

5 Materialien

5.1 Vektoren

pRSET	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pGEX-4T	Amersham (Freiburg, Deutschland)
pCR Blunt	Invitrogen
pMal-C2	New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland)
pEGFP-N1	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
pFASTBAC	Invitrogen

5.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)pLysS	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10 Bac	Invitrogen
<i>E. coli</i> INV α F'	Invitrogen
<i>E. coli</i> (One Shot [®]) TOP10	Invitrogen

5.3 Insektenzellen

Sf9-Zellen	Invitrogen
High Five-Zellen	Invitrogen

5.4 Medien und Kultivierung der Zellen

Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wird destilliertes entionisiertes Wasser verwendet. Stammlösungen und Flüssigmedien für die sterile Anzucht werden 20 min bei 200 kPa autoklaviert bzw. hitzelabile Lösungen sterilfiltriert (Membranfilter, Porengröße 0,2 μ m; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland).

5.4.1 Bakterien

Bakterien werden bei 37°C im Schüttelinkubator (225 rpm; HAT-Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Model B; Memmert, Deutschland) kultiviert. Zur Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum werden diese bei -80°C eingefroren und so für Jahre gelagert. Hierfür werden Kulturen zu einer OD600 von 0,3-0,6 angezogen, Glycerin bis zu einer Konzentration von 20% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren, bevor sie bei -80°C gelagert werden. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut werden und in Medium resuspendiert werden.

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l	Pepton (Invitrogen)
	5 g/l	Hefeextrakt (Invitrogen)
	10 g/l	NaCl
	15 g/l	Agar (nur bei Festmedien)
	Bei Festmedien für die DH10 Bac-Zellen werden 12 g/l statt 15 g/l Agar zugegeben.	

<u>SOC-Medium:</u>	20 g/l	Pepton (Invitrogen)
	5 g/l	Hefeextrakt (Invitrogen)
	0,5 g/l	NaCl
	4 g/l	MgCl ₂
	3,6 g/l	Glucose
	186 mg/l	KCl

Nach dem Autoklavieren werden bei Selektivmedien noch entsprechende Antibiotika zugegeben:

50 mg/ml	Ampicillin
25 mg/ml	Chloramphenicol
50 mg/ml	Kanamycin
10 mg/ml	Tetracyclin
7 mg/ml	Gentamycin
25 µg/ml	Zeocin

Für die Blau-Weiß-Selektion werden zusätzlich noch folgende Substanzen zugegeben:

40 mg/ml	IPTG
200 mg/ml	Bluo-Gal

5.4.2 Insektenzellen

Insektenzellen werden bei 27°C als Suspensionskultur im Schüttelinkubator (115 rpm; Multitron; HT-Infors, Schweiz) oder adhärenent als Monolayer im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

Zur längerfristigen Lagerung werden Insektenzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür werden die Zellen als Suspension oder Monolayer angezogen, 3 min bei 500 × g pelletiert und mit einer Dichte von mindestens 2 × 10⁸ Zellen/ml in 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden langsam (1°C/min) auf -80°C abgekühlt und anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut und in Medium resuspendiert werden. Aufgetaute Zellen werden zunächst adhärenent kultiviert. Nach 4-6 h und weiteren 24 h erfolgt jeweils ein Mediumwechsel, um tote, nicht adhärenente Zellen zu entfernen.

Sf9-Zellen:

Grace's Insect Medium, mit L-Aminosäuren (Invitrogen)

100 ml/l	FCS (PAA, Österreich)
10 ml/l	200 mM Glutamin (Invitrogen)
10 ml/l	10% Synperonic F68 (Serva, Heidelberg, Deutschland)
5 ml/l	Gentamycin, 10 mg/ml (Invitrogen)

Sf-900 II-Zellen:

Sf-900 II Medium (Invitrogen)

10 ml/l	200 mM Glutamin (Invitrogen)
---------	------------------------------

High Five-Zellen:

Insect-XPress Medium, mit L-Glutamin (BioWhittaker, USA)

10 ml/l	200 mM Glutamin (Invitrogen)
5 ml/l	FKS (PAA)
1 ml/l	10% Synperonic F68 (Serva)

5.5 Primer

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

5.5.1 Mutageneseprimer

Veränderte Nukleotide sind unterstrichen. Revers-komplementäre Primer sind nicht aufgeführt.

K24A 5'-CAT CAT GTT CGG CAT TGC GAC GGA GCC TGC GTT C-3'

D112N	5'-CAT GAT TGT TCA CGG <u>AAA</u> CCG ATT TGA CGC CCT C-3'
E134Q	5'-CGC ATC CTT CAC ATT <u>CAA</u> GGA GGA GAG GTC AGC-3'
D143N	5'-GTC AGC GGG ACT ATT <u>AAT</u> GAC TCT ATC AGA CAC-3'
H220N	5'-CAT TGT TGC CCT GCA <u>AAA</u> CCC GGT GAC CAC CGA C-3'
M712T	5'-CTT GGT GCG GCC AGC <u>ACG</u> GTT CTG GAC TAC ACG-3'

5.5.2 Sequenzierprimer

Für das GNE-Gen der Ratte:

pFastBac	5'-CCC CGG ATG AAG TGG TTC G-3'	5' IRD 800
42f	5'-CTG ATA CAG GAG TGG AA-3'	5' IRD 800
53f	5'-GTG ATC AAC CTG GGC AC-3'	5' IRD 800
64f	5'-CAG CCA TGG TAG AGT CAG TG-3'	5' IRD 700
70f	5'-GGT GTT GAT GTC AAA GTC G-3'	5' IRD 700
53rc-1	5'-CGT AGT CGT CGA TCA GGT GA-3'	
53rc-2	5'-TGG CGT GTC TGA TAG AGT C-3'	
T3-3	5'-CTC TCA CCT GAT CGA CGA C-3'	
53rc-2rc	5'-GAC TCT ATC AGA CAC GCC A-3'	
53rc-1rc	5'-GGA CCC TAG TTC TGT TTC-3'	
42-4	5'-CCA GTT CGG TAA ACA GTA CC-3'	
42-3	5'-GCT CAA TTG CAG AAT TCT GG-3'	
42-1	5'-TCG TGG TGT CTC TGG ATG GTC-3'	
400 fwd:	5'-CAT CCG CAT CCT TCA CAT TG-3'	
400 rev:	5'-CAT CCG CAT CCT TCA CAT TG-3'	
800 fwd:	5'-GAA GGG CAT CGA GCA TC-3'	
1600 rev:	5'-GTT TGG CCA AGG AAA AGG A-3'	
1900 rev:	5'-CAT CCA AGC CGCC AAG-3'	
1900 fwd:	5'-CAT CCA AGC CGC CAA G-3'	

Für das GNE-Gen des Menschen:

H42 F	5'-CCA AGA GTG GAA CTC TGT GAA-3'	5' IRD 800
H42 RC	5'-GGA GCT TCC GTG GAT CAA TT-3'	5' IRD 700
H53 F	5'-GTG ATC AAC CTG GGA ACA CGT-3'	5' IRD 800
H53 RC	5'-CGG CCA AGG CAC TTA GAG T-3'	5' IRD 700
H64 F	5'-CAG CCA TGG TGG AGT CAG TA-3'	5' IRD 800
H64 RC	5'-TGT CAT AGG AAG GGC AGC CT-3'	5' IRD 700

5.5.3 Klonierungsprimer

Für pFastBac1-rGNE-Strep-N, pFastBacHTA-rGNE-Strep-N:

<i>Xho</i> I/StrepN/2-Epi	5'-CTC GAG CTC GAG ATG ATG TGG AGC CAT CCA CAG TTC GAG AAG ATG GAG AAG AAC-3'
<i>Xho</i> I/HT/StrepN/Epi	5'-CTC GAG CTC GAG CAT GAT GTG GAG CCA TCC ACA GTT CGA GAA GAT GGA GAA GAA-3'
<i>Kpn</i> I/2-Epi	5'-GGT ACC GGT ACC CTA GTG GAT CCT GCG GGT CGT GTA- 3'

Für pFastBac1-rGNE-Strep-C:

<i>Xho</i> I/2-Epi	5'-CTC GAG CTC GAG ATG ATG GAG AAG AAC GGG AAT AAC CGG-3'
Epi/Stop/StrepC/ <i>Kpn</i> I	5'-GGT ACC GGT ACC CTA CTA CTT CTC GAA CTG TGG ATG GCT CCA GTG GAT CCT GCG GGT CGT GTA GTC-3'

5.5.4 Sonstige Primer:

Bac1	5'-ACC TAT AAA TAT TCC GGA TT-3'
Bac2rc	5'-AAA GCA AGT AAA ACC TCT AC-3'

5.6 Kits

¹⁷ Sequencing™-Kit	Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen
Rediprime™II	Amersham Biosciences
QIAquick-Gel-Extraktions-Kit	Qiagen
QuickChange Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Invitrogen

5.7 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Enzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Invitrogen und Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

5.8 Geräte

Brutschrank (Bakterien)	BK 6160	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Brutschrank (Zellkultur)	6000	Heraeus
Cleanbench	Faster 1	BioFlow-Technik (Meckenheim, Deutschland)
Elisa-Reader	Spectra	SLT-Labinstruments (Achterwehr, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	Mini Subcell GT	BioRad (München, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop		Zeiss
Gel-Dokumentations-Apparatur	Gel-Print 2000i	MWG-Biotech
Heizblock	Thermomixer 5336	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Hybaid-Thermo-Cycler	Touch-Down	MWG-Biotech
Kühlzentrifuge	Centricon H-401	Kontron Instruments (GB)
Mikroskop	TMS	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Hochdruck-Zellaufschlussgerät	Modell One-shot®	Constant Systems LTD (Königswinter, Deutschland)
Power-Supply	Power-Pac 1000	BioRad
SDS-PAGE-System	Mini-Protreat II	BioRad
Sequencer	LI-COR 4200	MWG-Biotech
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Amersham Biosciences
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus
Ultrazentrifuge	Centricon T-2070	Kontron Instruments
Vortex	Vortex-Genie 2	Bender & Hobein, (Schweiz)
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus

6 Methoden

6.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 min, 200 kPa, 120°C), Erhitzen bei 180°C oder durch Filtration (Satorius-Membranfilter, Porengröße 0,2 µm) sterilisiert.

6.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen werden nach den Anweisungen und mit den Materialien des Herstellers (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Die Methode geht auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zurück.

Für eine Mini-Plasmidpräparation (30-50 µg DNA) werden von einer *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium 2 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 10000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wird in 200 µl Puffer I resuspendiert. Anschließend erfolgt die alkalische Lyse der Zellen und Freigabe der DNA durch Zugabe von 200 µl Puffer II. Durch 6-faches Schwenken wird der Ansatz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl von Puffer III wird der Ansatz erneut 6-mal geschwenkt und mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Der Puffer III neutralisiert die DNA-Lösung. Plasmid-DNA renaturiert, während die viel größere chromosomale DNA und Proteine aufgrund der hohen Salzkonzentration ausfallen, welche durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 10000 × g pelletiert werden. Der Plasmid-DNA enthaltene Überstand wird nochmals für 10 min zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 450 µl 2-Propanol, kurzem Vortexen und einer 30-minütiger Inkubation bei -20°C wird die Plasmid-DNA im Überstand gefällt und durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 × g pelletiert. Zur Entfernung restlicher Salze wird das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wird getrocknet, in 30 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

Für die Isolierung größerer Mengen (100 bzw. 500 µg) an Plasmid-DNA wurde die Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmidisolierung wurde nach den Anweisungen und mit den Materialien des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Reinigung basiert wiederum auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979), der sich eine zusätzliche säulenchromatographische DNA-Reinigung anschließt. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um ein Anionenaustauscher-Harz, an das die DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH bindet. Durch Erhöhung des pH-Wertes und der Salzkonzentration kann die Plasmid-DNA eluiert werden. Mit Hochsalzpuffer wird die Plasmid-DNA eluiert, durch 2-Propanol gefällt und mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Das Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 60 µl bzw. 150 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

6.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wird spektralphotometrisch durch Absorptionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA kann durch das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm ermittelt werden. Saubere DNA-Proben zeigen einen Extinktionsquotienten von ca. 1,8.

6.1.3 Reinigung von DNA

Verunreinigungen von DNA-Lösungen durch Proteine lassen sich mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion entfernen. Durch Denaturierung der Proteine verlieren diese ihre Hydrophilität und können nicht wie die DNA in der wässrigen Phase gelöst bleiben, sondern reichern sich in der organischen Phase bzw. in der Interphase an.

Der Ansatz (wässrige Phase) wird zweimal mit einem Volumen Phenol und anschließend zweimal mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils 1 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert und die obere wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, abgenommen. Durch anschließende Alkoholfällung werden verbleibende Phenol- und Chloroformreste aus der Lösung entfernt.

6.1.4 Fällung von DNA

DNA lässt sich durch Ethanol und 2-Propanol fällen. Dafür werden 2 Volumina 2-Propanol bzw. 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Volumina Ethanol zugegeben, der Ansatz durch Vortexen gut gemischt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wird anschließend 10 min bei $10000 \times g$ pelletiert und das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das anschließend getrocknete Pellet wird in 5-20 μl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) aufgenommen.

6.1.5 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen besitzen die Fähigkeit, spezifische DNA-Sequenzen von 4-8 bp innerhalb doppelsträngiger DNA zu erkennen und zu hydrolysieren, wobei überhängende 3' bzw. 5' Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends) entstehen. Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wird für die Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt (Brooks, 1987). Restriktionsspaltungen werden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthält zwischen 1 und 40 μg DNA und etwa eine Einheit (U) Enzym pro μg DNA. Die enzymatische Reaktion erfolgt meist bei 37°C für mindestens 1 h.

Beispiel eines Kontrollverdaus (10 μl):

- 5 μl DNA-Probe
- 1 μl 10x Reaktionspuffer (abhängig von verwendeten Enzym)
- 3 μl aqua bidest.
- 1 μl Restriktionsenzym

Im Anschluss werden die erhaltenen Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (6.1.6) analysiert. Eine optionale Reinigung der Fragmente kann durch eine Gelelektion erfolgen (6.1.7).

6.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Elektrophoresen wurden zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdaus, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur

Qualitätskontrolle von DNA benutzt. Die elektrophoretische Trennung von DNA-Molekülen im Bereich von 300-10000 bp erfolgt in horizontalen 0,5 bis 1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose (Amersham Biosciences) wird durch Kochen in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl / 5 mM Na-Acetat / 1 mM EDTA, pH 7,9) gelöst und nach Abkühlen auf etwa 50°C in die entsprechenden Gelschritten gegossen und mit einem Kamm, welcher die Probestaschen formt, bestückt. Nach dem Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400 / 1% (w/v) SDS / 0,02% (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer) versetzt. Bei analytischen Gelen beträgt das Auftragsvolumen 5-20 µL pro Probestasche, bei präparativen Gelen 50-200 µL. Als Größenstandard dient der 1 kb-DNA-Marker (Invitrogen), von welchem 10 µL (250 ng) aufgetragen werden.

Die Elektrophorese wird anschließend bei 70-80 V (5 V/cm) durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hat. Zur Färbung der DNA-Banden wird im Anschluss das Gel für 5 bis 10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in TAE-Puffer) inkubiert und die DNA unter UV-Licht (366 nm) visualisiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Bestrahlung rötlich.

6.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution

Nach dem Ausschneiden der entsprechenden DNA-Banden aus einem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter UV-Licht (366 nm) wird die DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert. DNA kann aus Agarose-Gelen durch Verflüssigung der Agarose in Spezialpuffer herausgelöst und anschließend über Qiagen-Säulchen (QIAquick-Gel-Extraction-Kit) gereinigt werden. Der im Kit enthaltene Puffer QG ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen und modifiziert durch die im Puffer enthaltenen Salze die Nukleinsäure-Struktur so, dass eine optimale Bindung der DNA an die Silicagel-Membran der Säulchen ermöglicht ist. Die Säulchen werden mittels kurzer Zentrifugation beladen, gewaschen und eluiert. Die DNA-Bindung an das Säulenmaterial ermöglicht durch den Ethanol enthaltenden PE-Puffer die Reinigung von unerwünschten Primern und Verunreinigungen, wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Nukleotide, Agarose, Ethidiumbromid, Öle oder Detergenzien. Die Elution erfolgt schließlich mit 30 µl Wasser.

6.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mit Hilfe einer Ligase wird als Ligation bezeichnet (Weiss *et al.*, 1968). Ligiert werden entweder geschnittene DNA-Fragmente mit komplementär-restringierter Vektor-DNA oder PCR-Produkte mit dem bereits linearisierten PCR-Vektor pCR Blunt (Invitrogen).

Bei der Standardligation wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen der linearisierte Vektor mit dem isolierten DNA-Fragment verknüpft. Für die Ligation werden Vektor und Insert im Verhältnis von mindestens 1:3 eingesetzt. Der Ansatz wird mit 1 µl T4-DNA-Ligase (20 U) und 1 µl 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer pro 10 µl Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend vollständig zur Transformation von Bakterien eingesetzt (6.1.10).

6.1.9 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind Zellen, die fähig sind, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Ursache für die Kompetenz ist die Behandlung mit CaCl_2 , wodurch die Zellmembran für DNA-Moleküle durchlässig wird (Dagert und Ehrlich, 1979). Zur Herstellung von kompetenten Zellen werden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von Inv α F⁺ oder BL21 StarTM(DE3) pLysS angeimpft und bei 37°C über Nacht kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wird in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600} 0,2-0,3 angezogen. Die Zellen werden durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 5 min, 4°C) pelletiert, in 20 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, erneut 5 min bei $3000 \times g$ und 4°C sedimentiert, nochmals in 1 ml kaltem 100 mM CaCl_2 resuspendiert und für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen werden direkt zur Transformation eingesetzt (6.1.10) oder nach Zugabe von 20% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

6.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien bezeichnet. Dabei wird zu 100 μl kompetenten Zellen der Ligationsansatz oder etwa 100 ng Plasmid-DNA pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen 30 sec bei 42°C im Wasserbad erhitzt, was die Aufnahme von DNA begünstigt. Nach einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis werden die Zellen mit 250 μl LB-Medium oder alternativ SOC-Medium für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert, damit sich die Bakterienzellen regenerieren können. Aliquots von 1 bis 200 μl werden auf vorgewärmten LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit der exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Dazu werden zwei Oligonukleotidprimer benötigt, die in gegenläufiger Orientierung flankierend der zur amplifizierenden Region, an den entgegengesetzten DNA-Strängen hybridisieren.

Die DNA-Polymerase synthetisiert vom jeweiligen Primer aus in 5'→3'-Richtung den komplementären Strang; es werden Sense- und Antisense-Strang synthetisiert. Die neu synthetisierten Doppelstränge werden durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert, um ein erneutes Hybridisieren der Primer und die anschließende Synthesereaktion der Polymerase ermöglichen zu können.

Der Reaktionszyklus, der aus DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und Synthesereaktion besteht, liefert nach jeder Wiederholung eine Verdopplung der vorhandenen Matrizen-DNA und damit eine exponentielle Anreicherung der gewünschten Sequenz.

Für die PCR werden hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien verwendet, wie die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, so dass die Kettenreaktion in einem Gefäß ohne erneute Zugabe von Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurde für Klonierungs-PCRs, d.h. für PCR-Versuche, bei der das Amplifikat weiter verwendet wurde, die *Pfu*-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese Polymerase hat neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exopolymerase-Proof-Reading-Aktivität, die falsch eingebaute Nukleotide

erkennen und entfernen kann. Die *Pfu*-Polymerase hat eine 12-mal höhere Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase, die lediglich für Standard-PCRs eingesetzt wird.

Die Klonierungs-PCR wird mit dem AkkuPrime™-*Pfx*-SuperMix-Kit (Invitrogen, Niederlande) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Ein Ansatz für eine Standard-PCR sieht dabei wie folgt aus:

Template	0,1-200 ng
Primer	je 200 nM
AccuPrime-Mix	22,5 µl /25 µl Ansatz

Die Reaktion wird in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid, MWG-Biotech) mit folgendem Programm durchgeführt:

1 ×	3 min	94°C
30 ×	30 sec	94°C
	30 sec	55°C
	2 min 30 sec	68°C
1 ×	10 min	68°C

Die Standard-PCR wird mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Ein Ansatz für eine Standard-PCR sieht dabei wie folgt aus:

Template	1-10 ng
Primer	je 20 pmol
dNTPs	je 2 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Puffer	10 × <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl/50 µl Ansatz

Die Reaktion wird in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid, MWG-Biotech) mit folgendem Programm durchgeführt:

1 ×	3 min	94°C
30 ×	30 sec	94°C
	30 sec	55°C
	2 min 30 sec	72°C
1 ×	10 min	72°C

Ein Aliquot von 5 µl wird zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

6.1.12 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle von Klonierungsschritten und zur Sequenzanalyse generell werden Sequenzierungen durchgeführt. Bei allen Sequenzierungen wird die Kettenabbruchmethode angewandt (Sanger *et al.*, 1992).

Bei der DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimern werden in einem Gesamtvolumen von 13 µl 1,3 µg Template-DNA mit 2 pmol IRD-markiertem Sequenzierprimer in H₂O gelöst. Jeweils 3 µl des Templateansatzes wird auf vier verschiedene Nukleotid-Mixe (Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kits,

Amersham) verteilt, die jeweils eines der vier Didesoxynukleotide (entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) für den Abbruch der Polymerasereaktion enthalten. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 6 µl werden einer Sequenzier-PCR (2 min 94°C, 25 Zyklen 20 sec 94°C / 20 sec 60°C / 10 sec 72°C) unterzogen. Anschließend wird 1 µl des zuvor mit Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200, MWG-Biotech, München) analysiert.

Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden können unmarkierte Sequenzierprimer verwendet werden. 1 µg DNA wird mit 10 pmol Sequenzierprimer und 4 µL „BigDye-Lösung“ des BigDye-TM Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gelöst. Nach der Sequenzier-PCR (30 sec 96°C, 25 Zyklen 30 sec 96°C / 15 sec 55°C / 4 min 60°C) werden die Proben über CentriflexTM Gelfiltrationssäulen (Edge BioSystems, USA) gereinigt, wobei Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Primer und Nukleotide an die Säulenmatrix binden. Die eluierten DNA-Fragmente werden bis zur Trockne eingeengt, in 20 µl Template Suppression Reagent (Applied BioSystems, UK) resuspendiert und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200, MWG-Biotech, Deutschland) analysiert.

6.1.13 Herstellung von Punktmutanten

Zur Generierung von Mutanten wird der QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis-Kit (Stratagene, Niederlande) nach den Anweisungen des Herstellers verwandt. Zur Konstruktion einer Punktmutante sind zwei zueinander revers-komplementäre Oligonukleotidprimer erforderlich, die die gewünschte Mutation möglichst mittig tragen. Als Ausgangs-DNA dient der pFastBacHTA-rGNE-Vektor, der ausgehend von den Mutationsprimern von der *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase repliziert wird. Die Amplifikationsreaktionen werden in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	30 sec	95°C
12 x	30 sec	95°C
	1 min	55°C
	14 min	68°C

Anschließend wird die parentale Template-DNA mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* abgebaut, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA des Mutterplasmids abbaut (1 h, 37°C, 10 U). Die amplifizierte DNA mit den Mutationen wird in superkompetente *InvαF'* Zellen transformiert.

6.2 Expression in Insektenzellen

Die Überexpression von rekombinantem Protein in Insektenzellen wird mittels des BAC-TO-BACTM-Baculovirus-Expression-System bewerkstelligt, welches das zu untersuchende Gen durch einen Virus in Insektenzellen eingeschleust und dort exprimiert. Es werden weitgehend die Anweisungen des Herstellers (Invitrogen).

6.2.1 Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA

Zunächst wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit den unter 6.1 beschriebenen Methoden in das pFASTBAC-Donorplasmid kloniert. 100 µl kompetente DH10-BAC-*E.coli*-Zellen werden im nächsten Schritt mit 1 µg des pFASTBAC-Donorplasmid transformiert. Abweichend von der in 6.1.10 beschriebenen Transformation ist zum einen die Dauer des Hitzeschocks auf 45 sec verlängert, zum anderen wird den Zellen 400 µl SOC-Medium zugesetzt und eine wesentlich längere Regenerationszeit (4 h) bei 37°C gegeben, die für die Expression dreier Resistenzgene benötigt wird. 100 µl werden anschließend auf LB-Kan/Gent/Tetracyclin-Platten ausplattiert und für mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Mittels eines Helfersplasmids wird in einem Teil der transformierten DH10 BAC-*E. coli* Zellen das zu untersuchende Gen vom pFASTBAC-Donorplasmid in die Bacmid-DNA transpositioniert. Bei der Transposition wird das in der Bacmid-DNA vorhandene *lacZ*-Gen ersetzt und verliert so seine Funktionalität. Daher enthalten neben den Antibiotika für die Selektion die LB-Platten des Weiteren Bluo-Gal und IPTG, um durch Blau-Weiß-Selektion die Klone zu identifizieren, bei denen eine homologe Rekombination zwischen Donorplasmid und Bacmid-DNA stattgefunden hat. Weiße Klone werden zur phänotypischen Überprüfung erneut auf LB-Kan/Gent/Tetracyclin-Platten ausgestrichen und mindestens 24 h bei 37°C inkubiert.

6.2.2 Analyse der Bacmid-DNA

Die rekombinante Bacmid-DNA wird mit dem Plasmid-Purification-Kit der Firma Qiagen aus den DH10-BAC-Zellen präpariert. Dafür werden einzelne weiße Klone in 2 ml LB-Kan/Gent/Tetracyclin-Medium bis zur Sättigung angezogen. Die Bacmid-DNA-Präparation entspricht weitgehend der in 6.1.1 beschriebenen Plasmid-DNA-Präparation. Abweichend von 6.1.1 wird nach Zugabe von 450 µl 2-Propanol das Reaktionsgefäß nicht gevortext, sondern lediglich geschwenkt, da die wesentlich größere und damit labilere Bacmid-DNA durch die entstehenden Scherkräfte sonst brechen könnte. 5 µl der isolierten Bacmid-DNA werden auf einem 0,5%igen Agarose-Gel bei 20 V elektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und quantifiziert, wobei *Hind* III verdaute λ-DNA als Größenstandard dient.

Weiterhin kann mit einer Standard-PCR überprüft werden, ob das zu untersuchende UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Gen in der Bacmid-DNA enthalten ist, d.h. die Transfektion erfolgreich war. Die PCR wird mit dem Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt (6.1.11).

Als Primer werden die entgegengesetzten Oligonukleotide Bac1 und Bac2rc verwendet, die Homologien zu Sequenzen etwa 60 bp außerhalb der kodierenden UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Sequenz zeigen.

6.2.3 Generierung von rekombinantem Virus

Zur Generierung von rekombinanten Viruspartikeln werden Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter Bacmid-DNA transfiziert. Hierzu werden pro Well einer 6-Well-Platte 9×10^5 Sf9-Insektenzellen in 2 ml Grace's-Medium ausgesät und für mindestens 1 h bei 27°C inkubiert, damit die Zellen adhärieren können. Währenddessen werden 5 µl Bacmid-DNA 6 µl Cellfectin (Invitrogen, Niederlande) in je 100 µl Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gelöst. Nachdem die Cellfectin-Lösung gut gevortext wurde, werden beide Lösungen zusammengegeben und vorsichtig gemischt. Zur Bildung von DNA-Lipid-Komplexen wird der

Transfektionsmix für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend werden zu jedem Transfektionsmix 800 µl Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gegeben und gut gemischt, jedoch wegen der labilen Bacmid-DNA nicht gevortext. Nachdem die adhärennten Sf9-Zellen pro Well mit 2 ml Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gewaschen wurden, werden die Zellen vorsichtig mit dem Transfektionsmix überschichtet und für mindestens 5 h bei 27°C inkubiert. Nach der Inkubation wird der Transfektionsmix abgenommen; die Zellen werden mit 2 ml Grace's-Medium überschichtet und weiter bei 27°C inkubiert. Nach 5 Tagen wird der Medienüberstand, in dem sich rekombinante Viruspartikel befinden, abgenommen und für weitere Experimente bei 4°C gelagert.

6.2.4 Amplifikation von Virus

Da für die Expressionsversuche Viren in größeren Mengen benötigt werden, müssen diese vorerst amplifiziert werden. Dafür werden 30 ml Sf9-Insektzellensuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 500 µl Transfektionsüberstand infiziert und für 5 Tage bei 27°C als Schüttelkultur gehalten. Durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und $1000 \times g$ werden die Insektzellen pelletiert. Der virushaltige Medienüberstand wird abgenommen (= Urstock) und bei 4°C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation von Virus werden 200 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 3 ml Urstock infiziert und bei 27°C kultiviert. Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und $1000 \times g$ geerntet (= Erststock) und bei 4°C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation von Virus werden Sf9-Zellsuspensionen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit Erststock-Virus bei einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,1 infiziert und bei 27°C geschüttelt. Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch 5-minütige Zentrifugation bei RT und $1000 \times g$ geerntet (= Gebrauchsstock) und bei 4°C gelagert. Sämtliche Infektionen werden mit Gebrauchsstock-Viren durchgeführt.

6.2.5 Bestimmung des Virus-Titers

Zur Optimierung und Standardisierung der Proteinexpression (6.2.6) muss zuvor die Anzahl infektiöser Viren, der Virus-Titer, mittels eines Plaque-Assays ermittelt werden. Dafür werden in einer 6-Well-Platte (Falcon, USA) in 3 ml Grace's-Medium $1,5 \times 10^6$ Sf9-Insektzellen pro Well ausgesät und für mindestens 1 h bei 27°C inkubiert, damit die Zellen adhärennten können. Währenddessen wird eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-7} des zu untersuchenden Virus in Grace's-Medium angesetzt. Nachdem der Medienüberstand der adhärennten Sf9-Zellen abgenommen wurde, werden die Zellen mit jeweils 500 µl der Virusverdünnung 10^{-3} bis 10^{-7} vorsichtig überschichtet. Als Kontrolle werden die Zellen in einem Well nur mit 500 µl Grace's-Medium überschichtet. Die Zellen werden unter leichtem Schwenken für 2 h bei RT inkubiert. Währenddessen werden pro 6-Well-Platte 14 ml Grace's-Medium auf 45°C vorgewärmt und 7 ml 3%ige sterile SeaPlaque-Agarose (Biozym) aufgekocht und anschließend auch bei 45°C gehalten.

Nach 2 h Inkubation wird der Virusüberstand vorsichtig abgenommen. 14 ml vorgewärmtes Medium werden mit den 7 ml 3% Agarose gut gemischt. Anschließend werden die Zellen pro Well mit jeweils 3 ml der jetzt 1%igen Agaroselösung vorsichtig überschichtet. Um ein Austrocknen zu verhindern, wird nach dem Erstarren der Agarose jedes Well mit je 1 ml Medium überschichtet. Nach 5-tägiger Inkubation bei 27°C wird der Medienüberstand abgesaugt und in jedes Well 200 µl MTT (Thiazolyl blue)-Lösung (5 mg/ml in aqua bidest.;

sterilfiltriert) gegeben. Nach weiteren 2 h bei 27°C werden die farblosen Plaques pro Well ausgezählt. Der Virustiter in pfu/ml berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Virus - Titer} = \frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times (\text{Infektionsvolumen pro well in ml})}$$

6.2.6 Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Gemäß den ermittelten Bedingungen einer optimalen Expression erfolgt die Infektion der Insektenzellen. Konkret werden diese bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit rekombinantem Baculovirus bei einer MOI von 1 infiziert und unter Schütteln bei 27°C inkubiert. Nach 48 h werden die Insektenzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei $700 \times g$ und RT pelletiert. Das Zellpellet wird in 1 ml Lysepuffer pro 10 ml Insektenzellsuspensionskultur resuspendiert und mittels Hochdruck-Zellaufschlussgerät bei einem Druck von 0,5 kbar aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden anschließend bei $20000 \times g$ und 4°C für 30 min pelletiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

6.2.7 Virus-Klonierung

Analog zum Plaque-Assay (6.2.5) werden bei der Virus-Klonierung Sf9-Insektenzellen in 6-Well-Platten mit verschiedenen Virus-Konzentrationen infiziert und für 5 Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend werden einzelne Virus-Plaques ausgestochen und zur Infektion neuer Sf9-Zellen in 6-Well-Platten eingesetzt. Die Amplifikation des klonierten Virus' erfolgt wie in 6.2.4 beschrieben.

6.3 Expression von rekombinanten Protein in *E. coli*

Die Überexpression von rekombinantem Protein in *E. coli* erfolgt nach Anweisungen des Herstellers des Expressionsvektors pGEX-4T. Sämtliche Überexpressionen werden mit dem Bakterienstamm BL21 StarTM(DE3) pLysS (Invitrogen) durchgeführt.

6.3.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Zunächst werden die konstruierten Vektoren wie unter 6.1.10 beschrieben in BL21 StarTM(DE3) pLysS Bakterienzellen transformiert, auf LB-Ampicillin/Chloramphenicol-Selektionsmediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine Pilotexpression werden zur Ermittlung der Klone mit der höchsten Expressionsrate einzelne Kolonien in 2 ml LB-Amp-Medium bis zur Sättigung bei 37°C kultiviert. Mit 150 µl dieser Vorkulturen werden jeweils 15 ml LB-Amp-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C kultiviert. Durch Zugabe von 0,3 mM IPTG wird die Proteinexpression induziert. Nach 2 h werden die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 5 min bei $3000 \times g$ und 4°C pelletiert. Die Zellen werden zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die gefrorenen Zellpellets werden in 200 µl Lysepuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Suspensionen werden zur Lyse der Zellen 6-mal alternierend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend auf 37°C

erwärmt. Nach dem Frier-Tau-Zyklus werden Zelltrümmer und unlösliche Komponenten bei $20000 \times g$ und 4°C für 30 min pelletiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Pellet wird in $200 \mu\text{l}$ Lysepuffer resuspendiert und den gleichen Analysen unterzogen.

Zur weiteren Optimierung der Expressionsbedingungen werden mit dem Klon, welches die höchste Expressionsrate an rekombinantem Protein aufweist, Pilotexpressionen durchgeführt, bei denen die Expressionsdauer (3-20 h) und die Inkubationstemperatur (16°C , 25°C , 37°C) variiert werden.

6.3.2 Expression von rekombinantem Protein in *E. coli* im Litermaßstab

Für die Proteinexpression im großen Maßstab werden die in der Pilotexpression bestimmten optimalen Bedingungen und Zeiten verwendet. Für die Expression werden meist Ansätze von 4-8 l gewählt. Dazu werden 200 ml-Kulturen über Nacht in SOB-Medium mit Ampicillin ($50 \mu\text{g/ml}$) und Chloramphenicol ($35 \mu\text{g/ml}$) angezogen und am nächsten Tag mit LB-Medium auf 4 bzw. 8 l erweitert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 werden die Kulturen mit IPTG (Endkonzentration $0,3 \text{ mM}$) induziert und 4 h bei 37°C bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien bei $3000 \times g$ für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellpellets werden bei -20°C gelagert oder nach Resuspension in 20 bzw. 40 ml Lysepuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF / 1 U DNase I) in einer Hochdruck-Zellaufschlussgerät bei einem Druck von 1 kbar lysiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei $20000 \times g$ und 4°C wird der cytosolische Überstand für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

6.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

6.4.1 Proteinbestimmung

6.4.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Reaktion von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 mit Proteinen bilden sich Komplexe mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm (Bradford, 1976). Bei Extinktionswerten unter 0,5 besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Proteinkonzentration in der Lösung.

$10 \mu\text{l}$ Proteinlösung werden mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (v/v) Ethanol / 5% (v/v) Phosphorsäure / 0,1% (w/v) Coomassie R-250) versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Als Proteinstandard dient Rinderserumalbumin.

6.4.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration kann auch durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm gemessen werden (Pace *et al.*, 1995). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ (280 nm) des jeweiligen Proteins wird mittels der Gleichung ϵ (280) [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] = Anzahl der Tryptophane \times 5500 + Anzahl der Tyrosine \times 1490 + Anzahl der Cysteine \times 125 bestimmt.

6.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen werden zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt. Dabei lagert sich das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese denaturieren und eine stark negative Ladung eingeführt wird. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist die Beweglichkeit der Proteine dann umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte.

Die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird nach der Methode von Laemmli (1970) mit dem Mini-Protean II System der Firma Biorad durchgeführt. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird ein System aus zwei Gelen, einem Trenn- und einem Sammelgel, verwendet. Analog zu DNA-Agarosegelen bestimmt der Acrylamidanteil im Trenngel die Porengröße und somit auch die Trenneigenschaften des Gels, so eignen sich höher konzentrierte Trenngele für kleine Proteine und umgekehrt. Als Trenngele werden 7,5%-, 10%- und 11,5%ige Acrylamid-Minigele verwendet. Für die SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Proben mit einem Viertel Volumenanteil 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgt bei der konstanten Spannung von 150 V.

Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 60–120 V. Als Größenstandard dient der Molekulargewichtsmarker „High-Molekular-Weight“-Marker (Sigma, Deutschland) oder der „Prestained SDS-Molekular Weight Standard Mixture“ (Sigma, Deutschland).

Lösung A:	30% Acrylamid (w/v) 0,8% N, N'-Methylenbisacrylamid
Lösung B:	0,4% SDS (w/v) 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Lösung C:	0,4% SDS (w/v) 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 192 mM Glycin 0,1% SDS (w/v)
5 × Probenpuffer:	0,3 M Tris-HCl, pH 6,8 50% Glycerin (v/v) 15% SDS (w/v) 0,015% Bromphenolblau (w/v) 10 mM DTT (nur bei reduzierendem Probenpuffer)

Ansatz für 7,5%ige Trenngele: 2,25 ml Lösung A
2,25 ml Lösung B
4,50 ml aqua bidest
50 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
12 µl Tetramethyldiamin

Für 10%- bzw. 11,5%ige Trenngele werden statt 2,25 ml Lösung A 3 ml bzw. 3,45 ml und statt 4,5 ml aqua bidest 3,75 ml bzw. 3,3 ml in den Ansatz gegeben.

Ansatz für 4%ige Sammelgele: 0,40 ml Lösung A
0,75 ml Lösung C
1,85 ml aqua bidest
12 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
3 µl Tetramethyldiamin

Nach Auslaufen der Färbelösung wird die Elektrophorese gestoppt und das Gel ausgebaut. Im nächsten Schritt kann das Gel angefärbt (6.4.3/6.4.4) oder geblottet werden.

6.4.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteinmengen von 0,5 µg oder mehr können in Gelen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 angefärbt werden, wobei der Farbstoff mit den Proteinen unter Komplexbildung reagiert. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für mindestens 1 h bei RT in Färbelösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,1% (w/v) Serva-Blue G) geschüttelt. Das gefärbte Gel wird anschließend 3-mal in Entfärbelösung (5% (v/v) Ethanol / 7,5% (v/v) Essigsäure) für jeweils 1 h bei RT geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt sind.

6.4.4 Silberfärbung von Proteingelen

Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine Komplexe, in denen durch alkalisches Formaldehyd Ag^+ zu Ag reduziert wird. Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Färbung eine wesentlich empfindlichere Methode zur Detektion von geringen Proteinmengen. Die untere Grenze liegt bei 10 ng pro Bande. Sie wird nach Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für 20 min bei RT in Fixierlösung (40% (v/v) Methanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,05% (v/v) Formaldehyd) geschüttelt. Anschließend wird 3-mal für 5 min mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Im nächsten Schritt wird 1 min in Lösung A (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) unter leichtem Schwenken inkubiert, dreimal 20 sec in aqua bidest gewaschen, 12 min in Lösung B (0,16% (w/v) Silbernitrat / 0,08% (v/v) Formaldehyd) inkubiert und erneut 3-mal 20 sec mit aqua bidest gewaschen. Die Färbung erfolgt nach Sichtkontrolle in Lösung C (5% (w/v) Natriumcarbonat / 0,0005% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ / 0,05% Formaldehyd) für 1-5 min. Zum Stoppen der Färbereaktion wird Lösung C verworfen und Fixierlösung hinzugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation in der Fixierlösung wird das Gel bis zum Trocknen in Wasser gelagert.

6.4.5 UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays

Die Aktivität der UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird in der Regel mit dem colorimetrischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay bestimmt. Bei sehr geringer Aktivität (z.B. Organpräparationen) wird der wesentlich empfindlichere radiometrische UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay verwandt.

6.4.5.1 Radiometrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay

100 µl Probe/Wasser werden mit 45 µl 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 45 µl 50 mM MgCl_2 , 2,5 µl 100 mM UDP-GlcNAc und 12,5 nCi UDP-[^{14}C]-GlcNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 350 µl Ethanol abgestoppt, wodurch die Proteine denaturiert werden. Das entstandene ^{14}C -ManNAc lässt sich durch absteigende Papierchromatographie von UDP-[^{14}C]-GlcNAc trennen. Dazu

werden die Proben auf $2 \times 48 \text{ cm}^2$ große 3MMChr-Chromatographiestreifen (Whatman, Dassel, Deutschland) aufgetragen. Die Chromatographie wird für 16–20 h mit 70% (v/v) 1-Propanol / 100 mM Natriumacetat, pH 5,0 durchgeführt. Die getrockneten Chromatographiestreifen werden anschließend in 2,5 cm lange Stücke geschnitten und die Radioaktivität mit 5 ml Ultima Gold XR (Packard, Niederlande) in einem Tri-Carb 1900 CA Flüssigszintillationszähler (Packard, Niederlande) bestimmt. Der R_f -Wert für UDP-GlcNAc und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,08 bzw. 0,55.

6.4.5.2 Colorimetrischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay

100 μl Probe/Wasser werden mit 45 μl 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 45 μl 50 mM MgCl_2 und 2,5 μl 100 mM UDP-GlcNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch eine 1-minütige Inkubation bei 100°C gestoppt. Das entstandene ManNAc wird mit dem Morgan-Elson-Test (Reissig *et al.*, 1955), mit dem spezifisch *N*-Acetylhexosamine detektiert werden, nachgewiesen. Die durch Hitze denaturierten Proteine werden aus dem Enzymreaktionsansatz durch Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 1 min pelletiert. 150 μl des Überstandes werden mit 30 μl 0,8 M H_2BO_3 -Puffer, pH 9,1 (mit KOH eingestellt) gemischt und für 3 min bei 100°C inkubiert. Anschließend werden 800 μl Farbreagenz (1% (w/v) 4-Dimethylaminobenzaldehyd und 1,25% (v/v) 10 M HCl in Essigsäure) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wird bei 578 nm gegen eine Leerprobe, d.h. einen Ansatz ohne UDP-GlcNAc-2-Epimerase gemessen.

6.4.5.3 Gekoppelt optischer UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay

Eine Modifikation des colorimetrischen UDP-GlcNAc-2-Epimerase Assays ermöglicht zeitabhängige Aktivitätsmessungen, die bei Messungen von Enzymkinetiken benötigt werden. In dem gekoppelt optischen Epimerase-Assay werden unterschiedliche Probenvolumina mit 260 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 10 μl 100 mM UDP-GlcNAc, 40 μl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 20 μl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μl Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehydrogenase in einem Gesamtvolumen von 800 μl gemischt. Die Enzymreaktion wird bei 37°C im Photometer bei 340 nm verfolgt.

6.4.6 ManNAc-Kinase Assays

Die ManNAc-Kinase-Aktivität wird mit Hilfe des sehr empfindlichen radiometrischen oder mittels eines gekoppelt optischen Assays ermittelt werden.

6.4.6.1 Gekoppelt optischer ManNAc-Kinase-Assay

80 μl Probe/Wasser werden mit 65 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 20 μl 100 mM ATP, pH 7,5, 10 μl 100 mM ManNAc, 10 μl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 10 μl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μl Lactat-Dehydrogenase/Pyruvat-Kinase gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wird die Enzymreaktion mit 800 μl 10 mM EDTA, pH 7,5. Die Extintion der Proben wird bei 340 nm gegen Wasser gemessen. Als Kontrollen dienen Ansätze ohne ManNAc-Kinase.

Für eine zeitabhängige Aktivitätsmessung wird der Assay modifiziert, indem unterschiedliche Probenvolumina mit 260 μl 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl_2 , 80 μl 100 mM ATP, pH 7,5, 40 μl 100 mM ManNAc, 40 μl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 20 μl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 μl Pyruvat-Kinase/Lactat-Dehydrogenase in

einem Gesamtvolumen von 800 μ l gemischt. Die Enzymreaktion wird bei 37°C im Photometer bei 340 nm verfolgt.

6.4.6.2 Radioaktiver ManNAc-Kinase-Assay:

Analog zum radioaktiven UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay (6.4.5.3) werden beim radioaktiven ManNAc-Kinase-Assay 100 μ l Probe bzw. Wasser mit 65 μ l 200 mM Tris-HCl, pH 8,1 / 65 mM MgCl₂, 40 μ l 100 mM ATP, pH 7,5, 10 μ l 100 mM ManNAc und 50 nCi ¹⁴C-ManNAc gemischt und in der Regel für 30 min bei 37°C inkubiert. Die papierchromatographische Trennung des Eduktes ¹⁴C-ManNAc und des Produktes ¹⁴C-ManNAc-6-Phosphat erfolgt zu den in 6.4.7.3 beschriebenen Bedingungen. Der R_F-Wert für ManNAc-6-Phosphat und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,17 bzw. 0,55.

6.5 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ohne Fusionsteil

Proteine haben charakteristische strukturelle, biophysikalische und biochemische Eigenschaften, die zu ihrer Reinigung u.a. mittels verschiedener Chromatographiemethoden ausgenutzt werden können. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chromatographien an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) durchgeführt. Alle Puffer wurden filtriert, entgast und mit Helium begast.

6.5.1 Salminsulfatpräzipitation

Biomoleküle können durch das polykationische Salminsulfat gefällt werden (Green und Huges, 1955). Zur Reinigung von UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aus einem Proteingemisch wird dabei genutzt, dass UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase in einer 0,2% (w/v) Salminsulfat mit einigen anderen Proteinen ausfällt, während wiederum andere Proteine noch in gelöster Form vorliegen.

Eine frisch angesetzte Stammlösung von 2% (w/v) Salminsulfat wird mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die gepoolten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden unter Rühren auf Eis langsam durch Zutropfen der 2%igen Salminsulfat-Stammlösung auf 0,2% (v/v) Salminsulfat eingestellt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10000 \times g wird die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP unter Rühren extrahiert. Die Lösung wird für 10 min bei 4°C und 20000 \times g zentrifugiert und der Überstand für die weitere chromatographische Auftrennung eingesetzt.

6.5.2 MonoQ-Chromatographie

Die Ionenaustauscherchromatographie separiert Proteine nach ihren Ladungsunterschieden, wobei Anzahl und Verteilung geladener Aminosäuren bei einem bestimmten pH-Wert für jedes Protein ein Charakteristikum sind. Bei einer MonoQ-Chromatographie basiert die Trennung verschiedener Proteine auf einer reversiblen Interaktion zwischen den negativ

geladenen Aminosäureresten der Proteine und der positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen der Säulenmatrix.

Als Auftrag für die MonoQ-Säule HR 5/5 (Amersham Biosciences) dient der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die gepoolten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (Puffer A) äquilibriert. Zum Entfernen von nicht-bindenden Proteinen wird die Säule mit 20 ml Puffer A gewaschen. Eluiert werden die gebundenen Proteine anschließend mit 10 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 30% (v/v) 600 mM NaCl in Puffer A, 20 ml eines linearen Gradienten von 30% bis 50% (v/v) 600 mM NaCl in Puffer A, 2 ml eines linearen Gradienten von 50% bis 100% (v/v) 600 mM NaCl in Puffer A und 3 ml isokratisch 100% (v/v) 600 mM NaCl in Puffer A. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min werden 1 ml-Fractionen gesammelt.

Zur Reinigung von ManNAc-Kinase (6.7) mittels der MonoQ-Chromatographie sind Puffer A und Gradient zur oben beschriebenen Methode leicht modifiziert worden: Puffer A besteht aus 50 mM Tris/HCl pH7,5 / 50 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT, Puffer B aus 50 mM Tris/HCl pH7,5 / 600 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT. Eluiert werden die bindenden Proteine anschließend mit 10 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 600 mM NaCl in Puffer A.

6.5.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Die Trennung von Proteinen mittels der Hydroxylapatit-Chromatographie basiert auf Wechselwirkungen zwischen der ionische Gruppen von Proteinen und den Calcium- und Phosphatgruppen der Hydroxylapatit-Säulenmatrix. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die gepoolten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine Hydroxylapatit-Säule (16 mm × 13 cm CHT Ceramic Hydroxyapatite; BioRad, Deutschland) aufgetragen, nachdem der pH-Wert der Proben durch Verdünnen mit 2 Volumina Puffer A (s.u.) und 1/6 Volumen 200 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 auf pH 7,0 gesenkt wurde. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (Puffer A) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 30 ml Puffer A eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 15 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 10% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in Puffer A, 10 ml isokratisch 10% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in Puffer A, 85 ml eines linearen Gradienten von 10% bis 40% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in Puffer A, 5 ml eines linearen Gradienten von 40% bis 100% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in Puffer A gefolgt von 20 ml isokratisch 100% (v/v) 200 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in Puffer A, eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min werden 2 ml-Fractionen gesammelt.

6.5.4 ATP-, ADP-, UDP-Agarose, Blue- und Red-Sepharose

Eine weitere Methode zur Reinigung von Proteinen basiert auf der Affinitätschromatographie, so auch die ATP-, ADP-, und UDP-Agarose- sowie die Blue- und Red-Sepharose-Chromatographie, bei der sich Nukleotid-bindende Proteine durch ihre hohe Affinität zur Säulenmatrix von anderen Proteinen trennen lassen.

Partiell gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird auf eine ATP-Agarose-Säule (16 mm × 10 cm ATP-Agarose 4 B; Sigma, Deutschland; 7 mm × 1 cm ATP-Agarose

2767, 9264 und 4793; Invitrogen), ADP-Agarose (7 mm × 1 cm; Invitrogen), UDP-Agarose (7 mm × 1 cm; Invitrogen) bzw. auf eine Blue oder Red-Sepharose (16 mm × 2,5 cm Blue-Sepharose CL-6B; Sigma, Deutschland; 16 mm × 2,5 cm Red-Sepharose CL-6B; Amersham Biosciences) gegeben, die zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl (Puffer A) äquilibriert wurde. Nicht bindende Proteine werden mit 20 ml Puffer A eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 25 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 10 mM ATP, pH 7,5 in Puffer A gefolgt von 20 ml isokratisch 100% (v/v) 10 mM ATP, ADP bzw. UDP, pH 7,5 in Puffer A eluiert. Alternativ können die gebundenen Proteine auch mit 25 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 100% (v/v) 3 M NaCl in Puffer A eluiert werden. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min werden 2 ml-Fractionen gesammelt.

6.5.5 Phenylsepharose

Die Phenylsepharose-Chromatographie nutzt zur Proteintrennung die unterschiedliche Hydrophobizität verschiedener Proteine. Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die gepoolten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf eine Phenylsepharose-Säule (16 mm × 13 cm Phenyl Sepharose High Performance; Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 0,1 mM UDP (Puffer A) äquilibriert. Nicht bindende Proteine werden mit 50 ml Puffer A eluiert. Bindende Proteine werden anschließend mit 60 ml eines linearen Gradienten von 0% bis 70% (v/v) Ethylenglycol in Puffer A gefolgt von 20 ml isokratisch 70% (v/v) Ethylenglycol in Puffer A eluiert. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 2 ml/min werden 8 ml-Fractionen gesammelt.

6.5.6 Gelfiltration

Mit der Gelfiltration können Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Eine solche Trennung erfolgt über eine Superdex[®]200-Säule HR 10/30 (Amersham Biosciences), eine 16 × mm × 30 cm Sephacryl[™] S-300-Säule (Amersham Biosciences) oder eine HighLoad[®]16/60-Säule (Amersham Biosciences). Der proteinhaltige Überstand nach dem Aufbrechen der Zellen und anschließender Zentrifugation oder die gepoolten UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase aktiven Fraktionen vorausgegangener Chromatographien werden auf die entsprechende Säule aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit Gelfiltrationspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl / 0,1 mM UDP) äquilibriert. Die Proteine werden bei der Superdex[®]200-Säule mit 30 ml, bei den beiden anderen mit 90 ml Gelfiltrationspuffer bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert. Fractionen von je 0,5 ml bzw. 1 ml werden während der Chromatographie gesammelt.

PD10-Gelfiltrationssäule

Mit der PD10-Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) können Proteinlösungen schnell umgepuffert werden, um störende Salze abzutrennen. Die Proteinlösung wird zunächst auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte PD10-Säule gegeben und anschließend mit 5 ml des gleichen Puffers eluiert. Fractionen von je 5 Tropfen werden während der Chromatographie gesammelt.

6.6 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit N-bzw. C-terminalen Strep II-Fusionsteil

Je mehr über die biophysikalischen und biochemischen Charakteristika eines Proteins bekannt ist, desto leichter ist seine Reinigung. Durch einen Fusionsteil am zu untersuchenden Protein können neue Eigenschaften vorgegeben werden, welche die Reinigung von rekombinantem Protein wesentlich vereinfachen. So wird die in Insektenzellen rekombinant exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase u.a. mit einem N- bzw. C-terminalen Strep II-Fusionsteil exprimiert.

6.6.1 StrepTaktin-Chromatographie

Die rekombinant mit N- bzw. C-terminalem StrepII-Tag exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kann über eine StrepTaktin-Säule gereinigt werden. Nachdem die Zellen aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C) pelletiert wurden, wird der proteinhaltige Überstand auf eine 1 ml-StrepTaktin-Sepharose-Säule (IBA, Göttingen, Deutschland) gegeben, welche zuvor mit 2 ml Strep-Waschpuffer äquilibriert wurde, und für 1 h schüttelnd bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss werden nicht-bindende Proteine mit 10 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0 / 150 mM NaCl / 1 mM EDTA) eluiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird anschließend mit 3 ml Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,0 / 150 mM NaCl / 1 mM EDTA / 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Fraktionen zu je 5 Tropfen werden gesammelt. Die StrepII-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft. Fraktionen, die rGNE-Strep-Fusionsprotein enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe einer PD10-Gelfiltrationssäule (6.5.7) in Gelfiltrationspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl / 0,1 mM UDP) überführt.

6.7 Reinigung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase mit N-terminalem His₆-Fusionsteil

6.7.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit N-terminalem His-Tag exprimierte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase kann über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt werden. Nachdem die Zellen aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C) pelletiert wurden, wird der proteinhaltige Überstand auf 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gegeben, welche zuvor mit 8 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol (Ni-NTA-Waschpuffer) äquilibriert wurde, und für 1 h schüttelnd bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss werden nicht bindende Proteine mit 10 ml Ni-NTA-Waschpuffer eluiert. Die UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wird anschließend mit 3 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 / 300 mM NaCl / 100 mM Imidazol eluiert. Fraktionen zu je 3 Tropfen werden gesammelt. Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft.

6.8 Reinigung von Proteinen mit N-terminalen GST-Tag

6.8.1 Glutathion-Affinitätschromatographie

Rekombinant exprimiertes Protein mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) kann über eine Glutathion-Sepharose 4B-Säule (Amersham Biosciences) gereinigt werden. Dazu werden die gefrorenen Bakterienpellets einer 4l-Kultur in 40 ml PBS mit 50 mM MgCl₂, 1 mM PMSF und 8 U Dnase resuspendiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Hochdruck-Zellaufschlussgerät bei einem Druck von 0,9 kbar aufgeschlossen und bei 20000 × g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Währenddessen wird eine Glutathion-Sepharose 4B-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml mit 10 ml PBS äquilibriert. Mit dem Überstand der Zentrifugation wird die Säule für 1 h schwenkend bei 4°C inkubiert, anschließend wird die Säule mit 10 ml PBS gewaschen. Nicht bindende Proteine werden mit 10 ml PBS eluiert. Für den Verdau außerhalb der Säule wird die GST-Fusionsprotein mit 5 ml Elutionspuffer (10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) eluiert. Fraktionen zu je 5 Tropfen werden gesammelt. Die Glutathion-Affinitätschromatographie wird nicht an der FPLC-Anlage durchgeführt, sondern nur mittels Gravitationskraft. Nach Elution des GST-Fusionsproteins wird die Glutathion-Sepharose mit 5 ml 6 M Guanidiniumhydrochlorid in Wasser regeneriert und anschließend mit 10 ml PBS äquilibriert.

6.8.2 Abspaltung des GST-Fusionsteils

Der GST-Tag von GST-Fusionsproteinen lässt sich durch die Endopeptidase Thrombin abspalten. Dabei kann der Verdau sowohl direkt an der Säule (On-Column-Cleavage) als auch nach der Elution (Off-Column-Cleavage) durchgeführt werden.

6.8.2.1 On-Column-Cleavage

Das an der Glutathion-Sepharose-4B-Säule gebundene GST-Fusionsprotein wird auf der Säule mit 100 U Thrombin-Protease (Amersham Biosciences) in 1 ml PBS gelöst und über Nacht bei RT gespalten. Eluiert wird das daraufhin GST-freie Protein mit 10 ml PBS, während das abgespaltene GST nach dem Thrombin-Verdau an der Säule gebunden bleibt. Das Protein enthaltene Fraktionen werden vereinigt und im Verhältnis 2:1 mit Wasser verdünnt. Die Probe dient anschließend als Auftrag für die MonoQ-Säule, bei der die nicht an MonoQ-Säule bindende Thrombin-Protease von dem Zielprotein getrennt wird (6.5.2). Die ManNAc-Kinase enthaltenen Fraktionen werden vereinigt und über eine Gelfiltrationssäule gegeben, vorzugsweise die HighLoad 16/60-Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences), wodurch letzte Verunreinigungen von dem Protein getrennt werden.

6.8.2.2 Off-Column-Cleavage

Nach der Reinigung über die GST-Säule werden zu je 1 mg eluiertem Fusionsprotein 10 U Thrombin-Protease (Amersham Biosciences) zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Probe wird mittels einer PD10-Säule in PBS umgepuffert und für 1 h schwenkend auf einer mit PBS äquilibrierten GST-Säule (1 ml) inkubiert, um freies GST abzufangen. Der Durchlauf wird im Verhältnis 2:1 mit Wasser verdünnt und dient als Auftrag für die anschließende MonoQ-Säule (6.5.2).

6.9 Reinigung von Proteinen mit N-terminalen MBP-Tag

Ein rekombinant exprimiertes Protein mit N-terminalen MBP-Tag (Maltose-Binding-Protein) wird über eine Amylose-Säule gereinigt. Dazu wird zunächst analog zu 6.8.1 das Cytosol einer 4 l-Bakterienkultur, die das MBP-Fusionsprotein exprimiert, präpariert. Anschließend wird das Cytosol mit einer 1 ml-Amylosesäule, die zuvor mit 5 ml MBP-Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4 / 200 mM NaCl / 10 mM DTT / 1 mM EDTA) äquillibriert wurde, für 1 h bei 4°C schwenkend inkubiert. Nicht-bindende Proteine werden mit 10 ml MBP-Waschpuffer eluiert. Das MBP-Fusionsprotein wird mit 5 ml MBP-Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4 / 200 mM NaCl / 10 mM DTT / 1 mM EDTA / 10 mM Maltose) eluiert. Regeneriert wird die Säule durch Auftragen von 3 ml aqua dest., 3 ml 0,1 % SDS, 1 ml aqua dest. und 3 ml MBP-Waschpuffer.

6.10 Biophysikalische Methoden

6.10.1 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine anhand ihrer Stokes-Radii getrennt. Der Stokes-Radius beinhaltet neben dem durchschnittlichen Radius des Proteins auch die Dicke der Hydrathülle, die das Protein umgibt. Kennt man das umgebende Milieu, d.h. den Puffer, kann anhand des Stokes-Radius das Molekulargewicht und damit der oligomere Zustand des Proteins ermittelt werden.

Die oligomeren Strukturen von überexprimierten Proteinen werden bestimmt, indem partiell oder komplett gereinigtes Protein, gelöst in einem Volumen von 200–500 µl, auf eine Superdex 200- oder eine HighLoad-16/60-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen wird. Als Elutionspuffer dient Gelfiltrationspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl). Die bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gesammelten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE analysiert und, wie unter 6.4.7 bzw. 6.4.8 beschrieben, auf UDP-GlcNAc-2-Epimerase- und/oder ManNAc-Kinase-Aktivität untersucht. Als Gelfiltrationsstandard dient ein Gemisch aus Proteinen mit unterschiedlichen Molekularmassen (BioRad).

6.10.2 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Die analytische Ultrazentrifugation untersucht die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte und ist die einzige Technik, mit der akkurat das native Molekulargewicht eines Proteins bestimmt werden kann. Des Weiteren erlaubt es bei dynamischen Gleichgewichtssystemen, z.B. bei der Assemblierung eines Proteinkomplexes, Aussagen über den Sedimentations- und den Assoziationskoeffizienten s bzw. K_A . Die Zentrifuge muss dazu mit einem optischen System ausgestattet sein, das es erlaubt, während der Zentrifugation Messungen der lokalen Makromolekülkonzentration in der Probe durchzuführen. Man unterscheidet zwischen zwei Typen von analytischen Ultrazentrifugen-Experimenten, Sedimentationgeschwindigkeitsläufe und Sedimentationsgleichgewichtläufe.

Alle Experimente werden in der analytischen Ultrazentrifuge BeckmannCoulter XI-I (USA) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationsverteilung kann wegen der Zugabe von Nukleotidzuckern nicht bei 280 nm detektiert werden, sondern wird mittels der

Interferenzoptik der analytischen Ultrazentrifuge erfasst. Zur Sicherstellung, dass alle Experimente bei 4°C verlaufen, wird der 4-Kammer Rotor mit den entsprechenden Sektorzellen vorgekühlt. Die Proteinlösung wird bei 4°C und $10000 \times g$ für 10 min zentrifugiert, um große Aggregate und Partikel zu entfernen. Anschließend wird die rGNE-Probe auf gewünschte Konzentrationen verdünnt. Die Dichte und Viskosität der Puffers (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT) und das partialspezifische Volumen \bar{v} von GNE werden mit Hilfe der Software SEDNTERP berechnet. Alle genutzten Programme sind unter <http://www.bbri.org/RASMB/rasmb.html> frei zugänglich.

6.10.2.1 Sedimentationsgeschwindigkeitslauf

Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird die Geschwindigkeit u bestimmt, mit der sich Makromoleküle einer Spezies unter dem Einfluss von Zentrifugal-, Auftriebs- und Reibungskraft durch die Lösung bewegen. Nach Start der Zentrifugation bildet sich nahe des Meniskus' eine scharfe nach unten bewegende Front zwischen proteinfreier Lösung oberhalb und einer einheitlich konzentrierten, sedimentierenden Proteinlösung unterhalb. Ein Gemisch aus verschieden großen, nicht interagierenden Subpopulationen würde in mehreren Fronten sedimentieren. Der Quotient aus der Wanderungsgeschwindigkeit u des makroskopisch messbaren Konzentrationssprungs bzw. -gradienten und $\omega^2 \times r$ (ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors; r : Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum) bezeichnet man als Sedimentationskoeffizienten s , der in Svedberg-Einheiten angegeben wird.

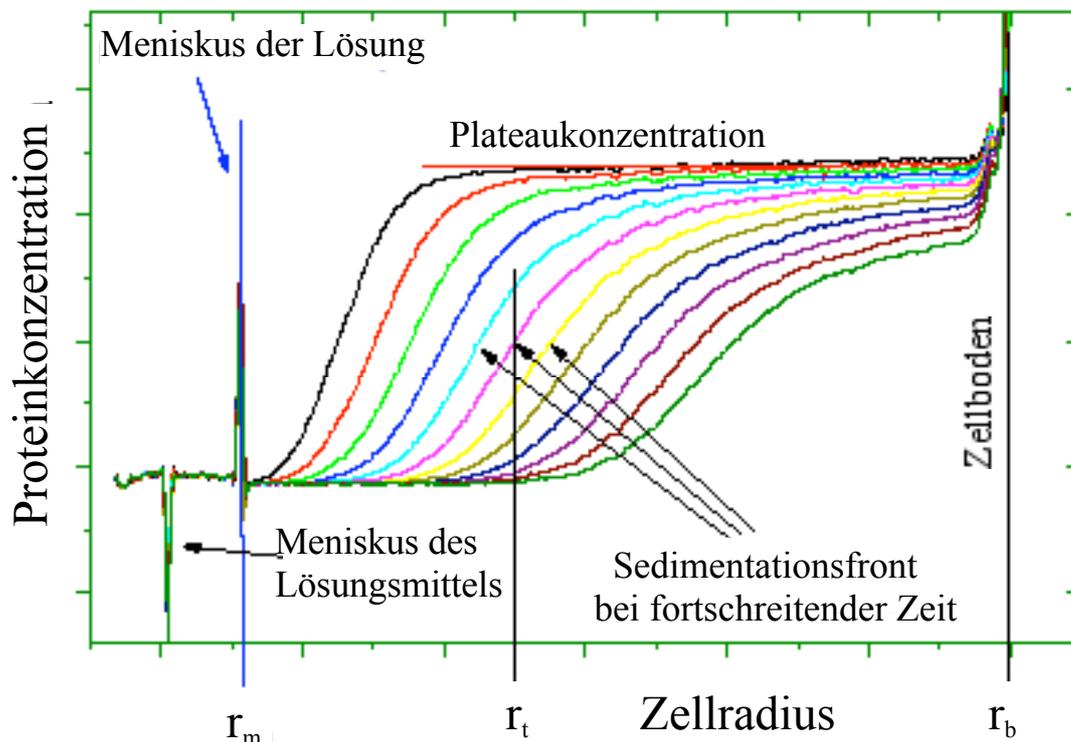


Abbildung 6.1: Zeitlicher Verlauf eines Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiments mit einer monodispersen Lösung. Abgebildet sind 12 chronologische Konzentrationsmessungen innerhalb einer Messzelle. Die Position, in der die halbe Plateaukonzentration erreicht ist, bezeichnet man als die Sedimentationsfront (r_t gilt für pinke Kurve).

Je 420 μl der GNE-Lösung werden mit bzw. ohne Nukleotidzucker (UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac) in 2-Sektorzellen gefüllt. Der jeweilige Referenzsektor wird mit 420 μl Wasser/Puffer gefüllt. Die GNE-Proteinlösung hat eine Konzentration von 1 mg/ml, und UDP-GlcNAc und CMP-Neu5Ac werden zu einer Endkonzentration von 10 und 0,1 mM zugegeben. Alle Proben werden mit dem gleichen Volumen an Puffer bzw. Nukleotidzuckerlösung in Puffer verdünnt, um sicher zu stellen, dass beim Start des Experiments die Protein- und Salzkonzentration in allen Zellen gleich ist. Nachdem der Rotor in der Zentrifuge bei 0 rpm auf 4°C äquilibriert wurde, wird er auf 40000 rpm beschleunigt. Die Entwicklung des Konzentrationsgradienten wird in 30 sec-Intervallen erfasst. Das Experiment wird erst abgebrochen, wenn der Großteil der Makromoleküle sedimentiert ist (ca. 5 h).

Die resultierende Zeit und die radial abhängige Entwicklung des Signals $a_{(r,t)}$ wird als eine Superposition von unabhängig voneinander sedimentierenden Partikeln gemodelt, die bezogen auf die $c(S)$ -Funktion in SEDFIT (Schuck, 2000) auf einem linear skalierten Raster der S-Werte von 1.58 S und 27.86 S implementiert ist. Die Anzahl der benutzten S-Werten betrug 150. Der friktionale Quotient wurde bei einem Wert von 1,2 festgesetzt, der Konfidenzbereich für eine maximale Entropieregulierung betrug 0,68.

6.10.2.2 Sedimentationsgleichgewichtslauf

Bei Sedimentationsgleichgewichtsläufen werden Proteinlösungen im Vergleich zu Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen bei einer geringeren Rotationsgeschwindigkeit zentrifugiert. Nach Start der Zentrifugation beginnt die Sedimentation der Proteine und bewirkt so eine Erhöhung der Proteinkonzentration am Boden. Aufgrund der Konzentrationsunterschiede innerhalb der Sektorzelle setzt der Prozess der Diffusion ein, die der Sedimentation entgegenwirkt (Abbildung 6.2). Nach einer längeren Zeitspanne (bis zu 5 Tage) stehen die beiden entgegengesetzt wirkenden Kräfte im Gleichgewicht.

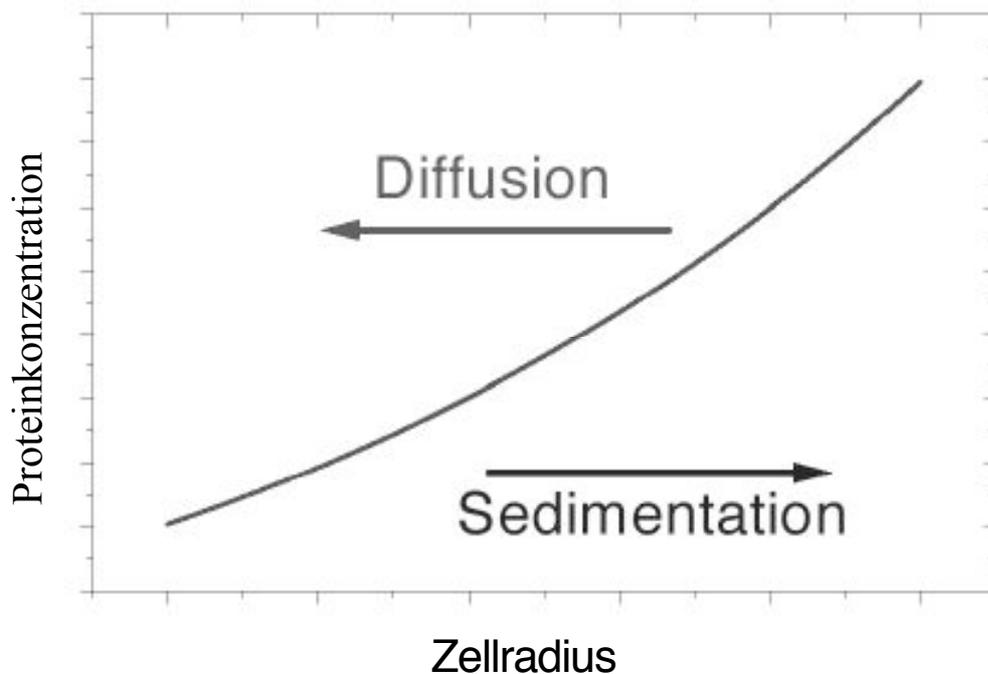


Abbildung 6.2: Theorie eines Sedimentationsgleichgewichts-Experiments. Nach mehrtägiger Zentrifugation stellt sich im Proteinkonzentrationsgradienten ein Gleichgewicht zwischen Sedimentations- und Diffusionskraft ein.

Gleichgewichtsläufe werden in 2-Sektor- oder 6-Sektorzellen durchgeführt. 100 – 120 µl der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml und einer entsprechenden Menge von Puffer im Dialysegleichgewicht werden wie in 6.12.2.1 benutzt. Des Weiteren kommen drei weitere Verdünnungen der Proteinlösung zum Einsatz, die zusammen mindestens eine Größenordnung (1:10) umfassen. Die Proben werden bei drei verschiedenen Geschwindigkeiten im Bereich von 6 – 20 krpm zentrifugiert. UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac werden mit einer Endkonzentration von 10 bzw. 0,1 mM zu den GNE-Proben hinzugegeben, der Referenzpuffer enthält keine Nukleotidzucker. Zur Überprüfung, ob Nukleotidzucker unter hohen Zentrifugalkräften sedimentieren und dadurch die bei den Experimenten detektierten Signale auch Protein-fremde Informationen enthalten, wird parallel zu den oben beschriebenen Versuchsbedingungen die Verteilung der Nukleotidzucker in Abwesenheit der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase untersucht. Dazu wird die Nukleotidzucker UDP-GlcNAc und/oder CMP-Neu5Ac mit einer Endkonzentration von 10 bzw. 0,1 mM in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT zentrifugiert. Für die Auswertung der experimentellen Daten wurde diese zunächst an einen Ein-Spezies-Modell angepasst. Der hierbei ermittelte Wert σ_{fit} ist proportional zum Molekulargewicht ($\sigma = \omega^2 \times M \times (1 - \text{PSV} \times \rho)$).

$\omega =$ Rotationsgeschwindigkeit in sec^{-1}
 $M =$ Molekulargewicht in g/mol
 $\text{PSV} =$ Partial-spezifisches Volumen in cm^3/g
 $\rho =$ Dichte des Puffers in g/cm^3

Der Quotient aus dem ermittelten σ_{fit} und dem berechneten σ_{calc} eines His₆-rGNE-Monomers gibt somit den gemittelten oligomeren Zustand des Proteins an.

6.10.3 Dynamische Lichtstreuung

Elektromagnetische Strahlung (Licht) zeigt im Wesentlichen zwei Wechselwirkungen mit Materie, das Licht kann absorbiert und/oder gestreut werden. Bei der Streuung unterscheidet man zwischen einer elastischen Streuung, bei der sich die Wellenlänge der gestreuten Strahlung nicht ändert, und einer inelastischen Streuung, bei der sich die Wellenlänge der gestreuten Strahlung ändert. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) nutzt die bei der inelastischen Streuung auftretenden Doppler-Effekte, daher ist es auch unter dem Begriff Quasielastische Lichtstreuung oder kurz QELS bekannt.

Eine kolloidale Dispersion (= Proteinlösung) wird mit kohärenten, monochromatischen Laserlicht bestrahlt. Zeit abhängige Fluktuationen in der Streuintensität werden durch Brown'sche Molekularbewegung der sehr kleinen Partikel (Proteinmolekül) hervorgerufen. Aufgrund der Bewegung der Partikel variiert auch der Abstand der einzelnen Partikel zueinander, welches wegen konstruktiver und dekonstruktiver Interferenz durch Nachbarpartikel in einem typischen Interferenzmuster resultiert. Die Analyse der Zeit abhängigen Intensitätsfluktuationen kann daher zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten D genutzt werden. Der hydrodynamische Radius bzw. Stokes-Radius kann bei bekannter Viskosität der Mediums mittels der Stokes-Einstein-Gleichung $D = K_B \cdot T / (\eta \cdot 6 \pi \cdot r)$ berechnet werden.

$D =$ Diffusionskoeffizient

$K_B =$ Boltzmann-Konstante ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K)

$T =$ Temperatur in K

$\eta =$ Viskosität

$r =$ (hydrodynamischer) Radius

Des Weiteren erweist sich die dynamische Lichtstreuung als eine nicht-invasive Technik zur Charakterisierung von Proteinlösungen. Da die Streuintensität proportional zu dem Quadrat des durchschnittlichen Molekulargewichtes des Partikels ist, ist es sehr empfindlich gegenüber Aggregaten und anderen großen Partikeln. Aufgrund der Tatsache, dass die Monomodalität einer Proteinlösung eine wichtige Vorbedingung für eine Kristallisation ist, wird die dynamische Lichtstreuung auch vor Kristallisations-Screenings eingesetzt.

100 ml gereinigte Proteinlösung mit einer Konzentration von (1 mg/ml) wird mit einem Millex-HV 0,45 mm-Filter (Millipore; Schwalbach, Deutschland) zunächst gefiltert, in eine Quarzküvette gefüllt und im Laser-Spectroscanner 201 (RiNA GmbH, Deutschland) für 2 min bei 20°C gemessen. Die Zeit abhängigen Fluktuationen in der Streuintensität werden zur Berechnung der Stokes-Radii der Partikel genutzt. Über den Stokes-Radius und das theoretisch berechnete Molekulargewicht eines Proteins wird zum einen der oligomere Zustand des Proteins ermittelt werden, zum anderen wird die für die Kristallisation notwendige Monomodalität überprüft.

6.10.4 CD-Spektroskopie

Zur Ermittlung von Sekundärstrukturinformationen wird die CD-Spektroskopie eingesetzt. Als Circular dichroismus (CD) bezeichnet man die Wellenlängen abhängige Absorptionsdifferenz zwischen rechts- und linkszirkulär polarisiertem Licht beim Durchgang durch chirale Moleküle. Proteine bestehen aus Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt, Loop), die aufgrund ihrer Chiralität optische Aktivität besitzen. Die optische Aktivität und damit auch das CD-Spektrum eines jeden Strukturelements ist von CD-Spektren anderer Elemente unterscheidbar und somit für die jeweilige Sekundärstruktur charakteristisch, so zeigt ein rein α -helikales Oligopeptid im CD-Spektrum zwei Minima bei 206 und 222 nm, die im CD-Spektrum eines α -Helix-freien Oligopeptids fehlen. Das CD-Spektrum eines Proteins ist also eine anteilige Komposition der CD-Spektren ihrer Sekundärstrukturelemente.

Gereinigte His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase und einige Punktmutanten werden in CD-Puffer (2 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 / 0,1 mM DTT) mittels einer PD10-Gelfiltrationssäule umgepuffert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die optische Dichte bei 280 nm gemessen (6.4.1.2). Eingesetzt werden die Proteinlösungen mit einer Konzentration zwischen 1-2 mM.

CD-Spektren werden bei 10°C, die mit Hilfe einer Temperatur-Kontrolleinheit (Lauda, Königshofen, Deutschland) gewährleistet wird, in einer 1 mm Quarzküvette im Bereich von 190 bis 260 nm mittels eines J-720 Spektropolarimeter (Jasco, Japan) aufgenommen. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile der zu untersuchenden Proteine basiert auf 43 Referenzspektra anderer löslicher Proteine und erfolgt mit Hilfe der CDPro-Software. Als Ergebnis erhält man die durchschnittlichen Sekundärstrukturanteile-Vorhersagen von Cdsstr-, Selcon- und Contin/LL-Algorithmen.

6.10.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, über die Fluoreszenzspektra aromatischer Aminosäuren Tertiärstrukturinformationen zu erhalten. So fluoresziert die aromatische Aminosäure Tryptophan in H₂O, pH 7,0 maximal nach Anregung mit 280 nm langwelligem Licht bei einer Wellenlänge von 355 nm. Tyrosin und Phenylalanin, die wie Tryptophan eine aromatische Seitengruppe tragen, zeigen ein ganz ähnliches

Fluoreszenzverhalten (Absorptionsmaxima: 275 bzw. 258 nm, Emissionsmaxima: 304 bzw. 282 nm), wobei in gefalteten Proteinen die Fluoreszenzemission zu 90% von Tryptophan dominiert wird.

Die Wellenlänge der Emissionsmaxima kann variieren und ist dabei von der Polarität der Umgebung der aromatische Seitenringe abhängig. So zeigen Tryptophan-Reste, die sich an der Proteinoberfläche befinden und so der polaren wässrigen Umgebung ausgesetzt sind, Fluoreszenzmaxima bei ca. 350-353 nm. Ist der Tryptophan-Rest aber in eine hydrophobe Region des Proteins eingebettet, so ist das Tryptophan von der wässrigen Phase abgeschirmt und zeigt eine Blauverschiebung im Fluoreszenzmaximum. Die Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz von der Polarität der Umgebung lässt demnach Rückschlüsse über die Umgebung der analysierten Tryptophanreste zu und enthält damit Informationen über die Tertiärstruktur des zu untersuchenden Proteins. Desweiteren können Konformationsänderungen, bei denen die Position und damit unter Umständen auch die Umgebungspolarität der Tryptophan-Reste wesentlich geändert wird, detektiert werden.

100 ml gereinigte His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (1 mg/ml) in 2 mM Natriumphosphat, pH 7,5 / 1 mM DTT werden in eine Fluoreszenz-Quarzküvette gefüllt und mit dem Fluoreszenzspektroskop bei einer Wellenlänge von 295 nm bei RT zum Fluoreszieren angeregt. Das Fluoreszenzspektrum wird zwischen 300 nm und 450 nm erfasst. Zum Vergleich werden Punktmutanten der His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase unter den gleichen Bedingungen analysiert.

6.11 Kristallisations-Screening

Die Proteinkristallographie bietet bisher als einzige Methode die Möglichkeit, die atomare Struktur von Proteinen, die größer als 50 kDa sind, aufzulösen. Ein herkömmliches Bild, wie bei der Licht- und Elektronenmikroskopie kann mittels Röntgenstrahlen jedoch nicht erhalten werden, da sich Röntgenstrahlen mit einer Linse nicht fokussieren lassen. Stattdessen entsteht ein für das Proteinkristall charakteristisches Beugungsmuster, aus der sich die dreidimensionale Anordnung des Proteinmoleküls ableiten lässt.

Um unter einer Vielzahl verschiedener Kristallisationsbedingungen die optimale zu ermitteln, werden Kristallisations-Screenings eingesetzt. Variiert werden dabei die Art und Konzentration des Puffers, der Salze, des Präzipitants und der spezifischen Additive (z.B. Substrate, Produkte und ihre Derivate), sowie der pH-Wert und die Lagerungstemperatur während des Kristallisationsprozesses.

6.11.1 His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase-Kristallisations-Screening

Das Kristallisations-Screening der His₆-UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde in 24-Well-Kristallisationsplatten mit Kristallisationspuffern der Firma Hampton (USA) durchgeführt. Dabei wurde mit der Hanging-Drop-Methode gearbeitet, bei der je 1 µl der Proteinlösung mit 2 µl eines der Kristallisationspuffer in die Mitte eines an den Ränden mit Silikon eingefetteten Deckgläschen gegeben und kopfüber luftdicht auf ein Well gedrückt wird, welches mit 500 µl des jeweiligen Puffers gefüllt ist. Da die Salzkonzentration des Gemisches aus Proteinlösung und Kristallisationspuffer niedriger ist als die des Pufferreservoirs im Well, steigt durch fortschreitende Äquilibration die Konzentration von Protein und Präzipitant im Tropfen langsam an. Proteinkristalle bilden sich in der Regel zwischen einigen Tagen bis zu einigen Monaten, haben eine Größe von typischerweise 0,1 bis

1 mm und färben sich im Unterschied zu Salzkristallen unter Zugabe des Proteinkristallfarbstoffs (Izit Crystal Dye; Hampton) aufgrund des hohen Wassergehalts von Proteinkristallen (30-70%) blau. Insgesamt wurden 192 verschiedene Pufferbedingungen bei 25°C ausgetestet.

6.11.2 ManNAc-Kinase-Kristallisations-Screening

Das Screening der ManNAc-Kinase fand im Sitting-drop-Verfahren statt, bei dem ein Gemisch aus 1,5 µl Proteinlösung und 1,5 µl Kristallisationspuffer (Nextal, Classics und Classics Lite, Kanada) in einer eigens dafür vorgesehenen Mulde oberhalb eines jeden Wells einer 24-Well-Sitting-Drop-Kristallisationsplatte sitzt. Nach Abdichten des Wells mittels eines an den Rändern mit Silikon eingefetteten Deckgläschen äquillibriert der Tropfen analog zur Hanging-Drop-Methode gegen die 500 µl Pufferreservoir im Well. Insgesamt wurden 196 Pufferbedingungen bei 20°C und 4°C getestet.

6.12 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

Als weiteres Analyseverfahren wurde die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie gewählt, bei der sich einzelne Makromoleküle bei sehr großer Vergrößerung untersuchen lassen. Bei genügender Anzahl und Homogenität einer Partikelpopulation kann zusätzlich noch eine dreidimensionale Struktur der Partikel mit einer Auflösung im zweistelligen nm-Bereich errechnet werden.

Für ein Kryo-TEM-Experiment wird zunächst enzymatisch aktives, gereinigtes His₆-rGNE-Protein in 20 mM HEPES-Puffer, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM UDP-GlcNAc über eine Superdex200-Gelfiltrationssäule gegeben und mit dem oben genannten Puffer eluiert. 5 µl der Fraktion, die laut Gelfiltrationsstandard homogenes tetrameres Protein enthält, dienen als Probe für die Kryo-Transmissionsmikroskopie.

Die Probe wird auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfergitter aufgetragen, welches zuvor in einer BALTEC MED 020 (Baltec, Lichtenstein) mittels der Glow Discharge-Technik hydrophilisiert wurde, bei der das Gitter im Teilvakuum für 30 s bei 8 W mit Elektronen bestrahlt wird. Anschließend wird die Proteinlösung auf dem Gitter vitrifiziert. Nach Zugabe von Proteinlösung und Kontrastmittel (2% Phospho-Wolframat; kurz PTA) wird das Gitter vitrifiziert. Zur Kühlung des Präparats während der Elektronenmikroskopie dient flüssiger Stickstoff. Die Bilder werden mit Hilfe eines Laser Diffraktometers optisch erfasst.