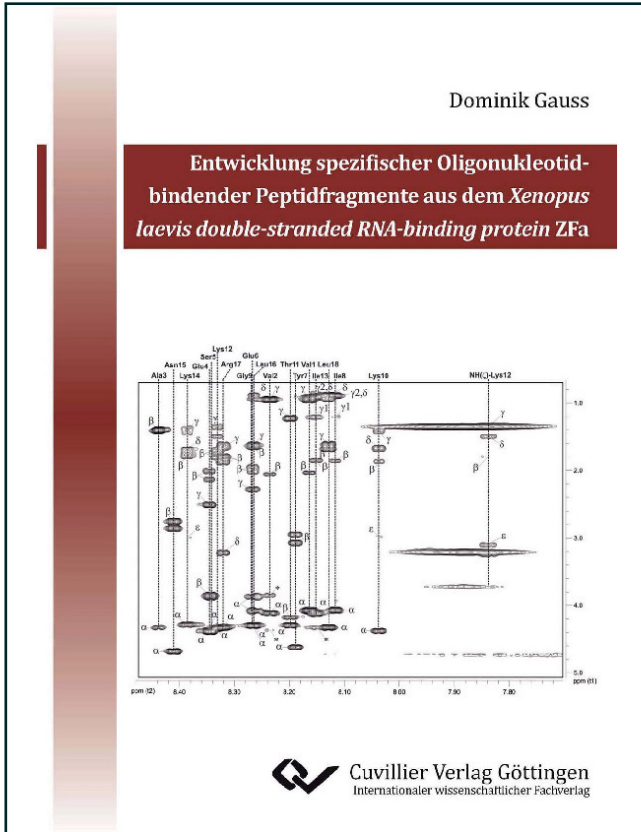




Dominik Gauss (Autor)

Entwicklung spezifischer Oligonukleotid-bindender Peptidfragmente aus dem *Xenopus laevis* double-stranded RNA-binding protein ZFa



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/141>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	7
1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren	7
1.1.1. Doppelsträngige RNA	7
1.1.2. DNA/RNA-bindende Proteine	8
1.1.3. Das <i>dsRNA-binding protein dsRBP-ZFa</i> aus <i>Xenopus laevis</i>	13
1.1.4. Das dsRNA-erkennende Protein Rnt1p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
1.2. Künstliche Bindungsmotive für Nukleinsäuredoppelstränge	21
1.2.1. Niedermolekulare dsRNA-Liganden	21
1.2.2. Peptidmimetika	22
2. Zielsetzung	25
3. Methoden	27
3.1. Peptidsynthese	27
3.2. Proteinexpression	31
3.3. NMR-Spektroskopie	33
3.3.1. Homonukleare 2D-NMR-Spektroskopie	35
3.3.2. Heteronukleare 2D-NMR-Spektroskopie	37
3.3.3. Wasserunterdrückung	39
3.3.4. Konformationsanalyse	41
3.4. CD-Spektroskopie	45
3.4.1. Anwendung	46
3.5. Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	47
3.5.1. Theoretische Grundlagen	47
3.5.2. Anwendung	50
3.6. Isotherme Titrationskalorimetrie	51
4. Oligonukleotid-bindende Peptide basierend auf der Struktur von dsRBP-ZFa	55
4.1. Verwendete Oligonukleotide	55

4.2.	Das ZF1 und ZF2 enthaltende Proteinfragment dsRBP-ZFa 2-128	58
4.2.1.	Transformation und Optimierung der Expressionsbedingungen	59
4.2.2.	Präparative Expression und Reinigung	62
4.2.3.	Interaktionsstudien mit Oligonukleotiden	68
4.3.	Von dsRBP-ZFa abgeleitete Peptide	74
4.3.1.	Nachbildungen der zweiten Zinkfingerdomäne	75
4.3.2.	Nachbildungen der ersten Zinkfingerdomäne	105
5.	Interaktion mit doppelsträngiger RNA - basierend auf der α1-Helix von Rnt1p	111
5.1.	Strukturelle Charakterisierung	111
5.2.	Interaktionsstudien	115
5.2.1.	NMR-Titration	115
5.2.2.	HHR-Assay	116
5.2.3.	SPR-Experimente	116
5.3.	N-terminale PEG-Funktionalisierung	119
5.4.	Photoschalter	121
6.	Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem NIR-Fluoreszenzfarbstoff	127
7.	Zusammenfassung	133
7.1.	Substrukturen des dsRNA-erkennenden Proteins dsRBP-ZFa	133
7.2.	Peptide ausgehend von der α 1-Helix des Proteins Rnt1p	138
7.3.	Labeling eines membrangängigen Peptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff	140
8.	Experimenteller Teil	143
8.1.	Allgemeine Angaben	143
8.1.1.	UV/Vis-Absorptionsspektroskopie	143
8.1.2.	HPLC	143
8.1.3.	Massenspektrometrie	144
8.1.4.	CD-Spektroskopie	144
8.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Peptidsynthese	145
8.3.	Synthetisierte Peptide	151
8.3.1.	dsRBP-ZFa-Peptide	151
8.3.2.	Rnt1p-Peptide	175
8.4.	Verwendete Oligonukleotide	184
8.4.1.	RNA-Transkription	185
8.5.	Proteinexpression	188
8.5.1.	Puffer und Medien	188

8.5.2. Transformation und Expression	189
8.5.3. Plasmidpräparation	192
8.5.4. Reinigung	192
8.6. NMR-Experimente	193
8.6.1. Probenvorbereitung	193
8.6.2. Spektrometer	193
8.6.3. Spektren	194
8.6.4. <i>Secondary chemical shifts</i>	194
8.6.5. NMR-Titrationsen	195
8.7. SPR-Experimente	198
8.7.1. Verwendete Puffer und Lösungen	198
8.7.2. Immobilisierung	200
8.7.3. Bindungsexperimente	202
8.8. ITC-Experimente	202
8.9. HHR-Experimente	202
8.10. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	203
8.10.1. Radioaktive Markierung der DNA	203
8.10.2. Gelelektrophorese	203
8.11. NIR-label	204
A. Verwendete Chemikalien	207
B. NMR-Pulsprogramme	209
C. Module Peptidsynthesizer	247
Literaturverzeichnis	255