

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Pflanzen und Bakterien

3.1.1 Sterilisation und Ausplattieren von *Arabidopsis* Samen

Ca. 200 Samen von *Arabidopsis* wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl Sterilisationslösung (4% Hypochlorit und 0,02% Triton X-100 in sterilem Wasser) für 10 min behandelt (Estelle und Somerville, 1987). Die Lösung wurde danach mit 500 µl Wasser verdünnt und anschließend abgenommen. Die so sterilisierten Samen wurden zur Entfernung des Hypochlorit dreimal mit 1 ml Wasser gewaschen, bevor sie in 300-400 µl 0.1% Agarose-Lösung auf Platten mit MS-Medium mit 1% Saccharose verteilt wurden. Nach 1-3 Tagen im Kühlschrank wurden die Platten in die Klimakammer überführt.

3.1.2 Wachstumsbedingungen für *Arabidopsis*

Die Pflanzen wurden in Klimakammern angezogen, in denen eine Luftfeuchtigkeit von 60%, 16 h Licht (Lichtintensität von ca. $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sowie 8 h Dunkelheit bei 18°C herrschten. Etwa 2 Wochen nach Aussaat wurden die Pflänzchen von Platten auf Erde (4 Teile Einheitserde P, 2 Teile Einheitserde T und 3 Teile Sand, Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa) umgesetzt.

3.1.3 Zellaufzucht von *E. coli*

Die Aufzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte durch Inkubation bei 37°C in einem Vollmedium (LB), während der Überexpression in einigen Fällen bei 28°C. Die Kontrolle des Zellwachstums wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 600 nm (A_{600}) kontrolliert. Falls auf Ampicillinresistenz selektiert werden sollte, wurde dem Kulturmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt. Übernachtskulturen, wie sie beispielsweise für die analytische Plasmidpräparation benötigt werden, wurden in Reagenzgläsern mit ca. 2,5 ml sterilem Medium, wenn nötig mit Antibiotikazugabe, angesetzt und im auf 37°C temperierten Wärmeschrank schüttelnd herangezogen.

3.2 DNA-Techniken

3.2.1 Klonierung

Standardmethoden wie Restriktionsverdau, Ligation, Transformation usw. wurden wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt. Analytische Plasmidpräparationen erfolgten nach Zhou *et al.* (1990), präparative Plasmidpräparationen wurde mit dem ‘Qiagen tip 500 maxiprep kit’ durchgeführt.

3.2.2 Klonierung verschiedener Konstrukte

-SQD1-Konstrukt zur Expression in *E. coli*

Für die Expression des rekombinanten SQD1 in *E. coli* wurde ein 1199 bp langes Fragment des *full length* cDNA Klon (Abb. 3-1) von *SQD1* in den HIS-tag Vektor pQE30 (Qiagen) kloniert. Die Klonierung erfolgte über eine PCR-Strategie. Hierfür wurde das gewünschte DNA Fragment mit dem Vorwärts-Primer AAAGGATCCCGTGTTTATGGTATTGGT und dem Rückwärts-Primer CAGCCTAGGAATACACCAGTACCTGA amplifiziert (s. 3.2.5). Dieser PCR-Ansatz diente einerseits dazu, das vermutete N-terminale Signalpeptid zu entfernen (Abb. 3-1), andererseits wurden *Bam*HI Schnittstellen eingeführt, die die Klonierung in pQE30 erleichterten. Das PCR-Fragment wurde mit *Bam*HI verdaut und in pBlueskript II SK⁺ subkloniert. Nach Restriktionsanalyse wurde das *SQD1* in die *Bam*HI Schnittstelle des pQE30 Vektors kloniert. Die richtige Orientierung wurde wieder durch Restriktionsanalyse bestätigt.

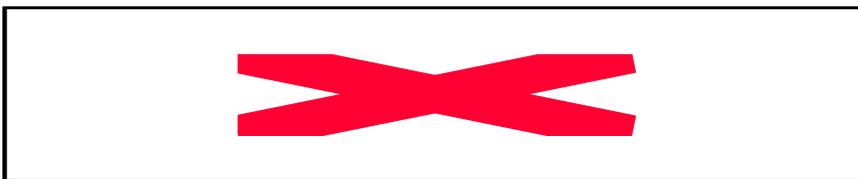


Abb. 3-1 : Full length cDNA Klon von *SQD1* in pZL1

Der graue Kasten zeigt den für das Transitpeptid kodierenden Bereich, der Pfeil die Orientierung des offenen Leserasters. VP, Vorwärts-Primer und RP, Rückwärts-Primer des PCR-Ansatzes.

-Antisense-Konstrukt

Für die antisense-Expression des *SQD1* Gens wurde ein 699 bp Fragment mittels *EcoRI* und *HindIII* aus dem *full length* cDNA Klon von *SQD1* herausgeschnitten und in pBS II SK⁺ (Stratagene) kloniert. Dieses Fragment wurde dann durch *KpnI/XbaI* Restriktion in den binären Vektor pBinAR-Hyg kloniert (Abb. 3-2). Der Vektor pBinAR-Hyg stammt von pBIB-Hyg ab, in den ein *HindIII-EcoRI* Fragment von pA7 inseriert wurde.

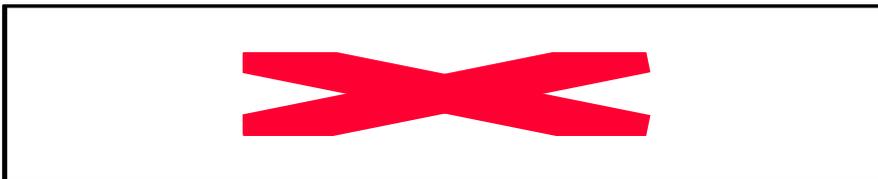


Abb. 3-2 : *SQD1* Antisense-Konstrukt

Der linke Kasten mit der Pfeilspitze steht für den CaMV 35S-Promotor und seine Orientierung, der mittlere Kasten zeigt die antisense Orientierung der *SQD1* Fragmentes an, OCS entspricht dem 3' Ende des Octopinsynthasegens von *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis*

Die Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis* erfolgte nach der CTAB-Methode von Rogers und Bendrich, 1985. Dazu wurden 2 bis 10 g Blattmaterial mit einem Mörser unter flüssigem N₂ zerrieben, in 65°C heißem CTAB-Puffer (25 ml) gelöst und unter Schütteln 20 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung wurden 10 ml Chloroform zugegeben und weitere 20 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Bei RT wird der Niederschlag gefällt, 10 min bei 3000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet löst man unter vorsichtigem Pipettieren in 4 ml TE-Puffer. Nach Zugabe von 4 ml 4 M LiAc, Inkubation von 20 min, folgt eine Ethanol-Fällung mit 16 ml Ethanol. Das Pellet wird in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und es folgt eine Phenol/Chloroform Extraktion, Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung.

3.2.4 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis*

Die RNA aus wurde entweder mit Hilfe des 'RNeasy Plant Mini Kit', Qiagen oder mit Hilfe der Z6-Methode nach Logemann *et al.*, (1987) isoliert. Hierfür wurde pflanzliches Gewebe in flüssigem N₂ eingefroren und zerkleinert. In der Z6 Methode wurden rund 2 Vol. Z6-Puffer (20 mM MES/NaOH, pH 7,5; 20 mM EDTA; 8 M Guanidinium Chlorid) zu dem Material gegeben und weiter homogenisiert. Anschließend wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert,

die Phasen durch Zentrifugation getrennt, der wässrige Überstand mit 0,05 Vol. 1 M Essigsäure und 0,7 Vol. Ethanol versetzt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt.

3.2.5 PCR-Amplifizierung

Die Amplifizierung von DNA Sequenzen und gleichzeitige Einführung von neuen Restriktionsschnittstellen erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*, *polymerase chain reaction*). Dazu wurden 100-500 pg Plasmid-DNA oder 1-100 ng genomischer DNA als Matrix in einen 100 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit *Pfu*-Polymerase in dem empfohlenen Reaktionspuffer, die Konzentration der *primer* wurde auf 1 µM, die der Nukleotide auf je 3 mM je dNTP eingestellt. Die Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von MgCl₂ (1-5 mM) und durch verschiedene *annealing* Temperaturen sowie Zyklenzahlen variiert. Die Reaktion (meist 30 Zyklen) wurde in einem automatischen 'Temperatur-Shift'-Gerät (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 1 min, (im ersten Zyklus, 5 min); *annealing* bei 55-61°C für 1 min und die Polymerasereaktion bei 72°C für 2 min. Nach Ablauf der 30 Zyklen erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 72°C. Anschließend wurde die Probe auf 4°C gekühlt.

3.2.6 DNA-Analyse („Southern-Blot“)

Genomische DNA (5 bis 30 µg) bzw. Plasmid-DNA (0,5 bis 1 µg) wurden mit geeigneten Restriktionsendonucleasen gespalten und auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Kapillartransfer mit 0,4 M NaOH als Transferlösung auf Nylon-Membran (Hybond N⁺, Amersham) übertragen und gleichzeitig fixiert. Nach dem Neutralisieren der Membran wurde sie mindestens 4 h bei der Hybridisierungstemperatur prähybridisiert. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 250 mM Na₂PO₄, pH 7,2; 7% SDS; 1 mM EDTA; 1% BSA und 10 µg ml⁻¹ denaturiertem Heringssperma. Dann erfolgte die Zugabe von der mit Hilfe des 'Megaprime DNA labelling System' (Amersham) mit [³²P]dCTP radioaktiv markierten DNA-Sonde und es wurde mindestens 6 h hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug bei homologen Sonden 65°C, bei heterologen, abhängig von der Stringenz, 45°-55°C. Die Membran wurde anschließend mindestens zweimal für jeweils 20 min in 2x SSC, 0,5% SDS bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen und autoradiographiert.

3.2.7 RNA-Analyse („Northern-Blot“)

Nach Denaturierung der RNA in RNA-Probenpuffer für 10 min bei 56°C wurden 10 bis 15 µg RNA in Formaldehyd-Agarosegelen (1,5% Agarose) aufgetrennt (Lehrach *et al.*, 1977) und anschließend durch Kapillartransfer mit 10x SSC als Transferlösung auf eine Nylon-Membran (Hybond N⁺) übertragen. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch zweistündiges 'Backen' bei 80°C, oder 5 min Inkubieren in 50 mM NaOH. Die Membran wurde dann in 2x SSC gewaschen und prähybridisiert. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte wie für den Southern-Blot (3.2.6) beschrieben.

3.3 Transformationen

3.3.1 Bakterientransformationen

E. coli wurde wie bei Hanahan 1983 beschrieben oder durch Elektroporation (Miller *et al.*, 1988) transformiert. *Agrobacterium tumefaciens* wurde mittels Elektroporation transformiert.

3.3.2 Transformation von Pflanzen

Pflanzentransformationen erfolgte durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58C1 [pGV2260]) vermittelten Gentransfer. Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte über Vakuum-Infiltration wie bei Bent *et al.*, (1994) beschrieben. Die Samen der transformierten *Arabidopsis* Pflanzen (T₁-Generation) wurden auf MS Medium mit 1% (w/v) Saccharose und dem entsprechenden Antibiotikum, 25 µg ml⁻¹ Hygromycin (Calbiochem, La Jolla) oder 50 µg ml⁻¹ Kanamycin, selektioniert. Die nächsten Generationen (T₂ und T₃) der transgenen Linien wurden über Selbstung erhalten.

3.4 Lipidanalyse

3.4.1 Lipidextraktion aus Pflanzen

Die Lipidextraktion aus *Arabidopsis* und die anschließende eindimensionale dünnschichtchromatografische Auftrennung erfolgt in der Regel wie zuvor bei Benning und Somerville (1992a) beschrieben. Im Falle der Pflanzen wurden etwa 1-2 cm² große Blattstücke in flüssigem Stickstoff eingefroren und zermörsert, dazu wurden 100 µl eines Gemisches aus Chloroform/Methanol/Ameisensäure (10:10:1) und 50 µl 1 M KCl/0.2 M H₃PO₄ gegeben und kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde 2 min bei 16000g zentrifugiert. Die untere der beiden Phasen wurde dann zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt, oder sie konnte bei -20°C gelagert werden.

3.4.2 Dünnschichtchromatographie von polaren Lipiden

Zur Vorbereitung der Dünnschichtchromatographieplatten (Baker SI250 oder Merk Kieselgel 60) wurden diese 30 s in 0,15 M Ammoniumsulfatlösung getränkt und anschließend mindestens zwei Tage bei RT getrocknet. Die Dünnschichtchromatographieplatten wurden kurz vor Gebrauch bei 120°C, 2,5 h aktiviert. Die Lipidphase wurde auf die Sammelzone mit Glaskapillaren aufgetragen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Aceton/Toluol/Wasser (91:30:8). Die Lipidbanden wurden nach der Auftrennung durch Joddämpfe sichtbar gemacht.

3.4.3 Gaschromatographie von Fettsäuremethylestern

Als Proben dienten die ausgekratzten Lipidbanden aus der Dünnschichtchromatographie. Sie wurden mit 1 ml 1 N methanolischer HCl sowie 5 µg Myristinsäure (eine 14:0-Fettsäure) als internem Standard versetzt. Nach Inkubation für zwei Stunden bei 80°C und Abkühlen bei 4°C wurden 1 ml 0,9% NaCl und 1 ml Hexan zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde 1 min bei 4500g zentrifugiert. Die obere Hexanphase wurde in ein frisches Glasröhrchen überführt und unter einem Stickstoffstrom bis auf wenige µl eingengt. Die Fettsäure-Methylester wurden dann in 100 µl Hexan wieder aufgenommen und in Gaschromatographie-Röhrchen überführt.

Die Gaschromatographie erfolgte in einem Hewlett-Packard 5890 Gaschromatographen mit einer 30 m langen Kapillarsäule mit 0,75 mm Durchmesser (Supelco SP-2330). Die Temperatur des Injektors betrug 220°C, die des

Flammenionisationsdetektors 250°C. Die Säule wurde mit einem Temperaturgradienten betrieben, der 1 min bei 100°C lag, dann innerhalb von 2 min auf 160°C und anschließend in 6 min auf 220°C gesteigert wurde. Diese Temperatur wurde gehalten, bevor die Säule in 5 min wieder auf 100°C abgekühlt wurde. Als Trägergas diente Helium mit einer Flußrate von 4,5 ml/min.

Die Daten wurden mit dem zugehörigen Programm 'Chemstation' (Hewlett-Packard) sowie einem Tabellenkalkulationsprogramm ausgewertet. Auf diese Weise konnte die Lipidzusammensetzung (in mol%) und der Gesamtlipidgehalt einer Probe bestimmt werden.

3.5 Proteinanalyse

3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde der 'Protein Assay' der Firma Bio-Rad verwendet. Eingesetzt wurden 2-10 µl Proteinextrakt, 790-798 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz. Nach Inkubation von 5 min wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Als Standard wurde 1 mg ml⁻¹ BSA eingesetzt.

3.5.2 Expression und Isolierung rekombinanter Proteine

Zur Expression des gewünschten Proteins wurden Übernachtskulturen angeimpft, mit denen am nächsten Tag Großkulturen 1:100 inokuliert wurden. Diese Großkulturen wurden dann (nach etwa 3 h) bei einer A_{600} von 0,7 zur Proteinexpression induziert. Die Induktion der Zellen mit 1 bis 0,5 mM IPTG erfolgte für weitere 4 h. Die Zellen wurden bei 10000g abzentrifugiert und in Lysispuffer (50 mM Hepes, pH 8,0; 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Bei den M15 Zellen (Qiagen) wurde zum Aufbrechen etwas Lysozym (1 mg/ml) zugegeben und die Zellen über Nacht bei -20°C gelagert. Nach Auftauen der Zellsuspension wurde diese sonifiziert (jeweils 2 x 1 min, 200-300 Watt), das Zellpellet wieder abzentrifugiert und der Überstand zur Proteinreinigung verwendet.

3.5.3 Aufreinigung der 'His tag'-Proteine

Die Proteinaufreinigung der in die pQE Vektoren klonierten Gene erfolgte im Prinzip nach Anleitung des QIAexpress Systems der Firma Qiagen. Das Prinzip dieses System besteht darin, daß das gewünschte Protein mit zusätzlichen 6 Histidin-Aminosäuren am N- oder C-terminalen Ende exprimiert werden und dann über eine Ni-NTA-Säule gereinigt werden

kann. Diese Proteine können Nickel sehr viel stärker komplexieren als Proteine, die diesen 'His-tag' nicht besitzen. Die Elution der Proteine erfolgt über eine ansteigende Imidazol Konzentration im Elutionspuffer.

Im Falle des SQD1 Proteins wurden Zellen einer 4 l Kultur geerntet, in 40 ml Lysispuffer aufgebrochen, das Zellpellet abzentrifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA Säule gegeben (10 ml Säulenmaterial). Die Säule wurde vorher mit 20 ml Lysispuffer equilibriert. Nach Durchlauf der Proteinlösung wurde die Säule mit 10 ml Lysispuffer und 20 ml Waschpuffer (50 mM Hepes, pH 8,0; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer (50 mM Hepes, pH 7,5; 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol). Die Reinheit des eluierten Proteins wurde über SDS-PAGE überprüft. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde dies mit 20 ml Wasser gespült, dann mit 10 ml 0,2 M Essigsäure gewaschen und mit Lysispuffer wieder äquilibriert.

3.5.4 SQD1 Enzymreaktionen

Die SQD1 Enzymreaktionen wurden in einem Volumen von 100 µl in Tris/HCl-Puffer (pH 7,5), 200 mM NaCl bei 37°C durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 1-100 µg, die Reaktionszeiten 1-60 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe radioaktiver UDP-Glucose gestartet und durch Denaturierung des Proteins beendet. Denaturierung erfolgte entweder durch Inkubation der Ansatzes für 5 min bei 95°C oder Zugabe von 200 µl Ethanol.

3.5.5 Isolierung pflanzlicher Proteine

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N₂ eingefroren und zerkleinert. Es folgte die Zugabe von Proteinextraktions-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % (v/v) Glycerin; 1 mM DTT; 1 mM PMSF, der immer frisch zubereitet wurde. Man sollte etwa 0.5-1 g Pflanzenmaterial in 1 ml Puffer aufnehmen. Die Zelltrümmer wurden für 1 min, 13000g abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Bradford-Proteinbestimmung des Extrakts sollte 1-10 mg/ml ergeben, falls niedriger, kann der Proteinextrakt in der ‚speed-vac‘ eingengt werden. Für einen Western-Blot wurden 20-100 µg Gesamtprotein pro Spur geladen.

3.5.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE erfolgte nach der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode. Die Proteinextrakte (10-100 µg) wurden in 1/5 Volumen 6 x Laemmli-Puffer aufgenommen und auf einem 12% Acrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit *Coomassie-Blue* gefärbt oder zur Immunodetektion auf Nitrocellulosemembranen transferiert.

3.5.7 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern

Zur Antikörper-Herstellung wurde aufgereinigtes SQD1-Protein (2 mg) an die Firma Eurogentec, Belgien, gesandt, die polyklonale Antikörper in Kaninchen herstellt. Das gelieferte Kaninchenserum wurde wegen seiner breiten Spezifität über eine Antigen-Antikörper Säule weiter aufgereinigt.

Zur Präparation der Antigen-Antikörper Säule wurde das gereinigte SQD1 Protein zunächst gegen 100 mM Mops-Puffer, pH 6,6 dialysiert. Zur Präparation des Säulematerials wurden 2 ml Affi-Gel 10 mit Wasser gewaschen, in einem Becherglas mit 2-3 mg Protein in Mops-Puffer vermischt und über Nacht im Kühlraum unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Säule wurde dann mit 15 ml 100 mM Mops-Puffer pH 6,6 gewaschen und anschließend die aktiven Gruppen mit 35 ml 200 mM Tris/HCl pH 8,0 blockiert. Nach dem Blocken wurden folgende Puffer auf die Säule geladen:

5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin;

10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin, 1 M NaCl;

5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin;

10 ml 50 mM Glycin/HCl, pH 2,5;

5 ml 200 mM Tris/HCl, pH 8;

10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin;

Nun wurde etwa 1 ml des Antiserums in 9 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin verdünnt und auf die Säule gegeben. Es folgten folgende Waschstritte:

10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin;

10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin, 0,5 NaCl;

10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10% Glycerin

und die Elution der gereinigten Antikörper mit 10 ml 50 mM Glycin/HCl, pH 2,5; die Antikörper wurden in einer Lösung von 10 mg/ml BSA, 0,2% NaN₃, 1 M Tris/HCl pH 9,0 aufgefangen.

Die so gereinigten Antikörper konnten für Western Blot eingesetzt werden.

3.5.8 Protein Analyse („Western-Blot“)

Proteingele wurden nach erfolgter SDS-PAGE für 15 min in kaltem Transfer-Puffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 20% Methanol (v/v), 0,1% SDS) äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einer 'semi-dry' Elektrobplot-Apparatur (Bio-Rad) für 20 min bei 15 Volt auf eine Nitrocellulosemembran (BA 85, Schleicher & Schuell). Anschließend wurde die Membran mit TBS-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl) gespült und dann für 1 h bei RT in TBS mit 3% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen in TBS, 0,05% Tween 20 für je 5 min wurde die Membran mit dem spezifischen Antiserum in einer geeigneten Verdünnung in TBS, 1% BSA für 2 h inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (2 x 10 min in TBS, 0,05% Tween) folgte über weitere 2 h die Kopplung mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, Promega), der wiederum mit einer Peroxidase gekoppelt war. Es folgte ein weiterer Waschschriff (2 x 10 min in TBS, 0,05% Tween 20). Die anschließende Farbreaktion erfolgte in 20 ml alkalischem Phosphatase-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) mit 132 µl 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (50 mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 66 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid). Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran in Wasser gestoppt.

3.6 Kristallstruktur

3.6.1 Kristallisation

Für die Kristallisationsversuche wurde das gereinigte SQD1-Protein in einer Konzentration zwischen 3-6 mg ml⁻¹ eingesetzt. Für diese Versuche wurden unterschiedliche Puffersysteme bei unterschiedlichen pH-Bedingungen, verschiedenen Salzkonzentrationen sowie unterschiedliche Detergentien getestet. Die Bedingung, bei denen sich das SQD1 Protein am weitesten konzentrieren ließ, war eine Pufferlösung, die 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 enthielt. Unter diesen Bedingungen war eine 7 mg ml⁻¹ SQD1-Lsg. bei 4°C im Kühlschrank über mehrere Tage stabil, bevor das Protein auszufallen begann. Hierbei konnte auch festgestellt werden, daß UDP-Glucose (10 mM) das Protein stabilisierte. Auch schien das Protein bei Raumtemperatur stabiler als bei 4°C zu sein. Mit diesen Vorinformationen wurden ein erster grober Kristallisationsversuch in einem Kristallisationsraum bei 22°C, mit einer frischen 5 mg ml⁻¹ Proteinlösung (in 300 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5) durchgeführt. Es wurde das Prinzip des Überdampfens als *hanging drop*-Methode mit dem *Crystal Screen I* und *Crystal Screen II* der Firma *Hampton Research* angewandt. In den meisten Fällen, in denen Kristallwachstum beobachtet werden konnte, handelte es sich um Mikrokristalle, in einigen Fällen konnten jedoch auch Kristalle bis zu 0,1 mm gezogen werden. Das Kristallwachstum setzte nach einem Tag ein und war in der Regel nach 2 Tagen abgeschlossen.

Größere Kristalle (0,4-0,5 mm) wurden mit der Optimierung der Wachstumsbedingungen und Anwendung der *sitting drop*-Methode erhalten, wobei die Mutterlauge aus 0,1 M MES (pH 6,5), 0,75 bis 2,0 M Ammoniumsulfat und die gefilterte (0,22 µm Filter) Proteinlösung 0,4 mg ml⁻¹ SQD1, in 300 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7,5), 10 mM UDP-Glucose, 5 mM NAD⁺ betrug. Nach Mischen von 10 µl Mutterlauge und 10 µl Proteinlösung setzte ein sichtbares Kristallwachstum ab dem 3. Tag ein und dauerte etwa 1 Monat, um 'große' Kristalle zu erzielen. Für Schwermetallderivate wurden die Kristalle mit unterschiedlichen Schwermetallverbindungen inkubiert. Schwermetallderivate des Proteins wurden von folgenden Verbindungen hergestellt:

1 mM Quecksilber Dibromofluorescin

20 mM Quecksilber Dibromofluorescin

1 mM Parahydroxy Quecksilber phenylsulfonsäure, Na-salz

1 mM Samarium Acetat, Hydrat

1 mM Natrium Ethylquecksilberthiosalicilat
1/10 gesättigte Kalium dicyanoaurat

3.6.2 Datenaufnahme und Bearbeitung

Die Vermessung der Proteinkristalle wurde an der Michigan State University durchgeführt. Röntgenstrahlen wurden durch ein Siemens Rotating-Anode-System mit einem 0,3 x 0,3 mm Kathoden Filament bei 50 kV, 100 mA und Kupfer „*target*“ erzeugt und mit einem Qsmic Confocal Max-Flux Optics Spiegelsystem fokussiert. Zur Datenaufnahme wurde die Probe (gefrorene Kristalle) auf einen Goniometerkopf montiert. Hierzu wurde der Kristall aus der Glycerin/Mutterlauge Lösung mit Hilfe einer Nylonöse auf eine Stahlspitze gebracht und in einem 100 K kaltem, trockenem N₂ Strom blitzartig eingefroren und während der Messung weiter vom kalten N₂ Strom umspült. Die Röntgenbeugung wurde mit einem Siemens HI-STAR Detektor gemessen.

Mit Hilfe der Schwermetallderivate kann die Patterson-Gleichung gelöst und die Phasen bestimmt und eine Elektronendichteverteilung errechnet werden. Dazu wurde das Programm SOLVE (www.solve.lanl.gov) benutzt.

3.7 Computergestützte Datenbankvergleiche und Sequenzanalysen

Für Datenbankvergleiche wurde die NCBI (National Center for Biotechnology Information) *non-redundant* Datenbank mittels dem BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) auf dem NCBI-Server durchsucht. Der paarweise Vergleich der Epimerasen und Dehydratasen erfolgte mit Hilfe des Programms SIM des ExpASY Molecular Biology Server (www.expasy.ch/sport/sim-prot.html)

3.8 Molecular Modelling

Swiss-Model, ein Protein Modelling Server, der von Glaxo Wellcome Experimental Research in Genf, Schweiz betrieben wird (www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html), wurde benutzt, um ein vorläufiges 3-dimensionales Struktur-Modell des SQD1 Proteins zu erhalten. Als Vorlage dienten unterschiedliche UDP-Glucose 4-Epimerasen von *E. coli*. Zuerst wurde die vollständige SQD1 Aminosäuresequenz zu Swiss-Model gesandt. Aufgrund einiger Lücken im Sequenz-Vergleich mit den bekannten Epimerase Sequenzen konnte jedoch nur ein unvollständiges Modell erhalten werden. Um dieses Problem zu beheben, wurden sieben kurze Regionen, in denen die Sequenzen keine Ähnlichkeit aufwiesen, in der SQD1 Sequenz

weggelassen. Diese so veränderte Sequenz wurde erneut zu *Swiss-Model* gesandt und es konnte ein vollständiges Struktur-Modell von SQD1, basierend auf den Kristalldaten der Epimerase von *E. coli*, erhalten werden. Alle weiteren Veränderungen der Protein-Struktur wurden mit der Molecular Modelling Software *Insight II* (Molecular Simulation, Inc.) durchgeführt.

Das von Swiss-Model erhaltene Modell wurde anschließend mit einer UDP-Glucose Epimerase-Struktur überlagert. Die hierfür verwendete UDP-Glucose Epimerase-Struktur, die gemeinsam mit NAD⁺ und UDP-Glucose kristallisiert wurde, ist in der Brookhaven *Protein Data Bank* gespeichert (PDB Code: 1xel; www.pdb.bnl.gov) (Abola *et al.*, 1987). NAD⁺ wurde gemäß seiner *syn* Konformation, in der es auch in 1xel vorliegt modelliert. Diese Konformation stimmt mit der Beobachtung von Thoden *et al.*, (1997) überein, der festgestellt hat, daß *syn* die aktive Konformation ist. Die Aminosäurereste, die an NAD⁺ und an UDP-Glucose in 1xel binden, wurden mit der „Ligand-Protein Contacts analysis“ (Sobolev *et al.*, 1996), das über PDB benutzt werden kann, identifiziert. Diese Reste wurden als Vorlage benutzt, um die Bindungsstellen im SQD1 Modell zu modellieren. Die entsprechenden Bindungsstellen-Reste in SQD1 wurden durch visuelle Analyse der überlagerten Epimerase-Struktur und des Modells gefunden. All jene Seitenketten, die zwischen den beiden Proteinen unterschiedlich waren, wurden hinsichtlich ihrer strukturellen und chemischen Eigenschaften in die ‘optimale’ Konformation modelliert. Die stereochemischen Eigenschaften des SQD1 Modells, einschließlich der (ϕ, ψ) Winkel, van der Waals Wechselwirkungen und *cis* Bindungen wurden während des ganzen Modelling Prozesses mit dem Programm *Procheck* (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Alle strukturellen Probleme die von *Procheck* bezüglich der Aminosäurereste in der Umgebung der Bindungsstellen erkannt wurden, wurden behoben. Schließlich wurden zwei der sieben Bereiche, die in der ursprünglichen Swiss-Model Struktur weggelassen wurden (Reste 143-148 und 364-374), zum Modell hinzugefügt. Hierfür wurde das *Insight II* Modul *search-loop-protein routine* benutzt. Die Bindungsstellen in dem endgültigen Modell wurden einer Energieminimierung von 100 Schritten unterzogen (*cff91 force field*), wozu das *Discover 3* Modul von *Insight II* benutzt wurde. Dieses Vorgehen sollte weitere, ungünstige Wechselwirkungen im SQD1 Modell vermindern.

3.9 Quantitative NAD⁺ Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung von NAD^+ wurde ein Alkoholdehydrogenase Enzymtest herangezogen. Der Test beruht auf dem Prinzip, daß Alkoholdehydrogenase unter Verbrauch von NAD^+ zu NADH, Ethanol in Acetaldehyd umwandelt. Das Aldehyd wird wiederum von vorliegendem Tris-Puffer als Schiffische Base gebunden, so daß die Reaktion vollständig auf der Seite des Aldehyds bzw. NADHs liegt. Das entstehende NADH kann dann photometrisch bestimmt werden. Der verwendete Reaktionspuffer bestand aus 50 mM Tris/HCl pH8,5, 0,2 M Ethanol, 1 mM EDTA, 10 units Alkoholdehydrogenase von Hefe (Sigma) sowie aus 50 μl des Proteinüberstandes. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 1ml und wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die Messung erfolgte bei einer Absorbtion von 340 nm gegen eine Küvette mit dem Reaktionspuffer ausgenommen dem Enzym. Alle Versuche wurden bei 25°C mit einem *Uvicon 930* Doppelstrahl Spektrophotometer (Kontron Instruments) unternommen.

3.10 HPLC-Analyse

Die HPLC (*high performance liquid chromatography*) Analyse der Nukleotide, einschließlich NAD^+ , wurde als *reverse phase* HPLC, mit einer 4,6 x 250mm, Partikelgröße 5 μm , RP-18 Säule (Ultrasphere von Beckman) durchgeführt. Als mobile Phase diente ein 30 mM KH_2PO_4 Puffer pH 6,0 mit 2 mM Tetrabutylammonium Hydroxid (Lösung A) und Acetonitril (Lösung B). Die Auftrennung erfolgte über einen 30 minütigen Gradienten von 0% auf 30% Lösung B in A. Dieses Verhältnis wurde für weiter 5 min gehalten, bevor die Säule mit 100% B für 10 min gewaschen, und anschließend mit 100% A über 20 min wieder equilibriert wurde. Die Detektion UV-absorbierender Verbindungen erfolgte im Durchflußphotometer bei 254 nm, radioaktive Verbindungen wurden mit Hilfe eines Festphasendurchfluß-Isotopendetektors detektiert.

3.11 Massenspektrometrie von NAD⁺

MALDI-Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry*) wurde mit einem *PerSeptive Biosystems Voyager Elite* Gerät, das mit einem Stickstoff Laser, der bei einer Wellenlänge von 337 nm jeweils Pulse von 2 ns aussendet, durchgeführt. Als MALDI-Matrix wurde eine Acetonitril/Wasser (1:1) gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxy-Benzoesäure verwendet. Zur Probenbereitung wurde 1 µl der Matrixlösung mit 1 µl der NAD⁺ Lösung gemischt und luftgetrocknet. Das Gerät wurde im positiven Ionenmodus gefahren.

3.12 NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren wurden ebenso wie die DQF-COSY (doppelquantengefilterten ¹H-¹H-Korrelationsspektren) in einem AMX 100 Gerät bei 500 MHz vermessen. Die Spektren wurden bei 20°C aufgenommen. Die gereinigte Probe wurde in 500 µl D₂O gewaschen, das Lösungsmittel abgedampft, erneut in 500 µl D₂O resuspendiert und für die NMR-Analyse eingesetzt. Die chemische Verschiebung wurde in ppm mit Trimethylsilylpropansulfonsäure (TPS) als externem und DHO als internem Standard (4,8 ppm) angegeben.