



CSSB
Centre for Structural
Systems Biology



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Bachelorthesis

Klonierung und Expression von Mutanten des 20S-Proteasoms aus
Thermoplasma acidophilum zur Untersuchung der Substrattranslokation

vorgelegt von

Jeshna Heeramun



Hamburg

am 29. Juni 2024

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Julien Béthune (Life Sciences, HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** Dr. Susanne Witt (Protein Production, CSSB Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der CSSB Centre for Structural Systems Biology im Protein Production Facility

Danksagung

An erster Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt Konstantin Altfrohne, der mich tatkräftig bei den Versuchen begleitet hat. Ebenso danke ich herzlich Philipp Lewe und Ronald Maitschke-Rajasekharan, die mir während meiner Zeit in der PPCF viel beigebracht und gezeigt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Dr. Susanne Witt, meine Betreuerin, die mir in dieser Zeit viel Wissen vermittelt, mich gefördert und stets unterstützt hat. Ihre hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit waren von unschätzbarem Wert. Bei Prof. Dr. Julien Béthune möchte ich mich ebenfalls herzlich für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken. Sie haben mich während meines gesamten Studiums stets unterstützt und ermutigt. Ohne ihre Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Abstract.....	10
Zusammenfassung	11
1. Einleitung.....	12
1.1 Das 20S Proteasom.....	14
1.1.1 Struktur des 20S Proteasoms in eukaryotischen Zellen	15
1.1.2 Struktur des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	15
1.2 Katalytischer Mechanismus des 20S Proteasoms	17
1.3 Translokation von Substraten	20
1.4 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 DNA	24
2.1.2 Enzymen.....	28
2.1.3 Bakterienstämme and Medien.....	29
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	30
2.1.5 Chemikalien	32
2.1.6 Kits.....	34
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	35
2.1.8 Geräte.....	36
2.1.9 Software.....	39
2.2 Methoden	40
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.2 Proteinexpression	46
2.2.3 Proteinanalyse	48
3. Ergebnisse.....	52

3.1 Analyse der Interaktionsstellen und Mutagenese im 20S-Proteasom von <i>Ta</i>	52
3.1.1 Alpha- Beta-Interaktion.....	53
3.1.2 intramolekularen Alpha-Alpha-Interaktion.....	55
3.1.3 intermolekularen Alpha-Alpha-Interaktion.....	56
3.2 QuikChange™ Mutagenese von pRSF::Ta20S Mutanten	57
3.3 Proteinexpression.....	58
4. Diskussion	66
4.1 QuikChange™ Mutagenese.....	66
4.2 Proteinexpression.....	67
4.3 Schlussfolgerung.....	70
5. Literatur.....	71
6. Zusatzmaterial	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primers	26
Tabelle 2: Enzymen.....	28
Tabelle 3: Bakterienstämme und Medien.....	29
Tabelle 4: Medien.....	29
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 6: Chemikalien	32
Tabelle 7: Kits	34
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 9: Geräte.....	36
Tabelle 10: Software	39
Tabelle 11: QuikChange™ PCR-Komponente.....	41
Tabelle 12: Amplifikation PCR Programm I.....	42
Tabelle 13: Amplifikation PCR Programm II.....	42
Tabelle 14: Komponente verwendet für die SDS-PAGE	49
Tabelle 15: Bedingungen für die Gele der Proteinanalyse	50
Tabelle 16: Messungen der optischen Dichte von R57A und L58A.....	59
Tabelle 17: Messungen der optischen Dichte von E182A und Y180A	59
Tabelle 18: Messungen der optischen Dichte von S95A und R115K.....	60
Tabelle 19: Messungen der optischen Dichte von R70A und R71A	60
Tabelle 20: Menge an Zellpellet nach Proteinexpression	65
Tabelle 21: Eigenschaften des <i>E. coli</i> Stamms XL1 Blue.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ubiquitin-abhängige Proteindegradation durch das 26S Proteasom	13
Abbildung 2: Ubiquitin- und ATP -unabhängige Proteindegradation durch das 20S Proteasom	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des 26S Proteasoms und seiner Untereinheiten ...	14
Abbildung 4: Seitenansicht des 20S-Kernpartiells	16
Abbildung 5: Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	17
Abbildung 6: Mechanismus der autokatalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven β -Untereinheit des 20S Proteasoms	19
Abbildung 7: Katalytischer Mechanismus der Proteolyse durch das 20S Proteasoms.....	20
Abbildung 8: Modell zur Funktionsweise des PAN.....	21
Abbildung 9: pRSF::T20S Plasmid Mappe	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung der ausgewählten Interaktionsstellen der Ta20S-Untereinheiten und der beteiligten Reste	53
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Alpha-Beta-Interaktionsstelle des Ta20S.....	54
Abbildung 12: Schematische Darstellung der intramolekularen Alpha-Interaktionsstelle des Ta20S	55
Abbildung 13: Schematische Darstellung der intermolekularen Alpha-Interaktionsstelle des Ta20S	57
Abbildung 14: Kolonien, die sich auf Kanamycin-haltigen Agarplatten nach der Hitze-Schock-Transformation gebildet haben.....	58
Abbildung 15: Grafische Darstellung der die OD-Werte (optische Dichte) verschiedener Mutanten im Verlauf der Zeit während der Proteinexpression	61
Abbildung 16: SDS-PAGE und Western Blot der β R70A- und β R71A-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers.	62
Abbildung 17: SDS-PAGE und Western Blot der α S95A- und α R115K-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers	63
Abbildung 18: SDS-PAGE und Western Blot der α R57A- und α L58A-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers	64

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Bedeutung
α	Alpha
β	Beta
ϵ	molaren Extinktionskoeffizienten
A	Absorption
ATP	Adenosintriphosphat
BBR250	Brillantblau R 250
BCA	Bicinchoninsäure
c	Konzentration
CDS	Codierungssequenz
d	Schichtdicke der Lösung
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
fwd	engl. <i>forward</i> , vorwärts
g	Gravitationsbeschleunigung
g/mg/ μ g/ng	Gramm/Milligramm/Mikrogramm/Nanogramm
h	Stunde
HF	engl. <i>High Fidelity</i> , Hochleistung
HRP	engl. <i>Horse reddish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Abkürzungen	Bedeutung
Kan	Kanamycin
l/ml/μl	Liter/Milliliter/Mikroliter
lacI	Lactose-Repressor
LB	Luria-Bertani Medium
M/mM/μM/nM	Mol/Millimol/Micromol/Nanomol
MCS	Mehrfachklonierungsstelle
MeOH	Methanol
min	Minute
<i>N</i>	Gesamtanzahl der Nukleotide
NC	Nitrozellulose
Ni	Nickel
Ntn	N-terminales nukleophil
°C	Grad Celsius
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAN	Proteasom-aktivierendes Nukleotidase
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank
pRSF	Plasmid-Resistenz-Sulfonamid-Faktor
RBS	Ribosomsbindungsstelle
rev	engl. <i>reverse</i> , rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ta	<i>Thermoplasma acidophilum</i>

Abkürzungen	Bedeutung
Ta20S	<i>Thermoplasma acidophilum</i> 20S-Proteasom
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung-Tween
term	terminal
TEV	Tabak-Mosaik-Virus
TFB	Transformationspuffer
TGX	Tris-Glycin-Erweiterung
T_m	Schmelztemperatur
U	Unit / Einheit
V	Volt

Nucleobasen	Bedeutung
A	Adenin
T	Tyrosin
G	Guanin
C	Cytosin

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

Abstract

The 20S proteasome is a crucial component of the proteasome system, responsible for the degradation of misfolded, damaged, or unneeded proteins in cells. Comprising of multiple subunits, it forms a barrel-shaped structure with proteolytic active sites located within its interior. In *Thermoplasma acidophilum*, an extremophilic archaeon, the 20S proteasome plays a vital role in maintaining cellular protein homeostasis under extreme environmental conditions. Central to its function is substrate translocation, where proteins targeted for degradation are unfolded and translocated into the proteolytic chamber. The 20S proteasome of *T. acidophilum* is constructed from four heptameric rings, each containing seven protein subunits. The outer rings are composed of identical alpha subunits, while the inner rings are made up of identical beta subunits. This arrangement creates a central cavity where proteolysis occurs. The actual process of proteolysis in the 20S proteasome core takes place in an ATP-independent manner. The structural complexity of these subunits is essential for the proteasome's stability and its ability to function in extreme environments [1].

In contrast to our detailed knowledge about the structure of the complex, less is known about the translocation of its substrates through the gate formed by the alpha subunits, the antechambers into the central chamber where proteolysis takes place. The regulation underlying the process of substrate translocation is also mostly unknown.

To bridge this gap in knowledge, specific mutants from the subunits of the 20S proteasome from *Thermoplasma acidophilum* were designed. These mutants were created to specifically alter regions thought to be involved in substrate translocation. Using QuikChange™ mutagenesis, targeted mutations were introduced into the DNA sequences encoding these subunits. The mutated genes were then cloned into the pRSF vector and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The results of cloning and expressing specific mutants of the 20S proteasome from *Thermoplasma acidophilum* provide a valuable foundation for further studies, which could help elucidate the structure-function relationship of the proteasome complex. This, in turn, contributes to a better understanding of substrate translocation and subunit interaction in the Ta20S proteasome.

Zusammenfassung

Der 20S-Proteasom ist ein wesentlicher Bestandteil des Proteasomsystems und verantwortlich für den Abbau fehlgefalteter, beschädigter oder überflüssiger Proteine in Zellen. Er besteht aus mehreren Untereinheiten, die eine faßförmige Struktur mit proteolytisch aktiven Stellen im Inneren bilden. In *Thermoplasma acidophilum*, einem extremophilen Archaeon, spielt der 20S-Proteasom eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase unter extremen Umweltbedingungen. Zentrale Funktion des Proteasoms ist die Substrattranslokation, bei der zu degradierende Proteine entfaltet und in die proteolytische Kammer transloziert werden. Der 20S-Proteasom von *T. acidophilum* besteht aus vier heptameren Ringen, von denen jeder sieben Proteinuntereinheiten enthält. Die äußeren Ringe bestehen aus identischen alpha-Untereinheiten, während die inneren Ringe aus identischen beta-Untereinheiten bestehen. Diese Anordnung schafft eine zentrale Kammer, in der die Proteolyse stattfindet. Der eigentliche Prozess der Proteolyse im 20S-Proteasomkern erfolgt ATP-unabhängig. Die strukturelle Komplexität dieser Untereinheiten ist entscheidend für die Stabilität des Proteasoms und seine Fähigkeit, unter extremen Bedingungen zu funktionieren. [1]

Obwohl die Struktur des Proteasomkomplexes gut erforscht ist, ist wenig über die Translokation seiner Substrate durch die Pore, die von den α -Untereinheiten gebildet wird, in die Vorkammern und schließlich in die zentrale Kammer, in der die Proteolyse stattfindet, bekannt. Auch die Regulation, die dem Prozess der Substrattranslokation zugrunde liegt, ist weitgehend unbekannt.

Um die Mechanismen der Substrattranslokation durch das 20S-Proteasom zu untersuchen, wurden spezifische Mutanten der Untereinheiten des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* entwickelt. Diese Mutanten zielten darauf ab, gezielt Bereiche zu verändern, die an der Substrattranslokation beteiligt sind. Mithilfe der QuikChange™-Mutagenese wurden gezielte Mutationen in die DNA-Sequenzen eingeführt, die diese Untereinheiten kodieren. Die mutierten Gene wurden anschließend in den pRSF-Vektor kloniert und in *Escherichia coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse der Klonierung und der Expression dieser spezifischen Mutanten des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* bilden eine wertvolle Grundlage für weitere Studien. Diese könnten zur Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung des Proteasomkomplexes beitragen, was wiederum zu einem besseren Verständnis der Substrattranslokation und der Interaktion der Untereinheiten im Ta20S-Proteasom führt.

1. Einleitung

Proteine spielen in Zellen eine Vielzahl von essenziellen Rollen, einschließlich der Katalyse biochemischer Reaktionen als Enzyme, der Unterstützung der Zellstruktur und -bewegung, der Signalübertragung, des Transports von Molekülen und der Regulation von Genen. Sie sind an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt und müssen daher streng reguliert werden, um die zelluläre Funktion aufrechtzuerhalten [2].

Ein entscheidender Aspekt dieser Regulierung ist die gezielte Degradation von Proteinen, um beschädigte, fehlgefaltete oder überflüssige Proteine zu entfernen und die Proteinhomeostase zu sichern [3]. Um diese Proteinhomeostase aufrechtzuerhalten, gibt es zwei Hauptwege für die Proteindegradation: den lysosomalen Abbauweg und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) [4, 5].

Die lysosomale Proteolyse ist ein Abbauweg innerhalb der Zelle, der durch das Lysosom, ein spezialisiertes Zellorganell, ermöglicht wird. Lysosomen enthalten mehr als 50 verschiedene hydrolytische Enzyme, die in der Lage sind, eine Vielzahl von biologischen Molekülen, einschließlich Proteinen, Nukleinsäuren, Lipiden und Kohlenhydraten, abzubauen [6]. Diese Enzyme arbeiten optimal bei saurem pH-Wert, der im Inneren des Lysosoms durch Protonenpumpen aufrechterhalten wird. Die lysosomale Proteolyse ist weniger spezifisch und umfasst den Abbau großer Proteinaggregate, ganzer Organellen und langlebiger Proteine [6]. Das UPS dagegen, ist der primäre Mechanismus für den gezielten Abbau von Proteinen. Hierbei werden Proteine durch Ubiquitin markiert und anschließend von einem großen proteolytischen Komplex, dem 26S-Proteasom, erkannt und abgebaut. Das 26S-Proteasom besteht aus einem 20S-Kernpartikel und zwei 19S-Regulatoren, die für die Erkennung, Entfaltung und Translokation der ubiquitinierten Proteine zuständig sind. Innerhalb des 20S-Kernpartikels findet die ATP-unabhängige Hydrolyse der Peptidbindungen statt, was zur Freisetzung von kurzen Peptiden und Aminosäuren führt [2, 7, 8]. Das UPS ist sehr spezifisch und wird oft für den schnellen Abbau von kurzlebigen oder abnormalen Proteinen verwendet.

Abbildungen 1 und 2 zeigen den Mechanismus der Proteindegradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System, das eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase in eukaryotischen Zellen spielt (siehe unten).

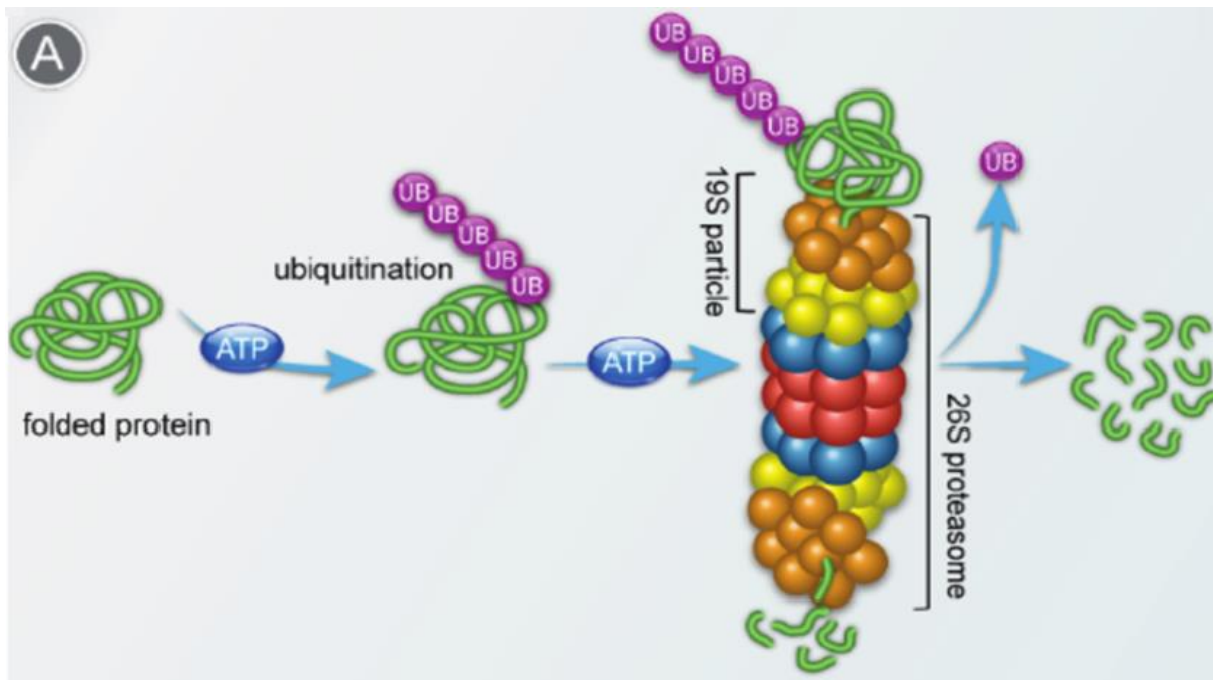


Abbildung 1: Ubiquitin-abhängige Proteindegradation durch das 26S-Proteasom [9].

Ein korrekt gefaltetes Protein wird durch eine Kaskade von Enzymen mit Ubiquitin markiert. Das Protein wird polyubiquitiniert, was es für den Abbau durch das Proteasom kennzeichnet. Dieser Schritt ist ATP-abhängig. Das polyubiquitinierte Protein wird von der 19S-Regulatorkappe des 26S-Proteasoms erkannt und gebunden. Das Protein wird entfaltet, durch den zentralen Kanal des 20S-Kernpartikels transloziert und in kleinere Peptide zerlegt. Ubiquitin wird recycelt.

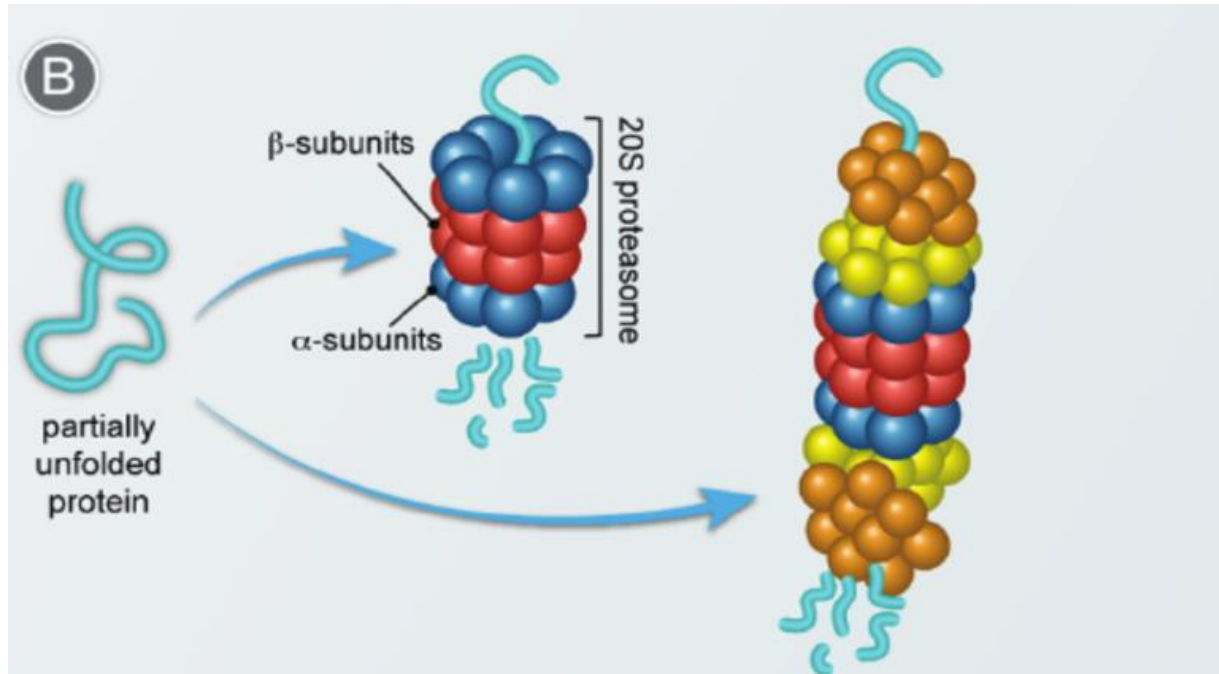


Abbildung 2: Ubiquitin- und ATP-unabhängige Proteindegradation durch das 20S-Proteasom [9].

Ein teilweise entfaltetes Protein wird direkt vom 20S-Proteasom erkannt. Das 20S-Proteasom besteht aus zwei Arten von Untereinheiten: den äußeren α -Untereinheiten und den inneren β -Untereinheiten. Die β -Untereinheiten enthalten die katalytisch aktiven Stellen, die das Protein abbauen. In diesem Weg wird das Protein in das Proteasom transloziert und in kleinere Peptide zerlegt, ohne dass eine vorherige Ubiquitinierung und ATP-Verbrauch notwendig sind.

1.1 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom handelt sich um einen zylinderförmigen Proteinkomplex, der in allen Domänen des Lebens vorkommt, von Eukaryoten über Bakterien bis hin zu Archaeen [10, 11]. In Eukaryoten ist das 20S Proteasom ein Kernbestandteil des größeren 26S Proteasoms, dass für die ATP-abhängige Degradation von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist.

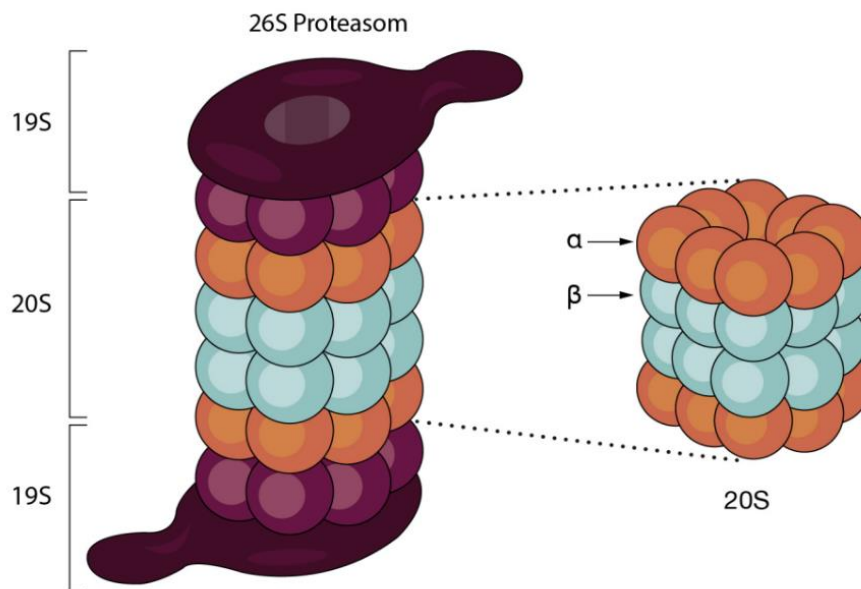


Abbildung 3: Schematische Darstellung 26S Proteasoms und seiner Untereinheiten, das 19S und 20S Proteasom [12].

Das 26S Proteasom ist ein großer Proteinkomplex, der aus einem 20S Kernkomplex und zwei 19S regulatorischen Partikeln besteht, die an beiden Enden des 20S Kerns binden.

Die beiden 19S Proteasomen, auch als 19S Regulator bekannt, sind oben und unten in dunklem Purpur dargestellt. Es besteht aus mehreren Untereinheiten, die eine regulatorische Kappe bilden. Die 19S Partikel sind für das Erkennen und Entfalten von ubiquitinierten Proteinen verantwortlich. Diese Proteine werden dann in das katalytische Zentrum des 20S Proteasoms geleitet.

Das 20S Proteasom hat eine zylinderförmige Struktur und besteht aus vier Ringen, die hier in orange und blau dargestellt sind. Die zwei äußeren Ringe bestehen aus α-Untereinheiten (orange), während die beiden inneren Ringe aus β-Untereinheiten (blau) bestehen. Diese Einheiten sind für das Erkennen und Einspeisen von Proteinen in den 20S Kern verantwortlich.

Abbildung 3 zeigt, wie die 19S Partikel an beide Enden des 20S Proteasoms binden, um das 26S Proteasom zu bilden. Dies bildet einen funktionalen Komplex, der in der Lage ist, ubiquitinierte Proteine zu erkennen, zu entfalten und abzubauen. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass nur spezifisch markierte Proteine, die durch Ubiquitin gekennzeichnet sind, zur Degradation zugelassen werden. Im Gegensatz dazu kann das 20S Proteasom auch unabhängig vom 26S Proteasom agieren und ATP-unabhängig Proteine erkennen und abbauen. 20S Proteasomen findet man in Eukaryoten, in einigen Prokaryoten und in Archaeen. Alle 20S Proteasomen-Komplexe sind strukturell identisch unterscheiden sich aber in der Komplexität der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten.

Um die Funktionalität des Proteasoms besser zu verstehen, ist es essenziell, sowohl die Struktur als auch die spezifischen Rollen der α - und β -Untereinheiten zu betrachten. Diese Unterscheidung erlaubt es, die mechanistischen Abläufe der Substraterkennung und des Proteinabbaus klarer zu definieren.

1.1.1. Struktur des 20S Proteasoms in eukaryotischen Zellen

Das eukaryotische 20S Proteasom besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten, die in einer hochstrukturierten und symmetrischen Anordnung organisiert sind. Es setzt sich aus sieben verschiedenen α -Untereinheiten ($\alpha 1$ bis $\alpha 7$) und sieben verschiedenen β -Untereinheiten ($\beta 1$ bis $\beta 7$) zusammen, wobei jede dieser Untereinheiten zweimal in der Struktur vorkommt.

Die äußeren α -Ringe bilden eine Barriere, die den Zugang zum proteolytischen Kern des Proteasoms reguliert und die Gesamtarchitektur des Komplexes stabilisiert [13, 14]. Die α -Untereinheiten bilden eine halbflexible Torstruktur, die den Eintritt von Substratproteinen kontrolliert. Ihre Hauptfunktion besteht darin, Substratproteine zu binden und sie für den Transport in den inneren Kanal des Proteasoms zu positionieren [15]. Jede α -Untereinheit hat eine N-terminal verlaufende α -Helix, die eine wichtige Rolle bei der Bildung der intersubunitären Kontakte spielt [16]. Diese Kontakte sorgen dafür, dass die sieben α -Untereinheiten fest und korrekt zueinander ausgerichtet bleiben.

Dies ist wichtig, um die strukturelle Integrität des gesamten Proteasom-Komplexes zu gewährleisten [15, 17]. Die C-terminalen Bereiche der α -Untereinheiten sind weniger konserviert und ermöglichen eine gewisse Flexibilität, die notwendig ist, um Substrate unterschiedlicher Größe und Form zu binden [18].

Die β -Untereinheiten, angeordnet in den beiden inneren Ringen, enthalten drei proteolytisch aktive Einheiten ($\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$), die für den gezielten Abbau von Proteinen verantwortlich sind (siehe Abbildung 4). Jede dieser β -Untereinheiten hat eine spezielle Rolle bei der Zersetzung von Proteinen und enthält verschiedene katalytische Stellen [17].

Diese Stellen ermöglichen unterschiedliche Arten von proteolytischen Aktivitäten, die notwendig sind, um verschiedene Proteinstrukturen effektiv abzubauen [19]. Die aktive Stelle jeder β -Untereinheit ist im Inneren des Zylinders positioniert, geschützt durch die Anordnung der α -Ringe [20]. Dies verhindert den unkontrollierten Zugang von Substraten und schützt die Zelle vor unerwünschtem Proteinabbau. Die β -Untereinheiten besitzen Threonin an ihrer N-terminalen Position, das als nukleophiler Katalysator in der Hydrolyse der Peptidbindungen dient [21].

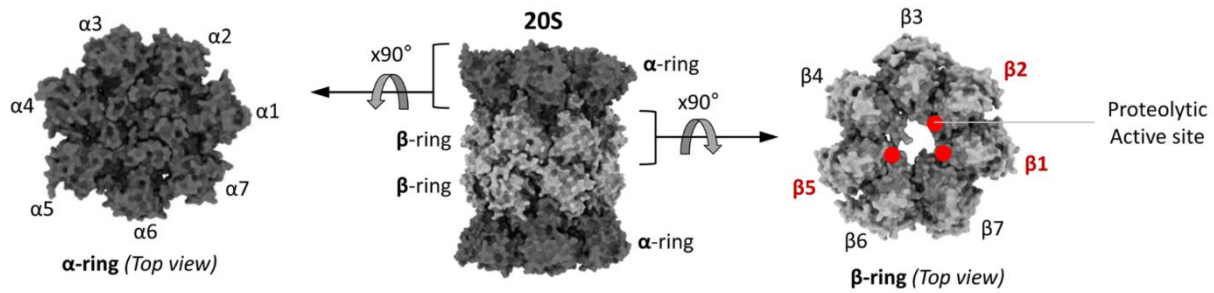


Abbildung 4: Die Seitenansicht des 20S-Kernpartikels zeigt vier übereinander gestapelte Ringe [22].

Die Draufsicht des oberen α -Rings (mit geschlossenem Tor) und des oberen β -Rings zeigt die sieben homologen Untereinheiten in einem inaktiven Proteasom. Die roten Punkte im β -Ring markieren die aktiven Stellen der drei katalytischen Untereinheiten.

1.1.2 Struktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*

Prokaryotische und eukaryotische 20S-Proteasomen weisen eine bemerkenswert ähnliche quartäre Struktur auf [23]. Trotz einiger architektonischer Unterschiede bestehen jedoch erhebliche Unterschiede in der Komplexität der Untereinheitenanordnung zwischen diesen Strukturen.

Thermoplasma acidophilum ist ein extremophiles Archaeon, das bei hohen Temperaturen und niedrigem pH-Wert lebt. Das 20S Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* besteht wie alle anderen 20S Proteasomen aus 28 Untereinheiten, die zu einem vier Ringe umfassenden Zylinder organisiert sind [13]. Diese Ringe sind symmetrisch in zwei identische Hälften unterteilt, die jeweils zwei äußere α -Ringe und zwei innere β -Ringe enthalten. Jeder dieser Ringe besteht aus sieben identischen oder homologen Untereinheiten, was die symmetrische Natur und die strukturelle Stabilität des Komplexes unterstreichen [14].

In Ta20S sind alle Beta-Untereinheiten katalytisch aktiv. Die katalytisch inaktiven α -Untereinheiten und die katalytisch aktiven β -Untereinheiten der Proteasomen zeigen eine bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit (siehe Abbildung 5) [13]. Beide Untereinheiten bestehen aus einer vierlagigen α + β -Struktur, die aus zwei antiparallelen, fünfsträngigen β -Faltblättern aufgebaut ist. Diese β -Faltblätter werden auf der einen Seite von zwei α -Helices und auf der anderen Seite von drei α -Helices flankiert.

In den β -Untereinheiten wird der Stapel aus β -Faltblättern an einem Ende von vier *hairpin loops* bedeckt. Am gegenüberliegenden Ende befindet sich eine Tasche, in der das aktive Zentrum lokalisiert ist. Diese strukturelle Organisation ermöglicht es den β -Untereinheiten, ihre katalytische Funktion effizient auszuführen, während die α -Untereinheiten strukturelle Stabilität und regulatorische Funktionen innerhalb des Proteasomkomplexes bereitstellen.

Um die Struktur und Funktion der α - und β -Untereinheiten des 20S Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* weiter zu verdeutlichen, betrachten wir die untenstehende Abbildung.

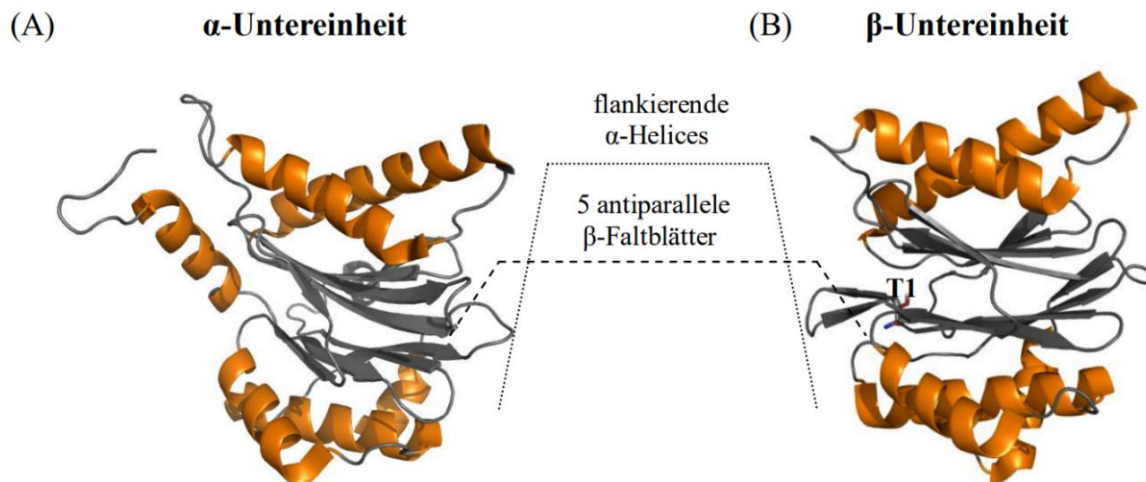


Abbildung 5: Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Ta* [modifiziert [13]

- A) zeigt eine α -Untereinheit, die durch die charakteristischen flankierenden α -Helices und die fünf antiparallelen β -Faltblätter definiert ist. Diese Strukturmerkmale sind wesentlich für die Ausbildung der intersubunitären Kontakte und die regulatorische Torfunktion, die den Zugang zum proteolytischen Kern kontrolliert.
- B) zeigt eine β -Untereinheit, die ebenfalls durch flankierende α -Helices und β -Faltblätter gekennzeichnet ist. Hervorgehoben ist die Position der katalytisch aktiven Threonin-Seitenkette (T1), die eine zentrale Rolle bei der proteolytischen Aktivität der β -Untereinheiten spielt.

1.2 Katalytischer Mechanismus des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom gehört zu der Familie der Ntn (N-terminal nucleophile)-Hydrolasen, einer Klasse von Enzymen, die ihre katalytische Aktivität durch einen nukleophilen Angriff eines N-terminalen Rests ausführen [24]

Die sieben Alpha-Untereinheiten auf jeder Seite des 20S Proteasoms bilden ein zentrales Tor, das auch als α -Annulus bezeichnet wird. Dieses Tor ermöglicht es Substraten, in den Komplex einzutreten. Die Struktur des Tors unterscheidet sich zwischen dem Proteasom von *T. acidophilum* und dem eukaryotischen Proteasom [18, 19]. Im Ta20S ist das Tor konstitutiv geöffnet, während es in eukaryotischen Zellen durch die N-Termini der Alpha-Untereinheiten geschlossen wird [18]. In Eukaryoten wird die Toröffnung durch die Bindung von Substraten an Bindungsstellen auf der Oberfläche der Alpha-Untereinheit induziert [22]. Das Tor führt in eine sogenannte Vorkammer, die sich zwischen den Alpha- und Beta-Ringen befindet.

Die Vorkammer hält Substrate in einem ungefalteten Zustand [25] und führt über den β -Annulus in die zentrale katalytische Kammer des Komplexes. Die katalytische Kammer ist der Ort des Proteinabbaus und enthält die aktiven Stellen der Beta-Untereinheiten. Im Ta20S sind alle Beta-Untereinheiten katalytisch aktiv, während in Eukaryoten nur drei der Untereinheiten aktiv sind [26].

Dies führt zu insgesamt 14 aktiven Stellen im Ta20S und sechs in der eukaryotischen katalytischen Kammer. Alle Ta20S enthalten Propeptide nach ihrer Translation, die während der Assemblierung des 20S-Proteasom-Komplexes autokatalytisch abgespalten werden [27].

Nachdem das ungefaltete Substrat über den β -Annulus in die katalytische Kammer des Proteasoms gelangt ist, beginnt der Proteinabbau. Die aktive Stelle wird durch das N-terminale Threonin (β T1) der Beta-Untereinheiten gebildet [27]. Das Proteasom ist inaktiv, bis das Propeptid abgespalten wird. Diese Abspaltung setzt die Aminogruppe des Threonins frei, die für seine katalytische Aktivität notwendig ist [28]. Diese Verarbeitung verhindert eine wahllose Degradation von zellulären Proteinen, da das Proteasom nicht direkt nach der Translation der Untereinheiten katalytisch aktiv ist.

Die proteolytische Spaltung von Substraten durch das verarbeitete aktive β T1 erfolgt durch einen nukleophilen Angriff auf die C-N-Bindung des Substrat-Rückgrats. Dieser Prozess beginnt, nachdem der Sauerstoff der Seitenkette von β T1 ein Proton an die freie Aminogruppe von β T1 abgegeben hat und somit ein freies Elektron hält. Die Spaltung des Substrats und die Regeneration der β T1-Seitenkette erfolgen dann über einen Übergangszustand. Dieser Prozess wird autokatalytisch prozessiert [27]. Im ersten Schritt der Autokatalyse erfolgt ein nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe des Threonins auf das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin. Dies führt zur Bildung eines tetraedrischen Übergangszustands. In diesem Übergangszustand wird das Substrat an die aktive Stelle des Enzyms gebunden. Die Bildung dieses Übergangszustands ist entscheidend für die Spaltung der Peptidbindung [29].

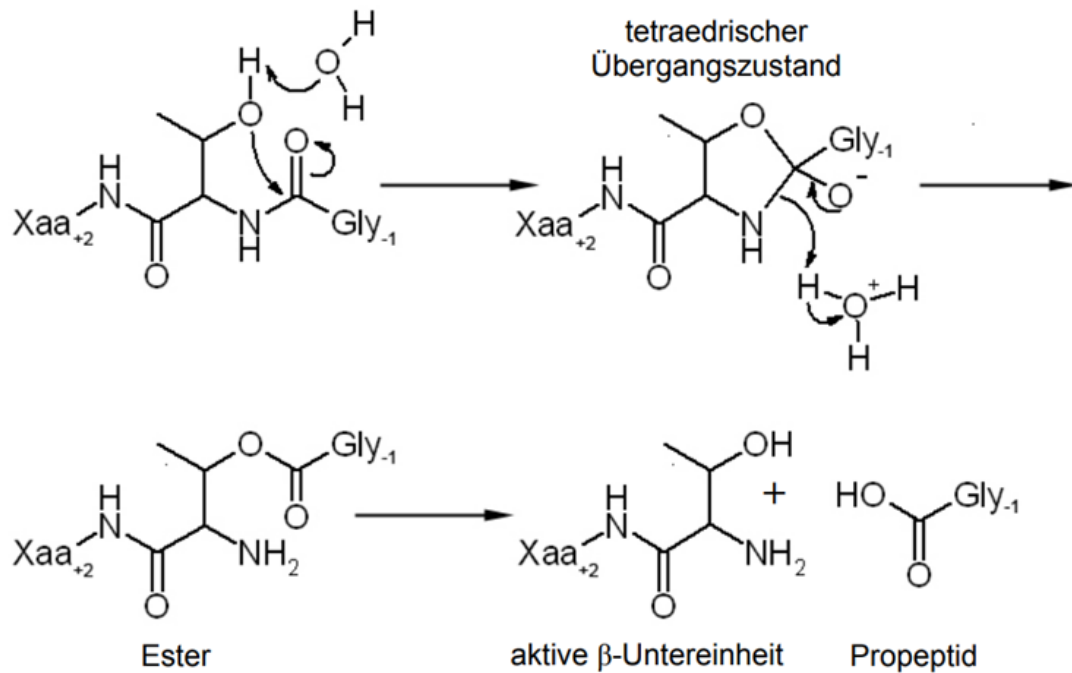


Abbildung 6: Mechanismus der autokatalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven β -Untereinheit des 20S Proteasoms [30].

Durch nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Hydroxygruppe des Threonin 1 am Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand. Dieser reagiert durch Spaltung der C-N-Bindung zum Ester weiter, der wiederum durch Hydrolyse gespalten wird.

Nach der Bildung des tetraedrischen Übergangszustands erfolgt der Kollaps des Übergangszustands, was zur Spaltung der Peptidbindung und Freisetzung des ersten Produktfragments führt [31]. Dabei wird ein Acyl-Enzym-Intermediat gebildet, in dem das Substrat kovalent an die Threoninhydroxylgruppe gebunden bleibt. Dieses Intermediat ist ein entscheidender Schritt im Proteolyseprozess, da es die effektive Spaltung des Substrats ermöglicht [27].

Im nächsten Schritt des katalytischen Zyklus wird wahrscheinlich ein Wassermolekül in die aktive Stelle rekrutiert und deprotoniert, wodurch ein weiteres nukleophiles Hydroxidion entsteht. Dieses Hydroxidion greift dann das Acyl-Enzym-Intermediat an, was zur Freisetzung des zweiten Produktfragments und zur Wiederherstellung der freien Threoninhydroxylgruppe führt. Damit ist der katalytische Zyklus abgeschlossen, und das Enzym ist bereit, ein neues Substratmolekül zu binden und zu hydrolysieren [32, 33].

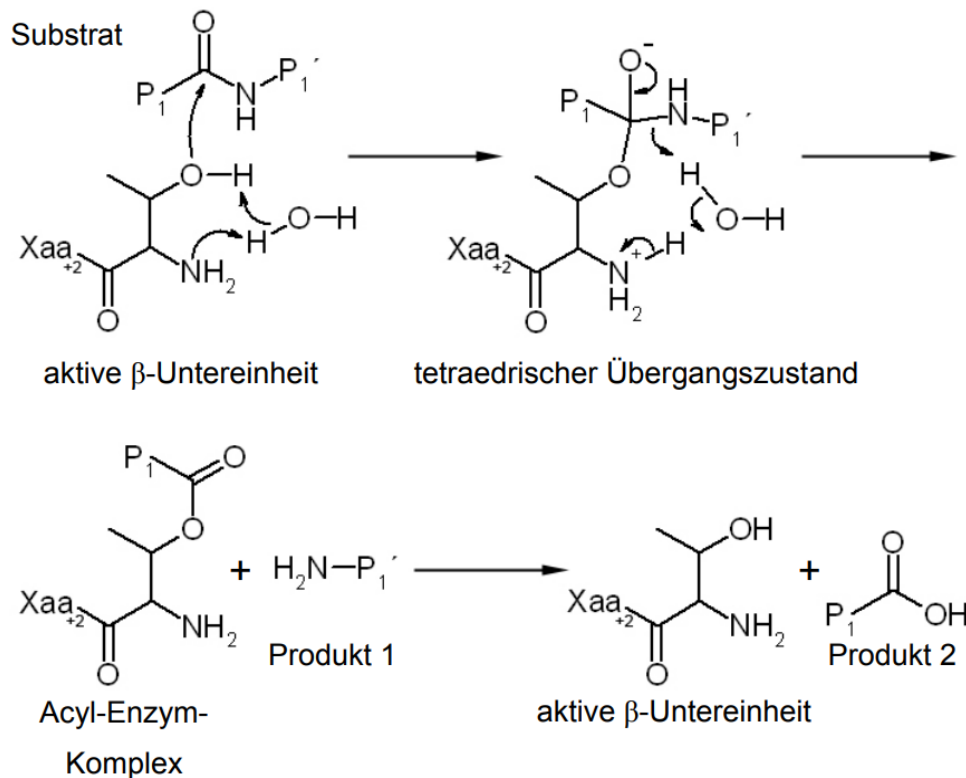


Abbildung 7: Katalytischer Mechanismus der Proteolyse durch das 20S Proteasom [30].

Durch Protonenübertragung von der Hydroxygruppe des Threonin 1 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms auf dessen Aminogruppe wird der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung des Substrats initiiert. Das sich bildende tetraedrische Intermediat wird durch Spaltung der C-N-Bindung in einen Acyl-Enzym-Komplex umgewandelt, wobei die Aminokomponente des Produkts freigesetzt wird. Die Carboxykomponente sowie die aktive β -Untereinheit entstehen aus diesem Komplex durch Esterhydrolyse.

1.3 Translokation von Substraten

Nachdem die enzymatischen Mechanismen des 20S-Proteasoms ausführlich beschrieben wurden, ist es nun wichtig, die Erkennung und Translokation von Substraten in den proteolytischen Kern zu betrachten. Obwohl die Substrattranslokation eine zentrale Rolle in der Funktion des Proteasoms spielt, ist sie weniger erforscht als die enzymatischen Aktivitäten [7].

Bei *Thermoplasma acidophilum* wird das 20S-Proteasom oft mit einem einfacheren ATPase-Komplex, bekannt als PAN (Proteasome-Activating Nucleotidase), assoziiert [34, 35]. PAN ist funktionell dem 19S-Regulationspartikel in eukaryotischen Zellen ähnlich, jedoch strukturell einfacher und spezifisch für Archäen [36]. PAN besteht aus einem Hexamer, das sich an das 20S-Proteasom bindet und ATP hydrolysiert [37]. Diese ATP-Hydrolyse führt zu konformationellen Änderungen in PAN, die an das 20S-Proteasom übertragen werden und die Toröffnung induzieren. Der Prozess der Substrattranslokation beginnt mit der Bindung des Substrats an PAN. PAN erkennt Proteine direkt und bindet sie an eine spezielle

Erkennungsstelle. Diese Bindung initiiert die Hydrolyse von ATP, was konformationelle Änderungen in PAN induziert. Im geöffneten Zustand können die gebundenen Proteine in die proteolytische Kammer des 20S-Proteasoms transloziert werden, wo sie abgebaut werden [38].

Das TA20S-Proteasom besitzt eine offene Pore, die es ihm ermöglicht, Substrate auch in Abwesenheit von PAN abzubauen. Dies bedeutet, dass Substrate, die mit dem TA20S-Proteasom inkubiert werden, auch ohne PAN effektiv degradiert werden können. Es scheint, dass PAN eine zusätzliche Öffnung der Pore im TA20S bewirkt, ähnlich der Öffnung, die durch die 19S-Regulatoren im eukaryotischen Proteasom ausgelöst wird, jedoch ist die genaue Rolle von PAN im TA20S-Prozess noch nicht vollständig geklärt.

Die Tatsache, dass das TA20S-Proteasom ohne PAN funktionsfähig ist und Proteine abbauen kann, hebt es von den eukaryotischen Systemen ab, wo die Proteasom-Funktion eng mit der Aktivität der regulatorischen Partikel und der ATP-Hydrolyse verknüpft ist. Das 20S-Proteasom von *T. acidophilum* ist ATP-unabhängig, während PAN ATP-abhängig ist. Diese Unabhängigkeit vom ATP für das 20S-Proteasom deutet darauf hin, dass die energetischen Anforderungen für die Proteolyse bei TA20S wesentlich geringer sind als bei den eukaryotischen Proteasomen, die eine ATP-abhängige Öffnung der Pore durch die 19S-Kappen erfordern.

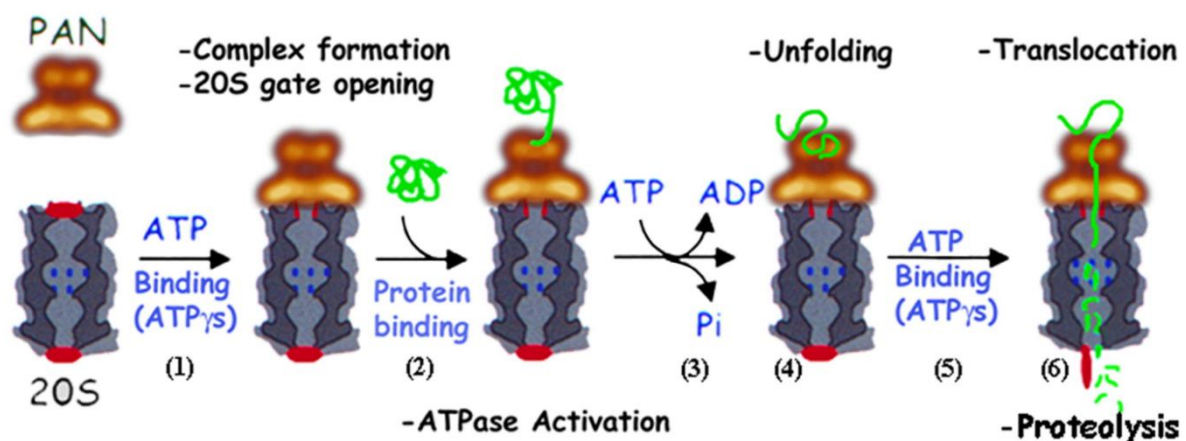


Abbildung 8: Modell zur Funktionsweise des PAN / 20S Komplexes (Querschnitt) [39]

Die gatebildenden Reste der N-Termini der α-Untereinheiten sind in Rot markiert. (1) Die ATP-Bindung an PAN fördert dessen Assoziation mit dem 20S und bewirkt die Öffnung seines Tors. (2) Proteine binden bevorzugt an PAN in seiner ATP-gebundenen Form [34] (3) Diese Bindung stimuliert die ATP-Hydrolyse. (4) Das Entfalten des Substrats ist der einzige Schritt in diesem Weg, der die Hydrolyse von ATP erfordert. (5) In seinem ATP-gebundenen Zustand unterstützt PAN die erleichterte Diffusion des entfalteten Proteins. (6) Die ATP-Bindung ohne Hydrolyse kann die Komplexbildung, die Toröffnung und die Translokation von entfaltenen Proteinen unterstützen.

Im Vergleich dazu erfordert das eukaryotische Proteasom eine komplexere Struktur und Mechanik zur Substrattranslokation. In eukaryotischen Zellen besteht das 26S-Proteasom aus einem 20S-Kernpartikel, das mit dem 19S-Regulationspartikel assoziiert ist. Das 19S-Regulationspartikel enthält mehrere ATPasen, die ATP hydrolysieren, um die Energie für die Substratentfaltung und -translokation zu liefern [40, 41]. Der 19S-Komplex erkennt ubiquitinierte Substrate, entfaltet sie und transloziert sie in den 20S-Kern, wo die Proteolyse stattfindet.

Die ATPasen des 19S-Regulationspartikels sind entscheidend für diese Prozesse, da sie die notwendige Energie für die Entfaltung und Translokation der Substrate durch ATP-Hydrolyse liefern. Diese energieintensive Mechanik stellt sicher, dass nur korrekt markierte Proteine, die durch Ubiquitinketten gekennzeichnet sind, abgebaut werden. Im Gegensatz dazu arbeitet das 20S-Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* ohne die Notwendigkeit von Ubiquitinierung [37].

Durch gezielte Mutagenese können spezifische Aminosäuren in den katalytischen und regulatorischen Domänen des Proteasoms verändert werden, um deren Rolle bei der Substratbindung, -erkennung und -translokation zu untersuchen [42].

1.4 *Thermoplasma acidophilum* 20S Modell

Aufgrund der Komplexität der Proteasom-Zusammensetzung bei Eukaryoten sind Klonexperimente sehr zeitaufwändig und kompliziert. Für Mutationsexperimente, die das gesamte Proteasom betreffen, müssen die entsprechenden Reste in jeder der sieben Untereinheiten identifiziert und mutiert werden. Eine Expression in eukaryotischen Zellen ist weniger effizient und teurer als in *E.coli*.

Das häufig verwendete Modellproteasom vom *Thermoplasma acidophilum*. Ta20S vermeidet einige der genannten Probleme und ist strukturell eng mit dem eukaryotischen Proteasom verwandt. Ta20S besteht aus nur zwei Untereinheitentypen, Alpha und Beta, was die Klonexperimente vereinfacht, da eine Mutation alle 14 Untereinheiten desselben Typs betrifft. Das Modellproteasom kann in *E.coli* exprimiert und mit einem His-Tag versehen werden, ohne die Proteasomstruktur zu verändern.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Einblicke in den Mechanismus der Substrattranslokation des 20S-Proteasoms zu gewinnen, indem das Modellproteasom aus *Thermoplasma acidophilum* verwendet wird. Im Rahmen dieses Projekts wurden spezifische Mutanten des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* (Ta20S) entwickelt, in *Escherichia coli* BL21(DE3) exprimiert und der Erfolg der Proteinexpression mittels SDS-PAGE analysiert. Das übergeordnete Ziel bestand darin, zu evaluieren, ob die anschließende Expression der Mutantenproteine in *E. coli* erfolgreich war.

Der Prozess der Mutagenese, Klonierung von Mutanten, Transformation und Proteinexpression des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* wird im Folgenden kurz zusammengefasst. Mittels PCR wurden spezifische Mutationen in das Gen, das für das 20S-Proteasom kodiert, eingeführt. Mutageneseprimer wurden entwickelt, um die gewünschten Mutationen einzubauen, und die resultierenden PCR-Produkte wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert, um sicherzustellen, dass die korrekten Mutationen eingeführt wurden. Die mutierten Gene wurden dann in den pRSF-Vektor kloniert, ein Plasmid, das für eine Hochspiegelexpression in *E. coli* ausgelegt ist. Dieser Vektor enthält einen Replikationsursprung, ein Selektionsmarker (Kanamycin) und eine multiple Klonierungsstelle für die Insertion des interessierenden Gens. Die klonierten Plasmide wurden dann in *E. coli* Top10 kompetente Zellen transformiert, um die Vermehrung und Plasmidreinigung durchzuführen. Nach der Klonierung wurden die rekombinanten Plasmide, die die mutierten T20S-Gene enthielten, in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Um festzustellen, ob die Proteinexpression erfolgreich war, wurde SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse zeigten, ob die Klonierungs- und Expressionsschritte erfolgreich waren.

Dieses Experiment legte das Fundament für eine weiterführende Untersuchung von Konstantin Altfrohne, die sich eingehend mit der Proteinreinigung sowie der enzymatischen Aktivität des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* auseinandersetzte. Diese nachfolgende Studie nutzte die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, um die Mechanismen der Substrattranslokation detaillierter zu analysieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 DNA

Die DNA-Sequenzen, Plasmide und Primer, die für die Klonierung verwendet wurden, sind unten aufgeführt. Die vollständigen DNA-Sequenzen sind im Abschnitt 6 zu finden.

2.1.1.1 DNA-Strangs und Plasmide

Das Plasmid pRSF::Ta20S, diente der Expression des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* in *E. coli*. Dieses Plasmid wurde von Yu et al. (2020) über Addgene [43] erworben. (siehe Abbildung 9)

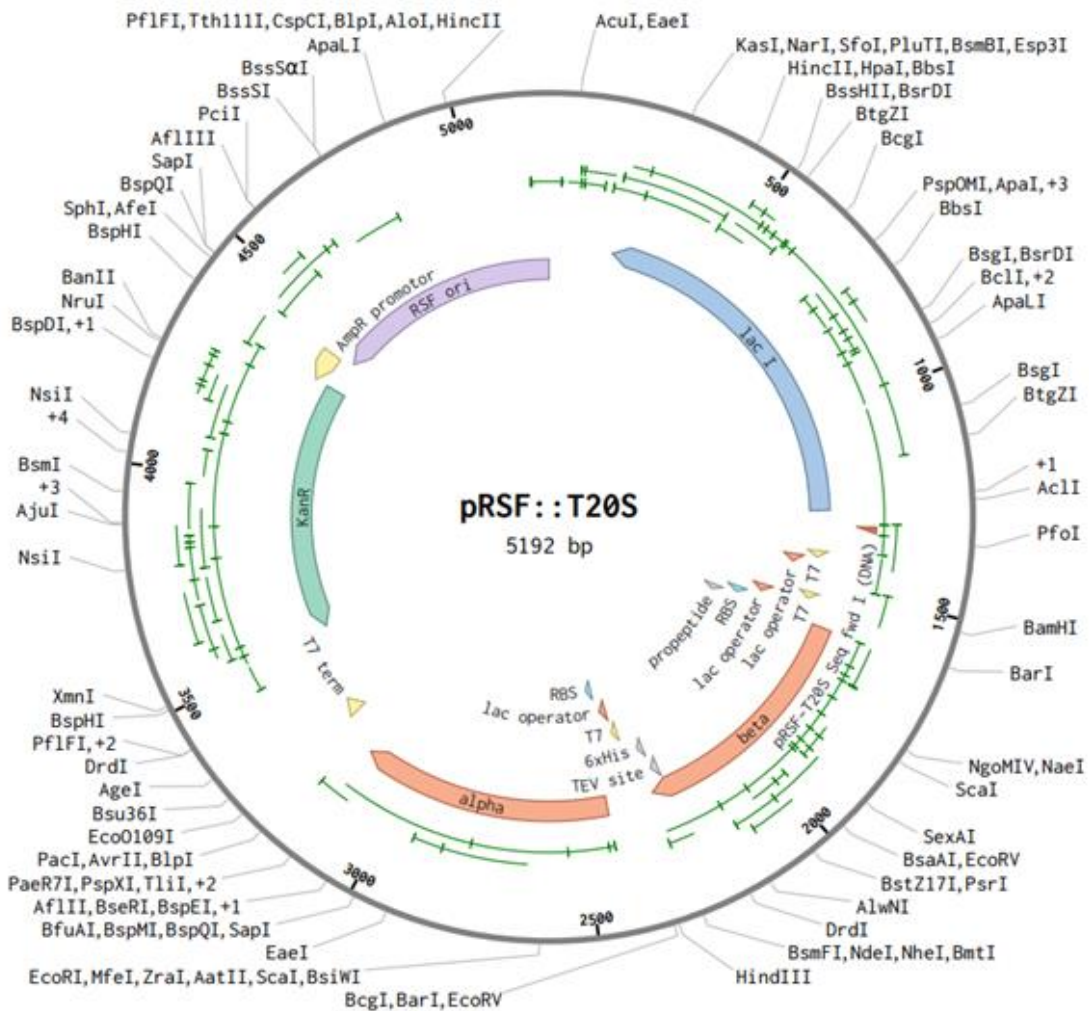


Abbildung 9: pRSF::Ta20S Plasmid Mappe (selbst erstellt von Benchling Webversion 05.2024)

pRSF-Vektor mit Ta20S-Insert, das eine Ribosomen-Bindungsstelle (RBS I), den T7-Promotor (I), das Ta20S-Beta-Untereinheiten-CDS mit 3'-TEV-Seite und 6xHis-Tag, RBS (II), T7-Promotor (II), Ta20S-Alpha-Untereinheiten-CDS und T7-Terminator enthält.

Im Kern des Plasmids befindet sich das effiziente T7-Expressionssystem, das die Transkription des eingefügten Gens durch die T7-RNA-Polymerase ermöglicht. Dieses System erfordert die Verwendung eines Wirtsstammes, der mit dem T7-System kompatibel ist. In diesem Fall wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) gewählt. BL21(DE3) enthält die T7-RNA-Polymerase-Sequenz in seiner genomischen DNA, was eine gezielte Expression des eingeführten Plasmids unter der Kontrolle des T7-Promotors ermöglicht.

Das pRSF::T20S-Plasmid enthält mehrere strategisch platzierte funktionelle Elemente, die für eine effektive Proteinexpression erforderlich sind. Ein wichtiges Element ist das *lacI*-Gen, das für den *lac*-Repressor kodiert. In Abwesenheit von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) bindet der *lac*-Repressor an den *lac*-Operator und unterdrückt so die vorzeitige Expression des rekombinanten Proteins. Dieser Mechanismus ermöglicht eine kontrollierte Induktion der Proteinexpression, indem IPTG hinzugefügt wird, um den Repressor zu deaktivieren und die Transkription zu initiieren.

Zusätzlich enthält das Plasmid ein Kanamycin-Resistenzgen. Dieses Gen verleiht den transformierten Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin, was die Selektion kanamycinresistenter Klone nach der Transformation erleichtert. Dies stellt sicher, dass nur die Bakterien, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben, in der Gegenwart von Kanamycin überleben und wachsen können.

Im Hinblick auf die spezifische Expression des Proteasoms beinhaltet das Plasmid zwei separate Expressionskassetten für die Alpha- und Beta-Untereinheiten des Ta20S-Proteasoms. Jede Kasette beginnt mit einer Ribosomen-Bindungsstelle (RBS I), die für eine effiziente Translation der mRNA in das Protein sorgt. Direkt nach der RBS I folgt ein T7-Promotor. Der Codierungssequenzbereich (CDS) für die jeweilige Untereinheit des Proteasoms folgt unmittelbar auf den Promotor. Dieser Bereich enthält die genetische Information für die Alpha- oder Beta-Untereinheit des Ta20S-Proteasoms, abhängig von der jeweiligen Kasette. Am Ende des CDS sind spezielle Sequenzen eingefügt, die zusätzliche Funktionalitäten ermöglichen. Dazu gehört die 3'-TEV-Site, eine Erkennungsstelle für die Tabak-Etch-Virus (TEV) Protease. Diese Stelle ermöglicht die gezielte Proteolyse. Ein weiteres wichtiges Element ist der 6xHis-Tag, der an den C-Terminus der Proteasom-Untereinheiten angefügt ist. Dieser His-Tag besteht aus sechs Histidinresten und erleichtert die Reinigung der exprimierten Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Abschließend sorgt der T7-Terminator für das Ende der Transkription.

2.1.1.2 Primers

Alle Primer wurden von Microsynth synthetisiert oder aus der Standardprimerliste von Microsynth entnommen. Die Primer wurden in H₂O auf eine Konzentration von 100 µM gelöst. Diese Stammlösung wurde vor der Verwendung auf 10 µM verdünnt.

Tabelle 1: Primer

Primer	Schmelztemperatur	Sequenz 5'-3'
Amplification Ta20S fwd	64,8 °C	5'-GAA CGT GGA TCC GTT GAT CTG CAAATT ATT GTT GCC-3'
Amplification Ta20S rev	65,3 °C	5'-TTC ACG CAA GCT TCC GAAAAA GAT CGG ATA ATT GAG C-3'
Sequencing fwd T7	64,2 °C	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
Sequencing rev T7term	68,3 °C	5'-TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG-3'
pRSF-Ta20S Seq fwd	65,6 °C	5'-CCG CGAAAG GTT TTG CG-3'
pRSF-Ta20S S95A fwd	80,2 °C	5'-CTT GTG GAC TTT GCC AGG ATA GCC GCC CAG CAG G-3'
pRSF-Ta20S S95A rev	80,2 °C	5'-CCT GCT GGG CGG CTA TCC TGG CAAAGT CCA CAA G-3'
pRSF-Ta20S Q98A fwd	79,9 °C	5'-CCA GGA TAA GCG CCC AGG CGG AAAAGG TAA CGT ACG-3'
pRSF-Ta20S Q98A rev	79,9 °C	5'-CGT ACG TTA CCT TTT CCG CCT GGG CGC TTA TCC TGG-3'

Primer	Schmelztemperatur	Sequenz 5'-3'
pRSF-Ta20S R57A fwd	76,0 °C	5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCG CAC TTA TTG AGC AGAATT C-3'
pRSF-Ta20S R57A rev	76,0 °C	5'-GAA TTC TGC TCAATA AGT GCG CTT CTT ACC TTC TTA TCG G-3'
pRSF-Ta20S L58A fwd	76,0 °C	5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCA GAG CTA TTG AGC AGAATT C-3'
pRSF-Ta20S L58A rev	76,0 °C	5'-GAA TTC TGC TCAATA GCT CTG CTT CTT ACC TTC TTA TCG G-3'
pRSF-Ta20S R115K fwd	75,0 °C	5'-CGC TTG TAAATA TTG AGAATC TAG TTA AGA AAG TTG CTG ACC AG-3'
pRSF-Ta20S R115K rev	75,0 °C	5'-CTG GTC AGC AAC TTT CTT AAC TAG ATT CTC AAT ATT TAC AAG CG-3'
pRSF-Ta20S Y180A fwd	81,1 °C	5'-GCT TCC TTG AGC GCG AAG CCAAGG AAAACC TGC CCG-3'
pRSF-Ta20S Y180A rev	81,1 °C	5'-CGG GCA GGT TTT CCT TGG CTT CGC GCT CAA GGAAGC-3'
pRSF-Ta20S E182A fwd	77,8 °C	5'-GAG CGC GAA TAC AAG GCA AAC CTG CCC GAG AAG-3'
pRSF-Ta20S E182A rev	77,8 °C	5'-CTT CTC GGG CAG GTT TGC CTT GTA TTC GCG CTC-3'

Primer	Schmelztemperatur	Sequenz 5'-3'
pRSF-Ta20S R70A fwd	81,5 °C	5'-GCT TGA ACT TTA CAG GCT CCA GGC AAG AGT AAA CAT GCC AAT AGA GGC-3'
pRSF-Ta20S R70A rev	81,5 °C	5'-GCC TCT ATT GGC ATG TTT ACT CTT GCC TGG AGC CTG TAA AGT TCA AGC-3'
pRSF-Ta20S R71A fwd	78,7 °C	5'-CTT GAA CTT TAC AGG CTC CAG AGA GCA 31 GTAAAC ATG CCAATA GAG-3'
pRSF-Ta20S R71A rev	78,7 °C	5'-CTC TAT TGG CAT GTT TAC TGC TCT CTG GAG CCT GTA AAG TTC AAG-3'

2.1.2 Enzymen

Tabelle 2: Enzymen

Enzyme	Hersteller
Phusion HF Polymerase 2000 U/ml	New England Biolabs
DpnI 20.000 U/ml	New England Biolabs
DNAseI 5029,2 U/ml	Panreac Applichem
Lysozym	Roth
TEV protease	Im Haus vorhanden

2.1.3 Bakterienstämme and Medien

Tabelle 3: Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotype	Hersteller
Top10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
XL10 Gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZ Δ M15 Tn10(TetR Amy CmR)]	Stratagene/Agilent
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)	Merck/Novagen

2.1.3.1 Medien

Tabelle 4: Medien verwendet

Media	Komponente	Menge
LB (Luria/Miller) pH 7,0 (\pm 0,2)	Trypton	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
LB-Agar	Agar agar	1,5% (w/v)
	LB (Luria/Miller)	98,5% (w/v)

Nach Abkühlung des autoklavierten bzw. in der Mikrowelle geschmolzenen Agars auf ca. 50 °C wurde die Selektionsmarker zugesetzt und der Agar in Petrischalen gegossen.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Herstellung aller Pufferlösungen erfolgte gemäß den unten aufgeführten detaillierten Anweisungen. Nach der Herstellung wurden die Lösungen gründlich filtriert, um Reinheit und Konsistenz zu gewährleisten.

Tabelle 5: Puffer

Puffer	Komponente	Menge
TAE-Puffer	Tris Basis	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
DNA Elutionspuffer	Tris/HCl pH 8.5	5 mM
TFB I Puffer	Rubidiumchlorid	100 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Glycerol	15% (v/v)
TFB II Puffer (pH 7,0)	Calciumchlorid	75 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	MOPS	10 mM
	Glycerol	15% (v/v)
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycinsulfat	50 mg/ml
IPTG-Stammlösung	IPTG	1 M

Puffer	Komponente	Menge
APS-Stammlösung	APS	10% (w/v)
SDS-Stammlösung	SDS	10% (w/v)
SDS-Laufpuffer (engl. <i>running buffer</i>)	Glycin	190 mM
	Tris Basis	25 mM
	SDS	0,1% (w/v)
Coomassie Färbelösung (engl. <i>staining buffer</i>)	EtOH	25% (v/v)
	Essigsäure	8% (v/v)
	BBR250	0,1% (w/v)
Coomassie Entfärbelösung (engl. <i>destaining buffer</i>)	EtOH	25% (v/v)
	Essigsäure	8% (v/v)
SDS-PAGE Trenngel (engl. <i>resolving gel solution</i>)	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
SDS-PAGE Sammelgel (engl. <i>stacking gel solution</i>)	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
TBS-T	Tris/HCl	10 mM
	NaCl	15 mM
	Tween20	0,1% (v/v)
Blotting Transferpuffer	Glycin	25 mM
	Tris Basis	20% (v/v)
	MeOH	190 mM

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien verwendet

Chemical	Abkürzung/Formel	Hersteller
2-Hydroxy-3-morpholinopropan-sulfonsäure	MOPS	PanReac AppliChem
7-Amino-4-methylcumarin	AMC	Merck
Essigsäure	CH ₃ COOH	Chemsolute
Acrylamid	CH ₂ =CHC(O)NH ₂	Roth
Agarose	-	Roth
Ammoniumpersulfat	APS	Roth
Coomassie Brilliant Blue R 250	BBR250	Roth
Calciumchlorid	CaCl	Roth
Dinatriumphosphat	Na ₂ HPO ₄	Chemsolute
Ethanol	EtOH	Chemsolute
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Chemsolute
Glukose	D(+)-Glucose	Roth
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	Roth
Glycin	-	Roth
Salzsäure	HCl	Chemsolute
Imidazol	C ₃ N ₂ H ₄	Roth
Isopropanol	Isopropyl alcohol	Chemsolute

Chemical	Abkürzung/Formel	Hersteller
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth
Kanamycinsulfat	Kan	Roth
LB-Pulver	LB	Roth
Mangan(II)-chlorid	MnCl ₂	Chemsolute
Methanol	MeOH	Chemsolute
Milchpulver	-	Roth
Mononatriumphosphat	NaH ₂ PO ₄	Chemsolute
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	NiSO ₄	Roth
Kaliumacetat	CH ₃ COOH	Chemsolute
Rubidiumchlorid	RbCl	Acros Organics
Natriumchlorid	NaCl	Chemsolute
Natriumdodecylsulfat	SDS	Roth
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris Basis	Roth
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	PanReac AppliChem
Wasser	H ₂ O	-

2.1.6 Kits

Tabelle 7: Kits

Kit	Beschreibung	Hersteller
10x CutSmart Puffer	Puffer verwendet für Restriktionsverdau	New England Biolabs
10x HF GC Puffer	Puffer verwendet für Quikchange PCR	New England Biolabs
BCA-Protein Assay Kit	Verwendet für die Proteinquantifizierung	Thermofisher
Clarity Western ECL-Substrat	Kit zur Detektion von HRP-markierten Antikörpern	Bio-Rad
DNA Ladder	Quickload Purple 1kb plus DNA ladder	New England Biolabs
DNA Ligation Kit	Ligation Mighty Mix	TaKaRa
DNA Loading Dye	Gel LD Purple 6x	New England Biolabs
dNTPs	-	New England Biolabs
Nucleospin Gel und PCR Cleanup Kit	Verwendet für die DNA-Isolation	Machery Nagel
Plasmid DNA Reinigungskit	MiniPrep	Machery Nagel
Protease- Inhibitor- Cocktail	Verwendet bei der Zellyse	Roche

Kit	Beschreibung	Hersteller
Protein-Ladepuffer	-	New England Biolabs
Proteinstandard	-	New England Biolabs
Stainfree gel Kit 12%	Verwendet für die Probenanalyse	Bio-Rad

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Beschreibung	Hersteller
Becherglas	10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml	VWR
Blotting-Membranen	NC 0,45 µm	Amersham/cytiva
Blotting-Papier	Whatman	Amersham/cytiva
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin20	Sartorius
Kulturflaschen	250 ml	Duran
Küvetten	Rotilabo single-use-cells PS	Roth
Messzylinder	20 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	VWR
Filtertücher	P4 Grade	Fisher Scientific
Filter für die Pufferfiltration	Celluloseacetate 0,22 µm	Labsolute

Verbrauchsmaterialien	Beschreibung	Hersteller
Filterspritzen	0,45 µm	Labsolute
Flüssigstickstoff	-	-
Kolben	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	VWR
Parafilm	-	Bemis
Petrischalen	94x16 mm	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	1000 µl, 200 µl, 10 µl	Sarstedt
Pipetten	1000 µl 100 µl multichannel 200 µl, 100 µl, 50 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl	Eppendorf Eppendorf Gilson
Reaktionsgefäße	0,2ml, 1,5ml, 15ml, 50ml	Sarstedt
Spritzen	Luer-Lak Tip	BD

2.1.8 Geräte

Tabelle 9: Geräte verwendet

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Agarose-Gelkammer	700-0741	VWR
Akkubetriebene Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Akkubetriebene Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann
Autoklav	VX-150	Systemec
Blotting-Gerät	Trans-Blot-Turbo	Bio-Rad
Falcon-Zentrifuge	5920R	Eppendorf
Filtrationseinheiten für Puffer	-	Nalgene
Flockeneisautomat	AF156	Scotsman
Gel-Schüttler	WT12	Biometra
Hochdruckhomogenisator	LM10	Microfluidizer
Imager	ChemiDoc MP	Bio-Rad
Inkubator	-	Binder
Kühlschrank	MediLine	Liebherr
Magnetrührer	RH basic	IKA
Mikrowelle	inverter	Sharp
MilliQ-Anlage	Q-Pod	Merck
PCR-Thermocycler	Mastercycler X50a	Eppendorf
pH-Meter	Five easy plus	Mettler-Toledo

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Präzisionswaage	A200S	Sartorius
Rollenmischer	rollermixer SRT6D	Stuart
SDS-PAGE-Ausrüstung	Glassplatten, engl. <i>spacer</i> , engl. <i>wells</i> (8, 10, 12, 15)	Invitrogen
SDS-PAGE-Gelkammer	Minizell	Invitrogen
Schüttler für Hauptkulturen	InnovaS44i	Eppendorf
Schüttler für Vorkulturen	Innova40	New Brunswick
Schüttelinkubator	Trayster	IKA
Stromversorgungseinheit	Basic	Bio-Rad
Thermoblock	Thermomixer c	Eppendorf
Tiefkühler	CryoCubeF101h -80 °C, -20 °C	Eppendorf
Vakuumpumpe	CVC 3000	Vacuumbrand
Vortexer	Vortexgenie2	Scientific Industries
Waage	SQP-E	Sartorius
Zentrifuge	MiniStar (I)	VWR
	5425 (II)	Eppendorf
	5430R (III)	Eppendorf

Geräte	Beschreibung	Hersteller
Zentrifuge (Kont.)	5920R (IV)	Eppendorf
	AvantiJXN-26 (V)	Beckman
	Optima XPN-90 (VI)	Beckman
Zentrifugenrotoren	FA 24x2 (für II)	Eppendorf
	F-35-6-30 (für III)	Eppendorf
	S-4x1000 (für IV)	Eppendorf
	JA 25.50 (für V)	Beckman
	JLA 8.1000 (für V)	Beckman
	45Ti (für VI)	Beckman

2.1.9 Software

Tabelle 10: Software verwendet

Software	Version	Firma
MS Office	2309	Microsoft
PyMOL	4.4.0	Schrödinger
Benchling	Webversion (05.2024)	Benchling Inc.
Quikchange primer design	20.11.2023	Agilent

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Um intra- und intermolekulare Interaktionsstellen der 20S-Proteasom-Untereinheiten zu identifizieren, wurden die Kristallstrukturen von *T. acidophilum* (PDB-Struktur 1PMA) mit PyMOL analysiert. Dabei wurden mögliche ionische Bindungen und Wasserstoffbrücken durch eine eingehende Analyse der Seitenketten der Aminosäurereste untersucht (siehe Abschnitt 3). Diese strukturellen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die gezielte Erzeugung spezifischer Mutanten.

2.2.1.1 QuikChange™ Mutagenese

Die Erzeugung spezifischer Mutanten des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* für die Alpha- (S95A, Q98A, R57A, L58A, R115K, Y180A, E182A) und Beta-Untereinheiten (Q69A, R70A, R71A) wurde mittels der QuikChange™-Mutagenese realisiert. Dieses Verfahren, das erstmalig von Cormack im Jahr 1994 beschrieben wurde, nutzt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um gezielt Punktmutationen in die DNA einzuführen. Hierbei wurden speziell angefertigte Primer verwendet, die an der gewünschten Stelle der Plasmid-DNA eine Mutation einführen.

Für jede zu erzeugende Mutante wurde ein Primerpaar konstruiert. Beide Primer enthalten die gewünschte Mutation und sind reverse komplementär zueinander. Die Primer wurden so designt, dass der Mutationsort zentriert ist und die Primer eine Länge von 25 bis 45 Basen aufweisen. Diese Kriterien gewährleisten eine hohe Spezifität und eine Schmelztemperatur von mindestens 78 °C, um eine effiziente Hybridisierung zu ermöglichen.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte nach Gleichung 1.

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\%GC) - \left(\frac{675}{N}\right) - (\%mismatch)$$

[1]

Die Schmelztemperatur (T_m) gibt an, bei welcher Temperatur die Doppelstrang-DNA in zwei einzelsträngige DNA-Moleküle aufgetrennt wird. Der %GC-Gehalt bezieht sich auf den prozentualen Anteil von Guanin (G) und Cytosin (C) in einer DNA-Sequenz und ist ein Maß für die Stabilität des Doppelstrangs. Die Gesamtanzahl der Nukleotide (N) gibt die Anzahl der Basen in einer DNA-Sequenz an. Der %mismatch ist der prozentuale Gehalt an nicht übereinstimmenden Nukleotiden in einem Hybridisierungsprozess und kann die Spezifität einer Hybridisierung beeinflussen. Das Design der Primer wurde mit Hilfe des QuikChange™ Primer Design Tools und Handbuchs von Agilent durchgeführt.

Für die QuikChange™-PCR wurden die Primer, das Plasmid pRSF::Ta20S als „Template“, dNTPs, eine Polymerase sowie Puffer und Wasser in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 200-µl-PCR-Röhrchen kombiniert. Alle Reagenzien für die QuikChange™-PCR wurden von New England Biolabs bezogen. Um die Möglichkeit der Selbsthybridisierung der Primer zu minimieren, wurden zwei separate Reaktionen durchgeführt. In der ersten Reaktion wurde nur der Forward-Primer verwendet, während in der zweiten Reaktion nur der Reverse-Primer eingesetzt wurde.

Tabelle 11: Amplification PCR Komponente für die QuikChange™

Komponente	Volume
Wasser	37 µl
10x HF GC Puffer	5 µl
Primer fwd (10 µM) oder rev (10 µM)	5 µl
Template (20 ng/µl)	1 µl
dNTPs (jeder 10 mM)	1 µl
Phusion HF polymerase (2000 U/ml)	1 µl

Nach fünf PCR-Zyklen wurden die beiden Reaktionen gemischt und für weitere 25 Zyklen amplifiziert. Auf diese Weise wurden neu synthetisierte DNA-Stränge erzeugt, was das Risiko einer Primer-Dimer-Bildung verringerte. Die Bildung von Primer-Dimeren während der PCR kann auftreten, wenn die Primer, die zur Amplifikation der Ziel-DNA-Sequenz verwendet werden, unerwünscht miteinander interagieren und sich gegenseitig hybridisieren. Dies kann passieren, wenn die Primersequenzen Komplementaritäten aufweisen, die es ermöglichen, dass sich die Primer aneinander binden, anstatt an die Ziel-DNA. Wenn diese unerwünschte Bindung zwischen den Primern stattfindet, kann die Polymerase an den Primer-Dimeren anlagern und diese amplifizieren, was zu einer unerwünschten Vergrößerung führt, und die Ausbeute des gewünschten PCR-Produkts reduziert.

Das PCR-Programm bestand aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während des Denaturierungsschritts bei 98 °C wurden die doppelsträngigen Plasmid-DNA-Moleküle in einzelsträngige DNA aufgeschmolzen, um das Annealing der Primer zu ermöglichen. Bei der Annealing-Temperatur von 60 °C hybridisierten die Primer mit den einzelsträngigen DNA-Vorlagen. Anschließend synthetisierte die hitzeresistente Fusion HF-

Polymerase bei 72 °C einen neuen komplementären DNA-Strang, der die Mutation des Primers enthielt.

Tabelle 12: Amplification PCR program I

98 °C	98 °C	60 °C	72 °C	72 °C	10 °C
30 s	15 s	30 s	180 s	60 s	hold
1x	5x			1x	1x

Tabelle 13: Amplification PCR program II

98 °C	98 °C	60 °C	72 °C	72 °C	10 °C
30 s	15 s	30 s	180 s	60 s	hold
1x	25x			1x	1x

Nach insgesamt 30 Zyklen wurde die Reaktion gestoppt und die Reaktionsmischung bei 10°C aufbewahrt. Anschließend wurde 1 µl des Enzyms DpnI (20.000 U/ml) hinzugefügt und die Reaktion für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. DpnI ist ein Restriktionsenzym, das in der Lage ist, DNA an der spezifischen Erkennungsstelle 5'-Gm⁶ATC zu schneiden. Diese Erkennungsstelle bedeutet, dass das Enzym DNA spaltet, wenn eine Guanin-Basenposition methyliert ist (Gm⁶). In *E. coli* ist die genomische DNA aufgrund des Methylierungsprozesses an bestimmten Stellen methyliert. Während der PCR entsteht neu synthetisierte DNA, die nicht methyliert ist. Durch Zugabe von DpnI nach der PCR-Reaktion kann selektiv die methylierte Template-DNA geschnitten werden, da das Restriktionsenzym nur an methylierten Positionen bindet und schneidet. Dies ermöglicht es, die Template-DNA zu eliminieren und die Transformation mit nur den gewünschten, mutierten DNA-Fragmenten durchzuführen.

Nach der DpnI-Verdauung wurden 5 µl der Reaktionsmischung in *E. coli* transformiert, wobei die Hitzeschockmethode zur Transformation verwendet wurde. Zur Verifizierung des Erfolgs der QuikChange™ PCR wurde das Plasmid anschließend aus *E. coli* isoliert und zur Sequenzierung geschickt.

2.2.1.2 Kompetente Zellen

Kompetente Zellen werden benötigt, um fremde DNA, zum Beispiel in Form eines Plasmids, in Bakterien einzuschleusen. Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen werden die Zellen in einen Zustand versetzt, der die effiziente Aufnahme von fremder DNA ermöglicht. Dieser Prozess erfolgt typischerweise durch Behandlung der Zellen mit einem speziellen Puffer, wie dem TFB-Puffer, der eine hohe Konzentration an Kalziumionen enthält. Die Behandlung mit diesem Puffer führt zu einer vorübergehenden Permeabilität der Zellmembran, wodurch die DNA in die Zelle eindringen kann. Durch die Steigerung der Durchlässigkeit der Zellwand und Zellmembran wird die Effizienz der Transformation deutlich erhöht.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde ein spezielles Protokoll befolgt. Die Bakterienstämme, die für die Transformation verwendet wurden, wurden von New England Biolabs gekauft. Die Herstellung kompetenter Zellen beinhaltet die Kultivierung der Bakterien unter sterilen Bedingungen und bei niedrigen Temperaturen, um die Integrität der Zellen zu erhalten und die Effizienz der Kompetenz zu maximieren.

Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Schritte bei 4 °C und unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination zu vermeiden und die Integrität der Proben zu gewährleisten. Zunächst wurde eine Pipettenspitze über den gewünschten *E. coli*-Kryostock gestrichen und in 10 ml LB-Medium in einem 50 ml Kolben übertragen. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter konstantem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 3 ml dieser Übernachtskultur in 100 ml frisches LB-Medium in einem 250 ml Kolben überführt. Diese Kultur wurde wiederum bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,5 bis 0,6 erreicht war. Dieser OD-Bereich wurde gewählt, um sicherzustellen, dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellen wurden dann in vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 3500 g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren und das Medium abzutrennen. Der Pellet wurde in TFB I-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert, wie zuvor beschrieben. Der resultierende Zellpellet wurde dann in TFB II-Puffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in 50 µl Portionen aliquotiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Schließlich wurden diese Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Hitzeschocktransformation

Die Transformation von DNA in kompetente *E. coli*-Zellen deren Herstellung unter 2.2.1.2 beschrieben ist, mittels Hitzeschock ist ein etabliertes und effizientes Verfahren, um Plasmide oder andere DNA-Fragmente in Bakterienzellen einzubringen. Bei dieser Methode wird ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen zusammen mit dem gewünschten Plasmid oder DNA-Fragment auf Eis aufgetaut. Durch die Zugabe der DNA-Lösung zu den Zellen und anschließendes vorsichtiges Mischen wird eine effektive Interaktion zwischen den Zellen und der DNA ermöglicht.

Nach einer Inkubationszeit auf Eis erfolgt der sogenannte Hitzeschock. Hierbei werden die Zellen einer kurzzeitigen Temperaturerhöhung ausgesetzt. Diese rasche Erwärmung führt zu einer temporären Destabilisierung der Zellmembran, was die DNA-Aufnahme in die Bakterien erleichtert. Um mögliche Zellschäden zu minimieren, wird sofort nach dem Hitzeschock eine Kühlungsphase auf Eis initiiert. Nach der Abkühlung werden die Zellen in ein nährstoffreiches Medium überführt, um ihre Erholung zu fördern und die Expression bestimmter Gene, wie beispielsweise des Antibiotikaresistenz-Gens, zu unterstützen.

Nach der Inkubation wird die Zellkultur bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wird in dem verbleibenden Überstand resuspendiert und gleichmäßig auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die einen geeigneten Selektionsmarker enthalten, gegen das das Plasmid Resistenz verleiht.

Die Transformation wurde gemäß folgendem Protokoll durchgeführt: Zunächst wurden 50 µl hitzekompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden 5 µl der Ziel-DNA, die durch QuikChange™ PCR hergestellt wurde, zugegeben. Zur Amplifikation der Strukturgenen wurde der Bakterienstamm *E. coli* Top 10 transformiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß für 45 Sekunden in einen vorprogrammierten Benchtop Eppi Shaker mit einer Temperatur von 42 °C gegeben. Zur Regeneration der Zellen wurden 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt, und die Lösung wurde 30 Minuten lang bei 37 °C leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Zellkultur bei Raumtemperatur für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das resultierende Zellpellet wurde in den verbleibenden 50 µl des Überstands resuspendiert. Diese Suspension wurde gleichmäßig auf LB-Agarplatten aufgetragen, die Kanamycin-Stammlösung 1:1000 (v/v) als Selektionsmarker enthielten, um nur die erfolgreich transformierten Zellen zu selektieren.

Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, um das Wachstum der transformierten Bakterienkolonien zu ermöglichen. Das Vorhandensein von Kolonien auf den Platten am nächsten Tag diente als Indikator für eine erfolgreiche Transformation.

2.2.1.4 DNA-Isolierung

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurde mit einem speziell entwickelten Plasmid-DNA-Reinigungs-kit von Macherey-Nagel durchgeführt.

Gemäß dem Protokoll des Macherey-Nagel Kits zur Plasmid-DNA-Isolierung erfolgt zunächst die Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von mehreren Schritten der DNA-Bindung, -Waschung und -Elution, um eine reine Präparation der Plasmid-DNA zu erhalten. Zunächst wird mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie des gewünschten *E. coli*-Stammes von einer LB-Agarplatte aufgenommen. Diese Kolonie wird in 6 ml LB-Medium überführt, das zusätzlich 6 µl Kanamycin Stammlösung 1:1000 (v/v) enthält, um die Selektion für plasmidhaltige Zellen sicherzustellen. Die Kultur wird dann über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um ein ausreichendes Zellwachstum und eine ausreichende Plasmidvermehrung zu gewährleisten.

Nach der Übernachtinkubation werden 5 ml der resultierenden Kultur gemäß dem Protokoll des Macherey-Nagel Kits weiterverarbeitet. Dieser Schritt beinhaltet die Zellyse, die durch die Zugabe spezifischer Lysispuffer erfolgt, um die Zellmembranen zu disruptieren und die Plasmid-DNA freizusetzen. Nach der Lyse werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird auf eine Silikamembran-Säule übertragen. Die DNA bindet spezifisch an die Silikamembran der Säule, während Verunreinigungen durch mehrere Waschschriffe mit den entsprechenden Waschpuffern entfernt werden. Diese Schritte sind entscheidend, um eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA zu gewährleisten, indem Proteine, Salze und andere zelluläre Bestandteile entfernt werden.

Um die Ausbeute an Plasmid-DNA zu maximieren, wird der Elutionspuffer des Kits vor der Anwendung auf die Säule auf 70 °C erwärmt. Diese erhöhte Temperatur trägt dazu bei, dass die Plasmid-DNA effizienter von der Säule eluiert wird, indem die Bindung der DNA an die Silikamembran gelockert wird. Die Elution der Plasmid-DNA wird zweimal mit jeweils 25 µl des vorgewärmten Elutionspuffers durchgeführt. Zwischen den beiden Elutionsschritten wird eine Inkubationszeit von jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur eingehalten, um die Desorption der DNA aus der Säulenmatrix zu erleichtern und die Ausbeute zu optimieren. Der Eluat wird anschließend gesammelt.

2.2.1.5 DNA-Quantifizierung

Nach Abschluss der Elutionsschritte wird die Ausbeute der gewonnenen Plasmid-DNA mit einem NanoDrop-Spektrophotometer quantifiziert. Diese Technik ermöglicht eine präzise Messung der DNA-Konzentration und Reinheit, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bewertet und das Verhältnis von 260/280 als Indikator für Proteinverunreinigungen herangezogen wird.

2.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde durch den Sequenzierungsdienst von Microsynth durchgeführt. Dabei kam die von Sanger, Nicklen und Coulson im Jahr 1977 beschriebene Kettenabbruchmethode zur Anwendung, die auch als Sanger-Sequenzierung bekannt ist. Dieses Verfahren basiert auf der Inkorporation von Dideoxynukleotiden (ddNTPs) während der DNA-Polymerasereaktion. Dideoxynukleotide fungieren als Kettenabbruchmoleküle, da ihnen die 3'-OH-Gruppe fehlt, die für die Anlagerung weiterer Nukleotide erforderlich ist. Dies führt zur Synthese von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und detektiert werden, was die genaue Bestimmung der Nukleotidsequenz ermöglicht.

Für die Sequenzierung der auf dem T7-Expressionssystem basierenden Plasmide wurden spezifische Primer verwendet, die an den T7-Promotor und den T7-Terminator binden. Diese Primerwahl war strategisch, um die Regionen abzudecken, die für die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase relevant sind. Zusätzlich zur Verwendung dieser beiden Primer wurde für die Sequenzierung des pRSF::Ta20S-Plasmids ein dritter Primer eingesetzt. Dieser dritte Primer bindet in der 3'-Richtung des Codierungsbereichs (CDS) der Beta-Untereinheiten. Da das Plasmid zwei T7-Promotoren enthält, war dieser zusätzliche Primer notwendig, um eine eindeutige Sequenzierung sicherzustellen. Ein Primer, der nur an den T7-Promotor bindet, würde keine klaren Sequenzierungsergebnisse liefern. Die genauen Sequenzen der verwendeten Primer sowie ihre spezifischen Bindungsstellen auf dem Plasmid sind detailliert in der Materialsektion unter 2.1.1.2 aufgeführt.

2.2.2 Proteinexpression

Die Expression von Strukturgenen bezeichnet den Prozess, durch den genetische Information in einem Organismus genutzt wird, um Proteine zu synthetisieren, die strukturelle und funktionelle Rollen in der Zelle oder im Organismus übernehmen. Dieser Prozess umfasst mehrere aufeinanderfolgende Schritte, beginnend mit der Transkription, bei der die DNA in mRNA umgeschrieben wird, gefolgt von der Translation, bei der die mRNA in Proteine umgewandelt wird.

Während der Transkription bindet die RNA-Polymerase an den Promotorbereich des Strukturgens auf der DNA und initiiert die Synthese von mRNA. Diese mRNA wird anschließend vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert, wo sie an Ribosomen bindet, um die Translation zu ermöglichen. Die Translation selbst besteht aus drei Hauptphasen: Initiation, Elongation und Termination. Während der Initiation bindet die mRNA an das Ribosom, und der Prozess beginnt am Start-Codon.

In der Elongationsphase wird die mRNA durch das Ribosom bewegt, und die Aminosäuren werden entsprechend der mRNA-Sequenz zu einer Polypeptidkette verknüpft. Schließlich endet die Translation während der Terminationsphase, wenn ein Stop-Codon erreicht wird und das fertige Polypeptid freigesetzt wird.

2.2.2.1 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgt dabei unter Verwendung des T7-Expressionssystems [44]. BL21(DE3) trägt das DE3-Gen, das den T7-RNA-Polymerase-Promotor kodiert. Dieser Promotor ermöglicht die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid), was zu einer effizienten und starken Expression des Zielproteins führt.

Um die Gene, die die Untereinheiten des Proteasoms kodieren, sowie ihre mutierten Varianten in *Escherichia coli* BL21(DE3) zu exprimieren, wurden zunächst Vorkulturen angelegt. Einzelne Kolonien von transformierten *E. coli* wurden von einer LB-Agarplatte entnommen und in etwa 100 ml LB-Medium, das mit 50 μ g/ml Kanamycin supplementiert war, inokuliert. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um ein ausreichendes Zellwachstum zu gewährleisten.

Für die Hauptkultur wurden für jeder Mutanten sechs 1-Liter-Medienflaschen mit LB-Medium, das im Verhältnis 1:1000 (v/v) mit einer Kanamycin-Stammlösung versetzt war, vorbereitet. Die optische Dichte (OD_{600}) der Vorkultur wurde gemessen, und die Vorkultur wurde so zum LB-Medium hinzugefügt, dass eine endgültige OD_{600} von 0,1 erreicht wurde. Die OD_{600} wurde unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt, welches die lineare Beziehung zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration der absorbierenden Substanz beschreibt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

[2]

Hierbei steht A für die Absorption, ε für den molaren Extinktionskoeffizienten, c für die Konzentration und d für die Schichtdicke der Lösung. Diese Methode ermöglicht eine präzise Bestimmung der Zellkonzentration, um sicherzustellen, dass die Hauptkultur unter optimalen Bedingungen gestartet wird.

Die Hauptkultur wurde bei 37 °C kultiviert und kontinuierlich geschüttelt, bis eine OD_{600} von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde, was die exponentielle Wachstumsphase der Bakterien anzeigt. Dieser Zustand ist entscheidend, um eine optimale Proteinausbeute nach der Induktion der Expression zu gewährleisten.

Nach Erreichen der gewünschten OD_{600} wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. IPTG wirkt als Induktor im T7-Expressionssystem, indem es an den Lac-Repressor bindet und diesen inaktiviert. Dies ermöglicht die Transkription der eingeführten Gene, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Anschließend wurde die Kultur bei 18 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die niedrigere Temperatur nach der IPTG-Zugabe begünstigt die korrekte Faltung und Löslichkeit des exprimierten Proteins und minimiert die Bildung von Einschlusskörpern, was insgesamt zu einer höheren Ausbeute an funktionellem Protein führt.

Proben von je 1 ml wurden nach einer, zwei und drei Stunden nach der IPTG-Zugabe entnommen und zur Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE verwendet. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 Minuten bei 4 °C geerntet. Die resultierenden Zellpellets wurden gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3 Proteinanalyse

2.2.3.1 Gel-elektrophorese

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist eine gängige Methode zur Trennung von Proteinen basierend auf ihrer Größe. Zunächst werden die Proteine in den Proben durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit negativen Ladungen versehen, sodass sie ausschließlich nach ihrer Größe getrennt werden. Die denaturierten Proteine werden dann in Vertiefungen eines Polyacrylamidgels geladen und unter Einwirkung eines elektrischen Feldes durch das Gel bewegt. Da kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere, trennt die SDS-PAGE die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße. Nach dem Elektrophoresevorgang werden die Proteine im Gel sichtbar gemacht, typischerweise durch Färbung mit Coomassie-Blau. Anhand der Position der Proteine im Gel können ihre Molekulargewichte im Vergleich zu einem ebenfalls analysierten Protein-Marker abgeschätzt und ihre relative Konzentration bestimmt werden.

Nach der Expression wird SDS-PAGE durchgeführt, um den Erfolg der Proteinexpression zu überprüfen, die Reinheit des Proteins zu bewerten und die optimale Expressionszeit zu bestimmen. Durch die Analyse von Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der IPTG-Induktion gesammelt wurden, kann der zeitliche Verlauf der Proteinexpression verfolgt werden. Proben wurden nach eine Stunde, zwei Stunden und drei Stunden nach der IPTG-Induktion entnommen.

Für die Analyse wurde 12%ige Acrylamid-SDS-Gele gemäß Tabelle 14 hergestellt. Alternativ wurden 12%ige TGX- „Stain-Free“-Gele von BioRad verwendet.

Tabelle 14: Komponenten verwendet für die SDS-PAGE

Komponente	Volume (Trenngel)	Volume (Sammelgel)
H ₂ O	2300 µl	1800 µl
Tris/HCl pH 8,8; 1,5 M	1750 µl	-
Tris/HCl pH 6,8; 0,5 M	-	750 µl
Acrylamide	2800 µl	400 µl
10% SDS (w/v)	70 µl	33 µl
10% APS (w/v)	25 µl	33 µl
TEMED	10 µl	3,3 µl

Insgesamt wurden 15 µl jeder proteinhaltigen Probe mit 5 µl 4-facher Proteinfärbelösung gemischt. Die Proben wurden gemischt und bei 96 °C für 10 Minuten inkubiert. Diese Inkubation bei 96 °C diente dazu, die Proben zu denaturieren und die intermolekularen Bindungen, insbesondere die Wasserstoffbrückenbindungen und die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen, aufzubrechen. Dies war wichtig, um die Proteine in ihre einzelnen Untereinheiten zu entfalten und ihnen eine lineare Struktur zu verleihen, die mit den SDS-Molekülen interagieren konnte.

Durch die Zugabe von SDS und die Inkubation bei hoher Temperatur wurden die Proteine in eine einheitlich geladene, lineare Form gebracht. Dies ermöglichte die Elektrophorese durch das Gel und eine genaue Trennung der Proteine basierend auf ihrer Molekülmasse. Anschließend wurden die behandelten Proben in die Gel-Taschen gegeben. Proteinfärbelösung und Proteinstandard wurden von BioRad erworben.

Die Gele wurden in einem SDS-Laufpuffer unter den in Tabelle 15 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 15: Bedingungen für die Gele der Proteinanalyse

Bedingungen	12% Acrylamide SDS gel	12% TGX „Stain-Free“ gel
Zeit	60 min	30 min
Elektrisches Potenzial	180 V	300 V

2.2.3.2 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist eine Technik zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese. Diese Färbemethode basiert auf der Wechselwirkung zwischen den aromatischen Gruppen des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue und den basischen und aromatischen Aminosäureresten der Proteine.

Die Färbung beginnt mit einer Fixierung der Proteine im Gel, gefolgt von einer Inkubation in einer Lösung des Coomassie-Farbstoffs. Zur Analyse der Polyacrylamidgele wurden die Proteinbanden durch Behandlung mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 0,1 µg Protein pro Bande. Das Laufprotein-Gel wurde in eine Box gelegt und mit einer Coomassie-Färbungslösung bedeckt. Nach einer Mikrowellenbehandlung bei 360 W für 25 Sekunden wurde das Gel bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Während dieser Inkubation bindet der Farbstoff an die Proteine im Gel, wodurch sie sichtbar werden. Anschließend wurde die Färbungslösung verworfen, und das Gel wurde mit einer Coomassie-Entfärbelösung bedeckt und erneut mikrowellengehandelt. Nachdem die Proteine gefärbt wurden, bleiben oft ungebundene Farbstoffmoleküle im Gel und umgeben die Proteinbänder. Wenn das Gel in die Entfärbelösung gelegt wird, lösen sich die ungebundenen Farbstoffmoleküle aus dem Gel und diffundieren in die Lösung. Da die an die Proteine gebundenen Farbstoffmoleküle fest im Gel verankert sind, bleiben die Proteinbänder sichtbar, während der Hintergrund deutlich reduziert wird. Zur Beschleunigung des Prozesses wurde ein gefaltetes Papiertuch hinzugefügt, um die Coomassie-Färbung aufzusaugen. Dies ermöglicht eine klarere Visualisierung der Proteinbänder und erleichtert ihre Analyse und Quantifizierung. Die entfärbten Gele wurden anschließend analysiert und mit einem BioRad-Imager bei einer Wellenlänge von 560 nm fotografiert.

2.2.3.3 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die separierten Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Dieser Transfer immobilisiert die Proteine auf der Membran und ermöglicht die Zugänglichkeit der Proteine für spezifische Antikörper und erleichtert die nachfolgende Analyse. Nach dem Blot Vorgang wurde die Membran in einer Blockierlösung inkubiert, um nicht-spezifische Bindungsstellen zu blockieren und unspezifische Interaktionen zu reduzieren. Dadurch wurde verhindert, dass die Antikörper an unerwünschten Stellen binden.

Anschließend wurde die Membran mit spezifischen primären Antikörpern inkubiert, die gezielt an die zu untersuchende Proteine binden. Diese Antikörper bildeten spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe mit den Zielproteinen. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde die Membran mit sekundären Antikörpern behandelt, die an die primären Antikörper binden. Diese sekundären Antikörper waren oft mit Enzymen oder Fluoreszenzmarkern versehen, welche die Detektion der gebundenen Antikörper ermöglichten. Die gebundenen Antikörper wurden durch verschiedene Detektionsmethoden wie Chemilumineszenz oder Fluoreszenz sichtbar gemacht. Dies ermöglichten die Quantifizierung und Charakterisierung der Zielproteine, einschließlich ihrer Expression, Größe und möglicher posttranslationaler Modifikationen. Die erhaltenen Signale wurden anschließend analysiert und interpretiert.

Der spezifische Ablauf der Durchführung war wie folgt: Das Gel wurde zwischen vier Schichten Whatman-Blotting-Papier und einer Nitrocellulosemembran (NC-Membran) platziert. Dieses "Blotting-Sandwich" wurde mit Blotting-Transferpuffer befeuchtet und in ein BioRad-Blotting-Gerät überführt. Die Proteine wurden bei einer elektrischen Spannung von 25 V für 30 Minuten aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die Immunodetektion der Proteine wurde unter Verwendung eines HRP-gekoppelten Anti-His-Antikörpers durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem Antikörper wurde die proteinhaltige Membran mit TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20), das 5% Milchpulver enthielt, blockiert und eine Stunde lang unter Schütteln inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in 5% Milch-TBS-T aufgetragen. Nach der Blockierung wurde die Membran mit dem Antikörper inkubiert.

Nach der Antikörper-Inkubation wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS-T gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Zur Visualisierung der gebundenen HRP-gekoppelten Antikörper wurde das Western ECL Substrat Kit von BioRad verwendet, das eine Chemilumineszenz-Reaktion ermöglicht.

3. Ergebnisse

Zu Beginn wurden die vorhandenen Röntgenkristallstrukturen 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (Ta20S) mittels sequenzbasierter und struktureller Vergleiche computergestützt analysiert. Das erste Ziel dieser bioinformatischen Analyse war es, die Interaktionsoberflächen zwischen den Ta20S-Proteasom-Untereinheiten zu untersuchen. Basierend auf diesen Analysen und den Erkenntnissen früherer Studien [45] konnten Aminosäuren identifiziert werden, die vermutlich eine entscheidende Rolle für die Interaktion der Untereinheiten spielen und daher für nachfolgende Mutationen ausgewählt wurden. Diese Schlüsselaminosäuren wurden daraufhin gezielt im Ta20S-Konstrukt mutiert. Anschließend wurden die erzeugten Mutanten zur Expression gebracht, um ihre Auswirkungen auf die Proteasomfunktion zu untersuchen. Je nach Erfolg der Expression können weitere Experimente durchgeführt werden, um zu erforschen, wie diese Mutanten die Substrattranslokation innerhalb des Proteasoms beeinflussen.

3.1 Analyse der Interaktionsstellen und Mutagenese im 20S-Proteasom von *Ta*

Das 20S-Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* zeichnet sich dadurch aus, dass es aus lediglich einer Art von α - und β -Untereinheit besteht. Diese Homogenität führt dazu, dass die Interaktionsstellen zwischen den sieben Untereinheiten jedes der vier Ringe identisch sind. Der Schwerpunkt auf den Interaktionen der Alpha-Untereinheiten basiert auf der Annahme, dass die Alpha-Untereinheiten eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Zugangskontrolle zum katalytischen Kern des Proteasoms spielen. Insbesondere die Beweglichkeit und die Interaktionen der Alpha-Untereinheiten beeinflussen die Öffnung und Schließung des Proteasomtors, was für die Substrattranslokation und somit für die katalytische Effizienz des gesamten Komplexes von entscheidender Bedeutung ist [46]. Aus diesem Grund wurden hauptsächlich die Interaktionen der Alpha-Untereinheiten untersucht. Unveröffentlichte Studien der Forschungsgruppe haben potenzielle Reste identifiziert, die an der Bindung der Untereinheiten beteiligt sein könnten [46].

Diese Analysen betonen die Bedeutung von drei spezifischen Interaktionsstellen: einer Alpha-Beta-Interaktionsstelle, einer intramolekularen Alpha-Alpha-Interaktionsstelle und einer intermolekularen Alpha-Alpha-Interaktionsstelle.

Die folgenden Abbildungen stammen aus den Studien von Konstantin Altefrohe und wurden mit seiner freundlichen Genehmigung zur Verfügung gestellt. Diese Abbildungen illustrieren die Interaktionen der Untereinheiten detailliert. Für die Auswahl interessanter Reste für Mutagenese-Experimente wurden visuelle strukturelle Inspektionen der Reste sowie der spezifischen Interaktionsstellen verwendet.

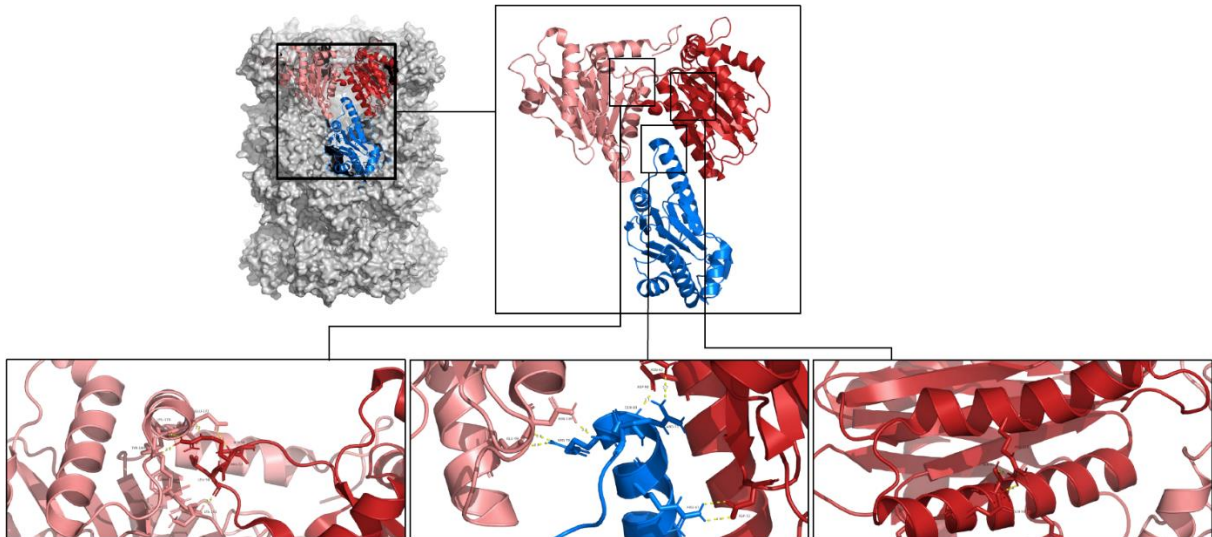


Abbildung 10: Schematische Darstellung der ausgewählten Interaktionsstellen der Ta20S-Untereinheiten und der beteiligten Reste.

Alpha-Untereinheiten sind in hellrot/rot und die Beta-Untereinheit in blau dargestellt. Die beteiligten Reste sind als Stäbchen gezeigt, Interaktionen werden durch gelbe gestrichelte Linien dargestellt.

3.1.1 Alpha- Beta-Interaktion

Die Interaktionen zwischen den Alpha- und Beta-Untereinheiten des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* sind entscheidend für dessen Stabilität und Funktion, wobei spezifische ionische Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Proteasoms spielen. Die Alpha-Untereinheiten bilden die äußeren Ringe, die die Beta-Untereinheiten umschließen und die proteolytische Kammer schaffen, in der der Proteinabbau stattfindet. Ohne diese kritische Interaktionsstelle wird die Assemblierung und Positionierung der Beta-Untereinheiten gestört, was zu einem Verlust oder einer Reduktion der katalytischen Aktivität führt und verhindert, dass der Proteasom-Komplex vollständig assembliert wird. Diese Aussagen basieren auf früheren Studien und auf bisher unveröffentlichten Ergebnissen der Gruppe [46].

Zu den Schlüsselresten an der Interaktionsstelle gehören Arginin 70 (β R70), Arginin 71 (β R71), Glutamin 69 (β Q69) und Glutamin 97 (α Q97), die alle wesentlich zur Interaktion zwischen den Alpha- und Beta-Untereinheiten beitragen. Aus diesem Grund wurden sie für Mutationen und weitere Experimente ausgewählt, um viele mögliche Interaktionen abzudecken. Beispielsweise bildet β R70 eine ionische Bindung mit Glutaminsäure 99 auf der Alpha-Untereinheit (α E99), wobei die positive Ladung von β R70 die negative Ladung von α E99 ergänzt und so für eine korrekte Ausrichtung und Stabilität an der Untereinheitenschnittstelle durch eine starke ionische Anziehung sorgt.

In ähnlicher Weise interagiert β R71 ionisch mit Asparagin 62 auf der Alpha-Untereinheit (α N62), was zusätzlich zur Stabilität und zum Zusammenbau des Proteasoms beiträgt, indem sichergestellt wird, dass die Untereinheiten eng verbunden bleiben, was für die proteolytische Funktion des Proteasoms entscheidend ist. Obwohl Glutamin 69 (β Q69) auf der Beta-Untereinheit keine direkte ionische Bindung eingeht, ist es wahrscheinlich an Wasserstoffbrückenbindungen oder polaren Wechselwirkungen beteiligt, die für die Aufrechterhaltung des strukturellen Rahmens notwendig sind, um die korrekte Positionierung der benachbarten ionischen Wechselwirkungen zu gewährleisten.

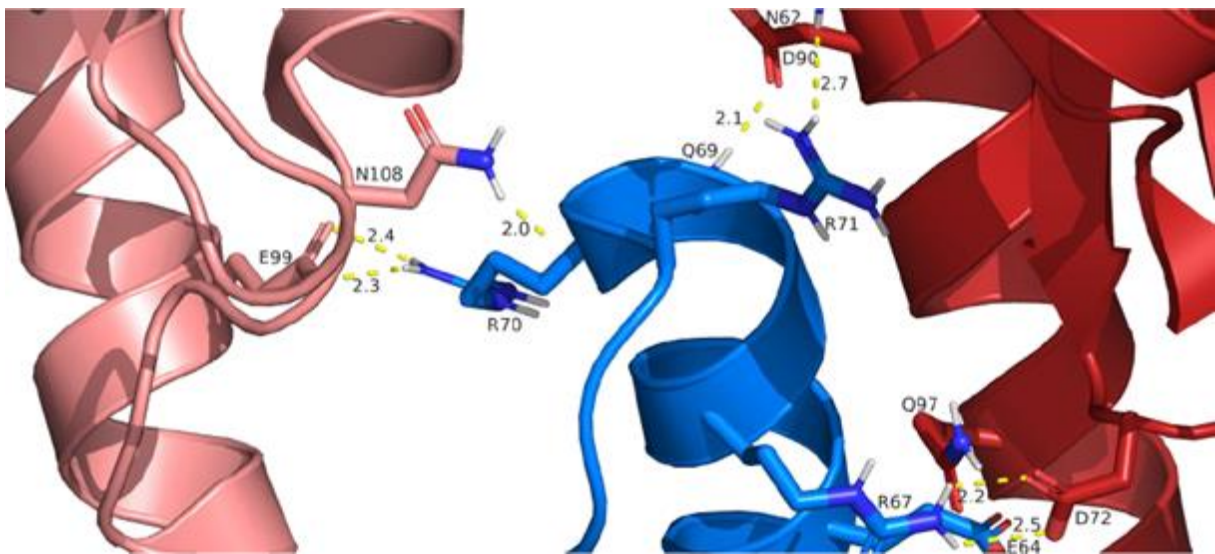


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Alpha-Beta-Interaktionsstelle des Ta20S.

Alpha-Untereinheiten sind in Hellrosa/Rot dargestellt und die Beta-Untereinheit in Blau. Beteiligte Reste werden als Stäbchen gezeigt, Interaktionen sind durch gelbe gepunktete Linien dargestellt. Die Zahlen repräsentieren den Abstand zwischen den Interaktionspartnern in [Å]. Ausgewählte Reste: Wasserstoff ist in Weiß, Sauerstoff in Hellrot und Stickstoff in Blau gefärbt.

3.1.2 intramolekulare Alpha-Alpha-Interaktion

Die Alpha-Untereinheit des 20S-Proteasoms in *Thermoplasma acidophilum* besitzt eine komplexe Struktur, die für seine Funktion von entscheidender Bedeutung ist. Zwei Alpha-Helices, H1 und H2, befinden sich auf der inneren Oberfläche dieser Untereinheit. Diese Helices wurden von Löwe et al. [13] identifiziert und bilden die zweite intramolekulare Alpha-Interaktionsstelle (siehe Abbildung 12).

Die Interaktion zwischen H1 und H2 wird von drei konservierten Aminosäuren getragen: Serin 95 (α S95), Glutamin 98 (α Q98) und Arginin 115 (α R115). Diese Aminosäuren sind für die interne Stabilität des Proteasoms von fundamentaler Bedeutung. Durch Röntgenkristallographie konnten Forscher ein komplexes Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen diesen Aminosäuren aufdecken. Insbesondere α Q98 und α R115 bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen der Seitenketten von α S95. Diese präzise Anordnung polarer Wechselwirkungen fungiert als Kohäsionszentrum und stärkt die Verbindung zwischen H1 und H2, was die gesamte Stabilität der Alpha-Untereinheit erhöht.

Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen α Q98, α R115 und α S95 sind ein wichtiger Bestandteil dieser Interaktion. Sie ermöglichen es den Alpha-Untereinheiten, sich stabil aufeinander abzustützen und ihre Struktur zu bewahren, selbst unter verschiedenen Bedingungen.

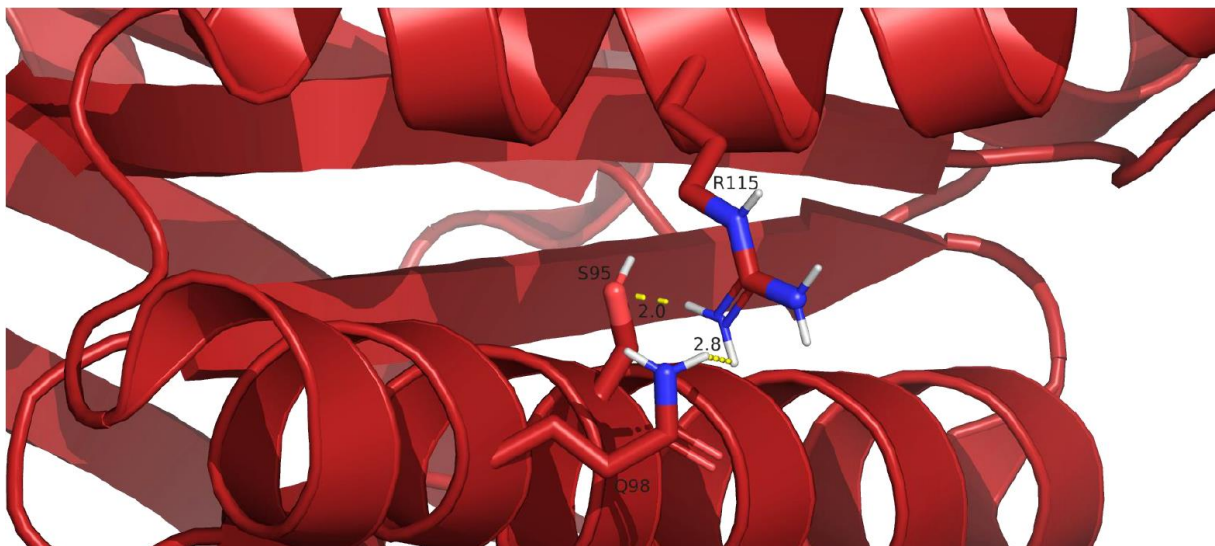


Abbildung 12: Schematische Darstellung der intramolekularen Alpha-Interaktionsstelle des Ta20S.

Die Alpha-Untereinheit ist in Rot dargestellt. Beteiligte Reste werden als Stäbchen gezeigt, Interaktionen sind durch gelbe gepunktete Linien dargestellt. Die Zahlen repräsentieren den Abstand zwischen den Interaktionspartnern in [Å]. Ausgewählte Reste: Wasserstoff ist in Weiß, Sauerstoff in Hellrot und Stickstoff in Blau gefärbt.

3.1.3 intermolekularen Alpha-Alpha-Interaktion

Die dritte Interaktionsstelle zwischen den Alpha-Untereinheiten ist für deren Bindung essentiell, was für die korrekte Funktionsweise des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* von großer Bedeutung ist. Diese Stelle besteht aus einer Schleife an einer Untereinheit, die mit einer Helix und einer Schleife der benachbarten Untereinheit interagiert (Abb. 13). Die spezifische Anordnung der Aminosäuren an dieser Stelle ermöglicht die Bildung eines stabilen Komplexes, der für die Funktion des Proteasoms bei der Proteinfaltung notwendig ist.

Die strukturelle Analyse zeigt, dass zwei spezifische Aminosäuren, Arginin 57 (α R57) und Leucin 58 (α L58), eine zentrale Rolle in dieser Interaktion spielen. Diese Aminosäuren sind im Zentrum der Interaktionsstelle innerhalb der Schleife der Alpha-Untereinheit 2 lokalisiert. Die genauen Bindungsmechanismen zwischen diesen Aminosäuren sind jedoch nicht vollständig sichtbar. Es ist aber wahrscheinlich, dass die positive Ladung von Arginin 57, bedingt durch seine Seitenkette, mit den negativen Ladungen von Glutaminsäure 177 (α E177) und Tyrosin 180 (α Y180) auf der Hauptkette der benachbarten Untereinheit interagiert. Diese Interaktion würde durch Wasserstoffbrücken zwischen der Guanidin-Gruppe von Arginin 57 und den Carboxylgruppen von Glutaminsäure 177 und Tyrosin 180 stabilisiert. Außerdem könnte Glutaminsäure 177 auch über Wasserstoffbrücken mit der Rückgratgruppe von Arginin 57 interagieren.

Leucin 58 hat hingegen eine unpolare Seitenkette, die keine polaren Interaktionen mit anderen Aminosäuren bildet. Es ist jedoch möglich, dass es schwächere Interaktionen wie hydrophobe oder Van-der-Waals-Interaktionen mit anderen Aminosäuren eingeht. Diese Art von Interaktionen könnte dazu beitragen, den Komplex durch zusätzliche Bindungsenthalpie zu stabilisieren. Glutaminsäure 182 (α E182) ist ebenfalls in Richtung der Interaktionsstelle orientiert, aber ihr Interaktionspartner ist nicht sichtbar. Es ist möglich, dass diese Reste eine Salzbrücke mit einem positiv geladenen Rest der benachbarten Untereinheit bildet oder über Wasserstoffbrücken mit anderen Resten im Komplex interagiert.

Um die Interaktionen zwischen diesen Aminosäuren besser zu verstehen, wurden die Reste α R57, α L58, α Y180 und α E182 für weitere Studien ausgewählt. Diese Reste sind entscheidend für den Erhalt der Stabilität und Funktionsfähigkeit des 20S-Proteasoms und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proteinfaltung. Außerdem tragen diese Reste auch zum Gesamtaufbau und zur Konformation der Alpha-Untereinheiten bei. Die einzigartige Anordnung dieser Reste ermöglicht die Bildung eines stabilen Komplexes, der Proteine in der Zelle effektiv abbauen kann.

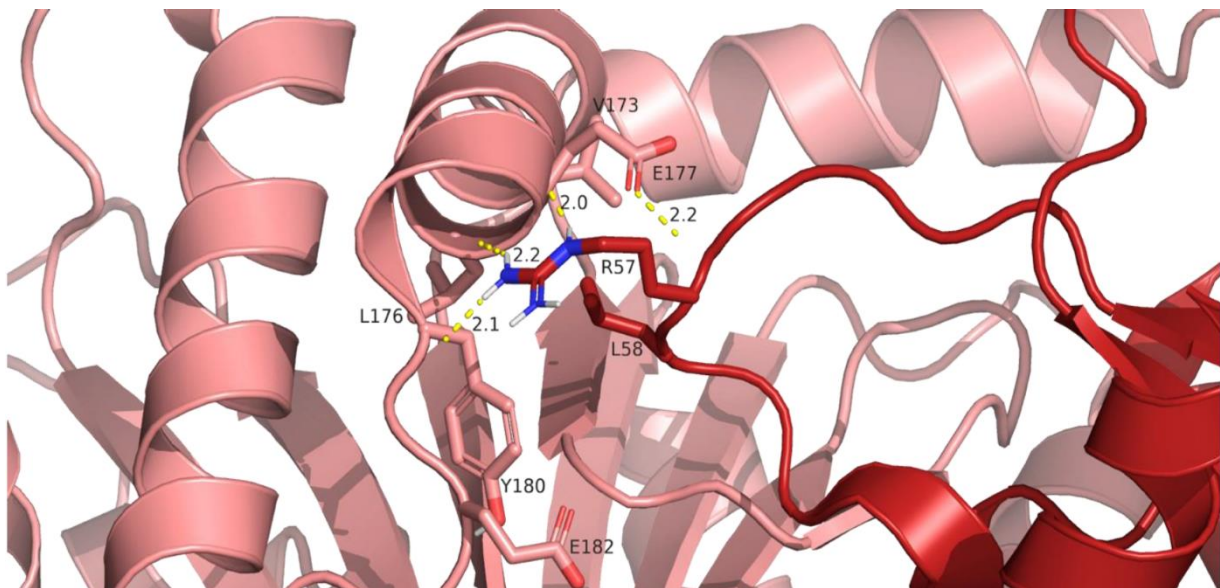


Abbildung 13: Schematische Darstellung der intermolekularen Alpha-Interaktionsstelle des Ta20S. Alpha-Untereinheiten sind in hellrosa/rot dargestellt. Die beteiligten Reste sind als Sticks gezeigt, Interaktionen werden durch gelbe gestrichelte Linien dargestellt. Die Zahlen geben den Abstand zwischen den Interaktionspartnern in [Å] an. Ausgewählte Reste sind wie folgt gefärbt: Wasserstoff in weiß, Sauerstoff in hellrot und Stickstoff in blau.

3.2 Quikchange Mutagenese von pRSF::Ta20S Mutanten

Für die Mutagenese wurden die Reste α R57, α L58, α S95, α Q98, α R115, α Y180, α E182, β Q69, β R70 und β R71 ausgewählt (Abschnitt 3.1). Um die Mutanten des 20S-Proteasoms zu generieren, wurde eine site-directed Mutagenese (QuikChange™-Mutagenese) durchgeführt. Hierbei wurden spezifisch entworfene Primer und das pRSF::Ta20S-Plasmid verwendet, um die entsprechenden Codons der Zielreste durch GCN (wo N ein beliebiges Nukleotid ist) zu ersetzen, um Alanin zu kodieren. Im Vergleich zu anderen Aminosäuren hat Alanin eine relativ kleine Seitenkette ohne funktionelle Gruppen. Die Methylgruppe ist nicht polar was bedeutet, dass Alanin keine starken elektrostatischen Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren eingeht. Die minimale Seitenketteninteraktion von Alanin resultiert in einer geringen Neigung zur Bildung von Hydrogenbrücken oder anderen spezifischen Wechselwirkungen mit umgebenden Resten in einem Protein, deswegen wurde Alanin aufgrund seiner minimalen Seitenketteninteraktionen gewählt. Eine Ausnahme bildete α R115, dessen Codon durch AAG ersetzt wurde, um Lysin zu produzieren. Diese Mutation basiert auf früheren Studien [45] und soll die Wechselwirkungen des Restes abschwächen, aber nicht vollständig eliminieren.

Die QuikChange™-PCR-Produkte wurden in *E. coli* Top10-Zellen transformiert und auf Kanamycin-haltigen Agarplatten kultiviert. Nach 24 Stunden wurden zwischen 5 und 15 Kolonien pro Platte beobachtet.

Die DNA dieser Kolonien wurde isoliert und sequenziert, um die gewünschten Mutationen zu bestätigen.

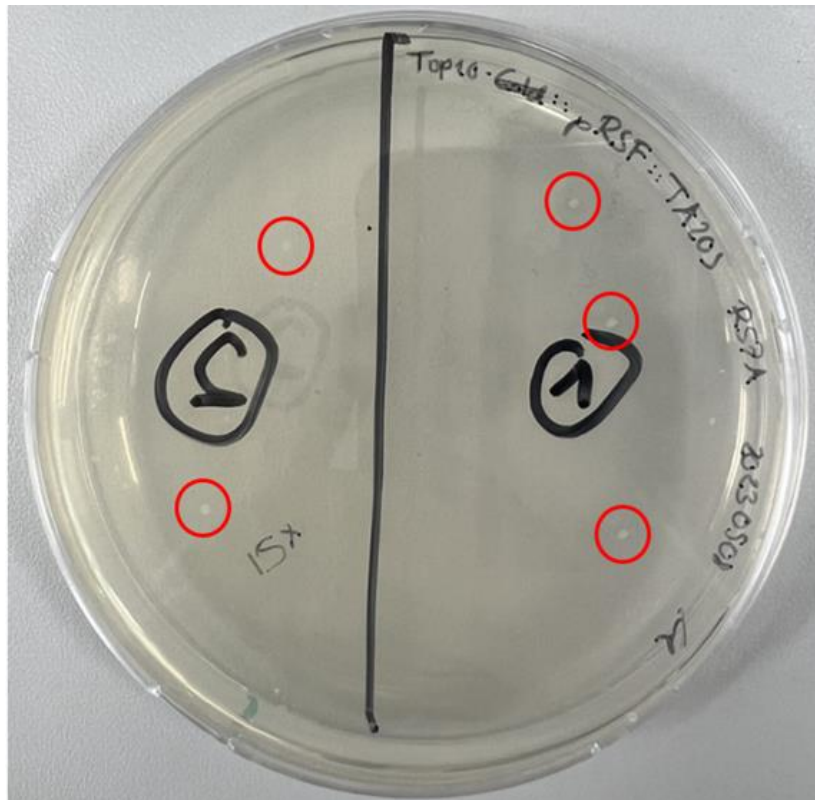


Abbildung 14: Einige Kolonien, die sich auf Kanamycin-haltigen Agarplatten nach der Hitze-Schock-Transformation gebildet haben (rot umkreist).

In diesem Fall wurde pRSF::T20S R57A in *E. coli* Top10-Zellen transformiert. Insgesamt wurden 15 Kolonien auf dieser Platte beobachtet.

Mutanten β Q69A und α Q98A konnten trotz mehrerer Versuche nicht erfolgreich sequenziert werden und wurden daher von weiteren Experimenten ausgeschlossen. Die restlichen Mutanten α R57A, α L58A, α S95A, α R115K, α Y180A, α E182A, β R70A und β R71A wurden erfolgreich generiert und in *E. coli* BL21(DE3) -Zellen exprimiert.

3.3 Proteinexpression

Die Expression von Ta20S-Mutanten erfolgte gemäß dem in Abschnitt 2.2.2.1 beschriebenen Protokoll. Davor wurde eine Minipräp (siehe Abschnitt 2.2.1.4) mit jeweils 5 zufällig ausgewählten Kolonien von jedem Mutanten durchgeführt und zur Sequenzierung geschickt, um den Erfolg der Transformation zu bestätigen.

Die Tabellen zeigen die Messungen der optischen Dichte zu verschiedenen Zeitpunkten für die unterschiedlichen Mutanten. Eine IPTG-Induktion wurde durchgeführt (t_0), um die Proteinexpression zu starten. Die OD-Werte wurden in regelmäßigen Abständen aufgezeichnet, um die Änderungen der Zelldichte nach der IPTG-Induktion zu verfolgen.

Tabelle 16: Messungen der optischen Dichte (OD) von R57A und L58A über die Zeit mit IPTG-Induktion.

R57A		L58A	
Zeit	OD-Wert	Zeit	OD-Wert
Start (VK)	3,53	Start (VK)	3,54
10:15	0,13	10:15	0,13
11:15	0,28	11:15	0,26
12:00	0,56	12:00	0,52
12:15 t_0	0,67	12:15	0,62
13:15 t_1	0,84	13:15	0,79
14:15 t_2	1,50	14:15	1,32
15:15 t_3	1,67	15:15	1,42
16:15 t_4	1,78	16:15 t_4	1,58
$t_{\text{übernacht}}$ t_5	2,70	$t_{\text{übernacht}}$ t_5	2,64

Tabelle 17: Messungen der optischen Dichte (OD) von E182A und Y180A über die Zeit mit IPTG-Induktion.

E182A		Y180A	
Zeit	OD-Wert	Zeit	OD-Wert
Start (VK)	3,47	Start (VK)	3,38
09:45	0,12	09:45	0,12
10:45	0,27	10:45	0,30
11:30	0,54	11:30	0,60
11:45 t_0	0,64	11:45	0,72
13:00 t_1	0,81	13:00	0,89
14:00 t_2	0,87	14:00	0,95
15:15 t_3	0,94	15:15	1,02
16:15 t_4	1,34	16:15 t_4	1,43
$t_{\text{übernacht}}$ t_5	2,04	$t_{\text{übernacht}}$ t_5	2,09

Tabelle 18: Messungen der optischen Dichte (OD) von S95A und R115K über die Zeit mit IPTG-Induktion.

S95A		R115K	
Zeit	OD-Wert	Zeit	OD-Wert
Start (VK)	2,81	Start (VK)	2,95
10:25	0,12	10:25	0,12
11:25	0,22	11:25	0,22
12:25	0,54	12:25	0,51
12:45 t_0	0,68	12:45	0,66
14:00 t_1	0,88	14:00	0,84
15:00 t_2	0,93	15:00	0,90
$t_{\text{übernacht } t_5}$	2,16	$t_{\text{übernacht } t_5}$	2,12

Tabelle 19: Messungen der optischen Dichte (OD) von R70A und R71A über die Zeit mit IPTG-Induktion.

R70A		R71A	
Zeit	OD-Wert	Zeit	OD-Wert
Start (VK)	2,91	Start (VK)	3,32
11:00	0,03	11:00	0,02
12:00	0,19	12:00	0,17
13:00	0,53	13:00	0,51
13:15 t_0	0,73	13:15	0,70
14:30 t_1	0,79	14:30	0,78
15:30 t_2	0,86	15:30	0,84
16:15 t_3	0,97	16:15	0,93
17:15 t_4	1,07	17:15 t_4	1,05
$t_{\text{übernacht } t_5}$	2,10	$t_{\text{übernacht } t_5}$	1,89

Um die Daten leichter interpretieren zu können, wurden die OD-Werte (optische Dichte) im Zeitverlauf graphisch dargestellt. Diese Darstellung ermöglicht eine präzisere Analyse der Zellwachstum, wobei höhere OD-Werte auf eine höhere Zelldichte hinweisen.

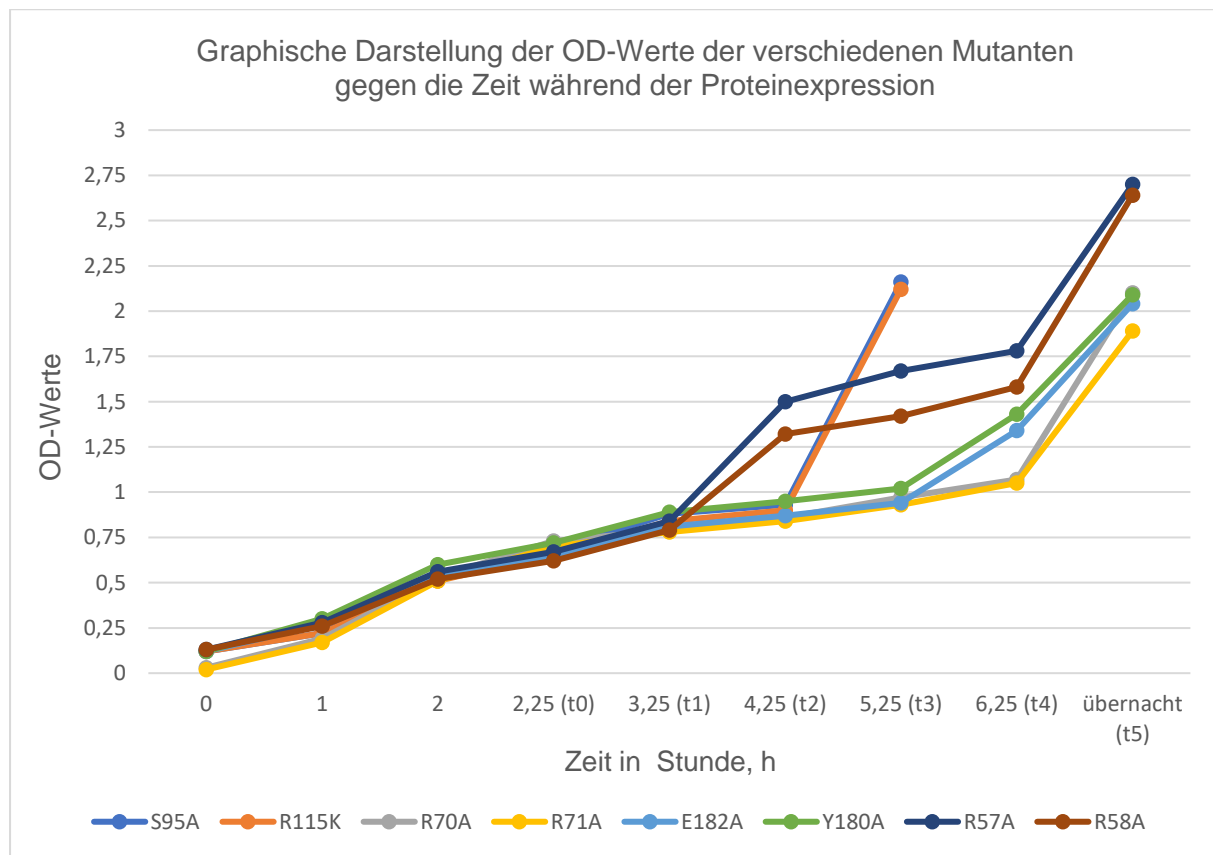


Abbildung 15: Grafische Darstellung der die OD-Werte (optische Dichte) verschiedener Mutanten im Verlauf der Zeit während der Proteinexpression.

Diese Werte wurden in regelmäßigen Zeitintervallen gemessen, beginnend bei 0 Stunden bis hin zu einer Übernacht-Messung (t₅)

Während der Expression wurden in regelmäßigen Abstände 1 mL Proben entnommen. Diese Proben wurden bei 10.000 g für 1 Minute zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das entstandene Pellet wurde in MilliQ-Wasser resuspendiert und auf eine OD von 1 eingestellt. Die Expression der Proteine wurde anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot überprüft. (siehe Abbildungen 16, 17 und 18). Die SDS-PAGE- und Western-Blot-Abbildungen für die E182A- und Y180A-Mutanten wurden leider nicht erfasst. Die Ergebnisse für diese Mutanten stimmten jedoch mit den für die anderen analysierten Mutanten beobachteten Banden überein.

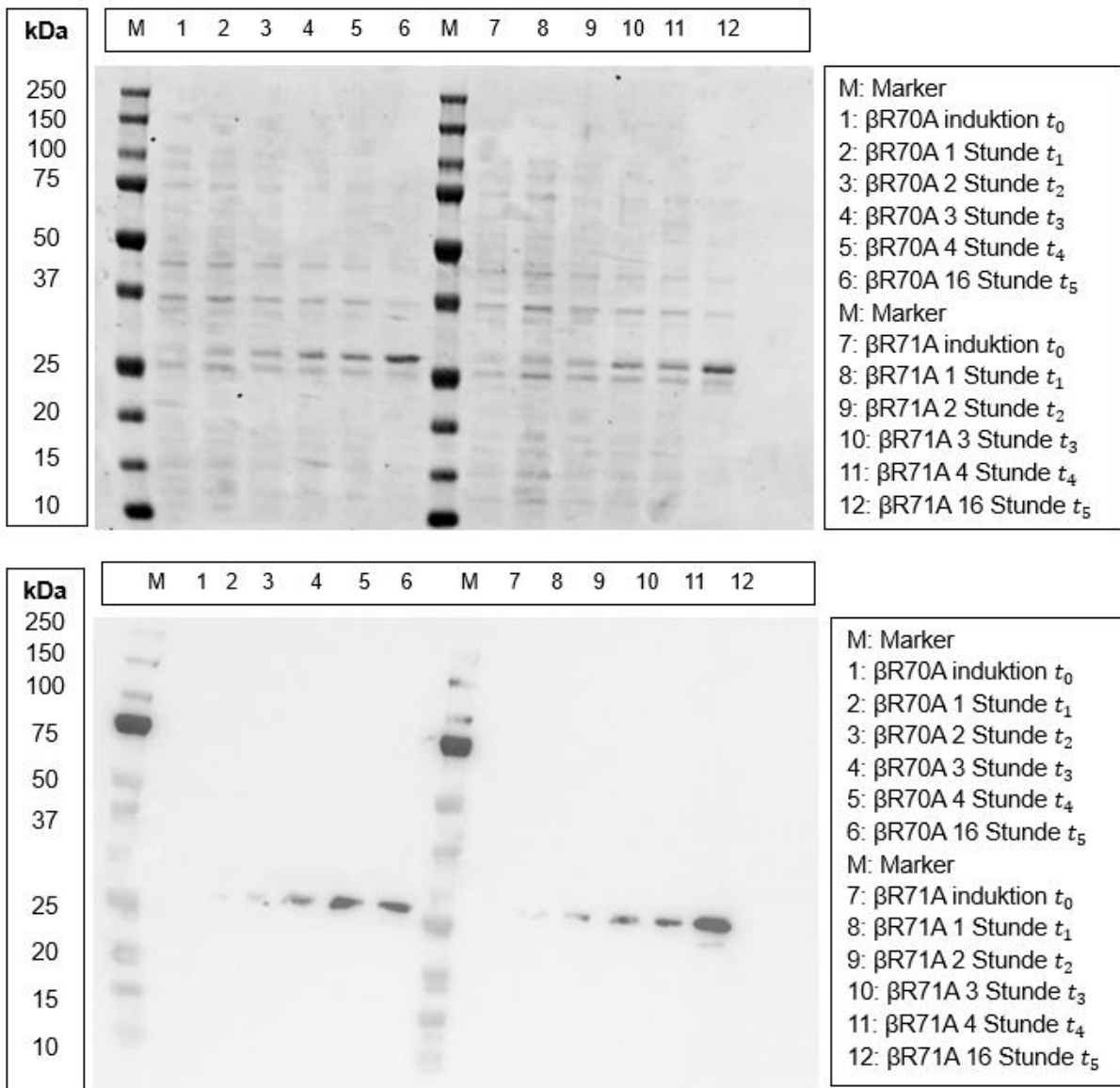


Abbildung 16: SDS-PAGE und Western Blot der β R70A- und β R71A-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers.

Dargestellt sind Expressionsproben vom Zeitpunkt der Induktion bis zur Ernte nach 16 Stunden. Die Bahnen 1-6 enthalten β R70A-Proben und die Bahnen 7-12 enthalten β R71A-Proben. Das obere Bild zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE und das untere Bild die Ergebnisse der Anti-His-chemilumineszenten Antikörperbindung nach dem Western Blotting.

Die beiden Banden um 25 kDa wurden während der Expression stärker. Dabei handelt es sich um die Untereinheiten des Ta20S, wie der Western Blot zeigt. Es wurde ein Anti-His-Antikörper verwendet, der an das 6xHis-Tag der Beta-Untereinheit bindet. Eine Zunahme des chemilumineszenten Signals des Antikörpers ist ebenfalls nach zwei Stunden Expression sichtbar.

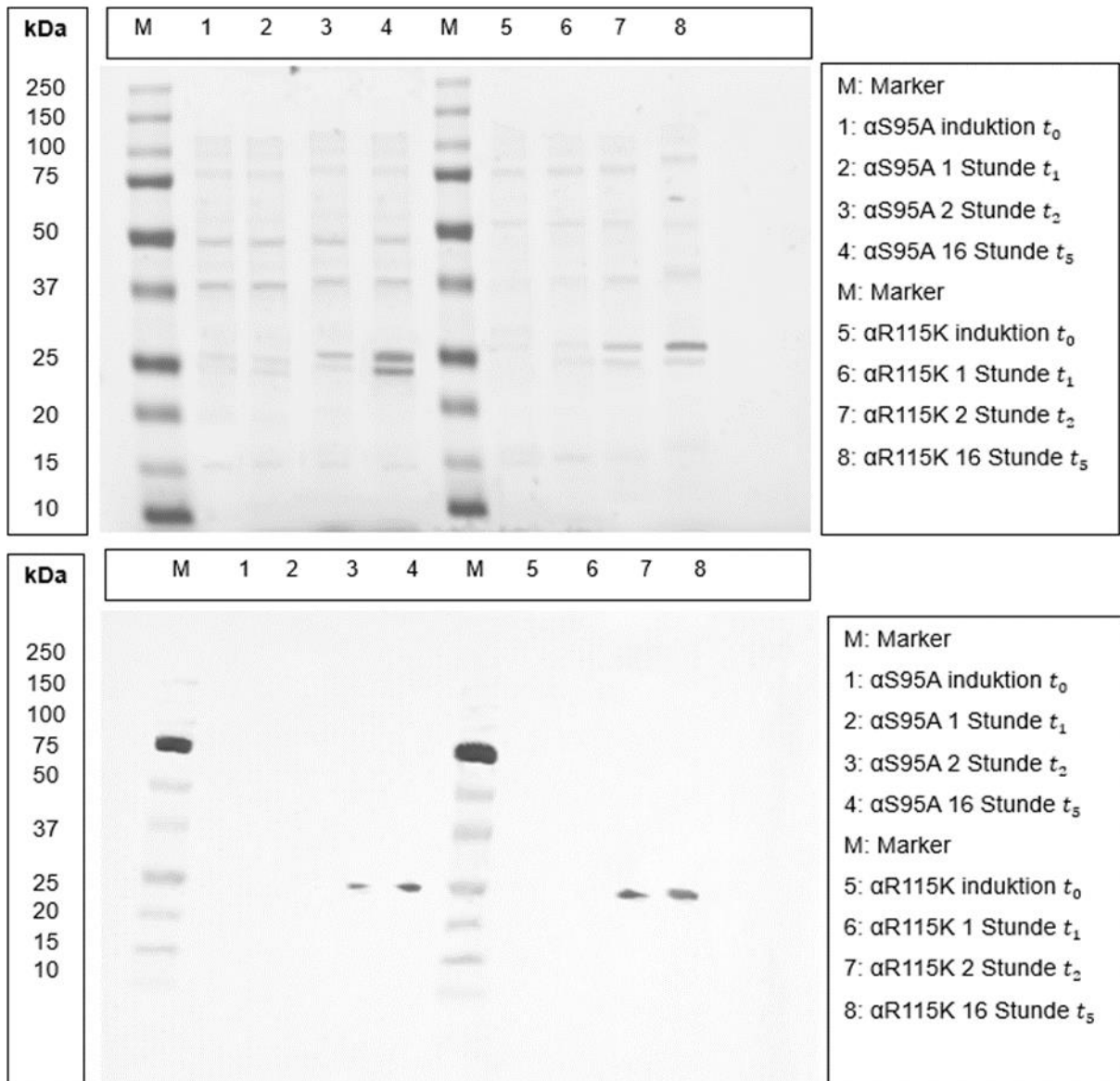


Abbildung 17: SDS-PAGE und Western Blot der α S95A- und α R115K-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers

Dargestellt sind Expressionsproben vom Zeitpunkt der Induktion bis zur Ernte nach 16 Stunden. Die Bahnen 1-4 enthalten α S95A-Proben und die Bahnen 5-8 enthalten α R115K-Proben. Das obere Bild zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE und das untere Bild die Ergebnisse der Anti-His-chemilumineszenten Antikörperbindung nach dem Western Blotting.

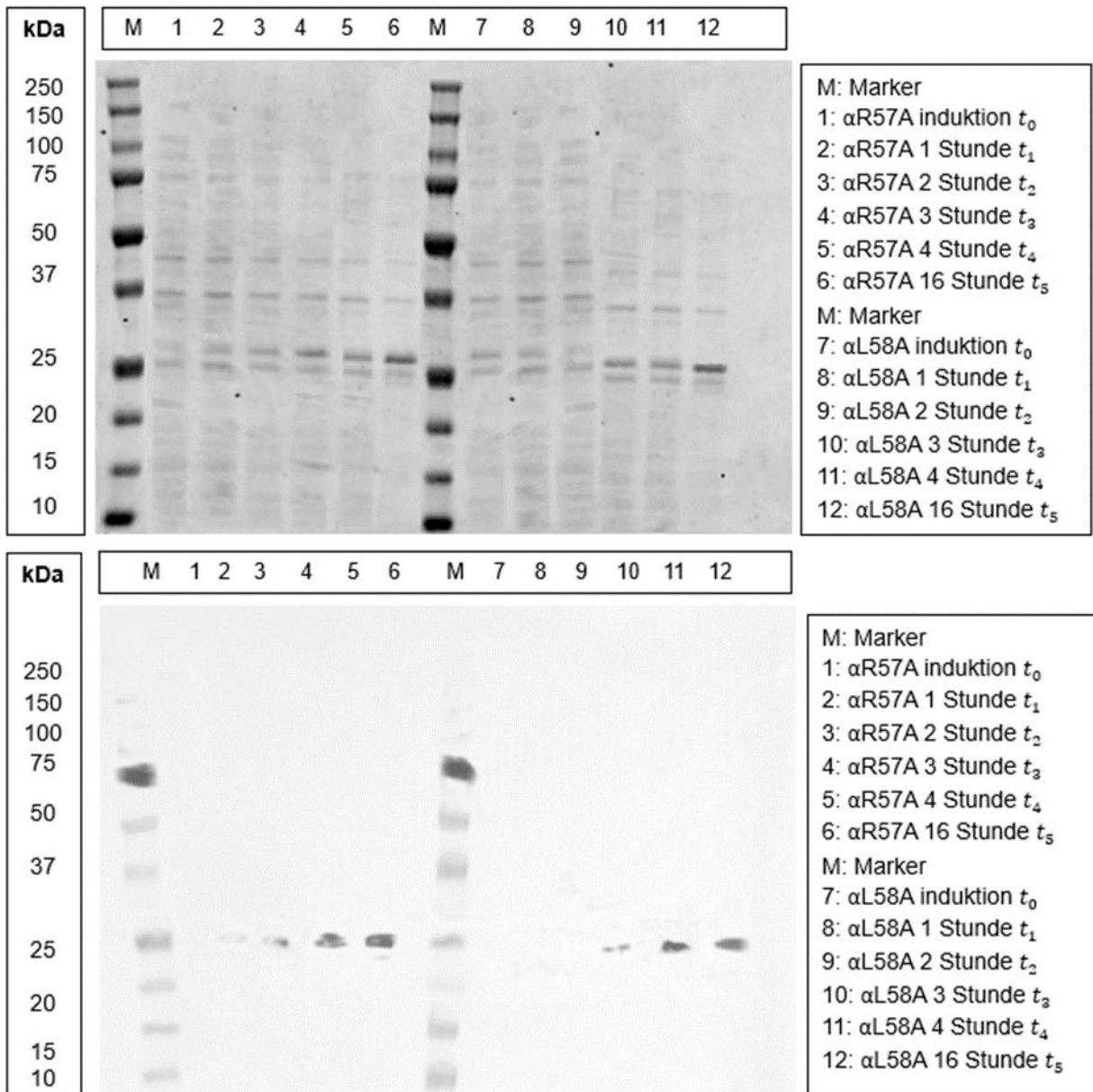


Abbildung 18: SDS-PAGE und Western Blot der α R57A- und α L58A-Expression unter Verwendung eines anti-His-HRP-gekoppelten Antikörpers

Dargestellt sind Expressionsproben vom Zeitpunkt der Induktion bis zur Ernte nach 16 Stunden. Die Bahnen 1-6 enthalten α R57A-Proben und die Bahnen 7-12 enthalten α L58A-Proben. Das obere Bild zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE und das untere Bild die Ergebnisse der Anti-His-chemilumineszenten Antikörperbindung nach dem Western Blotting.

Nach der Proteinexpression und dem Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen geerntet, um das Zielprotein zu isolieren. Die Menge an Zellpellet aus dem Proteinexpressionen sind in Tabelle 20 zu sehen.

Tabelle 20: Menge an Zellpellet nach Proteinexpression und Zentrifugation

Mutanten	Zellpelletmasse in g
α R57A	19,1
α L58A	14,9
α S95A	19,1
α R115K	21,3
α Y180A	23,0
α E182A	21,8
β R70A	21,2
β R71A	21,0

4. Diskussion

4.1 QuikChange™ Mutagenese

Die PCR-Produkte für die β Q69A- und α Q98A-Mutanten ergaben trotz mehrfacher Versuche keine positiven Sequenzierungsergebnisse. Dieses Ergebnis könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, die wahrscheinlich mit den experimentellen Bedingungen und den technischen Aspekten der PCR und Klonierung zusammenhängen. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen könnte zu besseren Ergebnissen führen und die Stabilität der DNA verbessern. Da die meisten Mutanten erfolgreich erzeugt wurden, wurden die Bedingungen der PCR während des gesamten Experiments nicht verändert. Es könnte zunächst sinnvoll sein, das Primer-Design nochmal zu überprüfen und gegebenenfalls anzupassen. Obwohl die aktuellen Primer so gestaltet sind, dass der Mutationsort zentriert ist und sie eine Länge von 25 bis 45 Basen aufweisen, um eine hohe Spezifität und eine Schmelztemperatur von mindestens 78 °C zu gewährleisten, könnte es dennoch hilfreich sein, alternative Designs zu testen. Dies würde sicherstellen, dass die Primer optimal an die DNA binden und eine effizientere Amplifikation ermöglichen.

Ein weiterer wahrscheinlicher kritischer Punkt ist das PCR-Protokoll. Aus zeitlichen Gründen wurde das PCR-Protokoll wie in Abschnitt 2.2.1.1 durchgeführt. Das Protokoll umfasste fünf initiale Zyklen, gefolgt von einer Mischung der Reaktionen und weiteren 25 Zyklen. Um eine ausreichende Voramplifikation sicherzustellen, könnte die Anzahl der initialen Zyklen wahrscheinlich auf zehn erhöht werden. Zudem könnte die Gesamtzahl der Zyklen auf 35 erhöht werden, um die Ausbeute zu maximieren. Es könnte auch hilfreich sein, die Denaturierungstemperatur von 98 °C auf 95 °C zu reduzieren, um die Integrität der DNA zu schonen. Zusätzlich könnte die Annealing-Temperatur in einem Gradient-Ansatz optimiert werden, beispielsweise zwischen 58 °C und 62 °C, um die beste Temperatur für die Primerbindung zu finden.

Die Wahl der Polymerase könnte ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Effizienz und Genauigkeit der PCR spielen. Der Einsatz einer Hochgenauigkeits-Polymerase wie der *PfuTurbo* DNA-Polymerase anstelle der Fusion HF-Polymerase könnte wahrscheinlich Verbesserungen bringen. Die *PfuTurbo* DNA-Polymerase ist bekannt für ihre außergewöhnliche Hitzestabilität und kann Temperaturen von bis zu 98 °C ohne signifikanten Aktivitätsverlust standhalten. Dies ist besonders wichtig bei hohen Denaturierungstemperaturen, um eine vollständige Trennung der DNA-Stränge zu gewährleisten. Zudem reduziert die Fähigkeit, bei hohen Temperaturen effizient zu arbeiten,

sekundäre Strukturen in der DNA, was besonders bei GC-reichen Templates oder komplexen DNA-Strukturen von Vorteil ist.

4.2 Proteinexpression

Basierend auf den erzielten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Expression erfolgreich war. Zusammenfassend zeigen die OD-Werte, die in den verschiedenen Tabellen (Tabellen 16, 17, 18 und 19) dargestellt sind, eine bemerkenswerte Zunahme der Zelldichte nach der Induktion mit IPTG in der Zellkultur. Diese Zunahme deutet darauf hin, dass das Zellwachstum nach der Induktion effektiv ist und zu einer erheblichen Vermehrung der Zellen führt. Insbesondere ein erreichter OD-Wert von etwa 2 gilt als erfreuliches Ergebnis und bestätigt die erfolgreiche Induktion. Außerdem lassen sich die Unterschiede zwischen den Zellausbeuten durch leicht unterschiedliche Medienzusammensetzungen und Zelldichten zum Zeitpunkt der Induktion erklären (siehe Tabelle 20).

Zusätzlich zu den quantitativen Daten der OD-Werte liefern die visuellen Darstellungen der Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western-Blot weitere Bestätigung für die erfolgreiche Induktion und Expression der Zielproteine. Basierend auf vorherigen Expressionsexperimenten mit den anderen Mutanten zeigten alle SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen bereits nach 3 Stunden ein deutliches Band bei 25 kDa. Daher wurde die Expression der Mutanten α S95A und α R115K nicht über Nacht fortgesetzt, sondern die Zellen wurden schon nach 3 Stunden geerntet. Die Ergebnisse für α S95A und α R115K waren somit wie erwartet und bestätigten die erfolgreiche Expression der Proteine in der vorgesehenen Zeitspanne.

Die Abbildungen 16, 17 und 18 liefern zusätzliche Informationen zur Expression von histidinmarkierten Proteinen in verschiedenen Mutanten. Die beobachtete Zunahme der Expressionsniveaus deutet auf eine fortschreitende Produktion der Zielproteine hin. Besonders wichtig ist die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der SDS-PAGE und den Western-Blot-Analysen, die die Identifizierung der His-markierten Proteine bei einer Molekülmasse von etwa 25 kDa unterstützt. Dieses Molekulargewicht stimmt mit den erwarteten Größen der Zielproteine überein.

Ein weiteres bemerkenswertes Detail ist das Auftreten von zwei Banden um 25 kDa in den Abbildungen 16, 17 und 18. Die stärkere Intensität des oberen Bands im Vergleich zum unteren Band lässt vermuten, dass das obere Band das Voll-Längen-Protein darstellt, während das untere Band ein Abbauprodukt oder eine teilweise prozessierte Form des Proteins sein könnte. Die verstärkte Intensität des oberen Bands könnte darauf hindeuten, dass die Voll-Längen-Form des Proteins stabiler oder effizienter exprimiert wurde als das untere Band.

Obwohl die erfolgreichen Expressionen nachgewiesen wurden, könnte man argumentieren, dass verschiedene Faktoren die Effizienz der Expression beeinflussen, sodass die Mutanten nicht im gleichen Maße exprimiert werden konnten. Ein anderes Plasmid könnte eine bessere Kontrolle der Expression bieten. Zum Beispiel könnten Plasmide mit unterschiedlichen Promotoren, Kopienzahlen oder Resistenzmarkern verwendet werden, um die Expression zu optimieren. Ein Plasmid mit einem stärkeren oder regulierbaren Promotor könnte die Ausbeute erhöhen.

Zur Expression der Mutanten des 20S Proteasoms könnten zum Beispiel die Plasmide pRSET 5a und 6a, verwendet werden, die möglicherweise besser mit den verwendeten Bakterienstämmen kompatibel sind. Die pRSET-Plasmide wurden auch in anderen Studien verwendet, um verschiedene Mutanten des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* zu exprimieren, und haben sich als erfolgreich erwiesen. Ein Vergleich zwischen den beiden Plasmiden könnte zeigen, ob die Ausbeute mit den gleichen Mutanten gleich wäre [28]. Die pRSET Plasmide sind bakterielle *E. coli* Expressionsvektoren. Sie enthalten einen Ursprung der Replikation (*origin of replication, ori*), der eine hohe Kopienzahl hervorruft, einen *f1(+)-ori*, sowie das b-Lactamase Gen zur Vermittlung der Ampicillin-Resistenz. Die Transkription ist unter der Kontrolle des starken Promotors und Terminators der *E. coli* Bakteriophage T7. Befindet sich das Plasmid im Expressionsstamm BL21 (DE3), so wird durch Zugabe von IPTG die Expression der T7 RNA-Polymerase induziert und die Translation des insertierten Gens mit hoher Frequenz gestartet.

Zusätzlich könnten verschiedene *E. coli* Stämme besser geeignet sein, da sie unterschiedliche Eigenschaften haben, die die Expression beeinflussen können. Der XL1-Blue *E. coli* Stamm könnte aufgrund seiner genetischen Eigenschaften, die die Stabilität und Integrität von klonierten Plasmiden verbessern, sowie seiner hohen Transformationseffizienz und der nützlichen Selektionsmarker eine geeignete Alternative für die Transformation und Klonierung sein. (siehe Tabelle unten)

Tabelle 21: Eigenschaften des *E. coli* Stamms XL1 Blue

<i>E. coli</i> Stamm	Genotype	Bemerkungen
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'[proAB+ lacIq lacZDM15 Tn10(tetr)]</i>	rekombinationsdefizienter Stamm mit hoher Transformationseffizienz

Obwohl die Expression und die QuikChange™-Mutagenese für die meisten Mutanten des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* erfolgreich waren, kann die genaue Rolle dieser Mutanten bei der Substrattranslokation nur durch die Analyse der enzymatischen Aktivität jeder einzelnen Mutante und deren Interaktionen innerhalb des Proteasoms ermittelt werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die enzymatische Aktivität von β R71A im Vergleich zu β R70A deutlich geringer war als die anderen Mutanten [45]. Wenn man die in dieser Studie erzielten Ergebnisse betrachtet, zeigen die Ausbeuten von R71A und R70A während der Proteinexpression keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu anderen Mutanten. Daher könnte man annehmen, dass auch die enzymatische Aktivität ähnlich sein sollte, da die Interaktionen innerhalb des Proteasoms gleich zu sein scheinen. Allerdings war dies nicht der Fall. Dies deutet darauf hin, dass trotz ähnlicher Proteinexpression und scheinbar gleicher Interaktionen im Proteasom, die enzymatische Funktion von R71A stark beeinträchtigt ist. Solche Unterschiede könnten auf spezifische strukturelle oder funktionelle Veränderungen in der Mutante R71A hinweisen, die ihre Fähigkeit zur Substrattranslokation beeinflussen. Zukünftige Studien könnten diese Erkenntnisse nutzen, um gezielte funktionelle Assays durchzuführen und die spezifischen Auswirkungen der Mutationen auf die Proteasom-Aktivität weiter zu untersuchen.

Auch wenn man die Expression der Mutanten betrachtet, lässt sich vermuten, dass die Proteinreinigung ebenfalls gut funktionieren sollte. Jedoch deutet die Studie von Konstantin Altfrohne, der sich mit der Proteinreinigung der Mutanten befasste, darauf hin, dass die Proteinausbeute pro Zelle signifikant von der Gesamtausbeute der Zellen, die aus der Expression gewonnen wurden, abweicht. Dies wurde auch in früheren Studien beobachtet [30]. Ein möglicher Grund dafür könnte der Einfluss der Proteasomen auf den Stoffwechsel und die Lebensfähigkeit von *E. coli* sein. Katalytisch aktivere Mutanten könnten einen stärkeren negativen Einfluss auf den Expressionswirt haben, was zu niedrigeren Proteinspiegeln pro Zelle führt. Es ist jedoch unklar, ob dies solch starke Effekte verursachen könnte. Wahrscheinlicher ist, dass die Verteilung des Effekts zufällig ist und dass einige der Mutanten mehr *inclusion bodies* gebildet haben.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Studie wurden die Mutagenese und Expression von Mutanten des Modellproteasoms Ta20S erfolgreich etabliert. Allerdings bestehen weiterhin Herausforderungen bei der vollständigen Charakterisierung der funktionellen Implikationen dieser Mutationen. Detaillierte biochemische Analysen sind erforderlich, um die spezifischen Rollen einzelner Aminosäureänderungen zu verstehen. Zudem muss der Einfluss dieser Mutationen auf die Gesamtstabilität und strukturelle Integrität des Ta20S-Proteasoms gründlich untersucht werden.

Im Vergleich zu anderen Studien, die teilweise unterschiedliche Mutationsstellen und Expressionsergebnisse untersuchten [45], verdeutlicht diese Arbeit die Komplexität der Proteasom-Assemblierung und die kritische Rolle einzelner Aminosäurereste. Während einige Studien eine vergleichbare Proteinexpression zeigen, weisen sie dennoch abweichende Ergebnisse hinsichtlich der enzymatischen Aktivität auf, was die Notwendigkeit weiterer funktioneller Assays zur Untersuchung der spezifischen Auswirkungen der Mutationen unterstreicht [45]. Dies zeigt die Wichtigkeit, sowohl strukturelle als auch funktionelle Aspekte bei der Analyse von Mutanten zu berücksichtigen, um deren Rolle in biologischen Systemen umfassend zu verstehen.

Im Hinblick auf das Modellproteasom Ta20S könnten zusätzliche kinetische Messungen mit verschiedenen Substraten das Verständnis der Interaktionsstellen der Untereinheiten weiter vertiefen. Die Anwendung und der Bau eines neuen Plasmids könnten die Durchführung dieser Experimente erleichtern. Langfristig sollten die gewonnenen Erkenntnisse auf das menschliche System übertragen werden, wobei diese Arbeit den ersten Schritt darstellt. Studien am menschlichen 20S-Proteasom könnten schließlich zu einem umfassenderen Verständnis der Aktivität und Regulation des Proteasoms führen.

5. Literatur

- [1] Campbell, M.G., et al, "2.8 Å resolution reconstruction of the *Thermoplasma acidophilum* 20S proteasome using cryo-electron microscopy," *eLife*, 2014. [Online]. Verfügbar unter: <https://elifesciences.org/articles/06380>
- [2] Goldberg, A. L., St. John, A. C., & Mitch, W. E., "Mechanisms and regulation of protein degradation in mammalian and bacterial cells: Advances in Enzyme Regulation," Nr. 15, 63--69, 1976.
- [3] J. M. Fagan, L. Waxman und A. L. Goldberg, "Skeletal muscle and liver contain a soluble ATP + ubiquitin-dependent proteolytic system," *The Biochemical journal*, Jg. 243, Nr. 2, S. 335–343, 1987, doi: 10.1042/bj2430335.
- [4] N. E. Tawa, R. Odessey und A. L. Goldberg, "Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles," *The Journal of clinical investigation*, Jg. 100, Nr. 1, S. 197–203, 1997, doi: 10.1172/JCI119513.
- [5] Hough, R., Pratt, G., Rechsteiner, M., "Ubiquitin-lysozyme conjugates: identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates.," *J Biol Chem*, S. 8303–8313, 1987.
- [6] Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, Beth Levine, "Methods in mammalian autophagy research," *Cell*, Nr. 3, S. 313–326, 2010.
- [7] D. Finley, "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome," *Annual review of biochemistry*, Jg. 78, S. 477–513, 2009, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.
- [8] A. Hershko und A. Ciechanover, "The ubiquitin system for protein degradation," *Annual review of biochemistry*, Jg. 61, S. 761–807, 1992, doi: 10.1146/annurev.bi.61.070192.003553.
- [9] G. Ben-Nissan und M. Sharon, "Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway," *Biomolecules*, Early Access. doi: 10.3390/biom4030862.
- [10] B. Dahlmann, L. Kuehn, A. Grziwa, P. Zwickl und W. Baumeister, "Biochemical properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*," *European journal of biochemistry*, Jg. 208, Nr. 3, S. 789–797, 1992, doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17249.x.
- [11] T. Tamura *et al.*, "The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*," *Cell*, Jg. 5, Nr. 7, S. 766–774, 1995.
- [12] A. Nooka, C. Gleason, D. Casbourne und S. Lonial, "Relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma with a focus on carfilzomib," *Biologics : targets & therapy*, Early Access. doi: 10.2147/BTT.S24580.

- [13] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister und R. Huber, "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution," *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 268, Nr. 5210, S. 533–539, 1995, doi: 10.1126/science.7725097.
- [14] P. Zwickl, A. Grziwa, G. Puehler, B. Dahlmann, F. Lottspeich und W. Baumeister, "Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase," *Biochemistry*, Jg. 31, Nr. 4, S. 964–972, 1992.
- [15] O. Coux, K. Tanaka und A. L. Goldberg, "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes," *Annual review of biochemistry*, Jg. 65, S. 801–847, 1996, doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.004101.
- [16] A. Förster und C. P. Hill, "Proteasome degradation: enter the substrate," *Trends in cell biology*, Jg. 13, Nr. 11, S. 550–553, 2003, doi: 10.1016/j.tcb.2003.09.001.
- [17] J. Rabl, D. M. Smith, Y. Yu, S.-C. Chang, A. L. Goldberg und Y. Cheng, "Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases," *Molecular cell*, Jg. 30, Nr. 3, S. 360–368, 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.004.
- [18] M. Groll *et al.*, "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution," *Nature*, Jg. 386, Nr. 6624, S. 463–471, 1997, doi: 10.1038/386463a0.
- [19] M. Groll *et al.*, "A gated channel into the proteasome core particle," *Nature structural biology*, Jg. 7, Nr. 11, S. 1062–1067, 2000, doi: 10.1038/80992.
- [20] M. J. Kunjappu und M. Hochstrasser, "Assembly of the 20S proteasome," *Biochimica et biophysica acta*, Early Access. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.008.
- [21] T. L. Religa, R. Sprangers und L. E. Kay, "Dynamic regulation of archaeal proteasome gate opening as studied by TROSY NMR," *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 328, Nr. 5974, S. 98–102, 2010, doi: 10.1126/science.1184991.
- [22] I. Sahu und M. H. Glickman, "Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome," *Biochemical Society transactions*, Jg. 49, Nr. 2, S. 629–644, 2021, doi: 10.1042/BST20200382.
- [23] A. Lupas, J. M. Flanagan, T. Tamura und W. Baumeister, "Self-compartmentalizing proteases," *Trends in biochemical sciences*, Jg. 22, Nr. 10, S. 399–404, 1997, doi: 10.1016/S0968-0004(97)01117-1.
- [24] P. Zwickl, E. Seemüller, B. Kapelari und W. Baumeister, "The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis," *Advances in protein chemistry*, Jg. 59, S. 187–222, 2001, doi: 10.1016/S0065-3233(01)59006-3.
- [25] A. M. Ruschak, T. L. Religa, S. Breuer, S. Witt und L. E. Kay, "The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state," *Nature*, Jg. 467, Nr. 7317, S. 868–871, 2010, doi: 10.1038/nature09444.

- [26] W. Heinemeyer, M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon und D. H. Wolf, "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing," *J Biol Chem*, Jg. 272, Nr. 40, S. 25200–25209, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.40.25200.
- [27] E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber und W. Baumeister, "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease," *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 268, Nr. 5210, S. 579–582, 1995, doi: 10.1126/science.7725107.
- [28] J. A. Brannigan *et al.*, "A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation," *Nature*, Jg. 378, Nr. 6555, S. 416–419, 1995, doi: 10.1038/378416a0.
- [29] M. Unno *et al.*, "The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 ?? resolution," *Structure*, Jg. 10, Nr. 5, S. 609–618, 2002.
- [30] K. C. Felderer, "Untersuchungen zur Substrattranslokation in das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*," Technische Universität München, 2006.
- [31] I. Dolenc, E. Seemüller und W. Baumeister, "Decelerated degradation of short peptides by the 20S proteasome," *FEBS letters*, Jg. 434, Nr. 3, S. 357–361, 1998, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01010-2.
- [32] L. Ditzel, R. Huber, K. Mann, W. Heinemeyer, D. H. Wolf und M. Groll, "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome," *Journal of molecular biology*, Jg. 279, Nr. 5, S. 1187–1191, 1998, doi: 10.1006/jmbi.1998.1818.
- [33] E. M. Huber, W. Heinemeyer, X. Li, C. S. Arendt, M. Hochstrasser und M. Groll, "A unified mechanism for proteolysis and autocatalytic activation in the 20S proteasome," *Nature communications*, Early Access. doi: 10.1038/ncomms10900.
- [34] N. Benaroudj, P. Zwickl, E. Seemüller, W. Baumeister und A. L. Goldberg, "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation," *Molecular cell*, Jg. 11, Nr. 1, S. 69–78, 2003.
- [35] N. Benaroudj und A. L. Goldberg, "PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaeobacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone," *Nature cell biology*, Jg. 2, Nr. 11, S. 833–839, 2000, doi: 10.1038/35041081.
- [36] A. A. Horwitz, A. Navon, M. Groll, D. M. Smith, C. Reis und A. L. Goldberg, "ATP-induced structural transitions in PAN, the proteasome-regulatory ATPase complex in Archaea," *J Biol Chem*, Early Access. doi: 10.1074/jbc.M702846200.
- [37] A. Köhler, P. Cascio, D. S. Leggett, K. M. Woo, A. L. Goldberg und D. Finley, "The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release," *Molecular cell*, Jg. 7, Nr. 6, S. 1143–1152, 2001.
- [38] D. H. Wolf und W. Hilt, "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal," *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1695, 1-3, S. 19–31, 2004, doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.007.

- [39] D. M. Smith, G. Kafri, Y. Cheng, D. Ng, T. Walz und A. L. Goldberg, "ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins," *Molecular cell*, Jg. 20, Nr. 5, S. 687–698, 2005.
- [40] D. Voges, P. Zwickl und W. Baumeister, "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis," *Annual review of biochemistry*, Jg. 68, S. 1015–1068, 1999, doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.1015.
- [41] A. L. Kierszenbaum, "The 26S proteasome: Ubiquitin-mediated proteolysis in the tunnel," *Mol. Reprod. Dev.*, Jg. 57, Nr. 2, S. 109–110, 2000, doi: 10.1002/1098-2795(200010)57:2%3C109::AID-MRD1%3E3.0.CO;2-9.
- [42] M. Groll und R. Huber, "Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle," *The international journal of biochemistry & cell biology*, Jg. 35, Nr. 5, S. 606–616, 2003, doi: 10.1016/S1357-2725(02)00390-4.
- [43] Z. Yu, Y. Yu, F. Wang, A. G. Myasnikov, P. Coffino und Y. Cheng, "Allosteric coupling between α -rings of the 20S proteasome," *Nature communications*, Early Access. doi: 10.1038/s41467-020-18415-7.
- [44] F. W. Studier und B. A. Moffatt, "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes," *Journal of molecular biology*, Jg. 189, Nr. 1, S. 113–130, 1986, doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- [45] S. M. Breuer, "Substrat-Translokation im 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*," 2010. [Online]. Verfügbar unter: <https://mediatum.ub.tum.de/?id=993392>
- [46] M. Classen, S. Breuer, W. Baumeister, R. Guckenberger und S. Witt, "Force spectroscopy of substrate molecules en route to the proteasome's active sites," *Biophysical journal*, Jg. 100, Nr. 2, S. 489–497, 2011.

6. Zusatzmaterial

pRSF::Ta20S plasmidsequenz

ACTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACG
ATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGG
GTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTT
ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCCAGG
GTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGC
CCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCCAGCAGGCGAAAATCCT
GTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCC
ACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCG
CCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCA
GCATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCT
ATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCG
CCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGAC
CAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATG
GGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCA
CAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGCGTTG
CGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATC
GACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTT
GCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTT
TGCCCAGCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGC
TTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAA
ACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCAC
ATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTT
TGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTA
GGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAA
ATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCA
CCACAGCCAGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGATCAGACTTTAGA
AACTGGTACAACCACGGTTGGTATTACACTGAAAGACGCCGTAATAATGGCAACTGAAA
GGCGTGTACAATGGAGAATTTTCATCATGCACAAGAATGGTAAAAAGCTGTTCCAGATC
GACACTTATACGGGGATGACAATAGCCGGCCTTGTGGGAGATGCCCAAGTACTGGTAA
GGTATATGAAGGCAGAGCTTGAACTTTACAGGCTCCAGAGAAGAGTAAACATGCCAATA
GAGGCTGTTGCCACTCTGCTTTCAAACATGCTCAACCAGGTAAAATACATGCCTTACAT

GGTCCAGCTGCTTGTGGGTGGAATTGATACAGCTCCCCACGTATTTTCCATAGATGCG
GCTGGAGGTTCCGTTGAGGATATCTATGCCAGCACAGGATCAGGCTCACCATTCGTAT
ACGGCGTTCTCGAATCGCAGTATAGCGAAAAGATGACCGTCGATGAAGGTGTCGATCT
TGTGATAAGGGCCATAAGCGCGGCAAAGCAGAGGGATTGAGCATCTGGAGGTATGATA
GATGTTGCGGTTATTACTAGGAAAGACGGATATGTCCAGCTTCTACCGATCAGATAGA
ATCAAGGATCAGGAAGCTCGGATTAATTCTGGCGGCAGCGGAAAACCTGTATTTTCAG
GGACACCACCACCACCACCTAACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGG
GTCGCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTC
TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAACAGGGCCAGATGGCT
TACGATAGAGCGATTACGGTTTTTTTACCAGATGGTAGACTTTTTCCAGGTAGAGTATGC
AAGGAAGCAGTTAAGAAAGGTTCAACGGCGCTCGGTATGAAATTCGCAAATGGTGTG
CTCTTGATATCCGATAAGAAGGTAAGAAGCAGACTTATTGAGCAGAATTC AATTGAAAA
GATACAGCTTATAGATGATTATGTTGCCGACGTGACGTCCGGGCTGGTGGCAGACGCG
AGAGTACTTGTGGACTTTGCCAGGATAAGCGCCCAGCAGGAAAAGGTAACGTACGGAT
CGCTTGTAATATTGAGAATCTAGTTAAGAGAGTTGCTGACCAGATGCAGCAGTACACA
CAGTACGGTGGCGTAAGGCCATACGGTGTATCGCTGATCTTCGCTGGCATAGATCAGA
TCGGCCCAAGGCTGTTGACTGCGATCCCGCCGGTACTATAAATGAGTACAAGGCAAC
GGCCATCGGATCGGGCAAAGATGCCGTTGTGAGCTTCTTGAGCGCGAATACAAGGAA
AACCTGCCCAGAGAAGGAAGCAGTGACGCTTGAATAAAGGCGCTGAAATCTTCCCTTG
AGGAGGGCGAAGAGCTTAAGGCTCCGGAGATCGCATCAATAACGGTGGGAAATAAGTA
CAGGATATACGATCAGGAGGAAGTTAAAAATTTCTTTGACTCGAGTCTGGTAAAGAAA
CCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTA
ACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC
GGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAACCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACT
GCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGAC
CCTGCCCTGAACCGACGACAAGCTGACGACCGGGTCTCCGCAAGTGGCACTTTTTCGG
GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTC AATATGTATCCG
CTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATA
TCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTCA
CCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTC
CAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAAT
CACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAG
ACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACC
GTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGGTGCTGTTAAAAGGA
CAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAA
TATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCG
CAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGGAAG

AGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAA
CGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGA
TAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCA
GCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCT
CATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGCATGCAGCGCTCTTCCGCTTCC
TCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTCGTTGACTGCGGCGAGCGGTGTCAGCTCACT
CAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAAGCCGGAAAGAACATGTG
AGCAAAAAGCAAAGCACCGGAAGAAGCCAACGCCGCAGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGCCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTC
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTTGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGG
GCTGTGTGCACGAACCCCCGTTGAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAAC
TGATTTAGAGGACTTTGTCTTGAAGTTATGCACCTGTTAAGGCTAAACTGAAAGAACAGA
TTTTGGTGAGTGCGGTCCTCCAACCCACTTACCTTGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGC
GAACCTTGAGAAAACCACCGTTGGTAGCGGTGGTTTTTCTTTATTTATGAGATGATGAAT
CAATCGGTCTATCAAGTCAACGAACAGCTATTCCGTT