

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien

2.1.1 Vektoren

pRSET	Invitrogen (Niederlande)
pGEX-4T	Amersham (Deutschland)
pYES2	Invitrogen (Niederlande)
pPICZ	Invitrogen (Niederlande)
pGAP	Invitrogen (Niederlande)
pFASTBAC	GibcoBRL (USA)

2.1.2 Bakterienstämme

INV α F:	F ⁻ <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i>	Invitrogen (Niederlande)
BL21 Star TM (DE3)pLysS:	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen (Niederlande)
DH10 BAC:	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL nupG</i> /bMON14272 / pMON7124</i>	GibcoBRL (USA)

2.1.3 Hefestämme

INVSc1:	<u><i>MATα his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i></u> <u><i>MATα his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52</i></u>	Invitrogen (Niederlande)
X-33:	Wildtyp	Invitrogen (Niederlande)
GS115:	<i>his4</i>	Invitrogen (Niederlande)
KM71H:	<i>aox1::ARG4 arg4</i>	Invitrogen (Niederlande)

2.1.4 Insektenzellen

Sf9-Zellen	GibcoBRL (USA)
High Five-Zellen	GibcoBRL (USA)

2.1.5 Medien und Kultivierung der Zellen

Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wird destilliertes entionisiertes Wasser verwendet. Stammlösungen und Flüssigmedien für die sterile Anzucht werden 20 min bei 200 kPa autoklaviert bzw. hitzelabile Lösungen sterilfiltriert (Satorius-Membranfilter, Porengröße 0,2 μ m).

2.1.5.1 Bakterien

Bakterien werden bei 37 °C im Schüttelinkubator (225 rpm; Novotron; Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Model B; Memmert, Deutschland) kultiviert.

Bakterien können bei –80 °C eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Kulturen bis zur Sättigung angezogen, Glycerin bis zu einer Konzentration von 20% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei –80 °C gelagert werden. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut werden und in Medium resuspendiert werden.

LB-Medium:

10 g/l	Pepton (GibcoBRL, USA)
5 g/l	Hefeextrakt (GibcoBRL, USA)
10 g/l	NaCl
15 g/l	Agar (nur bei Festmedien)

Bei Festmedien für die DH10 Bac-Zellen werden 12 g/l statt 15 g/l Agar zugegeben.

SOC-Medium:

20 g/l	Pepton (GibcoBRL, USA)
5 g/l	Hefeextrakt (GibcoBRL, USA)
0,5 g/l	NaCl
4 g/l	MgCl ₂
3,6 g/l	Glucose
186 mg/l	KCl

Low-Salt-Medium: LB-Medium mit nur 5 g/l NaCl statt 10 g/l.

Nach dem Autoklavieren werden bei Selektivmedien noch entsprechende Antibiotika zugegeben:

50 mg/ml	Ampicillin
25 mg/ml	Chloramphenicol
50 mg/ml	Kanamycin
10 mg/ml	Tetracyclin
7 mg/ml	Gentamycin
25 µg/ml	Zeocin

Für die Blau-Weiß-Selektion werden zusätzlich noch folgende Substanzen zugegeben:

40 mg/ml	IPTG
200 mg/ml	Bluo-Gal

2.1.5.2 Hefen

Hefezellen werden bei 30 °C im Schüttelinkubator (140 rpm; RFI-150; Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

Hefen können bei –80 °C eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Hefekulturen über Nacht angezogen, auf eine berechnete Zelldichte von OD₆₀₀ 50-100 eingestellt, Glycerin mit einer Konzentration von 15% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei –80 °C gelagert werden. Eingefrorene

Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut werden und in Medium resuspendiert werden.

YPD-Medium:
 20 g/l Pepton
 10 g/l Hefeextrakt
 20 g/l Agar (nur bei Festmedien)

Nach dem Autoklavieren wird noch folgende Lösung zugegeben:

100 ml/l 20% (w/v) Glucose

Für Selektivmedien wird zusätzlich 100 µg/ml bzw. 500 µg/ml Zeocin zugegeben.

Saccharomyces cerevisiae:

Minimalmedium: 1,155 g/l Dropout-Powder (s.u.)
 (Uracil) 20 g/l Bacto-Agar (nur bei Festmedien)

Nach dem Autoklavieren werden noch folgende Lösungen zugegeben:

100 ml 20% Raffinose
 10 ml Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Difco), 6,7 g / 100 ml
 8,3 ml Histidin, 240 mg / 100 ml
 8,3 ml Leucin, 720 mg / 100 ml
 8,3 ml Tryptophan, 480 mg / 100 ml

Dropout-Powder:
 2,5 g Adenin (Hemisulfat)
 1,2 g L-Arginin (HCl)
 6,0 g L-Asparat
 6,0 g L-Glutamat (Na-Salz)
 1,8 g L-Lysin (HCl)
 1,2 g L-Methionin
 3,0 g L-Phenylalanin
 22,5 g L-Serin
 12,0 g L-Threonin
 1,8 g L-Tyrosin
 9,0 g L-Valin

(enthält kein Uracil, Histidin, Tryptophan und Leucin)

Pichia pastoris:

M-Medium: 15 g/l Agar (nur bei Festmedien)

Nach dem Autoklavieren werden noch folgende Lösungen zugegeben:

100 ml 13,4% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Difco)
 2 ml 0,02% (w/v) Biotin
 10 ml 0,4% (w/v) L-Histidin

MGYH-Medium:
 900 ml M-Medium
 100 ml 10% (v/v) Glycerol

MDH-Medium:
 900 ml M-Medium
 100 ml 20% (w/v) D-Glucose

MMH-Medium:
 900 ml M-Medium
 100 ml 5% (v/v) Methanol

<u>B-Medium:</u>	20 g/l	Pepton
	10 g/l	Hefeextrakt
	Nach dem Autoklavieren werden noch folgende Lösungen zugegeben:	
	100 ml	1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0
	100 ml	13,4% (w/v) Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren (Difco)
	2 ml	0,02% (w/v) Biotin
	10 ml	0,4% (w/v) L-Histidin
<u>BMGY-Medium:</u>	900 ml	B-Medium
	100 ml	10% (v/v) Glycerol
<u>BMMY-Medium:</u>	900 ml	B-Medium
	100 ml	5% (v/v) Methanol

Für die intrazelluläre Expression von Protein werden die *Pichia pastoris*-Hefezellen in MGYH- bzw. MMH-Medium kultiviert, für die sekretorische Expression in BMGY- bzw. BMMY-Medium.

2.1.5.3 Insektenzellen

Insektenzellen werden bei 27 °C als Suspensionskultur im Schüttelinkubator (115 rpm; Multitron; Infors, Schweiz) oder adhärent als Monolayer im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

Insektenzellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Zellen als Suspension oder Monolayer angezogen, bei 500 x g abzentrifugiert und mit einer Dichte von mindestens 2×10^6 Zellen/ml in 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit 1 °C pro Minute langsam auf -80 °C abgekühlt und die Zellen anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie bei 37 °C aufgetaut und in Medium resuspendiert werden. Aufgetaute Zellen werden zunächst adhärent kultiviert. Nach 4-6 h und weiteren 24 h erfolgt ein Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen.

<u>Sf9-Zellen:</u>	<u>Grace's Insect Medium, mit L-Aminosäuren (GibcoBRL, USA)</u>	
	100 ml/l	FCS (PAA, Österreich)
	10 ml/l	200 mM Glutamin (GibcoBRL, USA)
	10 ml/l	10% Synperonic F68 (Serva, Deutschland)
	5 ml/l	Gentamycin, 10 mg/ml (GibcoBRL, USA)

<u>Sf-900 II-Zellen:</u>	<u>Sf-900 II Medium (GibcoBRL, USA)</u>	
	10 ml/l	200 mM Glutamin (GibcoBRL; USA)

<u>High Five-Zellen:</u>	<u>Insect-XPress Medium, mit L-Glutamin (BioWhittaker, USA)</u>	
	10 ml/l	200 mM Glutamin (GibcoBRL; USA)
	5 ml/l	FCS (PAA, Österreich)
	1 ml/l	10% Synperonic F68 (Serva, Deutschland)

2.1.5.4 CHO-Zellen

CHO- (Chinese-Hamster-Ovary) Zellen werden adhären im Brutschrank (Steri-Cult 200 Inkubator; Forma Scientific, USA) bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert.

α-MEM-Medium mit Ribonukleosiden (Biochrom KG, Deutschland)
10% (v/v) FCS (Cell-Concepts, Deutschland)

2.1.6 Primer

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Deutschland) bezogen.

Mutagenese-Primer: Veränderte Nukleotide sind unterstrichen.

Xho I 359	5'-GGT AAA CAG TAC CCT TGC TCG <u>AGG</u> ATA TAT GGG G-3'
Stop 383	5'-TTC AAG AGC CAT <u>GAC</u> AGA AGA AAT TCT GC-3'
Stop 490	5'-GCT GCA CTC GAC <u>CTA</u> <u>GTA</u> GAT ACA GGA GTG G-3'
Stop 597	5'-GGA ATG GCC TTG <u>TAG</u> AGG GAA GCA AAG AAG C-3'
Stop 697	5'-GGA TGT GGA TGT <u>ATA</u> GGT TTC AGA CTT GG-3'
Stop 717	5'-GGT TCT GGA CTA <u>CTA</u> GAC CCG CAG GAT CC-3'

Sequenzier-Primer:

pFastBac	5'-CCC CGG ATG AAG TGG TTC G-3'	5' IRD 800
42f	5'-CTG ATA CAG GAG TGG AA-3'	5' IRD 800
53f	5'-GTG ATC AAC CTG GGC AC-3'	5' IRD 800
64f	5'-CAG CCA TGG TAG AGT CAG TG-3'	5' IRD 700
70f	5'-GGT GTT GAT GTC AAA GTC G-3'	5' IRD 700
53rc-1	5'-CGT AGT CGT CGA TCA GGT GA-3'	
53rc-2	5'-TGG CGT GTC TGA TAG AGT C-3'	
T3-3	5'-CTC TCA CCT GAT CGA CGA C-3'	
53rc-2rc	5'-GAC TCT ATC AGA CAC GCC A-3'	
53rc-1rc	5'-GGA CCC TAG TTC TGT TTC-3'	
42-4	5'-CCA GTT CGG TAA ACA GTA CC-3'	
42-3	5'-GCT CAA TTG CAG AAT TCT GG-3'	
42-1	5'-TCG TGG TGT CTC TGG ATG GTC-3'	

Sonstige:

Bac1	5'-ACC TAT AAA TAT TCC GGA TT-3'
Bac2rc	5'-AAA GCA AGT AAA ACC TCT AC-3'

2.1.7 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma (Deutschland), Roth (Deutschland), ICN (Deutschland), Roche (Deutschland), Calbiochem (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen. Enzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von GibcoBRL (USA) bezogen.

2.1.8 Geräte

Cleanbench	Faster 1	BioFlow-Technik
Gel-Dokumentations-Apparatur	Uniflow UVUB 1200	Kendro
Filmentwicklungsmaschine	Gel-Print 2000i	MWG-Biotech
Flachbettgelelektrophoresekammer	Curix 60	Agfa AG
Kühlzentrifuge	B1A, B2	BioRad
Mikroskop	Centricon H-401	Kontron Instr.
NMR Geräte	TMS	Nikon
	GX 400MHz Delta	Jeol
	AC 270MHz	Bruker
	DRX 500MHz	Bruker
Power-Supply	Power-Pac 1000	BioRad
SDS-PAGE-System	Mini-Protreat II	BioRad
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia
Thermoblock	Thermomixer Compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus

2.2. Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen werden mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Deutschland) durchgeführt. Die Methode geht auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zurück.

Für eine Mini-Plasmidpräparation (30-50 μg DNA) werden von einer *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium 2 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 20000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wird in 200 μl Puffer I, versetzt mit 100 mg/l RNase A, unter leichtem Vortexen gut resuspendiert. Anschließend werden 200 μl Puffer II zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken wird der Ansatz gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die stark alkalische Pufferlösung II lysiert die Zellen und setzt dadurch die Plasmid-DNA frei. Nach Zugabe von 200 μl des Neutralisations-Puffers III wird der Ansatz mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 20000 x g werden die zellulären Proteine und die chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wird nochmals für 15 min zentrifugiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA im Überstand mit 450 μl (0,7 Volumen) 2-Propanol gefällt und nach 30-minütiger Inkubation bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g pelletiert. Um restliche Salze zu entfernen, wird das DNA-Pellet mit 500 μl kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das

Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 30 μ l Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

Um größere Mengen (100 bzw. 500 μ g) High-Copy-Plasmid-DNA zu isolieren, werden 25 ml bzw. 100 ml *E. coli*-Übernachtskulturen angesetzt und das Plasmid wie oben beschrieben isoliert. Bevor die Plasmid-DNA mit 2-Propanol gefällt wird, erfolgt bei diesen Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparationen eine weitere Reinigung der DNA über ein Anionen-Austauscher-Harz, an das Plasmid-DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert bindet. Verunreinigungen, wie z.B. Proteine, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Mit Hochsalzpuffer wird die Plasmid-DNA eluiert, durch 2-Propanol gefällt und mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Das Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 60 μ l bzw. 150 μ l Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

2.2.1.2 Reinigung von DNA

Häufig sind DNA-Lösungen mit Proteinen verunreinigt, die mit der Phenol-Chloroform-Extraktion ausgeschüttelt werden können. Bei dieser Methode werden die Verunreinigungen denaturiert und in der organischen Phase bzw. der Interphase angereichert, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst bleibt. Der Ansatz (wässrige Phase) wird zweimal mit einem Volumen Phenol und anschließend zweimal mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils 1 min bei 20000 x g zentrifugiert und die obere wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, abgenommen. Durch anschließende Fällung der DNA (s. 2.2.1.3) werden verbleibende Phenol- und Chloroformreste aus der Lösung entfernt.

DNA-Lösungen können von unerwünschten Oligonukleotidprimern und Verunreinigungen, wie Salzen, Enzymen, nicht inkorporierte Nucleotiden, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen oder Detergenzien auch gereinigt werden, indem die DNA-Probe über ein QIAgen-Säulen („QIAquick Gel Extraction Kit“) gegeben wird. Diese Reinigung erfolgt nach Anweisungen des Herstellers.

2.2.1.3 Fällung von DNA

DNA lässt sich durch Ethanol oder 2-Propanol fällen. Dafür werden 2 Volumina 2-Propanol bzw. 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,8 und 2,5 Volumina Ethanol zugegeben, der Ansatz durch vortexen gut gemischt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wird anschließend 10 min bei 20000 x g pelletiert und das

Pellet mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wird in 5-20 μ l Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.1.4 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen werden spektralphotometrisch durch Absorptionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht dabei 50 μ g Doppelstrang-DNA/ml Lösung. Wird gleichzeitig die Absorption bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, so kann aus dem Verhältnis 260 nm zu 280 nm die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Saubere DNA ist frei von Proteinen und RNA und hat ein Verhältnis der Wellenlängen 260 nm / 280 nm von ca. 1,8.

Eine weitere Möglichkeit DNA-Mengen zu quantifizieren, besteht in der Abschätzung der Bandenintensität auf Agarosegelen, im Vergleich zu bekannten DNA-Mengen.

2.2.1.5 DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen von 4-8 bp und führen in doppelsträngige DNA Strangbrüche ein, wobei überhängende 3' bzw. 5' Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt end) entstehen. Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wird für die Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. Restriktionsspaltungen werden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthält zwischen 1 und 40 μ g DNA. Pro Restriktionsansatz werden etwa eine Einheit (U) Enzym pro μ g DNA eingesetzt. Anschließend werden die erhaltenen Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Bei ringförmiger DNA können auch *coiled* und *supercoiled*-Strukturen auftreten, welche aufgrund ihrer höheren Kompaktheit schneller wandern und in den Gelen deshalb bei scheinbar kleineren Molekulargewichten detektiert werden. Mit Agarosegelen können DNA-Moleküle im Bereich von 500-8000 bp identifiziert werden.

Agarose-Gelelektrophoresen werden zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von DNA verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in

horizontalen 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose wird durch Kochen in TAE-Puffer (40 mM Tris / 5 mM Natriumacetat / 1 mM EDTA, pH 7,9) gelöst und in die entsprechenden Gelschritten gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400 / 1% (w/v) SDS / 0,02% (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer) versetzt. Das Auftragsvolumen beträgt etwa 5-20 μ l pro Probentasche. Als Größenstandard werden 10 μ l des 1 kb-DNA-Markers (Gibco-BRL, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese wird anschließend bei 0,5 V / cm² durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hat. Das Gel wird dann für 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) inkubiert und die DNA unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

2.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution

DNA kann aus Agarose-Gelen durch Verflüssigung der Agarose in Spezialpuffer herausgelöst und anschließend über QIAGEN-Säulen des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Deutschland) gereinigt werden. Der im Kit enthaltene Puffer QG ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen. Gleichzeitig führen die im Puffer enthaltenen Salze zu einer leichten Modifikation der Nukleinsäure-Struktur, so daß anschließend eine optimale Bindung an die Silicagel-Membran der Säulen möglich ist. Die DNA-Bindung an das Säulenmaterial ermöglicht die Reinigung von unerwünschten Primern und Verunreinigungen, wie Salzen, Enzymen, nicht inkorporierte Nucleotiden, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen oder Detergenzien durch den ethanolhaltigen PE-Puffer. Die Elution erfolgt anschließend mit 30 μ l Wasser. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Bei der Standardligation wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektor mit isolierten DNA-Fragmenten verknüpft, die durch Restriktionsspaltung und anschließende Gelelektrophorese mit Gelelution isoliert worden sind. Für die Ligation werden Vektor und Insert im Verhältnis von mindestens 1:3 eingesetzt. Der Ansatz wird mit 1 μ l T4-DNA Ligase (20 U; GibcoBRL, USA) pro 10 μ l Ansatz bei RT für 5-15 min inkubiert und anschließend vollständig zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

2.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA

Linearisierte Vektoren, deren Enden symmetrisch sind, zeigen eine hohe Religationsrate. Um bei Religationen mit DNA-Fragmenten die Selbstligationsrate des Vektors zu verringern, wird vorher eine Behandlung des linearisierten Plasmids mit Bakterieller-Alkalischer-Phosphatase aus *E. coli* durchgeführt. Diese Alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe von DNA, die bei Ligationen als Energielieferant benötigt wird, wodurch die Religationsrate des Vektors stark verringert wird. Die Dephosphorylierung der DNA wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers (GibcoBRL, USA) durchgeführt. Die in 100 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöste DNA (1 pmol) wird nach der Zugabe von 1 μ l Bakterieller-Alkalischer-Phosphatase 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die DNA mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Deutschland) gereinigt und in 20 μ l Wasser aufgenommen.

2.2.1.10 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind Zellen, die fähig sind, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Durch Behandlung mit CaCl_2 wird die Zellmembran für DNA-Moleküle durchlässig (Dagert und Ehrlich, 1979). Zur Herstellung von kompetenten Zellen werden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von Inv α F' oder BL21 StarTM(DE3)pLysS angeimpft und bei 37 °C bis zur Sättigung kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wird in 100 ml LB überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4 °C) sedimentiert und in 20 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wird 5 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert und nochmals für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen werden direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 20% (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

2.2.1.11 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien bezeichnet. Dabei wird zu 100 μ l kompetenten Zellen der Ligationsansatz oder etwa 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Proben werden anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Durch die nachfolgende 45-sec-Inkubation bei 42 °C im Wasserbad wird die Aufnahme der DNA durch die Bakterienzellen erleichtert. Die Zellen werden anschließend nochmals 2 min auf Eis inkubiert und danach in 250 μ l LB-Medium oder alternativ SOC-Medium für 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert, damit sich die Bakterienzellen regenerieren können. Aliquots von 50 bis 200 μ l werden auf vorgewärmten Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.12 Sequenzierungen

Zur Kontrolle von Klonierungsschritten und zur Sequenzanalyse generell werden Sequenzierungen durchgeführt. Alle Sequenzierungen werden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1992) durchgeführt. Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimern werden 4 pmol Sequenzierprimer mit 1,2 µg DNA auf vier Nukleotidmixe („Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit“; Amersham, Deutschland) verteilt und die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 6 µl einem Cycle-Sequencing mit 25 Zyklen (20sec 95°C / 20 sec 60 °C / 10sec 72°C) unterzogen. Anschließend wird 1 µl des zuvor mit 4 µl Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200; MWG-Biotech, Deutschland) analysiert.

Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden werden etwa 1 µg DNA mit 10 pmol Primern und 4 µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Nach der Sequenzier-PCR (30 sec 96 °C, 25 Zyklen 30 sec 96 °C / 15 sec 55 °C / 4 min 60 °C) wird der Ansatz über Centriflex™ Gel Filtration Cartridges (Edge BioSystems, USA) gereinigt, wobei Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Primer und Nukleotide an die Säulenmatrix binden. Die eluierten DNA-Fragmente werden bis zur Trockne eingengt, in 20 µl Template Suppression Reagent (Applied BioSystems, UK) resuspendiert und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied BioSystems, UK) analysiert.

2.2.1.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann eine ausgewählte DNA-Sequenz *in vitro* exponentiell amplifiziert werden, z.B. um die Anwesenheit eines bestimmten DNA-Fragments nachzuweisen. Zur Synthese werden eine DNA-Sequenz, die als Template bezeichnet wird, und zwei Oligonukleotidprimer benötigt, die die zu amplifizierende Region flankieren. Die PCR wird mit dem „AmpliTaq® DNA Polymerase with GeneAmp® Kit“ (Perkin Elmer, USA) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Ein Standardansatz für eine PCR sieht dabei wie folgt aus:

Template	10-100 ng
Primer	je 20 pmol
dNTPs	je 2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Puffer	10 x PCR-Buffer II
Taq-Polymerase	0,5 µl/50 µl Ansatz

Die Reaktion wird in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid) mit folgendem Programm durchgeführt:

3 min 95 °C
30 x (30 sec 95 °C / 30 sec 55 °C / 2 min 72 °C)
7 min 72 °C

Ein Aliquot von 5 µl wird zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.1.14 Herstellung von Punktmutanten

Zur Generierung von Mutanten wird der „QuickChange™ Site-Directed-Mutagenesis Kit“ von Stratagene (USA) eingesetzt. Zur Konstruktion jeder Mutante sind zwei zueinander revers komplementäre Oligonukleotidprimer erforderlich, die die gewünschte Mutation möglichst mittig tragen. Die Primersequenzen sind unter Materialien/Primer (2.1.6) beschrieben. Als Template-DNA dient der pFASTBACHTA/2epi-Vektor, der ausgehend von den Mutationsprimern von der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase repliziert wird. Die Amplifikationsreaktionen werden in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

30 sec 95 °C
16 x (30 sec 95 °C / 1 min 55 °C / 14 min 68 °C)

Anschließend wird die parentale Template-DNA mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* abgebaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA abbaut (1 h, 37 °C, 10 U). Die amplifizierte DNA mit den Mutationen wird in superkompetente InvαF' Zellen (Invitrogen, Niederlande) transformiert.

2.2.2 Expression von rekombinantem Protein in *Escherichia coli*

Die Überexpression von rekombinantem Protein in *E. coli* erfolgt nach Anweisungen des Herstellers der Expressionsvektoren pRSET (Invitrogen, Niederlande) bzw. pGEX (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Sämtliche Überexpressionen werden mit dem Bakterienstamm BL21 Star™(DE3) pLysS (Invitrogen, Niederlande) durchgeführt.

2.2.2.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Zunächst werden die Vektoren wie unter 2.2.1.11 beschrieben in BL21 Star™(DE3) pLysS Bakterienzellen transformiert. Einzelne Kolonien werden in 2 ml LB-Amp-Medium bis zur Sättigung bei 37 °C kultiviert. Mit 150 µl dieser Vorkultur werden 15 ml LB-Amp-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6

bei 37 °C kultiviert. Durch Zugabe von 0,03 mM IPTG wird die Proteinexpression induziert. Um die optimalen Bedingungen für maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zunächst Pilotexpressionen durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden jeweils 2 ml-Aliquots abgenommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert. Die Zellen werden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die gefrorenen Zellpellets werden in 200 µl PBS mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM UDP resuspendiert. Die Suspensionen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort wieder auf 37 °C erwärmt. Dieser Frier-Tau-Zyklus wird sechsmal wiederholt, damit die Zellen komplett lysiert sind. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in 200 µl PBS resuspendiert und den gleichen Analysen unterzogen.

Die maximale Expression von rekombinantem Protein wird nicht nur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit IPTG ermittelt. Zum einen werden Bakterien auch bei 18 °C bzw. 24 °C statt 37 °C kultiviert und zum anderen wird die Proteinexpression mit 0,01 mM, 0,03 mM und 0,1 mM IPTG induziert. Es zeigte sich, daß eine maximale Proteinausbeute durch Kultivierung der Bakterien bei 18 °C und einer Induktion mit 0,03 mM IPTG für 9-13 h erzielt werden konnte. Eine ähnlich hohe Ausbeute konnte mit Bakterien erzielt werden, die bei 37 °C gehalten wurden und nur für 3 h mit 0,03 mM IPTG induziert wurden.

2.2.2.2 Expression von rekombinantem Protein in *Escherichia coli*

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Einzelne Kolonien werden in 2 ml LB-Amp-Medium bis zur Sättigung bei 37 °C kultiviert. Mit 2 ml dieser Vorkultur werden 200 ml LB-Amp-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6 bei 18 °C oder 37 °C kultiviert. Durch Zugabe von 0,03 mM IPTG wird die Proteinexpression induziert. Nach 9-13 h bzw. 3 h werden die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert und das Zellpellet in 10 ml PBS mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM UDP resuspendiert. Die Zellen werden bei -20 °C gelagert oder direkt lysiert, indem sie dreimal bei einem Druck von 800-1000 psi durch eine „French® Pressure Cell Press“ (SIM Instruments Inc., Urbana, USA) gegeben werden. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C wird der cytosolische Überstand für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.3 Expression von rekombinantem Protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Überexpression von rekombinantem Protein in der Hefe *S. cerevisiae* erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers des Expressionsvektors pYES2 (Invitrogen, Niederlande). Sämtliche Expressionsexperimente werden mit dem Hefestamm INVSc1 (Invitrogen, Niederlande) durchgeführt.

2.2.3.1 Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Hefezellen

Für die Aufnahme von Fremd-DNA durch die Hefezellen werden zunächst kompetente Zellen hergestellt, d.h. Zellen, die fähig sind, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Dafür werden 5 ml Vollmedium mit einer Einzelkolonie von INVSc1 angeimpft und bei 30 °C bis zur Sättigung kultiviert. 4 ml dieser Vorkultur werden in 100 ml Vollmedium übergeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4 °C) sedimentiert und mit 20 ml 1 M Sorbitol / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8,4 / 3% (v/v) Ethylenglycol gewaschen. Die sedimentierten Zellen werden in 4 ml 1 M Sorbitol / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8,4 / 3% (v/v) Ethylenglycol resuspendiert und mit 100 µl zerschallter Heringssperma-DNA (10 mg/ml, zerschallt auf eine mittlere Fragmentgröße von 7 kb) sowie mit 100 µl einer sterilfiltrierten 1 M Histamin-Lösung versetzt. Aliquots von 200 µl werden bei -70 °C für mindestens 2 h eingefroren.

2.2.3.2 Transformation von Plasmid-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Organismen bezeichnet. Die *S. cerevisiae*-Hefezellen werden mittels der von M. von Pein modifizierten Gefriermethode von R.J. Dohmen *et. al.* (1991) transformiert. Dafür werden die gefrorenen kompetenten *S. cerevisiae*-Hefezellen mit 2,5 µg Plasmid-DNA versetzt. Alle Ansätze werden 5 min bei 37 °C geschüttelt, mit 1,2 ml 40% (v/v) PEG 3350 (Sigma) / 200 mM Tricine-NaOH, pH 8,4 gemischt und ohne weiteres Schütteln 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach Sedimentation bei 13000 x g für 5 sec werden die Zellen zweimal mit je 1 ml 0,15 M NaCl / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8,4 gewaschen, anschließend in 200 µl 0,15 M NaCl / 10 mM Tricine-NaOH, pH 8,4 aufgenommen, auf Agar-Platten mit Minimalmedium ausplattiert und etwa 4 Tage bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30 °C inkubiert. Von den erhaltenen Transformanten werden einzelne Klone als Strichkolonien auf Agar-Platten mit Minimalmedium subkultiviert und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.3.3 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zunächst Pilotexpressionen durchgeführt. Einzelne Klone werden in 5 ml Minimalmedium bis zur Sättigung bei 30 °C kultiviert. Mit 500 µl dieser Vorkultur werden 50 ml Minimalmedium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C kultiviert. Durch Zugabe von 2% (w/v) Galactose wird die Proteinexpression induziert. Um die optimalen Bedingungen für maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 5 ml Aliquots abgenommen, die OD₆₀₀ ermittelt und die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert. Der Medienüberstand und die Zellen werden bis zur weiteren Analyse bei -70 °C gelagert, wobei die Zellen zuvor noch mit 500 µl Wasser gewaschen werden. Die gefrorenen Zellen werden in Lysepuffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert, so daß eine berechnete OD₆₀₀ von 50-100 eingestellt wird. Anschließend wird ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben. Die Zellsuspension wird für 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wird siebenmal wiederholt, damit die Zellen komplett lysiert sind. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und RT für 10 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in 50 µl SDS-Probenpuffer (s. 2.2.6.3) resuspendiert.

2.2.3.4 Expression von rekombinantem Protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Einzelne Kolonien werden in 5 ml Minimalmedium bis zur Sättigung bei 30 °C kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur werden 100 ml Minimalmedium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C kultiviert. Durch Zugabe von 2% (v/v) Galactose wird die Proteinexpression induziert. Nach 6 h werden die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert und das Zellpellet bei -20 °C gelagert oder direkt lysiert, indem die Zellen in 1 ml Lysepuffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert werden und ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben wird. Die Zellen werden, wie unter 2.2.3.3 beschrieben, mechanisch durch Scherkräfte aufgebrochen und Zelltrümmer und unlösliche Komponenten bei 20000 x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.4. Expression von rekombinantem Protein in *Pichia pastoris*

Die Überexpression von rekombinantem Protein in der Hefe *Pichia pastoris* erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers der Expressionsvektoren pPICZ und pGAPZ (Invitrogen, Niederlande). Für die Expressionsexperimente werden die Vektoren in die Hefestämme X-33, GS115 und KM71H (Invitrogen, Niederlande) transformiert.

2.2.4.1 Herstellung kompetenter *Pichia pastoris*-Zellen

P. pastoris-Hefezellen werden mittels Elektroporation transformiert. Dafür werden zunächst kompetente Zellen hergestellt. 5 ml YPD-Medium werden mit einer Einzelkolonie eines *P. pastoris*-Hefestamms angeimpft und bei 30 °C bis zur Sättigung kultiviert. 500 µl dieser Vorkultur werden in 500 ml YPD-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,4 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C für 5 min pelletiert und das Zellpellet mit 500 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen werden nochmals mit 250 ml eiskaltem Wasser und anschließend mit 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen. Durch diese Waschschrte werden die Zellen von Ionen befreit und damit kompetent gemacht. Zum Schluß werden die Zellen in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und direkt zur Transformation eingesetzt.

2.2.4.2 Linearisieren der Plasmid-DNA

Vor der Transformation werden die zu transformierenden pPICZ-Vektoren mit dem Restriktionsenzym *Pme* I (New England Biolabs, USA) bzw. die pGAPZ-Vektoren mit der Restriktionsendonuklease *Avr* II (New England Biolabs, USA) linearisiert. Dadurch wird die Transformationseffizienz etwa um den Faktor 10 gesteigert, da die Insertion des Plasmids ins *Pichia*-Genom durch homologe Rekombination stark begünstigt wird. 20 µg DNA werden mit 20 U Restriktionsenzym über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsenzyme werden durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C bzw. durch Zugabe von 10 mM EDTA inaktiviert und die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in 10 µl Wasser aufgenommen. Die DNA wird direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Elektroporation von *Pichia pastoris*-Hefezellen

P. pastoris-Hefezellen werden mittels Elektroporation transformiert. Dies ist eine sehr effektive und schonende Transformationsmethode, bei der die Zellwand nicht zerstört wird. Für die Transformation werden 80 µl kompetente Hefezellen mit 10 µg linearisierter DNA in einem vorgekühlten Eppendorfgefäß gemischt und in eine

vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad Laboratories, Deutschland) überführt. Nachdem der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert wurde, wird mit dem Gene-Pulser und Pulse-Controller (Bio-Rad Laboratories, Deutschland) bei 8 kV / 25 μ F / 600 Ohm elektroporiert (Schlitten wird 1 Tag bei -20 °C vorgekühlt). Anschließend wird sofort 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und der Ansatz in einem Eppendorfgefäß für 1-2 h ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert. 300 μ l werden auf YPDS-Agarplatten mit 100 μ g Zeocin/ml bzw. 600 μ l auf YPDS-Agarplatten mit 500 μ g Zeocin/ml ausplattiert und etwa 3 Tage bis zum Erscheinen von Kolonien bei 30 °C inkubiert. Von den erhaltenen Transformanten werden einzelne Klone als Strichkolonien auf YPDS-Agarplatten subkultiviert und für die weiteren beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.4.4 Ermittlung des Mut-Phänotyps

Transformanten der Hefestämme X-33 und GS115 sollten einen Mut⁺-Phänotyp zeigen, d.h. sie können Methanol genauso als Kohlenstoffquelle nutzen wie Glucose. Um den Phänotyp der einzelnen Transformanten zu ermitteln, werden die einzelnen Klone als Strichkolonien sowohl auf methanolhaltigem MMH-Medium als auch auf glucosehaltigem MDH-Medium ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird das Wachstum der Kolonien im Vergleich zu einem Mut⁺-Kontrollstamm (GS115 / pPICZ / *lacZ*) und einem Mut^S-Kontrollstamm (GS115 / Albumin) analysiert. Mut⁺-Transformanten wachsen auf beiden Medien gleich gut, während Mut^S-Transformanten nur auf glucosehaltigem Medium gut wachsen, auf methanolhaltigem Medium dagegen sehr viel schlechter bis gar nicht.

2.2.4.5 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zunächst Pilotexpressionen durchgeführt.

Methanol-induzierte Expression, Mut⁺-Transformanten: Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für Mut⁺-Transformanten werden einzelne Klone in 25 ml BMGY-Medium (sekretorische Proteinexpression) bzw. MGYH-Medium (intrazelluläre Proteinexpression) unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 angezogen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 2500 x g und RT werden die Hefezellen pelletiert und auf eine OD₆₀₀ von 1 in BMMY-Medium (sekretorische Proteinexpression) bzw. MMH-Medium (intrazelluläre Proteinexpression) resuspendiert, um die Proteinexpression zu induzieren. Damit die Methanol-Konzentration während der Expression nicht zu stark absinkt, wird alle 24 Stunden Methanol mit einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden

jeweils 1 ml Aliquots abgenommen und die Hefezellen durch Zentrifugation für 3 min bei 20000 x g und RT pelletiert. Die Zellen und der Medienüberstand werden bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Methanol-induzierte Expression, Mut^S-Transformanten: Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für Mut^S-Transformanten werden einzelne Klone in 100 ml BMGY-Medium (sekretorische Proteinexpression) bzw. MGYH-Medium (intrazelluläre Proteinexpression) unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 angezogen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 2500 x g und RT werden die Hefezellen pelletiert und in 10 ml BMMY-Medium (sekretorische Proteinexpression) bzw. MMH-Medium (intrazelluläre Proteinexpression) resuspendiert, um die Proteinexpression zu induzieren. Damit die Methanol-Konzentration während der Expression nicht zu stark absinkt, wird alle 24 Stunden Methanol mit einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) zugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden jeweils 1 ml Aliquots abgenommen und die Hefezellen durch Zentrifugation für 3 min bei 20000 x g und RT pelletiert. Die Zellen und der Medienüberstand werden bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Konstitutive Expression: Zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen für pGAPZ-Transformanten werden einzelne Klone in 10 ml YPD-Medium unter Schütteln bei 30 °C bis zur Sättigung angezogen. Mit 100 µl dieser Vorkultur werden 50 ml YPD-Medium beimpft und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden jeweils 1 ml Aliquots abgenommen und die Hefezellen durch Zentrifugation für 3 min bei 20000 x g und RT pelletiert. Die Zellen und der Medienüberstand werden bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.4.6 Lyse von Hefezellen

Die geernteten Hefezellen von 1 ml Hefekultur werden in 100 µl Lysepuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM DTT / 1 mM EDTA / 1 mM PMSF) resuspendiert und ein gleiches Volumen an „acid-washed 0,5 mm glass beads“ (Sigma, Deutschland) zugegeben. Die Zellsuspension wird für 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wird achtmal wiederholt, damit die Zellen komplett lysiert sind. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und den gleichen Analysen unterzogen.

2.2.4.7 Expression von rekombinantem Protein in *Pichia pastoris*

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt.

Methanol-induzierte Expression: Mut⁺-Transformanten werden in 50 ml, Mut^S-Transformanten in 200 ml BMGY- (sekretorisch) bzw. MGYH-Medium (intrazellulär) unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 2-6 angezogen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 2500 x g und RT werden die Hefezellen pelletiert. Um die Proteinexpression zu induzieren werden Mut⁺-Transformanten anschließend auf eine OD₆₀₀ von 1 in BMMY-Medium (sekretorisch) bzw. MMH-Medium (intrazellulär) resuspendiert, während Mut^S-Transformanten in 20 ml BMMY- (sekretorisch) bzw. MMH-Medium (intrazellulär) resuspendiert werden. Damit die Methanol-Konzentration während der Expression nicht zu stark absinkt, wird alle 24 Stunden Methanol mit einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) zugegeben. Nach 48 h werden die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und RT pelletiert. Die Zellen werden bei -20 °C gelagert oder direkt lysiert, indem sie, wie unter 2.2.4.6 beschrieben, mit Glasperlen mechanisch aufgebrochen werden. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C wird der cytosolische Überstand für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

Konstitutive Expression: Von mit pGAP-Vektoren transformierte *Pichia pastoris*-Hefezellen werden einzelne Kolonien in 10 ml YPD-Medium bis zur Sättigung bei 30 °C kultiviert. Mit 0,4 ml dieser Vorkultur werden 200 ml YPD-Medium beimpft und bei 30 °C kultiviert. Nach 48-72 h werden die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert. Die Zellen werden bei -20 °C gelagert oder direkt lysiert, indem sie, wie unter 2.2.4.6 beschrieben, mechanisch mit Glasperlen aufgebrochen werden. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.5. Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Bei dem BAC-TO-BAC[®]-Baculovirus-Expression-System wird das zu untersuchende Gen durch einen Virus in Insektenzellen eingeschleust und dort exprimiert. Die Überexpression von rekombinantem Protein erfolgt dabei weitgehend nach den Anweisungen des Herstellers (GibcoBRL, USA).

2.2.5.1 Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA

Zunächst wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit den unter 2.2.1 beschriebenen Methoden in das pFASTBAC-Donorplasmid kloniert. Für die anschließende Transposition in die Bacmid-DNA werden DH10BAC-*E. coli*-Zellen mit dem pFASTBAC-Donorplasmid transformiert. 100 µl kompetente DH10 BAC-Zellen werden mit 5-10 µg Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 sec Hitzeschock bei 42 °C werden die Bakterien nochmals für 2 min auf Eis inkubiert und

anschließend 400 μ l SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien werden zur Regeneration für 4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend jeweils 100 μ l auf LB-Kanamycin/Gentamycin/Tetracyclin-Platten ausplattiert und für mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert. Neben den Antibiotika für die Selektion enthalten die LB-Platten Bluo-Gal und IPTG, um durch Blau-Weiß-Selektion die Klone zu identifizieren, bei denen homologe Rekombination zwischen Donorplasmid und Bacmid-DNA stattgefunden hat. Positive weiße Klone werden zur phänotypischen Überprüfung erneut auf LB-Kanamycin/Gentamycin/Tetracyclin-Platten ausgestrichen.

2.2.5.2 Analyse der Bacmid-DNA

Die rekombinante Bacmid-DNA wird mit dem „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden), wie unter 2.2.1.1 beschrieben, aus den DH10 BAC-Zellen isoliert. Die präzipitierte DNA wird nach der Ethanol-fällung in 30 μ l Wasser aufgenommen. 5 μ l der isolierten Bacmid-DNA werden anschließend auf einem 0,5%igem (w/v) Agarose-Gel bei 20 V (14-16 Stunden) analysiert und quantifiziert, wobei *Hind* III verdaute λ -DNA als Größenstandard dient.

2.2.5.3 Herstellung von rekombinantem Virus

Für die Transfektion, d.h. die Aufnahme der rekombinanten Bacmid-DNA, werden pro Well einer Zellkultur 6-Well-Platte (Falcon, USA) 9×10^5 Sf9-Insektenzellen in 2 ml Grace's-Medium ausgesät und für mindestens 1 h bei 27 °C inkubiert, damit die Zellen adhäreren können. Währenddessen werden mindestens 5 μ l Bacmid-DNA in 100 μ l Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze und 6 μ l Cellfectin (Invitrogen, Niederlande) in weiteren 100 μ l Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gelöst. Nachdem die Cellfectin-Lösung gut gevortext wurde, werden beide Lösungen zusammengegeben, vorsichtig gemischt und der Transfektionsmix für 45 min bei RT inkubiert, damit sich DNA-Lipid-Komplexe bilden. Die adhärerten Sf9-Zellen werden pro Well mit 2 ml Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gewaschen. Anschließend werden zu jedem Transfektionsmix 800 μ l Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gegeben, gut gemischt und die Sf9-Zellen vorsichtig mit dieser Lösung überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, daß die Insektenzellen nicht austrocknen. Die Sf9-Zellen werden mit dem Transfektionsmix für mindestens 5 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wird der Transfektionsmix abgenommen, die Zellen mit 2 ml Grace's-Medium überschichtet und weiter bei 27 °C inkubiert. Nach 72 h wird der Medienüberstand, indem sich die gebildeten Viren befinden, abgenommen (= Transfektionsüberstand) und für weitere Experimente bei 4 °C gelagert.

2.2.5.4 Analyse der Viren

Mit Hilfe der PCR kann überprüft werden, ob das zu untersuchende UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen im Virus-Genom enthalten ist, d.h. die Transfektion erfolgreich war. Dafür werden 25 μl virushaltiger Medienüberstand mit Wasser auf ein Arbeitsvolumen von 100 μl verdünnt. Durch Zugabe von 5 μl 10% (w/v) SDS und 5 μl Proteinase K (20 mg/ml) und anschließender Inkubation bei 37 °C wird die proteinhaltige Virushülle zerstört. Die freigesetzte DNA wird wie unter 2.2.1.2 beschrieben mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Nach Ethanolfällung wird die Virus-DNA in 5 μl Wasser aufgenommen und direkt in die PCR eingesetzt. Die PCR wird mit dem „AmpliTa^q® DNA Polymerase with GeneAmp® Kit“ (Perkin Elmer, USA) wie unter 2.2.1.14 beschrieben durchgeführt. Als Primer werden die DNA-Sequenzen Bac1 und Bac2rc verwendet, die Homologien zu Vektor-Sequenzen etwa 200 bp bzw. 60 bp außerhalb der kodierenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Sequenz zeigen. Nach einem Cycle-Sequencing mit 35 Zyklen wird ein Aliquot von 5 μl zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.5.5 Amplifikation von Virus

Für die Expressionsversuche werden die Viren in größeren Mengen benötigt, d.h. sie müssen zunächst vermehrt werden. Dafür werden 30 ml Sf9-Insektenzellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 500 μl Transfektionsüberstand infiziert und für 5 Tage bei 27 °C geschüttelt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und 1000 x g werden die Insektenzellen pelletiert. Der virushaltige Medienüberstand wird abgenommen (= Urstock) und bei 4 °C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation von Virus werden 200 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 3 ml Urstock infiziert und bei 27 °C kultiviert. Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und 1000 x g geerntet (= Erststock) und bei 4 °C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation von Virus werden Sf9-Zellsuspensionen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit Erststock-Virus bei einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,1 infiziert und bei 27 °C geschüttelt. Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und 1000 x g geerntet (= Gebrauchsstock) und bei 4 °C gelagert. Sämtliche Infektionen werden mit Gebrauchsstock-Viren durchgeführt.

2.2.5.6 Bestimmung des Virus-Titers

Für die Proteinexpression müssen die Insektenzellen mit einer bestimmten Menge an Virus infiziert werden. Deshalb wird zunächst die Anzahl infektiöser Viren, d.h. der Virus-Titer, mit Hilfe des Plaque-Assays ermittelt. Dafür werden in einer Zellkultur 6-Well-Platte (Falcon, USA) in 3 ml Grace's-Medium $1,5 \times 10^6$ Sf9-Insektenzellen pro Well ausgesät und für mindestens 1 h bei 27 °C inkubiert, damit die Zellen adhären können. Währenddessen wird eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-7} des zu untersuchenden Virus in Grace's-Medium angesetzt. Der Medienüberstand der adhären Sf9-Zellen wird anschließend vorsichtig abgenommen und die Zellen mit jeweils 500 μ l der gut gemischten Virusverdünnung 10^{-3} bis 10^{-7} vorsichtig überschichtet. Als Kontrolle werden die Zellen in einem Well nur mit 500 μ l Grace's-Medium überschichtet. Die Zellen werden unter leichtem Schwenken für 2 h bei RT inkubiert. Währenddessen werden pro 6-Well-Platte 14 ml Grace's-Medium auf 45 °C vorgewärmt und 7 ml 3% (w/v) sterile SeaPlaque Agarose (Biozym, Deutschland) aufgekocht und anschließend auch bei 45 °C gehalten.

Nach 2 h Inkubation wird der Virusüberstand vorsichtig abgenommen, die 14 ml vorgewärmtes Medium mit den 7 ml 3% Agarose gut gemischt und die Zellen pro Well mit jeweils 3 ml Agarose vorsichtig überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, daß die Insektenzellen nicht austrocknen. Nach dem Erstarren der Agarose wird, um ein Austrocknen zu verhindern, jedes Well mit je 1 ml Medium überschichtet und die Platten für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Der Medienüberstand wird abgesaugt und in jedes Well 200 μ l MTT (Thiazolyl blue)-Lösung (5 mg/ml Wasser; sterilfiltriert) gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation bei 27 °C werden die weißen Plaques pro Well ausgezählt. Der Virustiter in pfu/ml berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Virustiter} = \frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times (\text{Infektionsvolumen pro well in ml})}$$

2.2.5.7 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Um die optimalen Expressionsbedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, werden zunächst Expressionen mit verschiedenen Zelllinien, Infektionszeiten und MOIs (Multiplicity of Infection) durchgeführt.

50 ml Insektenzellen, Sf-900 II-, Sf9- und High Five-Zellen, werden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei einer MOI von 3 infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Nach 48 h werden die Insektenzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 700 x g und RT pelletiert. Die Zellen werden in 5 ml Lysepuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert und mittels Ultraschall (15-30 sec

gepulst mit 60% Duty Cycle und 20% Output Control; Branson Sonifer 250) oder durch mindestens 20-faches Aufziehen in eine Spritze mit einer 0,45 mm-Kanüle aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

Um die maximale Proteinausbeute in Abhängigkeit von der Infektionszeit zu ermitteln, werden 100 ml Sf-900 II-Insektenzellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei einer MOI von 3 infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird jeweils ein 5 ml Aliquot abgenommen und die Insektenzellen durch Zentrifugation für 5 min bei 700 x g und RT pelletiert. Die Zellen werden zunächst bei -20 °C gelagert und anschließend, wie oben beschrieben, mittels einer Spritze bzw. mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 20000 x g wird der cytosolische Überstand abgenommen und für weitere Analysen verwendet, während das Pellet in 500 µl Lysepuffer resuspendiert wird und anschließend für die gleichen Analysen verwendet wird.

Um die für eine maximale Proteinausbeute optimale MOI zu ermitteln, werden jeweils 50 ml Sf-900 II-Insektenzellen bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Virus bei verschiedenen MOIs infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Nach 48 h werden die Insektenzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 700 x g und RT pelletiert. Die Zellen werden in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und wie oben beschrieben aufgeschlossen.

2.2.5.8 Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Insektenzellen werden bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit rekombinantem Baculovirus bei einer MOI von 1 bzw. einer MOI von 3 (Deletionsmutanten) infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Nach 48 h werden die Insektenzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 700 x g und RT pelletiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Lysepuffer pro 10 ml Insektenzellsuspensionskultur resuspendiert und mittels Ultraschall (30-60 sec gepulst mit 60% Duty Cycle und 20% Output Control; Branson Sonifer 250) oder durch mindestens 20-faches Aufziehen in eine Spritze mit einer 0,45 mm-Kanüle aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluß bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.6 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillantblau mit Proteinen unter Komplexbildung reagiert. 20 μ l proteinhaltige Probe werden mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (v/v) Phosphorsäure / 5% (v/v) Ethanol / 0,1% (w/v) Coomassie G-250) versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 578 nm bestimmt. Als Proteinstandard dient Rinderserumalbumin.

2.2.6.2 Konzentrieren von Proben

Proteine werden durch Ultrafiltration in einer UH 100/75-Ultrahülse in einer Ultrahülsen-Apparatur (Schleicher & Schuell, Deutschland) unter Vakuum angereichert.

Eine Konzentration der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wird durch die Acetonfällung erzielt. Dafür wird die proteinhaltige Probe mit 4 Volumenteilen Aceton gemischt und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Die ausgefällten Proteine werden für 10 min bei 4 °C und 20000 x g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Proteinpellet in der Speedvac bis zur Trockne eingeengt. Die getrockneten Proteinpellets werden in 20 μ l reduzierendem Probenpuffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.6.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird nach der Methode von Laemmli (1970) mit dem Mini-Protean II System der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese denaturieren und eine stark negative Ladung eingeführt wird. Dabei ist die Ladung eine Funktion der Größe der Proteine. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist die Beweglichkeit der Proteine im SDS-Gel dann proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird ein System aus zwei Gelen, einem Trenn- und einem Sammelgel, verwendet. Das Sammelgel weist einen sauren pH-Wert auf, so daß das im Laufpuffer enthaltene Zwitterion Glycin im Sammelgel nur zu einem geringen Teil als Anion vorliegt. Dadurch kommt es beim Anlegen eines elektrischen Feldes zu einem Mangel an Anionen im Sammelgel, so daß sich ein starkes lokales elektrisches Feld zwischen den sich schnell bewegenden Chloridionen und den langsameren Glycinationen aufbaut. Dies führt zu einer stärkeren Beschleunigung der

anionischen Proteine in dem großporigen Sammelgel und damit zu einer Fokussierung der Proteine. Mit dem Übergang ins Trenngel gehen die Glycin-Zwitterionen aufgrund des höheren pH-Wertes wieder voll in den anionischen Zustand über, wodurch der Ionenmangel aufgehoben wird und wieder eine konstante Feldstärke im gesamten Gel herrscht. Aufgrund der kleineren Porengröße des Trenngels werden die Proteine entsprechend ihrem Verhältnis Molekulargewicht zu Ladung verlangsamt.

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Proben mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert oder 3 min bei 95 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgt dann 10 min bei einer konstanten Spannung von 120 V, anschließend bei 180 V. Als Größenstandard dient der Molekulargewichtsmarker „Standard Mixture for High Molecular Weights 30000-200000“ (Sigma, Deutschland) oder der „Prestained SDS-Molecular Weight Standard Mixture“ (Sigma, Deutschland).

Lösung A:	30% Acryamid (w/v) 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
Lösung B:	0,4% SDS (w/v) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Lösung C:	0,4% SDS (w/v) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS (w/v)
5 x Probenpuffer:	0,3 M Tris-HCl, pH 6,8 50% Glycerin (v/v) 15% SDS (w/v) 0,015% Bromphenolblau (w/v) 50 mM DTT (nur bei reduzierendem Probenpuffer)
Ansatz für 7,5%ige Trenngele:	2,25 ml Lösung A 2,25 ml Lösung B 4,50 ml Aqua bidest 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v) 12 µl Tetramethyldiamin
Für 4,5%ige Trenngele werden statt 2,25 ml Lösung A 1,35 ml und statt 4,5 ml Aqua bidest 5,4 ml in den Ansatz gegeben.	
Ansatz für 4%ige Sammelgele:	0,40 ml Lösung A 0,75 ml Lösung C 1,85 ml Aqua bidest 12 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v) 3 µl Tetramethyldiamin

2.2.6.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteine über 0,5 μg können in Gelen sehr einfach mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 angefärbt werden, wobei der Farbstoff mit den Proteinen unter Komplexbildung reagiert. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für mindestens 1 h bei RT in Färbelösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,1% (w/v) Serva-Blue) geschüttelt. Das gefärbte Gel wird anschließend dreimal in Entfärbelösung (5% (v/v) Ethanol / 7,5% (v/v) Essigsäure) für jeweils 1 h bei RT geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt sind.

2.2.6.5 Silberfärbung von Proteingelen

Proteine, deren Menge zwischen 0,5 μg und 50 ng liegt, werden in Proteingelen mit der Silberfärbung nachgewiesen. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für 20 min bei RT in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,05% (v/v) Formaldehyd) geschüttelt. Anschließend wird dreimal für 5 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Dann wird 1 min in 0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ unter leichtem Schwenken inkubiert, dreimal 20 sec in aqua bidest gewaschen, 15 min in 0,16% (w/v) Silbernitrat / 0,08% (v/v) Formaldehyd inkubiert und erneut dreimal 20 sec mit aqua bidest gewaschen. Die Färbung erfolgt nach Sichtkontrolle in 5% (w/v) Natriumcarbonat / 0,0005% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / 0,05% Formaldehyd für 1-5 min. Das Gel wird zügig in Fixierlösung überführt, wodurch die Färbereaktion gestoppt wird. Nach 20-minütiger Inkubation in der Fixierlösung wird das Gel bis zum Trocknen in Wasser gelagert.

2.2.6.6 Western-Blot

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wird in Anlehnung an Towbin et al. (1979) im Tank-Blot-Verfahren mit Blotapparaturen der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrocellulosemembran (Protran[®] Nitrocellulose Transfer Membran; Schleicher & Schuell, Deutschland) zur Anode zeigt. Der Transfer wird bei 4 °C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 1 h in Transferpuffer (25 mM Tris / 160 mM Glycin / 10% (v/v) Ethanol) durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers werden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau-Rot S / 3% (v/v) Trichloressigsäure / 3% (w/v) Sulfosalicylsäure) angefärbt. Dazu wird die Membran etwa 1 min in die Färbelösung getaucht und dann mit 1% (v/v) Essigsäure solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Bei Verwendung des „Standard Mixture for High Molecular Weights 30000-200000“-Markers werden die Markerbanden auf der Membran markiert. Anschließend wird die Membran durch

zweimaliges Waschen in PBS (11 mM Na₂HPO₄ / 0,7 mM NaH₂PO₄ / 140 mM NaCl) mit 0,1% (v/v) Tween-20 (PBS-Tween) vollständig entfärbt.

2.2.6.7 Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte immunologisch mit Antikörpern. Dafür wird die Membran zunächst für mindestens 30 min bei RT mit Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween) inkubiert, um unspezifische Bindungstellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran zweimal für je 5 min in PBS-Tween gewaschen und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper wird der Penta-His-Antikörper (Qiagen, Deutschland) oder der H-15 Antikörper (Santa Cruz, USA) 1:2000 in PBS-Tween bzw. das Epimerase-Antiserum 1:500 in Blockierungspuffer verwendet. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS-Tween für 5 min wird die Membran für 2 h mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper Rat-Anti-Mouse und Goat-Anti-Rabbit (Dianova, Deutschland; 1:5000 in PBS-Tween) sind mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, so daß die Blotmembranen mit dem Enhanced-Chemoluminescence-Luminol-System entwickelt werden können. Zuvor wird die Membran noch je zweimal mit PBS-Tween und PBS gewaschen, anschließend mit Whatman-Papier getrocknet und in eine Folie gelegt. Durch Inkubation mit einer frisch hergestellten Mischung aus 10 µl 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO, 1 ml 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 und 3 µl 3% (v/v) H₂O₂ entsteht, katalysiert durch die Peroxidase, eine Chemolumineszenz, deren Signale mit einer LAS-1000-Kamera (Fuji, Japan) für 30 sec bis 1 h aufgenommen werden. Eine Quantifizierung von Proteinbanden wird mit dem Programm Image Gauge V3.4 durchgeführt.

2.2.6.8 UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays

Zum Nachweis der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität werden zum einen der nicht-radioaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay mit anschließendem colorimetrischen Nachweis des entstandenen ManNAc zum anderen der sehr viel empfindlichere radioaktive UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay durchgeführt.

Nichtradioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 1: 100 µl Probe/Wasser werden mit 45 µl 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 45 µl 50 mM MgCl₂ und 2,5 µl 100 mM UDP-GlcNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch 1-minütige Inkubation bei 100 °C gestoppt. Die denaturierten Proteine aus dem Enzymreaktionsansatz werden durch Zentrifugation bei 20000 x g für 1 min pelletiert. Das entstandene ManNAc wird mittels Morgan-Elson-Test (Reissig et

al., 1955), mit dem spezifisch *N*-Acetylhexosamine detektiert werden, nachgewiesen. Nach der Zentrifugation werden 150 μ l des Überstandes mit 30 μ l 0,8 M H_2BO_3 -Puffer, pH 9,1 (mit KOH eingestellt) gemischt und für 3 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend werden 800 μ l Farbreagenz (1% (w/v) 4-Dimethylaminobenzaldehyd / 1,25% (v/v) 10 M HCl in Essigsäure) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wird bei 578 nm gemessen.

Nichtradioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay 2: Für einige zeitabhängige Aktivitätsmessungen wird ein modifizierter UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay verwendet. In diesem Epimerase-Assay 2 werden unterschiedliche Probenvolumina mit 260 μ l 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 10 μ l 100 mM UDP-GlcNAc, 40 μ l frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 20 μ l frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μ l Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehydrogenase (2 U) in einem Gesamtvolumen von 800 μ l gemischt. Die Enzymreaktion wird bei 37 °C im Photometer bei 340 nm verfolgt. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne Enzym gemessen und die ermittelten Werte später von den Werten der Enzymreaktion abgezogen.

Radioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay: Beim radioaktiven Assay werden zusätzlich zu den Komponenten des nichtradioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays 1 12,5 nCi UDP-[^{14}C]-GlcNAc in den Enzymreaktionsansatz gegeben. In der Regel wird die Enzymreaktion für 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend werden 350 μ l Ethanol zugegeben, wodurch die Proteine denaturiert werden, d.h. die Reaktion gestoppt wird. Das entstandene ^{14}C -ManNAc wird durch absteigende Papierchromatographie von UDP-[^{14}C]-GlcNAc abgetrennt. Die Proben werden auf Whatman 3MMChr-Chromatographiestreifen (Herolab, Deutschland) von 2 x 48 cm aufgetragen. Die Chromatographie wird für 16-20 h mit 70% (v/v) 1-Propanol / 100 mM Natriumacetat, pH 5,0 durchgeführt. Die getrockneten Chromatographiestreifen werden anschließend in 2,5 cm lange Stücke geschnitten und die Radioaktivität mit 5 ml Ultima Gold XR (Packard, Niederlande) in einem Tri-Carb 1900 CA Flüssigszintillationszähler (Packard, Niederlande) bestimmt. Der R_f -Wert für UDP-GlcNAc und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,08 bzw. 0,55.

2.2.6.9 ManNAc-Kinase-Assays

Zum Nachweis der ManNAc-Kinase-Aktivität wird zum einen ein nicht radioaktiver ManNAc-Kinase-Assay, zum anderen der sehr viel empfindlichere radioaktive ManNAc-Kinase-Assay durchgeführt.

Nichtradioaktiver ManNAc-Kinase-Assay 1: 80 μl Probe/Wasser werden mit 65 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 20 μl 100 mM ATP, pH 7,5, 10 μl 100 mM ManNAc, 10 μl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 10 μl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μl Lactat-Dehydrogenase/Pyruvat-Kinase (2 U) gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei der Phosphorylierung von ManNAc durch die ManNAc-Kinase entsteht ADP. Dieses wird mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvat-Kinase wieder zu ATP und Pyruvat umgesetzt. Die Lactat-Dehydrogenase katalysiert anschließend die Reduktion von Pyruvat zu Lactat unter Verbrauch von NADH. Die Abnahme der NADH-Konzentration führt zu einer Verringerung der Absorption bei 340 nm. Nachdem die Enzymreaktion durch Zugabe von 800 μl 10 mM EDTA, pH 7,5 gestoppt wurde, wird die Extinktion bei 340 nm gegen Wasser gemessen. Als Kontrollen werden Ansätze ohne ManNAc-Kinase gemessen.

Nichtradioaktiver ManNAc-Kinase-Assay 2: Für einige zeitabhängige Aktivitätsmessungen wird ein modifizierter ManNAc-Kinase-Assay verwendet. In diesem Kinase-Assay 2 werden unterschiedliche Probenvolumina mit 260 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 80 μl 100 mM ATP, pH 7,5, 40 μl 100 mM ManNAc, 40 μl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 20 μl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μl Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehydrogenase (2 U) in einem Gesamtvolumen von 800 μl gemischt. Die Enzymreaktion wird bei 37 °C im Photometer bei 340 nm verfolgt. Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne Enzym gemessen und die ermittelten Werte später von den Werten der Enzymreaktion abgezogen.

Radioaktiver ManNAc-Kinase-Assay: Beim radioaktiven ManNAc-Kinase-Assay werden 100 μl Probe/Wasser mit 65 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 40 μl 100 mM ATP, pH 7,5, 10 μl 100 mM ManNAc und 50 nCi ^{14}C -ManNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 350 μl Ethanol gestoppt, indem die Proteine denaturiert werden. Das entstandene ^{14}C -ManNAc-6-phosphat wird, wie unter 2.2.6.8 radioaktiver UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay beschrieben, durch absteigende Papierchromatographie von ^{14}C -ManNAc abgetrennt. Der R_f -Wert für ManNAc-6-phosphat und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,17 bzw. 0,55.

2.2.6.10 UDP-Gal-4-Epimerase-Assay

Die Aktivität der UDP-Gal-4-Epimerase (Sigma, Deutschland) kann in einem einfachen Assay bestimmt werden. Dafür werden verschiedene Proteinmengen in 100 mM Glycin, pH 8,7 / 0,125 mM UDP-Gal / 0,125 mM NAD^+ / 5 mU UDP-Glucose-Dehydrogenase in einem Gesamtvolumen von 800 μl gemischt und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die aus UDP-Gal entstandene UDP-Glc wird von der UDP-Glucose-Dehydrogenase mit NAD^+ zu UDP-Glucuronsäure und NADH umgesetzt. Nachdem die

Enzymreaktion durch 1-minütige Inkubation bei 100 °C gestoppt wurde, wird die Absorption des entstandenen NADH am Photometer bei 340 nm gemessen.

2.2.6.11 β -Gal-Assay

Mit dem β -Gal-Assay wird überexprimierte aktive β -Galactosidase in Zellen nachgewiesen, die durch Transformation DNA mit einem funktionsfähigen *lacZ*-Gen enthalten. Die β -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von β -Galactosiden, z.B. auch des nicht natürlich vorkommenden *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosids (ONPG). Für den Assay werden 30 μ l Probe/Wasser mit 70 μ l *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid-Lösung (4 mg/ml Wasser) und 200 μ l „Cleavage Buffer“ (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 / 10 mM KCl / 1 mM MgSO₄) mit β -Mercaptoethanol (270 μ l auf 100 ml „Cleavage Buffer“) gemischt und für 10-30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Hydrolyse von *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid entsteht das *ortho*-Nitrophenol-Anion, was zu einer gelblichen Verfärbung der Lösung führt. Nach Zugabe von 500 μ l Stop-Lösung (1 M NaCO₃) wird die Absorption bei 420 nm gegen *ortho*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosids und „Cleavage-Buffer“ gemessen.

2.2.6.12 Testen verschiedener inhibitorischer Strukturen

Die inhibitorische Wirkung verschiedener Substanzen wurde sowohl für die UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität als auch für die ManNAc-Kinase-Aktivität untersucht – einige Substanzen wurden auch an der UDP-Gal-4-Epimerase getestet. Für alle Messungen wurden zunächst 100 mM Stocklösungen der zu untersuchenden Substanzen in Wasser hergestellt. Unterschiedliche Mengen dieser Substanzen wurden in die unter 2.2.6.7 bis 2.2.6.9 beschriebenen Enzymassays für die Epimerase- bzw. Kinaseaktivität gegeben. Zeigt die zu untersuchende Substanz inhibitorische Wirkung, so führt dies gegenüber einer Kontrolle zu einer verringerten enzymatischen Aktivität.

2.2.6.13 Bestimmung der oligomeren Strukturen

Die oligomeren Strukturen von überexprimiertem Enzym werden bestimmt, indem nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation 200-600 μ l proteinhaltiger Überstand auf eine Superdex[®]200-Säule HR 10/30 (Pharmacia, Deutschland) aufgetragen werden. Als Laufpuffer dient Gelfiltrationspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl). Die bei einer Flußrate von 0,2 ml/min gesammelten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert und, wie unter 2.2.6.7 bzw. 2.2.6.8 beschrieben, auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und/oder ManNAc-Kinase-Aktivität untersucht. Als Gelfiltrationsstandard dient ein Gemisch (BioRad, Deutschland) aus Proteinen mit unterschiedlichen

Molekularmassen, bestehend aus Thyroglobulin (670 kDa), IgG (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B-12 (1,35 kDa).

2.2.7 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chromatographien an einer FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (Deutschland) durchgeführt. Die Leitfähigkeit und die Absorption bei 280 nm wurden ständig kontrolliert und von einem integrierten Schreiber aufgezeichnet. Alle Puffer wurden filtriert, mit Helium entgast und anschließend mit Argon überschichtet.

2.2.7.1 Glutathion-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kann über eine Glutathion-Sepharose 4B-Säule (Pharmacia, Deutschland) aufgereinigt werden. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation wird auf 0,5 ml Glutathion-Sepharose 4B in Poly-Prep-Chromatography-Columns (BioRad, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,3 / 0,1 mM DTT / 0,1 mM UDP / 140 mM NaCl (Waschpuffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 10 ml Waschpuffer eluiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird anschließend mit 5 ml 10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert. Fraktionen zu je 5 Tropfen werden gesammelt. Die Glutathion-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft.

Nach Elution der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird die Glutathion-Sepharose mit 5 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid in Wasser regeneriert und anschließend mit 10 ml Waschpuffer äquilibriert.

Der GST-Tag von GST-Fusionsproteinen läßt sich durch die Endopeptidase Thrombin abspalten. Nach der Reinigung über die Glutathion-Säule werden 390 μ l der eluierten Fraktionen mit 10 μ l Thrombin Protease (Amersham Pharmacia Biotech, UK) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz über eine Gelfiltrationssäule gegeben, wobei Thrombin Protease (37 kDa), GST-Fusionsprotein (655 kDa für hexameres Fusionsprotein), freies GST (26 kDa) und freie UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (450 kDa) voneinander getrennt werden.

2.2.7.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit N-terminalem His-Tag exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kann über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt werden. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation wird auf 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Deutschland) in Poly-Prep-Chromatography-Columns (BioRad, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 8 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 / 0,1 mM EDTA / 0,1 mM DTT / 0,1 mM UDP / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol (Ni-Waschpuffer) äquilibriert. Nachdem die Säule 1 h bei RT geschwenkt wurde, werden nicht bindende Proteine mit 10 ml Ni-Waschpuffer eluiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird anschließend mit 3 ml 100 mM Imidazol in Ni-Waschpuffer eluiert. Fraktionen zu je 3 Tropfen werden gesammelt. Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft.

Um störende Salze abzutrennen, werden Fraktionen mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität vereinigt und auf eine PD-10-Säule (Pharmacia, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 100 mM NaCl äquilibriert wurde. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird mit 5 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 100 mM NaCl mit der Gravitationskraft eluiert. Fraktionen von je 5 Tropfen werden während der Chromatographie gesammelt.

2.2.7.3 Salminsulfatpräzipitation

Salminsulfat ist ein Polykation, das zur Präzipitation von Biomolekülen eingesetzt werden kann (Green und Huges, 1955). Eine frisch angesetzte Stammlösung von 2% (w/v) Salminsulfat wird mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden unter Rühren auf Eis langsam durch Zutropfen der 2%igen Salminsulfat-Stammlösung auf 0,2% (w/v) Salminsulfat eingestellt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 20000 x g wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP unter Rühren extrahiert. Die Lösung wird für 10 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere chromatographische Auftrennung eingesetzt.

2.2.7.4 MonoQ-Chromatographie

Anzahl und Verteilung geladener Aminosäuren bei einem bestimmten pH-Wert sind für jedes Protein ein Charakteristikum. Bei der Trennung nach Ladung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie treten die Proteine mit der positiv geladenen Säulenmatrix in Wechselwirkung, beispielsweise mit quartären Ammoniumgruppen bei der MonoQ-Säule. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine MonoQ-Säule HR 5/5 (Pharmacia, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (MonoQ-Puffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 20 ml MonoQ-Puffer eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 10 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 30% (v/v) 600 mM NaCl in MonoQ-Puffer und 20 ml eines linearen Gradienten von 30% bis 50% (v/v) 600 mM NaCl in MonoQ-Puffer eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min werden 1 ml-Fractionen gesammelt.

2.2.7.5 Hydroxyapatit-Chromatographie

Ionische Gruppen von Proteinen können mit den Calcium- und Phosphatgruppen der Hydroxyapatit-Säulenmatrix in Wechselwirkung treten, was für eine Proteintrennung ausgenutzt werden kann. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine Hydroxyapatit-Säule (16 mm x 13 cm CHT Ceramic Hydroxyapatite; BioRad, Deutschland) aufgetragen, nachdem der pH-Wert der Proben durch Verdünnen mit 2 Volumina HAP-Puffer (s.u.) und 1/6 Volumen 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 auf etwa pH 7 gesenkt wurde. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (HAP-Puffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 30 ml HAP-Puffer eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 15 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 10% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in HAP-Puffer, isokratisch für 10 ml gefolgt von 85 ml eines linearen Gradienten bis 40% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in HAP-Puffer eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min werden 2 ml-Fractionen gesammelt.

2.2.7.6 ATP-Agarose-Chromatographie

Die ATP-Agarose-Säule zeigt eine hohe Affinität zu ATP-bindenden Proteinen. Die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine ATP-Agarose-Säule (16 mm x 10 cm ATP-Agarose 4B; Sigma, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl (ATP-Puffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 20 ml ATP-Puffer eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 25 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 10 mM ATP, pH 7,5 in ATP-Puffer eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min werden 2 ml-Fraktionen gesammelt.

2.2.7.7 Blue- und Red-Sepharose-Chromatographie

Die Blue-Sepharose-Säule und die Red-Sepharose-Säule haben hohe Affinitäten zu Nukleotid-bindenden Proteinen. Die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine Blue- bzw. Red-Sepharose-Säule (16 mm x 2,5 cm Blue-Sepharose CL-6B; Sigma, Deutschland; 16 mm x 2,5 cm Red-Sepharose CL-6B; Pharmacia, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl (Blue/Red-Puffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 20 ml Blue/Red-Puffer eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 25 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 10 mM ATP, pH 7,5 in Blue/Red-Puffer eluiert. Alternativ können die gebundenen Proteine auch mit 25 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 3 M NaCl in Blue/Red-Puffer eluiert werden. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min werden 2 ml-Fraktionen gesammelt.

2.2.7.8 Phenylsepharose-Chromatographie

Anzahl, Größe und Verteilung hydrophober Regionen sind für jedes Protein Charakteristika, die für ihre Trennung ausgenutzt werden können. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine Phenylsepharose-Säule (16 mm x 13 cm Phenyl Sepharose High Performance; Pharmacia, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (Phenylsepharose-Puffer) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 50 ml Phenylsepharose-Puffer eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 60 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 70% (v/v)

Ethylenglycol in Phenylsepharose-Puffer eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 2 ml/min werden 8 ml-Fraktionen gesammelt.

2.2.7.9 Gelfiltration

Mit der Gelfiltration können Proteine nach ihren Größen aufgetrennt werden. Eine solche Trennung erfolgte über eine Superdex[®]200-Säule HR 10/30 (Pharmacia, Deutschland) oder bei größeren Probenvolumina über eine 16 mm x 30 cm Sephacryl[™]S-300-Säule (Pharmacia, Deutschland). Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die vereinigten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf die entsprechende Säule aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit Gelfiltrationspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl / 0,1 mM UDP) äquilibriert. Die Proteine werden mit 30 ml bzw. 90 ml Gelfiltrationspuffer bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Fraktionen von je 0,5 ml bzw. 1 ml werden während der Chromatographie gesammelt.

2.2.7.10 Analyse der erhaltenen Fraktionen

Die erhaltenen Fraktionen werden, wie unter 2.2.6.8 und 2.2.6.9 beschrieben, auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität und ManNAc-Kinase-Aktivität untersucht. Der Proteingehalt der Fraktionen wird, wie unter 2.2.6.1 beschrieben, mittels Bradford-Assay bestimmt. Fraktionen mit Enzymaktivitäten werden durch SDS-PAGE (2.2.6.2) auf Reinheit überprüft.

Aus dem Verhältnis von ermittelter Enzymaktivität zu ermittelter Proteinmenge ergibt sich die spezifische Enzymaktivität, wobei 1 Unit UDP-GlcNAc-2-Epimerase 1 μ mol ManNAc pro Minute synthetisiert bzw. 1 Unit ManNAc-Kinase 1 μ mol ManNAc-6-Phosphat pro Minute. Homogene UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase hat eine spezifische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität von 6000 mU/mg. Daraus läßt sich für partiell gereinigtes Enzym bzw. das Cytosol die Menge an UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ermitteln.

2.2.8 Chemische Synthese von UDP-GlcNAc-Derivaten

Die selektive Oxidation von UDP-GlcNAc-Derivaten an den *cis*-ständigen Hydroxylgruppen der Ribose erfolgt in Anlehnung an Prehm (1985).

2.2.8.1 Synthese von oxidiertem UDP-GlcNAc

Oxidiertes UDP-GlcNAc (o-UDP-GlcNAc) wird durch die Oxidation von UDP-GlcNAc mit 1 Äquivalent Natriummetaperiodat synthetisiert. Dafür werden 100 mg (154 μ mol) UDP- α -D-N-Acetylglucosamin in 1 ml 40 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 gelöst. Nach Zugabe von einem Äquivalent Natriummetaperiodat wird der Reaktionsansatz bei 0 °C für 1 h gerührt. Durch Zugabe von 10 μ l Glycerol wird die Reaktion gestoppt und der Reaktionsansatz über eine Bio-Gel P2 Säule (16 mm x 15 cm Bio-Gel P2; BioRad, Deutschland) entsalzt, wobei Wasser als Eluent dient. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer eingengt und flash-chromatographisch mit Ethylacetat / Methanol / Wasser 3:2:1 über eine Kieselgelsäule gereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, Fraktionen mit dem Produkt o-UDP-GlcNAc vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum erhält man 85,7 mg (132 μ mol, 86%) eines weißen Feststoffs.

In wässriger Lösung bildet der Dialdehyd o-UDP-GlcNAc Hydrate, so daß vier verschiedene Verbindungen entstehen. Deshalb ist eine genaue Zuordnung der NMR-Signale schwierig.

DC (Ethylacetat / Methanol / Wasser 3:2:1): $R_f = 0,32$

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 2,09 (s, 3H, Ac), 3,50-4,02 (m, 9H, H-4', H-5'a, H-5'b, 6 H Glc), 5,18-5,68 (m, 2H, H-2', H-3'), 5,88-6,01 (m, 2H, H-1', H-5), 7,83-7,95 (m, 1H, H-6)

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ (ppm) = -10,6 (mc, 1P, α P), -12,4 (d, 1P, $J = 17$ Hz, β P)

MALDI-MS: (Matrix: DHB, Postiv Mode) $[M + H^+] = 650,7$

Elementaranalyse: C₁₇H₂₃N₃O₁₇P₂Na₂·4 H₂O (721,31):

Berechnet: N: 5,82; C: 28,31; H: 4,33

Gefunden: N: 5,69; C: 28,62; H: 4,64

2.2.8.2 Synthese von oxidiertem Uridin

Oxidiertes Uridin (o-Uridin) wird durch die Oxidation von Uridin mit 1 Äquivalent Natriummetaperiodat synthetisiert. Dafür werden 100 mg (410 μ mol) Uridin in 1 ml 40 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 gelöst. Nach Zugabe von einem Äquivalent Natriummetaperiodat wird der Reaktionsansatz bei RT für 2 h gerührt. Der Ansatz wird flash-chromatographisch mit Ethylacetat / Methanol 10:1 über eine Kieselgelsäule gereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, Fraktionen mit dem Produkt o-Uridin vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum erhält man 56 mg (231 μ mol, 56%) eines gelblichen Öls.

In wässriger Lösung bildet der Dialdehyd o-Uridin Hydrate, so daß vier verschiedene Verbindungen entstehen. Deshalb ist eine genaue Zuordnung der NMR-Signale schwierig.

DC (Ethylacetat / Methanol 10:1): $R_f = 0,27$

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, D_2O): δ (ppm) = 3,40-4,07 (m, 3H, H-4', H-5'a, H-5'b), 4,90-5,80 (m, 4H, H-5, H-1', H-2', H-3'), 7,58-7,82 (m, 1H, H-6)

MALDI-MS: (Matrix: DHB, Postiv Mode) $[\text{M}+\text{H}^+] = 243,8$

2.2.8.3 Synthese von oxidiertem Methylribosid

Oxidiertes Methylribosid (o-Methylribosid) wird durch die Oxidation von Methyl- β -D-ribofuranosid mit 1 Äquivalent Natriummetaperiodat synthetisiert. Dafür werden 50 mg (306 μmol) Methyl- β -D-ribofuranosid in 1 ml 40 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8 gelöst. Nach Zugabe von einem Äquivalent Natriummetaperiodat wird der Reaktionsansatz bei RT für 2 h gerührt. Der Ansatz wird flash-chromatographisch mit Ethylacetat über eine Kieselgelsäule gereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, Fraktionen mit dem Produkt o-Methylribosid vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum erhält man 24 mg (148 μmol , 49%) eines weißen kristallinen Feststoffes.

In wässriger Lösung bildet der Dialdehyd o-Methylribosid Hydrate, so daß vier verschiedene Verbindungen entstehen. Deshalb ist eine genaue Zuordnung der NMR-Signale schwierig.

DC (Ethylacetat): $R_f = 0,25$

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, D_2O): δ (ppm) = 3,32 (s., 3H, Me), 3,38-4,01 (m, 3H, H-4, H-5a, H-5b), 4,27-5,05 (m, 3H, H-1, H-2, H-3)

MALDI-MS: (Matrix: DHB, Postiv Mode) $[\text{M}+\text{Na}^+] = 184,7$

2.2.8.4 Synthese von reduziertem o-UDP-GlcNAc

Reduziertes UDP-GlcNAc (r-UDP-GlcNAc) wird durch die Reduktion von o-UDP-GlcNAc mit Natriumborhydrid synthetisiert. Dafür werden 25 mg (40 μmol) o-UDP-GlcNAc in 1,5 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 400 mg (10,6 mmol) Natriumborhydrid wird die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie wird der vollständige Umsatz überprüft. Der Reaktionsansatz wird über eine Bio-Gel P2 Säule (Pharmacia, Deutschland) entsalzt, wobei Wasser als Eluent dient. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer eingeengt und flash-chromatographisch mit Ethylacetat / Methanol / Wasser 3:2:1 über eine Kieselgelsäule gereinigt. Die gesammelten Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, Fraktionen mit dem Produkt r-UDP-GlcNAc

vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum erhält man 8,5 mg (13 μ mol, 33%) eines weißen Feststoffs.

DC (Ethylacetat / Methanol / Wasser 3:2:1): $R_f = 0,20$

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, D_2O): δ (ppm) = 1,9 (s, 3H, Ac), 3,32-3,88 (m, 13H), 5,34 (dd, 1H, $J_{1'',2''} = 3$ Hz, $J_{1'',\text{P}} = 7$ Hz, H-1''), 5,76-5,81 (m, 2H, H-1', H-5), 7,71 (d, 1H, $J_{5,6} = 8$ Hz, H-6)

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, D_2O): δ (ppm) = -10,2 (d, 1P, $J = 21$ Hz, αP), -12,0 (d, 1P, $J = 17$ Hz, βP)

2.2.9 NMR-Untersuchungen der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase

2.2.9.1 Proteinreinigung für NMR-Untersuchungen

Die rekombinant mit N-terminalem His-Tag exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation wird auf 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Deutschland) in Poly-Prep-Chromatography-Columns (BioRad, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 8 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol (Ni-Waschpuffer) äquilibriert. Nachdem die Säule 1 h bei RT geschüttelt wurde, werden nicht bindende Proteine mit 8 ml Ni-Waschpuffer und 4 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH* 8,0 / 300 mM NaCl / 20 mM d_4 -Imidazol in D_2O (Ni-Waschpuffer II) eluiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird anschließend mit 3 ml 100 mM Imidazol in Ni-Waschpuffer II eluiert. Fraktionen zu je 3 Tropfen werden gesammelt. Die Ni-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft.

Um das Imidazol abzutrennen, werden Fraktionen mit UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität vereinigt und auf eine PD-10-Säule (Pharmacia, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH* 7,5 / 100 mM NaCl in D_2O bzw. 50 mM d_{12} -Tris-HCl, pH* 7,5 / 60 mM NaCl in D_2O äquilibriert wurde. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird mit 5 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH* 7,5 / 100 mM NaCl in D_2O bzw. 5 ml 50 mM d_{12} -Tris-HCl, pH* 7,5 / 60 mM NaCl in D_2O mit der Gravitationskraft eluiert. Fraktionen von je 5 Tropfen werden während der Chromatographie gesammelt.

2.2.9.1 STD-NMR-Messungen

NMR-Messungen werden in einem 5 mm Norell 502 NMR-Tube mit einem Probenvolumen von 600 μl durchgeführt. Die Proteinkonzentration beträgt jeweils zwischen 9 und 20 μM während die Ligandenkonzentration zwischen 0,2 und 4 mM liegt. Um den Einfluß von Mg^{2+} zu untersuchen, wird Proben in d_{12} -Tris-Puffer MgCl_2 mit einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben. Die STD-NMR- und die Referenz-Experimente werden mit der in Abbildung 2.1 dargestellten Pulsfrequenz durchgeführt. Alle Spektren werden bei 278 K an einem 12,1 T (für ^1H 500,35 MHz) Bruker DRX Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mm TXI HCN z-Achsen Gradient Probenkopf, aufgenommen. STD-NMR- und Referenz-Experimente werden bei einer Sättigungszeit von 2 sec mit einer Off-Resonanz-Frequenz von -20 ppm und einer On-Resonanz-Frequenz von -1 ppm durchgeführt. Die Sättigung wird durch 40 49 msec Gauß-Pulse (1000 Punkte mit 1% Abnahme), jeweils mit einer Feldstärke von 86 Hz und durch einen Delay δ von 1 msec getrennt, erreicht. Proteinsignale werden mit einem 15 msec $T_{1\rho}$ -Relaxationsfilter mit einer Feldstärke von 8,7 kHz unterdrückt. STD-Spektren werden mit 4096 und Referenz-Spektren mit 2048 Scans aufgenommen.

Kinetische Analysen werden unter den gleichen Bedingungen wie die STD-NMR-Experimente durchgeführt, nur daß die 1D-Experimente mit 128 Scans durchgeführt werden. Die resultierenden Spektren werden anschließend mit der „matNMR 2.7 toolbox“ (van Beek, 2002) für MatLab analysiert.

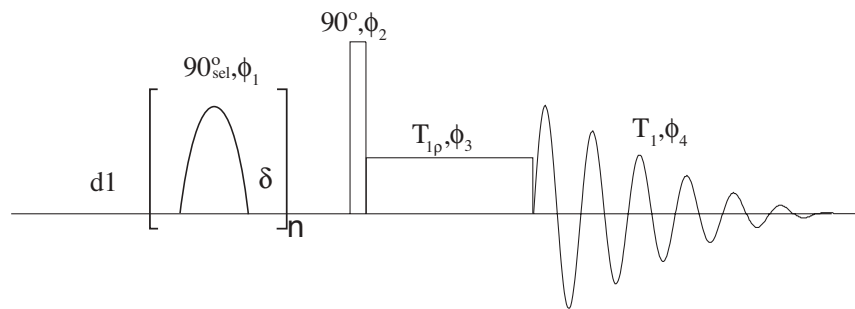


Abbildung 2.1: Pulssequenz für STD-NMR-Experimente.

Die Proteinsättigung wird durch selektive Pulse mit der Phase $\phi_1=x$, die durch den Delay δ getrennt sind, erreicht. Der anschließende starke 90° Puls bringt die Magnetisierung des Liganden in xy-Ebene. Vor der Detektion folgt diesem Puls ein $T_{1\rho}$ Relaxationsfilter, der orthogonal zum Detektionspuls einwirkt. Anschließend erfolgt die Detektion. Die Differenzbildung erfolgt über den Phasenzyklus nach jedem Scan. Die On- und Off-Resonanz-Frequenzen liegen bei -1 ppm und -20 ppm. Für die STD-Spektren sind die Pulsphasen $\phi_2=2x,4-x,2x,2y,4-y,2y$; $\phi_3=2y,4-y,2y,2x,4-x,2x$ & $\phi_4=x,2-x,x,-x,2x,-x,y,2-y,y,-y,2y,-y$ und für die Referenz-Spektren $\phi_4=2x,4-x,2x,2y,4-y,2y$. d1 ist ein zusätzlicher Relaxations-Delay, damit die Probe zwischen den Pulsen wieder in den Gleichgewichtszustand zurückkehren kann.

