

### 3. Methoden

#### 3.1. Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

100 ml eines bei Bedarf mit den nötigen Antibiotika versetzten LB-Mediums wurden im Verhältnis 1:1000 mit einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{595nm}$  von 0,5 bei 200 rpm und der jeweiligen optimalen Wachstumstemperatur (*Erwinia* spp.: 28 °C, *E. coli*: 37 °C) im Schüttelinkubator angezüchtet. Anschließend wurden die Zellen 5 min lang bei 5000 rpm und 4 °C im Sorvall GSA-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde zum Waschen der Zellen zwei mal in je 30 ml autoklaviertem deionisiertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Ein letzter Waschschrift mit autoklaviertem 10 % Glycerin schloss sich an. Nach jedem Durchgang wurden die Überstände autoklaviert und verworfen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen auf Eis in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu je 80 µl aliquotiert.

Die Elektroporation der Zellen erfolgte möglichst direkt nach deren Präparation, speziell im Falle von *E. coli* ist aber auch eine Lagerung über mehrere Monate bei -70 °C möglich.

#### 3.2. Herstellung Calcium-kompenter *E. coli* Zellen

100 ml eines bei Bedarf mit den nötigen Antibiotika versetzten LB-Mediums wurden im Verhältnis 1:1000 mit einer über Nacht gewachsenen Flüssigkultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{595nm}$  von 0,2 bei 200 rpm und 37°C im Schüttelinkubator angezüchtet.

Die Zellen wurden 5 min lang bei 4 °C und 5000 rpm im Sorvall GSA-Rotor pelletiert und das Pellet in 20 ml auf 4 °C vorgekühltem, autoklaviertem 0,1 M  $CaCl_2$ , 10 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min lang auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Überstände aller Zentrifugationsschritte wurden autoklaviert und verworfen. Die Bakterienzellen wurden in 1 ml 0,1 M  $CaCl_2$ , 10 % Glycerin aufgenommen, zu je 100 µl aliquotiert und zur Erlangung der optimalen Kompetenz mindestens einen Tag lang bei -70 °C gelagert.

#### 3.3. Transformation elektrokompenter Bakterienzellen (Elektroporation)

Für die Elektroporation wurden die wie unter 3.1. beschrieben präparierte elektrokompente Zellen eingesetzt.

40  $\mu\text{l}$  der aufgetauten elektrokompenten Zellen wurden auf Eis mit 2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt. Das Gemisch wurde luftblasenfrei in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporations-Küvette der Spaltbreite 1 mm überführt. Die Küvette wurde in einen Elektroporator eingesetzt, dessen Kondensator von 50  $\mu\text{F}$  Kapazität bei einem Ladewiderstand von 150  $\Omega$  und einer Spannung von 1.500 V aufgeladen und anschließend in einem Puls über die Küvette wieder entladen wurde. Die jetzt sehr empfindlichen Zellen wurden sofort mit 400  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt und bei der optimalen Wachstumstemperatur des transformierten Stammes unter Schütteln mindestens 30 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf geeignet selektivem LB-Agar-Medium ausplattiert und im Brutschrank über Nacht inkubiert.

### 3.4. Transformation Calcium-kompetenter Bakterienzellen

Für diese Transformation wurden die wie in 3.2. beschriebenen Calcium-kompetenten *E.-coli*-Zellen eingesetzt.

Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese mit 4  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA versetzt und die Lösung vorsichtig durchmischt. Die Suspension wurde 5 min lang auf Eis inkubiert, einem 3 min langen Temperaturschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Dem Transformationsansatz wurden 400  $\mu\text{l}$  LB-Medium hinzugefügt und das Gemisch 30 bis 60 min lang bei 37 °C unter Schütteln in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einem geeignet selektivem Agar-Medium ausplattiert.

### 3.5. Analytische Präparation bakterieller Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Die aufzuschließenden Zellen wurden entweder durch Zentrifugation von 1 ml Flüssigkultur (Tischzentrifuge, 5 min, 13.000 rpm) oder durch Abschaben einer Agar-Platte mit einer sterilen Impföse erhalten und gründlich in 100  $\mu\text{l}$  Lösung 1 resuspendiert. Die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lösung 2 bewirkte die Lyse der Zellen, die Lösung wurde klar und durch die Freisetzung der bakteriellen DNA hochviskos. Aufgrund des basischen Mediums wurde gleichzeitig die chromosomale DNA denaturiert. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Lösung 3 neutralisiert. Bei diesem Schritt fielen die chromosomale DNA und die durch das SDS denaturierten Proteine als weißer Niederschlag aus, Plasmid-DNA blieb in Lösung. Bis zur vollständigen Neutralisation und Präzipitation wurde das Gemisch 5 min lang auf Eis inkubiert.

Der Niederschlag wurde bei 4 °C in einer Tischzentrifuge pellettiert (13.000 rpm, 10 min) und der Überstand mit 450  $\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 extrahiert. Zur schnelleren Trennung der Phasen wurde die Lösung eine min lang bei 13.000 rpm und Raumtemperatur

zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 1 ml -20 °C kaltem, absolutem Ethanol versetzt und bei -20 °C mindestens 30 min lang inkubiert. Der Niederschlag wurde 30 min lang bei 4 °C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und anschließend mit -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen. Die so gewonnene DNA konnte für Agarose-Gelelektrophoresen oder Restriktionsverdauung eingesetzt werden

### 3.6. Plasmid-DNA-Gewinnung im präparativen Maßstab

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das „Plasmid Midi Kit“ von Qiagen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen aus 150 ml einer bei 37 °C inkubierten Übernachtskultur durch Zentrifugation im Sorvall-GSA-Rotor (10 min, 9.000 rpm, 4°C) geerntet und in 4 ml Lösung 1 in einem 30-ml-Corex-Röhrchen resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 8 ml Lösung 2; die Lösung klärte sich und wurde viskos. Hierbei ist auf eine sehr vorsichtige Durchmischung zu achten, da zu große Scherkräfte die chromosomale DNA in kleinere Stücke fragmentieren könnten, die die Plasmid-Isolierung später stören würden. Das Gemisch wurde anschließend durch 6 ml 4 °C kalter Lösung 3 neutralisiert, das Corex-Röhrchen mit Parafilm verschlossen, mehrmals vorsichtig zur Durchmischung invertiert und 30 min lang in waagerechter Position unter Eis inkubiert. Die dabei ausgefallenen Proteine, chromosomale DNA sowie andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation im Sorvall-HB4-Rotor (15 min, 10.000 rpm, 4 °C) abgetrennt und der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Tip-100-Säule gegeben. Nachdem die gesamte Lösung die Säule passiert hatte, wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen, anschließend die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer in ein 30-ml-Corex-Röhrchen eluiert und durch Zugabe von 4 ml Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation im HB-4-Rotor (30 min, 10.000 rpm, 4 °C) pelletiert, mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet oder mit Druckluft vorsichtig trocken geblasen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und weiterverwendet.

### 3.7. DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich gezielt gewünschte DNA-Fragmente *in vitro* vermehren. Es wurden dünnwandige, 500 µl PCR-Röhrchen eingesetzt. In jeden Ansatz kamen je 1 µl der Hin- und Rückprimer, deren Hybridisierungsorte mit der Templat-DNA die Größe des Amplifikats bestimmten. Dazu wurden, je nach Quelle, variable Mengen von Template-DNA, 10 µl 10 × ThermoPol-Puffer, 2 µl dNTP-Mix sowie nach Bedarf 1 bis 5 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung

und 7  $\mu$ l Formamid gegeben und mit deionisiertem Wasser auf 99  $\mu$ l aufgefüllt. Die Lösung wurde durch kurzes Vortexen vermischt und mit 1  $\mu$ l Vent-Polymerase versetzt. Nach erneutem vorsichtigen Mischen wurde der Ansatz mit 50  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet und kurz in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit zur besseren Phasentrennung zentrifugiert.

Die Reaktion fand in einem programmierbaren Thermozykler statt. Prinzipiell besteht die PCR aus drei Reaktionsschritten, die zur Steigerung der Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Zuerst wird die DNA-Doppelhelix durch Erhitzen der Lösung auf 95 °C in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen. Bei der anschließenden Abkühlung können die im Gemisch vorhandenen Primer mit den Einzelsträngen hybridisieren. Dies geschieht für jedes Primerpärchen bei einer charakteristischen Temperatur, die üblicherweise zwischen 30 °C und 60 °C liegt. Die dabei entstandenen Konstrukte werden von der DNA-Polymerase als Substrat erkannt. Bei einer Temperatur von 72 °C beginnt die DNA-Polymerisation von den Primern ausgehend in 5' - 3' Richtung unter Verbrauch der dNTPs. Diese drei Schritte wurden üblicherweise 30 mal wiederholt, wobei ihre Dauer von der Natur der Template-DNA und der Länge des Amplifikats bestimmt wurde. Der Denaturierungsschritt wurde für chromosomale DNA etwas länger gewählt als für Plasmide. Bei der Polymerisation rechnet man ca 1 min Reaktionszeit pro 1000 bp. Nach Beendigung aller Zyklen schloss sich ein fünfminütiger Polymerisationsschritt an, der dazu diente, noch unvollständige, einzelsträngige Bereiche aufzufüllen. Eine Lagerung der so behandelten PCR-Ansätze über mehrere Stunden bei Raumtemperatur (z. B. über Nacht) erwies sich als problemlos.

Zur Weiterverarbeitung wurde dem PCR-Röhrchen mittels einer Pipette die untere, wäßrige Phase vorsichtig entnommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle der Reaktion wurden 7  $\mu$ l Ansatz mit 3  $\mu$ l DNA-Probenpuffer vermischt und einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese unterworfen (siehe 3.10.). Bei erfolgreicher PCR konnten die Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Elution erhalten werden (3.11.).

Die detaillierten Zusammensetzungen und Zyklus-Programme aller PCRs werden im Ergebnisteil aufgeführt.

### 3.8. Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die in der Praxis am häufigsten eingesetzten Restriktionsenzyme, die Restriktionsendonukleasen der Klasse II, spalten doppelsträngige DNA sequenzspezifisch an ihren palindromischen Erkennungsstellen. Dabei können sowohl stumpfe (*blunt ends*) als auch rezessive Enden (*sticky ends*) erzeugt werden.

Üblicherweise wurden die Restriktionsansätze in dieser Arbeit in einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l durchgeführt, nur im Fall von Plasmid- oder chromosomaler DNA gelegentlich in

100  $\mu$ l. Dabei wurden 2  $\mu$ l (10  $\mu$ l) des vom Enzymhersteller empfohlenen 10  $\times$  Puffers vorgelegt und mit einer Lösung der zu schneidenden DNA sowie mit 2  $\mu$ l (5 $\mu$ l) der entsprechenden Restriktionsendonuklease versetzt. Bei Bedarf wurde außerdem noch BSA bis zu einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ g/ml beigemischt.

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur inkubiert und falls möglich das enthaltene Enzym 20 min lang bei 65 °C inaktiviert. War dies nicht möglich und sollte das DNA-Fragment anschließend für Ligationen oder Fill-in-Reaktionen eingesetzt werden, so mußte es durch Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Elution von der Restriktionsendonuklease getrennt werden.

### **3.9. Ligation von DNA-Fragmenten**

Die kovalente Verknüpfung passender, d. h. zweier komplementärer rezessiver oder zweier stumpfer DNA-Enden wurde durch Zugabe des Enzyms T4-DNA-Ligase erreicht. Für einen Ligationsansatz wurden üblicherweise 17  $\mu$ l eines Gemisches der zu ligierenden DNA-Fragmente mit 2  $\mu$ l 10  $\times$  T4-DNA-Ligase Puffer und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase versetzt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Dabei wurde versucht, das Verhältnis Insert:Plasmid auf ca. 3:1 einzustellen, um eine möglichst effiziente Insertion der gewünschten Sequenz in das geschnittene Plasmid zu erreichen. Die Bandenintensität der Fragmente im Agarosegel diente hierzu als Orientierungshilfe. Die eine Hälfte des Ligationsansatzes wurde zur Transformation eingesetzt, die andere konnte zur Sicherheit mehrere Tage bei 18 °C gelagert werden.

### **3.10. Agarose Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten**

Die Agarose-Gelelektrophorese in Horizontalgelen wurde zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe angewandt. Standardmäßig wurden Gele der Konzentration von 1 % eingesetzt.

Eine entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen und in 1  $\times$  TBE suspendiert. Das Gemisch wurde unter mehrmaligem Schütteln im Mikrowellenofen erwärmt, bis eine klare, homogene Lösung entstanden war. Die Gewünschte Menge an Lösung wurde in ein Becherglas überführt und mit 40  $\mu$ l Ethidiumbromid-Stammlösung pro zu gießendem Gel versetzt. Nach kurzen Abkühlen wurde die Agarose-Lösung in eine horizontale Gelkammer bis zu einer Höhe von etwa 3 mm gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach Erstarren der Lösung wurden die Spacer und der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1  $\times$  TBE -Puffer überschichtet.

Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die vom Kamm herrührenden Aussparungen im Gel vorsichtig hineinpipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V bei kleinen Kammern

(7 cm × 14 cm) und 140 V beim Southern-Blot (16 cm × 16 cm). Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Fragmente wurde sie gestoppt, wenn zu erwarten war, daß eine hinreichende Trennung erreicht war, üblicherweise wenn sich die Bromphenolblau-Bande ca. ein bis zwei cm vor dem Gelende befand. Das Gel wurde anschließend aus der Apparatur genommen und auf einem UV-Transilluminator (Emissionsmaximum bei 312 nm) betrachtet. Ethidiumbromid lagert sich als Interkalator zwischen die DNA-Basenpaare und wird dort durch UV-Bestrahlung zur Fluoreszenz im sichtbaren Bereich angeregt. Um eventuelle Schädigungen der DNA zu vermeiden, sollte die Betrachtungszeit präparativer Gele minimiert werden. Das Gel wurde mit einer Polaroid-Kamera fotografiert, anschließend konnten bei Bedarf die Banden von Interesse mit einem Sklapell ausgeschnitten werden. Die Gelabschnitte wurden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und konnten wie unter 3.11. beschrieben weiterverarbeitet werden.

### **3.11. DNA Elution aus Agarose-Gelen**

Zur Exktraktion von DNA-Fragmenten wurde das JETsorb-Kit von Genomed gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Die zu Isolierenden DNA-Banden wurden mit einem Sklapell aus dem Agarose-Gel geschnitten, einzeln in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Auf je 100 mg Gelstück wurden je 300 µl Lösung A1 und je 10 ml JETsorb-Suspension hinzugegeben und die Lösung gründlich durch Vortexen durchmischt (Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf 100 mg Agarosegelabschnitte). Anschließend wurden die Ansätze bei 50 °C in einem Tischheizblock unter ständigem Schütteln 15 min lang inkubiert, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Die Glaspartikel wurden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (1 min, 13000 rpm) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Lösung A1 resuspendiert und gewaschen. Einer erneuten Zentrifugation und Entfernung des Überstandes schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit Lösung A2 an. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet bis zu vollständigen Trocknung im Heizblock bei 50 °C inkubiert. Die gebundene DNA konnte anschließend mit deionisiertem Wasser von der Glas-Matrix eluiert werden. Dazu wurden die Glaspartikel in ca. 60 µl Wasser resuspendiert und gründlich vermischt. Anschließend wurde das Gemisch 5 min lang bei 50 °C geschüttelt. Eine letzte zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge bewirkte die Pelletierung der Glasmilch. Der DNA-haltige Überstand konnte abgenommen und direkt für andere Experimente eingesetzt werden.

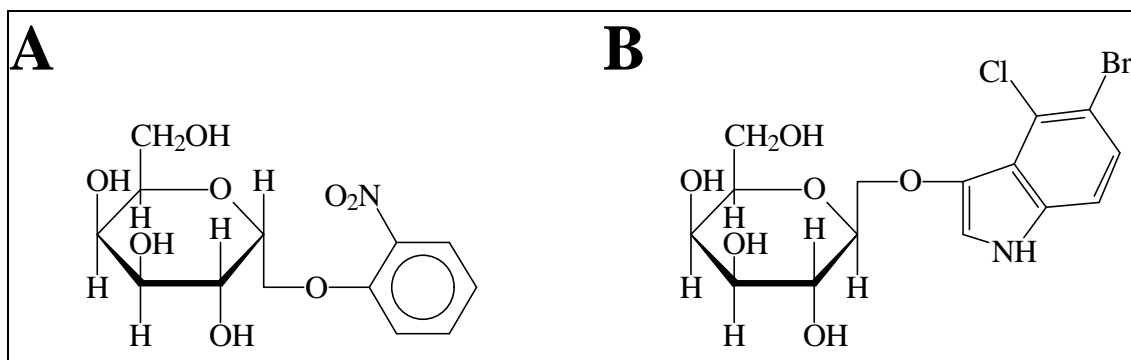
### 3.12. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Falls sich die Abschätzung von DNA-Konzentrationen über die Intensität der Banden in Agarosegelen als zu ungenau für den gewünschten Einsatzzweck (wie z. B. bei Konkurrenzexperimenten) erwies, wurde das GeneQuant Mikrophotometer von Pharmacia eingesetzt. Dafür wurden 50 µl einer geeignet verdünnten DNA-Lösung blasenfrei in die dafür vorgesehene Quarzküvette pipettiert. Das Gerät erlaubte die Einstellung verschiedener Meßparameter wie Schichtdicke, Natur der DNA (Einzelstrang, Doppelstrang), sowie, falls bekannt, dessen Basenkomposition. Die Messung selbst erfolgte bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm, wobei die Wellenlängen 230 nm und 320 nm zur Hintergrundkorrektur und die Wellenlängen 260 nm und 280 nm zur Bestimmung des DNA-Protein-Verhältnisses dienten. Die Elektronik des Gerätes erlaubte die Berechnung der DNA-Konzentration in pmol/ml, µg/ml und µg/µl.

### 3.13. $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen-Assay (ONPG-Test)

Reportergen-Assays werden bei der Untersuchung der Genexpression und -regulation *in vivo* und *in vitro* eingesetzt. Sie ermöglichen u. a. die quantitative Bestimmung der Aktivitäten von Promotoren oder Transkriptionsfaktoren. Darüberhinaus können Reporter Gene zur Überprüfung von Transfektions- bzw. Translationseffizienzen, Protein-Protein-Interaktionen oder Rekombinationsereignissen benutzt werden. Idealerweise codiert das Reporter Gen ein Protein, welches nicht innerhalb der zu untersuchenden Zelle existiert. Es sollte weiterhin eine einfach nachweisbare, reproduzierbare und quantifizierbare Reaktion katalysieren. Das Reporter Gen kann sich sowohl auf einem Plasmid befinden als auch durch Rekombination als Insertion im Chromosom der Zelle vorliegen.

In dieser Arbeit wurde die  $\beta$ -Galactosidase als Reporter-System eingesetzt. Sie ist ein vom *lacZ*-Gen codiertes homotetrameres Enzym aus *E. coli* mit einer Masse von 116 kDa pro Untereinheit und katalysiert die Hydrolyse von  $\beta$ -Galactosiden wie z. B. Lactose. Zur Quantifizierung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität werden die zwei unphysiologischen Substrate ONPG und X-Gal (Abb. 7) benutzt. Die ONPG-Farbreaktion erfolgt in Lösung und kann photometrisch verfolgt werden. X-Gal wird oftmals zur Kontrolle von Klonierungen eingesetzt (Blau-Weiß-Selektion).



**Abb. 7: Strukturen der  $\beta$ -Galactosidase-Substrate ONPG (A) und X-Gal (B), die für Reporter-Gen-Assays eingesetzt werden.**

Zur Untersuchung der Aktivierung der Kapsel-Biosynthese Gene wurde der *E. coli* Stamm JB3034 benutzt. Dieser Stamm trägt eine *lacZ*-Insertion im *manC*- (*cpsB*)-Gen des Colansäure-Biosyntheseklusters.

Zur Durchführung eines  $\beta$ -Galactosidase-Reporter-Gen-Assays wurden 3 ml autoklavierten, bei Bedarf mit Antibiotika versetzten LB-Mediums mit 50  $\mu$ l einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienstamms angeimpft und bei der gewünschten Temperatur (28 °C oder 37 °C) im Schüttelinkubator bei 200 rpm angezchtet. Falls Proteine überexprimiert werden mussten, ließ man die Zellen erst bis zu einer  $OD_{595}$  von 0,5 wachsen und induzierte anschließend durch Zugabe von IPTG. Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen zehn Minuten lang in Eis gestellt, um ihr Wachstum zu stoppen. Die Zelldichte wurde durch Messung der  $OD_{595}$  einer 1:10-Verdünnung der Zellsuspension bestimmt. Anschließend wurden in einem Reagenzglas maximal 1 ml Bakteriensuspension mit Z-Puffer auf das Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt und mit je 100  $\mu$ l 0,1 % SDS und Chloroform versetzt. Zur Lyse der Zellen wurden die Lösungen 30 s lang auf dem Vortex gründlich gemischt und dann im Wasserbad 5 min lang bei 28 °C vorinkubiert. Zu den so präparierten Lösungen wurden 400  $\mu$ l ONPG-Stammlösung gegeben und die Zeitmessung gestartet. Sobald die Ansätze eine deutlich gelbe Farbe annahmen, spätestens jedoch nach einer Stunde, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 1M  $Na_2CO_3$ -Lösung gestoppt und ein 1-ml-Aliquot 2 min lang in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm vermessen. Als Referenz diente ein Gemisch von 2 ml Z-Puffer und 400  $\mu$ l ONPG-Lösung, welches ebensolange wie die anderen Lösungen bei 28 °C inkubiert und zusammen mit der ersten Probe durch Zugabe von 1 ml 1M  $Na_2CO_3$ -Lösung gestoppt wurde. Zur Berechnung der resultierenden  $\beta$ -Galactosidase-Einheiten wurde folgende Formel benutzt:

$$U = \frac{OD_{420} * 1000}{OD_{595} * t[\text{min}]}$$

Alle OD-Werte wurden auf 1 ml Zellsuspension bezogen.



### 3.14. Digoxigenin-Markierung von Oligonukleotid-Sonden für den Southern-Blot

Zur Detektion von hybridisierten Oligonukleotid-Sonden auf Southern-Blots wurden diese mit Digoxigenin markiert. Dazu wurde die Terminale Transferase aus Kalbsthymus eingesetzt. Dieses Enzym kann polymere Nukleotid-Schwänze in einer Template-unabhängigen Reaktion an das 3'-Ende doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA-Fragmente anfügen. Setzt man dazu Digoxigenin-markierte Dideoxy-Nukleotide ein, kann sichergestellt werden, daß pro DNA-Fragment genau ein Nukleotid angehängt wird. Auf diese Weise wird verhindert, daß ein zu langer Polynukleotid-Schwanz mit den gewünschten Eigenschaften der Sonde interferiert.

Die Transferase-Reaktion zur Digoxigenin-Markierung einzelsträngiger Oligonukleotide wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 4 µl 5 × Reaktionspuffer, 4 µl CoCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µl DIG ddUTP, je nach Konzentration bis zu 10 µl einzelsträngige DNA-Sonde, 1 µl Terminale Transferase sowie die geeignete Menge deionisiertes Wasser gemischt und mindestens 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte anschließend direkt zur Hybridisierung im Southern-Blot eingesetzt werden.

### 3.15. Southern Blot

30 bis 50 µg chromosomale DNA der zu untersuchenden Bakterienstämme wurden mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut und die resultierenden Fragmente elektrophoretisch in einem 1%-Horizontal-Agarosegel getrennt. Nach der Elektrophorese wurden alle leeren Gelbereiche mit einem Sklapell abgeschnitten und zur späteren Orientierung eine kleine Ecke des zugeschnittenen Gels entfernt. Das Gel wurde mit angelegten Linealen fotografiert, um damit die Größenbestimmung der gefärbten Banden auf der Membran zu gewährleisten. Danach wurde das Gel vorsichtig 2 mal 10 min lang in 200 ml Nicking-Lösung und anschließend 45 min lang in Denaturierungs-Lösung geschüttelt. Die Neutralisierung des Gels wurde durch 2 mal 20 minütiges Schütteln in 200 ml Neutralisations-Lösung erreicht. Zum Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran wurde die Kapillar-Transfer-Methode gewählt. Der Blot wurde über Nacht im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurde ein Kunststoffsockel, der größer war als das Gel, mit Whatman 3MM Papier belegt, so daß dieses an beiden Enden des Sockels bis zum Boden reichte. Dieser Aufbau wurde in eine Schüssel gestellt, die mit 20× SSC Transfer-Puffer so hoch gefüllt wurde, daß der Flüssigkeitsspiegel ca. 1 cm unterhalb der Sockeloberfläche stand. Sobald das Filterpapier vollständig mit Puffer gesättigt war, wurden mit einer Glaspipette alle noch vorhandenen Luftblasen durch vorsichtiges Rollen entfernt. Anschließend wurde das Gel auf die Papieroberfläche gelegt. Das Gel wurde mit einer genau

auf dessen Maße zurechtgeschnittenen Nylonmembran bedeckt und alle Luftblasen durch Rollen mit einer Glaspipette sorgfältig entfernt. Auf die Membran wurden ca. 20 gleichgroße Blätter Whatman 3MM Filterpapier sowie weitere 30 bis 40 zurechtgeschnittene Papierhandtücher gelegt und das Sandwich mit einem Gewicht von 500 g gleichmäßig beschwert. Dabei war darauf zu achten, daß kein Filterpapier oberhalb des Gels Kontakt mit der Sockeloberfläche hatte. Dies konnte durch Unterlegen von kleinen Glaskapillaren oder Parafilm erreicht werden.

Am nächsten Tag wurde die Membran vom Gel abgenommen und die DNA zunächst durch 5 min lange UV-Bestrahlung auf einem Transilluminator auf der Nylonoberfläche immobilisiert. Alle weiteren Schritte wurden in einem Hybridisierungsröhrchen in einem Hybridisierungssofen durchgeführt, die Volumenangaben beziehen sich auf 100 cm<sup>2</sup> Membranfläche. Die Membran wurde bei 48 °C in 20 ml Hybridisierungslösung mindestens eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung durch 2,5 ml Hybridisierungspuffer mit frisch präparierten, Digoxigenin-markierten einzelsträngigen Oligonukleotiden ersetzt und die Membran bei 48 °C über Nacht inkubiert. Der Hybridisierung schlossen sich je zwei Waschschrte in 50 ml Waschlösung 1 (5 min, Raumtemperatur) sowie 50 ml Waschlösung 2 (5 min, 48 °C) an. Die Membran konnte nun direkt zur Detektion der hybridisierten Sonden eingesetzt oder zur späteren Benutzung getrocknet werden.

Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten Oligonukleotide wurde die Membran 1 min lang in 100 ml Detektionspuffer 1 gewaschen, anschließend 30 min lang in 100 ml Detektionspuffer inkubiert und danach nochmals 1 min lang in 100 ml Detektionspuffer gewaschen. Die Membran wurde nun mit 20 ml Antikörperlösung (150 U/ml Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente in Detektionspuffer 1) inkubiert und die ungebundenen Antikörper durch drei mal 30 min langes Waschen mit je 100 ml Detektionspuffer 1 entfernt. Nachdem die Membran 3 min lang in Detektionspuffer 3 äquilibrierte, wurde sie in Kuststoffolie eigeschweißt und mit 20 ml frisch hergestellter Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion war üblicherweise über Nacht abgeschlossen. Die gefärbte Membran wurde zum Stoppen der Färbung 5 min in 50 ml Detektionspuffer 4 oder deionisiertem Wasser gewaschen. Zur weiteren Lagerung wurde die Membran bei 37 °C im Brutschrank getrocknet, die dabei verblassenden Farben konnten durch Benetzung mit Detektionspuffer 4 oder Wasser wiederhergestellt werden.

### 3.16. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Falls möglich, wurden Proteine zur einfacheren Reinigung als Fusionsproteine exprimiert. Es wurden zwei verschiedene Expressionssysteme eingesetzt.

Das Plasmid pMalc2 trägt als Replikationsursprung den Col E1 *ori*, das Ampicillin Resistenzgen und ist ein *multicopy*-Vektor. Es enthält u.a. die beiden *E. coli* Gene *malE*, welches für das Maltose-Bindungsprotein (MBP) codiert, und *lacZ $\alpha$* , das für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Zwischen diesen beiden Genen befindet sich eine *multiple cloning site* (MCS), in die das zu exprimierende Gen kloniert werden kann. Dabei entsteht ein Fusionsprodukt aus *malE* und kloniertem Gen, welches sich unter der Kontrolle des starken *lac*-Promotors  $P_{lac}$  befindet. Normalerweise reprimiert der vom *lacI*-Gen codierte *lac*-Repressor diesen Promotor, doch kann die Repression durch Zugabe des Induktors Lactose, oder wie in dieser Arbeit des Lactose-Analogons Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (IPTG), aufgehoben werden. Dies führt zu einer Expression eines Fusionsproteins aus MBP und kloniertem Genprodukt. Am Terminationscodon des einklonierten Gens stoppt die Transkription, so daß das  $\beta$ -Galactosidase  $\alpha$ -Peptid nicht mehr exprimiert wird. Bei rückligierten, „leeren“ Vektoren wird es jedoch bei Induktion als MBP-Fusion exprimiert. Diese Eigenschaften des Plasmids werden zur Detektion erfolgreicher Klonierungen benutzt. Transformiert man die Plasmide in *E. coli*-Stämme, die chromosomal das  $\beta$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase codieren, wie z. B. XL1-Blue oder DH5 $\alpha$ , so kann man durch Ausplattieren dieser Zellen auf X-Gal/IPTG-Platten erfolgreiche (weiße Kolonien) von erfolglosen (blaue Kolonien) Klonierungsversuchen unterscheiden. Das fertige Fusionsprotein wird im Falle des pMalc2-Plasmids in das Cytoplasma abgegeben, im Gegensatz zum pMal-p2, wo ein zusätzliches Signalpeptid am N-Terminus des MBPs das Fusionsprotein ins Periplasma dirigiert.

Beim Plasmid pQE 30 befinden sich stromaufwärts der MCS sechs Histidin-Codons. Das klonierte Gen wird unter der Kontrolle eines artifiziellen Promotors exprimiert. Dieser besteht aus zwei *lac*-Operatoren ( $O_{lac}$ ), Bakteriophagen T5-Promotor ( $P_{T5}$ ) und einer künstlichen Ribosomen-Bindungsstelle (RBS II). Genau wie im pMAL-c2 erfolgt eine Derepression dieses Promotors durch Zugabe des Induktors IPTG.

Nach der Klonierung des zu exprimierenden Gens in einen der beiden Vektoren wurde folgendermaßen vorgegangen:

Bei pMALc2-Konstrukten wurde der Ligationsansatz entweder in den *E. coli* Stamm XL1-Blue oder DH5 $\alpha$  transformiert, der Transformationsansatz direkt auf eine 40  $\mu$ g/ml X-Gal 50  $\mu$ g/ml IPTG und 100  $\mu$ g/ml Ampicillin enthaltende LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Kolonien, die keine Blaufärbung zeigten wurden am nächsten Tag mit sterilen Zahnstochern auf eine weitere X-Gal/IPTG/Ampicillin-Platte

transferiert und wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Ausstriche, die immer noch Farblos waren wurden auf Ampicillin-Platten passagiert. Die Identifikation der korrekten Klone erfolgte durch analytische Plasmid-DNA-Präparation mit anschließender Restriktionsanalyse.

Bei pQE30-Konstrukten konnte lediglich nach der Transformation nach der Ampicillin-Resistenz selektiert, also nicht zwischen „leeren“, d. h. rücklegierten, Vektoren und solchen mit Insert unterschieden werden. Die über Nacht bei 37 °C inkubierten transformierten Zellen wurden daher direkt einer analytischen Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse unterworfen.

Die korrekten Klone wurden daraufhin auf die Synthese des gewünschten Proteins getestet. Dazu wurden je 3 ml atoklavierten, passend selektiven LB-Mediums mit allen positiven Klonen angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,6 im Schüttelinkubator vermehrt. Anschließend wurde in die Röhren IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mM gegeben und diese weitere drei Stunden inkubiert. Daneben wurden als Referenz die gleichen Klone ohne Induktion vermehrt. Nach Ablauf der Wachstumszeit wurden die nichtinduzierten Zellen durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge 5 min lang bei Raumtemperatur und 13.000 rpm pelletiert und in 750  $\mu$ l SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Die induzierten Zellen wurden einem Ultraschallaufschluß unterzogen und anschließend die unlöslichen Bestandteile 5 min lang bei 4 °C und 13.000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit SDS-Probenpuffer verستetzt. Das Pellet wurde ebenfalls in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Damit konnte getestet werden, ob das exprimierte Protein in löslicher Form oder als *inclusion bodies* vorlag.

Alle mit SDS-Probenpuffer versetzte Proben wurden 5 min lang bei 95 °C aufgeköcht und anschließend wie unter 3.21. beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Klone, die das gewünschte Protein in löslicher Form synthetisierten wurden als Glycerinkultur aufbewahrt, alle anderen verworfen.

Zur Präparation größerer Mengen nativen Proteins wurden zwischen 1 l und 10 l entsprechend selektiven LB-Mediums aus einer Übernachtskultur eines positiven Klons im Verhältnis 1: 100 angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 im Schüttelinkubator oder Fermenter bei der optimalen Wachstumstemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine IPTG-Konzentration von 5 mM eigestellt und weitere drei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch 10 min lange Zentrifugation im GS3-Rotor bei 4 °C und 9.000 rpm geerntet. Die Überstände wurden autoklaviert und verworfen, die Pellets je nach geplanter Reinigung in verschiedenen Puffern resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.17. Zellaufschluß durch Druck in der *French Press*

Zum Aufschluß größerer Zellmengen wurde die *French Press* eingesetzt. Dazu wurde ein Zellpellet so im Puffer der für den ersten Proteinreinigungsschritt vorgesehenen Säule sorgfältig resuspendiert, daß das Gesamtvolumen der Suspension 50 ml betrug. Im Falle von MBP-Fusionsproteinen wurde die Lösung zusätzlich auf 200 mM NaCl eingestellt. Der Zellaufschluß erfolgte unter Eiskühlung durch wiederholtes Ansaugen und Auspressen bei 1000 psi an einer French Pressure Cell Press. Die Zellen passierten eine ca. 1 mm schmale Öffnung und wurden durch die dabei auftretenden Scherkräfte zerstört. Es war darauf zu achten, daß der Druck nicht zu stark abfiel, weil sonst die Effektivität des Aufschlusses stark litt. Der Ansatz wurde anschließend 60 min lang bei 30.000 rpm und 4 °C im Ti60-Rotor ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde der Proteinreinigung zugeführt, die Pellets autoklaviert und verworfen.

### 3.18. Gelperfusionschromatographie

Zur weiteren, feineren Aufreinigung der Proteine wurde die BioCAD™ Workstation benutzt. Bei dieser Variante der HPLC wurden POROS-Säulenmaterialien eingesetzt. Sie bestehen aus kugelförmigen Partikeln mit Durchmessern von 10 bis 50 µm und sind von feinsten Poren mit Durchmessern von 600 bis 800 nm durchzogen. Dadurch haben sie eine sehr große aktive Oberfläche und gleichzeitig eine hohe Druckstabilität. Diese Eigenschaften erlaubten es, Proteine schneller als bei herkömmlichen FPLC/HPLC-Apparaturen aufzureinigen. Es standen Säulenmaterialien zur Anionen- und Kationenaustauscher-, Affinitäts-, hydrophoben Interaktions-, und *reversed-phase*-Chromatographie zur Verfügung. Die eingesetzten Säulen hatten einen Durchmesser von 4,6 mm und eine Länge von 5 cm (Säulenvolumen 831 µl).

Vor dem Auftragen auf die Säule mußten die Proteinlösungen sterilfiltriert werden. Die Proteinreinigung wurde zuerst empirisch mit kleineren Aliquots von 500 µl optimiert und anschließend mit bis zu 5 ml Auftragsvolumen präparativ durchgeführt.

#### 3.18.1. Aufreinigung von His<sub>6</sub>-getagten Proteinen an der Metallchelate-Säule

An Metallchelate-Säulen können His<sub>6</sub>-getagte Proteine in einem Schritt affinitätschromatographisch gereinigt werden. Dabei nutzt man die Tatsache, daß bei neutralem bis basischem pH-Wert eines der Stickstoffatome im Imidazolring der Aminosäure Histidin deprotoniert vorliegt, dessen freies Elektronenpaar koordinative Bindungen zu Übergangsmetallkationen ausbilden kann.

Das hierfür eingesetzte Säulenmaterial POROS MC20 mit einem Partikeldurchmesser von 20  $\mu\text{m}$  trägt als funktionelle Gruppe das Imidodiacetat (IDA). Diese Gruppe kann sowohl mit  $\text{Cu}^{2+}$  als auch mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladen werden. Dabei werden vier der sechs Koordinationsstellen des Metallions vom IDA abgesättigt, die verbleibenden zwei Koordinationsstellen werden für die Bindung des His<sub>6</sub>-tags benutzt.

Vor jeder Proteinreinigung mußte zunächst die Säule konditioniert werden. Dazu wurde sie zunächst von allen möglicherweise noch vorhandenen Metallkationen befreit. Dies wurde durch Spülen der Säule mit 10 Säulenvolumina Stripping-Lösung erreicht. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina deionisiertem Wasser gewaschen und durch Spülen mit 10 Säulenvolumina Cu(II) oder Ni(II)-Lösung beladen. Überschüssige Metallionen wurden durch Waschen mit 10 Säulenvolumina deionisiertem Wasser entfernt. Anschließend wurde die Säule im Laufpuffer äquilibriert und das Protein aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Imidazol-Konzentrationsgradienten (üblicherweise von 0 bis 500 mM). Neben einer Probe des Durchflusses der Proteinbeladung wurde die Fraktionierung des Eluates bei Beginn des Gradienten gestartet. Proteinhaltige Fraktionen wurden durch den Bradford-Tüpfeltest identifiziert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

### 3.18.2. Anionenaustauscher-Gelperfusionschromatographie

Als Anionenaustauscher-Säulenmaterial standen sowohl POROS HQ10 (Partikeldurchmesser 10  $\mu\text{m}$ ) und POROS HQ20 (Partikeldurchmesser 20  $\mu\text{m}$ ) zur Verfügung. Beide sind mit quaternären Polyethylenimininen als funktionelle Gruppen derivatisiert.

Nach der Beladung der Säule mit Protein wurde so lange mit Säulenpuffer gespült, bis kein Protein mehr im Durchfluß nachweisbar war. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Konzentrationsgradienten, die Fraktionierung des Eluates wurde bei dessen Beginn gestartet. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden mit Bradford-Tüpfeltests nachgewiesen und mit SDS-PAGE näher untersucht.

### 3.19. Affinitätschromatographie an der Dextrinsäule

Proteine, die mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) fusioniert waren, konnten über die Affinitätschromatographie auf einer Dextrinsäule aufgereinigt werden. Dextrin ist ein wasserunlösliches,  $\alpha$ -(1-4)-glycosidisch verknüpftes D-Maltose Homopolymer und wird vom MBP hochaffin gebunden.

Das weiße, pulverförmige Dextrin wurde mehrmals vorsichtig in deionisiertem Wasser suspendiert, wobei die Ausübung von Scherkräften wie z.B. Umrühren auf das Material

vermieden werden sollten. Nach jedem Waschgang wurde der Überstand, der Reste von zerkleinertem Säulenmaterial, die sog. „fines“, enthielt, vorsichtig dekantiert, bis dieser frei von fines war. Anschließend erfolgte ein letzter Waschgang in Säulenpuffer. Die folgenden Schritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Das Dextrin wurde in Säulenpuffer resuspendiert und vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung in einen Säulenkörper gegossen. Dort ließ man das Material sedimentieren. Die Größe der Säule richtete sich nach der Menge des zu reinigenden Materials, üblicherweise betrug der Durchmesser 5 cm und die Füllhöhe 7 cm. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Säulenpuffer äquilibriert, wobei sie im Gravitations-Fluß-Modus betrieben wurde. Anschließend wurde die Säule mit dem durch Ultrazentrifugation geklärten Rohextrakt beladen und so lange mit Säulenpuffer gewaschen, bis kein Protein mehr eluierte. Dies wurde durch Bradford-Tüpfelproben überprüft. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer. Dieser enthält 20 mM D-Maltose, die das Dextrin aus der MBP-Bindungstasche verdrängt und so das Protein von der Säule löst. Das Eluat wurde manuell in 10-ml-Reagenzröhrchen fraktioniert. Die Proteinhaltigen Fraktionen wurden wiederum durch Bradford-Tüpfeltests identifiziert, wobei die Fusionsproteine häufig schon durch eine Trübung der Fraktionen zu erkennen waren. Diese Trübung entsteht durch Aggregatbildung der MBPs. Falls das Salz oder die Maltose für spätere Anwendungen störend wirkte, wurden die Proteine anschließend dialysiert.

### 3.20. Dialyse

Die Dialyse dient zur Abtrennung kleiner Moleküle wie Salze oder Imidazol aus Proteinlösungen. Dazu wurde ein Dialyseschlauch passender Ausschlußgröße zwei mal in 100 mM EDTA gekocht und anschließend mit deionisiertem Wasser gründlich gespült. Der Schlauch konnte zur Lagerung in 30% Ethanol gelagert oder in 10% Glycerin autoklaviert werden. Für die Dialyse wurde von einem präparierten Schlauch ein geeignet großes Stück abgeschnitten, gründlich mit deionisiertem Wasser gespült und auf einer Seite sorgfältig verknotet. Beim Einfüllen der Proteinlösung ist auf die Unversehrtheit des Schlauches zu achten. Nach Verknotung der noch offenen Seite wurde der Schlauch in mindestens das 100-fache Volumen Dialysepuffer bei 4 °C gegeben und die Dialyse unter langsamem Rühren über Nacht durchgeführt. Nach ca. zwei Stunden wurde der Dialysepuffer ausgewechselt.

### 3.21. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Kalibrierung einer neu angesetzten Bradford-Reagenz-Lösung wurden aus einer 1mg/ml BSA-Stammlösung je drei mal zehn Aliquots entnommen, die zwischen 1µg BSA und 10 µg BSA enthielten und in 1-ml-Kunststoffküvetten gegeben. Die Küvetten wurden mit Bradford-Reagenz auf 1ml aufgefüllt, 10 min lang bei Raumtemperatur inklubiert und ihre Extinktion bei 595 nm ( $A_{595}$ ) bestimmt. Die Messungen fanden in einem Zweistrahl-Photometer mit reiner Bradford-Lösung als Referenz statt. Eine Auftragung von  $A_{595}$  vs. Proteinmenge lieferte eine Kalibrierkurve, die zur Bestimmung des Proteingehalts unbekannter Proben diente.

Zur groben Kontrolle auf Anwesenheit von Proteinen in Fraktionen einer chromatographischen Trennung wurden je 90 µl Bradford-Reagenz in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 10 µl der jeweiligen Fraktionen veretzt. Eine Blaufärbung des Gemisches nach einer Inkubationszeit von ca 10 min. zeigte das Vorhandensein von Proteinen an.

### 3.22. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE handelt es sich um ein Verfahren zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei durchwandern die Proteingemische zwei Zonen verschiedener Polyacrylamid-Gele. Im oberen, geringer vernetzten Sammelgel werden die Proteine bei pH 6,8 zu einer scharfen Bande fokussiert, die sich bei Eintritt in das stärker vernetzte Sammelgel bei pH 8,8 in seine verschiedenen Komponenten trennt. Große Proteine wandern langsamer, kleine Proteine schneller durch die Gelmatrix. Das im Puffer enthaltene SDS dient zur Denaturierung der Proteine und schirmt gleichzeitig die intrinsische Ladung der Proteine ab. Durch Anlagerung an die Moleküle verleiht es den linearisierten Proteinen eine effektive, zur Größe der Polypeptidketten proportionale negative Ladung und stellt so sicher, daß alle Komponenten ausschließlich in Richtung Anode wandern. Das daneben anwesende Mercaptoethanol dient zur Spaltung von Disulfidbrücken.

Zwei Glasplatten (9 × 15 cm) wurden gründlich erst mit Spülmittel, dann mit deionisiertem Wasser und schließlich mit Ethanol gewaschen. Zwischen beide Scheiben wurde der Kunststoffspacer so plaziert, daß nach Fixierung des Aufbaus mit Metallklammern keine Flüssigkeit zwischen den Scheiben mehr austreten konnte. Anschließend wurden die Lösungen für das Trenn- und Sammelgel in den gewünschten Prozentualitäten angesetzt (Tab. 4)



**Tabelle 4: Zusammensetzungen der SDS-PAGE Gelmischungen**

	5 ml Sammelgel	10 ml Trenngel			
Prozentualität	4 %	5 %	7,5 %	10 %	15 %
Acrylamid- Bisacrylamid- Stammlösung	0,67 ml	1,67 ml	2,5 ml	3,4 ml	5 ml
Puffer	1,25 ml Sammelgel-Puffer	2,5 ml Trenngel-Puffer			
Wasser	3,08 ml	5,8 ml	5 ml	4,2 ml	3,5 ml

Nach Zugabe von 50  $\mu$ l 10 % APS und 5  $\mu$ l TEMED zur Trenngel-Lösung wurde diese blasenfrei bis ca. 1 cm unterhalb des Glasrandes in die Apparatur gegossen und vorsichtig mit Isopropanol zur Glättung der Phasengrenze überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und die Apparatur zur Beseitigung letzter Alkohol-Reste mit Wasser gespült. Anschließend wurde das Trenngel mit der zuvor mit 50  $\mu$ l 10% APS und 5  $\mu$ l TEMED versetzten Sammelgel-Lösung bis zur vollständigen Füllung der Apparatur überschichtet. In das noch flüssige Gel wurde sofort ein passender Kamm gesteckt, der die Taschen für die Proteinlösung formte.

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden Spacer und Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gespannt. Beide Reservoirs wurden mit Elektrophoresepuffer gefüllt, eventuell entstandene Luftblasen unter dem Gel mittels einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt und Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült.

Vor dem Aufragen von Proteinlösungen wurden diese im Verhältnis von 1:10 mit 10 $\times$  SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min lang bei 95 °C inkubiert. Im Falle von Zellpellets einer Miniexpression wurden diese in 500  $\mu$ l 1 $\times$  SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95 °C 5 min lang inkubiert und anschließend zentrifugiert (2 min, 13000 rpm, Raumtemperatur).

Die aufgekochten Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Geltasche injiziert. Als Referenz wurden zusätzlich 7  $\mu$ l eines Breitband-Proteinmarker-Gemischs in eine der Taschen gegeben. Dieses Gemisch diente zur späteren Größenordnung der zu analysierenden Banden. Die Elektrophorese erfolgte bei 170V, 50 mA, bis die Bromphenolblau-Front gerade aus dem Gel wanderte. Anschließend wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, mit deionisiertem Wasser gewaschen und wie unter 3.22. beschrieben gefärbt.

### 3.23. Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei Banden mit ca. 40 ng Protein (Sambrook *et al.*, 1989) Die zu färbenden Gele wurden zunächst in einer Kunststoffschale kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen und dann unter sanftem Schütteln 15 min lang in ca. 200 ml Färbelösung belassen. Die Färbelösung kann wiederverwendet werden und wurde

nach Ablauf dieser Zeit zurück in die Vorratsflasche gegossen. Die Entfärbung des Gelhintergrundes erfolgte in im Microwellenofen erhitztem Wasser. Zur Steigerung des Kontrastes konnte das Gel nach zweimaligem Wasserwechsel erneut eine Minute lang in die Färbelösung gelegt und dann wie zuvor in heißem Wasser entfärbt werden. Zur kurzen Lagerung von wenigen Tagen wurden die Gele in Wasser aufbewahrt, zur langfristigen Archivierung in Plastikfolie eingeschweißt und gegebenenfalls fotografiert oder gescannt.

### **3.24. *In-vitro*-Phosphorylierung von Proteinen**

Zur Protein-Phosphorylierung wurden 10-Vol% 10× Phosphorylierungspuffer zugesetzt und das Gemisch 20 min lang bei 28 °C inkubiert. Anschließend konnte das so behandelte Protein direkt für EMSAs eingesetzt werden.

### **3.25. EPS-Präparation**

Entsprechend zugeschnittene, autoklavierte Cellophan-Membranen wurden so auf LB-Agar-Platten gelegt, daß die gesamte Oberfläche des Mediums bedeckt war und die Membran noch ca 1 bis 2 mm an der Innenseite der Petrischale emporragte. Dies sollte die Diffusion größerer Polysaccharide aus dem Medium in die Bakterienkapseln und so die Verfälschung der Meßwerte verhindern. Alle dabei entstandenen Luftblasen mussten sorgfältig entfernt werden, es war wichtig, daß Membran und Medium stets in Kontakt miteinander blieben. Die Cellophanoberfläche ließ man kurz unter sterilen Bedingungen an der Luft antrocknen und strich dann den entsprechenden Bateriaienstamm in einer zick-zack-förmigen Linie aus. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C oder 28 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 3 ml Suspensionslösung auf die Platten gegeben, die Bakterienzellen darin aufgeschwemmt und mit Hilfe einer Pipette in ein 30-ml-Corex-Röhrchen überführt. Es schloss sich eine Spülung der Plattenoberfläche mit weiteren 3 ml Suspensionslösung an. Aus den vereinigten Bakterien-Suspensionen wurde ein Aliquot von 200 ml abgenommen und 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup> und 1:10<sup>7</sup> verdünnt. 250 µl dieser Verdünnungen wurden auf separate LB-Agar-Platten ausgestrichen und erlaubten die Bestimmung der Zellzahl in der Suspension.

Durch 3 min langes sorgfältiges Vortexen der restlichen Bakterien-Suspension wurde auf mechanischem Weg die Kapsel von den Bakterien getrennt. Das Gemisch wurde 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C im Sorvall SS 34 Rotor zentrifugiert und der EPS-haltige Überstand anschließend vom Zellpellet abgenommen. Nach diesem Schritt war es wichtig, das Volumen der EPS-Lösung zu notieren, da es in den nächsten Schritten zu Verdünnungseffekten kommen konnte und es so möglich war, diese durch Korrekturfaktoren zu kompensieren.

Die nach der Zentrifugation erhaltenen Überstände wurden in Dialyseschläuche überführt und über Nacht gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Dabei sollten möglicherweise vorhandene, aus dem Medium stammende Monosachharide aus der EPS-Lösung entfernt werden. Nach der Dialyse konnte man die Lösung entweder direkt weiterbenutzen oder lyophilisieren.

### **3.26. Anthron-Test zur Bestimmung der Glucose-Konzentration**

Je 100  $\mu$ l der EPS-Lösungen wurden mit 900  $\mu$ l deionisiertem Wasser versetzt und mit Anthonreagenz auf 5 ml aufgefüllt. Die Proben wurden vorsichtig gevortext und anschließend 10 min lang in einem Wasserbad bei 100 °C inkubiert. Dabei wurden die Polysaccharide durch die konzentrierte Schwefelsäure in ihre Monosaccharid-Bausteine gespalten. Diese Monosaccharide gingen mit dem Anthron eine Farbreaktion ein, die Lösungen schlugen von gelb nach grün um. Nach Abkühlen der Mischungen wurden die Extinktionen bei 625 nm gemessen. Zur Kalibrierung einer neu Angesetzten Anthron-Reagenz-Lösung wurde eine Eichkurve mit verschiedenen konzentrierten Glucose-Lösungen aufgenommen. Dazu wurden zehn Lösungen der Konzentrationen 1 mg/ml bis 100  $\mu$ g/ml Glucose hergestellt und deren Extinktion bei 625 nm über die Glucosekonzentration aufgetragen. Mit Hilfe dieser Kalibrierkurve konnten die unbekanntes EPS-Konzentrationen berechnet werden (nach Dubois *et al.*, 1956)

### **3.27. Hybridisierung von Oligonukleotiden**

Um für Protein-DNA-Bindungsassays kleine, und damit durch PCR schlecht zugängliche, doppelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten, wurde diese durch Hybridisierung aus einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt.

Dazu wurden 18  $\mu$ l eines äquimolaren Gemisches der beiden komplementären Oligonukletide in einem 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2  $\mu$ l des 10 $\times$  Hybridisierungspuffers versetzt, gründlich vermischt und durch Zentrifugation (10 s, 5000 rpm, Raumtemperatur) am Boden des Gefäßes gesammelt. Das Gemisch wurde anschließend in einem auf 95 °C erwärmten Heizblock 10 min lang inkubiert. Nach Ausschalten des Heizblocks verblieb das Gefäß solange in dem Gerät, bis sich das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt hatte.

### **3.28. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mittels *Fill-in***

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente wurde durch „Fill-in“ rezessiver 3'-Enden durch die Klenow-Polymerase realisiert. Diese wurden entweder durch Verdau mit einer Restriktions-Endonuclease oder durch Hybridisierung zweier entsprechend

gestalteten einzelsträngiger Oligonukleotide erhalten. Zur Markierung wurde das „Multiprime DNA labelling system“ (Amersham) eingesetzt.

20 µl eines Restriktions- oder Hybridisierungsansatzes wurden mit 5 µl 10× Reaktionspuffer, je 4 µl der erforderlichen dNTP-Stammlösungen, je nach Alter der Lösung 3 bis 6 µl  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP sowie 2 µl Klenow-Polymerase versetzt, mit Wasser zu einem Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und gut durchmischt. Zum vollständigen Einbau aller Nucleotide wurde das Gemisch bei 25 °C über Nacht inkubiert und mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ wie unter 3.28.1. beschrieben aufgereinigt.

### **3.28.1. Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit**

Um nichtinkorporierte Nucleotide, Puffersubstanzen und Proteine aus den Markierungsansätzen zu entfernen, wurde das „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ benutzt. Das Reinigungsprinzip beruht auf der spezifischen Adsorption von DNA-Fragmenten an einer Silikamembran in Gegenwart höherer Salzkonzentrationen. Die saubere DNA kann durch Waschen mit Tris-Puffer oder Wasser von der Matrix eluiert werden.

50 µl des Markierungsansatzes wurden mit 450 µl Puffer PN versetzt und das Gemisch auf ein QIAquick-Säulchen aufgetragen. Um das Durchlaufen der Lösung durch die Säule zu beschleunigen, wurde diese in einer Tischzentrifuge 1 min lang bei 6000 rpm, dann 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der erste, langsamere Zentrifugationsschritt sollte die Bildung von Aerosolen unterdrücken. Der stark radioaktive Durchlauf wurde gesammelt und angemessen entsorgt. Die Säule wurde je zwei mal mit 500 µl Puffer PE gewaschen. Nach jeder Pufferzugabe folgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Die Durchflüsse wurden gesammelt und als radioaktiver Abfall entsorgt. Anschließend wurde die Säule nochmals 1 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert, um alle Ethanol-Reste von der Matrix zu entfernen. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte durch Zugabe von 220 µl Puffer EB in die Säule und Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm. Das Eluat wurde in einem 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. 2 µl dieser Lösung wurden benutzt, um durch Szintillationsmessung wie unter 3.29. beschrieben, die Markierungseffizienz zu bestimmen.

### **3.29. Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA)**

Die EMSA-Technik ist ein wichtiges Werkzeug zur Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Trennt man ein Gemisch aus Ziel-DNA und DNA-bindendem Protein auf einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf, so zeigt der Protein-DNA-Komplex gegenüber der freien DNA ein unterschiedliches Laufverhalten. Aufgrund seiner Größe wird

der Komplex stärker von der Gelmatrix retardiert, läuft also langsamer. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich nicht nur qualitative Aussagen über Bindung oder Nichtbindung treffen, sondern bei geeigneten experimentellen Bedingungen auch die Stöchiometrie und Gleichgewichtskonstanten ermitteln.

Standardmäßig wurden bei EMSAs 5% native Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Zwei Glasplatten (170 × 130 × 1 mm) wurden nacheinander mit Spülmittel, Wasser und Ethanol gereingt, um alle Reste von Silikonfett zu entfernen. Eine Gelapparatur aus den Glasplatten und drei Spacern wurde mit Silikonfett gut abgedichtet und mit nativer Gellösung, der 200 µl 10 % APS und 10 µl TEMED zugegeben waren, gefüllt. In das noch flüssige Gel wurde ein Kamm gesetzt und der Aufbau ca. 1 Stunde zur Polymerisation stehen gelassen. Anschließend wurden Kamm und horizontaler Spacer entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gespannt. Beide Pufferreservoirs wurden mit 1× TBE gefüllt und eventuell entstandene Luftblasen unter dem Gel mit einer Spritze mit gebogener Kanüle entfernt. Zur Vorbereitung des Gels wurde eine Präelektrophorese bei 225 V unter Ventilator Kühlung durchgeführt, bis die Stromstärke einen konstanten Wert von etwa 35 mA erreichte.

Währenddessen wurden die Ansätze zusammenpipettiert. Dazu wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 5 µl Ret-Mix vorgelegt, mit den gewünschten Mengen an Proteinlösungen und radioaktiv markierter DNA (mindestens 100.000 cpm pro Tasche) versetzt und schließlich mit Wasser auf das Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden kurz durchmischt, zentrifugiert und anschließend, falls nicht anders angegeben, 10 min lang bei 28 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden mit 5 µl auf 28 °C vortemperiertem nativem Probenpuffer versetzt und danach auf das präelektrophorierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 225 V unter Ventilator Kühlung durchgeführt. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurde die Elektrophorese zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Für kleine Fragmente unter 100 bp ließ man die Bromphenolblau-Bande bis ungefähr zur Hälfte des Gels wandern, für größere Fragmente konnte die Bromphenolblau-Front knapp die Unterkante des Gels erreichen.

Das fertige demontierte Gel wurde auf einem zurechtgeschnittenen Stück Whatman 3MM Filterpapier fixiert, mit Saran-Folie bedeckt und auf einem Trockentisch mit angeschlossener Vakuumpumpe und Kühlfalle bei 70 °C getrocknet. Die Visualisierung der radiaktiven Banden erfolgte durch Autoradiographie. Zur besseren Detektion wurde zusätzlich ein Intensivierungs-Schirm eingesetzt.

### **3.30. Szintillationsmessung**

Die Bestimmung des <sup>32</sup>P-Gehalts einer Probe wurde standardmäßig mittels der Szintillationsmessung durchgeführt. Dazu wurden entweder Lösungen oder aus getrockneten Polyacrylamid-Gelen ausgeschnittene Banden direkt in ein Szintillationsgefäß gegeben und mit 5 ml Szintillations-Cocktail versetzt. Dabei war auf eine gute Durchmischung bzw.

vollständige Bedeckung und Benetzung der Probe zu achten. Nach Verschließen der Gefäße wurden diese im Szintillationszähler eine Minute lang mit einem  $^{32}\text{P}$ -sensitiven Programm gemessen.

### **3.31. *In-vitro*-Selektion (SELEX)**

Die *in-vitro*-Selektion diente zur Auffindung einer optimierten DNA-Bindungsstelle für das RcsAB-Heterodimer. Dabei handelt es sich um eine iterative Technik. Aus einem Gemisch vieler verschiedener zufälliger DNA-Fragmente werden mit geeigneten Methoden solche ausgewählt, die eine erhöhte Affinität zum Zielmolekül aufweisen. Diese Fragmente werden isoliert, vermehrt und einer neuen Selektionsrunde unterzogen, bis im Idealfall die optimale, hochaffine Sequenz gefunden wird.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus EMSA und PCR angewandt. DNA-Fragmente mit bis zu vier aufeinanderfolgenden zufälligen Nukleotid-Positionen wurden im EMSA durch das RcsAB-Heterodimer gebunden und die retardierten Banden ausgeschnitten. Die darin enthaltenen Fragmente wurden eluiert (siehe 3.31.) und mit Hilfe der PCR reamplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte konnten einem weiteren EMSA unterzogen werden. Diese Selektionszyklen wurden zur Optimierung der Sequenz mindestens dreimal wiederholt. Nach Ende der Selektionsprozedur wurden die gefundenen Fragmente in das Plasmid pBluescript KS<sup>+</sup> kloniert und sequenziert (siehe 3.32.).

### **3.32. DNA-Elution aus Polyacrylamidgelen**

Bei der SELEX-Technik war es notwendig, die im EMSA retardierte DNA/Protein-Komplex-Bande zur weiteren Amplifikation aus der Polyacrylamid-Matrix zu eluieren. Dazu wurden die Gele zunächst in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt und die retardierte Bande mit einem Sklapell ausgeschnitten. Der Gelabschnitt wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer versetzt. Anschließend wurde das Gelstückchen mit Hilfe einer 10- $\mu\text{l}$ -Pipettenspitze so gut wie möglich zerkleinert und die Suspension zur vollständigen Durchmischung gevortext. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln im Heizblock inkubiert und danach 5 min lang bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und konnte direkt zur PCR eingestetzt werden.

### 3.33. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Bestimmung der DNA-Sequenzen der durch *in-vitro*-Selektion erhaltenen Fragmente wurde die Dideoxy-Kettenterminationsmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) benutzt. Dieser Methode liegt eine modifizierte DNA-Polymerasereaktion zugrunde. Ausgehend von einem Primer-Oligonukleotid wird ein komplementärer Strang der Templat-DNA synthetisiert. In der Reaktionsmischung befindet sich jedoch neben den vier dNTPs dATP, dCTP, dGTP und dTTP im Unterschuß ein 2',3'-Dideoxynukleotid (ddNTP), welches aufgrund seiner fehlenden 3'-OH-Gruppe zur Termination der DNA-Synthese führt. Da das ddNTP im Unterschuß vorliegt, werden nicht sofort alle Ketten an der erstmöglichen Position terminiert, sondern zufällig alle für dieses ddNTP möglichen Fragmentlängen erzeugt. Führt man vier Parallelreaktionen mit jeweils ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP durch und trennt die Reaktionsansätze anschließend elektrophoretisch, so läßt sich anhand des Bandenmusters direkt die untersuchte DNA-Sequenz ablesen.

Für die hier durchgeführten Sequenzierungen wurde das „T7 Sequenase v2.0“-Kit von Amersham Life Science benutzt. Zur Hybridisierung der Primer mit der Templat-DNA wurde ein Gemisch aus 1 µl Primer, 1µl 1:10 verdünnter Templat-DNA, 2µl T7-Sequenase-Puffer und 6 µl tridest. Wasser erst zwei min lang auf 65 °C erhitzt und dann langsam über einen Zeitraum von ca. 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Der so erhaltene Annealing-Mix wurde mit 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl 1:5 verdünntem Labeling-Mix, 0,5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP und 2 µl einer 1:8-Verdünnung der T7 Sequenase DNA Polymerase (entspricht 3,25 *units*) versetzt und nach gründlicher Durchmischung zwei bis fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurde in vier mit „G“, „A“, „T“ und „C“ markierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 2,5 µl des jeweiligen Terminationsgemisches vorgelegt und auf mindestens 37 °C (maximal bis zu 45 °C) vorgewärmt. Nach Abschluß der Markierungsreaktion wurden je 3,6 µl Labeling-Mix in die vier vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt und bei 37 °C zwei bis fünf min lang inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 4 µl Stop-Lösung beendet und die Ansätze auf Eis gelagert.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsansätze wurde eine Harnstoff-PAGE eingesetzt. Dazu wurde die Gellösung frisch angesetzt und entgast. Zwei Sequenzgel-Glasplatten (35 × 45 cm) wurden gründlich erst mit Wasser, dann mit Ethanol gereinigt und anschließend silanisiert. Die so behandelten Platten wurden, durch 0,4 mm dicke Spacer voneinander getrennt, übereinander gelegt und die Seiten und Ecken dieses Aufbaus zusätzlich mittels Klebeband abgedichtet. Die mit APS und TEMED versetzte Gellösung wurde nun vorsichtig und möglichst blasenfrei zwischen die Platten gegossen. Anschließend wurde das Gels mit Hilfe einer Wasserwaage in eine horizontale Lage gebracht und ein Kamm mit der geraden Seite ca. 5 mm tief in das Gel geschoben. Nach vollständiger Polymerisation wurden der untere Spacer, Klebeband und Kamm entfernt und das Gel in eine

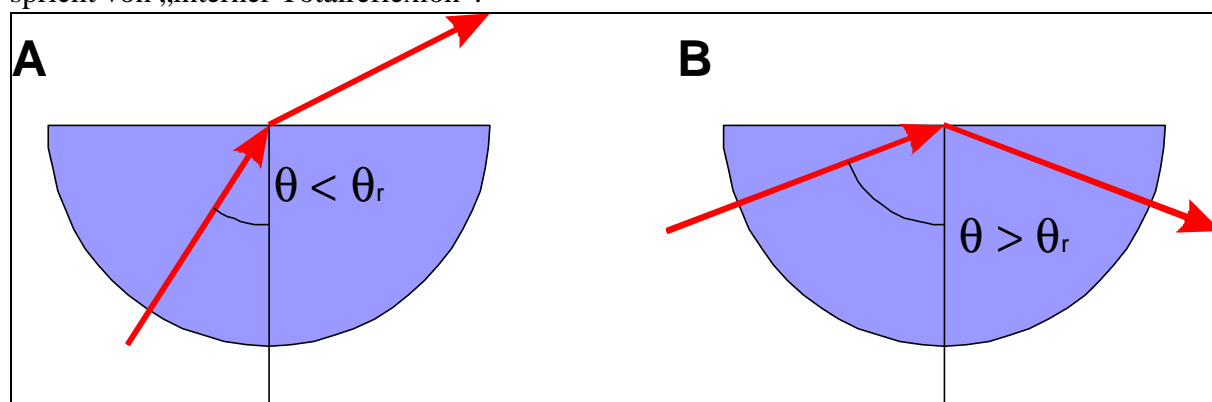
passende Apparatur eingespannt. Als Laufpuffer wurde  $1 \times$  TBE eingesetzt. Nachdem das Gel ca. 1 Stunde bei 85 W (bis zu 2800 V, 40 bis 60 mA) vorgelaufen war, wurde die Elektrophorese unterbrochen, der Kamm mit der „Sägezahn“-Seite („sharktooth“) so auf das Gel gesetzt, daß die Zähne gerade ins Gel eindringen und schließlich je  $5 \mu\text{l}$  der jeweiligen Sequenzierungsreaktionen in die entstandenen Taschen aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese unter den gleichen Bedingungen fortgesetzt, wobei sich die Laufzeit nach der Lage und Länge der zu bestimmenden Sequenz richtete.

Das fertige Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese vorsichtig aus der Apparatur entnommen. Nach Entfernung der oberen Glasplatte wurde das Gel auf einem passend zugeschnittenen Stück Filterpapier fixiert, mit Saran-Folie bedeckt und getrocknet. Ein Röntgenfilm wurde anschließend, je nach der Stärke der Radioaktivität entweder über Nacht oder wenige Stunden, dem trockenen Gel exponiert und entwickelt.

### 3.34. Biomolekül-Interaktions-Studien mit der Oberflächen Plasmon Resonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)

Die SPR ist ein optisches Verfahren, welches es erlaubt, in Echtzeit die kinetischen Charakteristika der Interaktion zweier Biomoleküle zu messen.

Dabei wird ein halbkreisförmiges Prisma eingesetzt. Das für dieses Verfahren wichtigste Phänomen stellt die „interne Totalreflexion“ (TIR) dar. Abb. 8 zeigt das Verhalten eines solchen Prismas. Bei kleinen Winkeln  $\theta$  tritt ein eingestrahler Lichtstrahl unter einem bestimmten Brechungswinkel aus der Flachseite des Prismas aus. Je größer  $\theta$  gewählt wird, desto kleiner wird der Austrittswinkel. Bei einem bestimmten Winkel  $\theta_r$  verläuft das gebrochene Licht parallel zur Flachseite des Prismas. Für alle  $\theta$  größer  $\theta_r$  wird das Licht innerhalb des Prismas vollständig reflektiert und tritt auf der gebogenen Seite wieder aus, man spricht von „interner Totalreflexion“.



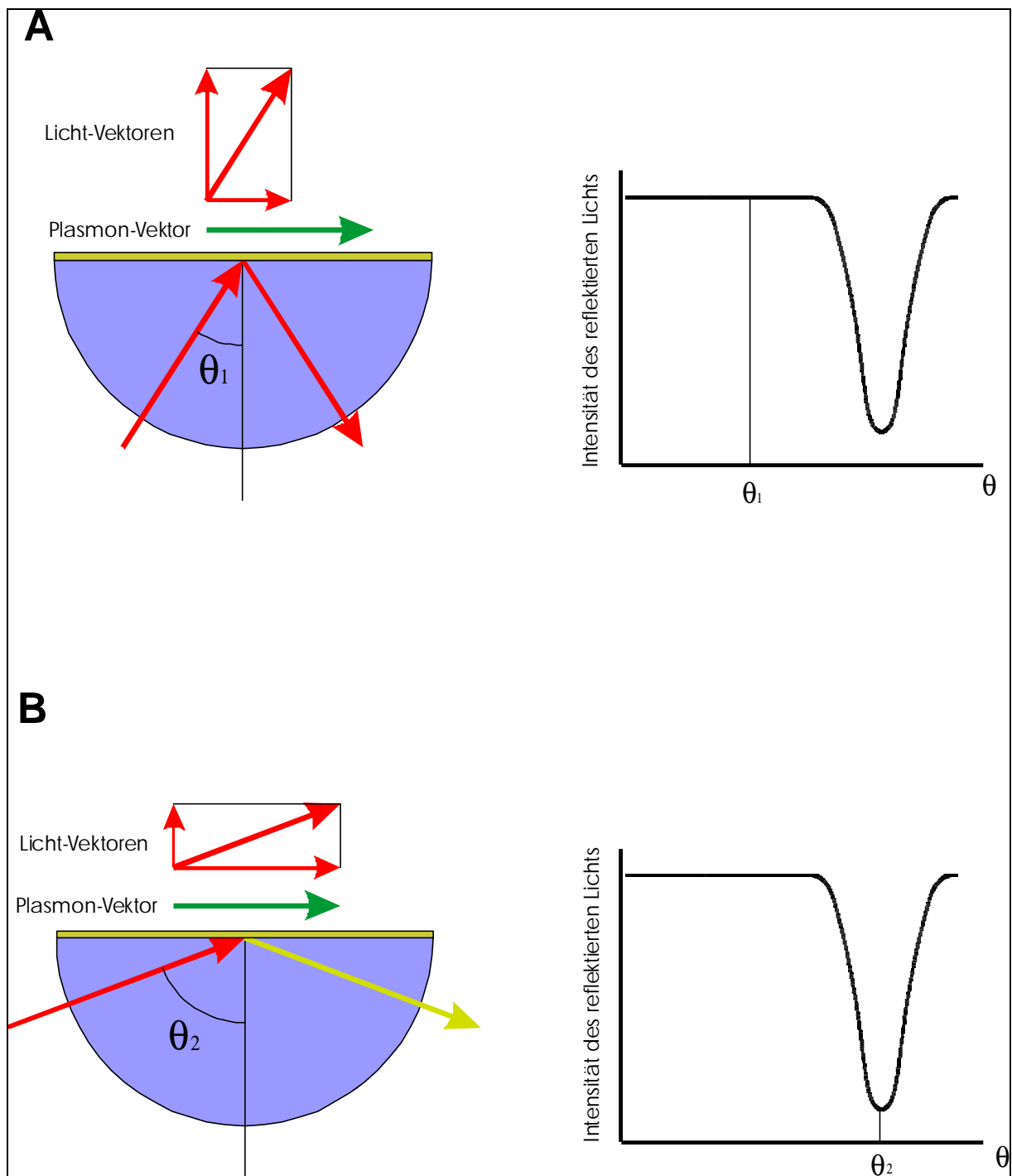
**Abbildung 8: Physikalische Grundlagen der SPR**

A: Brechungsverhalten von Licht in einem halbrunden Prisma bei einem Einstrahlwinkel unterhalb des kritischen Wertes  $\theta_r$ . B: Bei einem Einstrahlwinkel oberhalb des kritischen Wertes  $\theta_r$  tritt interne Totalreflexion auf (nach Markey, 1999)



Obwohl kein Licht die Flachseite des Prismas durchdringt, reicht dessen elektrisches Feld ungefähr um ein Viertel seiner Wellenlänge über die reflektierende Oberfläche hinaus.

Befindet sich auf dieser Oberfläche ein dünner Goldfilm, so kann das elektrische Feld mit freien Elektronen der Goldmatrix interagieren. Dabei werden unter bestimmten Voraussetzungen Photonen in Oberflächen-Plasmone, Elektronendichte-Wellen, umgewandelt. Das Wort „Plasmon“ steht für die korpuskulare Repräsentation dieses Wellenphänomens. Sowohl Lichtwellen als auch Plasmone haben, als Teilchen betrachtet, einen ihnen eigenen Impuls. Der Impuls eines Teilchens ist eine vektorielle Größe, charakterisiert durch seine Stärke und Richtung. Für einen Lichtstrahl, der in einem Winkel  $\theta$  auf eine Oberfläche trifft, läßt sich der Impuls in Komponenten parallel und senkrecht zu dieser Oberfläche auflösen. Da Plasmone auf den Goldfilm beschränkt sind, ist für die weitere Betrachtung nur die parallele Vektorkomponente des Lichtstrahls entscheidend. Eine Resonanz entsteht dann, wenn die parallele Vektorkomponente des eingestrahnten Lichts gerade so groß ist, um in der Goldoberfläche ein Plasmon mit gleichgroßem Impuls-Vektor zu induzieren (Abb. 9). Die Voraussetzungen zur Anregung eines Plasmons hängen von der Beschaffenheit des Goldfilms ab und werden außerdem durch eventuell auf der Oberfläche gebundene Moleküle beeinflusst. Diese verändern den Winkel des eingestrahnten Lichtes, unter dem Resonanz, und damit verbunden minimale Reflexion, zu beobachten ist. Die Änderung des Resonanzwinkels ist damit ein Maß für die Menge der an der Goldoberfläche gebundenen Teilchen.



**Abb. 9: Resonanzbedingungen für die Reflexionsauslöschung**

A: Der Plasmon-Vektor und die horizontale Licht-Vektorkomponente haben verschiedene Beträge und können nicht in Resonanz treten. Die Intensität des reflektierten Lichtes bleibt maximal. B: Der Plasmon-Vektor und die horizontale Licht-Vektorkomponente haben identische beträge. Die resultierende Resonanz führt zur Minimierung der Intensität des reflektierten Lichts.

Für die Messungen in dieser Arbeit wurde eine „BIAcore X“-Anlage von BIAcore (Uppsala, Schweden) benutzt. Vom Hersteller werden verschiedenartig substituierte Goldoberflächen zur Immobilisierung von Liganden angeboten. Hier kamen die Sensorchips „SA“ und „NTA“ zum Einsatz.

Beim „Sensorchip SA“ handelte es sich um eine Goldoberfläche, die mit einer Dextranmatrix beschichtet war. Die Dextranschicht selbst war über Spacer-Gruppen mit Streptavidin-Molekülen derivatisiert. Auf diesen Oberflächen war die Immobilisierung biotinylierter Liganden möglich. Hierzu wurden biotinylierte DNA-Fragmente eingesetzt, die entweder durch PCR mit entsprechend präparierten Primern oder durch Hybridisierung biotinylierter einzelsträngiger Oligonukleotide hergestellt werden konnten. Dazu wurde die DNA-Lösung mit HBS-Puffer 1:5 bis 1:10 verdünnt, mit 1 M NaCl auf 300 mM NaCl eingestellt und bei einer Flußrate von 1 µl/min über die Chipoberfläche gegeben. Für empfindliche kinetische Messungen wurden Beladungsmengen von maximal 100 Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) gewählt, wodurch der Effekt des Massentransports unterdrückt werden sollte. Unter Massentransport versteht man die Rückbindung eines schon von der Oberfläche abdissoziierten Analyten, bevor dieser durch den Lösungsmittelstrom abtransportiert werden kann. Dieser Effekt kann zu Verfälschungen bei der Bestimmung der Dissoziationsrate ( $k_d$ ) führen. Für Bindungsexperimente mit den RcsB-Proteinen wurden höhere Beladungsdichten von ca. 800 RU benutzt. Die so präparierten Sensorchips waren bei 4 °C mehr als 6 Monate haltbar.

Die eigentlichen Protein-DNA-Bindungsstudien wurden in Bindungspuffer durchgeführt. Bei einer Flußrate von 25 µl/min oder 50 µl/min wurden Konzentrationsreihen der zu untersuchenden Proteine injiziert und möglichst bis zum Erreichen der Plateauphase mit der Ligandenoberfläche in Kontakt gebracht. Zur Darstellung der Dissoziationsphase wurde anschließend die Chipoberfläche mindestens 5 min lang mit Bindungspuffer gespült. Sofern die Proteine nach Ablauf dieser Zeit noch nicht vollständig abdissoziiert waren, wurde die Oberfläche durch einen Puls von 5 µl Regenerationslösung regeneriert. Das Gerät erlaubte die simultane Messung zweier Zellen. Auf diese Weise konnte ein DNA-Fragment unspezifischer Sequenz als Referenz eingesetzt werden. Die Resonanzsignale wurden als Differenzen zwischen spezifischer und unspezifischer Oberfläche gemessen. Darüber hinaus wurden der Analyt-Lösung zur Verhinderung unspezifischer Protein-DNA-Interaktionen 200 ng/ml BSA und 8 ng/ml λ-DNA als Kompetitoren zugesetzt.

Beim „Sensorchip NTA“ handelte es sich ebenfalls um eine dextranbeschichtete Goldoberfläche, die allerdings über Spacer-Gruppen mit NTA-Gruppen derivatisiert war. Die Methode zur Immobilisierung von Liganden auf dieser Matrix beruht auf der Bindung von Histidinen an ein NTA-chelatisiertes  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion und ist vom Prinzip her vergleichbar mit der Metallchelate-Affinitätschromatographie wie in 3.18.1. beschrieben.

Alle Messungen mit dem NTA-Chip wurden im Eluent-Puffer durchgeführt. Bevor der Ligand an die NTA-Oberfläche gebunden werden konnte, musste diese vorher konditioniert

werden. Dazu wurden 20 µl Stripping-Puffer mit 20 ml/min über die Oberfläche gegeben, anschließend ein *Wash*-Programmschritt ausgeführt. Danach wurden 20 µl Nickel-Puffer injiziert. Dies sättigte die Oberfläche mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen und führte zu einer Basislinienerhöhung von ca. 40 RU. Es folgte ein erneuter *Wash*-Schritt. Die zu immobilisierenden His<sub>6</sub>-*getagten* Proteine wurden in Eluent-Puffer 1:5 bis 1:10 verdünnt und mit einer Flußrate von 25 µl/min über die Chipoberfläche injiziert. Es wurden üblicherweise Beladungsmengen von ca. 1000 RU eingestellt. Als unspezifische Referenz diente ein His<sub>6</sub>-*getagtes* Modul des Surfactin-Synthetase-Komplexes aus *Bacillus subtilis*, welches keinerlei Gemeinsamkeiten mit den zu analysierenden Proteinen zeigte. Zusätzlich wurde der Analyt-Lösung 200 ng/ml BSA als Kompetitor zur Unterdrückung unspezifischer Protein-Protein-Interaktionen zugesetzt.

Die Analyt-Lösungen wurden bei 25 µl/min zwei min lang über die Ligandenoberfläche injiziert. Danach schloß sich eine Dissoziationsphase von 4 min an. Falls sich auch nach längerer Dissoziationszeit die Protein-Protein-Komplexe nicht auflösten, mußte der Chip erst mit Stripping-Lösung regeneriert und anschließend mit Nickel-Puffer und His<sub>6</sub>-Proteinen neu beladen werden.

Die Auswertung der gewonnen Rohdaten wurde mit der Software „BIAevaluation 3.0“ (BIAcore) durchgeführt. Wenn möglich, wurde als mathematisches Modell zur Berechnung der kinetischen Daten eine 1:1 Langmuir-Kinetik zugrunde gelegt, bei schwächeren Bindungen kam das „steady-state“-Modell zum Einsatz.

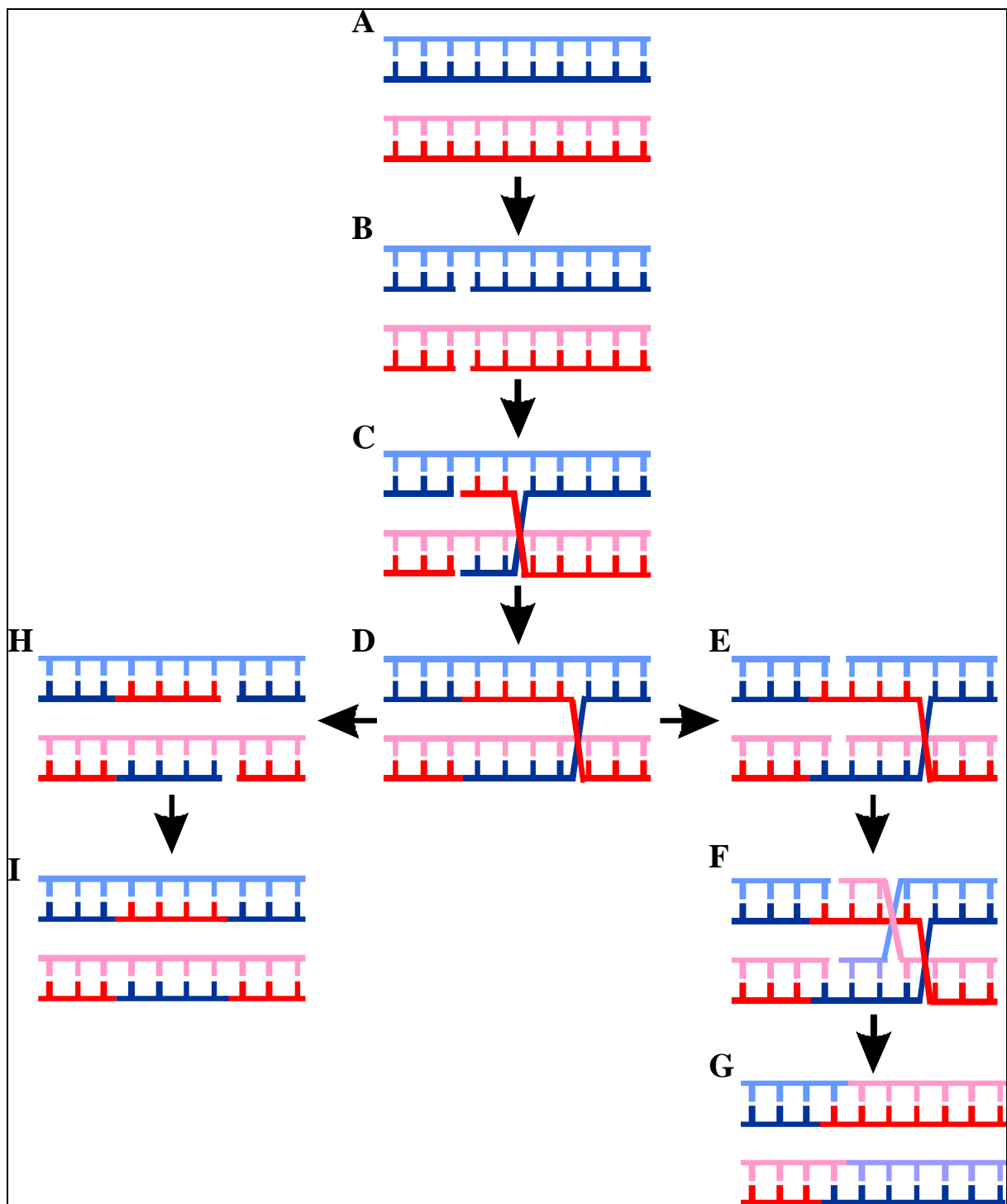
### **3.35. *In-vivo*-Mutagenese der bakteriellen chromosomalen DNA durch homologe Rekombination**

Die Einführung von Mutationen auf dem *E. coli* Chromosom erfolgte durch homologe Rekombination. Dabei handelt es sich um den Austausch homologer Abschnitte zwischen zwei doppelsträngigen DNA-Molekülen. Ein Modell des Rekombinationsmechanismus' ist in Abb. 10 A-I dargestellt. Der Prozeß wird durch Einzelstrangbrüche (*nicks*) in zwei einander entsprechenden Strängen gestartet (B). Die Einzelstränge überkreuzen (*Crossing over*) sich und paaren mit den komplementären Strängen des homologen DNA-Moleküls unter Bildung einer Heteroduplex-Struktur (*Holliday junction*, C). Die Einzelstrangbrüche werden geschlossen und die relativ stabile Kreuzstruktur kann weiterwandern (D). In *E. coli* wird diese Schenkelwanderung (*branch migration*) durch das RecA-Protein vermittelt, indem es einen der beiden DNA-Stränge unter ATP-Hydrolyse rotiert. Die Holliday-Struktur kann auf zwei verschiedene Arten aufgelöst werden. Zu einen können in den anderen Strängen Einzelstrangbrüche eingeführt werden (E), die wiederum zu einem Crossing-over führen (F). Nach Verschließen der Einzelstrangbrüche liegen zwei getrennte DNA-Doppelhelices mit klassisch rekombinanten Bereichen vor (G). Zu anderen kann in den sich überkreuzenden Strängen ein zweiter Einzelstrangbruch induziert werden (H). Nach dessen Verschließen

entstehen in beiden DNA-Doppelhelices Bereiche, in denen homologe Einzelstränge ausgetauscht worden sind (I).

In der Praxis werden zur erfolgreichen homologen Rekombination von bakterieller chromosomaler DNA mit „externer“ DNA, d. h. gentechnisch hergestellten Konstrukten *E. coli*-Stämme mit intaktem *recA*-Gen eingesetzt. Wie oben beschrieben, wäre die Rekombinationseffizienz in Abwesenheit des RecA-Proteins drastisch (um den Faktor  $10^4$ ) reduziert. In dieser Arbeit wurde der *recA*-defiziente Stamm C600 benutzt. Darüberhinaus werden Plasmide benötigt, die im Wirtsstamm nicht in der Lage sind, repliziert zu werden. Sofern auf dem Plasmid eine Antibiotika-Reststanz codiert ist, erlauben solche Konstrukte die direkte Selektion von Rekombinanten auf mit entsprechendem Antibiotikum versetzten Agar-Platten. In dieser Arbeit wurde das Plasmid pfdA8 eingesetzt, welches den Replikationsursprung des Bakteriophagen fd besitzt und nur in Anwesenheit eines *in trans* exprimierten Phagen-Gens 2 vermehrt werden kann.

Zunächst wurden die zu rekombinierenden Sequenzen, die die gewünschten Mutationen enthielten, in das Plasmid pfdA8 kloniert. 10  $\mu$ l der Ligationsansatzes wurden in den *E. coli*-Stamm DH2 transformiert. DH2 besitzt das Gen 2 und ist gleichzeitig *recA*<sup>-</sup>, so daß in diesen Zellen das Plasmidkonstrukt vermehrt werden kann. Aus Kanamycin-resistenten Kolonien wurden die Plasmide in analytischem Maßstab isoliert und diese anschließend einer Restriktionsanalyse unterworfen. Korrekte Plasmide wurden aus den zugehörigen Stämmen in präparativem Maßstab isoliert und in den Stamm C600 elektroportiert. Kanamycin-resistente Kolonien wurden, wenn möglich, nach ihrem Phänotyp selektiert und potentiell positive Klone zusätzlich durch Southern-Blot analysiert.



**Abb. 10: Mechanismus der homologen Rekombination**

A: die beiden homologen Ausgangsstränge; B: Einführung zweier Einzelstrangbrüche; C: Crossing-over der beiden Einzelstränge, Ausbildung der Holliday-Struktur; D: Verschluss der Einzelstrangbrüche, Schenkelwanderung; E: zweite Einzelstrangbrüche in anderen Strängen; F: zweites Crossing-over G: Verschluss der Einzelstrangbrüche liefert zwei rekombinante DNA-Moleküle; H: Bruch der überkreuzten Einzelstränge; I: Verschluss der Einzelstrangbrüche liefert zwei DNA-Moleküle mit ausgetauschten homologen Einzelsträngen (nach Lewin, 1994)

### 3.36. Isolation bakterieller chromosomaler DNA

20 ml einer über Nacht in Flüssigmedium gewachsenen Bakterienkultur wurden im HB 4 Rotor 10 min lang bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml TE 20/1 aufgenommen und gewaschen, anschließend erneut zentrifugiert und abermals in 5 ml TE 20/1 resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Lysozym-Stammlösung ließ man die Suspension 30 min lang bei Raumtemperatur inkubieren. Die Lyse der Zellen wurde durch 500 µl 10 % SDS abgeschlossen, das Gemisch wurde bei 37 °C bis zur vollständigen Klärung der Lösung inkubiert. Die Proteine wurden durch zwei- bis dreimaliges Extrahieren mit 1 ml mit TE gesättigtem Phenol entfernt. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die Lösung zur besseren Phasentrennung 5 min lang bei 10.000 rpm im HB 4 Rotor zentrifugiert und die Phenol-Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde drei- bis viermal zur Beseitigung von Phenolresten mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Danach wurde die wässrige Phase mit NaCl-Stammlösung auf 0,2 M NaCl eingestellt. Die chromosomale DNA konnte durch Zugabe des doppelten Volumens 100 % Ethanol ausgefällt werden, sie bildete einen weißen, flockig-viskosen Niederschlag, der mit Hilfe einer gebogenen Glaskapillare vorsichtig aus der Lösung gefischt werden konnte. Das Präzipitat wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur langsam getrocknet. Dabei war darauf zu achten, daß ein kleiner Restanteil Feuchtigkeit im Niederschlag verblieb, da sich ansonsten die DNA beim anschließenden Aufnehmen in 1 ml 20 mM Tris pH 8,0 oder deionisiertem Wasser nur schwer löste.