

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Agarose-Gelkammer	BioRad
Autoklav	Sterico, Vapoklav 500-D
CryoTong™ (Loop-Zange)	Hampton Research
CrystalWand™ (Loop-Halter)	Hampton Research
Dewar-Gefäße	Hampton Research / Carl Roth
Feinwaage	Mettler PC 4400
Geltrockner	Biometra
Goniometerkopf	Hampton Research
Heizschrank	Heraeus, B 5042
HPLC	Beckmann, System Gold
Kühlzentrifuge	Heraeus / Beckman, J2-21
Lyophilisator	Heraeus-Christ, Savant, Speed Vac Concentrator
Magnetrührer	IKAMAG® RCT
Micro-Tools™ Kristallisationsbesteck	Hampton Research
Mikroskop	Olympus
Netzgerät	Pharmacia, ECPS 3000/150
PAA-Gelkammer	IBI
PCR-Gerät GeneAmp 2400	Perkin Elmer
pH-Meter	Knick, 761 Calimatic, Ingold Elektrode
Photoapparat	Olympus OM-2
Photometer	Shimadzu
Pipetten	Gilson-Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000
Reinstwasseranlage	Millipore, Milli-Q
RNA-Synthesizer	Christ, Beta A
Schüttler G76 (Mikrobiologie)	New Brunswick Scientific
Schüttler (Tisch)	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Thermomixer	Eppendorf
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf / Qualitron Inc.
Transportabler Kristallcontainer	Taylor Wharton
Ultraschall-Gerät	Bioblock Scientific
Vial Clamp™ (Behälter-Klemme)	Hampton Research
Waage	Sartorius
Wasserbad	B. Braun

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

CryoLoops	Hampton Research
CrystalCap™ Vial (Loop-Behälter)	Hampton Research
Deckgläschen <sub>silikonisiert</sub>	Hampton Research
Gelfiltrationssäulen (NICK™ / NAP™)	Pharmacia
Linbro®-Zellkulturplatten	ICN
PCR-Tubes	Biozym
Petrischalen	Greiner
Silikonfett	Carl Roth
Spritzen	B. Braun
Sterilfilter 0,2 µm, FP 030/3	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen	Carl Roth

### 3.1.3 Chemikalien

Aceton	Carl Roth
Acetonitril	J. T. Baker
Acrylamid	Carl Roth
Agar	Gibco BRL
Agarose	Biozym
Ammoniak (33%)	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
APS	Merck
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampicillin	Serva
Bariumchlorid	Sigma Aldrich
Borsäure	Riedel de Häen
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA	NEB
Cacodylsäure	Hampton Research
Chitin- <i>Beads</i>	NEB
CPG (500/1000 Å)	ChemGenes
Cytidin-2'-monophosphat	Sigma Aldrich
Cytidin-3'-monophosphat	ICN
Cytidin-5'-monophosphat	Sigma Aldrich
Desoxynukleotidtriphosphate	Boehringer Mannheim
DTT	NEB
DNA- / RNA-Leitern	Life Technologies
EDTA	J. T. Baker
Eisen(III)-chlorid	Merck
Eisen(II)-sulfat	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethanolamin	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
Essigsäure	Sigma Aldrich
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Guanosin-3'-monophosphat	ICN
Guanosin-5'-monophosphat	Sigma Aldrich
Harnstoff	Biomol
Hefeextrakt	Life Technologies
HEPES	Carl Roth
IPTG	Bissendorf Biochemicals
Izit™ -Farbstoff	Hampton Research
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kalziumsulfat	Merck
Kobaltchlorid	Merck
Kobalthexaminchlorid	Sigma Aldrich
Lithiumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Riedel-de Häen
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
MOPS	Fluka
MPD	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nickelchlorid	Sigma Aldrich
N, N'-Methylen-bisacrylamid	Life Technologies
Phenol	Carl Roth
PEG 400 / 3350 / 4000 / 8000	Sigma Aldrich
2-Propanol	Fluka
Protein-Marker P4 / P5	Serva Electrophoresis

RNA-Phosphoramidite	ChemGenes
rRNasin® RNase Inhibitor	Promega
Salzsäure	Sigma Aldrich
SDS	Merck
Spermidin	Sigma Aldrich
Spermin	Sigma Aldrich
Stickstoff <sub>flüssig</sub>	Linde
Strontiumchlorid	Fluka
TEMED	Sigma Aldrich
Tetrabutylammoniumfluorid	Sigma Aldrich
Thiamin-HCl	Merck
Tris-HCl	ICN
Bulk-tRNA	Boehringer Mannheim
X-Gal	Sigma Aldrich
Xylencyanol	Serva Electrophoresis

### 3.1.4 Enzyme

Advantage®-GC Genomic DNA Polymerase Mix	Clontech
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB
DNase I	Boehringer Mannheim
<i>KlenTaq</i> -LA Polymerase Mix	Clontech
Lysozym	Boehringer Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Phosphodiesterase I	USB
Proteinase K	Gibco BRL
Restriktionsendonukleasen	NEB
Ribonuclease H	Promega
Ribonuclease T <sub>2</sub>	Pharmacia
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics
T4 Polynukleotid-Kinase	Promega
<i>TaqPlus</i> ® Long PCR System	Stratagene
<i>Thermus</i> RNA Polymerase	Epicentre Technologies

### 3.1.5 Kits

BCA Protein Assay	Pierce
Crystal Screen™ / Cryo™ / Lite™	Hampton Research
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification	Pharmacia
Grid Screen™ Ammonium Sulfate	Hampton Research
Heavy Atom Screen™ Hg	Hampton Research
IMPACT™-CN System	NEB
JETQUICK Plasmid Mini Prep Spin Kit	Genomed
JETSPIN Plasmid Midi Prep Spin Kit	Genomed
Natrix™	Hampton Research
Nucleic Acid Mini Screen™	Hampton Research
Peg/Ion Screen™	Hampton Research
RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems	Promega
Riboprobe® <i>in vitro</i> Transcription System	Promega
TOPO TA Cloning®	Invitrogen

### 3.1.6 Zellen

<i>E. coli</i> B ER2566	NEB
Epicurian Coli <sup>®</sup> BL21-CodonPlus <sup>™</sup> (DE3)-RP	Stratagene
Epicurian Coli <sup>®</sup> XL10-Gold Ultracompetent Cells	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	Promega
AT-62 <i>Thermus flavus</i> , DSM 674	DSMZ

### 3.1.7 Medien

#### LB-Agarplatten

- 12 g/l Agar (w/v) in LB-Medium
- Autoklavieren: 20 min, 121°C
  - Zugabe von Ampicillin bei ~50°C  
( $c_{\text{End}} = 100 \mu\text{g/ml}$ )
  - Gießen in sterile Petrischalen

#### LB-Medium

- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1,0 % (w/v) Pepton Nr. 140  
1,0 % (w/v) NaCl
- Anpassen des pH auf 7.0 mit NaOH
  - Autoklavieren: 20 min, 121°C

#### LB<sub>modifiziert</sub> „TSS-Lösung“

- 10 % (w/v) PEG 8000  
5 % (v/v) DMSO  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
in LB-Medium, pH 6.5

#### M9-Minimalmedium

- 0,60 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,30 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,05 % (w/v) NaCl  
0,10 % (w/v) NH<sub>4</sub>Cl
- Anpassen des pH auf 7.4 mit NaOH
  - Autoklavieren: 20 min, 121°C
  - Zugabe von: MgSO<sub>4</sub> ( $c_{\text{End}} = 2,0 \text{ mM}$ ),  
CaCl<sub>2</sub> ( $c_{\text{End}} = 0,1 \text{ mM}$ ),  
Glucose ( $c_{\text{End}} = 0,2 \%$ ),  
Thiamin-HCl ( $c_{\text{End}} = 1,0 \text{ mM}$ )  
nach Sterilfiltration durch 0,2  $\mu\text{m}$  Filter

#### Thermus 162-Agarplatten

- 28 g/l Agar (w/v) in *Th.* 162 Medium
- Autoklavieren: 20 min, 121°C
  - Zugabe von: 0,0544 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
0,4300 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - Gießen in sterile Petrischalen

#### Thermus 162-Medium (DSM 630)

- 0,250 % (w/v) Hefeextrakt  
0,250 % (w/v) Pepton 140  
0,010 % (w/v) Nitrilotriessigsäure  
0,004 % (w/v) CaSO<sub>4</sub>  
0,020 % (w/v) MgCl<sub>2</sub>  
1,4\*10<sup>-4</sup> % (w/v) FeCl<sub>3</sub>  
1,5\*10<sup>-4</sup> % (w/v) Na<sub>3</sub>-Citrat  
7,0\*10<sup>-5</sup> % (w/v) FeSO<sub>4</sub>  
2,5\*10<sup>-5</sup> % (w/v) MnCl<sub>2</sub>  
1,5\*10<sup>-5</sup> % (w/v) CoCl<sub>2</sub>  
2,5\*10<sup>-6</sup> % (w/v) CuCl<sub>2</sub>  
2,5\*10<sup>-6</sup> % (w/v) Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>  
1,0\*10<sup>-6</sup> % (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
1,0\*10<sup>-6</sup> % (w/v) NiCl<sub>2</sub>
- 
- 0,0544 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (seperat  
0,4300 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> autoklaviert)
- Anpassen des pH auf 7.2 mit NaOH
  - Autoklavieren: 20 min, 121°C

#### Th. thermophilus Medium (DSM 74)

- 0,4 % (w/v) Hefeextrakt  
0,8 % (w/v) Pepton Nr. 140  
0,2 % (w/v) NaCl
- Anpassen des pH auf 7.0 mit NaOH
  - Autoklavieren: 20 min, 121°C

### 3.1.8 Puffer

#### **DNA-Enzym-Spaltungspuffer (10x)**

500 mM Tris-HCl, pH 7.5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **DNA-Probenpuffer (6x)**

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol  
30 % Glycerin

#### **E-Mix B (16,6x)**

166,6 mM Acetyl-Phosphat, pH 7.0  
166,6 mM Phosphoenolpyruvat  
16,6 mM ATP  
16,6 mM GTP  
8,3 mM CTP  
8,3 mM UTP

#### **E-Mix D (12,5x)**

0,75 x E-Mix B (16,6x) mit  
2,25 x Phosphoenolpyruvat (375 mM)

#### **HPLC-Puffer A**

100 mM TEAAc, pH 7.0

#### **HPLC-Puffer B**

100 mM TEAAc, pH 7.0  
80 % Acetonitril

#### **IMPACT-Puffer**

20 mM Na-HEPES, pH 8.5  
500 mM NaCl  
1 mM EDTA

#### **KlenTaq-Puffer (10x)**

400 mM Tricin-KOH, pH 9.2  
150 mM Kaliumacetat  
35 mM Magnesiumacetat  
37,5 µg/ml BSA

#### **Laemml-Probenpuffer (2x)**

125 mM Tris, pH 6.8  
20 % (v/v) Glycerin  
4 % (w/v) SDS  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

#### **Lyse-Puffer**

200 mM NaOH  
1 % (w/v) SDS

#### **Pfu-Puffer (10x)**

200 mM Tris-HCl, pH 8.0  
100 mM KCl  
60 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 % Triton X-100  
100 µg/ml BSA

#### **Phosphat-Puffer, pH 7.0**

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Phosphodiesterase I-Puffer (5x)**

500 mM Tris-HCl, pH 8.9  
500 mM NaCl  
70 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Proteinase K-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8.0  
15 mM EDTA  
0,5 % SDS

#### **Restriktionspuffer NEB3 (10x)**

500 mM Tris-HCl, pH 7.9  
1 M NaCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM DTT

#### **Restriktionspuffer NEB4 (10x)**

200 mM Tris-Acetat, pH 7.9  
500 mM Kaliumacetat  
100 mM Magnesiumacetat  
10 mM DTT

#### **Resuspensionspuffer**

50 mM Tris-HCl, pH 8.0  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A

#### **RiboMAX-Transkriptionspuffer (5x)**

400 mM HEPES-KOH, pH 7.5  
120 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Spermidin  
200 mM DTT

#### **Riboprobe-Transkriptionspuffer (5x)**

200 mM Tris-HCl, pH 7.9  
50 mM NaCl  
30 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Spermidin

**RNA-MOPS-Probenpuffer (2,5x)**

26 mM MOPS-NaOH, pH 7.0  
 6,5 mM Natriumacetat  
 1,3 mM EDTA  
 65 % Formamid  
 8 % Formaldehyd  
 0,1 % Bromphenolblau

**RNA-Probenpuffer Harnstoffgel (2x)**

2 x TBE  
 16 M Harnstoff  
 20 % Saccharose  
 0,04 % Bromphenolblau  
 0,04 % Xylencyanol

**RNase H-Puffer (5x)**

200 mM Tris-HCl, pH 8.0  
 20 mM MgCl<sub>2</sub>  
 5 mM DTT

**RNase T<sub>2</sub>-Puffer (10x)**

300 mM Tris-HCl, pH 7.0  
 150 mM MgCl<sub>2</sub>

**S-Mix (3,3x)**

0,13 x TL-Puffer  
 3,33 x ALP  
 0,33 U/μl RNase-Inhibitor  
 0,33 g/l Bulk-tRNA  
 86,7 % (v/v) S30  
 26,7 mg/l Pyruvatkinase

**SDS-Proteingel-Laufpuffer (5x)**

192 mM Tris-HCl  
 1,9 M Glycin  
 0,5 % SDS

**T-Mix (100/26x)**

2,7 x TL-Puffer  
 7,7 mM MESNA  
 15,4 mM MgCl<sub>2</sub>  
 15,4 % PEG 2000  
 0,08 % NaN<sub>3</sub>  
 0,38 mM Folsäure  
 1,54 mM je Aminosäure (ohne Leu)

**T4 DNA Ligase-Puffer (10x)**

660 mM Tris-HCl, pH 7.5  
 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM DTT  
 10 mM ATP

**T4 Polynukleotidkinase-Puffer (10x)**

700 mM Tris-HCl, pH 7.6  
 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
 50 mM DTT

**TAE-Puffer (50x)**

242 g Tris  
 57,1 ml Essigsäure  
 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0  
 ad 1 l mit Bidest.

**TaqPlus Long-Puffer (10x)**

200 mM Tris-HCl, pH 8.8  
 100 mM KCl  
 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 20 mM MgSO<sub>4</sub>  
 1 % Triton X-100  
 1 mg/ml BSA

**TBE-Puffer (10x)**

108 g Tris  
 37,2 g Borsäure  
 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0  
 ad 1 l mit Bidest.

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8.0  
 1 mM EDTA

**Thermus RNA Polymerase-Puffer (5x)**

250 mM Glycin-NaOH, pH 8.2  
 500 mM KCl  
 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM MnCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM EDTA  
 50 mM β-Mercaptoethanol

**TL-Puffer (10x)**

200 mM HEPES, pH 7.5  
 1 M KCl  
 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM EDTA  
 0,2 % NaN<sub>3</sub>

**TMK-Bindungspuffer (10x)**

300 mM Tris-HCl, pH 8.0  
 200 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1,2 M KCl

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Nukleinsäure-Aufreinigung

#### 3.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Die genetische Information befindet sich in prokaryotischen Zellen auf einem einzigen, ringförmigen DNA-Molekül im Kernäquivalent. Zur Isolation wurden 1 ml *Thermus flavus* Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase (OD von ca. 1,0 nach 8 h) 3 min mit 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 33 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation erfolgte die Zellyse in 66 µl 1 %-iger SDS-Lösung bei 60°C für 10 min. Das anionische Detergens löst durch Micellenbildung Lipide aus der Zellmembran, deren zerstörte Struktur zelleigenen Enzymen Angriffspunkte zum weiteren Abbau der Zellwand bietet. Die Zelltrümmer konnten in einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm sedimentiert werden. Zum Überstand wurden 20 µl 0,25 M EDTA (pH 8.0), 10 µl Tris-HCl (pH 7.1) und 25 µl 3M Natriumacetat (pH 4.8) gegeben, die Probe 40 min auf Eis inkubiert und die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (12.000 rpm, 10 min). Zur quantitativen Proteinabtrennung war an diesem Punkt eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchzuführen. Abschließend mußte die DNA mit 90 µl Isopropanol gefällt (-20°C, 10 min), abzentrifugiert (12.000 rpm, 15 min) und das bei RT getrocknete Pellet in 20 µl TE-Puffer gelöst werden.

#### 3.2.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus wäßrigen Lösungen. Sie wird insbesondere zur Aufreinigung von Nukleinsäuren nach enzymatischen Reaktionen genutzt. Während Proteine im Lösungsmittelgemisch denaturieren, gehen Nukleinsäuren in die wäßrige, obere Phase.

Die Nukleinsäureprobe wurde mit dem äquivalenten Volumen eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1), das mit 50 mM Natriumacetat (pH 4.5) im Fall der Aufreinigungen von RNA oder mit 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) bei DNA-Aufarbeitungen gepuffert war, versetzt und eine Minute per Vortex gemischt. Eine 2-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm ergab eine Phasentrennung in die untere Phenolphase, die proteinhaltige Interphase und eine wäßrige, obere Phase. Letztere wurde mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) eine Minute intensiv gemischt und erneut zentrifugiert. Mitgetragenes Phenol verblieb dabei in der organischen Phase. Die in der wäßrigen Phase erhaltenen Nukleinsäuren präzipitierten unter Einwirkung von Ethanol, wodurch zugleich Chloroform-Reste entfernt werden konnten.

### 3.2.1.3 Proteinase K-Verdau von Proteinen

Eine Alternative zur Phenol/Chloroform-Extraktion stellt der endoproteolytische Verdau mit Proteinase K dar. Die Protease schneidet in Proteinen vorzugsweise nach der Carboxylgruppe aliphatischer und aromatischer Aminosäuren. Die Methode eignet sich zur quantitativen Entfernung großer Proteinmengen bei geringen Nukleinsäuregehalten. Im Vergleich zur Chloroform/Phenol-Extraktion sind in diesem Fall bessere Ausbeuten an DNA oder RNA festzustellen. Ein Anwendungsbeispiel ist die RNA-Aufreinigung nach der *in-vitro* Prozessierung.

Proteinase K wurde in einer Konzentration von 50 µg/ml im korrespondierenden Puffer gelöst. 50 µl Prozessierungsansatz wurden mit 100 µl Proteinase K-Vormix 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Ethanol-fällung der RNA. Zwecks Volumenvergrößerung war mit einem äquivalenten Volumen einer 0,6 M Natriumacetatlösung (pH 4.8) zu arbeiten.

### 3.2.1.4 Fällungen mit Alkohol

Durch Alkohol-Fällungen werden Nukleinsäuren aufkonzentriert und gleichzeitig von unerwünschten Pufferkomponenten befreit. Die Gegenwart organischer Solventien führt zu einer Verringerung der Dielektrizitätskonstanten. Die Folge ist - nach dem Coulombschen Gesetz - eine Vergrößerung der elektrostatischen Anziehung zwischen entgegengesetzten Ladungen, womit eine Abnahme der Löslichkeit einhergeht. Als Gegenion für die Nukleinsäuren dient Natrium.

Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,05 bis 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2 bis 2,5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol versetzt. Der Ansatz mußte entweder 30 min bei -80°C oder ÜN bei -20°C inkubiert werden. Anschließend konnten die Nukleinsäuren abzentrifugiert (25 min, 13.000 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet mit Ethanol gewaschen werden. Nach kurzer Zentrifugation von 30 s wurde das Pellet 15 min bei RT getrocknet oder 1-2 min lyophilisiert (nicht bis zur Trockne, da dies die Löslichkeit herabsetzt) sowie in Bidest. resuspendiert.

Wird die Fällung mit Isopropanol durchgeführt, werden nur 0,7 Volumenanteile Alkohol benötigt. Der Vorteil ist ein kleineres Endvolumen; der Nachteil eine geringere Ausbeute. Die Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen.

Für die Reinigung kurzer RNA-Oligonukleotide hat sich die Verwendung von Butanol als Fällungsmittel bewährt. Pro OD-Einheit wurden 100 µl Butanol zum RNA-Oligonukleotid gegeben und die RNA 1 h bei -80°C gefällt. Es folgten die Zentrifugation der RNA (20 min, 13.000 rpm, 4°C) und eine Wiederholung der Fällung mit dem Butanol-Überstand.

### 3.2.1.5 Gelfiltration

Die Gelchromatographie trennt die Moleküle einer Lösung aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Gestalt. Grundlage der makromolekularen Matrix sind linear aufgebaute Polymere, die infolge gezielter Quervernetzung wasserunlösliche, perlförmige Festkörper mit definierter Porengröße entstehen lassen. Während kleine Moleküle in der Lage sind, in dieses Netzwerk der stationären Phase einzudringen, wandern größere Moleküle vorzugsweise in der mobilen Phase und mit größerer Geschwindigkeit durch die Säule.

Zum Wechseln des Puffers bzw. zum Entsalzen von Nukleinsäurelösungen sowie zur Abtrennung von Oligonukleotiden mit bis zu 10 nt kamen in Abhängigkeit vom Probenvolumen NICK™-, NAP™-5 und NAP™-10 Säulen auf Sephadex-Basis von Pharmacia zum Einsatz. Um eine vollständige Entfernung von NTPs zu erreichen, sollte im Anschluß eine Ethanol-Fällung durchgeführt werden.

**Protokoll NAP™-5:**

- Waschen der Säule mit 10 ml Bidest.
- Auftragen von max. 0,5 ml Probe
- Ad 0,5 ml mit Bidest.
- Elution mit 1 ml Bidest.

### 3.2.1.6 rpHPLC

Eine weitere chromatographische Trennmethode ist die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Die stationäre Phase besteht aus sehr kleinen und homogenen Partikeln von 5 bis 10 µm Durchmesser, die eine große Kontaktfläche zur mobilen Phase und eine Vielzahl sogenannter Trennböden generieren. Daraus resultieren hohe Auflösungen, die auch eine Trennung sehr ähnlicher Moleküle erlauben. Um einen Fluß durch die kompakten, stationären Säulenmaterialien zu erreichen, wird unter hohem Druck (1,4 kPSI) gearbeitet. Gängige Trennprinzipien beruhen auf dem Ionenaustausch oder der Adsorption an der hydrophilen, stationären Phase. Ist das Säulenmaterial in der Adsorptionschromatographie mit hydrophoben Kohlenwasserstoffketten derivatisiert, wird von einer Umkehrphase und der *reversed phase* HPLC gesprochen.

Die Aufreinigung von RNA-Transkripten oder synthetisierten RNA-Oligonukleotiden sowie deren Nukleosidanalysen wurden auf einer HPLC der Firma Beckman Instruments durchgeführt – bestehend aus einem programmierbaren Pumpenmodul mit zwei analytischen Pumpen, einer Detektoreinheit, dem programmierbaren Säulenofen und der Software *System Gold*. Für den Nukleosidnachweis und die präparative Aufreinigung von RNA-Oligonukleotiden wurden Säulen (250 mm x 4.6 mm) mit Ultrasphere®-Material (Umkehrphase ODS C<sub>18</sub>, 5 µm spärlich, 8 nm Porengröße) verwendet. Für die präparative Reinigung der 5S rRNA-Transkripte waren die Poren des C<sub>18</sub>-Säulenmaterial erweitert

(Jupiter, 5µm sphärisch, 30 nm Porengröße). Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Säulentemperatur 45°C. In Abhängigkeit vom Trennproblem kamen verschiedene Gradientenprogrammierungen mit den HPLC-Puffern A und B zum Einsatz:

#### **Gradientenelution**

##### **RNA-Transkripte (≤ 123 nt) :**

Start	1 % Puffer B
5 min	5 % Puffer B
30 min	17 % Puffer B
35 min	100 % Puffer B
40 min	100 % Puffer B
45 min	1 % Puffer B

##### **RNA-Oligos :**

Start	1 % Puffer B
⋮	⋮
60 min	15 % Puffer B
65 min	100 % Puffer B
70 min	100 % Puffer B
75 min	1 % Puffer B

##### **Nukleosidanalyse :**

Start	1 % Puffer B
⋮	⋮
30 min	20 % Puffer B
35 min	100 % Puffer B
40 min	100 % Puffer B
45 min	1 % Puffer B

### **3.2.1.7 Gelelution**

Obwohl die Gelelektrophorese in erster Linie ein analytisches Nachweisverfahren darstellt (siehe 3.2.2), besteht die Möglichkeit einer präparativen Anwendung zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder der gezielten Isolation eines DNA-Fragments, zum Beispiel nach Plasmid-Restriktionen. Die im (vorzugsweise *Biozym DNA Low Melt*) Agarosegel getrennten DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter längerwelligem UV-Licht (302 nm) mit einem sauberen Skalpell zügig ausgeschnitten, um Schädigungen, wie Thymin-Dimere, zu vermeiden. Die weiteren Schritte sind dem *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von Pharmacia entnommen, der auf der selektiven Bindung von DNA an eine Glasfaser-Matrix basiert. Zu je 10 mg Gelstück wurden 10 µl chaotrophaltiger Puffer gegeben (max. 300 µl) und die Agarose unter leichtem Schütteln im Thermomixer bei 60°C gelöst. Nach etwa 10 min konnte die Probe auf die GFX-Säule aufgetragen werden. Einer kurzen Abzentrifugation (30 s, 14.000 rpm) von denaturierten Proteinen und Salzen folgte der Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer (TE-Puffer mit 80 % Ethanol) und eine erneute Zentrifugation. Die Probe wurde mit max. 50 µl Bidest. eine Minute inkubiert und durch 1-minütige Zentrifugation eluiert.

### **3.2.2 Gelelektrophorese**

Beim Anlegen einer Spannung wandern geladene Moleküle zur Elektrode entgegengesetzter Ladung. Das Trennprinzip der Gelelektrophorese beruht auf einer unterschiedlichen molekularen Beweglichkeit im elektrischen Feld, die von der Nettoladung, der Größe und der Struktur der Moleküle abhängt. Darüber hinaus beeinflussen die elektrische Feldstärke und die Porengröße der Gelmatrix die elektrophoretische Mobilität. Erst die geeignete Wahl dieser

externen Parameter gewährleistet intensive Wechselwirkungen der Moleküle mit der Matrix und die volle Entfaltung des trennenden Molekularsiebeffekts.

### 3.2.2.1 Agarosegele

Die Analyse und Aufreinigung von Plasmiden, PCR-Produkten und RNA-Transkripten erfolgte in Agarosegelen. Deren Gelmatrix besteht aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die alternierend durch  $\beta$ -1,4- und  $\alpha$ -1,3-Bindungen linear verestert sind. Die Porengröße des Gels läßt sich über die Agarosekonzentration variieren. Aufgrund einer annähernd gleichmäßigen Ladungsverteilung in DNA- und RNA-Molekülen ist die Nettoladung konstant, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts direkt (negativ) proportional ist. Während dsDNA-Fragmente unter nativen Bedingungen analysiert werden können, sind aufgrund ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNA-Molekülen denaturierende Bedingungen empfehlenswert. Über den Standard einer Basenpaar-Leiter ist eine Größenordnung möglich. Im Rahmen der Arbeit lag das Fragmentspektrum zwischen 100 und 8000 bp, die in einem Konzentrationsbereich der Agarose von 1,0 bis 4,2 % aufgetrennt wurden. Die exakte Gelkonzentration richtete sich nach der Art der verwendeten Agarose (Herstellerangabe).

Für DNA-Gele wurde TAE-Puffer und für RNA-Gele TBE-Puffer verwendet. Bei Konzentrationen von mehr als 2 % wurde die Agarose zum Quellen 10 min im Puffer belassen. Um bei höheren Konzentrationen ein Anfärben der Banden, d. h. die Diffusion des Ethidiumbromids und die Durchlässigkeit des UV-Lichts, zu gewährleisten, mußte die Geldicke über ein kleineres Puffervolumen (max. 25 ml) verringert werden. Standardmäßig wurde die Agarose in 40 ml Puffer unter leichtem Schwenken aufgeköcht. Die schlierenfreie Lösung wurde in die Gelkammer mit Taschenkamm gegossen, in der sie innerhalb von 20 min erstarrte. Die Proben wurden im jeweiligen Probenpuffer aufgenommen und die RNA zusätzlich durch 3-minütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Die Gelelektrophorese dauerte bei einer konstanter Spannung von 110 V, was einer elektrischen Feldstärke von 8 bis 10 V/cm entspricht, etwa 1,5 h.

Die Nukleinsäuren wurden 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1  $\mu$ g/ml) in 1 x TAE-Puffer angefärbt. Das heterozyklische, kationische Ethidiumbromid interkaliert zwischen aromatische Ringsysteme benachbarter Nukleotide. Bei Anregung durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm wird eine orange Fluoreszenz der Nukleinsäurebanden sichtbar. Erfahrungsgemäß sind 0,5  $\mu$ g Plasmid sehr gut zu erkennen.

### 3.2.2.2 Denaturierende Harnstoff-PAGE

Die Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde für die analytische Trennung heterogener Transkripte eingesetzt.

Polyacrylamidgele zeichnen sich durch eine höhere Beladungskapazität und bessere Trennleistungen aus. Das Trägermaterial ist aus Acrylamidketten aufgebaut, die durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt sind. Die Polymerisation wird durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfat in zwei freie Sulfatradikale, die durch TEMED stabilisiert werden, initiiert. Die Porosität des Gels wird durch die Kettenlänge und den Grad der Quervernetzung bestimmt, die über die Konzentrationen und das Verhältnis von Acrylamid zu Methylenbisacrylamid eingestellt werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Die RNA wird mittels 7 M Harnstoff denaturiert, der die Ausbildung struktureller Wasserstoffbrückenbindungen stört. Für Transkriptlängen zwischen 90 und 140 nt wurde ein 8 %-iges Gel der Größe 37 cm x 19 cm x 0,1 cm gewählt. Nach einer gründlichen Reinigung der Glasplatten mit Ethanol konnten die Spacer an einer Seite paßgerecht ineinander geschoben werden, so daß der Druckverlust am rechten Winkel ein Auslaufen der Lösung verhinderte. Dem Einfüllen der Gellösung folgte die Fixierung des Taschenkamms. Nach einer halbstündigen Polymerisation wurden die Klammern, der Kamm sowie der untere Spacer entfernt und das Gel mit 1 x TBE als Laufpuffer überschichtet. Während der Probenvorbereitung konnte das Gel vorlaufen. Zwischenzeitlich war

**8 % Harnstoff-PAA-Gel (RNA):**

20 ml	40 % Acrylamid / Bisacrylamid (19:1)
42 g	Harnstoff
10 ml	10 x TBE-Puffer
ad 100 ml mit Bidest.	
0,8 ml	10 % APS
80 µl	TEMED

dabei der Harnstoff aus den Taschen zu spülen. Der RNA-Probenpuffer für das Harnstoffgel wurde im Verhältnis 1:1 mit ca. 1,5 µg RNA gemischt. Für die erforderliche Bandenschärfe sollte das Endvolumen 10 µl nicht übersteigen. Nach der Probendenaturierung bei 90°C für 3 min wurden die Proben aufgetragen und der Lauf gestartet. Als obere Leistungsbegrenzung waren 40 W eingestellt. Die diskontinuierliche Anpassung der Spannung von 650 auf 1050 V (entsprechend einer etwas mehr als handwarmen Platte) unterstützte die RNA-Denaturierung. Mit dem Auslaufen des Xylencyanol-Farbmarkers nach 5 bis 6 h wurde die Trennung beendet und die RNA mit Ethidiumbromid gefärbt.

### 3.2.2.3 Denaturierende SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat zerstört nichtkovalente Wechselwirkungen in Proteinen, indem ein SDS-Anion an ca. jeden zweiten Aminosäurerest bindet. Die entstandenen SDS-Protein-Komplexe lassen sich über ihre Masse trennen, die der stark negativen Ladung linear und der gelelektrophoretischen Beweglichkeit logarithmisch proportional ist (Stryer, 1994). Um die Trennschärfe und die Auflösung zu verbessern, wird das Proteingel in ein Sammel- und ein Trenngel im Laufstreckenverhältnis von 1:4 unterteilt (Laemmli, 1970). Außerdem werden Salze, die das Laufverhalten beeinflussen, bei einer Acetonfällung der Proteine entfernt.

Mittels SDS-PAGE erfolgte die Dokumentation der Proteinexpression von TflL18. Die zu analysierende Proteinprobe wurde zunächst mit dem 3-fachen Volumen an eiskaltem Aceton 15 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (15.000 g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 x Laemmli-Probenpuffer gelöst, 3 min auf 90°C erhitzt und auf ein Gel der Größe 12 cm x 19 cm x 0,1 cm aufgetragen. Es kamen ein 5 %-iges Sammelgel und ein 12 %-iges Trenngel in SDS-Laufpuffer zur Anwendung. Nach einem 75-minütigen Lauf bei 170 V wurden die Proteinbanden in einer Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemacht. Der Färbung von 20 min folgte die Entfärbung in 20 % Ethanol & 7,5 % Essigsäure. Die Nachweisgrenze beträgt 0,1 µg Protein.

5 % SDS-PAA-Sammelgel	12 % PAA-SDS-Trenngel	Coomassie blue-Lösung
1,25 ml 30 % Acrylamid-Mix	10 ml 30 % Acrylamid-Mix	50 % Ethanol
1,88 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	6,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	10 % Essigsäure
75 µl 10 % SDS	0,25 ml 10 % SDS	0,1 % Coomassie blue R250
4,21 ml Bidest.	8,23 ml Bidest.	
75 µl 10 % APS	0,25 ml 10 % APS	
7,5 µl TEMED	25 µl TEMED	
7,5 ml Σ	25 ml Σ	

### 3.2.2.4 Native Polyacrylamidgele

Die Bindung der *Thermus flavus* 5S rRNA an das ribosomale Bindungsprotein TflL18 wurde in *Gel-Shift*-Experimenten untersucht. Um den RNA-Protein-Komplex nicht zu zerstören, mußte unter nativen Bedingungen gearbeitet werden. 5S rRNA-Varianten und das rekombinante Protein TflL18 wurden im molaren Verhältnis von 1:1 in 1 x TMK-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Komplex wurden 0,2 Volumenanteile DNA-Probenpuffer gegeben. Zur Beobachtung der Bandenverschiebung infolge 30 %-iger Molekulargewichtserhöhung bezüglich

#### 8 % natives PAA-Gel (Bindungsstudie):

8 ml 30 % Acrylamid / Bisacrylamid (36,5:1)  
 3 ml 10 x TBE-Puffer (10x)  
 ad 30 ml mit Bidest.  
 0,3 ml 10 % APS  
 30 µl TEMED

der 5S rRNA war ein 8 %-iges Gel der Größe 12 cm x 19 cm x 0,1 cm geeignet. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei 4°C und 150 V für maximal 5 h. Der Wildtyp der *Thermus flavus* 5S rRNA lief im nativen Zustand mit dem Xylencyanol-Marker. Angefärbt wurde die RNA mit Ethidiumbromid.

### 3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1 Optische Dichte

UV-Licht führt zur Anregung zyklisch konjugierter  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen und bewirkt den Elektronenübergang in das nichtbesetzte  $\pi^*$ -Orbital. An das Chromophor gebundene Auxochrome bestimmen die Bathochromie. Nukleinsäuren besitzen bei Wellenlängen um 260 nm ein Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde in Quarzküvetten ein Spektrum der optischen Dichte zwischen 220 und 300 nm aufgenommen. Der Wert der Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) dient als Grundlage für die Abschätzung der Konzentration unter der Voraussetzung einer Schichtdicke von 1 cm (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  läßt auf die Reinheit der Nukleinsäurelösung schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

#### Umrechnungsfaktoren:

- 1  $A_{260}$  doppelsträngige DNA  $\cong$  50  $\mu\text{g/ml}$
- 1  $A_{260}$  einzelsträngige DNA  $\cong$  33  $\mu\text{g/ml}$
- 1  $A_{260}$  RNA  $\cong$  40  $\mu\text{g/ml}$

#### 3.2.3.2 Lambert-Beersches Gesetz

Die Intensität der Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$E = \varepsilon * c * d \quad (3-1)$$

Extinktion E und Konzentration c sind in verdünnten Lösungen (mit  $c < 0,01$  mol/l) und für Extinktionswerte kleiner 0,8 linear proportional. Der spezifische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist eine bei der Wellenlänge  $\lambda$  charakteristische Stoffkonstante. Ist  $\varepsilon$  bekannt, kann mit dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration des Stoffes in Lösung berechnet werden. Eine genaue Konzentrationsangabe war insbesondere für die Hybridisierung von RNA-Strängen vor der Kristallisation von essentieller Bedeutung. Da bisher Möglichkeiten einer exakten theoretischen Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten eines Oligoribonukleotids fehlen, wurde der folgende Weg einer indirekten experimentellen Ermittlung gewählt:

Durch alkalische Hydrolyse in 0,1 M NaOH ließen sich RNA-Oligonukleotide in ihre 2'- und 3'-Nukleosidmonophosphate spalten. Die Summe der Produkte aus dem spezifischen Extinktionskoeffizient eines 2'- & 3'-NMP-Gemischs und der jeweiligen Häufigkeit des

Nukleotids im RNA-Oligonukleotid ergibt den spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_h$  für das hydrolysierte Oligoribonukleotid. Mit  $\epsilon_h$  und dem gemessenen  $E_{260}$ -Wert des hydrolysierten RNA-Oligonukleotides kann über das Lambert-Beersche Gesetz (3-1) die Konzentration berechnet werden, die nach dem Massenerhaltungsgesetz der des intakten

#### Alkalische Hydrolyse:

2  $\mu$ l RNA-Oligo (< 0,2 OD)  
 23  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
 25  $\mu$ l 0,1 M NaOH  
 → Hydrolyse: 45 min, 90°C  
 25  $\mu$ l 0,1 M HCl  
 100  $\mu$ l Phosphat-Puffer  
 825  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
 →  $E_{260}$ -Messung in 1 ml -Küvette

RNA-Oligonukleotides entspricht. Bei wiederholter Verwendung des gleichen Oligoribonukleotids (aus verschiedenen Synthesen) war es zweckmäßig, aus dem  $E_{260}$ -Verhältnis von intakter zu hydrolysiert RNA, multipliziert mit  $\epsilon_h$ , den spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_i$  des intakten Oligoribonukleotids zu berechnen. Für die Rechenschritte wurde die Datenmaske ALKABRID unter Excel programmiert (siehe Anlage).

Der spezifische Extinktionskoeffizient eines Gemisches aus 2'- und 3'-NMP wurde für jede der vier Basen vorab bestimmt, indem äquimolare Mengen der Spaltprodukte (Sigma) gemischt und die Extinktion bei 260 nm gemessen wurde. Die Extinktion einer 1 M Lösung entsprach dem spezifischen Extinktionskoeffizienten.

#### $\epsilon$ für äquimolare Gemische aus 2'- und 3'-NMP:

- $\epsilon_G = 11794$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_C = 7308$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_A = 15385$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_U = 9804$  l/(mol\*cm)

### 3.2.3.3 Integration von HPLC-Peaks

Die Quantifizierung chromatographischer Peaks diente der Qualitätskontrolle der Basenzusammensetzung von synthetisch hergestellten Oligoribonukleotiden. Das aus einem vollständigen RNase T<sub>2</sub>-Verdau plus anschließender Dephosphorylierung hervorgegangene Gemisch einzelner Nucleoside wurde auf der rpHPLC analysiert (Gradient siehe 3.2.1.6). Unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktionskoeffizienten der Nucleoside korrespondierten die durch Integration erhaltenen Peakflächen  $A$  mit der Konzentration. Sofern kein Standard benutzt wurde, konnte über die Formel (3-2) für jedes Nucleosid seine Häufigkeit im RNA-Oligonukleotid berechnet werden:

#### $\epsilon_{\text{Nucleosid}}$ (Fasman, 1975):

- $\epsilon_G = 13600$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_C = 9100$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_A = 14900$  l/(mol\*cm)
- $\epsilon_U = 10100$  l/(mol\*cm)

$$\text{Anzahl}_{\text{Nucleosid}} = \frac{\frac{A_{\text{Nucleosid}}}{\epsilon_{\text{Nucleosid}}}}{\frac{A_G}{\epsilon_G} + \frac{A_C}{\epsilon_C} + \frac{A_A}{\epsilon_A} + \frac{A_U}{\epsilon_U}} * \text{Länge}_{\text{RNA-Oligo}} \quad (3-2)$$

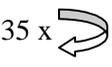
### 3.2.4 DNA-Amplifikation und Mutagenese

**Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)** ist eine effiziente Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. DNA-Polymerasen benötigen einen Primer mit einer freien 3'-OH-Gruppe, da sie nicht in der Lage sind, DNA-Ketten *de novo* zu synthetisieren. Als ein Grund wird die obligatorische Überprüfung des vorhergehenden Basenpaares durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität angesehen. Zwei Primersequenzen werden so gewählt, daß sie komplementär zu den jeweiligen 3'-Enden des codogenen und nichtcodogenen Template-Stranges sind. Durch Hybridisierung der Primer an die hitzedenaturierten Template-Stränge werden folglich das terminale 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definiert. Die Primer werden matritzenabhängig von einer thermostabilen DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung verlängert. Im Ergebnis sind aus einem dsDNA-Template zwei dsDNA-Fragmente entstanden, die nun wiederum selbst als Template fungieren. Die mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus, bestehend aus den drei Temperaturschritten Denaturierung, Annealing und Elongation, führt zur exponentiellen Anreicherung der DNA.

In Abhängigkeit von der Template-Beschaffenheit sowie den Anforderungen an das PCR-Produkt wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Der *KlenTaq*-LA Polymerase Mix enthält zu 99,4 % eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) ohne N-Terminus und ohne 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität, aber auch eine vergleichsweise hohe Fehlerrate aus. Einsatzgebiete waren die analytische PCR sowie die Zwischenklonierung ribosomaler Bindungsproteine ins pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Plasmid, welche die template-unabhängige terminale *Taq* Transferaseaktivität erforderte. Eine 6-mal höhere Genauigkeit im Vergleich zur *Taq* DNA-Polymerase weist die *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* auf, was sie für akkurate DNA-

#### Advantage<sup>®</sup>-GC Genomic PCR von Tfil18 (25µl):

12,4 µl Bidest.  
 2,5 µl *KlenTaq*-Puffer (10x inkl. 50 % DMSO)  
 0,5 µl 50 mM dNTPs (je 12,5 mM)  
 1,0 µl 10 µM 5'-Primer 1  
 1,0 µl 10 µM 3'-Primer 2  
 0,5 µl Polymerase-Mix (50x)  
 1,0 µl Template<sub>genomisch</sub> (10-100 ng)  
 1,1 µl 25 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>  
 5,0 µl 5 M GC-Melt

94°C	30 s	DNA-Denaturierung & Dissoziation <i>Th</i> Start-Antikörper	
94°C	15 s	Denaturierung	
65°C	85 s	Annealing	35 x 
71°C	45 s	Elongation	
71°C	6 min	Finale Extension	

#### *Pfu* PCR der 5S rRNA:

18,5 µl Bidest.  
 2,5 µl *Pfu*-Puffer (10x)  
 0,5 µl 50 mM dNTPs  
 1,0 µl 10 µM 5'-Primer 3  
 1,0 µl 10 µM 3'-Primer 4  
 0,5 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U/µl)  
 1,0 µl Template<sub>Oligo</sub> (100 ng)

94°C	30 s	Denaturierung	
94°C	15 s	Denaturierung	
67°C	80 s	Annealing	27 x 
70°C	30 s	Elongation	
70°C	6 min	Finale Extension	

Amplifikationen zur Klonierung, Transkription oder Genexpression prädestinierte. Ihre 3' → 5'-Exonukleaseaktivität beinhaltet einen Kontroll- und Korrekturmechanismus betreffs der letzten 3'-Basenpaarung. Der Advantage<sup>®</sup>-GC Genomic Polymerase Mix von Clontech besteht aus der *Tth* DNA-Polymerase, ergänzt um eine zweite mit 3' → 5' *proofreading*-Aktivität. In Kombination mit dem GC-Melt und einem DMSO-haltigen Puffer eignete sich der Mix insbesondere für die Amplifikation GC-reicher genomischer Templates, wie sie in thermophilen Bakterien anzutreffen sind.

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Aufreinigung der Produktbande erfolgte aus dem Gel oder direkt aus der Lösung mit dem Pharmacia *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (siehe 3.1.2.7).

Die analytische **Kolonie-PCR** stellt ein hervorragendes Werkzeug dar, um in Rekombinationsexperimenten mit erwarteten geringen Effizienzen eine Vielzahl von Klonen auf ein positives Insert zu screenen. Die Methode umgeht das Animpfen einer Flüssigkultur und die Plasmidisolierung zwecks Restriktionsanalyse. Stattdessen hybridisieren zwei Primer stromaufwärts und stromabwärts der multiplen Klonierungsstelle des Vektors. Das determinierte intermediäre DNA-Fragment wird in der PCR amplifiziert. Die Analyse im Agarosegel zeigt im positiven Fall eine Bandenverschiebung, die der Insertgröße entspricht.

Die Kolonien wurden mit einer sterilen Impfpöse von der LB-Agarplatte gepickt und in 100 µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) suspendiert. 2 µl wurden in der PCR als Template eingesetzt. Der erste

Temperaturschritt war deutlich verlängert, um einen hinreichenden Zellaufschluß und das Aufschmelzen der DNA zu erreichen. Eine um 30 % erhöhte Annealing-Zeit berücksichtigte die durch Zellpartikel ggf. erschwerte Primerdiffusion sowie DNA-DNA-Wechselwirkung. Die Elongationsphase blieb konstant, um unspezifische Nebenprodukte zu vermeiden. Mit den bei 4°C gelagerten 98 µl Zellen konnte nachfolgend die Flüssigkultur angeimpft

**KlenTaq Kolonie-PCR von Tfil18 (25 µl):**

17,3 µl Bidest.  
 2,5 µl KlenTaq-Puffer (10x)  
 0,5 µl 50 mM dNTPs (je 12,5 mM)  
 1,0 µl 10 µM 5'-Primer 5  
 1,0 µl 10 µM 3'-Primer 6  
 0,7 µl KlenTaq-Polymerase  
 2,0 µl Template<sub>Zellen</sub>

94°C	5 min	Zellaufschluß, DNA-Denaturierung & Dissoziation TaqStart-Antikörper	
94°C	22 s	Denaturierung	25 x 
71°C	110 s	Annealing	
72°C	45 s	Elongation	
72°C	7 min	Finale Extension	

werden, sofern der Klon im Gel als positiv identifiziert worden war.

Eine weitere PCR-Variante, **die *in-vitro* Vektormutagenese**, ersetzt ein erneutes Klonieren der Zielsequenz ins Plasmid. Stattdessen werden Substitutionen, Insertionen und/oder Deletionen durch vollständige Strangamplifikation mit Primern, die die gewünschten Mutationen tragen, ins Plasmid eingeführt. Für Modifikationen von bis zu 17 Basen wurde nach dem QuikChange™-Prinzip verfahren (Papworth *et al.*, 1995). An die Primer werden folgende Anforderungen gestellt:

1. Sie sind zueinander komplementär.
2. Beide Primer enthalten die gewünschte Mutation, die sich in ihrer Mitte befindet.
3. Die minimale Primerlänge ist 25 Basen; mindestens 10 Basen beidseitig der Mutation entsprechen exakt der Plasmidsequenz.
4. Der GC-Gehalt sollte über 40 % liegen.
5. Die Primer enden 3'-terminal mit Cytosin oder Guanin.
6. Die Schmelztemperatur  $T_m$  beträgt ca. 78°C. Sie wird nach der empirischen G/C-Regel abgeschätzt:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 0,41 * \text{GC}[\%] - \frac{675}{\text{Primerlänge}} - \text{Mismatch}[\%] \quad (3-3)$$

Die Primer hybridisierten an der gleichen Position der entgegengesetzten Stränge jeweils komplementär (Abb. 4.3). Die Einzelstränge wurden in der PCR linear amplifiziert; die Synthese stoppte genau nach einer Umrundung des Matrizen-Stranges. Über die Primersequenz war die Mutation am 5'-Ende des Einzelstrangs vorhanden. Denaturierung und Annealing in den folgenden PCR-Zyklen bedingten nicht nur eine Primerhybridierung, sondern auch die Rehybridisierung komplementärer synthetisierter Einzelstränge zu einem neuen Plasmid mit zwei Einzelstrangbrüchen, das transformierbar war. Das Eltern-Plasmid sowie Hybride aus Matrize und mutiertem Strang wurden nach der PCR mittels 0,5 µl *Dpn* I (20 U/µl) in kleine Bruchstücke zerlegt. Dieses Restriktionsenzym schneidet seine Erkennungssequenz nur, wenn sie in *E. coli dam* methyliert wurde. 2 bis 8 µl Ansatz wurden direkt in kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert.

#### QuikChange™ PCR (50 µl):

39,4 µl Bidest.  
 5,0 µl *Pfu*-Puffer (10x)  
 1,0 µl 10 mM dNTPs (je 2,5 mM)  
 1,3 µl 10 µM 30-mer Primer 7 (~130 ng)  
 1,3 µl 10 µM 30-mer Primer 8 (~130 ng)  
 1,0 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U/µl)  
 1,0 µl Template<sub>Plasmid</sub> (50 ng)

95°C	30 s	Denaturierung	
95°C	30 s	Denaturierung	
55°C	60 s	Annealing	12-18 x
68°C	2 min/kb	Elongation	

Waren größere Insertionen und/oder Deletionen beabsichtigt, empfahl sich Stratagenes ExSite™-System. Das Primerdesign unterscheidet sich gegenüber QuikChange™ in den folgenden Punkten:

1. Die Primer sind zueinander nicht komplementär.
2. Nur ein Primer trägt am 5'-Ende die Insertionssequenz.
3. Die minimale Primerlänge beträgt 20 Basen; mindestens 15 Basen am 3'-Ende entsprechen exakt der Plasmidsequenz.
7. Die Primer werden phosphoryliert.

Die Primer hybridisierten versetzt an den entgegengesetzten Plasmidsträngen (Abb. 4.3). Nukleotide zwischen den 5'-Enden der Primer wurden in der PCR deletiert, nichtkomplementäre Nukleotide am 5'-Ende inseriert. Der zur Amplifikation verwendete *TaqPlus* Long PCR-Mix (für schwierige und lange Templates) enthielt Stratagenes *Taq2000*- und die *Pfu* DNA-Polymerase. Der PCR schlossen sich der Verdau des Eltern-Plasmids mit 1,2 µl *Dpn* I

#### ExSite™ PCR (35 µl):

12,4 µl Bidest.  
 3,5 µl *TaqPlus* Long-Puffer (10x)  
 0,7 µl 50 mM dNTPs (je 12,5 mM)  
 5,0 µl Primer-Mix 9/10 (je 21 pmol; 3.2.5.2)  
 1,4 µl *TaqPlus* Long-Polymerase (5 U/µl)  
 12,0 µl Template<sub>pUC18</sub> (0,7 pmol ~ 1,3 µg)

94°C 4 min Denaturierung

50°C 2 min Annealing

72°C 2 min Elongation

94°C 1 min Denaturierung

56°C 2 min Annealing

72°C 1 min Elongation

72°C 5 min Finale Extension



(20 U/µl; 37°C, 30 min) und das Entfernen überhängender Basen am 3'-Ende mit 0,6 µl *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/µl; 72°C, 30 min) an. Jeweils 5 µl Probe wurden nach der PCR und dem *Dpn* I-Verdau in der Gelelektrophorese analysiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl Bidest., 10 µl *TaqPlus* Long-Puffer und 5 µl 10 mM ATP zum Ansatz. Ein Aliquot von 15 µl wurde durch 3 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl) innerhalb einer Stunde bei 37°C ligiert. 5 bis 10 µl Ligationsreaktion wurden in kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert.

## 3.2.5 *in-vitro* Rekombination und Klonierung

### 3.2.5.1 Dephosphorylierung des Vektors

Die *in-vitro* Rekombination beinhaltet den Austausch genetischer Information über Art- und Gattungsgrenzen hinweg. Zum Einschleusen spezifischer Gene, insbesondere für die produktbezogene, selektive Rekombination, werden Plasmide als Vehikel benutzt. Sowohl

das Plasmid als auch das DNA-Insert werden mit der gleichen Restriktionsendonuklease spezifisch geschnitten. Zur Vermeidung einer Rezirkulation des linearisierten Plasmids oder der multiplen Verknüpfung über kompatible Enden mit sich selbst in der Ligationsreaktion wird die 5'-Phosphatgruppe entfernt. Die Dephosphorylierung wird von der zinkabhängigen Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) katalysiert. Da die Alkalische Phosphatase in den Restriktionspuffern NEB2, 3 und 4 aktiv ist, konnte nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme sofort weitergearbeitet werden. Für kohäsive 5'-Enden (*sticky ends*) wurden 0,1 Units CIP

**Vektor-Dephosphorylierung:**

26,4 µl Plasmid (10 µg) in H<sub>2</sub>O  
(pTYB12: *Nde* I / *Xho* I-Restriktion)  
3,2 µl NEB3-Puffer (10x)  
2,4 µl CIP (10 U/µl)  
→ 60 min, 37°C  
0,32 µl 0,5 M EDTA (pH 8.0)  
→ 10 min, 75°C

pro Picomol DNA-Ende, für kohäsive 3'-Enden sowie glatte Enden (*blunt ends*) 1 Unit pro Picomol verwendet. Die Alkalische Phosphatase konnte innerhalb von 10 min bei 75 °C und in Gegenwart von 5 mM EDTA (pH 8.0) inaktiviert werden. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde in Abhängigkeit von der Fragmentzahl bzw. deren Größe direkt oder nach einem präparativen Agarosegel mit dem *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* aufgereinigt. Die Schritte für die direkte Aufreinigung aus der Lösung entsprachen den unter Gelelution beschriebenen (Abschnitt 3.2.1.7), beginnend mit 500 µl *Capture*-Puffer für max. 100 µl DNA.

### 3.2.5.2 Phosphorylierung des Inserts

In der PCR amplifizierte DNA-Produkte besitzen keine 5'-Phosphatgruppe, so daß die Dephosphorylierung des Vektors folglich ihre Insertion ausschließen würde. Deshalb wird vor der DNA-Amplifikation mit Hilfe der T4 Polynukleotid-Kinase die  $\gamma$ -ständige Phosphatgruppe von ATP-Molekülen mit der freien 5'-Hydroxylgruppe der Oligonukleotid-Primer verestert. Nebenstehender Reaktionsansatz wurde 40 min bei 37°C inkubiert, bevor die Kinase bei 94°C über 5 min inaktiviert werden konnte. Aufgrund einer hinreichend großen Verdünnung des Phosphorylierungsansatzes in der PCR war eine Aufreinigung nicht notwendig.

**10 µl Phosphorylierungsansatz für****ExSite™-Vektormutagenese:**

2,8 µl Primer 9 (15 µM)  
2,8 µl Primer 10 (15 µM)  
1,0 µl T4 Kinase-Puffer (10x)  
1,0 µl ATP (10 mM)  
1,4 µl Bidest.  
1,0 µl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)

### 3.2.5.3 DNA-Ligation

In der Ligation wird ein DNA-Fragment in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors inseriert, in deren Ergebnis ein rezirkularisiertes Plasmid entsteht. Die neue Knüpfung der Phosphodiesterbindung durch die T4 DNA-Ligase unter Verbrauch von ATP entspricht der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, die verschiedene 5'- und 3'-Enden erzeugen, ist eine gezielte Insertion in nur einer Orientierung gegeben. Standardmäßig erfolgten pro Ligation drei Ansätze: eine Religationskontrolle ohne Insert sowie zwei Ansätze mit unterschiedlichen Mengen an Insert in einem molaren Vektor-zu-Insert-Verhältnis von 1:1 und 1:3. Ligiert wurde bei 16°C ÜN.

**Ligation:**

a µl Plasmid (300 ng)  
b µl Insert  
2 µl T4 Ligase-Puffer (10x)  
3 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl)  
ad 20 µl mit Bidest.

Für eine vereinfachte Zwischenklonierung von PCR-Produkten beim Fischen ribosomaler Bindungsproteine der 5S rRNA kam der TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit zum Einsatz. Die *KlenTaq*-Polymerase besitzt eine template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität, die einen 3'-Überhang eines einzelnen Desoxyadenylats verursacht. Dieses PCR-Produkt kann in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO ligiert werden, der je ein überlappendes Desoxythymidylat an seinen 3'-Enden trägt. Die Ligation wird durch Topoisomerase I in 5 min bei RT katalysiert.

### 3.2.5.4 Transformation kompetenter Zellen

Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit, fremde DNA in die Zelle aufzunehmen. Im Gegensatz zur Konjugation (direkter Kontakt F<sup>+</sup>-Zelle → F<sup>-</sup>-Zelle) oder zur Transduktion (via Bakteriophagen) wird bei der Transformation freie, lösliche DNA in ein Empfängerbakterium übertragen. Infolge der variablen Zelloberfläche während des Wachstums, kann DNA nur innerhalb einer kurzen Zeitspanne in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase adsorbiert werden. Durch Behandlung mit Kalziumchlorid oder durch Elektroporation können gezielt kompetente Zellen hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde auf das Protokoll von Chung *et al.* (1989) zurückgegriffen, das auf einer PEG-vermittelten Kompetenzsteigerung basiert. 10 ml M9-Flüssigmedium wurden mit *E. coli* JM109-Zellen von M9-Agarplatten angeimpft (37°C, 200 rpm, ÜN). Mittels Minimalmedium wird auf den Erhalt des F<sup>'</sup>-Episoms in der Zelle selektiert und auf diese Weise die Anzahl falsch-positiver Klone reduziert. Das F<sup>'</sup>-Episom trägt das im Genom deletierte proAB-Gen und komplementiert dadurch die für ein Wachstum im Minimalmedium essentielle Prolin-Biosynthese. 50 ml LB-Medium wurden mit

1 ml Vorkultur angeimpft. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,3 bis 0,4 konnten die Zellen 10 min bei 1000 g und 4°C pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 5 ml TSS-Lösung (das entspricht einem Zehntel des Kulturvolumens) resuspendiert werden. Aliquote von je 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

1 bis 10 µl Ligationsansatz wurden zu einem Aliquot kompetenter Zellen gegeben und zur Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche 30 min auf Eis gestellt. Während des Hitzeschocks von 42°C für 45 s erfolgte die Aufnahme der DNA in die Zellen. Nach weiteren 10 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und die Zellen zwecks Expression der Ampicillinresistenz 1 h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt (500 rpm). Sofern größere Volumina als max. 200 µl ausplattiert werden sollten, mußten die Zellen abzentrifugiert (10 min, 1000 g) und nachfolgend in 100 µl LB-Medium resuspendiert werden. Der Drigalski-Spatel wurde in 70 % Ethanol getaucht, abgeflammt und unter leichtem Drehen der LB-Agarplatte die Zellsuspension gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank (max. 16 h zur Verhinderung von Satellitenkolonien). Die Transformationseffizienz der JM109-Zellen belief sich auf etwa  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro Mikrogramm Plasmid-DNA. Das war ausreichend für Standardklonierungen der 5S rDNA, von ribosomalen 5S RNA Bindungsproteinen sowie nach *in-vitro* Vektormutagenesen.

Für anspruchsvollere Klonierungen, wie die Insertion von TflL18 ins 7.2 kp große Expressionsplasmid der pTYB-Serie mit einem Insert-zu-Vektor-Größenverhältnis von über 1:21, waren ultrakompetente Zellen XL10-Gold (Stratagene) mit Transformationseffizienzen von mindestens  $5 \cdot 10^9$  Kolonien je Mikrogramm pUC18 zu wählen. Für die *in-vivo* Synthese von TflL18 mußten die Expressionsstämme *E. coli* B ER2566 (NEB) und Epicurian Coli® BL21-CodonPlus (DE3)-RP transformiert werden. Als wesentlicher Unterschied zum obigen Protokoll wurden die Epicurian Coli® zunächst mit β-Mercaptoethanol 10 min auf Eis inkubiert (Endkonzentration etwa 25 mM). Die genaue Verfahrensweise ist dem jeweiligen *Stratagene Manual* zu entnehmen.

### 3.2.5.5 Selektion

Nur ein kleiner Teil der Bakterien nimmt ein Plasmid auf, das wiederum nur zu einem geringen Prozentsatz die gewünschte Insertion enthält. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, durch geeignete genetische Systeme die positiven Klone zu selektieren. Ampicillinhaltige LB-Agarplatten ermöglichen ausschließlich transformierten Bakterien, die eine plasmid-codierte Ampicillinresistenz erworben haben, ein Wachstum. Über ein Blau-/Weiß-Screening, das die Umsetzung von X-Gal in einen blauen Farbstoff beinhaltet, gelingt die Unterscheidung zwischen Religanden und rekombinanten Klonen nach folgendem Prinzip: Die verwendeten

Bakterienstämme tragen auf dem F'-Episom die genetischen Marker *lacZ*ΔM15 und *lacI*<sup>q</sup>, die eine partielle Deletion des β-D-Galactosidase-Gens und eine Überproduktion des Lac-Repressors bewirken. Auf dem Plasmid liegt das *lacZ'*-Gen, das das fehlende α-Peptid der β-Galactosidase inklusive der *multiple cloning site* enthält. Handelt es sich um ein religiertes Plasmid ohne Insert, wird die β-Galactosidase durch das plasmid-codierte α-Peptid komplementiert, so daß nach IPTG-Induktion das exprimierte Enzym X-Gal spaltet (α-Komplementation). Die Religanden erscheinen blau, während positive Klone weiß bleiben. 40 µl X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid, im Dunkeln zu lagern!) und 40 µl 100 mM IPTG wurden 30 min vor dem Ausplattieren der Zellsuspension auf der Agarplatte verteilt und auf 37°C im Brutschrank erwärmt.

### 3.2.5.6 Zellanzucht im Flüssigmedium

Mittels einer sterilen, abgeflamnten Impföse erfolgte das Picken von Einzelkolonien und deren Resuspendierung in Erlenmeyerkolben mit LB-Medium. Für die Plasmid-Stabilität und ein Wachstum in Monokultur wurde Ampicillin (Stammlösung: 100 mM) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin zum Medium gegeben. Für einen verbesserten Sauerstoffeintrag sorgten Kolben mit Schikanen. Die Kultivierung erfolgte im Schüttler bei 200 bis 250 rpm und 37°C ÜN. Für die Lagerung positiver Klone bei -20°C wurde ein *Glycerin Stock* angelegt, der Zellen in 30 % Glycerin enthielt.

### 3.2.5.7 Plasmid-Präparation

Zur Kontrolle der *in-vitro* Rekombination mußte das Plasmid aus der Zelle isoliert werden. Verwendung fanden kommerzielle *Spin Kits* der Firma Genomed, deren Vorteil eine direkte Säulenuktion des Plasmids ohne Ethanol-Fällung ist. Maximal 5 ml Zellen wurden in PPN-Röhrchen abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min) und in 210 µl JETQUICK-Resuspensionspuffer homogenisiert. Nach Zugabe von 210 µl Lyse-Puffer konnten die Zellen 5 min aufgeschlossen werden. 280 µl Neutralisationslösung (3 M Natriumacetat, pH 4,8, und Guanidinhydrochlorid unbekannter Konzentration) und eine 10-minütige Zentrifugation (14.000 rpm) präzipitierten Proteine und die denaturierte chromosomale DNA. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säule pipettiert, an die das Plasmid während einer 1-minütigen Zentrifugation adsorbierte. Das Plasmid wurde mit 700 µl Wasch- und Rekonstitutionslösung (aus Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl) versetzt und zweimal 1 min zentrifugiert. 50 µl Bidest. – vorab auf 70°C erwärmt – verblieben für 1 min auf die Säule, bevor 3 bis 5 µg Plasmid durch Zentrifugation eluiert wurden (14.000 rpm, 2 min).

Mit dem analogen JETSPIN-Kit konnten präparative Plasmidmengen von bis zu 100 µg für die *in-vitro* Transkription aus max. 25 ml Kulturvolumen isoliert werden. Die Zellresuspensionslösung war RNase-frei.

### 3.2.5.8 Restriktionsspaltung

DNA-Doppelhelices werden durch Restriktionsendonukleasen spezifisch gespalten. Ihre ursprüngliche biologische Funktion beinhaltet die Spaltung von Fremd-DNA in der prokaryotischen Zelle, während die jeweiligen Erkennungsstellen der zelleigenen DNA durch Methylierung geschützt sind (Stryer, 1994).

Die gelelektrophoretische Auftrennung restringierter DNA-Fragmente ermöglicht über die Größenbestimmung Rückschlüsse auf erfolgte Insertionen und/oder Deletionen sowie auf die Orientierung von DNA-Abschnitten nach der *in-vitro* Rekombination. Darüber hinaus können Mutationen innerhalb der Restriktionsschnittstelle nachgewiesen werden. Die Restriktionsendonukleasen der Klasse II erkennen spezifisch palindrome Sequenzen aus 4 bis 8 nt, innerhalb derer die beiden Stränge symmetrisch geschnitten werden. Im Gegensatz dazu enthalten die spezifischen Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen der Klasse III keine Palindrome, und die Restriktion geschieht in definierter Entfernung innerhalb einer unspezifischen Basensequenz. Diese Enzyme sind insbesondere bei der Linearisierung des Plasmid-Templates für die *run-off* Transkription von Vorteil, da das 3'-Ende des Transkripts seine native Sequenz behält.

Für einen quantitativen Verdau wurden 2 bis 2,5 Units Enzym je Mikrogramm DNA ÜN inkubiert. Für eine qualitative Restriktionsanalyse reichten 2 h. Die Zugabe von BSA sowie höhere Temperaturen führen bei einigen Enzymen zur

**37 µl Restriktionsansatz für  
100 µl *run-off* Transkription:**  
2,5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)  
27,1 µl Plasmid (10 µg) in Bidest.  
3,7 µl Restriktionspuffer NEB4 (10x)  
3,7 µl BSA (1 mg/ml)

Aktivitätssteigerung. Abweichungen von den idealen Reaktionsbedingungen, zu denen hohe Glycerin- (> 5 %) und Enzymkonzentrationen (> 100 U/µg), geringe Ionenstärken (< 25 mM) inklusive fehlendes Magnesium, hohe pH-Werte (> 8.0) oder organische Lösungsmittel zählen, können in „*star activity*“ resultieren. Die Folge sind unspezifische Spaltungen an der der Erkennungsschnittstelle ähnlichen Sequenzen oder eine deutlich verringerte Aktivität.

Die Notwendigkeit einer Hitzeinaktivierung sowie der Entfernung von Pufferkomponenten und Enzym ergab sich aus der nachfolgenden Anwendung.

### 3.2.5.9 DNA-Sequenzierung

Die Desoxy-Methode nach Sanger basiert auf der kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Replikation durch 2',3'-Dideoxynucleotida, deren Einbau das weitere Kettenwachstum blockiert (Sanger *et al.*, 1977). Die Reaktion wird in vier parallelen Ansätzen durchgeführt, die jeweils in der Farbe der kovalenten Fluoreszenzmarkierung am Primer sowie dem 2',3'-Dideoxynucleotid variieren. Nach der Hybridisierung an das DNA-Template wird der Sequenzierprimer durch eine DNA-Polymerase verlängert. Unter statistisch optimierten Bedingungen, die im wesentlichen einen Unterschuss des 2',3'-Dideoxynucleotids gegenüber den 2'-Monodesoxy-NTPs beinhalten, kommt es für die jeweilige Base an jeder ihrer Positionen im DNA-Template zum Kettenabbruch. Im Ergebnis entstehen Fragmente verschiedener Länge mit einem Dideoxynucleotid am 3'-Ende. Die vier Reaktionsgemische werden vereinigt und im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand der Fluoreszenz werden die Banden am Ende des Gels detektiert und einer Base zugeordnet. Die Farbsequenz korrespondiert direkt mit der Basensequenz des Komplementärstrangs in 5' → 3'-Richtung.

Für die Sequenzierreaktion wurden 15 µl Plasmid-DNA (200 ng/µl) und 5 µl Primer (10 µM) benötigt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

### 3.2.6 *in-vitro* Transkription

RNA-Polymerasen transkribieren eine DNA-Matrize in ihre komplementäre RNA-Sequenz. Die Transkription beginnt an spezifischen Initiationsstellen, die homologe Sequenzbereiche aufweisen. So setzen sich prokaryotische Promotoren aus der Pribnow-Box und der -35-Sequenz zusammen. Die Transkription wird durch Sekundärstrukturen, wie eine Haarnadelschleife, der mehrere Uridine folgen, terminiert.

Für die *in-vitro* Transkription werden vorzugsweise Bakteriophagensysteme genutzt (Milligan *et al.*, 1987). Bei der T7-Transkription erkennt die aus dem gleichnamigen Bakteriophagen isolierte DNA-abhängige RNA-Polymerase spezifisch 17 Basenpaare. Als Initiationsnukleotid des RNA-Transkripts ist Guanosin essentiell. *In-vitro* handelt es sich um eine *run-off* Transkription, d. h. die RNA-Polymerase dissoziiert am 3'-Ende der DNA-Matrize ab. Das 3'-Ende von Plasmiden wird durch Linearisierung mit einem Restriktionsenzym definiert (Abb. 4.2). Dabei sind einzelsträngige 3'-Überhänge sowie Natrium-Ionen im Restriktionspuffer zu vermeiden, da ersteres längere Transkripte durch Polymerase-Umkehr und letzteres eine Inhibierung der RNA-Polymerase zur Folge haben kann.

<b>RiboMAX™-T7 (100 µl):</b>	<b>Riboprobe®-T7 (100 µl):</b>	<b>Therm. Transkription (100 µl):</b>
20 µl RiboMAX-Puffer (5x)	20,0 µl Riboprobe-Puffer (5x)	20 µl <i>Thermus</i> -Puffer (5x)
3 µl rRNasin (40 U/µl)	2,5 µl rRNasin (40 U/µl)	4 µl rRNasin (40 U/µl)
30 µl rNTP-Mix (je 25 mM)	20,0 µl rNTP-Mix (je 2,5 mM)	29 µl rNTP-Mix (je 25 mM)
37 µl Plasmid (10 µg)	18,5 µl Plasmid (5 µg)	37 µl Plasmid (10 µg)
10 µl Enzym-Mix	2,0 µl T7 RNA-Polym. (20 U/µl)	10 µl <i>Th.</i> RNA-Polym. (2,5 U/µl)
	10,0 µl 100 mM DTT	
	27,0 µl Bidest.	
37°C, 3-21 h	37°C, 2 h	65°C, 2,5 h

Beispiele für die verwendeten Transkriptionssysteme sind in der Übersicht gegeben. Darüber hinaus kamen der RiboMAX™-T3 Kit (Pipettierschema analog zu T7) sowie RiboMAX-Puffer anstelle von *Thermus*-Puffer zum Einsatz. Der RiboMAX™-T7-Enzym-Mix enthält die T7 RNA-Polymerase, rRNasin® und inorganische Hefe-Pyrophosphatase in unbekanntenen Konzentrationen.

Nach der Transkription degradierte das DNA-Template unter Einwirkung von RQ1 DNase I (1 U/µl) in einer Endkonzentration von 1 Unit je Mikrogramm DNA bei 37°C. Der Verdau wurde nach 15 min mit 0,5 M EDTA (pH 6.3) gestoppt; die Endkonzentration an EDTA war 20 mM. Die Aufreinigung des Transkript erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion, Gelfiltration und Ethanol-Fällung. Die Konzentration wurde über die optische Dichte bei 260 nm erfaßt. Größe und Reinheit der RNA waren in der Gelelektrophorese ersichtlich.

### 3.2.7 Prozessierung von RNA

#### 3.2.7.1 3'-Prozessierung der 5S rRNA in der S100-Fraktion

Die S100-Enzymfraktion des Translationssystems enthält RNasen, die u.a. eine Prozessierung der beteiligten RNA-Komponenten, wie tRNAs, bewirken (Fuchs *et al.*, 1997). Deshalb wäre in diesem System auch eine *in-vitro* Reifung der 5S rRNA aus Primärtranskripten denkbar.

Die S100-Fraktion wurde von Michael Gerrits (RiNA GmbH, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung orientiert sich an der von Herrlich & Schweiger (1974) publizierten Methode. In einer 16-stündigen Zentrifugation des S30-Lysats (3.2.8.1) bei 100.000 g werden die Ribosomen sedimentiert. Durch Anionenaustauscherchromatographie werden Nukleinsäuren aus dem Überstand entfernt und das S100-Eluat abschließend gegen Translationspuffer dialysiert.

Die Wahl der Reaktionsbedingungen für die 5S rRNA-Prozessierung erfolgte in Anlehnung an die *in-vitro* Aminoacylierung von tRNAs. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Dem schlossen sich ein Proteinase K-Verdau und eine Ethanol-fällung an (siehe 3.2.1.3). Das RNA-Pellet wurde in 20 µl Bidest. gelöst und in der denaturierenden Harnstoff-PAGE analysiert.

**50 µl Prozessierungsansatz:**

25 µl 15 µM 5S rRNA-Precursor  
5 µl TL-Puffer (10x)  
5 µl 100 mM DTT  
3 µl E-Mix B (16,6x)  
4 µl S100-E96 (19 µg/µl)  
8 µl Bidest.

### 3.2.7.2 3'-Modifikation mit Phosphodiesterase I

Die Phosphodiesterase I wird aus Schlangengift isoliert (Richards *et al.*, 1965). Das Enzym katalysiert die schrittweise, exonukleolytische Hydrolyse des 3'-Endes von DNA oder RNA unter Freisetzung der 5'-Nucleosidmonophosphate. Bedingung für die 3'-Nucleotidase-Aktivität ist eine freie 3'-Hydroxylgruppe. Der Abbau der überhängenden 3'-Enden in einem Pool von 5S rRNA-Transkripten sollte in einem homogenen RNA-Produkt resultieren. 1 mg *Crotalus adamanteus* Phosphodiesterase I (39 U/mg) wurde in 1 ml 1,1 x Phosphodiesterase-Puffer mit 50 % Glycerin rehydriert. Zur 3D-Faltung wurden die RNA-Transkripte in 5 mM MgCl<sub>2</sub> auf 80°C erwärmt und langsam ÜN abgekühlt (Pan *et al.*, 1999). Der Reaktionsansatz setzte sich aus 1 bis 10 µg Transkript und 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>0</sup> Units Enzym in 1 x Phosphodiesterase-Puffer zusammen. Die Inkubationszeit bei 25°C schwankte zwischen 0,25 und 2 h. Die Hydrolyse wurde durch Proteinase K-Verdau der Phosphodiesterase I beendet und die RNA mit Ethanol gefällt. Alternativ war eine direkte Zugabe von RNA-Probenpuffer in den enzymatischen Ansatz mit einer anschließenden Hitzedenaturierung und Gelelektrophorese möglich.

### 3.2.7.3 RNA-Spaltung mit DNA-Enzym 10-23

Santoro & Joyce (1997) selektierten *in-vitro* mehrere Mg<sup>2+</sup>-abhängige DNA-Enzyme, die in der Lage sind, RNA-Substrate spezifisch zwischen einem ungepaarten Purin und einem gepaarten Pyrimidin zu spalten. Das DNA-Enzym 10-23 (der 23. Klon der 10. Runde) besteht aus einem katalytischen Zentrum von 15 Nucleotiden, das von zwei Substraterkennungsarmen flankiert wird. Es wurde zur Abspaltung heterogener 3'-Enden von 5S rRNA-Transkripten verwendet. Die Linearisierung des Plasmidtemplates erfolgte so, daß das Transkript am 3'-Ende ein -R↓Y(N)<sub>7-11</sub>-3'-Motiv enthält, das an der Pfeilmarkierung gespalten werden konnte. Zwecks Annealing wurde der Ansatz im vortemperierten Thermomixer von 90°C auf 37°C innerhalb von 20 min abgekühlt. Ein 10-facher molarer Überschuß des DNA-Enzyms zum

RNA-Transkript hatte das bevorzugte Entstehen von Hybrid-Helices gegenüber nativen RNA-Strukturen zum Ziel. Die Umsetzung erfolgte unter *single turnover* Bedingungen bei 37°C für 20 min. Die Zugabe von RNA-Probenpuffer stoppte die Reaktion. Die Analyse im 8 %-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel schloß sich an.

**DNA-Enzym Ansatz (15 µl):**

4,5 µl 1 x RNA-Transkript (5 µg)  
 1,5 µl DNA-Enzym-Puffer (10x)  
 5,0 µl 10 x DNA-Enzym (~1 nmol)  
 4,0 µl Bidest.

### 3.2.7.4 RNase H-Spaltung

Die *E. coli* Endoribonuclease H hydrolysiert spezifisch die Phosphodiesterbindungen eines RNA-DNA-Hybrids, wobei 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-terminierte Produkte entstehen. Weder einzelsträngige Nukleinsäuren (Ausnahme: Lima & Crooke, 1997) noch dsDNA oder dsRNA werden abgebaut. Diese Aktivität wird u. a. für Sekundär-/Tertiärstrukturanalysen von RNA-Molekülen herangezogen, da die Bindung von DNA-Oligonukleotiden an die RNA und die nachfolgende Spaltung durch RNase H eine Aussage über die Zugänglichkeit der RNA-Bereiche machen. In der vorliegenden Arbeit wurde damit die Bindung des DNA-Enzyms 10-23 an das 5S rRNA-Transkript nachgewiesen. Nach dem 20-minütigen Annealing im Temperaturgradienten von 90°C auf 37°C erfolgte die Zugabe von RNase H und eine Inkubation für weitere 20 min. Die Aktivität des DNA-Enzyms wurde von jener der RNase H überlagert.

**RNase H-Spaltung (15 µl):**

4,5 µl 1 x RNA-Transkript (5 µg)  
 3,0 µl RNase H-Puffer (5x)  
 5,0 µl 10 x DNA-Enzym 10-23 (~1 nmol)  
 2,5 µl RNase H (2 U/µl)

### 3.2.7.5 Nukleosidanalyse

Die *Aspergillus oryzae* Ribonuklease T<sub>2</sub> spaltet unspezifisch einzelsträngige 3',5'-verknüpfte Oligoribonukleotide unter Freisetzung von Nukleosid- bzw. Oligonukleotid-3'-phosphaten. Durch den Zusatz hinreichend großer Enzymmengen und langer Reaktionszeiten wurde eine totale enzymatische Hydrolyse des RNA-Oligonukleotids erzielt. Nach anschließender Dephosphorylierung lieferte die HPLC vier diskrete Nukleosid-Peaks, die integriert zur Bestimmung der Basenzusammensetzung dienten (vergleiche Abschnitt 3.2.3.3). Darüber hinaus kann durch die selektive 3',5'-Spaltung auch das Fehlen unerwünschter 2',5'-Verknüpfungen nach der Synthese überprüft werden.

**Nukleosidanalyse (20 µl):**

3,0 µl RNA-Oligo (≅ 0,2 OD)  
 10,0 µl RNase T2 (1 U/µl)  
 0,2 µl CIP (10 U/µl)  
 2,0 µl RNase T<sub>2</sub>-Puffer (10x)  
 4,8 µl Bidest.  
 → 1 h, 37°C

### 3.2.8 Proteinexpression von TflL18

#### 3.2.8.1 *in-vitro* Proteinbiosynthese

Gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktionen *in-vitro* werden im optimierten S30-System des *E. coli* Stamms D10 durchgeführt (Stiege & Erdmann, 1995). Für die Herstellung des S30-Lysats werden die Zellen im Hochdruckhomogenisator (Gaulin) aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 30.000 g abzentrifugiert. Die Inkubation des Überstands mit Energiekomponenten führt zur Beendigung der Translation aktiver Komplexe und der Freisetzung von mRNA, die degradiert. Abschließend wird dialysiert.

Sämtliche Komponenten für den nebenstehenden analytischen Ansatz wurden von Dr. Helmut Merck (RiNA GmbH, Berlin) bereitgestellt. Neben dem S-Mix waren der Translations-Mix (mit 19 Aminosäuren) sowie der Energie-Mix (mit Nukleotiden) enthalten. Rifampicin blockierte die Transkription der

#### 125 µl Ansatz TflL18-Intein:

12,4	µl	Bidest.
37,5	µl	S-Mix (2/2000)
32,5	µl	T-Mix (11/99)
10,0	µl	E-Mix D (12,5x)
0,13	µl	Rifampicin (20 g/l)
1,25	µl	T7 RNA Polymerase (50 U/µl)
3,75	µl	10 mM Leucin
12,5	µl	1 mM <sup>14</sup> C-Leucin (100 dpm/pmol)
15,0	µl	2 nM Plasmid pHMFA3xSRTR

endogenen RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach einer TCA-Fällung konnte der Einbau des radioaktiv markierten Leucins ins Protein zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Dazu wurden 3 ml Szintillationscocktail mit der Probe vermischt. Während der 20-minütigen Inkubation bei RT erfolgte die Anregung der Moleküle des Cocktails durch die radioaktive β-Strahlung. Die beim Übergang in den Grundzustand als Licht freigesetzte Energie wurde durch einen Photoelektronenvervielfacher verstärkt und gezählt. Die Proteinkonzentration berechnete sich wie folgt:

$$c_{\text{Protein}} [\mu\text{g} / \text{ml}] = \frac{dpm * MG_{\text{Protein}} [kDa]}{V_{\text{Probe}} [\mu\text{l}] * \text{Anzahl}_{\text{Leu}} * \text{Spez. Aktivität}_{\text{Leu}} [dpm / \text{pmol}]} \quad (3-4)$$

#### 3.2.8.2 *in-vivo* Überexpression

Zur Expression des ribosomalen Bindungsproteins TflL18 in *E. coli* wurde das IMPACT™-CN System gewählt. Der Vorteil dieses Systems liegt in einer zugleich einfachen wie effektiven Aufreinigung des Zielproteins in einem chromatographischen Schritt und dem Erhalt der annähernd nativen Proteinsequenz. Unter Kontrolle des T7-Promotors wird ein intrazelluläres Fusionsprotein, bestehend aus dem Zielprotein, Intein und einer chitinbindenden Domäne (CBD), exprimiert. Der fusionierte Precursor bindet über die CBD

hochaffin an die Affinitätsmatrix, deren Ligand immobilisiertes Chitin ist. In Gegenwart von Thiolen wird die spezifische Selbstspaltung des (mutierten) Inteins induziert. Hierbei handelt es sich um ein proteinspleißendes Element aus dem *Saccharomyces cerevisiae* *VMA1*-Gen. Intein bleibt über CBD an der Säule gebunden, so daß das Zielprotein eluiert werden kann.

Zur C-terminalen Fusion des Zielproteins mit Intein wurde das Tfil18-Gen ins Expressionsplasmid pTYB4 kloniert, während für die N-terminale Fusion pTYB12 verwendet wurde. Expressionsstämme waren *E. coli* B ER2566 oder Epicurian Coli<sup>®</sup> BL21-CodonPlus<sup>™</sup> (DE3)-RP. Im folgenden sind die optimierten Schritte für das Protein Tfil18 dargestellt; für methodische Details sei auf das korrespondierende *NEB-Manual* verwiesen. 0,5 l LB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Mit Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 37°C konnte die Proteinexpression mit 2,5 ml 100 mM IPTG (c<sub>End</sub> = 0,5 mM) induziert und bei 24°C 5 h fortgesetzt werden. Durch Bindung des Induktors IPTG erleidet der *lac*-Repressor eine Konformationsänderung, die seine Affinität zur Operator-DNA herabsetzt. Der beladene Repressor diffundiert vom *lac*-Operator ab und gibt damit den in unmittelbarer Nachbarschaft befindlichen T7-Promotor frei.

Die Zellen wurden im JA14-Rotor bei 5000 g und 4°C 20 min abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml IMPACT-Puffer resuspendiert und mit 250 µl 10 % Triton X-100 sowie 25 µl 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor) versetzt. Der mechanische Zellaufschluß auf Eis erfolgte durch 3 s Ultraschallimpulse in 2 s Intervallen und erstreckte sich über 5 min. Ein leicht gelblicher Zellextrakt wurde nach der Zentrifugation (JA14, 12.000 g, 4°C, 30 min) in 30 ml Corex-Röhrchen erhalten.

Die Säule (Ø 2,5 cm x 18 cm) war je 20 min mit 1 % SDS sowie 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Entfernung von Proteasen und RNasen vorbehandelt worden. Nach jedem Schritt wurde gründlich mit Bidest. gespült. 24 ml Chitin-*Beads*-Lösung in 20 % Ethanol (entspricht ≈ 15 ml Gelvolumen) sedimentierten innerhalb einer Stunde. Die Säule wurde ans LKB-System angeschlossen und bei 4°C mit 10 Gelbettvolumina IMPACT-Puffer äquilibriert (Flußrate: 0,5 ml/min).

Die Beladung der Säule mit dem Zellextrakt erfolgte mit gleicher Flußrate. Unspezifisch bindende Moleküle wurden anschließend mit 10 Gelbettvolumina eines stringenten IMPACT-Puffers mit 2 x NaCl und erhöhter Flußrate (2 ml/min) von der Säule gewaschen. Die Spaltung – mit 70 mM DTT in 50 ml IMPACT-Puffer induziert (2 ml/min) – benötigte mindestens 40 h bei 23°C. Schließlich konnte Tfil18 in 1,2 ml Fraktionen in 2 Racks à 26 Eppendorfgefäße eluiert werden. Die Regenerierung der Säule erfolgte mit 50 ml 1 % SDS, 75 ml Bidest. und 75 ml IMPACT-Puffer. Sämtliche Schritte wurden durch SDS-PAGE dokumentiert.

### 3.2.8.3 Protein-Fällungen

**Ammoniumsulfat** in hohen Konzentrationen führt zum Aussalzen von Proteinen. Diese Fällung diente dem Aufkonzentrieren des von der Affinitätssäule eluierten Proteins TfIL18. Die durch SDS-PAGE ermittelten proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt. Durch Zugabe von 100 % Ammoniumsulfat (69,7 g je 100 ml Puffer; hier: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) mußte eine Endkonzentration von 60 % eingestellt werden. Ein Magnetrührer sorgte für die langsame Durchmischung der Lösung bei 4°C ÜN. Die Zentrifugation in 30 ml Corex-Röhrchen (12.000 g, 30 min, 4°C) ergab ein streifenförmiges farbloses Pellet, das in max. 1 ml des o. g. Puffers gelöst wurde. Zur Entfernung von Ammoniumsulfat-Resten und anderen niedermolekularen Komponenten folgte eine Dialyse.

**Trichloressigsäure** (TCA) bewirkt die Denaturierung und Fällung sowohl von Proteinen als auch Nukleinsäuren. Zur Bestimmung der Syntheserate im Proteinbioreaktor mußte das TCA-präzipitierte Produkt durch eine Filtration vom unverbrauchten, löslichen <sup>14</sup>C-Leucin abgetrennt werden. Anschließend wurden 5 µl proteinhaltige Probe mit 50 µl 0,5 % BSA sowie 3 ml 10 % TCA- & 2 % Pepton-Lösung versetzt. Ein 15-minütiges Kochen bei 90°C hydrolysierte die unerwünschte Esterverbindung zwischen der <sup>Leu</sup>tRNA und der kovalent verknüpften radioaktiven Aminosäure. Auf Eis gestellt, fielen die Proteine innerhalb einer halben Stunde aus. Sie wurden abfiltriert, der Filter mit Aceton getrocknet und in 3 ml Szintillationscocktail überführt (zur Zählung siehe Abschnitt 3.2.8.1).

### 3.2.8.4 Dialyse

Mittels Dialyse durch eine semipermeable Membran können Proteine von kleinen Molekülen getrennt werden. Der Konzentrationsgradient zwischen der Proteinlösung und ihren Pufferkomponenten auf der inneren Membranseite sowie dem Dialysepuffer in der Umgebung treibt einen Diffusionsprozess an. Während kleine Moleküle die Membranporen passieren, werden Moleküle, deren Stokescher Radius größer als der Porendurchmesser ist, zurückgehalten. Nach einer hinreichend großen Zeit hat ein Konzentrationsausgleich stattgefunden. Aufgrund eines vergleichsweise großen Pufferreservoirs zum Probenvolumen entspricht die Endkonzentration annähernd der Eingangskonzentration des Pufferreservoirs.

Für die Dialyse von TfIL18 nach der Ammoniumsulfatfällung fand der QuixSep<sup>®</sup> Dialyzer der Firma Membrane Filtration Products Inc. Verwendung. Etwa 1 ml Proteinlösung wurden in ein flaches Plastikgefäß gefüllt, über das eine mit Bidest. gespülte Membran gelegt und fixiert wurde (Spectrapor<sup>™</sup>; Ausschlußgrenze: 3,5 kDa). Die Dialyse erfolgte in einem Becherglas mit 150 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) Puffer, der alle zwei Stunden und insgesamt

mindestens viermal gewechselt wurde. Alternativ konnte auch ein Dialyseschritt ÜN eingeschoben werden. Abschließend wurde die Membran mit einem Skalpell geöffnet und die dialysierte Proteinprobe per Pipette entnommen.

### 3.2.8.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die BCA-Bestimmung nutzt den Umstand, daß Proteine im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduzieren. Beteiligt sind vor allem die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin sowie die Peptidbindung. Zwei Moleküle Bichinolin-4-carbonsäure (BCA) reagieren mit einem  $\text{Cu}^{+1}$ -Ion zu einem purpur gefärbten Chelatkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Zur Durchführung wurden 50 Teile des Reagens A und 1 Teil des Reagens B (Pierce) vereinigt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Proteinprobe zu 1000  $\mu\text{l}$  der fertigen Reagenslösung erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Transfer der Proben auf Eis verlangsamt. Den gemessenen  $E_{562}$ -Werten konnten über eine BSA-Eichgerade Proteinkonzentrationen im Bereich von 30-1000  $\mu\text{g/ml}$  zugeordnet werden. Eine strukturbedingte, variable Zugänglichkeit der relevanten Aminosäuren und der Peptidbindungen sowie eine unterschiedlichen Zusammensetzung von Proteinen hinsichtlich reduzierender Aminosäuren bedingen eine hohe Standardabweichung um 15 %.

Vergleichsweise wurden zwei mathematische Formeln zur Berechnung der Proteinmenge herangezogen, die auf UV-Messungen des  $A_{260}$ - und des  $A_{280}$ -Wertes basieren (Kalb & Bernlohr, 1977):

$$c_{\text{Protein}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = 1525 * A_{280} - 757,3 * A_{260} \quad (3-5)$$

$$c_{\text{Protein}} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{A_{280}}{d} * \left[ -0,647 * \left( \frac{A_{280}}{A_{260}} \right)^2 + 2,172 * \left( \frac{A_{280}}{A_{260}} \right) - 0,739 \right] \quad (3-6)$$

### 3.2.8.6 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Verifizierung von TfIL18 wurde das Protein im Gasphasensequenzier N-terminal ansequenziert. Dem Verfahren liegt der Edman-Abbau zugrunde, bei dem Phenylisothiocyanat mit der endständigen Aminogruppe des Proteins zu einem Phenylthiocarbamoyl-Derivat reagiert, aus dem unter schwach sauren Bedingungen die Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäure abgespalten wird. Dieses zyklische Derivat läßt sich

chromatographisch anhand seiner Retentionszeit identifizieren. Dem schließt sich ein neuer Zyklus mit dem um eine Aminosäure verkürzten Protein an.

Für die Sequenzierung von 20 Aminosäuren waren etwa 100 pmol Protein nötig. Zur besseren Fixierung des Proteins wurde der Glasfaserfilter mit Biobren behandelt und mehreren Vorzyklen unterworfen. Das Probenvolumen wurde mit Trifluoressigsäure auf 40 µl ergänzt und auf den Filter pipettiert. Die Sequenzierung erfolgte im Applied Biosystems 473A Protein Sequencer. Als Eluent A in der analytischen rpHPLC dienten 5 % THF in 25 mM Natriumacetat (pH 4.6). Die Flußrate betrug 0,28 ml/min.

**Gradientenelution von PTH-Aminosäuren:**

Start	11 % Acetonitril
18 min	36 % Acetonitril
27 min	36 % Acetonitril
30 min	90 % Acetonitril
34 min	90 % Acetonitril
40 min	11 % Acetonitril

### 3.2.9 Chemische Synthese von RNA-Oligonukleotiden

RNA-Oligonukleotide für die Kristallisation von 5S rRNA Domänen können unter Nutzung der Festphasen-Phosphoramidit-Chemie synthetisiert werden. Verwendet wurde ein Applied Biosystems Syntheseautomat PCR-MATE EP 391. Die Durchführung der Synthesen erfolgte mit CPG-gekoppeltem Säulenmaterial der Porengröße 500 Å im 1,0 µmol Maßstab. Sämtliche 2'-O-triisopropylsilyl-geschützten Phosphoramidit-Synthone wurden bei der Firma ChemGenes (USA) erworben. Die einzelnen Schritte der RNA-Synthese sind im Ergebnisteil dieser Arbeit näher erläutert. Aufgrund der zusätzlichen Schutzgruppe an der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose erfolgte die Entschützung in zwei Stufen: Die Inkubation der CPG in einer Ammoniak/Ethanol-Lösung [3:1, (v/v)] für 24 h bei 55°C bewirkte in der ersten Stufe die Abspaltung der RNA-Kette vom Säulenmaterial sowie die Hydrolyse der Schutzgruppen am Phosphat und an den exozyklischen Aminogruppen der Basen. Nach dem Abziehen des Ammoniaks erfolgte in der zweiten Stufe die Entfernung der Triisopropylschutzgruppe mit 10 µl 1,1 M Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran/Ethanol [10:1, (v/v)] je A<sub>260</sub>-Rohprodukt (72 h, RT). Zu diesem Gemisch waren 2 µl Bidest. und 100 µl Butanol je A<sub>260</sub>-Rohprodukt zu geben, um die RNA zu fällen (Abschnitt 3.2.1.4). Die Fällung wurde mit dem Überstand wiederholt, die Pellets vereinigt und in einem Endvolumen von 60 µl Bidest. aufgenommen. Es folgte die weitere Aufreinigung durch rpHPLC (Abschnitt 3.2.1.6). Anschließend wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge vom Acetonitril befreit und mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Qualitätskontrolle bestand in einer Nukleosidanalyse (Abschnitt 3.2.7.5).

### 3.2.10 Kristallisation

„*Behind every structure is a crystal.*“ (Hampton Research Tools, 2000). Kristalle biologischer Makromoleküle entstehen aus wäßrigen Lösungen durch Erreichen einer Übersättigung. Die hohe Ordnung des Kristallgitters bedingt nach optischen Gesetzmäßigkeiten konstruktive Interferenz einfallender Röntgenwellen, aus der sich mittels Röntgenstrukturanalyse der Aufbau errechnen läßt. Die Struktur läßt Rückschlüsse auf die biologische Funktion zu.

#### 3.2.10.1 Vorinkubation und Kristallisationsansätze

Zur Ausbildung ihrer nativen räumlichen Struktur in Lösung mußten die verschiedenen Biomoleküle vorinkubiert werden:

- a) Strukturelle Domänen der 5S rRNA wurden chemisch synthetisiert. Zwei RNA-Oligonukleotide bilden über komplementäre Sequenzen eine Helix aus, die durch Bulges unterbrochen sein kann. Die Stränge wurden in Bidest. durch langsames Abkühlen eines Wasserbades von 95°C auf RT ÜN hybridisiert (Konzentrationsbereich: 0,2 bis 0,5 mM). Um ein molares Verhältnis der Oligoribonukleotide von 1:1 im Ansatz zu garantieren, waren ihre exakten Konzentration durch alkalische Hydrolyse bestimmt worden (siehe Abschnitt 3.2.3.2).
- b) 5S rRNA-Transkripte in 5 mM MgCl<sub>2</sub> wurden im vortemperierten Wasserbad von 80°C auf RT ÜN abgekühlt (Pan *et al.*, 1999). Parallel erfolgte die Durchführung der Kristallisationsansätze mit nicht-wärmebehandelten 5S rRNA-Transkripten in Bidest.. Die RNA-Konzentration lag zwischen 1,5 und 2,5 mg/ml.
- c) Das gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) dialysierte ribosomale Bindungsprotein Tfil18 wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml direkt zur Kristallisation eingesetzt.
- d) Für die Kokristallisation mußte die 5S rRNA in 1 x TMK-Puffer mit Tfil18 komplexiert werden (37°C, 30 min). Die Konzentration des Komplexes betrug 35 µM.

Die Kristalle wurden im Hängenden Tropfen angesetzt. Bei dieser Kristallisationsmethode sind die RNA/Protein-Lösung im Tropfen und die Reservoirlösung durch eine Dampfphase räumlich getrennt. Aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen des Fällungsmittels im Tropfen und im Reservoir baut sich ein Konzentrationsgradient auf, der durch Dampfdiffusion einen Gleichgewichtszustand anstrebt. Indem das Lösungsmittel Wasser aus dem vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen diffundiert, wird die RNA/Protein-Lösung aufkonzentriert, und die Probe kristallisiert im Idealfall.

Für die Kristallisation fanden Linbro<sup>®</sup>-Schalen aus der Zellkultur Verwendung. 1 µl der zu kristallisierenden Probe wurde mit 1 µl Kristallisationslösung (auch Mutterlösung genannt) auf einem silikonisierten Deckgläschen (Ø 22 mm) gemischt. Als Reservoir dienten 700 bis 1000 µl Mutterlösung im Well. Um ein geschlossenes System während des Aquilibrierungsvorgangs zu garantieren, war der Rand des Reservoir-Well mit viskoser Silikonpaste einzufetten, bevor das Deckgläschen umgekehrt darüber gelegt und angedrückt wurde. Durch die Verdünnung im Tropfen bestand ein Konzentrationsgradient zwischen dem Fällungsmittel im Tropfen und im Reservoir. Die Mutterlösungen variierten in Bezug auf Puffer, pH, Art und Konzentration mono-/divalenter Ionen, Fällungsmittel und Polyamin. Im ersten Ansatz wurden verschiedene kommerzielle Screens der Firma Hampton Research benutzt, die jeweils eine unvollständige Matrix an Bedingungen enthalten (Crystal<sup>™</sup>, Grid<sup>™</sup>, Natrix<sup>™</sup>, NUC<sup>™</sup>, Peg/Ion<sup>™</sup>). Das bedeutet, die Kristallisationslösungen sind in ihrer Zusammensetzung nicht systematisch variiert, sondern beinhalten die Bedingungen, die sich schon in der Vergangenheit bewährt haben. Darüber hinaus wurden in der Literatur beschriebene (Doudna *et al.*, 1993) und eigene optimierte Screens hergestellt. Die Kristallisation erfolgte bei 4°C, 18°C und 32°C. Für Kristallisationen oberhalb der RT mußten die Linbro-Platten und Deckgläschen vor der Verwendung auf die Inkubationstemperatur erwärmt werden, um die Bildung von Kondensationstropfen zu vermeiden. Das Kristallwachstum wurde mittels Olympus-Mikroskop, Kamera und zugehöriger Video-Dokumentationseinrichtung verfolgt.

### 3.2.10.2 Seeding

Häufig sind Kristalle bezüglich ihrer Größe suboptimal. Dem Entstehen einer Vielzahl an Mikrokristallen infolge Übersättigung konnte durch eine Verringerung der Proben- oder Präzipitantenkonzentration entgegengewirkt werden. Der einfachste Weg war hier die Veränderung des Volumenverhältnisses von Probe zu Mutterlösung im Tropfen.

Kristallisationstropfen mit einer diskreten Anzahl zu kleiner Kristalle können für das gezielte Animpfen von Kristallisationskeimen verwendet werden. Diese *Seeding* genannte Prozedur ermöglicht ein Kristallwachstum in der metastabilen Zone, die zugleich die weitere Keimbildung blockiert. Der mikrokristallhaltige Tropfen wurde in Mutterlösung pipettiert und eine Verdünnungsreihe erstellt, die mit einigen wenigen Kristallen endet. 1 µl Probe und 1 µl Kristallisationslösung waren 24 h gegen das Reservoir zu äquilibrieren, bevor der 2 µl Tropfen mit 0,5 µl *Seed Stock* angeimpft wurde.

War die Kristallgröße bereits ausreichend für ein Fischen mittels Loop, konnte der Einzel-Kristall auf einem Deckgläschen drei- bis viermal in der Mutterlösung gewaschen und anschließend in einen neuen, vorinkubierten Tropfen überführt werden.

### 3.2.10.3 Derivatisierung mit Schweratomen

Für die Strukturlösung mit der Methode des isomorphen Ersatzes müssen Schweratome in den Kristall eingeführt werden. RNA-Oligonukleotide können zu drei verschiedenen Zeitpunkten derivatisiert werden. Die früheste Möglichkeit beinhaltete die Verwendung schweratom-modifizierter Phosphoramidite während der chemischen Synthese. Die dargestellten Derivate enthielten beispielsweise Brom, welches kovalent mit der C5-Position von Cytosin oder Uracil verknüpft war.

Zum zweiten kann synthetisierte RNA direkt modifiziert werden (Correll *et al.*, 1997b). Die Platinverbindung  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\text{-OH}_2]^{2+}$  reagiert mit dem N7-Atom von Guanin, während Quecksilber(II)-acetat an die C5-Position von Pyrimidin-Ringen addiert wird. 100  $\mu\text{l}$  0,5 mM RNA-Oligonukleotid wurden mit 15  $\mu\text{l}$  100 mM Quecksilber(II)-acetat (pH 6.0), d. h. einem 30-fachen molaren Überschuß, 4 h bei 37°C inkubiert. Das Produkt wurde mittels rpHPLC aufgereinigt und durch Butanol-Fällung aufkonzentriert. Bei beiden skizzierten Wegen folgte die Kristallisation des Schweratom-Derivats im Anschluß.

Die dritte und gängigste Methode der Derivatisierung ist die Diffusion von Schweratomen in den vorhandenen Kristall, das *Soaking* (Stura & Chen, 1992). Der Kristall wurde mittels Loop gefischt, in 10  $\mu\text{l}$  Mutterlösung ohne Schweratom gewaschen und anschließend in 4  $\mu\text{l}$  Mutterlösung mit 1 bis 10 mM einer Schweratomverbindung, wie Quecksilber(II)-acetat, transferiert. Die Soaking-Temperatur entsprach der Kristallisationstemperatur. Nach 24-stündiger Inkubation im Dunkeln wurde der Kristall erneut gewaschen und für die Messung vorbereitet.

### 3.2.10.4. Cryo-Konservierung

Tiefe Temperaturen während der Datensammlung gestatten eine längere Exposition der Kristalle im Röntgenstrahl. Da die Diffusion entstehender Hydroxylradikale bei 100 K stark vermindert ist, sind die Strahlenschäden im Kristall reduziert.

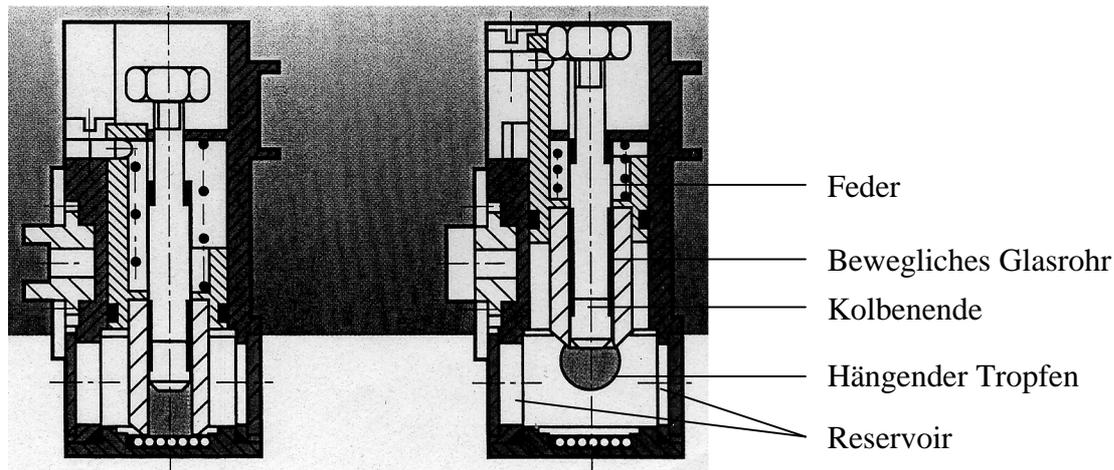
Kristalle bestehen zu 30 bis 80 % aus flüssiger Mutterlauge, die sich in Lösungsmittelkanälen befindet. Während des Einfrierens der Kristalle (streng genommen handelt es sich um ein Tiefkühlen, da keine Änderung des Aggregatzustands erfolgt) würde die Bildung von Eis im Kristallwasser sowie in der umgebenden Flüssigkeit infolge der Anomalie des Wassers zur

mechanischen Zerstörung des Kristalls führen. Durch Äquilibrieren in Cryo-Puffern, die Glycerin, MPD, PEG 400 oder Cryo-Salze als Frostschutzmittel enthalten, werden Kristalle cryotauglich (Rubinson *et al.*, 2000). Sind geeignete Konzentrationen der Cryoprotectanten bereits in den Kristallisationsbedingungen vorhanden (mindestens 10 % MPD, 10 % Glycerin, 20 % PEG 400, 2 M Lithiumsalz), können die Kristalle sofort im Stickstoffstrom der Cryo-Anlage an der Meßeinrichtung eingefroren werden.

Aufgrund der Sensibilität der Kristalle gegenüber veränderten Umweltbedingungen, wie sie beim Transport zum Synchrotron auftreten, und der Gefahr der Kristallalterung in Lösung empfiehlt es sich, die Kristalle mit Erreichen ihrer maximalen Größe einzufrieren und zu lagern. Methodisch war so vorzugehen, daß ein Kristall im Loop gefischt, bis zu 1 min im getesteten Cryo-Puffer äquilibriert und in einer flachen Dewar-Schale mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Der montierte Loop besteht aus einer Nylon-Schleife an einem Schaft, der mit einem magnetischen Deckel mit Gewinde verklebt ist und über einen Stab (Crystal Wand™) gehalten wird. Der Loop wurde im Stickstoffbad mit einem Loop-Behälter (Crystal Cap™ Vial), der mittels einer Schere (Vial Clamp™) fixiert war, verschraubt. Abschließend wurde der verschlossene Behälter zügig in den transportablen Kristallcontainer überführt, dessen Lamellen mit flüssigem Stickstoff gefüllt sind. An der Meßeinrichtung wiederholte sich die Prozedur in umgekehrter Richtung, wobei für den Transport des Loops aus dem Stickstoffbad bis zum Goniometerkopf eine Loop-Zange (CryoTong™) diente. Abbildungen und nähere Beschreibungen zu den einzelnen Kristallisationswerkzeugen enthält der Katalog *CRYSTALLIZATION RESEARCH TOOLS* der Firma Hampton Research (CA, USA).

### **3.2.10.5 Kristallisation unter Bedingungen der Schwerelosigkeit**

Mikrogravitation reduziert sowohl die Konvektionsströme, die durch Temperatur- und Dichtegradienten induziert werden, als auch die Sedimentation von Kristallisationskeimen (Erdmann *et al.*, 1989). Aufgrund dieser für die Kristallisation positiven Effekte wurden verschiedene RNA-Helices in Kooperation mit der Europäischen Weltraumbehörde ESA während eines Space-Shuttle-Flugs im All kristallisiert. Verwendet wurden Reaktoren des Typs HD8 (*Hanging Drop* 8 µl) der EADS AG. Ein poröses Polymer nahm die Reservoirolösung auf. Die RNA-Probe befand sich in einem beweglichen Glasrohr mit fixiertem, inneren Kolben. Durch eine 90°-Drehung per Schraubenschlüssel konnte das Glasrohr mechanisch von der Silikondichtung zurückgezogen werden, wodurch die Lösung am Kolbenende einen Tropfen formte, der über die Dampfphase in Kontakt mit dem Reservoir stand (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1 HD8-Reaktoren im aktivierten (rechts) und inaktivierten Zustand (links) für die Kristallisation im Weltall.**

Die Reaktoren mußten vorab einer wiederholten Reinigung unterzogen werden, um Mikropartikel, die als Kristallisationskeime fungieren könnten, auszuschließen. Als erstes konnten an der Silikondichtung haftende Partikel mit einer sterilen Kanüle mechanisch entfernt werden. Nach der weiteren Reaktordemontage wurden die Einzelteile (Kolben, Glasrohr, Metallplatte, O-Ring und Silikonabdichtung) in 50 ml-Falcon-Tubes überführt und mit 30 ml 70 % Ethanol überschichtet. Alle Tubes wurden 5 min bei 40°C im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte mittels Wasserstrahlpumpe und einer sterilen Pasteurpipette das Absaugen des Ethanols. Im letzten Schritt wurden die Einzelteile in 50 ml sterilem, DEPC-behandeltem Wasser nochmals 5 min im Ultraschallbad bei 40 °C gereinigt. Sämtliche Schritte wurden dreimal wiederholt. Die Trocknung der Teile erfolgte in sterilen Petrischalen bei 40°C ÜN.

### 3.2.10.6 Röntgendiffraktion

Die Kristalle wurden mit hochenergetischer Synchrotronstrahlung am EMBL/DESY Hamburg (*beamlines* X11 und X31), am Sincrotrone ELETTRA Trieste/Italien (*beamline* 5.2R) und am ESRF Grenoble/Frankreich (*beamline* ID2) vermessen.

Synchrotronstrahlung ist ein „Abfallprodukt“ an Teilchenbeschleunigern (Synchrotron). Werden relativistische Teilchen (Elektronen) dort mit annähernder Lichtgeschwindigkeit eingeschossen und beschleunigt, vergrößern sie während dieses Vorgangs nur ihre Energie, während sich die Geschwindigkeit kaum ändert. Die dabei auftretenden, beträchtlichen Strahlungsverluste in Form von elektromagnetischer Synchrotronstrahlung reichen bis in den

Spektralbereich der Röntgenstrahlung. Das macht sie für spektroskopische Untersuchungen interessant.

Die hohe Intensität der Synchrotronstrahlung erlaubte kurze Meßzeiten am Kristall und hohe Auflösungen. Die Wellenlänge lag um 1 Å. In diesem Bereich sind Absorptionseffekte zu vernachlässigen. Der Kristall wurde auf dem Goniometerkopf exakt im Röntgenstrahl justiert. Die Datensammlung erfolgte unter cryogenen Bedingungen bei 100 K und unter Anwendung der Rotationsmethode, um reziproke Gitterpunkte möglichst vollständig zum geometrischen Schnitt mit der Ewald-Kugel, d. h. in Reflexionsstellung, zu bringen. Die Reflexdaten wurden auf einem *MAR Research Imaging Plate System* aufgezeichnet. Das System basiert auf einer  $\text{Eu}^{2+}$ -dotierten Phosphorschicht, die durch Röntgenlicht in einen metastabilen Zustand übergeht. Mit Hilfe eines Lasers wird das latente Bild angeregt und die Emission von violetterem Licht induziert, welches von Photomultiplern detektiert wird.

Die theoretischen Berechnungen im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse wurden von Dr. Markus Perbandt (AG Prof. Christian Betzel „Makromolekulare Strukturanalyse“, Universität Hamburg) durchgeführt. Zur Datenprozessierung sowie zur Bestimmung von Raumgruppe und Einheitszelle kamen die Programme DENZO und SCALEPACK zum Einsatz (Otwinowski, 1993). Das Phasenproblem wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes und dem Programmpaket AMoRe gelöst (Navaza, 1994). Die Verfeinerung erfolgte mit REFMAC und X-PLOR (Brünger, 1992).