

## 4. Methoden

### 4.1 *Escherichia coli* -Zellkulturen

#### 4.1.1 Zellanzucht in Flüssigkultur

Zur Anzucht von *Escherichia coli* eignet sich LB-Medium (Luria-Bertani). Dieses wird in Erlenmeyerkolben mit Schikane portioniert und 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt, beispielsweise Ampicillin in einer Konzentration von 100 mg/l. Angeimpft wird mit 1/1000 Volumen der entsprechenden Stammkultur oder mit einer auf Festmedium gezüchteten Einzelkolonie. Bei Kulturvolumina über 200 ml sollte man zum Animpfen der eigentlichen Hauptkultur eine Vorkultur verwenden. Das Zellwachstum erfolgt über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C.

Zur Ernte werden die Zellen bei ca. 3000 xg abzentrifugiert und in dem gewünschten Puffer aufgenommen. Zum Anlegen einer Glycerinkultur versetzt man 600 µl der Bakterienkultur mit ca. 300 µl sterilem Glycerin und friert die Suspension in flüssigem Stickstoff ein. Glycerinkulturen sind bei -80°C mehrere Jahre lang haltbar. Für etwa einen Monat lang können kleinere Portionen der Kultur auch direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und bei -20°C gelagert werden.

LB -Medium:            10 g/l Pepton 140  
(1 Liter)                5 g/l Hefeextrakt  
                              5 g/l NaCl  
                              pH auf 7,4 einstellen (ca. 1 ml 1M NaOH), autoklavieren

#### 4.1.2 Zellanzucht von Einzelkolonien

Die Anzucht von Einzelkolonien erfolgt auf Agarplatten. Dem gewünschten Medium – in der Regel LB – werden zur Verfestigung 1,5% (w/v) Agar hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C können dem Medium temperaturempfindliche Additive - beispielsweise Ampicillin in einer Konzentration von 50 mg/l – zugegeben werden. Hiernach wird das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

Zur Anzucht der Kolonien werden ca. 150 µl eines Transformationsansatzes oder einer Flüssigkultur auf Agarplatten ausgestrichen und für ca. 15 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da die Vergrößerung der Kolonien exponentiell verläuft, ist während der Endphase des Zellwachstums darauf zu achten, daß die Kolonien nicht zu groß werden. Idealerweise sollte der Durchmesser der Kulturen 1 mm nicht überschreiten. Die Beschaffenheit der Platten (Feuchtigkeit, Dicke der Agarschicht, Alter) beeinflusst die Größe der Einzelkolonien und das Auftreten von Tochterkolonien. Nach dem Zellwachstum können die Platten für ca. 4 Wochen

bei 4°C gelagert werden. Zum Animpfen von Flüssigkulturen werden Einzelkolonien mit einer sterilen Platin-Impföse oder einer sterilen Nadel entnommen.

#### 4.1.3 Anzucht und Ernte von *amber*-Suppressor-Zellstämmen

Zur Aufrechterhaltung der jeweiligen *amber*-Suppressoraktivität enthalten alle in der Arbeit verwendeten *amber*-Suppressor-Zellstämme eine Mutation in einem Schlüsselenzym des Argininbiosyntheseweges,  $\text{argE}^{\text{am}}$ . Die Zellen können somit in Abwesenheit von Arginin nur dann wachsen, wenn die *amber*-Suppressor-tRNAs auch exprimiert werden. Aus diesem Grund werden die verschiedenen Zellstämme mit Ausnahme eines Kontrollstammes, der keine *amber*-Suppressor-tRNA exprimiert, in Minimalmedium (M9) kultiviert, das kein Arginin enthält. Zusätzlich enthalten alle Zellstämme mit Plasmid codierten *amber*-Suppressor-tRNAs eine Ampicillinresistenz auf dem entsprechenden Plasmid, so daß ein weiterer Selektionsdruck in Richtung *amber*-Suppressoraktivität durch die Zugabe von Ampicillin in das Medium erzeugt werden kann.

Die Anzucht der Zellen beginnt mit dem Anlegen einer Vorkultur. Je 10 ml M9-Medium werden mit 20 µl Glycerinstock des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

M9-Medium:  
(1 Liter)            6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
                          3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                          0,5 g NaCl  
                          1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

=> Autoklavieren und auf 50°C abkühlen lassen

=> Zugabe der folgenden für das Wachstum der Zellen benötigten hitzeempfindlichen Komponenten:

2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$   
0,1 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$   
10 ml 20% Glucose  
10 ml 0,1 M Thiamin-HCl  
10 ml 0,1 M Methionin  
10 ml 0,1 M Prolin  
(im Falle des Kontrollstammes noch zusätzlich 10 ml 0,1 M Arginin)

Mit der Vorkultur werden jeweils 0,5 Liter LB-Medium (bei plasmidhaltigen *amber*-Suppressor-Zellstämmen mit 50 µg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37°C solange geschüttelt, bis das Wachstum der Zellen die späte logarithmische Phase erreicht hat (ca. 3 bis 5 Stunden). Das Wachstum der Zellen muß während dieser Zeit durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD600) verfolgt werden. Bei einer optischen Dichte von ca. 1,2 werden die Kulturen auf Eis abgekühlt und für 15 Minuten bei 4°C und 3.000 xg zentrifugiert. Die Zellpellets werden in je 100 ml Zellwaschpuffer suspendiert und wieder abzentrifugiert. Dieser Wasch wird einmal

wiederholt. Die Zellpellets können hiernach bis zum Aufschluß der Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zellwaschpuffer:     10 mM TrisAc pH 8,2  
(1 Liter)             14 mM MgAc  
                          60 mM KAc  
                          0,5 ml  $\beta$ -ME

Die beschriebene Anzucht der Zellen in Vollmedium (LB-Medium) führt zu einer hohen Expressionsrate auch von plasmidkodierten tRNAs (Masson und Miller 1986).

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

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* werden Zellen eingesetzt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase und geringer Zelldichte befinden und diese mit Calciumchlorid behandelt.

500 ml LB Medium werden mit 1 ml einer 10 ml-Übernachtskultur angeimpft und für ca. 1,5 Stunden unter kräftigem Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,3 je Milliliter Kultur bei 600 nm inkubiert. Zur Ernte werden die Zellen für 5 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 2500 xg sedimentiert. Das Zellpellet wird in 20 ml vorgekühltem 75 mM Calciumchlorid resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert (5 Minuten,  $4^{\circ}\text{C}$ , 2500 xg). Es wird ein sichelförmiges Zellpellet erhalten, welches in 1 ml vorgekühltem 75 mM Calciumchlorid, 25 % Glycerin resuspendiert wird. Die Zellsuspension wird aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  sind die so erhaltenen kompetenten Zellen mehrere Monate haltbar.

### **4.2 Methoden für die Herstellung, Aufreinigung und Analytik von Nukleinsäuren**

#### **4.2.1 Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation**

Die Ethanol-Präzipitation dient vor allem der Konzentrierung von Nukleinsäuren. Die nukleinsäurehaltige Lösung wird mit einem zehntel Volumen einer 3 M Stammlösung Natriumacetat (NaOAc) pH 4,8-5,2 versetzt und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Bei stark konzentrierten Nukleinsäurelösungen sieht man direkt nach der Zugabe des Alkohols das weißliche Präzipitat. Dieses kann in einer fünfminütigen Zentrifugation bei 15.000 xg sedimentiert werden. Geringer konzentrierte Nukleinsäurelösungen müssen vor der Zentrifugation für mindestens 30 min (bei kleinen DNAs oder tRNAs mindestens zwei Stunden, besser über Nacht) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert werden um eine Präzipitation der Nukleinsäuren zu ermöglichen. Hiernach wird der Fällungsansatz für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 15.000 xg zentrifugiert. Bei gering konzentrierten Lösungen kleinerer Nukleinsäuren wie DNA-Oligomeren oder tRNAs sollte die Zentrifugationszeit am besten auf zwei Stunden bis über Nacht verlängert werden. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig

dekantiert und das Pellet mit 300 µl - 20°C kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Während des Waschs wird nochmals für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipettenspitze restlos entfernt und das Pellet im Lyophilisator getrocknet. Um eine Übertrocknung von Plasmiden zu vermeiden, sollte auf keinen Fall zu lange lyophilisiert werden, da das übertrocknete Plasmid sehr schlecht in Lösung geht und zudem enzymatischen Reaktionen wie der Spaltung mit Restriktionsenzymen nicht oder sehr schlecht zugänglich ist. Im Zweifelsfall ist eine Trocknung an der Raumluft vorzuziehen.

Bei der Fällung mit Isopropanol wird nach dem Versetzen mit Natriumacetatlösung lediglich mit einem Volumen Alkohol gemischt. Der Vorteil liegt in dem deutlich geringeren Fällungsvolumen. Die Fällungseffizienz ist jedoch geringer. So können gering konzentrierte Lösungen kleiner RNA- bzw. DNA-Fragmente nicht quantitativ gefällt werden. Der Fällungsansatz wird hier 30 min im Kühlschrank inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert.

#### **4.2.2 Phenol-Extraktion**

Aus wässrigen Lösungen von Nucleinsäuren können Proteine durch Phenol-Extraktion abgetrennt werden. Dabei werden die Proteine denaturiert und verworfen, während die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase gelöst verbleiben.

Die wässrige Nucleinsäurelösung wird mit dem gleichen Volumen wassergesättigtem Phenol pH 4-4,5 oder bei Bedarf mit Natriumacetat pH 4,5 gepuffertem Phenol für RNA-Aufarbeitungen bzw. Tris-HCl pH 8,0 gepuffertem Phenol für DNA-Aufarbeitungen versetzt und durch dreiminütiges intensives Schütteln gründlichst vermischt. Eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und mindestens 6000xg führt zu einer Trennung in eine organische Phenolphase (unten), eine Interphase, die denaturiertes Protein enthält und eine wässrige Phase. Die obere, wässrige Phase, in der die Nucleinsäure gelöst vorliegt, wird sorgfältig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um eine möglichst effiziente Abtrennung der Proteine erzielen zu können wird die Extraktion mindestens einmal wiederholt. Alternativ kann die Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Volumenverhältnis von 25:24:1 durchgeführt werden. Dies kann zu einer verbesserten Trennung der Phasen führen. Um eine höhere Ausbeute der Nucleinsäure zu erzielen, kann die phenolische Phase mit wässriger Lösung reextrahiert werden.

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

### 4.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Bei der herkömmlichen Methode werden 1,5 bis 10 ml einer Über-Nacht-Flüssigkultur 3 min bei 15000xg und RT (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in 110 µl Resuspensions-Lösung resuspendiert und mit 220 µl Lysis-Lösung unter leichtem Schwenken lysiert. Mit 165 µl Neutralisationslösung und leichtem Schwenken wird chromosomale DNA präzipitiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000xg und RT werden 400 µl des Überstands zur Entfernung von Protein mit Phenol pH 4,5 extrahiert. Nach Chloroform-Extraktion und Isopropanolpräzipitation wird das Sediment in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und zur Entfernung von RNA 30 min bei 37°C mit Ribonuklease A in einer Endkonzentration von 50 µg/ml inkubiert. Die gewonnene DNA ist vor allen Dingen für die DNA-Sequenzierung sowie für analytische Restriktionsverdau einsetzbar.

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

Tabelle 1: Lösungen für die analytische Plasmid-Präparation

Zur Isolierung größerer Plasmid-Mengen und zur Ermöglichung einer Ribonuklease-freien Aufarbeitung eignet sich der Plasmid-Isolierungs Kit Jetstar der Firma Genomed. Die Methode ist im Prinzip der herkömmlichen sehr ähnlich. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß Proteine und RNAs nicht durch Phenolextraktion und Ribonuklease-Verdau sondern durch eine Anionenaustauscher-Chromatographie von der DNA abgetrennt werden. Mit Mini-Säulen der Firma Genomed sind Ausbeuten von bis zu 40 µg Plasmid aus 10 ml Kultur möglich. Bei Midi-Säulen werden Kulturvolumina von 50 ml verwendet, aus denen je nach Plasmid 130 bis zu 250 µg Plasmid gewonnen werden können.

### 4.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund der  $\pi$ -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den Basen von Nukleinsäuren absorbieren DNA und RNA ultraviolettes Licht mit einer Maximalabsorption bei etwa 257 nm. Mit Hilfe der UV-Absorptionsspektroskopie kann die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung ermittelt und die Reinheit der nukleinsäurehaltigen Lösung näherungsweise bestimmt werden. Dazu wird ein Spektrum im Bereich zwischen 200 und 300 nm aufgenommen. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm kann als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen werden. Für reine DNA-Lösungen erhält man Werte um 1,8 und für RNA-Lösungen um 2,0. Die Absorption bei 260 nm dient als Grundlage für die Konzentrationsberechnung. Je nach Typ der Nukleinsäure können verschiedene Umrechnungsfaktoren eingesetzt werden. Diese, auf Lösungen mit einer Schichtdicke von 1 cm bezogenen

Näherungswerte, sind abhängig von der relativen Basenzusammensetzung der Nukleinsäure. Für einzelsträngige DNA-Oligomere entspricht 1 Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von etwa 33 µg/ml. Für RNA beträgt dieser Wert etwa 40 µg/ml und für doppelsträngige DNA etwa 50 µg/ml.

#### 4.2.5 Gelelektrophoresemethoden für Nukleinsäuren

Das Verfahren der Elektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Mobilität von Molekülen verschiedener Größe und Ladung im elektrischen Feld. Da bei Nukleinsäuren im Arbeits-pH-Bereich (pH 6 - 9) das Ladung/Masse-Verhältnis weitgehend unabhängig von Größe und Sequenz des Moleküls ist, beruht die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im angelegten elektrischen Feld hauptsächlich auf den Siebeigenschaften der Gelmatrix. Bei Agarose besteht diese aus Polysacchariden, bei Polyacrylamid-Gelen aus Polyacrylamidsträngen, die je nach Menge des zugesetzten Bisacrylamids mehr als weniger stark quervernetzt sind. Durch Anpassung der Porengröße lassen sich so Nukleinsäuren in einem weiten Größenbereich auftrennen. Bei Nukleinsäuren mit einer Länge von über über 500 Nukleotiden empfiehlt sich die Verwendung von Agarose-Gelen, darunter wird meist vernetztes Polyacrylamid verwendet. Die Elektrophorese kann sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen stattfinden. Eine Denaturierung der Nukleinsäuren ist bei der Analyse von Sequenzierungsreaktionen oder längeren RNAs obligatorisch. In Polyacrylamidgelen wird eine Denaturierung durch die Zugabe von 8M Harnstoff oder (und) Formamid erreicht, bei der Agarosegelelektrophorese werden die Proben durch die Zugabe von Formamid denaturiert und während des Laufs eventuell in Anwesenheit von Formalin denaturiert gehalten. Denaturierende Gele werden vor allen Dingen bei der Sequenzierung von DNA und bei der Analyse von RNA verwendet.

##### 4.2.5.1 Agarose Gelelektrophorese von DNA und RNA

Diese Methode wird z.B. routinemäßig bei der Restriktionsanalyse von Plasmiden, für eine Analyse von PCR-Produkten oder für die Auftrennung von Transkriptionsprodukten eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden folgende Agarosekonzentrationen verwendet:

Trennbereich (Nt.)	Agarosekonzentration (w/v)
800	0,7
300 – 800	1,0
150 – 500	1,5
70 - 300	2,5

##### Nativ:

In ein geeignetes Glasgefäß wird der Gelpuffer (1 x TBE-Puffer) vorgelegt. Hiernach wird eine entsprechende Menge an Agarose nach und nach - um Klumpenbildung zu vermeiden -

zugegeben und in der Mikrowelle unter gelegentlichem Schwenken vorsichtig zum Schmelzen gebracht. Die Lösung wird mit 1/10.000 Volumen einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) versetzt und in einen an beiden Seiten (mit Textilband) abgedichteten Elektrophoreseschlitten gegossen. Beim Erstarren wird das Gel milchig trüb.

Die Proben werden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Der Lauf erfolgt in einer speziellen Flachgel-Kammer bei ca. 100 V mit 1 x TBE als Laufpuffer. Gele können auch nachträglich durch 10-minütiges Schwenken in 1 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE gefärbt werden. Unter langwelligem UV-Licht (306 nm) fluoreszieren die Nukeinsäurebanden leuchtend orange.

### Denaturierend:

Für denaturierende Gele wird anstelle von 1 x TBE-Puffer MOPS-Puffer verwendet. Nach dem Abkühlen wird der Gellösung 2 % Formaldehyd zugegeben. Die Proben werden mit drei Volumina MOPS-Probenpuffer versetzt und für drei Minuten auf 65°C erwärmt. Ethidiumbromid zum Anfärben der Nukleinsäuren befindet sich nicht im Gel sondern im Probenpuffer. Zu bemerken ist, daß viele RNAs auch dann ein gutes Laufverhalten zeigen, wenn man sie in MOPS-Probenpuffer denaturiert und hiernach auf ein natives Agarosegel aufträgt. Hierdurch kann der Gebrauch des gesundheitsschädigenden Formaldehyds eingeschränkt werden.

Die Zusammensetzungen der für die Agarosegel-Elektrophorese erforderlichen Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

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

Tabelle 2: Lösungen für die native (A) und denaturierende (B) Agarosegel-Elektrophorese

#### 4.2.5.2 Gelelution von DNA aus nativen Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung von DNA – beispielsweise für den Einsatz in einer Ligationsreaktion - kann eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert werden. Dazu wird das Gelstück mit einem Skalpel intensiv zerkleinert und mit demselben

Volumen Phenol pH 8 versetzt. Nach 10 min intensivem Schütteln wird in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, wobei das Gel kollabiert. Nach dem Auftauen, weiterem fünfminütigen Schütteln und einer Zentrifugation für 10 min bei 15000xg und Raumtemperatur wird die wäßrige Phase isoliert. Phenol und die Agarose enthaltende Interphase werden mit einem Gelvolumen TE-Puffer (siehe Kap. 4.2.3) wie oben reextrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden noch mindestens zweimal phenolextrahiert bis keine weißliche Trübung mehr zu erkennen ist. Nach zweimaliger Chloroformextraktion wird die DNA-Lösung einer Ethanol- oder Isopropanol-Präzipitation unterzogen.

Eine gute Alternative zu dieser doch recht umständlichen Methode ist die Elution von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits (beispielsweise Quiaquick Gel Extraction Kit der Firma Quiagen).

#### 4.2.5.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung einzelsträngiger Nukleinsäuren nach ihrer Kettenlänge ist es nötig, sekundäre und tertiäre Wechselwirkungen zu zerstören. Dies geschieht im allgemeinen durch Verwendung von Formamid oder durch Zusatz von 8 M Harnstoff. Die Gellösung enthält:

48 g / 100 ml Harnstoff  
 1/5 vol 5 xTBE-Puffer  
 entsprechende Menge an Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung  
 ad H<sub>2</sub>O

Die Lösung wird filtriert und entgast. Durch Zugabe von TEMED (60µl / 100 ml) und 10%-igem APS (600 µl/ 100 ml) leitet man die Polymerisation ein.

Um eine Nachpolymerisation von Acrylamid am Boden der Taschen zu verhindern und in die Taschen diffundierte Salze zu entfernen, werden die Probenaschen nach dem Erstarren des Gels sowie vor dem Auftragen der Proben mit Laufpuffer (1 x TBE) gespült. Die Proben werden mit 1 bis 2 Volumina Auftragpuffer vermischt und im Falle von Auftragpuffer A für 3 Minuten bei 70°C denaturiert. Das Gel sollte bei niedriger Stromstärke für 30 min vorlaufen. Der Lauf kann anhand der Banden von Bromphenolblau und Xylencyanolblau verfolgt werden. Ein 8%-iges Gel mit den Maßen 20 x 14 x 0,08cm läuft bei einer Spannung von 300 bis 400 V für etwa 4 Stunden.

<b>5 x TBE-Puffer pH 8,3</b>	<b>Auftragpuffer A</b>	<b>Auftragpuffer B</b>
450 mM Tris	97,5 % Formamid (deionisiert)	8M Harnstoff
450 mM Borsäure	10 mM EDTA (pH 8,0)	50 mM EDTA (pH 8,0)
10 mM EDTA	0,1 % Bromphenolblau	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol	0,1 % Xylencyanol

Tabelle 3: Lösungen für die PAGE von Nukleinsäuren



#### 4.2.5.4 Polyacrylamid-Gele für die DNA-Sequenzierung und die Auftrennung von radioaktiv markierten tRNAs

Die Sequenzierung von DNA sowie die Auftrennung von tRNAs auf ein Nukleotid genau erfordern die Herstellung sehr langer Gele, um die benötigte Trennschärfe zu erreichen. Für analytische Zwecke werden Sequenziergele mit einer Länge von 42 cm und einer Gelstärke von 4mm eingesetzt.

##### Vorbereitung der Glasplatten:

Besonders wichtig für die Herstellung brauchbarer Sequenzierungsgele ist die Vorbereitung der Glasplatten, damit sich nach der Elektrophorese das nur 0,4 mm dünne Gel vollständig von der kleinen Platte löst und an der größeren Glasplatte haften bleibt, so daß es gespült, getrocknet und autoradiographiert werden kann.

Die beiden Platten werden unterschieden: die große Platte (33 x 42 cm), auf der das Gel haften bleiben soll und die als Unterlage für das Gel während der Autoradiographie dient, wird silanisiert. Die kleine Platte (33 x 39 cm) wird dagegen silikonisiert (Dichlordimethylsilan), um die Platte vom Gel lösen zu können. Der wichtigste Schritt bei der Herstellung von Sequenziergelen besteht in der Reinigung der Glasplatten. Beide Glasplatten werden gründlich mit Scheuersand und Schwamm gereinigt. Dies ist sehr wichtig, um alle anhaftenden Gelreste zu entfernen, so daß das nur 0,4 mm dünne Gel nicht an der kleinen Platte haften bleibt. Hiernach wird mit Wasser und Spülmittel entfettet und gesäubert, mit vollentsalztem Wasser abgespült und mit Ethanol getrocknet.

Neue Glasplatten werden vor der eigentlichen Behandlung mehrmals mit 1 M NaOH abgerieben und wie oben gesäubert.

##### *Silanisierung der großen Platte:*

Die Platte wird mit Ethanol abgerieben und die folgende Lösung aus 400 µl Bind-Silan, 600 µl Essigsäure und 20 ml Ethanol in die Mitte der Platte gegossen und mit einem KIMWIPE-Tuch homogen auf der Platte verteilt. Das Lösungsmittel läßt man 60 min oder über Nacht verdunsten und danach wird die Platte 3 x mit Ethanol abgerieben. Abschließend bleibt die Platte noch weitere 60 min liegen.

##### *Silikonisierung der kleinen Platte:*

Unter einem Abzug werden in die Mitte der Platte etwa 10 ml einer 2 %-igen Lösung aus Dichlordimethylsilan in Chloroform gegossen und mit einem KIMWIPE-Tuch verteilt. Die Flüssigkeit wird so lange verteilt, bis durch die rasche Verdampfung des Lösungsmittels eine gleichmäßige Verteilung feinsten Tröpfchen erreicht ist. Wichtig ist hierbei, die Lösung mit leichtem Druck „einzureiben“.

Die Platte wird für mindestens eine halbe Stunde unter dem Abzug belassen, um das Chloroform abdampfen zu lassen.

### Elektrophorese:

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt in 6%-igen Polyacrylamid-Gelen. Dazu benötigt man:

48 g Harnstoff (entspricht 8M)  
20 ml 5 x TBE-Puffer  
15 ml 40% Acrylamid-Mix  
ad 100 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O

Nachdem sich der Harnstoff gelöst hat (Nachhelfen durch Erwärmen), wird die klare Lösung filtriert und die Polymerisation mit 60 µl TEMED und 600 µl 10 %-igem APS ausgelöst. Nach der Aushärtung des Gels wird ein Vorlauf für etwa 30 min bei 55 Watt durchgeführt. Dadurch werden störende Elektrolyte entfernt und das Gel gleichmäßig erwärmt. Idealerweise sollte das Gel so heiß sein, daß man es mit der Hand gerade eben noch länger berühren kann.

Nach dem Probenauftrag wird das Fortschreiten der Sequenzierungsgel-Elektrophorese bei 55 Watt anhand der beiden, im Probenpuffer enthaltenen Farbmarker Bromphenolblau (BPB) und Xylencyanolblau (XCB) optisch verfolgt und bei einem sog. Kurzlauf dann abgebrochen, wenn sich die BPB-Bande 3 cm vor der Gelunterkante befindet.

Die kleine Glasplatte wird dann vorsichtig entfernt und das an der großen Platte haftende Gel für etwa 7 min unter fließendem dest. Wasser gespült, um den Harnstoff auszuwaschen. Er würde bei der anschließenden Trocknung auskristallisieren und das Gel zerreißen. Das Gel wird vor der Autoradiographie für etwa 30 min im Trockenschrank bei 75° C getrocknet, um die Schärfe der Banden zu erhöhen. Nach dem Abkühlen wird ein Röntgenfilm oder eine „Phosphor-Screen“ direkt auf das Gel gelegt, mit einer zweiten Glasplatte fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

#### **4.2.5.5 Ethidiumbromidfärbung**

Die Ethidiumbromidfärbung ist die gebräuchlichste Methode, um Nukleinsäuren in Gelen sichtbar zu machen. Die Nachweisgrenze liegt bei doppelsträngiger DNA bei etwa 20 ng. Die Detektion von einzelsträngiger DNA oder RNA ist nicht ganz so sensitiv. Zur Färbung wird das Gel in eine Lösung von 0,5µg/ml Ethidiumbromid in Wasser (oder 1x TBE) für 10 min geschwenkt. Im UV-Durchlicht (306 nm) sind Nukleinsäurebanden dann leuchtend orange zu erkennen.

#### **4.2.6 Behandlung von Nukleinsäurelösungen mit Proteinase K**

Im Gegensatz zur Phenolextraktion können Proteine aus DNA- oder RNA-Lösungen mit geringeren Verlusten durch Inkubation mit Proteinase K entfernt werden. Diese Behandlung empfiehlt sich vor allen Dingen vor einer gelelektrophoretischen Analyse von RNA.

Beispielsweise ist die Behandlung mit Proteinase K eine sehr gute Möglichkeit, um tRNAs ohne größere Verluste nach ihrer Inkubation in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems von Protein zu befreien.

Proteinhaltige Reaktionsansätze wie Prozessierungs- oder in vitro Transkriptionsreaktionen werden mit EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM, zur Denaturierung der Proteine mit SDS in einer Endkonzentration von 0,5 % und mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 300 µg/ml versetzt. Die Ansätze werden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend einer Ethanol-Präzipitation unterzogen.

#### **4.2.7 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis und Faloona 1987) bietet eine einfache Möglichkeit, um ausgewählte DNA-Segmente zu vervielfältigen. Bei dieser Methode werden Primer an die komplementären Stränge hitzedenaturierter DNA hybridisiert und mit hitzebeständiger DNA-Polymerase verlängert. Hierbei müssen nur etwa 22 Basen der 3'-Enden der beiden Primer zu der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementär sein. Über die 5'-Enden der beiden Primer können nahezu beliebig lange neue DNA-Sequenzen oder modifizierte Basen an das zu amplifizierende DNA-Segment angefügt werden. Auch die Einführung von Punktmutationen ist mit Hilfe der beiden Primer leicht möglich. Während der PCR erfolgt die DNA-Amplifikation exponentiell durch die Wiederholung eines mehrstufigen Zyklus aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Anstelle der häufig verwendeten *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, welche sich durch ihre hohe Prozessivität aber auch durch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate auszeichnet, wurde in der vorliegende Arbeit die rekombinante, in *Escherichia coli* exprimierte *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* sowie die ebenfalls rekombinante, in *Escherichia coli* exprimierte *Pwo* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* eingesetzt. Diese beiden Polymerasen besitzen eine ähnlich hohe Prozessivität wie die *Taq*-Polymerase. Daneben aber besitzen sie eine deutlich höhere Halbwertszeit bei 100°C und eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, welche einen Korrekturmechanismus bezüglich fehleingebauter Nukleotide darstellt. Die Aktivität der DNA-Polymerasen aus *Pyrococcus* ist bei niedrigen Temperaturen äußerst gering, was eine Verlängerung der Primer vor dem ersten Denaturierungsschritt relativ unwahrscheinlich macht. Dies führt zu einer geringeren Menge an PCR-Nebenprodukten.

##### **4.2.7.1 Standard PCR**

Je nach Sequenz und Länge der zu amplifizierenden DNA und der verwendeten Primer müssen verschiedene Parameter der PCR-Reaktion optimiert werden. Kritisch sind besonders die Annealingtemperatur und die Anzahl der Zyklen, aber auch Primer- und Matrizenkonzentration. Nachfolgend sind der Reaktionsansatz (Tabelle 4) sowie das

Temperaturprogramm (Tabelle 5) für eine typische Standard-PCR - beispielsweise für die Amplifikation von tRNA-Genen - aufgeführt. Die Denaturierung erfolgt bei 94°C, die Primerhybridisierung bei 54°C und die Elongation bei 72°C.

Reaktionskomponente	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	1 x 10 mM Tris-HCl, pH 8,85 (bei 20°C) 25 mM Kaliumchlorid 50 mM Ammoniumsulfat 2 mM Magnesiumsulfat
4 Desoxyribonukleosid-Triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP jeweils 2,5 mM	je 0,2 mM
Primer 25-45 Nukleotide, 100 µM	je 0,5 µM
DNA-Matrize (Plasmid oder Oligomer)	ca. 100 fmol / 100 µl
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase 5 U / µl	5 U / 100µl

Tabelle 4: Reaktionskomponenten für die PCR mit *Pwo* DNA-Polymerase

<u>Schritt:</u>		
1	1 min	94°C
2	45s	94°C
3	15s	54°C
4	55s	72°C
5	gehe 24 mal zu Schritt 2	
6	4°C	

Tabelle 5: PCR-Programm für die Amplifikation von tRNA-Genen mit den im Ergebnisteil (Kapitel 5.3.1) aufgeführten Primern

Größe, Qualität und ungefähre Konzentration des PCR-Produktes können durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelt werden. Für eine genaue photometrische Konzentrationsbestimmung müssen nicht umgesetzte Primer und Nukleotide zusammen mit weiteren niedermolekularen Komponenten und der Polymerase entfernt werden. Dies geschieht durch eine Phenol-Extraktion mit anschließender Isopropanol-Präzipitation oder mit Hilfe des "High pure PCR-product purification Kit".

#### 4.2.7.2 Mutagenese von Plasmid mittels Vektor-PCR

Mutationen, Deletionen oder Insertionen von mehreren benachbarten Basen innerhalb eines Plasmids können auf einfachem Weg durch die Amplifikation des ganzen Plasmids mit Hilfe der PCR eingeführt werden. Es werden Primer verwendet, die zu der Sequenz des Plasmids nicht vollständig komplementär sind, und eine Länge von 30 bis 40 Basen haben. Die beiden

Primer enthalten die zu mutierende Sequenz genau in ihrer Mitte und müssen zueinander vollständig komplementär sein. Innerhalb der Primer werden die gewünschten Mutationen stromauf- und stromabwärts von etwa 15 Basen flankiert, die komplementär zur Sequenz des Plasmids sind. Der Austausch einer einzelnen Base ist in Einzelfällen auch dann möglich, wenn diese nur 6 Basen vom Ende der Primer entfernt lokalisiert ist. Hierdurch können auch Mutationen eingeführt werden, die nicht unmittelbar benachbart sind.

Während der PCR werden beide Stränge der Plasmid-DNA unabhängig voneinander linear amplifiziert, wobei die Synthese der Komplementärstränge exakt nach einer Umrundung des Matrizen-Plasmids stoppt. Durch Rehybridisierung der komplementären neu synthetisierten Einzelstränge wird ein neues zirkuläres Plasmid gebildet, welches zwei um die Primerlänge versetzte Einzelstrangbrüche aufweist. In dieser Form kann das PCR-Produkt in kompetente Zellen transformiert werden. Vor der Transformation werden das Ursprungsplasmid und Hybride aus Matrizen- und neu synthetisiertem Strang durch einen Restriktionsverdau mit DpnI in nicht transformierbare kleinere DNA-Fragmente zerlegt. DpnI hat eine vier Basen lange methylierte Erkennungssequenz, so daß statistisch in einem 256 Basen langen DNA-Fragment eine Schnittstelle vorkommt. Ein selektiver Verdau der Stränge des Ursprungsplasmids ist möglich, da nur diese methyliert sind. Da das PCR-Produkt nicht methyliert ist, bleibt dieses während des Restriktionsverdaus intakt.

Im Vergleich zur oben aufgeführten Standard-PCR weicht das Protokoll der Vektor-PCR folgendermaßen ab: Die Plasmid-Matrize wird mit 50 ng/50 µl in relativ hoher Konzentration eingesetzt. Die Reaktionsdauer der Elongationsphase ist sehr lang und beträgt abhängig von der Plasmidgröße etwa 12 min (Tabelle 6).

Schritt:	
1	1 min 94°C
2	30s 94°C
3	60s 53°C
4	12 min 68°C
5	gehe 17 mal zu Schritt 2
6	4°C

Tabelle 6: Programm für die Vektor-PCR

Nach der Amplifikation wird der Reaktionsansatz mit 10 U DpnI auf 50 µl versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Hiernach werden 8 µl des Restriktionsansatzes direkt für die Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen eingesetzt.

#### 4.2.8 *In vitro* DNA-Rekombination - Klonierung

Unter dem Begriff Klonierung versteht man die Kombination einer Reihe von Methoden, deren Ziel es ist, eine neue oder veränderte DNA-Sequenz in einen Vektor einzuführen. Hierbei werden verschiedene Methoden, wie Restriktion, Phosphorylierung

Dephosphorylierung, Ligation, Transformation, Gelelution aus Agarosegelen oder andere Methoden zur Aufreinigung von DNA miteinander kombiniert. In Regel ist die Durchführung der einzelnen Methoden für sich genommen unproblematisch und relativ fehlertolerant. Die Hersteller der für die verschiedenen Methoden verwendeten Enzyme geben meist äußerst detaillierte Protokolle für die verschiedensten Anwendungen an. Weitgehend entscheidend für eine erfolgreiche Klonierung ist die Wahl der richtigen Strategie, das heißt die Auswahl der für den speziellen Fall geeigneten Methoden und ihre Kombination miteinander.

#### **4.2.8.1 Verschiedene für die Klonierung von DNA benötigte Methoden**

##### Restriktionsenzymsspaltung

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

##### Dephosphorylierung

Um das Rezirkularisieren eines linearisierten Plasmids oder eine Multimerisierung eines DNA-Fragments über kompatible Enden bei Ligationsreaktionen zu verhindern, werden die 5'-Enden der DNA mit Hilfe der Zink-abhängigen alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm entfernt (Maniatis et al. 1989). Miteinander kompatibel sind stumpfe DNA-Enden und cohäsive Enden deren einzelsträngige Überhänge zueinander komplementär sind. Ein Dephosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus einem Zink-haltigen Reaktionspuffer, dessen weitere Komponenten in den meisten Restriktionspuffern ingeeigneter Konzentration enthalten sind, der DNA mit den zu entfernenden 5'-Phosphat-Enden und der alkalischen Phosphatase in einer Konzentration von 1 U je Picomol 5'-Phosphat-Ende. Die Dephosphorylierung erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Durch 10 min Inkubation bei 75°C wird das Enzym inaktiviert. Es kann zusammen mit den Puffersalzen durch Phenolextraktion und Isopropanol-Präzipitation entfernt werden. Muß das dephosphorylierte DNA-Fragment außerdem noch aus einem Gemisch weiterer DNAs abgetrennt werden, so kann die Entfernung aller Komponenten in einem Schritt über Elution nach Agarosegel-Elektrophorese erfolgen.

##### Phosphorylierung

Zur Insertion synthetisch hergestellter DNA-Oligonukleotide in Plasmid-DNA muß zunächst die synthesebedingt fehlende 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphorylierungsreaktion mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase in Anwesenheit von ATP angefügt werden. Dabei wird die  $\gamma$ -ständige Phosphatgruppe von ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Ein Phosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus der einzel- oder doppelsträngigen DNA mit freier 5'-Hydroxylgruppe, dem Reaktionspuffer mit 70 mM Tris-HCL pH 7,6, 10 mM

Magnesiumchlorid, 5 mM Dithiothreitol und 1 mM ATP Endkonzentration sowie 30-100 U T4 Polynukleotidkinase je Picomol 5'-Ende. Nach 30 min Inkubation bei 37°C kann das Enzym durch 20 min Inkubation bei 65°C inaktiviert werden. Alternativ können zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide in einem Ansatz phosphoryliert und anschließend hybridisiert werden. Der Hybridisierungsschritt, der eine einminütige Inkubation bei 90°C und eine anschließende Abkühlung auf 30°C innerhalb eines Zeitraums von 20 min umfaßt, ersetzt den Hitzedenaturierungsschritt. Die Sequenzen der DNA-Oligomere werden so gewählt, daß an den Enden der Duplex-DNA nach Hybridisierung überhängende Einzelstränge kompatibel für die Ligation mit einem entsprechenden Plasmid verbleiben. Die Phosphorylierungsreaktion findet gewöhnlich in Gegenwart hoher Konzentrationen an DNA-Oligomer statt. Aufgrund der starken Verdünnung des Oligomers im Ligationsansatz kann auf eine Aufreinigung der phosphorylierten DNA verzichtet werden.

#### Auffüllen von inkompatiblen Enden mit *Pwo* Polymerase

Sollen nicht kompatible 5'-überstehende Enden für eine Ligation verwendet werden, so können diese durch eine Auffüllreaktion mit einer DNA-Polymerase in Anwesenheit von dNTPs in ligierbare stumpfe Enden umgewandelt werden. Eine gute Möglichkeit ist es, diese Auffüllreaktion mit der thermostabilen *Pwo* Polymerase bei 74°C durchzuführen. Die Reaktionsbedingungen entsprechen dann denen einer PCR. Ist eines der beiden Enden kompatibel, so wird dieses Ende vor der Auffüllreaktion mit dem Plasmid ligiert. Hiernach werden die nicht kompatiblen Enden von Plasmid und Insert aufgefüllt und ebenfalls miteinander ligiert.

#### DNA-Ligation

Der letzte Schritt bei der *in vitro* DNA-Rekombination ist die Rezirkularisierung eines linearen Plasmidfragments unter Insertion eines DNA-Fragments mit Hilfe der DNA-Ligase. Aus dem linearen Plasmid-Fragment, dem Ligase-Puffer mit 40 mM Tris-HCl pH 7,8 und 10 mM Magnesiumchlorid Endkonzentration sowie 10-100 U T4 DNA-Ligase je Microgramm DNA wird eine Vormischung erstellt. Bei cohäsiven Enden wird mit ATP in einer Endkonzentration von 1 mM ergänzt. Da bei stumpfen Enden hohe ATP-Konzentrationen inhibierend wirken, beträgt hier die Endkonzentration 0,05-0,1 mM und der Ansatz wird mit Polyethylenglycol 4000 in einer Endkonzentration von 5 % versetzt. Nach Portionierung der Vormischung werden in parallelen Ansätzen verschiedene Mengen des zu insertierenden DNA-Fragments eingesetzt. Für die meisten Ligationsreaktionen ist eine Inkubation bei 22°C für eine Stunde ausreichend. Bei stumpfen Enden kann das Reaktionsergebnis durch längere Inkubation von bis zu 24 Stunden und tieferer Temperatur von 4°C oft verbessert werden.

#### 4.2.8.2 Vorbereitung von Vektoren für die *in vitro* Rekombination von DNA

Die Präparation eines Vektors für die Klonierung wird nachfolgend beispielhaft anhand des Vektors pSP64 beschrieben, der für die Klonierung neuer tRNA-Gene verwendet wurde.

20 µg Plasmid in einer Präparation, die auf keinen Fall übertrocknetes Plasmid enthalten darf, werden mit je 40 U der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffers (ist aus dem Katalog zu entnehmen) verdaut. Hieran schließt sich eine Dephosphorylierung der 5'-Enden der linearen Fragmente mit CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) oder BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) an. Hierzu wird das Enzym (1U/ pmol 5'-Enden) direkt in die Restriktionsreaktion gegeben und für 1 Stunde bei 37°C weiter inkubiert. Dieser Schritt ist zwar nicht unbedingt notwendig, da die beiden Restriktionsschnittstellen der Plasmide nicht miteinander kompatibel sind und nicht ligiert werden können; durch die Dephosphorylierung wird aber eine Religation von Plasmiden, die eventuell nur mit einem der beiden Enzyme geschnitten wurden, verhindert. Die Anwendung von CIAP hat den Vorteil, das das Enzym durch eine Hitzebehandlung inaktiviert werden kann. Hierzu wird mit 5mM EDTA für eine Stunde bei 65°C oder 10 Minuten bei 75°C inkubiert. Es folgt eine Phenolextraktion, bevor der Restriktionsansatz auf einem präparativen 1%-igem Agarosegel aufgetrennt wird. Die Aufreinigung des geschnittenen Plasmids über eine Gelelektion ist zwingend erforderlich, um das herausgeschnittene Insert zu entfernen. Gleichzeitig werden mit diesem Schritt eventuell vorhandenen Rückstände der Phosphatase entfernt. Die mit Ethidiumbromid angefärbte Vektorbande wird - um eine Schädigung der DNA zu vermeiden - unter langwelligem UV-Licht (365 nm) visualisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und gelelekt (Kapitel 4.2.5.2).

#### 4.2.8.3 Klonierung von tRNA-Genen

Die Klonierung von tRNA-Genen beginnt mit der Herstellung der entsprechenden Gensequenzen mittels einer Standard-PCR (Kapitel 4.2.7.1). Hierzu wird ein DNA-Oligomer, das das an beiden Enden von konstanten Bereichen flankierte tRNA-Gen enthält, mit zwei Universal-Primern amplifiziert (vgl. Kap. 5.3. Abb. 20). Das Produkt der PCR wird zur Entfernung von dNTPs, Polymerase und Salzen mit dem "High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit" aufgereinigt. Die Alternative hierzu besteht in einer Phenolextraktion mit anschließender Isopropanolfällung. Hiernach erfolgt ein Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI zur Generierung von Enden, die mit dem für die *in vitro* Rekombination vorbereiteten Vektor kompatibel sind. Die Genkassette, die nach der Restriktion mit dem Vektor kompatible Enden aufweist, wird mit dem "High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit" aufgereinigt. Hierdurch können neben Salzen und Proteinen auch die während der Restriktion entstandenen unter 10 Bp langen Restriktionsfragmente der beiden Enden des PCR-Produktes effektiv entfernt werden.



Alternativ kann eine Gelelution durchgeführt werden, die aber wesentlich zeitaufwendiger ist. Hiernach erfolgt die Ligation der Genkassette in den vorbereiteten Vektor. Es wird ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5 eingesetzt. Ligiert wird für 15 Minuten bei 4°C und Ultraschall, ein Verfahren das sich als sehr effizient erwiesen hat. Alternativ kann bei 4°C über Nacht ligiert werden. Die Ligationsansätze werden hiernach in kompetente JM109-Zellen transformiert (Kapitel 4.2.8.4). Von drei Klonen werden 10 ml Übernachtskulturen in LB angesetzt und Stockkulturen angelegt (Kapitel 4.1.1). Die Plasmide werden aufgearbeitet (Kapitel 4.2.3) und über einen Restriktionsverdau analysiert. Plasmide mit erwarteter Insertgröße werden zur Verifizierung der korrekten Sequenz sequenziert (Kapitel 4.2.9 und Kapitel 4.2.5.4).

Eine Alternative der beschriebenen Klonierung eines DNA-Fragmentes über zwei Restriktionsschnittstellen mit überhängenden Enden ist die Klonierung eines DNA-Fragments mit stumpfen Enden in einen über eine einzige Schnittstelle geöffneten und dephosphorylierten Vektor. Für eine solche Klonierung wird beispielsweise ein mit SmaI geschnittener Vektor verwendet. Die PCR-Produkte müssen vor der Ligation phosphoryliert sein. Dies geschieht am besten, indem man in der PCR phosphorylierte Primer einsetzt. In der Regel ist bei einer solchen Klonierung aber mit einer wesentlich höheren Zahl von Religanden zu rechnen.

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

Das Einschleusen zirkulärer DNA in Zellen wird als Transformation bezeichnet. Die Zellanzucht auf ampicillinhaltigem Nährboden erlaubt die Selektion auf Bakterienklone, welche ein Plasmid mit exprimierbarer Ampicillinresistenz enthalten. 7,5 µl Ligationsansatz entsprechend 100-200 ng Plasmid-DNA werden mit 150 µl kompetenten *Escherichia coli* JM109-Zellen unter Vermeidung starker Scherkräfte versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wird der Transformationsansatz einem Hitzeschock ausgesetzt, indem er für eine Zeit von genau 90 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis abgekühlt wird. Hiernach wird der Transformationsansatz auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und Einzelkolonien gezüchtet. Bei schwierigen Ligationen kann das Protokoll leicht abgewandelt werden: Nach dem Hitzeschock wird der Ansatz mit 1 ml LB-Flüssigmedium versetzt und für 45 min bei 37°C in Abwesenheit von Ampicillin inkubiert, um den transformierten Zellen zu ermöglichen sich zu rekonstituieren. Nach einer kurzen Zentrifugation werden etwa 900 µl des Überstands abdekantiert, das Zellsediment in dem verbliebenen Überstand sanft resuspendiert und auf Agarplatten ausgestrichen (Kapitel 4.1.2).

### 4.2.9 DNA-Sequenzierung

Bei der Kettenabbruch-Technik nach Sanger et al. (1977) wird die zu sequenzierende DNA mit einer DNA-Polymerase, einem geeigneten DNA-Einzelstrang-Oligomer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten inkubiert. Zusätzlich wird in getrennten Reaktionen von jeweils einem Nukleotid ein Didesoxyribonukleosidtriphosphat-Analogon (ddNTP) im Unterschub eingesetzt. Wird ein solches ddNTP an die wachsende DNA-Kette angehängt, wird die Synthese des DNA-Stranges unterbrochen, da keine weiteren Phosphodiesterbindungen durch die DNA-Polymerase mehr geknüpft werden können. In vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils einem ddNTP neben den 4 normalen dNTPs entstehen so Populationen unterschiedlicher Moleküle, deren Länge jeweils Information über das Auftreten einer komplementären Base (A-T, G-C) an der entsprechenden Position in der Matrize gibt. Werden die vier verschiedenen Ansätze in nebeneinander liegenden Spuren im Sequenziergel getrennt, so kann die zu ermittelnde Sequenz im Vergleich der vier Spuren von unten nach oben in 5'-3'-Richtung gelesen werden.

Bei der klassischen DNA-Sequenzierung wird in der Regel ein Nukleotid radioaktiv mit  $^{35}\text{S}$ -dATP oder  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -dCTP markiert und das fertige PAA-Gel autoradiographiert. Dieses Verfahren wird jedoch zunehmend seltener angewendet. Es wird mehr und mehr durch automatisierte Verfahren ersetzt, bei denen die während der Sequenzierungsreaktion entstehenden Abbruchprodukte fluoreszenzmarkiert werden, so daß sie schon während des Gellaufs detektiert werden können. Auf diese Weise können in einem einzigen Gellauf DNA-Sequenzen von 500 bis 1000 Nukleotide bestimmt werden.

#### klassische Methode:

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

Der Doppelstrang von 2  $\mu\text{g}$  der zu sequenzierenden DNA in 8  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wird im stark alkalischen Milieu durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  2 M NaOH und vorsichtigem Durchmischen in Einzelstränge denaturiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die DNA durch Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  eiskalter 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,9, 7  $\mu\text{l}$  eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  sowie 60  $\mu\text{l}$  -20°C kaltem Ethanol und 15 min Inkubation bei -80°C präzipitiert. Das Sediment aus der zehnmütigen Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wird mit 70 % Ethanol gewaschen und im Lyophilisator getrocknet.

Die getrocknete, denaturierte DNA wird in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, mit 2  $\mu\text{l}$  Primer-Lösung - entsprechend einem zehnfach molaren Überschub gegenüber dem Plasmid -, und mit 2  $\mu\text{l}$  Hybri-

disierungspuffer versetzt. Die Hybridisierung des Primers an die komplementäre Zielsequenz des Plasmids wird durch Inkubationen von 20 min bei 37°C und 10 min bei Raumtemperatur unterstützt. Eine Lösung mit 7 U/μl T7 DNA-Polymerase wird mit eiskaltem Enzym-Verdünnungspuffer auf 1,5 U/μl eingestellt. Der Plasmid/Primer-Hybridisierungsansatz wird mit 2 μl verdünnter Polymerase, 3 μl Markierungs-Mix und 1 μl 10 μCi/μl α-<sup>35</sup>S-Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In vier Reaktionsgefäßen werden jeweils 2,5 μl einer der vier Nukleotidmischungen vorgelegt, welche die vier Desoxynukleotide und jeweils ein Didesoxy-Analogen enthalten und auf 37°C vorgewärmt. Die Nukleotidmischungen werden jeweils mit 4,5 μl des Markierungsansatzes versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze werden mit 5 μl Auftragpuffer A (Kapitel 4.2.5.3) für die denaturierende Gelelektrophorese versetzt, welcher gleichzeitig die Reaktion stoppt.

#### 4.2.9.1 Zyklische Sequenzierung von DNA („Cycle-Sequencing“)

Eine Alternative zu der im vorangehenden Kapitel geschilderten Methode der DNA-Sequenzierung besteht - vor allen Dingen bei der Sequenzierung kurzer Sequenzen (tRNA-Gene) - in der Anwendung der Methode des Cycle-Sequencing. Hierbei wird der zu sequenzierende DNA-Strang in einer mehrstufigen PCR-Reaktion in Anwesenheit der entsprechenden Desoxyribonukleosidtriphosphate und Didesoxyribonukleosidtriphosphat-Analoga mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) amplifiziert. Da die zu sequenzierende DNA während der PCR hitzedenaturiert wird, kann auf eine Denaturierung durch Alkalibehandlung verzichtet werden.

#### 4.2.10 *In vitro* Transkription

Die Herstellung von RNA mit nahezu jeder beliebigen Sequenz ist mit Hilfe der RNA-Polymerasen aus den Bakteriophagen T7, T3 oder SP6 leicht möglich. Hinter einen viralen Promotor klonierte DNA-Fragmente oder PCR-Produkte, bei denen der Promotor in die Primer integriert wurde, können mit Hilfe der genannten Polymerasen aus Phagen in einer *in vitro* Reaktion transkribiert werden. Hierbei sind die 3'-Enden der RNAs durch eine Restriktionsschnittstelle innerhalb eines Plasmids oder bei PCR-Produkten durch einen der beiden Primer definiert. Durch sogenannte „run-off“-Transkription der linearen DNA können RNAs mit definierten Enden hergestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transkripte wurden unter der Kontrolle der RNA-Polymerase des Phagen T7 (T7-RNA-Polymerase) synthetisiert. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die Herstellung nicht markierter sowie radioaktiv markierter *in vitro* transkribierter tRNAs angegeben. Das Protokoll weicht in einem einzigen Punkt von der Standardprozedur für die

Herstellung von mRNA ab: Um die Generierung eines monophosphorylierten 5'-Endes der tRNA zu ermöglichen, enthält der Reaktionsansatz zusätzlich GMP. Das verwendete Konzentrationsverhältnis zwischen GTP und GMP gewährleistet einen hohen Anteil von monophosphorylierten 5'-Enden (Sampson und Uhlenbeck 1988).

Zu beachten ist, daß *in vitro* Transkriptionsreaktionen bei Raumtemperatur pipettiert werden sollten. Ein typischer Ansatz zur *in vitro* Transkription von tRNA enthält folgende Komponenten:

Reaktionskomponente	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration	
		nicht markierter Ansatz	radioaktiv markierter Ansatz
<u>8x Transkriptionspuffer</u>			
Hepes-KOH, pH 7,5	640 mM	80 mM	80 mM
MgCl <sub>2</sub>	176 mM	22 mM	22 mM
Spermidin	8 mM	1 mM	1 mM
<u>Nukleotide pH 7,0</u>			
ATP	100 mM	3,75 mM	3 mM
CTP	100 mM	3,75 mM	2 mM
GTP	100 mM	3,75 mM	3 mM
UTP	100 mM	3,75 mM	3 mM
GMP ( <i>nur für tRNA</i> )	100 mM	10 mM	(10 mM)
$\alpha$ - <sup>35</sup> S-Cytosin-5'-triphosphat	10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	—	0,2 $\mu$ Ci/ $\mu$ l
DTE	500 mM	10 mM	10 mM
BSA (RNase-,DNase-frei)	20 g/l	120 $\mu$ g/ml	120 $\mu$ g/ml
anorganische Pyrophosphatase in 20 mM MOPS pH 6,85 / 10 mM MgCl <sub>2</sub>	1 U/ $\mu$ l	5 U/ml	5 U/ml
RNase-Inhibitor	40 U/ $\mu$ l	200 U/ml	200 U/ml
linearisiertes Plasmid (aufgereinigt oder Restriktionsansatz)	variabel	40 – 80 $\mu$ g/ml	40 – 80 $\mu$ g/ml
T7 RNA-Polymerase	50 U/ $\mu$ l	1000 U/ml	1000 U/ml

Tabelle 7: Komponenten für die *in vitro* Transkription von RNA mit T7-RNA-Polymerase

Analytische Transkriptionsreaktionen werden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, präparative Ansätze für drei bis vier Stunden oder über Nacht. Die DNA kann nach der Transkriptionsreaktion während einer 15 minütigen Inkubation mit DNaseI (f.c. 1U/ $\mu$ l) verdaut werden.

#### 4.2.10.1 Aufarbeitung von Transkriptionsansätzen

Zur Aufreinigung von mRNA schließen sich eine Phenol-Extraktion, eine Gelfiltration sowie eine Isopropanolpräzipitation an. Das Transkript kann durch photometrische Messung quantifiziert und Größe und Reinheit mittels denaturierender Gelelektrophorese überprüft werden. tRNAs können wie mRNAs aufgearbeitet werden, wenn eine genaue Bestimmung der spezifischen Aktivität nicht notwendig ist. Sollen Transkripte für Ligationsreaktionen aufgearbeitet werden oder soll eine genaue Bestimmung der spezifischen Aktivität bestimmter tRNA-Spezies – beispielsweise in der Aminoacylierung oder in der *in vitro* Suppression – durchgeführt werden, ist eine Gelelution der korrekten Transkripte zwingend erforderlich. Hierdurch können abortive Produkte, die in hoher Molarität am Anfang der Transkription entstehen, oder andere RNAs mit unkorrekter Länge aus der Präparation abgetrennt werden.

Zur Bestimmung der molaren Aktivität radioaktiv markierter Transkripte wird mit Trichloressigsäure gefällt.

#### 4.2.11 Gelelution von tRNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen

Vor der Gelelution muß die Präparation der tRNAs zugunsten eines besseren Laufverhaltens im Gel von Proteinen und Salzen befreit werden. Dies geschieht am zweckmäßigsten durch eine Pheneolextraktion und anschließende Fällung der tRNA mit Isopropanol.

Zunächst werden die Reaktionsansätze mit einem Volumen Phenol pH 4,5 bis 5,5 versetzt, für eine Minute geschüttelt und 5 Minuten bei maximaler rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Wieder wird eine Minute lang geschüttelt und 5 Minuten lang zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird dann zur Entfernung verbliebenen Phenols mit einem Volumen Chloroform versetzt, noch einmal für eine Minute geschüttelt und zwei Minuten zentrifugiert.

RNA-Elutionspuffer	Aufbewahrungspuffer für gelelutierte tRNAs	RNA-Harnstoff-Probenpuffer	TE-Puffer
0,5 M NH <sub>4</sub> Ac pH 4,8 10 mM MgAc 0,1 mM EDTA	10 mM HEPES pH 7,6 10 mM MgCl <sub>2</sub>	7,5 M Harnstoff 50 mM EDTA 0,1 % Xylencyanol 0,1 % BPB	10 mM Tris pH 7,8 1 mM EDTA

Tabelle 8: Komponenten für die Aufarbeitung von *in vitro* transkribierten tRNAs

Zur Präzipitation der Transkripte wird die Lösung mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) vermischt, für 30 Minuten oder über Nacht bei 4°C zwecks Präzipitation der RNA gelagert und 15 Minuten bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 %-igem Ethanol gewaschen,

lyophyllisiert und in TE-Puffer aufgenommen. Vor der Elektrophorese wird die tRNA mit einem Volumen RNA-Harnstoffprobenpuffer versetzt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem denaturierende 8%-igen PAA-Harnstoff-Gel. Für die präparative Aufarbeitung größtmöglicher Mengen an tRNA werden Gele mit den Maßen 40 x 30 x 0,4 cm verwendet.

550 ml 8 % AA-Harnstoff:

264 g Harnstoff

146 ml 30 % Acrylamid

110 ml 5 x TBE

ad H<sub>2</sub>O 550 ml

Zugabe von 3,3 ml 10 %iger APS und 330 µl TEMED zur Polymerisation

Die Elektrophorese findet bei 45 Watt über Tag (für ca. 6h) oder bei 18 W über Nacht (für ca. 13,5h) statt, bis die Xylen-Cyanol-Front ca. 2/3 der Gellänge erreicht hat. Nach der Gelelektrophorese wird der Bereich des Gels, der die tRNA enthält, mit Ethidiumbromid (5 µg/ml in 1 x TBE) gefärbt. Die tRNA befinden sich in der Regel ca. ein bis fünf cm unterhalb der Xylen-Cyanol-Front. Die tRNA-Banden werden visualisiert, ausgeschnitten, mit einem Spatel zerquetscht und mit 5 Volumina RNA-Elutionspuffer bei 4°C für mindestens 1½ Tage unter starkem Schütteln eluiert.

Hiernach werden die Gelstückchen bei 6000 xg abzentrifugiert und die tRNAs über Nacht mit Isopropanol präzipitiert. Am nächsten Tag wird für 2h zentrifugiert (15.000 x g), die präzipitierten tRNAs mit 80%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 590 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die tRNA-Lösung wird zur Entfernung verbliebenen Ethidiumbromids mit einem Volumen n-Butanol extrahiert, (die wässrige untere Phase) mit Hilfe einer NAP5-Säule entsalzt (siehe Gelfiltration, Kap. 4.2.11), mit drei Volumina Ethanol gefällt und in tRNA-Aufbewahrungspuffer aufgenommen.

#### **4.2.12 Aufarbeitung von Bulk-tRNA aus *Escherichia coli***

Die in der vorliegenden Arbeit optimierte Methode zur Aufarbeitung von Bulk-tRNA eignet sich für die schonende Präparation großer Mengen an Bulk-tRNA. Die Grundzüge der Aufarbeitung lehnen sich an die bei Zubay (1973) beschriebene Methode zur Herstellung von S30-Lysaten für die *in vitro* Translation an.

Zellen aus den für die Aufarbeitung vorgesehenen Zellstämmen, die bei -80°C gelagert wurden (vgl. Kapitel. 4.1.3), werden aufgetaut, ohne sie zu stark zu erwärmen und noch einmal in 20 ml S30-Waschpuffer pro Gramm Zellen suspendiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 6.000 xg werden je 1 g Zellen mit 2 g Alcoa gründlich zu einer homogenen Paste zerrieben (auf Eis arbeiten!). Hiernach werden 1,5 ml S30-Aufschlußpuffer pro g Zellen zugegeben und die Zellen weiter für 3 Minuten zerrieben. Dies wird wiederholt nach der

Zugabe von weiteren 1,5 ml Aufschlußpuffer pro g Zellen. Im Anschluß werden nicht zerstörte Zellen, Zellrümpfer sowie der größte Teil der chromosomalen DNA durch eine Zentrifugation bei 4°C und 30.000 xg für 45 Minuten aus dem Lysat entfernt. Der Überstand dieser Zentrifugation wird vorsichtig abgenommen und einer weiteren Zentrifugation bei identischer Drehzahl für 30 Minuten unterworfen. Hiernach erfolgt die Abtrennung der Ribosomen durch eine dreistündige Ultrazentrifugation bei 45.000 rpm im 50 Ti-Rotor der Firma Beckmann. Nach dieser Zentrifugation wird der S100-Überstand, der die tRNAs enthält, vorsichtig abgenommen.

Die tRNAs können nun wahlweise über eine Phenolextraktion oder über die Elution aus einer Anionenaustauscher-Säule (DEAE) aufgereinigt werden. Die Elution über eine Anionenaustauscher-Säule empfiehlt sich, wenn gleichzeitig eine S100-Enzymfraktion für Aminoacylierungszwecke aufgearbeitet werden soll. Wesentlich schneller ist jedoch die Phenolextraktion, mit deren Hilfe die tRNAs effektiv von den Proteinen abgetrennt werden können. Bulk-tRNAs, die mittels Phenolextraktion aufgereinigt werden, weisen in der *in vitro* Translation eine genauso hohe Aktivität auf wie über Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigte Bulk-tRNAs.

Zellwaschpuffer	Aufschlußpuffer	S30-Puffer	A30-Puffer
10 mM TrisAc pH 8,2 14 mM MgAc 60 mM KAc 7 mM $\beta$ -ME	10 mM TrisAc pH 8,2 14 mM MgAc 60 mM KAc 1 mM DTT 0,5 mM PMSF	10 mM TrisAc pH 8,2 14 mM MgAc 60 mM KAc 1 mM DTT	10 mM Tris-HCl pH 7,8 30 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM MgCl <sub>2</sub>

Tabelle 9: Lösungen für die Präparation von Bulk-tRNA aus *Escherichia coli*

#### 4.2.12.1 Aufarbeitung von Bulk-tRNA aus einem S100-Überstand mittels Phenolextraktion

Für die Phenolextraktion wird TE-gesättigtes Phenol mit einem pH-Wert von 8,0 verwendet. Der S100-Überstand wird zweimal mit Phenol, einmal mit einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8,0), einmal mit Chloroform extrahiert und hiernach einer Isopropanolfällung unterzogen. Die tRNAs werden in Wasser gelöst, Reinheit und Aktivität in einem Agarosegel bzw. mittels *in vitro* Translation überprüft.

#### 4.2.12.2 Aufarbeitung von Bulk-tRNA über Anionenaustauscherchromatographie

Die Aufarbeitung von Bulk-tRNA über Anionenaustauscherchromatographie ist eine schonende Methode, um neben Bulk-tRNA aus dem S100-Überstand eine nukleinsäurefreie S100-Enzymfraktion zu gewinnen.

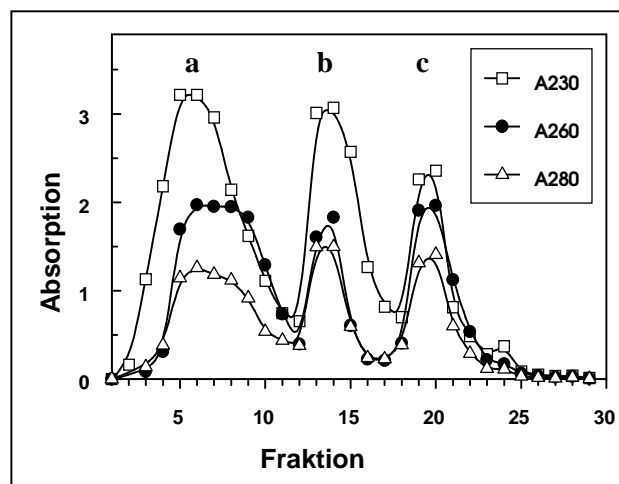
### Vorbereitung des Säulenmaterials DE52:

Je 1 g DE52 werden in 5 ml 10 x A30 suspendiert und für 20 Minuten auf 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert der Suspension auf 7,8 eingestellt. Das Säulenmaterial kann sich nun absetzen, worauf der Überstand dekantiert wird. Hiernach wird das Säulenmaterial in 15 ml Wasser pro g DE52 suspendiert. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials wird wieder dekantiert. Es werden 5 ml A30 pro g DE52 zugegeben, das Material wird suspendiert, nach dem Absetzen des Säulenmaterials wird dekantiert. Dieser Schritt wird vier mal wiederholt, bis der pH-Wert dem von A30 entspricht. Der Puffer enthält für eine längere Lagerung des Säulenmaterials 0,2% Benzalkoniumchlorid.

### Elution:

Eine Säule mit den Maßen 1,2 x 20 cm wird ca. 3 cm hoch mit DE52 gefüllt. Das Material wird mit einem Säulenvolumen einer Mischung aus S30- und A30-Puffer äquilibriert. Der S100-Überstand wird mit einem Volumen A30-Puffer verdünnt und auf die Säule gegeben. Hiernach wird die Säule mit 10 ml A30-Puffer gewaschen. Die Elution der S100-Enzymfraktion erfolgt mit 9 ml A250 (A30-Puffer mit 250 mM NH<sub>4</sub>Cl). Hiernach erfolgt die Elution der tRNAs mit 10 ml A450 (A30-Puffer mit 450 mM NH<sub>4</sub>Cl). Es werden Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml gesammelt und nach Messung der Absorption der einzelnen Fraktionen bei Wellenlängen von 230, 260 und 280 nm ein Elutionsprofil erstellt (vgl. Abb.8). tRNA enthaltende Fraktionen werden vereinigt, die tRNAs mit Ethanol präzipitiert und in

Abb. 8



*Elutionsprofil der Auftrennung eines S100-Überstandes in eine RNA-freie S100-Enzymfraktion und eine tRNA-Fraktion mittels Anionenaustauscher-Chromatographie:*

**a:** Durchlauf und Wasch (30 mM Ammoniumchlorid) **b:** S100-Enzymfraktion – Elution mit 250 mM Ammoniumchlorid **c:** tRNA-Fraktion (Bulk-tRNA) – Elution mit 450 mM Ammoniumchlorid

**A230:** Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm, **A260:** Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, **A280:** Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm

Wasser aufgenommen. (Die S100-Enzymfraktion muß vor Gebrauch entsalzt und notfalls eingengt werden.)



#### 4.2.13 Gelfiltration

NAP-Säulen von Pharmacia sind mit Sephadex G-25 Gelfiltrationsmaterial gefüllt. Sie werden allgemein zum Entsalzen wässriger Oligonukleotid-Lösungen (> 10 Nt.) verwendet. Es werden bis zu 97 % des eingesetzten Materials zurückgewonnen. Die Prozedur wird hier am Beispiel der Entsalzung einer tRNA-Lösung mit Hilfe einer NAP5-Säule wiedergegeben: Vor dem Probenauftrag wird die Säule mit 3 Füllungen H<sub>2</sub>O gewaschen. Hiernach wird die Probe in einem Volumen von 500 µl auf die Säule gegeben einlaufen gelassen. Der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wird über einem 12 ml PPN-Röhrchen plaziert und die tRNA in einem Volumen von 900 µl H<sub>2</sub>O eluiert. In der Regel schließt sich an diese Prozedur eine Ethanol-fällung der RNA an. Hierzu wird die Lösung mit 1/10 Volumen NaOAc pH 5,2 und 2,5 Volumina Ethanol versetzt, gemischt und für 2 Stunden oder über Nacht bei -20°C gelagert (vgl. Kap. 4.2.1).

NAP-Säulen können mehrmals verwendet werden. Sie sollten nach Gebrauch mit 3 Füllungen H<sub>2</sub>O gewaschen werden. Die Lagerung der Säulen erfolgt mit 0,02 % Natrium-Azid bei 4°C.

#### 4.2.14 "Annealing" von *in vitro* transkribierten tRNA

tRNA-Moleküle weisen in ihrer aktiven Form eine genau definierte Tertiärstruktur auf. Damit diese sich ausbilden kann, müssen die tRNAs korrekt gefalten sein. Die Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur geschieht auch bei *in vitro* transkribierten tRNAs zum Teil spontan, kann aber durch ein sogenanntes Annealing der tRNAs in Anwesenheit von Magnesium unterstützt werden. Hierzu werden die tRNAs in 10 mM Hepes pH 7,6 und 10 mM MgCl<sub>2</sub> für 3 Minuten auf 75°C erhitzt. Hiernach wird die Temperatur (durch Überführung in einen anderen Heizblock) schnell auf 65°C gesenkt, worauf die Temperatur über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten bis auf Raumtemperatur gesenkt wird. Dies geschieht am besten, indem man den Heizblock abschaltet und mit einem Ventilator kühlt. Die beschriebene Prozedur ist vor dem Einsatz von *in vitro* transkribierten tRNAs in der Aminoacylierung oder *in vitro* Translation obligatorisch.

#### 4.2.15 Aminoacylierung, Prozessierung und Reparatur von tRNA in der S100-Fraktion des fraktionierten Systems

Die Aminoacylierung von tRNA wird in der S100-Enzymfraktion des Translationssystems in Anwesenheit radioaktiv markierter Aminosäure durchgeführt. Nach der Reaktion wird der Anteil beladener tRNA (Aminoacyl-tRNA) an der Gesamtmenge an zugegebener tRNA mittels TCA-Fällung analysiert. Der Quotient aus dem aus der spezifischen Aktivität der radioaktiven Aminosäure) und der in der Reaktion eingesetzten Gesamtmenge an RNA

(photometrisch bestimmt) dient als Maß für die spezifische Aktivität der tRNA. Diese wird angegeben in pmol/A<sub>260</sub>.

Für eine Aminoacylierungsreaktion wird die S100-Enzymfraktion in einer Enkonzentration von 0,2 - 2 µg/µl eingesetzt. Die Reaktion wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen einer Translationreaktion sehr ähnlich sind. So enthalten die Ansätze neben ATP auch alle anderen NTPs sowie Phosphoenolpyruvat und Acetylphosphat zur Regeneration der Energiekomponenten. In der nachfolgenden Tabelle sind die Komponenten in den typischen Konzentrationen für eine Aminoacylierungsreaktion aufgeführt.

Komponente	Endkonzentration
<u>TL-Puffer:</u>	
HEPES pH 7,6	500 mM
Kaliumacetat	700 mM
NH <sub>4</sub> Cl	300 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
NaN <sub>3</sub>	0,2 %
DTT	10 mM
Magnesiumchlorid	12 mM
ATP, GTP und CTP, UTP	jew. 1 mM und jew. 0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	30 mM
Acetylphosphat	10 mM
anorganische Pyrophosphatase	2,5 U/ml
Pyruvatkinase	25 µg/ml
<sup>14</sup> C-markierte Aminosäure (100-400 dpm/pmol)	30-120 µM
<u>tRNA</u> (alternativ):	
<i>in vitro</i> Transkript	5 - 10 µM
oder	
Bulk-tRNA	2,5 mg/ml
S100-Enzymfraktion	0,2 - 2 µg/µl

Tabelle 10: Zusammensetzung einer Aminoacylierungsreaktion

Zur Aufnahme einer Reaktionskinetik werden der Reaktion zu den gewünschten Zeitpunkten 10 µl Aliquots entnommen und in 100 µl einer auf Eis vorgelegten Stopplösung (0,6 M Natriumacetatlösung pH 5,2, 20 mM EDTA und 0,8 g/l Hefe-tRNA) pipettiert. Diese Lösung wird mit 2 ml 10 %-iger Trichloressigsäure mit 2 % Pepton versetzt. Die radioaktiv markierten Aminoacyl-tRNAs werden hiernach - wie in Kapitel 4.5 beschrieben - durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis präzipitiert.

Prozessierung und Reparatur von tRNA-Molekülen finden unter den gleichen Bedingungen statt wie die Aminoacylierung. Der Einbau der Nukleotide ATP und CTP während der tRNA-Reparatur durch tRNA-Nukleotidyltransferase kann in Anwesenheit der entsprechenden

radioaktiven Analoga nachgewiesen werden. Hierzu wird die Konzentration der nicht radioaktiv markierten NTPs halbiert und das entsprechende radioaktiv markierte Nukleosidtriphosphat ( $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -ATP oder  $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ -CTP) in einer spezifischen Aktivität von 250 bis 500 dpm/pmol eingesetzt. Die radioaktiv (end-)markierten tRNAs können über eine Gelelektrophorese (Kapitel 4.2.5.3 und 4.2.5.4) oder mittels TCA-Fällung (Kapitel 4.5) analysiert werden.

#### 4.2.16 Chemische Aminoacylierung von tRNA (nach Schulz et al. 1995)

Da die chemische Aminoacylierung von tRNA nicht eigenhändig durchgeführt wurde, soll hier nur kurz das Prinzip erläutert werden. Die chemische Aminoacylierung von tRNAs basiert auf einer zweistufigen Methode, die in ihren Grundzügen auf Hecht et al. (1978) zurückgeht: Das Dinukleotid pCpA, das das Ende des Akzeptorarms der tRNA darstellt, wird chemisch mit einer  $\text{N}^\alpha$ -geschützten Aminosäure acyliert und dann enzymatisch an eine um das terminale Dinukleotid pCpA am 3'-Acceptorstamm verkürzte tRNA (tRNA-C) gebunden. Die verkürzte Suppressor-tRNA kann direkt durch "run off"-Transkription eines mit einem entsprechenden Restriktionsenzym linearisierten Plasmids, das das tRNA-Gen codiert, gewonnen werden.

Zur Acylierung des Dinukleotids wird der Cyanomethylester der entsprechenden Aminosäure verwendet. Dieser reagiert unter den verwendeten Bedingungen selektiv mit den 2',3'-Hydroxygruppen der Ribose zum monoacylierten Produkt.

Weiterhin ist im Dinukleotid Cytidin durch Desoxycytidin ersetzt, was die Synthese enorm vereinfacht und wodurch eine 2'-OH-Gruppe entfernt wird, ohne die biologische Aktivität zu beeinflussen. Die  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure und alle reaktiven Seitengruppen werden vor der Acylierung des Dinukleotids mit der Nitroveratryloxycarbonyl(N-VOC)-Gruppe unter Bildung der entsprechenden Carbamate, Ester und Ether geschützt. Diese Schutzgruppe kann nach der Ligation des acylierten Dinukleotids mit tRNA-C photochemisch unter schwach sauren Bedingungen (2 mM NaOAc pH 5,2) glatt von der intakten Aminoacyl-tRNA ohne Deacylierung der tRNA abgespalten werden. Für lichtempfindliche Aminosäuren kann die Biphenylisopropylloxycarbonyl(BPOC)-Gruppe verwendet werden; diese wird von Aminoacyl-pdCpA vor der Kopplung an tRNA-C unter schwach sauren Bedingungen abgespalten. Die Ligation selbst findet bei großem molarem Überschuss des acylierten Dinukleotids für 10 Minuten mit 300 U/ml T4-RNA-Ligase in einem Puffer statt, der 55 mM Na-HEPES (pH 7,5), 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3,3 mM DTT, 250  $\mu\text{M}$  ATP, 10  $\mu\text{g/ml}$  BSA und 10% DMSO enthält. Die Aminoacyl-tRNA-Bindung ist bei pH 7 bis 8, dem optimalen pH-Bereich für eine hohe Aktivität der T4-RNA-Ligase, relativ instabil, so daß schnell ligiert werden muß.

#### 4.2.17 Behandlung von N<sup>α</sup>-geschützter chemisch aminoacylierter tRNA

Nach der Ligationsreaktion wird die Aminoacyl-tRNA durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaOAc pH 5,2 und drei Volumina Ethanol über Nacht bei -80°C gefällt. Auf eine vorherige Phenolextraktion oder Entsalzung des Ligationsansatzes kann verzichtet werden. Nach einer zweistündigen Zentrifugation bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge bei 4°C wird das Pellet mit 75% Ethanol, 2 mM NaOAc pH 5,2 gewaschen und in 2 mM NaOAc pH 5,2 aufgenommen. Bei diesem Schritt löst sich die tRNA relativ schnell, während die ebenfalls präzipitierte T4-RNA-Ligase aus der Ligationsreaktion nicht mehr in Lösung geht. Diese wird durch eine kurze Zentrifugation entfernt.

Direkt vor dem Einsatz in der *in vitro* Translationsreaktion wird die Aminoacyl-tRNA mit einem Laser geeigneter Wellenlänge bestrahlt, um die zum Schutz der  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure und anderer reaktiver Seitengruppen verwendete photochemisch spaltbare N-VOC-Gruppe abzuspalten. Der hierfür verwendete Spectron Laser (Spectron Laser Systems, SL404-97A, U.K.) enthielt folgende Einstellungen:  $\lambda = 355\text{nm}$ , Pulslänge = 10 ns, Frequenz = 10 Hz, Energie = 50 mJ pro Puls Dauer der Bestrahlung = 30 s.

### 4.3 *In vitro* Translation

*In vitro* Translationsreaktionen wurden hauptsächlich in dem sogenannten fraktionierten System des *Escherichia coli* Stammes D10 unter den im Labor von Prof. V.A. Erdmann von Dr. W. Stiege optimierten Bedingungen durchgeführt. Das fraktionierte System zur *in vitro* Translation setzt sich im wesentlichen aus einer ribosomalen 70S-, einer tRNA- und einer nukleinsäurefreien S100-Enzymfraktion zusammen. Diese Zusammensetzung des Systems bietet entscheidende Vorteile im Hinblick auf eine genaue Charakterisierung von Reaktionen, die mit der Funktion von tRNAs bei der *in vitro* Translation verbunden sind. So können bestimmte an der tRNA stattfindende Reaktionen – wie Aminoacylierung oder Prozessierung – in der S100-Enzymfraktion untersucht werden, die eine Teilkomponente des Gesamtsystems darstellt und somit eine minimale Aktivität bestimmter Enzyme, beispielsweise von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, innerhalb des Gesamtsystems reflektiert. Die Sytheseleistung des fraktionierten Systems liegt bei etwa 20 – 40  $\mu\text{g}$  FABP pro ml Reaktion.

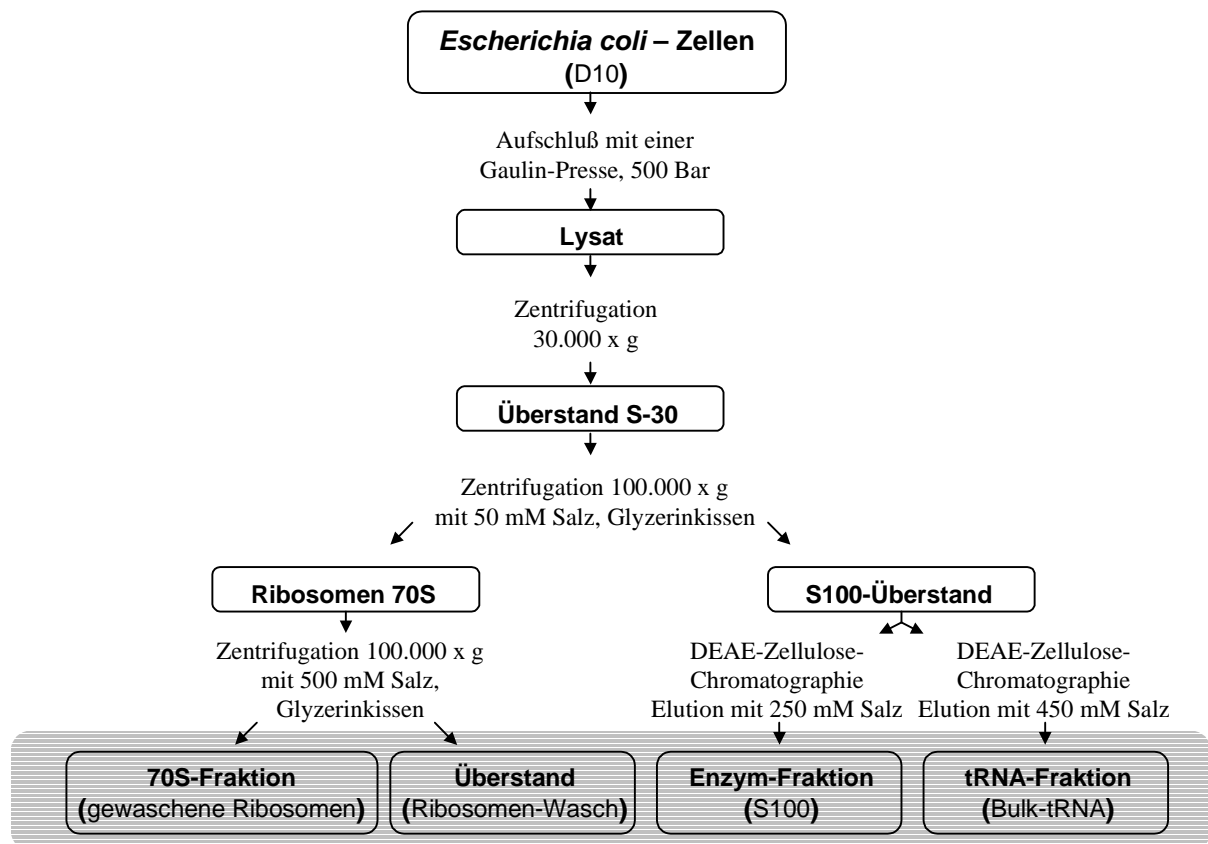
#### 4.3.1 Herstellung der Komponenten für das fraktionierte System

Da die Herstellung des fraktionierten Systems nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, werden hier nur die prinzipiellen methodischen Schritte zur Aufarbeitung der einzelnen Komponenten erläutert (vgl. Abb.9). Die im folgenden beschriebene Fraktionierung der für die *in vitro* Translation benötigten zellulären Komponenten geht im wesentlichen auf die Ende der 60er und Anfang der 70er Jahre von Herrlich und Schweiger durchgeführten Untersuchungen

zurück (Herrlich und Schweiger 1974). Die Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen und ihre Zusammenführung in einem *in vitro* Translationssystem wurden im Labor von Prof. V.A. Erdmann durch Dr. W. Stiege weiterentwickelt (Erdmann et al. 1989, Erdmann et al. 1994, Stiege & Erdmann 1995) und führten zu dem in der vorliegenden Arbeit vorwiegend verwendeten fraktionierten System.

Mitentscheidend für den Erfolg der Aufarbeitung ist die Wahl eines geeigneten Verfahrens zum Aufschluß der Zellen. Im Hinblick auf die Komplexität der in die Translation eingreifenden zellulären Vorgänge ist es von großer Bedeutung, nach dem Aufschluß der

Abb. 9



Die Herstellung der verschiedenen Teilkomponenten des fraktionierten Systems in der schematischen Übersicht: Die dargestellte Fraktionierung der für die *in vitro* Translation benötigten zellulären Komponenten geht im wesentlichen auf die Ende der 60er und Anfang der 70er Jahre von Herrlich und Schweiger durchgeführten Untersuchungen zurück (Herrlich und Schweiger 1974). Die Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen und ihre Zusammenführung in einem *in vitro* Translationssystem wurden im Labor von Prof. V.A. Erdmann durch Dr. W. Stiege weiterentwickelt (Erdmann et al. 1989, Erdmann et al. 1994, Stiege & Erdmann 1995) und führten zu dem in der vorliegenden Arbeit vorwiegend verwendeten fraktionierten System, dessen Zusammensetzung (grau unterlegt) und Aufarbeitung hier schematisch dargestellt sind.

Zellen ein Lysat zu erhalten, daß alle zellulären Komponenten in möglichst nativer Form enthält. Hierbei ist zu beachten, daß auch die nicht für die *in vitro* Translation benötigten Komponenten – beispielsweise Zellwandbestandteile und chromosomale DNA – bis zu ihrer Entfernung nach Möglichkeit in nativer Form erhalten werden sollten. Hierdurch kann eine Freisetzung degradierender Enzyme (z. B. RNasen) oder die Auslösung unerwünschter

Enzymkaskaden, die eine Verringerung der Translationsaktivität des Systems zur Folge haben würden, zum Teil verhindert werden.

In Flüssigmedium angezüchtete und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase geerntete Zellen des *Escherichia coli* Stammes D10 werden mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators (Gaulin-Press) bei einem Druck von 500-900 bar aufgeschlossen. Hiernach werden nicht zerstörte Zellen und Zelltrümmer sowie der größte Teil der chromosomalen DNA und eventuell an der einen oder anderen Komponente anhaftende Proteine durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen bei 30.000xg aus dem Lysat entfernt. Der hiernach erhaltene Überstand S30 enthält bereits sämtliche für die *in vitro* Translation benötigten zellulären Komponenten in ausgewogener Zusammensetzung und dient als Grundlage sowohl für die Herstellung der verschiedenen Teilkomponenten des hier beschriebenen fraktionierten Systems als auch für das ebenfalls innerhalb dieser Arbeit verwendete hochaktive S30-System.

Der Überstand S30 wird nun mit Glycerol unterschichtet und 14-18 Stunden bei 100.000xg zentrifugiert. Dabei sedimentieren hauptsächlich Ribosomen und anhaftende Moleküle, während weitere für die Translation benötigte Moleküle (z.B.: Terminationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, tRNAs, Enzyme des Energiestoffwechsels etc.) im S100-Überstand verbleiben. Dieser wird zur weiteren Aufreinigung mitsamt der glycerolhaltigen Phase abgenommen.

Um eine möglichst reine Präparation von 70S-Ribosomen zu erhalten, werden die nach der ersten Zentrifugation gewonnenen Ribosomen durch eine weitere Zentrifugation bei 100.000xg in einer höher konzentrierten Salzlösung von anhaftenden oder mit sedimentierten Proteinen (RNasen, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Initiationsfaktoren) befreit. Die im hierbei entstehenden Überstand (Ribosomen-Wasch, RW) enthaltenen Initiationsfaktoren sind für die Funktion des Gesamtsystems essentiell, so daß der Ribosomen-Wasch bei der Rekonstitution des fraktionierten System in der Regel als Quelle für Initiationsfaktoren dient. In der vorliegenden Arbeit wurden für das verwendete fraktionierte System allerdings anstelle des Ribosomen-Waschs weiter aufgereinigte Initiationsfaktoren verwendet.

Zur Auftrennung in eine nukleinsäurefreie Enzym- und in eine tRNA-Fraktion wird der S100-Überstand auf eine Säule mit DEAE-Cellulose aufgetragen (vgl. 4.2.12.2, S. 56). Durch Erhöhung der Ammoniumchloridkonzentration auf 250 mM werden die für die Translation benötigten Enzyme (S100-Enzym-Fraktion, S100) eluiert, während die tRNAs auf der Säule verbleiben. Die tRNAs können bei einer Ammoniumchloridkonzentration von 450 mM von der Säule eluiert werden. Durch Entsalzung bzw. Umpufferung mittels Dialyse oder Gelfiltration gegen 1 x TLM-Puffer werden in der S100-Enzymfraktion definierte Bedingungen bezüglich niedermolekularer Verbindungen eingestellt. Die Proteinkonzentration der S100-Fraktion wird durch photometrische Messung der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt und über die Formel "Proteinkonzentration

$[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 1525 \cdot A_{280\text{nm}} - 757,3 \cdot A_{260\text{nm}}$  berechnet (Kalb & Bernlohr, 1977). Hiernach kann die S100-Enzymfraktion entweder für die Rekonstitution des fraktionierten Systems oder für Aminoacylierungsuntersuchungen eingesetzt werden.

10 x TLM-Puffer:		
HEPES pH 7,6		500 mM
Kaliumacetat		700 mM
NH <sub>4</sub> Cl		300 mM
MgCl <sub>2</sub>		100 mM
EDTA pH 8,0		1 mM
NaN <sub>3</sub>		0,2 %

### 4.3.2 Durchführung einer *in vitro* Translationsreaktion

Eine typische *in vitro* Translations-Reaktion im fraktionierten System wird für 90 Minuten bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert und enthält folgende Komponenten, die in der dargestellten Reihenfolge pipettiert werden:

Komponente (Konzentration in Stammlösung)	Konzentration in der Reaktion
MgCl <sub>2</sub> (200 mM) <sup>1)</sup>	9 -12 mM
DTT (1M) <sup>1)</sup>	10 mM
Aminosäuren (ohne Leucin)	je 200 μM
<sup>14</sup> C-Leucin (1 mM)	70 μM (spezifische Aktivität: 100 dpm /pmol Leucin)
Rifampicin (20g/l)	0,02 mg /ml Reaktion
Bulk-tRNA (8 – 20 g/l)	600 μg / ml Reaktion
Suppressor-tRNA (Transkript)	0 bis 10 μM
E-Mix (20 x) <sup>3)</sup>	1 x
Pyruvatkinase (10g/l)	8 μg / ml Reaktion
linearisiertes Plasmid <sup>2)</sup>	ca. 2 pmol Plasmid / ml Reaktion
T7-Polymerase <sup>2)</sup>	500 U / ml Reaktion
St-Mix (2 x) <sup>3)</sup>	1 x
Initionsfaktoren-Präparation	ca. 50 μg / ml Reaktion

Tabelle 11: Zusammensetzung einer typischen *in vitro* Translationsreaktion im fraktionierten System

<sup>1)</sup> Die Konzentrationen von Magnesium und DTT werden sowohl durch die Zugabe als Einzelkomponenten als auch durch ihre Konzentration im ST-Mix definiert. <sup>2)</sup> Anstelle von linearisiertem Plasmid kann auch aufgereinigte mRNA als Matrize verwendet werden. <sup>3)</sup> Die Zusammensetzung des ST-Mix ist aus Tabelle 12 zu entnehmen, die des E-Mix aus Tabelle 13.

Einzelkomponente	Konzentration im St-Mix	Endkonzentration in der Reaktion
<b>TLM-Puffer:</b>	(2 x)	(1 x)
HEPES pH 7,6	100 mM	50 mM
Kaliumacetat	140 mM	70 mM
NH <sub>4</sub> Cl	60 mM	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	5 mM
EDTA pH 8,0	0,2 mM	0,1 mM
NaN <sub>3</sub>	0,04%	0,02%
DTT	10 mM	5 mM
PEG 4000	4 %	2 %
RNase Inhibitor (Gibco)	200 U/ml	100 U/ml
<b>Proteinase-Inhibitoren:</b>		
Aprotinin	20 µg/ml	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml	5 µg/ml
Pepstatin	10 µg/ml	5 µg/ml
Folsäure	100 µM	50 µM
<b>Ribosomen</b> (70S-Fraktion) <sup>1)</sup>	ca. 1.800 µM	ca. 900 µM
<b>S100</b> (Enzym-Fraktion) <sup>1)</sup>	2 - 3 mg/ml	1 - 1,5 mg/ml

Tabelle 12: Zusammensetzung der Komponente St-Mix des fraktionierten Systems

<sup>1)</sup> Der St-Mix besteht im wesentlichen aus einer aufgereinigten gewaschenen ribosomalen Fraktion und aus einer S100-Fraktion, die zur Entfernung von tRNA über DEAE aufgereinigt wurde (vgl. Abb.xx).

Einzelkomponente	Konzentration im E-Mix	Konzentration in der Reaktion
ATP	20 mM	1 mM
CTP	20 mM	1 mM
GTP	10 mM	0,5 mM
UTP	10 mM	0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	200 mM	10 mM
Acetylphosphat	200 mM	10 mM

Tabelle 13: Zusammensetzung der Komponente E-Mix (Energie-Mix) des fraktionierten Systems

Nach der Reaktion werden die Translationsansätze mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.4) und/oder über eine TCA-Fällung (Kapitel 4.5) analysiert. Für die TCA-Fällung werden 2 x 6 µl Reaktion verwendet, für die gelelektrophoretische Analyse 12 µl.



#### 4.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Bei einer Hitzebehandlung in Anwesenheit des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturieren Proteine und zerfallen in ihre Untereinheiten, wobei sich SDS-Moleküle in einem Massenverhältnis von etwa 1,4 zu 1 an die Polypeptidkette anlagern. Die Zahl der an Protein angelagerten SDS-Moleküle ist in der Regel annähernd proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so daß im elektrischen Feld eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Marker). Größere Abweichungen in der elektrophoretischen Mobilität sollten bei stark hydrophoben Proteinen (z. B. Membranproteinen) oder bei Proteinen, die größere geladene Gruppen wie Phosphatgruppen enthalten, erwartet werden.

Bei der denaturierenden "diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese" nach Laemmli (1970) dient die Unterteilung des Gels in ein Sammel- und ein Trenngel einer erhöhten Bandenschärfe und damit einer verbesserten Auflösung.

Zunächst wird das Trenngel auf etwa 80 % der Gelhöhe gegossen und mit 20 % Ethanol überschichtet. Nach mindestens 30 min Polymerisationsdauer wird die überstehende Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesogen, die Sammelgellösung überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das zu trennende Proteingemisch (beispielsweise eine *in vitro* Translationsreaktion) wird mit dem dreifachen Volumen Aceton vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 15000xg und 4°C wird das vom Überstand befreite Sediment im Lyophilisator 5 min getrocknet. Durch die Fällung mit Aceton können Salze, die das Laufverhalten der Proteine beeinflussen sowie Aceton-lösliche Radioaktivität entfernt werden. Das Sediment wird in Laemmli-Probenpuffer gelöst, 3 min bei 90°C inkubiert und auf die mit Laufpuffer bedeckten Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei maximal 15 V/cm unter Kühlung der Glasplatten statt.

5x Laufpuffer	Sammelgel	Trenngel	Laemmli-Probenpuffer
250 mM Tris 1920 mM Glycin 0,5 % SDS	5 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % SDS 0,2 % TEMED 0,1 % APS	15 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1 % SDS 0,04 % TEMED 0,1 % APS	1 % SDS 8,5 % Glycerol 2,5 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

Tabelle 14: Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli

Die Proteinbanden des Polyacrylamidgels können durch 30-60 min Schwenken in Coomassie blue-Färbelösung sichtbar gemacht werden. Unspezifische Färbung wird durch mehrstündiges

Schwenken in Entfärbelösung entfernt. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei ca. 100 ng.

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

Tabelle 15: Lösungen für die Färbung und Entfärbung von Proteingelen

Das gefärbte Gel wird auf Filterpapier übertragen und 3 Stunden bei 70°C in einem partiellen Vakuum von 50 mbar getrocknet. Im Falle einer radioaktiven Markierung von Proteinen wird mit Hilfe des "PhosphoImager-Systems" ein Autoradiogramm der radioaktiven Banden erstellt.

#### 4.5 TCA-Fällung von Protein und RNA

Nukleinsäuren und Proteine denaturieren und präzipitieren im sauren Milieu der TCA (Trichloressigsäure). Zur Quantifizierung der Radioaktivität, die in die Makromoleküle während bestimmter Reaktionen (Translation, Transkription, Aminoacylierung oder tRNA-Reparatur) eingebaut wurde, können die Präzipitate der TCA-Behandlung in Glasfiltern von löslicher, nicht eingebauter Radioaktivität abgetrennt und im Szintillationszähler gemessen werden.

Maximal 100 µl einer wässrigen Lösung mit radioaktiv markiertem Protein oder radioaktiv markierter RNA werden zu 100 µl vorgelegter Stopplösung pipettiert. Zu dieser Lösung gibt man 3ml 10 %-ige TCA hinzu, die zur Absättigung des Filters 2 % Pepton oder 50 mM Pyrophosphat enthält (siehe Tabelle 16). Die radioaktiv markierten Makromoleküle werden durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis präzipitiert. Zur Fällung von *in vitro* Translationsreaktionen wird vor der Inkubation auf Eis zur Vermeidung der Kopräzipitation radioaktiv markierter Aminoacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA die Esterbindung zwischen tRNA und kovalent verknüpfter Aminosäure durch eine 15 minütige Inkubation bei 90°C hydrolysiert. Diese Hitzeinkubation entfällt natürlich bei der Fällung von RNA. Nach der Inkubation auf Eis wird die durchmischte Suspension über einen mit 5 %-iger TCA befeuchteten Glasfilter abgesaugt. Das zur Präzipitation verwendete Gilsonröhrchen wird zweimal, die Innenwand der Absaugkammer dreimal mit jeweils 2 ml 5 %-iger TCA nachgespült. Durch zweimaliges Spülen mit jeweils 3 ml Aceton wird der Filter getrocknet. Nach Überführung des Filters in ein Szintillationsgefäß und Versetzen mit 3,5 ml Szintillationscocktail wird eine Stunde leicht geschwenkt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

	<b>Protein</b>	<b>nicht acylierte RNA</b>	<b>Aminoacyl-tRNA</b>
<b>Stopplösung</b>	0,5 % BSA	25 mM EDTA 1 g/l Hefe-RNA	0,6 M NaOAc pH 5,2 20 mM EDTA 0,8 g/l Hefe-tRNA
<b>TCA-Lösung zur Fällung</b>	10% TCA 2% Pepton	10% TCA 50 mM Pyrophosphat	10% TCA 2% Pepton

Tabelle 16: Lösungen für die Fällung von Proteinen, Aminoacyl-tRNAs und radioaktiv markierten in vitro Transkripten (nicht acylierten RNAs)

## 4.6 Detektion von $\beta$ -Strahlung

### 4.6.1 Autoradiographie

Die qualitative und quantitative Detektion von Banden radioaktiv markierter Proteine und Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel erfolgt im PhosphoImager-System. Das getrocknete Gel wird 1-3 Tage im Dunkeln auf eine Detektionsplatte gelegt. Die genaue Funktionsweise dieser Platte unterliegt dem Firmengeheimnis. Sie enthält komplexe Verbindungen mit dem Metall Europium. Diese werden durch  $\beta$ -Strahlung in einen angeregten Zustand mit einer Halbwertszeit von etwa 3 Tagen versetzt. Bei der Abtastung der Platte im PhosphoImager wird der angeregte Zustand mit Hilfe eines Lasers in den Grundzustand zurückversetzt. Die hierbei emittierten Lichtimpulse werden im PhosphoImager gezählt. Die Position der Quelle der Lichtblitze wird in digitaler Form im Computer abgespeichert, so daß ein zweidimensionales Abbild eines Gels oder einer Dünnschichtplatte dargestellt werden kann. Das Verhältnis der zu detektierenden Radioaktivität zur Anzahl der gemessenen Lichtimpulse ist laut Herstellerangaben über fünf Zehnerpotenzen linear. Da dieses System relative Meßwerte liefert, muß zur absoluten Quantifizierung parallel eine Probe mit bekannter spezifischer Aktivität eingesetzt werden.

### 4.6.2 Szintillationszählung

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

#### 4.7 Quantifizierung der spezifischen Aktivität von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT-Assay)

Chloramphenicol-Acetyltransferase katalysiert die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf Chloramphenicol. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete CAT-Assay Kit der Firma Molecular Probes verwendet als Substrat ein Chloramphenicolderivat, dessen 1-Hydroxylgruppe durch eine fluoreszierende Gruppe ersetzt ist, das sogenannte BODIPY FL 1-deoxychloramphenicol. Diese Gruppe hat ihr Absorptionsmaximum bei 504 nm und ihr Emissionsmaximum bei 510 nm. Somit können Substrat und monoacetyliertes Produkt nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung durch eine Bestrahlung mit Blaulicht anhand des emittierten Fluoreszenzsignals detektiert werden. Der Aktivitätstest wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, wobei die vom Hersteller angegebenen Mengen aus Gründen der Kostenersparnis erheblich reduziert wurden. Die im Assay eingesetzte Menge an *in vitro* Translationsreaktion wurde an die geringe Expressionsrate des für die gekoppelte Transkription/Translation von Chloramphenicol-Acetyltransferase verwendeten Plasmids (pACYC184) angepaßt.

Aus einer *in vitro* Translationsreaktion werden 5 µl Probe entnommen und mit 7 µl Verdünnungspuffer (50mM Tris.HCl pH 7,8; 2mM DTT; 0,03% BSA) versetzt. Von einem Eichstandard (1mU/µl) werden 1, 2, 4, 7 und 12µl ebenfalls in Verdünnungspuffer eingesetzt. Nun wird mit 2µl fluoreszenzaktivem Substrat (BODIPY FL 1-deoxychloramphenicol) versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 2µl Acetyl-Coenzym A zugegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 200µl eiskaltem Ethylacetat beendet. Das Fluoreszenzsubstrat und sein acetyliertes Derivat werden durch intensives Durchmischen aus der wässrigen Phase extrahiert. Nach 3 min Zentrifugation bei maximaler Drehzahl in einer Tischentrifuge werden 180µl der oberen Phase vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Trockne lyophilisiert. Der Rückstand wird in 10µl Ethylacetat aufgenommen. Hiervon werden 8µl auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen und 5 min getrocknet. Der Probenauftrag erfolgt dabei in einem Abstand von ca. 2cm von der Unterkante der Platte. Die verschiedenen Auftragungspunkte sollten möglichst klein sein und einen Abstand von etwa 12 mm untereinander aufweisen. Die Chromatographie erfolgt in einer dafür vorgesehenen Glaskammer, die bis auf eine Höhe von 0,5 cm mit dem Laufmittel (Chloroform:Methanol in einem Verhältnis von 85:15) gefüllt ist. Die Chromatographie wird gestoppt, wenn die Lauffront etwa 10cm zurückgelegt hat.

Substrat und Produkt werden unter Anregung mit Blaulicht einer Wellenlänge von 450 nm im PhosphoImager detektiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgt mit dem Programm ImageQuant der Firma Molecular Probes. Aus den Fluoreszenzintensitäten von Substrat und Produkt wird für jede Reaktion eine Konversionsrate in % berechnet:

Konversionsrate [%] =  $I_{\text{Produkt}} \times 100 / (I_{\text{Substrat}} + I_{\text{Produkt}})$ , wobei I der Fluoreszenzintensität entspricht

Anhand der berechneten Konversionsrate kann durch Vergleich mit einem mitaufgetragenen Eichstandard die Aktivität der in der *in vitro* Reaktion synthetisierten Chloramphenicol-Acetyltransferase rückgerechnet werden.