

Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Zellanzucht von *Escherichia coli* in Flüssigkultur

Für die Aufzucht von *E. coli*-Zellen in Flüssigkulturen wird die benötigte Menge LB-Medium mit einer Einzelkolonie oder mit 1/1000 Volumen einer Stammkultur angeimpft. Bei Kulturvolumina über 200 ml sollte man zum Animpfen der Hauptkultur eine Vorkultur verwenden. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme, deren Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, wird das Medium mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Das Zellwachstum erfolgt über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Zur Herstellung einer Stammkultur werden 600 µl der Bakterienkultur mit sterilem Glycerin in einer Endkonzentration von 10% versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

LB (Luria-Bertani)-Medium

10 g/l Caseinhydrolysat No.140	pH-Wert auf 7,0 –7,4 mit NaOH einstellen
5 g/l Hefeextrakt	portionieren und autoklavieren (20 min, 121°C, 1 bar)
10 g/l NaCl	

3.1.2 Zellanzucht von Einzelkolonien

Die Anzucht von Einzelkolonien erfolgt auf ampicillinhaltigem LB-Festmedium (Agarplatten). Für die Herstellung von Agarplatten wird dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C wird Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

Zur Anzucht der Kolonien werden ca. 100 µl einer Zellkultur nach Transformation kompetenter Zellen oder einer Flüssigkultur auf Agarplatten ausgestrichen und bis zu 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen von Flüssigkulturen werden Einzelkolonien mit einer sterilen Platin-Impföse entnommen.

3.1.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Man bezeichnet Zellen, die Nukleinsäuren aufnehmen können als kompetent. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz von Plasmid-DNA in *E. coli* werden Zellen eingesetzt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase und geringer Zelldichte befinden und diese mit Calciumchlorid behandelt (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook *et al.*, 1989).

100 ml LB-Medium werden mit 100 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* JM109 angeimpft und unter kräftigem Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,3 bei 600 nm inkubiert. Die Kultur wird 4 min bei 4°C und 3.000× g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 20 ml eiskalter 75 mM Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird wie zuvor zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Zellpellet wird in 1 ml eiskalter 75 mM Calciumchloridlösung mit 25% Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspension wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2 Methoden zur Präparation, Aufreinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmiden werden die Zellen durch alkalische Lyse in Gegenwart von SDS aufgeschlossen (Ish-Horowicz und Burke, 1981; Birnboim und Doly, 1979). Nach Neutralisation fallen Lipide, Proteine und chromosomale DNA als unlöslicher Komplex aus. Aus dem Überstand der folgenden Zentrifugation kann die Plasmid-DNA direkt durch Ethanolpräzipitation gewonnen werden. Für Restriktionsanalysen, *in vitro* Transkriptionen und vor allem für Sequenzierungsreaktionen sollte die DNA jedoch frei von jeglichen Kontaminationen sein. Daher empfiehlt sich die Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Das Säulenmaterial ist in der Lage, DNA bei einer angemessenen niedrigen Salzkonzentration zu binden und während des Waschens mit einer mittleren Salzkonzentration nur RNA und unerwünschte Verunreinigungen abzugeben. Die saubere Plasmid-DNA wird bei leicht alkalischem pH-Wert und einer vergleichsweise hohen Salzkonzentration eluiert. Durch eine anschließende Alkoholfällung werden die Salze entfernt und die DNA aufkonzentriert.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Säulen und die zugehörigen Kits der Firmen Genomed und Qiagen benutzt. Je nach gewünschter Plasmidausbeute werden verschieden große Kulturvolumina und Säulen verwendet.

3.2.2 Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation

Die Konzentrierung von Nukleinsäuren und Entfernung von Salzen, welche überwiegend in Lösung bleiben, erfolgt durch Präzipitation (Fällung) mit Ethanol in Gegenwart monovalenter Kationen (Shapiro, 1981).

Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit einem zehntel Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem doppelten Volumen -20°C kaltem Ethanol gemischt. Nach einer Inkubation von mindestens 15 min bei -80°C oder 2 Stunden bei -20°C wird der Ansatz für 30 min bei 4°C und 15.000× g zentrifugiert. Das Sediment wird anschließend zur Entfernung mitgefällter Salze mit -20°C kaltem, 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Sediment entweder 5-15 min an der Luft oder 1-2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wird es in einem adäquaten Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst. Mit dieser Methode können selbst so geringe Nukleinsäurekonzentrationen wie 20 ng/ml quantitativ präzipitiert werden. Die Fällung noch geringerer Konzentrationen ist durch Zugabe von Glycogen in einer Endkonzentration von 20-40 µg/ml möglich. Auf diese Weise lassen sich pg-Mengen von DNA oder RNA quantitativ präzipitieren.

Anstelle von Ethanol kann zur Fällung auch ein Volumen Isopropanol verwendet werden. Der Vorteil liegt in dem deutlich geringeren Fällungsvolumen. Der Nachteil in der Kopräzipitation von Salzen und in der schwierigeren Entfernung des Alkohols nach der Fällung. Der Fällungsansatz kann nach Zugabe von 4°C kaltem Isopropanol direkt 30 min bei 4°C und 15.000× g zentrifugiert werden.

3.2.3 Phenolextraktion

Aus wässrigen Lösungen von Nukleinsäuren können Proteine durch Phenolextraktion abgetrennt werden. Dabei werden die Proteine denaturiert und verworfen, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase verbleiben.

Die zu reinigende Nukleinsäurelösung wird mit einem Volumen Phenol (pH 7,5-8,0 für DNA, pH 4,5-5,0 für RNA) versetzt, 30 sec intensiv gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 15.000× g zentrifugiert. Die Zentrifugation führt zur Trennung in eine organische Phenolphase (unten), eine Interphase, die das denaturierte Protein enthält und eine wässrige Phase. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und eine weitere Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (v/v/v) 25:24:1 wie beschrieben durchgeführt. Danach wird mit einem Volumen Chloroform in gleicher Weise extrahiert, um verbliebene Phenolspuren zu entfernen. Verbliebene Chloroformreste können durch Ethanolfällung entfernt werden.

3.2.4 Gelfiltration

Die Gelfiltration trennt Moleküle nach ihrer Größe und Form. Die stationäre Phase (Matrix) besteht aus vernetzten Polysacchariden (Dextran oder Agarose), welche in einem weiten Bereich von Porengrößen erhältlich sind. Moleküle, die klein genug sind, um in die Matrix einzudringen, haben ein größeres Volumen zu durchwandern und werden somit auf der Säule verzögert.

Die bei der *in vitro* Transkription nicht eingebauten Nukleotide werden mittels NAP-Säulen der Firma Pharmacia abgetrennt. Bei der Gelmatrix handelt es sich um Sephadex G-25 (Sephadex-Polydextrane). Die Auftragung der Probe auf die Säule und die Elution der RNA erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers. Ausnahme macht nur das Elutionsvolumen der NAP-5-Säule. Anstelle von 1 ml werden 200 µl aufgetragen und verworfen, bevor mit 700 µl eluiert wird. In Anschluß an die Gelfiltration erfolgt eine Isopropanolfällung, zur Konzentrierung der Probe und restlichen Entfernung von Nukleotiden.

3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der π -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren, absorbieren DNA und RNA ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Mit Hilfe der UV-Absorptionsspektroskopie kann die Konzentration einer Nukleinsäurelösung bestimmt und deren Reinheit näherungsweise ermittelt werden. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden, da die aromatischen Aminosäuren der Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Für reine DNA-Lösungen erhält man Werte um 1,8 und für RNA-Lösungen um 2,0.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = \epsilon \times c \times d$) ist die Absorption A einer Nukleinsäurelösung der Konzentration c proportional, wobei die Schichtdicke d der Lösung und der stoffspezifische Extinktionskoeffizient ϵ die Proportionalitätskonstanten darstellen. Die Absorption bei 260 nm dient als Grundlage für die Konzentrationsberechnung, wobei für einzelsträngige DNA 1 Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von etwa 33 µg/ml entspricht. Für RNA beträgt dieser Wert etwa 40 µg/ml und für doppelsträngige DNA etwa 50 µg/ml.

3.3 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wandern aufgrund ihres Polyanionencharakters im elektrischen Feld zur Anode. Die auf dieser Tatsache beruhende Gelelektrophorese ist eine effiziente Methode zur

Trennung von Nukleinsäuren. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle hängt dabei von der angelegten elektrischen Feldstärke, ihrer Gestalt, ihrer Ladung, ihrer Beweglichkeit in der umgebenden Gelmatrix und der An- oder Abwesenheit denaturierender Agenzien ab. Aufgrund der weitestgehend identischen Ladungsdichte von Nukleinsäuren hängt deren Mobilität hauptsächlich von der Größe und Struktur des Moleküls ab. Bei der Auftrennung von Nukleinsäuren mit einer Länge von über 500 Nukleotiden empfiehlt sich als Gelmatrix die Verwendung von Agarose (lineares Polysaccharid), darunter wird meist quervernetztes Polyacrylamid verwendet.

3.3.1 Agarosegel-Elektrophorese von DNA und RNA

Diese Methode wird standardmäßig bei der Restriktionsanalyse von Plasmiden, für die Analyse von PCR-Produkten oder Transkriptionsprodukten eingesetzt.

Zur Herstellung von Agarosegelen wird die benötigte Menge Agarose eingewogen, mit TBE-Puffer auf das gewünschte Endvolumen gebracht und unter gelegentlichem Schwenken solange gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist und sich keine Schlieren mehr bilden. Die Lösung wird in einen abgedichteten Elektrophoreseschlitten mit Taschenformer (Kamm) gegossen. Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Bei nativer Elektrophorese wird die Probe mit einem fünftel Volumen $6\times$ DNA-Probenpuffer versetzt und in die pufferbedeckten Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 70-110 Volt. Die denaturierende Gel-Elektrophorese findet ihre Anwendung bei der Auftrennung von RNA. Die Probe wird mit dem dreifachen Volumen MOPS-Probenpuffer versetzt und für etwa 5 min bei 65°C inkubiert. Alternativ kann für RNA-Gele MOPS-Laufpuffer verwendet und zur Unterstützung der denaturierenden Wirkung das Gel mit Formaldehyd in einer Endkonzentration von 2% (v/v) versetzt werden.

Zum Nachweis der Nukleinsäuren in Gelen wird Ethidiumbromid verwendet. Es enthält eine planare aromatische Gruppe, die in die gestapelten Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Unter langwelligem UV-Licht fluoreszieren die Nukleinsäurebanden intensiv orange (Sharp *et al.*, 1973). Es kann der Gellösung vor dem Erstarren in einer Endkonzentration von $0,5\ \mu\text{g/ml}$ zugegeben werden. Alternativ kann das Gel nach der Trennung durch 30 minütiges Schwenken in TBE-Puffer mit $1\ \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt werden.

In Tabelle 3 sind die Zusammensetzungen der Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese aufgeführt.

Tabelle 3: Lösungen für die native (A) und denaturierende (B) Agarosegel-Elektrophorese

A	1× TBE-Puffer	6× DNA-Probenpuffer	Gelzusammensetzung
	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA	30% (v/v) Glycerin 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanolblau	0,7-3% Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 1× TBE-Puffer
B	MOPS-Puffer pH 7,0	MOPS-Probenpuffer	Gelzusammensetzung
	20 mM MOPS-NaOH 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA	1 ml Formamid (deionisiert) 332 µl 37% Formaldehyd 200 µl MOPS-Puffer 0,1% Bromphenolblau 17 µl Ethidiumbromid [10 g/l]	0,7-2% Agarose 1× MOPS-Puffer 2% Formaldehyd

3.3.2 Elution von DNA aus nativen Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung kann eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert werden. Für diesen Vorgang stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Bei der Elektroelution wird das Gelstück in eine spezielle Elektrophoresekammer gegeben und durch Anlegung eines elektrischen Feldes wandert die DNA aus der Gelmatrix in eine durch Membranen abgetrennt Kammer. Dabei ist nur die erste Membran für die DNA durchlässig, so daß sich die DNA in dieser Kammer sammelt und schließlich abgenommen werden kann.

Bei Verwendung von Agarose, die bei niedrigen Temperaturen schmilzt ($\leq 65^{\circ}\text{C}$), wird das Gelstück mit 5 Volumen 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert, um die Agarose aufzuschmelzen. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und dann so oft mit Phenol extrahiert, bis keine weißliche Trübung mehr auftritt. Nach zweimaliger Chloroformextraktion wird die DNA-Lösung einer Ethanol- oder Isopropanolfällung unterzogen. Bei Elution von doppelsträngiger DNA ist darauf zu achten, daß die Schmelztemperatur der DNA oberhalb von 65°C liegt.

Handelt es sich um geringere DNA-Mengen und somit relativ kleine Gelstücke, bieten kommerzielle Kits eine gute Alternative. Bei diesen Kits wird das Gelstück mit einem Puffer versetzt, der ein chaotropes Salz (z.B. Guanidin-Thiocyanat) enthält und bei etwa 56°C aufgeschmolzen. In Gegenwart des chaotropen Salzes werden Nukleinsäuren spezifisch an Glasfaser- oder Silicaoberflächen gebunden (Vogelstein und Gillespie, 1979). Von diesen Oberflächen wird die DNA nach einem Waschvorgang mit einer alkalischen Lösung (Tris-HCl pH 8,5), welche die Wechselwirkung mit der Matrix schwächt, eluiert.

3.3.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen dient sowohl der analytischen Trennung von DNA und RNA, als auch von Peptiden und Proteinen. Darüber hinaus kann sie auch zur

präparativen Aufreinigung von RNA und DNA eingesetzt werden. Für Nukleinsäuren hat die Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Vergleich zur Elektrophorese in Agarosegelen eine höhere Beladungskapazität, sowie eine größere Trennkapazität.

Die Elektrophorese erfolgt beispielsweise bei Bindungsstudien unter nativen Bedingungen, da hier die dreidimensionale Struktur der Moleküle erforderlich ist. Unter denaturierenden Bedingungen kann dagegen die relative Molekülgröße durch Vergleich mit Größenstandards ermittelt werden. Zur Denaturierung wird Harnstoff bei der Trennung von Nukleinsäuren verwendet. Durch den Harnstoff, der sowohl Wasserstoffbrückendonator als auch -akzeptor ist, wird die Ausbildung von inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken unterdrückt, was die Auftrennung einzelsträngiger Nukleinsäuren nach ihrer Kettenlänge ermöglicht. Das Denaturierungsmittel bei der Elektrophorese von Proteinen ist Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses kann höhere Strukturen in Proteinen aufbrechen und die Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation zwingen. Dabei lagert sich SDS in einem Massenverhältnis von 1,4 g SDS zu 1 g Polypeptid an, wobei die negative Ladung des Dodecylsulfats die Eigenladung des Polypeptids maskiert. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist in der Regel annähernd proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so daß im elektrischen Feld eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Zwischen der relativen Mobilität des Proteins und dem Logarithmus des entsprechenden Molekulargewichts besteht ein linearer Zusammenhang (Weber und Osborn, 1969). Größere Abweichungen in der elektrophoretischen Mobilität können bei stark hydrophoben Proteinen (z.B. Membranproteinen) oder bei Proteinen, die geladene Gruppen (z.B. Phosphatgruppen) enthalten, auftreten.

Das Polyacrylamidgel ist ein Kopolimerisat von Acrylamid und N, N'-Methylen-bisacrylamid. Die Größe der Poren des Gels wird durch die eingesetzte Acrylamid-Menge und durch den Grad der Vernetzung bestimmt, welcher von der zugesetzten Menge an N, N'-Methylen-bisacrylamid abhängig ist. Als Starter für die Polymerisationskettenreaktion dient Ammoniumperoxodisulfat (APS), welches in wäßriger Lösung freie Radikale bildet. Durch die Zugabe von N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) werden diese Radikale stabilisiert.

3.3.4 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese von DNA und RNA

Denaturierende Gele eignen sich zur Auftrennung von RNA und einzelsträngiger DNA. Die benötigte Gellösung wird nach den Angaben in Tabelle 4 angesetzt und zum Lösen des Harnstoffs leicht erwärmt. Die klare Lösung wird filtriert, entgast und durch Zugabe von 10%-igem APS (60 µl/ml) und TEMED (6 µl/ml) leitet man die Polymerisation ein. Die Gellösung wird dann sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und ein

Taschenformer (Kamm) plaziert. Nach vollständiger Polymerisation wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, mit Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die Auftragung der Proben erfolgt nach 30-minütigem Vorlauf bei 12 Watt und intensivem Spülen der Taschen. Die in TBE-Puffer vorliegende Nukleinsäurelösung wird zuvor zur Denaturierung mit Formamid-Probenpuffer (30% des Endvolumens) versetzt und 2 min bei 80°C inkubiert. Das Laufverhalten kann in einigen Fällen durch Anwesenheit von 0,1% SDS im Gel, sowie in Lauf- und Probenpuffer verbessert werden. Der Lauf erfolgt bei Gelen mit den Dimensionen 120 × 150 mm bei konstanter Leistung von 12-14 Watt.

Tabelle 4: Lösungen für die denaturierende PAGE von DNA und RNA

Stammlösungen	Formamid-Probenpuffer	Gelzusammensetzung
2× TBE-Puffer	97,5% Formamid (deionisiert)	4-20% Acrylamid/Bisacrylamid
30% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	10 mM EDTA	1× TBE-Puffer
10% APS	0,05% Bromphenolblau	7 M Harnstoff
TEMED	0,05% Xylencyanolblau	0,1% SDS (optional)

Nach dem Lauf können die Nukleinsäurefragmente durch 30 minütiges Schwenken in TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und dadurch unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei Auftrennung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wird das Gel zweimal durch jeweils 15 minütiges Schwenken in 20% Methanol, 7,5% Essigsäure dehydratisiert und fixiert. Anschließend wird das Gel auf Filterpapier übertragen und auf einem Gelrockner bei 70°C und angelegtem Vakuum getrocknet. Mit Hilfe des 'Phosphorimager-Systems' wird ein Autoradiogramm der Banden erstellt.

3.3.4.1 Probenvorbereitung für die denaturierende PAGE

Im Gegensatz zur Phenolextraktion können Proteine aus DNA- oder RNA-Lösungen mit geringeren Verlusten durch Inkubation mit Proteinase K entfernt werden. Proteinase K schneidet endoproteolytisch bevorzugt nach der Carboxylgruppe aliphatischer und aromatischer Aminosäurereste.

Bei gelelektrophoretischer Analyse von DNA und mRNA nach Inkubation im *in vitro* Translationsystem empfiehlt es sich, die Proteine durch Verdau mit Proteinase K zu entfernen. Dadurch werden gleichzeitig Nukleinsäuremodifizierende Enzyme inaktiviert. Im Fall der Analytik von DNA ist ein Verdau mit RNase A in einer Endkonzentration von 300 µg/ml in Gegenwart von 24 mM EDTA empfehlenswert, welcher der Behandlung mit Proteinase K vorangeht.

Der *in vitro* Translationsansatz wird zur Unterstützung der Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten mit EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM, zur Denaturierung der

Proteine mit SDS in einer Endkonzentration von 0,5% und mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 0,1 g/l versetzt. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend einer Isopropanolfällung unterzogen. Das Sediment wird in 1,43× TBE-Puffer, 1,43% SDS aufgenommen (evtl. einige min bei 50°C im Thermomixer inkubieren).

3.3.4.2 Polyacrylamidgele für die DNA-Sequenzierung

Besonders wichtig für die Herstellung brauchbarer Sequenziergele ist die Vorbereitung der Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wird, damit sich nach der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierungsreaktion das nur 0,4 mm dicke Gel vollständig von der kleinen Platte löst, getrocknet und autoradiographiert werden kann.

Die beiden Glasplatten unterscheiden sich in ihrer Größe und werden entsprechend ihrer Aufgabe unterschiedlich behandelt. Die große Platte (33 × 42 cm), auf der das Gel nach dem Probenlauf haften bleiben soll und die als Unterlage für das Gel während er Autoradiographie dient, wird silanisiert. Die kleine Platte (33 × 39 cm) wird dagegen silikonisiert, um die Platte vom Gel lösen zu können.

Zunächst werden die Platten gründlich mit Scheuerpulver gereinigt, um letzte Gelrückstände zu entfernen. Danach werden sie mit Spülmittel entfettet, bevor sie zum Schluß mit deionisiertem Wasser sehr gründlich abgespült und mit Ethanol getrocknet werden. Neue Glasplatten werden vor der eigentlichen Behandlung mehrmals mit 1 M NaOH abgerieben und wie oben gereinigt.

Silanisierung der großen Platte:

Die Platte wird mit Ethanol abgerieben und die folgende Lösung aus 400 µl Bind-Silan, 600 µl Essigsäure und 20 ml Ethanol in die Mitte der Platte gegossen und mit einem fusselfreien Papiertuch homogen auf der Platte verteilt. Das Lösungsmittel läßt man 60 min verdunsten. Danach wird die Platte 3× mit Ethanol abgerieben und weitere 60 min getrocknet.

Silikonisierung der kleinen Platte:

Unter einem Abzug werden in die Mitte der Platte 10 ml einer 2%-igen Lösung aus Dichlordimethylsilan in Chloroform gegossen und mit einem fusselfreien Papiertuch verteilt. Die Flüssigkeit wird so lange verteilt, bis durch die rasche Verdampfung des Lösungsmittels eine gleichmäßige Verteilung feinsten Tröpfchen erreicht ist. Die Platte wird für mindestens 30 min unter dem Abzug belassen, um das Chloroform abdampfen zu lassen.

Sequenzierungsreaktionen werden in 6%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Zusammensetzung: 48 g Harnstoff (entspricht 8 M)
 50 ml 2× TBE-Puffer
 20 ml 30% Acrylamid-Mix (37,5:1)
 ad 100 ml bidest. H₂O

Nachdem sich der Harnstoff unter leichter Erwärmung gelöst hat, wird die klare Lösung filtriert. Die Polymerisation wird mit 600 µl 10%-igem APS und 60 µl TEMED ausgelöst. Das Gel wird nach der Aushärtung in die DNA-Sequenzierungskammer eingespannt, diese mit 1× TBE-Puffer gefüllt und ein Vorlauf für 30 min bei 55 Watt durchgeführt. Danach werden die Taschen zur Entfernung des herausdiffundierten Harnstoffs mit Puffer gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 55 Watt, wobei die im Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau (BPB) und Xylencyanolblau (XCB) zur optischen Kontrolle geeignet sind. Nach dem Lauf wird die kleine Glasplatte vorsichtig abgehoben und das an der großen Platte haftende Gel für etwa 7 min unter fließendem deionisiertem Wasser gespült, um den Harnstoff auszuwaschen. Er würde bei der anschließenden Trocknung auskristallisieren und das Gel zerreißen. Das Gel wird vor der Autoradiographie für etwa 30 min im Trockenschrank bei 75°C getrocknet, um die Schärfe der Banden zu erhöhen. Nach dem Abkühlen wird ein Röntgenfilm oder ein 'Phosphorscreen' direkt auf das Gel gelegt, mit einer zweiten Glasplatte fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

3.3.4.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Nach einer *in vitro* Translationsreaktion kann das Proteinprodukt neben systemeigenen Proteinen mit der denaturierenden 'diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese' untersucht werden. Dabei dient die Unterteilung des Gels in ein Sammel- und ein Trenngel einer erhöhten Bandenschärfe und damit einer verbesserten Auflösung (Laemmli, 1970).

Zunächst wird ein Trenngel auf etwa 80% der Gelhöhe gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird die überstehende Flüssigkeit entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Taschenformer eingesetzt.

Das zu trennende Proteingemisch wird einer Acetonfällung unterzogen, wodurch Salze, die das Laufverhalten der Proteine beeinflussen, entfernt werden. Dazu wird der Ansatz erst 1:3 mit H₂O verdünnt, dann mit dem fünffachen Volumen Aceton versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15.000× g und 4°C wird das vom Überstand befreite Sediment 2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in Laemmli-Probenpuffer gelöst, 3 min bei 90°C inkubiert und auf das mit Laufpuffer bedeckte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei 160-180 Volt statt.

Tabelle 5: Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli

Laufpuffer	Sammelgel	Trenngel	Laemmli-Probenpuffer
25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS	5% Acrylamid-Mix (37,5:1) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED	15% Acrylamid-Mix 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 1% SDS 8,5% Glycerin 2,5% β -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau

Die Proteinbanden des Polyacrylamidgels können durch 15-30 minütiges Schwenken in Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht werden. Unspezifische Färbung wird durch mehrstündiges Schwenken in Entfärbelösung entfernt. Die Coomassie-Färbung ist die Standardfärbemethode für Proteine und färbt diese irreversibel mit einer Nachweisgrenze von etwa 100 ng.

Tabelle 6: Lösungen für die Färbung und Entfärbung von Proteingelen

Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung
50% Methanol 10% Essigsäure 0,1% Coomassie blau R250	20% Methanol 7,5% Essigsäure

Das gefärbte Gel wird auf Filterpapier übertragen und auf einem Gelrockner bei 70°C und angelegtem Vakuum 1,5 Stunden getrocknet. Im Falle einer radioaktiven Markierung von Proteinen wird mit Hilfe des 'Phosphorimager-Systems' ein Autoradiogramm der radioaktiven Banden erstellt.

3.4 Enzymatische DNA-Synthese

DNA synthetisierende Enzyme sind nicht in der Lage eine DNA-Synthese *de novo* zu katalysieren. Sie benötigen grundsätzlich eine freie 3'-Hydroxylgruppe eines bereits existierenden DNA- oder RNA-Stranges, die mit dem α -Phosphoratom des eintretenden Nukleosid-5'-triphosphats reagiert. Daraus resultiert die 5'-3' Syntheserichtung der enzymatischen DNA-Synthese. Die Abgangsgruppe bei diesem Vorgang ist das vom 5'-Ende des Nukleosidtriphosphates abgespaltene Pyrophosphat. Neben der freien 3'-Hydroxylgruppe benötigen DNA-Polymerasen einen Matrizenstrang, der die Nukleotidbasenfolge für den zu synthetisierenden Strang vorgibt.

3.4.1 Komplementärstrang-Synthese

Doppelsträngige DNA mit einer Länge von weniger als 100 Basenpaaren wird durch eine sog. Auffüllreaktion erzeugt. Dazu wird ein vergleichbar kurzes DNA-Oligonukleotid am 3'-Ende eines zweiten DNA-Oligonukleotids, welches die benötigte Länge und Sequenz aufweist,

hybridisiert. Mit Hilfe einer beliebigen DNA-Polymerase wird nach Hybridisierung im zugehörigen Puffersystem der komplementäre Strang erzeugt. Der Hybridisierungsschritt umfaßt eine 3 minütige Inkubation bei 94°C und eine anschließende Abkühlung auf 40°C innerhalb eines Zeitraums von mindestens 20 min. Durch Zugabe einer geeigneten DNA-Polymerase und eine mehrminütige Inkubation bei der für das Enzym optimalen Temperatur, erfolgt die Synthese des fehlenden, komplementären Stranges. Im allgemeinen verlaufen solche Reaktionen nahezu quantitativ, was sich gelelektrophoretisch überprüfen läßt. Solche DNA-Moleküle werden z.B. benötigt, um einen bestimmten Bereich in einem Gen auszutauschen.

3.4.2 Reverse Transkription (RT)

Bei der Transkription (Kapitel 3.7) wird von einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase eine zur DNA-Sequenz komplementäre RNA erzeugt. Bei der reversen Transkription handelt es sich um die Umkehrung dieser Reaktion. Es wird also mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der sog. reversen Transkriptase, eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) erzeugt. Für diese Reaktion ist ein DNA-Oligonukleotid (Primer) notwendig, der an die RNA hybridisiert und dessen freies 3'-Hydroxylende dann komplementär zu der RNA-Matrize verlängert wird. Die reverse Transkription wird mit aufgereinigter mRNA nach einer Translationsreaktion (Kapitel 3.8) und der M-MLV RNase H⁻ reversen Transkriptase durchgeführt. Dazu wird die mRNA mit 2-5 pmol Primer in einem Volumen von 15 µl versetzt und nacheinander 2 min bei 80°C, 2 min bei 75°C und 6 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Hybridisierungsschritt wird der Ansatz sofort auf Eis gestellt und mit 5 µl 5× Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1,25 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP), 2,75 µl H₂O versetzt. Nach 2 min bei 52°C wird 1 µl M-MLV RT (200 U/µl) zugegeben und weitere 58 min bei 52°C inkubiert. Anschließend wird zur Inaktivierung des Enzyms 15 min bei 70°C inkubiert.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung spezifischer DNA-Segmente. Dazu werden DNA-Oligonukleotide (Primer) benötigt, die komplementär am 3'- bzw. 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren und von hitzebeständiger DNA-Polymerase (Saiki *et al.*, 1988) verlängert werden. Die PCR läßt sich in drei Schritte unterteilen. Zunächst wird durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94°C die doppelsträngig vorliegende DNA in ihre Einzel-

stränge überführt. Daran schließt sich die Hybridisierung mit den beiden Primern an. Dabei wird durch schnelles Abkühlen auf die Hybridisierungstemperatur und einen großen Überschuß an Primern die Rückbildung des vorher vorliegenden DNA-Doppelstranges unterbunden. Nun wird ausgehend von den angelagerten Primern die DNA-Synthese mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und den vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) durchgeführt. Je nach Verwendungszweck der synthetisierten DNA wird entweder die *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die *Pwo* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* eingesetzt. Letztere zeichnet sich im Vergleich zur *Taq* Polymerase durch eine ähnlich hohe Prozessivität aus und besitzt zudem eine 3'-5'Exonukleaseaktivität, welche einen effizienten Korrekturmechanismus bezüglich fehleingebauter Nukleotide darstellt. Sie eignet sich daher für alle Anwendungen bei denen Mutationen nicht tolerierbar sind. Als Matrize für die PCR kann doppelsträngige wie auch einzelsträngige DNA benutzt werden. Durch Verwendung terminal überhängender Primer kann die ursprüngliche DNA-Sequenz in der PCR um diesen Überhang verlängert werden. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise Schnittstellen für Restriktionsenzyme (Kapitel 3.5.1) oder Promotoren für die *in vitro* Transkription (Kapitel 3.7) einführen.

3.4.3.1 Standard PCR

Die Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes ist in Tabelle 7 aufgeführt. Dieser Ansatz, sowie das aufgeführte Temperaturprogramm, dienen als Startpunkt zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die jeweilige Amplifikation.

Tabelle 7: Reaktionskomponenten für die PCR

Reaktionskomponente	Endkonzentration für 'Taq'	Endkonzentration für 'Pwo'
10× Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,4 50 mM Kaliumchlorid	10 mM Tris-HCl pH 8,85 25 mM Kaliumchlorid 5 mM Ammoniumsulfat 2 mM Magnesiumsulfat
Magnesiumchlorid 50 mM	1,5 mM	-
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	0,2 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
Primer 100 µM	0,5 µM jeweils	0,5 µM jeweils
DNA-Matrize	variabel (pM - nM)	variabel (pM - nM)
DNA-Polymerase	50 U/ml Taq-Polymerase	50 U/ml Pwo-Polymerase

Standardtemperaturprogramm:	Denaturierung vor dem 1. Zyklus	3 min bei 94°C
	Denaturierung	30 sec bei 94°C
	Hybridisierung	60 sec bei x°C
	Primerextension	30-90 sec bei 72°C

Das jeweils benötigte Temperaturprogramm hängt entscheidend von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und der verwendeten Primer ab. Die optimale Hybridisierungstemperatur x ist empirisch zu ermitteln. Mit diesem Programm werden in der Regel 20-40 Zyklen durchlaufen und anschließend auf 4°C gekühlt. Die Größe und Qualität des PCR-Produktes kann durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelt werden. Für eine genaue photometrische Konzentrationsbestimmung müssen nicht umgesetzte Primer und Nukleotide zusammen mit weiteren niedermolekularen Komponenten und der Polymerase entfernt werden. Dies geschieht durch Phenolextraktion und anschließender Ethanol-fällung oder mit Hilfe des 'High pure PCR-product purification Kit' der Firma Roche. Das Prinzip des Kits beruht auf selektiver Bindung von DNA mit mehr als 100 Basenpaaren an eine Silikamatrix (siehe Kapitel 3.3.2), während ungebundene Komponenten durch ethanolhaltige Puffer abgewaschen werden. Die DNA wird dann mit Wasser eluiert.

3.4.3.2 PCR nach reverser Transkription

Für diese PCR wird eine gewisse Menge einer reversen Transkription ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Im allgemeinen sollte dabei die verwendete Menge der reversen Transkription nicht mehr als 10% des Endvolumens der PCR betragen, da höhere Konzentrationen oft einen negativen Einfluß auf die PCR haben. Für die präparativen PCRs der *in vitro* Selektionsexperimente wird allerdings die Menge des RT-Ansatzes auf bis zu 20% des Endvolumens erhöht. Die durchgeführte PCR ist der Standardreaktion sehr ähnlich.

3.5 *In vitro* DNA-Rekombinationstechniken

3.5.1 Restriktionsenzymspaltung

Mit Hilfe der Restriktionsenzymspaltung können die Größe und die Orientierung von DNA-Fragmenten nach *in vitro* Rekombination sowie Mutationen, die innerhalb der Restriktionserkennungssequenz vorliegen, kontrolliert werden. Größere Mengen restriktionsverdauter DNA-Fragmente und linearisierter Plasmide werden sowohl für *in vitro* Rekombination als auch für die *in vitro* 'run-off-Transkription' benötigt.

Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II erkennen palindromische Sequenzen von meist vier bis sechs Basen, innerhalb derer sie in Gegenwart von Magnesiumionen schneiden (Arber und Linn, 1969; Yuan, 1981). Die Aktivität einer Restriktionsendonuklease wird in Einheiten (Units) angegeben, wobei eine Einheit (1U) als die Enzymmenge definiert ist, die 1 μg DNA in einer Stunde unter optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen vollständig

schneidet. Die benötigten Puffer werden vom Hersteller als zehnfach konzentrierte Lösungen mitgeliefert. Einige Restriktionsenzyme zeigen in Gegenwart von 0,1 g/l Rinderserumalbumin eine erhöhte Aktivität. Kritische Faktoren sind, neben dem pH-Wert des Puffersystems und der Magnesiumkonzentration, hohe Enzym- und Glycerinkonzentrationen, sowie niedrige Konzentrationen an einwertigen Metallionen. Extreme Abweichungen können jeweils unspezifische Spaltungen oder minimale Enzymaktivitäten zur Folge haben. Das Ergebnis einer Restriktionsenzymspaltung kann mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft werden. Für viele Zwecke kann ein Restriktionsansatz direkt, ohne Aufreinigung für Folgereaktionen eingesetzt werden. In einigen Fällen ist es jedoch nötig, das Restriktionsenzym durch Hitze-denaturierung zu inaktivieren oder mittels Phenolextraktion zu entfernen. Zur Entfernung von Puffersalzen ist meistens eine Ethanol-fällung ausreichend.

3.5.2 Dephosphorylierung

Um das Rezirkularisieren eines linearisierten Plasmids oder eine Multimerisierung eines DNA-Fragments über kompatible Enden bei Ligationsreaktionen zu verhindern, werden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe der zinkabhängigen alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm entfernt (Sambrook *et al.*, 1989). Miteinander kompatibel sind stumpfe DNA-Enden und kohäsive Enden, deren einzelsträngige Überhänge zueinander komplementär sind. Ein Dephosphorylierungsansatz basiert auf einem zinkhaltigen Reaktionspuffer, läßt sich aber auch in den gängigen Restriktionspuffern mit einer Salzkonzentration ≥ 50 mM durchführen. Es wird eine Einheit Enzym pro Picomol 5'-Phosphatenden eingesetzt. Die Dephosphorylierung erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Durch 10 minütige Inkubation bei 75°C oder 1 h bei 65°C in Gegenwart von 5 mM EDTA wird das Enzym inaktiviert. Es kann zusammen mit den Puffersalzen durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung entfernt werden. Muß das dephosphorylierte DNA-Fragment außerdem noch aus einem Gemisch weiterer DNAs abgetrennt werden, so kann die Entfernung aller Komponenten in einem Schritt durch Elution nach Agarosegel-Elektrophorese erfolgen.

3.5.3 Phosphorylierung

Zur Insertion synthetisch hergestellter DNA-Oligonukleotide in Plasmid-DNA muß zunächst die synthesebedingt fehlende 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphorylierungsreaktion mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase in Anwesenheit von ATP angefügt werden. Dabei wird die γ -ständige Phosphatgruppe von ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Ein Phosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus der einzel- oder doppelsträngigen DNA mit freier 5'-Hydroxylgruppe, 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid, 5 mM

Dithiothreitol, 1 mM ATP und 30-100 U T4 Polynukleotidkinase je Picomol 5'-Enden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C kann das Enzym durch 20 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert werden. Zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide können in einem Ansatz phosphoryliert und anschließend hybridisiert werden. Der Hybridisierungsschritt, der eine einminütige Inkubation bei 94°C und eine anschließende Abkühlung auf 30°C innerhalb eines Zeitraums von mindestens 20 min umfaßt, ersetzt den Hitzedenaturierungsschritt. Die Sequenzen der DNA-Oligomere werden so gewählt, daß an den Enden der Duplex-DNA nach Hybridisierung überhängende Einzelstränge verbleiben, die kompatibel für die Ligation mit einem entsprechenden Plasmid sind. Die Phosphorylierungsreaktion findet gewöhnlich in Gegenwart hoher DNA-Konzentrationen statt. Aufgrund der starken Verdünnung des Oligomers im Ligationsansatz kann auf eine Aufreinigung der phosphorylierten DNA verzichtet werden.

3.5.4 DNA-Ligation

Der letzte Schritt bei der *in vitro* Rekombination ist die Rezirkularisierung eines linearen Plasmidfragments unter Insertion eines DNA-Fragments mit Hilfe der DNA-Ligase. Formal entspricht die Ligation der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche einer doppelsträngigen DNA. Die T4 DNA-Ligase kann unter Hydrolyse von ATP sowohl kohäsive als auch stumpfe Enden ligieren (Weiss *et al.*, 1968). Die linearen Plasmid-Fragmente werden mit 40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM Magnesiumchlorid und 10-100 U T4 DNA-Ligase je Mikrogramm DNA versetzt. Bei kohäsiven Enden wird mit ATP in einer Endkonzentration von 1 mM ergänzt. Da bei stumpfen Enden hohe ATP-Konzentrationen inhibierend wirken, beträgt hier die Endkonzentration 0,05-0,1 mM und der Ansatz wird mit Polyethylenglycol 4000 auf eine Konzentration von 5% gebracht. In der Regel wird eine Vormischung hergestellt, auf mehrere Ansätze verteilt und mit unterschiedlichen Mengen Insert-DNA versetzt. Als Religationskontrolle wird stets ein Ansatz ohne Zugabe von Insert-DNA mitgeführt. Für die meisten Ligationen ist eine Inkubation bei 22°C für eine Stunde ausreichend. Bei stumpfen Enden kann das Reaktionsergebnis durch längere Inkubation von bis zu 24 Stunden und tieferen Temperaturen von 4°C oft verbessert werden.

3.5.5 Transformation von *Escherichia coli* JM109-Zellen

Das Einschleusen zirkulärer DNA in kompetente Zellen wird als Transformation bezeichnet (Cohen *et al.*, 1972). Die Zellanzucht auf antibiotikahaltigem Nährboden erlaubt die Selektion auf Bakterienklone, welche ein Plasmid mit exprimierbarer Antibiotikaresistenz enthalten. 200 µl kompetente *E. coli* JM109-Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz

oder 30 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz schließt sich ein Hitzeschock an, bei dem die Zellen 45 Sekunden im Wasserbad auf 42°C temperiert werden. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 2 min, bevor der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz eine Stunde bei 37°C inkubiert wird. Danach wird 3 min bei 1.000× g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment in dem verbliebenen Medium resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wird auf einer Agarplatte ausgestrichen, sofern ein Ligationsansatz verwendet wurde und Einzelkolonien gezüchtet (Kapitel 3.1.2). Bei einer Transformation mit Plasmid-DNA wird nur etwa ein Viertel ausgestrichen.

3.6 DNA-Sequenzierung

Zur Ermittlung der DNA-Sequenz wird die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) verwendet. Grundlage dieser Methode ist eine enzymatische Reparatursynthese an einzelsträngigen DNA-Molekülen, die basenspezifisch unterbrochen wird. Diese enzymatische Methode beruht auf der Fähigkeit einer DNA-Polymerase, einen an der DNA-Matrize hybridisiert vorliegenden Primer so lange zu verlängern, bis ein Nukleotid eingebaut wird, das die Synthese terminiert. Jede Synthese wird als Satz von vier Reaktionen durchgeführt, die alle die vier 2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie zusätzlich eine begrenzte Menge je eines 2', 3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphats (ddNTP) enthalten. Da es einem ddNTP an der für die Kettenverlängerung nötigen 3'-Hydroxylgruppe mangelt, wird das Wachstum des Oligonukleotids in Abhängigkeit vom entsprechenden Dideoxy-Analogon selektiv bei einem A, G, C oder T terminiert. Das Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs ist so gewählt, daß zum einen Ketten ausreichender Länge gebildet werden und daß zum anderen statistisch nach jeder Base der DNA-Matrize ein Abbruch stattfindet. Die entstehenden Fragmente, die alle den gleichen Anfang, jedoch unterschiedliche Enden besitzen, können entsprechend ihrer Länge auf einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel (Kap. 3.3.4.2) aufgetrennt werden.

Bei der klassischen DNA-Sequenzierung wird in der Regel α -³⁵S-dCTP verwendet und das fertige PAA-Gel autoradiographiert. Diese Verfahren wird jedoch zunehmend seltener angewendet. Es wird mehr und mehr durch automatisierte Verfahren ersetzt, bei denen die bei der Sequenzierungsreaktion entstehenden Abbruchprodukte fluoreszenzmarkiert sind, so daß sie schon während des Gellaufs detektiert werden können.

Die für die enzymatische Reaktion erforderlichen Komponenten sowie die Arbeitsvorschriften sind dem 'T7 Sequencing Kit' der Firma Pharmacia entnommen, welches

eine modifizierte T7 DNA-Polymerase als Enzym und die radioaktive Markierung nach der Methode von Tabor und Richardson (1987) verwendet. Die Durchführung umfaßt folgende Schritte:

Denaturierung 32 µl Doppelstrang DNA (1,5–2 µg) werden durch Zugabe von 8 µl 2 M NaOH und vorsichtigem Mischen 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wird durch Zugabe von 7 µl 3 M NaOAc pH 4,8, 4 µl H₂O und 125 µl 96%-igem Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wird in 10 µl H₂O aufgenommen und enthält jetzt die gewünschte Einzelstrang DNA, die direkt als Matrize für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird.

Hybridisierung Die 10 µl Einzelstrang DNA werden mit 2 µl Primer (5–10 pmol) und 2 µl 'Annealing-Puffer' versetzt, vorsichtig gemischt und zuerst 5 min bei 65°C, dann 10 min bei 37°C und schließlich 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Markierung Zu dem 'Annealing-Ansatz' werden 3 µl 'Labeling-Mix', 1–2 µl [α -³⁵S]-dATP und 2 µl T7 DNA-Polymerase (1:5 mit 'enzyme dilution buffer' verdünnt) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit werden je 2,5 µl der entsprechenden Mixe (A, G, C und T-Mix) in beschriftete Reaktionsgefäße pipettiert und bei 37°C vorgewärmt.

Reaktion Jeweils 4,5 µl der Markierungsreaktion werden zu den entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben und für die Kettenabbruchreaktion 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze werden mit 5 µl Formamid-Probenpuffer (Kapitel 3.3.4) für die denaturierende Gelelektrophorese versetzt, welcher gleichzeitig die Reaktion stoppt.

Pro Spur werden 2–6 µl auf das Sequenziergel in der Reihenfolge A, G, C, T aufgetragen. Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel werden die Ansätze zur vollständigen Denaturierung der DNA für 2 min bei 75–80°C inkubiert.

3.7 *In vitro* Transkription

Die Herstellung von RNA mit nahezu jeder beliebigen Sequenz ist mit Hilfe der RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7, T3 und SP6 leicht möglich. Hinter einen viralen Promotor klonierte DNA-Fragmente oder PCR-Produkte, bei denen der Promotor in die Primer integriert wurde, können mittels der genannten Polymerasen aus Phagen in einer *in vitro* Reaktion transkribiert werden. Hierbei sind die 3'-Enden der RNAs durch eine Restriktionsschnittstelle innerhalb eines Plasmids oder bei PCR-Produkten durch einen der beiden Primer definiert. Bei Spaltung mit einem Restriktionsenzym sollte kein einzelsträngiger 3'-Überhang entstehen, da sich solche DNAs für die Transkription nicht eignen. Sie müssen zuerst mit einer DNA-Polymerase, welche eine 3'-5'-

Exonukleaseaktivität besitzt, behandelt werden. Durch sogenannte 'run-off' Transkription der linearen DNA können RNAs mit definierten Enden hergestellt werden. Wird der T7 Transkriptionsterminator am 3'-Ende synthetisiert, wird die Linearisierungsstelle so gewählt, daß die Position der natürlichen Termination und der 'run-off' Termination möglichst übereinstimmen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transkripte wurden unter der Kontrolle der RNA-Polymerase des Phagen T7 (T7 RNA-Polymerase) synthetisiert. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die Herstellung nicht markierter, sowie radioaktiv markierter Transkripte angegeben. Die Transkriptionsreaktion wird bei Raumtemperatur pipettiert.

Tabelle 8: Komponenten für die in vitro Transkription mit T7 RNA-Polymerase

Reaktionskomponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	
		nicht markierter Ansatz	radioaktiv markierter Ansatz
10x Transkriptionspuffer HEPES-KOH (pH 7,5) MgCl ₂ Spermidin	800 mM 220 mM 10 mM	80 mM 22 mM 1 mM	80 mM 22 mM 1 mM
Nukleotide (pH 7,0) ATP CTP GTP UTP	100 mM 100 mM 100 mM 100 mM	3,75 mM 3,75 mM 3,75 mM 3,75 mM	3,75 mM 2,0 mM 3,75 mM 3,75 mM
α - ³⁵ S-Cytosin-5'-triphosphat	10 μ Ci/ μ l	-	0,2 μ Ci/ μ l
DTE	500 mM	100 mM	100 mM
BSA (RNase-, DNase-frei)	20 g/l	120 μ g/ml	120 μ g/ml
anorganische Pyrophosphatase in 20 mM MOPS (pH 6,85) 10 mM MgCl ₂	1 U/ μ l	5 U/ml	5 U/ml
RNase-Inhibitor	40 U/ μ l	400 U/ml	400 U/ml
DNA-Matrize linearisiertes Plasmid PCR-Produkt	variabel variabel	40 μ g/ml 100 nM	40 μ g/ml 100 nM
T7 RNA-Polymerase	50 U/ μ l	1 U/ μ l	1 U/ μ l

Analytische Transkriptionsreaktionen werden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, präparative Ansätze für drei Stunden oder über Nacht. In Anschluß an die Transkription wird die DNA durch Zugabe von RNase-freier DnaseI in einer Endkonzentration von 200 U/ml und 15 min bei 37°C abgebaut. Zur Aufreinigung werden die Transkripte erst einer Phenolextraktion, dann einer Gelfiltration und letztlich einer Isopropanolpräzipitation unterzogen. Die erhaltene RNA kann durch photometrische Messung quantifiziert und deren Größe und Reinheit mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft werden. Die Transkripte können mit Trichloroessigsäure gefällt (Kapitel 3.9) und bei radioaktiver Markierung, nach Überführung auf einen Glasfilter, im Szintillationszähler vermessen werden.

3.8 *In vitro* Proteinbiosynthese

Zellfreie Translationsreaktionen werden im sogenannten S30-System des *Escherichia coli* Stammes D10 unter denen von Dr. Stiege im Labor von Prof. Dr. V.A. Erdmann optimierten Bedingungen durchgeführt (Lamla und Erdmann, 2002). Das im selben Labor weiterentwickelte fraktionierte System setzt sich im wesentlichen aus einer ribosomalen 70S-, einer tRNA- und einer nukleinsäurefreien S100-Enzymfraktion zusammen (Erdmann *et al.*, 1989; Erdmann *et al.*, 1994; Stiege und Erdmann, 1995; Merk *et al.* 1999). Dieses System bietet gegenüber dem S30-System Vorteile, wenn es um die Charakterisierung von Reaktionen geht, da es über eine definiertere Zusammensetzung verfügt. Ein entscheidender Nachteil sind aber die vergleichbar geringen Syntheseleistungen des fraktionierten Systems, die bei etwa 20-40 µg Protein pro ml Reaktion liegen.

Da die Herstellung des S30-Systems nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, werden hier die methodischen Schritte zur Aufarbeitung des S30-Lysats prinzipiell dargestellt. Zellen des *Escherichia coli* Stammes D10 werden in Flüssigmedium angezüchtet und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Durch Ausübung eines hohen Druckes von 500-900 bar und plötzlicher Expansion in einer Gaulin-Pressen zerplatzen die Zellen. Nicht zerstörte Zellen und Zelltrümmer, sowie der größte Teil der chromosomalen DNA und eventuell an der einen oder anderen Komponente anhaftende Proteine werden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen bei 30.000× g aus dem Lysat entfernt. Der hiernach erhaltene S30-Überstand enthält bereits sämtliche für die *in vitro* Translation benötigten Komponenten. Durch kurze Inkubation des S30-Überstandes mit den Energiekomponenten ATP und GTP wird die Termination aktiver Translationskomplexe ermöglicht und Ribosomen von endogener mRNA freigesetzt. Die ungeschützte mRNA wird dabei von endogenen Ribonukleasen degradiert. Durch Entsalzung bzw. Umpufferung mittels Dialyse oder Gelfiltration gegen 1× TLM-Puffer (Tabelle 9) werden definierte Bedingungen bezüglich niedermolekularer Verbindungen eingestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des TLM-Puffers

Komponenten	Stammlösungen	10 ⁻¹ TLM-Puffer	Konzentration in der Reaktion (1 ⁻¹)
HEPES (pH 7,6)	1 M	500 mM	50 mM
Kaliumacetat	2 M	700 mM	70 mM
Ammoniumchlorid	5 M	300 mM	30 mM
Magnesiumchlorid	2 M	100 mM	10 mM
EDTA (pH 8,0)	0,5 M	1 mM	100 µM
Natriumazid	10%	0,2%	0,02%

Schließlich werden im S-Mix (Tabelle 10) das S30-Lysat und weitere proteinogene Komponenten, sowie zusätzliche tRNAs, zusammengefaßt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des S-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
Protease-Inhibitoren		
Aprotinin	2 g/l	2 mg/l
Leupeptin	1 g/l	1 mg/l
Pepstatin	1 g/l	1 mg/l
RNase-Inhibitor	40 U/ μ l	100 U/ml
gesamt-tRNA (<i>E. coli</i>)	20 g/l	100 mg/l
Pyruvatkinase	10 g/l	8 mg/l
S30-Lysat	100%	30%

Vor der *in vitro* Translationsreaktion wird der S-Mix mit niedermolekularen Komponenten, die im T-Mix zusammengefaßt sind, sowie mit denen im E-Mix zusammengefaßten Energiekomponenten und einer Matrize in Form von mRNA oder DNA versetzt. Bei Verwendung von DNA als Matrize muß zusätzlich noch die entsprechende RNA-Polymerase zugegeben werden. Die Transkription der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Matrizen steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors, so daß dem System bei Verwendung dieser Matrizen T7 RNA-Polymerase zugegeben werden muß. Die Transkription der endogenen Polymerase wird gleichzeitig durch das Antibiotikum Rifampicin blockiert. Wird DNA als Matrize eingesetzt, spricht man von einem gekoppelten Transkriptions-, Translationssystem.

Tabelle 11: Zusammensetzung des T-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
TLM-Puffer	10 \times	0,7 \times
Magnesiumchlorid	2 M	4 mM
Dithiothreitol oder MESNA	1 M	5 mM
	2 M	2 mM
Polyethylenglycol 2000	50%	4%
Rifampicin	20 g/l	20 mg/l
Folsäure	10 mM	100 μ M
19 Aminosäuren ohne Leucin	5 mM	400 μ M
Leucin	5 mM	150 μ M

Tabelle 12: Zusammensetzung des E-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im E-Mix	Konzentration in der Reaktion
ATP	100 mM	12,5 mM	1 mM
GTP	100 mM	12,5 mM	1 mM
CTP	100 mM	6,25 mM	0,5 mM
UTP	100 mM	6,25 mM	0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	1 M	375 mM	30 mM
Acetylphosphat	1 M	125 mM	10 mM

Ein typischer Reaktionsansatz für die zellfreie Proteinbiosynthese setzt sich wie folgt zusammen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zusammensetzung einer Reaktion zur zellfreien Proteinbiosynthese

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
S-Mix	3 - 3,2x	1x
T-Mix	2 - 3,2x	1x
E-Mix	12,5x	1x
mRNA-Matrize	variabel	50 – 1000 nM
DNA-Matrize	variabel	0,5 – 2 nM
¹⁴ C-Leucin (bei Bedarf)	1 mM (100 dpm/pmol)	50 µM
T7 RNA-Polymerase	50 U/µ	500 U/ml

Die meisten Komponenten der Reaktion befinden sich im S- und T-Mix, wo sie etwa um den Faktor drei konzentrierter vorliegen, so daß die benötigte Endkonzentration durch Verdünnung mit den anderen Mixen erzielt wird. Die richtige Konzentration an TLM-Puffer wird durch den S- und T-Mix sichergestellt. 30% des TLM-Puffer werden vom S30-Lysat im S-Mix beigesteuert und die restlichen 70% stammen vom T-Mix. Eine Gesamtübersicht aller Komponenten und deren Endkonzentration in der Reaktion zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14: Gesamtübersicht aller Komponenten und Endkonzentrationen bei der in vitro Proteinbiosynthese

Komponente	Endkonzentration in der Reaktion
TLM-Puffer: HEPES (pH 7,6)	50 mM
KOAc	70 mM
NH ₄ Cl	30 mM
MgCl ₂	10 mM*
EDTA	100 µM
NaN ₃	0,02%
Magnesiumchlorid	4 mM (*Σ 14 mM)
Dithiothreitol oder MESNA	5 mM oder 2 mM
Polyethylenglycol 2000	4%
Rifampicin	20 µg/ml
Folsäure	100 µM
19 Aminosäuren ohne Leucin	400 µM
Leucin	150 µM
¹⁴ C-Leucin (100 dpm/pmol)	50 µM
gesamt-tRNA (<i>E. coli</i>)	100 µg/ml
Matrize: DNA oder mRNA	0,5-2 nM oder 50-1000 nM
ATP und GTP	je 1 mM
CTP und UTP	je 0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	30 mM
Acetylphosphat	10 mM
Pyruvatkinase	8 µg/ml
T7 RNA-Polymerase	500 U/ml
RNase-Inhibitor	100 U/ml
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
S30-Lysat	30%
H ₂ O	ad Endvolumen

Analytische Ansätze werden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Präparative Ansätze können ein Volumen von mehreren Millilitern haben. Die Pipettierschritte finden alle auf Eis statt, so daß die Reaktion durch Inkubation bei 37°C (in Ausnahmefällen auch bei geringeren Temperaturen) gestartet wird. Die Reaktion erfolgt über 90 min, kann in Einzelfällen jedoch verlängert werden.

3.9 Fällung von Protein und RNA mittels Trichloressigsäure

Nukleinsäuren und Proteine denaturieren und präzipitieren im sauren Milieu der Trichloroessigsäure (TCA). Zur Quantifizierung der Radioaktivität, die in die Makromoleküle während der Translation bzw. Transkription eingebaut wurde, können die Präzipitate der TCA-Behandlung durch Filtration über Glasfilter von löslicher Radioaktivität abgetrennt und im Szintillationszähler vermessen werden. Diese Meßwerte dienen der Bestimmung von Translations- bzw. Transkriptionsraten *in vitro*, sowie von mRNA nach *in vitro* Selektionsexperimenten.

Maximal 100 µl einer wäßrigen Lösung mit radioaktiv markierter RNA werden zu 100 µl vorgelegter Stopplösung (25 mM EDTA, 1 g/l Hefe-RNA) pipettiert. Dabei fängt EDTA Magnesiumionen ab und stoppt somit die Transkription. Die Hefe-RNA erhöht die vorhandene Nukleinsäurekonzentration und ermöglicht so die quantitative Fällung der radioaktiven RNA. Diese Lösung wird mit 3 ml 10% TCA mit 50 mM Natriumpyrophosphat versetzt und die Nukleinsäuren durch 30 minütige Inkubation auf Eis präzipitiert. Natriumpyrophosphat dient hierbei zur Absättigung des Glasfilters, um eine unspezifische Bindung löslicher Radioaktivität zu vermeiden. Die durchmischte Suspension wird über einen mit 5% TCA befeuchteten Glasfilter abgesaugt, das Reaktionsgefäß zweimal und die Wände der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5% TCA nachgespült. Durch zweimaliges Spülen mit jeweils 2 ml Aceton wird der Filter getrocknet. Nach Überführung des Filters in ein Szintillationsgefäß und Versetzen mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit wird 30 min leicht geschwenkt und anschließend die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Die TCA-Fällung von Protein ist der von Nukleinsäuren sehr ähnlich. Statt Stopplösung werden hier 50 µl 0,5% BSA vorgelegt und die zur Fällung eingesetzte TCA-Lösung wird zur Absättigung des Filters mit 2% Pepton versetzt. Wird ein *in vitro* Translationsansatz gefällt, muß vor der Inkubation auf Eis zur Vermeidung der Kopräzipitation radioaktiv markierter Aminoacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA die Esterbindung zwischen tRNA und Aminosäure durch 15 minütige Inkubation bei 90°C hydrolysiert werden. Die nachfolgenden Arbeitsschritte sind mit denen der TCA-Fällung von Nukleinsäuren identisch.

3.10 Detektion von β -Strahlung

3.10.1 Szintillationszählung

Die kurze Reichweite der β -Strahlung der Isotope ^{14}C , ^{35}S und ^3H erschwert deren quantitative Detektion. Die im Szintillationscocktail enthaltenen Moleküle werden durch die Energie der radioaktiven Strahlung in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand geben sie die Energie in Form von Strahlung längerer Wellenlänge ab (Lumineszenz). Die so erhaltenen Signale bestehen also aus Lichtblitzen und können deshalb im Detektionsgerät durch einen Photoelektronenvervielfacher verstärkt und gezählt werden. Ein über Eichung ermittelter Korrekturfaktor dient zur Umrechnung der Rohmeßwerte mit der Einheit cpm (counts per minute) in die geräteunabhängige Einheit für Radioaktivität dpm (disintegrations per minute).

3.10.2 Autoradiographie

Die qualitative und quantitative Auswertung von Banden radioaktiv markierter Proteine und Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel erfolgt mit dem 'Phosphorimager-System'. Das getrocknete Gel wird in der Regel über Nacht und in Einzelfällen mehrere Tage im Dunkeln auf eine Detektionsplatte ('Phosphorscreen') gelegt, die Verbindungen aus dem Lanthanoid Europium enthält. Diese werden durch β -Strahlung in einen angeregten Zustand mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen versetzt. Bei der Abtastung der Platte im 'Phosphorimager' wird der angeregte Zustand mit Hilfe eines Lasers in den Grundzustand zurückversetzt. Die hierbei emittierten Lichtimpulse werden Abhängigkeit von Ort und Intensität im 'Phosphorimager' gezählt. Letztlich erhält man ein zweidimensionales Abbild eines Gels in digitaler Form. Das Verhältnis der zu detektierenden Radioaktivität zur Anzahl der gemessenen Lichtimpulse ist laut Herstellerangaben über fünf Zehnerpotenzen linear. Da dieses System relative Meßwerte liefert, muß zur absoluten Quantifizierung parallel eine Probe mit bekannter spezifischer Aktivität eingesetzt werden.

3.11 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Ein hervorstechendes Merkmal vieler Proteine ist ihre Fähigkeit, feste, nicht-kovalente und reversible Bindungen mit anderen Molekülen einzugehen. Auf diesem Prinzip basiert die Affinitätschromatographie zur Reinigung biologisch aktiver Proteine. Bei dieser Technik wird der sogenannte Ligand – ein Molekül, das von dem gewünschten Protein spezifisch gebunden wird – an eine inerte und poröse Matrix immobilisiert. Wird eine ungereinigte Proteinlösung

über die Affinitätsmatrix geschickt, bindet das gewünschte Protein an den fixierten Liganden, wogegen andere Substanzen mit dem Puffer von der Säule gewaschen werden. Das gesuchte Protein wird anschließend unter geeigneten Bedingungen von der Affinitätsmatrix eluiert. Durch dieses Verfahren kann das gewünschte Protein direkt aus einer *in vitro* Translationsreaktion isoliert werden.

3.11.1 Strep-tag II Affinitätschromatographie

Das Strep-tag II ist ein Oktapeptid (WSHPQFEK) mit intrinsischer Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin (Schmidt et al., 1996). Da die Dissoziationskonstante des Strep-tag II zu Streptavidin $>10^{-5}$ M ist, wurde von Voss und Skerra (1997) StrepTactin, eine Streptavidinvariante mit höherer Strep-tag II Bindungsaffinität (K_d ca. 10^{-6} M), generiert. *In vitro* synthetisierte Proteine, die mit einem Strep-tag II versehen sind, lassen sich quantitativ und ohne Aktivitätsverlust mit Hilfe von StrepTactin-Sepharose aufreinigen (Lamla und Erdmann, 2001a). Neben der spezifischen Bindung sind vor allem die sanften Elutionsbedingungen mit einem spezifischen Kompetitor vorteilhaft.

In eine Säule mit einem Fassungsvermögen von 1 ml wird zuerst eine kleine Fritte eingesetzt, dann die aufgeschlammte Affinitätsmatrix hineingegeben und nach Absetzen der Matrix mit einer großen Fritte abgeschlossen. Die Säule wird zweimal mit dem 2,5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert, bevor das Proteingemisch aufgetragen wird. Nachdem die Probe durchgelaufen ist, wird dreimal mit einem Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und schließlich mit mindestens drei Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert. Das aufgereinigte Protein kommt relativ konzentriert mit dem zweiten Säulenvolumen Elutionspuffer von der Säule. Der Verlauf der Chromatographie, sowie dessen Ergebnis wird mittels SDS-PAGE oder im Fall von radioaktiv markierten Proteinen mittels TCA-Fällung analysiert. Der im Elutionspuffer befindliche spezifische Kompetitor Desthiobiotin wird durch Behandlung der Säule mit 15 Säulenvolumen Regenerierungspuffer entfernt. Letztlich wird die Säule mit acht Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und bis zur nächsten Anwendung bei 4°C gelagert.

Tabelle 15: Lösungen für die Strep-tag II Affinitätschromatographie

Waschpuffer	Elutionspuffer	Regenerierungspuffer
100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 0,02% Natriumazid	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin 0,02% Natriumazid	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 1 mM HABA 0,02% Natriumazid

3.11.2 His-tag Affinitätschromatographie

Das wohl am häufigsten verwendete Affinitätspeptid zur Aufreinigung von Proteinen ist der His-tag. Er besteht in der Regel aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten, kann in seiner Länge aber von vier bis zu zehn Histidinresten variieren. Seine Imidazolgruppen chelatieren die freien Koordinationsstellen von Ni^{2+} -Ionen, welche ihrerseits als Chelatkomplexe mit an einer Festphase gebundener Iminodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) vorliegen (Hochuli *et al.*, 1988; Arnold, 1991). Bei der Festphase handelt es sich in den meisten Fällen um Agarose oder Sepharose. In dieser Arbeit wurde IDA-Agarose und die in Tabelle 16 aufgeführten Puffer verwendet.

Die Affinitätssäulen werden unter Verwendung von IDA-Agarose wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben hergestellt. Die Säule wird mit drei Säulenvolumen H_2O gewaschen und dann mit fünf Säulenvolumen 100 mM Nickelsulfat beladen. Danach wird sie mit drei Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert, bevor das Proteingemisch aufgetragen wird. Nachdem die Probe durchgelaufen ist, wird mit zehn Säulenvolumen Bindungspuffer und anschließend mit sechs Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt durch Zugabe von sechs Säulenvolumen Elutionspuffer. Zum Schluß wird sämtliches Nickel mit Hilfe von drei Säulenvolumen 'Strip-Puffer' von der Säule entfernt und diese schließlich bei 4°C gelagert. Verlauf und Ergebnis der Chromatographie werden wie oben beschrieben analysiert.

Tabelle 16: Lösungen für die His-tag Affinitätschromatographie

Bindungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer	'Strip-Puffer'
20 mM Tris-HCl pH 7,9 500 mM Natriumchlorid 5 mM Imidazol	20 mM Tris-HCl pH 7,9 500 mM Natriumchlorid 60 mM Imidazol	20 mM Tris-HCl pH 7,9 500 mM Natriumchlorid 1 M Imidazol	20 mM Tris-HCl pH 7,9 500 mM Natriumchlorid 100 mM EDTA

3.12 'Ribosome Display'

Beim sogenannten 'Ribosome Display' handelt es sich um eine Methode zur *in vitro* Selektion von Peptiden und Proteinen. Die Methode basiert auf der zellfreien Proteinbiosynthese und setzt sich aus einer Reihe von Einzelreaktionen zusammen. Ausgehend von einer geeigneten DNA-Bibliothek wird zuerst eine *in vitro* Transkription (Kapitel 3.7) durchgeführt. Die so erhaltene mRNA-Bibliothek wird während einer *in vitro* Translation (Kapitel 3.8) in Anwesenheit von $5\ \mu\text{M}$ eines 'Antisense'-Oligonukleotids (AS-Oligo) gegen die tmRNA (Abb. 6) in eine Proteinbibliothek übersetzt. Aufgrund des Fehlens eines Stop-codons bleibt die Termination der Translation aus und es entstehen Protein-Ribosom-mRNA-Komplexe (PRM-Komplexe). Diese werden durch Zugabe von Magnesiumacetat in einer

Endkonzentration von 50 mM und Kühlung auf Eis stabilisiert. Der gesamte Ansatz wird mit ein bis zwei Volumen RD-Puffer (50 mM Tris-HOAc (pH 7,5), 150 mM NaCl, 50 mM Mg(OAc)₂, 0,1% Tween 20) verdünnt und der Selektion unterzogen (Lamla *et al.*, 2001). Aufgrund einer vom Protein vermittelten Eigenschaft können die gewünschten PRM-Komplexe abgetrennt werden. Anschließend ist lediglich die mRNA noch von Interesse, welche durch eine reverse Transkription (Kapitel 3.4.2) in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR (Kapitel 3.4.3) amplifiziert wird. Die DNA in Form des PCR-Produktes steht nun einer weiteren Selektionsrunde zur Verfügung.

3.13 Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Stärke der Bindung zwischen zwei Molekülen gibt die Spezifität ihrer Wechselwirkung an. Die in Abbildung 8 gezeigte Reaktion läuft solange ab, bis sie einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Das Gleichgewicht zwischen den Molekülen A und B und dem Dimer AB wird durch einen Ausgleich zwischen den beiden gegenläufigen Reaktionen, die in (1) gezeigt sind, aufrecht erhalten. Wie in (2) gezeigt, entspricht das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziations- und die Dissoziationsreaktion der Gleichgewichtskonstanten K der Reaktion.

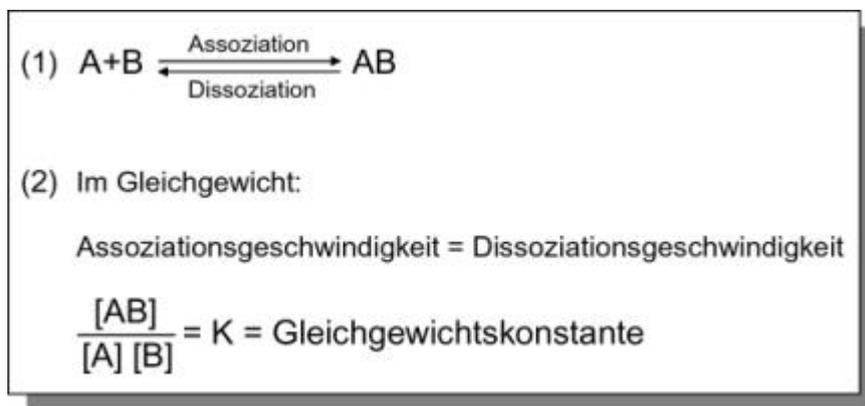


Abb. 8 Das Prinzip des Gleichgewichts

Wie traditionsgemäß definiert, erscheinen die Konzentrationen der Produkte im Zähler und die Konzentrationen der Reaktanden im Nenner der Gleichung für eine Gleichgewichtskonstante. Daher ist die Gleichgewichtskonstante in (2) für eine Assoziationsreaktion $A+B \rightarrow AB$, während der Kehrwert diejenige für die Dissoziationsreaktion $AB \rightarrow A+B$ darstellt. Wenn man es mit einfachen Bindungswechselwirkungen zu tun hat, ist es jedoch weniger verwirrend, von Affinitätskonstanten oder Assoziationskonstanten mit der Dimension l/mol zu sprechen. Je größer der Wert der Assoziationskonstante (K_a), desto stärker ist die

Bindung zwischen A und B. Der Kehrwert von K_a ist die Dissoziationskonstante (K_d) mit der Dimension mol/l. Je kleiner der K_d -Wert, desto stärker ist die Bindung zwischen A und B.

3.13.1 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch ‘Oberflächen Plasmonen Resonanz’ Spektroskopie

Die bimolekulare Interaktionsanalyse (BIA), d.h. die Messung von Bindungsaffinitäten zwischen zwei Molekülen, kann mit Geräten der Firma BIAcore bewerkstelligt werden. Die den BIAcore-Geräten zugrundeliegende Technologie ist die sogenannte ‘Oberflächen Plasmonen Resonanz’ (SPR, surface plasmon resonance). Wird polarisiertes Licht auf ein Prisma gestrahlt, kommt es oberhalb eines kritischen Winkels zur Totalreflexion, so daß kein Licht mehr in das weniger dichte Medium übergeht. Obwohl bei der Totalreflexion tatsächlich kein Licht das Prisma verläßt, geht das elektrische Feld der Photonen über die reflektierende Fläche hinaus. Wird auf die Oberfläche dieses Prismas nun ein Metall aufgedampft, kann das elektrische Feld mit freien Elektronen in dieser Metalloberfläche interagieren, sofern die Energien übereinstimmen. Wenn dies passiert, werden die eingestrahnten Photonen mit der ‘richtigen Energie’ absorbiert, bzw. in Oberflächenplasmonen konvertiert. Man erhält ‘Oberflächen Plasmonen Resonanz’ und es kommt zur Auslöschung eines Teils des reflektierten Lichts in einem für das aufgedampfte Metall spezifischen Winkel. Mit Veränderungen auf der Metalloberfläche gehen Winkelveränderungen einher. Von der Detektionseinheit werden diese Winkelveränderungen gemessen und in das sogenannte Resonanzsignal überführt, welches letztlich dargestellt wird.

Bei BIAcore handelt es sich um eine Goldoberfläche, an der einer der beiden Bindungspartner immobilisiert wird (=Ligand). Der zweite Bindungspartner befindet sich in Lösung (=Analyt) und wird über eine Flußzelle am immobilisierten Bindungspartner vorbeigeführt. Kommt es zur Bindung, ändern sich die Verhältnisse auf der Oberfläche und somit der Winkel des ausgelöschten Bereichs. Dabei ist das Ausmaß der Winkeländerung direkt von der Masse auf der Oberfläche befindlicher Moleküle abhängig. Abbildung 9 soll den Aufbau des SPR-Detektionssystems veranschaulichen und den Zusammenhang zum daraus resultierenden Resonanzsignal darstellen.

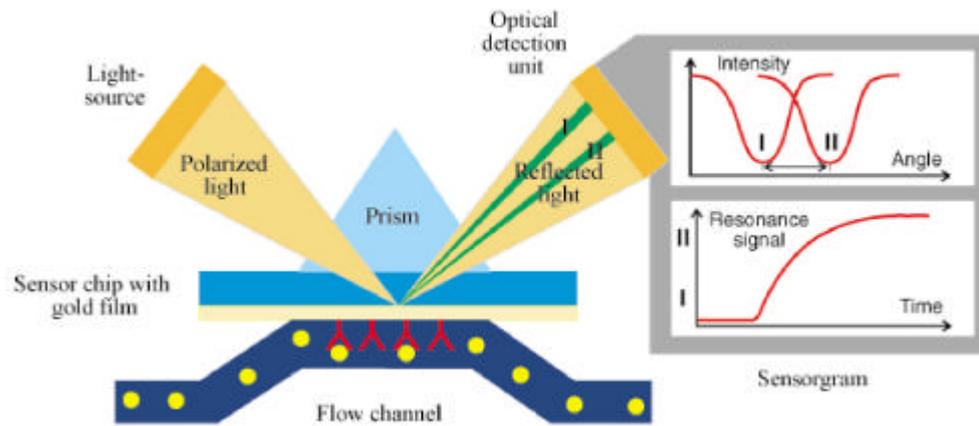


Abb. 9 Zusammenhang zwischen dem SPR-Detektionssystem und dem Resonanzsignal

Wird der zeitliche Verlauf des Resonanzsignals aufgezeichnet, erhält man das sogenannte Sensorgramm. Die Stärke des Resonanzsignals wird dabei in Resonanzeinheiten (RU) angegeben, wobei es sich um absolute Zahlenwerte handelt. Das Sensorgramm spiegelt die Vorgänge auf der Goldoberfläche wider und ist die Grundlage für weitere Auswertungen. Ein typisches Sensorgramm ist in Abbildung 10 gezeigt.

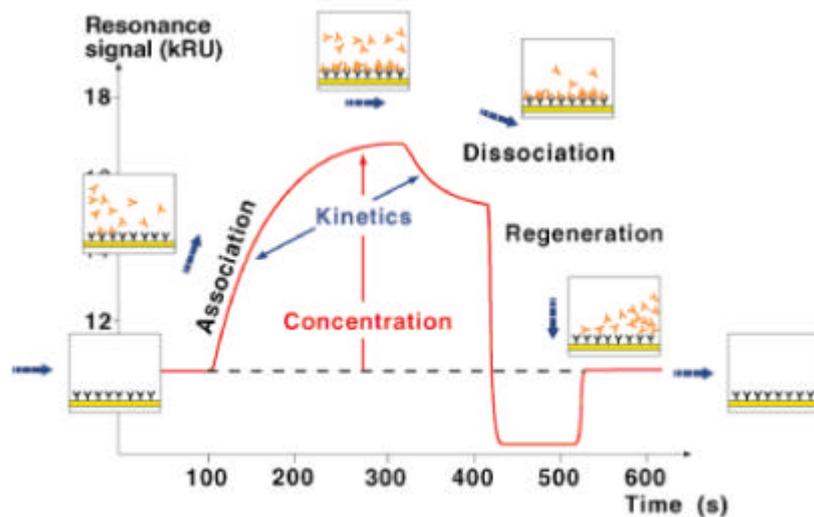


Abb. 10 Interpretation eines typischen Sensorgramms

Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten werden etwa sechs bis acht Sensorgramme mit verschiedenen Analytkonzentrationen aufgenommen. Dabei muß auf der Oberfläche der Gleichgewichtszustand, bei dem sich Assoziation und Dissoziation entsprechen, erreicht werden und mindestens eine Konzentration oberhalb des K_d -Wertes liegen, da sonst die Auswertung unmöglich ist. Schließlich werden die eingesetzten Analytkonzentrationen auf der Abszisse gegen die im Gleichgewichtszustand erhaltenen Resonanzeinheiten aufgetragen.

Aus der so erhaltenen Sättigungskurve kann bei halber Höhe der K_d -Wert direkt von der Abszisse abgelesen werden.

3.13.2 Verwendung des NTA Sensor-Chips

In der Praxis besteht der Sensor-Chip aus einem Trägerglas, auf das eine dünne Goldschicht aufgebracht ist und von einem Kunststoffgehäuse umgeben wird. Zudem befinden sich an der Oberfläche der Goldschicht, in Abhängigkeit vom jeweiligen Sensor-Chip, die zur Immobilisierung benötigten Gruppen. Im Falle des NTA Sensor-Chip handelt es sich um Nitrilotriessigsäure und demzufolge können, wie in Kapitel 3.11.2 beschrieben, Proteine mittels His-tag an der Oberfläche immobilisiert werden (Nieba *et al.*, 1997). Analog zur Vorgehensweise bei der Affinitätschromatographie wird der Chip zuerst mit einer 500 μM Nickelchloridlösung in 'Eluentpuffer' beladen. Anschließend wird überschüssiges Nickel vom Chip gewaschen, bevor der mit dem His-tag versehene Bindungspartner (Ligand) auf den Chip gebracht wird. Hat sich die Basislinie einigermaßen stabilisiert, wird die erste Analytkonzentration auf den Chip gebracht und die Bindung im Sensorgramm verfolgt. Ist die Bindung des Liganden an der NTA-Oberfläche so gut, daß es zu keiner Abnahme während der Messung kommt, wird der Analyt durch geeignete Puffer entfernt und anschließend die nächste Analytkonzentration vermessen. Zeigt die Basislinie jedoch eine Drift, d.h. der Ligand wird mit der Zeit von der Oberfläche gewaschen, muß nach jeder Einzelmessung der Chip regeneriert werden. Dazu wird der Regenerierungspuffer auf den Chip gebracht und vor erneuter Verwendung der Nickellösung mit 'Eluentpuffer' gespült. Bei dieser Vorgehensweise ist die strikte Einhaltung vergleichbarer Bedingungen absolut notwendig.

Tabelle 17: Lösungen für die Verwendung des NTA Sensor-Chips

'Eluentpuffer'	Regenerierungspuffer
10 mM Hepes 150 mM Natriumchlorid 50 μM EDTA 0,005% Triton X-100 pH 7,4	10 mM Hepes 150 mM Natriumchlorid 350 mM EDTA 0,005% Triton X-100 pH 8,3