

1 Material

1.1 Organismen und Plasmide

Die für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 4 aufgeführt. In Tabelle 5 sind die Klonierungsvektoren und die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten rekombinanten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Organismen

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>Enbacterium acidaminophilum</i> al-2 (DSM 3953 ^T)	Wildtyp	Zindel <i>et al.</i> (1988)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (DSM 22)	Wildtyp	Donk (1920), Nazina <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus sphaericus</i> (DSM 396)	Wildtyp	Meyer & Neide (1904)
<i>Thermoanaerobacter kivui</i> (<i>Acetogenium kivui</i>) (DSM 2030)	Wildtyp	Leigh & Wolfe (1983), Collins <i>et al.</i> (1994)
<i>Thermus thermophilus</i> HB 8 (DSM 579)	Wildtyp	Oshima & Imahori (1974)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA 96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac⁺</i>] Z Δ M15 Tn10 (Tc ^R)	Stratagene

Tabelle 5: Klonierungsvektor und rekombinante Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBluescript II SK+	Phagemid-Klonierungsvektor (2,96 kb); Amp ^R , lacPOZ'	Stratagene
pASK-IBA 1	Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminaler Strep-tag Fusion (3,25 kb, omp A Signalsequenz); Amp ^R	IBA
pAki SLH	pBluescript SK+ mit <i>slb</i> vom <i>slp</i> aus <i>A.kivui</i>	diese Arbeit
pEa SLH	pBluescript SK+ mit <i>slb</i> vom <i>slp</i> aus <i>E.acidaminophilum</i>	diese Arbeit
pBst SLH	pBluescript SK+ mit <i>slb</i> vom <i>slp</i> aus <i>B.stearothermophilus</i>	diese Arbeit
pBsp SLH	pBluescript SK+ mit <i>slb</i> vom <i>slp</i> aus <i>B.sphaericus</i>	diese Arbeit
pTht SLH	pBluescript SK+ mit <i>slb</i> vom <i>slp</i> aus <i>T.thermophilus</i>	diese Arbeit
pAki Slp	pBluescript SK+ mit <i>slp</i> aus <i>A.kivui</i>	diese Arbeit
pEa Slp	pBluescript SK+ mit <i>slp</i> aus <i>E.acidaminophilum</i>	diese Arbeit
pTht Slp	pBluescript SK+ mit <i>slp</i> aus <i>T.thermophilus</i>	diese Arbeit
pTth Polymerase	pASK-IBA 2 mit <i>tth pol</i> aus <i>T.thermophilus</i>	diese Arbeit

1.2 Medien und Stammhaltung

Alle Nährmedien und Zusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 121 °C für 25 min autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität steril filtriert.

Die anaeroben Bakterien *E. acidaminophilum* und *A. kiviu* wurden durch die DSM angezüchtet und als Lebendkultur in Hungate-Röhrchen verschickt. Für den Zeitraum der Verwendung der Bakterien wurden diese alle drei Tage neu ausplattiert.

E. coli

Luria-Bertani-Medium, LB-Medium (Sambroock *et al.*, 1989)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1000 ml H₂O_{bidest.}

Zur Herstellung von LB-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

Für LB-Amp-Platten wurde eine Ampicillin-Stammlösung mit der Konzentration von 125 mg/ml angesetzt und anschließend steril filtriert. Die eingesetzte Konzentration betrug 125 µg/ml. Ampicillinhaltige Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt. Für 1000 ml Indikator-Platten, die für ein blau/weiß-„Screening“ dienen sollten, wurden 2 ml einer 0,1 M IPTG-Lösung und 2 ml einer 20 mg/ml X-Gal-Lösung zugegeben.

T. thermophilus HB8

Medium 74 (DSM)

8 g Pepton
4 g Hefeextrakt
2 g NaCl
ad 1000 ml H₂O_{bidest.}

Die Bakterien wurden bei 75 °C kultiviert.

B. stearothermophilus

Medium 1(DSM)

5 g Pepton
3 g Fleischextrakt
ad 1000 ml H₂O_{bidest.}

Die Bakterien wurden bei 55 °C kultiviert.

B. sphaericus

Medium 1 (DSM)

5 g Pepton
3 g Fleischextrakt
ad 1000 ml H₂O_{bidest.}

Die Bakterien wurden bei 30 °C kultiviert.

1.3 Zellernte und Zellaufschluss

Die Kulturen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Dazu wurden sie 10 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in dem jeweiligen Aufschlusspuffer aufgenommen und entweder durch Gefriertau, d.h., dass eine wechselseitige Inkubation bei 90 °C und Einfrieren mit flüssigem Stickstoff stattfand oder mittels Ultraschall aufgeschlossen.

1.4 Puffer und Lösungen

Nachfolgend sind die Zusammensetzungen aller Puffer und Lösungen aufgeführt, die in der weiteren Arbeit nicht näher erläutert werden. Zur Einstellung niedriger Pufferkonzentrationen wurde mit H₂O_{bidest.} verdünnt.

0,5 M EDTA, pH 8,0

Na₂EDTA 46,5 g
H₂O_{bidest.} ad 250 ml
Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit NaOH.

1 M Tris/HCl, pH 8,0

Tris Base 121,1 g
HCl konz. 42 ml
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

50x TAE-Puffer

Tris Base 242 g
Eisessig 57 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0 100 ml
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

1 x TE-Puffer

1,0 M Tris, pH 8,0 10 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0 2 ml
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

3 M NaAc, pH 5,2

NaAc 408,24 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml
Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit Eisessig.

1 M MgCl₂

MgCl₂ x 6 H₂O 203,31 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

II MATERIAL UND METHODEN

5 M NaCl

NaCl 292,2 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

Die aufgeführten Puffer wurden zur Entfernung von DNasen 25 min bei 121 °C autoklaviert.

0,1 M IPTG

IPTG 1,19 g
H₂O_{bidest.} ad 50 ml

20 mg/ml X-Gal

X-Gal 0,4 g
N'N-dimethyl-
formamid ad 20 ml

10 % SDS, pH 7,2

SDS 100 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

Die Einstellung des pH-Wertes
erfolgte HCl

100 % (w/v) TCA

TCA 500 g
H₂O_{bidest.} ad 227 ml

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation genomischer DNA

0,3 g Zellen wurden in 3 ml TE I (50 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und 2 h bei 25 °C inkubiert bis viskose Strukturen sichtbar wurden. Anschließend wurden 0,8 ml 10% SDS zugegeben, für 15 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 0,8 ml 5 M NaCl hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit 1 Vol. Chloroform und eine Zentrifugation für 20 min bei 5000 x g. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 2,5 Vol. Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die an der Phasengrenze sichtbaren Fäden wurden um einen Glasstab gewunden und nach Trocknung in 2 ml TE II (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM EDTA) aufgenommen. Um RNA zu entfernen wurde mit RNase A (1 g/l) behandelt. Zur Entfernung der RNasen wurde 1 Vol. Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0; Roth, Karlsruhe) hinzugefügt, geschwenkt und bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert, dieser Prozess wurde mit Chloroform wiederholt. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (abs.) versetzt, 2 h bei -20 °C gefällt und bei 15000 x g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die pelletierten Nukleinsäuren wurden 20 min an der Luft getrocknet und in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Ein ΔA_{260} -Wert gleich 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die Qualität der DNA durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überprüft.

2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von „Spinprep-Kits“ verschiedener Firmen durchgeführt. Dazu wurde eine 3 ml LB-Amp-Kultur, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde, bei 5000 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann nach den Anweisungen des Herstellers weiterbehandelt.

Sollten in kürzester Zeit viele Kolonien, die aus Klonierungen hervorgegangen waren, kontrolliert werden, wurde ein Klon mit einem Zahnstocher von der Platte gepickt, in LB-Medium suspendiert und 1-2 h wachsen gelassen. Die im 1,5 ml-Maßstab kultivierten Zellen wurden bei 15000 x g zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 40 µl STE Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:23:1; Roth, Karlsruhe) versetzt, stark „gevortext“ und dann für 5 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit RNase A (1 mg/ml) behandelt. 20 µl der Plasmidlösung wurden direkt auf ein 1 % iges Agarosegel aufgetragen und analysiert. (pBluescript II Phagemid Vectors, Instruction Manual, Stratagene)

Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des STETL Puffers

1,5 ml Bakterien-Kultur wurden bei 15 000 x g für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl STETL Puffer vollständig resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation bei RT °C für 3-5 min. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in heißes Wasser (90-95 °C) gestellt und 30 s gewartet und schließlich zentrifugiert: 14000 x g, 15 min, RT °C. Der Überstand wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt, kurz geschwenkt und sofort zentrifugiert: 15 min, 15000 x g, 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und kurz auf- und abpipettiert. Es erfolgte eine Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und eine Zentrifugation für 5 min, bei 15000 x g, RT °C. Die wässrige obere Phase wurde abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform versetzt, kurz „gevortext“ und kurz anzentrifugiert. Wiederum wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 150 µl 8 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol (abs.) versetzen, durch Schwenken gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Es wurde erneut für 20 min bei 15000 x g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 25 µl Wasser (bidest.) aufgelöst. (pBluescript II Phagemid Vectors, Instruction Manual, Stratagene)

STETL Puffer

8 % Sucrose
0,5 % Triton X-100
50 mM Tris/HCl, pH 8
50 mM EDTA, pH 8
0,5 mg/ml Lysozym

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
1 mg/ml RNase A

2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen fand analytisch in einem Gesamtvolumen von 20 µl und präparativ in einem Volumen von 50 µl statt.

Für die Reaktion wurden 1-20 U/ μ l Enzym und 10x Restriktionspuffer, der auf eine 1x Konzentration verdünnt wurde, eingesetzt. Es wurde 1-24 h inkubiert, je nach Angaben des Herstellers.

2.1.4 Spaltung von DNA mit DNase I

Um Fragmente unterschiedlicher Größe für das „DNA-Shuffling“ zu erhalten, wurde DNase I (Roche, Mannheim) verwendet. Diese baut den DNA-Strang statistisch zu Oligonukleotiden ab. Dabei ist der Fragmentgrößenbereich abhängig von der Reaktionstemperatur und -zeit. Der Fragmentbereich war groß, wenn die Reaktionen zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt wurden.

Für einen 20 μ l präparativen DNase I-Verdau für das „DNA-Shuffling“ wurden 10 μ g DNA mit 2 μ l 10x DNase I-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM MgCl₂) auf 22 °C temperiert bevor 2 μ l DNase I (Roche, Mannheim) hinzugegeben wurden. Es wurden Aliquots zwischen 30 sec und 3 min entnommen, durch Stickstoff schockgefroren und anschließend für 5 min bei 90 °C inkubiert, um die DNase I zu inaktivieren.

2.1.5 Abbau von DNA-Einzelsträngen

2.1.5.1 Degradierung mit Exonuklease III

Die Exonuklease III (Promega, Mannheim) baut DNA-Stränge sukzessiv vom 3'-Ende zu Mononukleotiden ab. Für ihre Aktivität ist ein 5'- oder ein glattes DNA Ende erforderlich. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fragmente wurden für die Generierung des 5'-Endes mit dem Restriktionsenzym *Xba* I (Promega, Mannheim) geschnitten. Die Exonuklease III verdaut bei 25 °C ca. 100 bp pro min. Ein präparativer Ansatz von 5 μ g DNA wurde mit 10x Reaktionspuffer (660 mM Tris/HCl, pH 8,0; 6,6 mM MgCl₂) zu 1x konzentriertem Puffer versetzt und bei 25 °C vortemperiert, bevor das Enzym mit einer Endkonzentration von 1 U/ μ l hinzugefügt wurde und 10 min gewirkt hat. Um die Reaktion abzustoppen wurde der Ansatz entweder bei 75 °C für 10 min inkubiert oder EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben.

2.1.5.2 Degradierung mit Mung Bean Nuklease

Die Mung Bean Nuklease (Promega, Mannheim) katalysiert den Abbau von einzelsträngigen DNA- und RNA-Molekülen endonukleolytisch zu 5'-Phosphoryl-terminierten Produkten.

5 µg dsDNA wurden mit 25 U Mung Bean Nuklease und 10x Reaktionspuffer (0,3 M Na-Acetat, pH 5,0; 0,5 M NaCl; 10 mM ZnCl₂) versetzt (1x in der Endkonzentration) und 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religierung des Vektors nach dem Restriktionsverdau zu unterdrücken, wurde 1 µl Shrimps-alkalische-Phosphatase (Roche, Mannheim) zu dem Restriktionsansatz zugegeben und für 1-2 h bei 37 °C inkubiert.

2.1.7 Phosphorylierung von DNA-Enden

Fehlende 5'-Phosphatgruppen können mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (Stratagene, Heidelberg) in Anwesenheit von ATP angefügt werden. Ein Phosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus der einzel- oder doppelsträngigen DNA mit freier 5'-Hydroxylgruppe, dem 10x Puffer, der 1x eingesetzt wird und 30-100 U T4 Polynukleotidkinase je picomol 5'-Enden. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C kann das Enzym durch 20 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert werden.

2.1.8 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten bzw. – Gemischen. Dazu wurden 1-2 %-ige Agarosegele mit Ethidiumbromid (2 µg/ ml) verwendet, als Puffer diente 1x TAE Puffer. Und als Größenstandard wurde der DNA-Marker Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) benutzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit je 0,3 Vol. Stopp-Lösung (50 % (v/v) Glycerin, 0,2 M EDTA, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Die Agarosegele mit einem Dokumentationssystem (Gel Doc 2000, Biorad, München) abgeleuchtet.

2.1.9 Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte über „*Purification Kits*“ oder „*Quick Clean*“ (Bioline, Luckenwalde). Lag ein Gemisch verschiedener DNA-Fragmente vor, wurde dieses zunächst gelelektrophoretisch getrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels eines „*Extraction Kit*“ nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Zur Konzentrierung wurde das gewünschte Elutionsvolumen verwendet.

2.1.10 Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation

Die Konzentrierung von Nukleinsäuren und Entfernung von Salzen, welche überwiegend in Lösung bleiben, erfolgte durch Präzipitation (Fällung) mit Ethanol in Gegenwart monovalenter Kationen (Shapiro, 1981). Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem doppelten Volumen -20 °C kaltem Ethanol gemischt. Nach einer Inkubation von mind. 15 min bei -80 °C oder 2 Stunden bei -20 °C wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend zur Entfernung mitgefällter Salze mit -20 °C kaltem, 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Sediment entweder 5-15 min an der Luft oder 1-2 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde es in einem adäquaten Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst. Mit dieser Methode können selbst so geringe Nukleinsäurekonzentrationen wie 20 ng/ml quantitativ präzipitiert werden. Die Fällung noch geringerer Konzentrationen ist durch Zugabe von Glycogen in einer Endkonzentration von 20-40 µg/ml möglich. Auf diese Weise lassen sich pg-Mengen von DNA oder RNA quantitativ fällen.

Anstelle von Ethanol kann zur Fällung auch ein Vol. Isopropanol verwendet werden. Der Vorteil liegt in dem deutlich geringeren Fällungsvolumen. Der Nachteil in der Kopräzipitation von Salzen und in der schwierigeren Entfernung des Alkohols nach der Fällung. Der Fällungsansatz kann nach Zugabe von -20 °C kaltem Isopropanol direkt 30 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert werden.

2.1.11 Band Interception

Um DNA Fragmente von ca. 50-100 bp aus einem Agarosegel extrahieren zu können, wurde auf die Methode des Bandenabfangs („*Band Interception*“) zurückgegriffen. Hierzu wurde ober- und unterhalb des zu extrahierenden Fragmentbereiches ein entsprechend großes Stück DEAE-Zellulose (DE 81, Whatman, Rothenburg) mittels Pinzette eingefügt und erneut Spannung angelegt, so dass die DNA auf die untere Membran laufen kann und gebunden wird, während die obere Membran ungewünschte größere Fragmente abfängt. Nach Kontrolle des Gels unter UV-Licht wurde die untere Membran in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Elutionspuffer (TE-Puffer, 1,2 M NaCl) überführt, kräftig gemischt und 1 min bei 15000 x g zentrifugiert. Die DNA enthaltende Lösung wurde mit 2,5 Vol. Ethanol sowie 1/10 3 M Na-Acetat (pH 5,2) bei -20 °C gefällt.

2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von gereinigtem (II 2.1.9) Vektor und Insert wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 μ l durchgeführt. Das Verhältnis bzw. die eingesetzten Mengen richteten sich nach den abgeschätzten Konzentrationen (Vektor-DNA zu Insert-DNA: 1:3 bis 1:10). Der Ansatz wurde mit 2-3 μ l 10x Ligationspuffer und 1 μ l T4 DNA-Ligase (Roche, Mannheim) versetzt und mit sterilem Wasser auf 20-30 μ l aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16 °C oder bei 4 °C für 2-3 Tage inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten über TA-Enden

Die Ligation von DNA-Fragmenten über entsprechende T- und A-Enden ist eine unspezifische, aber schnelle Methode, die sich besonders zur Aufklärung und Vervielfältigung von DNA-Sequenzen über PCR und Sequenzierungen eignet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Restriktionsschritte, die eine gezielte Verknüpfung von DNA-Fragmenten ermöglichen, entfallen. Voraussetzung für eine derartig schnelle Ligation ist die Verwendung von DNA-Polymerasen, die ein 3'-A-Ende an ein PCR-Produkt anhängen. Der Vektor der verwendet wird, muss im Gegenzug ein T-Ende tragen. Dazu wurden 8 μ g des Vektors pBluescript SK+ (pBSK, Statogene, Heidelberg) mit 1,5 U des Restriktionsenzym *Eco* RV (NEB, Schwalbach) unter Verwendung des entsprechenden 10x Reaktionspuffers in einem 20 μ l Reaktionsvolumen für 4 h bei 37 °C geschnitten. Diese 20 μ l wurden mit „*Quick Clean*“ (Bioline, Luckenwalde) aufgereinigt. Das Pellet wurde in 42 μ l Wasser aufgenommen. 40 μ l des *Eco* RV geschnittenen Vektors wurden mit 5 μ l 10x Puffer, 3 μ l 50 mM MgCl₂, 1 μ l 100 mM dTTP und 1 μ l *Taq*-Polymerase (Promega, Mannheim) versetzt. Das Anhängen des T-Endes durch die *Taq*-Polymerase fand bei 72 °C für 2 h statt. Der so präparierte Vektor wurde erneut durch „*Quick Clean*“ gereinigt. Die Ligation erfolgte wie unter 2.1.12 bei 4 °C über Nacht.

Für die Klonierung der DNA-Bibliotheken wurde das pGEM-T Easy System II von Promega benutzt.

2.1.13 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen (Mandel & Higa, 1970)

1 ml einer über Nacht Kultur wurden in 100 ml LB-Medium (1:100) überimpft und bis zu einer OD von 0,3-0,5 bei 37 °C unter schütteln inkubiert.

Die Zellen wurden bei 4 °C für 10 min, 5000 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden immer auf Eis gehalten. Das Medium wurde dekantiert, das Zellpellet in 50 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und weitere 15 min auf Eis gehalten. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 x g, 10 min, 4° C. Das Pellet wurde in 10 ml (1/10 Vol. d. Ausgangssuspension) eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 2 h auf Eis belassen. Diese Suspension wurde aliquotiert und mit Glycerin (10-20 %) versetzt.

2.1.14 Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode (Hanahan, 1983)

Diese Methode beruht auf einer Salzbehandlung und einem Temperaturwechsel, welche die Aufnahme der DNA in den Wirtsstamm ermöglichen. Hierfür wurden *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ ultrakompetente Zellen der Fa. Stratagene verwendet oder eigene präparierte Zellen. Die Zellen, die bei -80 °C lagerten, wurden auf Eis aufgetaut, davon 25 µl mit 0,5 µl (25 mM) β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe von 2 µl Plasmid-DNA und eine Inkubation auf Eis für 30 min. Der Hitzeschock fand bei 42 °C, 45 s, im Wasserbad statt. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gelagert und mit 0,5 ml – 1 ml LB-Medium versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden 200 - 300 µl Ansatz auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert und die Platten über Nacht bei 30 °C/37 °C inkubiert. Als Wirtsstamm diente *Escherichia coli* XL1 Blue MRF⁺ (siehe Tab. 4).

2.1.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Dazu benötigt man zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem Strang des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren und eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Dies kann zum einen die *Taq*-Polymerase sein, die keine „proofreading“-Aktivität besitzt, und zum anderen die *Pfu*-DNA-Polymerase, die diese Fähigkeit hat und damit eine geringere Fehlerrate bei der Synthese zeigt. Eine weitere thermostabile DNA-Polymerase ist die *Tth*-Polymerase aus dem extrem thermophilen Organismus *Thermus thermophilus* HB8. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine Besonderheit aus. Sie besitzt neben der DNA-abhängigen Polymeraseaktivität auch noch eine reverse Transkriptaseaktivität beim Vorhandensein von Mangan-Ionen. Die PCR wird dazu verwendet, DNA-Fragmente aus chromosomaler DNA zu amplifizieren sowie für den Nachweis von Klonierungen und Sequenzierungen, Mutationsmethoden oder zur Einführung von DNA-Sequenzen.

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Thermoblock, Biometra, Göttingen und PCT-100 MJ Research, Inc.) durchgeführt. Die *Tth*-Polymerase wurde grundsätzlich für die PCR verwendet. Größere Fragmente, die zur Expression von Proteinen verwendet werden sollten, wurden mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) hergestellt.

Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt folgende Bestandteile:

H ₂ O _{bidest.}	ad 20,0 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 – 0,8 µl
10 mM dNTP-Mix	0,4 µl
10 µM Primer 1	0,4 µl
10 µM Primer 2	0,4 µl
Template	1-100 ng
10x-Puffer	2,0 µl
<i>Tth</i> / <i>Taq</i> / <i>Pfu</i> -DNA-Pol.	1U

Im Allgemeinen wurden 25-31 Reaktionszyklen durchlaufen:

		<i>Taq</i> / <i>Tth</i>	<i>Pfu</i>	
0.	Denaturierung	3-5 min	5 min	95 °C
1.	Denaturierung	25-35 s	1 min	95 °C
2.	Annealing	25-45 s	1 min	45-70 °C
3.	Elongation	0,5-2 min	3-7 min	72 °C
Schritte 1-3 wurden 24-30x durchlaufen				
4.	Nachsynthese	3-5 min	5 min	72 °C
5.	Pause			4 °C

Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, dass sie 3-5 °C unter der der Schmelztemperatur der Primer lag. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt (2.1.8), danach gereinigt und je nach Verwendungszweck eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

2.1.16 Mutagenese

2.1.16.1 „DNA-Shuffling“

Das „DNA-Shuffling“ ist eine Mutationsmethode, die es ermöglicht, über einen ausgewählten Sequenzbereich ungerichtet Mutationen einzubauen.

Das hier angegebene Protokoll kann nicht verallgemeinert werden. Für jede DNA-Sequenz, die dem „*Shuffling*“ unterzogen werden soll, müssen die Bedingungen neu optimiert werden.

Präparation des zu „shuffelnden“ Gens

Um entsprechend große Mengen des Sequenzbereiches zu erhalten, wurde die PCR (II 2.1.15) mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) in großen Maßstäben 15 x 100 µl durchgeführt. Diese PCR wurde mit der selbst hergestellten *Tth*-Polymerase abgewickelt, eine Polymerase, die keine Korrekturlesefunktion hat. Die so hergestellte DNA wurde mit Hilfe des „GFX-Kit“ (Amersham, Freiburg) aufgereinigt.

Fragmentierung der DNA durch DNase I

Der DNase I-Verdau der DNA-Sequenzen wurde wie oben beschrieben (2.1.4) durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 30 s, 1 min und 3 min gestoppt, so dass die entstehenden Fragmente ein breiteres Größenspektrum umfassen. Die Spaltung der DNA ist ein statistischer Prozess, da die DNase I keine Erkennungssequenz besitzt. Die gestoppten Fraktionen wurden auf Vollständigkeit des DNase I-Verdaus überprüft. Für ein erfolgreiches „*Shuffling*“ sollten keine ganzen Sequenzbereiche mehr nachweisbar sein. Waren keine ganzen DNA-Sequenzen mehr nachweisbar, wurden die einzelnen Fraktionen miteinander vereinigt und konnten in einer Rekonstruktionsreaktion eingesetzt werden.

Rekonstruktion (Reassemblierung) der DNA-Sequenzen

Die Rekonstruktion der DNA-Sequenzen erfolgt mit einer modifizierten PCR. Das besondere an dieser PCR ist, dass keine Primer eingesetzt werden, da die DNA-Fragmente selbst nach Hybridisierung (Annealing) als Oligonukleotid fungieren. Für eine 20 µl Rekonstruktionsreaktion wurden 100-250 ng DNA, 2 µl 10x Puffer (ohne Mg²⁺), 0,8 µl 50 mM MgCl₂, 0,4 µl dNTPs (je 10 mM) und 1 µl *Tth*-Polymerase (2,5 U/µl) zusammengegeben. Es ist zu beachten, dass die DNA-Fragmente nach dem DNase I-Verdau nicht aufgereinigt wurden und somit zusätzlich Mg²⁺ eingebracht wurde. Es sollte eine Mg-Konzentration von 2,2 mM herrschen. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

0.	Denaturierung	3 min	95 °C
1.	Denaturierung	25 s	95 °C
2.	Annealing	30 s	50 °C
3.	Schritte 1-2 wurden 40x durchlaufen		
4.	Nachsynthese	3 min	72 °C
5.	Pause		4 °C

Auf einem Agarosegel ist diese Reaktion als DNA-„Schmier“, der sich über die eigentliche Größe der DNA-Sequenzen erstreckt, nachvollziehbar.

Amplifikation der rekonstruierten DNA-Sequenzen

Um aus den vielfältig zusammengesetzten DNA-Sequenzen die mutierten Ausgangssequenzen zu erhalten, erfolgte im Anschluss an die Rekonstruktionsreaktion eine PCR mit spezifischen Primern (Exp fow I/II, Exp rev). Dazu wurden 2,5 µl der Rekonstruktionsreaktion mit 2 µl 10x Puffer (ohne Mg²⁺), 0,4 µl dNTP (je 10 mM), je 0,4 µl 10 µM von drei Primern (Exp fow I, Exp fow II, Exp rev) und 1 µl *Tth*-Polymerase (2,5 U/µl) in einem 20 µl Reaktionsansatz miteinander kombiniert. Folgendes PCR Programm wurde benutzt:

0.	Denaturierung	3 min	95 °C
1.	Denaturierung	25 s	95 °C
2.	Annealing	25 s	50 °C
3.	Elongation	50 s	72 °C
Schritte 1-3 wurden 30x durchlaufen			
4.	Nachsynthese	3 min	72 °C
5.	Pause		4 °C

2.1.16.2 ITCHY (Incremental Truncation for the Creation of HYbrid enzymes) mod.

Das ITCHY ist ebenfalls eine Mutationsmethode, die auf der stufenweisen Verkürzung der kodierenden Sequenz beruht. Es ist eine Kombination aus der Exonuklease III-Spaltung und der Spaltung der DNA mit Mung Bean Nuklease. Die Exonuklease III-Reaktion fand wie in II 2.1.5.1 beschrieben statt, wodurch einzelsträngige DNA-Überhänge entstanden. Diese wurden durch die Mung Bean Nuklease (II 2.1.5.2) zu glatten DNA Enden degradiert und in einer Ligationreaktion ungerichtet miteinander verbunden.

2.1.16.3 SCRATCHY mod.

Das SCRATCHY ist eine alternative Methode zum „family-shuffling“. Es verbindet das ITCHY und das „Shuffling“ miteinander, so dass auch unterschiedliche, nicht homologe Sequenzen in das „Shuffling“ eingesetzt werden können. Dazu wurde zuerst das ITCHY durchgeführt, bei dem die Reaktionszeit (10 min bei 25 °C) der Exonuklease III so eingestellt wurde, dass keine vollständigen DNA-Sequenzen mehr vorhanden waren aber die Fragmentierung dennoch relativ weit fortgeschritten war.

Der Ansatz wurde mit 2,5 Vol. Ethanol (abs.) und 1/10 Vol. Na-Acetat (pH 5,2) gefällt, über Nacht bei -20 °C inkubiert und dann bei 4 °C, 15000 x g, 30 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden die einzelsträngigen Überhänge mit Mung Bean Nuklease abgebaut, so dass glatte Enden generiert wurden. Erneut erfolgte eine Fällung wie zuvor. Diese beiden Reaktionen wurden für vier verschiedene SLH kodierenden Sequenzen ausgeführt. Die entstandenen Fragmente der vier kodierenden SLH-Sequenzen wurden in einer Ligationsreaktion (II 2.1.12) ungerichtet miteinander kombiniert und danach einem DNase I-Verdau (II 2.1.4) unterzogen.

So konnten Fragmente propagiert werden, die in einer „*Shuffling*“-Reaktion eingestreut wurden und somit die Mutationsrate des „*Shufflings*“ erhöhen.

2.1.17 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma IBA (Göttingen) durchgeführt. Die Proben wurden wie von der Firma angegeben vorbereitet. Zur Auswertung der Sequenzen wurden entsprechende Programme über die Website www.expasy.org verwandt oder freie Software wie das BioEdit und pDraw benutzt.

2.1.18 Molekularbiologisches Arbeiten mit RNA

RNA ist im Gegensatz zu DNA weitaus anfälliger für eine spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung, wie z.B. Autoklavieren, schnell wieder renaturieren. Ein Inaktivieren kann mit verschiedenen Substanzen bewirkt werden. Eine gängige Methode ist die Behandlung von Wasser und Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Ehrenberg *et al.*, 1994).

2.1.18.1 Isolierung bzw. Aufreinigung von RNA

Zur Isolierung bzw. Aufreinigung von RNA aus Transkriptions- und Translationsansätzen wurde das „*High Pure RNA Purification Kit*“ (Roche, Mannheim) verwendet. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur schnellen Kontrolle auf Vorhandensein von RNA wurden 4-5 µl RNA-Probe mit 3 µl RNA-Probenpuffer (II 2.1.18.3) gemischt und auf einem Agarosegel (II 2.1.8) aufgetragen. Die RNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.18.2 Fällung von RNA mittels Trichloressigsäure

Nukleinsäuren und Proteine denaturieren und präzipitieren im sauren Milieu der Trichloressigsäure (TCA). Zur Quantifizierung der Radioaktivität, die in die Makromoleküle während der Transkription eingebaut wurde, können die Präzipitate der TCA-Behandlung durch Filtration über Glasfaserfilter (Merck, Darmstadt) von löslicher Radioaktivität abgetrennt und im Szintillationszähler vermessen werden. Diese Messwerte dienen der Bestimmung von Transkriptionsraten *in vivo* sowie von mRNA nach *in vitro*-Selektionsexperimenten.

Maximal 100 µl einer wässrigen Lösung mit radioaktiv markierter RNA werden zu 100 µl vorgelegter Stopplösung (25 mM EDTA, 1 g/l Hefe-tRNA (Roche, Mannheim)) pipettiert. Dabei fängt EDTA Magnesiumionen ab und stoppt somit die Transkription. Die Hefe-tRNA erhöht die vorhandene Nukleinsäurekonzentration und ermöglicht so die quantitative Fällung der radioaktiven RNA. Diese Lösung wird mit 3 ml 10 % TCA mit 50 mM Natriumpyrophosphat versetzt und die Nukleinsäuren durch 30 minütige Inkubation auf Eis präzipitiert. Natriumpyrophosphat dient hierbei zur Absättigung des Glasfaserfilters, um eine unspezifische Bindung löslicher Radioaktivität zu vermeiden. Die durchmischte Suspension wird über einen mit 5% TCA befeuchteten Glasfaserfilter abgesaugt, das Reaktionsgefäß zweimal und die Wände der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5 % TCA nachgespült. Durch zweimaliges Spülen mit jeweils 2 ml Aceton wird der Filter getrocknet. Nach Überführung des Filters in ein Szintillationsgefäß (Zinsser Analytik, Frankfurt/a.M.) und Zugabe des „Scintillationscocktails“ (Beckman, München) wurde 30 min leicht geschüttelt und anschließend die Radioaktivität im Szintillationszähler (Beckman, München) gemessen.

2.1.18.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA

Das Laufverhalten der RNA kann beim Vorhandensein von Sekundärstrukturen zu einem nicht eindeutigen Gelbild führen. Um dies ausschließen zu können wurden denaturierende Agarosegele benutzt. Ein 1,5 %iges Agarosegel enthielt dabei 3 % Formaldehyd. Zur Probenvorbereitung wurden 6 µl RNA-Probe mit 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10x MOPS-Puffer und 4 µl Formaldehyd versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 65 °C in einem Wasserbad inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden 3 µl Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1mg/ml) zugesetzt.

II MATERIAL UND METHODEN

Probenpuffer

100 mM EDTA
 50 % Glycerinl
 0,1 % SDS
 0,1 % Bromphenolblau

MOPS-Puffer

200 mM MOPS, pH 7
 50 mM Natrium-Acetat
 10 mM EDTA

2.1.18.4 T7 *In vitro*-Transkription

Die Generierung von RNA fast jeder Sequenz ist mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7, T3 und SP6 möglich. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der T7 Polymerase (Stratagene, Heidelberg) gearbeitet. Voraussetzung für eine erfolgreiche *in vitro*-Transkription ist ein T7 Promotor, der von der T7 RNA-Polymerase erkannt wird, so dass dahinter liegende DNA-Sequenzen transkribiert werden. Des Weiteren sollten die DNA-Sequenzen, die transkribiert werden sollen, keine 3'-Überhänge besitzen, da diese für eine Transkription ungeeignet sind. Durch so genannte „*run-off*“-Transkription der linearen DNA können RNAs mit definierten Enden hergestellt werden. Wird der T7 Transkriptionsterminator am 3'-Ende synthetisiert, wird die Linearisierungsstelle so gewählt, dass die Position der natürlichen Termination und der „*run-off*“-Termination möglichst übereinstimmen. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die Herstellung nicht markierter sowie radioaktiv markierter Transkripte angegeben.

Tabelle 6: Komponenten für die *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase

Reaktionskomponente	Endkonzentration nicht markierter Ansatz	Endkonzentration markierter Ansatz
10x Transkriptionspuffer	1x	1x
0,5 M DTE	100 mM	100 mM
0,1 M ATP (pH 7,0) (Roche)	3,75 mM	3,75 mM
0,1 M CTP (Roche)	3,75 mM	2,00 mM
0,1 M GTP (Roche)	3,75 mM	3,75 mM
0,1 M UTP (Roche)	3,75 mM	3,75 mM
10 µCi/µl α ³⁵ -S CTP (Amersham)		0,20 µCi/µl
20 g/l BSA (RNase-, DNase-frei) (Roche)	120 mg/l	120 mg/l
40 U/µl RNase-Inhibitor (Promega)	1 U/µl	1 U/µl
1 U/µl anorganische Pyrophosphatase (Sigma)	5 U/ml	5 U/ml
50 U/µl T7 RNA Polymerase (Stratagene)	1 U/µl	1 U/µl
linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt	40 mg/l 100 nM	40 mg/l 100 nM

10x Transkriptionspuffer

800 mM HEPES-KOH (pH 7,5)
220 mM MgCl₂
10 mM Spermidin

anorganische Pyrophosphatase

in 20 mM MOPS (pH 6,85)
10 mM MgCl₂

Die Transkriptionsreaktion wird bei Raumtemperatur pipettiert. Analytische Transkriptionsreaktionen wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert, präparative Ansätze für 3 h.

2.1.18.5 Reverse Transkription (RT)

Im Gegensatz zur Transkription wird bei der reversen Transkription eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) und ein DNA-Oligonukleotid (UniR Link Primer, Anhang) eingesetzt, die aus RNA ein RNA-DNA-Hybridmolekül, was als cDNA bezeichnet wird, generiert. Die reverse Transkription wurde mit aufgereinigter mRNA und der M-MLV reversen Transkriptase RNase H⁻ (Promega, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurde die mRNA mit 5-10 pmol Primer (bezogen auf 30 µl Gesamtvolumen) in einem Volumen von 22 µl versetzt und nacheinander 2 min bei 80 °C, 2 min bei 75 °C und 6 min bei 70 °C inkubiert. Nach diesem Hybridisierungsschritt wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und mit 6 µl 5x Puffer (250 mM Tris/HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl dNTP Mix (10 mM je dNTP) und 1 µl M-MLV RT (Promega, Mannheim) (200 U/µl) versetzt. Die Reaktion dauert 1 h bei 52 °C. Anschließend wurde zur Inaktivierung des Enzyms 15 min bei 70 °C inkubiert. Zur Abtrennung des Primers und der RNA wurde grundsätzlich mit Hilfe von „*Quick Clean*“ (Bioline, Luckenwalde) behandelt.

Sofern die RNA nicht über das „*High Pure RNA Purification Kit*“ (Roche, Mannheim) gereinigt wurde, wurde die DNA durch Zugabe von RNase-freier DNase I in einer Endkonzentration von 200 U/ml und 15 min bei 37°C abgebaut, einer Phenolextraktion, dann einer Gelfiltration über NAP-5 Säulen (Amersham, Braunschweig) und letztlich einer Isopropanolpräzipitation (2.1.10) unterzogen. Die erhaltene RNA kann durch photometrische Messung quantifiziert werden. Ein ΔA_{260} -Wert gleich 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Heterologe Expression und Aufreinigung der *Tth*-Polymerase aus *E. coli*

Für die Überexpression eines Proteins wurde das entsprechend kodierende Gen in den Expressionsvektor pASK-IBA 1 oder 2 (IBA, Göttingen) nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der multiplen Klonierungsstelle ligiert. Das Plasmid wurde in den Stamm *E. coli* XL1 transformiert. Zur Expression des Proteins wurden 100 ml LB-Amp-Medium entweder mit mehreren Einzelkolonien oder mit 2 ml einer Vorkultur angeimpft, bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,4-0,6 inkubiert und mit 10 µl einer Anhydrotetracyclinlösung (2 mg/ml; IBA, Göttingen) induziert. Nach 3-4 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 x g) geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde das Zellpellet in 10 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) aufgenommen und unter ständiger Eiskühlung beschallt. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension 20 min bei 4 °C, 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Polymerase befand, wurde abgenommen und einer Hitze-fällung bei 80 °C für 20 min unterzogen. Alle hitzeunbeständigen Proteine denaturieren und konnten nach 20 minütiger Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C abgetrennt werden. Anschließend wurde der Überstand mit Streptomycin (20 % Streptomycin in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) in einer Endkonzentration von 1 % behandelt. Dies hat zur Folge, dass die Nukleinsäuren, bei Erhalt der Polymeraseaktivität, präzipitiert werden können. Letztlich erfolgte eine Gelfiltration, um störende Salze zu entfernen. Die *Tth*-Polymeraseaktivität wurde im Vergleich mit der *Taq*-Polymerase durch eine PCR abgeschätzt. Sowohl für die *Taq*-Polymerase als auch für die *Tth*-Polymerase wurde der gleiche 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 500 mM KCl; 1 % Triton X-100).

2.2.2 *In vitro*-Proteinbiosynthese

Die hier verwendete zellfreie Proteinbiosynthese beruht auf dem fraktionierten S30-System des *E. coli* Stammes D10, welches unter den von Dr. Stiege optimierten Bedingungen im Labor von Prof. Dr. V.A. Erdmann durchgeführt worden ist (Lamla & Erdmann, 2002; Erdmann *et al.*, 1989; Erdmann *et al.*, 1994; Stiege & Erdmann, 1995; Merk *et al.*, 1999). Die Herstellung des S30-Systems soll in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden.

Nachfolgend wird lediglich die Zusammensetzung des Systems tabellarisch wiedergegeben.

II MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7: Zusammensetzung einer Reaktion zur zellfreien Proteinbiosynthese

Komponente	Endkonzentration im Ansatz
3-3,2x S-Mix	1x
2-3,2x T-Mix	1x
12,5x E-Mix	1x
mRNA-Template	50-1000 nM
DNA-Template	0,5-2 nM
1 mM (100 dpm/pmol) ¹⁴ C-Leucin (bei Bedarf)	50-200 μM
T7 RNA-Polymerase bei DNA-Template	500 U/ml

3-3,2x S-Mix

2 g/l Aprotinin
 1 g/l Leupeptin
 1 g/l Pepstatin
 40 U/μl RNase-Inhibitor
 20 g/l Gesamt-tRNA (*E.coli*)
 10 g/l Pyruvatkinase
 100 % S30-Lysat

12,5x E-Mix

12,5 mM ATP
 12,5 mM GTP
 6,25 mM CTP
 6,25 mM UTP
 375 mM Posphoenolpyruvat
 125 mM Acetylphosphat

2-3,2x T-Mix

10x TLM-Puffer
 2 M MgCl₂
 1 M DTT oder
 2 M MESNA
 50 % PEG 2000
 20 g/l Rifampicin
 10 mM Folsäure
 je 5 mM der 19 AS (ohne Leu)

10x TLM-Puffer

500 mM HEPES (pH 7,6)
 700 mM Kaliumacetat
 300 mM Ammoniumchlorid
 100 mM Magnesiumchlorid
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 0,2 % Natriumazid

Die Transkription der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Matrizen steht unter der Kontrolle eines T7 Promotors, so dass bei Verwendung dieser Matrizen T7 RNA-Polymerase zugegeben wurde. Die Transkription der endogenen Polymerase wird gleichzeitig durch das Antibiotikum Rifampicin blockiert. Wird DNA als Template eingesetzt, wird von einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem gesprochen.

Analytische Ansätze werden in einem Volumen von 25 μl durchgeführt, kleine präparative Ansätze bis zu 500 μl. Die Pipettierschritte fanden alle auf Eis statt, so dass die Reaktion durch Inkubation bei 37 °C gestartet wird. Die Reaktion dauert 90 min. Eine Gesamtübersicht aller Komponenten und deren Endkonzentration in der Reaktion sind in Tabelle 8 gezeigt.

II MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 8: Gesamtübersicht aller Komponenten und Endkonzentrationen in der *in vitro*-Proteinsynthese

Komponente	Endkonzentration in der Reaktion
TLM-Puffer: HEPES (pH 7,6)	50 mM
KOAc	70 mM
NH ₄ Cl	30 mM
MgCl ₂	10 mM*
EDTA	0,1 mM
NaN ₃	0,02 %
T-Mix: MgCl ₂	4 mM (Σ 14 mM)
DTT oder MESNA	5 mM oder 2 mM
PEG 2000	4 %
Rifampicin	20 µg/ml
Folsäure	100 µM
19 Aminosäuren (ohne Leucin)	400 µM
Leucin	150 µM
¹⁴ C-Leucin (100 dpm/pmol)	50 µM
S-Mix: Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
RNase-Inhibitor	100 U/ml
Gesamt-tRNA (<i>E. coli</i>)	100 µg/ml
Pyruvatkinase	8 µg/ml
S30-Lysat	30 %
E-Mix: ATP und GTP	je 1 mM
CTP und UTP	je 0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	30 mM
Acetylphosphat	10 mM
T7 RNA-Polymerase	500 U/ml
Template: DNA oder mRNA	0,5-2 nM oder 50-1000 nM
H ₂ O	ad Endvolumen

2.2.3 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei kamen 10 bis 15 %ige Trenngele zum Einsatz (Tab. 9).

Vor dem Auftragen der Proben auf das SDS-Gel wurden diese mit 2,5-3 Vol. Aceton gefällt, wodurch Salze, die das Laufverhalten der Proteine beeinflussen, entfernt wurden. Nach der Zugabe von -20 °C kaltem Aceton wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C wurde das vom Überstand befreite Sediment luftgetrocknet, in Wasser gelöst, mit 1/3 Volumenanteil SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Elektrodenpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei max. 34 mA pro Gel.

II MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9 : Zusammensetzung der SDS-Gele

Bestandteile	Trenngel	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	5 %
Acrylamid-Lösung (30 %) ¹	2,0 ml	2,4 ml	3,0 ml	0,251 ml
Trenngel-Puffer	0,75 ml	0,75 ml	0,75 ml	
Sammelgel-Puffer				0,5 ml
SDS (10 %)	0,06 ml	0,06 ml	0,06 ml	0,02 ml
H ₂ O _{bidest.}	3,22 ml	2,81 ml	2,21 ml	1,214 ml
APS-Lösung (10 %)	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml	0,0133 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml	0,0017 ml

¹ Rotiphorese Gel 30 % (w/v) Acrylamid, 1,33 % (w/v) Bisacrylamid (Roth,Karlsruhe)

Trenngel-Puffer pH 8,8

3 M Tris/HCl

Die pH-Werte wurden mit HCl eingestellt.

Sammelgel-Puffer pH 6,8

0,5 M Tris/HCl

SDS-Laufpuffer 10x

30,3 g Tris Base

144 g Glycin

10 g SDS

ad 1 l H₂O_{bidest.}

SDS-Probenpuffer

0,125 M Tris/HCl, pH 6,8

10 % (w/v) SDS

10 % (v/v) Glycerin

20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

0,02 % Bromphenolblau

Der Lauf wurde beendet, sobald die Lauffront das Trenngelende erreicht hatte. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der Marker „LMW6“ (14,4-94 kDa; Amersham, Braunschweig) verwendet.

2.2.4 Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie-Blue (Weber & Osborn 1969, mod.) sichtbar gemacht. Das Gel wurde mindestens 30 min leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung angefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes durch Entfärbelösung in 1-2 h. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O_{dest.} aufbewahrt. Die SDS-Gele wurden luftblasenfrei auf Filterpapier (3MM, Whatman) gelegt und mittels Geltrockners (Unigeldryer 4050D, Uniequip, Leipzig) unter Anlegen eines Vakuums und einer Heizleistung bei 65 °C für 90 min getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

0,2-0,5 % Serva Blau R-250
50 % Methanol
10 % Essigsäure (96 %)
ad 11 H₂O_{dest.}

Entfärbelösung

20 % Methanol
7,5 % Essigsäure

2.2.5 Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)

Die TCA-Fällung von Proteinen ist der von Nukleinsäuren (II 2.1.18.2) sehr ähnlich. Statt der Stopplösung werden hier 50 µl 0,5 % BSA vorgelegt und die zur Fällung eingesetzte 5 %ige 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 die Esterbindung zwischen tRNA und Aminosäure durch 15 minütige Inkubation bei 90 °C hydrolysiert werden. Die nachfolgenden Arbeitsschritte sind mit denen der TCA-Fällung von Nukleinsäuren identisch (2.1.18.2).

2.2.6 „*Ribosome Display*“

Das „*Ribosome Display*“ ist eine komplexe *in vitro*-Methode, mit der Peptide und Proteine selektiert werden können.

Ausgehend von einer DNA-Bibliothek, die über Transkription (II 2.1.18.4) in eine mRNA-Bibliothek umgewandelt wurde, konnten Bibliotheksproteine zellfrei synthetisiert werden (II 2.2.2), die in Anwesenheit von 5 µM des „Antisense-Oligonukleotides“ (AS-Oligo, VII 3), das Ribosom nicht verlassen können. Es entsteht der **Protein-Ribosom-mRNA-Komplex (PRM-Komplexe)**, der in Gegenwart von 50 mM Magnesiumchlorid bei 4 °C einige Tage stabil ist.

Durch Zugabe von 2-3 Vol. Bindungspuffers (III 9.2, Tab. 14) sind die Bedingungen für eine Selektionsrunde geschaffen. Dieser Ansatz gerät in Kontakt mit den Zielmolekülen, die an einer Matrix (Sepharose) gebunden wurden, so dass die Proteine im PRM-Komplex mit den Zielmolekülen in Wechselwirkung treten können. Die Proteinmoleküle, die eine geringere Affinität gegenüber den Zielmolekülen besitzen, werden in zwei Waschschritten mit Bindungspuffer entfernt. Die anderen proteingebundenen PRM-Komplexe können durch einen Elutionspuffer (III 9.2, Tab. 14) von der Zielmatrix abgetrennt werden. Die darin enthaltenen RNAs werden durch reverse Transkription in cDNAs und durch anschließende PCR in transkribierbare Konstrukte umgewandelt. Diese linearen DNAs würden für eine erneute Selektionsrunde zur Verfügung stehen.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Detektion von β -Strahlung

Die kurze Reichweite der β -Strahlung der Isotope ^{14}C , ^{35}S und ^3H erschwert deren quantitative Detektion. Die im Szintillationscocktail (Beckman, Krefeld) enthaltenen Moleküle werden durch die Energie der radioaktiven Strahlung in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand geben sie die Energie in Form von Strahlung längerer Wellenlänge ab (Lumineszenz). Die so erhaltenen Signale bestehen also aus Lichtblitzen und können deshalb im Detektionsgerät (LS 6000, Beckman, Krefeld) durch einen Photoelektronenvervielfacher verstärkt und gezählt werden. Ein über Eichung ermittelter Korrekturfaktor dient zur Umrechnung der Rohmeßwerte mit der Einheit cpm (counts per minute) in die geräteunabhängige Einheit für Radioaktivität dpm (disintegrations per minute).

2.3.2 Autoradiographie

Die qualitative und quantitative Auswertung von Banden radioaktiv markierter Proteine und Nucleinsäuren im Polyacrylamidgel erfolgte mit dem „Phosphorimager-System“ (Storm 840, Molecular Dynamics, Amersham). Das getrocknete Gel wurde in der Regel über Nacht und in Einzelfällen mehrere Tage im Dunkeln auf eine Detektionsplatte („Phosphorscreen“) gelegt, die eine Verbindung aus dem Lanthanoid Europium enthält. Diese wird durch β -Strahlung in einen angeregten Zustand mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen versetzt. Bei der Abtastung der Platte im „Phosphorimager“ wird der angeregte Zustand mit Hilfe eines Lasers in den Grundzustand zurückversetzt. Die hierbei emittierten Lichtimpulse werden in Abhängigkeit von Ort und Intensität im „Phosphorimager“ gezählt. Letztlich erhält man ein zweidimensionales Abbild eines Gels in digitaler Form. Das Verhältnis der zu detektierenden Radioaktivität zur Anzahl der gemessenen Lichtimpulse ist laut Herstellerangaben über fünf Zehnerpotenzen linear. Da dieses System relative Messwerte liefert, müsste zur absoluten Quantifizierung parallel eine Probe mit bekannter Aktivität eingesetzt werden.

2.3.3 Nachweis von Kohlenhydraten mittels Anthron-Reaktion

300 μl einer Kohlenhydratlösung wurden mit 75 μl 2% Anthron (Roth, Karlsruhe) in Essigsäureethylester versetzt. Es erfolgte die tropfenweise Zugabe von 750 μl konzentrierter Schwefelsäure, da diese Reaktion stark exotherm ist. Die Verbindung aus Anthron und Kohlenhydrat kann photometrisch bei 625 nm vermessen werden.

2.4 Chromatografische Methoden

2.4.1 Präparation von Heparin-Sepharose CL-6B

1 g gefriergetrocknete Heparin-Sepharose CL-6B (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde in 6 ml destilliertem Wasser aufgenommen und 30 min bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Nachdem die Heparin Sepharose gequollen war, wurde mit 200 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Sepharose ergibt in gequollenem Zustand etwas über 4 ml. Die Heparin-Sepharose kann durch abwechselndes Waschen mit 0,1 M HEPES + 0,5 M NaCl (pH 8,5) und 0,1 Na-Acetat + 0,5 M NaCl (pH 5,0) regeneriert werden.

Gequollene Sepharose wurde bei 4 °C in 20 % Ethanol und 0,02 % Natriumazid gelagert.

2.4.2 Präparation von epoxy-aktivierter Sepharose 6B (epa Sepharose)

Epoxy-aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) ist für die Immobilisierung verschiedener Liganden bereits voraktiviert. Diese Sepharose kann zur Kopplung von Kohlenhydraten über eine stabile Ether-Verbindung genutzt werden.

Generell können Liganden mit Hydroxyl-, Amino- oder Thiolgruppen an die epoxy-aktivierte Sepharose gekoppelt werden.

Diese Sepharose besitzt einen 12 Atom langen hydrophilen Spacerarm mit 1,4-bis (2,3-epoxy-propoxy-)butan, welcher sich besonders zur Immobilisierung von kleinen Molekülen eignet. 1 ml Sepharose weist 19-40 µmol Epoxygruppen auf. 1g gefriergetrocknete epa-Sepharose wurde in 6 ml destilliertem Wasser suspendiert und bei 4 °C, 30 min unter Rollen inkubiert. Anschließend wurde sie mit 200 ml destilliertem Wasser gewaschen. 1g Sepharose ergibt ca. 3,5 ml Sepharose. Die Sepharose wurde sofort in eine Kopplungsreaktion eingesetzt.

2.4.3 Immobilisierung von Kohlenhydraten an epoxy-aktivierter Sepharose 6B

Sepharose ist eine makroporöse Matrix mit hoher chemischer und physikalischer Stabilität und einer geringen unspezifischen Adsorptionsrate. Liganden, die kleiner als 5000 g/mol sind, sollten über einen Abstandshalter (Spacer) gekoppelt werden, um eine sterische Hinderung mit der Sepharose zu vermeiden. Für die Kopplung der hier verwendeten Kohlenhydrate wurde die Sepharose 6B (Amersham Bioscience, Freiburg) verwendet, da dieser einen 12 atomigen Spacer hat. In der Tab. 9 sind die verwendeten Kohlenhydrate mit Molekulargewicht und eingesetzter Stoffmenge zur Präparation von 1 ml gequollener Sepharose angegeben.

II MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 9: Übersicht über die eingesetzten Kohlenhydrate dieser Arbeit

Kohlenhydrat	Molekulargewicht in g/mol	eingesetzte Stoffmenge in μmol pro 1 ml Sepharose
Heparin	6000-14000	19-45
Streptomycin	1457,38	100
N-Acetylglucosamin	222	100
Sialyl-Lewis X	842,8	2,4

Das entsprechende Kohlenhydrat wurde in 100 mM HEPES (pH 8,0) gelöst. Die gequollene epoxy-aktivierte Sepharose wurde ebenfalls in 100 mM HEPES (pH 8,0) suspendiert (1:1). Beide Komponenten wurden in einem Verhältnis von Kohlenhydrat zu Sepharose von 1:2 über Nacht bei 40 °C im Hybridisierungs-ofen unter Rotation inkubiert. Das Reaktionsgefäß sollte so befestigt werden, dass eine sanfte Durchmischung gewährleistet ist. Danach wurde der Überstand nach Absetzen der präparierten Sepharose abgenommen. Die Sepharose wurde in 1 M Ethanolamin (pH 8) suspendiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren und für 3-4 h bei 40 °C unter leichtem schwenken inkubiert. Danach wurde mit 100 mM HEPES (pH 8,0) , dann mit 0,5 M NaCl und zuletzt Wasser gewaschen.