

### 3. Methoden

#### 3.1 Methoden zur Nukleinsäure-Aufreinigung und -Analytik

##### 3.1.1 Ethanol-und Isopropanol-Präzipitation

Die Ethanol-Präzipitation (oder -Fällung) dient vor allem der Konzentrierung von Nukleinsäuren (Shapiro, 1981) aber auch der Entfernung von Salzen, die hierbei überwiegend in Lösung bleiben. Die Ausbeute an präzipitierter Nukleinsäure ist gewöhnlich sehr hoch und selbst aus gering konzentrierten Lösungen mit Nukleinsäurekonzentrationen von 10 ng/ml kann DNA bzw. RNA quantitativ präzipitiert werden. Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit einem zehntel Volumen einer 3 M Stammlösung Natriumacetat pH 4,8-5,2 versetzt und mit dem doppelten Volumen  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wird der Fällungsansatz für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $15000\times g$  zentrifugiert. Das Sediment wird anschließend mit  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem, 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation der Überstand gründlich abgenommen. Das Sediment wird je nach Größe vor der Wiederaufnahme in wässriger Lösung 5-15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei der Fällung mit Isopropanol wird nach dem Versetzen mit Natriumacetatlösung lediglich mit dem 0,7-fachen Volumen Alkohol gemischt. Der Vorteil liegt in dem deutlich geringeren Fällungsvolumen. Die Fällungseffizienz ist jedoch geringer. So können gering konzentrierte Lösungen kleiner RNA- bzw. DNA-Fragmente nicht quantitativ gefällt werden. Der Fällungsansatz wird hier 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  oder 1 Stunde bei  $15^{\circ}\text{C}$  und  $15000\times g$  zentrifugiert.

##### 3.1.2 Phenol-Extraktion

Aus wässrigen Lösungen von Nukleinsäuren können Proteine durch Phenol-Extraktion abgetrennt werden. Dabei werden die Proteine denaturiert und verworfen, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst verbleiben (Kirby, 1956; Kurland, 1960).

Die wässrige Nukleinsäurelösung wird mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem Phenol pH 4-4,5 oder bei Bedarf mit Natriumacetat pH 4,5 gepuffertem Phenol für RNA-Aufarbeitungen bzw. Tris-HCl pH 8,0 gepuffertem Phenol für DNA-Aufarbeitungen versetzt und durch dreiminütiges intensives Schütteln gründlichst vermischt. Eine 20-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und mindestens  $6000\times g$  führt zu einer Trennung in eine organische Phenolphase (unten), eine Interphase, die denaturiertes Protein enthält und eine wässrige Phase. Die obere, wässrige Phase, in der die Nukleinsäure gelöst vorliegt, wird sorgfältig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um eine möglichst effiziente Abtrennung der

Proteine erzielen zu können wird die Extraktion mindestens ein mal wiederholt. Alternativ kann die Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Volumenverhältnis von 25:24:1 durchgeführt werden. Dies kann zu einer verbesserten Trennung der Phasen führen. Um eine höhere Ausbeute der Nukleinsäure zu erzielen, kann die phenolische Phase mit wäßriger Lösung reextrahiert werden.

Anschließend wird die wäßrige Phase der Phenol-Extraktion in ein neues Gefäß überführt und mit dem selben Volumen Chloroform versetzt. Nach kurzem Durchmischen und kurzzeitiger Zentrifugation wird die obere, wäßrige Phase abgenommen und die Extraktion noch einmal wiederholt. Dabei werden Phenolreste aus der wäßrigen Phase entfernt. Verbliebene Chloroformreste können durch Ethanol- oder Isopropanol-Präzipitation entfernt werden.

### 3.1.3 Gelfiltration

Die Gelfiltration dient der Trennung von Molekülen nach Größe und Form. Das Trennprinzip beruht auf verschiedenen Verteilungsgleichgewichten der Komponenten eines Gemisches im Säulenmaterial. Die stationäre Phase besteht aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten Materials - in der Regel polymere organische Verbindungen - mit relativ konstanter molekularer Porenweite. In Abhängigkeit der Größe der Kügelchen und Poren stehen unterschiedliche Volumina für die zu trennenden Substanzen zur Verfügung. Je größer das zu trennende Molekül desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Diffusion in die Gelkügelchen. Größere Moleküle wandern daher mit größerer Geschwindigkeit durch die Säule als kleine.

Zum Entsalzen von Proteinlösungen oder *in vitro* synthetisierter DNA oder RNA sowie zur Abtrennung von einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäure-Oligomeren bis zu einer Größe von etwa 10 Nukleotiden eignen sich NAP-Säulen der Firma Pharmacia. Die Gelmatrix, Sephadex G-25, besteht aus porösen Polymerkügelchen des Dextran-Typs. Die NAP-5-Säule wird mit dem dreifachen Säulenvolumen Reinstwassers equilibriert und die zu reinigende Lösung in einem Volumen von 500 µl aufgetragen. DNA und RNA können anschließend mit 1 ml Reinstwasser eluiert werden. Wenn es das Trennverhalten der zu isolierenden Substanz zuläßt, kann das Elutionsvolumen verringert werden, was zu einer verbesserten Abtrennung von Salzen führen kann. So können Nukleinsäuren mit einer Länge von mehr als 25 Nukleotiden problemlos in einem Elutionsvolumen von 900 µl nahezu quantitativ isoliert werden. Dabei können im allgemeinen die ersten 200 µl des Eluats ohne Ausbeuteverlust verworfen werden. Um eine nahezu hundertprozentige Abtrennung von Nukleosidtriphosphaten erzielen zu können, kann die nukleinsäurehaltige Lösung zusätzlich im Anschluß an die Gelfiltration einer Ethanol- oder Isopropanol-Präzipitation unterzogen werden.

### 3.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der  $\pi$ -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren absorbieren DNA und RNA ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Mit Hilfe der UV-Absorptionsspektroskopie kann die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung ermittelt und die Reinheit der nukleinsäurehaltigen Lösung näherungsweise bestimmt werden. Dazu wird ein Spektrum im Bereich zwischen 200 und 300 nm aufgenommen. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden. Für reine DNA-Lösungen erhält man Werte um 1,8 und für RNA-Lösungen um 2,0. Die Absorption bei 260 nm dient als Grundlage für die Konzentrationsberechnung. Je nach Typ der Nukleinsäure können verschiedene Umrechnungsfaktoren eingesetzt werden. Diese, auf Lösungen mit einer Schichtdicke von 1 cm bezogenen Näherungswerte, sind abhängig von der relativen Basenzusammensetzung der Nukleinsäure. Für einzelsträngige DNA-Oligomere entspricht 1 Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von etwa 33  $\mu\text{g/ml}$ . Für RNA beträgt dieser Wert etwa 40  $\mu\text{g/ml}$  und für doppelsträngige DNA etwa 50  $\mu\text{g/ml}$ .

## 3.2 Gelelektrophorese

Das Trennprinzip der Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Mobilität geladener Moleküle im homogenen elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix mit definierter Porengröße. In Abhängigkeit der zu trennenden Substanzen kommen in erster Linie Gele aus Agarose und Polyacrylamid zur Anwendung.

### 3.2.1 Native und denaturierende Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese in Agarosegelen dient der Auftrennung von Nukleinsäuren zu analytischen Zwecken sowie zu deren Aufreinigung. Das Prinzip der Auftrennung beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Moleküle im homogenen elektrischen Feld. Aufgrund der weitestgehend identischen Ladungsdichte von Nukleinsäuren hängt deren Mobilität hauptsächlich von der Gesamtladung und damit von der Molekülgröße sowie von der Struktur ab. Dabei ist die Laufstrecke eines Fragments dem dekadischen Logarithmus der Fragmentlänge weitgehend proportional (Helling et al., 1974). Mit Hilfe von Größenstandards kann die Größe eines Fragments ermittelt werden. Die optimale Auftrennung wird durch die Agarosekonzentration im Gel (Tab. 2) festgelegt.

Agarosekonzentration [%]	Trennbereich von DNA-Fragmenten [Bp]
0,7	800 - 10000
0,8	500 - 7000
1,2	400 - 6000
1,5	200 - 4000
2,0	100 - 3000

Tab. 2 Agarosekonzentration für Trennbereiche von DNA-Fragmenten

Die Agarose wird in TBE-Puffer gekocht und gelegentlich geschwenkt bis keine festen Bestandteile mehr zu erkennen sind und sich keine Schlieren mehr bilden. Die Lösung wird in eine Gelkammer aus Plexiglas mit einem Taschenformer (Kamm) gegossen. Nach 30 min erstarrt das Gel. Es wird in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Bei nativer Elektrophorese wird die zu trennende Nukleinsäurelösung mit einem fünftel ihres Volumens an 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die pufferbedeckten Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung mit einer Feldstärke von 8-10 V/cm. Bei denaturierender Elektrophorese, die in erster Linie für RNA Anwendung findet, wird die Probe mit dem dreifachen Volumen MOPS-Probenpuffer versetzt und für 3-10 min bei 60°C erhitzt. Alternativ kann für RNA-Gele MOPS-Laufpuffer verwendet und zur Unterstützung der denaturierenden Wirkung das Gel mit Formaldehyd in einer Endkonzentration von 2 % (v/v) versetzt werden.

Die Nukleinsäurefragmente können mit Hilfe von Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht mit der Wellenlänge von 302 nm in Form von Banden mit intensiv orangefarbener Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (Sharp et al., 1973). Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarte Basen der Nukleinsäure. Es kann der Gellösung vor dem Erstarren in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben werden. Das Laufverhalten von zirkulärer, superhelikaler Plasmid-DNA kann dabei beeinflusst werden, da deren Konformation durch interkaliertes Ethidiumbromid verändert wird. Alternativ kann das Gel nach der Trennung durch 30 minütiges Schwenken in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt werden. In Tabelle X sind die Zusammensetzungen der erforderlichen Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese aufgeführt.

<b>A</b>	<b>TBE-Puffer pH 8,3</b>	<b>6x DNA-Probenpuffer</b>	<b>Gelzusammensetzung</b>
	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA	30 % (v/v) Glycerol 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanolblau	0,8-2 % Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 1 x TBE-Puffer
<b>B</b>	<b>MOPS-Puffer pH 7</b>	<b>MOPS-Probenpuffer</b>	<b>Gelzusammensetzung</b>
	20 mM MOPS-NaOH 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA	1 ml Formamid (deionisiert) 332 µl 37 % Formaldehyd 200 µl 10x MOPS-Puffer 0,1 % Bromphenolblau 17 µl 10 g/l Ethidiumbromid	0,8-2 % Agarose 1 x MOPS-Puffer 2 % Formaldehyd

Tab. 3 Lösungen für die native (A) und denaturierende (B) Agarosegel-Elektrophorese

Zur präparativen Aufreinigung kann eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert werden. Dazu wird das Gelstück mit einem Skalpel intensiv zerkleinert und mit dem selben Volumen Phenol pH 8 versetzt. Nach 10 min intensivem Schütteln wird in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, wobei das Gel kollabiert. Nach dem Auftauen, weiterem fünfminütigen Schütteln und einer Zentrifugation für 10 min bei 15000xg und Raumtemperatur wird die wäßrige Phase isoliert. Phenol und die Agarose enthaltende Interphase werden mit einem Gelvolumen TE-Puffer wie oben reextrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden noch mindestens zweimal phenolextrahiert bis keine weißliche Trübung mehr zu erkennen ist. Nach zweimaliger Chloroformextraktion wird die DNA-Lösung einer Ethanol- oder Isopropanol-Präzipitation unterzogen.

### 3.2.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen dient sowohl der analytischen Trennung von DNA und RNA als auch von Peptiden und Proteinen. Darüberhinaus kann sie auch zur präparativen Aufreinigung von RNA- und DNA-Molekülen eingesetzt werden. Für Nukleinsäuremoleküle hat die Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Vergleich zur Agarosegel-Elektrophorese im allgemeinen eine höhere Beladungskapazität sowie eine größere Trennkapazität.

Wenn native Konformationen der zu trennenden Moleküle erhalten bleiben sollen, kann die Elektrophorese unter nativen Bedingungen erfolgen. Unter denaturierenden Bedingungen kann dagegen die relative Molekülgröße durch Vergleich mit Größenstandards ermittelt werden. Zur Denaturierung bei der Trennung von Nukleinsäuren wird Harnstoff eingesetzt. Dieser kann Wasserstoffbrücken-Bindungen höherer Nukleinsäurestrukturen stören und somit die Vereinheitlichung der Struktur verschiedener Nukleinsäuren bewirken. Das Denaturierungsmittel bei der Protein-Elektrophorese ist Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses kann höhere Strukturen in Proteinen aufbrechen und die Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation zwingen. Dabei lagert sich SDS in einem vom Polypeptid abhängigen, jedoch einigermaßen konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS je 1 g Polypeptid an. Die negative Ladung von SDS maskiert die Eigenladung des Polypeptids. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Polypeptide im elektrischen Feld hängt dann nur noch von der zur Molekülgröße proportionalen Ladung ab. Nach Weber & Osborn (1969) besteht zwischen der relativen Mobilität des Proteins und dem Logarithmus des entsprechenden Molekulargewichts ein linearer Zusammenhang. Aus diesem kann das tatsächliche Molekulargewicht näherungsweise bestimmt werden.

Die Gelmatrix besteht aus Polyacrylamid nach einer Radikalkettenpolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid, wobei die Porenweite des Gels über deren Konzentration und das Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid in der Lösung gesteuert werden kann. Die Reaktion wird durch Ammoniumproxidsulfat gestartet und verläuft unter Stabilisierung freier Radikale durch TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin).

## Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese von DNA und RNA

Zwei Glasplatten gleicher Größe werden durch drei Abstandhalter an drei Seiten getrennt und aufeinander geklammert. Harnstoff wird in TBE-Puffer und einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 19:1 gelöst. Nach Filtrieren und 15 min Entgasen im Wasserstrahlvakuum wird die Polymerisation mit einer Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und TEMED mit Endkonzentrationen von jeweils 0,1 % vermischt und die Polymerisation gestartet. Die Gellösung wird dann sofort zwischen die Glasplatten gegossen und unverzüglich ein Taschenformer plaziert. Nach einer Polymerisationsdauer von mindestens 30 min werden der Taschenformer und der gegenüber liegende Abstandhalter vorsichtig entfernt, das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Nach 30-minütigem Vorlauf und intensivem Spülen der Taschen wird die Probe in die Taschen aufgetragen. Dazu wird die in TBE-Puffer vorliegende Nukleinsäurelösung zuvor zur Denaturierung mit 30 % des Endvolumens an Formamid-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 80°C inkubiert. Das Laufverhalten kann in einigen Fällen in Anwesenheit von 0,1 % SDS im Gel sowie in Lauf- und Probenpuffer verbessert werden. Der Lauf erfolgt bei Gelen mit den Dimensionen 20 x 30 x 0,1 cm bei konstanter Leistung von 28 Watt. In Tabelle X sind die Zusammensetzungen der erforderlichen Lösungen für die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgeführt.

Stammlösungen	Formamid-Probenpuffer	Gelzusammensetzung
10 x TBE-Puffer	97 % Formamid (deionisiert)	4-20 % Acrylamid/ Bisacrylamid
40% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1	10 mM EDTA	1 x TBE-Puffer
10 % APS	0,05 % Bromphenolblau	7 M Harnstoff
TEMED	0,05 % Xylencyanol-Blau	0,1 % SDS (optional)

Tab. 4 Lösungen für die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese von DNA und RNA

Nach der Trennung wird das Gel zweimal durch jeweils 15-minütiges sanftes Schwenken in 20 % Methanol, 7,5 % Essigsäure dehydratisiert und fixiert. Das Gel wird auf Filterpapier übertragen und in einer Geltrocknungsapparatur bei 70°C und einem partiellen Vakuum von 50 mbar getrocknet. Schließlich wird mit Hilfe des "Phosphoimager-Systems" ein Autoradiogramm der Banden mit den radioaktiv markierten Nukleinsäuren erstellt.

### **DNA-Sequenzierungs-Elektrophorese**

Die korrekte Nukleotidabfolge der über *in vitro* DNA-Rekombinationstechniken hergestellten Plasmide wird mit Hilfe der DNA-Sequenzierung verifiziert. Neu synthetisierte DNA-Stränge unterschiedlicher Länge aus den vier Sequenzierungsansätzen nach Kettenabbruch durch Einbau von Didesoxyribonukleotiden werden mittels denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese getrennt.

Ein denaturierendes Polyacrylamidgel mit den Dimensionen 32 x 38 x 0,04 cm wird hergestellt. Die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration beträgt hier 6 %. Damit das Gel nach Elektrophorese auf einer Glasplatte haften bleibt, während die kleinere Glasplatte leicht abgelöst werden kann, wird die große Platte mit einem frisch angesetzten Gemisch aus 10 ml Ethanol, 500 µl konzentrierter Essigsäure und 100 µl Methacryloxypropyltrimethoxysilan benetzt. Nach Wiederholung des Vorgangs nach 10 min und einer Trocknungsdauer von einer Stunde wird die Platte zweimal gründlich mit Ethanol abgerieben und für eine weitere Stunde getrocknet. Für die kleine gründlichst mit Scheuerpulver gereinigt Platte werden 10 ml einer Lösung von 2 % Dichlordimethylsilan in Chloroform über die Plattenfläche verteilt, bis sie vollständig verdampft ist. Der Vorgang wird nach 5 min wiederholt. Nach Gießen des Gels, Einsetzen eines speziellen Taschenformers und vollständiger Polymerisation erfolgt ein mindestens 30-minütiger Vorlauf des Gels bei 55 Watt. Die zu trennenden Proben werden vor dem Auftragen mit dem selben Volumen Formid-Probenpuffer versetzt und 2 min bei 96°C inkubiert.

Nach der Elektrophorese wird der Harnstoff des an der großen Platte haftenden Gels 10 min unter laufendem deionisiertem Wasser ausgespült und dann das Gel 45 min bei 50°C getrocknet. Die Detektion der radioaktiv markierten DNA-Banden erfolgt durch Autoradiographie im Phosphoimager-System.

### **SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

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

Zunächst wird das Trenngel auf etwa 80 % der Gelhöhe gegossen und mit 20 % Ethanol überschichtet. Nach mindestens 30 min Polymerisationsdauer wird die überstehende Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesogen, die Sammelgellösung überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das zu trennende Proteingemisch wird mit dem dreifachen Volumen Aceton vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wird das vom Überstand befreite Sediment im Lyophilisator 5 min getrocknet. Durch die Fällung

mit Aceton können Salze, die das Laufverhalten der Proteine beeinflussen sowie Aceton-lösliche Radioaktivität entfernt werden. Das Sediment wird in Laemmli-Probenpuffer gelöst, 3 min bei 90°C inkubiert und auf die mit Laufpuffer bedeckten Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei maximal 15 V/cm unter Kühlung der Glasplatten statt. Die Gelmaße sind 20 x 30 x 0,1 bzw. 12 x 15 x 0,08 cm.

<b>5x Laufpuffer</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Laemmli-Probenpuffer</b>
50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1 % SDS	5 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % SDS 0,2 % TEMED 0,1 % APS	15 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1 % SDS 0,04 % TEMED 0,1 % APS	1 % SDS 8,5 % Glycerol 2,5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

Tab. 5 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli

Die Proteinbanden des Polyacrylamidgels können durch 30-60 min Schwenken in Coomassie blue-Färbelösung sichtbar gemacht werden. Unspezifische Färbung wird durch mehrstündiges Schwenken in Entfärbelösung entfernt. Die Coomassie-Färbung ist die Standardfärbemethode für Proteine und färbt diese irreversibel mit einer Nachweisgrenze von etwa 100 ng.

<b>Coomassie blue-Färbelösung</b>	<b>Entfärbelösung</b>
50 % Methanol 10 % Essigsäure 0,1 % Coomassie blue R250	20 % Methanol 7,5 % Essigsäure

Tab. 6 Lösungen für die Proteingel-Färbung und -Entfärbung

Das gefärbte Gel wird auf Filterpapier übertragen und 3 Stunden bei 70°C in einem partiellen Vakuum von 50 mbar getrocknet. Schließlich wird mit Hilfe des "Phosphoimager-Systems" ein Autoradiogramm der Banden mit den radioaktiv markierten Proteinen erstellt.

### 3.3 Zellanzucht von *Escherichia coli* Zellen

#### 3.3.1 Zellanzucht in Flüssigkultur

10 ml LB-Flüssigmedium (Luria-Bertani) werden zur Selektion plasmidhaltiger Stämme, deren Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen tragen, mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml versetzt und entweder mit einer Spatelspitze gefrorener Stammkultur oder mit einer auf Festmedium gezüchteten Einzelkolonie angeimpft. Das LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Caseinhydrolysat und 10 g/l NaCl) wird zuvor in Erlenmeyerkolben mit Schikane portioniert und 20 min bei 120°C autoklaviert. Das Zellwachstum erfolgt über Nacht im



Schüttelinkubator bei 37°C. Zur Herstellung einer Stammkultur werden 600 µl der Flüssigkultur mit Glycerol in einer Endkonzentration von 10 % versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.3.2 Zellanzucht von Einzelkolonien**

100 µl Zellkultur nach Transformation kompetenter Zellen oder aus einer Flüssigkultur werden auf ampicillinhaltigem LB-Festmedium in Petrischalen (Agarplatten) ausgestrichen und 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen von Flüssigkulturen werden Einzelkolonien mit einer sterilen Platin-Impföse entnommen oder maximal 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Das LB-Festmedium wird durch Versetzen von LB-Flüssigmedium mit Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) angesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C wird mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt und das Medium in sterile Petrischalen portioniert.

### **3.3.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* werden Zellen eingesetzt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase und geringer Zelldichte befinden und diese mit Calciumchlorid behandelt (Cohen et al., 1972; Maniatis et al., 1989b). Mit 100 µl einer Über-Nacht-Kultur von *Escherichia coli* JM109-Zellen werden 100 ml LB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,3 je Milliliter Kultur bei 600 nm inkubiert. Die Zellen werden 4 min bei 4°C und 3000xg sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 20 ml eiskalter 75 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wird wie zuvor zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Sediment wird in 1 ml eiskalter 50 mM Calciumchlorid-Lösung mit 25 % Glycerol aufgenommen, kleine Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.4 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur schnellen Überprüfung der Insertion eines gewünschten Fragments in ein Plasmid mit Hilfe der *in vitro*-DNA-Rekombination können mit der herkömmlichen, analytischen Plasmidisolierung schnell und einfach geringe Mengen Plasmid-DNA isoliert werden (Maniatis, 1989a).

Bei der herkömmlichen Methode werden 1,5 ml Über-Nacht-Flüssigkultur 3 min bei 15000xg und RT (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in 110 µl Resuspensions-Lösung resuspendiert und mit 220 µl Lysis-Lösung unter leichtem Schwenken lysiert. Mit 165 µl Neutralisationslösung und leichtem Schwenken wird chromosomale DNA präzipitiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000xg und RT werden 400 µl des Überstands zur Entfernung von Protein mit Phenol pH 4,5 extrahiert (Kapitel 3.1.2). Nach Chloroform-Extraktion und Isopropanolpräzipitation (Kapitel 3.1.1) wird das Sediment in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und zur Entfernung von RNA 30 min bei 37°C mit Ribonuklease A in einer Endkonzentration von 50 µg/ml inkubiert.

Resuspensions-Lösung	Lysis-Lösung	Neutralisationslösung	TE-Puffer
50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA	0,2 M NaOH 1% SDS	3 M Natriumacetat pH 4,8	10 mM Tris-HCl pH 7,8 0,1 mM EDTA

Tab. 7 Lösungen für die analytische Plasmid-Präparation

Zur Isolierung größerer Plasmid-Mengen und zur Ermöglichung einer Ribonuklease-freien Aufarbeitung eignet sich der für den analytischen Maßstab konzipierte Plasmid-Isolierungs Kit Jetstar der Firma Genomed. Die Methode ist der herkömmlichen sehr ähnlich und unterscheidet sich nur durch die Kapazität von 10 ml Zellkultur je Anwendung sowie den Ersatz der Phenolextraktion sowie der Ribonuklease-Inkubation durch einen einzigen Aufreinigungsschritt über Anionenaustauscher-Chromatographie. Im analytischen Maßstab, bei einem Einsatz von 10 ml Zellkultur erhält man reines Plasmid hoher Replikationsrate mit großen Ausbeuten um 40 µg, wodurch die Notwendigkeit einer präparativen Aufarbeitung entfällt.

### 3.5 Nukleinsäure-modifizierende enzymatische Reaktionen

#### 3.5.1 Behandlung von RNA-Präparationen mit Desoxyribonuklease I

Die Templat-DNA aus *in vitro* Transkriptionsansätzen kann durch Inkubation mit Ribonuklease-freier DNase I entfernt werden. In Anwesenheit von Magnesium-Ionen kann diese DNA statistisch schneiden.

Nach *in vitro* Transkription wird der Reaktionsansatz mit DNase I-Stammlösung der Konzentration 10 U/µl auf 0,2 U/µl Endkonzentration eingestellt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNase wird später zusammen mit anderen Proteinen durch Phenol-Extraktion wieder entfernt (Kapitel 3.9).

### 3.5.2 Behandlung von Nukleinsäurelösungen mit Proteinase K

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

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

Der *in vitro* Translationsansatz wird zur Unterstützung der Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten mit EDTA in einer Enkonzentration von 20 mM, zur Denaturierung der Proteine mit SDS in einer Endkonzentration von 0,5 % und mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 300 µg/ml versetzt. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend einer Isopropanol-Präzipitation unterzogen.

### 3.6 *In vitro* DNA-Rekombinationstechniken

#### 3.6.1 Restriktionsenzymspaltung

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

Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II erkennen palindromische Sequenzen von meist vier bis sechs Basen innerhalb derer sie in Gegenwart von Magnesium-Ionen schneiden (Arber & Linn, 1969; Yuan, 1981). Ein typischer Restriktionsansatz setzt sich zusammen aus einem zehntel Volumen 10x Restriktionspuffer, der auf die speziellen Bedingungen des entsprechenden Enzyms angepaßt ist. Einige Restriktionsenzyme zeigen in Gegenwart von 0,1 g/l Rinderserumalbumin eine erhöhte Aktivität. Entsprechend der eingesetzten Menge DNA wird abhängig vom Enzym gewöhnlich eine Menge von 1 U je Microgramm DNA eingesetzt. Die meisten Enzyme spalten die DNA unter diesen Bedingungen zu einem hohen Prozentsatz schon nach etwa einer Stunde. Ein quantitativer Verdau wird jedoch oft erst nach 24 Stunden oder bei höherer Konzentration des Enzyms erzielt. Kritische Faktoren sind, neben dem pH-Wert des Puffersystems und der Magnesiumkonzentration, hohe Enzym- und Glycerolkonzentrationen sowie niedrige Konzentrationen an einwertigen Metallionen. Extreme Abweichungen können jeweils unspezifische Spaltungen an Sequenzen, die der Erkennungssequenz sehr ähnlich sind, oder minimale Enzymaktivitäten zur Folge haben. Das Ergebnis einer Restriktionsenzymspaltung kann mit Hilfe einer analytischen Polyacrylamidgel- oder Agarosegel-Elektrophorese überprüft werden. Für viele Zwecke kann ein Restriktionsansatz direkt, ohne Aufreinigung für Folgereaktionen eingesetzt werden. In einigen Fällen ist es jedoch nötig das Restriktionsenzym durch Hitzedenaturierung zu inaktivieren oder mittels Phenol-Extraktion zu entfernen. Zur Entfernung von Puffersalzen ist eine Isopropanol-Präzipitation meistens ausreichend.

#### 3.6.2 Dephosphorylierung

Um das Rezirkularisieren eines linearisierten Plasmids oder eine Multimerisierung eines DNA-Fragments über kompatible Enden bei Ligationsreaktionen zu verhindern, werden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe der Zink-abhängigen alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm entfernt (Chaconas & van de Sande, 1980; Maniatis et al., 1989c). Miteinander kompatibel sind stumpfe DNA-Enden und cohäsive Enden deren einzelsträngige Überhänge zueinander komplementär sind. Ein Dephosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus einem Zinkhaltigen Reaktionspuffer, dessen weitere Komponenten in den meisten Restriktionspuffern

ungeeigneter Konzentration enthalten sind, der DNA mit den zu entfernenden 5'-Phosphat-Enden und der alkalischen Phosphatase in einer Konzentration von 1 U je Picomol 5'-Phosphat-Ende. Die Dephosphorylierung erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Durch 10 min Inkubation bei 75°C wird das Enzym inaktiviert. Es kann zusammen mit den Puffersalzen durch Phenolextraktion und Isopropanol-Präzipitation entfernt werden. Muß das dephosphorylierte DNA-Fragment außerdem noch aus einem Gemisch weiterer DNAs abgetrennt werden, so kann die Entfernung aller Komponenten in einem Schritt über Elution nach Agarosegel-Elektrophorese erfolgen.

### 3.6.3 Phosphorylierung

Zur Insertion synthetisch hergestellter DNA-Oligonukleotide in Plasmid-DNA muß zunächst die synthesebedingt fehlende 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphorylierungsreaktion mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase in Anwesenheit von ATP angefügt werden. Dabei wird die  $\gamma$ -ständige Phosphatgruppe von ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der DNA übertragen (Richardson, 1971). Ein Phosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus der einzel- oder doppelsträngigen DNA mit freier 5'-Hydroxylgruppe, dem Reaktionspuffer mit 70 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Dithiothreitol und 1 mM ATP Endkonzentration sowie 30-100 U T4 Polynukleotidkinase je Picomol 5'-Ende. Nach 30 min Inkubation bei 37°C kann das Enzym durch 20 min Inkubation bei 65°C inaktiviert werden. Alternativ können zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide in einem Ansatz phosphoryliert und anschließend hybridisiert werden. Der Hybridisierungsschritt, der eine einminütige Inkubation bei 90°C und eine anschließende Abkühlung auf 30°C innerhalb eines Zeitraums von 20 min umfaßt, ersetzt den Hitzedenaturierungsschritt. Die Sequenzen der DNA-Oligomere werden so gewählt, daß an den Enden der Duplex-DNA nach Hybridisierung überhängende Einzelstränge kompatibel für die Ligation mit einem entsprechenden Plasmid verbleiben. Die Phosphorylierungsreaktion findet gewöhnlich in Gegenwart hoher Konzentrationen an DNA-Oligomer statt. Aufgrund der starken Verdünnung des Oligomers im Ligationansatz kann auf eine Aufreinigung der phosphorylierten DNA verzichtet werden.

### 3.6.4 DNA-Ligation

Der letzte Schritt bei der *in vitro* DNA-Rekombination ist die Rezirkularisierung eines linearen Plasmidfragments unter Insertion eines DNA-Fragments mit Hilfe der DNA-Ligase. Formal entspricht die Ligation der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche einer doppelsträngigen DNA. Die T4 DNA-Ligase kann unter Hydrolyse von ATP sowohl cohäsive als auch stumpfe Enden ligieren (Weiss et al., 1968). Aus dem linearen Plasmid-Fragment, dem Ligase-Puffer mit 40 mM Tris-HCl pH 7,8 und 10 mM Magnesiumchlorid Endkonzentration sowie 10-100 U T4 DNA-Ligase je Microgramm DNA wird eine Vormischung erstellt. Bei cohäsiven En-

den wird mit ATP in einer Endkonzentration von 1 mM ergänzt. Da bei stumpfen Enden hohe ATP-Konzentrationen inhibierend wirken, beträgt hier die Endkonzentration 0,05-0,1 mM, und der Ansatz wird mit Polyethylenglycol 4000 in einer Endkonzentration von 5 % versetzt. Nach Portionierung der Vormischung werden in parallelen Ansätzen verschiedene Mengen des zu insertierenden DNA-Fragments eingesetzt. Für die meisten Ligationsreaktionen ist eine Inkubation bei 22°C für eine Stunde ausreichend. Bei stumpfen Enden kann das Reaktionsergebnis durch längere Inkubation von bis zu 24 Stunden und tieferer Temperatur von 4°C oft verbessert werden. Wird das Ligationsprodukt nicht zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt, so ist zur Entfernung der Ligase eine Behandlung mit Proteinase K empfehlenswert.

### 3.6.5 Transformation von *Escherichia coli* JM109-Zellen

Das Einschleusen zirkulärer DNA in kompetente Prokaryonten wird als Transformation bezeichnet (Cohen et al., 1972). Die Zellanzucht auf ampicillinhaltigem Nährboden erlaubt die Selektion auf Bakterienklone, welche ein Plasmid mit exprimierbarer Ampicillinresistenz enthalten. 5 µl Ligationsansatz entsprechend 100-200 ng Plasmid-DNA werden mit 100 µl kompetenten *Escherichia coli* JM109-Zellen unter Vermeidung starker Scherkräfte versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz kann der Transformationsansatz einem Temperaturschock von 42°C im Wasserbad und anschließender zweiminütiger Kühlung im Eis-Wasserbad ausgesetzt werden. Wenn erforderlich wird der Ansatz mit 1 ml LB-Flüssigmedium versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Dies ermöglicht den transformierten Zellen das Ampicillinresistenz-Gen effektiv zu exprimieren. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000xg und RT werden etwa 900 µl des Überstands abdekantiert und das Zellsediment in dem verbliebenen Überstand sanft resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf einer Agarplatte ausgestrichen und Einzelkolonien gezüchtet (Kapitel 3.3.2).

### 3.7 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion mit *Pwo* DNA-Polymerase

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis & Faloona, 1987) bietet eine einfache Möglichkeit, um spezifische DNA-Segmente zu vervielfältigen. Bei dieser Methode werden Primer an die komplementären Stränge hitzedenaturierter DNA hybridisiert und mit hitzebeständiger DNA-Polymerase inkubiert. Die Primer sind dabei so ausgewählt, daß sie dem 5'- bzw. 3'-terminalen Ende des zu amplifizierenden DNA-Segments entsprechen und die Synthese komplementärer Stränge einleiten. Multiple Cyclen dieses Prozesses durch Variation der Inkubationstemperatur amplifizieren die DNA exponentiell. Dabei wird in jedem Zyklus ein dreistufiges Temperaturprofil mit Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation der DNA durchlaufen.

Anstelle der häufig verwendeten *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, welche sich durch ihre hohe Prozessivität aber auch durch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate auszeichnet, wird hier die rekombinante, in *Escherichia coli* exprimierte *Pwo* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* eingesetzt. Letztere zeichnet sich durch eine nahezu ebenso hohe Prozessivität im Vergleich zur *Taq* Polymerase sowie einer deutlich höheren Halbwertszeit bei 100°C aus und besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, welche einen effizienten Korrekturmechanismus bezüglich fehleingebauter Nukleotide erlaubt. Sie eignet sich daher für den direkten Einsatz von PCR-Produkten als Template für die Transkription oder die Genexpression unter Verzicht einer Selektion auf mutationsfreie Klone. Ein praktischer Vorteil der *Pwo* DNA-Polymerase resultiert aus der sehr geringen Aktivität bei niedrigen Temperaturen. Daher ist zur Vermeidung von Nebenreaktionen infolge unspezifischer Primerhybridisierung vor dem ersten Denaturierungsschritt ein verzögertes Einsetzen der Polymeraseaktivität (nach dem ersten Denaturierungsschritt) nicht nötig.

### 3.7.1 Standard PCR

Die für die Expressions-PCR optimierten Bedingungen sind im entsprechenden Ergebniskapitel aufgeführt. In Tab. 8 wird die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für eine typische Standardreaktion aufgeführt.

Reaktionskomponente	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,85 (20°C) 25 mM Kaliumchlorid 50 mM Ammoniumsulfat 2 mM Magnesiumsulfat
4 Desoxyribonukleosid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP jeweils 2,5 mM	0,2 mM jeweils
Primer 17-95 Nukleotide 100 µM	0,5 µM jeweils
DNA-Matrize	0,1-2000 pg/50 µl
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase 5 U/µl	3 U/50µl

Tab. 8 Reaktionskomponenten für die PCR mit *Pwo* DNA-Polymerase

Das Temperaturprogramm setzt sich aus 40-70 sich wiederholenden Zyklen zusammen. Ein Zyklus besteht aus:

Hitzenaturierung: 0,5 min 94°C  
Primerhybridisierung: 1 min 50-60°C  
Elongation: 1-1,5 min 72°C

Die Größe und die Qualität sowie die ungefähre Konzentration des PCR-Produkts kann durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelt werden. Für eine genaue photometrische Konzentrationsbestimmung können nicht umgesetzte Primer und Nukleotide zusammen mit weiteren niedermolekularen Komponenten und der Polymerase durch Phenol-Extraktion und anschließender Isopropanol-Präzipitation oder mit Hilfe des "High pure PCR-product purification Kit" entfernt werden. Das Prinzip des Kits beruht auf selektiver Bindung von DNA mit mehr als 100 Basenpaaren an eine Silika-Matrix, während ungebundene Komponenten abgewaschen werden. Die DNA wird dann mit einer alkalischen Lösung  $\text{pH} > 8$  eluiert, die die Wechselwirkung der DNA mit der Matrix schwächt.

### 3.7.2 Plasmid-Amplifikation und Mutagenese

Mutationen, Deletionen oder Insertionen von mehreren benachbarten Basen können auf einfachem Weg durch Amplifikation eines ganzen Plasmids mit nicht vollständig komplementären Primern eingeführt werden. Dazu werden zwei zueinander vollständig komplementäre Primer eingesetzt, dessen veränderte Sequenz im Zentrum lokalisiert ist, während mindestens 15 Basen stromauf- und abwärts des Zentrums vollständig komplementär zur Plasmidsequenz sein müssen. Während der PCR werden beide Stränge der Plasmid-DNA unabhängig voneinander linear amplifiziert und modifiziert, wobei die Synthese der Komplementärstränge exakt nach einer Umrundung des Matrizen-Plasmids stoppt. Durch Rehybridisierung komplementärer neu synthetisierter und überhängender Einzelstränge wird ein neues zirkuläres Plasmid gebildet, welches formal zwei, um die Primerlänge versetzte, Einzelstrangbrüche aufweist. In dieser Form kann das PCR-Produkt in kompetente Zellen transformiert und Einzelkolonien mit intaktem Plasmid isoliert werden. Vor der Transformation werden das Ursprungsplasmid und Mischhybride aus Matrizenstrang und neu synthetisiertem Strang durch das Methylgruppen-abhängige Restriktionsenzym DpnI, welches statistisch etwa nach jedem 256-sten Basenpaar spaltet, in nicht transformierbare kleinere DNA-Fragmente zerlegt. Nicht methyliertes PCR-Produkt bleibt dabei intakt.

Im Vergleich zur oben aufgeführten Standard-PCR weicht das Protokoll folgendermaßen ab: Mit 50 ng/50  $\mu\text{l}$  wird die Plasmid-Matrize in relativ hoher Konzentration eingesetzt. Die Reaktionsdauer der Elongationsphase beträgt abhängig von der Plasmidgröße etwa 12 min. Nach der Amplifikation wird der Reaktionsansatz mit 10 U DpnI je 50  $\mu\text{l}$  versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. 8  $\mu\text{l}$  des Restriktionsansatzes können direkt für die Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen eingesetzt werden.



### 3.8 DNA-Sequenzierung

Bei der Kettenabbruch-Technik nach Sanger et al. (1977) wird die zu sequenzierende DNA mit einer DNA-Polymerase, einem geeigneten DNA-Einzelsrang-Oligomer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten inkubiert. Zusätzlich wird von einem Nukleotid ein Didesoxyribonukleosidtriphosphat-Analogon im Unterschluß eingesetzt, nach dessen statistischem Einbau der Abbruch des Kettenwachstums erfolgt, da keine weiteren Phosphodiesterbindungen durch die DNA-Polymerase mehr geknüpft werden können. Nach Trennung im denaturierenden Polyacrylamidgel kann ein ganzer Satz verkürzter radioaktiv markierter Ketten nach Autoradiographie detektiert werden. Dabei zeigen die Ketten im Gel die Position an, bei der das entsprechende Didesoxy-Analogon eingebaut wurde. Werden vier verschiedene Ansätze mit jeweils nur einem der vier möglichen Didesoxyribonukleotide parallel im Gel getrennt, so kann die zu ermittelnde Sequenz im Vergleich der vier Spuren von unten nach oben in 5'-3'-Richtung gelesen werden.

Der Doppelstrang von 2 µg der zu sequenzierenden DNA in 8 µl Reinstwasser wird im stark alkalischen Milieu durch Zugabe von 2 µl 2 M NaOH und vorsichtigem Durchmischen in Einzelstränge denaturiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA durch Zugabe von 3 µl eiskalter 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,9, 7 µl eiskaltem Reinstwasser sowie 60 µl -20°C kaltem Ethanol und 15 min Inkubation bei -80°C präzipitiert. Das Sediment aus der zehnminütigen Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wird mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend im Lyophilisator getrocknet und schließlich in 12 µl Reinstwasser bei 4°C gelöst.

Die für die enzymatische Reaktion erforderlichen Komponenten sowie die Arbeitsvorschrift sind zu großen Teilen dem T7-Sequencing Kit der Firma Pharmacia entnommen. Die hier eingesetzte T7-DNA-Polymerase hat gegenüber dem in der herkömmlichen Methode eingesetzten Klenow-Fragment der *Escherichia coli* DNA-Polymerase I, die Vorteile einer größeren Prozessivität als auch einer höheren Einbaurate. Zudem ist der Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat gleichmäßiger.

10 µl des in Wasser gelösten, denaturierten Plasmids werden mit 2 µl Primer-Lösung entsprechend eines zehnfach molaren Überschuß gegenüber dem Plasmid, sowie mit 2 µl Hybridisierungspuffer versetzt. Inkubationen von 20 min bei 37°C und 10 min bei Raumtemperatur unterstützen die Hybridisierung des Primers an die komplementäre Zielsequenz des Plasmids. Eine Lösung mit 7 U/µl T7 DNA-Polymerase wird mit eiskaltem Enzym-Verdünnungspuffer auf 1,5 U/µl eingestellt. Der Plasmid/Primer-Hybridisierungsansatz wird mit 2 µl verdünnter Polymerase, 3 µl Markierungs-Mix und 1 µl 10 µCi/µl  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In vier Reaktionsgefäßen werden jeweils 2,5 µl einer der vier Nukleotidmischungen vorgelegt, welche die vier Desoxynukleotide und jeweils ein Didesoxy-Analogon enthalten und auf 37°C vorgewärmt. Die Nukleotidmischungen werden jeweils mit 4,5 µl des Markierungsan-

satzes versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze werden mit 5 µl Formamid-Probenpuffer (Kapitel 3.2.2) für die denaturierende Gelelektrophorese versetzt, welcher gleichzeitig die Reaktion stoppt.

### 3.9 *In vitro* Transkription

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Transkripte wurden unter der Kontrolle der RNA-Polymerase des Phagen T7 synthetisiert. Die 3'-Enden der RNAs werden durch die Ermöglichung einer run-off Transkription definiert. Die run-off Position wird durch Linearisierung der Plasmidtemplate mit einem Restriktionsenzym festgelegt, welches nach Spaltung keine einzelsträngigen 3'-Überhänge hinterlassen sollte. Wird der T7 Transkriptionsterminator am 3'-Ende synthetisiert, wird die Linearisierungsstelle so gewählt, daß die Positionen der natürlichen Termination und der run-off Termination möglichst übereinstimmen. In Tab. 9 sind die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für nicht markierte und radioaktiv markierte Transkripte angegeben. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur zusammengestellt.

Reaktionskomponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	
		nicht markierter Ansatz	radioaktiv markierter Ansatz
8x Transkriptionspuffer Hepes-KOH, pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> Spermidin	640 mM 176 mM 8 mM	80 mM 22 mM 1 mM	80 mM 22 mM 1 mM
Nukleotide pH 7 ATP CTP GTP UTP	100 mM 100 mM 100 mM 100 mM	3,75 mM 3,75 mM 3,75 mM 3,75 mM	3 mM 2 mM 3 mM 3 mM
α- <sup>35</sup> S-Cytosin-5'-triphosphat	10 µCi/µl	—	0,2 µCi/µl
DTE	500 mM	10 mM	10 mM
BSA (RNase-,DNase-frei)	20 g/l	120 µg/ml	120 µg/ml
anorganische Pyrophosphatase in 20 mM MOPS pH 6,85 / 10 mM MgCl <sub>2</sub>	1 U/µl	5 U/ml	5 U/ml
RNase-Inhibitor	40 U/µl	200 U/ml	200 U/ml
lineares DNA-Templat	variabel	10-40 nM	10-40 nM
T7 RNA-Polymerase	50 U/µl	1500 U/ml	1500 U/ml

Tab. 9 Komponenten für die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase

Für analytische Transkriptmengen reicht eine Inkubationsdauer von einer Stunde bei 37°C aus, während präparative Ansätze über Nacht inkubiert werden. Zur Aufreinigung der Transkripte schließen sich ein Verdau mit DNase I, eine Phenol-Extraktion, eine Gelfiltration sowie eine Isopropanolpräzipitation an. Das Transkript kann durch photometrische Messung quantifiziert und Größe und Reinheit mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft werden. Zur Bestimmung der molaren Aktivität radioaktiv markierter Transkripte wird mit Trichloressigsäure gefällt (Kapitel 3.10).

### 3.10 *In vitro* Proteinbiosynthese

*In vitro* Translationsreaktionen werden im sogenannten S30-System des *Escherichia coli* Stammes D10 unter den im Labor von Prof. V.A. Erdmann von Dr. W. Stiege optimierten Bedingungen durchgeführt. Von dem im selben Labor weiterentwickelten fraktionierten System, welches sich im wesentlichen aus einer ribosomalen 70S und einer S-100-Enzymfraktion zusammensetzt (Erdmann et al., 1989; Erdmann et al., 1994; Stiege & Erdmann, 1995, Merk et al., 1999), wird die S-100-Fraktion für Aminoacylierungs-Untersuchungen eingesetzt.

Da die Herstellung des S30-Systems nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, werden hier die prinzipiellen methodischen Schritte zur Aufarbeitung des S30-Lysats dargestellt. Zellen des *Escherichia coli* Stamms D10 werden in Flüssigmedium angezüchtet und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Durch Ausübung eines hohen Drucks von 500-900 bar und plötzlicher Expansion in einer Gaulin-Pressen zerplatzen die Zellen. Nicht zerstörte Zellen und Zelltrümmer des Lysats werden durch Sedimentierung während der Zentrifugation bei 30000xg vom S30-Überstand abgetrennt. Durch kurze Inkubation des S30-Überstands mit Energiekomponenten (ATP, GTP) wird die Termination aktiver Translationskomplexe ermöglicht und Ribosomen von endogener mRNA freigesetzt. Die ungeschützte mRNA wird dabei von endogener Ribonukleaseaktivität degradiert. Durch Entsalzung bzw. Umpufferung mittels Dialyse oder Gelfiltration werden definierte Bedingungen bezüglich niedermolekularer Verbindungen eingestellt. Schließlich werden im S-Mix (Tab. 10) das S30-Lysat und weitere proteinogene Komponenten sowie zusätzliche tRNA zusammengefaßt.

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
RNase-Inhibitor	40 U/µl	100 U/ml
Gesamt-tRNA ( <i>E. coli</i> )	20 g/l	100 µg/ml
Pyruvatkinase	10 g/l	8 µg/ml
S30-Lysat	> 3x	1x

Tab. 10 Komponenten und Konzentrationen des S-Mix

Vor der *in vitro* Translationsreaktion wird der S-Mix mit niedermolekularen Komponenten, die im T-Mix (Tab. 11) zusammengefaßt sind sowie mit den im E-Mix (Tab. 12) zusammengefaßten Energiekomponenten und mRNA versetzt.

Komponente	Endkonzentration in der Reaktion bezogen auf T-Mix	tatsächliche Endkonzentration*
TLM-Puffer	(70 %)*	100 %
HEPES pH 7,6	35 mM	50 mM
Kaliumacetat	49 mM	70 mM
Ammoniumchlorid	21 mM	30 mM
Magnesiumchlorid	7 mM / 11 mM	14 mM*
EDTA	0,07 mM	1 mM
Natriumazid	0,014 % / 0,034 %*	0,4 %*
Magnesiumchlorid	4 mM / 11 mM	(14 mM* siehe oben)
Dithiothreitol	5 mM	5 mM
Polyethylenglycol 2000	4 %	4 %
Natriumazid	0,02 % / (0,034 %* siehe oben)	(0,4 %* siehe oben)
Folsäure	100 µM	100 µM
19 Aminosäuren (ohne Leucin)	je 400 µM	je 400 µM

Tab. 11 T-Mix-Komponenten und Endkonzentrationen

\*70% der TLM-Puffer-Endkonzentration werden durch den T-Mix beigesteuert. Die Magnesiumchlorid- und Natriumazidkonzentrationen werden sowohl durch den TLM-Puffer als auch durch Zugabe als Einzelkomponente definiert. Die tatsächlichen Endkonzentrationen in der Translationsreaktion, welche sich nach Vereinigung aller Komponenten ergeben, sind in der rechten Spalte angegeben.

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

Tab. 12 Zusammensetzung des E-Mix

Wird DNA als Templat eingesetzt, dessen Transkription nicht unter der Kontrolle der endogenen RNA-Polymerase steht, muß zusätzlich noch - hier vom T7 Phagen stammende - RNA-Polymerase eingesetzt werden, während die Transkription der endogenen Polymerase durch das Antibiotikum Rifampicin blockiert wird. Beim Einsatz von DNA als Templat

handelt es sich um ein gekoppeltes Transkriptions/Translations-System. Ein typischer Reaktionsansatz für die *in vitro* Proteinbiosynthese setzt sich wie folgt zusammen (Tab. 13).

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
T-Mix	3-4 x	1 x
<sup>14</sup> C-Leucin (bei Bedarf)	1 mM (100 dpm/pmol)	40 µM (20 dpm/pmol)
Leucin	10 mM	160 µM; gesamt 200 µM
Rifampicin	20 g/l	0,02 g/l
Energie-Mix	12,5 x	1 x
S-Mix	3-4 x	1 x
mRNA-Templat oder DNA-Templat	5 µM  0,1 µM	200-800 nM  2-5 nM
T7 RNA-Polymerase	50 U/µl	500 U/ml

Tab. 13 Zusammensetzung einer Translations- bzw. gekoppelten Transkriptions/Translationsreaktion

### 3.11 Aminoacylierung von tRNA in der S100-Fraktion

Zur Überprüfung der Effizienz der *in vitro* Aminoacylierung von tRNA wird diese in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems mit radioaktiv markierter Aminosäure inkubiert. Der prozentuale Anteil der mit Aminosäure beladenen tRNA nach einer bestimmten Inkubationsdauer wird dann mittels TCA-Fällung analysiert

#### S100-Enzymfraktion

Die von Herrlich und Schweiger (1974) beschriebene Herstellung der S100-Fraktion wird hier kurz beschrieben. Das S30-Lysat wird mit Glycerol unterschichtet und 14-18 Stunden bei 100000xg zentrifugiert. Dabei sedimentieren Ribosomen, während alle weiteren für die Aminoacylierung benötigten Komponenten im Überstand isoliert werden. Zur Entfernung von Nukleinsäuren und vor allem von tRNA, werden diese mittels Anionenaustauscher-Chromatographie abgetrennt. Dazu wird der Überstand auf eine Säule mit DEAE-Cellulose aufgetragen und mit Puffer niedriger Ammoniumchloridkonzentration gewaschen. Durch Erhöhung der Ammoniumchloridkonzentration auf 250 mM werden die für die Translation benötigten Enzyme eluiert, während tRNA auf der Säule verbleibt. Das Eluat wird schließlich gegen Translationspuffer dialysiert und kann entweder für Aminoacylierungsuntersuchungen oder zusammen mit gereinigten Ribosomen für die *in vitro* Translation eingesetzt werden. Die Proteinkonzentration der S100-Fraktion wird durch photometrische Messung der Absorptio-

nen bei 260 und 280 nm bestimmt und über die Formel "Proteinkonzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] =  $1525 \cdot A_{280\text{nm}} - 757,3 \cdot A_{260\text{nm}}$ " berechnet (Kalb & Bernlohr, 1977).

### Aminoacylierungsreaktion

Für eine Aminoacylierungsreaktion wird die S100-Fraktion in einer Enkonzentration von 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Zusätzlich werden Komponenten und Bedingungen eingesetzt, die denen einer Translationreaktion sehr ähnlich sind. In Tab. 14 sind die Komponenten in den typischen Konzentrationen für eine Aminoacylierungsreaktion aufgeführt.

Komponente	Endkonzentration
10x TLM-Puffer ohne Magnesium	1x
Dithiothreitol	10 mM
Magnesiumchlorid	12 mM
ATP, GTP und CTP, UTP	jew. 1 mM und jew. 0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	30 mM
Acetylphosphat	10 mM
anorganische Pyrophosphatase	2,5 U/ml
Pyruvatkinase	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
$^{14}\text{C}$ -markierte Aminosäure (100-400 dpm/pmol)	30-120 $\mu\text{M}$
tRNA ( <i>in vitro</i> Transkript)	2-10 $\mu\text{M}$
S100-Fraktion	1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tab. 14 Zusammensetzung einer Aminoacylierungsreaktion

Innerhalb eines Zeitraums von 30 min werden der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten 10  $\mu\text{l}$  Aliquots entnommen und mit 100  $\mu\text{l}$  einer auf Eis vorgelegten Stopplösung (0,6 M Natriumacetatlösung pH 5,2, 20 mM EDTA und 0,8 g/l Hefe-tRNA) vermischt. Diese Lösung wird mit 2 ml 10 % Trichloressigsäure mit 2 % Pepton versetzt und im weiteren wie bei der in Kapitel 3.12 beschriebenen TCA-Fällung von Nukleinsäuren verfahren.

### 3.12 TCA-Fällung von RNA und Protein

Nukleinsäuren und Proteine denaturieren und präzipitieren im sauren Milieu der TCA (Trichloressigsäure). Zur Bestimmung des Anteils an radioaktivem Marker der in das Makromolekül während der Synthese eingebaut wurde, können die Präzipitate der TCA-Behandlung durch Filtration über Glasfilter von löslicher Radioaktivität abgetrennt und im Szintillationszähler gemessen werden. Diese Meßwerte dienen der Bestimmung von Transkrip-

tions- bzw. Translationsraten *in vitro* sowie von mRNA-Degradationsraten. Die spezifische Aktivität radioaktiv markierter Transkripte und Proteine kann ebenfalls ermittelt werden.

Maximal 100 µl einer wäßrigen Lösung mit radioaktiv markierter RNA oder DNA werden zu 100 µl vorgelegter Stopplösung (25 mM EDTA, 1 g/l Hefe-RNA) pipettiert. Dabei fängt EDTA Magnesiumionen ab und stoppt somit die Transkription. Hefe-RNA dient als "Carrier" zur Erhöhung der Fällungseffizienz. Diese Lösung wird mit 3 ml 10 % TCA mit 50 mM Natriumpyrophosphat versetzt und die Nukleinsäure durch 30 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Natriumpyrophosphat dient hierbei zur Absättigung des Glasfilters, um eine unspezifische Bindung löslicher Radioaktivität zu inhibieren. Die durchmischte Suspension wird über einem mit 5 % TCA befeuchteten Glasfilter abgesaugt, das Reaktionsgefäß zweimal und die Wände der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5 % TCA nachgespült. Durch zweimaliges Spülen mit jeweils 3 ml Aceton wird der Filter getrocknet. Nach Überführung des Filters in ein Szintillationsgefäß und Versetzen mit 3,5 ml Szintillationscocktail wird eine Stunde leicht geschwenkt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

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

### 3.13 Detektion von $\beta$ -Strahlung

#### Autoradiographie

Die qualitative und quantitative Detektion von Banden radioaktiv markierter Proteine und Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel erfolgt im Phosphoimager-System. Das getrocknete Gel wird 1-5 Tage im Dunkeln auf eine Detektionsplatte gelegt. Die genaue Funktionsweise dieser Platte unterliegt dem Firmengeheimnis. Sie enthält komplexe Verbindungen mit dem Metall Europium. Diese werden durch  $\beta$ -Strahlung in einen angeregten Zustand mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen versetzt. Bei der Abtastung der Platte im Phosphoimager wird der angeregte Zustand mit Hilfe eines Lasers in den Grundzustand zurückversetzt. Dabei werden Lichtimpulse ausgesandt, die im Phosphoimager gezählt und deren Ort der Aussendung digitalisiert im Computer dargestellt werden. Dabei ist das Verhältnis der zu detektierenden Radioaktivität zur Anzahl der gemessenen Lichtimpulse laut Herstellerangaben über fünf Zehnerpotenzen linear. Da dieses System relative Meßwerte liefert muß zur absoluten Quantifizierung parallel eine Probe mit bekannter Radioaktivität eingesetzt werden.

### Szintillationszählung

Die relativ kurze Reichweite der  $\beta$ -Strahlung der Isotopen  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$  erschwert deren quantitative Detektion. Die im Szintillationscocktail enthaltenen Moleküle werden durch die Energie der radioaktiven Strahlung in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand wird Strahlung in Form von Lichtblitzen abgegeben, welche im Szintillationszähler durch einen Photoelektronenvervielfacher verstärkt und dann gezählt werden. Ein über Eichung ermittelter Korrekturfaktor entsprechend der Zählzählbeute des Geräts dient zur Umrechnung der Rohmeßwerte mit der Einheit "cpm" (counts per minute) in die geräteunabhängige Einheit für Radioaktivität "dpm" (disintegrations per minute).

### 3.14 Affinitätschromatographie mit Strep-tag II

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie können Proteine aus Komplexen Gemischen hochspezifisch aufgereinigt werden. Strep-tag II ist ein kurzes Peptid aus acht Aminosäureresten mit Affinität zu StrepTactin. Proteine die mit dem Strep-tag fusioniert sind, können schonend von den Komponenten verschiedener Expressionssysteme abgetrennt werden (Kleymann et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Murphy & Lagarias, 1997). Dazu wird StrepTactin kovalent an Sepharose gebunden (Schmidt & Skerra, 1994) und StrepTactin-Sepharose kann als Affinitätsmatrix in Minisäulen eingesetzt werden.

In eine Minisäule mit 1 ml Fassungsvermögen werden eine kleine Fritte, aufgeschlammte Affinitätsmatrix und nach Absetzen der Matrix eine zweite Fritte eingesetzt. Die Säule wird zweimal mit dem 2,5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und das Proteingemisch auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einsickern wird dreimal mit einem Säulenvolumen Waschpuffer zur Entfernung sämtlicher hoch- und niedermolekularer Verbindungen gewaschen. Das Fusionsprotein wird sechsmal mit dem 0,6-fachen Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und die Elutionseffizienz mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder im Fall von radioaktiv markiertem Protein mittels TCA-Fällung analysiert. Das ebenfalls an StrepTactin bindende, im Überschuß eingesetzte Elutionsagens Desthiobiotin konkurriert mit dem Strep-tag um die Affinitätsmatrix und verdrängt das Fusionsprotein von der Bindungsstelle. Zur Wiederverwendung wird die Säule dreimal mit dem 5-fachen Säulenvolumen Regenerierungspuffer behandelt, im Anschluß zweimal mit dem 4-fachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

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

Tab. 15 Lösungen für die Affinitätschromatographie mit Strep-tag II



### 3.15 Bestimmung der Ölsäurebindung an das Fettsäure Bindende Protein H-FABP

Der ganze Proteinsynthese-Ansatz wird zur Messung der Bindung von Ölsäure an das *in vitro* exprimierte H-FABP eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der Messung der Radioaktivität der <sup>3</sup>H-markierten Ölsäure nach Inkubation mit H-FABP und Abtrennung ungebundener Ölsäure mittels Gelfiltration.

Ein Aliquot eines Translationsansatzes mit *in vitro* synthetisiertem H-FABP wird mit einem Reaktionsansatz ohne H-FABP auf 30 µl aufgefüllt. Diese Lösung wird mit 90 µl Translationspuffer (50 mM HEPES-Puffer pH 7,6 , 70 mM Kaliumacetat-Lösung, 30 mM Ammoniumchlorid-Lösung, 10 mM Magnesiumchlorid-Lösung, 0.1 mM EDTA und 0.002 % Natriumazid-Lösung) versetzt. Nach Zugabe von 2 µl 5 mM [9,10(n)-<sup>3</sup>H]Ölsäure mit einer molaren Aktivität von 1000 dpm/pmol wird der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Ungebundene Ölsäure wird durch Gelfiltration (Kapitel 3.1.3) eines 50 µl Aliquots mit der zentrifugierbaren Gelfiltrationssäule "Micro Bio-Spin Chromatography Column" entsprechend den Herstellerangaben abgetrennt. Die eluierte <sup>3</sup>H-Radioaktivität wird im Szintillationszähler gemessen.