

# Protein-Expressions-Pipeline für die Forschung an Faltungshelferproteinen für ribosomale RNA

P. Vierig<sup>1,2</sup> und R. Börner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laserinstitut Hochschule Mittweida, Hochschule Mittweida

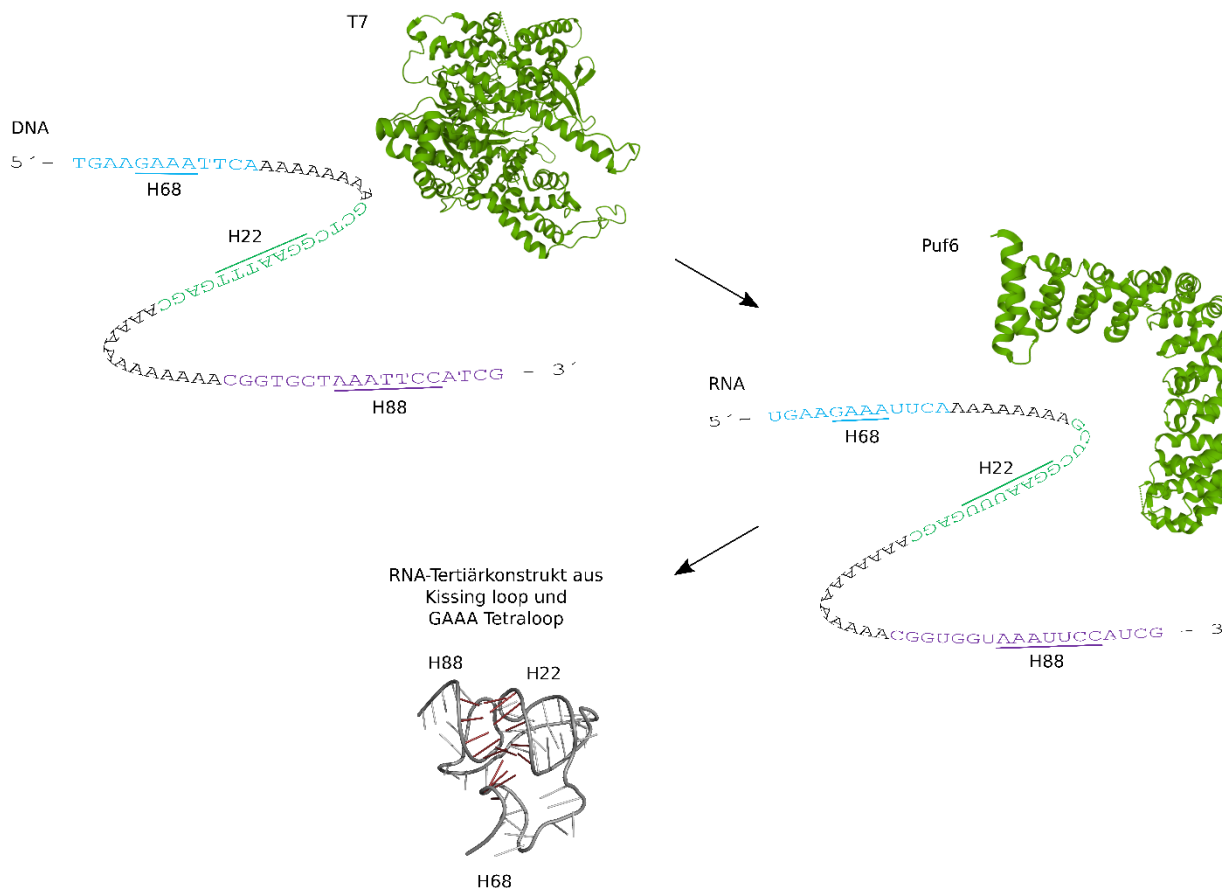
<sup>2</sup> Ingenieurwissenschaftliche Fakultät Hochschule Mittweida

\* Korrespondenz: [pvierig@hs-mittweida.de](mailto:pvierig@hs-mittweida.de), [richard.boerner@hs-mittweida.de](mailto:richard.boerner@hs-mittweida.de)

**Kurzfassung.** Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Etablierung einer Proteinsynthesestrecke für T7-RNA Polymerase (T7-RNAP) und Pumilio und fem3 mRNA-Bindungsfaktoren 6 (Puf6) unter Verwendung der minimal notwendigen Methoden. Die Proteine können kosteneffizient in Prokaryoten rein und hochaktiv exprimiert und danach wirksam mit einem Hexahistidin-Tag über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Anwendung finden die Proteine bei der Synthese und Faltung z.B. von ribosomaler RNA (rRNA). In dieser Arbeit wird die Optimierung der T7 und Puf6 Synthese beschrieben, um eine möglichst hohe Ausbeute und Reinheit zu gewährleisten, beides unverzichtbare Faktoren für die Forschung und die biotechnologische Anwendung der Proteine.

## 1. Motivation

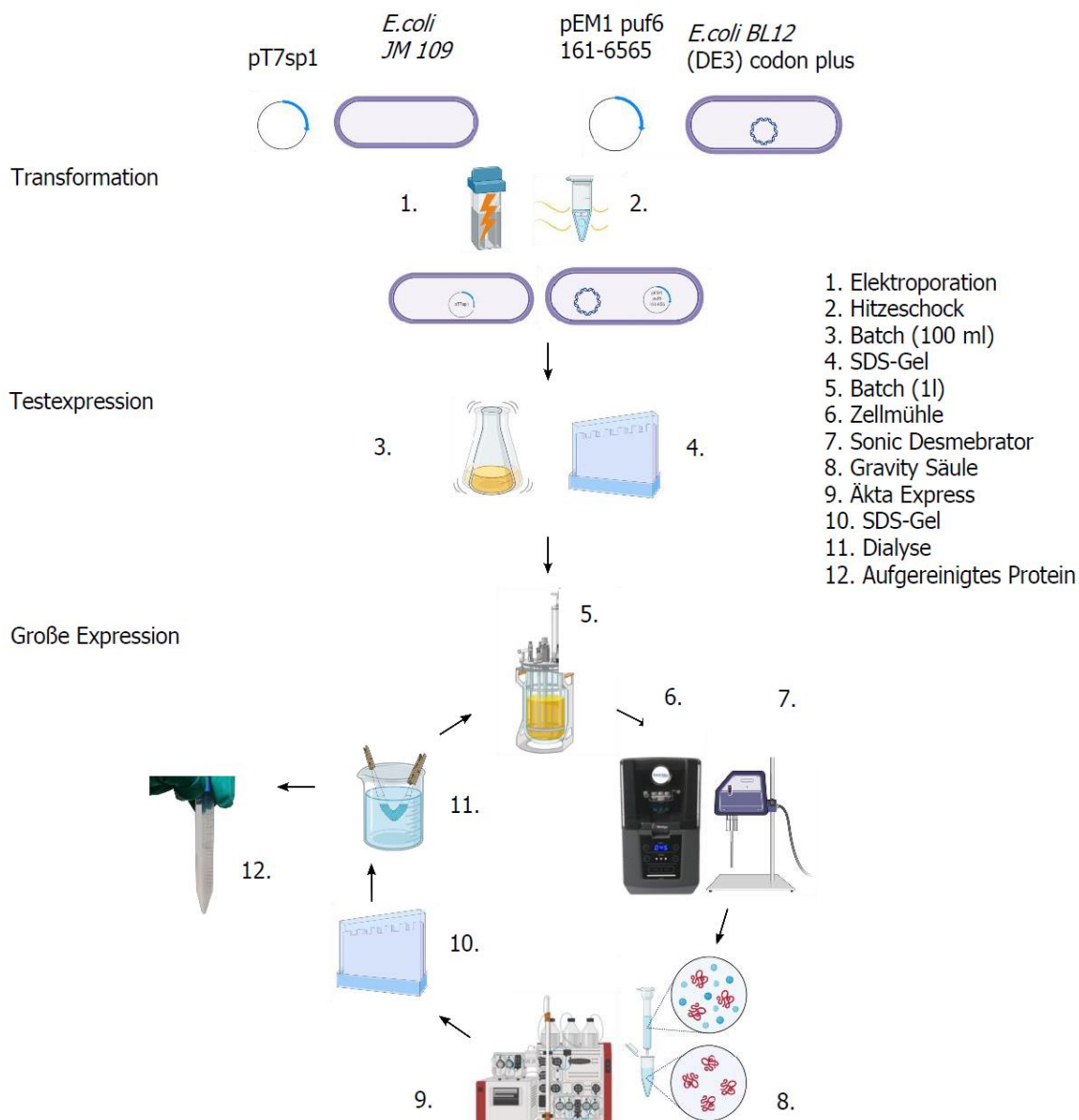
Unsere aktuelle Forschung zielt auf das bessere Verständnis des Reifungsprozesses von ribosomaler RNA (rRNA) ab. Der Fokus liegt dabei auf der Interaktion von einem Kissing Loop mit einem GAAA Tetraloop. Das RNA-Tertiärkonstrukt besteht dabei aus drei Hairpins, wobei zwei Hairpins (Helix H88 und H22) den Kissing Loop bilden und ein Hairpin (Helix H68) den GAAA Tetraloop darstellt. *In vitro* sind die Helices mit Poly-A-Linkern verknüpft und stellen somit ein 65 bp langes DNA-Template dar. Durch einen davor geschalteten T7-RNA Polymerase (T7-RNAP) Promotor kann in einer *in vitro* Transkription aus dem DNA-Template RNA hergestellt werden [1]. Damit Struktur- und Ligandenbindungsstudien durchgeführt werden können, muss die RNA gefaltet werden, ohne die Bindungsstelle des Tertiärkonstruktes zu beeinflussen. Um die native Faltung der RNA zu garantieren, wird ein Protein benötigt, welches Chaperone-ähnliche Eigenschaften aufweist. Puf6 interagiert mit der rRNA und erleichtert deren Faltung insbesondere bei niedrigen Temperaturen [2]. Dieser Prozess ist schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der RNA Synthese unter Verwendung von T7-RNAP (PDB 1MSW) und Puf6 (PDB 4WZW).

## 2. Methoden

Die Expression eines Proteins kann in drei Etappen Transformation, Testexpression und große Expression unterteilt werden. Jeder Teilschritt muss dabei je nach Gegebenheiten und angestrebtem Ziel angepasst und optimiert werden. Zu Beginn muss der Expressionsvektor in den gewünschten Expressionsorganismus transformiert werden. Dies kann je nach Größe des Vektors, Organismus und Transformationseffizienz durch Elektroporation oder durch Hitzeschock durchgeführt werden. Daraufhin werden, in Form einer Testexpression, die Expressionsbedingungen im kleinen Maßstab getestet und optimiert. Die Ergebnisse werden im SDS-Gel ausgewertet und kontrolliert. Die Große Expression dient der effizienten Gewinnung hoch aktiven Proteins. Die Zellen können durch physikalische Kraft z.B. in einer Zelmühle oder durch Ultraschall aufgeschlossen werden. Das Zilopeptid von anderen Proteinen zu trennen kann je nach Laborausstattung über Nickel-Affinitätschromatographie eines automatisierten Chromatographiesystems (z.B. Äkta) oder einer Schwerkraftsäule (engl. *gravity column*) erfolgen. Die Aufreinigungsschritte der Proteinexpression werden im SDS-Gel ausgewertet. Hoch reine Proteinfractionen aus dem Chromatographieschritt werden im Dialyseverfahren umgepuffert. Zum Schluss erhält man reines, aktives Protein, welches z.B. im 25% Glycerolstock fraktioniert bei -80 °C gelagert werden kann. Eine schematische Darstellung des Proteinexpressionsprozesses ist in Abb. 2 zu sehen.



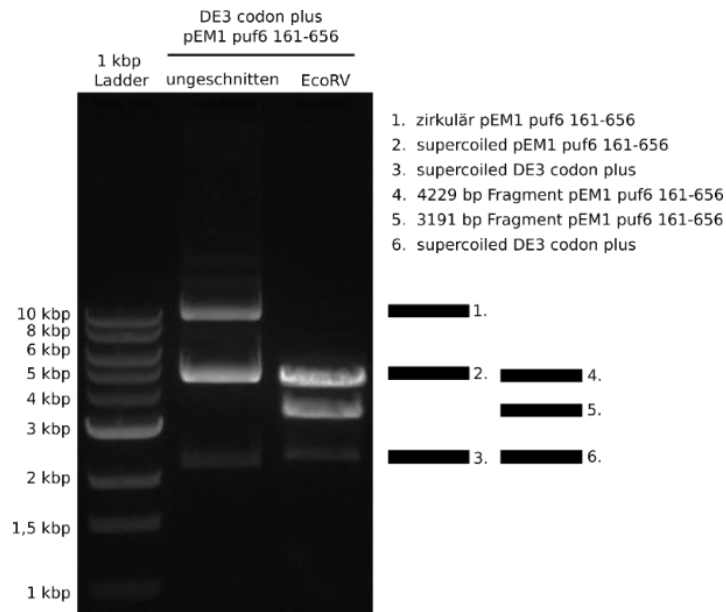
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung von Beginn der Proteinexpression bis zur Aufreinigung. Es werden die Prozesse der Transformation über Testexpression bis zur Expression im Großen Maßstab zugeordnet.

### 3. Ergebnisse

Die Etablierung eines Proteinsynthesewegs von T7-RNAP und Puf6, mit Beginn bei der Transformation, über die Testexpression bis hin zur Expression im großen Maßstab und der darauffolgenden Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie wird hier in Kurzform dargestellt.

#### 3.1 Testverdau

Die transformierten *E. coli BL12 (DE3) codon plus* pEM1 puf6 161-656 Zellen wurden nach einer Übernachtskultur mit Hilfe des Plasmid Miniprep-Kit aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmidpräparationen betrug 390,5 ng/µl. Anschließend wurde ein Testverdau durchgeführt, um den Expressionsvektor eindeutig nachzuweisen (Abb. 3). Der 20 µl Ansatz wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

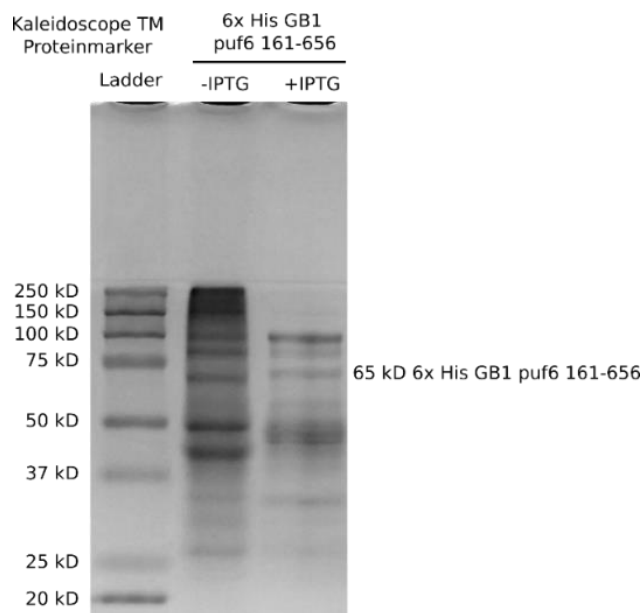


**Abbildung 3:** Testverdau von DE3 codon plus pEM1 puf6 161-656 mit EcoRV. Auftrag einer 1 kbp DNA-Leiter auf ein 1% Agarosegel.

Im 1% Agarosegel wurde neben dem Vektorverdau von DE3 codon plus pEM1 puf6 161-656 mit EcoRV der ungeschnittene Vektor aufgetragen. Zum besseren Verständnis wurden die Banden numerisch beschriftet. In der Bahn des ungeschnittenen Vektors pEM1 puf6 161-656, welcher eine Größe von 7420 bp besitzt, wurden drei Banden sichtbar. Dabei stehen die Banden 1 und 2 für den Expressionsvektor pEM1 puf6 161-656 in seiner zirkulären- (ca. 10 kbp) und seiner *supercoiled* Form (ca. 5 kbp). Die Banden 3 und 6 in der „ungeschnitten“ und „EcoRV“ Bahn zeigen den ungeschnittenen DE3 codon plus Vektor in seiner *supercoiled* Form (ca. 2,5 kbp). Die gewünschten Fragmente des pEM1 puf6 161-656 Vektors nach dem Verdau mit EcoRV liegen bei einer Größe von 3191 bp (Bande 5) und 4229 bp (Bande 4).

### 3.2 Testexpression

Um die Expressionsbedingung des Konstruktes *E. coli* BL12 (DE3) codon plus pEM1 puf6 161-656 zu testen, wurde eine Testexpression durchgeführt. Für die Beurteilung wurde die Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 4).

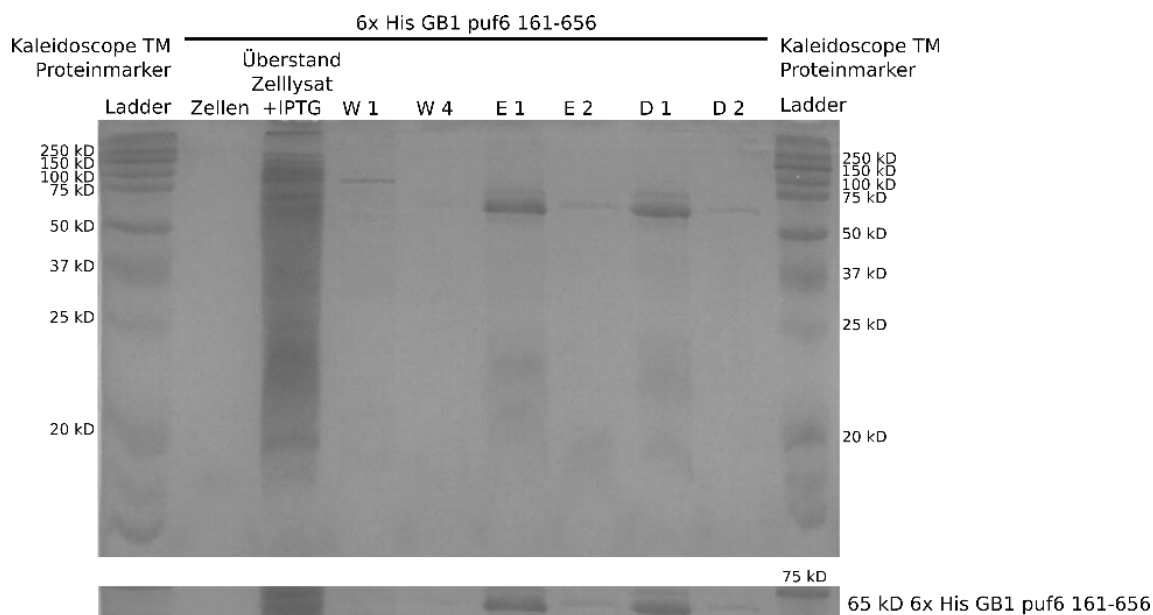


**Abbildung 4:** SDS-Gel der Testexpression von *E. coli* BL12 (DE3) puf6 161-656 ohne und mit Zugabe von IPTG unter reduzierenden Bedingungen. Als Leiter wurde der KaleidoscopeTM-Proteinmarker aufgetragen.

Bei beiden Proteinproben des Konstruktes *E. coli* BL12 (DE3) codon plus pEM1 puf6 161-656 (Abb. 4) wurde eine Expression nachgewiesen. Beide Proben zeigten vollständig separate Banden. Auffällig ist, dass bei den Bahnen „-IPTG“ und „+IPTG“ unterhalb der Laufweite der 75 kDa Markerbande eine Bande zu sehen ist. Die Bande entspricht mit einer Laufweite von ca. 65 kDa den Polypeptid 6x His GB1 puf6 161-656. Die anderen Banden unter der 50 kDa Markerbande stellen mit den Banden über 75 kDa nicht gewünschte Expressionsprodukte dar.

### 3.3 Große Expression

Für die Synthese reiner, hoch aktiver Proteine wurde die Expression im großen Maßstab durchgeführt. Nach Aufbereitung des Probenextraktes wurde mit der Proteinaufreinigung per Ni-NTA Affinitätschromatographie begonnen. Für die Auswertung der Puf6 Proteinaufreinigung über eine Schwerkraftsäule, wurden Zellen ohne IPTG, der Überstand des Zelllysats mit IPTG, der Waschschrift 1, der Waschschrift 4, der Elutionsschritt 1, der Elutionsschritt 2, die Dialyse 1 (von Elutionsschritt 1) und die Dialyse 2 (von Elutionsschritt 2) zusammen auf ein Gel aufgetragen und verglichen (Abb. 5).



**Abbildung 5:** SDS-Gel von Puf6 Proteinproben nach Aufreinigungsschritten über eine Schwerkraftsäule unter reduzierenden Bedingungen. Aufgetragen wurde Zellen ohne IPTG, Überstand Zelllysat mit IPTG, Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 4 (W4), Elutionsschritt 1 (E1), Elutionsschritt 2 (E 2), Dialyse 1 (von Elutionsschritt 1) (D 1) und Dialyse 2 (von Elutionsschritt 2) (D 2). Als Leiter wurde der KaleidoscopeTM-Proteinmarker aufgetragen.

Im SDS-Gel ist auf jeder Bahn, außer auf der ersten, mindestens eine Bande zu erkennen. Auf der Spur „Überstand Zelllysat +IPTG“ sind neben der Proteinbande für Puf6 bei 65 kDa, weitere Banden erkennbar. Der Probenauftrag von Waschschrift 1 und 4 zeigt jeweils eine Bande. Die Bande in der Bahn des Probenauftrags von W1 läuft bei einer Weite von 100 kDa, die des W4 bei ca. 65 kDa. In Spur E1 und D1 sowie E2 und D2 sind die Bandenmuster identisch. In der Bahn von E1 und D1 läuft eine Bande knapp unter der 75 kDa Markerbande und eine Bande bei ca. 65 kDa. Die Bande bei einer Laufweite von 65 kDa entspricht der Größe von Puf6 und ist ebenfalls in Spur E2 und D2 vorzufinden. Die Proteinkonzentration von Puf6 des Dialyseschritt 1 beträgt 13,1  $\mu$ M.

## Datenverfügbarkeit

Gezeigte Daten wurden selbst erhoben und nicht von anderen genutzt und können von den Autoren erfragt werden.

## Interessenskonflikte

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte bestehen.

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei der Erarbeitung dieses Projektes unterstützt haben. Zuallererst möchte ich Richard Börner für das spannende Thema und die Betreuung meiner Arbeit danken. Danksagung bei Michaela Oplova und Vikram Panse für das zur Verfügung stellen des Plasmids und der Zelllinie. Roland K.O. Sigel für den Praktikumsplatz sowie die Betreuung durch Ferreira Rodrigues an der Universität Zürich. Weiterhin möchte ich mich bei Röbbke Wünschiers für die Zweitbetreuung sowie die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Rene Kretschmer und Sandra Feik danke ich für die Unterstützung

im Labor und für die anregenden Diskussionen. Außerdem möchte ich der gesamten Forschungsgruppe des B-Labs für die großartige Arbeitsatmosphäre danken. Wir bedanken uns ausdrücklich für die finanzielle Unterstützung beim Aufbau des Börner Labs bei der Hochschule Mittweida und dem Laserinstitut Hochschule Mittweida.

## Literaturverzeichnis

1. Sousa, Rui; Mukherjee, Srabani (2003): T7 RNA Polymerase. In: , Bd. 73: Elsevier (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology), S. 1–41.
2. Gerhardy, Stefan; Oborská-Oplová, Michaela; Gillet, Ludovic; Börner, Richard; van Nues, Rob; Leitner, Alexander et al. (2021): Puf6 primes 60S pre-ribosome nuclear export at low temperature. In: Nature communications 12 (1), S. 4696.