

6 Material und Methoden

6.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* verwendet, die in Tabelle 6-1 aufgeführt sind.

Tabelle 6-1
Übersicht über Name, Genotyp und Referenz der verwendeten *E. coli* Stämme

a) Klonierungszellstämme

| <i>Zellstamm</i> | <i>Genotyp</i> | <i>Referenz</i> |
|--|--|-------------------|
| DH5 α | ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> - <i>m_K</i> +), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 | Life Technologies |
| TOP10 | F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> | Invitrogen |
| XL1 blue | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^R)] | Stratagene |
| Mach1 TM T1 phage-resistant | <i>recA1398</i> , <i>endA1</i> , <i>tonA</i> , 80 <i>lacM15 lacX74</i> , <i>hsdR</i> (<i>r_K</i> - <i>m_K</i> +)) | Invitrogen |

b) Expressionszellstämme

| <i>Zellstamm</i> | <i>Genotyp</i> | <i>Referenz</i> |
|------------------------------|---|-----------------|
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) λ (DE3) | Novagen |
| BL21(DE3) pLysS | F ⁻ <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) λ (DE3) pLysS(Cm ^R) | Novagen |
| Rosetta (DE3) | F ⁻ <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) λ (DE3) pRARE(Cm ^R) | Novagen |
| BL21 Codon ⁺ -RIL | F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) <i>dcm</i> + Tet ^R <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [argZ ileY leuW Cm ^R) | Stratagene |
| ER2566 | F ⁻ Λ ⁻ <i>fhuA2 [lon]ompT lacZ::T7 gebel gal sulA11</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) 114:: IS10 <i>R(mcr-73:: miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10) 1</i> (Tet ^S) <i>endA1 [dcm]</i> | Invitrogen |
| M15 [pREP4] | Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ | Qiagen |

6.1.1 Klonierungszellstämme

Die Stämme *E. coli* DH5 α , TOP10, XL1 blue und Mach1TM wurden zur Klonierung und Plasmidanreicherung eingesetzt. Diese sind restriktions- und rekombinationsnegativ und zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus.

6.1.2 Expressionszellstämme

Die *E. coli*-Stämme BL21 und Rosetta wurden für die Expression rekombinanter Proteine verwendet, da hier die OmpT- und Lon-Proteasen genetisch inaktiviert wurden. Für den Einsatz eines pET-Expressionssystems eignen sich Stämme, die ein λ (DE3)-Lysogen enthalten, das unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors die cDNA für die T7-RNA-Polymerase trägt. Rosetta (DE3) bzw. BL21 Codon⁺ RIL erlaubt die Expression von Genen, die durch seltene Arginincodons AGA, AGG und CGA und dem Glycincodon GGA, Isoleucincodon AUA, Leucincodon CUA und Prolincodon CCC verschlüsselt werden, durch die Bereitstellung der entsprechenden tRNAs. Auf dem Plasmid pLysS ist T7 Lysozym codiert, dessen Expression die Aktivität der T7 RNA Polymerase inhibiert, wodurch die Transkriptionsrate gesenkt wird. Auf dem Plasmid pREP4 ist das Repressorprotein LacI codiert. Dieser Repressor wird durch IPTG vom Promotor verdrängt, so dass erst dann die Proteinexpression möglich ist. Das Plasmid wurde aus *E. coli* M15 isoliert und in den Expressionsstamm BL21 Codon⁺-RIL transformiert, um hier die Regulierbarkeit der Expression zu verbessern.

6.2 Plasmide und Oligonukleotide

Die verwendeten Expressionsvektoren sind in Tabelle 6-2 aufgelistet.

Tabelle 6-2

Übersicht über Name, Resistenz, Eigenschaft und Referenz der verwendeten Plasmide

| <i>Plasmid</i> | <i>Resistenz</i> | <i>Fusions-partner</i> | <i>Position des Fusions-partners</i> | <i>Protease-Spaltstelle</i> | <i>Expressions-ort</i> | <i>Referenz</i> |
|----------------|------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------|
| pET11a | Amp | | | | Cytoplasma | Novagen |
| pET21a | Amp | | | | Cytoplasma | Novagen |
| pET24a | Kan | | | | Cytoplasma | Novagen |
| pET28a | Kan | His6 | N-Terminus | Thrombin | Cytoplasma | Novagen |
| pTwin1 | Amp | Intein | N- und C-Terminus | Intein | Cytoplasma | NEB |
| pTwin2 | Amp | Intein | N- und C-Terminus | Intein | Cytoplasma | NEB |
| pMAL c2X | Amp | MBP | N-Terminus | Faktor Xa | Cytoplasma | NEB |
| pMAL c2E | Amp | MBP | N-Terminus | Enterokinase | Cytoplasma | NEB |
| pMAL c2G | Amp | MBP | N-Terminus | Genenase I | Cytoplasma | NEB |
| pGEX-5X-1 | Amp | GST | N-Terminus | Faktor Xa | Cytoplasma | Amersham Bioscience |

| | | | | | | |
|----------------------|-----|------------------|------------|------------------|------------|------------|
| pASK 3 | Amp | Strep II | C-Terminus | | Cytoplasma | IBA |
| pASK 6 | Amp | OmpA Strep II | N-Terminus | Faktor Xa | Periplasma | IBA |
| pASK 15 | Amp | Strep II | N-Terminus | Enterokinase | Cytoplasma | IBA |
| Champion pET SUMO | Kan | His6 SUMO | N-Terminus | SUMO Protease | Cytoplasma | Invitrogen |

| <i>Plasmid</i> | <i>Resistenz</i> | <i>Fusions-partner</i> | <i>Position des Fusions-partners</i> | <i>Protease-Spaltstelle</i> | <i>Expression</i> | <i>Referenz</i> |
|-------------------------------|------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| pc-DNA3.1/ CT-GFP- Topo | Amp, Neo | GFP | C-Terminus | | Eukaryotische Expression | Invitrogen |
| pcDNA3.1/ CT-GFP | Amp, Neo | GFP | C-Terminus | | Eukaryotische Expression | Invitrogen |

6.2.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung, DNA-Amplifikation durch PCR und Mutagenese wurden von MWG Biotech synthetisiert. Sie sind in Tabelle 6-3 zusammengefasst.

Tabelle 6-3
Übersicht der verwendeten Primer für Sequenzierung, Klonierung und Mutagenese

a) Sequenzierprimer

| <i>Name</i> | <i>Sequenz</i> | <i>Sequenzierte Vektoren</i> |
|------------------|---------------------------------|------------------------------|
| T7 promoter | 5'-taatacgaactcactataggg-3' | pET-Vektoren |
| T7 terminator | 5'-gctagttattgctcagcgg-3' | pET-Vektoren |
| pTWIN forward | 5'-actgggactccatcgtttct-3' | pTwin-Vektoren |
| pTwin reverse | 5'-ggcacgatgctcggcgatg-3' | pTwin-Vektoren |
| IBA forward | 5'-agagttatcttaccactccct-3' | pASK Vektoren |
| IBA reverse | 5'-gacgcagtagcggtaaacg-3' | pASK Vektoren |
| pGEX forward | 5'-tatagcatggcctttgcagg-3' | pGEX-5X-1 |
| pGEX reverse | 5'-gccctttcgtcttcaagaat-3' | pGEX-5X-1 |
| Mal EF | 5'-ggtcgctcagactgctgatgaagcc-3' | pMAL-Vektoren |
| M13/pUC R | 5'-cgccagggttttcccagtcacgac-3' | pMAL-Vektoren |
| GFP TOPO reverse | 5'-gggtaagctttccgtatgtagc-3' | pc-DNA3.1/ CT-GFP-Topo |
| SUMO forward | 5'-agattcttgtacgacggtatttag-3' | Champion pET SUMO |

b) PCR Primer

Klonierung Hexahistidin-Fusionsproteine:

| | |
|----------------|---|
| rat_NdeI_s | 5'-aaaaacatagcacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_His_NdeI_s | 5'-aaaaacatagcatcaccatcaccatcaccacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttaacggtccactgtgcggg-3' |

| | |
|------------------|--|
| rat-10C_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttagttgtccttctcctcattgtaac-3' |
| rat+10Nc4s_NheIs | 5'-aaaaagctagccatcaccatcaccatcacgtggtgatcagcgtcatcgtg-3' |
| rat+7C_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttacgtcaccacaacaagctgagac-3' |
| rat+6Nc4s_NdeI_s | 5'-aaaaacatatgcatcaccatcaccatcacgtcatcgtgctca-3' |
| rat+4C_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttaaaacaagctgagacggtccact-3' |

Klonierung Strep-Fusionsproteine:

| | |
|--------------|---|
| rat_SacII_s | 5'-aaaaaccgcgggcacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttaacggtccactgtgcggg-3' |
| tor_SacII_s | 5'-aaaaaccgcgggcacttccgaactccaagcacaca-3' |
| tor_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttatctgtcaatagtctggccc-3' |
| strep_NcoI_s | 5'-aaaaaacatggctagctggagccaccgcagttggaaaaa-3' |

Klonierung Intein-Fusionsproteine:

| | |
|----------------------|---|
| rat_pTWIN_NcoI_s | 5'-aaaaaccatgggccacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_pTWIN_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagacggtccactgtgc-3' |
| rat+6N_pTWIN_NcoI_s | 5'-aaaaaccatgggctcatcgtgctcaacatccacttccgaac-3' |
| rat+4C_pTWIN_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagaaacaagctgagacggtccactgtg-3' |
| tor_pTWIN_SapI_s | 5'-ggtggttgccttccaaccacttccgaactccaagcacaca-3' |
| tor_pTWIN_SapI_as | 5'-ggtggttgccttccgcacatctgtcaatagtctggcc-3' |

Klonierung GST-Fusionsproteine:

| | |
|-------------|--|
| rat_BamHI_s | 5'-aaaaagggatccccacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttaacggtccactgtgcggg-3' |
| tor_EcoRI_s | 5'-aaaaagaattccacttccgaactccaagcacaca-3' |
| tor_XhoI_as | 5'-aaaaactcgagttatctgtcaatagtctggccc-3' |

Klonierung MBP-Fusionsproteine

| | |
|-------------|--|
| rat_EcoRI_s | 5'-aaaaagaattccacttccgaacaccagcac-3' |
| rat_SalI_as | 5'-aaaaagtcgacttaacggtccacgt-3' |
| tor_EcoRI_s | 5'-aaaaagaattccacttccgaactccaagcacaca-3' |
| tor_SalI_as | 5'-aaaaagtcgacttatctgtcaatagtctggccc-3' |

Klonierung SUMO-Fusionsproteine

| | |
|-------------|-------------------------------|
| tor_sumo_s | 5'-cacttccgaactccaagcacaca-3' |
| tor_sumo_as | 5'-tctgtcaatagtctggccc-3' |
| rat_sumo_s | 5'-cacttccgaacaccagca-3' |
| rat_sumo_as | 5'-acggtccactgtgcgggc-3' |

c) Mutagenese-Primer

| | |
|--------------|--|
| ratS53D_s | 5'-ctcatccggaggacc gact tctctgggatacatctc-3' |
| ratS53D_as | 5'-gagatgtatcccagag agtc ggctcctccggatgag-3' |
| ratS54D_s | 5'-ccggaggaccagc gat tctgggatacatctcc-3' |
| ratS54D_as | 5'-ggagatgtatcccag atc gctggctcctccgg-3' |
| ratS53_54Ds | 5'-ccggaggacc gacgat tctgggatacatctcc-3' |
| ratS53_54Das | 5'-ggagatgtatcccag atcgtc ggctcctccgg-3' |
| ratS70D_s | 5'-ggagtacttctcacttaag gac cgcagtgacctcatggt-3' |
| ratS70D_as | 5'-aacatgagggtcactg cggtc ccttaagtgagaagtactcc-3' |

| | |
|----------------|--|
| torS56D_s | 5'-agctgcgacgcagc gat tctgttgggtacatttcc-3' |
| torS56D_as | 5'-ggaaatgtacccaacaga aatc gctgctcgcagct-3' |
| torS57D_s | 5'-gctgcgacgcagcag tgat gttgggtacatttccaaa-3' |
| torcS57D_as | 5'-tttggaaatgtacccaac atc actgctgctcgcagc-3' |
| torS56_57D_s | 5'-agctgcgacgcagc gatgat gttgggtacatttcc-3' |
| torcS56_57D_as | 5'-ggaaatgtacccaac atc atcgcctgctcgcagct-3' |
| torS72D_s | 5'-agcacaagaatattttaa acat caaa gac agaaagtgaactcatgtttga-3' |
| torS72D_as | 5'-ttcaaacatgagttcacttct gtc tttgatgttaaaatattcttgtgct-3' |

In **Tabelle 6-3** sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide angegeben. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen wurden bei den PCR-Primern unterstrichen und in den Mutageneseprimern sind die Nukleotide, die für einen Aminosäureaustausch codieren, fett gedruckt.

6.3 Chemikalien und Enzyme

6.3.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad.

| | |
|-------------------------------------|----------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Roth |
| Ammonium- ¹⁵ N-chlorid | Sigma Aldrich |
| BSA | Sigma |
| dNTPs | NEB |
| n-Dodecyl-β-Maltosid | Glycon |
| Dodecylphosphocholin, | Dr. Ehrendorfer GmbH |
| Dodecylphosphocholin, D38 (deutert) | Dr. Ehrendorfer GmbH |
| DTT | Sigma |
| Ethidiumbromid | Biomol |
| Fluoromount-G | Southern Biotech |
| Hefeextrakt | Roth, ICN |
| Iodacetamid | Sigma |
| IPTG | Sigma |

| | |
|--------------------------------------|---------------|
| β-Mercaptoethanol | Sigma |
| NDSB 201 | Calbiochem |
| NDSB 195 | Calbiochem |
| n-Octyl-β-D-glycopyranosid | Glycon |
| Protease-Inhibitor-Cocktail Complete | Roche |
| PMSF | Serva |
| Top Vision TM GQ Agarose | MBI Fermentas |
| Trypton | Roth, ICN |

6.3.2 Kits und Marker

| | |
|--|----------------------|
| 1-kb Längenstandard /Smart LadderSF | Eurogentic |
| 100-kb DNA Längenstandard/Smart Ladder | Eurogentic |
| Mass Ruler TM DNA Ladder Mix | Fermentas |
| 6x Mass Loading Dye Solution | Fermentas |
| 6x Orange Loading Dye Solution | Fermentas |
| LMW SDS Marker Kit | Amersham Biosciences |

| | |
|---|--------------------------|
| ABI Prism <i>Big Dye</i> Terminator Cycle- Sequencing Ready Reaction Kit | Perkin Elmer |
| MiniElute PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| Endofree Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| High Speed Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| DNA Ligation Kit | NEB |
| Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit II | Stratagene |
| Ultra Clean DNA Purification Kit | MoBio Labarotories, Inc. |
| Super Signal West Pico | Pierce |
| BCA Protein Assay Kit | Perbioscience |
| 20x XT-MES Running Buffer | BioRad |
| Champion pET SUMO Protein Expression System | Invitrogen |

6.3.3 Enzyme

Die in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme und ihre zugehörigen Puffersysteme stammten von NEB.

| | |
|------------------------------|------------------------------|
| Benzonase | Merck |
| Enterokinase, light chain | NEB |
| Faktor Xa | NEB |
| Genenase I | NEB |
| Lysozym | Sigma |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase | Promega, Fermentas, Genaxxon |
| T4-DNA-Ligase | NEB |
| Thrombin | Novagen |
| Trypsin (Sequenzierungsgrad) | Sigma |

6.3.4 Antikörper

6.3.4.1 Primäre Antikörper

| <i>Spezifität</i> | <i>Spezies</i> | <i>Verdünnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|----------------|-------------------|--|
| Anti-MBP | Maus | 1:20.000 | NEB |
| Anti-His6 | Maus | 1:1000 | Dianova |
| Anti-GST | Kaninchen | 1:1500 | Amersham Biosciences |
| anti- δ -loop (nAChR mAb139) | Ratte | 1:1000 | zur Verfügung gestellt von S. Tzartos (Heellenic Pasteur Intitut, Athen) |

6.3.4.2 Sekundäre Antikörper

| <i>Spezifität</i> | <i>Spezies</i> | <i>Verdünnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------------------------------|----------------|-------------------|----------------------|
| Anti-Maus-IgG HRP Konjugat | Schaf | 1:1000 | Dianova |
| Anti-Ratte-IgG HRP Konjugat | Ziege | 1:2000 | Dianova |
| Anti-Kaninchen-IgG HRP Konjugat | Schaf | 1:1000 | Amersham Biosciences |
| Anti-Ratte-IgG Alexa564 Konjugat | Hühnchen | 1:600 | Molecular Probes |

6.4 Geräte und sonstige Materialien

6.4.1 Zentrifugen

| | |
|----------------------------------|----------------|
| Kühlzentrifuge Centricon H-401 | Kontron-Hermle |
| Kühlzentrifuge Sorvall RC-5 | Sorvall |
| Tischzentrifuge Sigma 1-15K | Sigma |
| Tischzentrifuge 5414C | Eppendorf |
| Tischzentrifuge Biofuge Primus R | Heraeus |
| Tischzentrifuge UEC Force 14/B | UniEquip |
| Ultrazentrifuge TGA-65 | Kontron |

6.4.2 Autoklav, Brutschrank, Schüttler

| | |
|------------------------------------|------------------------|
| Autoklav3870EL | Systec GmbH |
| Brutschrank (Bakterien) Modell 300 | Memmert GmbH |
| Brutschrank (Zellkultur) | |
| CO ₂ -Inkubator C200 | Labotec GmbH |
| CO ₂ -Inkubator 3164 | Forma Scientific, Inc. |
| Schüttler HT, Infors AG | Bottmingen |
| Schüttler Centromat HK/RO | Centromat |

6.4.3 Elektrophorese- und Westernblotzubehör

| | |
|--------------------------|----------------|
| Gelelektrophoresekammern | |
| EasyCast™ Minigel System | Owl Scientific |
| Mini ProteanII | BioRad |

| | |
|-----------------------------------|----------------------|
| Protean II xi | BioRad |
| Criterion | BioRad |
| Blotappatur | Schleicher/Schuell |
| Spannungsgeräte: | |
| Power Pac 300 | BioRad |
| EPS 3000/150 | Pharmacia |
| Filmentwickler Optimax Typ TR | MS Laborgeräte |
| Hyperfilm ECL | Amersham Biosciences |
| Immobilon P-Membran | Millipore |
| Nitrozellulose-Membranen Hybond-C | Amersham-Buchler |

6.4.4 Ultraschall, Heizblock, Wasserbad

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Ultraschallgerät Sonorex TK30 | Bandelin |
| Thermomixer Compact | Eppendorf |
| Wasserbad MA6 | Lauda |

6.4.5 Spektrometer

| | |
|---|-----------------|
| UV-VIS Spektrometer, UV mini240 | Shimadzu |
| CD Spektropolarimeter J-600 | Jasco |
| Bruker DRX600 Spektrometer, Kryoprobenkopf. | Bruker Daltonik |
| Massenspektrometer Bruker Reflex | Bruker Daltonik |

6.4.6 FPLC, Säulen und Säulenmaterialien

| | |
|---|----------------------|
| FPLC (Pumpe P500, Controller LCC-500Plus, Fraktionssammler Frc100, Monitor UV1) Recorder 1327 | Pharmacia Biorad |
| Poly Prep Chromatography Columns | Biorad |
| NAP5 Säulen | Amersham Biosciences |
| Superdex TM 75 | Amersham Biosciences |
| Sephadex G25 | Amersham Biosciences |
| Ni-NTA-Agarose | Novagen |
| Ni-NTA-HP-Agarose | Amersham Biosciences |
| Chitin-Matrix | NEB |
| GST-Sepharose | Amersham Biosciences |
| Amylose-Matrix | NEB |
| Streptactin-Matrix | IBA |

6.4.7 Dialyse, Konzentrierung, Filter

| | |
|---|-----------|
| Dialysemembran Spectra Por R | Roth |
| Ultra-15-Filter YM 10 | Millipore |
| Microcon YM 3 | Millipore |
| 4mm Millex Durapore (PVDF) Membran 22µm | Millipore |

6.4.8 Thermocycler und UV-Detektion von DNA-Gelen

| | |
|--------------------|-------------------|
| Thermocycler: | |
| Primus | MWG-Biotech |
| PTC-150 | MJ Research, Inc. |
| Biodoc Analyse Ti5 | Biometra |

6.4.9 pH-Elektrode

| | |
|-------------------------|--------|
| pH-Messgerät Modell 643 | Knick |
| pH-Elektrode N 5700 A | Schott |

6.4.10 Sonstiges

| | |
|---|-----------------|
| Vakuumkonzentrator: | |
| Evaporzentrifuge Univapo VUC 150H | Leybold-Heraeus |
| Lyophilisator GT 2 | Leybold-Heraeus |
| Milli-Q Millipore water purification system | Biocel |

6.5 Puffer und Lösungen

6.5.1 Molekularbiologie

| | |
|-----------------|--|
| TAE-Puffer: | 10 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0 |
| Tfb I - Lösung: | 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , pH 8,0 mit 0,2 M Essigsäure, sterilfiltriert |
| Tfb II-Lösung: | 10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl ₂ , 15 % Glycerol, pH 6,5 mit 1M KOH, sterilfiltriert |

6.5.2 Zellbiologie

| | |
|-----------------------|--|
| PBS-Puffer: | 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,3 |
| 3% Paraformaldehyd: | 3% Paraformaldehyd in 100 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,2 |
| 0,3 % Triton-X 100: | 0,3 % Triton-X 100 in PBS |
| 100 mM Glycin: | 100 mM Glycin in PBS |
| 25% NGF-PBS: | 25 % Normalziegenserum in PBS |
| 3% NGF-PBS: | 3 % Normalziegenserum in PBS |
| STM Puffer: | 0,25 M Sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgSO ₄ |
| Denaturierungspuffer: | 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff pH 8,0 |

6.5.3 Proteinbiochemie

6.5.3.1 SDS-Gele

| | |
|---------------------------|---|
| SDS-Laufpuffer: | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 |
| SDS-Probenpuffer (4x): | 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % (w/v) Glycerin, 10 % (w/v) β -Mercapthoethanol, 6% (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau |
| SDS-Sammelgel (3 %): | 3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mg/ml APS, 1 μ g/ml TEMED |
| SDS-Trenngel (10%): | 10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mg/ml APS, 1 μ g/ml TEMED |
| SDS-Trenngel (12,5%): | 12,5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mg/ml APS, 1 μ g/ml TEMED |
| Tricin-Laufpuffer : | 100 mM Tris, pH 8.3, 100 mM Tricine, 0.1 (w/v) % SDS |
| Tricin-Probenpuffer: | 200 mM Tris/HCl, pH 6,8, 40 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) β -Mercapthoethanol, 2% (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) CoomassieBlau G-250 |
| Coomassie-Entfärbelösung: | 30 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure |
| Coomassie-Färbelösung: | 0,1 % (w/v) Servablau R-250, 30 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure |
| Fixierlösung: | 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure |
| Glutaraldehydlösung: | 30 % (v/v) Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd |
| Färbelösung: | 0,1 % (w/v) AgNO_3 , 0,01 % (v/v) Formaldehyd |
| Entwicklerlösung: | 2,5 % (w/v) Na_2CO_3 pH 10,9, 0,01 % (v/v) Formaldehyd |
| Stopplösung: | 50 mM EDTA, 0,02% (w/v) Thimerosal |

6.5.3.2 Western-Blot

| | |
|-------------------|---|
| Blotto: | 5 % Magermilchpulver in TBST-Puffer, 0,02 % (w/v) Natriumazid |
| Blotpuffer: | 48 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol |
| Ponceau-S-Lösung: | 2 % (w/v) Ponceau S, 30 % (w/v) Trichloressigsäure, 30 % (w/v) Salicylsäure |

| | |
|---------------|---|
| Strip-Puffer: | 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol |
| TBS-Puffer: | 20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7,4 |
| TBST-Puffer: | 20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7,4, 0,1 % (v/v) Tween 20 |

6.5.3.3 Tryptischer Verdau von Proteinen für MALDI-MS

| | |
|-------------------------|--|
| Ammoniumcarbonatpuffer: | 100 mM NH_4HCO_3 , pH 7,9 – 8,5 |
| Reduktionslösung: | 100 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 |
| Carbamidomethylierung: | 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 |
| Trypsinlösung: | 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 |

6.5.3.4 Sonstiges

Bradford-Reagenz: 0,06% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 42,8% Perchlorsäure

6.5.4 Proteincharakterisierung

6.5.4.1 Hexahistidin-Fusionsproteine

| | |
|--------------------------|--|
| Lysispuffer: | 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, pH 8 |
| Waschpuffer: | 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 6,7 |
| Elutionspuffer: | 50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 6,7 |
| Denaturierungspuffer: | 100 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff pH 8,0, pH 6,3 bzw. pH 4,5 |
| Rückfaltungspuffer: | 50 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, pH 6,7 |
| Phosphatpuffer: | 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 50 mM NaCl, pH 6,5 |
| Thrombinspaltpuffer: | 20 mM Tris/HCl, 1,5 M NaCl, 25 mM CaCl_2 , 3 M Harnstoff, pH 8,4 |
| Phosphorylierungspuffer: | 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NDSB-201, pH 7,5 |

6.5.4.2 Strep-Fusionsproteine

| | |
|----------------------------|---|
| Bindungspuffer = Puffer W: | 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA |
| Puffer P: | 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM Sucrose, 1mM EDTA |
| Puffer E: | 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin |
| Denaturierungspuffer: | 100 mM Na_2HPO_4 , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff pH 8,0 |

6.5.4.3 Intein-Fusionsproteine

Puffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA

Puffer B: 20 mM HEPES, pH 8,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA,
50 mM Mercaptoethansulfonsäure

6.5.4.4 GST-Fusionsproteine

PBS-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl,
pH 7,3

GST-Elutionspuffer: 50 mM Tris/Hal, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8,0

Faktor Xa-Spaltpuffer: 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8,0

6.5.4.5 MBP-Fusionsproteine

MBP-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

MBP-Elutionspuffer: 10 mM Maltose, 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA,
pH 8,0

Enterokinasespaltpuffer: 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8,0

Faktor Xa-Spaltpuffer: 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8,0

GenenaseI-Spaltpuffer: 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8,0

6.5.4.6 SUMO-Fusionsproteine

SUMO-Puffer: 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol,
pH 7.4

SUMO-Elutionspuffer: 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl,
200 mM – 1M Imidazol, pH 7.4

Denaturierungspuffer: 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris, 8M Harnstoff pH 8,0

10x SUMO-Protease-Spaltpuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 % Igepal (NP-40),
10 mM DTT

6.6 Molekularbiologische Methoden

6.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Überprüfung von Plasmidpräparationen und Restriktionen, sowie zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für die Gele wurden 0,8 % bzw. 1,5 % (w/v) Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und im Anschluss 5 µg/ml Ethidiumbromid dazugegeben. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Sechstel Volumen der Mass Loading Dye solution bzw. Orange Loading

Dye solution versetzt. Als Längenstandards diente der Smartladder (Eurogentec) bzw. Mass Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V mit 1x TAE-Puffer als Laufpuffer. Die DNA-Banden wurden unter der UV-Lampe analysiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten und gereinigt (siehe 6.6.6).

6.6.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Von einer Übernachtskultur wurde eine Kultur 1: 100 in LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ angezogen. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (4000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 2/5 des Volumens der Ausgangskultur in TfbI resuspendiert und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 1/25 des Volumens der Ausgangskultur Tfb II gelöst, 15 min auf Eis inkubiert und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei – 80 °C gelagert.

6.6.3 Transformation

Die kompetenten Bakterien wurden mit 20-100 ng DNA 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitze-Schock bei 42 °C für 60 Sekunden und direkt danach wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe des Nährmediums SOC zur Anzucht der Bakterien bei 37 °C für 45 Minuten. Dieser Ansatz wurde direkt in eine Übernachtskultur gegeben bzw. 50 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum für zur Selektion ausgestrichen.

6.6.4 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für die Klonierung, Sequenzierung und Transformation in Expressionszellstämme wurde der Qiagen Plasmid Mini Kit eingesetzt. Hierbei wird die DNA durch alkalische Lyse isoliert und mit Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die DNA (5–10 µg) wurde mit 30µl EB-Puffer von den Spinsäulen eluiert (5 mM Tris/HCl pH 8,5). Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem HighSpeed Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers aus einer 250 ml LB-Kultur in einem Elutionsvolumen von 500 µl gewonnen. Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde die Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Kit

aus einer 250 ml LB-Kultur isoliert und in 200 µl EndoFree TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,5) aufgenommen.

6.6.5 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen

Zum Entsalzen von DNA aus vorangegangenen enzymatischen Reaktionen und zum Entfernen der eingesetzten Enzyme, sowie zum Pufferwechsel wurde der Qiagen MiniElute PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde mit 30 µl des jeweilig benötigten Puffers von der Membran der Spinsäulen eluiert.

6.6.6 Gelextraktion

Die Gewinnung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des MiniElute Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,5) von der Säule eluiert.

6.6.7 Modifikation von DNA

6.6.7.1 Restriktion

Der Verdau von DNA mit den Restriktionsendonukleasen vom Typ II erfolgte unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen. Die verwendete Enzymmenge betrug 2–10 Units / µg DNA. Soweit vom Hersteller nicht anders empfohlen, wurden die Restriktionsansätze bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert.

6.6.7.2 Ligation

Für die Ligation mit dem Quick Ligation Kit wurden 50 ng verdaute Vektor DNA mit dem verdauten Fragment im Verhältnis der molaren Enden von 1:3 in 10 µl Wasser, mit 10 µl 2x Quick Ligation Puffer und 1 µl Quick-T4-DNA-Ligase für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ erfolgte die Ligation mit T4 DNA-Ligase in gleichem Vektor – Insert Verhältnis in einem 30 µl Ansatz, mit 3 µl 10x Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase bei 16 °C über Nacht.

6.6.7.3 AT Klonierung

Der verwendete Vektor Champion pET SUMO lag linearisiert mit einem 3' überhängenden Desoxythymidin (T) vor. Die in der PCR verwendete DNA-*Taq*-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige terminale Transferase-Aktivität und generiert einen 3' Desoxyadenin

(A)-Überhang des PCR-Fragmentes, wodurch das Fragment effizient in den linearisierten Vektor inseriert werden konnte.

6.6.7.4 Topo Klonierung

Der verwendete Vektor pcDNA3.1/CT-GFP TOPO lag mit einem 3' überhängenden Desoxythymidin (T) linearisiert vor. Am Plasmid war eine Topoisomerase kovalent gebunden, die durch Raumtemperatur aktiviert wurde und die Insertion des PCR-Fragmentes mit 3' Desoxyadenin (A)-Überhang ermöglichte. Zur Ligation wurden 4 µl DNA, 1 µl salt-solution und 1 µl Vektor für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und 1 µl dieser Lösung direkt zur Transformation in *E. coli* Top10 Zellen eingesetzt.

6.6.7.5 Mutagenese

Zur gerichteten Mutagenese wurden Primer synthetisiert, die durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche einen Aminosäureaustausch einführen. In einem 50 µl Ansatz wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer, 5-50 ng template-Plasmid-DNA, je 125 ng sense- und antisense-Primer 1 µl dNTPs und 1 µl *Pfu*-Turbo-DNA Polymerase in H₂O gemischt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler, nach 30 sec DNA Denaturierung bei 95 °C wurde folgender Zyklus 18-mal durchlaufen: 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 55°C (Primerannealing) und 12 min bei 68 °C (Primerextension). Nach Abkühlung der Lösung auf Eis wurde 1 µl Restriktionsenzym *DpnI* dazugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurden die DNA-Stränge des Originalplasmids verdaut, die hemimethyliert vorliegen, da sie aus einem *dam*⁺ *E. coli*-Stamm isoliert wurden. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Plasmide in XL-1-blue transformiert, isoliert und die Mutation durch Sequenzierung bestätigt.

6.6.8 Polymerase–Kettenreaktion

6.6.8.1 PCR mit Linker–Primern

In einem PCR–Gefäß wurden 50–100 ng Plasmid–DNA, 10 mM dNTPs, 2 Units *Taq* DNA Polymerase, je 5 pmol der sense- und antisense-Primer in 50 µl 1x Polymerasepuffer (mit MgSO₄) gemischt und anschließend in einem Thermocycler bei 94°C 5 min denaturiert. Es wurden 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 20 s Primerannealing bei 54°C und 1 min Primerextension bei 72°C durchlaufen. Der letzte Primer–Extensions–Schritt wurde bei 72°C durchgeführt. Der gesamte PCR–Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und das amplifizierte Fragment durch Gelextraktion gewonnen.

6.6.8.2 Kolonie-PCR

Die erfolgreiche Klonierung überprüft man mittels Kolonie-PCR. Als Primer dienten Oligonukleotide, die stromaufwärts bzw. -abwärts des klonierten Fragments hybridisieren. In einem PCR-Gefäß wurden jeweils 10 mM dNTPs, 0,5 Units *Taq* DNA Polymerase, je 5 pmol der Primer in 1x Polymerasepuffer (mit MgSO₄) vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine gut separierte Bakterienkolonie auf der Agarplatte gepickt und diese in das Reaktionsgefäß getaucht. Anschließend wurde die Pipette in eine Übernachtskultur überführt. Die Amplifikation erfolgte analog der Fragment-PCR. Anschließend wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die Anreicherung eines DNA-Fragmentes entsprechender Größe untersucht. Von den Kolonien mit positivem Signal erfolgte am nächsten Tag eine Plasmidisolierung zur DNA-Sequenzierung.

6.6.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von AGOWA Sequencing Service Berlin bzw. SEQLAB Göttingen durchgeführt. Für den AGOWA Sequenzierservice wurden die Proben mit dem ABI Prism *Big Dye* Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v. 3.1. vorbereitet, in dem 200 ng DNA in 6 µl H₂O mit 10 pmol/µl Primer, 2 µl Ready Reaction Mix und 2 µl Big Dye 5x Puffer auf Eis versetzt wurden. Im Thermocycler erfolgte nach 30 Sekunden Denaturierung bei 96 °C die Amplifizierung mit 25 Zyklen: 96 °C 30 s Denaturierung, 56 °C 15 s Annealing und 72 °C 4 min Primerextension. Die Proben wurden im Anschluss gereinigt und gefällt. Dafür wurde die DNA mit 2,5fachem Volumen 100 % Ethanol versetzt und gevortext, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 40 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, 10 min zentrifugiert, 5 min an der Luft getrocknet und erneut gewaschen. Schließlich wurde die DNA 5 min lyophilisiert und dann zum Analysieren versandt.

Für die Sequenzierung bei SEQLAB wurden 0,6 µg DNA und 20 pmol Primer gemischt und versandt. In beiden Fällen erfolgt die Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

6.6.10 Klonierung der Fusionsproteine für die Expression der intrazellulären Domäne des nAChR

In dieser Arbeit wurden Fusionsproteine der intrazellulären Domäne der δ -Untereinheit des nAChR von *Torpedo californica* und *Rattus norvegicus* kloniert. Tabelle 6-1 gibt einen Überblick der Konstrukte, der verwendeten Expressionsvektoren, der Primer und Restriktionsschnittstellen für die Klonierung.

Tabelle 6-4 Klonierung der in der Arbeit verwendeten Fusionsproteine

| Name des Fusionsproteins | Expressionsvektor | Restriktionsschnittstellen | Klonierungsprimer |
|--------------------------|-------------------|----------------------------|---|
| Strep-RID_EK | pASK15 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | rat_ <i>SacII</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-TID_EK | pASK15 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | tor_ <i>SacII</i> _s tor_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-RID_EK | pET28a | <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> | strep_ <i>NcoI</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-TID_EK | pET28a | <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> | strep_ <i>NcoI</i> _s tor_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-RID | pASK3 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | rat_ <i>SacII</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-TID | pASK3 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | tor_ <i>SacII</i> _s tor_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-RID | pASK6 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | rat_ <i>SacII</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| Strep-TID | pASK6 | <i>SacII</i> / <i>XhoI</i> | tor_ <i>SacII</i> _s tor_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID | pET24a | <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> | rat_His_ <i>NdeI</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID_Thr | pET28a | <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> | rat_ <i>NdeI</i> _s rat_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID(-10C) | pET24a | <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> | rat_His_ <i>NdeI</i> _s rat-10C_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID(-10C)_Thr | pET28a | <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> | rat_ <i>NdeI</i> _s rat-10C_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID(+6N+4C) | pET21a | <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> | rat+6Nc4s_ <i>NdeI</i> _s rat+4C_ <i>XhoI</i> _as |
| His-RID(+10N+6C) | pET21a | <i>NheI</i> / <i>XhoI</i> | rat+10Nc4s_ <i>NheI</i> _s rat+7C_ <i>XhoI</i> _as |

| | | | |
|---------------------|-----------------------|-------------------|---|
| His-RID | pcDNA 3.1/CT-GFP-Topo | AT-Klonierung | rat_His_NdeI_s rat_XhoI_as |
| Intein1-RID | pTWIN1 | <i>NcoI/ XhoI</i> | rat_pTwin_NcoI_s rat_pTwin_XhoI_as |
| Intein1-TID | pTWIN1 | <i>SapI</i> | tor_pTwin_SapI_s tor_pTwin_SapI_as |
| Intein2-RID | pTWIN2 | <i>NcoI/ XhoI</i> | rat_pTwin_NcoI_s rat_pTwin_XhoI_as |
| Intein1-RID(+6N+4C) | pTWIN1 | <i>NcoI/ XhoI</i> | rat+6N_pTwin_NcoI_s rat+4C_pTwin_XhoI_as |
| Intein2-RID(+6N+4C) | pTWIN2 | <i>NcoI/ XhoI</i> | rat+6N_pTwin_NcoI_s rat+4C_pTwin_XhoI_as |
| GST-RID_Xa | pGEX-5X-1 | <i>BamHI/XhoI</i> | rat_BamHI_s rat_XhoI_as |
| GST-TID_Xa | pGEX-5X-1 | <i>EcoRI/XhoI</i> | tor_EcoRI_s tor_XhoI_as |
| MBP-RID_Xa | pMALc2X | <i>EcoRI/SalI</i> | rat_EcoRI_s rat_SalI_as |
| MBP-TID_Xa | pMALc2X | <i>EcoRI/SalI</i> | tor_EcoRI_s tor_SalI_as |
| MBP-RID_EK | pMALc2E | <i>EcoRI/SalI</i> | rat_EcoRI_s rat_SalI_as |
| MBP-TID_EK | pMALc2E | <i>EcoRI/SalI</i> | tor_EcoRI_s tor_SalI_as |
| MBP-RID_GE | pMALc2G | <i>EcoRI/SalI</i> | rat_EcoRI_s rat_SalI_as |
| MBP-TID_GE | pMALc2G | <i>EcoRI/SalI</i> | tor_EcoRI_s tor_SalI_as |
| SUMO-RID | pET SUMO | AT-Klonierung | rat_sumo_s rat_sumo_as |
| SUMO-TID | pET SUMO | AT-Klonierung | tor_sumo_s tor_sumo_as |

6.7 Anzucht von Bakterien

6.7.1 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden vor Gebrauch autoklaviert (20 min, 1,2 bar, 121°C).

6.7.1.1 LB (Luria–Bertani)–Medium

10 g Pepton, tryptisch verdaut, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1 l H₂O.

Zur Herstellung der LB-Agar-Platten wurde das Medium zusätzlich mit 1,5 % Agar versetzt.

6.7.1.2 SOB- und SOC-Medium

SOB- Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefe- Extrakt, 0,5 g NaCl ad 1 l H₂O,
autoklavieren, dann 10 ml 1 M sterilfiltriertes MgCl₂ und 10 ml 1M
sterilfiltriertes MgSO₄ zufügen

SOC- Medium: 100 ml SOB- Medium + 1 ml 2 M sterilfiltrierte Glukose- Lösung

6.7.1.3 M9–Minimalmedium

1 Liter 1–fach M9–Minimalmedium–Lösung (Sambrook et al., 1989) wurde mit 1 ml Spurenelement TS 2 (Meyer u. Schlegel, 1983), 2 ml 1 M MgSO₄, 1 ml 10 mM Fe(III)citrat, 0,1 ml 1 M CaCl₂, 20 ml 20% (w/v) Glukose, sowie 0,1 ml 0,5% Vitamin B1 versetzt. Die Salz– und Spurenelementlösungen wurden getrennt autoklaviert, die Glukose– und Vitaminlösung sterilfiltriert. Bei der Zellanzucht für die Expression von markiertem Protein wurde ¹⁵NH₄Cl verwendet.

5–fach M9 Stammlösung: 33,9 g Na₂HPO₄, 15,0 g KH₂PO₄, 2,5 g NaCl, 5,0 g NH₄Cl
ad 1 l H₂O.

TS2 – Mischung: 100 mg ZnSO₄ · 7 H₂O, 30 mg MnCl₂ · 4 H₂O, 300 mg
H₃BO₃, 200 mg CoCl₂ · 6H₂O, 20 mg NiCl₂ · 6 H₂O,
10 mg CuCl₂ · 2 H₂O, 900 mg Na₂MoO₄ · 2 H₂O
ad 1 l H₂O.

6.7.1.4 Antibiotika

Die Nährmedien wurden zur Selektion der transformierten Bakterien mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt. Ampicillin wurde mit 100 µg/ml Endkonzentration, Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml und Chloramphenicol mit 35 µg/ml eingesetzt.

6.7.2 Übernachtskulturen

10 ml LB-Medium mit der erforderlichen Antibiotikakonzentration wurden mit 100 µl einer Dauerkultur bzw. mit einer gepickten Bakterienkolonie angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

6.7.3 Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden durch Mischen der Übernachtskultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 15% (w/v)) hergestellt und bei – 80 °C gelagert.

6.7.4 Zellanzucht für prokaryotische Proteinexpression

6.7.4.1 Testexpression

Zum Optimieren der Expressionsbedingungen wurden 25 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei unterschiedlichen Bedingungen angezogen. Die Expression erfolgte bei 25 °C und 37 °C nach einer Induktion bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 mit 1 mM IPTG. Die Expression von den pASK IBA – Vektoren wurde mit 2 ng/ml Anhydrotetracyclin induziert. Vor Induktion und 2h, 4h, 6h und 20 h nach Induktion wurde ein Aliquot von 1 ml genommen und abzentrifugiert. Zur Beobachtung der Gesamtexpression wurde das Pellet mit 100 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE/Western Blot analysiert. Zur Überprüfung der Löslichkeit des exprimierten Proteins wurde ein nativer Zellaufschluss durchgeführt (siehe 6.9.1).

Wenn unter diesen Bedingungen keine lösliche Expression beobachtet werden konnte oder generell eine Erhöhung der Expression notwendig war, wurden die Expressionsbedingungen weiter variiert. So wurde mit variablen IPTG-Konzentrationen (1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM) induziert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Expression getestet. Ein Einfluss der Bakteriendichte in einer Kultur wurde ebenfalls untersucht. So erfolgte die Expression bei niedriger OD₆₀₀=0,2. Weitere Testexpressionen wurden in Gegenwart von 20 % Ethanol oder in Gegenwart von 500 mM Sorbitol/2,5 mM Betaine durchgeführt. Zusätzlich wurde getestet ob eine Induktion bei hoher Zelldichte (Zellanzucht über Nacht, OD₆₀₀>3) und für kurze Zeit (30min-1h) zu erhöhter Expression führt.

6.7.4.2 Zellanzucht

Die Bakterienanzucht in größerem Maßstab erfolgte in Schüttelkolben mit LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die Kulturen wurden 1:500 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zum Erreichen

einer OD_{600} von 0,4–0,6 inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG. Die Zellen wurden nach der Induktion wie im Expressionstest bestimmt inkubiert (i.d.R. für 4 h bei 37 °C und 180 rpm) und anschließend bei 6000 rpm bei 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert.

6.7.4.3 Proteinexpression nach Blackwell et al. (1991)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 1x LB-Medium mit 500 mM Sorbitol und 2,5 mM Betaine bis zu einer OD_{600} von 0,4–0,6 bei 37°C. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Wachstumstemperatur auf 25 °C gesenkt und die Zellen nach 20h geerntet.

6.7.4.4 Zellanzucht für toxische Proteine (GST-Fusionsproteine)

Die Anzucht der mit pREP4 transformierten Bakterien erfolgte in Schüttelkolben mit LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum und mit 100 µl einer Dauerkultur angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 25 °C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe von 1 mM IPTG und die Ernte der Zellen nach 30 minütiger Inkubation.

6.7.4.5 Anzucht nach Marley et al. (2001)

Die Bakterien wurden in LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum mit einer Übernachtskultur 1:500 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,7 inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in sterilen Zentrifugenbechern bei 6000 rpm, 15 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Waschlösung (6,4 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 1,5 g KH_2PO_4 , 0,25 g NaCl ad 500 ml H_2O) resuspendiert und anschließend bei 6000 rpm, 4 °C für 15 min pelletiert. Es folgte die Resuspension der Zellen in isotopenmarkiertem Minimalmedium ($^{15}NH_4Cl$), dass einem Viertel des Ausgangsvolumens an LB-Medium entsprach. Die Zellen wurden weiter für 1 h bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt, dann erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach weiteren 4 h erfolgte die Ernte der Zellen und die Aufbewahrung bei –20°C.

6.8 Zellbiologische Methoden

6.8.1 Zellkultur

HEK293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen) wurden in Dubeccos modifizierten Eagle Medium (High Glucose, # 61965, Gibco) und CHO-K1 Zellen (chinesische Hamsterovarien) in F12 Nutrient Ham's Mixture (# 31765, Invitrogen) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit

10 % (v/v) fötalem Kälberserum FCS (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin versetzt. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre mit 5 % CO₂.

6.8.2 Transfektion

Die Transfektion mit Lipofectamin Plus Reagenz erfolgte nach den Angaben des Hersteller bei 60 %iger Zelldichte. Zur Prä-Komplexierung wurden 0,7 µg Plasmid-DNA (His-RID in pcDNA3.1 und GFP in pcDNA3.1,CT-GFP), mit 5 µl PLUS Reagenz in 50 µl serumfreien Medium verdünnt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden 2 µl Lipofectamin in 50 µl serumfreien Medium ebenfalls 15 min inkubiert. Die beiden Lösungen wurden vereint und 100 µl davon mit 400 µl serumfreien Medium für 3h bei 37 ° C auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Danach wurde das Medium durch frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen für 48 h inkubiert.

Für die Totalexpression wurde in Schalen (140 mm Durchmesser) kultiviert. Diese wurden mit folgenden Komponenten versetzt: 15 µg DNA (His-RID in pcDNA3.1), 200 µl PLUS Reagenz in 7,5 ml serumfreien Medium, sowie 300 µl Lipofectamin in 7,5 ml serumfreien Medium. Von der vereinten DNA-Lipofectaminlösung wurden 3,875 ml mit 12,5 ml serumfreien Medium auf die Zellen zur Transfektion gegeben.

6.8.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf 12 mm Deckgläschen kultiviert mit 3% Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2x in PBS-Puffer gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation in 0,3 % Triton-X 100 für 10 min, daraufhin in 100 mM Glycin für 20 min. Die Zellen wurden 3x in PBS-Puffer gewaschen und dann 30 min in 25% NGF-PBS blockiert. Es erfolgte die Zugabe des 1. Antikörpers (anti-δ-loop (nAChR mAb139)) in 3% NGF-PBS für 1h. Die Zellen wurden 3x mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper (Anti-Ratte-IgG Alexa564 Konjugat) in 3 % NGF-PBS wieder für 1h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen zur Kernfärbung 5 min mit DAPI gefärbt und mit Wasser gewaschen. Mit Fluoromount-G folgte die Versiegelung der Deckgläschen auf Objektträgern. Die Analyse erfolgte an einem Konfokalmikroskop (Zeiss 100 MX) mit einem 63x Objektiv (Ölimersion). Für GFP erfolgte die Anregung bei 488nm, und einer Emissionsdetektion bei 505-530 nm, für Alexa564 wurde mit einem 543 nm Laserstrahl angeregt (Filter bis 580 nm), die Detektion erfolgte ab 640 nm. Die Bilder wurden mit dem LSM (laser scanning microscope) Programm ausgewertet.

6.8.4 Aufschluss von kultivierten HEK293-Zellen

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in kaltem PBS gewaschen, und in 10 ml PBS von den Schalen geschabt. Die Zellen wurden 5 min bei 500xg zentrifugiert und auf Eis in 0,25 M STM Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM PMSF und 1µl/ml Benzonase resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Glashomogenator durch 40 Züge homogenisiert und das Zellysate (Gesamtzellextrakt) bei 40.000 rpm, 4°C und 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,25 M STM Puffer + 1% Dodecylmaltosid resuspendiert und abzentrifugiert (10.000 rpm, 4°C und 30 min). Dieses Pellet wurde in Denaturierungspuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und zentrifugiert (10.000 rpm, 4°C und 30 min). Der Gesamtzellextrakt, der Überstand der Ultrazentrifugation, Pellet in Detergenz und Harnstoff solubilisiert und die unlösliche Fraktion wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

6.9 Proteinreinigung

6.9.1 Zellaufschluss der Testexpression

Die aus der Testexpression gewonnenen Bakterienpellets wurden in 100 µl Lysispuffer resuspendiert, und mit 0,1 mg/ml Lysozym, complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 µl/ml Benzonase für 30 min auf Eis inkubiert. Für den Zellaufschluss wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischendurch im 30 °C Wasserbad aufgetaut. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand (enthält lösliche Proteine) und das Pellet (unlösliche Proteine) mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

6.9.2 Hexahistidin-Fusionsproteine

6.9.2.1 Zellaufschluss und Reinigung unter nativen Bedingungen

Das Zellpellet von 500 ml Anzuchtkultur wurde in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und mit 0,1 mg/ml Lysozym, complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 µl/ml Benzonase 30 min auf Eis inkubiert. Für den Zellaufschluss wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischendurch im 30 °C Wasserbad aufgetaut. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand auf 500 µl mit in Lysispuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben. Die Agarose wurde für 1h unter leichtem Schwenken bei 4 °C zur Proteinassoziation inkubiert, danach der Durchfluss gesammelt. Mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (10 mM Imidazol, 1

M Harnstoff) wurde die Agarose gewaschen, die Elution erfolgte mit 0,5 ml Elutionspuffer (1 M Imidazol, 1M Harnstoff).

6.9.2.2 Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Lyse erfolgte durch Rühren des Zellpellet (von 100 ml Anzuchtkultur) über Nacht in 10 ml Denaturierungspuffer, pH 8.0. Nach 30 min Zentrifugation für 14.000 rpm und 4 °C wurde der Rohextrakt auf in Denaturierungspuffer, pH 8.0, äquilibrierte Ni-NTA-Agarose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben. Die Agarose wurde eine Stunde inkubiert, der Durchfluss gesammelt und mit 2x10 Säulenvolumen Denaturierungspuffer, pH 6.3 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3x0,5 ml Denaturierungspuffer, pH 4.5 oder mit 3x0,5 ml Denaturierungspuffer, pH 6.3 mit 200 mM Imidazol.

6.9.2.3 Rückfaltung

a) Gelfiltration

250 µl der Elutionsfraktion der Ni-NTA-Agarose wurden auf die mit Rückfaltungspuffer äquilibrierte Superdex TM 75 Säule gegeben. Der Lauf erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/min, die Proteinelution detektierte man mit einer Absorptionsmessung bei 280 nm und sammelte 0,4 ml Fraktionen.

b) Entsalzungssäule Sephadex 25

Die Säule wurde mit Rückfaltungspuffer mit den entsprechenden Zusätzen äquilibriert. 1 ml der Ni-NTA-Elutionsfraktion wurde auf die Säule aufgetragen. Der Lauf erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min und die Proteinelution mit einer Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert.

c) Dialyse

Die Elutionsfraktionen wurden in einen Dialyseschlauch überführt und 3x für jeweils mindestens zwei Stunden (i.d.R. ein Schritt über Nacht) gegen den Rückfaltungspuffer dialysiert. Für die Renaturierung durch Dialyse gegen Phosphatpuffer (auch für 3x2h) wurden die Elutionsfraktionen vorher mit 1% Dodecylmaltosid bzw. mit 60fach molaren Überschuss Dodecylphosphocholin (bzw. mit anderen Detergenzien, siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) versetzt.

In den Rückfaltungsversuchen wurde auch schrittweise dialysiert, d.h. nach 2h wird der Dialysepuffer gegen einen Puffer mit geringerer Harnstoffkonzentration ausgetauscht.

d) Microcon-Filter

Die Elutionsfraktion wurde mit 60-fachem molarem Überschuss Dodecylphosphocholin versetzt, auf eine mit Phosphatpuffer äquilibrierte Microcon-Filter gegeben und mit Phosphatpuffer + 2mM Dodecylphosphocholin verdünnt. Nach Einengung der Probe wurde diese wieder mit dem Puffer verdünnt und erneut eingengt. Dies erfolgte bis der Denaturierungspuffer durch den Phosphatpuffer ersetzt und dadurch der Harnstoff entfernt war.

e) Verdünnung

Die Elutionsfraktionen wurden mit dem Rückfaltungspuffer/Phosphatpuffer und den entsprechenden Zusätzen 1:50 durch zugeben des Puffers verdünnt, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend auf Microcon-Filtern konzentriert.

f) An Nickelagarose gebunden

Die an Ni-NTA-Agarose gebundenen Fusionsproteine wurden durch Waschen mit den entsprechenden Puffern renaturiert und dann in Gegenwart von Imidazol eluiert.

6.9.2.4 Spaltung des Hexahistidin-Fusionsproteins mit Thrombin

Nach Bindung der Fusionsproteine an Ni-NTA wurde die Säule mit dem Thrombinspaltungspuffer äquilibriert. Das Säulenmaterial wurde in 1 ml Thrombinspaltungspuffer aufgenommen, mit 0,5 µl Thrombin versetzt und 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Durchfluss wurde gesammelt, die Säule mit 2 x 0,5 ml Denaturierungspuffer pH 6.3 gewaschen und ungespaltene Proteine mit 2 x 0,5 ml Denaturierungspuffer pH 4.5 eluiert.

6.9.2.5 in vitro Phosphorylierung

Durch Gelfiltration (Superdex TM75) wurde His-TID in den Phosphorylierungspuffer überführt. Die Lösung mit 100 – 300 µg/ml Fusionsprotein wurde mit 1 mM ATP, geringen Mengen [³²P]ATP und ~250 Units/ µg Protein cAMP-abhängige Proteinkinase PKA (New England Biolabs) versetzt und 1,5 h bei 30°C inkubiert.

Das phosphorylierte His-TID wurde durch reversed-phase HPLC (Vydac C₁₈ Säule, 4,6 x 250 mm) in einem Gradienten von Acetonitril in Wasser (0,1 % Trifluoressigsäure) von 5 zu 45%

in 40 min isoliert und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat erwies sich schwer löslich. Das Protein konnte in Phosphatpuffer für CD-spektroskopische Experimente nur in Gegenwart von Dodecylphosphocholin wieder in Lösung gebracht werden.

6.9.3 Strep-Fusionsproteine

6.9.3.1 Zellaufschluss und Reinigung unter nativen Bedingungen

Die Zellpellets von 1l Anzuchtvolumen wurden in 5 ml Puffer W resuspendiert, und mit 0,1 mg/ml Lyozym, complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 µl/ml Benzonase 30 min auf Eis inkubiert. Für den Zellaufschluss wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischendurch im 30 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellen mit den periplasmatisch exprimierten Proteinen wurden in Puffer P resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C erhalten und auf 500 µl mit Puffer W äquilibrierte Strep-Tactin Sepharose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben. Die Sepharose wurde für 1h unter leichtem Schwenken bei 4 °C zur Proteinassoziation inkubiert, danach der Durchfluss gesammelt. Mit 5x 1ml Puffer W wurde die Sepharose gewaschen, die Elution erfolgte mit 7 x 0,2 ml Puffer E.

6.9.3.2 Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Zellen (Pellet von 1l Anzuchtkultur) wurden über Nacht in durch Rühren in 10 ml Denaturierungspuffer aufgeschlossen. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wurde der Rohextrakt gewonnen. Dieser wurde durch Gelfiltration oder Dialyse renaturiert. So wurde zum einen auf eine mit Puffer W äquilibrierte Gelfiltrationssäule (TM75) 250 µl Rohextrakt gegeben und mit 0,4 ml/min eluiert. Zum anderen wurde der Rohextrakt 3x2h bei 4°C gegen Puffer W dialysiert. Die renaturierten Proben wurden über 500 µl mit Puffer W äquilibriertes Strep-Tactin gegeben, mit 10 Säulenvolumen Puffer W gewaschen und mit 2x 1ml Puffer E eluiert.

6.9.4 Intein-Fusions-Proteine

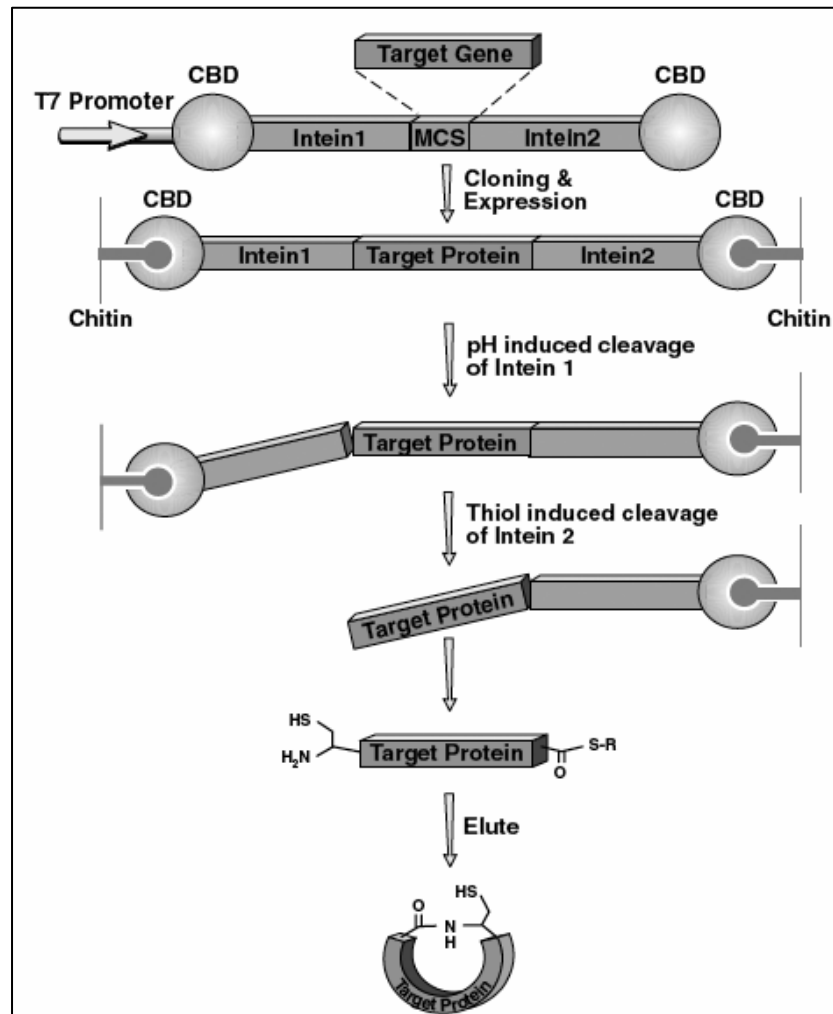
Chitinbindene Domänen in selbstspaltenden Inteinen erlauben eine Reinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an Chitin. Intein1 ist ein Mini-Intein, abgeleitet vom *Synechocystis sp dnaB* Gen und so modifiziert, dass eine pH- und temperaturabhängige Spaltung nach seinem C-terminalen Asparaginrest möglich ist.

Intein 2 ist ein Mini-Intein abgeleitet vom *Mycobacterium xenopi gyrA* Gen (pTWIN1) bzw. Intein 3 vom *Methanobacterium thermoautotrophicum rir1* Gen (pTWIN2). Diese unterliegen in Gegenwart von Thiolreagenzien einer Selbstspaltung an ihrem N-terminalen Cysteinrest.

Die hier untersuchte intrazelluläre Domäne der δ -Untereinheit des nAChR wurde zwischen zwei selbstspaltende Inteine fusioniert. Durch Spaltung entsteht am N-Terminus des untersuchten Proteins ein Cysteinrest und am C-Terminus eine aktive Thioestergruppe. Diese reagieren zu einer Peptidbindung, wodurch eine Verbindung von N- und C-Terminus möglich ist.

Abbildung 6.1
Prinzip des Inteinspaltung und
Intein-vermittelten
Proteinligation

Zwischen zwei Inteinen mit Chitinbindungsdomäne wird das Targetprotein exprimiert. Gebunden an Chitin-Matrix erfolgt die erste pH-induzierte Spaltung am C-Terminus des Intein 1, wodurch am N-Terminus des Targetproteins ein freier Cysteinrest entsteht. Die Abspaltung des Intein 2 erfolgt in Gegenwart eines Thiolreagenz (hier als R gekennzeichnet), wodurch am C-Terminus des Targetproteins eine reaktive Thiolgruppe entsteht. Der Cysteinrest am N-Terminus und die freie Thiolgruppe am C-Terminus können zu einer Peptidbindung ligieren.



6.9.4.1 Zellaufschluss

Das Zellpellet von 600 ml Anzuchtkultur wurde in 10 ml Puffer A resuspendiert, mit complete Protease Inhibitor Cocktail versetzt und die Proben dreimal 30 sec mit einem Ultraschallpuls auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde der Rohextrakt durch Abzentrifugation der Zelltrümmer für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C erhalten.

6.9.4.2 Reinigung an Chitin/ Inteinspaltung

3 ml Chitin-Matrix werden in einer PolyPrep Säule mit Puffer A äquilibriert. Der Rohextrakt wurde aufgetragen und 1h unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit 20 Säulenvolumen Puffer A gewaschen und im gleichen Puffer (1,5 Säulenvolumen) 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Matrix wurde am nächsten Tag mit

20 Säulenvolumen Puffer B gewaschen und im gleichen Puffer (1,5 Säulenvolumen) 24h bei 4 °C inkubiert. Der Durchfluss und zwei weitere Fraktionen, die mit 2x1 ml Puffer B eluiert wurden, enthielten das korrekt gespaltene Proteininsert.

6.9.5 GST-Fusionsproteine

6.9.5.1 Zellaufschluss und Reinigung an Glutathion-S-Sepharose

Das Zellpellet von 800 ml Anzuchtkultur wurde in 10 ml PBS-Puffer mit 5 mM DTT resuspendiert und mit 0,1 mg/ml Lysozym, complete Protease Inhibitor Cocktail, 1 µl/ml Benzonase 30 min auf Eis inkubiert und anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischendurch im 30 °C Wasserbad aufgetaut. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand auf 500 µl mit PBS-Puffer äquilibrierte Glutathion-S-Sepharose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben. Die Sepharose wurde für 1h unter leichtem Schwenken bei 4 °C zur Proteinassoziation inkubiert, danach der Durchfluss gesammelt. Mit 10 Säulenvolumen PBS-Puffer wurde gewaschen, die Elution erfolgte mit 0,5 ml GST-Elutionspuffer.

6.9.5.2 Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa

Nach dem Waschschrift erfolgte ein Pufferaustausch gegen Faktor Xa-Spaltpuffer, in dem die Sepharose mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen mit 10 Säulenvolumen dieses Puffers gewaschen wurde. Anschließend wurde die Sepharose in 1 ml Faktor Xa-Spaltpuffer resuspendiert und mit 5 µl Faktor Xa Protease versetzt. Nach 1h, 2h, 4h, 6h und 20 h bei Raumtemperatur bzw. 4 °C wurde eine Probe für die SDS-Gel und Western Blot Analyse von der Sepharosesuspension genommen.

6.9.6 MBP-Fusionsproteine

6.9.6.1 Zellaufschluss und Reinigung an Amylose

Das Zellpellet von 200 ml Anzuchtkultur wurde in 10 ml MBP-Puffer resuspendiert und mit 0,1 mg/ml Lysozym, complete Protease Inhibitor Cocktail und 1 µl/ml Benzonase versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischendurch im 30 °C Wasserbad aufgetaut. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Rohextrakt erhalten und auf 500 µl mit MBP-Puffer äquilibrierte Amylose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben. Die Sepharose wurde für 1h unter leichtem Schwenken bei 4 °C zur Proteinassoziation inkubiert, danach der Durchfluss gesammelt. Mit 10 Säulenvolumen MBP-Puffer wurde gewaschen, die Elution erfolgte mit MBP-Elutionspuffer mit 10 mM Maltose.

6.9.6.2 Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa, Enterokinase und Geranase

Die Elutionsfraktionen (0,5 ml) wurden auf eine mit Spaltungspuffer äquilibrierte NAP-Säule gegeben, und mit 1 ml Spaltungspuffer eluiert. Dazu wurden 10 µl der entsprechenden Protease gegeben, und nach 6h und 20 h bei 4°C bzw. bei Raumtemperatur eine Probe auf dem SDS-Gel analysiert.

6.9.7 SUMO-Fusionsproteine

6.9.7.1 Expression und Zellaufschluss

Das Zellpellet von 100 ml Anzuchtkultur wurde in 10 ml SUMO-Puffer mit 1% Dodecylmaltosid resuspendiert, mit complete Protease Inhibitor Cocktail versetzt und durch dreimaligen Ultraschallpuls auf Eis aufgeschlossen. Alternativ erfolgte der Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen, in dem das Pellet für 2 h in Denaturierungspuffer gerührt wurde.

Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand auf 500 µl mit SUMO-Puffer bzw. Denaturierungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-HP-Sepharose in einer PolyPrep Chromatographie Säule gegeben.

6.9.7.2 Proteinreinigung an Ni-NTA-HP Sepharose

Die Sepharose wurde für 1h unter leichtem Schwenken bei 4 °C zur Proteinassoziation inkubiert, danach der Durchfluss gesammelt. Zur Renaturierung (denaturierender Zellaufschluss) und Reinigung wurde mit 10 Säulenvolumen SUMO-Puffer gewaschen. Es folgten zwei Elutionsschritte (2 x 0,5 ml) mit SUMO-Elutionspuffer mit 200 mM Imidazol und drei Elutionsschritte (3 x 0,5 ml) mit 500 mM Imidazol.

6.9.7.3 Abspaltung von SUMO mit SUMO-Protease

Die Elutionsfraktionen wurden 1:5 verdünnt, da die SUMO-Protease nur bei einer Salzkonzentration unter 150 mM NaCl und 150 mM Imidazol aktiv ist. Der Verdau erfolgte in einem Ansatz: 100 µl Elutionsfraktion, 340 µl Wasser, 50 µl 10x SUMO-Proteasespuffer und 10 µl Protease über Nacht bei 4°C bzw. für 1 h bei 30°C.

6.10 Proteincharakterisierung

6.10.1 Limitierte Proteolyse

0,3 mg/ml His-TID in Rückfaltungspuffer und in Phosphatpuffer mit DPC wurden mit folgenden Konzentrationen Trypsin und Proteinase K versetzt: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min, 2h und 20h wurde die Reaktion durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer und kochen bei 5 min gestoppt. Für die Ansätze mit Dodecylphosphocholin erfolgte vor dem Versetzen mit SDS-Probenpuffer eine Chloroform-Methanol-Fällung.

6.10.2 Dynamische Lichtstreuung

Bei der Messung der dynamischen Lichtstreuung kann die Größe von Makromolekülen und Partikeln in Lösung bestimmt werden. Die Probe wird mit einem Laser bestrahlt und die Intensität der gestreuten Strahlung bei einem bestimmten Streuwinkel gemessen. Die Schwankungen des Feldes der gestreuten Welle werden durch die Zeit-Autokorrelationsfunktion (ACF) beschrieben, für den Fall identischer und kugelförmiger Moleküle nicht sie die Form einer einfachen Exponentialfunktion an. Diese enthält den Translationsdiffusionskoeffizient (D), wodurch sich der Stokessche Radius (Rs), also die Abmessungen eines hydratisierten Moleküls berechnen lässt.

$$R_s = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}$$

k_B : Boltzmann-Konstante
 T : Temperatur
 η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

Alle Proben wurden vor der Messung durch 4mm Millex Durapore (PVDF) Membranen gefiltert und 20 µl in eine Küvette (Hellma, Typ 105.252-QS) überführt. Die Messung erfolgte in einem Spectroscatter-201 (RiNA) mit einem Laser bei 685 nm, 30 mW und wurde mit der zugehörigen Software ausgewertet.

6.10.3 Analytische Ultrazentrifugation

Die Charakterisierung des Protein-Detergenz-Komplexes His-TID mit Dodecylphosphocholin erfolgte durch eine analytische Ultrazentrifugation in einer Beckman XL-1 analytischen Ultrazentrifuge mit Absorptions- und Interferenzoptik. Das Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment wurde bei 20 °C durchgeführt. Die Proben wurden in einer Doppelsektorzelle mit Wasser im Referenzsektor analysiert, da die freie

Detergenzkonzentration in der Proteinprobe nicht exakt bekannt war und somit keine Referenzlösung zur Verfügung stand. Untersucht wurde His-TID in Phosphatpuffer mit ca. 50 mM DPC in folgenden Konzentrationen: 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml und 0,3 mg/ml. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 60000 rpm und die Sedimentationsmuster wurden durch Messung der Interferenz bei 675 nm und der Absorption bei 290 nm aufgenommen. Aus der Analyse der sich mit der Zeit ausbildenden Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und der Lösung der sedimentierenden Teilchen kann eine Verteilung von Sedimentationskoeffizienten s ermittelt werden. Der s -Wert wird bestimmt durch die folgende Gleichung:

$$s \equiv \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{Nf} = \frac{u}{\omega^2 r}$$

s : Sedimentationskoeffizient in S (Svedberg)= 10^{-13} sec

M : Molekulargewicht

N : Avogadro'sche Zahl

f : Reibungskoeffizient

\bar{v} : partielles spezifisches Volumen des Makromoleküls

ρ : Dichte des Lösungsmittels

ω : Winkelgeschwindigkeit

r : Abstand r von der Rotationsachse

Der Sedimentationskoeffizient beschreibt, wie schnell ein Partikel in einem Einheitsfeld um eine bestimmte Wegstrecke sedimentiert, und hängt von den Eigenschaften des untersuchten Moleküls, unter anderem der Form und dem Molekulargewicht ab. Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung einer $c(S)$ Verteilung mit dem Programm Sedfit (Schuck, 2000). Damit kann eine vollständige Beschreibung des Partikeltransports nach einem Modellexperiment erfolgen. Eine gute Anpassung wird dadurch definiert, dass die Standardabweichung der Kurvenanpassung minimal ist und keine systematischen Fehler auftauchen, was durch die Angabe der Residuen deutlich gemacht wird. Die Parameter Dichte, partielles spezifisches Volumen des Makromoleküls und die Viskosität wurden aus der bekannten Zusammensetzung des Lösungsmittels und der Sequenz des Proteins mit Hilfe des Sedterp (Laue et al., 1992) berechnet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. des Oligomerisierungszustandes von His-TID wurden Sedimentationsgleichgewichtsexperimente durchgeführt. Dafür wurde eine Lösungsmitteldichte bestimmt, in der Mizellen und an Protein gebundenes Detergenz nicht

mehr sedimentieren, d.h. die Sedimentation nur von den Proteineigenschaften abhängt (Reynolds und Tanford, 1976; Reynolds und McCaslin, 1985). In dem verwendeten Puffer (20 mM DPC, 50 mM Tris pH 7,4 und 150 mM NaCl) wurde diese Dichte in Gegenwart von 51% (v/v) D₂O erreicht. Dies entspricht einer Dichte von 1,06 g/ml (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), das berechnete partielle Spezifische Volumen liegt unter den experimentellen Bedingungen bei 0,7354 ml/g. Die Läufe erfolgten bei 20 °C und 20.000, 30.000 und 40.000 rpm bis zur Einstellung des apparenten Sedimentationsgleichgewichts. Die Detektion erfolgte durch Interferenzoptik. Es wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen in Gegenwart unterschiedlicher DPC-Konzentrationen: 2 mg/ml mit 50 mM DPC, 2 mg/ml mit 25 mM DPC und 1 mg/ml mit 25 mM DPC untersucht; wovon jeweils eine 1:1, eine 1:2 und eine 1:4 Verdünnung mit Puffer ohne Detergenz (also bei gleichem Protein-Detergenz-Verhältnis) analysiert wurde. Dadurch sollte ein Einfluss der Proteinkonzentration und eine Abhängigkeit vom Protein-Detergenz-Verhältnis auf das Oligomerisierungsverhalten von His-TID untersucht werden.

Die aufgenommenen Daten beschreiben das Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion, also das apparente Sedimentationsgleichgewicht. Dieses lässt sich für ideale Lösungen mit einheitlichen Makromolekülen mit folgender Exponentialgleichung ausdrücken:

$$c_r = c_0 e^{[\sigma(r^2 - r_0^2)]}$$

mit c_r : lokale Konzentration (Radius r)

c_{r_0} : Konzentration des Monomers am Referenzort (Radius r_0)

R : Gaskonstante

T : Temperatur

σ : auftriebkorrigiertes, reduziertes Molekulargewicht, definiert als:

$$\sigma = \frac{\omega^2}{2RT} M(1 - \bar{v}\rho)$$

Diese Gleichung kann entsprechend erweitert werden, um die Verteilung polydisperser Systeme zu beschreiben. Die Auswertung der Gradienten erfolgte mit dem Programm Nonlin (Johnson et al., 1981), mit dessen Hilfe die Daten an mehrere Modelle angepasst wurden. Eine geeignete Modellbeschreibung wurde gefunden durch die Kurvenanpassung aller Läufe bei unterschiedlicher Konzentration, unterschiedlichem Protein-Detergenz Verhältnis und bei unterschiedlicher Rotorgeschwindigkeit. Die Wahrscheinlichkeit des Modells wurde an Hand

der Standardabweichung (r.m.s.d.: root mean squared deviation), der beobachteten unsystematischen Fehler (Residuen) und der Übereinstimmung der ermittelten Molmasse mit der theoretisch erwartete Molmasse bestimmt.

6.11 Proteinanalytische Methoden

6.11.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. Sie wurde als vertikale Plattenelektrophorese im diskontinuierlichen System durchgeführt. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden 10 %ige oder 15 % ige SDS-Trenngele mit 3% igen Sammelgelen eingesetzt.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Proteinproben mit hoher Detergenzkonzentration (über 1%) wurden einer Chloroform-Methanol-Fällung unterzogen. 125 µl der Proteinlösung wurden mit 100 µl Chloroform und 300 µl Methanol versetzt, gemischt und anschließend mit 400 µl Wasser versetzt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge, wurde der Überstand verworfen. In der Interphase befand sich das Protein, welches durch Zugabe von 300 µl Methanol und 4 min Zentrifugation pelletiert wurde. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht.

Die Gelelektrophorese wurde im SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 18 mA durchgeführt, bis die Blaufront die untere Gelkante erreicht.

Zum Färben der Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese für 15–30 min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur und anschließend Coomassie-Entfärbelösung zum vollständigen Entfärben des Gelhintergrundes geschüttelt.

Für die Silberfärbung wurden die Gele über Nacht in Fixierlösung geschüttelt. Es folgte eine Inkubation mit Glutaraldehydlösung für 2 Stunden. Anschließend wurde das Gel 3 x 2h mit Wasser gewaschen und dann im Dunkeln mit der Silberlösung 30 min unter Schütteln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift von 30 sec mit Wasser, wurde auf das Gel die Entwicklerlösung gegeben und bei Erscheinen der Banden mit Stopplösung die Entwicklungsreaktion gestoppt.

Bei der Verwendung von Criterion Precast Gelen wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Für die 4-12% Bis-Tris-Gele wurden mit 1x XT MES Running Buffer bei einer konstanten Spannung von 150 V gefahren.

Für die Analyse von kleinen Proteinen wurden *Criterion Tricine* Gele, 16,5% verwendet. Die Proben wurden in Tricin-Probenpuffer 1:1 für 5 min bei 95°C gekocht. Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V mit Tricin-Laufpuffer.

6.11.2 Westen Blot

In einer Carbonglas-Blottkammer erfolgte der Transfer der Proteine von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Auf die Anodenplatte wurden drei Schichten in Blotpuffer getränktes Filterpapier gelegt, darauf die ebenfalls in Blotpuffer getränkte Nitrocellulosemembran und darauf das ungefärbte SDS-Gel. Anschließend wurden nochmals drei Schichten in Blotpuffer getränktes Filterpapier aufgelegt und mit der Kathodenplatte verschlossen. Mit beschwertem Deckel (2 kg) erfolgte der Transfer für 90 min bei 1A/cm² Blotmembran.

Nach dem Lauf wurden die Membranen 5 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser entfärbt, wodurch die Banden der transferierten Proteine sichtbar wurden und die Markerbanden markiert werden konnten.

Der Blot wurde über Nacht bei 4 °C in Blotto geschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Mit dem ersten Antikörper, verdünnt in Blotto, wurde der Blot 1h inkubiert. Anschließend wurde drei mal 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgte für 1h die Inkubation des zweiten Antikörpers, verdünnt in Blotto ohne Azid. Im Folgenden wurde wieder zweimal 10 min mit TBST-Puffer und einmal 10 min mit TBS gewaschen. Für die ECL-Reaktion wurde die gewaschene Blotmembran 5 min mit 125 µl/cm² einer 1:1 Mischung der Lösungen A und B (Super Signal West Pico Kit) inkubiert, abgetropft und gegen einen ECL-Hyperfilm exponiert.

Zum Strippen wurde die Blotmembran mit Strip-Puffer 30 min bei 56 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend für 3x10 min in TBS gewaschen. Für eine weitere Entwicklung folgte die Blockierung in Blotto.

6.11.3 Proteinbestimmung

6.11.3.1 Bradford

5-20 µg Protein wurden in 500 µl H₂O mit 500 µl Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte an Hand einer Eichreihe mit dem Standardprotein BSA, welches in mehreren Verdünnungen zwischen 0-20 µg Protein/Ansatz vermessen wurde.

6.11.3.2 BCA

Die Eichreihe wurde analog zum Bradford-Test aufgestellt. 5-20 µg Protein werden in 50 µl H₂O mit 1 ml BCA-Mix versetzt. Dieser Mix wurde aus 1 Anteil Lösung A und 1/50stel Lösung B (BCA Protein Assay Kit) angesetzt. Die Proben wurden 30 min bei 60 °C inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen.

6.12 Spektroskopische Methoden

6.12.1 UV/VIS Spektroskopie

6.12.1.1 Bakteriendichte

Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm. Eine Absorptionseinheit (OD₆₀₀) entspricht dabei etwa einer Bakteriendichte von 1x10⁹ Zellen/ml.

6.12.1.2 Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde über das Lambert–Beersche Gesetz durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Demnach gilt folgender Zusammenhang zwischen der Absorption A und der Konzentration c [M]:

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

ε [M⁻¹·cm⁻¹]: molekularer Extinktionskoeffizient

d [cm]: Schichtdicke der Küvette

6.12.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA–Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Dabei gilt im Allgemeinen, dass 1 A₂₆₀ einer dsDNA–Menge von 50 µg/ml entspricht (Sambrook et al., 1989).

6.12.2 Circular dichroismus–Spektroskopie

Alle Circular dichroismus (CD)–Spektren wurden an einem JASCO J–600 Spektropolarimeter (Jasco, Groß–Umstadt) mit einer Empfindlichkeit von 20 mdeg, einer Zeitkonstante von 1 s, einer Bandbreite von 1 nm und einer Auflösung von 0,1 nm aufgenommen. Es wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bzw. 0,1 cm verwendet. Dabei wurden jeweils sechs Spektren akkumuliert und um das Pufferspektrum korrigiert.

Die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest wurde berechnet (Schmid 1990):

$$[\theta]_{\text{MRW}} = (\theta \cdot 100) / (c \cdot d \cdot N)$$

- mit $[\theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$]
 θ : gemessene Elliptizität [deg]
 c : Proteinkonzentration [M]
 d : Küvettschichtdicke [cm]
N: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Für die Sekundärstrukturvorhersage wurden der k2D Algorithmus (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d.html>) und CONTIN (<http://s-provencher.com/pages/contin-cd.shtml>) angewandt.

6.12.3 NMR

Für die 1D- ^1H -NMR-Spektren wurden 300 μM His-TID und His-RID in Phosphatpuffer wurden mit 10 % (v/v) D_2O versetzt und bei Raumtemperatur gemessen.

Zusätzlich wurden die Proteine in M9-Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als einzige Stickstoffquelle exprimiert. Die Reinigung erfolgte analog der unmarkierten Proteine, die Rückfaltung in Gegenwart von deuteriertem DPC. 300 μM der ^{15}N isotopgelabelten Proteine in Phosphatpuffer mit deuteriertem DPC wurden mit 10 % (v/v) D_2O versetzt. Die Messung der Spektren erfolgte an einem Bruker DRX600 Spektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit einem Kryoprobekopf. Die Aufnahme der ^{15}N HSQC Spektren erfolgten 32 scans (Zahl der akkumulierten FIDs) und 128 Inkrementen in F1 bei Raumtemperatur.

6.12.4 Massenfingerprint/MS-Analyse

Zur Identifizierung der Proteine mit MS-Fingerprint wurden die Banden aus einem coomassiegefärbten SDS-Gel ausgeschnitten und in etwa 1x1 mm große Stücke zerkleinert. In einem 500 μl - Eppendorfgefäß wurden diese mit 20 μl 1 : 1 Acetonitril : 100 mM NH_4HCO_3 für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch 20 μl 100 % Acetonitril ersetzt. Dieser Überstand wurde nach ca. 5 min abgenommen. Wenn die Gelstücke noch nicht milchig weiß sind, wurde nochmals Acetonitril dazugegeben, inkubiert und der Überstand abgenommen. Die Gelstücke wurden dann 10 min lyophilisiert und anschließend für 30 min bei 56 °C in 20 μl 100 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 inkubiert. Das Volumen des hier abzunehmenden Überstandes wurde hier für den späteren Verdau genau bestimmt. Die Gelstücke wurden erneut für 5-10 min in 20 μl 100 % Acetonitril inkubiert und der Überstand durch 20 μl 55mM Iodacetamid ersetzt. Diese Probe wurde 20 min im Dunkeln inkubiert. Der

Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke erneut 15 min in 100 mM NH_4HCO_3 gespült, 5 min mit 100 % Acetonitril behandelt und lyophilisiert. Die getrockneten Gelstücke wurden mit Trypsin versetzt, und zwar mit dem oben bestimmten Volumen + 3 μl , anschließend 30 min auf Eis und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben zentrifugiert und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. 1 μl des erhaltenen Überstandes wurden auf eine *fast-evaporation* Nitrocellulose/ α -Cyano-4-Hydroxymizsäure-Matrix aufgetragen und mit MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem Bruker Reflex Massenspektrometer im Reflektormode, ausgestattet mit einem Puls-Ionen und einem Stickstofflaser (337nm), analysiert.

Die Datenanalyse der bestimmten Peptidmassen erfolgte mit der Mascot-Suchmaschine (Matrix Science Ltd.) auf <http://www.matrixscience.com> mit den Suchparametern: mono-isotopic masses M+H, mass tolerance ± 50 ppm, maximum one missed cleavage site.

Für die Bestimmung der Gesamtmasse, wurde das Protein in 40% Acetonitril / 0.1% TFA auf 10–20 pmol/ μl verdünnt und α -Cyano-4-Hydroxymizsäure als Matrix benutzt.