

**STRUKTUR- UND
FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN AN DER
ERSTEN NUKLEOTIDBINDENDEN DOMÄNE
VON CFTR**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

**von
Dipl. Chem. Horst Flathmann
geboren am 29.10.1968 in Gnarrenburg**

1999

Referent:

Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler

Korreferent:

Priv. Doz. Dr. Heinrich-Hubert Thole

Tag der Promotion:

19. Mai 1999

DANKSAGUNGEN

Diese Arbeit wurde an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Klinischen Forschergruppe „Molekularpathologie der Mukoviszidose“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank nicht nur für die Überlassung des Themas sondern auch für die exzellente wissenschaftliche Betreuung.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt danke ich für die finanzielle Förderung sowie Herrn Prof. Dr. Wilfried Bautsch und Herrn Prof. Dr. Volkhard Kaefer für die aufmerksame und fachliche Kobetreuung.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe sei für die einzigartige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima gedankt. Ganz besonders danke ich Frau Julia Clemens, Frau Dr. Annette Demmer, Frau Dr. Claudia Spangenberg, Herrn Dipl. Biochem. Lutz Wiehlmann und Frau Dipl. Biochem. Frauke Mekus für wissenschaftliche Hilfestellungen und für ihre stets offene Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für biophysikalische Chemie, insbesondere

Herrn Priv. Doz. Dr. Claus Urbanke für die Durchführung der analytischen UZ-Messungen,

Frau Dr. Gabriele Möller für die Überlassung von aufgereinigten RecA-Präparationen, Frau Dr. Ute Curth und Herrn Dr. Joachim Greipel für die Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen

und nicht zuletzt Frau Lidija Litz für Fermentationshilfe, Dialyseschläuche, Glycerin, Kaffee und gute Laune.

Ebenfalls besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud und Herrn Dr. Uwe Pieper für die Ermöglichung der Durchführung von CD-spektroskopischen und biochemischen Experimenten am Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Herrn Priv. Doz. Heinrich-Hubert Thole danke ich für die Aminosäuresequenzanalysen und für die Übernahme des Korreferats.

Vielen Dank an Herrn Priv. Doz. Dr. Karl Kunzelmann für die freundliche Überlassung der CFTR-cDNA.

Für die bereitwillige Unterstützung und viele fachübergreifende Diskussionen sei insbesondere Herrn Dr. Andreas Kiewitz sowie Herrn Dr. Wolfgang Küster, Herrn Dr. Reinhard Sokolowski und Herrn Dr. Holger Wesche gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Erbkrankheit Mukoviszidose / Cystische Fibrose	1
1.2 Das <i>CFTR</i>-Gen	2
1.3 Struktur und Funktion von <i>CFTR</i>	4
1.3.1 <i>CFTR</i> als Mitglied der ABC-Transporterfamilie	4
1.3.2 <i>CFTR</i> als ATP-regulierter Chloridkanal	6
1.3.3 Die pleiotropen Funktionen von <i>CFTR</i>	7
1.3.4 Einfluß der Mutation $\Delta F508$ auf die Proteinreifung von <i>CFTR</i>	10
1.4 Problemstellung und Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Eu- und prokaryontische Zellen	13
2.2.1 <i>Sf9</i> -Zellen	13
2.2.1.1 Zellkultur	13
2.2.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	14
2.2.1.3 Einfrieren und Lagern von <i>Sf9</i> -Zellen	14
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	14
2.2.2.1 Nährmedien	14
2.2.2.2 Bestimmung des Zellwachstums	15
2.2.2.3 Einfrieren und Lagern von <i>E. coli</i>	15
2.3 Präparation und Analyse von DNA	16
2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	16
2.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	16
2.3.3 Agarosegelelektrophorese	17
2.3.3.1 Analytischer Maßstab	17
2.3.3.2 Präparativer Maßstab	18
2.3.4 DNA-Sequenzierung	18
2.4 PCR-Expressionsklonierung	18
2.4.1 PCR-Amplifikation	19
2.4.2 Restriktionsverdau von amplifizierten PCR-Produkten und Vektoren	20
2.4.2.1 <i>Insert</i> -Präparation	20
2.4.2.2 Rahmenpräparation	20
2.4.3 Ligation	20

2.4.4	Transformation durch Elektroporation.....	21
2.4.5	Kolonie-PCR: Prüfung auf positive Klone.....	22
2.4.6	Überblick: Klonierte Vektoren für die Proteinexpression.....	23
2.4.6.1	Baculovirus-Transfervektoren.....	23
2.4.6.2	Expressionsvektoren für <i>E. coli</i>	24
2.5	Proteinexpression in Sf9-Zellen	25
2.5.1	Kotransfektion.....	25
2.5.2	Virustiterbestimmung.....	26
2.5.3	Proteinexpression und Zellernte.....	27
2.6	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	27
2.7	Proteinaufreinigung	28
2.7.1	GST-Fusionsproteine aus Sf9-Zellen.....	29
2.7.2	GST-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i>	29
2.7.3	MBP-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i>	30
2.7.3.1	De- und Renaturierung aufgereinigter MBP-Fusionsproteine	30
2.7.4	Spaltung von Fusionsproteinen mit Faktor X _A und Thrombin.....	31
2.7.5	Ionenaustauschchromatographie mittels FPLC.....	32
2.7.6	Dialyse.....	32
2.8	Proteinbestimmung	33
2.8.1	Nach Bradford	33
2.8.2	UV-Absorptionsmessung	33
2.9	SDS-PAGE	34
2.10	N-terminale Sequenzierung nach Edman	36
2.11	Bestimmung der ATPase Aktivität	37
2.11.1	Enzymgekoppelter LDH/PK-Test	37
2.11.2	Hydrolyse von [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP	38
2.12	ATP-Bindungstests	39
2.12.1	Fluoreszenztitration mit TNP-ATP	39
2.12.2	Bindung auf Nitrocellulosemembran	39
2.13	Analytische Ultrazentrifugation (UZ)	40
2.13.1	Kosedimentation mit TNP-ATP	40
2.13.2	Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten	40
2.13.3	Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens.....	43
2.13.4	Umrechnung von Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten auf 20 °C.....	44
2.13.5	Berechnung theoretischer Mindestmolekulargewichte	44
2.14	Circulardichroismus (CD)	45
2.14.1	Darstellung von CD-Spektren	46
2.14.2	Berechnung von Sekundärstrukturanteilen	46

3	ERGEBNISSE	48
3.1	Überblick: Klonierte NBD1-Konstrukte	48
3.2	Proteinexpression und -aufreinigung von NBD1-Fusionsproteinen	50
3.2.1	GST-NBD1(R347-A596) aus <i>Sf9</i> -Zellen	50
3.2.2	GST-NBD1 aus <i>E. coli</i>	52
3.2.2.1	GST-NBD1(T351-S589)	52
3.2.2.2	N-terminal verkürzte GST-NBD1-Konstrukte	54
3.2.3	MBP-NBD1(N386-F650) aus <i>E. coli</i>	55
3.2.3.1	Expression und Aufreinigung	55
3.2.3.2	Bindung, Identifizierung und Entfernung von GroEL und DnaK	57
3.2.4	Präzipitation nach Faktor X _A - und Thrombinverdau	59
3.3	Biochemische Untersuchungen	60
3.3.1	Bestimmung der intrinsischen ATPase Aktivität	60
3.3.2	ATP-Bindung	63
3.4	Biophysikalische Untersuchungen	67
3.4.1	Analytische UZ-Experimente	67
3.4.1.1	Nachweis von polydispersen MBP-NBD1-Aggregaten	67
3.4.1.2	Partielle Aggregatauflösung durch SDS	68
3.4.1.3	Aggregatauflösung durch De- und Renaturierung	69
3.4.2	CD-spektroskopische Untersuchungen	73
3.4.2.1	Vergleich von wt- und Δ F508-MBP-NBD1	73
3.4.2.2	Einfluß von SDS auf die Sekundärstruktur	74
3.4.2.3	De- und renaturierte Proteine	75
3.4.2.4	Berechnete Sekundärstrukturanteile	77
4	DISKUSSION	81
4.1	Expression und Aufreinigung der NBD1	81
4.2	ATP-Bindung und -Hydrolyse	88
4.3	Das Phänomen der Polydispersität	95
4.4	Sekundärstrukturanalysen	100
4.5	Vergleich mit NBD1-Strukturmodellen	104
4.6	Implikationen für die Ätiologie der Mukoviszidose	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	ABSTRACT	113
7	LITERATUR	116
	ANHANG	i-viii

ABKÜRZUNGEN

ad	auffüllen auf
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Rinderserumalbumin
CMC	kritische Mizellenkonzentration
CD	Circulardichroismus
CF	Cystische Fibrose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GSH	Glutathion, reduziert
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IBs	<i>inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MBP	Maltose bindendes Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MMW	<i>mid range protein molecular weight marker</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NBD	nukleotidbindende Domäne
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pS	pico-Siemens
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R-Domäne	regulatorische Domäne
RB	<i>rich broth</i>
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg [= 10 ⁻¹³ sec]
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SNAP	Synaptosomen assoziiertes Protein
SV	Säulenvolumen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TBE	Tris / Borat / EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TM	Transmembrandomäne
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol (=Tris[hydroxymethyl]aminomethan)
TNP-ATP	2'(oder 3')-O-(2, 4, 6-Trinitrophenyl) Adenosin 5'-Triphosphat
UZ	Ultrazentrifuge, Ultrazentrifugation
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ERBKRAKHEIT MUKOVISZIDOSE / CYSTISCHE FIBROSE

Die Mukoviszidose oder Cystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit der eurokaukasischen Bevölkerung. Die Häufigkeit bezogen auf die Anzahl der Lebendgeburten beträgt 1/2000 bis 1/2500 in der weißen [Davis *et al.*, 1983], ca. 1/17000 in der schwarzen [Kulczycki und Schauf, 1974] und ca. 1/90000 in der asiatischen Bevölkerung [Wright und Morton, 1968]. Etwa jeder zwanzigste bis dreißigste Deutsche ist heterozygoter Erbträger der Krankheit.

Das Krankheitsbild der Mukoviszidose entsteht durch eine Funktionsstörung der exokrinen Drüsen. Diese produzieren ungewöhnlich wasserarme Sekrete, was zur Verstopfung und Entzündung bis hin zum Ausfall der betroffenen Organe führen kann. Die folgenden CF-typischen Symptome können beobachtet werden:

- verminderte Selbstreinigung des Bronchialepithels; Folgen: Besiedlung der Lunge mit Bakterien, Atemnot, Lungenherz
- exokrine Pankreasinsuffizienz
- Darmverschluss (Mekoniumileus) bei etwa 10 % der Neugeborenen
- Stauung der Gallenflüssigkeit (Cholestase), primäre biliäre Leberzirrhose
- Bildung von Nasalpolypen
- Sterilität beim Mann durch Nichtanlage [Kaplan *et al.*, 1968] bzw. Obstruktion [Gaillard *et al.*, 1997] des Vas deferens
- verminderte Fertilität der Frau durch erhöhte Viskosität des Zervikalschleims
- erhöhte Kochsalzkonzentration im Endschweiß (CF: > 60 mM; gesund: 15-30 mM)

Als besonders problematisch erweisen sich die kaskadenartigen Pathomechanismen in der Lunge. Sie stellen bei der Mehrzahl der CF-Patienten die primäre Todesursache dar [Fitzsimmons, 1993; *The Cystic fibrosis foundation*, 1995]. Das Bronchialepithel ist aufgrund der gestörten mukoziliären Selbstreinigung anfällig für Virusinfektionen, wodurch Schleimhautveränderungen hervorgerufen werden. Dies führt zu einer Besiedlung der Lunge mit Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Im weiteren Verlauf der Krankheit wird die Bakterienbesiedlung chronisch. Die körpereigene Immunreaktion gegen diese Erreger [z. B. Tsao *et al.*, 1998] zerstört zunehmend die Struktur des Lungengewebes, bis schließlich ein Gasaustausch nicht mehr gewährleistet ist. Therapeutisch wird dieser Problematik auf verschiedene Weise begegnet. Zur regelmäßigen Entfernung des viskosen Bronchialsekrets kommen Physio- und Inhalationstherapie zur Anwendung. Impfungen und die Gabe von Antibiotika helfen, den Beginn der chronischen Besiedlung zu verzögern.

Aufgrund der Verbesserung solcher konventioneller Behandlungsmethoden ist das durchschnittliche Lebensalter von CF-Patienten mit 18 (anno 1976) auf heute etwa 30 Jahre deutlich gestiegen. Die Entdeckung des *CFTR*-Gens im Jahre 1989 (s. unten) trug zu einem besseren Verständnis der Krankheit bei und konnte der Diagnostik und Therapie neue Impulse geben.

1.2 DAS *CFTR*-GEN

Untersuchungen von Knowles *et al.* [1981 und 1983], Quinton [1983] sowie Quinton und Bijman [1983] ergaben, daß in Epithelzellen von CF-Patienten die Chloridleitfähigkeit gestört ist. Versuche, das dafür verantwortliche Protein zu isolieren, schlugen jedoch fehl. Mittels positioneller Klonierung [Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989] gelang es schließlich, einen ca. 250 kbp großen DNA-Abschnitt zu identifizieren, dessen 27 Exons für ein 1480 Aminosäuren großes Protein codieren [Riordan *et al.*, 1989]. Aufgrund folgender Kriterien wurde angenommen, daß das betreffende Gen mit der Mukoviszidose assoziiert war:

- es befand sich in der erwarteten Kandidatengenregion auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (q31.1)
- die Transkription des Genprodukts (Northernblotanalyse) war gewebespezifisch für die betroffenen Organe (Lunge, Pankreas, Darm, Schweißdrüse, ...)
- bei CF-Patienten wurde auf DNA-Ebene eine 3 bp-Deletion gefunden, die im exprimierten Protein zu einer Deletion der Aminosäure Phenylalanin an der Position 508 führt ($\Delta F508$) und offensichtlich die Funktionsstörung auslöst.

Aufgrund seiner vermuteten Rolle die Ionenleitfähigkeit der Zellmembran regulatorisch zu beeinflussen, wurde das Genprodukt als Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) bezeichnet. Nachfolgende biochemische Untersuchungen bestätigten dies experimentell. So zeigten Drumm *et al.* [1990] und Rich *et al.* [1990], daß die gestörte Chloridleitfähigkeit $\Delta F508$ homozygoter CF-Epithelzellen nach Transfektion und Expression von nicht mutierter *CFTR*-cDNA aufgehoben werden kann. Diese Befunde initiierten die Erforschung und Entwicklung gentherapeutischer Ansätze zur Behandlung der Mukoviszidose. Dabei wird angestrebt, auf analoge Weise den genetischen Defekt *in vivo* durch Einschleusung des gesunden *CFTR*-Gens in (respiratorische) Epithelzellen von CF-Patienten zu kompensieren. Bis zu diesem Zeitpunkt ist es jedoch weder mittels modifizierter Adenoviren noch durch Liposomentransfektion gelungen, erfolgreiche routinemäßige Anwendungen zu etablieren [Überblick: Middleton und Alton, 1998; Jang und Engelhardt, 1998].

Mit der Entdeckung des *CFTR*-Gens erweiterte sich die klassische (z. B. Schweißtest = Pilocarpin-Iontophorese) um die unter anderem auch pränatal Anwendung findende molekulargenetische Diagnostik, bei der nach CF-verursachenden Mutationen gesucht

wird. Mittlerweile sind davon mehr als 800 bekannt [*The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* 1998]. Am häufigsten ist die Mutation $\Delta F508$ mit einem Anteil von ca. 70 % bei eurokaukasischen CF-Patienten anzutreffen. Als mögliche Ursachen für das vergleichsweise häufige Auftreten der Mutation $\Delta F508$ werden unter anderem ein Reproduktionsvorteil [Dahl *et al.*, 1998] und eine erhöhte Resistenz gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen bei heterozygoten Erbträgern [z. B. Field und Semrad, 1993; Gabriel *et al.*, 1994] diskutiert. Nach genetischen Kopplungsanalysen von Morral *et al.* [1993 und 1994] soll die Entstehung der Mutation $\Delta F508$ auf ein einmaliges Ereignis in der Altsteinzeit um 50000 Jahre v. Chr. zurückzuführen sein. Im Zuge von Völkerwanderungen soll sich dann die Mutation vom mittleren Osten in den nordwesteuropäischen Raum bis zur heutigen Verteilung ausgebreitet haben. Slatkin und Rannala *et al.* [1997] schätzen im Gegensatz zu Morral *et al.* [s. oben] den chronologischen Ursprung der Mutation auf etwa 1000 bis 3000 Jahre v. Chr. ab.

In Deutschland machen weitere Mutationen (unter anderem R347P, G542X, G551D, R553X, N1303K, 3849+10kb C→T, CFTR del Ex 2,3(21kb)) weniger als 10 % aus [Tümmler *et al.*, 1996; persönliche Mitteilung von Frau Dipl. Biochem. Frauke Mekus und Herrn Doktor Thilo Dörk]. Die meisten anderen Mutationen im *CFTR*-Gen treten nur sporadisch auf.

Obwohl es sich bei der Mukoviszidose um eine monogene Erbkrankheit handelt, resultiert aus einem gegebenen Genotyp nicht immer derselbe Phänotyp. So ist bei $\Delta F508$ -homozygoten CF-Patienten eine große Bandbreite in der klinischen Ausprägung der Krankheit zu beobachten [Johannsen *et al.* 1991; Lester *et al.* 1994]. Dies kann nicht ausschließlich auf den Einfluß unterschiedlicher Umweltfaktoren zurückgeführt werden. Es wird daher vermutet, daß weitere Gene die Krankheit zu modulieren vermögen [Fislage, 1994; Mekus, 1999].

1.3 STRUKTUR UND FUNKTION VON CFTR

1.3.1 CFTR ALS MITGLIED DER ABC-TRANSPORTERFAMILIE

Basierend auf Homologieuntersuchungen und Hydrophobizitätsplots nach Kyte und Doolittle [1982] schlugen Riordan *et al.* [1989] ein topologisches Modell für CFTR vor. Demnach handelt es sich um ein Membranprotein aus der *ATP-Binding-Cassette*-(ABC)-Transporterfamilie, das aus

- zwei cytosolisch lokalisierten nukleotidbindenden Domänen (NBD1 und 2),
- einer cytosolisch lokalisierten regulatorischen Domäne (R-Domäne) und
- zwei Transmembrandomänen mit jeweils sechs membranüberspannenden α -Helices

besteht (Abbildung 1-1). *In vivo* wird CFTR vorwiegend in Epithelzellen exprimiert und zur Apikalmembran transloziert [Denning *et al.*, 1992b]. Das prozessierte Protein ist in der vierten extrazellulären Schleife zweifach N-glykosyliert und weist ein Molekulargewicht von 190 kDa auf.

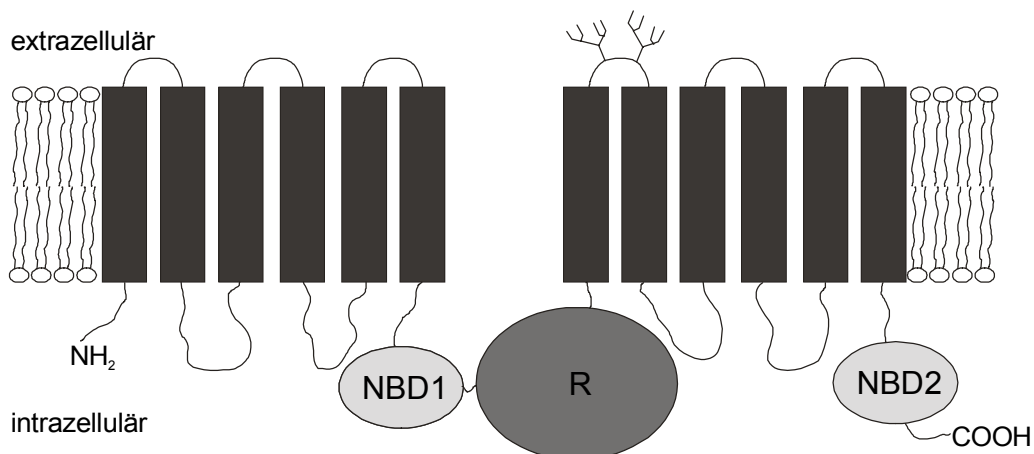


Abbildung 1-1: Topologisches Modell für CFTR

Transmembranhelices: schwarzgrau, nukleotidbindende Domänen (NBD) 1 und 2: hellgrau, regulatorische (R)-Domäne: mittelgrau, schematische Kennzeichnung der beiden N-Glykosylierungsstellen in der vierten extrazellulären Schleife.

Die dargestellte Topologie von CFTR folgt mit Ausnahme der R-Domäne dem prinzipiellen Aufbau von Proteinen der ABC-Transporterfamilie. ABC-Transporter sind in Archaeobakterien sowie in Eu- und Prokaryonten zu finden. In letzteren werden die Domänen oftmals auf getrennten Genabschnitten codiert und bilden erst am Zielort den funktionellen ABC-Transporterkomplex. ABC-Transporter zeichnen sich dadurch aus, daß sie auf ATP-abhängige Weise Substrate wie Aminosäuren, Peptide, Zucker, Lipide und Zytostatika durch die Zellmembran transportieren können [Überblick: Higgins, 1992; Nikaido und Hall, 1998]. In Tabelle 1-1 sind exemplarisch einige ABC-Transporter und deren Funktionen aufgeführt.

Tabelle 1-1: Auswahl einiger pro- und eukaryontischer ABC-Transporter

ABC-Transporter	Spezies	Funktion	Referenz
P-Glykoprotein Pgp, MDR1	Mensch	Zytostatika-, Lipid- export	Shapiro und Ling [1998]
MRP	Mensch	Zytostatika-, GSH- konjugatexport	Cole und Deeley [1998]
Sulfonylharnstoff- Rezeptor SUR1	Mensch	Beteiligung an Insulinsekretion	Aguilar-Bryan <i>et al.</i> [1995]
Transporter antigener Peptide TAP1/2	Mensch	Antigenpeptidimport ins ER	Momburg und Hämmerling [1998]
Hefe Cadmium Faktor YCF1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cadmiumresistenz	Li <i>et al.</i> [1996]
Histidin-Permease His (J)QMP ₂	<i>Salmonella typhimurium</i>	Histidinimport	Liu und Ames [1998]
Maltose-Transporter Mal (E)FGK ₂	<i>Escherichia coli</i>	Maltoseimport	Ehrmann <i>et al.</i> [1998]

Charakteristisch für alle ABC-Transporter sind die nukleotidbindenden Domänen (NBDs). Sie umspannen jeweils einen Bereich von etwa 200 vorwiegend hydrophilen Aminosäuren. Neben dem für ABC-Transporter diagnostischen „LSGGQ“-Motiv (syn. Motiv C) [Higgins, 1992] enthält jede NBD evolutionär hochkonservierte Aminosäuresequenzen, die an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind. Diese Schlüsselsequenzen werden als Walkermotive A und B [Walker *et al.*, 1982] bezeichnet und sind auch bei anderen ATP-bindenden und -hydrolysierenden Proteinen zu finden. Tabelle 1-2 illustriert die hohe Identität der Aminosäuren in den genannten Motiven bei ABC-Transportern.

Tabelle 1-2: Vergleich hochkonservierter Aminosäuresequenz-Motive in den nukleotidbindenden Domänen verschiedener ABC-Transporter

nukleotidbindende Domäne (NBD)	Sequenzmotiv		
	Walker A ¹⁾	„LSGGQ“ ²⁾	Walker B
CFTR NBD1	GSTGAGKTS	LSGGQ	LYLLDS
CFTR NBD2	GRTGSGKST	LSHGH	ILLLDE
Pgp NBD1	GNSGCGKST	LSGGQ	ILLLDE
Pgp NBD2	GSSGCGKST	LSGGQ	ILLLDE
TAP1	GPNGSGKST	LSGGQ	VLILDD
TAP2	GPNGSGKST	LAAGQ	VLILDE
His P	GSSGSGKST	LSGGQ	VLLFDE

¹⁾ syn. P-loop; Konsensussequenz: GX₄GK(S/T) ²⁾ syn. linker-Peptid; Signaturmotiv oder Motiv C

Zusätzlich existieren noch weitere Aminosäure-Sequenzen, die innerhalb der NBDs hochkonserviert sind. So befindet sich die Aminosäure F508 von CFTR, dessen Deletion phänotypisch zum CF-Krankheitsbild führt, in einem als Zentralregion oder Motiv D [Bianchet *et al.*, 1997] bezeichneten Abschnitt (TIKENIIF) in der NBD1.

Offensichtlich liegt bei ABC-Transportern stets das gleiche mechanistische Prinzip zugrunde, nach dem über ATP-Bindung und -Hydrolyse an den NBDs die freiwerdende Energie mit dem Transport des Substrats gekoppelt wird. Diese besondere Eigenschaft erlaubt die Beförderung des Substrats entgegen eines Konzentrationsgradienten. An der Energiekopplung oder -übertragung scheint das „LSGGQ“-Motiv maßgeblich beteiligt zu sein.

1.3.2 CFTR ALS ATP-REGULIERTER CHLORIDKANAL

Untersuchungen sowohl nach Überexpression in verschiedenen eukaryontischen Zellen (Oocyten aus *Xenopus laevis*, CHO-, Sf9-Zellen, ...) als auch am aufgereinigten, in planaren Lipiddoppelschichten rekonstituierten Protein [Bear *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Ramjeesingh *et al.*, 1997] ergaben, daß es sich bei CFTR um einen Chloridkanal handelt, der durch die folgenden elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert ist:

- lineare Strom/Spannungskennlinie
- geringe Leitfähigkeit von 7-10 pS
- Phosphorylierung und Aktivierung vorwiegend durch cAMP-abhängige Proteinkinase A und Proteinkinase C [Überblick: Sheppard und Welsh, 1999]
- Deaktivierung durch Proteinphosphatasen PP2A und PP2C
- Mg²⁺/ATP-abhängige Kanalregulation
- Anionenpermeabilität: Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > F⁻

Innerhalb der ABC-Transporterfamilie nimmt das Protein offensichtlich eine Sonderstellung ein, da es nicht als ATP-getriebene „Pumpe“, sondern als ATP-regulierter Chloridkanal fungiert und somit einen Transport des Substrates durch die Zellmembran in beide Richtungen zuläßt, sofern dies entlang des Konzentrationsgradienten möglich ist. Zudem stellt die etwa 300 Aminosäuren umfassende regulatorische R-Domäne in dieser Ausdehnung unter ABC-Transportern eine Ausnahme dar.

Der Mechanismus der Kanalregulation besteht aus einem komplizierten Wechselspiel zwischen den einzelnen CFTR-Untereinheiten und ist im Detail nicht vollständig geklärt. Verschiedenen Modellen [Gadsby und Nairn, 1994; Carson *et al.*, 1995; Gunderson und Kopito, 1995; Überblick: Sheppard und Welsh 1999] liegt die Gemeinsamkeit zugrunde, daß zunächst für die Aktivierung von CFTR die R-Domäne, in der mehrere Phosphorylierungsstellen für cAMP-abhängige PKA und PKC enthalten sind, phosphoryliert werden muß [Berger *et al.*, 1993; Winpenny *et al.*, 1995]. Ebenso wurde eine Phosphorylierung und Aktivierung durch cGMP-abhängige Proteinkinase cGK (Typ II) gezeigt [Vaandrager *et al.*, 1998]. Die von einigen Autoren vermutete [Illek *et*

al., 1995; Lehrich und Forrest, 1995] und nachgewiesene [Fischer und Machen, 1996] Aktivierung von CFTR durch Tyrosin-Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert [French *et al.*, 1997; Weinreich *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998]. In jedem Fall kann erst nach erfolgter Phosphorylierung die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanalpore in Abhängigkeit von ATP-Bindung und -Hydrolyse über die beiden nukleotidbindenden Domänen NBD 1 und 2 reguliert werden. Eine Deaktivierung der Kanalaktivität erfolgt durch Dephosphorylierung der R-Domäne unter anderem durch die Proteinphosphatasen PP2A und PP2C [Travis *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1998].

1.3.3 DIE PLEIOTROPEN FUNKTIONEN VON CFTR

Neueren Untersuchungen zufolge besitzt CFTR vielfältige Eigenschaften. So vermag es neben Chlorid nicht nur weitere Substrate (unter anderem Glutathion, organische Anionen und neutrale Aminosäuren) durch die Zellmembran zu transportieren, sondern kann überdies offensichtlich regulatorische Funktionen auf andere Ionenkanäle ausüben [Überblick: Schwiebert *et al.*, 1999]. Zudem wurden Protein/Protein-Wechselwirkungen mit Syntaxin 1A und mit dem ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) bindenden Phosphoprotein EBP 50 gezeigt. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit sind auf der nachfolgenden Seite in Tabelle 1-3 einige vermutete (regulatorische) Funktionen und Wechselwirkungspartner von CFTR aufgeführt.

Die Annahmen eines regulatorischen Einflusses von CFTR auf andere Ionenkanäle basieren vorwiegend auf elektrophysiologischen Untersuchungen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen auf Proteinebene steht noch aus. So ist eine Wechselwirkung zwischen CFTR und dem auswärts gerichteten Chloridkanal (*outwardly rectifying chloride channel* ORCC) schon seit langem bekannt [Welsh *et al.*, 1990]. Der ORCC besitzt im Vergleich zu CFTR eine bedeutend höhere Ionenleitfähigkeit von 30 bis 70 pS. Er wurde jedoch bis dato noch nicht molekular charakterisiert oder kloniert. Insbesondere der CFTR-vermittelte Export von ATP und die damit verbundene Aktivierung des ORCC über einen autokrinen Mechanismus durch Bindung von ATP an den purinergen Rezeptor P_{2U} [Schwiebert *et al.*, s. obige Tabelle] ist Gegenstand kontrovers geführter Diskussionen, da der ATP-Export durch CFTR von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnte [Reddy *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996]. Als Lösung für diesen Widerspruch diskutieren Sugita *et al.* [1998] einen möglichen regulatorischen Einfluß von CFTR auf einen noch unbekanntem ATP-Transporter.

Tabelle 1-3: Einige vermutete Funktionen und Wechselwirkungspartner von CFTR

Funktion / Wechselwirkungspartner	Referenz
Regulation des auswärts gerichteten Chloridkanals (<i>outwardly rectifying chloride channel</i> ORCC)	Gabriel <i>et al.</i> [1993] Jovov <i>et al.</i> [1995]
Regulation von ORCC durch ATP-Export und Bindung von ATP an den purinergen Rezeptor P _{2U}	Reisin <i>et al.</i> [1994] Schwiebert <i>et al.</i> [1995 und 1998] Cantiello [1998]
Regulation des epithelialen Natriumkanals ENaC	Stutts <i>et al.</i> [1997] Briel <i>et al.</i> [1998]
Regulation des renalen Kaliumkanals (ROMK2)	McNicholas <i>et al.</i> [1996] Ho [1998]
Regulation endogener Kanäle in Oocyten von <i>Xenopus laevis</i>	Mall <i>et al.</i> [1996b] Kunzelmann <i>et al.</i> [1997b] Schreiber <i>et al.</i> [1997]
Beeinflussung des Ionenmilieus intrazellulärer Kompartimente	Biwersi und Verkman [1994] Seksek <i>et al.</i> [1996]
Transport von Glutathion (und anderen großen organischen Anionen)	Linsdell und Hanrahan [1998a und b]
Ausbildung des Phänotyps der <i>multidrug</i> -Resistenz	Wei <i>et al.</i> [1995]
Beteiligung an der Apoptose	Gottlieb und Dosanjh [1996]
CFTR als Rezeptor für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Salmonella typhimurium</i>	Pier <i>et al.</i> [1997 und 1998]
Bindung von EBP-50 über die C-terminale Aminosäuresequenz DTRL	Short <i>et al.</i> [1998] Wang <i>et al.</i> [1998]
Bindung von Syntaxin 1A am N-Terminus von CFTR	Naren <i>et al.</i> [1997 und 1998]

Beim epithelialen Natriumkanal ENaC ist eine Interaktion mit CFTR nicht nur elektrophysiologisch in der Zelle, sondern auch im *Yeast-two-hybrid*-System [Kunzelmann *et al.*, 1997a] und an in planaren Lipiddoppelschichten rekonstituierten Proteinen [Ismailov *et al.*, 1996] nachgewiesen worden. CFTR reduziert drastisch den ENaC-vermittelten, amiloridsensitiven Natriumeinstrom in die Zelle (beide Kanäle sind unabhängig voneinander cAMP aktivierbar). Diese Tatsache könnte erklären, warum in respiratorischen Epithelzellen von CF-Patienten, in denen die Funktion von CFTR gestört ist, nicht nur eine verminderte Chloridsekretion, sondern auch eine erhöhte Natriumabsorption beobachtet wird [Quinton, 1990; s. auch Mall *et al.*, 1996a].

Die Wechselwirkung zwischen CFTR und dem renalen, aus der K_{ir}-Familie (K_{ir} = *inwardly rectifying potassium channel*) stammenden Kaliumkanal ROMK2 (K_{ir} 1.1b) läßt eine interessante Parallele zu K_{ATP}-Kanälen in β -Zellen im Pankreas erkennen. K_{ATP}-Kanäle bestehen aus einem Komplex der einwärts gerichteten Kaliumpore K_{ir} 6.2 und dem ABC-Transporter SUR1 (Tabelle 1-1), wobei letzterer die Sensitivität des Komplexes gegenüber ATP und Glibenclamid vermittelt. Ein analoger, ebenfalls modulierender (wenn auch

schwächerer) Effekt konnte elektrophysiologisch von McNicholas *et al.* [1996] für CFTR bei Koexpression mit ROMK2 in Oocyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* gezeigt werden. In diesem Zusammenhang demonstrierten einige Autoren, daß CFTR offensichtlich auch regulatorische Einflüsse auf endogen exprimierte Ionenkanäle von *Xenopus laevis*-Oocyten ausübt. So werden Calcium-aktivierbare Chloridleitfähigkeiten inhibiert [Kunzelmann *et al.*, 1997b] bzw. Wasserkanäle [Schreiber *et al.*, 1997] und Chromanol-inhibierbare Kaliumkanäle aktiviert [Mall *et al.*, 1996b]. Darüberhinaus wird eine CFTR-vermittelte Veränderung des Ionenmilieus intrazellulärer Kompartimente, wie Golgi-Apparat, Prälysosomen und Endosomen [Barasch *et al.*, 1991; Biversi und Verkman, 1994; Seksek *et al.*, 1996] kontrovers diskutiert.

Für die Klinik als bedeutsam mag sich die von Linsdell und Hanrahan [s. obige Tabelle] elektrophysiologisch untersuchte, CFTR-vermittelte Permeabilität der Zellmembran für Glutathion herausstellen. Glutathion ist ein wichtiges extrazelluläres Antioxidans im Respirationstrakt [Cantin *et al.*, 1987; van Klaveren *et al.*, 1997]. Tatsächlich ist bei CF-Patienten die extrazelluläre Glutathionkonzentration im Vergleich zu gesunden Menschen drastisch reduziert [Roum *et al.*, 1993]. Das Phänomen ließe sich somit durch eine gestörte Transportfunktion von CFTR erklären. Diesbezüglich wird als neuartiger Therapieansatz die Inhalation von reduziertem Glutathion diskutiert. Neben dem Transport organischer Anionen ist eine Beteiligung von CFTR am Efflux neutraler Aminosäuren von Rotoli *et al.* [1994] beschrieben worden.

Die Protein-Interaktion sowohl mit Syntaxin 1A am N-Terminus als auch mit EBP-50 (ERM bindendes Phosphoprotein 50) am C-Terminus liefern erste Anhaltspunkte dafür, daß CFTR in der Apikalmembran von Epithelzellen in einem Multiproteinkomplex vorliegen muß. Syntaxin 1A ist Bestandteil des an der Exocytose sekretorischer Vesikel beteiligten SNAP-Rezeptor (SNARE)-Komplexes [z. B. Weber *et al.*, 1998] und inhibiert die cAMP abhängige Translokation von CFTR zur Zellmembran sowie dessen cAMP abhängige Chloridleitfähigkeit. Gemäß Naren *et al.* [1998] könnte Syntaxin 1A zur Verankerung von CFTR in der Plasmamembran beitragen und an der Regulation der Endo- und Exocytose von CFTR beteiligt sein. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang auch der möglicherweise durch den trans-SNARE-Komplex koordinierte lokale Calciumioneneinstrom über die Zellmembran in das Cytoplasma [Peters und Mayer, 1998], wodurch die Membranfusion ausgelöst wird. EBP-50 enthält zwei PDZ-Domänen (PDZ1 und 2; PDZ = *postsynaptic density 95, disc large, zonula-occludens*-Domänen). PDZ-Domänen besitzen die Eigenschaft, an C-Termini von Ionenkanälen spezifisch zu binden [Überblick: Kim, 1997]. EBP-50 wechselwirkt über seine PDZ1-Domäne mit der C-terminalen DTRL-Sequenz von CFTR. Desweiteren enthält EBP-50 am C-Terminus eine Ezrin-Bindungsstelle [Reczek *et al.*, 1997]. Ezrin ist ein mit dem Aktingerüst verbundenes cAMP-abhängiges Proteinkinase-Ankerprotein [Dransfield *et al.*, 1997]. Auf diese Weise könnte CFTR einerseits am Zellgerüst fixiert sein und andererseits mit Proteinkinase A in Wechselwirkung treten, wodurch die für die Aktivierung des Chloridkanals benötigte Phosphorylierung der R-Domäne begünstigt ist [Short *et al.*, 1998].

1.3.4 EINFLUSS DER MUTATION $\Delta F508$ AUF DIE PROTEINREIFUNG VON CFTR

Cheng *et al.* [1990] und Gregory *et al.* [1991] demonstrierten, daß in COS-Zellen exprimiertes $\Delta F508$ -CFTR nach Translation und Einschleusung in das endoplasmatische Retikulum (ER) nur eine Modifikation durch Übertragung der Kernoligosaccharide erfährt, während eine weitere Prozessierung des Proteins ausbleibt. Die komplexe Glykosylierung durch Enzyme des Golgi-Apparates und die anschließende Translokation des Proteins an die Zielmembran wurde nur für wt-CFTR beobachtet. Der fast quantitative Reifungsdefekt der Mutante $\Delta F508$ -CFTR konnte in anderen heterologen Expressionssystemen bestätigt werden [Dalemans *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1993a; Lukacs *et al.*, 1994; Pind *et al.*, 1994].

Offensichtlich ist die Prozessierungsrate auch für wt-CFTR im überexprimierenden System äußerst gering. Unmittelbar nach Neusynthese werden 50-80 % wt- bzw. > 99 % $\Delta F508$ -CFTR mit einer Halbwertszeit von nur 30 Minuten abgebaut [Ward und Kopito, 1994]. Involviert sind das lektinartige Calnexin und das cytosolische Hitzeschockprotein Hsp70, welche durch ATP-Umsatz einen geringen Teil des wt-Proteins in eine faltungskompetente proteaseresistente Konformation überführen und dessen Prozessierung in den Golgi-Apparat erlauben. Bei $\Delta F508$ -CFTR bleiben die Faltungshelferenzyme (Chaperone) jedoch assoziiert [Yang *et al.*, 1993b; Pind *et al.*, 1994] und führen zur Polyubiquitinierung und Degradation der Mutante durch den 26 S-Proteasomkomplex [Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995]. Neueren Untersuchungen zufolge scheint die Polyubiquitinierung bereits während der Elongation der Polypeptidkette stattzufinden [Sato *et al.*, 1998]. Auf welche Weise das Protein vom ER zum cytosolischen Proteasomkomplex gelangt, ist noch unklar.

Desweiteren übt die Temperatur im überexprimierenden System einen starken Einfluß auf den Reifungsprozeß aus. So ist eine Aufhebung des Prozessierungsdefektes von $\Delta F508$ -CFTR zur Apikalmembran bei erniedrigten Kultivierungstemperaturen (24 bis 28 °C) möglich [Drumm *et al.*, 1991; Denning *et al.*, 1992; Lukacs *et al.*, 1993]. Bei $\Delta F508$ -CFTR handelt es sich demnach um eine temperatursensitive Mutante.

Im Vergleich zum Wildtyp äußert sich die Kanalaktivität von $\Delta F508$ -CFTR nach Drumm *et al.* [1991] weniger sensitiv gegenüber einer Stimulation durch Forskolin oder dem Phosphodiesterase-Inhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX). Außerdem wird eine verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit beschrieben [Dalemans *et al.*, 1991; Haws *et al.*, 1996]. Mall *et al.* [1996a] stellten fest, daß in *Xenopus laevis*-Oocyten exprimiertes $\Delta F508$ -CFTR den amiloridsensitiven ENaC-vermittelten Natriumeinstrom im Gegensatz zum Wildtyp nicht inhibiert. Nach Rekonstitution des Proteins in planaren Lipiddoppelschichten konnte dagegen kein signifikanter Unterschied in den elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen Wildtyp und Mutante gesehen werden [Li *et al.*, 1993].

Immunohistochemische Untersuchungen an Schweißdrüsen [Kartner *et al.*, 1992] und an submukösen Drüsen des Respirationstraktes von CF-Patienten [Engelhardt *et al.*, 1992] wiesen nach, daß der Reifungsdefekt offensichtlich auch bei endogener Expression von $\Delta F508$ -CFTR vorliegt. Aufgrund dieser Daten wird die molekulare Ursache der Cystischen

Fibrose bei $\Delta F508$ -homozygoten Patienten darin gesehen, daß $\Delta F508$ -CFTR im Gewebe einem defekten Reifungsprozeß unterliegt und nicht oder nur zu einem drastisch verminderten Anteil an die Apikalmembran transloziert wird. Als Folge davon kann das Protein seine Funktion als Regulator der Chloridleitfähigkeit nicht bzw. nur ungenügend erfüllen.

Kälin und Mitarbeiter wiesen jedoch in immunhistochemischen Untersuchungen an CF-Patientengewebe [Kälin, 1997; Kälin *et al.*, 1999] eine Translokation von $\Delta F508$ -CFTR gewebespezifisch nach. Während an der luminalen Oberfläche in Epithelzellen von Schweißdrüsen kein $\Delta F508$ -CFTR detektierbar war, konnten in der Apikalmembran von Epithelzellen in Darm und Respirationstrakt nicht unterscheidbare Mengen von Wildtyp und Mutante nachgewiesen werden. In diesem Fall läge die molekulare Ursache der Cystischen Fibrose bei $\Delta F508$ -homozygoten Patienten vielmehr in einer defekten Funktion des Proteins am Zielort.

1.4 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Über die dreidimensionale Struktur von CFTR sind bis heute keine Daten publiziert worden. Es besteht deshalb generell ein großes Interesse daran, mehr über die Struktur- und Funktionsbeziehungen von CFTR zu erfahren. Insbesondere für die zukünftige Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze ist es von essentieller Bedeutung, die Auswirkungen CF-verursachender Mutationen wie $\Delta F508$ auf die Konformation des Proteins besser zu verstehen. Da es sich bei CFTR um ein 190 kDa großes Transmembranprotein handelt, liegt jedoch ein methodisches Problem vor. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur durch Beugung von Röntgenstrahlen am Kristallgitter erfordert die Züchtung homogener Proteinkristalle, ein Unterfangen, das sich für Transmembranproteine als schwierig erweist. Mit den derzeit vorhandenen technischen Mitteln können NMR-spektroskopische Methoden aufgrund der Größe des Proteins keine Anwendung finden. Auch erfordern biochemische und biophysikalische Untersuchungen am isolierten Protein detaillierte Kenntnisse über die Aufreinigung, Solubilisierung und Rekonstitution von Transmembranproteinen und speziell für CFTR Erfahrungen im Umgang mit elektrophysiologischen Meßmethoden.

Ein Ansatz, Informationen über Struktur und Funktion des Proteins zu erhalten, besteht darin, die Untersuchung auf einzelne Domänen zu fokussieren. Als Protein der ABC-Transporterfamilie ist CFTR aufgrund seiner relativ eindeutig definierten Domänen (Abbildung 1-1) hierfür gut geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die erste nukleotidbindende Domäne (NBD1) von CFTR ausgewählt, da

- die häufigste CF-verursachende Mutation $\Delta F508$ in der NBD1 lokalisiert ist und geklärt werden sollte, ob die Mutation Veränderungen auf die Struktur und Funktion dieser Domäne bewirkt
- die NBD1 aufgrund ihrer Primärsequenz vorwiegend hydrophile Anteile enthält, cytosolisch lokalisiert ist (Abbildung 1-1) und damit als lösliches Protein leicht zugänglich sein sollte
- der NBD1 ATP-bindende und/oder hydrolytische Eigenschaften zugeordnet werden, die biochemisch charakterisierbar sind
- der Funktion der NBD1 als Bestandteil des „Motors“ von CFTR eine zentrale Rolle zukommt
- die hohe Sequenzhomologie zwischen den NBDs auf ein funktionelles und strukturelles Grundprinzip schließen läßt, das möglicherweise auf andere ABC-Transporter übertragbar ist.

Für die Durchführung biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen war es zunächst notwendig, ein Protein-Aufreinigungsprotokoll zur Isolierung der NBD1 im Milligramm-Maßstab zu etablieren. Hierzu sollte ein von Wulbrand [1994] in einen pGEX-Expressionsvektor kloniertes NBD1-Konstrukt verwendet werden. Nach Wulbrand [1994] fiel jedoch die in *E. coli* exprimierte GST-NBD1 in Form von biologisch inaktiven, wasserunlöslichen Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*, IBs) an. Dies machte es erforderlich, das Protein mit Hilfe von chaotropem Reagenz aus den IBs zu solubilisieren und in einem aufwendigen Renaturierungsprotokoll in eine stabile Tertiärstruktur zu überführen. Eine der Kernfragen dieser Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob eine lösliche Proteinexpression dieses GST-NBD1-Konstrukts in einem alternativen, eukaryontischen System möglich ist. Hierzu sollte das Sf9-Zellen/Baculovirus-Expressionssystem Anwendung finden. Parallel dazu bestand Interesse daran, ob durch eine Optimierung der Kultivierungs- und Expressionsbedingungen die Bildung von IBs in *E. coli* vermindert und eine Expression von löslicher NBD1 erreicht werden kann. Das Ziel bestand stets darin, eine löslich exprimierte NBD1 mit möglichst hohem Reinheitsgrad zu erhalten.

Mittels biochemischer und biophysikalischer Methoden sollte eine Charakterisierung der aufgereinigten NBD1 erfolgen. Zunächst galt es zu prüfen, ob die NBD1 in isolierter Form in der Lage ist, intrinsisch ATP zu binden und/oder zu hydrolysieren. Desweiteren bestand besonderes Interesse daran, mittels CD-Spektroskopie die Sekundärstrukturen von Wildtyp und $\Delta F508$ -NBD1 nach Aufreinigung unter nativen Bedingungen miteinander zu vergleichen. Mittels analytischer Ultrazentrifugation sollten Aussagen über die Form des rekombinanten Proteins in Lösung getroffen werden. Als langfristiges Ziel wurde die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie angestrebt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von Boehringer (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) und AppliChem (Darmstadt) bezogen. Puffer und Stammlösungen wurden mit Reinstwasser H₂O E-Pure (Barnstead, Dubuque/Iowa) angesetzt und entweder über 0,22 µm Filter (Sartorius) sterilfiltriert oder autoklaviert.

2.2 EU- UND PROKARYONTISCHE ZELLEN

2.2.1 SF9-ZELLEN

Bei *Sf9*-Zellen handelt es sich um eine aus den Ovarien des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* etablierte Zelllinie [Summers und Smith, 1987; Luckow, 1991] der Risikogruppe 1. *Sf9*-Zellen dienen als Wirt für die eukaryontische Baculovirus-vermittelte Proteinexpression, worauf in Kapitel 2.5, Seite 25 näher eingegangen wird.

2.2.1.1 ZELLKULTUR

Im folgenden ist das Standardprotokoll für die Zellkultur von *Sf9*-Zellen zusammengefasst [Gruenwald und Heitz, 1993]. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Herasafe 203, Heraeus) durchgeführt.

- TC/FCS/G-Medium = TC-100 Insektenzellmedium (Gibco BRL) + 10 % fötales Kälberserum (FCS) + 50 µg/ml Gentamycinsulfat (Gibco BRL) auf 27 °C temperieren
- in flüssigem Stickstoff eingefrorene *Sf9*-Zellen im 37 °C Wasserbad sofort auftauen und unmittelbar in 20 ml TC/FCS/G-Medium (50 ml Falconröhrchen) verdünnen
- 10 Minuten bei 600 x g zentrifugieren, Medium abdekantieren, Zellen in 10 ml TC/FCS/G-Medium vorsichtig resuspendieren und in Kulturflasche oder 60 mm-Kulturschale überführen
- bei 27 ± 0,5 °C und CO₂-Abwesenheit kultivieren, nach 12-24 Stunden Medium erneuern, Verdopplungszeit: ca. 24 Stunden

Gesunde *Sf9*-Zellen waren von sphärischer Gestalt und adhärirten am Kulturschalenboden. Bei dichter Zellrasenbildung wurden die Zellen mit einem Schaber abgelöst, resuspendiert und für die Fortführung der Kultur 1:4 mit Medium verdünnt.

2.2.1.2 BESTIMMUNG VON ZELLZAHL UND ZELLVITALITÄT

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei 100facher Vergrößerung unter dem Binokular (IM35, Zeiss) in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellvitalität wurde durch Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau (Zugabe von 0,1 ml 0,4 % Trypanblaulösung, gelöst in PBS, zu 1 ml *Sf9*-Zellsuspension) überprüft. Die Zellvitalität betrug in der logarithmischen Wachstumsphase typischerweise mehr als 95 %.

2.2.1.3 EINFRIEREN UND LAGERN VON *Sf9*-ZELLEN

Sf9-Zellen in der log-Wachstumsphase wurden 10 Minuten bei 600 x g zentrifugiert, im Eisbad mit eiskaltem 90 % FCS/10 % DMSO auf eine Zellzahl von $>4 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und sofort in verschraubbare Kryoröhrchen (Nalgene) zu 1 ml Fraktionen steril aliquotiert. Im Anschluß wurden die Zellen für eine Stunde bei -20°C , dann über Nacht bei -80°C eingefroren und abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 *ESCHERICHIA COLI*-STÄMME

Das Darmbakterium *Escherichia coli* wurde einerseits für die Produktion und Isolierung von Plasmid-DNA eingesetzt. In diesem Fall kam ausschließlich der K 12-Stamm DH5 α zur Anwendung, welcher sich durch geringe Endonukleaseaktivität und hohe Transformationskompetenz auszeichnet [Sambrook *et al.*, 1989; Raleigh *et al.*, 1989] und im Sinne des Gentechnikgesetzes eine biologische Sicherheitsmaßnahme darstellt. Zum anderen wurde *E. coli* als Wirt für die heterologe Überexpression rekombinanter Proteine verwendet. In diesem Fall kamen zusätzlich die B-Stamm-Derivate BL21, BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS [Dunn und Studier, 1983; Studier und Moffatt, 1986; Studier, 1991] zur Anwendung, welche der Risikogruppe 1 zugeordnet werden.

2.2.2.1 NÄHRMEDIEN

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur oder auf Agarplatten kam entweder Luria-Bertani (LB)- oder *rich broth* (RB)-Medium zum Einsatz. Letzteres wurde ausschließlich für mit dem pMALC2-Expressionsplasmid transformierte *E. coli*-Stämme verwendet, um die Expression endogener Amylasen zu reprimieren [NEB *instruction manual*, 1994]. Desweiteren wurde bei Transformationsansätzen (vgl. Kapitel 2.4.4, Seite 21) SOC-Medium angewendet. Durch Plasmidaufnahme (pVL1393, pGEX, pMALC2) erwarben die Stämme Resistenz gegenüber Ampicillin, welches in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ dem Medium zugesetzt wurde. Die Kultivierung von BL21(DE3)pLysS erfolgte zusätzlich in Gegenwart von 20 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol [Studier, 1991]. Auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wird in den entsprechenden Abschnitten näher eingegangen.

LB-MEDIUM

- 10 g Caseinhydrolysat (Gibco BRL)
- 10 g Hefeextrakt (Gibco BRL)
- 5 g NaCl (Baker)
- pH 7,5; ad 1 l H₂O E-pure; 30 min autoklavieren bei 121 °C / 1,1 bar

RB-MEDIUM

- 1 l LB-Medium
- 2 g D-(+)-Glucose (Merck, p. A.)
- autoklavieren

SOC-MEDIUM

- 20 g Bacto-Trypton (Gibco BRL)
- 5 g Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL)
- 0,5 g NaCl (Baker)
- 2,5 g MgCl₂·6H₂O (Merck, p. A.)
- 3,6 g D-(+)-Glucose (Merck, p. A.)
- pH 7,0; ad 1 H₂O E-pure; autoklavieren

AGARMEDIUM FÜR AGARPLATTEN

- 0,5 l LB-Medium (oder RB-Medium)
- 7,5 g bakteriologischer Agar (Gibco BRL)
- autoklavieren; nach Abkühlung auf etwa 40 °C Zugabe von Antibiotikum (falls erforderlich) und Ansetzen der Agarplatten; ca. 2 Monate bei 4 °C haltbar.

2.2.2.2 BESTIMMUNG DES ZELLWACHSTUMS

Die Messung der optischen Dichte (OD) des Kulturmediums zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung wurde als Maß für das Zellwachstum von *E. coli* herangezogen. Die OD-Messung erfolgte im Photometer (U-3000, Hitachi, Tokyo) bei 600 nm in Plastik-Einmalküvetten (Plastibrand). Um den linearen Meßbereich des Gerätes (0...1) einzuhalten, mußten Proben einer OD > 1 entsprechend mit Medium vorverdünnt werden. Es wurde stets der maximal angezeigte OD-Wert der kurz vor der Messung kräftig durchmischten Probe abgelesen.

2.2.2.3 EINFRIEREN UND LAGERN VON *E. COLI*

E. coli wurde in Glycerinkulturen konserviert. Ansatz:

- Ausstreichen des (frisch transformierten) *E. coli*-Stamms auf Agarplatte und Inkubation über Nacht bei 37 °C
- Animpfen von 5 ml LB- oder RB-Medium mit einer auf Agarplatte frisch gewachsenen Kolonie und Inkubation über Nacht bei 37 °C (200 rpm)
- Zentrifugieren von 3 ml Übernachtskultur in einem 1,5 ml Eppendorfhütchen (8000 x g/4 °C/1 min)
- Resuspendieren in 500 µl autoklaviertem 10 % Glycerin; sofort einfrieren bei -80 °C

2.3 PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA

2.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Protokolle zur Isolierung von Plasmid-DNA aufgeführt. Die Bestimmung von Reinheitsgrad und Konzentration erfolgte sowohl durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (Kapitel 2.3.3, Seite 17) als auch durch Aufnahme eines UV-Spektrums von 220 bis 320 nm (Reinheitskriterium: $1,8 \geq OD_{260}/OD_{280} \geq 1,6$; Konzentrationsabschätzung: $1 OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$). Isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

PLASMIDMINIPRÄPARATION

Die Präparation von Plasmid-DNA im 2 – 5 μg -Maßstab wurde ausgehend von frisch transformierter (vgl. Kapitel 2.4.4, Seite 21) 3 - 4,5 ml *E. coli*-Übernachtskultur mit Hilfe von QIAprep *spin*-Säulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben [QIAprep Miniprep Handbook, 1995] durchgeführt. Nach diesem Prinzip bindet die aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse [vgl. Birnboim und Doly, 1979] freigesetzte Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen spezifisch an einer Silicamatrix und kann im Anschluß nach intensiven Waschschritten in hochreiner Form mit alkalischem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert werden. Im vorliegenden Fall wurden dazu 2 x 50 μl 10 mM TRIS/HCl (pH 8,5) mit jeweils einminütiger Inkubation des Elutionsvolumens auf der Matrix verwendet. Plasmidminipräparationen wurden aufgrund ihres hohen Reinheitsgrades vorwiegend für die Baculovirus-Transfektorpräparation und für die DNA-Sequenzierung (vgl. Kapitel 2.3.4, Seite 18) eingesetzt.

PLASMIDMAXIPRÄPARATION

Insbesondere für die Rahmenpräparation bei Ligationsansätzen (2.4.2.2, Seite 20) war es notwendig, größere Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden Plasmidmaxipräparationen gemäß Sambrook *et al.* [1989] durchgeführt. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt 1-3 mg Plasmid-DNA.

2.3.2 AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Um amplifizierte PCR-Produkte (vgl. Kapitel 2.4.1, Seite 19) enzymatisch modifizieren zu können (z. B. für den Verdau mit spezifischen Restriktionsendonukleasen), war es nötig, diese aus dem PCR-Reaktionsansatz von den übrigen Komponenten (Oligonukleotide, Desoxyribonukleotide, Salze, ...) abzutrennen. Hierzu erfolgte eine Aufreinigung über QIAquick *spin*-Säulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben [QIAquickTM Handbook, 1995], wobei maximal 100 μl PCR-Reaktionsansatz auf eine Säule gegeben und das Produkt mit 2 x 50 μl 10 mM TRIS/HCl (pH 8,5) von der Silicamatrix eluiert wurde; Lagerung bei -20°C .

2.3.3 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

2.3.3.1 ANALYTISCHER MAßSTAB

Der analytische Nachweis von Plasmiden, PCR-Produkten und Restriktionsverdau-fragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung (6 Volt/cm) in einer TRIS-Borat-EDTA-gepufferten Agarosegelmatrix bei 4 °C und Detektion im UV-Licht nach Anfärbung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid. Als Größenstandards dienen λ -*BstE* II (mit dem Restriktionsenzym *BstE* II verdaute DNA des Phagen λ) und 1 kbp-Standard der Firma New England Biolabs. Die Fragmentgrößen sind im Anhang aufgeführt.

10FACH TBE-PUFFER (TRIS / BORAT / EDTA)

- 0,89 M TRIS 108 g TRIZMA BASE (Sigma, M = 121,1 g/mol)
- 0,89 M Borat 54 g H₃BO₃ (M = 61,83 g/mol)
- 20 mM EDTA 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- ad 1 l H₂O E-pure, autoklavieren

TBE-AGAROSEGELE

In Abhängigkeit von der DNA-Fragmentgröße wurden 0,8 bis 2 %ige TBE-gepufferte Agarosegele hergestellt. Ansatz:

- 0,4 bis 1 g Agarose (Gibco BRL, *electrophoretical grade*)
- Agarose durch Aufkochen in 50 ml 1fach TBE-Puffer lösen; in Elektrophorese-apparatur gießen; bei 4 °C auskühlen lassen
- mit 1fach TBE-Puffer überschichten

6FACH DNA-AUFTRAGSPUFFER

Vor Gelelektrophorese wurden alle DNA-Proben mit 1/6 Volumen 6fachem DNA-Auftragspuffer versetzt. Ansatz:

- 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 50 mg
- 0,002 % (w/v) Xylencyanol 100 mg
- 50 % (w/v) Saccharose 25 g
- 1 mM EDTA 0,1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- ad 50 ml H₂O E-Pure, Aliquotierung à 2 ml, Lagerung bei -20 °C

FÄRBUNG MIT ETHIDIUMBROMID UND AUSWERTUNG

- Färbung 10 Minuten in 1 µg/ml wäßriger Ethidiumbromidlösung; Entsorgung der Färbelösung durch Filtration über Aktivkohle
- Entfärbung 20 - 30 Minuten in H₂O bei Raumtemperatur (Schüttler)

Die Auswertung und Bildverarbeitung von DNA-Agarosegelen erfolgte unter UV-Licht (302 nm) unmittelbar nach Entfärbung mit Hilfe einer digitalen Kamera (Gel Print 2000i, MWG-Biotech). Für Dokumentationszwecke wurden die digitalisierten Bilddaten als TIFF-Dateien auf Diskette gespeichert.

2.3.3.2 PRÄPARATIVER MAßSTAB

Zur Gewinnung homogener DNA-Restriktionsverdaufragmente im Mikrogramm-Maßstab erfolgte zunächst eine elektrophoretische Auftrennung im präparativen TBE-Agarosegel (maximales Probenauftragsvolumen 120 µl) nach obigen Bedingungen. Die betreffende Bande wurde dann aus der Gelmatrix ausgeschnitten und mittels QIAquick *spin*-Säulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben [QIAquick™ Handbook, 1995] aufgereinigt. Bei diesem Verfahren wird zunächst die Agarosegelmatrix durch Erwärmung in einem chaotropen Puffer (QBT) solubilisiert und mit 1/3 Volumen Isopropanol versetzt. Im Anschluß erfolgt die DNA-Aufreinigung aus dem Solubilisat wie bei der Plasmidmini-präparation (s. oben) mittels Bindung an einer Silicamatrix und anschließender Elution mit alkalischem Puffer niedriger Ionenstärke. War auf diese Weise die DNA-Konzentration z. B. für nachfolgende Ligationsansätze zu niedrig, konnte eine bedeutende Ausbeuteerhöhung mit einer aufwendigeren Variante erzielt werden, indem das Solubilisat auf zwei bis vier Qiagen-Spinsäulen verteilt und mit einem großen Puffervolumen (pro Säule bis 200 µl) eluiert wurde. Im Anschluß erfolgte eine Ethanol/Acetat-Fällung der DNA aus der Pufferlösung nach Sambrook *et al.* [1989] und Aufnahme des DNA-Sediments in maximal 30 µl Puffer.

2.3.4 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten erfolgte im Kapillarzonen-elektrophorese-Sequenziergerät (ABI PRISM™ 310, Institut für Peptidforschung). Sequenzierreaktionen wurden mit dem ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* nach Herstellerprotokoll P/N 402078, Revision A, August 1995 sowohl direkt mit Plasmid-DNA als auch mit amplifizierten PCR-Produkten durchgeführt.

2.4 PCR-EXPRESSIONSKLONIERUNG

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987] stellt aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ein unentbehrliches Werkzeug in der Molekularbiologie dar. In dieser Arbeit wurde die PCR genutzt, um unterschiedlich große, für die erste nukleotidbindende Domäne (NBD1) von CFTR codierende Genabschnitte *in vitro* exponentiell zu amplifizieren und gezielt in verschiedene Vektoren zu klonieren. Auf diese Weise war es möglich, die NBD1 heterolog als GST- oder MBP-Fusionsprotein zu exprimieren. In den folgenden Unterkapiteln ist die Methodik der PCR-Expressionsklonierung beschrieben. Das letzte Unterkapitel 2.4.6 auf Seite 23 gibt einen zusammenfassenden Überblick über alle für die Proteinexpression generierten Vektorkonstrukte und die jeweils verwendeten Oligonukleotide.

2.4.2 RESTRIKTIONSVERDAU VON AMPLIFIZIERTEN PCR-PRODUKTEN UND VEKTOREN

Für die Ligationsreaktion mußten zunächst sowohl das amplifizierte PCR-Produkt als auch der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (zusammenfassend dargestellt in Kapitel 2.4.6, Seite 23) verdaut werden. Im Fall des Vektors folgte eine enzymatische Behandlung mit alkalischer Phosphatase (Kalb), welche den 5'-Phosphatrest am linearisierten DNA-Strang hydrolysiert und dadurch Re-Ligationsereignisse minimiert. Die erhaltenen Produkte werden im folgenden als *insert* bzw. Rahmen bezeichnet. Eine Abschätzung der DNA-Konzentrationen erfolgte im analytischen TBE-Agarosegel (Kapitel 2.3.3.1, Seite 17) mit Standards bekannter Konzentration.

2.4.2.1 INSERT-PRÄPARATION

- 200 µl PCR-Produkt (aufgereinigt aus 4 x 50 µl PCR-Reaktionsansätzen)
- 40 µl 10fach Restriktionspuffer (New England Biolabs)
- optional: 4 µl 100fach BSA (New England Biolabs)
- je 2 µl Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, 20 U/µl)
- ad 400 µl H₂O E-Pure
- 3 h Inkubation bei der für die Restriktionsendonuklease/n optimalen Temperatur
- 20 min / 65 °C; 2 min auf Eis; zentrifugieren
- Aufreinigung über eine QIAquick spin-Säule gemäß Herstellerangaben (Qiagen)

2.4.2.2 RAHMENPRÄPARATION

- 7-10 µg Plasmid in ca. 20 µl H₂O (aus Plasmidmaxipräparation)
- 8 µl Restriktionspuffer, optional + 0,8 µl 100 x BSA (New England Biolabs)
- je 2 µl Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, 20 U/µl)
- ad 80 µl H₂O E-Pure
- 2 h Inkubation bei der für die Restriktionsendonuklease/n optimalen Temperatur
- 20 min / 65 °C; 2 min auf Eis; zentrifugieren
- Dephosphorylierung: +10 U Alkalische Phosphatase (Kalb, CIP Boehringer Mannheim); 60 min / 37 °C
- 20 min / 65 °C; 2 min auf Eis; zentrifugieren
- präparative Auftrennung im TBE-Agarosegel

2.4.3 LIGATION

Die Ligation von *insert* und Rahmen erfolgte durch Inkubation mit T4-DNA-Ligase in Mg²⁺/ATP-haltigem Puffer. Zur Kontrolle wurden sowohl reiner Rahmen ohne *insert* als auch reiner *insert* ohne Rahmen angesetzt, um das Vorhandensein von falsch positiven Ligationsereignissen abschätzen zu können. Durchführung:

- 2 µl dephosphorylierter Rahmen; 200 - 500 ng
- 2 µl *insert*; 200 - 500 ng
- 2 µl Ligase-Puffer (5fach, Gibco BRL)
- 2 µl T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, 1 Weiss-Unit/µl)
- 4 µl H₂O E-Pure, autoklaviert
- 1 h bei Raumtemperatur für überhängende DNA-Enden; zusätzlich 2 h bei 16 °C für glatte DNA-Enden
- 20 min 65 °C; bis zur Transformation auf Eis aufbewahren

2.4.4 TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION

Der Vorgang der Plasmidaufnahme in das Cytosol von *E. coli* wird als Transformation bezeichnet. Ist dies geschehen, so wird im Zuge der Zellteilung das Plasmid zusammen mit dem Genom repliziert. Auf diese Weise ist es möglich, durch Anzucht von transformiertem *E. coli* das gewünschte Plasmid in größeren Mengen zu isolieren. Um die Transformation mit genügend hoher Effizienz zu gestalten, gibt es neben der klassischen chemischen Methode [Hanahan, 1985] die Elektroporation [Dower *et al.*, 1988; Chuang *et al.*, 1995], welche in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Hierbei wird eine *E. coli*-Zellsuspension in Gegenwart des Plasmids für kurze Zeit einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Durch plötzliche Entladung des Kondensators entstehen kurzzeitig Löcher in den Bakterienzellwänden, durch die das Plasmid in die Zelle eindringen kann. Für die Elektroporation ist es notwendig, eine Zellsuspension mit möglichst geringer Ionenstärke herzustellen, da sonst bei der Entladung die Gefahr der Lichtbogenbildung besteht, was zum Tod sämtlicher Zellen führen kann. Auch darf das eingesetzte Plasmid nur in wässriger Lösung vorliegen und in nicht zu hoher Menge eingesetzt werden (Pikogramm bis 200 Nanogramm auf 50 µl Zellsuspension).

HERSTELLUNG VON ELEKTROKOMPETENTEN *E. coli*-ZELLEN

Diese Arbeitsvorschrift wurde erfolgreich für die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und DH5α angewandt, während sich JM107 und BL21(DE3)pLysS aufgrund vorzeitiger Zellyse nicht eigneten. Die Transformationskompetenz frisch präparierter Zellen, gemessen an der Anzahl der nach 20-24 Stunden auf Agarplatte gewachsenen Kolonien, betrug 10^8 - 10^9 pro µg pUC und nahm innerhalb von vier Wochen auf 10^5 - 10^6 /µg ab. Dies reichte stets für gewöhnliche Transformationen mit Plasmidminipräparationen aus. Für Klonierungszwecke (Ligationsansätze) wurden nur frische elektrokompente Zellen verwendet. Durchführung:

- 500 ml LB-Medium mit 25 ml Übernachtskultur animpfen
- 37 °C/200 rpm bis OD₆₀₀ = 0,5 - 0,6 (4 -5 h)
- Zentrifugation GS3-Rotor (RC 5B Plus, Sorvall) 20 min/4000 x g/4 °C
- Zellen 2x waschen mit je 0,5 l eiskaltem, sterilem H₂O E-pure
- Resuspension in 20 ml eiskaltem sterilem 10 % Glycerin
- Zentrifugation SS34-Rotor (RC 5B Plus, Sorvall) 10 min/4000 x g/4 °C

- Resuspension in 1,5 ml 10 % Glycerin, 50 µl-Aliquote einfrieren in flüssigem Stickstoff
- Lagerung bei -80 °C

DURCHFÜHRUNG DER ELEKTROPORATION

In dieser Arbeit wurde der *Electroporator II* (Invitrogen, San Diego) in Verbindung mit einem Spannungsversorger (2197 *power supply*, LKB Bromma) verwendet. Geräteaufbau und -bedienung erfolgten exakt nach Anleitung [*The Electroporator II instruction manual*, 1995]. Durchführung:

- Voreinstellungen Elektroporator:
Spannung 1800 V / Widerstand 150 Ω / Kapazität 50 µF
- maximale Voreinstellungen am Spannungsversorger LKB:
Spannung 1500 V / Strom 25 mA / Leistung 25 W
- 1 – 2 µl Plasmid (< 5 ng) oder Ligationsansatz im Eisbad auf 50 µl gefrorene, elektrokompetente Zellen geben
- Zellsuspension durch Schütteln bei Raumtemperatur auftauen und sofort in eine auf 0 °C temperierte Elektroporatorküvette (Plattenabstand 0,1 cm, *Invitrogen*) pipettieren; Elektroporation ausführen (s. Anleitung)
- Resuspension in 800 µl SOC-Medium; Inkubation für 1 h bei 37 °C im Thermomixer 5436 (Eppendorf) auf Stufe 11
- Zentrifugation 8000 x g / 1 min / Raumtemperatur
- Zellen in 100-200 µl Medium resuspendieren und auf Agarplatten (+Antibiotikum) ausstreichen
- Inkubation bei 37 °C über Nacht

Zusätzlich wurden jeweils die elektrokompetenten Zellen in Abwesenheit von Plasmid bzw. Ligationsansatz elektroporiert und ausgestrichen, um Kontaminationen durch fremde Plasmid-DNA zu überprüfen.

2.4.5 KOLONIE-PCR: PRÜFUNG AUF POSITIVE KLONE

Je nach Ligationsausbeute wurden 10 bis 20 über Nacht gewachsene *E. coli*-Kolonien pro auf Agarplatte ausgestrichenen Transformationsansatz mittels Kolonie-PCR auf Vorhandensein der in das betreffende Plasmid klonierten DNA-Sequenz geprüft (Prüfung auf positive Klone). Der PCR-Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR erfolgte entsprechend dem in Kapitel 2.4.1 auf Seite 19 aufgeführten PCR-Standardprotokoll mit dem Unterschied, daß in diesem Fall eine preiswerte *Taq*-Polymerase (InViTAQ™, InViTEK, Berlin) und je 5 pmol Oligonukleotid verwendet wurden. Die Überführung von *E. coli* aus Kolonien in den PCR-Reaktionsansatz erfolgte über sterile Zahnstocher. Mit Oligonukleotiden, bestehend aus DNA-Sequenzen des Plasmids etwa 50 bp oberhalb (5'-Ende) bzw. unterhalb (3'-Ende) der *multiple cloning site* (MCS), war im Fall von positiven Klonen nach elektrophoretischer Auftrennung des PCR-Reaktionsansatzes im ethidiumbromidgefärbten TBE-Agarosegel eine der Größe der klonierten DNA-Sequenz

entsprechende Bande identifizierbar (Kontrollansatz: Leervektor). Im Anschluß erfolgte eine Plasmidminipräparation aus drei bis fünf ausgewählten, positiven Klonen und im Parallelansatz der analytische Nachweis auf korrekte Proteinexpression durch IPTG-Induktion von je 5 ml Übernachtskultur (nur für *E. coli*-Expressionsplasmide). Abschließend wurden jeweils aus einem ausgewählten Klon größere Plasmidmengen isoliert und das klonierte DNA-Fragment gemäß Kapitel 2.3.4 auf Seite 18 sequenziert.

2.4.6 ÜBERBLICK: KLONIERTE VEKTOREN FÜR DIE PROTEIN-EXPRESSION

Nachfolgend sind alle für die Proteinexpression klonierten Konstrukte und die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Vektoren aufgeführt. Die entsprechenden Plasmidkarten befinden sich im Anhang.

2.4.6.1 BACULOVIRUS-TRANSFERVEKTOREN

Zur Überexpression von Proteinen in *Sf9*-Zellen kam das BaculoGold™-System der Firma PharMingen (San Diego) zum Einsatz. Zunächst wurden jeweils die für die GST codierende *gex*-Domäne aus pGEX-3X und die für die GST-NBD1(R347-A596) codierende DNA-Sequenz aus pGEX-3X-1C [Wulbrand, 1994] über die Schnittstellen von *Xba* I und *Pst* I in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 (9639 bp) ligiert (Tabelle 2-2). Dabei war es nötig, durch geeignetes Oligonukleotiddesign sowohl Start-(ATG) als auch Stopcodon (TGA) zu integrieren. Das zu exprimierende Zielgen steht im Transfervektor unter Kontrolle des Baculovirus-Polyhedrinpromotors [Gruenwald und Heitz, 1993], der erst im Zuge der Viruspropagation induziert wird. Da es sich bei dem Transfervektor um ein pUC8-Derivat (mit Codierung für Ampicillinresistenz) handelt, konnte dieser nach erfolgter Ligation zunächst aus *E. coli* in größeren Mengen isoliert bzw. anschließend der klonierte DNA-Abschnitt sequenziert werden. Erst dann erfolgte eine Kotransfektion von Transfervektor und linearisierter Baculovirus-DNA in *Sf9*-Zellen, worauf in Kapitel 2.5 auf Seite 25 eingegangen wird.

Tabelle 2-2: pVL1393-Transfervektorkonstrukte zur Expression in *Sf9*-Zellen

PCR-Produkt (<i>insert</i>)		Bez. des klonierten Vektorkonstrukts	Bezeichnung des Genprodukts
Matrize	Oligonukleotidpaar ³⁾		
pGEX-3X-1C ¹⁾	A-GST / E-1C	pVL1393GEX1C	GST-NBD1 (R347-A596)
pGEX-3X ²⁾	A-GST / E-PGEX3X	pVL1393GEX	GST

¹⁾ Wulbrand [1994]; ²⁾ Pharmacia; ³⁾ DNA-Sequenzen im Anhang; 5'-Verdau mit *Xba* I, 3'-Verdau mit *Pst* I; der Rahmenverdau von pVL1393 erfolgte ebenfalls mit *Xba* I / *Pst* I

2.4.6.2 EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR *E. coli*

pGEX-VEKTOREN

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* kam der kommerziell erhältliche Vektor pGEX4T1 (Pharmacia) zum Einsatz. Die unterschiedlich großen für die NBD1 codierenden DNA-Sequenzen wurden alle am Leseraster orientiert über die Schnittstellen von *Eco* RI und *Xho* I am 3'-Ende der *gex*-Domäne in den Vektor ligiert. Für die Expression der GST in Kontrollansätzen diente pGEX-2T, da hier die Anzahl der C-terminalen, nicht GST-eigenen, bis zum Stopcodon translatierten Aminosäuren geringer ist als bei pGEX4T1. Alle pGEX-Vektoren codieren für den lacI^q-Repressor und für Ampicillinresistenz. Die Expression des Zielgens steht unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren p_{tac}-Promotors [Smith und Johnson, 1989]. In der nachfolgenden Tabelle sind die klonierten NBD1-Vektorkonstrukte aufgeführt.

Tabelle 2-3: pGEX4T1-NBD1 Vektorkonstrukte

PCR-Produkt (<i>insert</i>)		Bez. des klonierten Vektorkonstrukts	Bezeichnung des Genprodukts
Matrize ¹⁾	Oligonukleotidpaar ²⁾		
pGEX-3X-1C	F1 / R1B	pGEX4T-F1	GST-NBD1(T351-S589)
pGEX-3X-1C	F2 / R1B	pGEX4T-F2	GST-NBD1(D373-S589)
pGEX-3X-1C	F3 / R1B	pGEX4T-F3	GST-NBD1(G404-S589)
pGEX-3X-1C	F4 / R1B	pGEX4T-F4	GST-NBD1(F433-S589)
pGEX-3X-1C	F6 / R1B	pGEX4T-F6	GST-NBD1(D529-S589)

¹⁾ Wulbrand [1994]; ²⁾ DNA-Sequenzen im Anhang; 5'-Verdau *Eco* RI, 3'-Verdau *Xho* I; der Rahmenverdau von pGEX4T1 erfolgte ebenfalls mit *Eco* RI und *Xho* I

pMAL-VEKTOREN

Für die Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde der kommerziell erhältliche pMALC2-Vektor (New England Biolabs) verwendet. Wie bei den pGEX-Vektoren codiert dieser für den lacI^q-Repressor, für Ampicillinresistenz und ermöglicht eine unter Kontrolle des p_{tac}-Promotors stehende, IPTG-induzierbare Expression des Zielgens ins Cytosol des Wirtsorganismus [Guan, 1987].

Die für die NBD1 im Bereich von N386 bis F650 codierende DNA-Sequenz wurde über die Schnittstellen von *Eco*RI und *Pst*I am 3'-Ende des *malE*-Gens leserasterorientiert in pMALC2 ligiert. Die Erzeugung des *inserts* für die Ligation erfolgte mittels PCR-Amplifikation aus einem pBS-CFTR-Derivat unter Verwendung der Oligonukleotide F-1C-N386 und R-1C-F650PST. Dadurch wurden die oben angegebenen Restriktionsschnittstellen und zusätzlich am 3'-Ende ein TGA-Stopcodon eingeführt (Sequenzen im Anhang). Das erhaltene Plasmid wurde als wt-pMAL-1C386-650 bezeichnet.

Die Insertion der $\Delta F508$ -Mutation geschah wie folgt. Zunächst wurde aus dem von Wulbrand [1994] generierten $\Delta F508$ -pGEX-3X-1C-Plasmid mit den Oligonukleotiden F-1C-N386 und E-1C ein 700 bp-PCR-Produkt amplifiziert und mit *Eco* RI und *Sph* I verdaut. Nach gelelektrophoretischer Separation wurde das 495bp-Fragment präparativ aufgereinigt und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Eco* RI und *Sph* I in den Vektor pMAL1C386-650 ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde als ΔF -pMAL1C386-650 bezeichnet.

Im pMALC2-Vektor ist am 3'-Ende des *malE*-Gens das *lacZ*- α -Fragment fusioniert, welches eine Prüfung auf positive Klone mittels Blau/Weiß-Selektion [NEB, 1994] ermöglicht. Diese Methode wurde im vorliegenden Fall jedoch nicht angewendet, da die Kolonie-PCR (vgl. voriges Kapitel) bereits als sichere und effiziente Methode etabliert war. Zur Expression des Maltose bindenden Proteins (MBP) für Kontrollversuche wurde ein von Frau Dr. Stamminger (New England Biolabs) zur Verfügung gestellter pMALC2-Vektor verwendet, in dem am 3'-Ende des *malE*-Gens ein Stopcodon integriert ist und dadurch das *lacZ*- α -Fragment nicht exprimiert wird.

2.5 PROTEINEXPRESSION IN *Sf9*-ZELLEN

In dieser Arbeit wurde das BaculoGold™-System (PharMingen) verwendet, um die NBD1 von CFTR im Bereich von R347 bis A596 als GST-Fusionsprotein in *Sf9*-Zellen zu exprimieren (GST-NBD1(R347-A596)). Dies erfolgte durch Kotransfektion mit Transfervektor und letal deletierter, linearisierter DNA des *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) [O'Reilly *et al.*, 1992; Gruenwald und Heitz, 1993]. Ein großer Vorteil im BaculoGold™-System besteht darin, daß vermehrungsfähige Baculoviren ausschließlich durch homologe Rekombination zwischen Transfervektor und linearisierter Baculovirus-DNA in der Wirtszelle gebildet werden und somit mehr als 99 % aller erzeugten Baculoviren das zu interessierende Gen enthalten. Die Expression des Zielgens steht unter Kontrolle des sehr starken Polyhedrinpromotors, der in der sehr späten Phase des Virusvermehrungszyklus induziert wird. In rekombinanten Viren ist das Polyhedrin-Strukturgen durch das Zielgen substituiert. *In natura* codiert das Polyhedrin für das Baculovirus-Hüllprotein [Harrap, 1972; Summers *et al.*, 1978; Rohrman, 1986; Possee *et al.*, 1991]. Es ist jedoch nicht essentiell, so daß sich rekombinante Viren in hülfreier Form in *Sf9*-Zellen vermehren [Smith *et al.*, 1983] und nach 2-3 Tagen im Zellkulturüberstand anreichern können.

2.5.1 KOTRANSFEKTION

Die Kotransfektion von *Sf9*-Zellen mit Transfervektor und linearisierter Baculovirus-DNA erfolgte nach der Calciumphosphatmethode. Materialien und Durchführung:

- 2 µg Transfektor-DNA, aufgereinigt als Plasmidminipräparation gemäß Kapitel 2.3.1 (Seite 16); 0,5 µg linearisierte Baculovirus-DNA und wt-Baculovirus (PharMingen)
- drei 60 mm-Zellkulturschalen à $2 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen, frisch ausgesät in TC-100-Medium + 50 µg/ml Gentamycinsulfat (Gibco BRL) ohne FCS (= TC/G-Medium)
- 1 ml Transfektionspuffer A (Grace Medium, Gibco BRL)
- 1 ml Transfektionspuffer B (20 mM HEPES pH 7,1; 125 mM CaCl₂; 140 mM NaCl), sterilfiltriert
- TC/FCS/G- und TC/G-Medium auf Raumtemperatur thermostatisiert
- 0,5 µg linearisierte Baculovirus-DNA und 2 µg Transfektor-DNA in einem Eppendorfhütchen mischen; 5 min Raumtemperatur; 1 ml Transfektionspuffer B zugeben und vorsichtig mischen
- Medium aus der ersten Zellkulturschale absaugen und Zellen mit 1 ml Transfektionspuffer A überschichten
- tropfenweise Transfektionspuffer B + DNA zugeben, vorsichtig umschwenken; dabei bildet sich ein feiner Calciumphosphatniederschlag
- Negativ- und Positivkontrolle: in die zweite und dritte Zellkulturschale jeweils 0 und 50 µl wt-Baculovirus pipettieren
- alle drei Platten 4 h bei 27 °C inkubieren; Überstände absaugen; Zellen mit 3 ml TC/FCS/G-Medium waschen und in 3 ml TC/FCS/G-Medium kultivieren
- nach 2 bis 3 Tagen Untersuchung der Sf9-Zellen auf Infektionserscheinungen
- 4 bis 5 Tage nach Infektion die virushaltigen Überstände abnehmen und bei 4 °C lagern (6 Monate haltbar)

2.5.2 VIRUSTITERBESTIMMUNG

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels Plaque-Assay, bei dem in einer Agarosematrix immobilisierte Sf9-Zellen mit einer sehr niedrigen Anzahl an Viren infiziert werden. Aufgrund der Agarose ist die Freisetzung von Viruspartikeln gehemmt und es bilden sich nach einigen Tagen Regionen lokal infizierter Zellen (Plaques), die mit dem Tetrazoliumfarbstoff MTT negativ angefärbt werden können. Durchführung:

- aus der Kotransfektion isolierten Virusüberstand je 10^{-1} , ..., 10^{-6} mit TC/G-Medium (ohne FCS) verdünnen
- in 6-well-Zellkulturschalen je $1,5 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen + 2 ml TC/G-Medium (ohne FCS) eine Stunde adhären lassen (strikte Einhaltung der Zellzahl!)
- TC/G-Medium absaugen und je 400 µl der verdünnten Virusüberstände auf die Sf9-Zellen tropfenweise verteilen; 1 h bei Raumtemperatur; gelegentlich umschwenken, nicht austrocknen lassen
- eine 3 %ige, autoklavierte Lösung von Sea-Plaque-Agarose (Biozym, Oldenburg) in PBS bei 37 °C 1:3 mit TC/FCS/G-Medium (mit FCS) verdünnen
- Virusüberstände von den Zellen absaugen und Zellen vorsichtig mit je 2 ml Agarose/Medium-Lösung überschichten

- Nach Erstarrung der Agarose mit 1 ml TC/FCS/G-Medium (mit FCS) überschichten; 5-6 Tage bei 27 °C inkubieren
- Färbung durch Zugabe von 0,2 ml MTT-Lösung; 0,5-24 h bei 27 °C inkubieren; Flüssigkeit absaugen; Plaques auszählen

Der Virustiter wird auch als *multiplicity of infection* (MOI) bezeichnet und ist als Anzahl gebildeter Plaques pro Zellen definiert.

2.5.3 PROTEINEXPRESSION UND ZELLERNTE

Für die Proteinexpression wurden zunächst größere Mengen an Virusüberständen mit einer MOI von 0,1 bis 1 generiert und zu 1 ml Aliquoten bei -80 °C eingefroren. Dies geschah durch Infektion von je $5 \cdot 10^6$ Sf9-Zellen in vier 10 cm-Zellkulturschalen. Ausgehend von diesen Passagen erfolgte eine erneute Virusamplifikation. Die eigentliche Proteinexpression wurde durch Infektion mit Virusüberständen einer MOI von 20 durchgeführt (Bedingungen wie oben). Die Zellernte erfolgte nach 2 bis 3 Tagen durch Resuspension der Zellen und Zentrifugation in Falconröhrchen bei 2000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment bis zur Proteinaufreinigung bei -80 °C aufbewahrt.

2.6 PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI*

Für die Expression von GST- und MBP-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden die mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Stämme in Flüssigmedium bei 27 °C kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zugabe von IPTG zum Medium. Da die Ausbeute der löslich exprimierten Genprodukte aus pMAL-Derivaten (MBP und MBP-NBD1) und aus pGEX-2T (GST) hinreichend hoch war, genügte eine Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab. Für GST-NBD1-Fusionsproteine dagegen wurden Kultivierungen im 10-Liter-Maßstab vorgenommen.

KULTURFÜHRUNG UND PROTEINEXPRESSION IM SCHÜTTELKOLBENMAßSTAB

- Animpfen von 120 ml LB- oder RB-Medium^{*)} in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer frisch transformierten, auf Agarplatte gewachsenen *E. coli*-Kolonie; Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
- > 24 h / 27 °C / 270 rpm (G24 Schüttelinkubator, New Brunswick, New Jersey)
- 2 x 500 ml Medium in 1 l-Erlenmeyerkolben mit je 45 ml Übernachtskultur animpfen
- 27 °C / 270 rpm; stündliche Entnahme von ~1,5 ml-Aliquoten zur Bestimmung des Zellwachstums und für die SDS-PAGE
- Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG bei $OD_{600} = 1,0$
- Zellernte nach drei Stunden bei $OD_{600} = 2,0$ bis 3,0
- Zentrifugation: GS-3-Rotor / 6500 rpm / 10 min / 4 °C (RC 5B Plus, Sorvall)

- Resuspension in 50 ml eiskaltem 50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 2,5 mM EDTA / 0,1 mM PMSF (PMSF aus 0,1 M Stammlösung in 2-Propanol, Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
 - Zentrifugation: SS 34-Rotor / 9000 rpm / 10 min / $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (RC 5B Plus, Sorvall); Bestimmung der Biofeuchtmasse (BFM)
 - Schockfrieren der Zellernte in flüssigem Stickstoff, Aufbewahrung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - typische Ausbeuten: 2,5 bis 3,0 g BFM nach einmaligem Waschen
- *) Bei der Expression von MBP und MBP-Fusionsproteinen wurde RB- statt LB-Medium verwendet, da die darin enthaltene Glucose die basale, nicht IPTG-induzierte Proteinexpression deutlich reduzierte. Zudem reprimiert die Glucose laut Herstellerangaben [NEB, 1994] die Expression endogener Amylasen, welche sich als störend bei der anschließenden Affinitätsaufreinigung (enzymatischer Verdau der immobilisierten Amylose) auswirken.

KULTURFÜHRUNG IM 10 LITER MAßSTAB

Die Kultivierung in 10 Liter-Glasfermentern (Forschungswerkstätten, MHH) wurde am Institut für Biophysikalische Chemie durchgeführt. Rührung und Belüftung der Apparatur erfolgten durch Druckluftestrom. Die Kultivierungstemperatur wurde über eine mit einem externen Thermostaten verbundene Kühlschlange auf $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten. Durchführung:

- Vorkultur: 2 x 0,5 l LB-Medium plus 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin wie oben animpfen
- mindestens 24 Stunden bei $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 270 rpm (G24 Schüttelinkubator, New Brunswick, Edison, New Jersey) kultivieren
- Hauptkultur: 8 Liter LB-Medium + Ampicillin mit 2 x 0,5 l Vorkultur animpfen
- stündliche Probenahme für die Bestimmung des Zellwachstums, für die SDS-PAGE und für die pH-Wertkontrolle (pH-Papier, 2 M NaOH)
- Wachstum bis $\text{OD}_{600} = 1,2 - 1,3$; Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG
- Zellernte nach 3 h bei $\text{OD}_{600} = 2,0 - 3,0$
- Zentrifugation in 1 Liter-Zentrifugenbechern bei 4300 rpm ($6000 \times g$)/10 min/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cryofuge 8500, Heraeus Sepatech)
- Resuspension in 400 ml eiskaltem 50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 2,5 mM EDTA / 0,1 mM PMSF; Aliquotierung in 10 x 50 ml Falcon-Röhrchen;
- Zentrifugation bei $6000 \times g$ /10 min/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cryofuge 8500, Heraeus Sepatech)
- Schockfrieren der Zellernte in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- typische Ausbeuten: 10 x 6 g BFM nach einmaligem Waschen

2.7 PROTEINAUFREINIGUNG

Die Aufreinigung von heterolog überexprimierten Zielproteinen erfolgte nach Zellaufschluß und Zentrifugation aus dem cytosolischen Überstand mittels Affinitätschromatographie über den jeweiligen N-terminalen Fusionspartner. GST und GST-Fusionsproteine wurden an immobilisiertem Glutathion (GSH-Sepharose 4B, Pharmacia), MBP und MBP-Fusionsproteine an immobilisierter Amylose (New England Biolabs) chromatographiert. Im folgenden sind die einzelnen Methoden beschrieben.

2.7.1 GST-FUSIONSPROTEINE AUS *Sf9*-ZELLEN

Basierend auf folgendem Standardprotokoll wurden GST und GST-NBD1(R347-A596) aus *Sf9*-Zellen aufgereinigt.

- Resuspension des *Sf9*-Zellsediments (vgl. Kapitel 2.5.3, Seite 27) in 10 ml Aufschlußpuffer AP (= 50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 20 % Glycerin / 2,5 mM EDTA / 1 % Triton X-100) plus 1 mM DTT (= AP/DTT)
- Zugabe von Proteaseinhibitoren (in µg/ml): 10 Aprotinin, 10 Leupeptin; 10 Pepstatin A und 1 mM PMSF (aus 0,1 M Stammlösung in 2-Propanol)
- Zellaufschluß durch Ultraschall (Branson Sonifier 250): Leistungsstufe 1; Puls 10 %; Dauer 1 min; Eisbad; lichtmikroskopische Kontrolle bei 800-1000facher Vergrößerung
- Zentrifugation des Zellaufschlusses bei 12000 x g (12500 rpm) / 10 min / 4 °C im SS-34-Rotor (RC 5B Plus, Sorvall)
- Applikation des Überstands auf in AP/DTT äquilibrierte GSH-Sepharose 4B (Pharmacia, Bettvolumen 2-4 ml) in *Poly-Prep Chromatography Columns* (0,8 x 4 cm, BioRAD) unter Gravitationsdurchflußbedingungen bei 4 °C
- Waschen mit dem 10 bis 20fachen Bettvolumen AP/DTT
- Elution mit 10 x 1 ml Elutionspuffer (AP/DTT + 20 mM GSH, pH-Wertkontrolle); Aufbewahrung der Eluate bei 4 °C; Proteinbestimmung; analytische SDS-PAGE

2.7.2 GST-FUSIONSPROTEINE AUS *E. COLI*

Etwa 6 g BFM (für die Aufreinigung der GST: 1,0 g BFM) eingefrorene *E. coli*-Zellernte (gemäß Kapitel 2.6, Seite 27) wurden mit Hilfe eines Spatels auf Eis in 40 ml Aufschlußpuffer AP (= 50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 20 % Glycerin / 2,5 mM EDTA) + 1 mM PMSF resuspendiert. Zellaufschluß und Proteinaufreinigung:

- Zugabe von 100 µg/ml Lysozym / 30 min / Eis; bei Einsatz von *E. coli* BL21(DE3)pLysS: 30minütige Inkubation ohne Lysozym; Zugabe von 1 mM DTT + 0,5 % CHAPS
- Ultraschall (Branson Sonifier 250); Leistungsstufe 5; Puls 50 %; 2 x 1 min mit je einminütiger Pause im Eisbad
- Zentrifugation des Zellaufschlusses bei 9000 x g/10 min/4 °C (SS34-Rotor, RC 5B Plus, Sorvall); Überstand abdekantieren und erneut zentrifugieren bei 12500 x g/4 °C/10 min
- den klaren Überstand in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 5 ml 50 %iger, in AP + 1 mM DTT (=AP/DTT) äquilibrierter GSH-Sepharose 4B versetzen und zwei Stunden bei 4 °C auf einer Wippe inkubieren
- Zentrifugation 1000 x g / 2 min / 4 °C; waschen mit 3 x 50 ml AP/DTT
- Resuspension in 20 ml AP/DTT, Überführung auf Elutionssäule (vgl. oben)
- Säule waschen mit 10 bis 20fachem Bettvolumen AP/DTT; Elution mit 10 x 1 ml Elutionspuffer (= AP/DTT+ 20 mM GSH, pH-Wertkontrolle)
- Aufbewahrung der Eluate bei 4 °C; Proteinbestimmung; analytische SDS-PAGE

2.7.3 MBP-FUSIONSPROTEINE AUS *E. COLI*

Etwa 1 g eingefrorene Zellernte wurde auf Eis in 40 ml Aufschlußpuffer AP (= 50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 10 mM KCl / 2,5 mM EDTA / 0,1 mM PMSF) resuspendiert und wie oben mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 x g (12500 rpm) / 10min / 4 °C, SS34-Rotor, Sorvall. Der klare Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, mit 1 mM DTT und nochmals 1 mM PMSF versetzt und in einem 50 ml Falconröhrchen 30 Minuten bei Raumtemperatur in Gegenwart von 5 mM MgCl₂/ATP pH 7,5 inkubiert. Danach erfolgte die Proteinaufreinigung an immobilisierter Amylose-Agarose:

- Applikation des Überstandes auf in AP/DTT ohne PMSF äquilibrierte Amylose-Agarose (New England Biolabs, 5 – 6 ml Bettvolumen in einer 0,8 x 4 cm *Poly-Prep Chromatography Column*, BioRAD) bei 4 °C, Dauer: 2 – 3 h
- Waschen mit 5 Säulenvolumen AP/DTT + 5 mM MgCl₂/ATP
- Waschen mit 10 Säulenvolumen AP/DTT
- Elution mit 10 x 1 ml AP/DTT + 20 mM Maltose
- Aufbewahrung der Eluate bei 4 °C; Proteinbestimmung; analytische SDS-PAGE

2.7.3.1 DE- UND RENATURIERUNG AUFGEREINIGTER MBP-FUSIONS-PROTEINE

Von Wulbrand [1994, Seite 14-15] wurde für die Aufreinigung der GST-NBDs von CFTR und P-Glykoprotein mittels präparativer Gelelektrophorese ein SDS/Harnstoff-Auftragungspuffer eingesetzt. Im vorliegenden Fall erfolgten mit diesem Puffer Denaturierungsversuche bei 0 und 95 °C mit den nach Affinitätschromatographie erhaltenen wt- und ΔF508-MBP-NBD1 bzw. dem MBP. Im Anschluß wurden die Proteine mittels schrittweiser Dialyse gegen Phosphatpuffer renaturiert.

DURCHFÜHRUNG

Je 600 µl MBP-NBD1 bzw. MBP in Elutionspuffer (50 mM TRIS/Acetat, pH 7,5 / 2,5 mM EDTA / 20 mM Maltose / 0,1 mM DTT, OD₂₈₀ = 1-2) wurden 1:5 mit frisch angesetztem Denaturierungspuffer verdünnt und im Parallelansatz jeweils zehn Minuten bei 0 °C bzw. 95 °C inkubiert. Ansatz für den Denaturierungspuffer:

- | | |
|--|-------------------------------|
| - 10 M Harnstoff | 30,05 g |
| - 20 mM EDTA | 2 ml 0,5 M EDTA pH 7,5 |
| - 50 mM DTT | 0,386 g |
| - 5 %(w/v) Glycerin | 5 ml 100 % (w/v) Glycerin |
| - 60 mM TRIS/HCl pH 6,8 | 6 ml TRIS/HCl 2 ^{*)} |
| - 0,1 % SDS (w/v) | 0,5 ml 10 % SDS (w/v) |
| - ad 50 ml H ₂ O E-Pure, lösen durch leichte Erwärmung im Wasserbad | |

^{*)} siehe Kapitel 2.9 auf Seite 34

Renaturierung durch Dialyse bei 4 °C gegen:

- 0,1 M Na-Phosphat pH 8,0 / 10 % Glycerin
- 0,05 M Na-Phosphat pH 8,0 / 5 % Glycerin + Ionenaustauscher AG501-X8 (BioRAD)
- 0,02 M Na-Phosphat pH 8,0 / 2 % Glycerin + Ionenaustauscher AG501-X8 (BioRAD)
- 0,05 M Na-Phosphat pH 8,0
- 0,05 M Na-Phosphat pH 8,0

Der Pufferwechsel erfolgte jeweils nach 14-20 Stunden. Abschließend wurden die Proben in Centricon-Röhrchen (MW-Ausschluß 10.000 g/mol, Centricon) gemäß Herstellerangaben bis $OD_{280} = 0,2 - 0,35$ aufkonzentriert. Die mittels p-Rosanilin-Farbstoff [Rosen *et al.*, 1972; Amons und Schrier, 1981; Wulbrand, 1994] quantifizierte SDS-Konzentration in den Proben nach Dialyse betrug weniger als 0,001 % (w/v).

2.7.4 SPALTUNG VON FUSIONSPROTEINEN MIT FAKTOR X_A UND THROMBIN

Um den N-terminalen Fusionspartner GST bzw. MBP von der zu interessierenden C-terminalen NBD1-Domäne abzutrennen, wurden die Fusionsproteine mit spezifischen Proteasen verdaut, welche die Peptidbindung spezifisch zwischen Affinitätspartner und zu interessierendem Protein hydrolysieren. Für pGEX4T1-Derivate kam Thrombin mit der Erkennungsstelle Leu-Val-Pro-Arg[↓]-Gly-Ser [Chang, 1985a und b; Pharmacia, 1993] bzw. für pMAL-Derivate Faktor X_A mit der Erkennungsstelle Ile-Glu-Gly-Arg[↓] [Nagai und Thogersen, 1985 und 1987; NEB, 1994] zum Einsatz. pMALC2 enthält zusätzlich eine (Asp)₁₀-Sequenz N-terminal der Erkennungsstelle, um die Faktor X_A -Spalteffizienz zu erhöhen [NEB, 1994]. Eine Aufreinigung der abgespaltenen NBD1 sollte im Anschluß über Ionenaustauschchromatographie erfolgen (s. nachfolgendes Kapitel). Die Spaltbedingungen wurden nach Herstellerangaben [Pharmacia, 1993; NEB, 1994] mit Variationen [Ellinger *et al.*, 1991] durchgeführt. Um den proteolytischen Verdau zeitlich verfolgen zu können, wurden dem Spaltansatz in bestimmten Zeitabständen Aliquote entnommen und mittels SDS-PAGE untersucht. Beispiel für einen analytischen Reaktionsansatz:

- 50 µl MBP-NBD1 nach Affinitätschromatographie
- 50 µl Puffer (verschiedene Bedingungen)
- 1 – 10 µl Thrombin (Sigma) oder Faktor X_A (New England Biolabs) entsprechend einem 0,5 – 5 %igem (w/w)- Verhältnis Protease/Protein
- Inkubation bei Raumtemperatur; 10 µl Aliquotentnahme nach 2, 20, 40, 120, ... min
- Inaktivierung der Protease durch 1:2 Verdünnung mit SDS-Auftragspuffer (siehe Kapitel 2.9, Seite 34); aufbewahren der Aliquote bei –20 °C bis zur SDS-PAGE

2.7.5 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE MITTELS FPLC

Am Anionenaustauscher Q-Sepharose wurden nach Affinitätschromatographie erhaltene GST- und MBP-Fusionsproteine weiter aufgereinigt. Dabei sollte zum einen überprüft werden, ob eine Isolierung der NBD1 nach Spaltung mit spezifischer Restriktionsprotease gemäß vorigem Kapitel möglich war. Zum anderen sollte die Frage geklärt werden, ob die nach Affinitätschromatographie erhaltene MBP-NBD1 mit ATP-hydrolysierenden Verunreinigungen kontaminiert war. Die Arbeiten wurden bei Raumtemperatur an einer FPLC-Anlage (*Fast Protein Liquid Chromatography*, Pharmacia) mit Detektion bei 280 nm und automatischem Probensammler (Frac-100, Pharmacia) durchgeführt. Zur Anwendung kam eine Mono Q-HR 5/5-Säule mit einem Partikeldurchmesser von 10 µm und einem Säulenvolumen von 1 ml (Pharmacia). Die geladene Gruppe des Anionenaustauschers besteht aus einer quarternären Ammoniumgruppe $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, die Proteinkapazität beträgt durchschnittlich 20 – 50 mg/ml Bettvolumen (*INSTRUCTIONS* Mono Q HR 5/5 Code No. 17-0546-01, Pharmacia). Chromatographiebedingungen:

Puffer A: 50 mM TRIS/HCl pH 7,5 – 0,1 mM DTT, filtriert über 0,22 µm

Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl, filtriert über 0,22 µm

Probenauftrag: MBP-NBD1 5 ml (~1 mg/ml) in Puffer A

Elutionsprogramm:

- Flußrate: 0,5 ml/min (Säulendruck: < 0,8 MPa)
- 10 Säulenvolumen (SV) Puffer A
- linearer Salzgradient: in 20 SV von Puffer A nach Puffer B (= 50 mM NaCl/ml)
- 10 SV Puffer B, dann 10 SV Puffer A
- Probensammlung: 0,5 ml/Fraktion

Für die Chromatographie von Restriktionsansätzen enthielten Puffer A und B zusätzlich 20 % Glycerin und 0,2 % CHAPS. Da grundsätzlich starke Proteinpräzipitation auf der Mono Q-Säule zu beobachten war, erfolgte nach Chromatographie eine intensive Spülung mit 0,05 % SDS / 0,1 M NaOH bei Raumtemperatur. Säule und FPLC-Anlage wurden nach Benutzung in 20 % Ethanol/10 mM NaN_3 gewaschen.

2.7.6 DIALYSE

Zur schonenden Umpufferung wurden alle aufgereinigten Proteine in Servapor-Dialyseschläuchen (Serva) bei 4 °C gegen den gewünschten Puffer über drei Tage unter mehrfachem Pufferwechsel (jeweils 100faches Volumen) dialysiert. Vorbehandlung von Dialyseschläuchen:

- 2 x 1 h auskochen in 2 % NaHCO_3 / 1 mM EDTA pH 8,0
- mehrmals waschen in 1 mM EDTA pH 8,0 bis pH 8,0 (pH-Papier)
- 1 x waschen in Lagerpuffer 1 mM EDTA pH 8,0/10 mM NaN_3 /20 % Ethanol
- bei 4 °C aufbewahren in Lagerpuffer
- vor Dialyse den Schlauch im Puffer waschen und 1 h äquilibrieren

2.8 PROTEINBESTIMMUNG

2.8.1 NACH BRADFORD

Die kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford [1976] erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA) als Eichstandard für Proteinkonzentrationen im Bereich 0,05 - 0,8 mg/ml. Eichreihe und Proben wurden in Doppelbestimmungen vermessen. Ansatz für Bradfordreagenz:

- 0,015 g Coomassie Brillant Blau G 250
- 10 ml Ethanol
- 20 ml 85 %ige Phosphorsäure
- ad 200 ml H₂O E-pure
- filtrieren über Faltenfilter; bei 4 °C maximal 1 Monat haltbar

DURCHFÜHRUNG

- BSA-Eichreihe aus 4000 µl 1 mg/ml BSA-Stammlösung ansetzen:
0 0,05 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 mg/ml
- 50 µl Eichstammlösung bzw. Probe + 950 µl Bradfordreagenz (Eppendorfhütchen)
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
- Extinktionsmessung in einer Einmalküvette (Plastibrand) bei 595 nm im Spektralphotometer (Hitachi U-3000, Tokyo)

2.8.2 UV-ABSORPTIONSMESSUNG

Nach dem Gesetz von *Lambert und Beer* [s. physikalische Lehrbücher, z. B. Winter und Noll, 1998] ist die Konzentration eines gelösten Stoffes proportional zu seiner Extinktion:

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \Leftrightarrow c = \frac{E}{\varepsilon \cdot l}$$

E: Extinktion; I₀, I: Lichtintensität vor/nach Durchstrahlung der Probe; ε: Extinktionskoeffizient [M⁻¹·cm⁻¹]; c: Proteinkonzentration [mol·l⁻¹]; l: Schichtdicke [cm].

Damit läßt sich photometrisch die Konzentration aufgereinigter Proteine aus dem Absorptionsmaximum bei 280 nm berechnen. Im vorliegenden Fall wurden nach Gill und von Hippel [1989] berechnete molare Extinktionskoeffizienten von ε₂₈₀ = 64700 M⁻¹cm⁻¹ für MBP bzw. ε₂₈₀ = 86400 M⁻¹cm⁻¹ für wt- und ΔF508-MBP-NBD1 verwendet. Die Extinktionsmessungen erfolgten in Quarzmikroküvetten (Probenvolumen 80 µl; QS, Hellma, Schichtdicke 1 cm) im Spektralphotometer U-3000 (Hitachi, Tokyo) mit dem entsprechenden Puffer als Referenz. Von aufgereinigten Proteinen wurden zur Reinheitskontrolle Spektren im Bereich von 190 bis 400 nm aufgenommen. Alle OD₂₈₀-Werte wurden bezüglich der Streuung bei 400 nm korrigiert.

2.9 SDS-PAGE

Der analytische Nachweis von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen [Lämmli, 1970; Hames und Rickwood, 1990]. Dabei wurden die Proteine in einer Polyacrylamidgelmatrix nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluß durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht. Zum Größenvergleich kam der Molekulargewichtsmarker MMW von Promega zum Einsatz, dessen Molekulargewichte im Anhang aufgeführt sind.

PROBENVORBEREITUNG –UND PROBENAUFTRAG

Alle löslichen Proteinproben wurden in Eppendorfhütchen 1:2 mit reduzierend wirkendem SDS-Auftragspuffer (siehe unten) versetzt, nacheinander je 5 Minuten bei 95 °C und 0 °C inkubiert und eine Minute bei 14000 x g zentrifugiert. War die Proteinkonzentration der Lösung zu niedrig, erfolgte eine Fällung durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure, Zentrifugation bei 4 °C für 30 Minuten, Spülen des Sediments mit Aceton und direkte Aufnahme in SDS-Auftragspuffer. Bei unlöslichen Proben und Zellsuspensionen wurde zunächst die Trübung bei 600 nm gegen Puffer bestimmt und mittels Zentrifugation eines Aliquots bzw. anschließender Resuspension in zweifachem SDS-Auftragspuffer auf die jeweils unten aufgeführte, optische Dichte eingestellt. Dann wurden die unlöslichen Proben wie oben gekocht, auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Ansatz für reduzierend wirkenden SDS-Auftragspuffer (zweifach):

- 5 ml TRIS-Puffer 2 (= 0,5 M TRIS/HCl pH 6,8)
- 2 ml 10 % (w/v) SDS
- 1 ml 100 % (w/v) Glycerin
- 0,0025 g Bromphenolblau
- 0,15 g 0,1 M DTT
- ad 10 ml H₂O E-pure, 2 ml-Aliquote einfrieren bei -20 °C, mind. 1 Jahr haltbar

Tabelle 2-4 faßt die Probenauftragsbedingungen zusammen.

Tabelle 2-4: Probenauftragsvolumina und –mengen für die SDS-PAGE

Probe	Probenauftrag ¹⁾
lösliche Proben	
aufgereinigte Proteine	1 - 20 µl (0,5 - 5 µg)
cytosolische Überstände nach Zellaufschluß	4 - 8 µl (2 - 4 µg)
MW-Standard	5 µl (1:5) = 0,5 µg
unlösliche Proben / Suspensionen	
Gesamtzellen aus Kultivierung	10 - 15 µl (OD ₆₀₀ = 5)
Rückstände nach Zellaufschluß ²⁾	8 - 10 µl (OD ₆₀₀ = 2)

¹⁾ Verdünnungen und OD-Werte beziehen sich auf die mit SDS-Auftragspuffer versetzten Proben.

²⁾ Rückstände wurden nach Zentrifugation des Ultraschallaufschlusses bzw. vor der Trübungsmessung bei 600 nm zweimal gewaschen.

GELPOLYMERISATION, ELEKTROPHORESE UND FÄRBUNG

Die Angaben für die Herstellung der aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestehenden Polyacrylamidmatrix sind in Tabelle 2-5 aufgeführt. Die elektrophoretische Trennung wurde in Lämmli-puffer mit Hilfe einer MiniProtean II Kammer (BioRad) bei konstanter Ampèrezahl (35 mA pro Gel) durchgeführt. Ansatz für 10fachen Lämmli-puffer:

- 0,25 M TRIS 30,275 g
- 1,9 M Glycin 142,63 g
- 1 % SDS 10 g
- ad 1 l H₂O E-pure, filtrieren über 0,22 µm, pH nicht einstellen

Tabelle 2-5: Ansatz von Trenn- und Sammelgel (Angaben für zwei Gele)

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	17 %	4 %
H ₂ O E-pure	4,07 ml	3,3 ml	1,7 ml	2,43 ml
TRIS-Puffer 1	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
TRIS-Puffer 2	-	-	-	1 ml
30 % AA/Bis (37,5:1; Protogel)	3,33 ml	4,02 ml	5,7 ml	530 µl
10 % SDS (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl	40 µl
40 % APS (w/v)	20 µl	20 µl	20 µl	15 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	7,5 µl

¹⁾ = 1,5 M TRIS pH 8,8; ²⁾ = 0,5 M pH 6,8

Die Färbung eines Gels erfolgte unmittelbar nach Elektrophorese für 10 min bei Raumtemperatur im Schüttler (New Brunswick, Stufe 3) in 200 ml Fixier- und Färbelösung:

- 120 ml Methanol
- 0,3 g Coomassie BB G250 (Serva)
- 120 ml H₂O E-pure
- 24 ml 96 % Essigsäure
- filtrieren über 0,22 µm-Filter

Zur Entfärbung wurde ein Gel zunächst 2-3 Minuten in H₂O E-Pure aufgekocht und nach Abkühlung auf Raumtemperatur solange in 7 % Essigsäure inkubiert, bis der Gelhintergrund eine klare Erscheinung annahm (abschließend waschen in H₂O).

DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG UND BESTIMMUNG DES REINHEITSGRADES

Mit Hilfe einer digitalen Kamera (Gel Print 2000i, MWG-Biotech) wurden SDS-Gele direkt nach der Entfärbung aufgenommen und als Pixeldateien im TIFF-Format gespeichert. Im Anschluß wurden mit dem Softwareprogramm RFLP-Scan Plus (Version 3.0, Scanalytics, Billerica, Maryland) die Intensitäten der Proteinbanden und daraus der Reinheitsgrad bestimmt. Der Reinheitsgrad einer Probe ist der prozentuale Anteil der betreffenden Proteinbande an allen detektierten Proteinbanden innerhalb einer Laufspur.

2.10 N-TERMINALE SEQUENZIERUNG NACH EDMAN

In Zusammenarbeit mit Herrn Priv. Doz. Dr. Heinrich-Hubert Thole wurden verschiedene Proteine mittels N-terminaler Sequenzierung nach Edman identifiziert. Voraussetzung: Es mußte sich dabei um eine mittels SDS-PAGE scharf aufgetrennte und nach Coomassie Brilliant Blau-Färbung sichtbare Proteinbande handeln.

ELEKTROTRANSFER AUF PVDF-MEMBRAN

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteinbande wurde nach dem *semi dry* Transfer-Verfahren in 50 mM Natriumborat (pH 9) / 20 % Methanol auf PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt [vgl. Kratzin *et al.*, 1989; Bökenkamp, *et al.*, 1994]. Bis zum Ausschneiden der Proteinbande für die Sequenzierung wurde die transferierte Probe bei 4 °C aufbewahrt. Ansatz und Durchführung des Elektrotransfers:

- Stammfärbelösung: 40 % Methanol / 1 % Essigsäure / 0,1 % Coomassie BB
- verdünnte Färbelösung: Stammfärbelösung 1:4 mit 40 % Methanol
- PVDF-Membran (Fluorotrans, Fa. Pall, Dreieich) 3-5 sec in 100 % Methanol, dann 5-15 min in Transferpuffer
- 6 Lagen Whatmanpapier 5 - 15 Minuten in Transferpuffer äquilibrieren
- SDS-Gel mit Transferpuffer spülen
- Transfer: 3 Lagen Whatmanpapier / PVDF-Membran / SDS-Gel / 3 Lagen Whatmanpapier in *semi-dry*-Blotkammer (Semiphor TE 70, Hoefer Scientifics) von Anode (+) zu Kathode (-) blasenfrei übereinanderlegen; Laufbedingungen: 4 °C/125 mA/30 min
- PVDF-Membran zweimal waschen mit H₂O E-pure, 2 min färben mit verdünnter Färbelösung
- waschen mit 50 % Methanol und H₂O E-pure, trocknen bei Raumtemperatur auf Glas

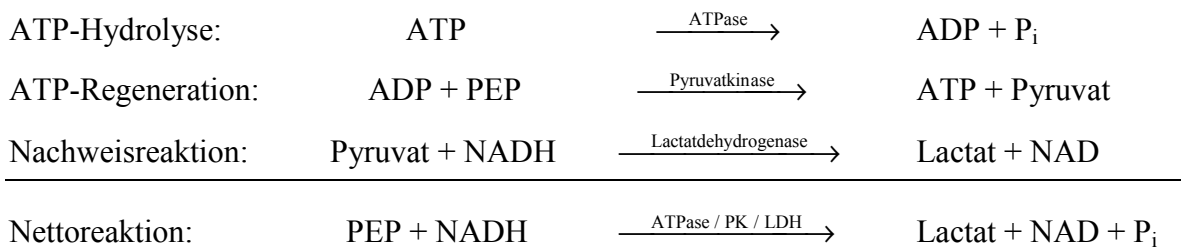
AMINOSÄURESEQUENZIERUNG

Die N-terminale Sequenzierung der auf PVDF-Membran transferierten Proteinbanden wurde von Herrn Priv. Doz. Dr. Heinrich-Hubert Thole mit einem A477-Gasphasensequenator und gekoppeltem 120A PTH-Analysator (Perkin Elmer Applied Biosystems) durchgeführt. Die Identifizierung der ersten 10 Aminosäuren reichte aus, um mittels Datenbankrecherche (FASTA-Homologiesuche, *European Bioinformatics Institute* EBI; <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>) das entsprechende Protein eindeutig nachzuweisen.

2.11 BESTIMMUNG DER ATPASE AKTIVITÄT

2.11.1 ENZYMGEKOPPELTER LDH/PK-TEST

Der Lactatdehydrogenase/Pyruvatkinase (LDH/PK)-Test beruht auf dem Prinzip des gekoppelten Enzymtests [Bergmeyer, 1984]. Durch Umsetzung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat regeneriert die Pyruvatkinase von der ATPase gebildetes ADP zu ATP. Pyruvat wird von der Lactatdehydrogenase unter Verbrauch von NADH in Lactat umgesetzt.



Wie aus der Nettoreaktion hervorgeht, bleibt die ATP-Konzentration über den gesamten Meßzeitraum konstant. Die ATP-Hydrolyserate kann deshalb direkt über die lineare Abnahme der NADH-Konzentration photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. Die Testlösung wurde 1-2 Stunden vor der Messung angesetzt und auf Eis gelagert (ca. 1 Tag stabil). Ansatz für zwei Messungen nach Standardvariante A (s. unten):

- Standard-Testpuffer ¹⁾ 870 µl
- LDH/PK-Suspension (Boehringer) 10 µl
- 0,4 M Phosphoenolpyruvat ²⁾ 10 µl
- 0,025 M NADH ^{2), 3)} 10 µl

¹⁾ 50 mM HEPES (pH 7,5) / 10 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 1 mM DTT / 5 % Glycerin;

²⁾ Stammlösungen in H₂O bei -20 °C gelagert; ³⁾ aus 0,25 M Stammlösung mit H₂O 1:10 verdünnt

STANDARDVARIANTE A

- 450 µl Testlösung in einer Halbmikroküvette (QS Hellma, 0,4 x1 cm) auf 37°C thermostatisieren (Spektralphotometer Hitachi U-3000)
- 25 µl der gegen 50 mM HEPES, pH 7,5 / 10 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 0,1 mM DTT dialysierten Probe zugeben und vermischen; NADH-Änderung über 100 sec verfolgen
- Initiation der ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 25 µl 0,1 M ATP (pH 6-7)
- Nullkontrollen: 450 µl Testlösung + 25 µl Puffer bzw. MBP + 25 µl 0,1 M ATP

VARIANTE B

War gemäß Variante A noch keine ATPase-Aktivität detektierbar, so wurde die Testlösung konzentrierter angesetzt und mit einem größeren Volumen der Proteinlösung (ATPase) versetzt. Um den Verbrauch der ATPase zu minimieren, erfolgten Messungen in Mikroküvetten (z. B. 75 µl konzentrierte Testlösung + 67,5 µl Proteinlösung (ATPase) + 7,5 µl 0,1 M ATP).

BERECHNUNG VON ATP-UMSATZ UND SPEZIFISCHER ATPASE-AKTIVITÄT

Da im LDH/PK-Test pro Mol hydrolysiertem ATP ein Mol NADH verbraucht wird, ließ sich nach dem Gesetz von Lambert und Beer (Kapitel 2.8.2, Seite 33) der ATP-Umsatz direkt aus der Steigung der linearen NADH-Abnahme bestimmen:

$$u_{\text{ATP}} = \frac{\Delta c_{\text{ATP}}}{\Delta t} = \frac{\Delta c_{\text{NADH}}}{\Delta t} = \frac{\Delta E_{\text{NADH},340\text{nm}}}{\Delta t \cdot \epsilon_{\text{NADH},340\text{nm}} \cdot l} = 1587,3 \cdot \frac{\Delta E_{\text{NADH},340\text{nm}}}{\Delta t}$$

u_{ATP} : ATP-Umsatz in der Testlösung [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]; $\Delta E/\Delta t$: Extinktionsänderung pro Minute; $\epsilon_{\text{NADH},340\text{nm}}$: Extinktionskoeffizient NADH = $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Bergmeyer, 1984]; l : Schichtdicke der Küvette = 1 cm.

Der ATP-Umsatz bezogen auf die eingesetzte ATPase-Konzentration ergibt die spezifische ATPase-Aktivität a_{ATP} :

$$a_{\text{ATP}} = \frac{u_{\text{ATP}}}{c_{\text{ATPase}}}$$

a_{ATP} : spezifische ATPase Aktivität [min^{-1}] = Umsatz mol ATP pro mol Protein pro Minute; c_{ATPase} : Konzentration der ATPase in der Testlösung [$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$].

2.11.2 HYDROLYSE VON $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Alternativ zum oben beschriebenen LDH/PK-Test wurde die ATPase-Aktivität durch Hydrolyse von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ gemessen. Dabei erfolgte zunächst eine Inkubation der betreffenden Proteinlösung in Gegenwart der radioaktiv markierten Substanz bei 37°C , wobei in definierten Zeitabständen Aliquote entnommen und in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden. Nach Abschluß einer Testreihe wurde hydrolysiertes $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, im Phospho-Imager detektiert und aus der Intensität quantifiziert [Kwok *et al.*, 1995]. Ansatz:

- Σ 100 μl ; Puffer: 50 mM HEPES (pH 7,5) / 10 mM KCl / 5 mM MgCl_2 / 1 mM DTT
- Zugabe von 0,2 mM ATP (1,4 μCi $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$)
- Initiation der Reaktion durch Zugabe von 1 – 8 μM Protein in Puffer
- Entnahme von 5 μl -Aliquoten (0 – 3 h), sofort einfrieren in flüssigen Stickstoff bis zur
- Auftragung: je 1 – 2 μl pro Aliquot auf PEI-Cellulose (Merck) im Abstand von 1 cm
- Laufmittel 0,25 M LiCl – 0,5 M Na-Acetat
- getrocknete Platten 1-3 h auf Phospho-Imagerplatte legen; im Phospho-Imager auswerten
- Negativkontrollen: Puffer und N-terminaler Fusionspartner (GST, MBP).

2.12 ATP-BINDUNGSTESTS

2.12.1 FLUORESZENZTITRATION MIT TNP-ATP

Mit Hilfe des ATP-Analogons 2'-(oder 3')-O-(trinitrophenyl)adenosin 5'-triphosphat (TNP-ATP) wurden ATP-Bindungsstudien durchgeführt. TNP-ATP ist ein Fluorophor (Excitation 410 nm, Emission 535 nm), bei dem am Ribosering des ATP eine TNP-Gruppe kovalent substituiert ist [Hiratsuka, 1982]. Das Meßprinzip besteht darin, daß durch die Einlagerung des Fluorophors in die ATP-Bindungstasche des betreffenden Proteins die Umgebung der TNP-Gruppe im Vergleich zu in Lösung befindlichem TNP-ATP hydrophober wird und daraus eine Verstärkung des Fluoreszenz-Emissionssignals bei 535 nm resultiert [z. B. Hiratsuka, 1975 und 1982]. Mittels Fluoreszenztitration wurde auf diese Weise die ATP-Bindung von wt- und Δ F508-MBP-NBD1 untersucht. Als Positivkontrolle diente RecA-Protein [Möller, 1996], als Negativkontrolle MBP. Geräteparameter und Durchführung:

- Fluorimeter RRS 1000 (Kratos-Schoeffel) mit Gittermonochromator
- auf 22 °C thermostatisierte Quarzküvetten 0,4 x 1 cm (Hellma) ohne Rührung
- Excitation 410 nm, Spaltbreite: 3 mm, Detektorempfindlichkeit 10 μ A
- Emission 535 nm, Spaltbreite 3 mm, Detektorempfindlichkeit 1 μ A
- Probenvolumen der Vorlage: 600 μ l, 0 – 4 μ M Protein, dialysiert in Puffer (= 50 mM HEPES pH 7,5-10 mM KCl-5 mM MgCl₂-0,1 mM DTT
- Zugabe von TNP-ATP von 0–15 μ M

Die mittels Fluoreszenztitration erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich mit einer zweiten Methode (analytische Ultrazentrifugation, siehe Kapitel 2.13.1, Seite 40) überprüft.

2.12.2 BINDUNG AUF NITROCELLULOSEMEMBRAN

Dieser von Miller und Weissbach [1974] entwickelte Test macht sich die Tatsache zunutze, daß binäre Protein-Nukleotid-Komplexe auf Nitrocellulosemembran binden können. Hierzu wurden analog Pieper [1995] zunächst 0,5-2 μ mol/l Protein (MBP, wt-MBP-NBD1, Δ F508-MBP-NBD1) in 50 mM HEPES (pH 7,5) / 10 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 0,1 mM DTT bei verschiedenen ATP-Konzentrationen (0-100 μ mol/l, \sim 1 μ Ci [α ³³P]-ATP) inkubiert und auf angefeuchtete Nitrocellulosefilter (Sartorius, Porengröße 0,45 μ m) in einer speziellen Absaugapparatur appliziert. Nach zweimaligem Waschen mit je 0,75 ml Puffer wurden die Membranen ohne weitere Trocknung direkt für die Szintillationszählung (Messung der Cerenkov-Strahlung) eingesetzt. Nach Pieper [1995] können auf diese Weise Bindungskonstanten von $\geq 10^3$ M⁻¹ bestimmt werden.

2.13 ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION (UZ)

In Zusammenarbeit mit Herrn Priv. Doz. Dr. Claus Urbanke (Institut für Biophysikalische Chemie, MHH) wurden Sedimentationsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge (Optima XL-A, Beckman) durchgeführt. Hierbei wurde das in Lösung befindliche Protein in einem durch Zentrifugation erzeugten Schwerefeld (maximal 300.000 x g) zu vollständiger Sedimentation gezwungen und das Sedimentationsverhalten mittels Messung der Extinktion bei 280 nm in Abhängigkeit von Ort und Zeit verfolgt. Mehrere zu verschiedenen Zeitpunkten gemessene Konzentrationsprofile dokumentierten den Verlauf eines UZ-Experiments. Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsläufe erfolgten im Rahmen dieser Arbeit nicht. Durchführung:

- Messung in sektorförmigen Zwei-Kanal-Zellen; Puffer: 5 mM Phosphat pH 8,0 mit Variationen
- Füllungen: ~350 µl Proteinlösung ($OD_{280} = 0,25 - 1,0$) bzw. ~380 µl Referenz (Puffer)
- Rotoren: An-50 Ti, An-60 Ti (7-, 3-Loch-Rotoren), Temperatur: 20 °C; Detektion: 280 ± 1 nm; Datenaufnahme: IBM-kompatibler PC
- Drehzahl: je nach Sedimentationsverhalten der Probe 10000 - 50000 U/min
- die Füllung der Zellen und die Bedienung der analytischen UZ erfolgte von Herrn Priv. Doz. Dr. Claus Urbanke

2.13.1 KOSEDIMENTATION MIT TNP-ATP

Um eine Wechselwirkung des ATP-Analogons 2',3',-O-(2, 4, 6-Trinitrophenyl)adenosin 5'-Triphosphat (TNP-ATP) mit dem betreffenden Protein fluoreszenzunabhängig und qualitativ nachweisen zu können, erfolgten Sedimentationsläufe bei zweifachem Fluorophorüberschuß in 50 mM HEPES (pH 7,5) / 10 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 0,1 mM DTT und zeitsynchroner Detektion bei 280 und 410 nm. TNP-ATP weist bei 410 nm ein Absorptionsmaximum mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 26400 \pm 400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ auf [Hiratsuka *et al.*, 1982].

2.13.2 BESTIMMUNG DES SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENTEN

In der vorliegenden Arbeit wurde der Sedimentationskoeffizient für monodispers sedimentierende Spezies mittels numerischer Integration der Lammschen Differentialgleichung (Lammsche DGL) berechnet [Lamm, 1929]. Für polydispers sedimentierende Spezies erfolgte eine Bestimmung der apparenten S-Wertverteilung mittels Parametrisierung nach Gralén und Lagermalm [1951]. Im folgenden sind die einzelnen Auswertemethoden theoretisch erläutert.

KLASSISCHE BESTIMMUNG DES SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENTEN AUS DER MITTLEREN BANDENPOSITION

Für ein mit konstanter Geschwindigkeit v sedimentierendes Teilchen der Masse m folgt aus dem geltenden Kräftegleichgewicht *Zentrifugalkraft minus Auftriebskraft = Reibungskraft*

$$m \cdot \omega^2 \cdot r \cdot (1 - \bar{V} \rho_L) = f \cdot v \quad (1)$$

die Definition für den Sedimentationskoeffizienten s

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M \cdot (1 - \bar{V} \rho_L)}{N_A \cdot f} \quad (2)$$

v : Geschwindigkeit des sedimentierenden Teilchens [$\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$]; ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors [sec^{-1}]; r : Abstand des Teilchens vom Rotormittelpunkt [m]; M : Molmasse der sedimentierenden Spezies [$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$]; N_A : Avogadro-Zahl = $6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$; ρ_L : Dichte des Lösungsmittels [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]; \bar{V} : partielles spezifisches Volumen [$\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$]; f : Reibungskoeffizient [$\text{kg} \cdot \text{sec}^{-1}$].

Der Sedimentationskoeffizient wird auch als SVEDBERG-Konstante oder S-Wert bezeichnet und in SVEDBERG-Einheiten ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ sec}$) angegeben. Der S-Wert faßt ausschließlich die vom sedimentierenden Teilchen abhängenden Eigenschaften zusammen und ist unabhängig von den Zentrifugationsbedingungen. Da die Sedimentationsgeschwindigkeit v des Teilchens als zeitliche Änderung der Position vom Rotormittelpunkt $v = dr/dt$ beschrieben werden kann, folgt aus Integration von Gleichung (2)

$$\ln \left(\frac{r(t)}{r_m} \right) = \omega^2 \cdot s \cdot t \quad (3)$$

$r(t)$: Abstand des sedimentierenden Teilchens vom Rotormittelpunkt zum Zeitpunkt t ; r_m : Abstand des Meniskus vom Rotormittelpunkt.

Bei Auftragung des natürlichen Logarithmus der Wanderungsstrecke $\ln(r(t)/r_m)$ über die Zeit ist damit aus der Steigung der Geraden eine experimentelle Bestimmung des S-Wertes für die sedimentierende Spezies möglich. Bei der Zentrifugation wirkt die Diffusion der Schwerkraft entgegen. Daher bildet sich während der Sedimentation keine scharfe Grenzschicht, sondern eine mehr oder weniger breite Bande aus. Für die S-Wertbestimmung wird jeweils die mittlere Bandenposition herangezogen.

SIMULATION DES UZ-LAUFS MIT DER LAMMSCHEN DGL

Eine andere Möglichkeit der S-Wertbestimmung bietet die Simulation eines UZ-Laufs mit der Lammschen DGL (4) [Lamm, 1929]. Diese beschreibt vollständig die Konzentrationsänderung einer monodispers sedimentierenden Spezies in einer sektorförmigen Zelle in Abhängigkeit von Zeit und Ort unter der Annahme konstanter Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten.

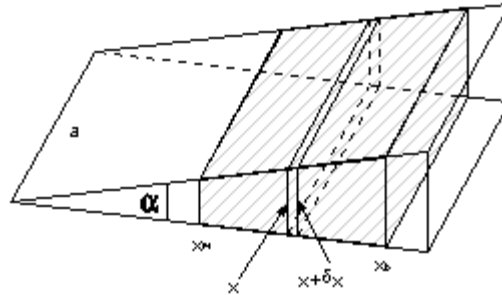


Abbildung 2-1: Sektorförmige Zelle für die analytische UZ

Nach: Vorlesungsskript Biophysikalische Chemie, Priv. Doz. Dr. Claus Urbanke, MHH

Die Konzentrationsänderung in einem Ausschnitt der Zelle mit der Länge dx ist gegeben durch

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{x} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left[x \cdot \left(D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} - s \cdot \omega^2 \cdot x \cdot c \right) \right] \quad (4).$$

x : Abstand vom Rotormittelpunkt [m], analog r in Glg. (3); D : Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$]; c : Stoffkonzentration [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$].

Die Lammsche DGL (4) kann nicht analytisch gelöst werden. Mit Hilfe des von Kindler [1997] entwickelten Computerprogramms AKKUPROG ist jedoch eine numerische Integration dieser Differentialgleichung möglich. Dabei werden unter Vorgabe von Anfangsbedingungen ($c(r)$ zum Zeitpunkt t) durch Variation der Modellparameter die errechneten Konzentrationsprofile bestmöglich an die experimentell gemessenen Werte angepaßt. Das Ergebnis liefert den Diffusions- und Sedimentationskoeffizienten. Der Diffusionskoeffizient ist über die Temperatur T und die Boltzmann-Konstante k mit dem Reibungskoeffizienten gemäß $D = (k \cdot T) / f$ verknüpft. Damit folgt aus Gleichung (2) für das Molekulargewicht der sedimentierenden Spezies

$$M_r = \frac{s \cdot R \cdot T}{D \cdot (1 - \bar{V} \rho_L)} \quad (5).$$

M_r : apparente Molmasse der sedimentierenden Spezies [$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$]; R : universelle Gaskonstante $R = k \cdot N_A = 8,314 \text{ [J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}]$.

AKKUPROG berechnet aus Gleichung (5) die apparente Molmasse M_r der sedimentierenden Spezies (zur Dichte des Lösungsmittels und dem partiellen spezifischen Volumen s , unten). Polydispers sedimentierende Makromoleküle (Aggregate) mit unterschiedlichen S -Werten führen zu starker Bandenverbreiterung. In diesem Fall wird mit zu hohem Diffusionskoeffizienten bzw. zu niedrigem Molekulargewicht angepaßt.

PARAMETRISIERUNG NACH GRALÉN UND LAGERMALM [1951]

Die Lammsche DGL kann das Sedimentationsverhalten hochmolekularer Aggregate nicht beschreiben. Auch ist eine klassische Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten aus der mittleren Bandenposition aufgrund der großen Bandenverbreiterung inakkurat. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, den UZ-Sedimentationslauf nach Gralén und Lagermalm [1951] auszuwerten. Hierbei werden die beiden unabhängigen Variablen Zeit und Ort zu einer einzigen zusammengefaßt. Für dieses als Parametrisierung bezeichnete Verfahren eignet sich der Sedimentationskoeffizient, welcher gemäß Gleichung (3) als

$$s_{r,t} = \frac{\ln\left(\frac{r}{r_m}\right)}{\omega^2 \cdot t} \quad (6)$$

gegeben ist. Für jeden Meßpunkt in jedem Konzentrationsprofil des UZ-Laufs, also für alle Konzentrationen und Orte, berechnet AKKUPROG nach Gleichung (6) nun die Größe $s_{r,t}$. Im Anschluß werden Konzentrationen mit gleichem $s_{r,t}$ gemittelt und gegen $s_{r,t}$ aufgetragen. Für diese Berechnung muß zuvor ein S-Wert-Intervall wählbarer Breite („Auflösung“) definiert werden. Die resultierende S-Wertverteilung hängt von den Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten aller sedimentierenden Spezies ab. Aus der ersten Ableitung einer solchen S-Wertverteilung kann das apparente S-Wertmaximum $s_{app,max}$ abgelesen werden, welches bei monodispers sedimentierenden Spezies unter Berücksichtigung der verwendeten Intervallbreite dem Sedimentationskoeffizienten entspricht. Bei hochmolekularen Aggregaten mit breiter S-Wertverteilung liefert das Maximum einen Anhaltspunkt, bei welchem apparenten S-Wert die Mehrzahl der Spezies sedimentiert.

2.13.3 BESTIMMUNG DES PARTIELLEN SPEZIFISCHEN VOLUMENS

Die partiellen spezifischen Volumina der Proteine wurden gemäß Cohn und Edsall [1943] aus der Aminosäurezusammensetzung kalkuliert und nach Durchschlag [1986] auf 20 °C umgerechnet. Daraus ergaben sich Werte [in $\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$] von $0,7371 \cdot 10^{-3}$ (MBP), $0,7376 \cdot 10^{-3}$ (wt-MBP-NBD1) und $0,7375 \cdot 10^{-3}$ (Δ F508-MBP-NBF1). Der relative Fehler zwischen experimentellen und kalkulierten Werten beträgt für globuläre Proteine nach Perkins [1986] maximal 1 % und für nicht globuläre maximal 3 % [Durchschlag, 1986; Perkins, 1986]. Deshalb wurde vereinfachend für alle Proteine ein partielles spezifisches Volumen von $0,74 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ angenommen.

2.13.4 UMRECHNUNG VON DIFFUSIONS- UND SEDIMENTATIONS-KOEFFIZIENTEN AUF 20 °C

Diffusions-, und Sedimentationskoeffizient sind von Temperatur und Viskosität des Lösungsmittels abhängig. Zum Vergleich rechnet AKKUPROG den S-Wert auf 20 °C und Wasser als Lösungsmittel nach Gleichung (7) um [Kindler, 1997]

$$s_{\text{Wasser}} = s_{\text{Lsg}} \cdot \eta_{\text{rel,Lsg}} \cdot \frac{1 - \bar{V} \cdot \rho_{\text{Wasser}}}{1 - \bar{V} \cdot \rho_{\text{rel,Lsg}} \cdot \rho_{\text{Wasser}}} \quad (7)$$

ρ_{Wasser} : Dichte von Wasser bei 20 °C = 998,23 kg·m⁻³; $\eta_{\text{rel,Lsg}}$, $\rho_{\text{rel,Lsg}}$: Verhältnis von Viskosität bzw. Dichte der Lösung relativ zu Viskosität bzw. Dichte von Wasser bei 20 °C.

Für den Diffusionskoeffizienten gilt $D_{\text{Wasser}} = D_{\text{Lsg}} \cdot \eta_{\text{rel,Lsg}}$.

2.13.5 BERECHNUNG THEORETISCHER MINDESTMOLEKULARGEWICHTE

Das theoretische wasserfreie Volumen sphärischer Monomere ist aus der Molmasse und dem partiellen spezifischen Volumen nach Gleichung (8) berechenbar [van Holde *et al.*, 1998]

$$V_{\text{Kugel,theo}} = \frac{M \cdot \bar{V}}{N_A} = \frac{4}{3} \cdot r_g^3 \quad (8).$$

Daraus ergibt sich der geometrische Radius r_g für die wasserfreie Kugel

$$r_g = \sqrt[3]{\frac{3 \cdot M \cdot \bar{V}}{4 \cdot N_A \cdot \pi}} \quad (9).$$

Für den Reibungskoeffizienten sphärischer Körper gilt das Stokes'sche Reibungsgesetz

$$f_0 = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_g \quad (10).$$

Nach Einsetzen von Gleichung (9) und (10) in Gleichung (2) folgt

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{V} \rho_L)}{N_A \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \sqrt[3]{\frac{3 \cdot M \cdot \bar{V}}{4 \cdot N_A \cdot \pi}}} \quad (11a)$$

bzw. nach Umformen

$$M_{\text{theo,Kugel}} = \sqrt{\frac{3 \cdot \bar{V}}{4 \cdot N_A \cdot \pi}} \cdot \left(\frac{s \cdot N_A \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta}{1 - \bar{V} \cdot \rho_L} \right)^{3/2} \quad (11b).$$

Da es kein kompakteres Teilchen als eine (wasserfreie) Kugel gibt, beschreibt Gleichung (11b) das zu einem bestimmten S-Wert zugehörige theoretische Mindestmolekulargewicht. Mit der Viskosität $\eta = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{sec}$, der Dichte $\rho = 998 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ und dem partiellen spezifischen Volumen $\bar{V} = 0,74 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ergibt sich

$$M_{\text{theo,Kugel}} = 1,713 \cdot 10^{-14} \cdot (\text{s} \cdot 4,341 \cdot 10^{22})^{3/2} \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1} \quad (11c).$$

Mit Hilfe von Formel (11c) erfolgte eine Abschätzung der theoretischen Mindestmolekulargewichte (in Lösung) aus den experimentell bestimmten S-Werten und apparenten S-Wertmaxima der jeweiligen Spezies. Desweiteren wurde ein Vergleich zu experimentell bestimmten Molekulargewichten und S-Werten von Referenzproteinen (Lysozym, Myoglobin, Chymotrypsin, β -Lactoglobulin, Ovalbumin, Rinderserumalbumin und Urease) gezogen [Molekulargewichte und S-Werte siehe Anhang; Daten aus Winter und Noll, 1998].

2.14 CIRCULARDICHROISMUS (CD)

Proteine besitzen die Eigenschaft, links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren [Cantor und Schimmel, 1980]. Diese als Circular-dichroismus bezeichnete optische Aktivität wird unter anderem durch die in der Probe enthaltenen chiralen Sekundärstrukturelemente, wie α -Helix und β -Faltblatt hervorgerufen. Mittels CD-Spektroskopie können somit Aussagen über die Sekundärstrukturen aufgereinigter Proteine getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck entsprechende Untersuchungen an der MBP-NBD1 und am MBP durchgeführt. Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Uwe Pieper am Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Durchführung und Meßparameter:

- Jasco-710-Spektralanalyse (Groß-Zimmern); Eichung mit Camphersulfonsäure
- Meßbereich 260-180 nm; Temperatur 25 °C; Auflösung 0,5 nm; Zeitkonstante 0,25 cm
- Aufnahmegeschwindigkeit 50 nm/min; 10 – 15 Akkumulationen pro Spektrum
- Zwei bis Vierfachbestimmungen bei zusätzlicher Aufnahme eines Puffer-Referenzspektrums unter identischen Bedingungen
- Küvettschichtdicke 0,05 cm; benötigtes Probenvolumen ca. 250 μl

Vor Aufnahme eines CD-Spektrums wurde das betreffende Protein intensiv (mind. 3 Tage) gegen 5 mM Phosphatpuffer pH 8,0 dialysiert und bei 4 °C gelagert. Vor der Messung erfolgte nach zehnmütiger Zentrifugation bei 15000 x g / 4 °C eine Proteinbestimmung aus dem UV-Absorptionsspektrum.

2.14.1 DARSTELLUNG VON CD-SPEKTREN

Mit Hilfe von Polarisationsfiltern bestimmt das Spektralpholarimeter die Intensitäten I_R und I_L von rechts und links zirkular polarisiertem Licht. Als Meßwert wird die über Gleichung (12) definierte Elliptizität θ_λ

$$\tan \theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad (12)$$

in Form von θ_λ mit der Einheit [mdeg] ausgegeben. Nach Korrektur durch Subtraktion der θ_λ -Werte des Pufferspektrums läßt sich über

$$\theta_{\lambda,M} = \theta_\lambda / (c \cdot l \cdot 10) \quad (13)$$

$\theta_{\lambda,M}$: molare Elliptizität [mdeg·cm²·dmol⁻¹]; c : Konzentration an Aminosäuren in der Lösung [mol·l⁻¹]; l : Schichtdicke der Küvette [cm]

die auf die Anzahl der Polymerisationseinheiten normierte molare Elliptizität zu jeder Wellenlänge berechnen. Jasco bietet hierzu ein entsprechendes Softwareprogramm an. Die Auftragung von $\theta_{\lambda,M}$ über die Wellenlänge ergibt das CD-Spektrum.

2.14.2 BERECHNUNG VON SEKUNDÄRSTRUKTURANTEILEN

Die Extraktion oder Dekonvolution von Sekundärstrukturdaten aus CD-Spektren von Proteinen ist auf halbempirischem Weg über die Anwendung computergestützter Auswertalgorithmen möglich [Überblick: Greenfield, 1996]. Die Grundlage solcher Berechnungen bildet dabei Gleichung (14)

$$\theta = f_\alpha \cdot \theta_\alpha + f_\beta \cdot \theta_\beta + \dots + f_{rc} \cdot \theta_{rc} \quad (14),$$

aus der hervorgeht, daß die Gesamte elliptizität θ aus einer Linearkombination der Elliptizitäten der einzelnen Sekundärstrukturelemente zusammengesetzt ist [Cantor und Schimmel, 1980]. Mit Hilfe von CD-Referenzspektren, deren Sekundärstrukturen aus röntgenkristallographischen Untersuchungen bekannt sind, erfolgt über die obige Gleichung für jede Wellenlänge eine bestmögliche Anpassung an die jeweiligen experimentell bestimmten CD-Daten. Das Ergebnis liefert die Sekundärstrukturanteile f . In dieser Arbeit kamen drei Auswertprogramme zur Anwendung. Auf diese Weise sollte die Genauigkeit und Verlässlichkeit der errechneten Sekundärstrukturanteile überprüft werden. Im folgenden sind die drei Methoden näher beschrieben.

AUSWERTUNG NACH YANG [Chang *et al.*, 1978; Yang, 1986]

Dieser Algorithmus verwendet einen Satz aus vier Basisspektren (α -Helix, β -Faltblatt, β -turn und Reststruktur). Die Iteration erfolgt nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Die Anpassung ist dabei unter der Bedingung eingeschränkt, daß am Ende die Summe der errechneten Sekundärstrukturanteile $f=1$ (100 %) ergeben muß. Die für die Auswertung nötige Software war im Jasco-Lieferumfang enthalten.

AUSWERTUNG NACH SELCON II [Woody und Sreerama, 1993, 1994a und b]

Das Dekonvolutionsprogramm SELCON II (*self consistent method*) enthält einen Datensatz von 17 Referenzproteinen mit bekannten Sekundärstrukturen. Zunächst werden diese mit steigender Fehlerquadratsumme in bezug auf das anzupassende Spektrum angeordnet. Im Anschluß werden die Spektren mit der größten Abweichung gemäß van Stokkum [1990] eliminiert. Im zweiten Schritt wird der Datensatz des experimentell bestimmten Spektrums in die Anpassung integriert und eine erste Annahme über die Sekundärstruktur des Proteins getroffen. Dann wird die Sekundärstruktur berechnet und durch die erste Annahme ersetzt. Der Vorgang wird solange wiederholt, bis die „Selbstkonsistenz“ erreicht ist. Als einschränkender Parameter wurde für den Gesamtstrukturgehalt eine Abweichung von maximal $100 \pm 10\%$ vorgegeben. Entsprechend wurden die erhaltenen Sekundärstrukturdaten nachträglich auf 100 % normiert. SELCON II berechnet im Gegensatz zur Vorgängerversion zusätzlich den Poly-Prolin-II-loop-Strukturanteil [Woody und Sreerama, 1994a]. Das SELCON II-Softwareprogramm ist in einem von Gilbert Déléage am *Institut de Biologie et Chimie des Protéins* am CNRS in Lyon entwickelten Programmpaket enthalten und wurde kostenlos per *file transfer protocol (ftp)* bezogen [ftp.ibcp.fr].

AUSWERTUNG NACH CDNN [Böhm *et al.*, 1992]

Das ebenfalls kostenlos erhältliche Dekonvolutionsprogramm CDNN [Version 2.1; <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>] berechnet Sekundärstrukturdaten aus CD-Spektren mit Hilfe eines neuronalen Netzwerks (NN). Zu dessen genauer Beschreibung und Funktionsweise sei auf die Originalliteratur [Böhm *et al.*, 1992] verwiesen. Neuronale Netzwerke werden zunächst in einer sogenannten Lernphase trainiert. Im vorliegenden Fall wird dabei die Gewichtung der neuronalen Verbindungen so lange optimiert, bis die CD-Spektren der Referenzproteine den entsprechenden Sekundärstrukturdaten mit geringstem Fehler zugeordnet sind. Die Lernphase nimmt mehrere Stunden Rechenzeit in Anspruch. Die eigentliche Auswertung (Abruf-Phase) dagegen dauert nur Bruchteile von Sekunden. Das von Böhm *et al.* erhältliche Programm CDNN enthält ein trainiertes neuronales Netzwerk. CDNN berechnet die Sekundärstrukturanteile α -Helix, antiparalleles und paralleles β -Faltblatt, β -turn und Reststruktur. In der Regel betrug der errechnete Gesamtstrukturgehalt $100 \pm (2-7)\%$ und war damit im Rahmen der erlaubten Fehlerbreite. Abweichungen von mehr als 10 % bedeuteten dagegen eine unzuverlässige Auswertung und wurden deshalb nicht verwendet [CDNN *instruction manual*, 1997].

3 ERGEBNISSE

3.1 ÜBERBLICK: KLONIERTE NBD1-KONSTRUKTE

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene in Größe und Position variierende *NBD1*-Genabschnitte kloniert und in unterschiedlichen Systemen exprimiert. Die nachfolgende Abbildung 3-1 dient diesbezüglich als Überblick und gibt die relative Lage der jeweiligen NBD1-Konstrukte im CFTR-Protein an.

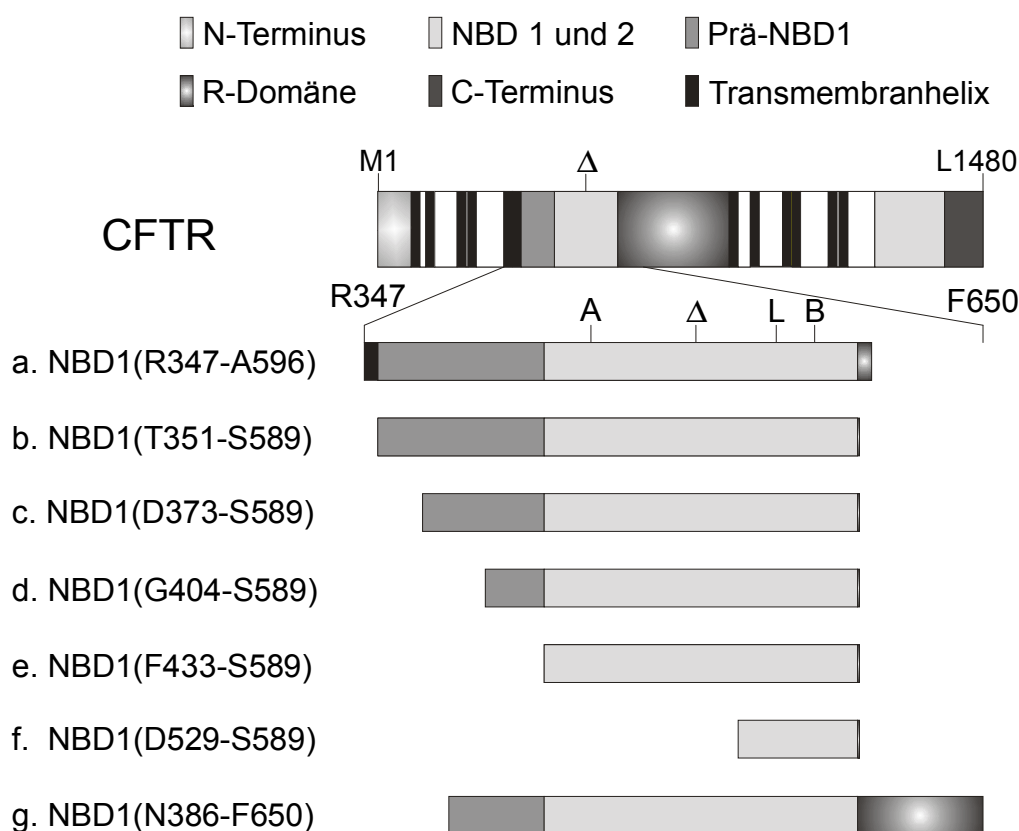


Abbildung 3-1: Klonierte und exprimierte CFTR-NBD1-Konstrukte und deren relative Lage im CFTR-Protein

Maßstabgetreue Darstellung der Domänen nach Riordan *et al.* [1989]. A, L, B = Position der Walker-Motive A und B und des LSGGQ-Motivs; Δ = Position von F508. Die NBD1 nach Riordan (konstant hellgrau) ist von F433 bis I586, die R-Domäne (dunkelgrau mit hellem Mittelbereich) von S589 bis L859 definiert. Der konstant mittelgrau dargestellte Bereich zwischen der sechsten Transmembrandomäne (TM) und dem Beginn der NBD1 nach Riordan (T351-N432) wird als Prä-NBD1 bezeichnet.

Die maximale Ausdehnung der NBD1 im CFTR-Protein ist N-terminal durch die sechste Transmembranhelix (schwarzgrau) und C-terminal durch die R-Domäne (dunkelgrau mit hellem Mittelbereich) begrenzt (vgl. auch Abbildung 1-1 in der Einleitung). Bis auf das Konstrukt f, welches als Kontrolle fungierte,

enthielten alle Peptidsequenzen die charakteristischen, an der Nukleotidbindung beteiligten Walker-Motive A und B [Walker *et al.*, 1982] sowie das LSGGQ-Motiv und die Zentralregion (Motiv D). In letzterer befindet sich die Aminosäure F508, die in der obigen Abbildung durch ein Δ gekennzeichnet ist. Die nach Riordan *et al.* [1989] definierte NBD1 entspricht dem Abschnitt F433 bis I586 (konstant hellgrau). Die R-Domäne (dunkelgrau mit hellem Mittelbereich) beginnt mit der Aminosäure S589 und endet mit der Aminosäure L859. In einigen Konstrukten ist der als Prä-NBD1 bezeichnete Bereich (konstant mittelgrau) von T351 bis N432 vollständig (a, b) oder teilweise (c, d, g) enthalten. Das Konstrukt g enthält C-terminal Sequenzabschnitte aus der R-Domäne.

PCR-EXPRESSIONSKLONIERUNG

Die PCR-Expressionsklonierung erwies sich als effiziente Methode, um alle gewünschten NBD1-Vektorkonstrukte zu generieren. Dabei wurden in einer vorgeschalteten PCR mit Hilfe speziell synthetisierter Oligonukleotide Schnittstellen für bestimmte Restriktionsendonukleasen an den Enden der entsprechenden NBD1-Genabschnitte eingeführt, um eine am Leseraster orientierte Ligation in den betreffenden Zielvektor zu ermöglichen. Im Anschluß wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert, wobei sich die Elektroporation mit durchschnittlich 100 Kolonien pro Agarplatte im Vergleich zur chemischen Transformation mit 1-10 Kolonien als bedeutend effizientere Methode erwies. Das in Abbildung 3-2 dargestellte, Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel stellt exemplarisch die auftretenden Produkte im Zuge der PCR-Expressionsklonierung der für das Konstrukt g (s. oben) codierenden DNA-Sequenz in den prokaryontischen Expressionsvektor pMALC2 dar. Das resultierende Plasmid wurde als pMAL1C386-650 bezeichnet.

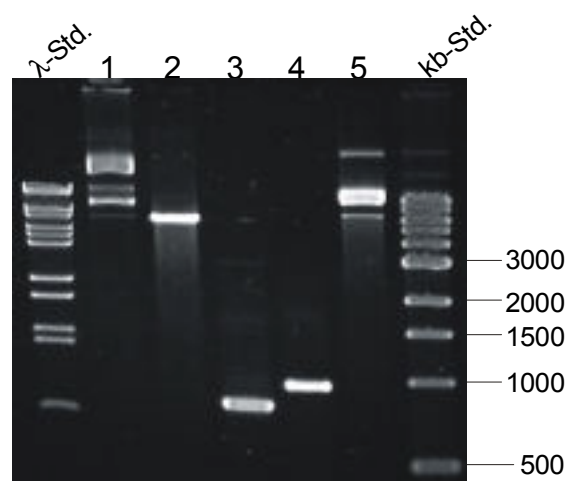


Abbildung 3-2: PCR-Expressionsklonierung von pMAL1C386-650

Ethidiumbromid gefärbtes DNA-Agarosegel. Probenauftrag: außen: MW-Standards; 1= pMalC2 6646 bp; 2 = Rahmenpräparation: *Eco* RI/*Pst* I-Verdau von pMalC2, 6618 bp; 3 = Insert-Präparation: 1C386-650 (815 bp PCR-Produkt); 4 = Kolonie-PCR-Produkt eines positiven Klons nach Ligation und Transformation, 975 bp; 5 = pMAL1C386-650 aus DH5 α , 7426 bp.

Eine Identifizierung positiver Klone nach Transformation des Ligationsansatzes war durch Kolonie-PCR auf einfache Weise möglich (Spur 4). Ein bedeutender Vorteil in der PCR-Expressionsklonierung zeigte sich bei der Klonierung der $\Delta F508$ -Mutanten. Diese mußten nicht mittels ortsspezifischer Mutagenese neu erzeugt, sondern konnten aus dem von Wulbrand [1994] hergestellten Konstrukt nach geeigneter PCR-Amplifikation umkloniert werden. Mittels vollständiger Sequenzierung der jeweils klonierten DNA-Abschnitte (ABI-PRISM™ 310) wurde das Vorhandensein von Sekundärmutationen ausgeschlossen.

3.2 PROTEINEXPRESSION UND -AUFREINIGUNG VON NBD1-FUSIONSPROTEINEN

In diesem Kapitel ist die Proteinexpression und –aufreinigung von NBD1-Fusionsproteinen aus *Sf9*-Zellen und aus *E. coli* beschrieben. Das vorrangige Ziel bestand in einer löslichen cytosolischen Expression des Produkts in der Wirtszelle und in einer Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen. Es wurde eine Proteinpräparation im Milligramm-Maßstab mit einem Reinheitsgrad von mindestens 90 % angestrebt, um im Anschluß die biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen durchführen zu können. Die C-terminale Fusionierung der NBD1 an Glutathion-S-Transferase (GST) oder Maltose bindendem Protein (MBP) sollte zum einen die lösliche Expression begünstigen und zum anderen eine effektive Einschnitt-Aufreinigung am immobilisierten Affinitätsliganden ermöglichen.

3.2.1 GST-NBD1(R347-A596) AUS *SF9*-ZELLEN

Gemäß Wulbrand [1994] führte die Expression der GST-NBD1(R347-A596) in *E. coli* zur Bildung von wasserunlöslichen Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*, IBs) und forderte zur Proteinisolierung die Durchführung eines aufwendigen Solubilisierungs- und Renaturierungsprotokolls. Eine der Grundfragen dieser Arbeit bestand in der Überprüfung, ob unter Verwendung des eukaryontischen Baculovirus/*Sf9*-Zellexpressionssystem eine lösliche Expression von GST-NBD1(R347-A596) und dessen Isolierung unter nicht denaturierenden Bedingungen erreichbar war. Dazu wurde das Konstrukt a (Abbildung 3-1) in den Baculovirustransfervektor pVL1393 kloniert und durch Kotransfektion mit linearisierter Baculovirus-DNA in *Sf9*-Zellen als GST-Fusionsprotein exprimiert. Als Kontrollen dienten die Expression der GST und die Infektion mit wt-Baculovirus. Exemplarisch ist die Änderung der Morphologie von *Sf9*-Zellen nach Infektion mit wt-Baculovirus in Abbildung 3-3 dargestellt.

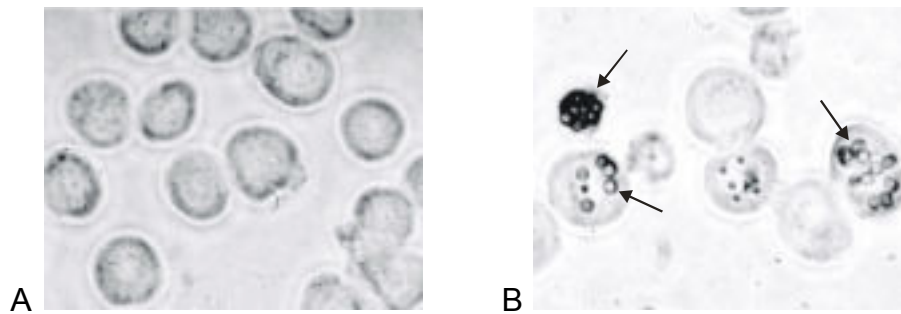


Abbildung 3-3: Infektion von *Sf9*-Zellen mit wt-Baculovirus (AcNPV)

Lichtmikroskopische Aufnahme von *Sf9*-Zellen bei 100facher Vergrößerung vor (A) und nach dreitägiger Infektion (B) mit wt-Baculovirus. Polyhedrinkörper sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Deutlich sichtbar ist die Expression des Hüllproteins Polyhedrin (Pfeile), welches *in vivo* das Virus nach Absterben des Wirts vor Dehydratation schützt [Kidd und Emery, 1993]. Das Volumen infizierter Zellen nahm geringfügig zu- bzw. die Zelldichte stark ab. Im Gegensatz zum Wildtyp exprimierten die rekombinanten Baculoviren erwartungsgemäß keine Polyhedrinkörper, da dieser Genabschnitt durch das jeweilige Zielgen substituiert war. Eine optimale Proteinausbeute nach Infektion mit einer MOI von 20 war typischerweise nach zwei bis drei Tagen erreicht. Nach erfolgter Zellernte wurden die *Sf9*-Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Zellysate zentrifugiert. Über die N-terminal fusionierte GST sollte eine einfache Affinitäts-Aufreinigung aus dem cytosolischen Überstand an immobilisiertem Glutathion erfolgen. Abbildung 3-4 faßt die Proteinaufreinigung von GST-NBD1 und GST zusammen.

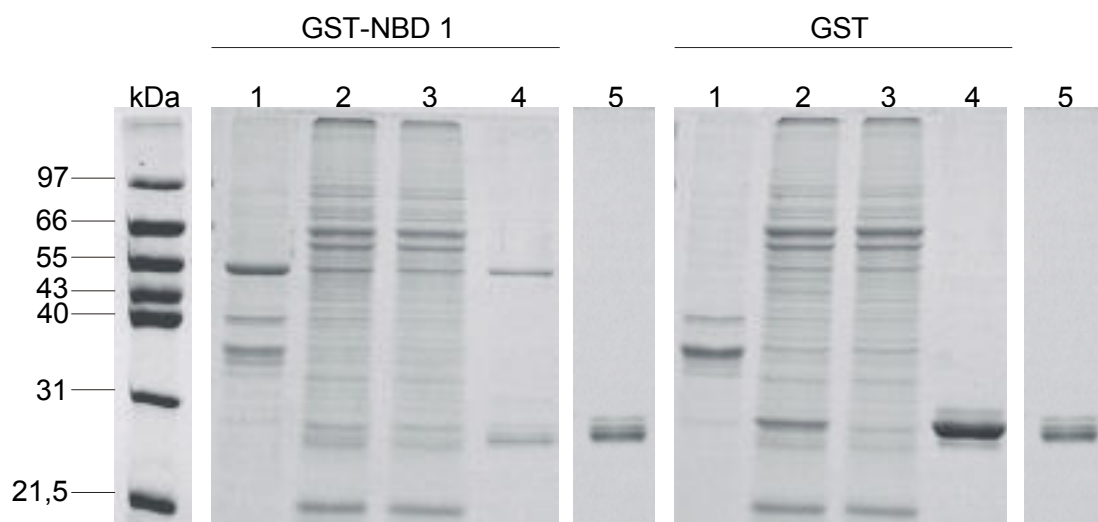


Abbildung 3-4: Aufreinigung von GST-NBD 1 (R347-A596) aus *Sf9*-Zellen

Coomassie Brilliant Blau gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag: Molekulargewichtsmarker MMW (kDa), Rückstand (1) vom zentrifugierten Zellaufschluß, Überstand vor (2) und nach (3) GSH-Affinitätschromatographie, aufgereinigtes Protein an GSH-Sepharose (4), Kontrollaufreinigung an GSH-Sepharose mit wt-Baculovirus infizierten *Sf9*-Zellen (5).

Während eine Expression beider Proteine in hohem Maße beobachtet wurde, fiel das Fusionsprotein im Gegensatz zur GST zu mehr als 99 % im abzentrifugierten unlöslichen Rückstand an (Vergleich der jeweiligen Spuren 1 und 2) und war damit für die nachfolgende Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose nicht zugänglich. Versuche, die GST-NBD1(R347-A596) aus dem Rückstand mit für die GSH-Affinitätschromatographie kompatiblen Detergentien wie 1 % Tween-20, 1 % Triton-X-100 und 0,5 % CHAPS zu solubilisieren, schlugen fehl.

Geringe Mengen des Fusionsproteins konnten aus dem cytosolischen Überstand mit einer Ausbeute von weniger als 1 µg pro initial 10^6 infizierte *Sf9*-Zellen isoliert werden (Spur 4, links). Der Reinheitsgrad von etwa 75-80 % fiel unerwartet niedrig aus und hätte einen zweiten Chromatographieschritt und damit weitere Ausbeuteverluste gefordert. Bei den deutlich sichtbaren niedermolekularen Verunreinigungen handelte es sich nicht um Abbauprodukte des Fusionsproteins, da die gleichen Nebenbanden im Kontrollansatz bei der GSH-Affinitätsaufreinigung aus dem abzentrifugierten Zellysate von mit wt-Baculovirus infizierten *Sf9*-Zellen (Spur 5) auftauchten. Die isolierte GST-NBD1(R347-A596) präzipitierte spontan innerhalb von wenigen Tagen.

Die GST konnte mit Ausbeuten von etwa 30 µg pro 10^6 initial infizierte *Sf9*-Zellen und Reinheitsgraden von etwa 90 % isoliert werden. Im Gegensatz zur GST-NBD1 war das isolierte Protein in wässriger Pufferlösung stabil und lagerungsfähig.

Die Daten zeigen, daß eine Isolierung der GST-NBD1(R347-A596) aus dem Cytosol von *Sf9*-Zellen mit unerwartet geringen Ausbeuten und hohem Aufwand verbunden war. Insbesondere aufgrund der Neigung zu spontaner Präzipitatbildung war es nicht möglich, mit der GST-NBD1(R347-A596) die angestrebten biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen durchzuführen.

3.2.2 GST-NBD1 AUS *E. COLI*

3.2.2.1 GST-NBD1(T351-S589)

Parallel zu den Untersuchungen im Baculovirus/*Sf9*-Zellexpressionssystem wurde versucht, die GST-NBD1 unter optimierten Kultivierungsbedingungen (s. unten) löslich in *E. coli* zu exprimieren. Hierzu wurde der NBD1-Abschnitt T351-S589 (vergleiche Abbildung 3-1, Seite 48, Konstrukt b) in den Vektor pGEX4T1 kloniert. Im Unterschied zum ursprünglichen Konstrukt R347-A596 waren zur Förderung der Löslichkeit am N-Terminus vier Aminosäuren deletiert, da diese nach Riordan *et al.* [1989] bereits als Bestandteile der sechsten Transmembrandomäne definiert sind. Desweiteren wurde der C-Terminus um sieben Aminosäuren verkürzt, da nach Riordan *et al.* [1989] die R-Domäne bereits ab Exon 13 (S589) beginnt. Der nicht als nukleotidbindende Domäne definierte Bereich von T351 bis N432, der auch als Prä-NBD1 bezeichnet wird, wurde zunächst beibehalten.

OPTIMIERTE KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

Wie in vorigem Kapitel einleitend erwähnt, fiel nach Wulbrand [1994] die in *E. coli* exprimierte GST-NBD1(R347-A596) in Form von biologisch inaktiven, wasserunlöslichen Einschlußkörperchen (*inclusion bodies* IBs) an. Dieses Phänomen kann durch Variation von Induktionsbedingungen, Stamm und Nährmedium zumindest teilweise unterbunden werden [z. B. Hockney *et al.*, 1994]. Im vorliegenden Fall war zusammenfassend durch die Kombination der folgenden optimierten Parameter eine Isolierung von GST-NBD1(T351-S589) aus dem cytosolischen Überstand möglich:

- ⇒ Verwendung des *E. coli* Stamms BL21 bzw. BL21(DE3)pLysS
- ⇒ Kulturführung und Proteinexpression bei 27 °C
- ⇒ Induktion der Proteinexpression durch Zugabe geringer IPTG-Konzentration (100 µM)
- ⇒ Dauer der Proteinexpression reduziert auf maximal 3 h
- ⇒ Verwendung von Proteaseinhibitoren bei der Zellernte (0,1 mM PMSF/ EDTA) und strikte Durchführung der GSH-Affinitätschromatographie bei 4 °C

Die nachfolgende Abbildung faßt die Proteinaufreinigung von GST-NBD1(T351-S589) aus *E. coli* zusammen.

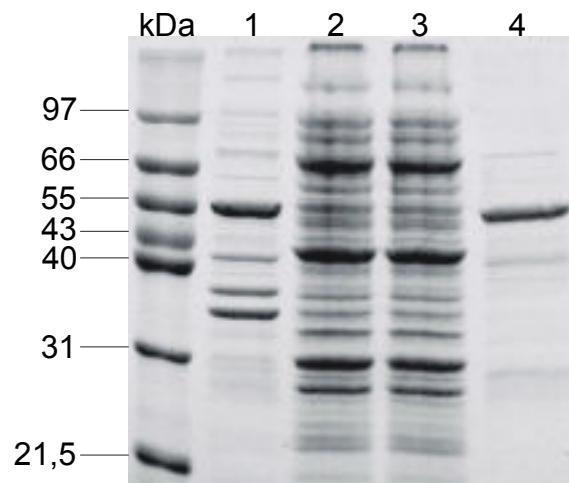


Abbildung 3-5: Aufreinigung von GST-NBD1 (T351-S589) aus *E. coli*

Coomassie BB gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag: MMW (kDa), Rückstand (1) vom zentri-fugierten Zellaufschluß, Überstand vor (2) und nach (3) GSH-Affinitätschromatographie, aufgereinigtes Protein an GSH-Sepharose (4).

Die Ausbeute aus einem Liter Schüttelkolbenkultur (ca. 3 g BFM) betrug maximal 500 µg Fusionsprotein mit Reinheitsgraden von 80 bis 85 % (Spur 4). Aus der obigen Abbildung ist ersichtlich, daß selbst unter optimierten Kultivierungs- und Induktionsbedingungen die GST-NBD1 nahezu vollständig im zentri-fugierten Rückstand des Zellysats (Spur 1) und nur ein marginaler Rest im cytosolischen Überstand auftauchte (Spur 2).

Lichtmikroskopische Untersuchungen wiesen das Vorhandensein von *inclusion bodies* nach, die als grünlich schimmernde Punkte im Cytosol von *E. coli* sichtbar waren. Wie bei den *Sf9*-Zellen konnte auch hier die GST-NBD1 nicht aus dem Rückstand mit für die GSH-Affinitätschromatographie kompatiblen Detergentien, wie 1 % Tween-20,

1 % Triton-X-100 und 0,5 % CHAPS, solubilisiert werden. Durch Anzucht von *E. coli* im Zehn-Liter-Fermenter waren Zellernten bis 60 g BFM möglich. Damit wäre eine ausreichende Menge an GST-NBD1 zugänglich gewesen, um die anstehenden biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen durchführen zu können. Jedoch stellte sich heraus, daß das aufgereinigte Fusionsprotein nur bis zu einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml aufkonzentriert werden konnte, in wäßriger Pufferlösung instabil war und innerhalb von einer Woche bei 4 °C-Lagerung präzipitierte. Insbesondere wurde während der Dialyse gegen den für die CD-spektroskopischen Untersuchungen erforderlichen Phosphatpuffer (vgl. Kapitel 3.4.2 auf Seite 73) im Gegensatz zu dem von Wulbrand [1994] beschriebenen GST-Fusionsprotein (NBD1-Abschnitt: R347-A596), eine nahezu quantitative Präzipitation des Proteins beobachtet.

3.2.2.2 N-TERMINAL VERKÜRZTE GST-NBD1-KONSTRUKTE

Die bisherigen Ergebnisse gaben Anlaß zu der Annahme, daß der ausgewählte Bereich für die erste nukleotidbindende Domäne möglicherweise membranassoziierte Domänen enthielt. Eine sukzessive N-terminale Deletion von Aminosäuren zwischen T351 und N432 sollte eine lösliche Expression des Proteinprodukts fördern. Nach Riordan *et al.* [1989] ist dieser als Prä-NBD1 bezeichnete Bereich nicht eigentlicher Bestandteil der NBD1, da darin die charakteristischen Walkermotive A und B und das LSSGQ-Motiv nicht enthalten sind. Darüberhinaus schließt die Prä-NBD1 N-terminal unmittelbar an die sechste Transmembrandomäne an und enthält hydrophobe Aminosäuresequenzen [Hydrophobizitätsplots nach Kyte und Doolittle, 1972]. Gemäß Abbildung 3-1 auf Seite 48 wurden deshalb insgesamt fünf N-terminal verkürzte GST-NBD1-Konstrukte (c bis f) kloniert und exprimiert. Dabei ergab sich, daß mit Ausnahme von Konstrukt f keine signifikante Zunahme des Anteils an löslich exprimiertem GST-Fusionsprotein erreicht werden konnte. Wie bei der ursprünglichen GST-NBD1(T351-S589) fielen mehr als 99 % der jeweiligen Fusionsproteine im unlöslichen Rückstand an. Lichtmikroskopische Untersuchungen wiesen ausnahmslos das Vorhandensein von *inclusion bodies* nach. Darüberhinaus konnte keine Verbesserung in der Proteinausbeute, im Reinheitsgrad und insbesondere in der Stabilität der isolierten GST-Fusionsproteine erzielt werden.

Nur das als Kontrolle dienende Konstrukt GST-NBD1(D529-S589) war in signifikant größerer Menge löslich exprimierbar. Da hier jedoch das Walkermotiv A, das LSGGQ-Motiv und die Aminosäure F508 fehlten, wurden damit keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

3.2.3 MBP-NBD1(N386-F650) AUS *E. coli*

Die experimentellen Daten aus den vorangegangenen Kapiteln zeigen, daß eine Isolierung von GST-NBD1-Konstrukten unter nicht denaturierenden Bedingungen aus dem Cytosol von *E. coli* zwar möglich war, jedoch aufgrund ihrer spontanen Neigung zur Präzipitation keine biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Damit war der angestrebte direkte Vergleich von löslich exprimierten GST-NBD1-Fusionsproteinen mit der von Wulbrand [1994] unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten GST-NBD1(R347-A596) nicht möglich. Um dennoch eine lösliche Proteinexpression von stabiler NBD1 zu erreichen, wurde analog Ko *et al.* [1993] ein anderer Weg mit der Expression der NBD1 als MBP-Fusionsprotein gewählt. Aufgrund neuer Strukturmodellberechnungen [Annereau *et al.*, 1997a und b] verdichtete sich zu diesem Zeitpunkt der praktischen Arbeiten die Annahme, daß die C-terminale Grenze der NBD1 entgegen ursprünglichen Überlegungen [bis I586 nach Riordan *et al.*, 1989] über Exon 12 hinaus in den Bereich der R-Domäne um etwa 60 Aminosäuren erweitert sein muß (bis F650). Desweiteren lieferten Yike *et al.* [1996a und b] den experimentellen Nachweis, daß die N-terminale Grenze der NBD1 nicht bis F433 [Riordan *et al.*, 1989], sondern mindestens bis zur Aminosäure N386 erweitert sein muß, um ein in wäßrigem Puffer stabiles Protein zu erhalten. Aus den genannten Gründen wurde das Konstrukt g (N386 bis F650; vgl. Abbildung 3-1, Seite 48) in den pMALC2-Vektor (New England Biolabs) kloniert und als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert.

3.2.3.1 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG

Mit den in Kapitel 3.2.2.1 auf Seite 52 beschriebenen optimierten Kultivierungs- und Expressionsparametern war wie bei den GST-Fusionsproteinen eine heterologe Überexpression von MBP-NBD1(N386-F650) in *E. coli* (DH5 α) in hohem Maße möglich (siehe Abbildung 3-6 auf der nachfolgenden Seite). Densitometrische Bestimmungen ergaben nach dreistündiger Produktexpression einen Anteil der exprimierten MBP-NBD1(N386-F650) am Gesamtzellprotein (MW-Bereich 20 bis 120 kDa) von ca. 25 %. Vergleichbare Werte ergaben sich für die Expression von Δ F508-MBP-NBD1 und MBP sowie für die zuvor beschriebenen GST-NBD1-Konstrukte. Aus der Zellwachstumskurve errechnete Verdopplungszeiten τ um 75 min (bei 27 °C) waren erwartungsgemäß etwa dreimal so niedrig wie für die Kultivierung von *E. coli* bei 37 °C (τ = 20 min). Die Zellernte aus einem Liter Schüttelkultur betrug ca. 3 g Biofeuchtmasse (BFM) und war vergleichbar mit den bei den GST-Fusionsproteinen erreichten Ausbeuten. Das *E. coli* B-Stammderivat BL21 [Studier und Moffatt, 1986] wies zwar günstigere Wachstumseigenschaften auf (τ = 60 min), jedoch wurde bereits während der Kultivierung eine starke partielle Degradation des Produkts beobachtet, so daß für die Expression der MBP-NBD1 ausschließlich der Stamm DH5 α zum Einsatz kam.

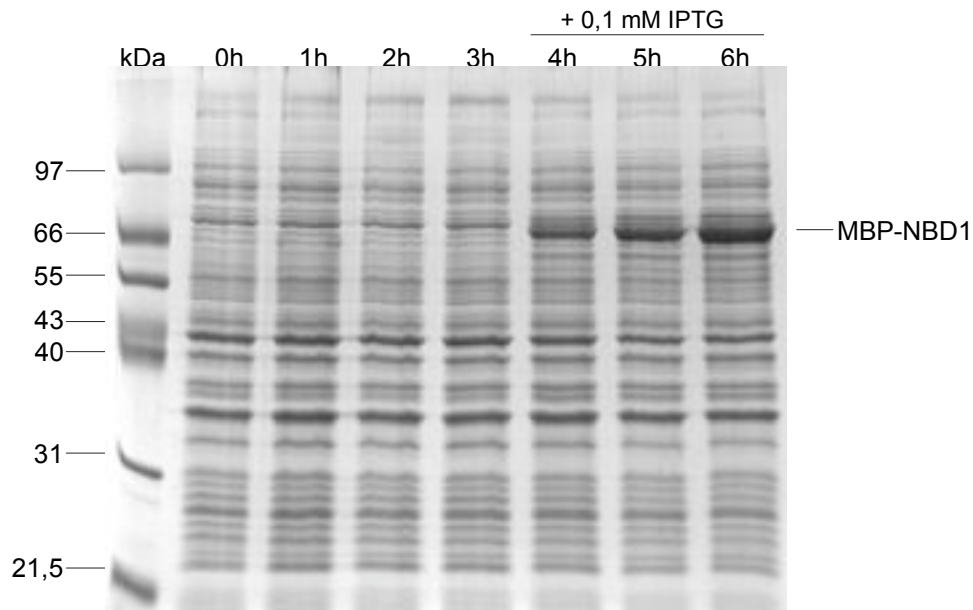


Abbildung 3-6: Heterologe Proteinexpression von MBP-NBD 1 in *E. coli* DH5α

Coomassie-BB gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag: MMW (kDa); Gesamtzellprotein über die Kultivierungsdauer; Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG nach 3 h 10 min.

Wie sich im Verlauf der Proteinaufreinigung zeigte, wurde die MBP-NBD1(N386-F650) im Vergleich zu den zuvor besprochenen GST-Fusionsproteinen in signifikant höheren Mengen löslich exprimiert und war unter geringem Arbeitsaufwand und ohne Zusatz von Detergentien aus dem Cytosol isolierbar. Abbildung 3-7 faßt die Aufreinigung von wt-, ΔF508-MBP-NBD1(386-650) und MBP an Amylose-Agarose zusammen.

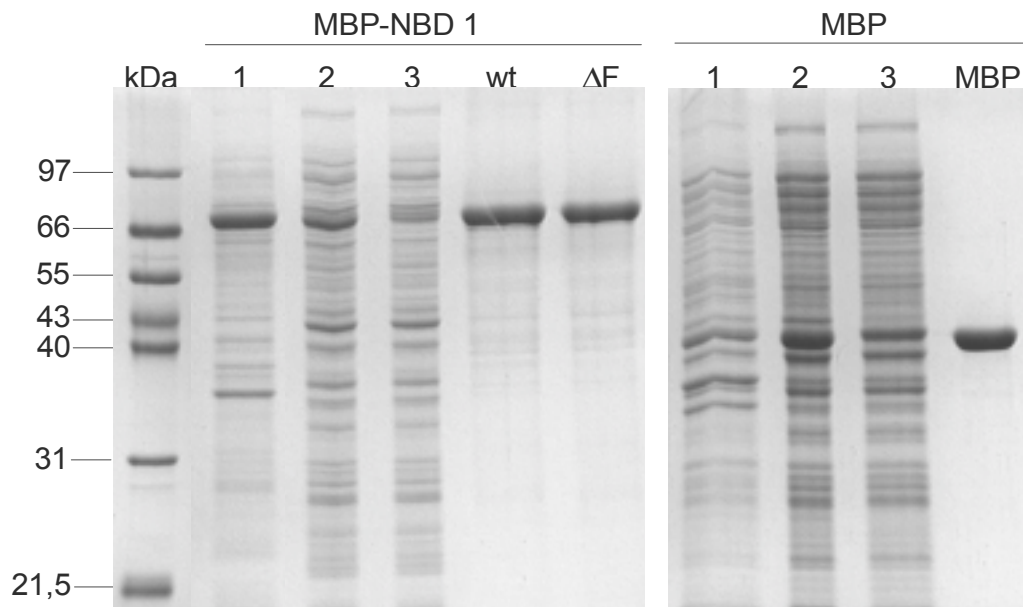


Abbildung 3-7: Aufreinigung von wt-, ΔF508-MBP-NBD1 und MBP an Amylose-Agarose

Coomassie BB gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag: MMW (kDa), Rückstand (1) und Überstand (2) nach Zentrifugation des Zellysats, Überstand (3) nach Amylose-Affinitätschromatographie, aufgereinigte Proteine wt- und ΔF508-MBP-NBD1 und MBP nach Elution mit 20 mM Maltose und Dialyse.

Nach Applikation des mittels Ultraschall aufgeschlossenen, abzentrifugierten *E. coli*-Zellysats (Spur 2) auf die Affinitätssäule retardierten MBP bzw. MBP-Fusionsprotein hochaffin am immobilisierten Zuckerrest. Aus dem Vergleich der jeweiligen Spuren 2 und 3 (Überstände vor und nach Affinitätschromatographie) ist deutlich die lösliche Produktexpression erkennbar, die bei den Fusionsproteinen mit einem densitometrisch bestimmten, prozentualen Anteil um 10 % etwa dreimal niedriger als beim MBP (28,3 %) war. Nach intensiven Waschschritten (vgl. nachfolgendes Kapitel) erfolgte die Elution der Fusionsproteine durch Zugabe von 20 mM Maltose. Typische Gesamtausbeuten betragen etwa 3 mg Fusionsprotein (Reinheitsgrad 90-92 %) aus 1 g Biofeuchtmasse (BFM) bzw. entsprechend ca. 9 mg aus einem Liter *E. coli*-Schüttelkultur (MBP: ca. 8 mg / g BFM bzw. ca. 24 mg pro Liter Schüttelkultur, Reinheitsgrad 95-97 %).

Der Anteil an überexprimierter MBP-NBD1 im Rückstand war bedeutend höher als beim MBP (Vergleich der Spuren 1). Demnach zeichnete wie bei den GST-Fusionsproteinen auch hier der NBD1-Anteil verantwortlich für eine verstärkte Anreicherung im Rückstand. Die aufgereinigten MBP-Fusionsproteine waren ohne Anwesenheit von Detergens in wäßriger Pufferlösung bei 4 °C-Lagerung und Konzentrationen von weniger als 30 µM ($OD_{280} \leq 2,6$) über mehrere Wochen stabil und präzipitierten nur bei höheren Proteinkonzentrationen.

3.2.3.2 BINDUNG, IDENTIFIZIERUNG UND ENTFERNUNG VON GroEL UND DnaK

Gemäß Herstellerangaben [NEB, 1994] sollte für die Affinitätsaufreinigung an Amylose-Agarose eine Waschbehandlung mit zehn Säulenvolumen Puffer ausreichen, um sämtliche unspezifisch gebundenen Verunreinigungen abzutrennen. SDS-gelelektrophoretische Untersuchungen der im Anschluß mit Puffer plus 20 mM Maltose eluierten MBP-NBD1 wiesen jedoch das Vorhandensein von zwei charakteristischen Nebenbanden (Abbildung 3-8) nach. Eine Abtrennung dieser Proteinnebenbanden durch Zugabe von 5 mM $MgCl_2/ATP$ war möglich und ließ deshalb vermuten, daß es sich dabei um Faltungshelferenzyme handeln könnte [Sherman und Goldberg, 1992].

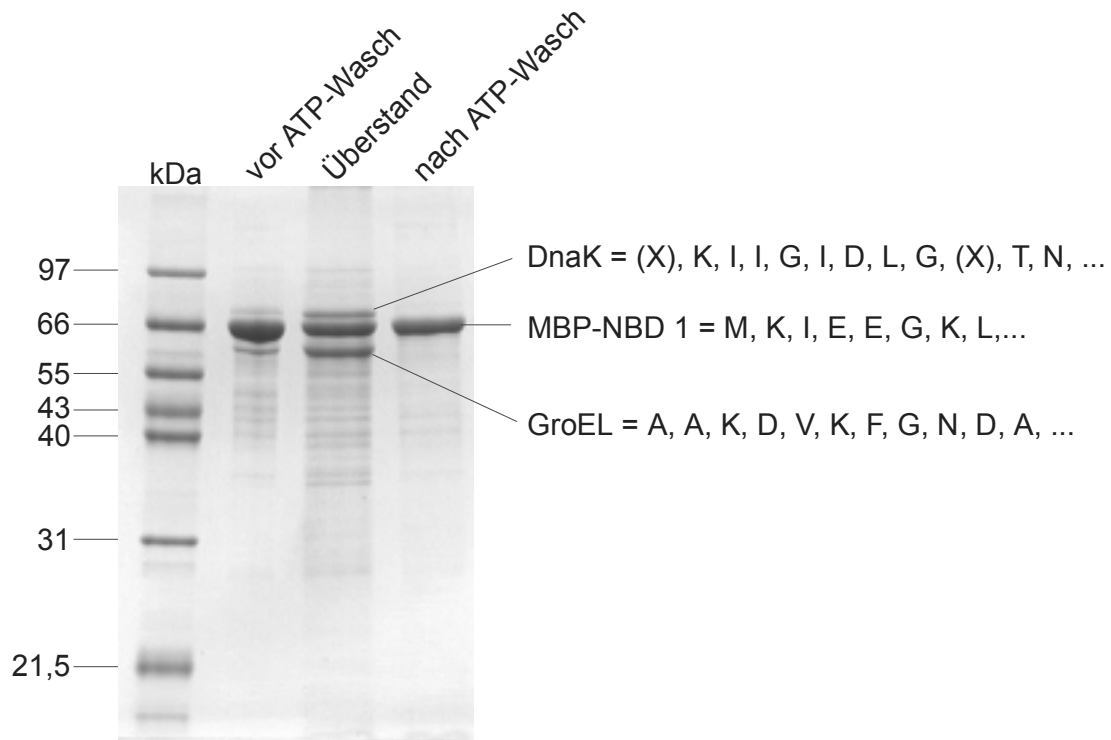


Abbildung 3-8: Identifizierung und Entfernung von DnaK und GroEL

Coomassie BB gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag: MMW (Spur 1), an Amylose-Agarose gebundene MBP-NBD1 vor (Spur 2) und nach (Spur 4) Behandlung mit 5 mM Mg^{2+}/ATP , mittels Trichloressigsäure präzipitierte Proteine im Mg^{2+}/ATP -Eluat (Spur 3).

Gemäß Abbildung 3-8 reicherten sich die Nebenbanden im Mg^{2+}/ATP -Eluat an. Densitometrische Auswertungen ergaben für die obere Bande eine Zunahme von 1,4 auf 13 %, für die mittlere eine Abnahme von 87 auf 45 % und für die untere eine Zunahme von 4,5 auf 25 %. Zur Identifizierung wurden die Proteinbanden auf PVDF-Membran transferiert und anschließend aminoterminal ansequenziert, wodurch sich neben der MBP-NBD1 das Vorhandensein der endogenen *E. coli*-Faltungshelferenzyme GroEL und DnaK bestätigte (100 % Identität der Aminosäuresequenz nach SWISSPROT-Datenbankrecherche).

OPTIMIERUNG DER WASCHBEDINGUNGEN

Da GroEL und DnaK ATP-bindende und unter bestimmten Bedingungen ATP-hydrolytische Eigenschaften aufweisen, war deren Entfernung notwendig, um einen störenden Einfluß auf die bevorstehenden biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen auszuschließen. Dazu wurde ein optimiertes Waschprotokoll etabliert, das eine dreißigminütige Inkubation des nach Zellaufschluß abzentrifugierten Überstands bei Raumtemperatur in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+}/ATP und Proteaseinhibitoren beinhaltete. Im Anschluß wurde der Überstand bei 4 °C auf Amylose-Agarose appliziert und mit 5 Säulenvolumen (SV) Mg^{2+}/ATP -haltigem Puffer gewaschen. Dann folgte nochmaliges Waschen mit 10 SV Puffer bzw. Elution mit 20 mM Maltose, woraus die im vorigen Kapitel angegebenen Reinheitsgrade für MBP-NBD1 und MBP resultierten. Eine Waschbehandlung unter Hochsalzbedingungen (bis 1 M NaCl), führte zu keiner

Entfernung von GroEL und DnaK. Auch konnten die übrigen, im Coomassie Brilliant Blau-gefärbten SDS-Gel noch spurenhafte sichtbaren Verunreinigungen auf diese Weise nicht eliminiert werden. Der Einsatz von Detergentien war nur sehr begrenzt möglich, da diese die auf Wasserstoffbrückenbindung basierende Wechselwirkung zwischen Amylose und MBP störten und dadurch das Fusionsprotein von der Affinitätsmatrix eluierte. Von acht getesteten Detergentien (Laurylsarcosin, Octylglucosid, SDS, CTAB, Triton-X-100, TOPPS, Tween-20, CHAPS) erwiesen sich lediglich 0,2 % Octylglucosid und 0,1 % Triton-X-100 als kompatibel für die Amylose-Affinitätschromatographie. Sie förderten jedoch weder eine Solubilisierung der MBP-NBD1 aus dem unlöslichen Rückstand, noch konnte dadurch der Reinheitsgrad erhöht werden. Damit waren die für die Amylose-Affinitätschromatographie zur Verfügung stehenden Puffervariationen erschöpft.

3.2.4 PRÄZIPITATION NACH FAKTOR X_A - UND THROMBIN-VERDAU

Sowohl das pGEX- als auch das pMAL-Expressionssystem sehen vor, nach erfolgter Affinitätschromatographie den N-terminalen Fusionspartner (GST, MBP) vom zu interessierenden Zielprotein abzutrennen. Dies erfolgt durch Einsatz einer spezifischen Protease, welche die kovalente Peptidbindung in der Verbindungsregion hydrolysiert. Nach erneuter Affinitätschromatographie retentiert im Idealfall die GST bzw. das MBP an der Matrix, während die NBD 1 über einen zweiten Chromatographieschritt (z. B. FPLC) aus dem Überstand isoliert werden kann. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren kamen als Restriktionsproteasen Thrombin (Erkennungssequenz Leu-Val-Pro-Arg[↓]-Gly-Ser) und Faktor X_A (Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg[↓]) zum Einsatz. Im vorliegenden Fall war weder nach Spaltung mit Thrombin (GST-NBD1) noch nach Faktor X_A -Verdau (MBP-NBD1) eine Isolierung der reinen NBD1 möglich, da

- die Spaltung der NBD1 unter Standardbedingungen [NEB, 1994] nur mit maximalen Ausbeuten von 5-10 % gelang
- die abgespaltene NBD1 vor und während der Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose bzw. Amylose-Agarose auf der Säule präzipitierte und nur unter denaturierenden Bedingungen eluierbar war
- der geringfügige Restanteil an löslicher NBD1 im Überstand vor Durchführung des zweiten Chromatographieschritts (FPLC) innerhalb von wenigen Stunden präzipitierte.

Daher wurde für die nachfolgend aufgeführten biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen ausschließlich die in wässriger Pufferlösung stabile MBP-NBD1 verwendet, zumal der N-terminale Fusionspartner MBP keine ATP-bindenden oder ATP-hydrolytischen Eigenschaften aufweist und sich offensichtlich als nicht störend auf die Eigenschaften der NBD1 auswirkt [Ko *et al.*, 1993 und 1995].

3.3 BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1 BESTIMMUNG DER INTRINSISCHEN ATPASE-AKTIVITÄT

ATPase-AKTIVITÄT VOR UND NACH Mg^{2+} /ATP-WASCHBEHANDLUNG

Um die Frage zu klären, ob die erste nukleotidbindende Domäne von CFTR die Fähigkeit besitzt, intrinsisch ATP zu hydrolysieren, wurden aufgereinigte MBP-NBD1-Präparationen im hochsensitiven Lactatdehydrogenase-Pyruvatkinase-Test (LDH/PK-Test) [Bergmeyer, 1984] untersucht. Nach dieser Methode kann der ATP-Umsatz in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion *in situ* über die zeitlich lineare Abnahme der NADH-Konzentration photometrisch bei 340 nm verfolgt und aus der Steigung der Geraden berechnet werden.

Um den Einfluß der detektierten Verunreinigungen an Faltungshelferenzymen GroEL und DnaK zu evaluieren, wurde die MBP-NBD1-Präparation vor und nach Durchführung des Mg^{2+} /ATP-Waschschrilles auf ATP-Umsatz untersucht (Abbildung 3-9).

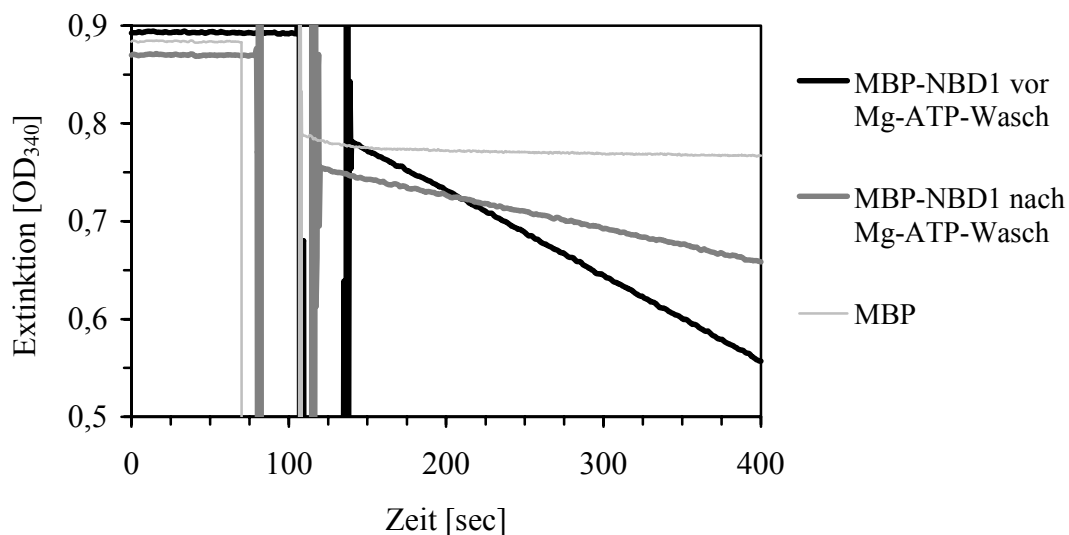


Abbildung 3-9: Nachweis von ATP-Hydrolyse im LDH/PK-Test

Vergleich des ATP-Umsatzes der MBP-NBD 1-Präparation vor und nach Mg^{2+} /ATP-Waschschrilt. Initiation der ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 5 mM ATP. Proteinkonzentrationen je 0,6 μ M MBP-NBD1 und 1,2 μ M MBP, Puffer: 50 mM HEPES (pH 7,5) / 10 mM KCl / 5 mM $MgCl_2$ / 5 % Glycerin.

Die Hydrolysereaktion wurde bei den MBP-NBD1-Präparationen unmittelbar durch Zugabe von 5 mM ATP initiiert, wobei erwartungsgemäß das als Kontrolle dienende MBP praktisch keinen ATP-Umsatz aufwies. Die Mg^{2+} /ATP-Waschbehandlung von MBP-NBD1 bewirkte eine Halbierung des ATP-Umsatzes. Rechnerisch ergaben sich unter V_{max} -Bedingungen (5 mM ATP) intrinsische spezifische ATPase-Aktivitäten von 11,2 bzw. 5,5 Molekülen ATP pro Molekül MBP-NBD1 pro Minute.

CHROMATOGRAPHIE AM ANIONENAUSTAUSCHER (FPLC)

Die obigen Ergebnisse ließen vermuten, daß noch weitere ATP-hydrolysierende Verunreinigungen vorhanden waren und damit eine intrinsische ATPase-Aktivität der NBD1 imitierten. Aus diesem Grund wurde die Mg^{2+} /ATP-gewaschene MBP-NBD1-Präparation am Anionenaustauscher (Mono Q-Säule, FPLC) chromatographiert und im Anschluß die einzelnen Fraktionen nach Dialyse auf ATP-Umsatz getestet.

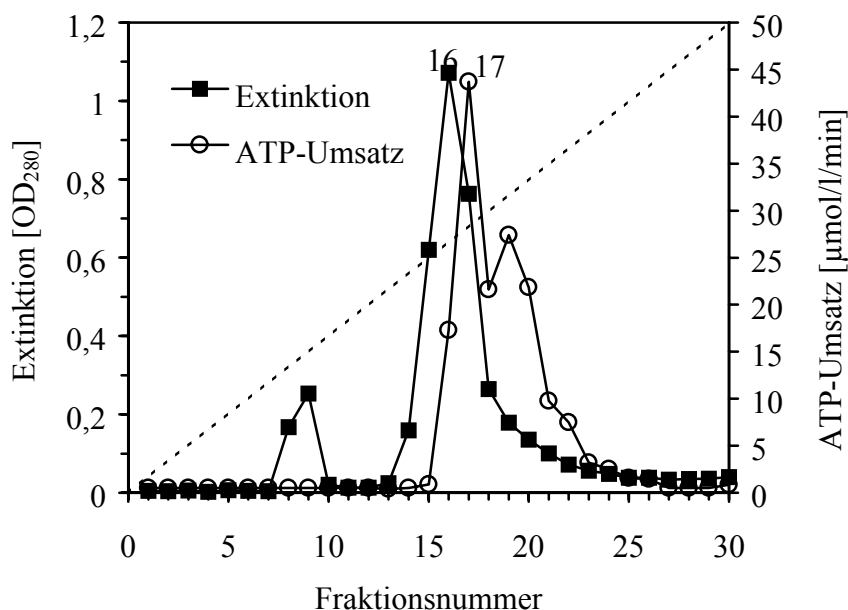


Abbildung 3-10: Anionenaustausch-Chromatographie von MBP-NBD1

Elutions- und ATPase-Aktivitätsprofile der Fraktionen 1 bis 30 nach Chromatographie an einer Mono Q-Säule (FPLC). Die gestrichelte Linie gibt den linearen Salzgradienten von 0-0,75 M NaCl an.

Wie aus Abbildung 3-10 ersichtlich, koeluierte die Proteinhauptfraktion 16 nicht mit der Haupt-ATPase-Aktivität (Fraktion 17), was auf das Vorhandensein von weiteren ATP-hydrolysierenden Verunreinigungen hinwies. Noch deutlicher wurde der Unterschied bei Einsatz gleicher Proteinkonzentrationen im LDH/PK-Test, d. h. bei einem Vergleich der spezifischen ATPase Aktivitäten (Abbildung 3-11).

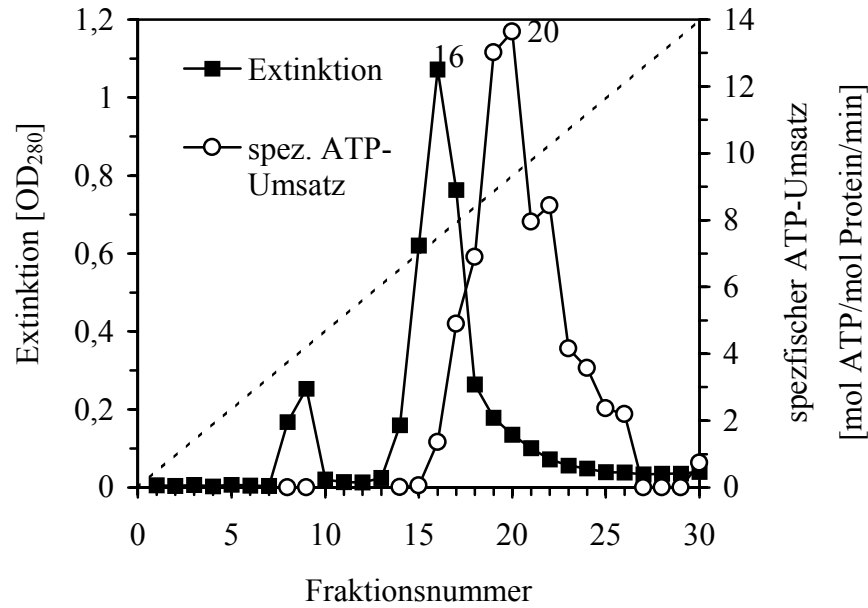


Abbildung 3-11: Spezifisches ATPase-Aktivitätsprofil der MBP-NBD1-FPLC-Fractionen (vgl. vorige Abbildung)

Demnach war die höchste spezifische Aktivität in Fraktion 20 zu finden. Eine SDS-gelelektrophoretische Untersuchung der Fraktionen 1 bis 26 ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

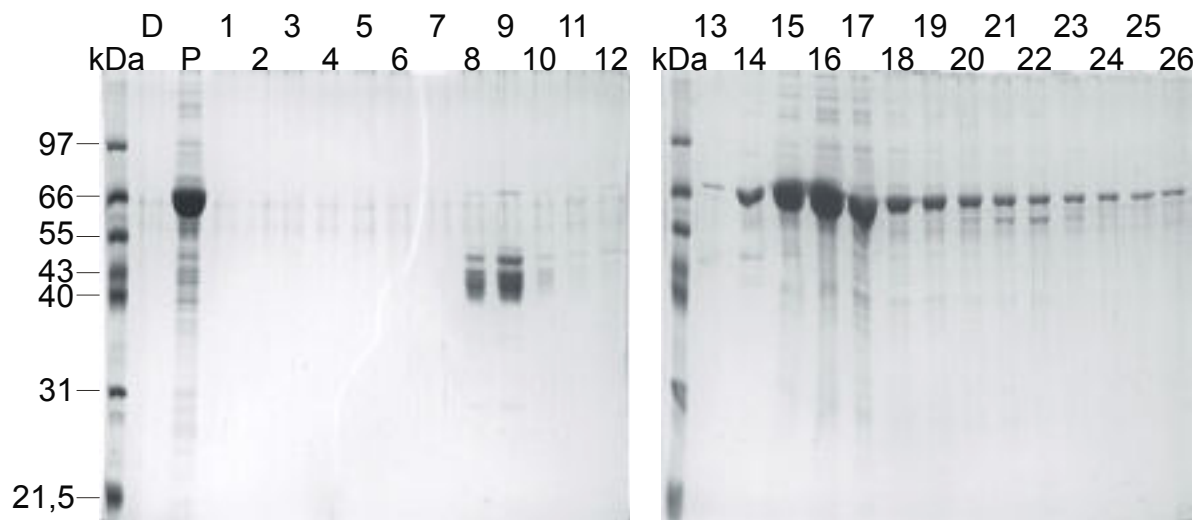


Abbildung 3-12: Gelelektrophoretische Untersuchung von MBP-NBD1 nach FPLC
 Coomassie BB gefärbte SDS-PA-Gele. Probenauftrag: MMW (kDa), Durchlauf (D), Probe vor Chromatographie (P), Fraktionen 1-26 nach FPLC an Mono Q-Säule.

Wie anhand der Fraktionen 8, 9 bzw. 20 bis 23 in Abbildung 3-12 erkennbar, war zwar eine Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen von der MBP-NBD1-Hauptfraktion (14 bis 18) begrenzt möglich, jedoch zeichneten sich diese nicht als hauptverantwortlich für die ATPase-Aktivität aus. Eine Reihe hoch- und niedermolekularer Nebenbanden

(Fraktionen 14 bis 18) blieben mit dem Fusionsprotein assoziiert. Eine eindeutige Zuordnung der für den ATP-Umsatz verantwortlichen Nebenbande(n) war nicht möglich. In jedem Fall konnte jedoch zu Beginn der Elution des Fusionsproteins mit den Fraktionen 14 und 15 eine nahezu eindeutige Trennung von Fusionsprotein und ATPase-Aktivität mit spezifischen Hydrolyseraten von jeweils 0 bzw. weniger als 0,05 mol ATP pro mol Protein pro Minute unter V_{\max} -Bedingungen (5 mM $MgCl_2/ATP$) erreicht werden.

Die obigen Daten zeigen, daß die NBD1 im MBP-Fusionsprotein keine oder nur eine vernachlässigbar geringe intrinsische ATPase Aktivität aufwies. Die Ursache für die gemessene ATP-Hydrolyse war vielmehr auf spurenhafte Verunreinigungen und darüberhinaus nicht ausschließlich auf die Faltungshelferenzyme GroEL und DnaK zurückzuführen. Die Wiederfindungsrate des Fusionsproteins nach FPLC-Chromatographie betrug etwa 30 %. Der Grund in dem hohen Ausbeuteverlust lag darin begründet, daß ein Großteil des Fusionsproteins auf der Anionenaustauschersäule aggregierte und nur mit 0,1 M NaOH / 0,05 % SDS eluiert werden konnte.

3.3.2 ATP-BINDUNG

FLUORESZENZTITRATION VON TNP-ATP

Zur Untersuchung der ATP-Bindung wurde zunächst das ATP-Analogon 2'-(oder 3')-O-(trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphat (TNP-ATP) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Fluorophor (Excitation 410 nm, Emission 535 nm), bei dem am ATP-Ribosering eine Trinitrophenyl-Gruppe kovalent substituiert ist. Mit der Einlagerung des Fluorophors in die ATP-Bindungstasche des zu untersuchenden Proteins geht eine Zunahme der hydrophoben Umgebung und dadurch eine Verstärkung des Fluoreszenz-Emissionssignals bei 535 nm einher [z. B. Hiratsuka *et al.*, 1975]. Mittels Fluoreszenztitration sollte auf diese Weise die ATP-Bindung der an Amylose-Agarose aufgereinigten MBP-NBD1 quantifiziert werden. Als Positivkontrolle diente das RecA-Protein, welches

- als ssDNA-abhängige ATPase gut charakterisiert ist und in hochreiner Form zur Verfügung stand [Möller, 1996]
- aufgrund seiner hohen Homologie zur NBD1 für NBD1-Strukturmodellberechnungen herangezogen wurde [Annereau *et al.*, 1997a und b; Bianchet *et al.*, 1997].

Eine Fluoreszenztitration von MBP-NBD1, MBP und RecA-Protein mit TNP-ATP ist exemplarisch in Abbildung 3-13 dargestellt.

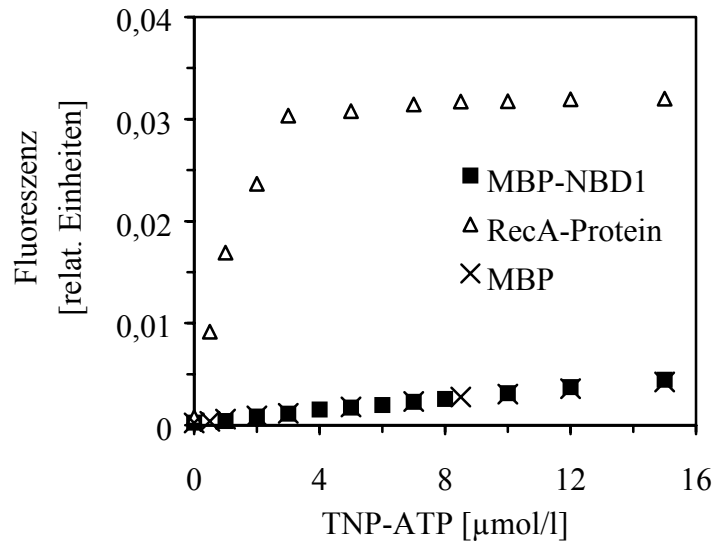


Abbildung 3-13: TNP-ATP-Fluoreszenztitration von MBP-NBD1 und RecA-Protein

Excitation 410 nm; Emission 535 nm; Proteinkonzentrationen: 2,8 µM MBP bzw. MBP-NBD1 3,7 µM RecA-Protein.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, war im Fall der MBP-NBD1 eine dem MBP entsprechende Titrationskurve zu beobachten. Demnach konnte unter den gegebenen Testbedingungen keinerlei TNP-ATP-Bindung an der NBD1 nachgewiesen werden. Auch führten diverse Variationen der Pufferbedingungen (HEPES-, TRIS-Puffer jeweils pH 7,2 bzw. pH 8; 0 - 200 mM NaCl; 0 - 50 mM KCl; 0 - 20 % Glycerin, Detergentien: Triton-X-100, CHAPS) zu keiner fluorimetrisch detektierbaren Wechselwirkung zwischen MBP-NBD1 und TNP-ATP. Lediglich bei Triton-X-100 und CHAPS wurde eine drastische Fluoreszenzverstärkung des Puffers (ohne Protein) oberhalb der jeweiligen kritischen Mizellkonzentration (CMC) beobachtet. Unter diesen Bedingungen erwies sich deshalb die Fluoreszenztitration als artefaktanfällig. Indirekt war über die TNP-ATP-Fluoreszenzzunahme sogar eine Bestimmung der CMC des jeweiligen Detergens möglich.

Im Gegensatz zur MBP-NBD1 war beim RecA-Protein eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Die Bindung erreichte dabei ihre Sättigung um 4 µmol/l TNP-ATP bei 3,7 µmol/l RecA-Protein, was einer nahezu stöchiometrischen Bindung entspricht.

MESSUNG DER BINDUNG VON TNP-ATP MITTELS ANALYTISCHER UZ

Um auszuschließen, daß die Bindung von TNP-ATP möglicherweise aufgrund einer zu geringen Meßempfindlichkeit des Fluorimeters bzw. eines zu schwachen Fluoreszenzsignals unsichtbar blieb, wurde die TNP-ATP-Bindung qualitativ und direkt mittels analytischer Ultrazentrifugation (UZ) untersucht. Dabei erfolgte eine Detektion des Sedimentationsverhaltens von MBP-NBD1 und TNP-ATP zeitgleich bei zwei verschiedenen Wellenlängen (280 nm für das Protein und 410 nm für den Fluorophor). Bei Fehlen einer Wechselwirkung zwischen beiden Spezies war aufgrund der stark unterschiedlichen Molekulargewichte von TNP-ATP (782,2 g/mol) und Protein (MBP-

NBD1 73 kDa) ein deutlich unterschiedliches Sedimentationsverhalten zu erwarten. Im Fall einer Wechselwirkung dagegen sollte das TNP-ATP mit dem apparenten Molekulargewicht des Proteins kosedimentieren. Abbildung 3-14 stellt UZ-Sedimentationsläufe von wt-MBP-NBD1 und RecA-Protein dar.

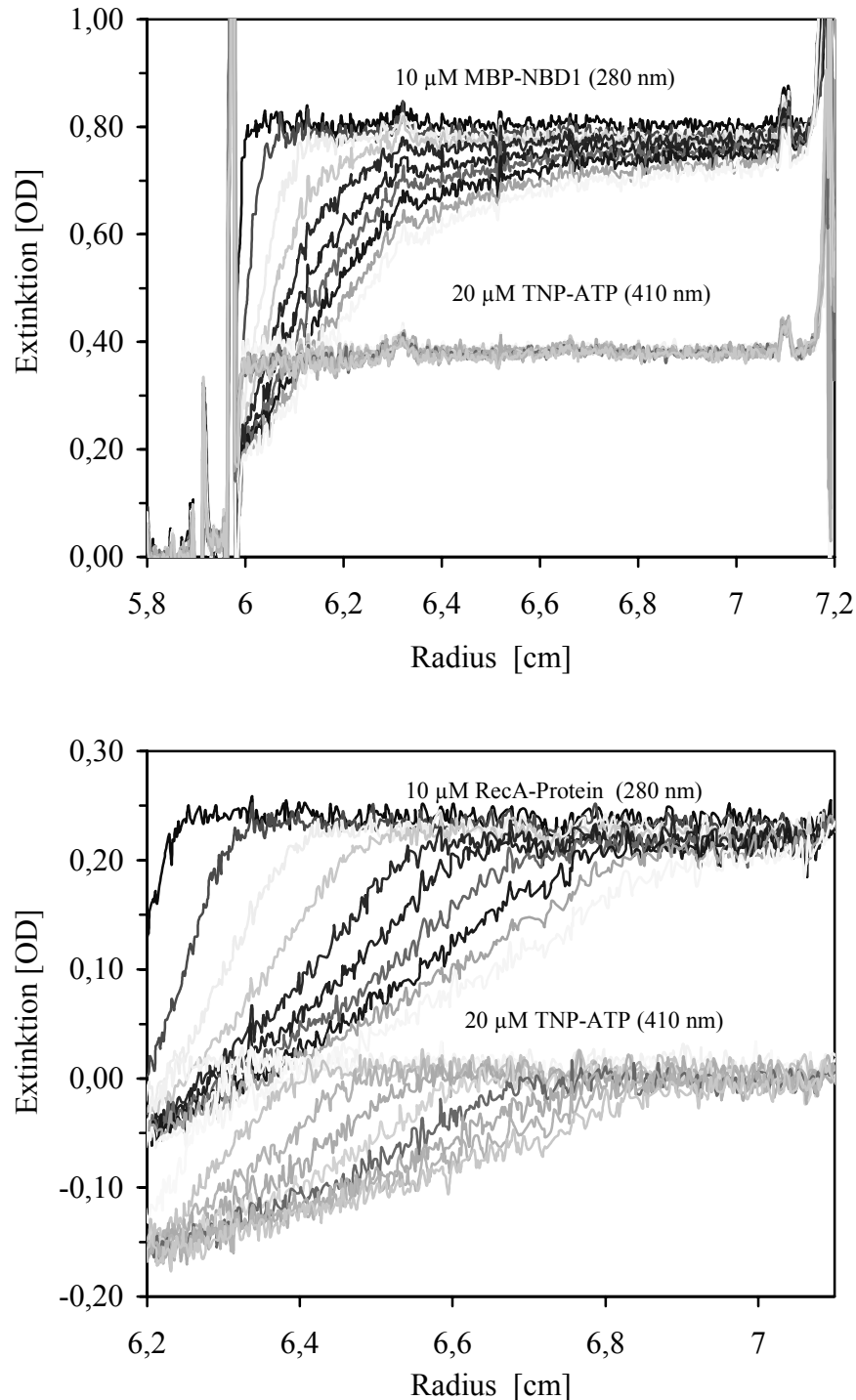


Abbildung 3-14: Messung von TNP-ATP-Bindung in der analytischen UZ

UZ-Sedimentationsläufe von MBP-NBD1 (oben) und RecA-Protein (unten) in Gegenwart von TNP-ATP. Zeitsynchrone Detektion bei 280 nm und 410 nm, T = 20 °C. Rotor An-Ti 50, Zentrifugation bei 10000 rpm für MBP-NBD1 und bei 28000 rpm für RecA-Protein. Zweifacher Überschuß TNP-ATP/Protein.

Wie bei den Fluoreszenzmessungen war nur im Fall des RecA-Proteins eindeutig eine TNP-ATP-Bindung nachweisbar. Die MBP-NBD1 zeigte keinerlei Wechselwirkung mit dem Fluorophor (das Sedimentationsverhalten des Proteins *per se* wird auf der nachfolgenden Seite näher beschrieben).

NACHWEIS DER BINDUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEM ATP AUF NITROCELLULOSE (FILTERBINDUNGSTEST)

Gegen Ende der praktischen Arbeiten wurden Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP auf Nitrocellulose [Pieper, 1995] durchgeführt. Dabei konnte in Gegenwart eines zehnfachen Substratüberschusses keine ATP-Bindung nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Sensitivität des Filterbindungstests ließ sich daraus folgern, daß unter den gegebenen Testbedingungen die ATP-Bindungskonstante der untersuchten MBP-NBD1 maximal 10^3 M^{-1} betrug.

3.4 BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.4.1 ANALYTISCHE UZ-EXPERIMENTE

Basierend auf röntgenkristallographischen Daten von homologen Proteinen sind für die NBD1 verschiedene Strukturmodelle berechnet worden [Hyde *et al.*, 1990; Annereau *et al.*, 1997b; Bianchet *et al.*, 1997; Hoedemaker *et al.*, 1998; Hung *et al.*, 1998]. Zur experimentellen Überprüfung dieser Modellvorstellungen erfolgten Untersuchungen mit der MBP-NBD1 in der analytischen Ultrazentrifuge. Unter Annahme idealisierter Bedingungen können dabei aus den Sedimentationskoeffizienten Aussagen über die Form der betreffenden Spezies in Lösung getroffen werden. Um den Einfluß des N-terminalen Fusionspartners abschätzen zu können, wurde zusätzlich das MBP bezüglich seiner hydrodynamischen Eigenschaften untersucht. Die rechnerische Bestimmung von S-Werten und apparenten S-Wertverteilungen aus den UZ-Primärdaten erfolgte mit dem von Kindler [1997] entwickelten Computerprogramm AKKUPROG.

3.4.1.1 NACHWEIS VON POLYDISPERSEN MBP-NBD1-AGGREGATEN

Auf der nachfolgenden Seite sind in Abbildung 3-15 exemplarisch jeweils die ersten zehn Konzentrationsprofile aus zwei Sedimentationsläufen für MBP-NBD1 und MBP gegenübergestellt. Dabei sedimentierte das Fusionsprotein bereits bei 10000 U/min (Rotor An-Ti 50) vollständig, das MBP dagegen erst ab 50000 U/min. Eine Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten der MBP-NBD1 durch Simulation des UZ-Laufs mit der Lammschen Differentialgleichung [Lamm, 1929] war aufgrund der Polydispersität der Probe nicht möglich. Näherungsweise konnte mittels Parametrisierung nach Gralén und Lagermalm [1951] eine apparente S-Wertverteilung abgeschätzt werden. Diese erstreckte sich asymmetrisch geformt über einen Bereich von 0 bis ca. 100 S mit einem Maximum um 18 S (Intervallbreite 3 S, vgl. Abbildung 3-15 B). Damit zeigte sich das Vorhandensein von hochmolekularen NBD1-Aggregaten in der Lösung auf.

Das MBP sedimentierte im Gegensatz zum Fusionsprotein nahezu monodispers. Der Sedimentationslauf konnte mit der Lammschen DGL simuliert werden. Hieraus errechnete sich ein Sedimentationskoeffizient von 3,69 S (Fehlerfaktor 1,06), der mit dem Maximum von 3,4 S (Intervallbreite 0,2 S) aus der apparenten S-Wertverteilung gut übereinstimmte. Das ungleiche Sedimentationsverhalten von MBP-NBD1 und MBP demonstriert, daß ausschließlich der C-terminale NBD1-Anteil im MBP-Fusionsprotein für die Aggregatbildung verantwortlich war.

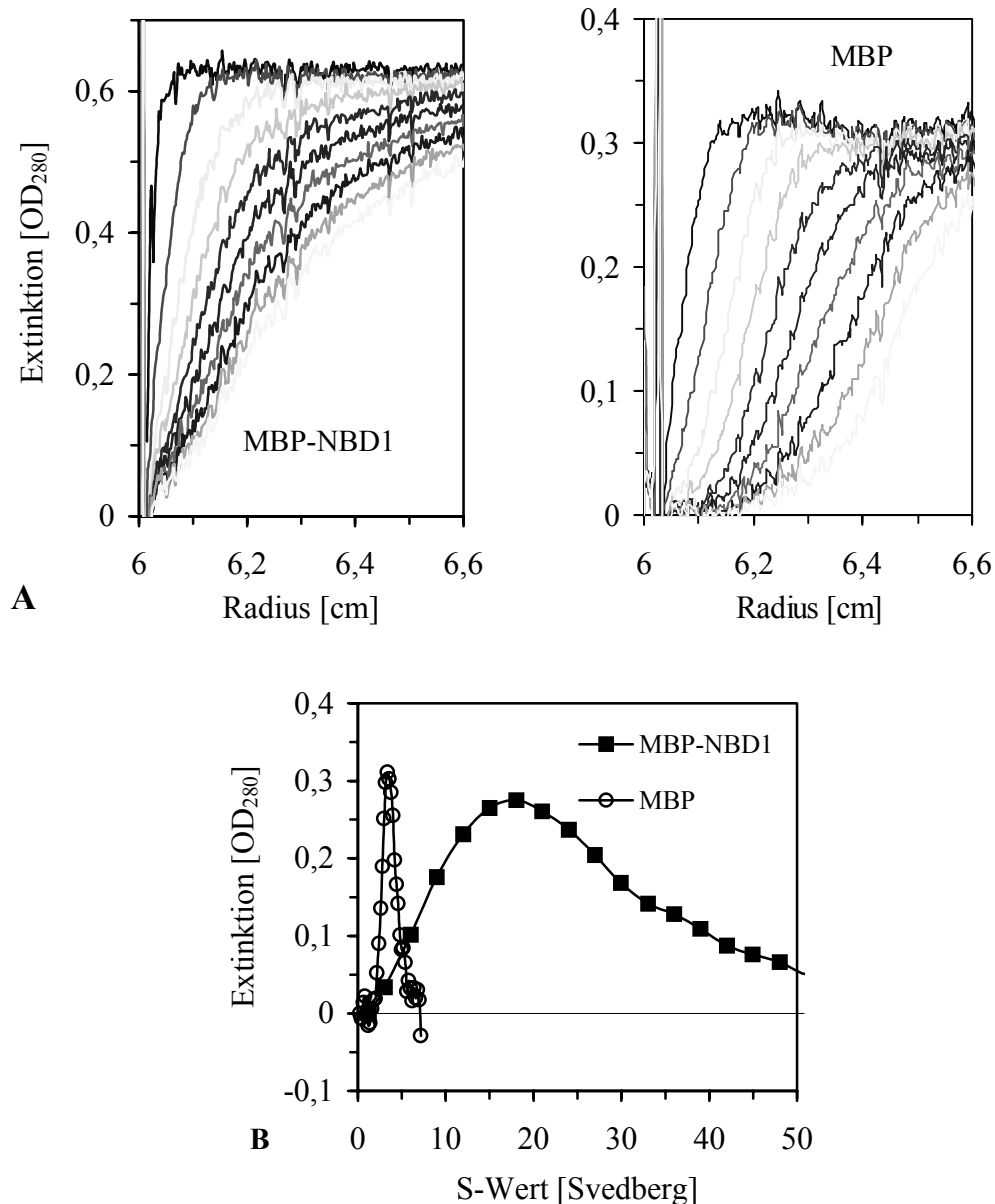


Abbildung 3-15: Polydisperse MBP-NBD1-Aggregate

A: Analytische UZ-Sedimentationsläufe von MBP-NBD1 und MBP, $T = 20\text{ °C}$, Rotor An-Ti 50, Zentrifugation bei 10000 rpm (MBP-NBD1) und 50000 rpm (MBP), grafische Darstellung der jeweils ersten zehn Konzentrationsprofile. B: aus A berechnete apparente S-Wertverteilungen mit Maxima von 3,4 S (Intervallbreite 0,2 S) für MBP bzw. 18 S (Intervallbreite 3 S) für MBP-NBD1.

3.4.1.2 PARTIELLE AGGREGATAUFLÖSUNG DURCH SDS

Nicht zuletzt um mittels analytischer UZ genauere Aussagen über die Form der NBD1 treffen zu können, war es nötig, das MBP-Fusionsprotein in eine monodispers sedimentierende Struktur zu überführen. Generell wurde das Phänomen der Aggregatbildung als Hauptursache für die auftretenden Probleme auch bei der biochemischen Charakterisierung der MBP-NBD1 (Löslichkeit, Spaltung mit Faktor X_A, Stabilität, Reinheitsgrad) angesehen. Eine Ausbildung der hochmolekularen MBP-NBD1-Aggregate

aufgrund von intermolekularen Disulfidbrücken war auszuschließen, da das Phänomen unter reduzierenden Bedingungen (1 mM DTT) persistierte. Vielmehr wurde angenommen, daß intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den NBD1 die Aggregatbildung verursachten. Die Zugabe von solubilisierend wirkendem SDS in geringer Konzentration sollte deshalb eine Auflösung der Aggregate bewirken, ohne dabei jedoch die Sekundärstruktur des Fusionsproteins zu zerstören. Abbildung 3-16 zeigt die apparenten S-Wertverteilungen der MBP-NBD1 in Abhängigkeit von verschiedenen SDS-Konzentrationen.

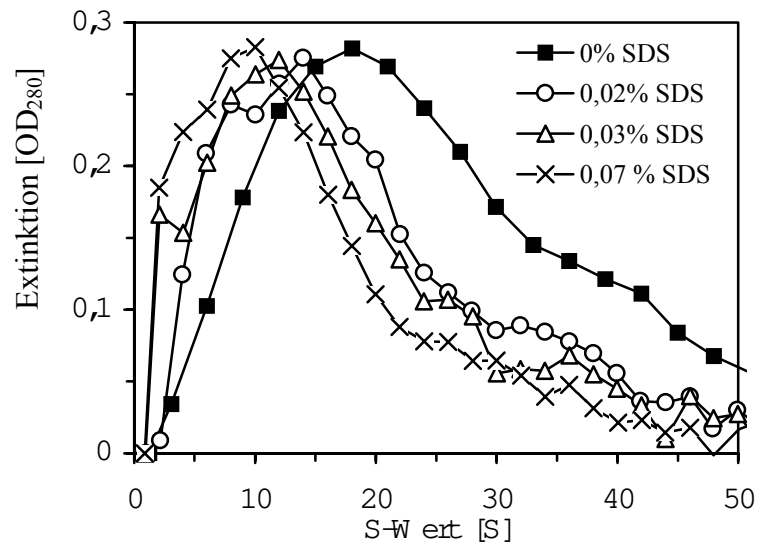


Abbildung 3-16: Solubilisierung von MBP-NBD1-Aggregaten durch SDS

Aus UZ-Sedimentationsläufen ermittelte apparente S-Wertverteilungen von MBP-NBD1 bei verschiedenen SDS-Konzentrationen.

Mit steigender SDS-Konzentration war eine partielle Auflösung der MBP-NBD1-Aggregate erreichbar. Dies ist zu erkennen an der Linksverschiebung der jeweiligen apparenten S-Wertmaxima von etwa 18 auf 12 S (Abbildung 3-16). Jedoch resultierten selbst in Gegenwart von 0,07 % SDS noch polydisperse Proteinaggregate. Eine Beschreibung des Sedimentationslaufs durch die Lammsche DGL war daher auch hier nicht möglich. Darüberhinaus wurde gemäß Kapitel 3.4.2.2 auf Seite 74 bereits ab 0,03 % SDS ein drastischer Einfluß auf die Sekundärstruktur beobachtet und deshalb von einer weiteren Erhöhung der SDS-Konzentration abgesehen. Der Einsatz von weiteren Detergentien in der analytischen UZ war limitiert durch deren niedrige CMC (Triton-X-100, Tween-20) und aufgrund von Eigenabsorption (TOPPS). Andere Detergentien wirkten bis zur CMC nicht aggregatauflösend (entsprechend 0,4 % Laurylsarcosin, 0,4 % CHAPS, 0,6 % Octylglucosid) [CMC-Werte nach Neugebauer, 1988].

3.4.1.3 AGGREGATAUFLÖSUNG DURCH DE- UND RENATURIERUNG

Da die Aggregatauflösung durch Zugabe von Detergentien nicht ohne eine Veränderung der Sekundärstruktur gelang, wurden Solubilisierungs- und Renaturierungsexperimente mit

chaotropen Reagentien durchgeführt. Nach anfänglichen Fehlversuchen in 6 M Guanidiniumhydrochlorid / 1 % Octylglucosid (erneute Aggregatbildung nach Renaturierung) kam eine Variante des von Wulbrand [1994] etablierten Aufreinigungsprotokolls zum Einsatz. Dabei wurden die Proteine in einem chaotropen Puffer denaturiert, der unter anderem 0,08 % SDS und 8 M Harnstoff enthielt. Im Anschluß erfolgte eine Renaturierung der Proben mittels schrittweiser Dialyse gegen Phosphatpuffer. Da die MBP-Fusionsproteine bereits aufgereinigt vorlagen, entfiel die nach Wulbrand [1994] durchgeführte präparative SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Elektroelution. Allerdings beinhaltete dieser Teilschritt eine zehnmünütige 95 °C-Inkubation der Proteinproben im SDS-Harnstoff-Puffer, bevor diese auf das präparative SDS-Gel appliziert wurden. Es erschien wichtig, diesen Temperatureinfluß zu untersuchen. Deshalb erfolgte hier im Parallelansatz je eine zehnmünütige 95 °C- und eine zehnmünütige 0 °C-Behandlung der im Denaturierungspuffer solubilisierten MBP bzw. MBP-NBD1s, bevor diese der Dialyse unterzogen wurden. In Abbildung 3-17 ist eine SDS-gelelektrophoretische Untersuchung der renaturierten Proteinprodukte dargestellt.

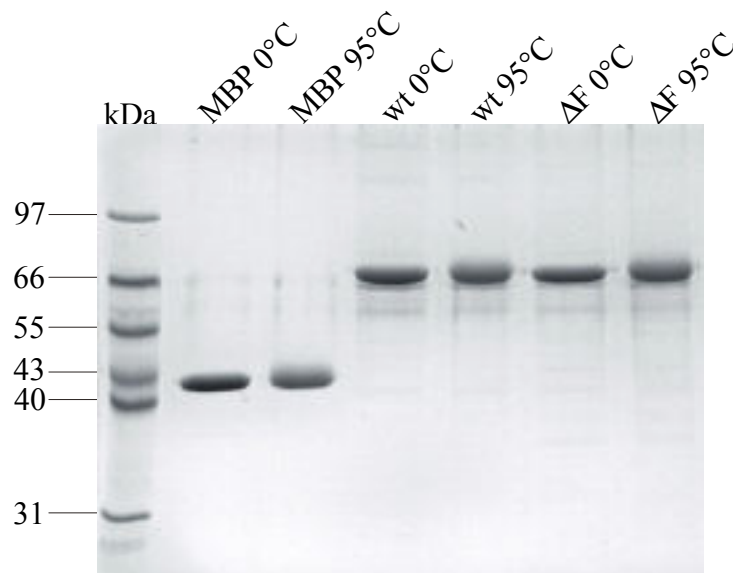


Abbildung 3-17: MBP, wt- und ΔF -MBP-NBD1 nach zehnmünütiger Denaturierung in SDS / Harnstoff bei 0 und 95 °C und anschließender Dialyse gegen Phosphatpuffer
Coomassie BB gefärbtes SDS-PA-Gel. Probenauftrag aller Proteine nach Dialyse, jeweils identische Proteinmengen.

Nach Dialyse enthielten die Proben weniger als 0,001 % SDS (p-Rosanilintest). Die Renaturierungsausbeute betrug etwa 50 % für das MBP und etwa 23 % für die Fusionsproteine. Die bei 95 °C vorinkubierten Proben wanderten auffallend diffuser im denaturierenden SDS-Gel.

Abbildung 3-18 auf der nachfolgenden Seite stellt vergleichend die mittels Parametrisierung ermittelten apparenten S-Wertverteilungen der de- und renaturierten und die unbehandelten Proteine gegenüber. Demnach resultierten nach De- und Renaturierung ausnahmslos MBP-Fusionsproteine mit weitaus geringerer Polydispersität. Die

zehnminütige Vorinkubation bei 95 °C führte zu nahezu monodispers sedimentierenden Spezies. Bei den „0 °C-MBP-Fusionsproteinen“ war anhand der asymmetrischen apparenten S-Wertverteilungen noch ein Vorhandensein von hochmolekularen Aggregaten erkennbar. Weiterhin ist zu erkennen, daß alle „95 °C-Proben“ im Vergleich zu den „0 °C-Proben“ mit deutlich kleineren S-Werten sedimentierten. Beim MBP ist im Gegensatz zu den Fusionsproteinen kaum ein Unterschied im Sedimentationsverhalten zwischen unbehandelter und bei 0 °C denaturierter Probe zu erkennen. Dieser Befund unterstreicht, daß die Ausbildung der hochmolekularen MBP-NBD1-Aggregate ausschließlich aufgrund von NBD1-NBD1-Wechselwirkungen beruhte.

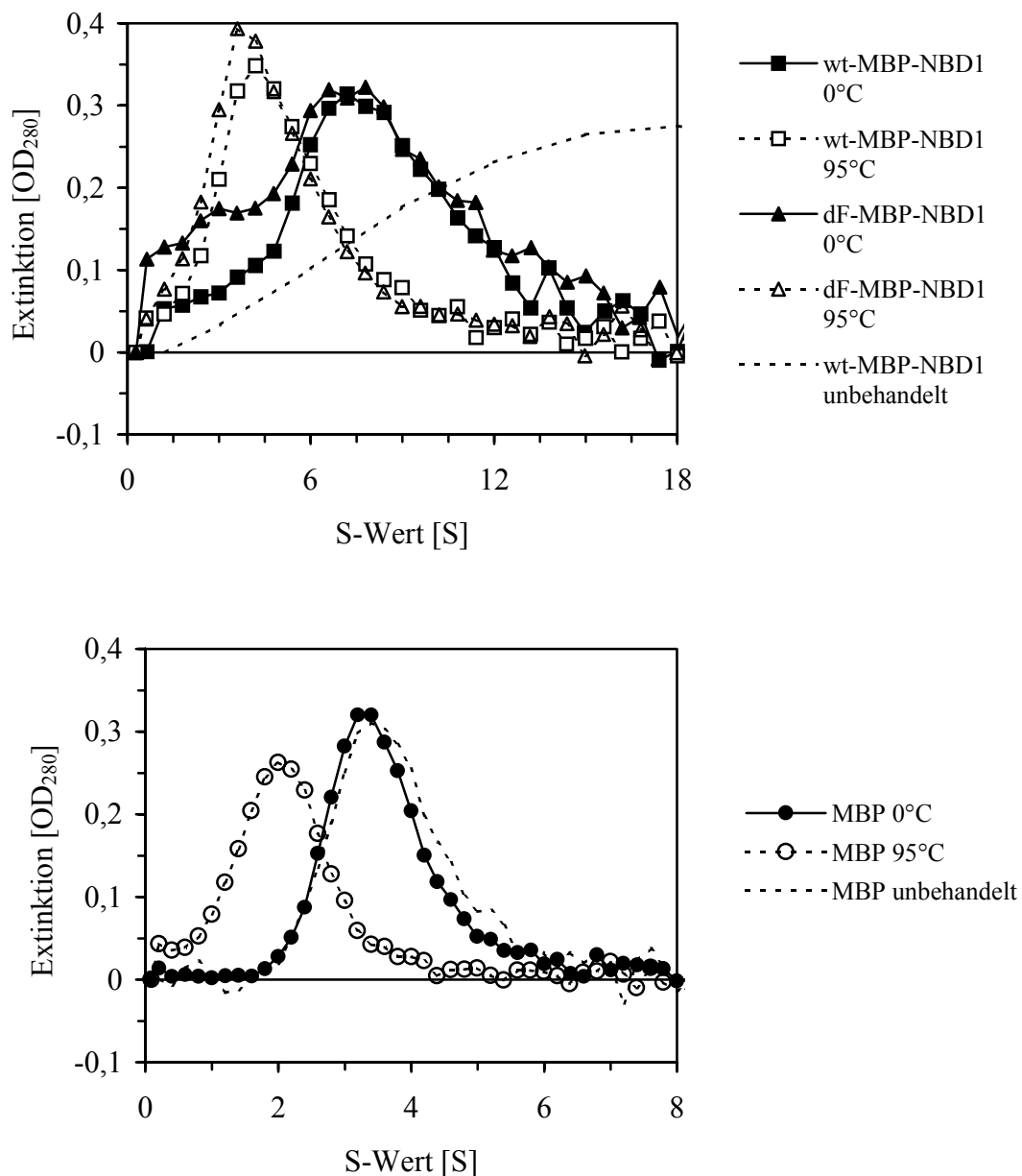


Abbildung 3-18: Apparente S-Wertverteilungen von wt-, ΔF508-MBP-NBD1 (oben) und MBP (unten) nach Solubilisierung und Renaturierung in SDS / Harnstoff
 Die Proteine wurden jeweils 10 Minuten bei 0 bzw. 95 °C in Harnstoff/SDS-haltigem Denaturierungspuffer vorinkubiert und dann mittels Dialyse renaturiert. Zum Vergleich: unbehandelt = nicht de- und renaturierte Proteine.

Aus den obigen Sedimentationsläufen war eine Bestimmung der S-Werte mittels numerischer Integration der Lammschen DGL möglich. Tabelle 3-1 stellt alle nach Lamm [1929] bzw. mittels Parametrisierung nach Gralén und Lagermalm [1951] ermittelten S-Werte und apparenten S-Wertmaxima gegenüber.

Tabelle 3-1: S-Werte und apparente S-Wertmaxima aus Sedimentationsläufen

Protein	S-Wert³⁾ / Fehlerfaktor nach Lamm¹⁾	S_{app,max}³⁾ / Intervallbreite nach Parametrisierung²⁾
wt-MBP-NBD1, unbehandelt	-	18 / 3
wt-MBP-NBD1 0 °C	8,00 / 1,06	7,2 / 0,6
wt-MBP-NBD1 95 °C	4,65 / 1,05	4,2 / 0,6
ΔF508-MBP-NBD1, unbehandelt	-	18 / 3
ΔF508-MBP-NBD1 0 °C	6,53 / 1,08	6,6 / 0,6
ΔF508-MBP-NBD1 95 °C	4,08 / 1,16	3,6 / 0,6
MBP, unbehandelt	3,69 / 1,06	3,4 / 0,2
MBP 0 °C	3,47 / 1,07	3,4 / 0,2
MBP 95 °C	2,04 / 1,11	2 / 0,2

¹⁾ Lamm [1929]; ²⁾ gemäß Gralén und Lagermalm [1951]; ³⁾ [S]=10⁻¹³ sec

Der Unterschied in den nach Lamm ermittelten S-Werten zwischen wt- und ΔF508-MBP-NBD1 liegt in einer fehlerbehafteten Anpassung begründet. Da die numerische Integration der Lammschen DGL im strengen Sinn nur für monodispers sedimentierende Spezies verwendbar ist, was bei den renaturierten „0 °C“-Fusionsproteinen aufgrund des Nochvorhandenseins von hochmolekularen Komponenten nicht zutraf, liegt ein extrem fehlerbehaftetes Iterationsergebnis vor. Die fehlerbehaftete Iteration äußert sich in den angepassten apparenten Molekulargewichten M_r für die MBP-Fusionsproteine (15 und 8 kDa für die 0 und 95 °C-Denaturierung, Fehlerfaktor 1,05 bis 2,0), die im Vergleich zu dem theoretischen Molekulargewicht aus der Aminosäuresequenz (etwa 73 kDa) auffallend niedrig ausfielen. Für das MBP, welches nahezu monodispers sedimentierte, wurden nach der Lammschen DGL apparente Molekulargewichte um 34 kDa (Fehlerfaktor 1,8) für die nicht denaturierte Probe, 36 kDa (Fehlerfaktor 2,00) für die „0 °C-Probe“ und um 28 kDa (Fehlerfaktor 2,52) für die „95 °C-Probe“ ermittelt, was im Rahmen der Fehlergrenzen dem theoretischen Molekulargewicht für das MBP-Monomer von 43 kDa aus der Aminosäuresequenz entspricht.

Im Vergleich zur Anpassung mit der Lammschen DGL ist eine Auswertung der apparenten S-Wertverteilungen nach Gralén und Lagermalm [1951] zwar „ungenauer“, für die MBP-NBD1s jedoch „verlässlicher“, da die Polydispersität der Spezies berücksichtigt wird. Im Rahmen der Intervallbreite besteht hier kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (vgl. Abbildung 3-18).

Die obigen Daten zeigen, daß durch Denaturierung in SDS/Harnstoffpuffer und anschließende Renaturierung mittels Dialyse eine signifikante Aggregatauflösung der an Amylose-Agarose aufgereinigten MBP-NBD1s erreicht werden konnte, wobei Wildtyp und $\Delta F508$ -Mutante im Rahmen der Meßschwankungen bezüglich der apparenten S-Wertverteilungen nicht signifikant voneinander unterscheidbar waren.

3.4.2 CD-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Mittels CD-Spektroskopie wurde untersucht, ob einerseits die MBP-Fusionsproteine in gefalteter Form vorlagen und ob andererseits die Mutation $\Delta F508$ eine Veränderung in der Sekundärstruktur im Vergleich zum Wildtyp bewirkte. Zur Kontrolle erfolgten Parallel-experimente mit dem MBP. Zur Aufnahme der CD-Spektren war es nötig, ein optisch inaktives Lösungsmittel zu wählen, das möglichst keine oder nur geringe Absorptionseigenschaften im Meßbereich aufwies. Aus diesem Grund wurden alle Proteine zuvor in 5 mM Phosphatpuffer pH 8,0 dialysiert. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile, wie α -Helix, β -Faltblatt und Reststruktur, erfolgte aus der Dekonvolution der jeweiligen CD-Spektren mit Hilfe von drei verschiedenen Auswerteprogrammen und ist separat in Kapitel 3.4.2.4 auf Seite 77 beschrieben.

3.4.2.1 VERGLEICH VON wt- UND $\Delta F508$ -MBP-NBD1

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit lag in der Klärung der Grundfrage, ob die Mutation $\Delta F508$ eine Veränderung im Sekundärstrukturprofil der isolierten NBD1 hervorruft. Hierzu wurden die an Amylose-Agarose aufgereinigten wt- und $\Delta F508$ -MBP-NBD1s sowie das MBP CD-spektroskopisch untersucht (Abbildung 3-19).

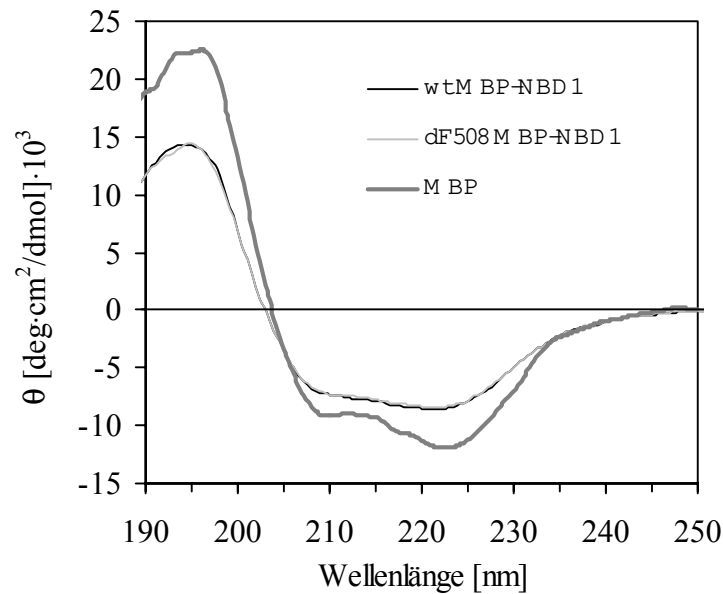


Abbildung 3-19: CD-Spektren von wt-, Δ F508-MBP-NBD1 und MBP

Analog dem MBP bildeten die löslich exprimierten und an Amylose-Agarose aufgereinigten Fusionsproteine definierte Sekundärstrukturen aus und lagen trotz ihrer Polydispersität nicht in denaturierter Form vor. Der unterschiedliche Verlauf der CD-Spektren von Fusionsproteinen und MBP liegt im Beitrag der jeweiligen NBD1-Anteile zur Elliptizität begründet und zeigt eindeutig das Vorhandensein von NBD1-Sekundärstrukturen auf. Auffallend ist hierbei der im Vergleich zum MBP erhöhte β -Faltblattanteil, zu erkennen an der Abnahme des Maximums um 195 nm und an der generell schwächeren Elliptizität über den gesamten Wellenlängenbereich. Desweiteren ist eine Reduktion des α -helikalen Strukturanteils deutlich sichtbar, da die Ausbildung der beiden Minima um 210 und 222 nm, wie sie für α -helixreiche Proteine charakteristisch ist, bei den CD-Spektren der Fusionsproteine nahezu verschwindet.

Weiterhin erkennbar ist die Identität der Spektren von wt- und Δ F508-MBP-NBD1. Daraus folgt, daß unter den gegebenen Bedingungen mittels CD-Spektroskopie keine durch die Mutation Δ F508 verursachte Veränderung des NBD1-Sekundärstrukturprofils im Vergleich zum Wildtyp detektierbar war (vgl. auch die Sekundärstrukturberechnungen ab Seite 77).

3.4.2.2 EINFLUß VON SDS AUF DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR

Wie in Abbildung 3-16 auf Seite 69 dargestellt, konnte durch Zugabe von SDS in steigender Konzentration eine partielle Auflösung der MBP-NBD1-Aggregate erreicht werden. Um zu überprüfen, ob mit der Detergensbehandlung Sekundärstrukturveränderungen verbunden waren, erfolgten parallel dazu CD-spektroskopische Untersuchungen (Abbildung 3-20).

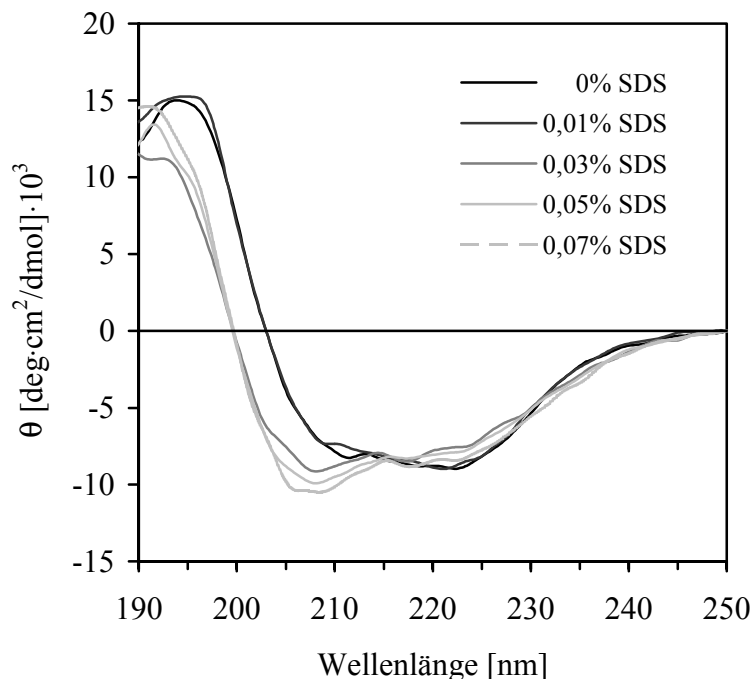


Abbildung 3-20: Einfluß von SDS auf die Sekundärstruktur von wt-MBP-NBD1
CD-Spektren von MBP-NBD1 in Gegenwart verschiedener SDS-Konzentrationen.

Wie aus der obigen Abbildung erkennbar, verursachte das Detergens ab einer Konzentration von 0,03 % eine drastische Veränderung im Sekundärstrukturprofil von wt-MBP-NBD1. In Kontrollexperimenten war kein Unterschied zu $\Delta F508$ -MBP-NBD1 erkennbar. Desweiteren nahmen sowohl die CD-Spektren der MBP-Fusionsproteine als auch die des MBP ab 0,03 % SDS eine ähnliche Form an (Daten nicht gezeigt). Eine monodisperse Sedimentation der Fusionsproteine bei dieser SDS-Konzentration wurde jedoch noch nicht beobachtet (vgl. Seite 68). Eine Auflösung der Proteinaggregate durch SDS war demnach ohne eine Beeinflussung der Sekundärstruktur nicht möglich. Aus diesem Grund wurde von weiteren Solubilisierungsexperimenten mit SDS abgesehen.

3.4.2.3 DE- UND RENATURIERTE PROTEINE

Wie in Kapitel 3.4.1.3 (Seite 69) geschildert, war eine weitgehende Auflösung der MBP-NBD1-Aggregate durch Denaturierung in 0,08 % SDS / 8 M Harnstoff-haltigem Denaturierungspuffer und anschließende Renaturierung mittels Dialyse gegen Phosphatpuffer erreichbar. Von Bedeutung erschien daher eine Überprüfung des Vorhandenseins von Sekundärstrukturen in den renaturierten Proteinen, zumal gemäß vorigem Kapitel das im Denaturierungspuffer enthaltene SDS diesbezüglich einen großen Effekt ausübte. Desweiteren bestand Interesse daran, den Einfluß der Denaturierung bei 95 °C zu untersuchen, da von Wulbrand [1994] bei Anwendung dieser Aufreinigungsmethode ein drastischer Unterschied in den Sekundärstrukturen zwischen wt- und $\Delta F508$ -GST-NBD1 gezeigt wurde. Abbildung 3-21 stellt vergleichend die CD-Spektren dar.

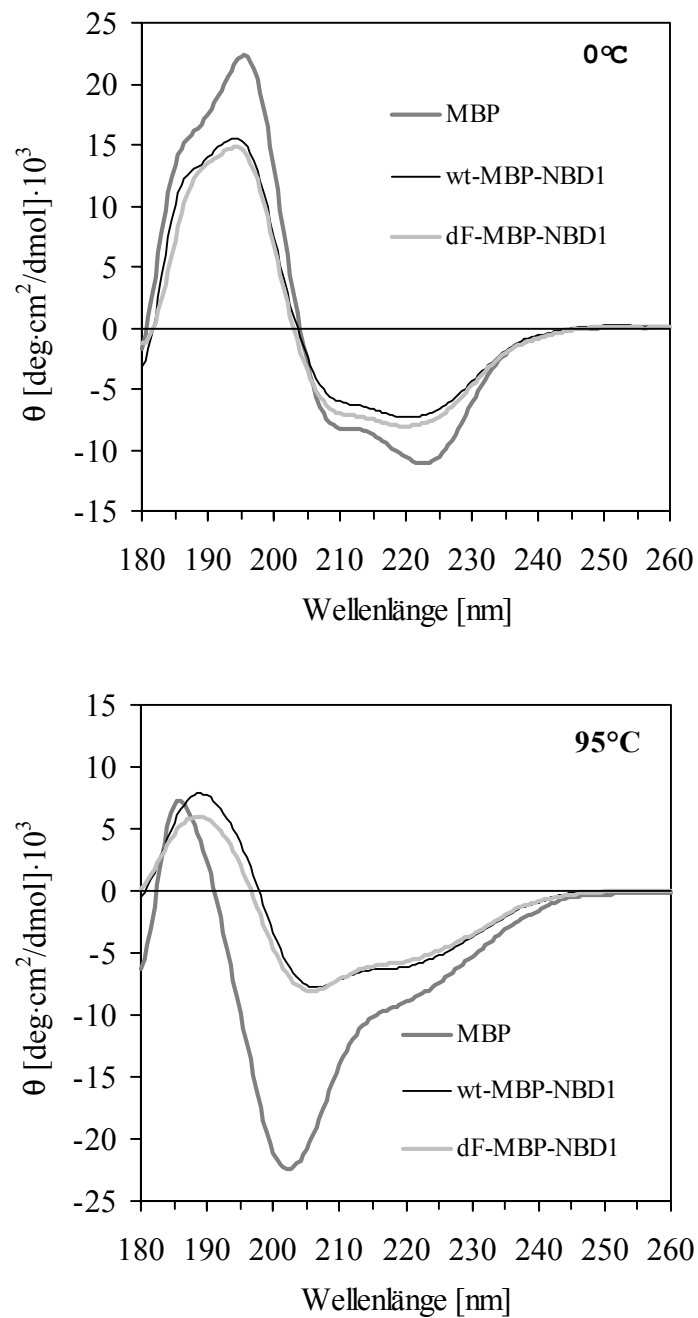


Abbildung 3-21: Einfluß der Denaturierungstemperatur auf die Sekundärstruktur von wt-, Δ F508-MBP-NBD1 und MBP

CD-Spektren renaturierter Proteine nach 10 minütiger Denaturierung in SDS / Harnstoffpuffer bei 0 °C (oben) und 95 °C (unten) und anschließender Renaturierung durch Dialyse gegen Phosphatpuffer.

Die CD-Spektren der bei 0 °C denaturierten und renaturierten Proben nahmen eine nahezu identische Form wie die der unbehandelten, löslich aufgereinigten Proteinpräparationen an (vgl. Abbildung 3-19 auf Seite 74). Demnach erfolgte nach Denaturierung bei 0°C und Renaturierung eine reversible Rückfaltung der zuvor vorhandenen Sekundärstrukturen. Der Aggregationsstatus beeinflusste somit die Sekundärstrukturen der Fusionsproteine nicht.

Im Gegensatz dazu waren drastische Veränderungen zu sehen, wenn die Proteine für zehn Minuten bei 95 °C denaturiert wurden. Deutlich zu erkennen sind hier die stark reduzierten Elliptizitäten unterhalb von 215 nm, insbesondere die annähernde Halbierung der jeweiligen Elliptizitäts-Maxima und deren Verschiebung zu kleineren Wellenlängen von ca. 196 nm zu 190 nm. Dieser Befund ist ein Indiz für den Verlust von geordneten Sekundärstrukturen. Es wurde daher vermutet, daß die bei 95 °C behandelten Proteinproben in modifizierter, möglicherweise auch in denaturierter Form vorlagen. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen MBPs und MBP-NBD1s abschließend auf ihre Fähigkeit überprüft, an Amylose-Agarose zu binden. Dabei war ein drastischer Aktivitätsverlust bei den „95 °C-Proben“ zu beobachten. Nach densitometrischen Auswertungen verringerte sich die Aktivität auf 44,2 % für das MBP, 19,6 % für wt-MBP-NBD1 und 13,6 % für Δ F508-MBP-NBD1 im relativen Vergleich zu den jeweiligen „0 °C-Proben“. Damit bestätigte sich, daß die Inkubation bei 95 °C in SDS / Harnstoffpuffer eine irreversible Denaturierung der Proteinproben zur Folge hatte.

Weiterhin ist aus der obigen Abbildung ersichtlich, daß im Rahmen der Meßgenauigkeit weder für die bei 0°- noch für die bei 95 °C-vorinkubierten Fusionsproteine ein signifikanter Unterschied in den Sekundärstrukturen zwischen Wildtyp und Δ F508-Mutante zu erkennen war.

3.4.2.4 BERECHNETE SEKUNDÄRSTRUKTURANTEILE

Da das CD-Spektrum eines Proteins die Information über dessen Sekundärstruktur enthält, können daraus mit Hilfe computergestützter Auswertemethoden α -Helix- und β -Faltblattanteile berechnet werden (Dekonvolution). In dieser Arbeit wurden dazu drei verschiedene Rechenalgorithmen (YANG, SELCON II, CDNN) verwendet. Auf diese Weise war es möglich, die jeweiligen Auswertemethoden miteinander zu vergleichen und Aussagen über die Verlässlichkeit der erhaltenen Ergebnisse zu treffen. Tabelle 3-2 faßt die Daten für die in Abbildung 3-19 auf Seite 74 dargestellten CD-Spektren von wt-, Δ F508-MBP-NBD1 und des MBP zusammen.

Tabelle 3-2: Sekundärstrukturanteile für wt-, ΔF508-MBP-NBD1 und MBP [%]

Protein	Anpassung	α-Helix	β-Faltblatt	β-turn	pp ⁴⁾	Rest
wt-MBP-NBD1	YANG ¹⁾	31 ± 4	35 ± 5	14 ± 2	-	21 ± 3
	SELCON II ²⁾	30 ± 4	20 ± 3	22 ± 3	10 ± 2	18 ± 3
	CDNN ³⁾	28	11 ^a + 10 ^p	17	-	35
ΔF-MBP-NBD1	YANG	30 ± 5	36 ± 5	13 ± 2	-	21 ± 3
	SELCON II	29 ± 5	21 ± 3	23 ± 4	10 ± 2	18 ± 3
	CDNN	27	11 ^a + 10 ^p	17	-	35
MBP	YANG	39 ± 7	42 ± 7	11 ± 2	-	9 ± 2
	SELCON II	36 ± 7	16 ± 3	18 ± 3	9 ± 2	21 ± 4
	CDNN	35	5 ^a + 9 ^p	15	-	36

¹⁾ Yang *et al.* [1986], Chang *et al.* [1978]; ²⁾ Sreerama und Woody [1993; 1994a und b]; ³⁾ Böhm *et al.* [1992]; ⁴⁾ Poly-Prolin-(II)-loop, wird nur von SELCON II ausgegeben; CDNN berechnet a = antiparallele und p = parallele β-Faltblattanteile; Es wurde jeweils der identische CD-Datensatz verwendet; alle Werte sind auf 100 % normiert.

Wie bereits visuell an der Form der CD-Spektren erkennbar, war auch hier erwartungsgemäß innerhalb einer Auswertemethode kein signifikanter Unterschied in den Sekundärstrukturanteilen zwischen Wildtyp und ΔF508-Mutante zu erkennen. Allerdings wichen die absoluten Werte je nach Rechenalgorithmus mehr oder weniger stark voneinander ab, obwohl jeweils der identische CD-Datensatz vorgegeben wurde. Während die Strukturvorhersage für den α-Helixanteil bei allen Modellen im Rahmen der Fehlergrenzen noch übereinstimmte, waren die β-Faltblattanteile nach YANG [Yang *et al.*, 1986] systematisch um ca. 15 % bei den Fusionsproteinen und um 26 % beim MBP erhöht. Für die β-turn-Strukturanteile lieferte SELCON II [Sreerama und Woody, 1993, 1994a und 1994b] um 3-9 % höhere Werte. Die Reststrukturanteile (*random coil*) wurden wiederum vom neuronalen Netzwerk CDNN [Böhm *et al.*, 1992] am höchsten eingestuft. Unter Einbeziehung des nur von SELCON II ausgerechneten Poly-Prolin-(II)-Strukturtyps ergab sich für alle Proteine eine Zunahme der Reststrukturanteile in der Richtung YANG → SELCON II → CDNN. Der visuellen Interpretation entsprachen die nach CDNN kalkulierten Daten am ehesten, da nach diesem Algorithmus der Unterschied in den β-Faltblattanteilen zwischen Fusionsproteinen (21 %) und MBP (14 %) am deutlichsten erkannt wurde (zum relativen Fehler der CDNN-Daten siehe unten). Die Abnahme des α-Helixgehaltes vom MBP zu den Fusionsproteinen wurde von allen Anpassungsprogrammen ähnlich interpretiert.

In Tabelle 3-2 sind die berechneten Sekundärstrukturdaten für die jeweils bei 0 °C und 95 °C denaturierten und anschließend renaturierten Proteine aufgeführt.

Tabelle 3-3: Sekundärstrukturanteile de- und renaturierter Proteine [%]

Protein	Anpassung	α -Helix	β -Faltblatt	β -turn	pp ⁴⁾	Rest
wt-MBP-NBD1 0 °C	YANG ¹⁾	23 ± 6	65 ± 18	0,5 ± 0,1	-	12 ± 3
	SELCON II ²⁾	22 ± 3	26 ± 4	13 ± 2	11 ± 2	29 ± 4
	CDNN ³⁾	26	11 ^a + 10 ^p	16	-	37
wt-MBP-NBD1 95 °C	YANG	11 ± 2	57 ± 11	0,5 ± 0,1	-	32 ± 6
	SELCON II	18 ± 2	27 ± 4	22 ± 3	12 ± 2	21 ± 3
	CDNN	-	-	-	-	-
Δ F-MBP-NBD1 0 °C	YANG	24 ± 5	57 ± 12	3,3 ± 0,7	-	16 ± 3
	SELCON II	22 ± 4	25 ± 4	16 ± 3	10 ± 2	26 ± 5
	CDNN	26	11 ^a + 10 ^p	17	-	36
Δ F-MBP-NBD1 95 °C	YANG	8 ± 2	57 ± 11	1,0 ± 0,2	-	34 ± 6
	SELCON II	17 ± 2	29 ± 3	22 ± 2	13 ± 1	20 ± 2
	CDNN	-	-	-	-	-
MBP 0 °C	YANG	39 ± 7	42 ± 7	11 ± 2	-	8,7 ± 1,5
	SELCON II	35 ± 7	18 ± 3	18 ± 3	9 ± 2	20 ± 4
	CDNN	34	5 ^a + 9 ^p	15	-	37
MBP 95 °C	YANG	6 ± 2	13 ± 5	9 + 3	-	73 ± 26
	SELCON II	16 ± 3	17 ± 3	25 ± 5	23 ± 5	19 ± 4
	CDNN	-	-	-	-	-

Fußnoten siehe Tabelle 3-2

VERGLEICH DER UNBEHANDELTEN MIT DEN BEI 0 °C DENATURIERTEN PROTEINEN

Obwohl die CD-Spektren der unbehandelten und der „0 °C-Proben“ fast identisch waren (vgl. Abbildung 3-19, S. 74 und Abbildung 3-21, S. 76), ergaben sich diesbezüglich unerwartet große Unterschiede in der Auswertung nach SELCON II und YANG. Insbesondere fallen die nach YANG berechneten ungewöhnlich hohen β -Faltblattanteile auf. Die Ergebnisse aus CDNN dagegen blieben den Erwartungen entsprechend annähernd unverändert.

VERGLEICH DER BEI 0 UND 95 °C DENATURIERTEN PROTEINEN

Da gemäß vorigem Kapitel die 95 °C-Inkubation in SDS / Harnstoff zum Verlust von geordneten Sekundärstrukturen und zu drastisch verminderten biologischen Aktivitäten führte, wurde eine Kalkulation erhöhter Reststrukturwerte erwartet.

Nach YANG konnte eine Erhöhung des Reststrukturanteils ausnahmslos bestätigt werden (Zunahme von „0 nach 95 °C“: wt: +20 %; Δ F: +18 %; MBP: +62 %). Auch der α -Helix-anteil sank nach YANG drastisch um jeweils 12 %, 16 %, und 33 %. Eine Abnahme des β -Faltblattanteils dagegen war nach YANG nur beim MBP eindeutig zu sehen. Darüberhinaus wurden allen de- und renaturierten Fusionsproteinen unerwartet hohe β -Faltblattanteile zugeordnet.

Die Auswertung nach SELCON II bestätigte eine Auffaltung der Proteinproben durch die Denaturierung bei 95 °C nicht, da die berechneten Reststrukturanteile im Vergleich zu den „0 °C-Proben“ durchgehend niedriger ausfielen. Lediglich beim MBP ist eine signifikante Abnahme des α -Helix- auf Kosten einer Zunahme des β -turn- und des Poly-Prolin-Anteils berechnet worden. Für die Fusionsproteine wurden von SELCON II nur geringfügige, nicht signifikante Abnahmen der α -helikalen Anteile „von 0 nach 95 °C“ erkannt.

Für das neuronale Netzwerk CDNN ergaben sich für die CD-Spektren der „95 °C-Proben“ ausschließlich Lösungen mit Gesamtstrukturanteilen von 113,1-118,9 % gegenüber 102,7-107,2 % bei den unbehandelten und „0 °C-Proben“. Damit war die maximal zulässige Abweichung für die Anpassung von mehr als 10 % überschritten [Böhm *et al.*, 1992; CDNN *instruction manual*, 1997]. Auf eine Angabe der nicht akkuraten Sekundärstrukturdaten wurde deshalb verzichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Vergleich der drei verwendeten Dekonvolutionsprogramme erwies sich das neuronale Netzwerk CDNN als am zuverlässigsten, da

- wie bei der rein visuellen Interpretation der CD-Spektren den nicht denaturierten MBP-Fusionsproteinen signifikant verminderte α -helikale und signifikant erhöhte β -Faltblattanteile im Vergleich zum nicht denaturierten MBP zugeordnet wurden
- die berechneten Sekundärstrukturanteile von nicht denaturierten und bei 0 °C denaturierten (und renaturierten) Proben nur geringfügig voneinander abwichen, bzw. dieser Befund mit der Form der CD-Spektren übereinstimmte
- generell die Schwankungsbreite der erhaltenen Werte im Vergleich zu SELCON II und YANG bedeutend geringer war
- die Auswertung der bei 95 °C vorinkubierten Proben ohne Ausnahme zu keiner verlässlichen Sekundärstrukturzuordnung führte (Anpassungsfehler >10 %) und auf das Vorhandensein von denaturierten Proteinen hinwies.

Nach CDNN ergab sich für die unbehandelten und für die bei 0 °C denaturierten und anschließend renaturierten wt- und Δ F508-MBP-NBD1 ein Gehalt von etwa

- 27 % α -Helix, 11 % antiparallelem bzw. 10 % parallelem β -Faltblatt, 16,2 % β -turn und 36 % Reststruktur.

Dem unbehandelten und bei 0 °C denaturierten und anschließend renaturierten MBP wurden von CDNN etwa

- 35 % α -Helix, 5,1 % antiparalleles, 8,9 % paralleles β -Faltblatt, 15,1 % β -turn und 36 % Reststruktur zugeordnet.

Im Rahmen der Fehlerbreite wurden von allen drei Auswerteprogrammen keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelter wt- und Δ F508-MBP-NBD1 berechnet. Bezüglich der 95 °C-Vorinkubation bestätigte nur der YANG-Algorithmus eindeutig die Zunahme von Reststrukturanteilen.

4 DISKUSSION

Bei der Deletion von Phenylalanin 508 in der ersten NBD1 von CFTR handelt es sich um die häufigste CF-verursachende Mutation. Um die Auswirkungen dieser Mutation auf Proteinebene besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit biochemische und biophysikalische Untersuchungen an der NBD1 von CFTR durchgeführt. Dabei galt es zu klären, ob die isolierte Domäne in der Lage ist, intrinsisch ATP zu binden und/oder zu hydrolysieren. Desweiteren war eine Untersuchung der hydrodynamischen Eigenschaften sowie ein Vergleich der Sekundärstrukturprofile von wt- und Δ F508-NBD1 von besonderem Interesse. In diesem Kapitel erfolgt eine Interpretation der Ergebnisse sowie ein Vergleich mit publizierten Daten.

4.1 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER NBD1

Bezüglich der Proteinexpression und –aufreinigung der NBD1 von CFTR wurden die folgenden Anforderungen gestellt:

- A. Die NBD1 sollte in löslicher Form exprimiert werden, um
 - die Durchführung eines aufwendigen De- und Renaturierungsprotokolls zu vermeiden
 - einen Vergleich zwischen nativ und denaturierend [Wulbrand, 1994] aufgereinigter NBD1 ziehen zu können.
- B. Für die biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen war es erforderlich,
 - die NBD1 im Milligramm-Maßstab aufzureinigen,
 - einen Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteinpräparationen von mindestens 90 % zu erzielen und
 - ein in wäßriger Pufferlösung stabiles Protein zu erhalten.

Die aufgeführten Anforderungen konnten mit dem in *E. coli* exprimierten Konstrukt MBP-NBD1(N386-F650) erfüllt werden. Im Gegensatz zu allen GST-NBD1-Konstrukten war das MBP-Fusionsprotein in signifikant größeren Mengen löslich exprimierbar, nach Affinitätschromatographie mit hohem Reinheitsgrad (90 bis 92 %) isolierbar und in wäßriger detergensfreier Pufferlösung stabil. Tabelle 4-1 faßt die Proteinexpression und –aufreinigung der untersuchten Konstrukte vergleichend zusammen.

Tabelle 4-1: Vergleich der Expression und –aufreinigung von NBD1-Fusionsproteinen

Protein	lösliche Protein-expression	Proteinausbeute und Reinheitsgrad	Stabilität in Puffer
<u>GST-NBD1-Konstrukte</u>			
R347-A596	} <1 %	<1 µg/10 ⁶ Sf9-Zellen (ca. 80 %)	wenige Tage
T351-S589			
D373-S589			
G404-S589			
F433-S589			
<u>MBP-NBD1-Konstrukt</u>			
N386-F650	ca. 10 %	3–5 mg/g BFM ¹⁾ (90-92 %)	stabil

¹⁾ BFM = *E. coli*-Biofeuchtmasse

AUSWAHL DES NBD1-ABSCHNITTS

Einen kritischen Punkt stellte die Auswahl des NBD1-Abschnitts dar. Die minimalen Grenzen der NBD1 sind durch die Walkermotive A und B definiert. Unter der Annahme, daß die R-Domäne evolutionär durch Exoneinschub entstanden ist und damit der Beginn von Exon 13 die C-terminale Grenze beschreibt, resultiert für die NBD1 der Bereich von F433 bis I586 [Riordan *et al.*, 1989; Zielenski *et al.*, 1995]. Da diese Überlegungen nur auf Modellannahmen beruhen, schlug Wulbrand [1994] vor, den N-terminalen Prä-NBD1-Bereich (R347-N432) bis zur sechsten Transmembrandomäne zu berücksichtigen. Aufgrund der geringen Löslichkeit dieses Konstrukts wurden im Anschluß N-terminal verkürzte NBD1-Abschnitte kloniert und exprimiert, ohne dabei die C-terminale Grenze wesentlich zu verändern (T351-S589 bis F433-S589). Neuere Untersuchungen wiesen jedoch darauf hin, daß die C-terminale Grenze aus folgenden Gründen weiter gefaßt werden mußte:

- ⇒ Aktuelle Sequenzvergleiche lieferten Hinweise darauf, daß eine Homologie zu anderen nukleotidbindenden Domänen aus der ABC-Transporterfamilie nicht bis I586 sondern bis F650 besteht [Havarstein *et al.*, 1995].
- ⇒ Die Berechnung eines dreidimensionalen Strukturmodells für die NBD1 basierend auf der von Abrahams *et al.* [1994] publizierte Röntgenstruktur der bovinen F₁-ATPase-Untereinheiten α und β [Annereau *et al.*, 1997a und b] ließ auf eine entsprechende Erweiterung der C-terminalen NBD1-Grenze bis F650 schließen.
- ⇒ Mutationen im N-terminalen Bereich L610-L633 der „R-Domäne“ führten nach Überexpression in COS-Zellen ausschließlich zu kernglykosyliertem CFTR [Annereau *et al.*, 1997b; Vankeerberghen *et al.*, 1998]. Dies ist charakteristisch für Mutationen in der NBD1 (z.B. Δ F508). Dagegen übten Missense-Mutationen im Bereich D648-R766 keinen Effekt auf die Proteinreifung aus. Diese Befunde implizierten eine „Aufteilung“

der R-Domäne in zwei Segmente, von denen der N-terminale der NBD1 zuzuordnen ist.

⇒ Yike *et al.* [1996a und b] testeten fünf verschiedene NBD1-Konstrukte auf Expression und Stabilität. Dabei war die NBD1(E384-F650) in wäßriger Lösung am stabilsten.

Die exakte Auswahl des NBD1-Abschnitts ist dennoch nicht einheitlich beschrieben. Während Annereau *et al.* [1997a und b] der NBD1 den Abschnitt L453-F650 zuordnen, postulieren Bianchet *et al.* [1997] den Bereich L441-K684. Weitere in Position und Ausdehnung variierende NBD1-Konstrukte sind in Tabelle 4-1 und in Tabelle 4-6 aufgeführt. Übereinstimmung findet sich dahingehend, daß die NBD1 C-terminal weiter gefaßt werden muß, als ursprünglich von Riordan *et al.* [1989] (I586) angenommen. In dieser Arbeit wurde insbesondere aufgrund der experimentellen Befunde von Yike *et al.* [1996a und b] der CFTR-Abschnitt N386-F650 gewählt, um eine in wäßriger Lösung maximal stabile NBD1 zu erhalten.

VERGLEICH DER EXPRESSIONSSYSTEME

Das pMAL- und pGEX-System wurden ausgewählt, da sie in vielen Fällen eine lösliche Expression bzw. eine effiziente Aufreinigung des betreffenden Zielproteins im Milligramm-Maßstab ermöglichen. Obwohl es sich bei der ersten nukleotidbindenden Domäne von CFTR um eine cytosolisch lokalisierte Untereinheit mit einem hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren handelt [Riordan *et al.*, 1989], war die erwünschte lösliche Expression mit den genannten Systemen nur bedingt realisierbar. Bei Verwendung eines weiteren in dieser Arbeit getesteten pTrx-Systems der Firma Invitrogen [LaVallie *et al.*, 1992] (Daten nicht gezeigt), bei dem eine Expression der NBD1 als Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* erfolgte, ergab sich wie beim pGEX-System eine fast 100 %ige Produktion von unlöslichen Trx-NBD1-*inclusion bodies*. Ausschließlich das pMAL-System ermöglichte eine lösliche Proteinexpression. Demnach besitzt das N-terminal fusionierte MBP besondere Eigenschaften, die zu einer entscheidenden Verbesserung von Löslichkeit und Stabilität der NBD1 führen. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigt, daß die Position und Ausdehnung der NBD1 dabei nur eine untergeordnete Rolle spielt. So berichten Ko und Mitarbeiter [Ko *et al.*, 1993; Ko und Pedersen, 1995] von einem in *E. coli* löslich exprimierbaren MBP-NBD1(F433-S589)-Konstrukt. Derselbe Abschnitt (F433-S589) wurde in dieser Arbeit als GST-Fusionsprotein in *E. coli* fast ausschließlich unlöslich exprimiert. Ein die lösliche Expression fördernder Effekt durch das MBP wird auch bei anderen nukleotidbindenden Domänen aus der ABC-Transporterfamilie beobachtet. So gelingt auf analoge Weise eine Aufreinigung der NBD2 von CFTR [Randak *et al.*, 1997] sowie der NBD1 und NBD2 von P-Glykoprotein [Sharma und Rose, 1995, Wang *et al.*, 1999], während die entsprechenden GST-Fusionsproteine fast quantitativ unlöslich exprimiert werden [Hartman *et al.*, 1992; Wulbrand, 1994; Randak *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999]. Wang *et al.* [1999] schlagen generell das pMAL-System als Methode der Wahl für die Expression und Aufreinigung von nukleotidbindenden Domänen der ABC-Transporterfamilie vor.

Der stark unterschiedliche Einfluß der N-terminalen Fusionspartner MBP und GST auf die lösliche Expression der NBD1 ist möglicherweise auf folgende Ursachen zurückzuführen:

- ⇒ Nach Röntgenstrukturanalyse liegt die GST als Homodimer vor [McTigue *et al.*, 1995]. In Fusion mit der NBD1, welche stark zur Selbstaggregation neigt, werden somit NBD1-NBD1-Interaktionen im Zuge der Translation des GST-Fusionsproteins gefördert und führen zur Bildung von *inclusion bodies*. Diese Hypothese findet Unterstützung darin, daß häufig eine Aggregation von GST-Fusionsproteinen beobachtet wird, wenn zusätzlich der C-terminale Fusionspartner definierte Di- oder Oligomere ausbildet. So führt die Expression von DNA-Einzelstrang-bindendem Protein (SSB) als GST-Fusionsprotein in *E. coli* aufgrund der Homodimerisierung von GST und der Homotetramerisierung von SSB zu einem präzipitierenden „Protein-Netzwerk“ [persönliche Mitteilung von Herrn Priv. Doz. Claus Urbanke]. Analog führen Nemoto *et al.* [1994] die Bildung von hochmolekularen GST-ARSBD-Oligomeren (ARSBD = Steroid bindende Domäne des Androgenrezeptors) auf GST-GST- und ARSBD-ARSBD-Homodimerisierungen zurück. Entsprechende Phänomene werden für das 90-kDa-Hitzeschockprotein [Nemoto *et al.*, 1995] und für den humanen c-Jun Leucin-Zipper [Riley *et al.*, 1996] beschrieben. Das MBP liegt im Gegensatz zur GST als Monomer vor [Spurlino *et al.*, 1991]. Hydrophobe NBD1-NBD1-Wechselwirkungen, die während der Proteintranslation zur Aggregation und zur Bildung von IBs führen können, treten deshalb im Vergleich zum GST-Fusionsprotein vermindert auf.
- ⇒ Bei der GST handelt es sich um ein detoxifizierend wirkendes Enzym aus *Schistosoma japonicum*, das keinerlei Verwandtschaftsgrad mit der NBD1 aufweist. Das *malE*-Genprodukt MBP dagegen ist Bestandteil des *E. coli*-Maltose-Importsystems Mal (E)FGK₂, einem Mitglied aus der Familie der ABC-Transporter [Überblick: Nikaido *et al.*, 1994; Ehrmann *et al.*, 1998]. *In vivo* ist das MBP im Periplasma lokalisiert. Dort bindet es Maltose und transportiert das Substrat zu dem in der Cytoplasma-Membran lokalisierten Mal FGK₂-Komplex. Dieser befördert auf ATP-abhängige Weise das Substrat in die Zelle. Die Komponente MalK entspricht der nukleotidbindenden Domäne und tritt im Komplex als Homodimer auf [Kennedy und Traxler, 1999]. Schneider *et al.* [1995] berichten von einer Zugänglichkeit der MalK-Untereinheiten von der periplasmatischen Seite. Es ist daher möglich, daß MBP und MalK direkt miteinander interagieren können. Aufgrund der Sequenzhomologie der NBDs von ABC-Transportern ist zu vermuten, daß das MBP auf analoge Weise Wechselwirkungen mit der NBD1 von CFTR eingehen kann. Dies könnte der NBD1 zu einer stabileren Proteinkonformation verhelfen. Als Folge davon wird eine im Vergleich zur GST signifikant löslichere Expression des MBP-Fusionsproteins beobachtet.

Trotz der geringen löslichen Expressionsrate war es möglich, auch die GST-Fusionsproteine in geringer Ausbeute (bis 200 µg pro g BFM) aus dem cytosolischen Überstand von *E. coli* zu isolieren. Dies konnte vor allem durch eine Optimierung der Kultivierungsparameter (Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 27 °C, Verwendung

des *E. coli*-B-Stammderivates BL21) erreicht werden. Als problematisch erwies sich im Anschluß die Instabilität der aufgereinigten Protein-Präparationen. Dabei war insbesondere nach Entfernung des Detergens durch Dialyse eine spontane Präzipitatbildung zu beobachten. Randak *et al.* [1995 und 1996] berichten ebenfalls von der Möglichkeit, geringe Mengen der zweiten nukleotidbindenden Domäne von CFTR als GST-Fusionsprotein aus dem cytosolischen Überstand von *E. coli* zu isolieren. Die Autoren bemerken, daß die GST-NBD2 nur in Gegenwart von Detergens (1 % Triton X-100) isolierbar ist, während Ausbeute und Reinheitsgrad bedeutend niedriger als beim entsprechenden MBP-Fusionsprotein ausfallen [Randak *et al.*, 1997].

Die Instabilität von aufgereinigten GST-NBD1-Konstrukten in Lösung ist vermutlich insbesondere auf die oben erwähnte GST-Homodimerisierung zurückzuführen. Dabei wird der Übergang von der Aggregat- zur Präzipitatbildung schon bei sehr geringen Proteinkonzentrationen erreicht. Dieser Grenzwert liegt bei den MBP-Fusionsproteinen höher (bis 2 mg/ml). Daher präzipitierten die MBP-Fusionsproteine unterhalb dieses Grenzwertes auch in Abwesenheit von Detergens nicht. Wie die analytischen UZ-Experimente zeigten, bildeten sie dennoch hochmolekulare Aggregate aus (näheres siehe Interpretation der UZ-Daten).

Auch im eukaryontischen *Sf9*-Zellen/Baculovirus-System erfolgte eine zu mehr als 99 %ige unlösliche Proteinexpression der GST-NBD1(R347-A596) mit Ausbeuten von weniger als 1 µg/10⁶ *Sf9*-Zellen (GST: 30 µg/10⁶ *Sf9*-Zellen). Die Arbeitsgruppe um Sorscher [Peng *et al.*, 1993] berichtet von einer Proteinaufreinigung der GST-NBD1(D426-E588) aus *Sf9*-Zellen/Baculoviren mit Ausbeuten von 1,5 µg/10⁶-*Sf9*-Zellen (GST: 25 µg/10⁶ *Sf9*-Zellen). Möglicherweise wurden in dieser Arbeit verhältnismäßig geringere Ausbeuten erzielt, da der Bereich R347-A596 am N-Terminus vier Aminosäuren aus der sechsten Transmembranhelix von CFTR enthält und somit eine Prozessierung der GST-NBD1(R347-A596) in die Zellmembran begünstigt. In jedem Fall neigte dieses Konstrukt wie die in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteine zu spontaner Präzipitatbildung, was in krassem Gegensatz zu den von Wulbrand [1994] beschriebenen Eigenschaften für dieses Protein steht. Die Ursachen für diesen Unterschied liegen in den verschiedenen Proteinaufreinigungsprotokollen begründet und werden auf den Seiten 99 und 102 im Zusammenhang mit den Auswirkungen der Denaturierung bei 95 °C auf die Proteinstruktur eingehend besprochen. Ungewöhnlich erscheint es, daß von Peng *et al.* [1993] keine weiterführenden Daten über die aus *Sf9*-Zellen aufgereinigte GST-NBD1(D426-E588) publiziert wurden. Es ist daher anzunehmen, daß dieses Konstrukt ebenfalls Probleme bezüglich Reinheitsgrad, Stabilität und Löslichkeit bereitet. Gruis und Price [1997] beschreiben die Expression der NBD1(429-591) ohne Fusionspartner in Baculovirus/*Sf9*-Zellen. Das Konstrukt inseriert vollständig in die Zellmembran und ist extrazellulär zugänglich. Demnach kann selbst in eukaryontischen Zellen eine lösliche Proteinexpression der NBD1 nicht erwartet werden.

Tabelle 4-2 stellt im Überblick die publizierten Daten bezüglich Proteinexpression und -aufreinigung der NBD1 von CFTR dar.

Tabelle 4-2: Publierte Daten über die Proteinexpression und –aufreinigung der NBD1 von CFTR

NBD1	Expressionssystem	Aufreinigung	Referenz
R450 – R516	synthetisches Peptid	HPLC	Thomas <i>et al.</i> [1991 und 1992]
D426 – E588	pGEX / <i>E. coli</i>	<i>inclusion bodies</i> De-, Renaturierung, präparative SDS-PAGE	Hartman <i>et al.</i> [1992] Arispe <i>et al.</i> [1992] Logan <i>et al.</i> [1994]
D426 – E588	pGEX / Baculo- virus/ <i>Sf9</i> -Zellen	nativ, GSH-Sepharose	Peng <i>et al.</i> [1993]
F433 – S589	pMAL / <i>E. coli</i>	nativ, Amylose-Agarose	Ko <i>et al.</i> [1993 und 1995]
R347 – A596	pGEX / <i>E. coli</i>	<i>inclusion bodies</i> De-, Renaturierung, präparative SDS-PAGE	Wulbrand [1994]
G404 – S589	pET-His ₆ / <i>E. coli</i>	<i>inclusion bodies</i> De-, Renaturierung, Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qu und Thomas [1996] Strickland <i>et al.</i> [1997] Qu <i>et al.</i> [1997]
E384 – F650	pRSET-His ₆ / <i>E. coli</i>	<i>inclusion bodies</i> De-, Renaturierung, Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Yike <i>et al.</i> [1996a und b]
G404 – K830	pRSET-His ₆ / <i>E. coli</i>	<i>inclusion bodies</i> De-, Renaturierung, Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Townsend <i>et al.</i> [1996] Neville <i>et al.</i> [1998]
F429 – C591	pVL1392- <i>flag-tag</i> / Baculov./ <i>Sf9</i> -Zellen	Membranpräparation	Gruis und Price [1997]

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, bietet die Fusion eines Hexahistidin-Liganden an die NBD1 eine attraktive Alternative zur Proteinisolierung mittels Nickel(II)-Chelat-Affinitätschromatographie. Die Autoren berichten von sehr hohen Reinheitsgraden (> 95 %). Da hier aufgrund der quantitativen Produktion von *inclusion bodies* unter denaturierenden Bedingungen aufgearbeitet werden muß, kam das System in dieser Arbeit jedoch nicht zur Anwendung. Die Aufreinigung der GST-NBD1 nach Hartman *et al.* [1992] entspricht weitgehend dem von Wulbrand [1994] beschriebenen Protokoll. Dabei erfolgt eine Aufreinigung der NBD1 unter denaturierenden Bedingungen mittels präparativer SDS-PAGE. Nur von Ko *et al.* [1993] wird eine lösliche Expression der NBD1 in Fusion mit dem MBP beschrieben. Zusammen mit dem MBP-NBD1-Konstrukt aus dieser Arbeit handelt es sich also um die einzig löslich aufgereinigten NBD1-Konstrukte von CFTR, von denen das vorliegende Konstrukt MBP-NBD1(N386-F650) als einziges die C-terminale Erweiterung berücksichtigt.

Bezüglich Löslichkeit und Stabilität der aufgereinigten Proteine in wäßriger Pufferlösung werden nur von wenigen Autoren exakte Angaben gemacht. Die MBP-NBD1(F433-S589) wird von Ko *et al.* [1993] als in wäßriger Lösung stabil beschrieben, was den Befunden aus

dieser Arbeit entspricht. Die anderen Konstrukte sind vermutlich ohne Ausnahme instabil. So beschreiben Yike *et al.* [1996a], daß nach Entfernung des chaotropen Reagenzes die NBD1 innerhalb von wenigen Stunden präzipitiert. Qu und Thomas [1996], Strickland *et al.* [1997] und Qu *et al.* [1997] beschäftigen sich ausführlich mit der Kinetik des Aggregationsprozesses. Alle Autoren berichten von der Ausbildung hochmolekularer NBD1-Aggregate mit Molekulargewichten von mehr als 400 kDa, was mit den UZ-Ergebnissen aus dieser Arbeit vergleichbar ist (siehe Seite 96).

Die MBP-NBD1(N386-F650) konnte bis maximal 2 mg/ml in wäßriger Pufferlösung aufkonzentriert werden. Die geringe Löslichkeit lag, wie bei den in der Literatur beschriebenen NBD1, in der Ausbildung hochmolekularer Aggregate begründet. Damit eignete sich das Protein nicht für Untersuchungen zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, da für Kristallisationsversuche und für die NMR-Spektroskopie Konzentrationen von mehr als 10 mg/ml erforderlich gewesen wären.

ABSCHLIESSENDE BETRACHTUNGEN ZUR PROTEINEXPRESSION UND -AUFREINIGUNG

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien im prokaryontischen *E. coli*- und im eukaryontischen *Sf9*/Baculovirus-System sowie der Vergleich mit publizierten Daten deuten darauf hin, daß sich die zur Ausbildung einer stabilen Konformation der NBD1 notwendigen Bedingungen weitaus komplexer darstellen, als sie im heterologen Expressionssystem simuliert wurden. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters ist anzunehmen, daß die NBD1 nicht nur rein cytosolisch lokalisiert ist, sondern innerhalb des CFTR-Proteins membranassoziierte Eigenschaften aufweist [vgl. Gruis und Price, 1997; Ko *et al.* 1997]. Diese Eigenschaft allein erklärt jedoch nicht die ausgeprägte Tendenz der NBD1 zur Aggregatbildung. Die Hauptursache liegt vielmehr darin, daß der isolierten exprimierten Domäne essentielle Interaktionen mit anderen Untereinheiten von CFTR fehlen. Ohne das Vorhandensein der für die Stabilität der NBD1-Struktur nötigen Wechselwirkungspartner erfolgt daher selbst im eukaryontischen Baculovirus/*Sf9*-Zellexpressionssystem eine fast quantitative Aggregation bzw. Anreicherung des überexprimierten Produkts im Rückstand. Aus elektrophysiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß die NBD1 und NBD2 in engem Kontakt die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanalpore von CFTR regulieren [Gadsby und Nairn, 1994; Carson *et al.*, 1995; Gunderson und Kopito, 1995; Sheppard und Welsh, 1999] (vgl. Abbildung 4-1). In den Mechanismus ist zusätzlich die R-Domäne involviert. Möglicherweise kann die NBD1 ohne diese beiden Untereinheiten keine stabile Konformation einnehmen und aggregiert unmittelbar nach erfolgter *de novo*-Synthese. Darüberhinaus sind auch essentielle Wechselwirkungen mit Transmembrandomänen vorstellbar. Insbesondere scheint eine Heterodimerisierung mit der NBD2 unter *in vivo*-Bedingungen wahrscheinlich zu sein. So ist die Dimerisierung von nukleotidbindenden Domänen in anderen ABC-Transportern gezeigt worden: Die MalK-Untereinheiten des Maltosetransporters aus *E. coli* sowie die HisP-Untereinheiten der Histidinpermease aus *Salmonella typhimurium* liegen sowohl im Gesamtkomplex als auch in isolierter Form als Homodimere vor [Hung *et al.*, 1998; Kennedy und Traxler, 1999]. Eine Besonderheit von CFTR besteht darin, daß die Sequenzidentität zwischen den NBDs

mit ca. 33 % ungewöhnlich niedrig ausfällt [Bianchet *et al.*, 1997]. Zum Vergleich weisen die nukleotidbindenden Domänen von P-Glykoprotein eine Sequenzidentität von ca. 80 % auf. Wahrscheinlich ist deshalb eine Dimerisierung mit der NBD2 von CFTR notwendig, eine NBD1-NBD1-Homodimerisierung jedoch nicht hinreichend, um eine Absättigung der hydrophoben NBD1-Oberflächenkontakte bzw. eine stabile Konformation des Proteins in Lösung zu erreichen. Diesbezüglich könnte ein möglicher Lösungsansatz darin bestehen, NBD1 und NBD2 zu koexprimieren. Hierzu bieten sich bestimmte Baculovirus-Transfervektoren an, die eine unabhängige Expression zweier Zielgene unter Kontrolle von zwei verschiedenen Viruspromotoren in einer *Sf9*-Zelle ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Expression eines auf einem Gen codierten NBD1/NBD2-Hybrids. Auch entsprechende *in vitro*-Proteinfaltungsexperimente in Gegenwart beider Domänen sind vorstellbar.

Aufgrund der obigen Ausführungen wird deutlich, daß der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz, die NBD1 in isolierter Form zu untersuchen, nur einen Kompromiß darstellen konnte.

4.2 ATP-BINDUNG UND -HYDROLYSE

ATP-BINDUNG

Weder in Fluoreszenztitrationen noch in analytischen UZ-Experimenten konnte eine Wechselwirkung zwischen der NBD1 und dem Fluorophor TNP-ATP nachgewiesen werden. Auch lieferten entsprechende Bindungsexperimente mit radioaktiv markiertem ATP und an verschiedenen ATP-Agarosen keine positiven Ergebnisse.

Die Verwendung von TNP-ATP als Substratanalogon für ATP-Bindungsstudien ist für einige Proteine wie die F_1 -ATPase oder die organische-Anionen-transportierende ATPase gezeigt worden [Pikula *et al.*, 1994; Murataliev *et al.*, 1995; Amano *et al.*, 1996; Weber und Senior, 1996]. Ebenso existieren für die NBD1 von CFTR Daten über die Bindung von TNP-ATP bzw. ATP. In der nachfolgenden Tabelle 4-3 sind die bisher publizierten Dissoziationskonstanten für die isolierte NBD1 vergleichend aufgeführt. Demnach befinden sich alle TNP-ATP-Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich. Überraschenderweise gilt dies auch für das synthetische Peptid R450-R516, obwohl darin das an der ATP-Bindung und -Hydrolyse beteiligte Walker-Motiv B (568 LYLLDS) nicht enthalten ist. In jedem Fall hätte also unter den in dieser Arbeit durchgeführten Testbedingungen eine TNP-ATP-Bindung gemessen werden müssen. Weiterhin zeigen die publizierten Daten, daß kaum ein Unterschied zwischen Wildtyp und der jeweiligen $\Delta F508$ -Mutante zu beobachten ist. Die Autoren schließen daraus, daß die Mutation auf die TNP-ATP-Bindung keinen entscheidenden Einfluß hat.

Tabelle 4-3: Publierte TNP-ATP- und ATP-Dissoziationskonstanten K_D für die NBD1 von CFTR

NBD1	K_D TNP-ATP [μ M]		K_D ATP [μ M]		Referenz
	wt	Δ F508	wt	Δ F508	
R450–R516	$0,49 \pm 0,1$	$0,41 \pm 0,08$	590 ± 360	830 ± 100	Thomas <i>et al.</i> [1991]
F433–S589	1,8	2,3	1800	1900	Ko <i>et al.</i> [1993]
D426–E588	„3,1“ ¹⁾	„3,1“ ¹⁾	„5000“ ¹⁾	„5000“ ¹⁾	Logan <i>et al.</i> [1994]
G404–S589	3	3	k. A. ²⁾	k. A. ²⁾	Qu <i>et al.</i> [1996]
E384–F650	$0,71 \pm 0,26$	$0,36 \pm 0,25$	$2,2 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,4$	Yike <i>et al.</i> [1996a]
G404–K830	$0,81 \pm 0,1$	$0,72 \pm 0,10$	3200	3200	Neville <i>et al.</i> [1998]

¹⁾ Angaben für halbmaximale Bindung; ²⁾ k. A. = keine Angabe

Die angegebenen ATP-Dissoziationskonstanten wurden fluorimetrisch mittels kompetitiver Verdrängungstitration von TNP-ATP durch ATP ermittelt. Dabei fällt auf, daß alle, bis auf die von Yike *et al.* [1996a] publizierten ATP-Dissoziationskonstanten, um zwei bis drei Größenordnungen höher ausfallen als die korrespondierenden TNP-ATP-Werte. Von den jeweiligen Autoren wird diesbezüglich angeführt, daß die schwache ATP-Bindung der NBD1 möglicherweise auf die Funktion von CFTR als ATP-Sensor [Quinton und Reddy, 1992] in der Zelle zurückzuführen ist. Experimentell kann dieser Befund jedoch auch dahingehend interpretiert werden, daß TNP-ATP nicht mit ATP um die Bindungstasche konkurriert, sondern über eine unspezifische, vermutlich hydrophobe Wechselwirkung mit der NBD1 interagiert [vgl. Faller, 1989]. Ausschließlich Yike *et al.* [1996] demonstrierten eine reversible Bindung von TNP-ATP und ATP. Dies mag darin begründet liegen, daß erstmals ein N- und C-terminal erweitertes Konstrukt (E384-F650) verwendet wurde. Die Autoren berichten jedoch davon, daß die renaturierte NBD1 nur für wenige Stunden in wäßriger Pufferlösung stabil war und die Messungen innerhalb von acht Stunden nach erfolgter Renaturierung durchgeführt wurden. Die Daten gelten also nur für ein in seiner Struktur instabiles Protein. Generell zeigten in dieser Arbeit durchgeführte Kontrollexperimente, daß sich die TNP-ATP-Fluoreszenztitration aus folgenden Gründen als artefaktanfällig erwies:

⇒ In Gegenwart von Detergens mit niedriger CMC (Triton-X-100; Tween-20) war eine starke Fluoreszenzverstärkung zu beobachten. Dies ist nur dadurch erklärbar, daß der Fluorophor spontan in Mizellen inkorporiert und aufgrund der zunehmend hydrophoben Umgebung ein falsch positives Emissionssignal erzeugt. Tatsächlich ist diese Eigenschaft für einige Fluorophore bekannt und wird genutzt, um die CMC von Detergentien in Pufferlösung zu bestimmen [Chattopadhyay und London, 1984; Kerkhoff *et al.*, 1996]. Ko *et al.* [1993] berichten von einer Aufreinigung der MBP-NBD1(F433-S589) in Gegenwart von 1 % Triton X-100, während das MBP kommerziell bezogen und nicht mit Detergens behandelt wurde. Kontrollexperimente in dieser Arbeit zeigten, daß unter diesen Bedingungen ein signifikant unterschiedliches Fluoreszenzsignal zwischen Probe (MBP-NBD1) und Negativkontrolle (MBP)

erzeugt werden kann, das allein auf Restkontaminationen von Triton X-100 zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde strikt auf die Anwendung von Detergentien niedriger CMC während der Aufreinigung und während der Fluoreszenzmessungen verzichtet.

- ⇒ Aufgrund der hohen Sensitivität von Fluoreszenzmessungen besteht die Gefahr der Detektion falsch positiver Signale durch Kontaminationen. Um dies auszuschließen, empfiehlt es sich daher, Kontrollexperimente mit direkten Meßmethoden durchzuführen, wie es in dieser Arbeit in der analytischen UZ (und mit radioaktiv markiertem ATP) geschehen ist.
- ⇒ Bei dem TNP-ATP-Fluoreszenzsignal handelt es sich nicht um einen absoluten, sondern um einen relativen Meßwert. Quantitative Angaben über den Anteil an biologisch aktivem Protein in der Probe sind deshalb nicht möglich.
- ⇒ Für Fluoreszenzmessungen ungewöhnlich erweist sich die von den Autoren [s. obige Tabelle] beschriebene Durchführung der TNP-ATP-Titration, wobei der Fluorophor in steigender Konzentration zur Proteinelösung gegeben wird. Zum einen muß dabei aufgrund der Eigenabsorption des Fluorophors ab einer Konzentration von $0,38 \mu\text{M}$ der innere Filtereffekt berücksichtigt werden. Zum anderen steigt zwangsläufig die Intensität des Emissionssignals an. Dadurch muß die Detektorempfindlichkeit im Verlauf des Experiments nachjustiert werden. Aufgrunddessen besteht im Anschluß die Gefahr, Probe und Referenz nur inakkurat aufeinander abzugleichen. In dieser Arbeit durchgeführte Kontrollexperimente bei konstanter Fluorophorkonzentration unter Variation der Proteinkonzentration ergaben ebenfalls keinen Nachweis einer TNP-ATP-Bindung.

Auffallend ist, daß alle publizierten ATP-Dissoziationskonstanten für die isolierte NBD1 ausschließlich auf TNP-ATP-Verdrängungstitrationen beruhen. Aufgrund der Gefahr von Artefaktmessungen wäre daher eine Überprüfung der Ergebnisse mit alternativen Nachweismethoden empfehlenswert gewesen. Es erscheint ungewöhnlich, daß Bindungsexperimente mit radioaktiv markiertem ATP gemäß Khananshvili und Gromet-Elhanan [1984 und 1985] oder (wie in dieser Arbeit) gemäß Miller und Weissbach [1974] noch nicht beschrieben worden sind. Hierbei handelt es sich um etablierte Standardmethoden, die bei der biochemischen Charakterisierung von ATP-bindenden und -hydrolysierenden Proteinen routinemäßig Anwendung finden.

ATP-HYDROLYSE

Die initial detektierte ATPase Aktivität von nach Amylose-Affinitätschromatographie erhaltenen MBP-NBD1-Präparationen war aus folgenden Gründen auf Verunreinigungen zurückzuführen:

- Es waren die Faltungshelferenzyme GroEL und DnaK assoziiert, welche erst durch Behandlung mit Mg^{2+}/ATP nahezu quantitativ entfernt werden konnten. Dadurch erhöhte sich der Reinheitsgrad des Proteins von 87 % auf 92 %. Die spezifische Hydrolyserate dagegen halbierte sich von ca. 11 auf 5,5 ATP-Moleküle pro Molekül MBP-NBD1 pro Minute (in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+}/ATP).
- Nach FPLC am Anionenaustauscher korrelierte die ATPase Aktivität nicht mit dem Elutionsprofil des Proteins. Die Hydrolyserate der ersten beiden Hauptfraktionen unter V_{max} -Bedingungen (5 mM Mg^{2+}/ATP) verminderte sich auf 0 bzw. weniger als 0,05 Moleküle ATP pro Molekül MBP-NBD1 pro Minute.

Angesichts solch niedriger Werte wurde davon ausgegangen, daß die MBP-NBD1 keine intrinsische ATPase Aktivität besitzt.

Bei der Assoziation der Faltungshelferenzyme DnaK und GroEL handelt es sich um ein Phänomen, das häufig bei der heterologen Expression von artfremden Proteinen in *E. coli* beobachtet wird. Als Folge der starken Überexpression reagiert die Wirtszelle mit einer erhöhten Expression endogener Faltungshelferenzyme, um einerseits eine Aggregation fehlgefalteter Proteine in der Zelle zu verhindern und andererseits deren Degradation zu ermöglichen. Neben den MBP-Fusionsproteinen war für die in *E. coli* aufgereinigten GST-NBD1-Konstrukte ebenfalls eine Assoziation von DnaK detektierbar (Daten nicht gezeigt). Auch Randak *et al.* [1995] berichten von der Koelution von GroEL mit einem GST-NBD2-Konstrukt. Aus den Befunden eine Funktion der NBD1 *in vivo* als Rezeptor für Chaperone bei der Reifungskontrolle von CFTR abzuleiten, erscheint unwahrscheinlich. Plausibler ist die Annahme, daß die isolierte NBD1 in einer nicht nativen Konformation vorliegt. Dies ist begründbar durch fehlende Interaktionen mit der NBD2 oder anderen CFTR-Untereinheiten (offensichtlich trifft das gleiche für die GST-NBD2 zu [Randak *et al.*, 1995]). Da bei der Aufreinigung des MBP keine Faltungshelferenzyme koeluierten, erfolgte vermutlich die Assoziation von DnaK und GroEL ausschließlich über nicht abgesättigte hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche der NBD1. Strickland *et al.* [1997] demonstrierten in *in vitro*-Experimenten, daß durch das humane Hitzeschockprotein Hsc70 (*heat shock cognate*) eine Selbstaggregation der isolierten NBD1 vermindert werden kann. Der Befund bestätigt sich in dieser Arbeit mit dem Hsc70-homologen DnaK während der *de novo*-Synthese des Proteins in *E. coli*.

Analog den Befunden aus dieser Arbeit wurden von Hartman *et al.* [1992], Qu *et al.* [1996], Yike *et al.* [1996a] und Neville *et al.* [1998] keine intrinsischen ATPase Aktivitäten von isolierten rekombinanten NBD1s nachgewiesen. Dem widersprechen die von Ko *et al.* [1995] durchgeführten Untersuchungen an einem MBP-NBD1(F433-S589)-Konstrukt. Bianchet *et al.* [1997] stützen deren experimentellen Befunde durch ein NBD1-

Strukturmodell, das analog Annereau *et al.* [1997a und b] mit Hilfe der Röntgenstruktur der bovinen F₁-ATPase berechnet wurde. Nach diesem Modell katalysiert Glutamat an der Position 504 die Hydrolyse, indem es mit dem γ -Phosphatrest von ATP wechselwirkt. Diese Vorstellung widerspricht jedoch einem aktuellen NBD1-Strukturmodell, welches auf der kürzlich gelösten 3D-Struktur der nukleotidbindenden Domäne HisP basiert [Hung *et al.*, 1998]. Nach dieser Vorstellung ist der Glutamatrest E504 nicht Bestandteil der ATP-Bindungstasche, sondern in einer peripheren α -Helix (α_3) lokalisiert.

Neben Ko *et al.* berichten Randak *et al.* [1997] nicht nur von einer intrinsischen ATPase-, sondern auch von einer GTPase- und Adenylatkinase-Aktivität der zweiten nukleotidbindenden Domäne von CFTR in Fusion mit dem MBP. In Tabelle 4-4 sind die publizierten Daten über die ATPase Aktivitäten der NBDs von CFTR zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 4-4: Publierte intrinsische ATPase Aktivitäten von NBD1 und 2 von CFTR

Protein	k_{cat} [min^{-1}]	$K_{\text{M, ATP}}$ [μM]	Referenz
MBP-NBD1 (F433-S589), 60 kDa	1,8 ¹⁾ (V_{max})	110	Ko <i>et al.</i> [1995]
MBP-NBD2 (G1208-L1399), 64 kDa	0,39 (V_{max})	86	Randak <i>et al.</i> [1997]

¹⁾ entspr. 30 nmol ATP/min/mg Fusionsprotein; über die Δ F508-Mutante existieren keine Daten

Beide NBDs wurden als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert und löslich mittels Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß nur dann die intrinsische ATPase Aktivität erhalten bleibt, wenn die NBDs löslich und nicht - wie bei den anderen Autoren - unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden. Jedoch zeigen die Ergebnisse aus dieser Arbeit, daß hierbei die Gefahr der Kontamination von endogenen ATPasen besteht. Von den Autoren werden sehr niedrige Umsatzraten von 0,4 bzw. 2 Molekülen ATP pro NBD pro Minute unter V_{max} -Bedingungen angegeben. Unter diesem Gesichtspunkt stellt der Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteinpräparationen den entscheidenden Parameter dar. Ko *et al.* [1995] und Randak *et al.* [1997] berichten von Reinheitsgraden um 95 % nach einmaliger Amylose-Affinitätschromatographie [vgl. auch FEBS *Advanced Lecture Course*, Gosau 1999]. Da entsprechende Kontrollversuche mit rechromatographierten Fusionsproteinen von den Autoren nicht beschrieben werden, ist nicht auszuschließen, daß in den restlichen 5 % ATP-hydrolysierende Verunreinigungen enthalten sind. Denn, wie in dieser Arbeit gezeigt, erfolgt selbst nach Rechromatographie mittels FPLC keine vollständige Trennung von Kontamination und Protein. Zudem ist ungewöhnlich, daß von Ko *et al.* [1995] keine Daten über die ATPase Aktivität der Δ F508-Mutante publiziert worden sind. Im Widerspruch zur gemessenen intrinsischen ATPase Aktivität stehen zudem die Befunde aus limitierten proteolytischen Verdau-Experimenten in Gegenwart von ATP. Grundlage bildet dabei die Annahme, daß durch ATP eine Konformationsänderung induziert wird, die das Protein in eine proteaseresistentere Form überführt [vgl. Schneider *et al.*, 1994]. In Trypsinverdau-Experimenten konnten Ko *et al.* [1993] jedoch keinen stabilisierenden

Einfluß von ATP auf die NBD1-Struktur feststellen. Von Randak et al. [1997] sind keine entsprechenden Daten publiziert worden.

Aufgrund der obigen Überlegungen ist anzunehmen, daß die löslichen MBP-Fusionsproteine weniger den Vorteil des Erhalts der intrinsischen ATPase Aktivität der NBDs als vielmehr den Nachteil der Kontamination durch endogene ATPasen mit sich bringen. Diese Gefahr potenziert sich insbesondere im Fall der (MBP)-NBDs, da sie aufgrund ihrer stark ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften hochmolekulare Aggregate in wäßriger Lösung ausbilden.

Die Kontaminationsgefahr durch endogene ATPasen ist bei Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen weitgehend auszuschließen. Dies würde erklären, weshalb die entsprechenden Autoren [Referenzen vgl. Tabelle 4-2] keine NBD1-vermittelten ATPase Aktivitäten detektierten. Qu *et al.* [1996], Yike *et al.* [1996a] und Neville *et al.* [1998] verwendeten das Nickelchelate-Hexahistidin-System zur Aufreinigung der NBD1-His₆ unter denaturierenden Bedingungen. CD-spektroskopische Untersuchungen wiesen das Vorhandensein von geordneten Sekundärstrukturen nach erfolgter Renaturierung nach. Die entsprechenden Autoren berichten von 95 bis 98 % reinen Proteinen. Gemäß Yike *et al.* [1996a] und Neville *et al.* [1998] waren zwar auch hier initial ATPase Aktivitäten nachweisbar, sie reduzierten sich jedoch nach denaturierender Rechromatographie an Nickel-NTA-Agarose auf vernachlässigbar geringe Werte. Die Autoren führen daher die anfangs gemessenen ATP-Hydrolyseraten auf endogene ATPasen von *E. coli* zurück.

Im Zusammenhang mit der ATP-Bindung fällt auf, daß die von Ko *et al.* [1993] publizierte ATP-Dissoziationskonstante von 1,8 mM für die NBD1 (vgl. Tabelle 4-3) um etwa eine Größenordnung höher ausfällt als der in obiger Tabelle aufgeführte K_M -Wert. Dies erscheint ungewöhnlich, da laut Michaelis-Menten-Kinetik der K_M -Wert ($K_M = (k_1 + k_3)/k_2$) größer als die Dissoziationskonstante ($K_D = k_1/k_2$) sein muß. Im Gegensatz dazu ist die von Randak *et al.* [1997] publizierte ATP-Bindungskonstante von $26,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$ mit dem entsprechenden K_M -Wert von 86 μM vereinbar.

ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNGEN ZUR ATP-BINDUNG UND -HYDROLYSE

In dieser Arbeit wurde weder eine intrinsische ATPase Aktivität noch eine ATP-Bindung der isolierten NBD1 festgestellt. Dieser Befund läßt sich damit erklären, daß die isolierte Domäne aufgrund des Fehlens essentieller Wechselwirkungen mit anderen CFTR-Untereinheiten keine stabile Tertiärstruktur ausbilden kann. Als Folge davon entstehen biologisch inaktive polydisperse (MBP)-NBD1-Aggregate. Als wahrscheinliche Wechselwirkungspartner für die NBD1 *in vivo* kommen die NBD2 und die R-Domäne in Frage. Aus elektrophysiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Untereinheiten bezüglich der Kanalregulation von CFTR in engem Kontakt zueinander stehen. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4-1 ein von Sheppard und Welsh [1999] vorgeschlagener Mechanismus der ATP-abhängigen Kanalregulation von CFTR dargestellt.

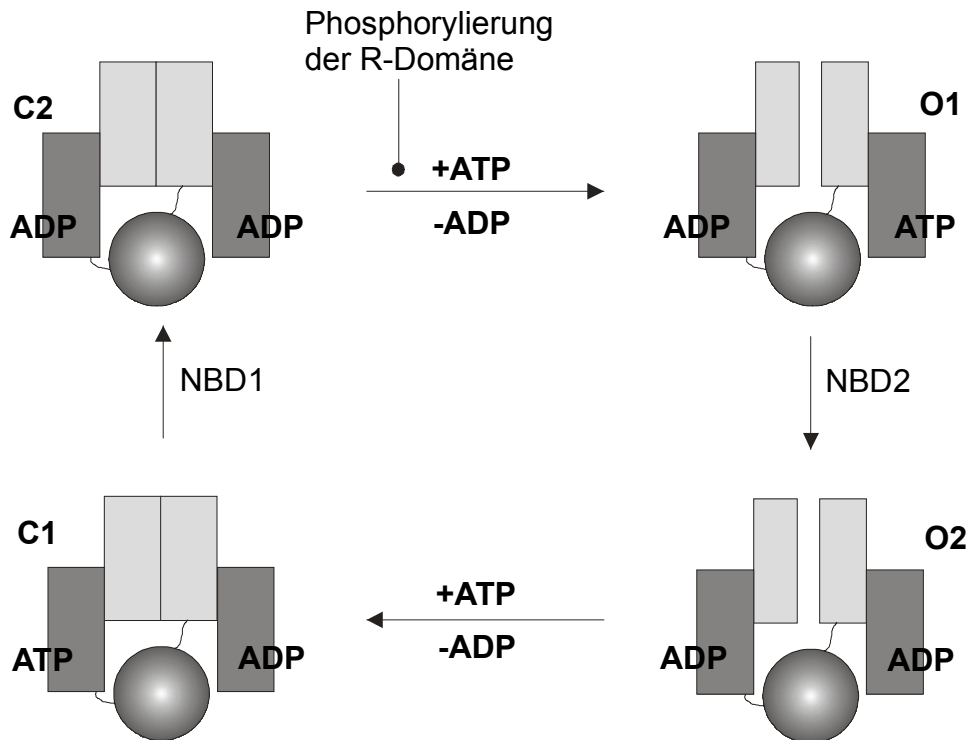


Abbildung 4-1: ATP-abhängige Kanalregulation von CFTR

Modell nach Sheppard und Welsh [1999]. NBD1 und 2 sind hellgrau, Transmembrandomänen dunkelgrau und die R-Domäne dunkelgrau mit hellem Mittelpunkt dargestellt. O1, O2 = offene Zustände 1 und 2; C1, C2 = geschlossene Zustände 1 und 2.

Die Aktivierung von CFTR erfolgt zunächst durch Phosphorylierung der R-Domäne über die cAMP abhängige Proteinkinase A. Erst dann kann die NBD2 gebundenes ADP gegen ATP austauschen und den Kanal vom geschlossenen Zustand C2 in den geöffneten Zustand O1 überführen. In Analogie der Funktionsweise heterotrimerer G-Proteine [Gilman, 1987] findet die ATP-Hydrolyse alternierend zwischen NBD2 und NBD1 statt, wobei aufeinanderfolgend die Zustände O2 bzw. C1 und C2 durchlaufen werden (eine Erweiterung dieses Modells ist möglich). Es wird angenommen, daß dabei der phosphorylierten R-Domäne eine zentrale Rolle als Rezeptor oder Nukleotid-Austauschfaktor zukommt. Damit eine der beiden NBDs ATP binden und hydrolysieren kann, müssen demnach mindestens zwei Voraussetzungen erfüllt sein:

- Es muß eine phosphorylierte R-Domäne anwesend sein.
- NBD1 und NBD2 müssen miteinander interagieren können - möglicherweise sogar dimerisieren.

Neben dem oben dargestellten werden noch weitere Modelle zur Beschreibung der ATP-getriebenen Kanalregulation von CFTR vorgeschlagen [Gadsby und Nairn, 1994; Carson *et al.*, 1995; Gunderson und Kopito, 1995]. Allen liegt zugrunde, daß die NBDs und die R-Domäne in engem Kontakt zueinander stehen.

Das Fehlen der für die NBD1 essentiellen Wechselwirkungen mit anderen CFTR-Untereinheiten äußert sich in der Ausbildung polydisperser Aggregate. Sofern überhaupt eine ATP-Bindung der isolierten NBD1 in Abwesenheit von NBD2 und/oder R-Domäne *in vitro* möglich ist, muß daher eine Auflösung der Aggregate erfolgen. Um dies zu erreichen,

stellt sich die Herausforderung, diejenigen *in vitro*-Bedingungen zu finden, die zur Ausbildung einer nativen NBD1-Konformation nötig sind. Diese Bedingungen können nur auf rein empirischem Wege ermittelt werden und sind möglicherweise für die isolierte NBD1 gänzlich unerreichbar. In dieser Arbeit konnte zwar durch Denaturierung in SDS/Harnstoff-Puffer und Renaturierung mittels Dialyse zunächst eine deutliche Reduzierung der Polydispersität der MBP-NBD1 erreicht werden. Jedoch bei dem Versuch, diese Präparation auf ATP-Bindung und -Hydrolyse zu untersuchen, war bereits während der Dialyse gegen HEPES/MgCl₂-haltigem Bindungspuffer eine erneute Re-Aggregation des Proteins zu beobachten. Die hohe Sensitivität der NBD1 gegenüber geringfügigen Änderungen der Ionenstärke ist ein Indiz dafür, daß sich die Untereinheit ohne Wechselwirkungspartner in Lösung instabil verhält. Beim Vergleich der publizierten Daten [Referenzen siehe Tabelle 4-2] über die NBD1 fällt auf, daß offensichtlich die Möglichkeit der Hetero-Dimerisierung mit der NBD2 bisher außer acht gelassen worden ist. Wahrscheinlich ist jedoch gerade diese Interaktion essentiell, um nicht nur ein stabiles, sondern auch ein funktionelles Protein zu erhalten. Generell äußert sich das Problem in der Charakterisierung der isolierten NBD1-Untereinheit darin, daß im Fall eines negativen Ergebnisses keine Aussagen getroffen werden können. Denn da es sich um ein rekombinantes Modellpeptid handelt, das in dieser Form *in vivo* nicht existiert, kann auch kein Vergleich zur biologischen Aktivität und Struktur des „nativen“ Proteins gezogen werden.

4.3 DAS PHÄNOMEN DER POLYDISPERSITÄT

ABSCHÄTZUNG DES MINDESTMOLEKULARGEWICHTS

Für sphärische Körper gilt das Reibungsgesetz von Stokes. Damit lassen sich für sphärische Monomere aus den S-Werten theoretische Mindestmolekulargewichte berechnen (Gleichungen 11b und c auf Seite 45) [vgl. van Holde *et al.*, 1998]. Da es kein kompakteres Teilchen als eine (wasserfreie) Kugel gibt, sind auf diese Weise aus experimentell bestimmten S-Werten Mindestmolekulargewichte in Lösung abschätzbar. In der nachfolgenden Abbildung ist eine doppeltlogarithmische Auftragung des Molekulargewichts über den S-Wert dargestellt. Die schwarz gestrichelte Linie beschreibt die nach Gleichung (11c) (Material und Methoden) gegebene Korrelation zwischen S-Wert und theoretischem Mindestmolekulargewicht für sphärische Monomere. Sie trennt demnach die „verbotene“ von der „erlaubten“ Zone. Weiterhin sind in Abbildung 4-2 experimentell bestimmte S-Werte und die zugehörigen Molekulargewichte in Lösung von globulären Referenzproteinen dargestellt [aus Winter und Noll, 1998]. Diese befinden sich entlang einer Geraden und aufgrund der Ausbildung einer Hydrathülle oberhalb der Grenzlinie für die theoretischen Mindestmolekulargewichte. Desweiteren sind in Abbildung 4-2 die aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichte von wt-, ΔF508-MBP-NBD1 und MBP über die jeweiligen experimentell bestimmten S-Werte bzw. apparenten S-Wertmaxima aufgetragen.

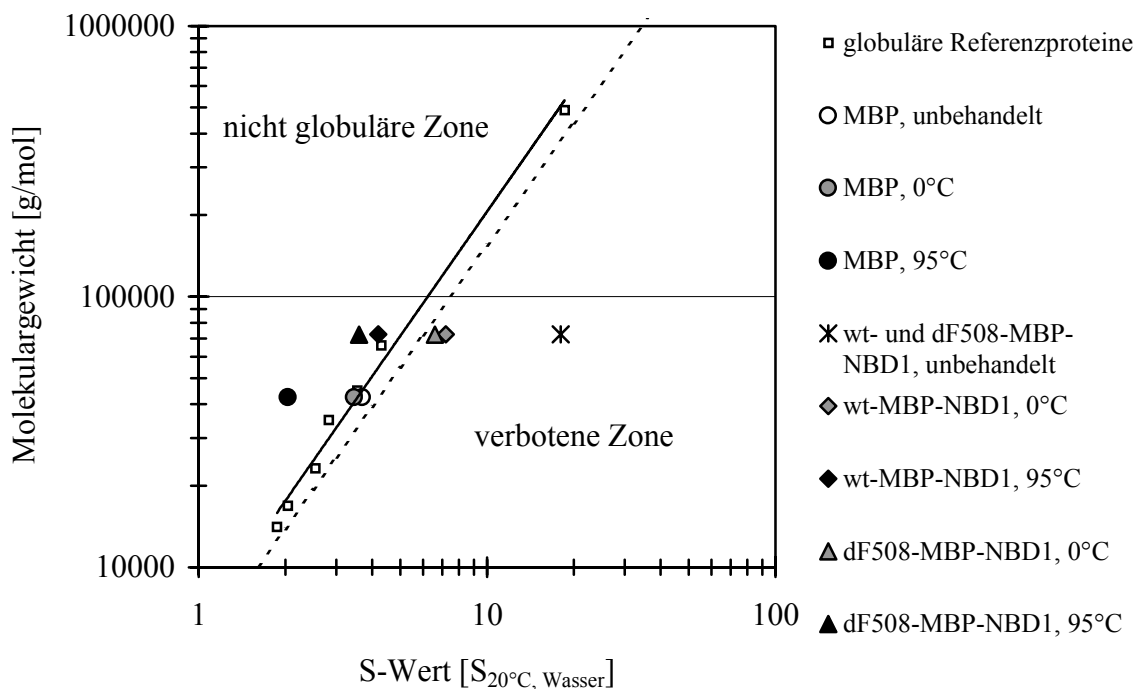


Abbildung 4-2: Abschätzung der Mindestmolekulargewichte für MBP, wt- und ΔF508-MBP-NBD1 aus den experimentell bestimmten S-Werten

Doppelt logarithmische Auftragung der theoretischen Molekulargewichte von MBP (42480 g/mol), wt-MBP-NBD1 (72580 g/mol) und ΔF508-MBP-NBD1 (72435 g/mol) über die jeweils experimentell bestimmten S-Werte bzw. apparenten S-Wertmaxima. Vergleich mit theoretischen Mindestmolekulargewichten für wasserfreie sphärische Monomere (Trennung von erlaubter und verbotener Zone durch die schwarz gestrichelte Linie) [nach van Holde *et al.*, 1998] sowie mit experimentell bestimmten Molekulargewichten und S-Werten globulärer Referenzproteine (grüne Linie und Punkte) [Winter und Noll, 1998].

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich, fallen sowohl die bei 0 °C denaturierten (und renaturierten) als auch die nicht denaturierten (unbehandelten) MBP-Fusionsproteine in die „verbotene“ Zone. Deren Molekulargewichte in Lösung müssen deshalb größer sein als die theoretisch berechneten aus der Aminosäuresequenz (ca. 72500 g/mol). Entlang einer imaginär vertikal gezogenen Linie erreicht man für die entsprechenden experimentellen S-Werte die „erlaubte Zone“, also die Molekulargewichte, die die betreffenden Proteine mindestens besitzen müssen. Für die nicht denaturierten Fusionsproteine ergibt sich damit ein Mindestmolekulargewicht von etwa 300.000 g/mol. Unter Berücksichtigung der Ausbildung einer Hydrathülle, wie im real existierenden Fall für die globulären Referenzproteine gezeigt (grüne Linie), muß sogar ein noch größeres Molekulargewicht von mehr als 400.000 g/mol angenommen werden. Diese Abschätzung stimmt mit Literaturdaten überein [Referenzen siehe Tabelle 4-2], wonach die NBD1-Aggregate in Gelfiltrationsexperimenten stets im Ausschlußvolumen eluieren. Für die bei 0 °C denaturierten wt- und ΔF508-MBP-NBD1 ergibt sich ein Mindestmolekulargewicht von 100.000 g/mol inklusive Hydrathülle. Unter der Voraussetzung, daß die Fusionsproteine in annähernd sphärischer Form vorliegen, kann auch eine Abschätzung über das maximale Molekulargewicht getroffen werden. Nach obiger Abbildung entspricht dies etwa

200.000 g/mol. Damit gilt für die überwiegende Anzahl der sedimentierenden MBP-NBD1, daß sie in Lösung nicht als Monomere, sondern vorwiegend als Dimere vorliegen müssen. Dies mag ein Indiz für die Tendenz der NBD1 zur Dimerisierung sein, die *in vivo* möglicherweise mit der NBD2 erfolgt.

Sowohl das nicht denaturierte als auch das bei 0 °C denaturierte MBP entsprechen in ihrem Sedimentationsverhalten globulären Monomeren. Dieser Befund stimmt mit Literaturdaten überein, wonach das MBP als Monomer kristallisiert und eine annähernd globuläre Raumausdehnung von 30 x 40 x 65 Angström einnimmt [Spurlino *et al.*, 1991].

Alle 95 °C-Proben dagegen befinden sich in der nicht globulären Zone. Die Proteine sedimentieren mit einem für die theoretischen Molekulargewichte ungewöhnlich niedrigen S-Wert. Dies ist besonders beim MBP zu erkennen und als drastische Auffaltung der globulären Proteinstruktur interpretierbar („Fallschirmeffekt“; Zunahme des partiellen spezifischen Volumens). Damit bestätigt sich der CD-spektroskopisch gemessene Verlust an geordneter Sekundärstruktur dieser Proteine.

MODELLVORSTELLUNG FÜR DIE GESTALT DER HOCHMOLEKULAREN AGGREGATE

Die analytischen UZ-Experimente zeigten, daß ausschließlich die NBD1 für die Aggregatbildung verantwortlich war. Nach Denaturierung in 0,08 % SDS / 8 M-Harnstoffpuffer bei 0 °C und Renaturierung erfolgte eine reversible Rückfaltung der Sekundärstrukturen. Da kein Verlust der biologischen Aktivität des MBP zu beobachten war, kann von einer reversiblen Rückfaltung der nativen Tertiärstruktur ausgegangen werden. Es wurde jedoch eine signifikante Auflösung der Aggregate nachgewiesen. Daher muß die Denaturierung bei 0 °C eine drastische Veränderung in der Quartärstruktur der NBD1 bewirkt haben. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist diese Veränderung auf eine Absättigung von hydrophoben NBD1-Oberflächenbereichen durch das Detergens SDS zurückzuführen. Überraschenderweise war in Abwesenheit von chaotropem Reagenz selbst bei 0,07 % SDS nur eine partielle Aggregatauflösung zu beobachten (Abbildung 3-16 im Ergebnisteil). Offensichtlich ist also in jedem Fall eine vollständige Denaturierung notwendig, damit das SDS seine Wirkung entfalten kann.

Diese Befunde lassen Rückschlüsse auf die Gestalt der polydispersen Aggregate zu. Demnach müssen sich die löslich exprimierten und aufgereinigten MBP-Fusionsproteine in „mizellenähnlicher“ Form aneinanderlagern. Im inneren Bereich dieser „Proteinmizellen“ sind die NBD1s miteinander assoziiert, um ihre hydrophoben Wechselwirkungen untereinander abzusättigen. Die jeweils N-terminal fusionierten MBPs sind der hydrophilen Pufferlösung zugewandt. Erst eine vollständige Auflösung der „Proteinmizellen“ durch Denaturierung in Harnstoff ermöglicht es dem SDS, an die hydrophoben NBD1-Oberflächenkontakte anzulagern und im Verlauf des Renaturierungsprozesses eine Re-Aggregation der NBD1s weitgehend zu verhindern (Abbildung 4-3).

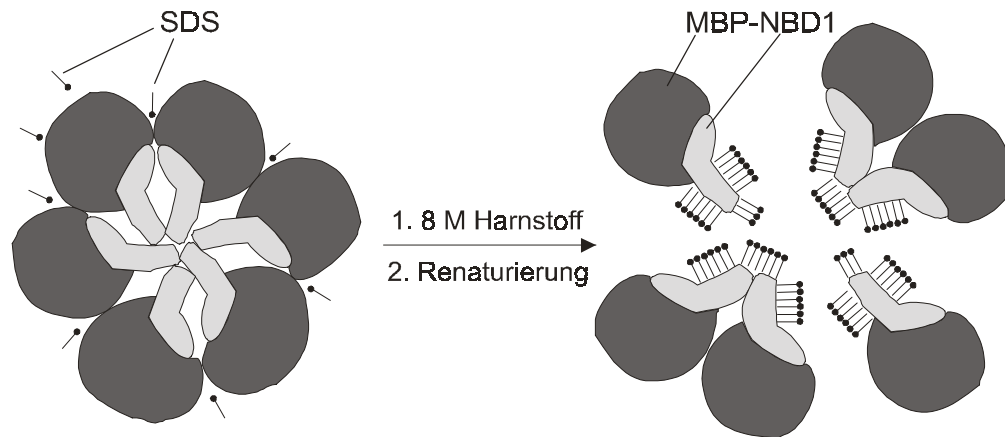


Abbildung 4-3: Modellvorstellung für die Quartärstruktur von MBP-NBD1-Aggregaten und die Auswirkungen der Denaturierung in SDS/Harnstoff

Mit dieser Vorstellung lassen sich weitere experimentelle Befunde erklären:

- Die Präzipitatbildung der NBD1 bleibt weitgehend aus, da die N-terminalen Fusionspartner die Aggregate in Lösung halten. GST-NBD1-Fusionsproteine dagegen „vernetzen“ aufgrund der GST-Homodimerisierung die „Proteinmizellen“ miteinander und erzwingen die vollständige Präzipitation.
- Diverse Mischformen von „Proteinmizellen“ sind vorstellbar und erklären sowohl das hohe Molekulargewicht der Spezies als auch die breite S-Wertverteilung.
- Spurenhaftige Verunreinigungen bleiben innerhalb der „Proteinmizellen“ über hydrophobe Wechselwirkungen mit den NBD1s assoziiert und können auch nach intensiven Waschschritten nicht abgetrennt werden.
- Die biologische Aktivität des MBP bleibt innerhalb der hochmolekularen Aggregate erhalten, da es der Lösungsmittelseite zugewandt ist.
- Die spezifische Proteolyse mit Faktor X_A oder Thrombin ist ineffizient, da die Proteaseerkennungsstellen nur bedingt zugänglich sind. Desweiteren neigt der geringe Anteil abgespaltener NBD1 zu spontaner Präzipitation, da der hydrophile MBP-Anteil nun die NBD1-Aggregate nicht mehr in Lösung hält.
- Da die NBD1s keine geordneten Quartärstrukturen einnehmen können, mißlingt die Züchtung von Proteinkristallen, was zur Erhebung röntgenkristallographischer Daten notwendig wäre.

Mit dieser Modellvorstellung wäre ebenfalls erklärbar, weshalb die NBD1 in den hochmolekularen Aggregaten keine ATP-bindenden Eigenschaften aufweist. Zum einen ist anzunehmen, daß die Domäne in dieser sterisch erzwungenen Raumstruktur nicht zur Ausbildung einer funktionellen ATP-Bindungstasche in der Lage ist. Zum anderen ist möglicherweise das Substrat ATP ebenso wie SDS für das Protein nur bedingt zugänglich. Die lösliche Proteinexpression der NBD1 als MBP-Fusionsprotein erweist sich demnach nicht als vorteilhaft. Die Proteinaufreinigung der isolierten Domäne muß deshalb in jedem Fall unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, um eine vollständige Auflösung der Proteinaggregate zu erreichen. Da unter diesen Bedingungen jedoch die Amylose-Affinitätschromatographie nicht durchführbar ist, empfiehlt sich die Verwendung des

Nickelchelat / Hexahistidin-Expressionssystem, mit dem die folgenden Vorteile verbunden sind:

- Es entfällt die Abspaltung des N-terminalen Fusionspartners, da sich im allgemeinen der Hexahistidinrest aufgrund seiner geringen Größe als nicht störend erweist.
- Die Kontamination durch endogene ATPasen ist vermeidbar.
- Vom denaturierten Status ausgehend besteht die Möglichkeit, systematisch Renaturierungsexperimente unter variierenden Pufferbedingungen und vor allem in Gegenwart von anderen CFTR-Untereinheiten (NBD2, R-Domäne) durchzuführen. Auch könnte mit diesem Ansatz die Frage geklärt werden, ob die NBDs von CFTR definierte Heterodimere ausbilden können.

In jedem Fall erscheint es sinnvoll, erst dann auf das Vorhandensein von biologischer Aktivität zu testen, wenn der Status einer stabilen und monodispersen Proteinspezies erreicht ist (Kontrolle durch Gelfiltration oder analytische UZ-Experimente). Selbstverständlich garantiert dieser Ansatz ebenso wenig wie der eingangs erwähnte Vorschlag, CFTR-Untereinheiten im eukaryontischen Baculovirus/Sf9-Zellsystem zu koexprimieren, für Aussichten auf Erfolg.

CHEMISCHE MODIFIKATION DER PROTEINSTRUKTUR DURCH DENATURIERUNG BEI 95 °C

Im Gegensatz zur Denaturierung bei 0 °C führte die Denaturierung bei 95 °C zu drastisch veränderten Sekundärstrukturprofilen aller Proteine. Obwohl weitgehend monodispers sedimentierende Proteinspezies resultierten, wurde ein irreversibler Verlust der biologischen Aktivität des MBP im Vergleich zu den bei 0 °C denaturierten Proben beobachtet. Da die Denaturierungsexperimente bei 0 und 95 °C unter identischen Bedingungen und im Parallelansatz durchgeführt wurden, kann der modifizierende Einfluß auf die Proteinstruktur nur mit der zehnmütigen Temperaturerhöhung verknüpft sein. Aufgrund des irreversiblen Charakters liegt die Vermutung nahe, daß die Temperaturerhöhung chemische Modifikationen in der Proteinstruktur zur Folge hatte. In diesem Zusammenhang beschreiben Dirnhuber und Schütz [1948], daß Harnstoff durch Erhitzung auf 100 °C einer Zersetzung in Ammonium und Cyanat unterliegt. Dabei stellt sich nach 30 Minuten ein Konzentrationsgleichgewicht von 8 M Harnstoff zu 0,02 M Cyanat ein. Stark *et al.* [1960] demonstrierten anhand der Ribonuklease aus der Bauchspeicheldrüse vom Rind, daß durch Cyanat bereits bei Raumtemperatur unter anderem eine Carbamoylierung der ϵ -Aminogruppen von Lysin- zu Homocitrullinresten in der Polypeptidkette erfolgte. Dies führte zu einer drastischen Reduktion der Ribonuklease-Aktivität um 65 %.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine zehnmütige Inkubation in 8 M Harnstoff bei 95 °C. Demnach ist davon auszugehen, daß eine Carbamoylierung der Proteine stattgefunden hat. Auf diese Weise läßt sich erklären, weshalb ein irreversibler Verlust in der biologischen Aktivität des MBP sowie drastische Sekundärstrukturveränderungen beobachtet wurden. Eine weitere Gefahr in diesem Zusammenhang besteht bei Wiederverwendung von Harnstoff-Stammlösungen. Um das chaotrope Agens zu lösen, muß der

Puffer erwärmt werden, wodurch die Cyanatkonzentration ansteigt. Daher empfehlen Stark *et al.* [1960] im Anschluß eine Acidifizierung auf $\text{pH} < 2$ mit anschließender Neutralisierung. Durch die Acidifizierung erfolgt eine quantitative Zersetzung von Cyanat.

4.4 SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSEN

ABSCHÄTZUNG DES SEKUNDÄRSTRUKTURGEHALTS DER NBD1 IM MBP-FUSIONS-PROTEIN

Nach Auswertung mit dem neuronalen Netzwerk CDNN ergaben sich für das native und für das bei 0 °C denaturierte (und renaturierte) MBP Sekundärstrukturanteile von

- 35 % α -Helix, 5 % antiparallelem, 9 % parallelem β -Faltblatt, 15 % β -turn und 36 % Reststruktur.

Diese Daten sind mit den nach Röntgenstrukturanalyse ermittelten Werten um 40 % α -Helix, 20 % β -Faltblatt und 40 % Reststruktur vergleichbar [Spurlino *et al.*, 1991]. Für die unbehandelten und für die bei 0 °C denaturierten (und renaturierten) wt- und Δ F508-MBP-NBD1 ergab sich nach CDNN ein Sekundärstrukturgehalt von ca.

- 27 % α -Helix, 11 % antiparallelem bzw. 10 % parallelem β -Faltblatt, 16 % β -turn und 36 % Reststruktur.

Da sich die Sekundärstruktur aus der Summe der einzelnen Anteile (α -Helix, β -Faltblatt, usw.) ergibt, lassen sich mittels Subtraktion die Sekundärstrukturkomponenten der NBD1 im MBP-Fusionsprotein berechnen. Mit dem Molekulargewicht von 42480 g/mol für das MBP und 72500 g/mol für die MBP-NBD1 ergeben sich für die NBD1 Werte von

- 16 % α -Helix, 20 % antiparallelem, 11 % parallelem β -Faltblatt, 17 % β -turn und 36 % Reststruktur.

Wenn auch eine quantitative Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus den weiter unten aufgeführten Gründen unter Vorbehalt zu betrachten ist, so stehen die obigen Daten mit der visuellen Interpretation der CD-Spektren dahingehend im Einklang, daß der Gehalt an β -Faltblattstruktur in der NBD1 im Vergleich zum α -helikalen Anteil deutlich erhöht ist. Bei Summierung des β -turn- und β -Faltblattgehalts ergibt sich der in der nachfolgenden Tabelle aufgeführte Vergleich mit Literaturdaten.

Tabelle 4-5: Vergleich publizierter Sekundärstrukturdaten für die NBD1 von CFTR

NBD1	α -Helix [%]	β -Faltblatt + β -turn [%]	Referenz
R450-R516	<10	80	Thomas <i>et al.</i> [1992]
D426-E588 ¹⁾	~11	~70	Hartman <i>et al.</i> [1992]
MBP-NBD1 (F433-S589)	40	37	Ko <i>et al.</i> [1993]
His ₆ -E384-F650	28	44	Yike <i>et al.</i> [1996a]
His ₆ -G404-K830	19	43	Neville <i>et al.</i> [1998]
MBP-NBD1 (N386-F650)	27	37	diese Arbeit
→ N386-F650 ²⁾	16	48	diese Arbeit

¹⁾ nach Spaltung des GST-Fusionsproteins und denaturierender Auftrennung mittels SDS-PAGE;

²⁾ rechnerisch ermittelt aus MBP-NBD1 und MBP-Referenzspektrum (s. Text)

Im allgemeinen wird der erhöhte β -Faltblatt+ β -turn-Anteil von anderen Autoren bestätigt. Nur der von Ko *et al.* [1993] ermittelte α -Helixgehalt von 40 % für die MBP-NBD1(F433-S589) fällt ungewöhnlich hoch aus. Laut Röntgenstrukturanalyse besteht die Sekundärstruktur des MBP aus 40 % α -Helix [Spurlino *et al.*, 1991]. Aufgrund des hohen β -Faltblattanteils der NBD1 wäre daher im MBP-Fusionsprotein ein α -Helixgehalt von weniger als 40 % zu erwarten gewesen. Eventuell ist diese Diskrepanz auf den von Ko *et al.* [1993] verwendeten Rechenalgorithmus nach Chang *et al.* [1978] zurückzuführen (s. Diskussion weiter unten).

EINFLUSS DER MUTATION Δ F508 AUF DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR DER NBD1

Weder in dieser Arbeit noch von Hartman *et al.* [1992], Ko *et al.* [1993] und Yike *et al.* [1996a] wurde ein Unterschied in der Sekundärstruktur zwischen wt- und Δ F508-NBD1 detektiert. Ein möglicher Grund dafür besteht in der Lokalisation von F508 innerhalb einer β -Faltblattregion. Die β -Faltblattstruktur trägt nur geringfügig zur Elliptizität eines CD-Spektrums bei und wird stark von α -helikalen Anteilen überlagert [Greenfield, 1996]. Auswirkungen der Mutation auf die Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie wären somit nicht unbedingt nachweisbar. Experimentelle Bestätigung findet diese Annahme für das synthetische Peptid NBD1(R450-R516). In diesem ruft die Mutation Δ F508 einen Verlust des β -Faltblattgehalts um 10 bis 14 % und eine Zunahme von Reststrukturanteilen hervor [Thomas *et al.*, 1992]. Möglicherweise konnte der Einfluß der Mutation auf die Sekundärstruktur aufgrund des geringen α -helikalen Anteils (< 10 %) des Peptids gesehen werden. Da das synthetische Peptid jedoch nur einen kleinen Abschnitt innerhalb der NBD1 beschreibt, repräsentiert es keineswegs das Sekundärstrukturprofil der gesamten Untereinheit. Das 3D-Strukturmodell von Annereau *et al.* [1997a und b] unterstützt diesen experimentellen Befund, wonach die Position von F508 in einem von sechs β -Faltblattsegmenten (N505-S511) zugeordnet wird. Im Modell sind die β -Faltblattsegmente alternierend mit fünf α -Helices angeordnet und bilden ein „Faß“ nach Art der bekannten

Rossmann-Struktur [Rossmann *et al.*, 1974]. Das betreffende β -Faltblattmotiv befindet sich in unmittelbarer Nähe zur ATP-Bindungstasche.

Die Überlegungen der Lokalisation von $\Delta F508$ in einem β -Faltblattstrukturelement widersprechen der Vorstellung eines aktuelleren Strukturmodells nach Hung *et al.* [1998]. Demnach ist die Mutation $\Delta F508$ in einer peripheren α -Helix (α_3) lokalisiert. Bis auf das synthetische Peptid [Thomas *et al.*, 1992] wären die experimentell erhobenen CD-Daten für die übrigen NBD1s [Hartman *et al.*, 1992; Ko *et al.*, 1993; Yike *et al.*, 1996a; diese Arbeit] mit dieser Modellvorstellung vereinbar, wenn davon ausgegangen wird, daß die Mutation $\Delta F508$ nur eine lokale Sekundärstrukturänderung in der α_3 -Helix verursacht.

Da CD-spektroskopisch kein Unterschied zwischen den Sekundärstrukturen von wt- und $\Delta F508$ -NBD1 gemessen wurde, stellt die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mit röntgenkristallographischen oder NMR-spektroskopischen Methoden die einzige Möglichkeit dar, den Effekt der Mutation auf die Proteinstruktur der NBD1 besser zu verstehen. Darüberhinaus ist denkbar, daß nicht die Tertiärstruktur, sondern ausschließlich die Quartärstruktur von CFTR durch die Mutation $\Delta F508$ beeinflusst wird. Hierzu wäre es nötig, die Wechselwirkungen auf Interdomänenebene aufzuklären. Dies kann nur durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von CFTR zweifelsfrei erreicht werden.

VERGLEICH MIT DEN SEKUNDÄRSTRUKTURDATEN VON WULBRAND [1994]

Analog Thomas *et al.* [1992] wies Wulbrand [1994] Unterschiede in den Sekundärstrukturen von wt- und $\Delta F508$ -GST-NBD1(R347-A596) nach. Ungewöhnlich erscheint, daß dabei die Deletion von F508 zu keinem Verlust, sondern zu einer drastischen Zunahme geordneter Sekundärstrukturen führte. Dies äußerte sich in einer Erhöhung des α -helikalen Anteils von etwa 32 auf 66 % und in einer geringfügigen Abnahme des β -Faltblattanteils von 27 auf 21 %. Da die untersuchten Proteine mit einem Protokoll aufgereinigt wurden, das eine zehnmünütige Denaturierung bei 95 °C beinhaltet, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die gemessenen Effekte auf einen unterschiedlichen Carbamoylierungsgrad der Proben zurückzuführen sind (vgl. voriger Abschnitt). Die Anwesenheit chemisch modifizierter GST-Fusionsproteine äußerte sich zum einen in den ungewöhnlich niedrigen Elliptizitäten von ± 5 ($\text{Grad} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) $\cdot 10^3$. Entsprechende Beobachtungen wurden in dieser Arbeit für die bei 95 °C denaturierten MBP bzw. MBP-NBD1 festgestellt. Zum anderen wies die Glutathion-S-Transferase in den untersuchten GST-Fusionsproteinen eine stark verminderte biologische Aktivität bezüglich der Bindung an immobilisiertem Glutathion auf [Wulbrand, 1994]. Auch diese Befunde bestätigten sich in der vorliegenden Arbeit für das MBP und die MBP-Fusionsproteine nach Denaturierung bei 95 °C.

EXTRAKTION VON SEKUNDÄRSTRUKTURINFORMATIONEN AUS CD-SPEKTREN

Der Vergleich von drei verschiedenen Dekonvolutionsprogrammen zeigte auf, wie stark die berechneten Werte für die Sekundärstrukturanteile (α -Helix, β -Faltblatt, Reststruktur, ...) aus einem gegebenen CD-Spektrum voneinander abweichen können. Die Ursache dafür ist in den verschiedenen Referenzdatensätzen zu finden. Dem SELCON II-Algorithmus liegen fast ausschließlich globuläre Referenzproteine mit vorwiegend α -helikalem Strukturanteil zugrunde [Woody und Sreerama, 1993 und 1994a]. Die Folge davon ist, daß für Proteine mit erhöhtem β -Faltblattanteil eine ungenaue Anpassung erfolgt, die der visuellen Interpretation der CD-Spektren nicht entspricht. Ähnlich verhält es sich mit dem YANG-Algorithmus. Dieser berechnet systematisch zu hohe β -Faltblattanteile. Die unzulänglichen Strukturvorhersagen dieser beiden Auswerteprogramme mögen zusätzlich ein Indiz dafür sein, daß in den MBP-NBD1 ein erhöhter β -Faltblattanteil vorliegt. Die visuelle Interpretation der CD-Spektren entsprach der Auswertung mit dem neuronalen Netzwerk CDNN am ehesten. Jedoch lieferte CDNN keine verlässlichen Daten über die bei 95 °C denaturierten Proben, bei denen ein erhöhter Reststrukturanteil zu erwarten war. Es ist deshalb anzunehmen, daß das neuronale Netzwerk nicht oder nur ungenügend mit CD-Spektren von denaturierten Proteinen trainiert wurde. Als Folge davon kann CDNN hohe Reststrukturanteile nicht erkennen.

Die Verwendung der CD-Spektroskopie für den qualitativen Vergleich von Sekundärstrukturprofilen zweier Proteine stellt in jedem Fall eine akkurate Methode dar. Wenn es gelingt, zukünftig weniger fehlerbehaftete Auswertelgorithmen zu entwickeln, dürfte sich die CD-Spektroskopie auch für die quantitative Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen als verlässliche Methode etablieren. Bis dahin sollten zum Vergleich mehrere Dekonvolutionsprogramme verwendet werden, um Aussagen über die Verlässlichkeit der berechneten Daten treffen zu können.

4.5 VERGLEICH MIT NBD1-STRUKTURMODELLEN

In Ermangelung des Vorhandenseins röntgenkristallographischer und NMR-spektroskopischer Strukturdaten wurden von verschiedenen Autoren Strukturmodelle für die NBD1 von CFTR berechnet. Tabelle 4-6 faßt die wichtigsten Modellproteine zusammen.

Tabelle 4-6: Strukturmodellproteine für die NBD1 von CFTR

NBD1	Modellprotein	Identität ¹⁾ [%]	Referenz
T438-K611	Adenylatkinase (ADK)	7	Hyde <i>et al.</i> [1990]
L453 – F650	α - und β -Untereinheit der F ₁ -ATPase, (Rind)	14	Annereau <i>et al.</i> [1997]
L441 – K684	α - und β -Untereinheit der F ₁ -ATPase, (Rind)	14	Bianchet <i>et al.</i> [1997]
D425 – P638	Aspartat-Aminotransferase AAT (Huhn)	14,5	Hoedemaker <i>et al.</i> [1998]
S422 – G670	HisP-Untereinheit der Histidin-Permease (<i>S. typhimurium</i>)	22	Hung <i>et al.</i> [1998]

¹⁾ identische Aminosäuren nach Sequenzvergleich

Nach Sander *et al.* [1994] kann von nahezu identischen Proteinstrukturen ausgegangen werden, wenn die Sequenzidentität über den gesamten Bereich mehr als 30 % beträgt. Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich, trifft dies für keines der genannten Strukturmodelle zu. Vielmehr konzentriert sich die Sequenzidentität auf die charakteristischen, an der ATP-Bindung beteiligten Walkermotive A und B. Für die Interpretation der NBD1-Struktur von besonderer Bedeutung sind neben den Walkermotiven die Zentralregion (Lokalisation von F508) und das diagnostische „LSGGQ“-Motiv. Die nachfolgende Tabelle 4-7 vergleicht die genannten Sequenzabschnitte der NBD1 (und NBD2) von CFTR mit denen der Modellproteine.

Tabelle 4-7: Vergleich hochkonservierter Regionen von NBD1 und NBD2 aus CFTR mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen von Strukturmodellproteinen

Protein	Walker A	Zentralregion	„LSGGQ“	Walker B
NBD1 CFTR	⁴⁵⁸ <u>G</u> STGAGKTS	⁵⁰¹ TIKENIIF	⁵⁴⁸ LSGGQ	⁵⁶⁷ DLYLLDS
NBD2 CFTR	¹²⁴⁴ <u>G</u> RT <u>G</u> SGKST	¹²⁹⁹ TFRK <u>N</u> LDP	¹³⁴⁶ <u>L</u> SHGH	¹³⁶⁵ KILL <u>L</u> LDE
Adenylatkinase	<u>G</u> PG <u>S</u> G <u>K</u> GT	-	(EVKQ)	LLLYVDA
F ₁ -ATPase (α -Untereinheit)	<u>G</u> DRQT <u>G</u> KTS	(LYC <u>I</u> Y)	(DAAPL)	AL <u>I</u> IY <u>D</u> D
AAT	<u>G</u> IS <u>G</u> T <u>G</u> SLR	(PIFRDAGL)	(PTGVD)	LLAYF <u>D</u> M
HisP	<u>G</u> SS <u>G</u> SGKST	<u>T</u> V <u>L</u> EN <u>V</u> M-	<u>L</u> SGGQ	<u>D</u> V <u>L</u> LL <u>F</u> DE

Zur NBD1 identische Aminosäuren sind unterstrichen. Hochgestellte Zahlen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im CFTR-Protein an.

Aus der obigen Tabelle ist erkennbar, daß im Vergleich zu HisP die übrigen Modellproteine nur geringe Sequenzhomologien in der konservierten Zentralregion aufweisen. Desweiteren fehlt in diesen Proteinen das „LSGGQ“-Motiv. Erwartungsgemäß weist die nukleotidbindende Domäne HisP der Histidin-Permease aus *Salmonella typhimurium* in den konservierten Regionen die höchste Sequenzidentität zur NBD1 von CFTR auf. Da die Identität in diesen Bereichen mehr als 30 % beträgt, ist zu vermuten, daß die ATP-Bindungstaschen von HisP und NBD1 sowie NBD2 von CFTR weitgehend einander entsprechen. Darüberhinaus enthalten HisP und die NBD1 von CFTR zusätzliche Aminosäureabschnitte, welche eine 100 %ige Sequenzidentität aufweisen. Hierbei handelt es sich um das ⁴⁷⁷PSEG-Motiv, das C-terminal an das Walkermotiv A anknüpft, sowie um die ⁵⁵⁷SLARA-Sequenz, welche C-terminal dem „LSGGQ“-Motiv folgt (die hochgestellten Zahlen geben die jeweilige Position der Aminosäure im CFTR an). Die nachfolgende Abbildung stellt die dreidimensionale Struktur von HisP dar [nach Hung *et al.*, 1998].

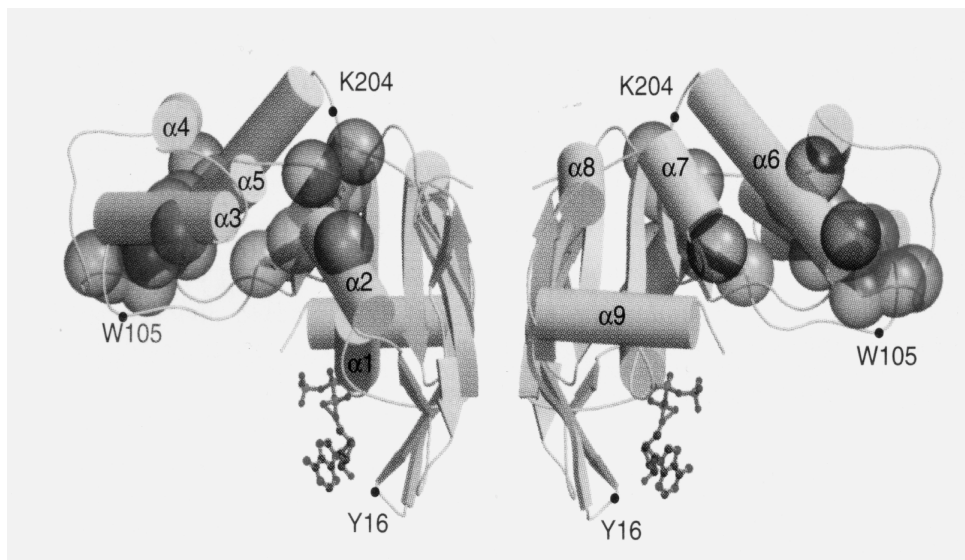


Abbildung 4-4: 3D-Struktur von (HisP)₂ nach Hung *et al.* [1998]

α-Helices sind als graue Zylinder, β-Faltblattstrukturen als flache Pfeile gekennzeichnet. HisP-Mutationen der Gruppen 1, 2 und 3 [Hung *et al.*, 1998] sind jeweils als Kugeln hervorgehoben. Nach dem 3D-Strukturmodell für die NBD1 entspricht die Position von F508 der von E116 (Kugel in der α₃-Helix). Das „LSGGQ“-Motiv befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur α₃-Helix (Kugeln im Hintergrund der α₃-Helix).

Die Vorstellung, daß HisP *in vivo* homodimerisiert, bestätigt sich in der Kristallstruktur. Die räumliche Struktur des Monomers kann als „L-Form“ beschrieben werden. Dieses „L“ besteht aus zwei dicken Armen (I und II), welche über sechs β-Faltblattstränge miteinander verbunden sind. Arm II enthält vorwiegend α-helikale Strukturanteile, während Arm I einem α- plus β-Strukturtyp entspricht. Die Dimerisierung von HisP wird durch hydrophobe Wechselwirkungen der antiparallelen β-Faltblätter β₁, β₄ und β₅ ermöglicht. Diese befinden sich an der Außenseite von Arm I.

Die ATP-Bindungstasche befindet sich nahe dem Ende von Arm I. Das ATP-Molekül bindet dabei über das Phosphatgerüst, während der Adeninring der Lösungsmittelseite zugewandt ist. Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich, stabilisiert dabei der Tyrosinrest an Position 16 die Orientierung des ATP-Moleküls über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Adeninring. Das Triphosphatgerüst wird vorwiegend über die Aminosäuren GSGKST aus dem Walkermotiv A (s. obige Tabelle) gebunden.

Eine wichtige Rolle ist dem Aspartatrest an Position 178 aus dem Walkermotiv B (DVLLF¹⁷⁸DE) zuzuordnen. D178 wechselwirkt im Kristall über ein Wassermolekül mit dem γ -Phosphatrest. In der Kristallstruktur von Ras-GMP-PNP-Mg²⁺ [Pai *et al.*, 1989 und 1990] ist dieses Wassermolekül durch ein Magnesiumion ersetzt. Um die Hydrolyse von ATP zu vermeiden, wurde HisP in Abwesenheit des divalenten Kations kristallisiert. Es wird daher angenommen, daß *in vivo* das Wassermolekül durch ein Magnesiumion substituiert ist, welches über Wechselwirkung mit D178 die Hydrolyse des γ -Phosphatrestes von ATP katalysiert.

Weiterhin in Wechselwirkung mit dem γ -Phosphatrest stehen die Aminosäuren E179 (aus dem Walkermotiv B) und Q100 sowie H211. Ein Sequenzvergleich zeigt, daß an den entsprechenden Positionen in der NBD2 von CFTR die identischen Aminosäuren auftreten (im CFTR: Q1291, E1371, H1402). In der NBD1 trifft dies nur für das Glutamin zu (im CFTR: Q493). Damit sind die ATP-Bindungstaschen von HisP und NBD2 nahezu identisch, während die der NBD1 davon abweicht. Möglicherweise deutet dies auf unterschiedliche Funktionsweisen von NBD1 und NBD2 hin. Das „LSGGQ“-Motiv im HisP beteiligt sich an der ATP-Bindung durch Wechselwirkung von Glutamin an Position 158 mit einem Sauerstoffrest am Ribosering von ATP.

IMPLIKATIONEN FÜR DIE 3D-STRUKTUR DER NBD1 VON CFTR

Das von Hung *et al.* [1998] vorgestellte 3D-Strukturmodell für die NBD1 von CFTR differiert stark von den berechneten Strukturmodellen nach Hyde *et al.* [1990], Annereau *et al.* [1997a und b], Bianchet *et al.* [1997] und Hoedemaker *et al.* [1998]. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie kann davon ausgegangen werden, daß das aktuelle Modell der dreidimensionalen Struktur der NBD1 von CFTR am ehesten entspricht. Folgende Implikationen lassen sich daraus ableiten:

- Es ist anzunehmen, daß die NBD1 nicht als „faßförmige“ Rossmann-Struktur, sondern analog HisP als „L-Form“ vorliegt. Diese Raumstruktur ist bisher nicht beschrieben worden. Möglicherweise repräsentiert sie den Grundaufbau aller nukleotidbindenden Domänen von ABC-Transportern. In jedem Fall läßt sich damit die Kopplung der ATP-Hydrolyse mit dem Substrattransport auf plausible Weise erklären: Arm I ist der cytosolischen Seite zugewandt. Dies ermöglicht die Bindung und Hydrolyse von ATP. Die freiwerdende Energie wird durch eine Konformationsänderung auf Arm II übertragen und führt zur Öffnung der Transport- oder Kanalpore.

- Möglicherweise ist die HisP-Dimerisierung auf die nukleotidbindenden Domänen der meisten ABC-Transporter und somit auch auf die NBDs von CFTR übertragbar. Vermutlich versetzt erst die dimere Quartärstruktur die nukleotidbindenden Domänen in die Lage, wie ATP-getriebene „Hebel“ zu fungieren. Damit wird die Vorstellung unterstützt, daß die NBDs von CFTR nur als Dimer biologische Aktivität aufweisen bzw. eine stabile Raumstruktur einnehmen können.
- Die Aminosäure F508 ist nach dem obigen Modell nicht in der ATP-Bindungstasche, sondern in der α_3 -Helix innerhalb von Arm II lokalisiert. Die Deletion der Aminosäure F508 äußert sich damit vermutlich nicht in einer Beeinträchtigung der ATP-bindenden und/oder -hydrolytischen Eigenschaften von CFTR. Hung *et al.* [1998] ordnen der konservierten α_3 -Helix im HisP eine essentielle Funktion bezüglich der Interaktion mit den membranüberspannenden Domänen HisQ und HisM zu. Daher ist anzunehmen, daß die Mutation $\Delta F508$ ebenfalls Interaktionsstörungen zwischen der NBD1 und transmembranen Untereinheiten von CFTR hervorruft.
- Möglicherweise bewirkt die Mutation $\Delta F508$ aufgrund der peripheren Lage der α_3 -Helix keine globale Veränderung in der Sekundärstruktur der NBD1. Damit wäre erklärbar, weshalb CD-spektroskopisch kein Unterschied zwischen wt- und $\Delta F508$ -MBP-NBD1 gemessen wurde.

Obwohl weitgehend von einer Identität der ATP-Bindungstaschen ausgegangen werden kann, ist anzunehmen, daß sich die räumlichen Strukturen von HisP und NBD1 in einigen Regionen deutlich voneinander unterscheiden. Dies ist nicht nur aufgrund der geringen Sequenzidentität außerhalb der hochkonservierten Regionen zu erwarten. So erklärt das Strukturmodell unter anderem nicht den von vielen Autoren mittels CD-Spektroskopie nachgewiesenen hohen β -Faltblattgehalt der NBD1 (in HisP sind laut Röntgenstrukturanalyse ca. 35 % α -Helix und 24 % β -Faltblatt enthalten). Zudem fällt auf, daß ein großer Sequenzabschnitt von HisP (Q68-M97), der unmittelbar N-terminal an die α_3 -Helix anknüpft, keinem Abschnitt in der NBD1 zugeordnet wird [Hung *et al.*, 1998]. In diesem Sequenzabschnitt sind die Segmente β_5 , β_6 , β_7 , α_2 und β_8 von HisP enthalten. Entsprechend existiert für die α_7 -Helix kein Pendant in der NBD1 von CFTR. Die Aminosäure F508 in der NBD1 kann sich demnach ebenso in einem anderen Bereich befinden. Diese Überlegungen machen deutlich, daß die Auswirkungen der Mutation $\Delta F508$ auf die Struktur und Funktion der NBD1 auch mit dem aktuellen Strukturmodell nicht zweifelsfrei erklärt werden können.

4.6 IMPLIKATIONEN FÜR DIE ÄTIOLOGIE DER MUKOVISZIDOSE

Rückschlüsse auf die molekularen Ursachen der Mukoviszidose aus den Ergebnissen dieser Arbeit können nur unter Vorbehalt gezogen werden, da das Verhalten der isolierten NBD1 *in vitro* nicht mit dem der NBD1 *in vivo* vergleichbar ist. Dies zeigten sowohl die Tendenz des rekombinanten MBP-Fusionsproteins zur Ausbildung polydisperser Aggregate als auch die fehlenden ATP-bindenden und/oder -hydrolysierenden Eigenschaften. Da jedoch die CD-spektroskopischen Ergebnisse von der Polydispersität unabhängig waren, kann davon ausgegangen werden, daß die Mutation $\Delta F508$ *in vivo* keinen drastisch verändernden Effekt in der NBD1-Sekundärstruktur hervorruft. Dies schließt jedoch keinesfalls aus, daß die Mutation keinen Einfluß auf die Tertiärstruktur der NBD1 oder gar auf CFTR bewirkt.

Von vielen Autoren wird die molekulare Ursache der Cystischen Fibrose bei $\Delta F508$ -homozygoten Patienten darin gesehen, daß $\Delta F508$ -CFTR einem defekten Reifungsprozeß im endoplasmatischen Retikulum unterliegt und sich somit phänotypisch als „Nullmutante“ verhält. Dem stehen die von Kälin [1997] erhobenen Daten gegenüber, nach denen Wildtyp und Mutante gewebespezifisch gleichermaßen in die Apikalmembran transloziert werden. $\Delta F508$ -CFTR äußert sich demnach vorwiegend als „funktionelle Mutante“. Keine der genannten Vorstellungen kann durch die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten favorisiert werden.

So besteht einerseits die Möglichkeit, daß Faltungshelferenzyme im endoplasmatischen Retikulum in der Lage sind, den eventuell durch die Mutation verursachten destabilisierenden Einfluß auf die Tertiärstruktur und/oder die Quartärstruktur von CFTR zu erkennen. Dies führt unmittelbar zur Degradation des Proteins durch den 26 S-Proteasomkomplex. Unterstützung findet die Vermutung in der thermodynamischen Instabilität von $\Delta F508$ -CFTR in überexprimierenden Systemen: bei 27 °C ist die Effizienz der Translokation von $\Delta F508$ -CFTR an die Zellmembran bedeutend höher als bei 37 °C [Drumm *et al.*, 1991; Denning *et al.*, 1992; Lukacs *et al.*, 1993].

Andererseits mag der Einfluß der Mutation auf die Tertiärstruktur von CFTR nur von geringem Ausmaß sein, sodaß *in vivo* kein Abbau von $\Delta F508$ -CFTR im endoplasmatischen Retikulum erfolgt. Umso mehr muß dann jedoch die Funktionalität des Proteins am Zielort gestört sein. Dies erscheint aufgrund der membranassoziierten Lage von F508 in Arm II der NBD1 plausibel [Hung *et al.*, 1998]. Es ist vorstellbar, daß die Mutation die Übertragung der aus der ATP-Hydrolyse freigewordenen Energie auf die Transmembranuntereinheiten von CFTR vermindert. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, daß nach dem Strukturmodell das an der Energieübertragung beteiligte „LSGGQ“-Motiv in unmittelbarer räumlicher Nähe zu F508 lokalisiert ist. Ebenso wäre damit die etwa drei- bis vierfach reduzierte Öffnungswahrscheinlichkeit [Dalemans *et al.*, 1991; Haws *et al.*, 1996] sowie die etwa fünffach reduzierte cAMP-Sensitivität [Drumm *et al.*, 1991] von $\Delta F508$ -

CFTR gegenüber dem Wildtyp erklärbar. Im Widerspruch dazu stehen jedoch die Befunde von Li *et al.* [1993] und Pasyk *et al.* [1995], wonach kein signifikanter Unterschied in den elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen wt- und Δ F508-CFTR zu beobachten ist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz besteht in der unterschiedlichen Reifung und Lokalisation der untersuchten Proteine. Li *et al.* [1993] verwendeten das Baculovirus/Sf9-Zellexpressionssystem, das nur eine kernglykosylierte Variante von CFTR bildet. Pasyk und Foskett [1995] untersuchten unreifes wt- und Δ F508-CFTR aus dem endoplasmatischen Retikulum von Säugerzellen. Die Eigenschaft von Δ F508-CFTR als „funktionelle Mutante“ mag sich darüberhinaus darin äußern, daß das Protein nicht mehr in der Lage ist, regulatorische Funktionen auf andere Ionenkanäle auszuüben. So zeigten Mall *et al.* [1996a] in *Xenopus laevis* Oocyten, daß Δ F508- im Gegensatz zum wt-CFTR den ENaC-vermittelten Natriumionen-Einstrom in die Zelle nicht inhibiert. Analog berichten Schwiebert *et al.* [1995] davon, daß nur wt-, jedoch nicht Δ F508- und G551D-CFTR den ORCC aktivieren.

Die genauen Ursachen der Mutation Δ F508 auf Proteinebene können nur durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von CFTR verstanden werden. Da sich die Untersuchung isolierter Domänen als problematisch erweist, ist dieses Ziel möglicherweise nur erreichbar, wenn in Zukunft effizientere Methoden zur Kristallisation von Membranproteinen entwickelt werden. Vielversprechende Ansätze liefert unter anderem die elektronenmikroskopische Bildanalyse von 2D-Proteinkristallen [vgl. Auer *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 1998]. Derzeit können damit Auflösungen von bis zu 4 Angström erreicht werden. Nur mit einem besseren Verständnis über das Zusammenspiel zwischen Struktur und Funktion von CFTR ist es möglich, die pleiotropen Eigenschaften des Proteins zu erfassen und daraus sinnvolle therapeutische Ansätze zu extrahieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

SCHLAGWÖRTER: Cystische Fibrose, CFTR, Nukleotidbindungsdomäne, ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse, analytische Ultrazentrifugation, CD-Spektroskopie

Mutationen im *CFTR*-Gen (*CFTR* = *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) rufen die autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) hervor. Bei CF-Patienten tritt am häufigsten eine Drei-Basenpaardeletion auf, welche in der ersten der beiden nukleotidbindenden Domänen (NBDs) von *CFTR* zur Deletion der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 ($\Delta F508$) führt. Um mehr über die Auswirkungen der Mutation $\Delta F508$ auf Proteinebene zu erfahren, erfolgten in dieser Arbeit Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der NBD1 von *CFTR*.

Mit dem Ziel, eine Proteinaufreinigung der isolierten Domäne unter nicht denaturierenden Bedingungen zu erreichen, wurden verschiedene in Position und Ausdehnung variierende *NBD1*-Genabschnitte kloniert und in heterologen Systemen überexprimiert.

Anfänglich wurden die *NBD1*-Konstrukte an Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert, um eine effiziente Affinitätsaufreinigung an immobilisiertem Glutathion zu ermöglichen. Sowohl Baculovirus/*Sf9*-Zellen als auch *Escherichia coli* produzierten die GST-Fusionsproteine zu mehr als 99 % in Form von wasserunlöslichen Proteinaggregaten. Nur in sehr geringen Ausbeuten gelang es, die Proteine aus den Überständen der Zellysate zu isolieren. Für die GST-*NBD1*(R347-A596) aus Baculovirus/*Sf9*-Zellen entsprach dies $< 1 \mu\text{g}$ pro $1 \cdot 10^6$ *Sf9*-Zellen mit einem Reinheitsgrad von bis zu 80 % (GST: $30 \mu\text{g}$ pro 10^6 *Sf9*-Zellen, Reinheitsgrad ca. 90 %). In *E. coli* wurden vier verschiedene GST-*NBD1*-Konstrukte exprimiert (T351-S589, D373-S589, G404-S589 und F433-S589). Die Ausbeuten betragen jeweils weniger als $200 \mu\text{g}$ pro Gramm *E. coli*-Biofeuchtmasse (BFM) mit Reinheitsgraden von 80 bis 85 % (GST: 5-10 mg pro Gramm BFM, Reinheitsgrad 95 %). Alle aufgereinigten GST-Fusionsproteine präzipitierten innerhalb von einer Woche in wässriger Pufferlösung. Die Trennung der Fusionspartner durch spezifische Proteolyse mit Thrombin war ineffizient. Zudem präzipitierte der geringe Anteil an abgespaltener *NBD1* innerhalb weniger Stunden. Die GST-Fusionsproteine eigneten sich nicht für die angestrebten biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen.

Ein an Maltosebindungsprotein (MBP) fusioniertes *NBD1*-Konstrukt (N386-F650) wurde in signifikant größeren Mengen in *E. coli* löslich exprimiert (ca. 10 %iger Anteil am löslichen Gesamtprotein). Die Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins aus *E. coli* erfolgte mittels Affinitätschromatographie an immobilisierter Amylose. Dabei wurden Ausbeuten bis 3 mg/ml pro Gramm BFM und Reinheitsgrade bis maximal 92 % erzielt (MBP: 8 mg/ml pro Gramm BFM; Reinheitsgrad 95 bis 97 %). Die MBP-*NBD1* war bei 4°C -Lagerung in Konzentrationen von weniger als 2 mg/ml über mehrere Wochen stabil und präzipitierte in Abwesenheit von Detergens nicht. Wie bei den GST-Fusionsproteinen erwies sich jedoch die Trennung der Fusionspartner durch spezifischen proteolytischen

Verdau mit Faktor X_A als ineffizient und führte innerhalb von wenigen Stunden zur spontanen Präzipitation der abgespaltenen NBD1. Für die biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen wurde daher das MBP-Fusionsprotein verwendet. Nach erfolgter Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE zwei Proteinnebenbanden nachgewiesen, die spezifisch mit der MBP-NBD1 assoziiert waren. Laut N-terminaler Sequenzierung handelte es sich um die endogenen Faltungshelferenzyme GroEL und DnaK. Durch Zugabe von 5 mM Mg^{2+}/ATP waren die Verunreinigungen vom MBP-Fusionsprotein abtrennbar.

In biochemischen Untersuchungen wurde die MBP-NBD1 auf ATP-Bindung und -Hydrolyse getestet. Mittels Fluoreszenztitration ließ sich keine Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dem fluoreszierenden ATP-Analogon 2'-(oder 3')-O-(trinitrophenyl)adenosin 5'-triphosphat (TNP-ATP) feststellen. Kontrollexperimente in der analytischen Ultrazentrifuge (UZ) demonstrierten ebenfalls keine Bindung von TNP-ATP am MBP-Fusionsprotein. In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem ATP auf Nitrocellulosemembran ließ sich keine Wechselwirkung zwischen ATP und der MBP-NBD1 nachweisen. Die initial detektierten ATPase Aktivitäten waren vom Reinheitsgrad der Proteinpräparation abhängig und auf endogene Verunreinigungen zurückzuführen. So zeigte die Chromatographie am Anionenaustauscher (FPLC) von zuvor an Amylose-Agarose aufgereinigten MBP-NBD1-Präparationen, daß ATPase Aktivitäts- und Proteinelutionsprofile nicht übereinstimmten. Für die ersten beiden nach FPLC erhaltenen MBP-NBD1-Fractionen betrug der spezifische ATP-Umsatz unter V_{max} -Bedingungen (5 mM Mg^{2+}/ATP) 0 bzw. weniger als 0,05 mol ATP pro mol MBP-NBD1 pro Minute. Demnach besitzt das isolierte Protein keine oder nur eine vernachlässigbar geringe intrinsische ATP-hydrolytische Aktivität.

Die Struktur der MBP-NBD1 wurde mittels analytischer UZ und CD-Spektroskopie untersucht. Laut analytischer UZ sedimentierte das MBP-Fusionsprotein als polydisperses Aggregat. Die apparente S-Wertverteilung wies ein Maximum um 18 S auf (Intervallbreite 3 S). Damit besaß der Hauptanteil der in Lösung befindlichen Spezies ein apparentes theoretisches Mindestmolekulargewicht von etwa 400 kDa (das Molekulargewicht aus der Aminosäuresequenz beträgt 73 kDa). Aus CD-spektroskopischen Untersuchungen ging hervor, daß die polydispersen Proteinaggregate geordnete Sekundärstrukturen ausbildeten. Unter Verwendung des auf einem neuronalen Netzwerk basierenden Auswertalgorithmus CDNN [Böhm *et al.*, 1992] ergaben sich für das MBP-Fusionsprotein Sekundärstrukturanteile von 27 % α -Helix, 11 % antiparallelem, 10 % parallelem β -Faltblatt, 16 % β -turn und 36 % Reststruktur. Durch Subtraktion des MBP-Anteils wurde für die NBD1 ein Sekundärstrukturgehalt von 16 % α -Helix, 20 % antiparallelem, 11 % parallelem β -Faltblatt, 17 % β -turn und 36 % Reststruktur errechnet. Die NBD1 im Fusionsprotein besteht somit etwa zur Hälfte aus β -Faltblattstrukturen. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurden keine Unterschiede sowohl in den hydrodynamischen als auch in den CD-spektroskopischen Eigenschaften zwischen wt- und $\Delta F508$ -MBP-NBD1 nachgewiesen.

Eine Denaturierung in 0,08 % SDS / 8 M Harnstoff-haltigem Puffer bei 0 °C mit anschließender Renaturierung durch Dialyse gegen Phosphatpuffer führte zu deutlich homogeneren Proteinspezies mit apparenten S-Wertmaxima um 6,6-7,2 S (Intervallbreite 0,6 S). Demnach lag der Hauptanteil der renaturierten in Lösung befindlichen Spezies mindestens als Dimer vor. Das Sekundärstrukturprofil und die biologische Aktivität des MBP im Fusionsprotein veränderten sich durch die De- und Renaturierung bei 0 °C nicht. Entsprechende Denaturierungsexperimente bei 95 °C mit anschließender Renaturierung durch Dialyse führten zu homogen sedimentierenden Proteinspezies mit drastisch veränderten Sekundärstrukturprofilen und deutlich reduzierten biologischen Aktivitäten. Wahrscheinlich ist die irreversible Denaturierung unter diesen Bedingungen auf chemische Modifikationen in der Polypeptidkette zurückzuführen. Wie bei den polydispersen MBP-NBD1-Aggregaten waren im Rahmen der Meßgenauigkeit nach De- und Renaturierung keine Unterschiede zwischen wt- und Δ F508-MBP-NBD1 bezüglich ihrer hydrodynamischen und CD-spektroskopischen Eigenschaften zu sehen.

Die für die Ausbildung einer nativen NBD1-Konformation notwendigen Bedingungen stellen sich weitaus komplexer dar, als sie im heterologen Expressionssystem simuliert wurden. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters ist anzunehmen, daß die NBD1 innerhalb des CFTR-Proteins membranassoziierte Eigenschaften aufweist. Dies allein erklärt jedoch nicht die ausgeprägte Tendenz der NBD1 zur Ausbildung von polydispersen Aggregaten. Vermutlich fehlen der isolierten Domäne essentielle Interaktionen mit anderen Untereinheiten von CFTR. Insbesondere scheint eine Hetero-Dimerisierung mit der zweiten NBD von CFTR notwendig zu sein, um eine native Struktur der isolierten Domäne unter *in vitro*-Bedingungen zu erhalten.

Da das Verhalten der isolierten NBD1 nicht dem der NBD1 *in vivo* entspricht, können nur einschränkend Rückschlüsse auf die Ätiologie der Mukoviszidose gezogen werden. Die Mutation Δ F508 *in vivo* übt keinen drastisch verändernden Effekt auf die Sekundärstruktur der NBD1 aus, ein Einfluß der Mutation auf die Tertiärstruktur der NBD1 oder auf die Tertiärstruktur von CFTR ist damit jedoch nicht ausgeschlossen. Von der dreidimensionalen Strukturaufklärung ist daher ein umfassendes Verständnis der Δ F508-induzierten Veränderungen zu erwarten.

6 ABSTRACT

KEY WORDS: cystic fibrosis, CFTR, nucleotide binding domain, ATP binding, ATP hydrolysis, analytical ultracentrifugation, CD-spectroscopy

Mutations in the CFTR gene (CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) cause the most common autosomal recessive inherited disease, cystic fibrosis. The deletion of phenylalanine at position 508 (Δ F508) is the most frequent CF-causing mutation. Phenylalanine 508 is located in the first of the two nucleotide binding domains (NBDs) of the CFTR gene product.

In this work biochemical and biophysical investigations with different recombinant NBD1 peptides were performed in order to gain structural and functional insights into the effects of the mutation Δ F508 on the protein level.

Initially different NBD1 constructs were fused to glutathione-S-transferase (GST) to facilitate both the expression of soluble fusion proteins and the efficient purification through affinity chromatography on immobilised glutathione. Both *E. coli* and baculovirus/*Sf9*-cells produced over 99 % insoluble GST fusion proteins. However, trace amounts of soluble GST-NBD1s could be isolated from centrifuged cell lysates. The expression of GST-NBD1(R347-A596) yielded less than 1 μ g per 10^6 *Sf9*-cells with approximately 80 % purity (GST: 30 μ g, 90 %). In *E. coli* four different GST-NBD1 fusion proteins were expressed with the corresponding NBD1 amino acid sequences T351-S589, D373-S589, G404-S589 and F433-S589, respectively. The yields were always less than 200 μ g soluble GST fusion proteins per gram wet cells with purities of 80-85 % (GST: 5-10 mg per gram wet cells, 95 %). Purified GST fusion proteins precipitated spontaneously within a week in aqueous buffer solutions. Separation of the NBD1 portions via cleavage of the GST fusion proteins with specific protease thrombin was inefficient (yield: < 5 %) and lead to a complete precipitation of the NBD1 within hours. Because of their thermodynamic instabilities GST-NBD1 proteins were not used for further biophysical and biochemical investigations.

Expression of the NBD1 amino acid sequence N386-F650 fused to maltose binding protein (MBP) in *E. coli* resulted in significantly higher amounts of solubly expressed protein (up to 10 % of the total soluble protein fraction as determined densitometrically). Purification of MBP-NBD1(N386-F650) on immobilised amylose yielded up to 3 mg per gram wet cells with a purity of 90-92 % (MBP: 8 mg/g wet cells, 95 %). In contrast to the GST-NBD1s the MBP-NBD1(N386-F650) was stable in aqueous buffer solutions up to concentrations of 2 mg/ml and did not precipitate in the absence of detergents. However, the cleavage of the fusion partners was also inefficient and resulted in a spontaneous precipitation of the NBD1(N386-F650) within hours. As a result the MBP-NBD1(N386-F650) was used for further biochemical and biophysical experiments.

Small amounts of the chaperones DnaK and GroEL (as determined by amino terminal sequencing) copurified with the MBP-NBD1(N386-F650) following amylose affinity chromatography. The addition of 5 mM Mg/ATP and incubation for 30 min lead to the dissociation of the two contaminants, whereas trace amounts of several other protein bands remained associated.

In biochemical experiments the MBP-NBD1 was monitored for its capability to bind and hydrolyse ATP. Neither fluorescence titration experiments nor analytical ultracentrifugations revealed any interaction with the fluorescent ATP-derivative 2'-(or 3')-O-(trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP). No interaction between ATP and MBP-NBD1 was detected in binding studies with radioactively labeled ATP on nitrocellulose filter. Initially determined ATPase activities were dependent upon the degree of purity and could be put down to endogenous trace contaminants. Fast protein liquid chromatography (FPLC) on anion exchanger (Mono Q) with previously affinity purified MBP-NBD1 demonstrated that elution and ATPase activity profile did not correspond to each other. The k_{cat} values for the first two FPLC elution fractions were 0 and 0.05 moles ATP per mol MBP-NBD1 per minute, respectively. Hence, the isolated MBP-NBD1 exhibited no significant intrinsic ATPase activity.

Analytical ultracentrifugation experiments revealed the presence of polydisperse high molecular protein aggregates with a widespread sedimentation coefficient distribution (maximum: 18 S, interval: 3 S). Thus, the majority of the polydisperse species had an apparent molecular weight of at least 400 kDa in solution (molecular weight for the monomer from the amino acid sequence: 73 kDa).

CD-spectroscopic measurements revealed the presence of highly ordered secondary structures. For the MBP-NBD1 27 % α -helix, 11 % antiparallel β -sheet, 10 % parallel β -sheet, 16 % β -turn and 36 % other structures were calculated using the neural network algorithm CDNN [Böhm *et al.*, 1992]. Upon subtraction of the MBP-portion a secondary structure content for the NBD1(N386-F650) was calculated as 16 % α -helix, 20 % antiparallel β -sheet, 11 % parallel β -sheet, 17 % β -turn and 36 % other. The hydrodynamic properties and secondary structure contents of wild-type and Δ F508-NBD1(N386-F650) were indistinguishable from each other.

Denaturation in 0.08 % SDS / 8 M urea at 0 °C and renaturation at 4 °C via dialysis against phosphate buffer drastically reduced the polydispersity of MBP-NBD1 species. The apparent sedimentation coefficient distribution exhibited a maximum of between 6.6 and 7.2 S (interval: 0.6 S). Hence, the majority of the renatured proteins in solution apparently existed at least as dimers. Because of its amphiphilic character it may be assumed that the NBD1 exhibits either membrane associated or membrane integrated character in the CFTR protein. However, this alone does not explain the tendency of the NBD1 to form polydisperse aggregates in solution. Probably the lack of essential protein/protein interactions with other CFTR subdomains are required. Especially a heterodimerisation with the second nucleotide binding domain (NBD2) of CFTR may be essential for the formation of a natively folded NBD1 under *in vitro* conditions.

Since the characteristics of the isolated NBD1 differ from the NBD1 under *in vivo* conditions only restricted conclusions can be drawn for the etiology of the cystic fibrosis on the protein level. The mutation $\Delta F508$ does not cause dramatic changes in the secondary structure of the NBD1. However, it cannot be excluded that the mutation has an influence on the tertiary structure of the NBD1. Therefore an extensive understanding may be expected from the resolution of the three dimensional structure of the NBD1 of CFTR.

7 LITERATUR

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV, Boyd AE III, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426

Aleksandrov AA, Riordan JR (1998) Regulation of CFTR ion channel gating by MgATP. *FEBS* **431**, 97-101

Amano T, Hisabori T, Muneyuki E, Yoshida M (1995) Catalytic activities of $\alpha_3\beta_3\tau$ complexes of F_1 -ATPase with 1, 2 or 3 incompetent catalytic sites. *J. Biol. Chem.* **271**, 18128-18133

Amons R, Schrier PI (1981) Removal of SDS from proteins and peptides by gel filtration. *Anal. Biochem.* **116**, 439-443

Andersen DH (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child.* **56**, 344-399

Annereau JP, Stoven V, Bontems F, Barthe J, Lenoir G, Blanquet S, Lallemand JY (1997a) Insight into cystic fibrosis by structural modelling of CFTR first nucleotide binding fold (NBF 1). *C R Acad Sci III* **320**(2): 113-121

Annereau JP, Wulbrand U, Vankeerberghen A, Cuppens H, Bontems F, Tümmler B, Cassiman JJ, Stoven V (1997b) A novel model for the first nucleotide binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS* **407**, 303-308

Arispe N, Rojas E, Hartman J, Sorscher EJ, Pollard HB (1992) Intrinsic anion channel activity of the recombinant first nucleotide binding fold domain of the cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1539-1543

Auer M, Scarborough GA, Kühlbrandt W (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H^+ ATPase in the open conformation. *Nature* **392**(6678), 840-843

Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, Al-Awqati Q (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* **43**, 295-300

Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjee Singh M, Riordan JR (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* **68**, 809-818

Berger HA, Travis SM, Welsh MJ (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by specific protein kinase and protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**, 2037-2047

Bergmeyer (1984) Methods of enzymatic analysis. Verlag Weinheim, 3rd edition, S. 324-335

Bertranpetit J, Calafell F (1996) Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: evolutionary considerations. *Ciba Found Symp.* **197**, 97-114, discussion 114-118

Bianchet MA, Ko YH, Amzel M, Pedersen PL (1997) Modeling of Nucleotide Binding Domains of ABC Transporter Proteins Based on a F_1 -ATPase/RecA Topology: Structural Model of the Nucleotide Binding Domains of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *J. Bioenerg. Biomem.* **29**(5), 503-524

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523

- Biwersi J, Verkman AS (1994) Functional CFTR in endosomal compartment of CFTR-expressing fibroblasts and T84-cells. *Am. J. Physiol.* **266**, C149-C156
- Böhm G, Muhr R, Jaenicke R (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**(3), 191-195
- Bökenkamp D, Jungblut PW, Thole HH (1994) Porcine estradiol receptor contains no post-translational modification: *determination* of the primary structure. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**, 163-172
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Briel M, Greger R, Kunzelmann K (1998) Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *X. oocytes* co-expressing CFTR and ENaC. *J. Physiol. (Lond.)* **508**, 825-836
- Cantiello HF (1998) Nucleotide transport through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biosci. Rep.* **17**(2), 147-171
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG (1987) Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J. Appl. Physiol.* **63**, 152-157
- Cantor CR, Schimmel PR (1980) Biophysical Chemistry. WH Freeman and Company, New York
- Carson MR, Travis SM, Welsh M (1995) The two nucleotide binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 1711-1717
- CDNN *instruction manual* (1997). Version 2.1. <http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cdnn/>
- Chang CT, Wu CS, Yang JT (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of beta-turns. *Anal. Biochem.* **91**, 13-31
- Chang JY, Alkan SS, Hilschmann N, Braun DG (1985a) Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. *Eur. J. Biochem.* **151**(2), 225-230
- Chang JY (1985b) Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.* **151**(2), 217-224
- Chattopadhyay A, London E (1984) Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal. Biochem.* **139**, 408-412
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE (1990) *Cell* **63**, 827-834
- Chillon MT, Casals B, Mercier L, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz Romero J, Verlingue C, Claustres M (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1475-1480
- Chuang S-E, Chen A-L, Chao C-C (1995) Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **23**(9), 1641

- Cohen BE, Lee G, Jacobsen KA, Kim YC, Huang Z, Sorscher EJ, Pollard HB (1997) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine and other xanthines differentially bind to the wild-type and $\Delta F508$ mutant first nucleotide binding fold (NBF-1) Domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* **36**, 6455-6461
- Cohn EJ, Edsall JT (1943) Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions. Rheinhold, New York, Chapter 4, p. 157
- Cole SP, Deeley RG (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* **20**(11), 931-940
- Cystic Fibrosis Foundation (1995) Patient registry 1994 annual data report. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, Maryland
- Dahl M, Tybaerg-Hansen A, Wittrup HH, Lange P, Nordestgaard BG (1998) Cystic fibrosis $\Delta F508$ heterozygotes, smoking, and reproduction: studies of 9141 individuals from a general population sample. *Genomics* **50**, 89-96
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP, Lazdunski M (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**(6354), 526-528
- Davis PB, Del Rio S, Muntz JA, Dieckman L (1983) Sweat chloride concentration in adults with pulmonary diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**, 34-37
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**(6389), 761-764
- Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ (1992b) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J. Clin. Invest.* **89**(1), 339-349
- Dirnhuber P, Schütz F (1948) The isomeric transformation of urea into ammonium cyanate in aqueous solutions. *Biochem. J.* **42**, 628
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-45
- Dransfield D, Bradford AJ, Smith J, Martin M, Roy C, Mangeat PH, Goldenring JR (1997) Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *EMBO J.* **16**, 35-43
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**, 1227-1233
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* **254**(5039), 1797-1799
- Dunn JJ, Studier FW (1983) Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage T7 DNA and the Locations of T7 Genetic Elements. *J. Mol. Biol.* **166**, 477-535
- Durchschlag H (1986) Thermodynamic data for Biochemistry and Biotechnology. H-J Hinz, ed., Springer-Verlag, New York, Chapter 3, p. 45
- Ehrmann M, Ehrle R, Hofmann E, Boos E, Schlosser A (1998) The ABC maltose transporter. *Mol. Microbiol.* **29**(3), 685-694

- Ellinger S, Mach M, Korn K, Jahn G (1991) Cleavage and Purification of prokaryotically expressed HIV gag and env fusion proteins for detection of HIV antibodies in the ELISA. *Virology* **180**, 811-813
- Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM (1992) Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet.* **2**(3), 240-248
- Faller LD (1989) Competitive binding of ATP and the fluorescent substrate analogue 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenylcyclohexadienylidene)adenosine 5'-Triphosphate to the gastric H⁺, K⁺-ATPase: evidence for two classes of nucleotide sites. *Biochemistry* **28**, 6771-6778
- Field M (1993) Toxygenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol* **55**, 631-55
- Fischer H, Machen TE (1996) The tyrosine kinase p60^{c-src} regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Biophys. J.* **71**(6), 3073-3082
- Fislage R (1994) Der D7S8-Locus des Menschen. Dissertation Universität Hannover
- Fitzsimmons SC (1993) The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **122**, 1-9
- Foskett JK (1998) CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 689-717
- French PJ, Bijman J, Bot AJ, Boomaars WE, Scholte BJ, de Jonge HR (1997) Genistein activates CFTR Cl⁻ channels via a tyrosine kinase- and protein phosphatase-independent mechanism. *Am. J. Physiol.* **273**(2 Pt 1), C747-753
- Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ (1993) CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* **363**(6426), 263-268
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* **266**, 107-109
- Gadsby DC Nairn AC (1994) Regulation of CFTR channel gating. *TIBS* **19**, 513-518
- Gadsby DC, Dousmanis AG, Nairn AC (1998) ATP hydrolysis cycles and the gating of CFTR Cl⁻ channels. *Acta Physiol. Scand.* **163**, Suppl. **643**, 247-256
- Gaillard DA, Carré-Pigeon F, Lallemand A (1997) Normal *vas deferens* in fetuses with cystic fibrosis. *J. Urol.* **158**, 1549-1552
- Gill SC, von Hippel PH (1989) Calculations of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649
- Gottlieb RA, Dosanjh A (1996) Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(8), 3587-3591
- Gralén N, Lagermalm G (1951) A Contribution to the Knowledge of Some Physico-Chemical Properties of Polystyrene. *J. Phys. Chem.* **56**, 514-523
- Greenfield NJ (1996) Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* **235**, 1-10

- Gregory RJ, Rich DP, Cheng S, Souza DW, Paul S, Manavalan P, Anderson MP, Welsh MJ, Smith AE (1991) Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3886-3893
- Gruenwald S, Heitz J (1993) Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual. 2nd Edition, PharMingen, San Diego (Kalifornien)
- Gruis DB, Price EM (1997) The nucleotide binding folds of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator are extracellular accessible. *Biochemistry* **36**, 7739-7745
- Guan C, Li P, Riggs PD Inouye H (1987) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30
- Gunderson KL, Kopito RR (1995) Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role of ATP binding and hydrolysis. *Cell* **82**, 231-239
- Hames BD, Rickwood D (1990) Gel Electrophoresis of Proteins – A Practical Approach., 2nd edition, IRL Press, Oxford
- Hanahan D (1985) *In* DNA Cloning Vol. 1 (Glover DM, ed.) IRL Press, Oxford, pp 109-135
- Harrap K (1972) The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body. *Virology* **50**, 114-123
- Hartman J, Huang Z, Rado TA, Peng S, Jilling T, Muccio DD, Sorscher EJ (1992) Recombinant synthesis, purification, and nucleotide binding characteristics of the first nucleotide binding domain of the cystic fibrosis gene product. *J. Biol. Chem.* **267**(10), 6455-6458
- Havarstein LS, Diep DB, Nes IF (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**(2), 220-240
- Haws CM, Nepomuceno IB, Krouse ME, Wakelee H, Law T, Xia Y, Nguyen H, Wine JJ (1996) Δ F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am. J. Physiol.* **270**, C1544-C1555
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 67-113
- Hiratsuka T (1975) Fluorescence Properties of 2'(or 3')-O-(2, 4, 6-Trinitrophenyl) Adenosine 5'-Triphosphate and its Use in the Study of Binding to Heavy Meromyosin ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **453**, 293
- Hiratsuka T (1982) Biological Activities and Spectroscopic Properties of Chromophoric and Fluorescent Analogs of Adenine Nucleoside and Nucleotides, 2',3'-O-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienylidene) Adenosine Derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **719**, 509-517
- Hirst JD, Sternberg MJE (1992) Prediction of structural and functional features of protein and nucleic acid sequences by artificial neural networks. *Biochemistry* **31**, 7211-7218
- Ho K (1998) The ROMK-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator connection: new insights into the relationship between ROMK and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **7**, 49-58

- Hockney RC (1994) Recent Developments in Heterologous Protein Production in *E. coli*. *Trends Biotechnol.* **12**, 456-463
- Hoedemaker FJ, Davidson AR, Rose DR (1998) A Model for the Nucleotide-Binding Domains of ABC Transporters Based on the Large Domain of Aspartate Aminotransferase. *Proteins* **30**, 275-286
- Hoof T, Demmer A, Hadam MR, Riordan JR; Tümmler B (1994) Cystic fibrosis-type mutational analysis in the ATP-binding cassette transporter signature of human P-glycoprotein MDR1. *J. Biol. Chem.* **269**, 20575-20583
- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GFL, Kim SH (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**, 703-706
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362-365
- IBA (1995) Methoden zur Produktion von Proteinen in der Zellkultur. Skript zum Symposium. Institut für Bioanalytik, Göttingen
- Illek B, Fischer H, Santos GF, Widdicombe JH, Machen TE, Reentsra WW (1995) cAMP-independent activation of CFTR Cl-channels by the tyrosine kinase genistein. *Am. J. Physiol.* **268**(4 Pt 1), C886-893
- Ismailov II, Awayda MS, Jovov B, Berdiev BK, Fuller CM, Dedman JR, Kaetzel MA, Benos DJ (1996) Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **271**, 4725-4732
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129-135
- Jiang Q, Engelhardt (1998) Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* **6**, 12-31
- Johannsen HK, Nir M, Hoiby N, Koch C, Schwartz M (1991) Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for $\Delta F508$ mutation. *Lancet* **337**, 631-634
- Jovov B, Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM, Sorscher EJ, Dedman JR, Kaetzel MA, Benos DJ (1995) Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outward rectifying chloride channels. *J. Biol. Chem.* **270**(49), 29194-29200
- Kälin N (1997) Charakterisierung der CFTR Mutation $\Delta F508$. Dissertation Universität Hannover
- Kälin N, Claabata A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B (1999) DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **103**(10), 1379-1389
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw K-T, Holsclaw D (1968) Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **279**, 65-69
- Kartner N, Augustinas O, Jensen TJ, Naismith AL, Riordan JR (1992) Mislocalization of delta F508 in cystic fibrosis sweat gland. *Nat. Genet.* **1**(5), 321-327
- Kennedy KA, Traxler B (1999) MalK forms a dimer independent of its assembly into the MalFGK₂ ATP-binding cassette transporter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**(10), 6259-6264

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L-C (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073-1080
- Kerkhoff C, Gehring L, Habben K, Resch K, Kaefer V (1996) Identification of two different lysophosphatidylcholine:acyl-CoA acyltransferases (LAT) in pig spleen with putative distinct topological localization. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 249-256
- Khananashvili D, Gromet-Elhanan Z (1984) Demonstration of two binding sites for ADP on the isolated β -subunit of the *Rhodospirillum rubrum* $R_1F_0F_1$ -ATP synthase. *FEBS* **178**, 10-14
- Khananashvili D, Gromet-Elhanan Z (1985) Evidence that the Mg-dependent low-affinity binding site for ATP and P_i demonstrated on the isolated β subunit of the F_0F_1 ATP synthase is a catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1886-1890
- Kidd M, Emery VC (1993) The Use of Baculoviruses as Expression Vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42**, 137-158
- Kim SK (1997) Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 853-859
- Kindler B (1997) AKKUPROG: Auswertung von Messungen chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Analyse von Biopolymeren in der Ultrazentrifuge. Anwendung auf Protein-DNA-Wechselwirkungen. Dissertation Universität Hannover
- Knowles MR, Gatzky J, Boucher RC (1981) Increased bioelectric potential differences across respiratory epithelial in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1489-1498
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC (1983) Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**, 1067-1070
- Ko YH, Thomas PJ, Delannoy MR, Pedersen PL (1993) The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – overexpression, purification, and characterization of wild type and $\Delta F508$ mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**(32), 24330-24338
- Ko YH, Pedersen PL (1995) The First Nucleotide Binding Fold of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Can Function as an Active ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**(38), 22093-22096
- Ko YH, Delannoy M, Pedersen PL (1997) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: The first nucleotide binding fold targets the membrane with retention of its ATP binding function. *Biochemistry* **36**, 5053-5064
- Kratzin HD, Wiltfang J, Karas M, Neuhoff V, Hilschmann N (1989) Gas-Phase Sequencing after Electroblothing on Polyvinylidene Difluoride Membrane Assigns Correct Molecular Weights to Myoglobin Molecular Weight Markers. *Anal. Biochem.* **183**, 1-8
- Kulczycki L, Schauf V (1974) Cystic fibrosis in blacks in Washington DC: incidence and characteristics. *Am. J. Dis. Child.* **127**, 64-67
- Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R, Riordan JR (1997a) Inhibition of epithelial Na^+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS* **400**, 341-344
- Kunzelmann K, Mall M, Briel M, Hipper A, Nitschke R, Ricken S, Greger R (1997b) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca^{2+} activated Cl^- conductance of *Xenopus oocytes*. *Pflü. Arch.* **435**, 178-181

- Kwok T, Yang J, Pittard AJ, Wilson TJ, Davidson BE (1995) Analysis of an *Escherichia coli* mutant TyrR protein with impaired capacity for tyrosine-mediated repression, but still able to activate at sigma 70 promoters. *Mol. Microbiol.* **17**(3), 471-81
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T4*. *Nature.* **227**, 680-685
- Lamm O (1929) *Arkiv för matematik, astronomi och fysik* **21B** (2)
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM (1992) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology* **11**, 187-193
- Lehrich RW, Forrest JN Jr. (1995) Tyrosine phosphorylation is a novel pathway for regulation of chloride secretion in shark rectal gland. *Am. J. Physiol.* **269**(4, Pt. 2), F594-600
- Lester LA, Kraut J, Lloyd-Still J, Karrison T, Mott C, Billstrand C, Lemke A, Ober C (1994) $\Delta F508$ genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatrics* **93**, 114-118
- Li C, Ramjeesingh M, Reyes E, Jensen T, Chang X, Rommens JM, Bear CE (1993) The cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat. Genet.* **3**(4), 311-316
- Li C, Ramjeesingh M, Bear CE (1996) Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J. Biol. Chem.* **271**(20), 11623-11626
- Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K, Bear CE (1996) ATPase activity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **271**, 28463-28468
- Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* **271**(11), 6509-6517
- Linsdell P, Hanrahan JW (1998a) Adenosine triphosphate dependent asymmetry of anion permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 601-614
- Linsdell P, Hanrahan JW (1998b) Glutathione permeability of CFTR. *Am. J. Physiol.* **275**, C323-326
- Liu PQ, Ames GF (1998) *In vitro* disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(7), 3495-3500
- Logan J, Hiestand D, Daram P, Huang Z, Muccio DD, Hartman J, Haley B, Cook WJ, Sorscher EJ (1994) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding. *J. Clin. Invest.* **94**, 228-236
- Luckow VA (1991) Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors, Seite 97-152. In Prokop A, Bajpai RK, Ho C (ed.), Recombinant DNA technology and applications. McGraw Hill, New York

- Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR, Grinstein S (1993) The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J. Biol. Chem.* **268**(29), 21592-21598
- Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (Δ F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* **13**(24), 6076-6086
- Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW (1998) Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A and other phosphatases. *Am. J. Physiol.* **274**, C1397-C1410
- Maina CV, Riggs PD, Grandea AG III, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan C (1988) A vector to express and purify foreign proteins in *Escherichia coli* by fusion to, and separation from, maltose binding protein. *Gene* **74**, 365-373
- Mall M, Hipper A, Greger R, Kunzelmann K (1996a) Wild type but not Δ F508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS* **381**, 47-52
- Mall M, Kunzelmann K, Hipper A, Busch AE, Greger R (1996b) cAMP stimulation of CFTR-expressing *Xenopus oocytes* activates a chromanol-inhibitable K⁺ conductance. *Pflüg. Arch.* **432**, 516-522
- McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Herbert SC, Giebisch G, Egan ME (1996) Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(15), 8083-8088
- McTigue M, Williams DR, Tainer JA (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: Glutathion-S-Transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug Praziquantel. *J. Mol. Biol.* **246**, 21-27
- Mekus F (1999) Cystic fibrosis as a genetically complex disease. Dissertation Universität Hannover
- Middleton PG, Alton EFW (1998) Gene therapy for cystic fibrosis: which postman, which box? *Thorax* **53**, 197-199
- Miller DL, Weissbach H (1974) Elongation factor Tu and the aminoacyl-tRNA-EFTu-GTP complex. *Meth. Enzymol.* **30**: 219-32
- Möller G (1996) RecA-Protein aus *Escherichia Coli*: Struktur und Dynamik der Komplexe mit einzelsträngiger Nukleinsäure. Dissertation Universität Hannover
- Momburg F, Hämmerling GJ (1998) Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* **68**, 191-256
- Morrall N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, Estivill X (1993) Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum. Mol. Genet.* **2**(7), 1015-1022
- Morrall *et al.* (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (Δ F508) in European populations. *Nat. Genet.* **7**(2), 169-175
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp.* **51**, 263-273

- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350
- Murataliev MB (1995) Interaction of mitochondrial F₁-ATPase with trinitrophenyl derivatives of ATP. Photoaffinity labeling of binding sites with 2-Azido-2', 3'-O-(4,6-trinitrophenyl)adenosine 5'-triphosphate. *Eur. J. Biochem.* **232**, 578
- Nagai K, Thogersen HC (1984) Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* **309**, 810-812
- Nagai K, Thogersen HC (1987) Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **153**, 461-481
- Naren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, Benos DJ, Quick MW, Kirk KL (1997) Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* **390**(6657), 302-305
- Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL (1998) Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(18), 10972-7
- NEB (1994) Protein Fusion & Purification System - Expression and Purification of Proteins from Cloned Genes. Instruction Manual Version 3.03. Beverly, MA (USA)
- Nelson DA, Bryan J, Wechsler S, Clement JP 4th, Aguilar-Bryan L (1996) The high-affinity sulfonyleurea receptor: distribution, glycosylation, purification, and immunoprecipitation of two forms from endocrine and neuroendocrine cell lines. *Biochemistry* **35**(47), 14793-14799
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Shimazaki S, Ota M (1994) Dimerization characteristics of the DNA- and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **50**(5-6), 225-233
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Ota M, Takagi T, Yokoyama K (1995) Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* **233**(1), 1-8
- Neugebauer J (1988) A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. CALBIOCHEM Corporation, Clarkson University Potsdam, New York
- Neville DCA, Rozanas CR, Tulk BM, Townsend RR, Verkman AS (1997) Expression and characterization of the NBD1-R-Domain region of CFTR: Evidence for subunit-subunit interactions. *Biochemistry* **37**, 2401-2409
- Nikaido H, (1994) Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. *FEBS* **346**, 55-58
- Nikaido H, Hall JA (1998) Overview of bacterial ABC transporters. *Meth. Enzymol.* **292**, 3-20
- O'Reilly D, Miller LK, Luckow VA (1992) Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual. WH Freeman and Company, New York, NY
- Pai EF *et al.* (1989) Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214
- Pasyk EA, Foskett JK (1995) Mutant (Δ F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 12347-12350

- Peng S, Sommerfelt M, Logan J, Huang Z, Jilling T, Kirk K, Hunter E, Sorscher E (1993) One-step affinity isolation of recombinant protein using the Baculovirus/Insect Cell Expression System. *Prot. Expr. Purif.* **4**, 95-100
- Perkins (1986) Protein volumes and hydration effects. The calculations of partial specific volumes, neutron scattering matchpoints and 280-nm absorption coefficients for proteins and glycoproteins from amino acid sequences. *Eur. J. Biochem.* **157**, 169-180
- Peters C, Mayer A (1998) Ca²⁺/Calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**, 575-580
- Pharmacia (1993) GST – Gene Fusion System. Instruction Manual, Uppsala, Schweden
- Pieper U (1995) Domänen-deletionsmutanten des Elongationsfaktors Tu aus *Escherichia coli*. Dissertation Universität Hannover
- Pier GB, Grout M, Zaidi TS (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12088-12093
- Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**, 79-82
- Pikula S *et al.* (1994) Organic anion-transporting ATPase of rat liver. *J. Biol. Chem.* **269**, 27566
- Pind S, Riordan JR, Williams DB (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **269**, 12784-12788
- Possee RD, Sun TP, Howard S, Ayres M, Hill-Perkins M, Gearing K (1991) Nucleotide sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9,4 kbp *EcoRI*-I and -R (polyhedrine gene) region. *Virology* **185**, 229-241
- QIAprep Miniprep Handbook (1997) For purification of Plasmid DNA. Qiagen, Hilden
- QIAquick™ Handbook (1995) For DNA purification from PCR and other enzymatic reactions. Qiagen, Hilden
- Qu BH, Thomas PJ (1996) Alteration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding pathway. *J. Biol. Chem.* **271**(13), 7261-7264
- Qu BH, Strickland EH, Thomas PJ (1997) Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding. *J. Biol. Chem.* **272**(25), 15739-15744
- Quinton PM (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**(5899), 421-422
- Quinton PM, Bijman J (1983) Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **308**(20), 1185-1189
- Quinton PM (1986) Missing Cl conductance in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* **251**, C639-C652
- Quinton PM (1990) Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J.* **4**, 2709-2717
- Quinton PM, Reddy MM (1992) Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non hydrolytic binding. *Nature (Lond.)* **360**, 79-81

- Raleigh EA, Lech K, Brent R (1989) Selected topics from classical bacterial genetics. *In* Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds.) pp 1.4.-1.4.14. John Wiley and Sons, New York
- Ramjeesingh M, Li C, Garami E, Huan L-J, Hewryk M, Wang Y, Galley K, Bear CE (1997) A novel procedure for the efficient purification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Biochem. J.* **327**, 17-21
- Randak C, Roscher AA, Hadorn HB, Assfalg-Machleidt I, Auerswald EA, Machleidt W (1995) Expression and functional properties of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator fused to glutathione-S-transferase. *FEBS* **363**, 189-194
- Randak C, Neth P, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Roscher AA, Hadorn HB, Machleidt W (1996) A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS* **398**, 97-100
- Randak C, Neth P, Auerswald EA, Eckersborn C, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W (1997) A recombinant polypeptide model of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functions as an active ATPase, GTPase and adenylate kinase. *FEBS* **410**, 180-186
- Reczek D, Berryman M, Bretscher A (1997) Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J. Cell. Biol.* **139**, 169-179
- Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL, Kopito RR (1996) Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* **271**, 1876-1879
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, Cantiello HF (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J. Biol. Chem.* **269**, 20584-20591
- Rhee KH, Morris EP, Barber J, Kühlbrandt W (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction center at 8 Å resolution. *Nature* **396**(6708), 283-286
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson D, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* **347**, 358-363
- Riley LG, Ralston GB, Weiss AS (1996) Multimer formation as a consequence of separate homodimerization domains: the human c-Jun leucine zipper is a transplantable dimerization module. *Protein Eng.* **9**(2), 223-230; *err. in: Protein Eng.* (1996) **9**(9), 831
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielinski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1080
- Rohrmann GF (1986) Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* **67**, 1499-1513
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **230**, 1054-1057

- Rosen MJ *et al.* (1972) Systematic Analysis of Surface Active Agents. New York, John Wiley and Sons
- Rossmann MG, Moras D, Olsen KW (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199
- Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *Appl. Physiol.* **75**, 2709-2424
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 3 Bände
- Sander C, Schneider R (1994) The HSSP database of protein structure-sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* **22**(17), 3597-3599
- Sato S, Ward CL, Kopito RR (1998) Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**(13), 7189-7192
- Schneider E, Hunke S, Tebbe S (1995) The MalK protein of the ATP-binding cassette transporter for maltose of *Escherichia coli* is accessible to protease digestion from the periplasmic side of the membrane. *J. Bacteriol.* **177**(18), 5364-5367
- Schneider E, Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 1-20
- Schreiber R, Greger R, Nitschke R, Kunzelmann K (1996) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus oocytes*. *Pflüg. Arch.* **434**, 841-847
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB (1995) CFTR regulates outward rectifying Cl⁻ channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063-1073
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB (1998) Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(5), 2674-2679
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* **79** (1 Suppl), 145-66
- Seksek O, Biwerski J, Verkman AS (1996) Evidence against defective trans-golgi acidification in cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 15542-15548
- Shapiro AB, Ling V (1998) The mechanism of ATP-dependent multidrug transport by P-glycoprotein. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **643**, 227-34
- Sharma S, Rose DR (1995) Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide binding domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**(23), 14085-14093
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, Suppl., No. 1, S23-S45
- Sherman MY, Goldberg AL (1992) Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**(1), 71-77
- Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**(31), 19797-19801

- Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ames GFL (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 18714-18719
- Slatkin M, Rannala B (1997) Estimating the age of alleles by use of intraallelic variability. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 447-458
- Smith DB, Johnson KS, Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31
- Smith GE, Fraser MJ, Summers MD (1983) Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* **46**, 584-593
- Spangenberg C (1997) Sequenzdiversität von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation Universität Hannover
- Spurlino JC, Lu G-Y, Quioco FA (1991) The 2,3 Angström Resolution Structure of the Maltose- or Maltodextrin-binding Protein, A Primary Receptor of Bacterial Active Transport and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**, 5205-5219
- Sreerama N, Woody RW (1993) A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal. Biochem.* **209**, 32-44
- Sreerama N, Woody RW (1994a) Poly(pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis. *Biochemistry* **33**(33)10022-10024
- Sreerama N, Woody RW (1994b) Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. *J. Mol. Biol.* **242**(4), 497-507
- Stark GR, Stein WH, Moore S (1960) Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.* **235**(11), 3177-3181
- Strickland E, Qu BH, Millen L, Thomas PJ (1997) The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N-terminal nucleotide binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **272**(41), 25421-25424
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of Bacteriophage T7 Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Studier FW (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219** (1), 37-44
- Stutts MJ, Rossier BC, Boucher RC (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J. Biol. Chem.* **272**(22), 14037-14040
- Sugita M, Yue Y, Foskett JK (1998) CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J.* **17**(4), 898-908
- Summers MD, Smith GE (1978) Baculovirus structural polypeptides. *Virology* **84**, 390-402
- Summers MD, Smith GE (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agric. Exp. Station Bull.* **1555**, 1-57
- The Electroporator II Instruction Manual (1995) Version A 25-0028. Invitrogen, San Diego

- Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Ysern X, Pedersen PL (1992a) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: nucleotide binding to a synthetic peptide. *Science* **251**, 555-557
- Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Sondek J, Hulihan JM, Pedersen PL (1992b) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J. Biol. Chem.* **267**(9), 5727-5730
- Thomas PJ, Ko YH, Pedersen PL (1992c) Altered protein folding may be the molecular basis of most cases of cystic fibrosis. *FEBS* **312**, 7-9
- Thomas PJ, Pedersen PL (1993) Effects of the $\Delta F508$ mutation on the structure, function, and folding of the first nucleotide-binding domain of CFTR. *J. Bioenerg. Biomem.* **25**(1), 11-19
- Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *TIBS* **20** 456-459
- Townsend RR, Lipniunas PH, Tulk BM, Verkman AS (1996) Identification of protein kinase A phosphorylation sites on NBD1 and R domains of CFTR using electrospray mass spectrometry with selective phosphate ion monitoring. *Prot. Science.* **5**, 1865-1873
- Travis SM, Berger HA, Welsh MJ (1997) Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11055-11060
- Tsao FHC, Meyer KC, Chen X, Rosenthal NS, Hu J (1998) Degradation of annexin I in bronchoalveolar lavage fluid from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **18**, 120-128
- Tümmler B, Storrs T, Dziadek V, Dörk T, Meitinger T, Golla A, Bertele-Harms RM, Harms HK, Schröder E, Claass A, Rutjes J, Schneppenheim R, Bauer I, Breuel K, Stuhmann M, Schmidtke J, Lindner M, Eigel A, Horst J, Kaiser R, Lentze MJ, Schmidt K, von der Hardt H, Estivill X (1996) Geographic distribution and origin of CFTR mutations in Germany. *Hum. Genet.* **97**(6), 727-31
- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, Edixhoven M, Boomars WE, Lohmann SM, de Jonge HR (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(4), 1466-1471
- van Holde KE, Johnson CW, Ho PSH (1998) Principles of Physical Biochemistry. Prentice-Hall, New Jersey, Kapitel 5 (u. a. Seite 202)
- Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H (1998) Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum. Mol. Genet.* **7**(11), 1761-1769
- van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B (1997) Cellular glutathione turnover *in vitro*, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur. Respir. J.* **10**, 1392-1400
- van Stokkum IH, Spoelder HJ, Bloemendal M, van Grondelle R, Groen FC (1990) Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **191**, 110-118

- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP-Synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951
- Wang S, Raab SW, Schaatz PJ, Guggino WB, Li M (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett.* **427**(1), 103-108
- Wang C, Castro AF, Wilkes DM, Altenberg GA (1999) Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem. J.* **338**, 77-81
- Ward CL, Kopito RR (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 25710-25718
- Ward CL, Omura S, Kopito RR (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127
- Weber J, Senior AE (1996) Binding and hydrolysis of TNP-ATP by Escherichia coli F1-ATPase. *J. Biol. Chem.* **271**(7), 3474-7
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner T, Rothman JE (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772
- Wei LY, Stutts MJ, Hoffman MM, Roepe PD (1995) Overexpression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in NIH 3T3 cells lowers membrane potential and intracellular pH and confers a multidrug resistance phenotype. *Biophys. J.* **69**(3), 883-895
- Weinreich F, Wood PG, Riordan JR, Nagel G (1997) Direct interaction of genistein on CFTR. *Pflügers Arch.* **434**(4), 484-491
- Welsh MJ (1990) Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia. *FASEB J.* **4**, 2716-2725
- Welsh MJ, Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254
- Winpenny JP, McAlroy HL, Gray MA, Argent BE (1995) Protein kinase C regulates the magnitude and stability of CFTR currents in pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol.* **268**, C823-C828
- Winter R, Noll F (1998) Methoden der biophysikalischen Chemie. Teubner Verlag Stuttgart
- Wright SW, Morton NE (1968) Genetic studies on cystic fibrosis in Hawaii. *Am. J. Hum. Genet.* **20**, 157-169
- Wulbrand U (1994) Klonierung, Expression und Charakterisierung der postulierten nukleotidbindenden Domänen der ABC-Transporter CFTR und P-Glykoprotein. Dissertation Universität Hannover
- Yang JT, Wu CSC, Martinez H (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Meth. Enzymol.* **130**, 208-69
- Yang Y, Devor DC, Engelhardt JF, Ernst SA, Strong TV, Collins FS, Cohn JA, Frizzell RA, Wilson JM (1993a) Molecular basis of defective anion transport in L cells expressing recombinant forms of CFTR. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1253-1261

-
- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson JM (1993b) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(20), 9480-9484
- Yike I, Ye J, Zhang Y, Manavalan P, Gerken TA, Dearborn DG (1996a) A recombinant peptide model of the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Comparison of wild-type and $\Delta F508$ mutant forms. *Prot. Science* **5**, 89-97
- Yike I, Zhang Y, Ye J, Dearborn DG (1996b) Expression in *Escherichia coli* of Cytoplasmatic Portions of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Apparent Bacterial Toxicity of Peptides Containing R-Domain Sequences. *Prot. Expr. Purif.* **7**, 45-50
- Zhou SS, Hazama A, Okada Y (1998) Tyrosine kinase-independent extracellular action of genistein on the CFTR Cl⁻ channel in guinea pig ventricular myocytes and CFTR-transfected mouse fibroblasts. *Jpn. J. Physiol.* **48**(5), 389-396
- Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 777-807

ANHANG

GRÖßENSTANDARDS FÜR DIE DNA-AGAROSEGELELEKTROPHORESE

λ -*BstE* II (New England Biolabs)

8454 / 7242 / 6369 / 5686 / 4822 / 4324 / 3675 / 2323 / 1929 / 1371 / 1264 / 702 bp

1 kbp-Standard (New England Biolabs)

0,5 μ g enthalten 10002 (41 ng) / 8001 (41 ng) / 6001 (50 ng) / 5001 (41 ng) / 4001 (32 ng) / 3001 (124 ng) / 2000 (63 ng) / 1500 (46 ng) / 1000 (31 ng) / 500 (31 ng) bp.

VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

Alle Nukleotidsequenzen sind in der Richtung von 5' nach 3' angegeben.

Gleichstrang-Oligonukleotide für die PCR-Expressionsklonierung

A-GST	GC TCT AGA ATG TCC CCT ATA CTA GG
F1	CG GAA TTC ACT CGG CAA TTT CCC TGG
F2	CG GAA TTC GAT TTC TTA CAA AAG C
F3	CG GAA TTC GGA TTT GGG GAA TTA TTT G
F4	CG GAA TTC TCA CTT CTT GGT ACT CC
F6	CG GAA TTC GAC ATC TCC AAG TTT GC
F-1C-N386	CG GAA TTC AAC TTA ACG ACT ACA GAA G

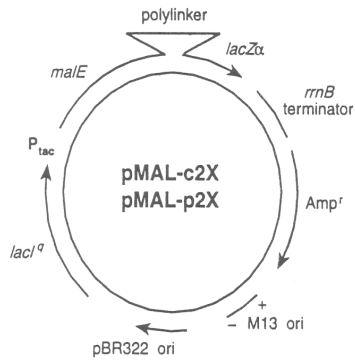
Gegenstrang-Oligonukleotide für die PCR-Expressionsklonierung

E-PGEX3X	AA CTG CAG TCA GTC AGT CAC GAT GAA TTC CCG
E-1C	AA CTG CAG TCA AGC CAT CAG TTT ACA GAC
R1B	CCG CTC GAG GCT TTC AAA TAT TTC TTT TTC
R-1C-F650PST	AA CTG CAG TCA GAA AGA ATC ACA TCC CAT GAG

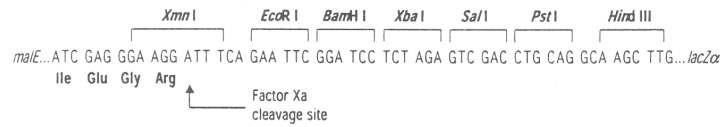
Oligonukleotide für die Kolonie-PCR

Gleichstrang	Gegenstrang
SEQMAL-F GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC	SEQMAL-R CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
SEQGEX-F GGTGGTGGCGACCATCCTCC	SEQGEX-R GCATGTGTCAGAGGTTTTCCACC
A-SEQGST GGTGGTTGTCCAAAAGAGCG	E-SEQGST ACGACCTTCGATCAGATCCG
PVL-F ATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAG	PVL-R GGTCCAAGTTTCCCTGTAGAACTC

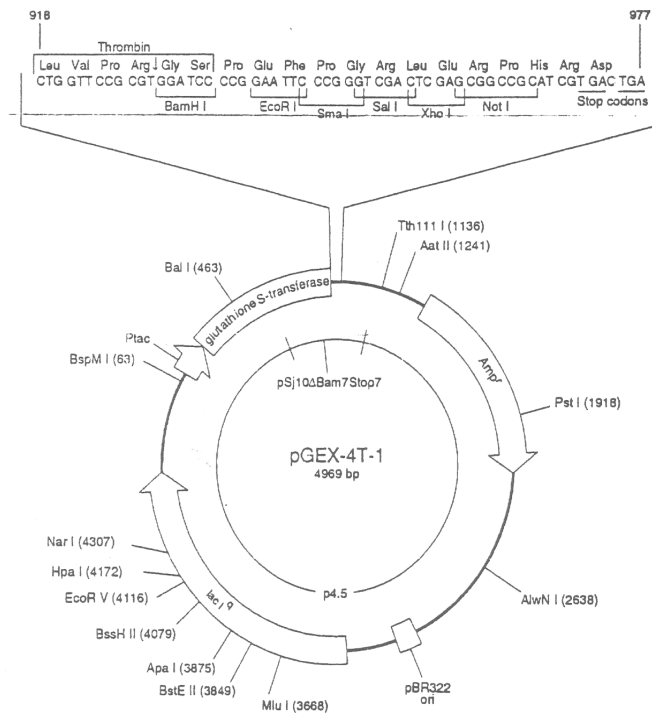
PLASMIDKARTE pMALC2 (NEW ENGLAND BIOLABS)



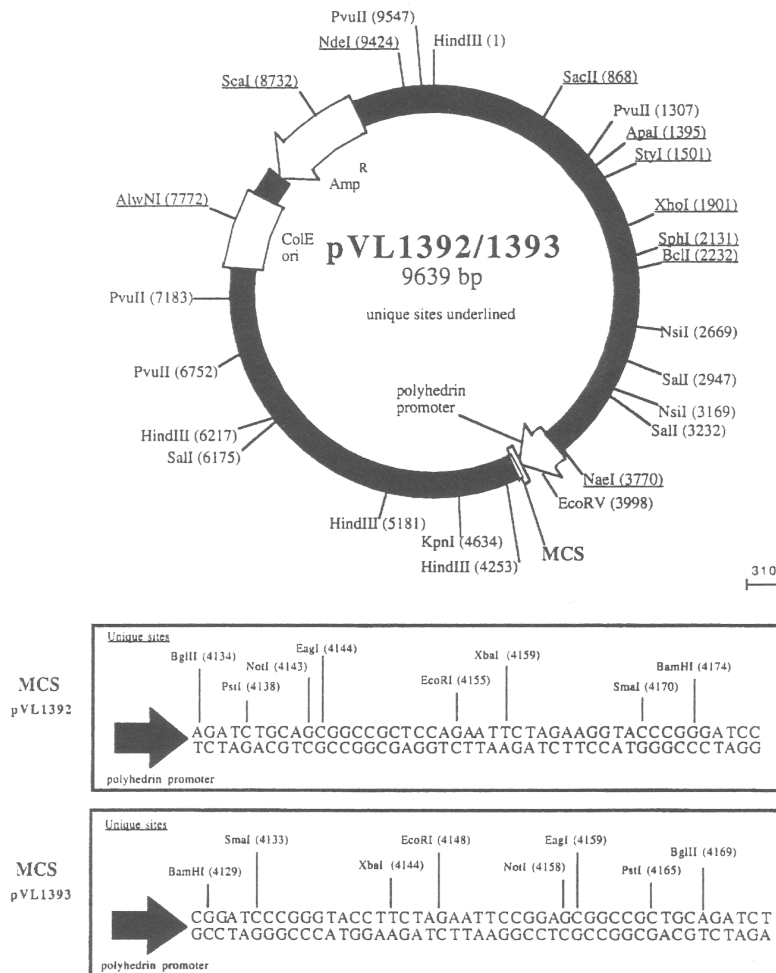
pMAL[™]-c2X, -p2X polylinker:



PLASMIDKARTE pGEX-4T(1) (PHARMACIA BIOTECH)



PLASMIDKARTE pVL1393 (PHARMINGEN) [GRUENWALD UND HEITZ, 1993]



GRÖßENSTANDARD FÜR DIE SDS-PAGE (PROMEGA)

MMW = *mid range protein molecular weight marker*

- 97,4 kDa Phosphorylase B
- 66,2 kDa Bovine serum albumin
- 55,0 kDa L-glutamic dehydrogenase
- 42,7 kDa Ovalbumin
- 40,0 kDa Aldolase
- 31,0 kDa Carbonic Anhydrase
- 21,5 kDa Soybean trypsin inhibitor
- 14,4 kDa Lysozyme

ANALYTISCHE UZ: HYDRODYNAMISCHE PARAMETER VON REFERENZ-PROTEINEN [AUS WINTER UND NOLL, 1998]

Protein	S-Wert [S _{20°C, Wasser}]	V _{quer} [m ³ ·kg ⁻¹].10 ⁻³	MW [Da]
Lysozym	1,87	0,751	14100
Myoglobin	2,04	0,741	16900
Chymotrypsin	2,54	0,721	23200
β-Lactoglobulin	2,83	0,721	35000
Ovalbumin	3,55	0,748	45000
Serumalbumin	4,3	0,734	66000
Urease	18,6	0,73	480000

Vollständige cDNA- und Aminosäuresequenz von CFTR [Riordan *et al.*, 1989]

1	ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAACTTTTTTTCAGCTGGACC	60
1	MetGlnArgSerProLeuGluLysAlaSerValValSerLysLeuPhePheSerTrpThr	20
61	AGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCTGGAATTGTCAGACATATAACCAATC	120
21	ArgProIleLeuArgLysGlyTyrArgGlnArgLeuGluLeuSerAspIleTyrGlnIle	40
121	CCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGAG	180
41	ProSerValAspSerAlaAspAsnLeuSerGluLysLeuGluArgGluTrpAspArgGlu	60
181	CTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTAAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGA	240
61	LeuAlaSerLysLysAsnProLysLeuIleAsnAlaLeuArgArgCysPhePheTrpArg	80
241	TTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTC	300
81	PheMetPheTyrGlyIlePheLeuTyrLeuGlyGluValThrLysAlaValGlnProLeu	100
301	TTACTGGGAAGAATCATAGCTTCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCG	360
101	LeuLeuGlyArgIleIleAlaSerTyrAspProAspAsnLysGluGluArgSerIleAla	120
361	ATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCA	420
121	IleTyrLeuGlyIleGlyLeuCysLeuLeuPheIleValArgThrLeuLeuLeuHisPro	140
421	GCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATT	480
141	AlaIlePheGlyLeuHisHisIleGlyMetGlnMetArgIleAlaMetPheSerLeuIle	160
481	TATAAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGATAAAATAAGTATTGGACAACCT	540
161	TyrLysLysThrLeuLysLeuSerSerArgValLeuAspLysIleSerIleGlyGlnLeu	180

541	GTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTTC	600
181	ValSerLeuLeuSerAsnAsnLeuAsnLysPheAspGluGlyLeuAlaLeuAlaHisPhe	200
601	GTGTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAG	660
201	ValTrpIleAlaProLeuGlnValAlaLeuLeuMetGlyLeuIleTrpGluLeuLeuGln	220
661	GCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTTCAGGCTGGGCTA	720
221	AlaSerAlaPheCysGlyLeuGlyPheLeuIleValLeuAlaLeuPheGlnAlaGlyLeu	240
721	GGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATCAGTGAAGACTTGTG	780
241	GlyArgMetMetMetLysTyrArgAspGlnArgAlaGlyLysIleSerGluArgLeuVal	260
781	ATTACCTCAGAAAATGATTGAAAATATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCA	840
261	IleThrSerGluMetIleGluAsnIleGlnSerValLysAlaTyrCysTrpGluGluAla	280
841	ATGGAAAAAATGATTGAAAACCTTAAGACAAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCC	900
281	MetGluLysMetIleGluAsnLeuArgGlnThrGluLeuLysLeuThrArgLysAlaAla	300
901	TATGTGAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTCTTTTGTGGTGTTTTTTA	960
301	TyrValArgTyrPheAsnSerSerAlaPhePhePheSerGlyPhePheValValPheLeu	320
961	TCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGAAAATATTCACCACCATC	1020
321	SerValLeuProTyrAlaLeuIleLysGlyIleIleLeuArgLysIlePheThrThrIle	340
1021	TCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCCTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACA	1080
341	SerPheCysIleValLeuArgMetAlaValThrArgGlnPheProTrpAlaValGlnThr	360
1081	TGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGAATAT	1140
361	TrpTyrAspSerLeuGlyAlaIleAsnLysIleGlnAspPheLeuGlnLysGlnGluTyr	380
1141	AAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTC	1200
381	LysThrLeuGluTyrAsnLeuThrThrThrGluValValMetGluAsnValThrAlaPhe	400
1201	TGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTTTGGAGAAAGCAAACAAAACAATAACAATAGAAAA	1260
401	TrpGluGluGlyPheGlyGluLeuPheGluLysAlaLysGlnAsnAsnAsnArgLys	420
1261	ACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTTCTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTC	1320
421	ThrSerAsnGlyAspAspSerLeuPhePheSerAsnPheSerLeuLeuGlyThrProVal	440
1321	CTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACT	1380
441	LeuLysAspIleAsnPheLysIleGluArgGlyGlnLeuLeuAlaValAlaGlySerThr	460
1381	GGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGAAGTGGAGCCTTCAGAGGGT	1440
461	GlyAlaGlyLysThrSerLeuLeuMetMetIleMetGlyGluLeuGluProSerGluGly	480
1441	AAAATTAAGCACAGTGGAGAATTTTATTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGC	1500
481	LysIleLysHisSerGlyArgIleSerPheCysSerGlnPheSerTrpIleMetProGly	500
1501	ACCATTAAGAAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTC	1560
501	ThrIleLysGluAsnIleIlePheGlyValSerTyrAspGluTyrArgTyrArgSerVal	520
1561	ATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTT	1620
521	IleLysAlaCysGlnLeuGluGluAspIleSerLysPheAlaGluLysAspAsnIleVal	540
1621	CTTGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGA	1680
541	LeuGlyGluGlyGlyIleThrLeuSerGlyGlyGlnArgAlaArgIleSerLeuAlaArg	560
1681	GCAGTATACAAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTT	1740
561	AlaValTyrLysAspAlaAspLeuTyrLeuLeuAspSerProPheGlyTyrLeuAspVal	580
1741	TTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACCTAGG	1800
581	LeuThrGluLysGluIlePheGluSerCysValCysLysLeuMetAlaAsnLysThrArg	600

1801	ATTTTGGTCACTTCTAAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCAT	1860
601	IleLeuValThrSerLysMetGluHisLeuLysLysAlaAspLysIleLeuIleLeuHis	620
1861	GAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTT	1920
621	GluGlySerSerTyrPheTyrGlyThrPheSerGluLeuGlnAsnLeuGlnProAspPhe	640
1921	AGCTCAAAACTCATGGGATGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCA	1980
641	SerSerLysLeuMetGlyCysAspSerPheAspGlnPheSerAlaGluArgArgAsnSer	660
1981	ATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACA	2040
661	IleLeuThrGluThrLeuHisArgPheSerLeuGluGlyAspAlaProValSerTrpThr	680
2041	GAAACAAAAAACAATCTTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCT	2100
681	GluThrLysLysGlnSerPheLysGlnThrGlyGluPheGlyGluLysArgLysAsnSer	700
2101	ATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCATTGTGCAAAGACTCCCTTACAA	2160
701	IleLeuAsnProIleAsnSerIleArgLysPheSerIleValGlnLysThrProLeuGln	720
2161	ATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAGAGAGAAGGCTGTCCTTAGTACCA	2220
721	MetAsnGlyIleGluGluAspSerAspGluProLeuGluArgArgLeuSerLeuValPro	740
2221	GATTCTGAGCAGGGAGAGGCGATACTGCCTCGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACG	2280
741	AspSerGluGlnGlyGluAlaIleLeuProArgIleSerValIleSerThrGlyProThr	760
2281	CTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGT	2340
761	LeuGlnAlaArgArgArgGlnSerValLeuAsnLeuMetThrHisSerValAsnGlnGly	780
2341	CAGAACATTCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCCTCAGGCA	2400
781	GlnAsnIleHisArgLysThrThrAlaSerThrArgLysValSerLeuAlaProGlnAla	800
2401	AACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGTTATCTCAAGAACTGGCTTGAAATA	2460
801	AsnLeuThrGluLeuAspIleTyrSerArgArgLeuSerGlnGluThrGlyLeuGluIle	820
2461	AGTGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCTTTTTTGATGATATGGAGAGCATA	2520
821	SerGluGluIleAsnGluGluAspLeuLysGluCysPhePheAspAspMetGluSerIle	840
2521	CCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTTCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATT	2580
841	ProAlaValThrThrTrpAsnThrTyrLeuArgTyrIleThrValHisLysSerLeuIle	860
2581	TTTGTGCTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTGGTTGTG	2640
861	PheValLeuIleTrpCysLeuValIlePheLeuAlaGluValAlaAlaSerLeuValVal	880
2641	CTGTGGCTCCTTGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAAT	2700
881	LeuTrpLeuLeuGlyAsnThrProLeuGlnAspLysGlyAsnSerThrHisSerArgAsn	900
2701	AACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTG	2760
901	AsnSerTyrAlaValIleIleThrSerThrSerSerTyrTyrValPheTyrIleTyrVal	920
2761	GGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACT	2820
921	GlyValAlaAspThrLeuLeuAlaMetGlyPhePheArgGlyLeuProLeuValHisThr	940
2821	CTAATCACAGTGTGAAAATTTTACACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCT	2880
941	LeuIleThrValSerLysIleLeuHisHisLysMetLeuHisSerValLeuGlnAlaPro	960
2881	ATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATA	2940
961	MetSerThrLeuAsnThrLeuLysAlaGlyGlyIleLeuAsnArgPheSerLysAspIle	980
2941	GCAATTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATT	3000
981	AlaIleLeuAspAspLeuLeuProLeuThrIlePheAspPheIleGlnLeuLeuLeuIle	1000
3001	GTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTG	3060
1001	ValIleGlyAlaIleAlaValValAlaValLeuGlnProTyrIlePheValAlaThrVal	1020

3061	CCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTC	3120
1021	ProValIleValAlaPheIleMetLeuArgAlaTyrPheLeuGlnThrSerGlnGlnLeu	1040
3121	AAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAA	3180
1041	LysGlnLeuGluSerGluGlyArgSerProIlePheThrHisLeuValThrSerLeuLys	1060
3181	GGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAA	3240
1061	GlyLeuTrpThrLeuArgAlaPheGlyArgGlnProTyrPheGluThrLeuPheHisLys	1080
3241	GCTCTGAATTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAA	3300
1081	AlaLeuAsnLeuHisThrAlaAsnTrpPheLeuTyrLeuSerThrLeuArgTrpPheGln	1100
3301	ATGAGAAATAGAAAATGATTTTTGTTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTTA	3360
1101	MetArgIleGluMetIlePheValIlePhePheIleAlaValThrPheIleSerIleLeu	1120
3361	ACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATG	3420
1121	ThrThrGlyGluGlyGluGlyArgValGlyIleIleLeuThrLeuAlaMetAsnIleMet	1140
3421	AGTACATTGCAGTGGGCTGTAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATCTGTG	3480
1141	SerThrLeuGlnTrpAlaValAsnSerSerIleAspValAspSerLeuMetArgSerVal	1160
3481	AGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAA	3540
1161	SerArgValPheLysPheIleAspMetProThrGluGlyLysProThrLysSerThrLys	1180
3541	CCATACAAGAAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTGAAGAAA	3600
1181	ProTyrLysAsnGlyGlnLeuSerLysValMetIleIleGluAsnSerHisValLysLys	1200
3601	GATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAATAACACA	3660
1201	AspAspIleTrpProSerGlyGlyGlnMetThrValLysAspLeuThrAlaLysTyrThr	1220
3661	GAAGGTGGAAAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTG	3720
1221	GluGlyGlyAsnAlaIleLeuGluAsnIleSerPheSerIleSerProGlyGlnArgVal	1240
3721	GGCCTCTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGGAGACTA	3780
1241	GlyLeuLeuGlyArgThrGlySerGlyLysSerThrLeuLeuSerAlaPheLeuArgLeu	1260
3781	CTGAACACTGAAGGAGAAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAA	3840
1261	LeuAsnThrGluGlyGluIleGlnIleAspGlyValSerTrpAspSerIleThrLeuGln	1280
3841	CAGTGGAGGAAAAGCCTTTGGAGTGATAACCACAGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAACATTT	3900
1281	GlnTrpArgLysAlaPheGlyValIleProGlnLysValPheIlePheSerGlyThrPhe	1300
3901	AGAAAAAATTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGAT	3960
1301	ArgLysAsnLeuAspProTyrGluGlnTrpSerAspGlnGluIleTrpLysValAlaAsp	1320
3961	GAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTG	4020
1321	GluValGlyLeuArgSerValIleGluGlnPheProGlyLysLeuAspPheValLeuVal	1340
4021	GATGGGGCTGTGTCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT	4080
1341	AspGlyGlyCysValLeuSerHisGlyHisLysGlnLeuMetCysLeuAlaArgSerVal	1360
4081	CTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACA	4140
1361	LeuSerLysAlaLysIleLeuLeuLeuAspGluProSerAlaHisLeuAspProValThr	1380
4141	TACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATTCTCTGT	4200
1381	TyrGlnIleIleArgArgThrLeuLysGlnAlaPheAlaAspCysThrValIleLeuCys	1400
4201	GAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAA	4260
1401	GluHisArgIleGluAlaMetLeuGluCysGlnGlnPheLeuValIleGluGluAsnLys	1420
4261	GTGCGGCAGTACGATTCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTCCGGCAAGCC	4320
1421	ValArgGlnTyrAspSerIleGlnLysLeuLeuAsnGluArgSerLeuPheArgGlnAla	1440

4321	ATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTTCCCACCGGA	4380
1441	IleSerProSerAspArgValLysLeuPheProHisArgAsnSerSerLysCysLysSer	1460
4381	AAGCCCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATAACAAGGCTT	4440
1461	LysProGlnIleAlaAlaLeuLysGluGluThrGluGluGluValGlnAspThrArgLeu	1480
4441	TAG	4443
1481	***	1481