



EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Als aller erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Zangger bedanken der es mir überhaupt ermöglichte diese Masterarbeit zu verfassen. Ohne seine moralische und tatkräftige Unterstützung wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern sowie meiner Großmutter bedanken die mich durch das gesamte Studium finanziell unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gebührt Sergio Pulido Muñoz der mir von Anfang an zur Seite stand und viele Tips und Tricks gezeigt hat. Auch möchte ich mich bei Gabriel Wagner bedanken der mit mir geduldig viele Messungen am NMR Spektrometer durchgeführt hat.

Ein weiterer großer Dank gebührt Helge Meyer der mir mit Rat und Tat im PD1-CPD Projekt unterstützt hat.

Natürlich dürfen auch die restlichen Mitglieder der Arbeitsgruppe nicht vergessen werden: Nina Gubensäck, Krishna Bhattiprolu Chaitanya, Simon Glanzer, Bernd Werner, Betti Höfer, Fabio Falsone. Viele Dank für die interessanten Gespräche und die amüsanten Pausen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abstract	4
Zusammenfassung	5
1 Material und Methoden.....	6
1.1 Material	6
1.1.1 Chemikalien	6
1.1.2 ¹⁵ N, ¹³ C, ² H Markierte Chemikalien	7
1.1.3 Antibiotika	7
1.1.4 Zellen	7
1.1.5 Plasmide	7
1.1.6 Enzyme.....	7
1.1.7 Agarplatten.....	8
1.1.8 Medien	8
1.1.9 Puffer.....	9
1.1.10 Gelelektrophorese	11
1.1.11 Standards.....	12
1.1.12 Verbrauchsmaterial	12
1.1.13 Stocks	13
1.1.14 Kits	13
1.1.15 Geräte	13
1.2 Methoden.....	15
1.2.1 Site Directed Mutagenesis Protokoll zur Erzeugung von jeweils 4 verschiedenen TcpH PPD Konstrukten in den pET-Vektoren MBP, Nus, Trx, Zt2	15
1.2.2 Expressionstest von TcpH-PPD Konstrukten	18
1.2.3 Expression und Aufreinigung von TcpH-FL-His in Inclusion bodies	19
1.2.4 Verpackung von TcpH-FL-His in SDS und DPC Mizellen für die CD-Spektroskopie ...	20
1.2.5 CD-Spektroskopie von TcpH-FL-His in SDS und DPC Mizellen	20

1.2.6	Triple Markierung und DPC Verpackung von TcpH-FL-His.....	21
1.2.7	Klonierung von PD1-CPD in pET-Zt2 Vektor	22
1.2.8	Expression und Aufreinigung von PD1-CPD-Zt2	23
1.2.9	¹³ C und ¹⁵ N Markierung von PD1-CPD-Zt2.....	24
1.2.10	Phosphorylierung und Aufreinigung von phosphoryliertem PD1-CPD-Zt2 aus HeLa-Zelllysat	24
1.2.11	NMR-Messung.....	25
2	Einleitung Teil TcpH	26
2.1	Die Cholera.....	26
2.1.1	Erreger, Vorkommen und Krankheitsbild.....	26
2.1.2	Diagnose und Behandlung	27
2.1.3	Wirkungsmechanismus des Cholera-Toxins	28
2.2	Toxin coregulated pilus H (TcpH)	28
2.2.1	Eigenschaften.....	30
2.3	Ziel der Arbeit	31
3	Ergebnisse und Diskussion Teil TcpH	31
3.1	Die Konstrukte von TcpH	32
3.1.1	Expressionstest der Konstrukte.....	33
3.2	Inclusion bodies und Verpackung in SDS- und DPC-Mizellen.....	37
3.2.1	CD-Spektren und Sekundärstrukturanteilsberechnung.....	38
3.2.2	Triple Markierung	41
3.3	HSQC und Triple-resonance Experimente.....	42
4	Ausblick.....	43
5	Einleitung Teil PD1-CPD.....	43
5.1	Eigenschaften	44
5.2	Funktion und Mechanismus	45
5.3	Klinische Relevanz.....	46
5.4	Ziel der Arbeit	47

6	Ergebnisse und Diskussion	47
6.1	Expressionstest von PD1-CPD-Zt2	47
6.2	Doppelmarkierung, Aufreinigung und Triple-resonance Experimente von PD1-CPD	48
6.3	Phosphorylierungsstudien an PD1-CPD-Zt2.....	50
6.3.1	¹⁵ N-Markierung und Aufreinigung	50
6.3.2	Phosphorylierung und Aufreinigung.....	52
6.3.3	HSQC.....	54
7	Ausblick.....	54
8	Literaturverzeichnis	55

Abstract

Cholera is an acute intestinal infection disease present in developing countries and is associated with malnutrition and poor sanitary conditions. The infection arises mainly at the ingestion of food or water contaminated with the bacterium *Vibrio cholerae* which leads to a profuse watery diarrhea and can finally result in death.

The two main virulence factors of *V. cholerae* are the cholera toxin and the toxin-coregulated pilus. The regulation of both of these factors is provided by the transcription factor ToxT. ToxT on its part is regulated by the membrane-bound factors ToxR/ToxS and TcpP/TcpH partners. It has been shown that the interaction between TcpP and TcpH protects TcpP from proteolytic degradation and thereby regulates the ToxT activity.

The aim of this thesis was the structural characterization of TcpH by NMR.

I was able to purify the full length TcpH protein including an N-terminal His-tag. The protein was packed in DPC micelles which allowed acquiring NMR spectra.

Another project which is also a part of this thesis was the structural analysis of the cytoplasmic domain of the programmed death 1 protein (PD1-CPD) by NMR.

PD1 is a T-cell membrane protein and plays an important role in the negative regulation of an immune response. The activation of the PD1 pathway leads to phosphorylation of two tyrosines on the cytoplasmic domain which is a binding site for the phosphatase SHP-2. This interaction activates the phosphatase and decrease the activity of PIK3 and Akt lowering the production cytokine. As a result of the decreased cytokine distribution, the immune response is down regulated. Hence, PD1 is a major player in autoimmunity, transplantation tolerance and cancer diseases.

I was able to express, purify and to phosphorylate PD1-CPD in vitro. NHSQC as well as triple-resonance experiments were acquired by NMR.

Zusammenfassung

Die Cholera gehört zu den akuten Darminfektionen und wird durch das Bakterium *Vibrio cholerae* ausgelöst. Der Krankheitserreger wird typischerweise durch verunreinigtes Wasser oder infizierte Lebensmittel aufgenommen und verursacht innerhalb von wenigen Tagen schwere Durchfälle mit hohem Wasser- und Elektrolytverlust. Wenn Cholera nicht ordnungsgemäß behandelt wird, kann dies in kürzester Zeit zum Tode führen.

Die wichtigsten Virulenzfaktoren sind das Cholera Toxin und der „toxin-coregulated pilus“. Die Regulation der beiden Faktoren erfolgt durch den Transkriptionsfaktor ToxT. ToxT seinerseits wird durch die beiden Membranproteine ToxR und TcpP reguliert. Der Interaktionspartner von TcpP ist TcpH. Dieser verhindert den proteolytischen Abbau und beeinflusst signifikant die Regulation von TcpP.

Das Ziel der Arbeit war die strukturelle Charakterisierung von TcpH mittels NMR.

Es ist gelungen das vollständige TcpH aufzureinigen und durch Verpackung in DPC Mizellen Triple-resonance Spektren aufzunehmen.

Ein weiteres Projekt welches Teil dieser Arbeit ist, war die strukturelle Analyse der cytoplasmatischen Domäne (CPD) des „programmed death 1“ Proteins (PD1).

PD1 ist ein T-Zell Membran Protein welches eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der Immunantwort spielt. Die Aktivierung von PD1 führt zur phosphorylierung an zwei Tyrosinen an der CPD und zur Bindung der Phosphatase SHP-2. Die dadurch aktivierte SHP-2 setzt die Aktivität sowohl von PIK3 und Akt herab als auch die Ausschüttung von Cytokinen. Die Reduzierung der Cytokine drosselt die Immunantwort. Somit hat PD1 einen entscheidenden Einfluss auf Autoimmunität, Transplantationstoleranz und Tumorentstehung.

Es ist gelungen, dass PD1-CPD aufzureinigen und zu phosphorylieren. Desweiteren konnten NHSQC und Triple-resonance Spektren aufgenommen werden.

1 Material und Methoden

1.1 Material

1.1.1 Chemikalien

Acrylamid / N'N'-Methylenbisacrylamid 37,5:1; 40%	Acros Organics
Adenosin 5' - triphosphat 99%	Sigma Aldrich
Agar	Sigma Aldrich
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma Aldrich
Biotin	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Coomassie Blue R-250	Fisher Scientific
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich
Deuteriumoxid 99,90%D	Euriso-top
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethylenediaminetetraacetic acid (ETDA)	Sigma Aldrich
Glycerin ≥ 99,5%, wasserfrei	Roth
HCl	Roth
Imidazol ≥ 99%	Sigma Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
LB-Broth (Lennox)	Roth
Methanol	Roth
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid - Plätzchen ≥ 99%	Roth
Natriumchlorid CELLPURE® ≥ 99,5%	Roth
Natriumdodecylsulfat - Pellet (SDS)	Roth
Natriumhydrogensulfat / Natriumdihydrogensulfat	Acros Organics
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Roth

Thiamin	Sigma Aldrich
Titron® X-100	Sigma Aldrich
Trizma® Base	Sigma Aldrich
Urea 98%	Acros Organics

1.1.2 ¹⁵N, ¹³C, ²H Markierte Chemikalien

Ammoniumchlorid ¹⁵ N	Cortecnet
D-Glucose U-13C6	CIL
D-Glucose U13C6, D7	CIL
Dodecylphosphocholin D38	CIL

1.1.3 Antibiotika

Kanamycinsulfat	Fisher Scientific
-----------------	-------------------

1.1.4 Zellen

One Shot® BL21(DE3) Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Thermo Fisher

1.1.5 Plasmide

pETMBP	Umea University
pETNUS	Umea University
pETTrx	Umea University
pETZt2	Umea University

1.1.6 Enzyme

Benzonase	Novagen
DNase	Sigma Aldrich

KpnI	NEB
Lysozym aus Hühnerei	Sigma Aldrich
NcoI	NEB
Phosphatase	NEB
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
Tev Protease	EMBL
T4 Polynucleotide Kinase	NEB

1.1.7 Agarplatten

Agarplatten - TcpH/PD1 CPD

20 g/l LB-Broth

1,5% Agar

50 µg/ml Kanamycin

1.1.8 Medien

LB-Medium - TcpH/PD1 CPD

20 g/l LB-Broth

50 µg/ml Kanamycin

Minimalmedium - TcpH/PD1 CPD

300 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

1 ml/l Vitaminstock

1 ml/l Microsalzstock

2g /l Glucose (¹³C Glucose)

1,5 g/l ¹⁵NH₄Cl

6,0 g/l Na₂HPO₄

3,0 g KH₂PO₄

0,5 g/l NaCl

50 µg/ml Kanamycin

Vitaminstock (1000X)

1 mg/l Biotin

1 mg/ml Thiamin

Microsalzstock (1000x)

1,5 M ZnCl₂ 50 mM H₃BO₃

20 mM FeCl₃ 800 µM CuCl₂

150µM CoCl₂ 15µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4 H₂O

1.1.9 Puffer

In alle Puffer wurde 0,02% Natriumazid hinzugefügt, um organisches Wachstum zu verhindern.

Aufreinigungspuffer für TcpH

Basic-Puffer (pH 8)

20mM Tris HCl
150mM NaCl
10mM Imidazol

Lysis-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
1mg/ml Lysozym
Proteininhibitor (150µl/20ml Lysis Puffer)
Benzonase (1µl/20ml Lysis Puffer)
4mM β-Mercaptoethanol

Wash I-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
4mM β-Mercaptoethanol

Wash II-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
500mM NaCl
4mM β-Mercaptoethanol

Wash III-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
20mM Imidazol
4mM β-Mercaptoethanol

Eluation-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
400mM Imidazol
4mM β-Mercaptoethanol

TEV/Dialyse-Puffer (pH 8)

20mM Tris HCl
150mM NaCl
4mM β-Mercaptoethanol

Lysis-Puffer für Expressionstest (pH 8)

20mM Tris-HCl
150mM NaCl
20mM Imidazol
20mg/ml Lysozym
2mM β-Mercaptoethanol
5µl/ml Proteinaseinhibitor
10µg/ml DNase I
0,2% Triton-X-100

Aufreinigungspuffer für TcpH Inclusion Bodies

Lysis-Puffer (pH 7,5)

50mM Tris-HCl

Resuspension-Puffer (pH 7,5)

50mM Tris-HCl

05M NaCl
1mg/ml Lysozym
10µg/ml Dnase I
3mM MgCl₂

0,5M NaCl
Proteininhibitor (150µl/20ml Puffer)

Solubilization Puffer (pH 7,5)

50mM Tris-HCl
2mM β-Mercaptoethanol
Proteininhibitor (150µl/20ml Puffer)
8M Urea (aufgefüllt)

Aufreinigungspuffer für PD1-CPD

Basic-Puffer (pH 8)

20mM Tris HCl
150mM NaCl
10mM Imidazol

Lysis-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
1mg/ml Lysozym
Proteininhibitor (150µl/20ml Lysis Puffer)
Benzonase (1µl/20ml Lysis Puffer)

Wash I-Puffer (pH 8)

Basic Puffer

Wash II-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
500mM NaCl

Wash III-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
20mM Imidazol

Eluation-Puffer (pH 8)

Basic Puffer
400mM Imidazol

TEV/Dialyse-Puffer (pH 8)

20mM Tris HCl
150mM NaCl
4mM β-Mercaptoethanol

Phosphorylisierungspuffer für PD1-CPD

Lysis-Puffer (pH 7)

50mM Tris HCl
150mM NaCl
1% Triton-X-100
2mM TCEP
10mM MgCl₂
Proteinaseinhibitor
Phosphataseinhibitor

100mM ATP-Stock (pH 7)

10ml Lysis-Puffer (pH 7)
0,551g ATP
Eingestellt mit 10N NaOH auf pH 7

FPLC und NMR Puffer für TcpH und PD1-CPD

HisTrap-Puffer A (pH 7,4)

20mM NaPi
300mM NaCl
10mM Imidazol

HisTrap-Puffer B (pH 7,4)

20mM NaPi
300mM NaCl
500mM Imidazol

SEC Running-Puffer (pH 8)

50mM NaPi
300mM NaCl

SEC Equilibration-Puffer (pH 8)

50mM NaPi
50mM NaCl

NMR Puffer (pH 6,5)

50mM NaPi
150mM NaCl

1.1.10 Gelelektrophorese

DNA-Laufpuffer (TAE-Puffer pH 8)

15g/l Agar
1,2g/l Essigsäure
0,372g/l EDTA

SDS-Gele

Zur Separierung von Proteinen nach ihrer Masse wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese benutzt. Dazu wurde erst das Trenngel gegossen. Nach Polymerisation wurde ein 5%iges Sammelgel

direkt auf das Trenngel gegossen. In der folgenden Tabelle 1 sind die Mischungsverhältnisse für ein 12%iges bzw. 15%iges Gel zu entnehmen:

Tabelle 1: Mischungsverhältnisse für das Gießen von SDS-Gelen

Reagenz	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel
H ₂ O	10,7ml	8,8ml	7,25ml
40% Acrylamin	7,5ml	9,4ml	1,25ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	6,3ml	6,3ml	---
1M Tris-HCl, pH 6,8	---	---	1,25ml
SDS (10%)	0,25ml	0,25ml	0,1ml
APS (10%)	0,25ml	0,25ml	0,1ml
TEMED	0,01ml	0,012ml	0,01ml
Gesamtvolumen	25ml	25ml	10ml

SDS-Laufpuffer

3,03g/l Tris-HCl

14,4g/l Glycin

1g/l SDS

Coomassie Färbelösung

1,5g/l Coomassie Blue R-250

100ml/l Essigsäure

400ml/l Methanol

500ml/l destilliertes Wasser

Entfärbelösung

100ml/l Essigsäure

450ml/l Methanol

450ml/l destilliertes Wasser

1.1.11 Standards

Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175kDa)

NEB

1 kb DNA Ladder

NEB

2-log DNA Ladder

NEB

1.1.12 Verbrauchsmaterial

Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices 50ml MWCO: 3500

Merck Millipore

Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices 50ml MWCO: 3500

Merck Millipore

Cellstar Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One
Cuvette Semi-Micro High Form	Kartell S.p.A.
NMR Sample Tube S-5-600-7 (178mm)	Norell
NMR Shigemi Tube	Shigemi Co., LTD
NORM-JECT® 1ml, 25ml, 60ml	Henke Sass Wolf
Pasteurpipetten	Bartelt
PerfectPro Ni-NTA Agarose	5 PRIME
Petrischalen 94x15	VWR
PURADISC 25 AS 0,45µm Spritzenfilter	GE Healthcare
Reaction Tubes 1,5ml	Greiner Bio-One
Reaction Tubes 2,0ml	Greiner Bio-One
Röhrchen 5ml, 12/75mm	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Bartelt
Wägeschalen	Bartelt

1.1.13 Stocks

Protease Inhibitor Mix HP	SERVA
Broad Spectrum Phosphatase Inhibitor Cocktail	BOSTER Biological Tech.

1.1.14 Kits

peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab

1.1.15 Geräte

Biologic DuoFlow F10FP Workstation	BioRad
Biorad Mini-PRTEAN® Tetra Cell	BioRad
Bruker Avance III 700Mhz Spectrometer	Bruker
Systec VB-55 Autoklav	Bartelt
Cole Parmer 1100 Spectrophotometer	Cole Parmer
E-Box VX2 UV-Transilluminator	Peqlab
Ecocell 55 Brutschrank	MMM GmbH
Ecotron Typ HT Schüttelinkubator	Ecotron
Empty Gravity Flow Columns	BioRad

Eppendorf MiniSpin	Eppendorf
HisTrap™ HP 5ml	GE Healthcare
HiLoad™ 26/600 (Superdex 75pg)	GE Healthcare
Inkubator 1000 Heizeinheit	Heidolph
Kern Typ 440-47N Waage	Kern
Kern Typ ABJ 120-4M Waage	Kern
Mikrowelle	Panasonic
MR 3001 Magnetrührer	Heidolph
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab
PCR Workstation	Peqlab
pH 209 pH-Meter	Hanna Instruments
PowerPac HC-Elektrophoresekammer	BioRad
Peristaltikpumpe Minipuls 3	Gilson
Sonopuls HD 3100 Homogenisator	Bandelin
Thermomixer 5436 Thermo Shaker	Eppendorf
Typ 6-16KS Zentrifuge	Sigma
Unimax 1010 Schüttelinkubator	Heidolph
Universal 320R kühlbare Tischzentrifuge	Hettich Zentrifugen
XCell SureLock™ Elektrophoresekammer	Life Technologies

1.2 Methoden

1.2.1 Site Directed Mutagenesis Protokoll zur Erzeugung von jeweils 4 verschiedenen TcpH PPD Konstrukten in den pET-Vektoren MBP, Nus, Trx, Zt2

Das Site Directed Mutagenesis Protokoll basiert hauptsächlich auf einem New England Biolabs Protokoll mit dem einzigen unterschied, dass hier einzeln gekaufte Enzyme (NEB Enzyme) und nicht der "KLD enzyme mix" verwendet wurde. Das ganze Prozedere bestand aus PCR, DpnI Verdau, PCR Produkt phosphorylierung, Ligation, Transfromation und dauert ca. 10 Stunden. Das Ziel war, jeweils 4 verschieden lange Amplifikate (siehe 3.1) in den pET-Vektoren MBP, NUS, Trx und Zt2 zu erzeugen.

Primerdesign

Zu Beginn des Protokolls müssen Primer designed werden. Dazu wurde ein Online basiertes Programm [44] verwendet, mit dessen Hilfe die vier Primerpaare designed worden sind. Zusätzlich wurde ein fünftes Paar erzeugt, um das Konstrukt TcpH-Fulllength-His (TcpH-FL-His) aus dem pET-Zt2 Vektor zu erzeugen.

Tabelle 2: Primerpaar (35-145). Ta= Annealing Temperatur

Name (F/R)	Sequenz	Len	% GC	Tm	Ta *
TcpH-Trx_35 to 145_F	GGCACGATGATCATCGAC	18	56	60°C	63°C
TcpH-Trx_35 to 145_R	CATGGCGCCCTGAAAATAAAG	21	48	63°C	

Tabelle 3: Primerpaar (109 -145). Ta= Annealing Temperatur

Name (F/R)	Sequenz	Len	% GC	Tm	Ta *
TcpH-Trx_109 to 145_F	CAACTGGGCAAAGGCTGC	18	61	65°C	66°C
TcpH-Trx_109 to 145_R	CATGGCGCCCTGAAAATAAAG	21	48	63°C	

Tabelle 4: Primerpaar (104 -145). Ta= Annealing Temperatur

Name (F/R)	Sequenz	Len	% GC	Tm	Ta *
TcpH-Trx_104 to 145_F	CTCTCTATTTATCAACTGGGC	21	43	58°C	61°C
TcpH-Trx_104 to 145_R	CATGGCGCCCTGAAAATAAAG	21	48	63°C	

Tabelle 5: Primerpaar (86 -145). Ta= Annealing Temperatur

Name (F/R)	Sequenz	Len	% GC	Tm	Ta *
TcpH-Trx_86 to 145_F	AAACTGAACTTGATTCCAGATTAC	24	33	58°C	62°C

TcpH-Trx_86 to 145_R	CATGGCGCCCTGAAAATAAAG	21	48	63°C	
----------------------	-----------------------	----	----	------	--

Tabelle 6: Primerpaar (TcpH-FL-His). Ta= Annealing Temperatur

Name (F/R)	Sequenz	Len	% GC	Tm	Ta *
TcpH-Trx_86 to 145_F	GGCAGTGGTTCTGAGAATCTTTATTTTC	28	39	64°C	67°C
TcpH-Trx_86 to 145_R	CATGGGGTGATGGTGATGGTGATG	24	68	68°C	

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist heutzutage eine nicht mehr wegzudenkende molekularbiologische Methode um DNA zu vervielfältigen. In der folgenden Tabelle 7 wird die Zusammensetzung des PCR-Mixes dargestellt. Je nach Konstrukt, wurden die jeweiligen Forward und Reverse Primer (siehe Primerdesign) verwendet. Als Template wurde TcpH PPD MBP, TcpH PPD Nus, TcpH PPD Trx und TcpH PPD Zt2 verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktion-Mixes.

Reagenz	Volumen für 50µl Ansatz	Finale Konzentration
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase 10X Buffer	10µl	1X
DNTP's mix 10mM	1µl	0,2mM
10µM Forward Primer	2,5µl	0,5µM
10µM Reverse Primer	2,5µl	0,5µM
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase 2U/µl	0,25µl	0,5U
Template DNA (20ng/µl)	1µl	20ng
Nuclease freies Wasser	Auf 50µl auffüllen	

Nachdem der Mix in den PCR-Reaktionsröhrchen hergestellt worden ist, wurden diese in den PCR-Thermocycler gestellt und das folgende Programm (Tabelle 8) gestartet. Die Annealing-Temperaturen wurden je nach Primerpaar individuell eingestellt.

Tabelle 8: Temperaturprotokoll der PCR mit 25 Cyclen

Stufe	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiale Denaturierung	98	2min	
Denaturierung	98	0,5	←←
Annealing	(50-72)	0,5	↑ (25X)
Extension	72	0,5/Kb	→→
Final Extension	72	2min	
Hold	4-10	∞	

DpnI Verdau

Das DpnI Enzym gehört zur Familie der Endonuclease des Typs II und verdaut methylierte DNA. DpnI wurde in diesem Experiment hinzugefügt, um die Template DNA zu verdauen. Dazu wurde jeweils immer 1µl des Enzyms direkt in jeden PCR Ansatz hinzugefügt und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert.

PCR Produkt Phosphorylierung

Die Phosphorylierung eines PCR Produktes ist immer dann notwendig, wenn man mit Nicht-phosphorylierten Primern arbeitet. Eine Phosphorylierung ist aber von immenser Wichtigkeit, da eine Ligation nur dann stattfinden kann, wenn ein Phosphat am 5'-Ende des Amplifikates hängt. Hierzu wurden jeweils 2µl des mit DpnI behandelten PCR Ansatzes mit 15µl Nuklease-freien Wasser vermischt und bei 80°C für 20min inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz zum Abkühlen für 5min auf Eis gestellt. Dann wurden 2µl 10X T4 Ligase Puffer (NEB) und 1µl T4 Polynukleotid Kinase (PNK NEB) hinzugegeben und für 30min bei 37°C in den Inkubator gestellt. Dabei war zu beachten, dass nur T4 Ligase Puffer genommen wurde, da dieses 10mM ATP enthält!

Ligation

Zur Ligation der beiden Enden des Amplifikates braucht man eine Ligase. Dazu wurde jeweils 1µl der T4 Ligase (NEB) verwendet. Nach Pipettierung der Ligase in die Ansätze, wurde dieser für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Transformation

Die Transformation in gentechnisch veränderte kompetente Zellen dient einerseits der Vervielfältigung des vollständigen Konstruktes auf DNA Ebene andererseits aber auch zur Umsetzung des Konstruktes in Protein. Dazu wurden entweder Top10 Zellen (Vervielfältigung auf DNA Ebene) oder BL21 Zellen (Protein Produktion) verwendet. Der Ablauf lief wie folgt ab: 5µl des Ligationsansatzes wurde mit

50µl der kompetenten Zellen vermischt und für 30min auf Eis stehen gelassen. Nach 30 Sekunden eines "heat shocks" bei 42°C konnte die DNA nun in die Zellen aufgenommen werden. Dann wurden die Zellen für 5min auf Eis stehen gelassen damit sich die Zellmembran wieder vollständig verschließen konnte. Nach Hinzugabe von 700µl LB Medium (kein Antibiotika) wurden die Zellen dann für 1 Stunde bei 37°C im Inkubator wachsen bzw. erholen gelassen. Eine Stunde später wurden die Zellen abzentrifugiert, das Medium entfernt (es soll ca. 150µl an Medium übrigbleiben) und schließlich auf einer Agarplatte (mit Antibiotika) ausplattiert.

1.2.2 Expressionstest von TcpH-PPD Konstrukten

Ein Expressionstest dient in der Regel dazu, meist viele verschiedene Konstrukte schnell auf ihren Expressionslevel in den Zellen zu überprüfen. Einerseits soll damit festgestellt werden, ob das gewünschte Konstrukt sich überhaupt exprimieren lässt und andererseits bei welchen Bedingungen die höchste Expression verläuft. Hierzu wurden erst Übernachtskulturen (ONCs) mit den jeweiligen Konstrukten angesetzt. Am darauf folgenden Tag wurden 200µl der ONC als Inokulum für 20ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (50ml Tube) verwendet. Diese Proben wurden dann bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 - 0,8 wachsen gelassen bevor sie mit IPTG induziert wurden. Das IPTG bindet an den Repressor, sodass dieser dann nicht mehr an die DNA wieder binden kann und löst damit die Produktion des gewünschten Proteins aus. Je nach Protein, kann man durch die geeignete Wahl der Temperatur während der Expression entscheidend auf die Faltung und damit die dreidimensionale Struktur Einfluss nehmen. Typische Expressionstemperaturen bei *E.coli* liegen zwischen 16°C und 37°C. Nachdem die Zellen die Proteine exprimiert haben müssen diese aufgeschlossen werden. Zu den entstandenen Pellets wurde jeweils 1ml Lysis Puffer (Lysis Puffer für Expressionstest S.9) hinzugegeben und mit dem Sonicator bei einer 30%igen Amplitude mit 2 Sekunden ON und 2 Sekunden OFF aufgeschlossen. Die Probe war dabei die ganze Zeit auf Eis. Nachdem Zellaufschluss wurden die Proben für 30min bei 13400rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei separierte sich der lösliche vom unlöslichen Teil. Der unlösliche Teil befand sich dabei im Pellet und der lösliche Teil im Überstand. Der Überstand wurde vom Pellet getrennt. Das Pellet wurde in 500µl 8M Harnstoff aufgelöst. Ein Laemmli Puffer wurde daraufhin vorbereitet, um die Proteine darin für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese vorzubereiten. Der Laemmli Puffer ist kommerziell erhältlich und muss 1:10 mit β-Mercaptoethanol verdünnt werden. Anschließend wurde die Probe 3:1 im Puffer aufgenommen und für 10min bei 95°C gekocht. Hierbei entfalten sich die Proteine. Die Anlagerungen der SDS Moleküle an das Protein führen zur Linearisierung und Polarisierung mit einer negativen Ladung. Der lösliche als auch der unlösliche Teil der Probe wurde somit nach seinem Molekulargewicht im Gel aufgetrennt.

1.2.3 Expression und Aufreinigung von TcpH-FL-His in Inclusion bodies

Inclusion bodies oder auch „Einschlusskörperchen“ entstehen häufig bei der Expression von rekombinanten Proteinen in Zellen und sind nichts anderes als Proteinaggregate. Meistens handelt es sich um Proteine mit größeren hydrophoben Bereichen wie z.B. Membranproteinen. Um nun wieder diese Proteinaggregate löslich zu machen, wurden zahlreiche Methoden entwickelt wie etwa die „Verpackung“ in Mizellen. Da es sich bei TcpH um ein Membranprotein handelte, wurde der Versuch unternommen, dieses Protein in Inclusion bodies zu exprimieren. So erfolgte die Expression von TcpH-FL-His in einem 2L Kulturkolben (mit Schikanen). Dazu wurde 1 Liter LB-Medium hergestellt und autoklaviert. Die eigentliche Expression lief Übernacht bei 37°C im Schüttelinkubator ab. Nach dem die Zellen vom Medium am darauf folgenden Tag abzentrifugiert worden sind, wurde 20ml des Lysis Puffer (siehe Lysis Puffer inclusion bodies S.9) zum Pellet hinzugefügt und mit Hilfe der French Press lysiert. Nach der Lysierung wurden 200µl 100%iges Triton-X-100 hinzugegeben und für eine Stunde bei 20000g (4°C) zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt dient der Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen. Da das TcpH-FL-His als Inclusion body vorlag, gehörte es zur unlöslichen Fraktion und befand sich somit im "Pellet". Der Überstand konnte damit verworfen werden und das "Inclusion body Pellet" wurde nochmals mit dem Resuspendierungspuffer (siehe Resuspendierungspuffer S.9) gewaschen für eine Stunde bei 20000g (4°C) zentrifugiert. Der nächste Schritt war dann die Solubilisierung des "Inclusion body Pellets". Hierfür wurde nach dem Zentrifugationsschritt 20ml des Solubilisierungspuffers (siehe Solubilisierungspuffer S.10) hergestellt und zum Pellet hinzugegeben. Da 8M Harnstoff als Lösungsmittel diente, konnte eine teilweise Auflösung des Pellets festgestellt werden. Um den Auflösungsprozess zu verbessern, wurde das Pellet im Sonicator (30%ige Amplitude, 2sek ON und 2sek OFF für 10min) beschallt und Übernacht bei 4°C geschüttelt stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das aufgelöste Pellet wieder für eine Stunde bei 20000g (4°C) zentrifugiert. Der jetzt entstandene Überstand wurde nun zur Aufreinigung weiterverwendet. Die Aufreinigung erfolgte in einer Gravity Column, die mit Nickel Beads beladen war. Die Säule wurde erst mit 10 Säulenvolumen (CV) Wasser gewaschen um das Ethanol zu entfernen. Dann wurden zur Equilibrierung 10 Säulenvolumen Wash I Puffer (siehe Wash-Puffer S.10) verwendet. Nachdem der Überstand nochmals filtriert worden ist, wurde dieser zweimal über die Säule laufen gelassen, damit genügend Protein an das Säulenmaterial binden konnte. Anschließend folgten 3 weitere Reinigungsschritte mit jeweils 10 Säulenvolumen Wash-Puffer I, Wash-Puffer II und Wash-Puffer III (siehe Wash Puffer S.10). Zur Eluation wurde ebenfalls 10 Säulenvolumen des Eluations-Puffers (siehe Eluations Puffer S.10) verwendet. Um nun den Harnstoff vollständig zu entfernen, wurde das Eluat gegen Wasser dialysiert. Die Dialyse verlief in einem Dialyseschlauch Übernacht bei 4°C.

1.2.4 Verpackung von TcpH-FL-His in SDS und DPC Mizellen für die CD-Spektroskopie

SDS und DPC Moleküle bilden bei bestimmten Konzentrationen Mizellen aus, die dazu verwendet werden können, um membranähnliche Zustände zu erzeugen. Damit können Membranproteine löslich gemacht werden. Der Vorgang zur Herstellung der Proben für die CD-Spektroskopie lief wie folgt ab. Nachdem der Harnstoff entfernt worden ist, wurde das präzipitierte Protein zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in zwei Teile gesplittet. Zu einem Teil wurde dann eine 200mM SDS Lösung (200mM SDS in 50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 2mM β -ME pH 7,5 Lösung) und zum anderen Teil eine 100mM DPC Lösung (100mM DPC in 50mM Tris HCl, 150mM NaCl, 2mM β -ME pH 7,5 Lösung) hinzugegeben, von der aus dann SDS Verdünnungen (8,2mM, 20mM, 50mM, 100mM) bzw. DPC Verdünnungen (100mM, 50mM, 20mM) erstellt worden sind.

1.2.5 CD-Spektroskopie von TcpH-FL-His in SDS und DPC Mizellen

Neben den bekannten Methoden zur Aufklärung von Proteinstrukturen wie der Röntgenstrukturanalyse oder der NMR Spektroskopie ist die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) eine recht einfache und schnelle Methode zur Untersuchung der allgemeinen Konformation von Proteinen. So können CD-Spektren dazu verwendet werden, die Anteile von α -Helix, β -Faltblatt oder random coil Strukturelementen in einem Protein zu bestimmen. Natürlich kann keine detaillierte Strukturaufklärung mittels CD-Spektroskopie betrieben werden, aber aufgrund der simplen Handhabung des Gerätes und der unkomplizierten Vorbereitung der Proben kann in kürzester Zeit der Gehalt an Sekundärstrukturelementen berechnet werden, um so eine erste Idee über das Protein bekommen werden. Die CD-Spektroskopie wurde also dazu verwendet, um einen ersten strukturellen Überblick über das TcpH-FL-His zu erhalten. Nach der Präparation aller SDS und DPC Verdünnungen von TcpH-FL-His, wie unter 1.2.4 beschrieben, wurde erst die jeweilige Konzentration berechnet, indem die Absorption mit dem UV/Vis Spektrometer ermittelt wurde. Basierend auf dem Lambert-beerschen Gesetz (1) kann aus der Extinktion und dem Extinktionskoeffizient und der Schichtdicke der Küvette die Konzentration ermittelt werden.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Anschließend wurden die mean residue ellipticity Werte mit folgender Formel (2) berechnet.

$$mRE = \frac{c \left(\frac{mg}{ml} \right)}{M (Da) \cdot \#peptidebonds} \quad (2)$$

Durch Einfügen der jeweiligen Konzentrationen, dem Molekulargewicht (17624,3 Da) und der Anzahl an Bindungen (155) wurden die mREs berechnet. Mit diesen Daten konnte dann mit Hilfe des Programms „SpectraManager“ die Molare Elliptizität in Abhängigkeit der Wellenlänge berechnet werden und als CD-Spektren (siehe 3.2.1) dargestellt werden. Um nun auch die sekundärstrukturellen Anteile von TcpH-FL-His zu berechnen wurde das Online Tool „dichroweb“ [26] benutzt.

1.2.6 Triple Markierung und DPC Verpackung von TcpH-FL-His

Die Markierung der Proteine mit ^{15}N , ^{13}C und ^2H hat in der NMR eine essentielle Bedeutung. Häufig wird neben der Doppelmarkierung mit ^{15}N , ^{13}C auch die sogenannte Triple Markierung mit Deuterium verwendet um die Auflösung der Spektren zu verbessern. Um solche markierte Proteine herzustellen, wurde ein Minimal Medium verwendet. Die Isotopenquellen waren dabei $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{13}C -Glucose und D_2O . Im Folgenden wird das Prozedere für einen Liter doppelmarkiertes Minimal Medium (^{15}N , ^{13}C) beschrieben. Das Volumen kann je nach Verwendung jederzeit angepasst werden, solange die Konzentrationen (siehe Rezept Minimal Medium S.8) beibehalten werden. Alle Komponenten sollten sterilfiltriert bzw. autoklaviert sein bevor sie im Kulturkolben zusammengeführt werden. Bei einer Triple Markierung wird das Wasser gegen D_2O ausgetauscht. D.h. es ist penibelst darauf zu achten, dass so wenig wie möglich Wasser ins Medium gelangt. Auch alle Puffer sollten wasserfrei sein. Das Protokoll sah nun folgendermaßen aus: Als erstes wurde 870ml Wasser in einem Kulturkolben autoklaviert. Danach wurden 300 μl 1M Ca_2Cl , 1ml 1M Mg_2SO_4 , 1ml (1000X) Vitaminstock und 1ml (1000X) Mikrosalzstock hinzugefügt. Daraufhin wurden 50ml einer " $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ " Lösung hergestellt. Hierzu wurden 1,5g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und 2g ^{13}C -Glucose eingewogen, in Wasser gelöst, sterilfiltriert und ebenfalls zum Kulturkolben hinzugefügt. Abschließend wurden 100ml (10X) des Phosphatpuffers und 1ml (1000X) Kanamycin hinzugegeben. Um nun die Bakterien darin aufwachsen zu lassen, wurde erst eine LB-Medium-ONC mit dem Stamm welches das TcpH-FL-His enthielt angesetzt. Am nächsten Tag wurden 5ml aus dieser ONC entnommen und zu 20ml Minimal Medium hinzugefügt. Diese gesamte ONC wurde schließlich am darauf folgenden Tag als Inokulum für den Kulturkolben verwendet. Nachdem die Kultur einen OD_{600} Wert von 0,6-0,8 erreicht hatte, wurde mit 1ml 1M IPTG induziert und Übernacht bei 37°C im Schüttelinkubator stehen gelassen. Die weiteren Schritte der TcpH-FL-His Aufreinigung erfolgten wie schon unter 1.2.3 beschrieben. Die finale Verpackung des nun Triple markierten TcpH-FL-His erfolgte mit deuteriertem DPC Mizellen. Dazu wurde das präzipitierte Protein in 1ml 100mM deuterierten DPC-Lösung (NMR-Puffer) aufgelöst und der pH-Wert mit HCl auf 3,5 eingestellt, um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten.

1.2.7 Klonierung von PD1-CPD in pET-Zt2 Vektor

Bei der Klonierung von PD1-CPD in den Zt2 Vektor wurde die klassische Variante der Klonierung verwendet. Als Ausgangskonstrukt wurde das PD1-CPD MBP verwendet. Wie bei einer klassischen Klonierung üblich, wurden Restriktionsenzyme (NcoI und KpnI) verwendet, um das PD1-CPD aus dem pET-MBP Vektor herauszuschneiden.

Tabelle 9: Reaktions-Mix für den Restriktionsverdau, um PD1-CPD aus dem pET-MBP Vektor herauszuschneiden.

PD1-CPD-MBP (1µg)	37,9µl
NcoI	2µl
KpnI	2µl
Cut smart buffer (10X)	5µl
H ₂ O	3µl
Insgesamt	50µl

Auch der „leere“ pET-Zt2 Vektor wurde mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, um das PD1-CPD später passend in den pET-Zt2 Vektoren zu ligieren.

Tabelle 10: Reaktions-Mix für den Restriktionsverdau, um den pET-Zt2 Vektor zu schneiden.

pET-Zt2 (1µg)	43µl
NcoI	1µl
KpnI	1µl
Cut smart buffer (10X)	5µl
H ₂ O	---
Insgesamt	50µl

Beide Restriktionsverdaue wurden für 3h bei 37°C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau wurden die gesamten 50µl in einem 1,5%igen Agarosegel bei 130V für 35min laufen gelassen und anschließend mit einem Gel Extraction Kit aufgereinigt (siehe Manual peqGOLD Gel Extraction Kit). Der nächste Schritt bestand darin, das aufgereinigte PD1-CPD mit dem ebenfalls aufgereinigten pET-Zt2 Vektor zu ligieren. Hierzu wurden die Verhältnisse 1:1 (Tabelle 12), 1:3 (Tabelle 11) und 1:5 (Tabelle 13) getestet.

Tabelle 11: Reaktions-Mix für die Ligation im Verhältnis 1:3

pET-Zt2 (28,2ng/μl)	5μl
PD1-CPD (3,6ng/μl)	6,4μl
10X T4 DANN Ligase Reaction Buffer	2μl
T4 DNA Ligase	1,5μl
H ₂ O	5,1μl
Insgesamt	20μl

Tabelle 12: Reaktions-Mix für die Ligation im Verhältnis 1:1

pET-Zt2 (28,2ng/μl)	5μl
PD1-CPD (3,6ng/μl)	2,1μl
10X T4 DANN Ligase Reaction Buffer	2μl
T4 DNA Ligase	1,5μl
H ₂ O	9,4μl
Insgesamt	20μl

Tabelle 13: Reaktions-Mix für die Ligation im Verhältnis 1:5

pET-Zt2 (28,2ng/μl)	5μl
PD1-CPD (3,6ng/μl)	10,7μl
10X T4 DANN Ligase Reaction Buffer	2μl
T4 DNA Ligase	1,5μl
H ₂ O	0,8μl
Insgesamt	20μl

Nach der Transformation in Top10 Zellen (siehe 1.2.1) konnten bei allen drei Ligationsansätzen reichlich Klone identifiziert werden.

1.2.8 Expression und Aufreinigung von PD1-CPD-Zt2

Nach der Transformation in Top10 Zellen wurden einige Klone zur Sequenzierung geschickt, um sicher zu gehen, dass die Ligation richtig funktioniert hat. Die richtigen Klone wurden dann für eine Plasmidpräparation (Miniprep) verwendet. Das Ziel der Miniprep ist es, möglichst viele Plasmide aus den Zellen zu extrahieren. Als erstes wurde mit den PD1-CPD-Zt2 Top10 Zellen eine 20ml LB-

Medium-ONC angesetzt. Am nächsten Tag wurde eine Miniprep mit dem peqGOLD Miniprep Kit (siehe Manual peqGOLD Miniprep Kit) durchgeführt. Das aufgereinigte PD1-CPD-Zt2 Plasmid wurde dann in BL21 Expressions-Zellen transformiert. Nach erfolgreicher Transformation in BL21 Zellen, konnten diese Zellen dazu verwendet werden, um 1 Liter einer markierten (^{15}N oder ^{13}C bzw. beides) bzw. nicht markierten Kultur herzustellen. Nachdem die Zellen genügend PD1-CPD hergestellt hatten (Übernacht bei 16°C), konnte mit der Aufreinigung begonnen werden. Dazu wurde die Kultur erst zentrifugiert um die Zellen vom Medium zu trennen. Das Zellpellet wurde im Lysis Puffer (siehe Aufreinigungspuffer PD1-CPD S.10) aufgelöst und in der French Press lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 1h bei 20000g (4°C) zentrifugiert um die löslichen Bestandteile von den unlöslichen zu trennen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand weiterverwendet. Um sicherzustellen, dass keine größeren Bestandteile die Säule schädigen können, wurde der Überstand nochmals durch einen Membranfilter gelassen. Das nun filtrierte Lysat wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine mit His-Trap Puffer A (siehe 11) kalibrierte HisTrap Säule geladen. Um zu gewährleisten, dass genügend PD1-CPD-Zt2 an der Säule hängen bleibt, wurde die Säule dreimal mit Lysat geladen. Die geladene Säule wurde dann an das FPLC System angehängt und gestartet. Zur Auftrennung wurden sowohl His-Trap Puffer A als auch His-Trap Puffer B (siehe S.11) im Gradienten Modus verwendet. Der nächste Schritt war dann, die Kollektivierung der richtigen Fraktionen und eine Size Exclusion Chromatography (SEC) um eine maximale Reinheit zu erreichen. Vor Beginn der Auftrennung wurde die SEC mit dem SEC Equilibration-Puffer (siehe S.11) äquilibriert und erst dann wurde die Säule mit den kollektivierten Fraktionen geladen. Auch hier wurde ein Gradient verwendet, wobei der zweite Puffer ein SEC Running-Puffer (siehe S.11) war.

1.2.9 ^{13}C und ^{15}N Markierung von PD1-CPD-Zt2

Die strukturelle Analyse von PD1-CPD mittels NMR ist ohne die Markierung mit ^{13}C oder ^{15}N Isotopen unmöglich. Das Prozedere für die Markierung ist die gleiche wie für TcpH-FL-His und wurde schon unter 1.2.6 beschrieben. Einzige Ausnahme war die Expression bei 16°C die Übernacht erfolgte. Da es sich hier nicht um ein Membranprotein handelte wurde auf DPC verzichtet.

1.2.10 Phosphorylierung und Aufreinigung von phosphoryliertem PD1-CPD-Zt2 aus HeLa-Zellysat

Die cytoplasmatische Domäne von PD1 hat zwei Tyrosine, die *in vivo* phosphoryliert werden. Um dies nun *in vitro* nachzuahmen, wurde PD1-CPD-Zt2 im Zellysat von HeLa Zellen (humane Epithelzellen aus einem Zervixkarzinoms) phosphoryliert. Die Idee dabei war die, dass die im Zellysat enthaltenen

Kinasen spezifische Phosphorylierungsdomänen am PD1-CPD erkennen und phosphorylieren. Das Prozedere sah folgendermaßen aus: Zu Beginn wurde das HeLa Zellpellet mit 500µl Lysis-Puffer (siehe Phosphorylierungspuffer S.11) aufgelöst und mit 5µl Phosphatase Inhibitor und 5µl Protease Inhibitor vermischt. Die Inkubation des Lysates erfolgte für 30min auf Eis, wobei jede 5-10min gevortext wurde. Nach der Inkubation wurde das Lysat für 30min bei 4°C „full speed“ zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen um damit weiterzuarbeiten. Um eine gesamt Proteinkonzentration des Lysates von >20mg/ml einzustellen, wurde der Bradford Assay hinzugezogen. Nach Verdünnung auf die richtige gesamt Proteinkonzentration, wurde zum Zelllysat sowohl 2-4ml 50µM PD1-CPD-Zt2 als auch ATP (Endkonzentration 10mM aus ATP-Stock siehe S.11) hinzugefügt und für 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste große Schritt, war die Aufreinigung des nun phosphorylierten PD1-CPD-Zt2. Hierzu wurde eine kleine Gravity Column (5cm) genommen, mit 500µl Nickel Resin beladen und mit Wash I-Puffer (siehe Aufreinigungspuffer PD1-CPD S.11) kalibriert. Das Lysat, welches auch das phosphorylierte PD1-CPD-Zt2 enthielt, wurde dreimal durch die Säule laufen gelassen, um sicher zu gehen, dass so viel wie möglich des Proteins an der Säule gebunden hat. Der nächste Waschschrift erfolgte mit 5CV Wash-II (siehe Aufreinigungspuffer PD1-CPD S.11) und die Eluation mit 1ml Eluation-Puffer (siehe Aufreinigungspuffer PD1-CPD S.11). So wurde nach der Eluation eine G25 Säule (siehe Manual PD MidiTrap™ G-25) verwendet, um den Eluation Puffer gegen einen NMR-Puffer (siehe NMR-Puffer S.11) auszutauschen.

1.2.11 NMR-Messung

Ein wesentlicher Faktor beim vermessen von Proben im NMR ist der Puffer, in dem die zu untersuchende Substanz oder das Protein gelöst ist. Darüber hinaus hat sowohl die Salzkonzentration als auch der pH-Wert einen immensen Einfluss und zwar nicht nur auf die Stabilität des Proteins sondern auch auf die Auflösung der Spektren. Der gängigste Puffer (siehe unter 1.1.9 NMR-Puffer S.11) in der Bio NMR ist ein 20-50mM Natriumphosphat Puffer mit einer 150mM Natriumchloridkonzentration, der meist einen physiologischen pH-Wert von 6-7 hat. Natürlich können je nach Experiment pH-Wert und Salzkonzentration dementsprechend variiert werden. Ein weiterer Faktor ist die Temperatur, die am Gerät eingestellt werden kann und in Kelvin angegeben wird. Zudem wurde allen Proben 10% Deuteriumoxid hinzugegeben. Alle in dieser Arbeit gemessenen Proben wurden am Bruker Avance III 700MHz Spectrometer durchgeführt.

2 Einleitung Teil TcPH

2.1 Die Cholera

Die Cholera gehört zu den akuten Darminfektionen und wird durch das Bakterium *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) ausgelöst. Der Krankheitserreger wird oft durch verunreinigtes Wasser oder infizierte Lebensmittel aufgenommen und verursacht innerhalb von wenigen Tagen schwere Durchfälle mit hohem Wasser- und Elektrolytverlust. Wenn Cholera nicht ordnungsgemäß behandelt wird, kann dies in kürzester Zeit zum Tode führen. Die durchschnittliche Todesrate pro Jahr liegt nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bei 100.000 - 120.000 wobei die Dunkelziffer vermutlich wesentlich höher liegt [1].

2.1.1 Erreger, Vorkommen und Krankheitsbild

V. cholerae ist ein fakultativ anaerobes, gramnegatives und nicht sporenbildendes Bakterium [2]. Es hat eine gekrümmte Stäbchen Form (Abbildung 1) und ist ca. 1,04 - 1,06µm groß [2]. Untersuchungen zeigten, dass das *V. cholerae* nicht nur im menschlichen Körper überleben kann, sondern auch die im Süß- bzw. Brackwasser enthaltenden Zoo- und Phytoplankton [2, 3]. So stammen die meisten Infektionen durch die Aufnahme von kontaminiertem Wasser (primär durch Fäkalien) oder durch infizierte Lebensmittel. Zu den potenziellen Lebensmitteln zählen Früchte [2], Gemüse [2], Fisch [5], Seefrüchte [4, 6], Milch- [7] und Fleischprodukte [8]. Nach oraler Aufnahme des Krankheitserregers gelangt dieser in den Gastrointestinaltrakt wo es sich einnistet und das Toxin (Cholera -A-B-Toxin) bilden kann. Die Inkubationszeit dauert ca. 2-3 Tage. Es folgen akute Durchfälle mit Übelkeit und Muskelkrämpfen. Der starke Wasser- und Elektrolytverlust (500-1000 ml pro Stunde) der dabei auftritt wirkt sich unter anderem auch auf das Kardiovaskuläre System aus, sodass eine Nichtbehandlung innerhalb von 24 Stunden zum Tode führen kann [2, 9].



Abbildung 1: TEM Aufnahme [23] von *V. cholerae* mit typischer Krümmung und Geißel

2.1.2 Diagnose und Behandlung

Die Diagnose erfolgt mittels Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose-Agar (TCBS) [10]. Hierbei werden die potenziellen Krankheitserreger für 24-48 Stunden bei 37°C kultiviert. *V. cholerae* fermentiert dabei die Succrose und bildet dadurch gelbe Kolonien, die anschließend isoliert und einem Oxidase Test unterzogen werden können. Die serotypische Zuordnung basiert auf einer O-Antigen-Antikörper Reaktion die mittels eines ELISAs durchgeführt werden kann. Fällt die Diagnose positiv aus, kann nun der Krankheitsverlauf auf zweierlei bekämpft werden. In erster Linie muss der Verlust von Elektrolyten gestoppt werden um den Kreislauf stabil zu halten. Dies geschieht über die Zugabe einer von der WHO empfohlenen Trinklösung, die eigentlich aus Elektrolytsalzen und Glucose besteht [11, 10]. Zweitens, kann die Bekämpfung durch die zusätzliche Gabe von Antibiotika wie Cotrimoxazol, Ciprofloxacin, Tetracycline [11] unterstützt werden. Nichtsdestoweniger zählt auch hier, wie bei vielen anderen Infektionskrankheiten der Satz: "Vorbeugung ist die beste Medizin". Da die Infektion meisten über den Fäkal-oralen Weg verläuft, sollten Maßnahme wie z.B. das gründliche waschen von Früchten und Gemüse, der Verzehr von nur pasteurisierten Milchprodukten und das vermeiden vom rohen Fleischverzehr dazu beitragen Infektionen zu vermeiden. Aber auch die eigene Körperhygiene wie das Händewaschen nach dem Toilettengang sollten dazu beitragen zukünftige Ausbreitungen zu verhindern.

2.1.3 Wirkungsmechanismus des Cholera-toxins

Obwohl das Cholera-toxin (Abbildung 2) nicht Teil dieser Arbeit ist, sollte der Wirkmechanismus trotzdem kurz erwähnt werden, da das klinische Erscheinungsbild einzig und allein auf das Cholera-toxin zurück zu führen ist. Das Cholera-toxin ist ein Protein des A-B-Typs.



Abbildung 2: Das Cholera-toxin aus PDB (1xtc) [24]. Zusehen ist die Pentamere B-Untereinheit und die Monomere A-Untereinheit.

Mit Hilfe der B-Komponente kann das Toxin an ein spezifisches Epithelzellengangliosid (GM1) binden. Die A-Komponente gelangt dann über die Plasmamembran in die Zelle und wird dort zu A₁ modifiziert. Die eigentliche Aufgabe von A₁ ist die Übertragung eines ADP-Ribosylrestes von NAD⁺ auf ein G-Protein. Hierbei wird die Adenylatcyclase dauerhaft aktiviert und die cAMP Konzentration in der Zelle steigt drastisch an. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Na⁺ - Pumpen inaktiviert werden und ein Einstrom von Cl⁻ - Ionen aus dem Blut in das Cytoplasma erfolgt. Der damit verbundene akute Wasserausstrom verursacht die typischen Symptome [12].

2.2 Toxin coregulated pilus H (TcpH)

Neben dem Cholera-toxin (CT), das das typische klinische Erscheinungsbild entstehen lässt, gibt es einen zweiten Virulenzfaktor, der für die Gastrointestinale Kolonisierung verantwortlich ist. Dies ist der „Toxin coregulated pilus (TCP)“ [13]. Beide Virulenzfaktoren (CT und TCP) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenität des Erregers und werden durch den Transkriptionsaktivator ToxT reguliert. Das TCP gehört zum Typ IV Pilus und hat einen 7nm großen Durchmesser und besteht hauptsächlich aus dem Protein TcpA (20,5KDa). Dieses Gen ist Teil des *tcp* Operons. Um dieses komplexe Gebilde

zu exprimieren benötigt es 15 weitere Gene (*tcpABCDEFGHIJNQRST*) die ebenfalls auf dem *tcp* Operon liegen [14]. Der genaue Mechanismus der Kolonisierung im Darm ist noch nicht ganz geklärt [15]. Die Transkription des *toxT* unterliegt zwei integralen Membranproteinen (ToxR und TcpP), die auf der inneren Membran des gramnegativen Bakteriums lokalisiert sind [16]. ToxR bindet an die -100 bis -69 *toxT* Promotorstelle während TcpP an die -51 bis -32 Regionen bindet [16]. Es gibt Hinweise, dass ToxR als Verstärker für die TcpP Promotor Bindung wirkt und das TcpP den alleinigen Kontakt zur RNA-Polymerase herstellt [15, 17]. ToxR seinerseits braucht das Membranprotein ToxS um eine maximale Transkriptionsaktivierung zu gewährleisten [18]. Das TcpP braucht für seine volle Funktionsfähigkeit ebenfalls ein Protein. Diese Funktion übernimmt das Transmembranprotein TcpH welches die Rolle eines Stabilisators hat [19]. Wie wichtig dieses Stabilisierungsprotein ist, zeigt sich wenn TcpH abwesend ist, denn dann wird das TcpP durch die Protease YaeL degradiert [20]. Die Transkription von *tcpPH* wird durch die beiden Proteine AphA und AphB stimuliert. AphA bindet an die -101 bis -71 *tcpPH* Promotorstellen und AphB an die -78 bis -43 Stelle [21]. So beeinflussen Umweltfaktoren, Quorum sensing und die Glucose Verfügbarkeit über die Expression von AphA-AphB und damit auch über die Transkription von *tcpPH*. In der folgenden Abbildung 3 wird der Mechanismus zur Transkriptionsaktivierung von ToxT nochmals dargestellt, denn dieses Protein ist letztendlich der eigentliche Aktivator für die beiden Virulenzfaktoren.

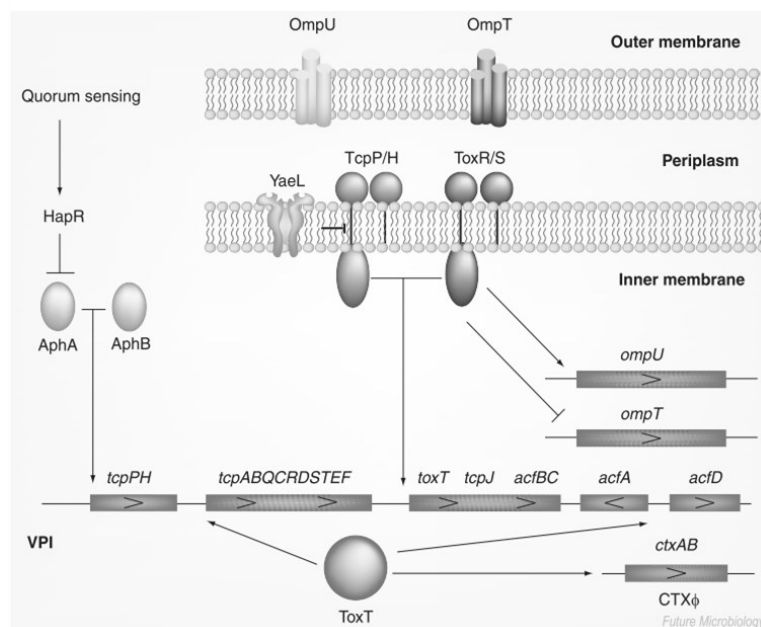


Abbildung 3: ToxT Regulierungsmechanismus [15]. Wie man sehen kann, aktivieren die beiden Proteine AphA-AphB die Transkription von TcpH und TcpP, die wiederum die Transkription von ToxT steuern. ToxT ist der direkte Transkriptionsaktivator des CT und TCP.

2.2.1 Eigenschaften

Im Folgenden wird sowohl die DNA-Sequenz als auch die Aminosäuresequenz von TcpH gezeigt.

DNA-Sequenz von TcpH. Der dunkel unterstrichene Bereich soll den Transmembranbereich darstellen und ist 87bp lang, wobei der hellere Bereich den periplasmatischen Sequenzbereich darstellt und 354bp lang ist.

```
CCATGGGCATGCATAAGAAATTAAAGGCATGGGGGGGTGCTGCGGGCTTGTTTGTGGTCGCACTGGGCGTCACCT
TAATTGCACTGCCGATGCGACAGAAAAATTCGCACGGCAGCATGATCATCGACGGCACCCTGACCCAGATCTTTT
CCACGTACCAGGGGAACCTGTCCAATGTCTGGCTCACCCAGACTGACCCGCAGGGTAACGTGGTTAAAAGCTGGA
CGACGCGCTATCAGACGCTGCCCCAGCCGAGCTCCCAGAACTGAACTTGATTCCAGATTACAGCGAAAGTAACG
TGTCCCGCGACTACAACGTGCTCTCTATTTATCAACTGGGCAAAGGCTGCTTTCTGGCTTTCCCTTATAACAAC
TGACCGCGAAAAAATGCTGGTTTTTCTCTCGAAACGCTTTCTGGGTTTCATATCATGAACCGCCTCGTTAAGGTA
CC
```

Proteinsequenz von TcpH. Der dunkle Bereich ist 29AS lang und soll den Transmembranteil darstellen. Der hellere Sequenzbereich ist die periplasmatische Domäne und ist 118AS lang.

```
Met G Met H K K L K A W G G A A G L F V V A L G V T L I A L P Met R Q K N S H G T
Met I I D G T V T Q I F S T Y Q G N L S N V W L T Q T D P Q G N V V K S W T T R Y
Q T L P D P S S Q K L N L I P D Y S E S N V S R D Y N V L S I Y Q L G K G C F L A
F P Y K Q L T A E K Met L V F L S K R F L G S Y H E P P R Stop
```

Die Tabellen 15 und 16 zeigen außerdem die physikochemischen Parameter vom gesamten TcpH und der periplasmatischen Domäne von TcpH, die mit Hilfe des Online Programms „ProtParam“ [22] berechnet wurden.

Tabelle 14: Physikochemische Parameter für TcpH

Gesamtzahl der Aminosäuren	147
Molekulargewicht [Da]	16460
Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] bei 280nm	26930
Theoretischer pI	9,64
Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren	15
Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren	8
Aliphatischer Index	85,51

Tabelle 15: Physikochemische Parameter der periplasmatische Domäne von TcpH

Gesamtzahl der Aminosäuren	118
Molekulargewicht [Da]	13527,3
Extinktionskoeffizient [$M^{-1} cm^{-1}$] bei 280nm	21430
Theoretischer pI	9,3
Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren	12
Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren	8
Aliphatischer Index	75,08

2.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Aufklärung des Transmembranproteins TcpH mittels liquid-state NMR. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von TcpH wurden für diese Fragestellung vier verschiedene Trunkierungen hergestellt und in die vier pET Vektoren MBP, Nus, Trx und Zt2 ligiert. Zusätzlich wurde das TcpH als Ganzes und ohne Solubilisierungs-Tags in inclusion bodies exprimiert, aufgereinigt und DPC-Mizellen verpackt. Basierend auf dieser Methode wurden anschließend NMR Spektren und CD Spektren für die Strukturaufklärung aufgenommen.

3 Ergebnisse und Diskussion Teil TcpH

Nach der Übernahme dieses Projektes von meinem Vorgänger Patrick Michael Köck, MSc. wurden erst alle seine Konstrukte nochmals sequenziert und dabei einige Unstimmigkeiten gefunden. Dies führte nach Absprache mit meinem Vorgesetzten unter anderem zu dem Schluss das TcpH Projekt komplett neu zu beginnen. Da die in dieser Arbeit erreichten Erkenntnisse schließlich dazu führten das TcpH aufzureinigen und erste NMR Spektren aufzunehmen, sollte an dieser Stelle kurz auf die Vorarbeiten eingegangen werden, die es überhaupt ermöglichten soweit zu kommen. Dabei soll aber auch die herausragenden molekularbiologischen Vorarbeiten bzgl. der periplasmatischen Domäne (PPD) die von meinem Vorgänger durchgeführt worden sind, dankend betont werden und es wird diesbezüglich auf seine Masterarbeit [14] verwiesen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zuerst die PPD von TcpH in die Vektoren pET- MBP, -Nus, -Trx und -Zt2 ligiert. Aufgrund bekannter Probleme mit der Löslichkeit [14], wurde versucht durch Kürzungen (nicht in dieser Arbeit gezeigt) am N- als auch am C-terminalen Teil dieses Problem in Griff zu bekommen. Zwar exprimierten die Zellen diese beiden Konstrukte, doch eine Aufreinigung konnte nicht erzielt werden. Das große Problem bei der Aufreinigung war, dass diese Konstrukte an die Ni^{2+} -Beads in der Gravity Column nicht gebunden hatten. Man entschloss sich weitere, kürzere

Konstrukte herzustellen um das Problem zu umgehen. Die Konstrukte die dabei hergestellt worden sind werden unter 3.1 graphisch dargestellt.

3.1 Die Konstrukte von TcpH

Die ersten Erkenntnisse über sekundärstrukturelle Merkmale von TcpH (Abbildung 4) wurden durch den „Disorder Prediction Meta-Server (Dismeta)“ [25] online gewonnen.

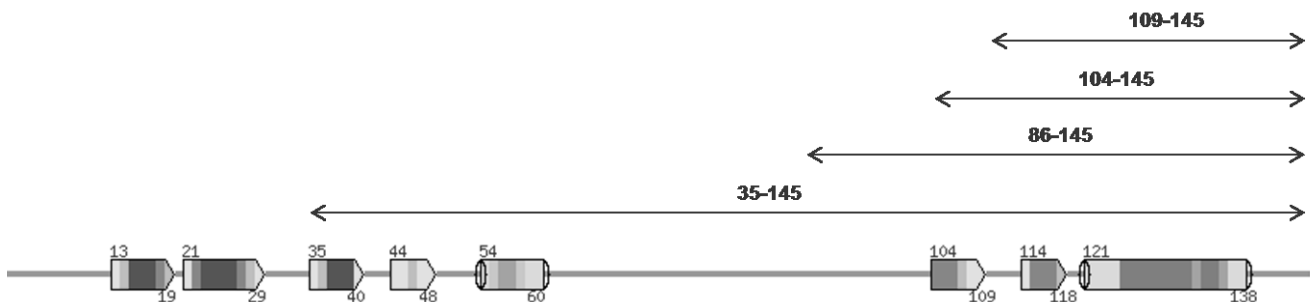


Abbildung 4: Graphische Darstellung der vier Trunkierungen die mittels Site Directed Mutagenesis Protokolls hergestellt worden sind. Wie man sieht, wurden die Sekundärstrukturmerkmale beibehalten. Die Pfeile sollen β -Sheet, die Zylinder α -Helices und der horizontale Strich unstrukturierte Bereiche darstellen.

Basierend auf dieser Darstellung wurden 4 verschiedene Trunkierungen (35-145, 86-145, 104-145, 109-145) hergestellt. Beim designen der Trunkierungen wurde darauf geachtet, alle Sekundärstrukturmerkmale als Ganzes zu lassen. Die Trunkierung **35-145** hatte eine Länge von 111bp, die Trunkierung **86-145** 60bp, **104-145** 42bp und **109-145** 37bp. Um noch die Löslichkeit weiter zu verbessern, wurden diese vier Trunkierungen in die pET-Vektoren MBP, Nus, Trx und Zt2 ligiert. Der Versuch diese 16 verschiedenen Konstrukte auf dem „klassischen“ Klonierungsweg zu erstellen, ist fehlgeschlagen. Auch eine langwierige und arbeitsintensive „trial and error“ Klonierungsarbeit erbrachte nicht die gewünschten Resultate bis das Side Directed Mutagenesis Protokoll (siehe 1.2.1) angewendet wurde und so endlich alle Konstrukte erschaffen werden konnten. Warum nun letztendlich dieses Protokoll erfolgreich war und nicht der „klassischen“ Weg, kann nicht genau gesagt werden. In der folgenden Tabelle 17 sind sowohl alle Molekulargewichte der Konstrukte, der Vektoren und der einzelnen Trunkierungen als auch die aliphatischen Indices zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung aller Molekulargewichte und aliphatischen Indices der Konstrukte und der einzelnen Trunkierungen

Trunkierung	MBP (43,5 KDa)	Nus (57,5 KDa)	Trx (14,5KDa)	Zt2 (10,4KDa)
35-145: 112 AA 12,8KDa <u>AIndex: 79,11</u>	56KDa	70,3KDa	27,3KDa	23,2KDa
86-145: 61 AA 7,1KDa <u>AIndex: 87,87</u>	50,3KDa	64,6KDa	21,6KDa	17,5KDa
104-145: 42 AA 4,9KDa <u>AIndex: 85,95</u>	48,1KDa	62,4KDa	19,4KDa	15,3KDa
109-145: 38 AA 4,4KDa <u>AIndex: 74,74</u>	47,6KDa	61,9 <u>KDa</u>	18,9KDa	14,8KDa

Alle 16 Konstrukte wurden sequenziert und in BL21 Expressionszellen transformiert.

3.1.1 Expressionstest der Konstrukte

Ein Expressionstest sollte Klarheit schaffen, ob sich die erzeugten Konstrukte in den Zellen überhaupt exprimieren lassen und ob sie löslich oder unlöslich sind. Wie in 1.2.2 beschrieben, wurde der Expressionstest durchgeführt. Hierbei wurden zwei verschiedene Expressionskonditionen verwendet. Ein Teil der Zellen wurde für 2,5h bei 37°C und der andere Teil Übernacht bei 16°C in den Inkubator gestellt. Was bei dem Expressionstest herausgekommen ist, wird in den folgenden Gelbildern 5,6,7,8,9 dargestellt. In allen Abbildungen zeigt sich eine Expression, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass alle Konstrukte in BL21 exprimierbar sind. Das Schema der Auftragung der einzelnen Fraktionen auf die Gele war die, dass immer die unlösliche (Pellet) und die lösliche (Supern.) Fraktion einer Kondition nebeneinander aufgetragen worden sind. Desweiteren wurden auch immer die gleichen Konstrukte, aber unterschiedlicher Konditionen (2,5h bei 37°C und Übernacht bei 16°C) nebeneinander aufgetragen. In der Abbildung 5 ist der Zeitpunkt Null d.h. ohne Induktion zu sehen. Dieser Zeitpunkt ist wichtig um festzustellen zu können, was die Zellen ohne Induktion produzieren. Nach Lyse der Zellen und Separierung der löslichen von der unlöslichen Fraktion zeigte sich ziemlich deutlich, dass bis auf zwei Konstrukte (TcpH MBP Mut. 86-145 und TcpH MBP Mut. 109-145 bei 16°C) alle anderen „Proteinkonstrukte“ sich in den unlöslichen Fraktionen (Pellet) befanden.

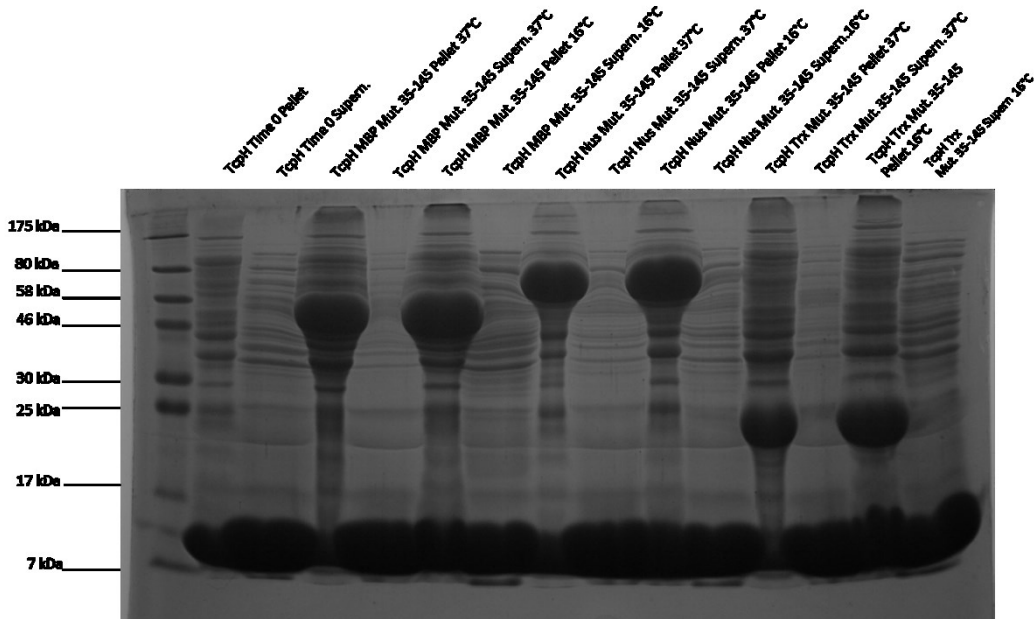


Abbildung 5: SDS-Gelbild nach Expressionstest. „Time 0“ repräsentiert die Zellen ohne Induktion. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. TcPH: Toxin coregulated pilus H; MBP: Maltose binding Protein; Nus: N- utilization substance protein; Trx: ThioredoxinA; Mut: Trunkierung.

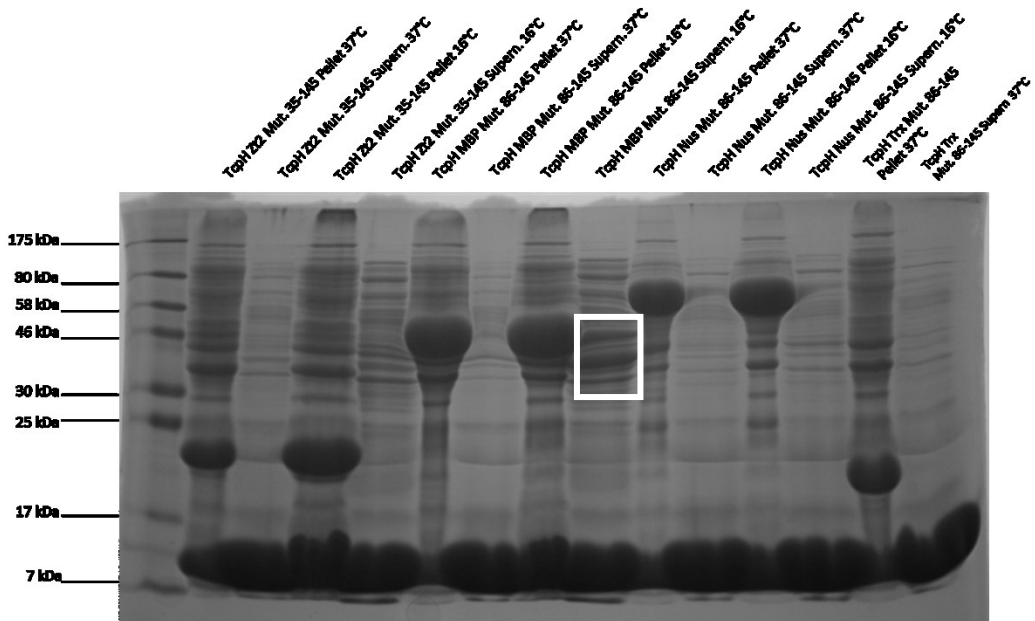


Abbildung 6: SDS-Gelbild nach Expressionstest. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. Der weiße Kasten markiert das Konstrukt, welches für die 1L Kultur-Expression verwendet wurde. TcPH: Toxin coregulated pilus H; MBP: Maltose binding Protein; Nus: N- utilization substance protein; Trx: ThioredoxinA; Zt2: IgG binding domain (Z-domain) of Staphylococcus aureus protein A; Mut: Trunkierung

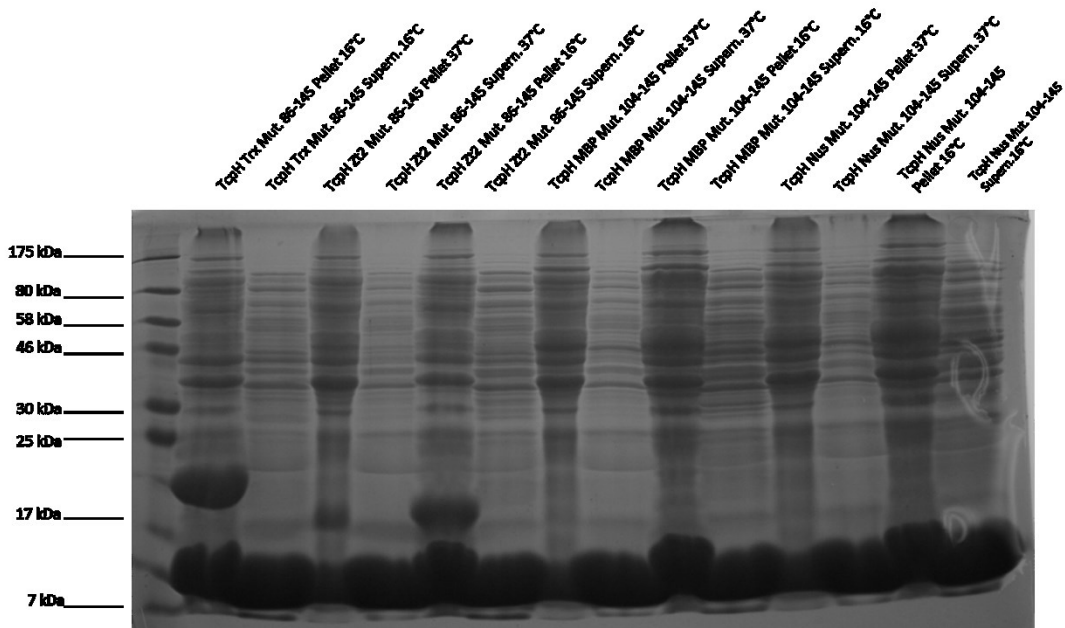


Abbildung 7: SDS-Gelbild nach Expressionstest. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. TcpH: Toxin coregulated pilus H; MBP: Maltose binding Protein; Nus: N- utilization substance protein; Trx: ThioredoxinA; Zt2: IgG binding domain (Z-domain) of Staphylococcus aureus protein A; Mut: Trunkierung.

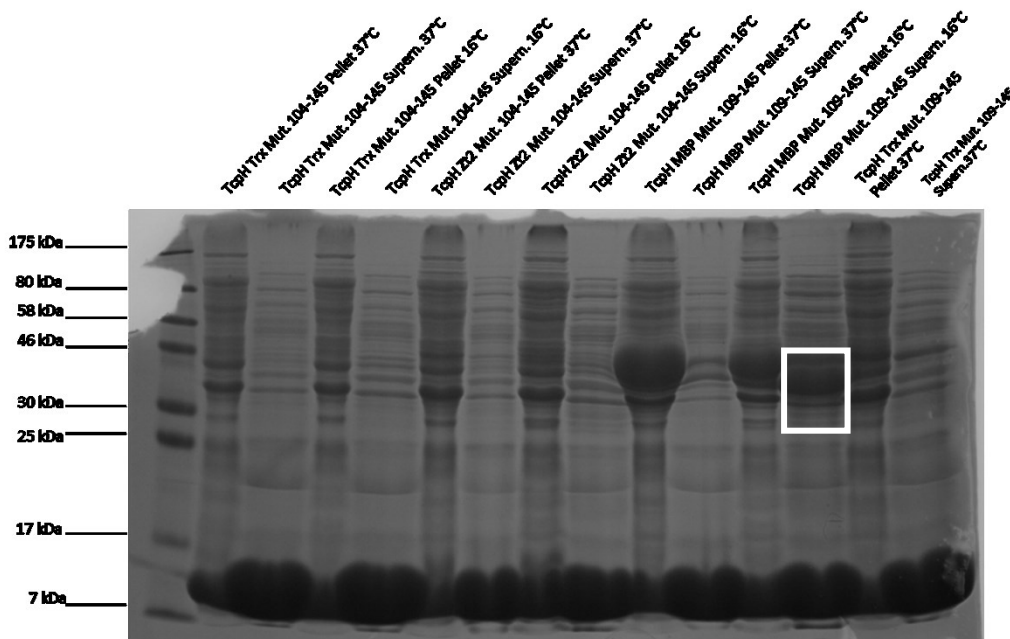


Abbildung 8: SDS-Gelbild nach Expressionstest. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. Der weiße Kasten markiert das Konstrukt, welches für die 1L Kultur-Expression verwendet wurde. TcpH: Toxin coregulated pilus H; MBP: Maltose binding Protein; Trx: ThioredoxinA; Zt2: IgG binding domain (Z-domain) of Staphylococcus aureus protein A; Mut: Trunkierung

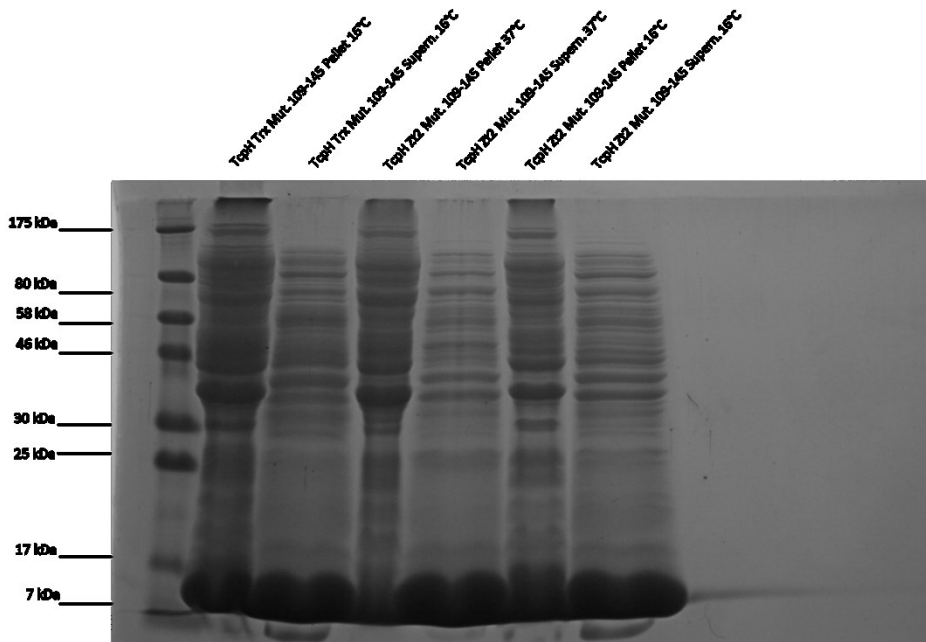


Abbildung 9: SDS-Gelbild nach Expressionstest. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. TcpH: Toxin coregulated pilus H; Trx: ThioredoxinA; Zt2: IgG binding domain (Z-domain) of Staphylococcus aureus protein A; Mut: Trunkierung

In Anbetracht der Löslichkeit der Konstrukte „TcpH MBP Mut. 86-145 16°C“ und „TcpH MBP Mut. 109-145 16°C“ wurde entschieden, die Expression dieser beiden Proteine in einem 1 Liter Kulturkolben zu testen und anschließend aufzureinigen. Folgendes ist dabei herausgekommen: In Abbildung 10 sind neben dem Zeitpunkt 0, auch die Aufreinigungsschritte (Supern, Flow th., Eluat und Dialysat) zu sehen. So bestätigt sich hier, was auch im Expressionstest aufgefallen war, dass diese Konstrukte löslich sind und sich fast das gesamte Protein im Überstand (Supern.) befand. Nachdem der Überstand zweimal durch die mit Ni^{2+} -Beats beladene Gravity Column gelaufen war, wurde der Durchlauf (Flow th.) aufgefangen. Wie man sieht, blieb ein erheblicher Teil nicht an der Säule hängen, was wieder das Problem darstellte, welches am Anfang erläutert worden ist. Nach der Eluation (Eluat) mit einem Eluationspuffer, zeigte sich, dass weniger als 40% des Proteins an der Säule hängengeblieben ist. Etwas Interessantes offenbarte sich, als der MBP Tag durch die TEV weggeschnitten worden ist. In den Fraktionen „Dialysat“ sind keine Trunkierungsbanden bei 7,1 KDa bzw. 4,4 KDa zu sehen. Es ist nur die Bande von dem gesamten Konstrukt (50,3KDa) als auch die des MBP (43,5 KDa) zusehen. Dies deutet daraufhin, dass der TEV Verdau zwar partiell funktioniert hat, aber die Trunkierungen nicht zu finden sind. Tatsächlich sah man im Dialysebeutel ein Präzipitat. Leider wurde kein Gel des Präzipitats laufen gelassen um sicher zu gehen, dass wirklich die gewünschten Proteine sich darin befanden. Hinsichtlich dieser Hinweise entstand die Idee das TcpH als Inclusion body zu exprimieren.

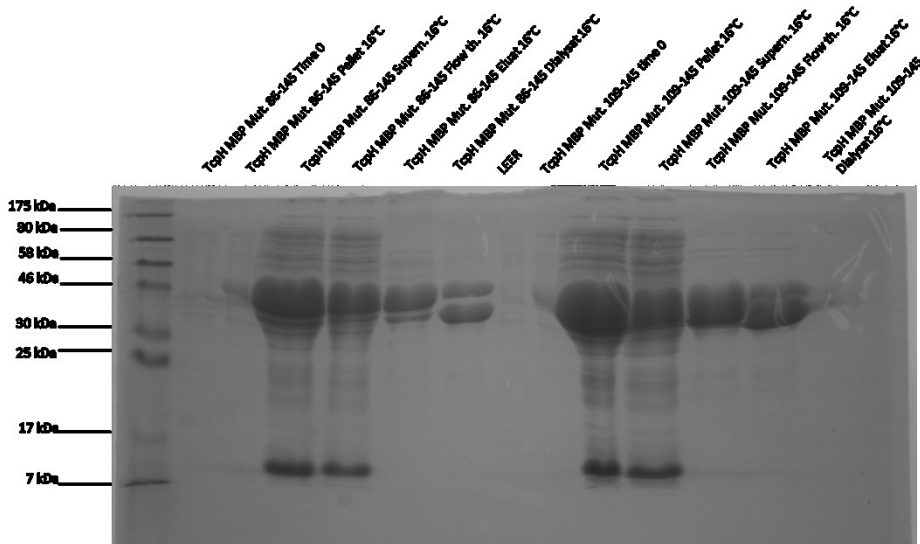


Abbildung 10: SDS-Gelbild der Aufreinigungsschritte der Konstrukte TcpH MBP Mut. 86-145 16°C und TcpH MBP Mut. 109-145 16°C. An der linken Seite ist der Proteinmarker aufgezeichnet. „Time 0“ repräsentiert die Zellen ohne Induktion. TcpH: Toxin coregulated pilus H; MBP: Maltose binding Protein; Mut: Trunkierung;

3.2 Inclusion bodies und Verpackung in SDS- und DPC-Mizellen

Nachdem die Idee mit den Inclusion bodies entstand, wurde der Versuch unternommen das TcpH auf genetischer Ebene so zu designen, dass es aus dem gesamten TcpH (full length) samt His-Tag aber keinen weiteren Solubilisierungs-Tag besteht. Wie unter 1.2.1 beschrieben, wurde dazu mit speziell angefertigten Primern das Side Directed Mutagenesis Protokoll angewendet um schließlich das TcpH-Full length-His tag (TcpH-FL-His) herzustellen. Mit diesem Konstrukt wurde nach Transformation in BL21 Zellen die Expression (siehe 1.2.3) gestartet. So wurde beim ersten Versuch kein markiertes Medium verwendet. Nach Expression und Lyse (ein Durchgang in der French Press) der Zellen, folgte die Aufreinigung wie unter 1.2.3 erwähnt. Als schließlich die Aufreinigung abgeschlossen war, konnte man am SDS-Gel (Abbildung 11) sehen, dass im Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt (siehe Abbildung 11, Lane „TcpH-FL-His Supern. after lysis“) kein TcpH-FL-His vorhanden war. Dies deutete daraufhin, dass fast das gesamte Protein in den Inclusion bodies war und somit im Proteinpellet zu finden sein sollte. Alsdann das Proteinpellet im Solubilisierungspuffer aufgelöst worden ist, konnte das TcpH-FL-His (siehe Abbildung 11, Lane „TcpH-FL-His Supern. with solubilization buffer“) darin entdeckt werden. Anhand des Durchflusses (Abbildung 11, Lane „TcpH-FL-His Flow th.“) erkennt man, dass die Säule auch nicht alles gebunden hat. Dies lässt sich durch den Kapazitätsmangel der Säule erklären. In der „Eluationslane“ (Abbildung 11) zeigt sich, dass mehr als 60% des Proteins eluiert werden konnte. Zudem sieht man in dieser Lane kaum Verunreinigungen, was sehr wichtig in der späteren NMR Vermessung ist.

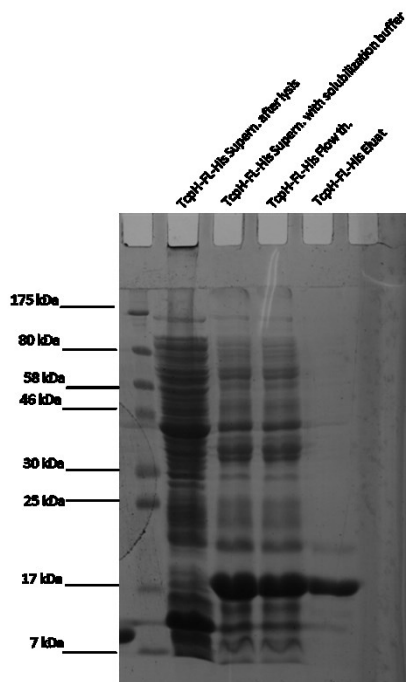


Abbildung 11: SDS-Gelbild der Inclusion body-Aufreinigungsschritte nach Expression in LB-Medium.

Dies war ein erster Erfolg, denn nun wurde ein Verfahren gefunden, dass eine effektive und saubere Aufreinigung von Tcph-FL-His ermöglichte. Der nächste Schritt bestand darin, nach Entfernung der denaturierenden Komponente (8M Harnstoff) das präzipitierte Protein wieder in Lösung zu bringen und so für die NMR messbar zu machen. Zwar findet man in der Literatur ein dutzend von Protokollen, wie präzipitierte Proteine wieder renaturiert werden können, doch da es sich in diesem Fall um ein Membranprotein handelte, lag es nahe, Membranmimetika zu nehmen. Die Entscheidung fiel deshalb auf SDS und DPC. Wie in 1.2.4 beschrieben, wurde das Tcph-FL-His in SDS- als auch in DPC-Mizellen erfolgreich verpackt. Um einen ersten Überblick über die Sekundärstruktur bzw. das Verhalten innerhalb der Mizellen zu bekommen wurde die unkomplizierte CD-Spektroskopie herangezogen.

3.2.1 CD-Spektren und Sekundärstrukturanteilsberechnung

In Abbildung 12 kann man anhand der CD-Spektren für das Tcph-FL-His, welches in SDS Mizellen verpackt war erkennen, dass es Hinweise auf helikale Strukturelemente gibt. Leider ist dieses Spektren nicht gut gelungen. Der Grund könnte vermutlich sein, dass wenig Tcph-FL-His in den Mizellen verpackt worden ist. Dies bestätigt auch die Messung der Proteinkonzentration am NanoDrop (Tabelle 18). Jedenfalls war nach der Auflösung des Proteins mit SDS keine Trübung im Reaktionsgefäß sichtbar, was darauf schließen ließe, dass das gesamte Protein verpackt war. Doch konnte vielleicht während der Lyse nicht genügend Zellen lysiert worden sein, was dazu führen könnte, dass einfach

weniger Protein von Grund auf vorhanden war. Wie man aber deutlich anhand der Kurve 1* (20mM) im CD-Spektrum sehen kann, sind höhere SDS Konzentrationen von 50-100mM notwendig um das Protein erfolgreich in Mizellen zu verpacken.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Berechneten Konzentrationen und mREs für TcpH-FL-His mit unterschiedlichen SDS bzw. DPC Konzentrationen

	Konzentration [mg/ml]	Molekulargewicht [Da]	Anzahl der Bindungen	MRE
20mM SDS	0,1505	17624,3	155	0,0013236
50mM SDS	0,2094	17624,3	155	0,0018416
100mM SDS	0,1702	17624,3	155	0,0014968
50mM DPC	0,3076	17624,3	155	0,0027052
100mM DPC	1,2369	17624,3	155	0,0180878
200mM DPC	0,9162	17624,3	155	0,0080576

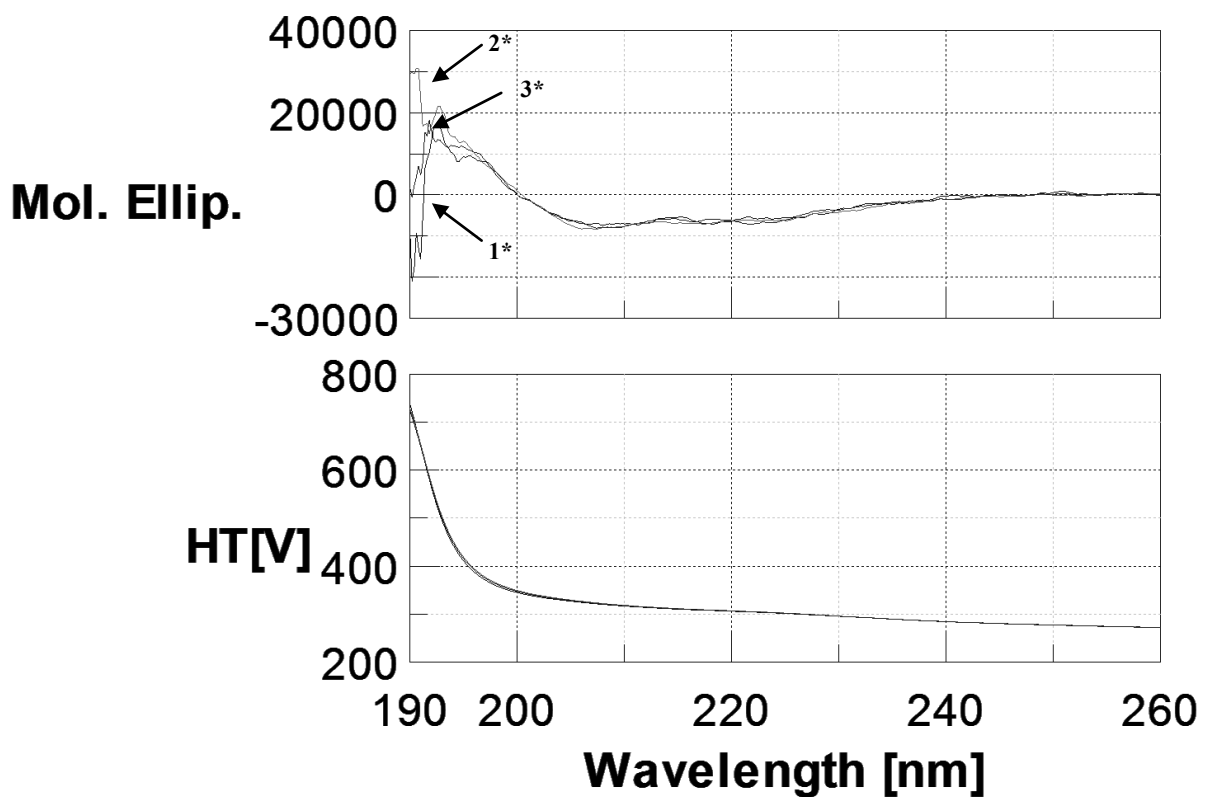


Abbildung 12: CD-Spektren von TcpH-FL-His in SDS-Mizellen verpackt. 1*: 20mM SDS; 2*: 50mM SDS; 3*: 100mM SDS.

Neben den SDS-Mizellen, wurden auch DPC-Mizellen verwendet, da diese eher einer physiologischen Membran ähneln als SDS Moleküle. In Abbildung 13 sind die CD-Spektren von TcpH-FL-His in DPC-Mizellen zu sehen. Hier zeigt sich ein typischer Kurvenverlauf und bestätigt die schon unter den SDS-Mizellen gefundenen helikalen Charakter von TcpH-FL-His. Auch hier zu erkennen, dass Konzentrationen über 50mM notwendig sind um das Membranprotein erfolgreich zu verpacken. Konzentrationen über 100mM wie anhand der roten Kurve (200mM) in Abbildung 13, zeigen keinerlei Verbesserungen in der „Verpackung“ von TcpH-FL-His.

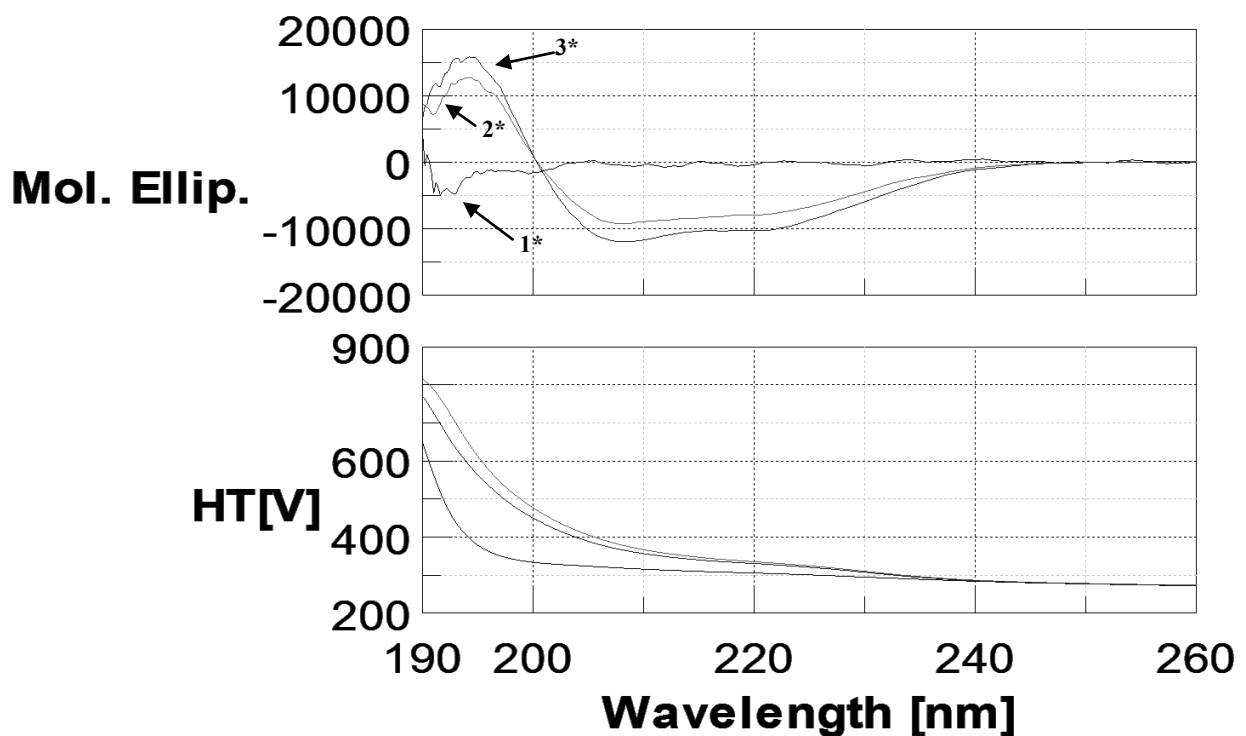


Abbildung 13: CD-Spektren von TcpH-FL-His in DPC-Mizellen verpackt. 1*: 50mM DPC; 2*: 100mM DPC; 3*: 200mM DPC.

Da anhand der CD-Spektroskopie keine detaillierte Strukturanalyse stattfinden kann und die Proteinkonzentrationen nicht sehr hoch waren, wird aus repräsentativen Gründen die Auswertung mittels „Dichroweb“ (Rohdaten des DC-Spektrometers im Anhang) nur für das TcpH-FL-His in 200mM DPC gezeigt (Abbildung 14). So ergab sich ein 39%iger „helikaler“, 14% „ β -Strand“ und 30%iger „ungeordneter“ Sekundärstrukturanteil. Der Vergleich mit den anderen SDS bzw. DPC Konzentrationen führte zu ähnlichen Ergebnissen.

Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
0.21	0.18	0.08	0.06	0.17	0.30	1

Abbildung 14: „Dichroweb“ Sekundärstrukturanteilsberechnung für TcpH-FL-His mit 200mM DPC.

3.2.2 Triple Markierung

Die Triple Markierung des TcpH-FL-His sollte dazu dienen, die dreidimensionale Struktur mit Hilfe der NMR aufzuklären. Zu diesem Zweck wurde das TcpH-FL-His im Minimal Medium (wasserfrei) exprimiert (1.2.6), anschließend lysiert (dreifacher Durchgang in French Press) und aufgereinigt (1.2.3). In Abbildung 15 sind die Aufreinigungsschritte zusehen. In der Lane „2H 13C 15N TcpH-FL-His Supern. after lysis“ ist wieder der Überstand nach dem ersten Zentrifugationsschritt aufgetragen worden. Das TcpH-FL-His (17KDa) ist nicht sichtbar. Demnach muss das Membranprotein im Proteinpellet sein, welches sich auch nach der Solubilisierung in der Fraktion „2H 13C 15N TcpH-FL-His after solubilization“ auch zeigt. Leider ist im Durchlauf (Lane „2H 13C 15N TcpH-FL-His Flow through“) wieder zusehen, dass nicht alles an das Säulenmaterial gebunden hat. Im Eluat (Lane „2H 13C 15N TcpH-FL-His Eluat“) ist ca. 60-70% des TcpH-FL-His zuerkennen. Das präzipitierte Protein wurde nach Entfernung des 8M Harnstoffs in 100mM deuteriertem DPC aufgelöst. Ein unerwartetes Problem entstand, weil das Protein sich nicht vollständig gelöst hatte. Eine Trübung im Reaktionsgefäß konnte beobachtet werden, dass durch den hohe Proteingehalt verursacht werden könnte. Anstatt einem einmaligen Durchgang in der French Press wurde diesmal ein dreifacher Durchgang gewählt um so viel wie möglich Protein zu erhalten. Nach Absprache mit meinem Vorgesetzten wurde der pH-Wert auf ca. 3,5 gesenkt. Diese Absenkung verhalf der vollständigen Auflösung des Proteins. Was nun genau dabei abgelaufen ist, ist schwer zu sagen und wird um Spekulationen zu vermeiden, hier vorerst nicht diskutiert.

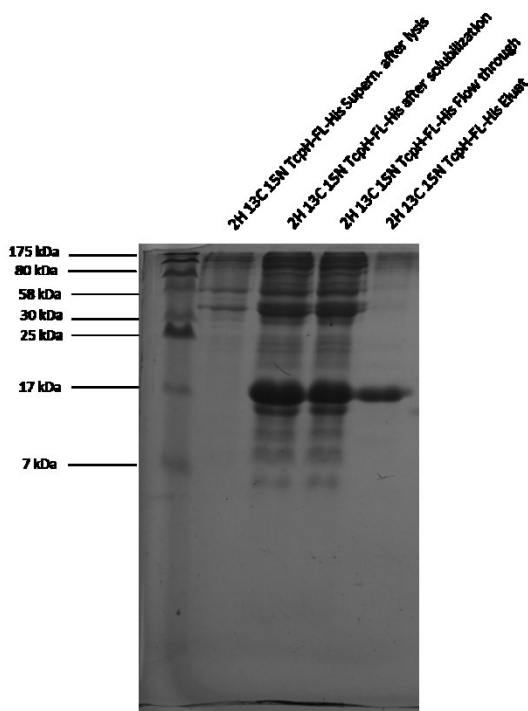


Abbildung 15: SDS-Gelbild der Inclusion body-Aufreinigungsschritte nach Expression in Triple markiertem Medium.

3.3 HSQC und Triple-resonance Experimente

Die Auflösung des TcpH-FL-His durch Absenkung des pH-Wertes war eine erfolgreiche Maßnahme, denn nun konnten HSQCs aufgenommen werden und die für die Struktur Berechnung so wichtigen Triple-resonance Experimente aufgesetzt werden. In der Abbildung 17 ist das HSQC zu sehen, welches bei 310K aufgenommen wurde. Nur anhand dieses HSQCs können noch keine wichtigen strukturellen Erkenntnisse getroffen werden. Zwar kann man darin erkennen, dass das TcpH-FL-His nicht ganz ohne Struktur ist und dadurch nicht zu den „Intrinsically disordered proteins“ (IDPs) gehört, aber wie genau die Struktur aussieht ist aus diesem HSQC nicht abzulesen und bedurfte weiteren Analysen. Zu diesem Zwecke wurden weitere sogenannte Triple-resonance Experimente aufgesetzt. So wurde ein HNCO, HNCACO, HNCACB, HNCOCA und HNCA aufgezeichnet. Da die HNCA, HNCOCA und HNCACB Experimente nicht sensitiv genug waren, wurden die dazu gehörigen TROSY Sequenzen verwendet, die wesentlich bessere Spektren lieferten.

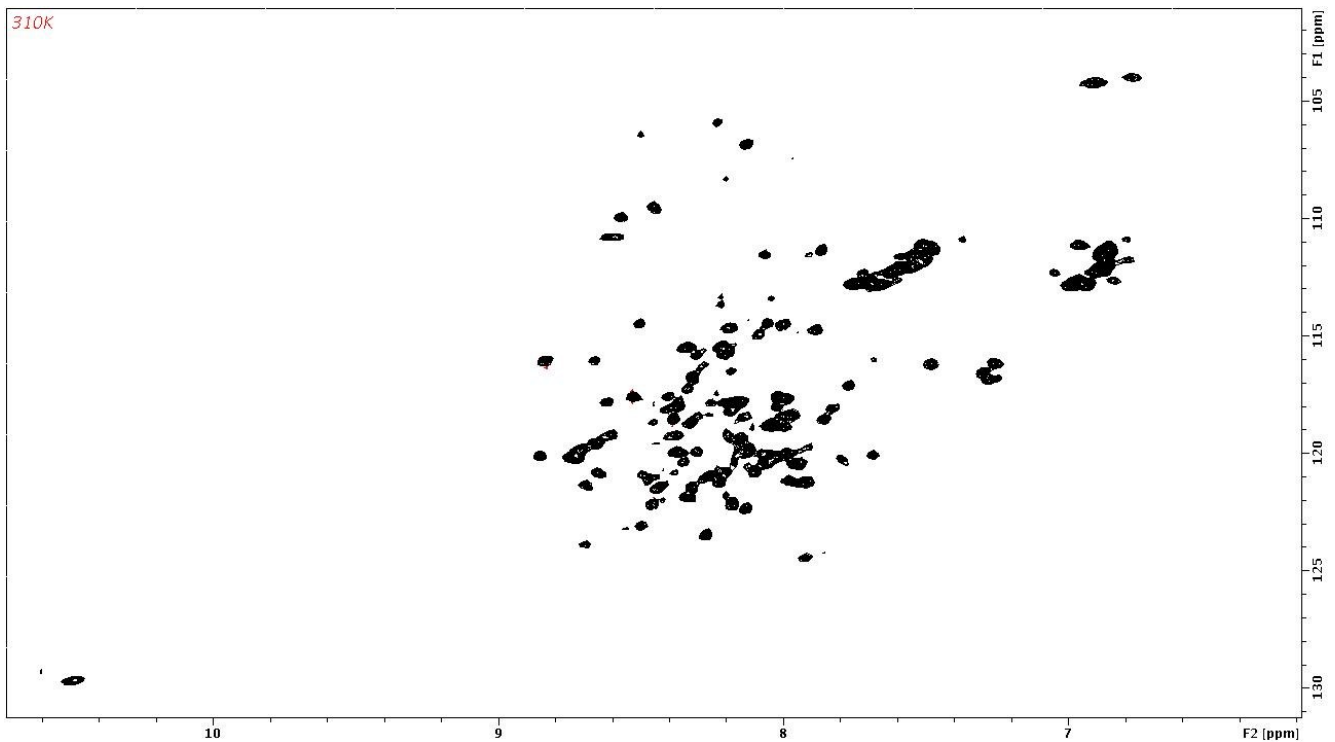


Abbildung 16: HSQC des triple markierten TcpH-FL-His in deuterierten DPC-Mizellen (100mM).

4 Ausblick

Nach einer langwierigen Arbeit gelang es schließlich das Transmembranprotein TcpH in seiner vollen Länge aufzureinigen und für eine NMR Messung zu stabilisieren. Es bleibt weiterhin eine Menge Arbeit erhalten, bis eine fertige dreidimensionale Struktur erstellt werden kann. So muss nun basierend auf den Triple-resonance Experimenten dem Protein das „Backbone“ zugeordnet werden d.h. jedem Peak im HSQC (Abbildung 15) muss die richtige Aminosäure zugeordnet werden. Sollte dies nicht vollständig zuordenbar sein, dann kann durch Erstellung weiterer Trunkierungen eventuell Abhilfe geschaffen werden. Hierdurch würden diejenigen Teile vom Protein entfernt werden, die aufgrund ihrer Flexibilität im Spektrum überrepräsentiert sind. Dies könnte das Zuordnen der Spektren erleichtern. Eine solche Trunkierung würde dann auf genetischer Ebene stattfinden, indem bestimmte flexible Teile entfernt werden. Der nächste Schritt in der Strukturaufklärung nach der Zuordnung des Backbones, würde die Aufnahme von sogenannten „Nuclear Overhauser effect (NOE)“ Spektren sein. Erst die Aufnahme von NOEs würde genügend Daten liefern um eine erste Struktur Berechnung durchzuführen. Das Programm welches es oft dazu verwendet wird ist CYANA (Combined assignment and dynamics algorithm for NMR applications). Eine weitere Möglichkeit der Strukturbestimmung, könnte die altbekannte Röntgenstrukturanalyse sein. Auch hier würde man vor dem Problem der Löslichkeit aufgrund der Transmembran Domäne stehen. Zwar gibt es kommerziell erhältliche Kits die spezielle Reagenzien enthalten die eine Membran imitieren können und dadurch Membranproteine löslich machen, doch dies ist ebenfalls arbeits- und kostenintensiv und muss daher gut abgewogen werden. Würde die Struktur geklärt werden so könnte mit Interaktionsstudien fortgesetzt werden um so die Interaktionsmechanismen potenzieller Partner zu studieren. Auch könnte anhand der Struktur ein spezifischer Wirkstoff gegen Cholera entdeckt werden. Nichtsdestoweniger wurde ein erster großer Schritt in Richtung der Strukturaufklärung von TcpH gemacht, der nun weiterhin verfolgt werden muss.

5 Einleitung Teil PD1-CPD

Das PD1-CPD Projekt wurde im Februar 2015 als Kooperationsprojekt mit Dr. Helge Meyer von der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg initiiert und soll Teil der vorliegenden Masterarbeit werden.

5.1 Eigenschaften

Das Programmed death 1 (PD1) ist ein 288 Aminosäure (AS) langes Typ I Transmembranprotein, welches aus einer Immunglobulin (Ig) Superfamilie Domäne, einer Transmembran Domäne und aus einer cytoplasmatische Domäne (CPD) mit 95AS besteht [27]. Die Intrazelluläre Domäne beinhaltet sowohl das sogenannte „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)“ als auch das „immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM)“ [27]. PD1 wird durch das Gen *Pdcd1* kodiert und ist beim Menschen im Chromosom 2 lokalisiert [27]. Das *Pdcd1* Gen besteht aus 5 Exons. Exon 1 kodiert eine kurze Signal Sequenz und Exon 2 kodiert die Ig Domäne. Die Transmembran Domäne befindet sich im Exon 3 und 4, wobei die letzten 12 AS im Exon 4 den Beginn der C- terminalen cytoplasmatische Domäne markieren und sich im Exon 5 fortsetzt [27]. Dieses Protein wird in T-Zellen, B-Zellen, natürlichen T-Killer Zellen, aktivierten Monocyten und dendrischen Zellen exprimiert. Da das Hauptinteresse bei der cytoplasmatischen Domäne lag werden im Folgenden nur die DNA- und Protein-Sequenzen als auch die physikochemischen Eigenschaften (Tabelle 19) dieser Domäne gezeigt.

DNA-Sequenz der cytoplasmatischen Domäne (303bp) von PD1.

```
ATGTGTAGCCGCGCAGCGCGTGGTACTATTGGCGCGCGTCGTACCGGTCAACCTCTGAAAGAAGACCCGTCGGCC
GTTCCGGTGTTTAGCGTAGATTACGGCGAACTGGATTTCCAATGGCGCGAAAAGACTCCGGAACCGCCGGTCCCT
TGC GTTCCTGAGCAGACCGAATATGCGACCATCGTGTTCGAGCGGCATGGGTACTAGCTCACCTGCGCGCCGT
GGTTCAGCAGATGGCCCTCGTTCAGCGCAGCCTCTGCGTCCGGAAGATGGCCATTGTAGCTGGCCGCTGTAAGGT
ACC
```

Proteinsequenz von PD1-CPD.

```
Met C S R A A R G T I G A R R T G Q P L K E D P S A V P V F S V D Y G E L D F Q W
R E K T P E P P V P C V P E Q T E Y A T I V F P S G Met G T S S P A R R G S A D G
P R S A Q P L R P E D G H C S W P L Stop
```

Tabelle 18: Physikochemische Parameter für die periplasmatische Domäne von PD1

Gesamtzahl der Aminosäuren	98
Molekulargewicht [Da]	10626,8
Extinktionskoeffizient [$M^{-1} cm^{-1}$] bei 280nm	14105
Theoretischer pI	5,76
Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren	11
Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren	12
Aliphatischer Index	49,80

5.2 Funktion und Mechanismus

Damit eine T-Zelle ihre vollständige Aktivität erlangt, braucht es zwei Signale. Das erste Signal, welches auch als das immunspezifische bezeichnet wird, entsteht zwischen dem Antigenpeptid-MHC Komplex (Major Histocompatibility Complex) der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und dem TCR(T-cell receptor) der T-Zelle. Das zweite, antigenunabhängige Signal, dass zwischen dem B7-Protein (APC) und dem CD28-Protein (T-Zelle) entsteht, führt letztendlich zur Cytokine und Chemokine Ausschüttung, klonalen T-Zell Expansion und vielen weiteren Effektor Funktionen die als typische „positive“ Immunantwort bekannt ist. Ohne das zweite Signal ist eine Immunantwort nicht möglich. Als 1992 erkannt wurde, dass das hochregulierte PD1 Gen in T-Hybridomazellen für das Umgehen der Apoptose verantwortlich ist [28], war schnell klar, dass der „PD1-Pathway“ für die negative Regulation einer Immunantwort verantwortlich ist. In den Jahren 2000 und 2001 wurden dann auch die zwei Liganden (PD-L1 und PD-L2) von PD1 entdeckt [31, 32]. Nachdem ein PD1-Ligand an das PD1 gebunden hat (Abbildung 17), kommt es zur Phosphorylierung an zwei cytoplasmatischen Tyrosinen im ITSM[33]. An diese Phosphotyrosine bindet nun die SHP-2 (tyrosine phosphatase 2) mit ihrer spezifische Erkennungsdomäne (SH2 Domäne) [33]. Die Bindung aktiviert die Phosphatase, die nun durch direkte Dephosphorylierungen von Signalintermediatoren die „negative“ Immunantwort steuert. So sinkt die Aktivität der CD28 vermittelte PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) und die damit verbundenen Akt Aktivität führt dann zur Senkung der IFN- γ , tumor necrosis factor- α und Interleukin-2 (IL-2) Ausschüttung der T-Zellen [34]. PD1 kann überdies sowohl die T-Zell Proliferation [35] als auch die Bcl-xL (antiapoptotisches Protein) [35] Produktion inhibieren. Zudem senkt es auch die Expression der Transkriptionsfaktoren GATA-3, Tbet und Eomes, die im Zusammenhang mit der T-Zell Effektorfunktion stehen [37]. Es zeigt sich somit, dass PD1 und seine Liganden durch Aktivierung inhibitorischer Signale das Gleichgewicht zwischen T-Zell Aktivität, Toleranz und Immunpathologie regulieren [27].

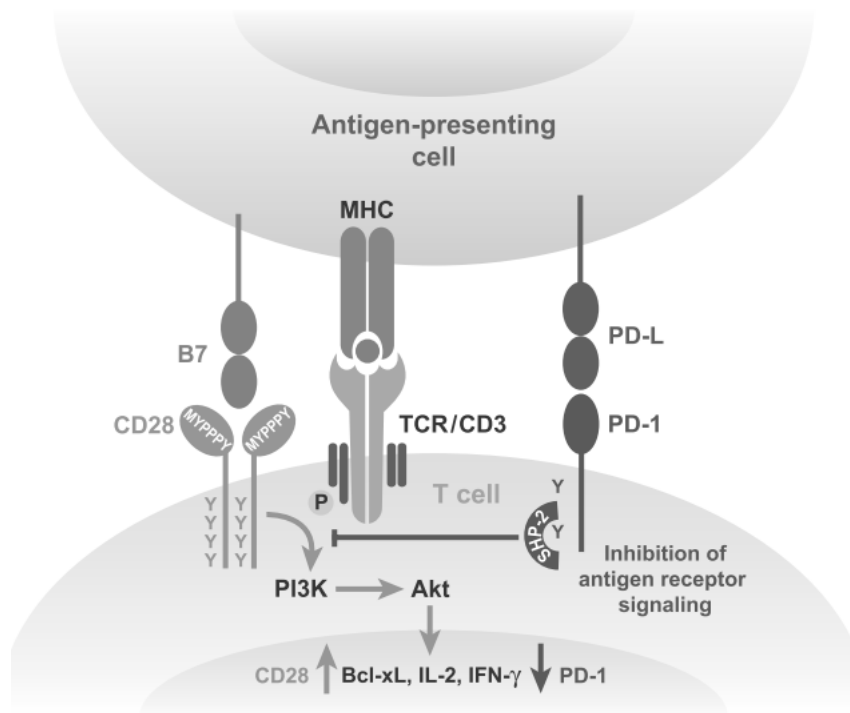


Abbildung 17: Der „PD1:PD-Ligand Pathway“ [27]. Die Kombination aus Antigenpräsentierendem MHC-Komplex, TCR, B7 und CD28 führt zur positiven Immunantwort. Die negative Immunantwort verläuft über den PD1:PD-Liganden „pathway“ und führt zur Aktivierung der Phosphatase SHP-2 die PI3K und Akt inaktiviert und so zur Senkung von IL-2, IFN- γ und Bcl-xL führt.

5.3 Klinische Relevanz

Im Jahr 1999 konnte erstmals eindrucksvoll gezeigt werden, dass Mäuse mit dem Phänotyp *Pdcd1*^{-/-} anfällig für Autoimmunerkrankungen waren [29, 30]. In den darauf folgenden Jahren stellte sich dann heraus, dass PD1 eine wichtige Rolle bei der Autoimmunität, Transplantationstoleranz, chronischen Virusinfektionen und Tumorerkrankungen spielt [38]. So zeigte sich immer wieder eine PD1 Überexpression auf T-Zellen in vielen der oben genannten Krankheiten. Solche T-Zellen werden auch als „erschöpfte“ T-Zellen oder „exhausted T-cells“ beschrieben und zeichnen sich sowohl durch ihren progressiven Verlust der Cytokine und Chemokine Produktion als auch durch ihren Proliferationsverlust aus [39]. Dies führte dazu, den „PD1:PD-Ligand pathway“ als potenzielles therapeutisches Target anzusehen und mit geeignete Inhibitoren zu blockieren. Eine solche Blockierung sollte die „erschöpften“ T-Zellen wiederbeleben und ihre volle Funktionsfähigkeit wiedergeben [40]. Im Bereich der Onkologie werden jetzt schon einige Antikörpervermittelten Inhibitoren (anti-PD-1 mAb) verwendet, die gerade aber noch die Phase I der klinischen Tests durchlaufen [41, 42]. Ob sich allein durch die Inhibition des „PD1:PD-Ligand pathways“ Krankheiten wie Krebs heilen lassen werden ist zweifelhaft. Präklinische Daten zeigen schon jetzt, dass PD1 Agonisten nicht effizient genug sind [43]. Nur durch die Kombination mit weiteren Inhibitoren könnte eine effektive Therapie erreicht werden [43].

5.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Analyse von phosphoryliertem PD1-CPD mit Hilfe der NMR. Die Phosphorylierung fand im Lysat von HeLa-Zellen statt. Nach der Aufreinigung des phosphorylierten und Nicht-phosphorylierten PD1-CPD mittels HisTrap und Größenausschlusschromatographie konnten HSQCs aufgenommen und miteinander verglichen werden. Darüber hinaus wurden Triple-resonance Spektren für die „Backbone“ Zuordnung aufgenommen.

6 Ergebnisse und Diskussion

Bevor die Ergebnisse diskutiert werden, sollten kurz die Vorarbeiten erwähnt werden, die nicht in dieser Masterarbeit detailliert diskutiert werden. Zu Beginn der Untersuchungen war das PD1-CPD im pET-MBP Vektor kloniert. Um eine effektivere Markierung während der Expression im Minimalmedium zu gewährleisten, wurde die cytoplasmatische Domäne mit Hilfe von Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den viel kleineren pET-Zt2 Vektor (Konstruktgröße: 21KDa) kloniert (1.2.7). Nach der Transformation in BL21 Zellen wurden diese Klone sequenziert und als „Ausgangspunkt“ jeder weiteren hier beschriebenen Untersuchung verwendet.

6.1 Expressionstest von PD1-CPD-Zt2

Um sicherzustellen, dass das PD1-CPD-Zt2 in den BL21 Zellen auch exprimiert wird, wurde am Anfang ein Expressionstest (1.2.8) unter zwei verschiedenen Temperaturkonditionen durchgeführt. Die erste Expression erfolgte bei 37°C für 6 Stunden und die andere bei 16°C Übernacht. Nach der Expression wurden die Zellen lysiert und aufgereinigt (1.2.8). Bei diesem Expressionstest wurde auf die Aufreinigung mittels HisTrap und SEC verzichtet. Stattdessen wurde eine mit Ni²⁺-Beat beladene Gravity Column verwendet. Das Wasch- bzw. Elutionsprotokoll folgte im Großen und Ganzen dem schon unter 1.2.3 beschriebenen Vorgang. Anstatt dem Harnstoff wurde hier deionisiertes Wasser als Lösungsmittel verwendet. Nach der Elution wurde ein 15%iges SDS Gel verwendet um die Reinheit der Aufreinigung nachvollziehen zu können. So kann man im Gelbild (Abbildung 18) erkennen, dass in den Pellet Lanes „PD1-CPD-Zt2 Pellet 6h 37°C“ und „PD1-CPD-Zt2 Pellet ON 16°C“ kein PD1-CPD-Zt2 vorhanden ist, was darauf schließen lässt, dass PD1-CPD-Zt2 löslich ist. Folgt man der Aufreinigung (Lane „PD1-CPD-Zt2 Supern.“ und „PD1-CPD-Zt2 Flow th.“) für beide Konditionen, dann findet sich nach der Elution (Lanes „PD1-CPD-Zt2 Eluat“) jeweils eine Bande bei ca. 21KDa mit etwa derselben Intensität. Der darauf folgende Verdau mit der TEV (Lanes „PD1-CPD-Zt2

Dialysat (TEV Digest)“) führt zur Entstehung einer Bande bei ca. 10,5 KDa. Diese Entstehung beruht darauf, dass sowohl das PD1-CPD (10,6 KDa) als auch das Zt2 (10,4KDa) ziemlich gleiche Molekulargewichte haben. Anhand dieses Gels konnte gezeigt werden, dass es keinen Unterschied macht, unter welcher der zwei Bedingungen das Protein exprimiert wird. Schließlich wurde aus Gründen des „Zeitmanagements“ die Expression bei 16°C Übernacht für alle weiteren Versuche gewählt.

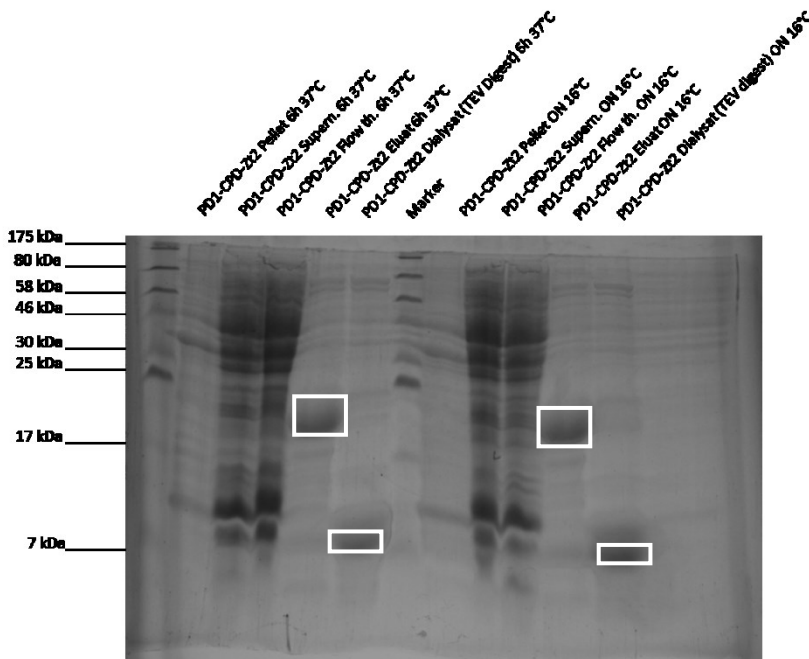


Abbildung 18: Expressionstest von PD1-CPD-Zt2 unter zwei verschiedenen Temperaturkonditionen (6h bei 37°C und Übernacht bei 16°C). Die weißen Balken markieren das eluierte PD1-CPD-Zt2 (21KDa) bzw. das PD1-CPD (10,6KDa) und Zt2 (10,4KDa) nach dem TEV Verdau.

6.2 Doppelmarkierung, Aufreinigung und Triple-resonance Experimente von PD1-CPD

Wegen der guten Expression und leichten Aufreinigung des PD1-CPD wurde entschieden, gleich mit der Doppelmarkierung zu beginnen um Triple-resonance Experimente am NMR aufzusetzen. Die Doppelmarkierung und Aufreinigung erfolgte wie unter 1.2.9 bzw. 1.2.8 beschrieben. Auch hier wurde die Aufreinigung in einem 15%igen SDS-Gel verfolgt und ist in der Abbildung 19 und 20 zusehen. In Abbildung 19 fehlt leider die „Eluationslane“ und die Auflösung der Banden in den Gelen ist nicht sehr gut gelungen. In der Pellet Lane (C13+N15 PD1-CPD-Zt2 Pellet) ist wieder keine Bande zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass das Protein sich in der löslichen Fraktion befindet. Nach der Aufreinigung, dem TEV Verdau und einer Ni²⁺-Gravity Column erkennt man eine distinkte Bande bei ca. 10,6KDa in der Lane „C13+N15 PD1-CPD-Zt2 Wash of Zt2 Tag after 2nd Ni²⁺ Column“. Die zweite Gravity Column“ diente der Entfernung des Zt2 Tags nach dem TEV Verdau. Um noch eine

wesentlich bessere Reinheit zu bekommen, wurde diese aufgefangene Fraktion durch eine SEC laufen gelassen. Das Ergebnis sieht man in der Abbildung 20, wobei hier jede zweite Fraktion aufgetragen worden ist. Die „reinsten“ Fraktionen (32-35) wurden zusammengeführt und für die Triple-resonance Experimente verwendet. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop vermessen und lagen bei ~1,2mg/ml. Aus zeitlichen Gründen musste die Probe weggefroren werden. Nach dem Auftauen ist ein Teil ausgefallen und musste daraufhin abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde dann für die Messungen weiter benutzt. Die Konzentrationsmessung ergab diesmal nur einen Wert von ~0,7mg/ml. Um doch noch eine höhere Konzentration zu bekommen wurde der Überstand in einem Amicon Röhrchen auf ein Volumen von ca. 200µl aufkonzentriert. Dieses kleine Volumen wurde dann in ein Shigemi Tube überführt und im NMR Spektrometer für die Triple-resonance Experimente verwendet. Anhand von 1D-Spektren konnte man erkennen, dass die Proteinkonzentration für Triple-resonance Aufnahmen vollkommen ausgereichend war. Die Zuordnung der Spektren wurde durch Dr. Helge Meyer zu 70% ausgeführt. Eine weitreichende Zuordnung konnte anhand der aufgenommenen Spektren leider nicht erfolgen.

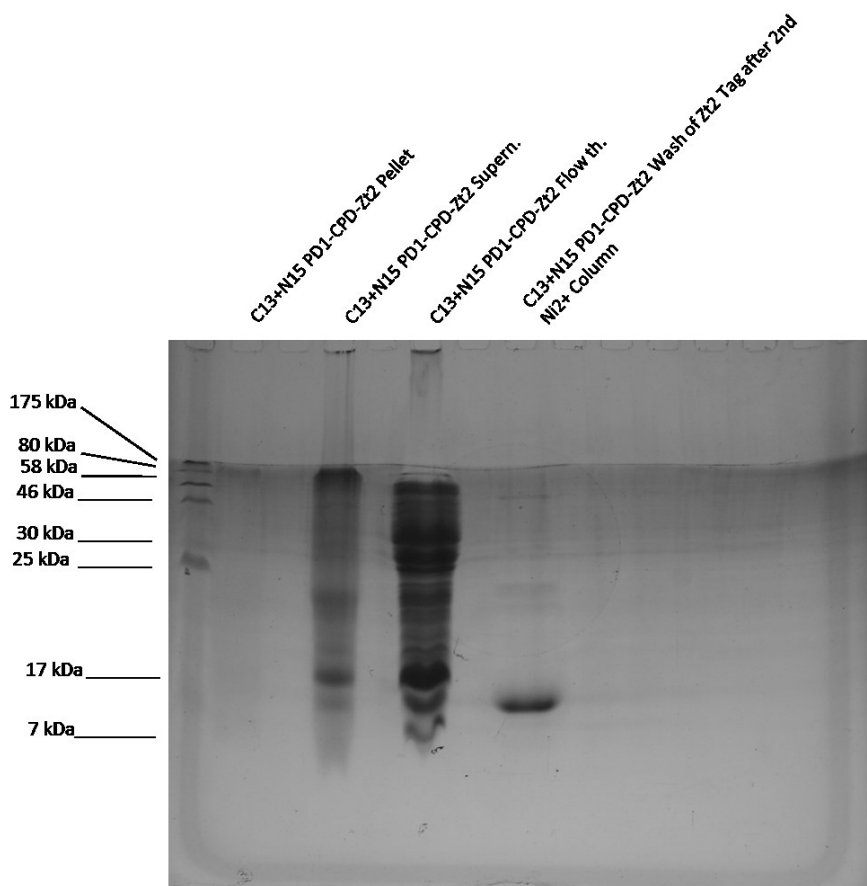


Abbildung 19: Aufreinigung des doppelmarkierten PD1-CPD in der HisTrap Säule mit TEV Verdau und anschließender Ni²⁺-Gravity Säule.

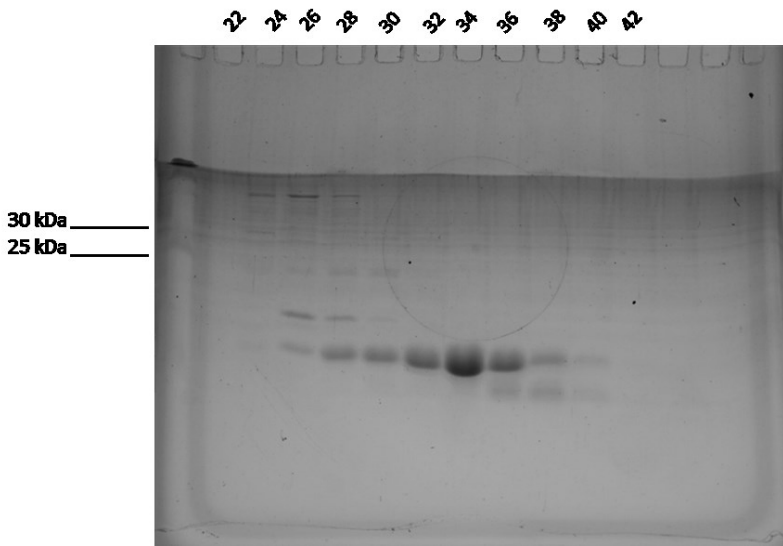


Abbildung 20: Aufreinigung des doppelmarkierten PD1-CPD in der SEC.

6.3 Phosphorylierungsstudien an PD1-CPD-Zt2

In der Phosphorylierungsstudie sollte die cytoplasmatische Domäne von PD1 phosphoryliert, aufgereinigt und anschließend NHSQCs im NMR Spektrometer aufgenommen werden. In Vorversuchen, die hier nicht detailliert erklärt werden, tauchte immer wieder ein und dasselbe Problem auf. Sobald die TEV den Zt2-Tag weggeschnitten hatte, verlor sich das Protein in großen Mengen während der nachfolgenden Schritte. Die gängigste Erklärung dafür könnte die Degradierung des PD1-CPD sein, da es keine Struktur besitzt. Um dieses Problem zu umgehen wurde der Versuch unternommen, das PD1-CPD samt Zt2-Tag aufzureinigen und so durch den gesamten Phosphorylierungsprozess stabil zu halten.

6.3.1 ¹⁵N-Markierung und Aufreinigung

Da die ¹⁵N-Markierung für eine Phosphorylierungsstudie vollkommen ausreicht wurde wie unter 1.2.9 und 1.2.8 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Die Resultate die dabei entstanden sind, sind in den folgenden Abbildungen 21, 22, 23, 24 zu sehen. Die Abbildung 21 zeigt das Chromatogramm der HisTrap. In der Abbildung 22 ist das dazugehörige SDS-Gelbild zu sehen. Leider sind die Banden auf dem Bild schlecht zu sehen, doch auf dem „Originalgel“ konnte bei ca. 21KDa Banden erkannt werden. So wurden die Fraktionen 27-39 aufgrund ihrer Reinheit zusammengeführt auf ca. 10ml in einem Amicon Röhrchen aufkonzentriert und für eine SEC weiter verwendet.

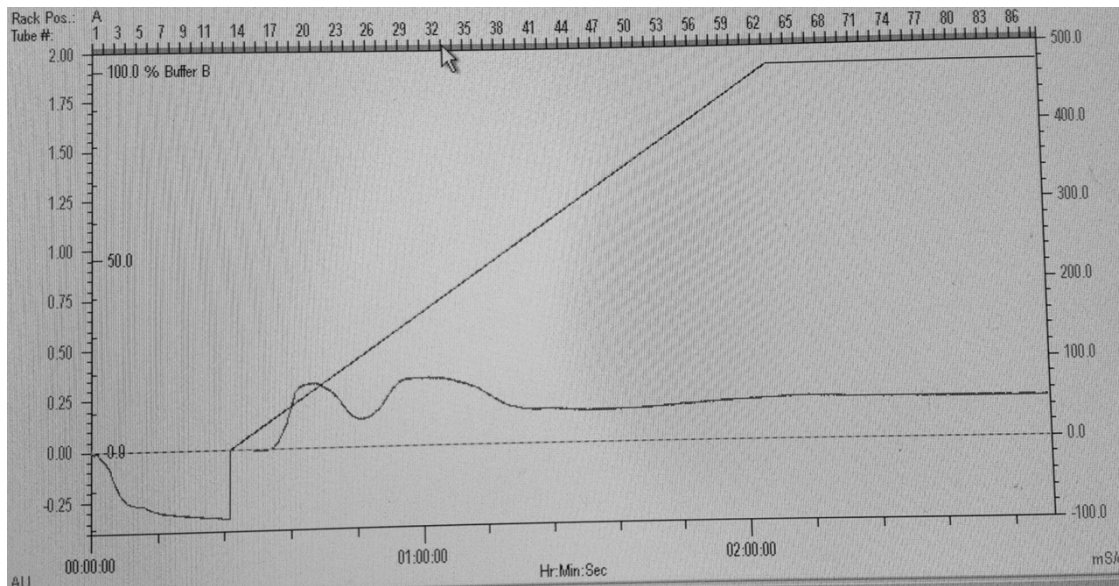


Abbildung 21: Chromatogramm (HisTrap-Säule) des ^{15}N -markierten PD1-CPD-Zt2. Links ist die Absorption bei 280nm und oben sind die gesammelten Fraktionen dargestellt.

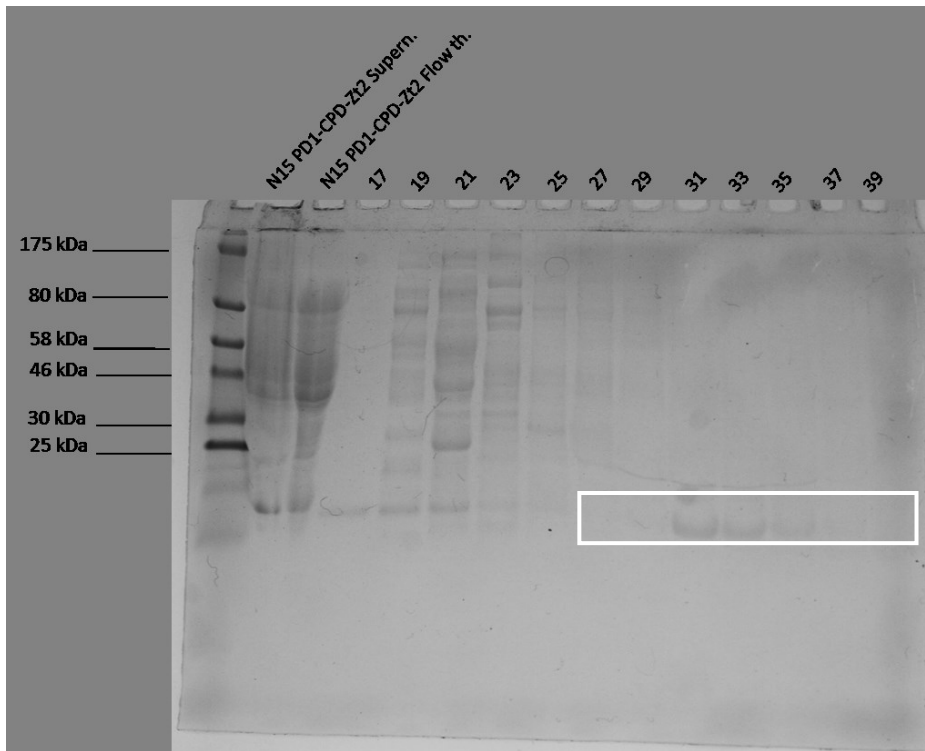


Abbildung 22: SDS-Gelbild des ^{15}N -markierten PD1-CPD-Zt2. Die Zahlen 17-39 symbolisieren die aufgefangenen Fraktionen. Der weiße Balken zeigt den Bereich an, aus welchen Fraktionen das Protein zusammen „gepoolt“ wurde.

Im Anschluss an die SEC wurden ebenfalls ein Chromatogramm (Abbildung 23) sowie das dazugehörige SDS-Gel (Abbildung 24) erstellt. Anhand des Gelbildes wurden die Fraktionen 36-42 „zusammen gepoolt“ und die Konzentration mittels NanoDrops bestimmt. Die Konzentration lag bei $\sim 1,03\text{mg/ml}$ (28ml Volumen). Um ein handlicheres Volumen für die NMR Messungen zu bekommen, wurde die Probe auf 2ml in einem Amicon Röhrchen aufkonzentriert. Die Konzentration lag bei 15mg/ml ($0,71\text{mM}$). Nun wurde die Probe in zwei Teile geteilt. Der erste Teil (1ml) wurde mit ATP

(10mM) vermischt und diente als Referenz Probe für die spätere NMR Messung. Der andere Teil (1ml) wurde für die eigentliche Phosphorylierung verwendet.

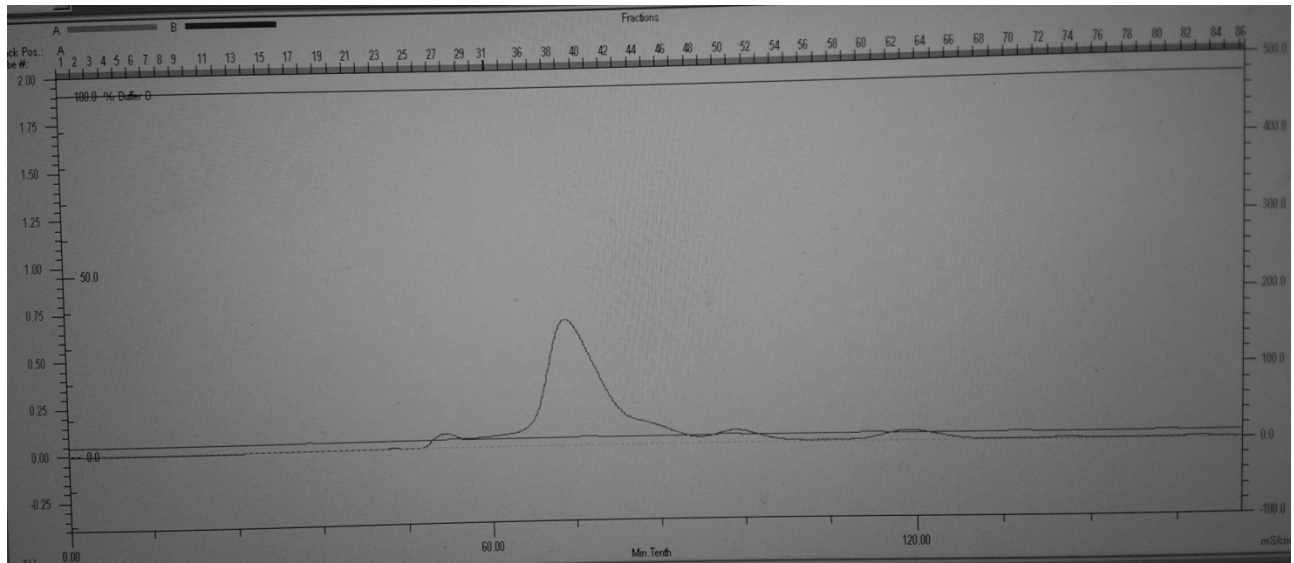


Abbildung 23: Chromatogramm (SEC) des ^{15}N -markierten PD1-CPD-Zt2. Links ist die Absorption bei 280nm und oben sind die gesammelten Fraktionen dargestellt.

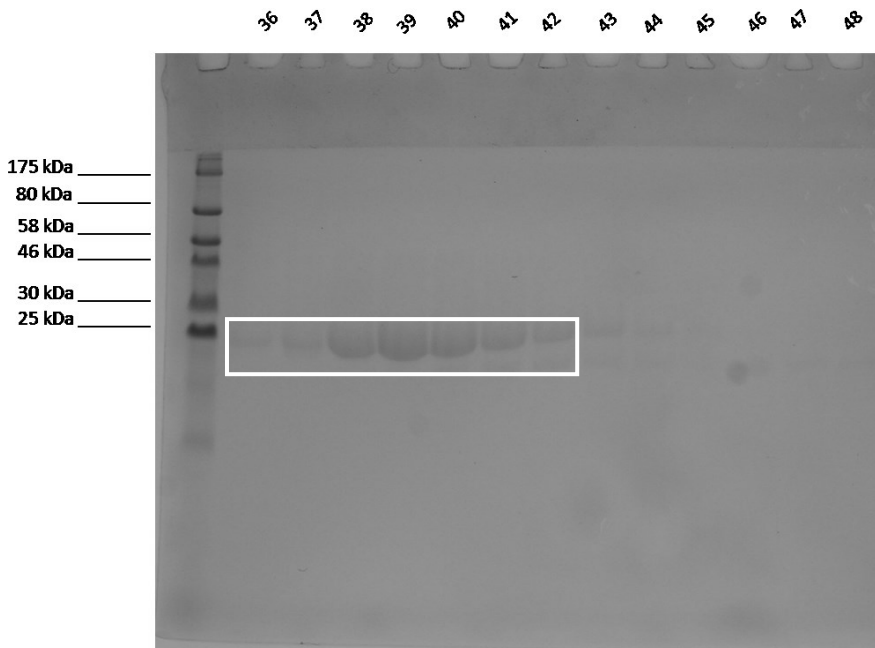


Abbildung 24: SDS-Gelbild des ^{15}N -markierten PD1-CPD-Zt2. Die Zahlen 36-48 symbolisieren die aufgefangenen Fraktionen. Der weiße Balken zeigt den Bereich an, aus welchen Fraktionen das Protein zusammen „gepoolt“ wurde.

6.3.2 Phosphorylierung und Aufreinigung

Das phosphorylierte PD1-CPD-Zt2 (1ml) wurde nun mit dem Zelllysate (siehe 1.2.10) zusammengebracht und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in 1.2.10 beschrieben. Während der Aufreinigung wurden einige Proben gezogen (Abbildung 25), um den Reinheitsstand nachvollziehen zu können. In der Abbildung 25 kann grundsätzlich erkannt

werden, dass durchgehend zwei große Banden dominieren. Die letzte unterste Bande kommt durch die Degradierung von Proteasen zustande, die im Zelllysate vorhanden sind. Vergleicht man nun die „PD1-CPD-Zt2 Eluat“ Lane mit der „PD1-CPD-Zt2 dialysiertes Eluat nach G25 Säule“ Lane, dann sieht man, dass in etwa gleich viel Protein nach der G25 Säule eluiert wurde wie im ursprünglichen Eluat vorhanden war. Um sicher zu gehen, dass alles aus der G25 Säule eluiert wurde, wurde durch die Säule NMR-Puffer laufen gelassen. Wie man in der „PD1-CPD-Zt2 dialysiertes Eluat nach G25 Säule (2nd)“ Lane erkenne kann, werden keine signifikanten Proteinmengen mehr ausgewaschen. Dies deutete daraufhin, dass es seitens der G25 Säule kein Proteinverlust gab. Die Lanes „Pd1 CPD Zt2 mit Zelllysate nach 3h Inkubation“ und „Pd1 CPD Zt2 mit Zelllysate nach 3h Inkubation (2)“ bestehen aus der ein und derselben Fraktion. Das mit „(2)“ gekennzeichnete ist beim Aufragen aus Versehen in die zweite Lane übergelaufen. Wenn der Reinheitszustand der Lane „Pd1 CPD Zt2 mit Zelllysate nach 3h Inkubation“ mit „PD1-CPD-Zt2 Eluat“ verglichen wird, ist deutlich zu erkennen, dass die Aufreinigung durch die kleine Gravity Säule (1.2.10) nicht sehr effektiv ist und noch optimiert werden muss.

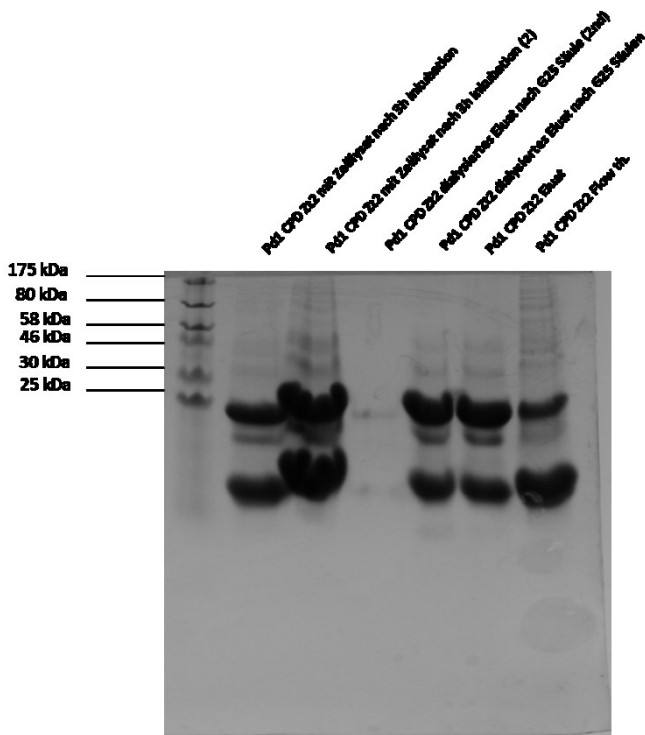


Abbildung 25: Aufreinigung des phosphorylierten PD1-CPD-Zt2 in der Ni²⁺-Gravity Column.

Die Proteinkonzentration betrug nach der Eluation aus der G25 Säule 1,9mg/ml (0,087mM) in einem Volumen von 1,5ml. Um die Konzentration zu erhöhen wurde auf bis zu 500µl (4mg/ml) aufkonzentriert. Die Probe wurde dann mit 50µl D₂O versetzt und war für die Vermessung im NMR Spektrometer fertig.

6.3.3 HSQC

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden HSQCs vom phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem PD1-CPD-Zt2 aufgenommen und mit dem HSQC vom PD1-CPD übereinander gelegt (Abbildung 26). Die Pfeile in der Abbildung 26 symbolisieren Peak shifts. Die beiden Pfeile, die durch die Sternchen markiert sind, könnten phosphorylierte Tyrosine sein. Aufgrund der nicht vollständigen Zuordnung der Peaks, wäre eine solche Aussage spekulativ und müsste erst durch weitere Experimente oder besser aufgelöste Spektren bestätigt werden.

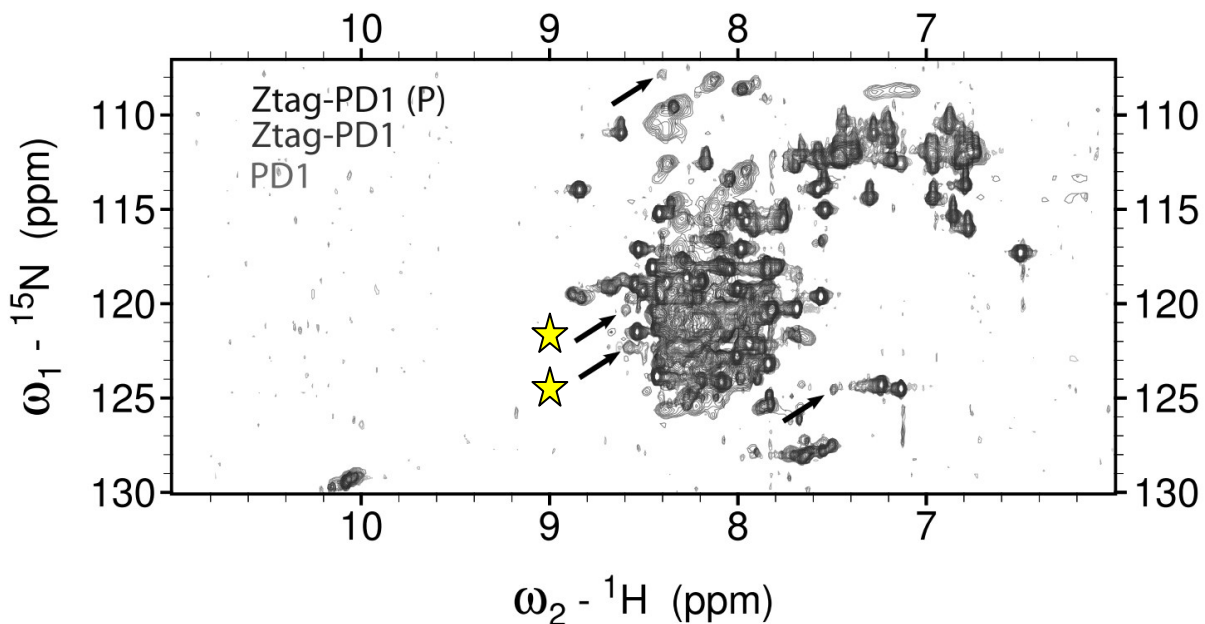


Abbildung 26: Überlagerung des phosphorylierten PD1-CPD-Zt2, Nicht-phosphorylierten PD1-CPD-Zt2 und PD1-CPD HSQC. Die Sterne symbolisieren die potenziellen phosphorylierten Tyrosine.

7 Ausblick

Das Anfangs beschriebene Problem mit der Degradierung konnte durch Beibehaltung des Zt2-Tags verbessert werden, aber nicht vollständig gelöst werden. Es bleibt also viel Optimierungsarbeit in der Aufreinigung sowohl des phosphoryliertem als auch des nicht-phosphoryliertem PD1-CPD bzw. PD1-CPD-Zt2 über. Auch muss die Degradierung minimiert werden. Denn nur durch einen hohen Konzentrationsgehalt und einen hohen Reinheitsgrad können gute Spektren aufgenommen werden. Der nächste Schritt könnte z.B. durch spezifische Anti-Phosphotyrosin Antikörper erfolgen, der die Phosphorylierung bestätigen könnte. Im weiteren Verlauf müsste auch der potenzielle Interaktionspartner SHP-2 exprimiert und aufgereinigt werden. Durch Interaktionsstudien mit diesem Protein könnte erstmals auf strukturebiologischer Ebene der Interaktionsmechanismus beschrieben werden und so der erste Schritt in das genaue Verständnis des „PD1-Pathways“ gemacht werden.

8 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization Link - zuletzt besucht am 10.01.2016:
<http://www.who.int/features/factfiles/cholera/facts/en/index1.html>
2. Mani Maheshwari, Krishnaiah Nelapati, Bindu Kiranmayi (2011). *Vibrio cholerae* - A review. *Vet World*. **4(9)**: 423-428
3. Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman, R. and Colwell, R.R. (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 275- 283.
4. Depaola, A. (1981). *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: Literature review. *J. Food Sci.* **46**: 66- 70.
5. Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes. Infect.* **2**:1651-1660. DOI:10.1016/S12864579(00) 01321-6.
6. Rippey, S.R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 419- 425.
7. Felsenfeld, O. (1967). The cholera problem. St. Louis; *Warren Green*. **165**.
8. Kolvin, J.L. and Roberts, D. (1982). Studies on the growth of *Vibrio cholerae* biotype Eltor and biotype classical in foods. *J. Hyg. (Lond)*. **89**: 243- 252.
9. Weinke T., Liebold I., Burchard G., Fruhwein N., Grobusch M., Hatz C., Kollaritsch H., Nothdurft H., Reisinger E., Rieke B., Schonfeld C., Steffen R. and Sticha. (2008). Prophylactic immunization against travellers diarrhoea caused by enterotoxin- forming strains of *Escherichia coli* and against Cholera, travel medicine and infectious disease. *Travel. Med. Infect. Dis.* **6**: 362- 336. DOI: 10.1016/j.tmaid.2006.05.003.
10. Finkelstein, R.A. (1988). Cholera, the cholera enterotoxins, and the cholera enterotoxin- related enterotoxin family, p **85-102**. In, Owen, P. and Foster, T.J.(ed.), *Immunochemical and molecular genetic analysis of bacterial pathogens*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
11. Steckbrief seltener importierter Infektionskrankheiten - Link vom Robert-Koch Institut (Stand 01.2016):
http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/Steckbriefe/Steckbriefe_120606.pdf?__blob=publicationFile
12. Georg Fuchs (2006). *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag. **8. Auflage**: S.584
13. Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ (1987): Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84** (9). 2833-2837

14. Patrick Michael Köck (2013) Masterarbeit Uni Graz. Expression and structural determination of the toxin co-regulated pilus biosynthesis protein H (TcpH) from *Vibrio cholerae* and studies for the selectivity of DNA binding of the *Cladosporium herbarum* cold shock protein Cla h 8 by NMR measurements.
15. Brandon M Childers & Karl E Klose. (2007). Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: the ToxR regulon. *Future Microbiol.* **2**(3). 335-344
16. Krukonis ES, Yu RR, DiRita VJ. (2000). The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol.* **38**(1):67-84.
17. Krukonis ES, DiRita VJ. (2003). DNA binding and ToxR responsiveness by the wing domain of TcpP, an activator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Mol Cell.* **12**(1):157-65.
18. Pfau JD, Taylor RK. (1998). Mutations in *toxR* and *toxS* that separate transcriptional activation from DNA binding at the cholera toxin gene promoter. *J Bacteriol.* **180**(17):4724-33.
19. Beck NA, Krukonis ES, DiRita VJ. (2004). TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP. *J Bacteriol.* **186**(24):8309-16.
20. Matson JS, DiRita VJ. (2005). Degradation of the membrane-localized virulence activator TcpP by the YaeL protease in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**(45):16403-8.
21. Kovacikova G, Skorupski K. (1999). A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J Bacteriol.* **181**(14):4250-6.
22. ExPASy site (ProtParam) 01.2016: <http://web.expasy.org/protparam/>
23. T.J. Kirn, M.J. Lafferty, C.M.P Sandoe and R.K. Taylor. (2000). Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization. *Molecular Microbiology*. Vol.**35**(4):896-910.Link:
http://remf.dartmouth.edu/images/BacteriaCholeraTEM/source/o395_wt_cholera_wild_type.html
24. Zhang, R.G., Scott, D.L., Westbrook, M.L., Nance, S., Spangler, B.D., Shipley, G.G., Westbrook, E.M. (1995). The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J.Mol.Biol.* **251**: 563-573
25. Disorder Prediction Meta-Server (Dismeta). (12.2015). Link: <http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/disorder/>
26. Dichroweb Online tool. (08.2015). Link: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

27. Keir ME¹, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* **26**:677-704
28. Ishida Y¹, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**(11):3887-95
29. Hiroyuki Nishimura, Masato Nose, Hiroshi Hiai, Nagahiro Minato, Tasuku Honjo. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity.* **11**(2):141-51
30. Nishimura H¹, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science.* **291**(5502):319-22.
31. Freeman GJ¹, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* **192**(7):1027-34.
32. Latchman Y¹, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* **2**(3):261-8.
33. Okazaki T¹, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(24):13866-71.
34. Parry RV¹, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* **25**(21):9543-53.
35. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* **203**(4):883-95.
36. Chemnitz JM¹, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* **173**(2):945-54.

37. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C. (2006). T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* **25**(11):2623-33.
38. Fife BT, Pauken KE. (2011). The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* **1217**:45-59.
39. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell.* **138**(1):30-50.
40. Vijayakumar Velu, Kehmia Titanji, Baogong Zhu, Sajid Husain, Annette Pladevega, Lilin Lai, Thomas H. Vanderford, Lakshmi Chennareddi, Guido Silvestri, Gordon J. Freeman, Rafi Ahmed and Rama Rao Amara. (2009). Enhancing SIV-Specific Immunity In Vivo by PD-1 Blockade. *Nature.* **458**(7235): 206–210.
41. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, Gilson MM, Wang C, Selby M, Taube JM, Anders R, Chen L, Korman AJ, Pardoll DM, Lowy I, Topalian SL. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* **28**(19):3167-75.
42. D. F. McDermott, C. G. Drake, M. Sznol, J. A. Sosman, D. C. Smith, J. D. Powderly, D. M. Feltquate, G. Kollia, A. K. Gupta, J. Wigginton; Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA; Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University, Baltimore, MD; Yale Cancer Center, New Haven, CT; Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN; University of Michigan, Ann Arbor, MI; Carolina BioOnco Institute, Huntersville, NC; Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ. (2011). A phase I study to evaluate safety and antitumor activity of biweekly BMS-936558 (Anti-PD-1, MDX-1106/ONO-4538) in patients with RCC and other advanced refractory malignancies. *J Clin Oncol.* **29**: 2011
43. Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, Chandraker A. (2012). Role of the PD-1 pathway in the immune response. *Am J Transplant.* **12**(10):2575-87.
44. NEB Calculator. Online tool. Stand 01.2016. <http://nebasechanger.neb.com/>