless protein splicing utilizing evolved split inteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(27): p. 10999-1004.
33. Xu, M.Q., et al., *In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1371-7.
34. Cooper, A.A., et al., *Protein splicing of the yeast TFP1 intervening protein sequence: a model for self-excision*. Embo J, 1993. **12**(6): p. 2575-83.
35. Hatfull, G.F., et al., *Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform*. PLoS Genet, 2006. **2**(6): p. e92.
36. Tori, K., et al., *Splicing of the mycobacteriophage Bethlehem DnaB intein: identification of a new mechanistic class of inteins that contain an obligate block F nucleophile*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2515-26.
37. Caspi, J., et al., *Distribution of split DnaE inteins in cyanobacteria*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1569-77.
38. Choi, J.J., et al., *Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite Nanoarchaeum equitans*. J Mol Biol, 2006. **356**(5): p. 1093-106.
39. Wu, H., Z. Hu, and X.Q. Liu, *Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9226-31.

40. Dassa, B., et al., *Fractured genes: a novel genomic arrangement involving new split inteins and a new homing endonuclease family*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(8): p. 2560-73.
41. Wu, H., M.Q. Xu, and X.Q. Liu, *Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1387**(1-2): p. 422-32.
42. Shi, J. and T.W. Muir, *Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(17): p. 6198-206.
43. Dassa, B., et al., *Trans protein splicing of cyanobacterial split inteins in endogenous and exogenous combinations*. Biochemistry, 2007. **46**(1): p. 322-30.
44. Zettler, J., V. Schutz, and H.D. Mootz, *The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 909-14.
45. Martin, D.D., M.Q. Xu, and T.C. Evans, Jr., *Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from Synechocystis sp. PCC6803*. Biochemistry, 2001. **40**(5): p. 1393-402.
46. Nichols, N.M., et al., *Zinc ion effects on individual Ssp DnaE intein splicing steps: regulating pathway progression*. Biochemistry, 2003. **42**(18): p. 5301-11.
47. Brenzel, S., T. Kurpiers, and H.D. Mootz, *Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein*. Biochemistry, 2006. **45**(6): p. 1571-8.
48. Mootz, H.D. and T.W. Muir, *Protein splicing triggered by a small molecule*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(31): p. 9044-5.
49. Pietrokovski, S., *Intein spread and extinction in evolution*. Trends Genet, 2001. **17**(8): p. 465-72.
50. Swithers, K.S., et al., *Conservation of intron and intein insertion sites: implications for life histories of parasitic genetic elements*. BMC Evol Biol, 2009. **9**: p. 303.
51. Derbyshire, V. and M. Belfort, *Lightning strikes twice: intron-intein coincidence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1356-7.
52. Belfort, M., et al., *Prokaryotic introns and inteins: a panoply of form and function*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 3897-903.
53. Dalgaard, J.Z., et al., *Statistical modeling, phylogenetic analysis and structure prediction of a protein splicing domain common to inteins and hedgehog proteins*. J Comput Biol, 1997. **4**(2): p. 193-214.
54. Koonin, E.V., *A protein splice-junction motif in hedgehog family proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(4): p. 141-2.
55. Amitai, G., et al., *Distribution and function of new bacterial intein-like protein domains*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 61-73.
56. Dori-Bachash, M., et al., *Bacterial intein-like domains of predatory bacteria: a new domain type characterized in Bdellovibrio bacteriovorus*. Funct Integr Genomics, 2009. **9**(2): p. 153-66.
57. Liu, X.Q. and Z. Hu, *A DnaB intein in Rhodothermus marinus: indication of recent intein homing across remotely related organisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 7851-6.
58. Pietrokovski, S., *Identification of a virus intein and a possible variation in the protein-splicing reaction*. Curr Biol, 1998. **8**(18): p. R634-5.
59. Pietrokovski, S., *Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains*. Protein Sci, 1998. **7**(1): p. 64-71.
60. Liu, X.Q., *Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 61-76.
61. Chong, S., et al., *Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element*. Gene, 1997. **192**(2): p. 271-81.
62. Chong, S., et al., *Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(22): p. 5109-15.
63. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from Methanobacterium thermoautotrophicum*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 3923-6.
64. Muir, T.W., D. Sondhi, and P.A. Cole, *Expressed protein ligation: a general method for protein engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6705-10.
65. Mathys, S., et al., *Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation*. Gene, 1999. **231**(1-2): p. 1-13.
66. Wood, D.W., et al., *A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 889-92.
67. Dawson, P.E., et al., *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. Science, 1994. **266**(5186): p. 776-9.
68. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element*. Protein Sci, 1998. **7**(11): p. 2256-64.
69. Camarero, J.A., et al., *Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8536-41.
70. Valiyaveetil, F.I., R. MacKinnon, and T.W. Muir, *Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(31): p. 9113-20.
71. McCaldon, P. and P. Argos, *Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences*. Proteins, 1988. **4**(2): p. 99-122.
72. Muralidharan, V. and T.W. Muir, *Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins*. Nat Methods, 2006. **3**(6): p. 429-38.
73. Kurpiers, T. and H.D. Mootz, *Regioselective cysteine bioconjugation by appending a labeled cystein tag to a protein by using protein splicing in trans*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(27): p. 5234-7.
74. Kurpiers, T. and H.D. Mootz, *Site-specific chemical modification of proteins with a prelabelled cysteine tag using the artificially split Mxe GyrA intein*. Chembiochem, 2008. **9**(14): p. 2317-25.
75. Ando, T., et al., *Construction of a small-molecule-integrated semisynthetic split intein for in vivo protein ligation*. Chem Commun (Camb), 2007(47): p. 4995-7.
76. Ludwig, C., et al., *Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(31): p. 5218-21.
77. Züger, S. and H. Iwai, *Intein-based biosynthetic incorporation of unlabeled protein tags into isotopically labeled proteins for NMR studies*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 736-40.
78. Southworth, M.W., et al., *Control of protein splicing by intein fragment reassembly*. Embo J, 1998. **17**(4): p. 918-26.
79. Kimura, R.H., A.T. Tran, and J.A. Camarero, *Biosynthesis of the cyclotide Kalata B1 by using protein splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(6): p. 973-6.
80. Scott, C.P., et al., *Production of cyclic peptides and proteins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13638-43.
81. Kanno, A., et al., *Cyclic luciferase for real-time sensing of caspase-3 activities in living mammals*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(40): p. 7595-9.
82. Volkmann, G., et al., *Intein-mediated cyclization of bacterial acyl carrier protein stabilizes its folded conformation but does not abolish function*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 8605-14.
83. Zhao, Z., et al., *Protein cyclization enhanced thermostability and exopeptidase-resistance of green fluorescent protein*. J Microbiol Biotechnol, 2010. **20**(3): p. 460-6.

84. Scott, C.P., et al., *Structural requirements for the biosynthesis of backbone cyclic peptide libraries*. Chem Biol, 2001. **8**(8): p. 801-15.
85. Kwon, Y., M.A. Coleman, and J.A. Camarero, *Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(11): p. 1726-9.
86. Ozawa, T., et al., *Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing*. Anal Chem, 2001. **73**(11): p. 2516-21.
87. Struhl, K., *Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes*. Cell, 1999. **98**(1): p. 1-4.
88. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
89. A-Mohammadi, S., et al., *Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues*. Gene Ther, 1997. **4**(9): p. 993-7.
90. Kistner, A., et al., *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10933-8.
91. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
92. Hasan, M.T., et al., *Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice*. Genesis, 2001. **29**(3): p. 116-22.
93. Keyvani, K., I. Baur, and W. Paulus, *Tetracycline-controlled expression but not toxicity of an attenuated diphtheria toxin mutant*. Life Sci, 1999. **64**(19): p. 1719-24.
94. Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
95. Sauer, B. and N. Henderson, *Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(1): p. 147-61.
96. O'Gorman, S., D.T. Fox, and G.M. Wahl, *Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells*. Science, 1991. **251**(4999): p. 1351-5.
97. Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 657-62.
98. Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(10): p. 743-55.
99. Feil, R., et al., *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
100. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
101. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
102. Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 129-38.
103. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
104. Bushati, N. and S.M. Cohen, *microRNA functions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 175-205.
105. Aravin, A.A., G.J. Hannon, and J. Brennecke, *The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race*. Science, 2007. **318**(5851): p. 761-4.
106. Winkler, W.C. and R.R. Breaker, *Regulation of bacterial gene expression by riboswitches*. Annu Rev Microbiol, 2005. **59**: p. 487-517.
107. Mandal, M. and R.R. Breaker, *Gene regulation by riboswitches*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 451-63.
108. Werstuck, G. and M.R. Green, *Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions*. Science, 1998. **282**(5387): p. 296-8.
109. Link, K.H. and R.R. Breaker, *Engineering ligand-responsive gene-control elements: lessons learned from natural riboswitches*. Gene Ther, 2009. **16**(10): p. 1189-201.
110. Dixon, N., et al., *Reengineering orthogonally selective riboswitches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 2830-5.
111. Nomura, Y. and Y. Yokobayashi, *Reengineering a natural riboswitch by dual genetic selection*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(45): p. 13814-5.
112. Verhounig, A., D. Karcher, and R. Bock, *Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6204-9.
113. Ehrlich, P., *The theory and practice of chemotherapy*. Folia Serologica, 1911. **7**: p. 697-714.
114. Keiser, M.J., et al., *Predicting new molecular targets for known drugs*. Nature, 2009. **462**(7270): p. 175-81.
115. Costanzo, M., et al., *The genetic landscape of a cell*. Science, 2010. **327**(5964): p. 425-31.
116. Wullschlegel, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
117. Young, D.A. and C.L. Nickerson-Nutter, *mTOR--beyond transplantation*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(4): p. 418-23.
118. Harrison, D.E., et al., *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 392-5.
119. Fontana, L., L. Partridge, and V.D. Longo, *Extending healthy life span - from yeast to humans*. Science, 2010. **328**(5976): p. 321-6.
120. Wolan, D.W., et al., *Small-molecule activators of a proenzyme*. Science, 2009. **326**(5954): p. 853-8.
121. Werner, J.N., et al., *Quantitative genome-scale analysis of protein localization in an asymmetric bacterium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 7858-63.
122. Huh, W.K., et al., *Global analysis of protein localization in budding yeast*. Nature, 2003. **425**(6959): p. 686-91.
123. Banaszynski, L.A., C.W. Liu, and T.J. Wandless, *Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(13): p. 4715-21.
124. Bierer, B.E., et al., *Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9231-5.
125. Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall, *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*. Science, 1991. **253**(5022): p. 905-9.
126. Lorenz, M.C. and J. Heitman, *TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27531-7.
127. Bayle, J.H., et al., *Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity*. Chem Biol, 2006. **13**(1): p. 99-107.
128. Liberles, S.D., et al., *Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 7825-30.
129. Belshaw, P.J., et al., *Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4604-7.

130. Ho, S.N., et al., *Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 822-6.
131. Rivera, V.M., et al., *A humanized system for pharmacologic control of gene expression*. Nat Med, 1996. **2**(9): p. 1028-32.
132. Spencer, D.M., et al., *Controlling signal transduction with synthetic ligands*. Science, 1993. **262**(5136): p. 1019-24.
133. Geda, P., et al., *A small molecule-directed approach to control protein localization and function*. Yeast, 2008. **25**(8): p. 577-94.
134. Haruki, H., J. Nishikawa, and U.K. Laemmli, *The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes*. Mol Cell, 2008. **31**(6): p. 925-32.
135. Robinson, M.S., D.A. Sahlender, and S.D. Foster, *Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria*. Dev Cell, 2010. **18**(2): p. 324-31.
136. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
137. Tobias, J.W., et al., *The N-end rule in bacteria*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1374-7.
138. Bachmair, A., D. Finley, and A. Varshavsky, *In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue*. Science, 1986. **234**(4773): p. 179-86.
139. Bachmair, A. and A. Varshavsky, *The degradation signal in a short-lived protein*. Cell, 1989. **56**(6): p. 1019-32.
140. Hwang, C.S., A. Shemorry, and A. Varshavsky, *N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals*. Science, 2010. **327**(5968): p. 973-7.
141. Dohmen, R.J., P. Wu, and A. Varshavsky, *Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1273-6.
142. Banaszynski, L.A., et al., *A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules*. Cell, 2006. **126**(5): p. 995-1004.
143. Banaszynski, L.A., et al., *Chemical control of protein stability and function in living mice*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1123-7.
144. Taxis, C., et al., *Efficient protein depletion by genetically controlled deprotection of a dormant N-degron*. Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 267.
145. Nishimura, K., et al., *An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells*. Nat Methods, 2009. **6**(12): p. 917-22.
146. Liang, R., et al., *A T7-expression system under temperature control could create temperature-sensitive phenotype of target gene in Escherichia coli*. J Microbiol Methods, 2007. **68**(3): p. 497-506.
147. Tan, G., et al., *Temperature-sensitive mutations made easy: generating conditional mutations by using temperature-sensitive inteins that function within different temperature ranges*. Genetics, 2009. **183**(1): p. 13-22.
148. Zeidler, M.P., et al., *Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(7): p. 871-6.
149. Skretas, G. and D.W. Wood, *Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins*. Protein Sci, 2005. **14**(2): p. 523-32.
150. Buskirk, A.R., et al., *Directed evolution of ligand dependence: small-molecule-activated protein splicing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10505-10.
151. Yuen, C.M., et al., *Control of transcription factor activity and osteoblast differentiation in mammalian cells using an evolved small-molecule-dependent intein*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(27): p. 8939-46.
152. Mootz, H.D., et al., *Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(35): p. 10561-9.
153. Schwartz, E.C., et al., *Post-translational enzyme activation in an animal via optimized conditional protein splicing*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(1): p. 50-4.
154. Tyszkiewicz, A.B. and T.W. Muir, *Activation of protein splicing with light in yeast*. Nat Methods, 2008. **5**(4): p. 303-5.
155. Sutcliffe, J.G., *Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1979. **43 Pt 1**: p. 77-90.
156. Conrad, S.E., M. Wold, and J.L. Campbell, *Origin and direction of DNA replication of plasmid RSF1030*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 736-40.
157. Sonntag, T., *Entwicklung einer cis und trans Intein-kassette zur Integration in Gene von Saccharomyces cerevisiae für die Kontrolle der Proteinaktivität durch reguliertes Protein-Splicing*, in *Fachbereich Biologie*. 2006, Philipps-Universität Marburg: Marburg.
158. Short, J.M., J.M. Fernandez, J.A. Sorge and W.D. Huse, *Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties*. Nucleic Acids Research, 1988. **16**: p. 7583-7600.
159. Mumberg, D., R. Müller and M. Funk, *Regulatable promoters of Saccharomyces cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**: p. 5767-5768.
160. Mumberg, D., R. Müller, and M. Funk, *Regulatable promoters of Saccharomyces cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(25): p. 5767-8.
161. Mumberg, D., R. Müller, and M. Funk, *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds*. Gene, 1995. **156**(1): p. 119-22.
162. Kuroda, S., S. Otaka, and Y. Fujisawa, *Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements*. J Biol Chem, 1994. **269**(8): p. 6153-62.
163. Wach, A., et al., *Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(11): p. 1065-75.
164. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
165. Binkowski, B.F., R.A. Miller, and P.J. Belshaw, *Ligand-regulated peptides: a general approach for modulating protein-peptide interactions with small molecules*. Chem Biol, 2005. **12**(7): p. 847-55.
166. Fan, H.Y., K.K. Cheng, and H.L. Klein, *Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant hpr1 delta of Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1996. **142**(3): p. 749-59.
167. Scherer, W.F., J.T. Syvertson, and G.O. Gey, *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. J Exp Med, 1953. **97**(5): p. 695-710.
168. Gluzman, Y., *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. Cell, 1981. **23**(1): p. 175-82.
169. CLONTECH, *Yeast Protocols Handbook*. 2001.
170. Dulbecco, R. and G. Freeman, *Plaque production by the polyoma virus*. Virology, 1959. **8**(3): p. 396-7.
171. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*. Third Edition ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
172. Rose, M.D., F. Winston, and P. Hieter, *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. 1990, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

173. Geiser, M., et al., *Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 88-90, 92.
174. van den Ent, F. and J. Lowe, *RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids*. J Biochem Biophys Methods, 2006. **67**(1): p. 67-74.
175. Stratagene, *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit*. Revision A ed: Stratagene.
176. Steiner, H., B. Pesold, and C. Haass, *An in vivo assay for the identification of target proteases which cleave membrane-associated substrates*. FEBS Lett, 1999. **463**(3): p. 245-9.
177. Sattler, I., et al., *Cloning, sequencing, and expression of the uroporphyrinogen III methyltransferase cobA gene of Propionibacterium freudenreichii (shermanii)*. J Bacteriol, 1995. **177**(6): p. 1564-9.
178. Kuwayama, H., et al., *PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(2): p. E2.
179. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
180. Schneider, S., M. Buchert, and C.M. Hovens, *An in vitro assay of beta-galactosidase from yeast*. Biotechniques, 1996. **20**(6): p. 960-2.
181. Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*. 1972, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
182. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th Edition*. 5th Edition ed. 2005, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 696.
183. Tarassov, K., et al., *An in vivo map of the yeast protein interactome*. Science, 2008. **320**(5882): p. 1465-70.
184. Yu, H., et al., *High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network*. Science, 2008. **322**(5898): p. 104-10.
185. Carrington, J.C. and W.G. Dougherty, *A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3391-5.
186. Parks, T.D., et al., *Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase*. Anal Biochem, 1994. **216**(2): p. 413-7.
187. Smith, T.A. and B.D. Kohorn, *Direct selection for sequences encoding proteases of known specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5159-62.
188. Wehr, M.C., et al., *Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 985-93.
189. Kapust, R.B., et al., *Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency*. Protein Eng, 2001. **14**(12): p. 993-1000.
190. Nunn, C.M., et al., *Crystal structure of tobacco etch virus protease shows the protein C terminus bound within the active site*. J Mol Biol, 2005. **350**(1): p. 145-55.
191. Frangioni, J.V. and B.G. Neel, *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins*. Anal Biochem, 1993. **210**(1): p. 179-87.
192. van Thor, J.J., et al., *Ultrafast and low barrier motions in the photoreactions of the green fluorescent protein*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33652-9.
193. Burkholder, A.C. and L.H. Hartwell, *The yeast alpha-factor receptor: structural properties deduced from the sequence of the STE2 gene*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(23): p. 8463-75.
194. Herskowitz, I., *MAP kinase pathways in yeast: for mating and more*. Cell, 1995. **80**(2): p. 187-97.
195. Hicke, L. and H. Riezman, *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 277-87.
196. Srivastava, K.C. and D.G. Smith, *Effect of cryo-protective agents on the growth and ultrastructure of Saccharomyces cerevisiae*. Cytobios, 1980. **29**(113): p. 29-36.
197. Muona, M., et al., *Segmental isotopic labeling of multi-domain and fusion proteins by protein trans-splicing in vivo and in vitro*. Nat Protoc, 2010. **5**(3): p. 574-87.
198. Zettler, J., *Wechselwirkungen zwischen Adenylierungs- und Peptidyl Carrier Protein-Domänen in nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen sowie biochemische und strukturelle Untersuchungen zu gespaltenen Inteinen*, in Fakultät Chemie. 2010, Technischen Universität Dortmund: Dortmund.
199. Warren, M.J., et al., *The Escherichia coli cysG gene encodes S-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 725-9.
200. Vevodova, J., et al., *Structure/function studies on a S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III C methyltransferase (SUMT), a key regulatory enzyme of tetrapyrrole biosynthesis*. J Mol Biol, 2004. **344**(2): p. 419-33.
201. Wildt, S. and U. Deuschle, *cobA, a red fluorescent transcriptional reporter for Escherichia coli, yeast, and mammalian cells*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(12): p. 1175-8.
202. Feliciano, J., Y. Liu, and S. Daunert, *Novel reporter gene in a fluorescent-based whole cell sensing system*. Biotechnol Bioeng, 2006. **93**(5): p. 989-97.
203. Rehse, P.H., T. Kitao, and T.H. Tahirou, *Structure of a closed-form uroporphyrinogen-III C-methyltransferase from Thermus thermophilus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005. **61**(Pt 7): p. 913-9.
204. Hamza, I., *Intracellular trafficking of porphyrins*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(10): p. 627-9.
205. Mootz, H.D., E.S. Blum, and T.W. Muir, *Activation of an autoregulated protein kinase by conditional protein splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(39): p. 5189-92.
206. Michnick, S.W., et al., *Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(7): p. 569-82.
207. Ye, X., et al., *Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer*. Science, 1999. **283**(5398): p. 88-91.
208. Williams, D.J., H.L. Puhl, 3rd, and S.R. Ikeda, *Rapid modification of proteins using a rapamycin-inducible tobacco etch virus protease system*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7474.
209. Werner-Washburne, M., et al., *Stationary phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev, 1993. **57**(2): p. 383-401.
210. Edwards, S.R. and T.J. Wandless, *The rapamycin-binding domain of the protein kinase mammalian target of rapamycin is a destabilizing domain*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13395-401.
211. Henrichs, T., et al., *Target-directed proteolysis at the ribosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4246-51.
212. Herskovits, A.A., et al., *Evidence for coupling of membrane targeting and function of the signal recognition particle (SRP) receptor FisY*. EMBO Rep, 2001. **2**(11): p. 1040-6.
213. Eser, M., et al., *Target-directed proteolysis in vivo*. Methods Enzymol, 2007. **421**: p. 68-83.
214. GIBCO, *TEV Protease, Recombinant\**. Vol. Cat. No. 10127-017: GIBCO BRL, Life Technologies.
215. Mondigler, M. and M. Ehrmann, *Site-specific proteolysis of the Escherichia coli SecA protein in vivo*. J Bacteriol, 1996. **178**(10): p. 2986-8.

216. Pauli, A., et al., *Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in Drosophila neurons*. Dev Cell, 2008. **14**(2): p. 239-51.
217. Ehrmann, M., et al., *TnTIN and TnTAP: mini-transposons for site-specific proteolysis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13111-5.
218. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
219. Wehr, M.C., et al., *Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 55.
220. Gray, D.C., S. Mahrus, and J.A. Wells, *Activation of Specific Apoptotic Caspases with an Engineered Small-Molecule-Activated Protease*. Cell, 2010. **142**(4): p. 637-646.
221. Lew, B.M. and H. Paulus, *An in vivo screening system against protein splicing useful for the isolation of non-splicing mutants or inhibitors of the RecA intein of Mycobacterium tuberculosis*. Gene, 2002. **282**(1-2): p. 169-77.
222. Bae, J.H., et al., *Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent proteins*. J Mol Biol, 2003. **328**(5): p. 1071-81.
223. Wachter, R.M., et al., *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. Structure, 1998. **6**(10): p. 1267-77.
224. Hiraga, K., et al., *Selection and structure of hyperactive inteins: peripheral changes relayed to the catalytic center*. J Mol Biol, 2009. **393**(5): p. 1106-17.
225. Busche, A.E., et al., *Segmental isotopic labeling of a central domain in a multidomain protein by protein trans-splicing using only one robust DnaE intein*. Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(33): p. 6128-31.
226. Lee, N.Y., T.L. Hazlett, and J.G. Koland, *Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain*. Protein Sci, 2006. **15**(5): p. 1142-52.
227. Kamionka, A., et al., *Independent regulation of two genes in Escherichia coli by tetracyclines and Tet repressor variants*. J Bacteriol, 2004. **186**(13): p. 4399-401.
228. Galameau, A., et al., *Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 619-22.
229. Stefan, E., et al., *Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16916-21.
230. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
231. Hughes, S.E., et al., *Heterochromatic threads connect oscillating chromosomes during prometaphase I in Drosophila oocytes*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000348.
232. Wray, J., et al., *Metnase mediates resistance to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cells*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5323.
233. Rickards, G.K., *Prophase chromosome movements in living house cricket spermatocytes and their relationship to prometaphase, anaphase and granule movements*. Chromosoma, 1975. **49**(4): p. 407-55.
234. Honda, S., et al., *Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10615-23.

## 7 Anhang

Tabelle 17: Liste zusätzlich verwendeter Plasmide

Plasmid	Kodierende Region	Vektorgrundgerüst	Insert / Templat-DNA	Verwendete Primer	Erzeugt durch: Restriktion / homologe Rekombination
pAI13	<i>MBP-N'gyrA-FKBP-His<sub>6</sub></i>	pTrc99a	-	-	-
pAU04	<i>C'dnaB(104-154)-grsA5422-Stop-PCP-His<sub>6</sub></i>	pBAD ( <i>Invitrogen</i> )	-	-	-
pAU07	<i>Npu C'dnaE-eGFP-His<sub>6</sub></i>	pBAD ( <i>Invitrogen</i> )	-	-	-
pAU08	<i>Strep-gpD-Npu N'dnaE</i>	pRSFDuet ( <i>Novagen</i> )	-	-	-
pCL20	<i>C'dnaB(12-154)-Trx-His<sub>6</sub></i>	pBAD202 ( <i>Invitrogen</i> )	-	-	- [76]
pDK01	<i>gpD-C'gyrA-Cys-His<sub>6</sub></i>	pTrc99a	-	-	-
pET19b-TEV(S219V)	<i>His<sub>10</sub>-TEV(S219V)</i>	pET19b ( <i>Novagen</i> )	-	-	-
pEB04	<i>MBP-N'VMA-FKBP</i>	pcDNA3 ( <i>Invitrogen</i> )	-	-	- [152]
pGAT-TEV(S219V)	<i>His<sub>6</sub>-GST-TEV(S219V)</i>	modifizierter pGEM ( <i>Promega</i> )	-	-	-
pISA417	<i>cobA(WT)</i>	pUC19	-	-	- [177]
pJZ28	<i>His<sub>6</sub>-grsA(1-421)-N'dnaB(1-104)</i>	pET28a ( <i>Novagen</i> )	-	-	-
pJZ42	<i>ST-gpD-N'dnaB(1-104)-His<sub>6</sub></i>	pET28a ( <i>Novagen</i> )	-	-	-
pSE07	<i>ST-gpD-GGG-N'dnaE_HIS3_C'dnaE-CGGG-Trx-His<sub>6</sub></i>	pTS160 (p425Δ)	pCasDnaE2	oSE05 & oSE07	homologe Rekombination
pSE08	<i>ST-gpD-AEY-N'dnaE_HIS3_C'dnaE-CFNK-Trx-His<sub>6</sub></i>	pTS160 (p425Δ)	pCasDnaE2	oSE06 & oSE08	homologe Rekombination
pSE15	<i>ST-cobA-His<sub>6</sub></i>	pTS171 (p425-TDH)	pISA417	oSE09 & oSE10	Restriktion: <i>NheI, NotI</i>
pTS34	<i>MBP-TEV(site)-EGFP</i>	pHM45 [152]	pEGFP-N1 ( <i>Clontech</i> )	oTS075 & oTS076	Restriktion: <i>EcoRI, HindIII</i>
pTS35	keine ( <i>GAL1</i> -Promotor)	p426-GPD	pYES2 ( <i>GAL1</i> -Promotor)	oTS071 & oTS072	Restriktion: <i>SacI, SpeI</i>
pTS40	<i>MBP-TEVsite-EGFP</i>	P425-TDH	pTS34	oTS077 & oTS076	Restriktion: <i>PstI, SpeI</i>
pTS68	<i>MBP-TEVsite-EGFP</i>	pTS34	pEGFP-N1 ( <i>Clontech</i> )	oTS097 & oTS098	Restriktion: <i>EcoRI, HindIII</i>
pTS201	<i>ssTM-PARPD-TEVsite-EGFP</i>	p415-MET	ssTM-PARPD-GAL4 [176] und pTS169	oTS197 & oTS204	Restriktion: p415-MET ( <i>SpeI, HindIII</i> ); PCR von ssTM-PARPD-GAL4 ( <i>SpeI, EcoRI</i> ); pTS169 ( <i>EcoRI, HindIII</i> )
pTS220	<i>ST-grsB1-His<sub>6</sub></i>	pET16b ( <i>Novagen</i> )	-	-	-
ssTM-PARPD-GAL4	<i>PSEN1-PARPI-CASP3site-GAL4</i>	modifizierter YCplac22	-	-	- [176]



Tabelle 18: Liste der verwendeten Primer

Primer-name	Beschreibung	Sequenz (5' nach 3')
oJZ055	<i>His<sub>6</sub></i> RP	TATCTCGAGTTAGTGATGGTGATGGTGATGAG
oJZ062	RF deletiert N'Gen pCasDnaB2 mit pAU08 FP	AATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAA ATAATTTTG
oJZ063	RF deletiert N'Gen pCasDnaB2 mit pAU08 RP	TGGTGGTGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTT AATT
oJZ064	RF deletiert C'Gen pCasDnaE1 mit pAU07 FP	CGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTG
oJZ065	RF deletiert C'Gen pCasDnaE1 mit pAU07 RP	AAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG
oJZ069	RF deletiert MCS pRSFDuet mit <i>araC</i> (pBAD) FP	CGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCAGGAGAAA CAGTAGAGAGTTGCG
oJZ070	RF deletiert MCS pRSFDuet mit <i>araC</i> (pBAD) RP	TTCGCAGCAGCGGTTTCTTTACCAGGCCTGCCA CCATACCCACGCCG
oJZ085	<i>Trx</i> FP	ATAGAATTCGGCGGAGGCGGAGGAGGATCTG ATAAAAT
oJZ091	RF deletiert N'Gen pCasDnaE2 mit pAI13 FP	ACTTTAATAAGGAGATATACCATGGAAATCGA AGAAGG
oJZ092	RF deletiert N'Gen pCasDnaE2 mit pAI13 RP	GTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTAATAACTA GTTTCCAGTTTTAG
oJZ093	RF deletiert C'Gen pCasGyrA1 mit pDK01 FP	ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGAGCA AAGAAACCTTTAC
oJZ094	RF deletiert C'Gen pCasGyrA1 mit pDK01 RP	AAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG
oJZ098	<i>cobA</i> FP (Säugerzellen)	ATAGAATTCACCATGATCAAAATAGCCACACG
oJZ099	<i>cobA</i> RP (Säugerzellen)	TATCTCGAGTCAGTGGTCGCTGGGCGCGCGA
oJZ100	N' <i>dnaE</i> RP (Säugerzellen)	ATACTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTAA
oJZ101	C' <i>dnaE</i> FP (Säugerzellen)	ATAGAATTCACCATGATCAAAATAGCCACACG
oJZ102	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA159</i> FP	GTTACCCGTCGTGTCGGGGCATGTATCGCCCA GCGACGAGTACTGTTTAAGCTATGAAACGG
oJZ103	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA159</i> (CFVP) RP	CCAGCGTGAGCCGGTCCCTTGGCGAGTTGGCGC CATGGCACGAAACAATTAGAAGCTATG
oJZ104	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA159</i> (CFNK) RP	GGATCACCAGCGTGAGCCGGTCCCTTGGCGAGT TGGCGCCATTTATTGAAACAATTAGAAGCTA
oSE01	RF <i>Ssp</i> DnaB-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (SGGG) RP	AATCATCAGTCAGATGAATAATTTTATCAGAT CCTCCTCCAGAGTTATGGACAATGATG
oSE02	RF <i>Ssp</i> DnaB-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (SIEQ) RP	ATCAAAAGAATCATCAGTCAGATGAATAATTT TATCAGACTGTTCAATAGAGTTATGGAC
oSE03	RF <i>Ssp</i> DnaB-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (GGG) FP	TGCCGGAACGGCAATCAGCATCGTTGAATTTCG GCGGAGGCTGCATCAGTGGAGATAGTT
oSE04	RF <i>Ssp</i> DnaB-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (ESG) FP	GCGTTTGCCGGAACGGCAATCAGCATCGTTGA ATTCGAAAGCGGATGCATCAGTGGAGAT
oSE05	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (GGG) FP	TGCCGGAACGGCAATCAGCATCGTTGAATTTCG GCGGAGGCTGTTTAAGCTATGAAACGG
oSE06	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (AEY) FP	GACCGGTTTGCCGGAACGGCAATCAGCATCG TTGAATTCGCGGAGTACTGTTTAAGCTATGAA AC
oSE07	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (CGGG) RP	AATCATCAGTCAGATGAATAATTTTATCAGAT CCTCCTCCACAATTAGAAGCTATGAAGC
oSE08	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>gpD-Trx</i> (CFNK) RP	ATCAAAAGAATCATCAGTCAGATGAATAATTT TATCAGATTTATTGAAACAATTAGAAGC
oSE09	<i>cobA</i> FP	ATAGCTAGCACCACCACACTGTTGCCCGG
oSE10	<i>cobA-His<sub>6</sub></i> RP	TATGCGGCCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATG ACTAGTGTGGTCGCTGGGCGCGCGATG
oES11	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA109</i> FP	CTCGTTTCGTCTTCGGGCGTGCCGGCGAGGAAT GGCAGGCCTGTTTAAGCTATGAAACGG
oSE12	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA 109</i> (CFN) RP	CCGAGGAGACTCCCGGGATCACGCGCACCGGG ATGCCGGCATTGAAACAATTAGAAGC

Primer-name	Beschreibung	Sequenz (5' nach 3')
oSE13	RF <i>Npu</i> DnaE-Kassette in <i>cobA</i> 109(CAE) RP	AGACTCCCGGGATCACGCGCACCGGGATGCCG GCCTCGGCACAATTAGAAGCTATGAAGC
oSE14	Fusions-PCR Einbau 110FN Mutation in <i>C'cobA</i> FP	GCATGCCTGCCATTCTCTCGCC
oSE15	Fusions-PCR Einbau 110FN Mutation in <i>N'cobA</i> RP	TGGCGGCGAGGAATGGCAGGCATGCTTCAACG CCGGCATCCCGGTGCGC
oTS025	<i>tor2-1</i> FP	CAAAGCGTGGCATAACTGGGCACTGG
oTS026	<i>tor2-1</i> RP	CTTCGGAGATAATGGGATTGCTGGATATTGCT GG
oTS071	<i>pGALI</i> FP	ATAGAGCTCACGGATTAGAAGCCGCCGAGC
oTS072	<i>pGALI</i> RP	ATAACTAGTGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAG
oTS073	<i>His<sub>10</sub>-TEV</i> FP	ATAGGATCCATACCATGGGCCATCATCATC
oTS074	<i>His<sub>10</sub>-TEV</i> RP	ATAGAATTCCTATCATTGCGAGTACACCAA
oTS075	<i>TEVsite-EGFP</i> FP	ATAGAATTCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCG GGATCCACCGGTCGCCACC
oTS076	<i>EGFP-HIS<sub>6</sub></i> RP	ATAAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGCT GCAGCGATCCCTGTACAGCTCGTCCATGCC
oTS077	<i>MBP</i> FP	ATAACTAGTAGCATATGAAAATCGAAGAAG
oTS091	Integration CPS-Kassette in <i>TEV151</i> FP	TATTCTGGAAGCATTGGATTCAAACCAAGGAT GGGCAGTGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS092	Integration CPS-Kassette in <i>TEV151</i> RP	ATGAACCCATCTCTAGTTGATACTAATGGACT GCCACAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS093	Integration CPS-Kassette in <i>TEV130</i> FP	AAACTAAGAGCATGTCTAGCATGGTGTCAGAC ACTAGTTGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS094	Integration CPS-Kassette in <i>TEV130</i> RP	ATGCTTCCAGAATATGCCATCAGATGAAGGGA ATGTGCAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS095	Integration CPS-Kassette in <i>TEV118</i> FP	AGGGAAGAGCGCATATGTCTTGTGACAACCAA CTTCCAAACTGTCGGGTGCTTTGCCAAGGGTA CCAA
oTS096	Integration CPS-Kassette in <i>TEV118</i> RP	AATGTGCAACTAGTGTCTGACACCATGCTAGA CATGCTCTTTTCTCCGCAATTGTGCACGACAAC CTGG
oTS097	<i>TEVsite-EGFP</i> FP	ATAGAATTCGCTGATGAGAATCTTTATTTTCAG GGCGGGGCCACCATGGTGAGCAAGGG
oTS098	<i>EGFP</i> RP	ATAAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCA
oTS121	Integration CPS-Kassette in <i>TEV110(Ile)</i> FP	AAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGGAA GAGCGCATATGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS122	Integration CPS-Kassette in <i>TEV110</i> RP	TAGACATGCTCTTAGTTTGGAAGTTGGTTGTCA CAAGACAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS123	Integration CPS-Kassette in <i>TEV110(Ala)</i> FP	CAAAGCTGAAATTTAGAGAGCCACAAAGGG AAGAGCGCGCATGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS124	Integration CPS-Kassette in <i>TEV206</i> FP	AAATCAGGAGGCGCAGCAGTGGGTTAGTGGTT GGCGATTAGGTTGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS125	Integration CPS-Kassette in <i>TEV206</i> RP	TCACCATGAAAACCTTTATGGCTCCCCACAAT ACTGAGTCGCAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS126	Integration CPS-Kassette in <i>TEV135</i> FP	GTCTAGCATGGTGTGACACTAGTTGCACAT TCCCTTCATGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS127	Integration CPS-Kassette in <i>TEV135</i> RP	CATCCTTGGTTTGAATCCAATGCTTCCAGAATA TGCCATCGCAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS128	Integration CPS-Kassette in <i>TEV97</i> FP	AATTATTCGCATGCCTAAGGATTTCCACCATT TCCTCAATGCTTTGCCAAGGGTACCAA
oTS129	Integration CPS-Kassette in <i>TEV97</i> RP	GACATATGCGCTCTTCCCTTTGTGGCTCTCTAA ATTCAGGCAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS130	Integration CPS-Kassette in <i>TEV16</i> FP	AAGCTTGTTTAAGGGACCACGTGATTACAACC CGATATCGTGCTTTGCCAAGGGTACCAA

Primer-name	Beschreibung	Sequenz (5' nach 3')
oTS131	Integration CPS-Kassette in <i>TEV16</i> RP	TTGTGTGCCCATCAGATTCATTCGTCAAATGAC AAATGGTGCAATTGTGCACGACAACCTGG
oTS140	Deletion <i>FPRI</i> -Gen mit <i>HIS3</i> -Marker FP	ATGTCTGAAGTAATTGAAGGTAACGTCAAAT TGACAGAACGTACGCTGCAGGTCGAC
oTS141	Deletion <i>FPRI</i> -Gen mit <i>HIS3</i> -Marker RP	GTTGACCTTCAACAATTCGACGTCGAAAACCA AAGTACTGATCGATGAATTCGAGCTCG
oTS152	<i>mCherry</i> FP	ATACTCGAGGCCACCATGGTGAGCAAGGGCG
oTS153	<i>TEV-site-mCherry</i> RP	ATAGGTACCCCGCCTGAAAATAAAGATTCTC ACCTCCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
oTS156	RF deletiert N'Gen pTS13 mit pJZ28 FP	AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGCGAGAT CTCGATCCCGCGAAAT
oTS157	RF deletiert N'Gen pTS13 mit pJZ28 RP	ATCTGGCGCGCCTTAATTAACCCGGATTTCCGCG GGATCGAGATCTCG
oTS158	RF deletiert C'Gen pTS13 mit pAU04 FP	TACTAACGCCGCCATCCAGTTTAAACTCAGCC ATACTTTTCATACTCC
oTS159	RF deletiert C'Gen pTS13 mit pAU04 RP	CCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGCGGATA CATATTTGAATGTAT
oTS160	<i>FRB</i> FP	ATAGGATCCACCATGGCTTCTAGAATCCTCTG GC
oTS161	<i>C'VEV-HA</i> RP	ATACTCGAGTTATTAGGCGTAATCTGGGACGT CGTATGGGTATCCACCTTGCAGTACACCAAT TCATTC
oTS162	<i>His<sub>6</sub>-GST</i> FP	ATAGAATTCACCATGAACACCATTTCATCACCA TC
oTS163	<i>FKBP</i> RP	ATACTCGAGTTATTAATAACTAGTTTCCAGTTT TAG
oTS175	iPCR p425-TDH FP	ATAAGATCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAG
oTS176	iPCR p425-TDH RP	ATAAAGCTTCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG
oTS177	<i>TEV</i> FP	ATAGAATTCGGAGGTGGAGGTGGAGAAAGCTT GTTAAGGGACCAC
oTS178	<i>TEV</i> RP	ATACTCGAGTCATTGCGAGTACACCAATTCAT
oTS182	SDM <i>TEV118</i> FP	CCAACCTCCAAACTGCCTTTGCCAAGGGTAC
oTS183	SDM <i>TEV118</i> RP	GTACCCTTGGCAAAGGCAGTTTGGAAAGTTGG
oTS184	SDM <i>TEV206</i> FP	GTTGGCGATTAGGTGCCTTTGCCAAGGGTAC
oTS185	SDM <i>TEV206</i> RP	GTACCCTTGGCAAAGGCACCTAATCGCCAAC
oTS186	<i>His<sub>6</sub>-GST</i> FP	ATAGCTAGCTCCATGAACACCATTTCATCACC
oTS187	<i>C'VEV-HA</i> RP	ATACTCGAGTTATTAGGCGTAATCTGGGACGT CGTATGGGTATCCACCACCAATTCATTTCATGA GTTGAG
oTS188	<i>MBP</i> FP	ATAAAGCTTAAACATGAAAATCGAAGAAGGTAA ACTG
oTS192	<i>MBP</i> RP	ATACCATGGAAATCCTTCCCTCGATCCCGAG
oTS197	<i>PSENI</i> FP	ATAACTAGTGCCATGGAGTTACCTGCACC
oTS201	<i>GAL4</i> RP	ATAAAGCTTTTACTCTTTTTTTGGGTTTGGTGG
oTS204	<i>PARP1</i> RP	ATAGAATTCATCGCCTTTTCTCTTTCCTTC
oTS205	<i>GAL4</i> FP	ATACCATGGGTAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC
oTS208	iPCR pTS203 deletiert <i>ssTMPARPD</i> FP	CTCCATGGCACTAGTTCTAGAATCC
oTS209	iPCR pTS203 deletiert <i>ssTMPARPD</i> RP	ATACATATGGCTGATGAGAATCTTTATTTTC
oTS210	<i>PMAI</i> FP	ATAACTAGTATGACTGATACATCATCCTCTTCA TC
oTS211	<i>PMAI</i> RP	ATACATATGTCCACCTCCACCTCCGGTTTCCTT TTCGTGTTGAGTAGAGACTC
oTS221	<i>STE2</i> FP	ATAACTAGTATGTCTGATGCGGCTCCTTCATTG AG
oTS222	<i>STE2</i> RP	ATACATATGTAAATTATTATTATCTTCAGTCCA G

FP: Vorwärts-Primer (engl. forward primer), RP: Rückwärts-Primer (engl. reverse primer), SDM: Punktmutagenese (engl. site-directed mutagenesis), RF: RF-PCR und iPCR: inverse-PCR.

## 8 Danksagung

Als Wissenschaftler stehe ich in der Schuld unzähliger, zum Teil unbekannter Kollegen, deren Ideen, Ergebnisse und Vorarbeiten die Grundlage des eigenen Werkes bilden und denen gerecht zu werden unmöglich ist. Dennoch möchte ich natürlich die Menschen, die mir *persönlich* den Abschluss dieser Arbeit ermöglicht haben, namentlich erfassen.

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Henning Mootz für die Möglichkeit bedanken, eine aus meiner Diplomarbeit hervorgegangene Projektidee über einen Ortswechsels hinaus weiterzuverfolgen. Zudem schätze ich seine mannigfachen Ansätze zu wissenschaftlichen Fragestellungen sowie seine Fähigkeit, Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten zu vermitteln; zwei Eigenschaften, die maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit beitrugen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Engelhard für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Dr. Leif Dehmelt für seine Teilnahme an meiner Prüfungskommission bedanken.

Dem gesamten Marburger und Dortmunder AK Mootz danke ich für viele gemeinschaftliche Unternehmungen und eine über Jahre hinweg angenehme und fruchtbare Arbeitsatmosphäre. Positiv hervorzuheben ist dabei die enge Kooperation mit Joachim Zettler und Simone Eppmann, ohne welche die Realisierung des SPLICEFINDER-Projektes unmöglich gewesen wäre.

Für die Hilfe bei Mikroskopie und Zellkultur betreffenden Fragen bedanke ich mich bei Dr. Leif Dehmelt und seiner Arbeitsgruppe. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen unterdessen wären ohne die freundliche Unterstützung von Dr. Ali Kinkhabwala und Dr. Sven Müller nicht realisierbar gewesen. Darüber hinaus geht mein Dank an das MPI in Dortmund und Prof. Dr. Philippe Bastians für die Möglichkeit, die dortigen Einrichtungen und Geräte benutzen zu dürfen.

Auch Simone Eppmann sei nochmals erwähnt, die mich gegen Ende der Doktorarbeit bei der Durchführung einiger Experimente tatkräftig unterstützte.

Meinen Bachelor- und Masterstudenten gebührt der Dank für produktive Auseinandersetzungen mit z.T. abweichenden Sichtweisen.

## Danksagung

---

Allen beteiligten Korrekturlesern, die diese literarisch insignifikanten Ergüsse ertragen mussten, bin ich nicht nur zu Dank, sondern auch zu Lob für ihre enorme Geduld verpflichtet.

Ferner möchte ich mich bei Nico, Nils und Joachim bedanken, die meine geistige Entwicklung jenseits der Biologie in besonderer Weise angeregt haben.

Zuletzt richte ich ein herzliches Dankeschön an meine Eltern, die mich nach der Wahl meines Studiums in vielerlei Hinsicht förderten, und an meine Geschwister Nina und Nico, deren moralische Unterstützung mir stets gewiss war.

---

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

*„Entwicklung einer schaltbaren Protease und eines fluoreszenten Reporters mittels Inteinkassetten“*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)