

3 METHODEN

3.1 DNA-Techniken

3.1.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab erfolgte nach der Methode von Holmes & Quigley (1981). Der *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Kap. 2.7) wurde angewendet, wenn die DNA anschließend sequenziert werden sollte. Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab mit dem *Plasmid Maxi Kit* (Kap. 2.7) isoliert. Einzelsträngige M13-DNA wurde aus Phagen, die mit PEG 6.000 gefällt wurden, nach der Methode von Messing (1983) erhalten. DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen bzw. aus Polyacrylamidgelen mit Hilfe des *QIAEXII Gel Extraction Kit* (Kap. 2.7) gewonnen. Standardverfahren, wie Phenolextraktion zur Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen, DNA-Fällung mit Ethanol oder Isopropanol und DNA-Quantifizierungsmethoden wurden entsprechend den Anleitungen von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

3.1.2 Allgemeine *in vitro*-Rekombinationstechniken

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Abschnitte für die *in vitro*-Rekombination zu gewinnen, wurde in einigen Fällen PCR zur Amplifizierung des gewünschten Fragmentes angewandt (Mullis & Faloona, 1987; Innis *et al.*, 1990). Dazu wurde die thermostabile Deep-Vent[®] DNA-Polymerase (Jannasch *et al.*, 1992) (NEB) eingesetzt. Ein 100 µl-Reaktionsansatz enthielt 0,05 bis 0,1 µg *template*-DNA, 20-50 pmol je Primer, 0,2 mM je dNTP und 2 Einheiten Polymerase.

Tabelle 3.1 Temperaturprogramm der PCR

Teilschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	1	95	1 ¹⁾
Denaturierung	1	95	30
Primeranlagerung	1	X ²⁾	
Primerverlängerung	Y ³⁾	75	
Primerverlängerung	10	75	1

¹⁾ vor Hinzugabe der Polymerase

²⁾ Die Temperatur wurde der Schmelztemperatur des verwendeten Primers angepaßt

³⁾ 1 min/1 kb *template*

Die Reaktionsprodukte wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel mit dem *QIAEXII Gel Extraction Kit* (Kap. 2.7) eluiert und zur Ligation eingesetzt.

(1) Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Fragmente definierter Länge wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erzeugt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

(2) Erzeugung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden

Die Umwandlung überstehender in glatte Enden erfolgte durch Behandlung des DNA-Fragmentes mit T4-DNA-Polymerase (NEB). Da das Enzym neben der 5'-3'-Polymerase-Aktivität auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, werden überstehende 3'-Enden abgebaut und überstehende 5'-Enden aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem 20 µl-Ansatz mit 2,5 Einheiten Polymerase je 1-5 pmol kohäsiver Enden für 30 min bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen inaktiviert (10 min, 75°C). Die DNA wurde nach Ethanolfällung in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (Kap. 2.6) resuspendiert.

(3) 5'-Dephosphorylierung von Restriktionsfragmenten

Zur Verhinderung einer möglichen Rezirkularisierung von linearisierter Vektor-DNA wurde diese mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) behandelt. Für die Dephosphorylierung von 10 pmol 5'-Enden wurden diese mit 1,5 Einheiten SAP für 60 min bei 37°C in T4-Ligasepuffer (NEB) inkubiert. Es erfolgte eine anschließende Inaktivierung der SAP bei 65°C für 20 min. Die so erhaltene DNA wurde direkt für die Ligation eingesetzt.

(4) Phosphorylierung von Restriktionsfragmenten

Zur radioaktiven Markierung von Restriktionsfragmenten wurden 10 pmol 5'-Enden mit 10 Einheiten T₄-Ligase (NEB) und 20 µCi (6,6 pmol) [γ -³²P] ATP in T₄-Ligasepuffer (NEB) bei 37°C für 45 min behandelt. Die anschließende Inkubation bei 65°C für 35 min diente zur Inaktivierung des Enzyms.

(5) Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (NEB) eingesetzt. Der 20 µl-Ansatz enthielt T4-Ligasepuffer (NEB), 0,5-1,0 pmol Fragment-DNA, 0,1-0,2 pmol Vektor-DNA und 400 Einheiten T4-DNA-Ligase. Die Linker wurden in einem 50-fachen molaren Überschuß, bezogen auf die Menge an DNA-Fragment, eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 16°C über Nacht (ca. 16 h) inkubiert und die Reaktionsprodukte direkt zur Transformation von Bakterienzellen eingesetzt. Die dazu notwendigen kompetenten Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode von Mandel & Higa (1970) hergestellt.

3.1.3 Herstellung einer *trbB-in frame*-Deletionsmutante

Das Plasmid pDB126 (Kap. 2.1) wurde mit *EcoRI* und *NdeI* verdaut. Anschließend wurde das daraus resultierende 1130 bp-Fragment mit *BsrI* inkubiert. Die Ligation des 22,6 kb-Fragmentes von pDB126 mit dem 171 bp-Fragment aus dem *BsrI*-Verdau und einem Linker (Kap. 2.5) ergab das Plasmid pSK126. Die korrekte Aneinanderfügung der Fragmente wurde durch Sequenzierung bestätigt.

3.1.4 Erzeugung von *trbB*-Punktmutationen

Punktmutationen in *trbB* wurden mit Hilfe des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* (Kap. 2.7; Kunkel, 1985) nach den Angaben des Herstellers erzeugt. Für jede Punktmutation in *trbB* wurden je zwei Primer konzipiert, welche die gewünschte Mutation enthielten (Kap. 2.5) und zu je einem DNA-Strang der *trbB*-wt-Sequenz komplementär waren. Mit diesen Primern wurde eine PCR durchgeführt, wobei pMS54 als *template* diente. Es wurde *Pfu*-Polymerase verwendet, da sie eine sehr effiziente *proof-reading*-Aktivität besitzt. Die so erzeugte Plasmid-DNA enthielt die gewünschte Mutation. Da im Reaktionsansatz nur die wt-DNA methyliert war, wurde diese durch Zugabe von *DpnI* verdaut.

Tabelle 3.2 Temperaturprogramm der PCR

Teilschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	60	95	1 ¹⁾
Denaturierung	30	95	
Primeranlagerung	30	58	16
Primerverlängerung	30	68	
Primerverlängerung	600	68	1

¹⁾ vor Hinzugabe der *Pfu*-Polymerase

E. coli SCS1 wurde mit der mutierten DNA transformiert. Die Einführung der Mutation wurde mittels DNA-Sequenzierung des mutierten *trbB*-Strukturgens verifiziert.

Um sicherzustellen, daß der Vektoranteil einheitlich ist, wurde das mutierte Strukturgen mit *KpnI* und *HindIII* ausgeschnitten und in den Originalvektor pMS470Δ8 subkloniert. Die so entstandenen Plasmide wurden pMS54K161A, pMS54D186A und pMS54R217T genannt.

3.1.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Serviceabteilung des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik nach dem Prinzip von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt.

3.1.6 Herstellung von ³²P-markierten ds-DNA-Fragmenten

Das mit *BamHI* und *EcoRI* verdaute Plasmid pJF143 (Kap. 2.1) wurde dephosphoryliert (Kap. 3.1.2) und anschließend mit Hilfe von [γ -³²P] ATP wieder phosphoryliert (Kap. 3.1.2).

3.2 Konjugation

Zur Bestimmung von Transferfrequenzen wurden Filterkreuzungen (*filtermatings*) durchgeführt. Da RP4 für die Konjugation einen halbfesten Untergrund braucht, wurde durch Filtration das Medium von den Zellen getrennt, um die auf dem Filter befindlichen Zellen auf einen halbfesten Nährboden aufbringen zu können. Bei einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml (Donorstamm) bzw. 1×10^8 Zellen/ml (Rezipientenstamm) wurden 5 ml der Rezipienten-zellkultur und 0,5 ml der Donorzellkultur gemischt, auf eine sterile Nitrozellulosemembran ($0,45 \mu\text{m}$ Porengröße; $\varnothing = 25 \text{ mm}$) filtriert und mit 0,7 ml 10 mM MgSO_4 gewaschen. Die Membran wurde, mit der Bakterenschicht nach oben gerichtet, auf eine YT-Mediumplatte ohne Antibiotikum gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden die Zellen in 5,5 ml 10 mM MgSO_4 resuspendiert und in geeigneten Verdünnungsstufen auf Selektiv-medium ausplattiert. Die Transferfrequenz ergab sich aus dem Verhältnis von Transkonjuganten- zu Donorzellen.

3.3 Elektrophoresetechniken

3.3.1 Elektrophoresetechniken zur Auftrennung von DNA

Zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden horizontale Minigelapparaturen verwendet (Kopchick *et al.*, 1981). Die Auftrennung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7%igen ($>1,0 \text{ kb}$) bzw. 1,2%igen ($0,3 - 1,0 \text{ kb}$) Agarosegelen. Kleinere Fragmente ($>0,3 \text{ kb}$) wurden in 7,5%igen Polyacrylamidgelelen in einer vertikalen Apparatur aufgetrennt. Für den Fragmentretentionstest wurden 3,5%ige Polyacrylamidgele verwendet.

	<u>7,5%iges Gel:</u>	<u>3,5%iges Gel:</u>
Acrylamid [% (w/v)]	7,5	3,5
Bisacrylamid [% (w/v)]	0,375	0,175
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ [% (w/v)]	0,105	0,105
TEMED [% (v/v)]	0,105	0,105

Das Acrylamid und Bisacrylamid wurden in TAE-Puffer (Kap. 2.6) verdünnt und vor der Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ und TEMED entgast.

Als Elektrophoresepuffer diente für horizontale Gele TBE-, für vertikale Gele TAE-Puffer (Kap. 2.6). Die Proben enthielten zu einem Drittel Probenpuffer [20% (w/v) Ficoll-400; 1% (w/v) SDS; 0,3% (w/v) Bromphenolblau in TBE-Puffer (Kap. 2.6)]. Die Elektrophorese wurde bei 6 - 10 V/cm durchgeführt. Anschließend wurden die Gele zum Anfärben der DNA in Ethidiumbromid-Lösung [2,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in TBE-Puffer (Kap. 2.6)] geschüttelt und unter UV-Licht (254 nm) fotografiert (Polaroid 667, Rotfilter 090).

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht in vertikalen, diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen nach der Methode von Lämmli (1970) aufgetrennt. Für Proteine betrug die Acrylamidkonzentration im Trenngel 15%(w/v) (>14 kDa) bzw. 17,5%(w/v) (<14 kDa), für chemisch vernetzte Proteine 10%(w/v). Für alle Gelsysteme war die Zusammensetzung des Sammelgels einheitlich. Im einzelnen hatten die Gele folgende Zusammensetzung:

	<u>15%(w/v)iges</u> <u>Trenngel:</u>	<u>17,5%(w/v)iges</u> <u>Trenngel</u>	<u>10%(w/v)iges</u> <u>Trenngel:</u>	<u>Sammel-</u> <u>gel:</u>
Acrylamid [% (w/v)]	15,0	17,5	10,0	5
Bisacrylamid [% (w/v)]	0,087	0,2	0,058	0,13
SDS [% (w/v)]	0,1	0,1	0,1	0,1
Tris-HCl, pH8,7 [M]	0,375	0,375	0,375	–
Tris-HCl, pH6,8 [M]	–	–	–	0,125
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ [% (w/v)]	0,03	0,03	0,03	0,05
TEMED [% (v/v)]	0,03	0,03	0,03	0,05

Die Gellösungen wurden vor Zugabe von SDS, (NH₄)₂S₂O₈ und TEMED entgast.

Der Elektrophoresepuffer enthielt 25 mM Tris-Base; 0,19 M Glycin; 0,1%(w/v) SDS. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer von NEB und 50 mM DTT (Endkonzentration) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde zum Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 100 V und anschließend bei 200 V durchgeführt. Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele für 5 min in Fixierlösung [20%(v/v) Methanol; 7%(v/v) Essigsäure] geschüttelt und nachfolgend 10-20 min in 0,25%(w/v) Coomassie Blue R250 in 50%(v/v) Methanol; 7%(v/v) Essigsäure gefärbt. Das Entfärben erfolgte über einen Zeitraum von mehreren Stunden in Fixierlösung. Die gefärbten Proteine wurden mit dem *Personal Densitometer* und dem Computerprogramm ImageQuANT von Molecular Dynamics abgebildet und ausgewertet.

3.4 Proteinanalyse

3.4.1 Proteinüberproduktion durch induzierte Genexpression

Eine Übernachtskultur, die das entsprechende Expressionsplasmid enthielt, wurde verdünnt und bei einer Zelldichte von $A_{600} = 0,5 - 0,6$ erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) für 4 h bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend geerntet und entweder zu analytischen Zwecken lysiert (Kap. 3.4.2) oder zur Aufbewahrung bei -70°C in 5 ml/g Zellnaßgewicht Spermidinmix [20 mM Spermidin; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA] aufgenommen und mit flüssigen Stickstoff schockgefroren.

3.4.2 Denaturierender analytischer Zellaufschluß

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen einer Bakterienkultur (5 ml) wurden in 150 µl/1 A₆₀₀ SDS-Lysemix [0,1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 M NaCl; 5%(w/v) SDS; 1 M Mercaptoethanol; 15%(w/v) Glycerin] suspendiert, 5 min bei 60°C und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Zentrifugation des Lysat (30.000 rpm/60 min/4°C/50 Ti-Rotor (Beckman)) wurden die im Überstand gelösten Proteine gelelektrophoretisch analysiert.

3.4.3 Nativer analytischer Zellaufschluß

Ein nativer Zellaufschluß wurde durchgeführt, um festzustellen, unter welchen Bedingungen ein Protein löslich ist. Als Lösungsvermittler wurden Brij-58 und Brij-58/NaCl in Kombination mit physikalischem Zellaufschluß durch Gefrieren (mit Hilfe von Trockeneis/Ethanol) und Auftauen verbunden mit einem enzymatischen Zellaufschluß durch Lysozym getestet.

5 ml Zellkultur wurden abzentrifugiert und mit 100 µl/1 A₆₀₀ eiskaltem Lysemix [50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 5%(w/v) Saccharose; 10 mM Spermidin; 100 mM NaCl; 2 mg/ml Lysozym; 1 mM EDTA] versetzt. Nach dreimaligem Gefrieren und Auftauen erfolgte die Zugabe von 0,25%(w/v) Brij-58 (Endkonzentration) bzw. 0,25%(w/v) Brij-58 (Endkonzentration) und 1 M NaCl (Endkonzentration) und erneutes dreimaliges Gefrieren und Auftauen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (30.000 rpm/60 min /4°C/50 Ti-Rotor (Beckman)) und der Überstand aufgehoben. Das Pellet wurde in 400 µl Harnstoffmix [20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 M NaCl; 6 M Harnstoff] resuspendiert und erneut zentrifugiert (30.000 rpm/60 min/4°C/50 Ti-Rotor (Beckman)). Der Überstand wurde aufgehoben und das Pellet einer SDS-Lyse (Kap. 3.4.2) unterzogen. Die Überstände wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

3.4.4 Proteinreinigung

(1) Nativer, präparativer Zellaufschluß

Zu den, in Spermidinmix aufgenommenen, Zellen (Kap. 3.4.1) wurden 2 Volumina Brij-Lysemix [100 mM Tris-HCl, pH 7,6; 40 mM NaCl; 8%(w/v) Saccharose; 0,1 mg/ml Lysozym; 0,15%(w/v) Brij-58] gegeben, 90 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zentrifugiert (30.000 rpm/60 min/4°C/45 Ti-Rotor (Beckman)). Der Überstand wurde aufgehoben. Das Pellet wurde in Brij-Lysemix, der 0,25%(w/v) Brij (Endkonzentration) und 1 M NaCl (Endkonzentration) enthielt, resuspendiert und zentrifugiert (30.000 rpm/60 min/4°C/45 Ti-Rotor (Beckman)). Die Überstände wurden vereint und stellten das Ausgangsmaterial für die Reinigung dar.

(2) Denaturierende Proteinextraktion mit Harnstoff

Einige unter nativen Bedingungen unlösliche Proteine konnten mittels Harnstoff in Lösung gebracht werden. Es wurde eine zweimalige Resuspendierung des Brij-Lysozym-Sedimentes (siehe oben) in Harnstoffmix [6 M Harnstoff; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7,6] durchgeführt. Die durch Zentrifugation (30.000 rpm/60 min/4°C/45 Ti-Rotor (Beckman)) erhaltenen Überstände wurden vereinigt und das enthaltene Protein mittels Dialyse

gegen R-Puffer (Kap. 2.6) renaturiert, um es weiteren Reinigungsschritten unterziehen zu können.

(3) Säulenchromatographie

Die Vorbereitung der Säulenmaterialien erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Säulenmatrices wurden vor Gebrauch in dem Puffer equilibriert, in dem sich die aufzutragende Proteinfraktion befand. Die Chromatographien wurden bei einer Flußrate von 1-2 Bettvolumina/h und 2°C durchgeführt. Säulenauftrag und Eluat wurden gelelektrophoretisch analysiert.

3.4.5 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde nach Lowry *et al.* (1951) durchgeführt.

3.4.6 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran

Für den immunologischen Nachweis bzw. für die N-terminale Mikrosequenzierung wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese auf Trägermembranen aus Nitrozellulose bzw. PVDF elektrophoretisch übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,19 M Glycin und 20%(v/v) Methanol. Da Glycin bei der N-terminalen Sequenzierung stört, wurde 25 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0,5 mM DTE und 0,02%(w/v) SDS als Transferpuffer verwendet. Der Transfer von TrbB erfolgte bei 50 V für 90 min und von TraG bei 50 V für 180 min.

3.4.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (SOPHIA)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen mit polyklonalen Antikörpern wurde der *solid-phase-immuno-assay* (SOPHIA) eingesetzt. Die proteinbeladene Nitrocellulose-membran (Kap. 3.4.6) wurde zuerst zur unspezifischen Absättigung mit BSA-Puffer [3%(w/v) BSA; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl] 1 h inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit Waschpuffer [10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl] wurde diese im Gefrierbeutel eingeschweißt und 2 h mit 10 ml des in BSA-Puffer verdünnten Antiserums [1:500 (TrbB) bzw. 1:1000 (TraG)] inkubiert. Danach wurde die Membran wiederum mit Waschpuffer behandelt und eingeschweißt, um anschließend für 1 h mit 10 ml der 1:100 in Waschpuffer verdünnten Dichlorotriazinylaminofluorescein-konjugierten Ziege-Anti-IgGs inkubiert zu werden. Nach kurzem Spülen in Waschpuffer konnten Kreuzreaktionen anhand der Fluoreszenz des sekundären Antikörpers mit dem *FluorImager* detektiert und dem Computerprogramm ImageQuANT (Molecular Dynamics) abgebildet und ausgewertet werden.

3.4.8 Protein-Sequenzierung

Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran (Kap. 3.4.6) wurden die Proteine 20 min mit Amidoschwarz [0,1%(w/v) in 50%(v/v) Methanol] gefärbt und die Membran anschließend mit 30%(v/v) Methanol gewaschen. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Edman-Abbaus (Stryer, 1988) in der Servicegruppe des Max-Planck-Institutes für Molekulare Genetik.

3.5 Elektronenmikroskopie

30 - 50 ng/μl gereinigtes Protein (Endkonzentration) wurde für 10 min in TN-Puffer (Kap. 2.6) bzw. in TN-Puffer mit 1 mM ATP und 10 mM MgCl₂ bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Elektronenmikroskopie (Philips CM 100) wurde das Protein mit 1%(w/v) Uranylacetat angefärbt (Steven *et al.*, 1988). Fotos wurden mit Scienta 23D56 Filmen von Agfa bei einer 73.000-fachen Vergrößerung und 100 kV aufgenommen. TrbB wurde direkt vor dem Kontrastieren mit 0,2%(w/v) Glutaraldehyd für 5 min fixiert, wenn die elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Ausgangsmaterial für das *Image processing* verwendet werden sollten.

3.6 Glyceringradientenzentrifugation

Zur Auftrennung der Proteine im nativen Zustand wurden Gradienten mit einem Glycerinanteil von 15-35%(w/v) erstellt. Hierzu wurden je 1,85 ml 15%(w/v) bzw. 35%(w/v) Glycerin in Puffer A [20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 500 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,1%(w/v) Brij-58 und 0,1 mM EDTA] über einen Gradienten-Mischer in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen von Beckman gegossen. Auf den vorgekühlten Gradienten wurden ca. 630 μg Protein (TraG), 372 μg Protein (TraD) bzw. 435 μg Protein (TrbB, HP0525) in 150 μl Puffer A aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 3°C und 47.000 rpm/38 h/SW60 Ti-Rotor (Beckman) (TraG, TraD) bzw. bei 47.000 rpm/15 h/SW60 Ti-Rotor (Beckman) (TrbB, HP0525) unter langsamer Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse. Die Gradienten wurden in je 15 Fraktionen (ca. 250 μl) ausgetropft und gelelektrophoretisch analysiert. Als Kalibrierproteine dienten Ovalbumin, Aldolase und BSA (TraG, TraD) bzw. Katalase, Aldolase und BSA (TrbB, HP0525).

3.7 Bestimmung der NTPase-Aktivität

Als [γ -³²P]-markierte Nukleotide wurden ATP, dATP bzw. GTP in Kombination mit dem entsprechenden nicht-markierten Nukleotid eingesetzt. Der Standardreaktionsansatz (20 μl) für die Untersuchung auf NTPase-Aktivität enthielt:

1,5 μ M Protein
 50 mM Tris-HCl, pH 7,6
 2 mM MgCl₂
 50 mM KCl
 1 mM DTT
 0,05 mg/ml BSA
 200 μ M NTP
 100 nCi [γ -³²P]-NTP

Die Reaktion erfolgte bei 30°C und wurde nach 20 min durch Zugabe von 10 mM EDTA (Endkonzentration) und Abkühlung auf 0°C gestoppt. 2 μ l-Aliquote wurden auf die polyethylenimin-imprägnierten Cellulose-Dünnschichtfolien (Kap. 2.7) aufgetragen und mit 1 M LiCl, 1 M Essigsäure als Laufmittel aufgetrennt. Nach Exponierung eines *Phosphor-Storage-Screens* mit der Dünnschichtfolie erfolgte die Darstellung und Auswertung mit einem *PhosphorImager* und der *ImageQuANT-Software* von Molecular Dynamics. Als Kontrolle diente das P4 α -Protein (5 pmol) mit bekannter ATPase-Aktivität (Ziegelin *et al.*, 1993).

3.8 Fragmentretentionstest zur Analyse von DNA-Protein-Komplexen

Gereinigtes Protein wurde mit geeigneten Mengen an ³²P-markierten dsDNA-Fragmenten (Kap. 3.1.6) bzw. kalter ssDNA (mJF182) in 20 mM Tris-HCl, pH7,6; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,05 mg/ml BSA; 1 mM DTT und 0,05% (w/v) Brij-58 für 30 min bei 37°C inkubiert. Da DNA-Protein-Komplexe eine geringere elektrophoretische Mobilität als die entsprechende freie DNA aufweisen, erfolgte die Analyse auf einem 3,5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (Kap. 3.3.2). Eine Exponierung des *Phosphor-Storage-Screens* mit dem entsprechenden Gel und anschließendem scannen mit dem *PhosphorImager* ermöglichte zusammen mit der *ImageQuANT Software* (Molecular Dynamics) die Abbildung des Gels.

3.9 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen

5 pmol N-terminal His₆-modifiziertes Protein in 100 μ l TNG-Puffer [50 mM Tris, pH 8,0; 100 mM NaCl; 10% (w/v) Glycerin] wurden an 200 μ l Ni-NTA-Superflow (Kap. 2.7) gebunden. Nach dem Waschen mit 1,4 ml TNG-Puffer + 20 mM Imidazol wurden 5 pmol des potentiellen Bindungsproteins in 100 μ l TNG-Puffer + 20 mM Imidazol 30 min auf der Ni-NTA-Säule inkubiert. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit 1,4 ml TNG-Puffer (200 mM NaCl) + 50 mM Imidazol entfernt. Die Elution des Protein-Protein-Komplexes erfolgte mit 700 μ l TNG-Puffer + 250 mM Imidazol, wobei die ersten 100 μ l Elutionspuffer 15 min auf der Säule verblieben. Es wurden 200 μ l-Fraktionen gesammelt und gelelektrophoretisch analysiert. Die Effizienz des zweiten Waschschrittes wurde mit einer zweiten, parallel geführten Säule, an der kein N-terminal His₆-markiertes Protein gebunden wurde, überprüft.