

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herkunft von Enzymen und Chemikalien

Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva GmbH, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Adenosindiphosphat (ADP)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Adenosinmonophosphat (AMP)	Sigma-Chemie, München
Agar und Agarose	Life Technologies, Eggenstein
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma-Chemie, München
Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	Biorad, München
Chromatographiematerial: (lose Trennmaterialien und vorgepackte Säulen)	Pharmacia GmbH, Freiburg
-außer: AMP-Sepharose	Sigma-Chemie, München
ADP-Agarose	Sigma-Chemie, München
Red120-Agarose	Sigma-Chemie, München
Coomassie-Brilliant-Blue R und G	Serva GmbH, Heidelberg
Cytochrom c	Sigma-Chemie, München
DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DL-Dihydroxyacetonphosphat, Li-Salz	Sigma-Chemie, München
Ferritin aus Pferdemuskel	Sigma-Chemie, München
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- Galactopyranosid (X-Gal)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, Mich., USA
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Molekularmassenstandard SDS 7	Sigma-Chemie, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH, Heidelberg
Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	ARK Scientific, Heidelberg
Pyridindinukleotide (NAD ⁺ , NADH ₂ , NADP ⁺ , NADPH ₂)	Gerbu Handelsges., Gaiberg
Pepton	Difco Lab., Detroit, Mich., USA
Rinderserumalbumin	Sigma-Chemie, München
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Reverse Transkriptase	Life Technologies, Eggenstein
RNase Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Röntgenfilme (Agfa X-ray 90)	Linnhard, München
Substrate für Enzymreaktionen	Sigma-Chemie, München
T4-DNS-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Substrate für Enzymreaktionen	Sigma-Chemie, München

Alle nicht gesondert aufgeführten Festsubstanzen wurden von Fluka (Buchs, St. Gallen, Schweiz) bzw. Gerbu (Gaiberg) bezogen, alle organischen Lösungsmittel stammten von J.T. Baker B. V., Deventer, Holland. Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p.A. Qualität auf.

2.1.2 Geräte

Anaerobenkammer:	Coy Lab. Inc., (Vertrieb Töpfer GmbH, Göppingen)
Chromatographieanlagen:	HPLC: Pumpe 420, Gradientenformer 425, Detektor 432 (Kontron Instruments, Neufahrn b. München), Kollektor Frac-100 (Pharmacia LKB, Freiburg) Standardchromatographie mit Minipuls 3 Schlauchpumpen (Abimed, Langenfeld), UV-Detektor Uvicord SD, Einkanalschreiber Rec 101 (beide Pharmacia LKB, Freiburg)
Chromatographiesäulen:	
Leersäulen:	C 16/20 (Pharmacia LKB, Freiburg) C 26/40 (Pharmacia LKB, Freiburg) C 26/100 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Fertigsäulen:	HiLoad 26/60 Superdex 200 (Pharmacia LKB, Freiburg) Superose 6 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Dampfsterilisator:	Webeco Modell H (Webeco GmbH, Bad Schwartau)
Dispergiergerät:	Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen)
Elektrophoresekammern:	
Agarose-Gelelektrophorese:	Eigenbau der Feinmechanik Universität-GH Essen
Polyacrylamid-Gelelektrophorese:	Agagel Mini (Biometra, Göttingen) Minigel Twin (Biometra, Göttingen)
Elektrotransfer-Kammer:	CarboGlas Semidry Transfersystem (Schleicher & Schüll, Dassel)
Fermenter:	50 l Glasfermenter im Ölbad, zur aeroben und anaeroben Anzucht thermophiler Mikroorganismen (Eigenbau der Abteilung Mikrobiologie, Prof. Dr. Hensel)
Hochdruckpresse:	FrenchPress (SLM Aminco Instruments Inc., Vertrieb d. Fa. Sopra, Büttelborn)
Inkubatoren:	RFI-125 Inkubator (Infors AG, Bottmingen, Basel, Schweiz) Certomat H/ Certomat R (B. Braun AG, Melsungen)
Mikroskope:	Olympus BH-2 RFCA (Olympus, Hamburg) Olympus CHT (Olympus, Hamburg)
Personalcomputer:	Pentium 90 MHz (Hardex, Essen) Pentium 133 MHz (Atelco, Bochum)
Spektrophotometer:	UVIKON 930, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Kontron Instruments, Neufahrn) Philips 8720, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Philips Analytical, Cambridge, England) Eppendorf 1101M, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler:	Eigenbau der Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried
Vakuum-Zentrifuge:	Speedvac Concentrator (Savant, Farmingdale)
Zentrifugen:	Ultrazentrifuge Centrikon T 1170 (Kontron Instruments, Neufahrn b. München)

Großzentrifuge Avanti J-25 (Beckman, München)
 Tischzentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun AG, Melsungen)
 Durchlaufzentrifuge CEPA Typ GLE (C. Padberg Zentrifugenbau,
 Lahr)

2.1.3 Organismen

Thermoproteus tenax, Stamm Kra1 (DSM 2078, Zillig et al., 1981)

Methanothermus fervidus, Stamm V24S (DSM 2088, Stetter et al., 1981)

Methanobacterium bryantii (DSM 862, Balch et al., 1979)

Pyrococcus woesei, Stamm Vul 4 (DSM 3773, Zillig et al., 1987)

Escherichia coli DH5 α (Hanahan, 1983)

Escherichia coli BL21 DE3 (Studier & Moffatt, 1986)

Escherichia coli TOP10 (Fa. Invitrogen)

Escherichia coli AA 200 (Anderson & Cooper, 1970)

Thermoproteus tenax wurde für die Reinigung der TIM und der PK sowie zur Gewinnung von genomischer DNS angezüchtet. Zellen von *M. bryantii* wurden für die Isolation genomischer DNS verwendet, um die DNS-Sequenz des *tpi*-Gens zu ermitteln. *P. woesei* und *M. fervidus*-Zellen wurden für die Amplifikation des jeweiligen *tpi*-Gens zur heterologen Expression benötigt. *E. coli* DH5 α wurde als Wirtsstamm für die Klonierung von genomischen DNS-Fragmenten und bei der heterologen Expression der *P. woesei*-TIM und der *T. tenax*-PK unter Verwendung des Vektors pJF118EH (Fürste et al., 1986, s. 2.1.4) eingesetzt. *E. coli* BL21DE3 diente als Wirtsstamm für die heterologe Expression der in den Vektor pET15b (Novagen, 2.1.4) klonierten *M. fervidus*-TIM. *E. coli* TOP10 wurde als Wirtstamm für die Klonierung eines *tpi*-spezifischen PCR-Produkts verwendet. Bei *E. coli* AA200 handelt es sich um einen *tpi*-defekten Stamm, der für Komplementationsexperimente eingesetzt wurde.

2.1.4 Plasmide

Vektor	Bezugsquelle
pBluescript KS+ (Bullock et al., 1987)	Stratagene, La Jolla, USA
pET15b	Novagen, Bioggio-Lugano/CH
pJF 118EH (Fürste et al., 1986)	Laborbesitz
pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985)	MBI Fermentas
pCR-TOPO	Invitrogen
pSPT19	Boehringer Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Mikroorganismen

2.2.1.1 Anzucht von *Thermoproteus tenax*

Die Kultivierung von *T. tenax* Kra 1 (DSM 2078) erfolgte anaerob bei 86°C und pH 5.5 (pH mit H₂SO₄ bzw. NH₃ eingestellt) in dem von Brock et al. (1972) beschriebenen Grundmedium. Das Komplexmedium setzte sich wie folgt zusammen (Angaben pro l): 1,3 g (NH₄)₂SO₄, 0,28 g KH₂PO₄, 0,25 g Mg SO₄ x 7 H₂O, 0,07 g Ca Cl₂ x H₂O, 0,02 g FeSO₄ x 7 H₂O, 1,8 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 4,5 mg Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 0,22 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,05 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 0,03 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,03 mg VOSO₄ x 5 H₂O, 0,01 mg CoSO₄ x 7 H₂O und 1 mg Resazurin. Nach Lösen der Komponenten wurden 4 g/l dispergierter elementarer Schwefel zugegeben; anaerobe Bedingungen wurden durch Zugabe von Na₂S x 7-9 H₂O hergestellt. Massenkulturen wurden in einem Eigenbau-Glasfermenter (50 l) gezogen.

Der Fermenter wurde mit 0.5-1 l einer Vorkultur (Lagerung bei 4°C über mehrere Monate) beimpft und über 6-7 Tage unter Begasung gezogen. Für die Anzucht unter autotrophen Wachstumsbedingungen wurde mit H₂/CO₂ (80%/20% [v/v]) begast. Das Wachstum unter heterotrophen Bedingungen erfolgte in Gegenwart von 0,2 g Glucose und 0,01 g Hefeextrakt (pro l Medium) und Begasung mit H₂/N₂ (20%/80% [v/v]). Der Wachstumsverlauf wurde über die Zellzahl verfolgt, die in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde. In der Massenkultur konnten bei Anzucht unter autotrophen Bedingungen Zelldichten von 3-4 x 10⁸/ ml erreicht werden, bei heterotrophen Bedingungen wurden in der Regel nur 1 x 10⁸/ ml erzielt. Vor der Zellernte wurde die Kulturflüssigkeit zunächst über einen Wärmetauscher auf ca. 10°C abgekühlt und der Schwefel sowie die ausgefallenen Metallsulfide mittels Passage durch einen Faltenfilter abgetrennt. Anschließend wurden die Zellen in einer Durchlaufzentrifuge auf Teflonfolie zentrifugiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80° C.

2.2.1.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob über Nacht in zuvor sterilisiertem Luria-Bertani Medium (LB-Medium, enthält 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und 10 g NaCl pro Liter) bei 37°C und 200 Upm. Flüssigkulturen von 3 ml wurden zur Analyse von Plasmid-DNS verwendet, für die Gewinnung von Plasmid-DNS zur anschließenden Sequenzierung wurden Kulturvolumina von 50 ml benutzt. Agar-Platten wurden zur Selektion und Lagerung von Klonen verwendet.

Zur Isolation von heterolog exprimiertem Enzym erfolgte die Anzucht in größeren Kulturvolumina (5 x 1 l). Dazu erfolgte die Dampfsterilisierung des Mediums im Autoklaven am Vorabend, so daß das Nährmedium am Morgen noch entsprechend temperiert war. Dadurch konnte die lag-Phase nach dem Animpfen (2%) mit einer ÜN-Kultur des entsprechenden Expressionsklons verkürzt werden.

Das Wachstum der Kultur wurde über die optische Dichte bei λ= 600 nm verfolgt und nach Erreichen einer O.D.₆₀₀ von 1.0 wurde durch Zugabe von IPTG die Expression des rekombinanten Enzyms induziert. Nach weiteren 4 Stunden wurde die Kultur auf Eis gestellt und zentrifugiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

In Abhängigkeit vom verwendeten Vektor bzw. Wirtsstamm betrug die Ausbeute 3-5 g Naßzellen pro Liter Medium.

Der *tpi*-defekte *E. coli*-Stamm AA 200 wurde in einem Medium mit 0,5% NaCl, 0,2% Na-Acetat, 0,02% MgSO₄ x 7 H₂O, 0,1% Di-Ammoniumhydrogenphosphat, 0,1% Di-

Kaliumhydrogenphosphat, pH 6.8 (modifiziert nach Drews, 1983) angezüchtet. Glucose (0,2%) wurde nach Autoklavieren des Mediums sterilfiltriert zugegeben.

Substanzen zur Selektion bzw. Induktion wurden dem Medium nach Dampfsterilisierung und anschließendem Abkühlen auf 60°C zugefügt. Hierbei wurde zur Selektion transformierter Klone Ampicillin (100 µg/ml Nährmedium) eingesetzt, rekombinante Klone wurden in α -Komplementationsagar (LB-Ampicillin-Platten mit 10 µl IPTG [80 mg/ml] und 40 µl X-Gal [40 mg/ml], s. 2.2.2.9) analysiert.

2.2.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNS

2.2.2.1 Isolierung von DNS

Isolierung von genomischer DNS aus Archaea

Die Gewinnung von genomischer DNS aus Zellen von *T. tenax* und *M. bryantii* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll nach Meakin et al. (1991), welches eine Modifizierung der Methode von Weil et al. (1988) darstellt.

Hierzu wurden 0.5-1 g tiefgefrorene Zellen unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff gründlich zermörsert und in 10 ml Aufschlußpuffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris, pH 7.4, 10 mM EDTA, 1% SDS) resuspendiert. Anschließend wurde 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und die Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min., 37.000 x g, 4°C). Die DNS wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Isopropanol und mindestens 30 minütiger Inkubation bei -20°C gefällt, in einer zweiten Zentrifugation (20 min., 18.000 x g, 4°C) sedimentiert und in einem Gesamtvolumen von 5 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen. Nach schonender Resuspendierung wurde die DNS durch RNase-Verdau (100 µg/ml, 60 min., 37°C), Proteinase K-Verdau (100 µg/ml, 30 min., 37°C) sowie eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.2.2.2) gereinigt. Nach Zugabe von 1 ml NH₄-Acetat (7,5 M) und 2.5 Vol Ethanol abs. wurde die DNS erneut 30 min. bei -20°C gefällt, pelletiert (20 min., 18.000 x g, 4°C), mit 70% igem Ethanol gewaschen und schließlich in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen. Die Ausbeute bei diesem Verfahren betrug ca. 0.6 mg DNS/g Naßzellen.

Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Schnellpräparation durch alkalische Lyse

Plasmid-DNS zur Restriktion und Klonierung wurde mittels alkalischer Lyse gereinigt (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979).

1-2 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (60 s, 12.000 x g), in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl frisch angesetzttem Puffer 2 (0.2 M NaOH, 0.1% SDS) wurden die Zellen für 5 min. bei RT lysiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer 3 (3 M K-Acetat, pH 5.5) und 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Fällung der genomischen DNS. Nach Zentrifugation (10 min., 12.000 x g, 4°C) wurden 800 µl Überstand abgenommen, die gereinigte DNS durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt, pelletiert (30 min., 20.000 x g, 4°C) und mit 1 ml EtOH (70%) gewaschen. Das

Pellet wurde in der Speed Vac vollständig getrocknet und in 50 µl A. bidest. aufgenommen. Für anschließende Restriktionsanalysen wurden 5-10 µl der so erhaltenen Plasmid-DNS eingesetzt.

Plasmidgewinnung für die "boiling"-PCR

Mit Hilfe dieser Methode kann aus rekombinanten *E. coli*-Klonen Plasmid-DNS gewonnen werden, die für eine PCR-Amplifikation (s. 2.2.2.8) ausreichend ist. So ist ein Screening von Transformanden ohne Anzucht von Übernacht-Kulturen (ÜNK) möglich, wenn Primer für die klonierte DNS vorhanden sind.

Die Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen, in 50 µl 10 mM Tris, pH 7.0 resuspendiert und anschließend 5 min. bei 94°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min., 14.000 x g) wurden 5 µl des Überstands direkt in die PCR eingesetzt.

QIAGEN-Plasmidpräparation

Plasmid-DNS, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde in 25 ml (high-copy Plasmide) bzw. 100 ml (low-copy Plasmide)-Übernachtulturen vermehrt und mit dem "Midi-Plasmid Kit" (QIAGEN, modifiziert nach Birboim & Doly, 1979) nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

2.2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS

Die Trennung der DNS von Proteinen wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Zur DNS-haltigen Lösung wurden 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]) gegeben, durch Vortexen zu einer weißlichen Emulsion vermischt und zentrifugiert (20 min., 18.000 x g, 4°C). Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Gefäß transferiert. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Partikel aus der Protein-haltigen Interphase mitgeführt werden. Dieser Vorgang wurde mit jeweils 1 Vol Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) und Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die DNS-haltige Lösung präzipitiert (s. 2.2.2.3).

2.2.2.3 DNS-Präzipitation

DNS-Fällungen wurden nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) entweder mit Ethanol oder mit Isopropanol als Fällungsmittel durchgeführt.

Die DNS-haltige Lösung wurde mit 1/5 Vol NH₄-Acetat (7.5 M) versetzt, mit 2.5 Vol Ethanol abs. für mindestens 30 min. bei -20°C gefällt und anschließend zentrifugiert (20 min., 37.000 x g, 4°C). Alternativ wurden bei Fällungen, nach denen die DNS weitestgehend entsalzt sein musste, 0,7 Vol Isopropanol (RT) zugesetzt und ebenfalls wie oben zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min., 37.000 x g, 4°C) und in einer adäquaten Menge TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) vollständig gelöst.

2.2.2.4 Quantitative und qualitative Analyse von DNS

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNS in wässriger Lösung wurde photometrisch (Photometer Philips 8720) mit A. dest. als Referenz bestimmt. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm entspricht eine O.D. = 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNS bzw. 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNS (Sambrook et al., 1989). Ist der Quotient $\text{O.D.}_{260} / \text{O.D.}_{280}$ größer als 1,8, so ist die Lösung nicht oder nur unwesentlich mit Phenol oder Proteinen verunreinigt.

Um unbekannte Plasmid-DNS-Mengen in einem Agarosegel zu quantifizieren, wurden 1 μg *EcoRI/HindIII*-verdauter λ -DNS als Standard aufgetragen, und die DNS-Konzentration durch Vergleich mit den hierbei entstehenden Banden ermittelt.

Größenbestimmung von DNS-Fragmenten

Die Laufstrecke von DNS-Fragmenten in einem Agarosegel ist dem Logarithmus ihrer Größe in Basenpaaren umgekehrt proportional. Daher läßt sich aus der Laufstrecke von DNS-Fragmenten mit bekannter Länge nach der Gelelektrophorese eine Eichkurve erstellen, aus der die Größe unbekannter DNS-Fragmente abgeleitet werden kann.

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNS (Sambrook et al., 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Mengen- und Größenabschätzung von linearisierter Plasmid-DNS und von PCR-Produkten, der Überprüfung von DNS-Restriktionen und der präparativen Gewinnung von DNS-Fragmenten.

Abhängig von der Fragmentgröße der aufzutrennenden DNS wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 2,5% (w/v) in 1 x TAE (50 x = 2 M Tris/HCl, 0,25 M Na-Acetat, 50 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Nach Versetzen der Proben mit Probenpuffer (6 x = 40 Vol% Saccharose, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF) erfolgte die Gelelektrophorese bei konstanter Spannung (60-100 V). Um die DNS sichtbar zu machen, wurden dem Agarosegel 2 μl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNS, so daß diese im Gel bei $\lambda = 254$ nm auf einem Transilluminator sichtbar wird. Als Größenstandard diente für DNS-Fragmente >1,5 kb DNS des Phagen λ , die mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und *HindIII* verdaut worden war. Bei kleineren DNS-Fragmenten wurde die "100-bp-Leiter" (MBI Fermentas) verwendet.

Die Dokumentation erfolgte durch Photographieren des Gels mit einer Polaroid-Sofortbildkamera.

2.2.2.6 Reinigung von DNS-Fragmenten

Extraktion von DNS aus TAE-Agarosegelen

Zur präparativen Gewinnung von DNS aus 0,8-2% igen TAE-Agarosegelen wurde der QIAEX-Gelextraktionskit nach Protokoll des Herstellers (QIAGEN) angewendet.

Dabei wurde die DNS durch 10 minütige Erwärmung bei 50°C aus der Agarose gelöst, unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Matrix gebunden und gereinigt. Unter

Niedrigsalzbedingungen wurde sie anschließend in ein adäquates Volumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) eluiert.

Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten wurde der "QIAQuick PCR Purification"-Kit verwendet.

Hierzu wurden nach Protokoll des Herstellers (QIAGEN) bis zu 10 µg DNS auf eine Säule geladen, gewaschen und in 40 µl TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) oder steriles A. bidest. eluiert. In allen Fällen wurde der im Spülpuffer vorhandene Ethanol unter Vakuum in der Speedvac Vakuum-Zentrifuge entfernt.

2.2.2.7 In vitro Rekombination von DNS

Restriktion

Zur Restriktion von 1 µg DNS wurden 3-5 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease nach den Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug für alle Restriktionsansätze 1 h bei 37°C.

Dephosphorylierung von restringierten DNS-Fragmenten

Bei der Ligation ist die Rezirkularisierung des Vektors gegenüber der Integration von Fremd-DNS begünstigt. Um dies zu verhindern, wurden Vektoren mit kompatiblen Enden durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert (modifiziert nach Sambrook et al., 1989).

Nach vollständiger Restriktion wird die Vektor-DNS im Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (s. 2.2.2.6). Nach Zugabe von 2 µl CIP-Puffer (10 x= 100 mM Tris/HCl, pH 8.3, 10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂) und 0.25 U alkalischer Phosphatase (CIP) wird der Reaktionsansatz für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 5 mM EDTA (pH 8.0) und 0,5% SDS gestoppt, anschließend wird die alkalische Phosphatase mit Proteinase K (50 µg/ml) für 30 min. bei 56°C abgedaut. Nach Extraktion mit Phenol und Phenol/Chloroform (jeweils einmal) wird die DNS mit 0.1 Vol NaCl (3 M, pH 7.0) und 2 Vol EtOH (100%) präzipitiert.

Ligation

Zur Ligation von DNS-Fragmenten mit restringierten Vektoren wurde T4-DNS-Ligase eingesetzt. Das Enzym katalysiert die kovalente Verknüpfung von benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNS-Moleküle unter ATP-Verbrauch. Dabei können sowohl komplementäre überhängende als auch- mit geringerer Ligationseffizienz- glatte Enden über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden.

Die T4-DNS-Ligase wurde gemäß den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) verwendet. Kohäsive Enden zweier DNS-Fragmente wurden ü.N. bei 4°C ligiert (2 U T4-Ligase/µg DNS). Das Mengenverhältnis zwischen Vektor und zu inserierender DNS betrug 1:3.

Abweichend hiervon wurde die Ligation von PCR-Produkten in den Vektor pCR-TOPO durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen TopoisomeraseI-gekoppelten Vektor mit einem Thymidin-Überhang, der in Anwesenheit eines PCR-Produktes mit Adenin-Überhang (s. 2.2.2.8)

spontan mit diesem ligiert (Shuman, 1994). Dieser Vorgang wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

2.2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Mullis et al., 1986) können Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Die Methode ist so sensitiv, daß bereits einzelne DNS-Moleküle als Vorlage für die Reaktion dienen können, und sie erlaubt es, schnell und zuverlässig sowohl genomische DNS als auch inserierte DNS aus Vektoren zu amplifizieren. Für die PCR werden eine dsDNS-Vorlage benötigt und zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen zu dem 5'- bzw. dem 3'-Ende der Vorlage identisch bzw. revers komplementär sind. Diese Oligonukleotide dienen einer thermostabilen DNS-Polymerase als Primer für die DNS-Synthese (Saiki et al., 1988). Die PCR ist in drei Schritte gegliedert:

1. Denaturierung einer dsDNS-Vorlage bei 94°C
2. Zusammenlagerung von Template-DNS und den Primern bei einer von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer-abhängigen Temperatur
3. DNS-Polymerisation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase

Für die Berechnung der Annealingtemperatur von Oligonukleotiden ≤ 20 Nukleotide wurde die Faustregel befolgt:

$$(A/T) \cdot 2 + (G/C) \cdot 4 = \text{Annealingtemperatur (Thein \& Wallace, 1986)}$$

Amplifikation genomischer DNS mittels PCR

PCR-Amplifikationen wurden mit 100 ng Template-DNS und 20 pmol jedes Primers in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l mit 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 200 μ M dNTPs, 0,01% Gelatine (w/v) und 1 U *Taq* Polymerase (MBI Fermentas oder QIAGEN) durchgeführt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 80°C für 5 min. wurde $MgCl_2$ zu einer Endkonzentration von 1,5 mM dazugegeben, gefolgt von 30 Zyklen von 1 min. Inkubation bei 92°C, 1 min. Inkubation bei einer Primer-spezifischen Annealingtemperatur zwischen 50 und 67°C und 1 min. Inkubation bei 72°C. Sollten PCR-Produkte in den Vektor pCR-TOPO kloniert werden, so verlängerte sich im letzten Zyklus die Elongationsphase zur Erhöhung der Ausbeute an Fragmenten mit überhängenden 5'-Adenin-Resten auf 15 min., um die Transformationseffizienz zu verbessern.

PCR-Mutagenese

Zur Klonierung von Genen in die Expressionsvektoren pJF118EH und pET15b sowie in den Transkriptionsvektor pSPT19 wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen mittels PCR-Mutagenese eingeführt. Zu diesem Zweck wurde das PCR-High Fidelity-System (Boehringer Mannheim) eingesetzt, welches die hohe Polymerisierungseffizienz der *Taq*-Polymerase mit der Fehlerkorrektur-Aktivität der *Pyrococcus woesei*-Polymerase verbindet, um mögliche Fehler bei der DNS-Amplifikation zu verhindern.

Die PCR erfolgte wie oben angegeben in einem Gesamtvolumen von 100 μ l mit 100 pmol Primer und 0,75 μ l High-Fidelity-DNS-Polymerase.

2.2.2.9 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNS (modifiziert nach Hanahan, 1983)

Herstellung kompetenter Zellen nach Sambrook

Für die Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen nach Sambrook et al. (1989) wurden 400 ml LB-Medium mit 1-2 ml einer Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C/200 Upm bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0.3-0.4 angezchtet, 10 min. auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (15 min., 1.000 x g, 4°C). Nach Resuspension in 10 ml CaCl₂-Puffer (50 mM) wurde erneut für 10 min. auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 min., 1.000 x g, 4°C). Das Sediment wurde vorsichtig in 10 ml CaCl₂-Puffer (50 mM) gelöst und für weitere 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung (5 min., 1.000 x g, 4°C) wurden die Zellen in 2 ml CaCl₂-Puffer vorsichtig suspendiert, mit 300 µl Glycerin (100%) versetzt und in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Danach wurden sie bei -80°C gelagert.

Transformation und phänische Expression

Vollständig ligierte Plasmid-DNS wurde vorsichtig mit 100 µl kompetenten, auf Eis aufgetauten, Zellen vermischt und 30 min. auf Eis belassen. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42°C erfolgte die phänische Expression durch Zugabe von 900 µl SOC-Medium (LB-Medium + 20 mM Glucose) und Inkubation bei 37°C für 45 min.

Zur Selektion transformierter Klone erfolgte die Anzucht auf Ampicillin-haltigem Medium (Sambrook et al. 1989), zur Identifikation rekombinanter Klone wurde die "boiling"-PCR oder, wenn möglich, die Blau-Weiß-Differenzierung (Langley et al., 1975) genutzt.

Für dieses System werden *E. coli*-Stämme zur Transformation eingesetzt, die ein defektes β-Galactosidase-Gen enthalten, z.B. DH5α. Geeignete Klonierungsvektoren wie das Plasmid pBluescript KS+ (s. 2.1.4) besitzen den im Wirt fehlenden Teil des β-Galactosidase-Gens *lacZ*, so daß die beiden für sich genommen inaktiven Genprodukte in transformierten Zellen zu funktionsfähigen Enzymen zusammengesetzt werden können (α-Komplementation). Nicht-rekombinante Klone erhalten durch die Umsetzung des Farbstoffs X-Gal eine blaue Färbung. Rekombinante Klone, die aufgrund einer DNS-Insertion in das *lacZ*-Gen des Vektors X-Gal nicht umsetzen können, erscheinen hingegen weiß.

2.2.2.10 Kapillartransfer von DNS auf Nylonmembranen (Southern Blot)

Um gelelektrophoretisch getrennte DNS auf Nylonmembranen (Nytran, Schleicher und Schuell) zu übertragen, wurde ein modifiziertes Transfersystem nach Southern (1975) gewählt. Es beruht wie alle Southern Blot-Verfahren auf der Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen durch Kapillartransfer.

Das Agarosegel wurde nach der Dokumentation unter leichtem Schwenken bei RT 2 x 15 min. in Denaturierungslösung (1 M NaCl, 0.5 M NaOH) und 2 x 15 min. in Neutralisationslösung (3 M NaCl, 0,5 M Tris) inkubiert. Der Kapillartransfer erfolgte in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7.0). Sowohl das Gel als auch die Membran, die so zugeschnitten und ausgerichtet wurde, daß sie an allen Seiten 0,5 cm größer als das Gel war, wurden 5-10 min. in 10 x SSC äquilibriert. Der Blotstapel wurde dann von unten nach oben wie folgt aufgebaut: Frischhaltefolie, ca. 4 cm hoch Papierhandtücher, 3 mit 20 x SSC angefeuchtete Whatman 3MM-Papiere, Membran, Gel, nochmals 3 mit 20 x SSC angefeuchtete Whatman 3MM-Papiere, Glasplatten. Beschwert wurde der Blot mit einem Gewicht von 1 kg. Ein Kurzschließen des Pufferstroms wurde durch Streifen von

Plastikfolie zwischen Gel und Membran verhindert. Der Transfer der DNS erfolgte über mindestens 3 Stunden.

Nach Beendigung des Transfers wurden die Geltaschen auf der Membran gekennzeichnet und die DNS durch 15-20 minütiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert.

2.2.2.11 Hybridisierung von DNS mit Digoxigenin-markierten Sonden

Die nicht-radioaktive Detektion von DNS wurde mit dem Digoxigenin-System (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Durch den Einbau von Digoxigenin-gekoppeltem dUTP in Sonden-DNS können nach Hybridisierung an die Ziel-DNS Hybride unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat) und einer anschließenden Detektionsreaktion mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff CDP-Star (Tropix) nachgewiesen werden. Puffer und Lösungen für Markierung, Hybridisierung und Detektion wurden nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) angesetzt.

Nichtradioaktive Markierung von DNS mit Digoxigenin

Markierung von dsDNS

Hierbei wurde das "DIG DNS Labeling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Template-DNS wurde 10 min. bei 100°C erhitzt und sofort in einem Ethanol/Eis-Gemisch abgekühlt. Ein Reaktionsansatz aus folgenden Lösungen

1µg	denaturierter DNS,
2 µl	Hexanukleotidgemisch,
2 µl	DIG-dUTP,
1 µl	Klenow-Enzym,

wurde mit sterilem A. bidest. auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde die Markierung mit dem "DIG High Prime"-System durchgeführt, bei der die einzelnen Komponenten des Markierungsansatzes als 5-fach konzentrierte Stammlösung vorliegen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA (0.2 M) gestoppt und die markierte DNS mit 2.5 µl 4 M LiCl, 75 µl eiskaltem Ethanol abs. und 5 µl Glycogen (20 mg/ml) für 2 Stunden bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min., 12.000 x g, 4°C) wurde das Sediment gewaschen, vakuumgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen.

Markierung von Oligonukleotiden

Für diese Anwendung wurde der "DIG 3'-Oligonucleotide Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) benutzt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen:

4 µl	Reaktionspuffer (1 M K-Cacodylat, 125 mM Tris/HCl, pH 6.6, 1,25 mg/ml BSA)
4 µl	25 mM CoCl ₂
1 µl	DIG-11-ddUTP

1 µl	Terminale Transferase (50 U/µl)
5 µl	Oligonukleotid (20 pmol/µl)
5 µl	H ₂ O

Die Reaktion wurde 15 min. bei 37°C durchgeführt. Die Fällung der markierten DNS erfolgte wie oben beschrieben.

Hybridisierung und Detektion der Hybride

Hybridisierung mit Oligonukleotiden und PCR-Fragmenten

Ausgehend von Aminosäuresequenzen wurden unter Berücksichtigung des universellen genetischen Codes Oligonukleotide abgeleitet. Dadurch ergaben sich bei der Übersetzung in DNS degenerierte Basen-Positionen, so daß die Ermittlung stringenter Hybridisierungsbedingungen empirisch erfolgen mußte.

Vor der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen in Prähybridisierungspuffer (5 x SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 3% Blockierungs-Reagenz; 80 ml/100cm² Membranfläche) 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Blockierungs-Reagenz wurde Magermilchpulver verwendet. Anschließend wurde mit den markierten Oligonukleotidsonden in Prähybridisierungspuffer (5-10 pmol/ml) die Hybridisierung angesetzt. Nach leichtem Schwenken ü.N. wurden die Membranen in 2 x SSC 15 min. bei 37°C gewaschen. Durch Erniedrigung der SSC-Konzentration oder Erhöhung der Temperatur konnte die optimale Stringenz des Waschens eingestellt werden. Anschließend erfolgte die Detektion (s.u.).

Bei der Hybridisierung mit DIG-markierten PCR-Fragmenten konnten stringenter Bedingungen gewählt werden, da homologe (Sonden-DNS)-(Ziel-DNS)-Hybride eine erhöhte Schmelztemperatur aufweisen. Daher wurden sowohl für die Prähybridisierung (2 Stunden) als auch für die Hybridisierung (ü.N.) die Membranen bei 68°C inkubiert (Pufferzusammensetzung s.o.). Die Sonde (2-20 ng/ml) wurde vor dem Zufügen zur Hybridisierungslösung 10 min. bei 100°C denaturiert.

Die Membran wurde zweimal in 100 ml Waschpuffer (0.1 x SSC, 0.1% SDS) pro 100 cm² Filterfläche bei 68°C stringent gewaschen. Um irreversible Bindung der Sonden (spezifisch und unspezifisch) an die Membran zu vermeiden, mußte darauf geachtet werden, daß der Filter während der gesamten Prozedur nicht austrocknet. Nur dann ist es möglich, nach der Detektion die komplementären DNS-Stränge durch Waschen bei 80°C in Niedrigsalz-Puffer (0.1 x SSC, 0.1% SDS) wieder vollständig voneinander zu trennen.

Detektion durch immunologischen Nachweis

Alle Inkubationen wurden bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt.

Die Membran wurde zunächst kurz in Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,9% NaCl) äquilibriert, für 60 min. durch Behandlung mit Blockierungs-Reagenz (3% in Puffer 1) abgesättigt und anschließend mit dem Antikörper (1:10.000 in Puffer 1 + 3% Blockierungs-Reagenz) versetzt. Ungebundener Antikörper wurde mit Puffer 1 (3 x 10 min.) abgewaschen. Vor der Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats (CDP-Star, Tropix) wurde die Membran 1 Minute in Phosphatase-Puffer (0,1 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, 0,05 M MgCl₂, pH 9.5) äquilibriert.

Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde in einer Klarsichtfolie durchgeführt, wobei der nasse Filter gleichmäßig mit CDP-Star bedeckt wurde. Nach Zuklappen der Deckfolie wurden Luftblasen

ausgestrichen und überschüssige Flüssigkeit durch Fließpapier abgesaugt. Die Autoradiographie erfolgte bei RT über 0.5-20 Stunden.

Nach der Exposition wurde die Sonde durch Waschen bei 80°C in Niedrigsalzpuffer (0.1 x SSC/0.1% SDS) vollständig von der Membran entfernt.

2.2.2.12 Sequenzierung von DNS

DNS-Sequenzierung mit [α -³⁵S]-dATP

Zur begleitenden Sequenzreaktion bei Primer Extension Analysen wurde die DNS-Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

Gelvorbereitung

Die Thermoplatte wurde mit Ethanol gereinigt und Dichlordimethylsilan darauf verteilt. Nach 5 min. wurde die Platte erneut mit Ethanol abgewischt und trockenpoliert. Auf die Thermoplatte wurden dann 0,2 mm starke Teflonspacer gelegt. Diese wiederum wurden mit einer sauberen Ohrenplatte bedeckt, welche zuvor mit 5 ml einer frisch angesetzten Haftlösung (5 ml Ethanol, 175 μ l 10% Essigsäure, 17,5 μ l γ -Methacryloxypropyltrimethyloxysilan) behandelt wurde. Die Ohrenplatte wurde mit 6 Metallklammern befestigt.

Für die Herstellung der 5% Polyacrylamidgele wurden folgende Bestandteile gemischt: 24,33 g Harnstoff, 6 ml 10 x TBE-Puffer [0,9 M Tris-HCl (pH 8.3), 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA], 7,5 ml 40% PAA, H₂O ad 60 ml. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 50 μ l TEMED und 300 μ l 10% APS eingeleitet. Die Lösung wurde durchmischt und anschließend zwischen die zuvor präparierten Platten gegossen. Für die späteren Probenaschen wurde ein Kamm eingesteckt und dieser mit einer zusätzlichen Klammer fixiert. Die Polymerisation dauerte ca. 30 min. bei RT. Die Gele konnten bei 4°C über Nacht gelagert werden.

Alkalische Denaturierung von doppelsträngiger DNS

32 μ l der Plasmid-DNS (3-5 μ g) wurde mit 8 μ l 2 M NaOH für 10 min. bei RT inkubiert. Die DNS wurde anschließend mit 7 μ l Na-Acetat (3 M, pH 5.2) und 200 μ l Ethanol für 20 min. bei -80°C gefällt. Nach der Zentrifugation (20 min., 14.000 g, 4°C) wurde das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der „Sequenase Version 2.0 DNS Sequencing Kit“ verwendet und die einzelnen Schritte (Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige DNS, Markierungsreaktion, Kettenabbruchreaktion) wurden nach Herstellerprotokoll (United States Biochemical [USB], Braunschweig) durchgeführt. Zur Markierung wurde [α -³⁵S]-dATP eingesetzt.

Gelelektrophorese und Autoradiographie

Das vorbereitete 5%-Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, die obere und untere Pufferkammer mit TBE-Puffer gefüllt und die Probenaschen gespült. Danach wurde ein Vorlauf (20 min., 50 W, 50°C) durchgeführt.

Die Proben wurden für 5 min. bei 95°C denaturiert und danach jeweils 3 μ l der einzelnen Ansätze aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 50 W und 50°C für 2,5 Stunden. Anschließend wurde das Gel (an der Ohrenplatte haftend) für 3 x 10 min. in 20% Methanol/10% Essigsäure gewaschen und anschließend 10 min. mit H₂O gespült, um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Das Gel wurde bei

80°C 2 Stunden lang getrocknet. Die Expositionszeit des aufgelegten Röntgenfilms betrug in der Regel 3 Tage.

Automatisierte DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen wurden von Frau Schmücker (Innere Klinik/Tumorforschung, AG Prof. Esche, Universitätsklinikum Essen) oder der Fa. SeqLab (Göttingen) mit einem A.L.F. (Automated Laser Fluorescence)-Sequencer (Pharmacia) oder einem ABIPrism 377 Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Isolation und Reinigung der Plasmid-DNS, die zur Sequenzierung gegeben wurde, erfolgte unter Verwendung des "Midi-Filter-Kits" (QIAGEN, s. 2.2.2.1).

2.2.3 Auswertung molekularer Sequenzen

GENMON 4.4 (Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig)

Dieses Programmpaket wurde zur Editierung von DNS-Sequenzen, für die Restriktionsanalyse, die Übersetzung von DNS- in Aminosäuresequenzen, die Bestimmung des Codon-Gebrauchs und des Molekulargewichts von Polymeren eingesetzt.

CHROMAS (McCarthy, unveröffentlicht)

Mit Hilfe dieser Software werden die Ergebnisse von Sequenzierläufen des ABIPrism 377 Sequencer auf einem Personal Computer (PC) visualisiert. Die Sequenzierdaten konnten manuell editiert werden und für weitere Analysen als ASCII-Zeichen oder im FASTA-Format (s.u.) ausgegeben werden.

FASTA (Pearson & Lipman, 1988)

Zum Vergleich von Aminosäuresequenzen wurde dieses Programm, welches auf einem Rechner des European Bioinformatics Institute (EBI) in Hinxton Hall, England, installiert ist, mittels e-mail aktiviert.

BLAST 1.0 und 2.0 (Altschul et al., 1997)

Dieses Programm ist über das Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) anwählbar und liefert sehr schnell Vergleiche von DNS- und Protein-Sequenzen. Ferner gibt es die Option, eine DNS-Sequenz in allen sechs möglichen Leserastern in die Aminosäuresequenz zu übersetzen und mit diesen Sequenzen Proteindatenbanken zu durchsuchen (blastx). In der Version 1.0 liefert BLAST dabei zusätzlich Auskunft, ob Rasterschübe in der DNS-Sequenz vorhanden sind, Version 2.0 ermöglicht eine graphische Übersicht über lokale Sequenzhomologien.

CLUSTAL W (Version 1.7, Thompson et al., 1994)

Zur Sequenzalignierung und zur Vorbereitung von Sequenzdaten für die phylogenetische Analyse wurde dieses Programm verwendet, welches homologe Sequenzbereiche erkennt. Phylogenetische Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Henner Brinkmann (TU Braunschweig) durchgeführt.

2.2.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit RNS von *T. tenax*

2.2.4.1 Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten

Zum Schutz vor RNAsen wurden alle Lösungen mit 0.1% DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und dann erst autoklaviert. Glasgeräte, -pipetten und -gefäße konnten im Wärmeschrank bei 180°C über mindestens drei Stunden RNase-frei gemacht werden. Nicht hitzebeständige Geräte wurden mit 3% H₂O₂ oder "RNase Away" (MWG Biotech) behandelt.

RNS wurde prinzipiell nur in DEPC-H₂O aufgenommen und in aliquotierter Form bei -80°C aufbewahrt. Alle RNS-Präparationen und Lösungen wurden nicht länger als drei Monate verwendet.

2.2.4.2 Isolation von RNS

Gesamt-RNS aus *T. tenax* wurde unter Verwendung von TRIzol (Life Technologies) isoliert. Das Reagenz ist eine Fertiglösung, in der u.a. Phenol, Guanidinium-Isothiocyanat und ein roter Farbstoff zur Erkennung der organischen Phase enthalten sind. Mit dieser Methode ist die Präparation gereinigter Gesamt-RNS in weniger als einer Stunde möglich. Alle Angaben beziehen sich auf die Präparation von 0.2 g Zellen (Naßgewicht).

Zur Aufarbeitung wurden die bei -80°C gelagerten Zellen in 1 ml TRIzol gründlich resuspendiert und für 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform wurden die Phasen durch Schütteln gemischt, 2-3 min. bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min., 12.000 x g, 4°C). Die wäßrige, RNS-enhaltende Phase, wurde abgenommen und mit 0,5 ml Isopropanol gemischt. Die Fällung wurde 10 min. bei RT durchgeführt. Das nach anschließender Zentrifugation (10 min., 12.000 x g, 4°C) sichtbare Sediment wurde mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und über 10 min. bei 37°C in DEPC-H₂O gelöst.

2.2.4.3 Bestimmung von Konzentration und Reinheit

Konzentration und Reinheit der RNS wurde photometrisch durch Messung der O.D.₂₆₀ sowie der Bestimmung des O.D.₂₈₀/O.D.₂₆₀-Quotienten bestimmt.

Zur Konzentrationsbestimmung von RNS-Präparationen wurden Aliquots (5 und 10 µl) in 1 ml A. bidest. homogenisiert und in einer Quarzküvette photometrisch bei $\lambda = 260$ nm vermessen. Quantitativ entspricht eine O.D.₂₆₀ von 1.0 einer RNS-Menge von 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Daraus kann die RNS-Konzentration in der Küvette berechnet werden. Etwaige Verunreinigungen der RNS mit Proteinen oder Phenol sind zu erwarten, wenn der Quotient von O.D.₂₈₀/O.D.₂₆₀ bei > 1.75 liegt. In diesem Falle wurde die RNS einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (s. 2.2.2.2) unterzogen, mit eiskaltem Ethanol abs. gefällt (2 Stunden bei -80°C), mit EtOH (70%) gewaschen und in einem entsprechenden Volumen DEPC-behandeltem A. bidest. aufgenommen.

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese von RNS

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten Gesamt-RNS wurde die Agarose-Gelelektrophorese von RNS unter denaturierenden Bedingungen in 1-2%igen MOPS/Formaldehyd-Gelen durchgeführt. Pro 100 ml Gelmatrix wurde 1-2 g Agarose in 10 ml MOPS-Puffer (10 x= 200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7.0) und 75 ml DEPC-H₂O durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden unter leichtem Schwenken 16,5 ml Formaldehyd (37%) zugegeben.

Nach ausreichender Durchmischung wurde das Gel sofort in die zuvor mit Wasserstoffperoxid (3%) gesäuberte Gelkammer gegossen und nach vollständigem Auspolymerisieren mit MOPS-Puffer (1 x) überschichtet.

Alle Proben wurden mit 2-3 Volumina Probenpuffer (10 x = 250 µl Formamid, 83 µl Formaldehyd (37%), 50 µl MOPS-Puffer (10 x), 0,01% Bromphenolblau) versetzt, gründlich durchmischt, 2 min. bei 94°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Direkt vor dem Auftrag wurden die Proben mit je 1 µl Ethidiumbromid (0,1 µg/µl) versetzt und kurz anzentrifugiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 60V über 60 bis 120 min.. Aufgrund der Zugabe von Ethidiumbromid zu den Proben war ein Anfärben des Gels nicht notwendig. Die RNS war unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese auf einem Transilluminator bei $\lambda = 254$ nm sichtbar. Die RNS wurde als nicht degradiert beurteilt, wenn sich im Gel die 16S- und die 23S-rRNA-Spezies als Banden erkennen ließen und nicht diffus erschienen.

2.2.4.5 Transfer von RNS auf Nylonmembranen (Northern Blot)

RNS-Gele (s. 2.2.4.4) wurden 2 x 15 min. in 20 x SSC äquilibriert. Die Nylon-Membranen (Nytran, Schleicher & Schuell) wurden kurz mit DEPC-H₂O angefeuchtet und dann ebenso wie mehrere Whatman 3MM-Papiere in 20 x SSC äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte wie unter 2.2.2.10 beschrieben. Nach Transfer ü.N. bei 4°C wurde die Membran kurz mit DEPC-H₂O abgespült, um die Salze zu entfernen.

2.2.4.6 Hybridisierung von RNS mit einer Digoxigenin-markierten *pyk*-spezifischen RNS-Sonde

Zur Identifikation der Transkriptgröße und der Transkriptmenge des *pyk*-Gens von *T. tenax* wurden Northern Blots mit *pyk*-Antisense-RNS hybridisiert. Die RNS-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNS-Sonden erfolgte mit dem „DIG RNS Labeling Kit (SP6/T7)“ nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim). Das RNS-Standardprotokoll wurde bei der Durchführung der Detektionsreaktion nach den Angaben von Engler-Blum et al. (1993) stellenweise modifiziert, um eine Reduktion des Hintergrundes zu erreichen.

Markierung von *pyk*-Antisense-RNS mit Digoxigenin durch *in vitro*-Transkription

Der Transkriptionsvektor pSPT19 (Boehringer Mannheim) wurde zur *in vitro*-Transkription von DNS-Fragmenten konzipiert. Er enthält Promotorsequenzen für die RNS-Polymerasen SP6 und T7, die sich diametral gegenüberliegen und die MCS aus dem pUC19-Vektor umschließen. Bei der Generierung von RNS-Sonden für Northern Blot-Analysen ist jedoch nur Antisense-RNS von Interesse, die mittels T7-RNS-Polymerase erzeugt werden kann. Daher wurden vor und hinter dem offenen Leserahmen des *pyk*-Gens von *T. tenax* durch PCR-Mutagenese *EcoRI/PstI*-Schnittstellen eingeführt. Nach PCR-Amplifikation (2.2.2.8) und Restriktion wurde das entstehende Fragment in pSPT19 inseriert und kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Bei der Transkription mit T7-RNS-Polymerase entstand *pyk*-Antisense-RNS, die durch Einbau von Digoxigenin-markierten Nukleotiden direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden konnte.

Die Template-DNS wurde 10 min. bei 100°C denaturiert und sofort in einem Ethanol/Eis-Gemisch abgekühlt. Für die *in vitro*-Transkription wurden 1 µg DNS, 2 µl NTP-Markierungsgemisch, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 2 µl T7-RNS-Polymerase-Lösung, 1 µl RNase-Inhibitor-Lösung mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und über 2 h bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen

der Reaktion und die Fällungsreaktion erfolgte analog zu 2.2.2.11. Die Transkriptionseffizienz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Hybridisierung und stringentes Waschen

Als Prähybridisierungs- und Hybridisierungspuffer wurde Formamidpuffer (50% Formamid, 5% Blockierungs-Reagenz, 5 x SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS) verwendet. Membranen wurden zunächst mindestens 1 Stunde bei 68°C in 20 ml Prähybridisierungslösung pro 100 cm² Filterfläche unter leichtem Schütteln inkubiert. Die DIG-markierte Antisense-RNS wurde in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 50-100 ng/ml verdünnt und für 10 min. bei 100°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurde die Prähybridisierungslösung gegen die denaturierte Probe ausgetauscht und 2-3 Stunden bei 68°C gegen die Gesamt-RNS hybridisiert. Dabei wurden 15 ml Hybridisierungspuffer pro 100 cm² Filterfläche eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter 2 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 2 x SSC/0,1% SDS gespült und anschließend 2 x bei 68°C in 0.1 x SSC/0,1% SDS stringent gewaschen.

Detektion durch immunologischen Nachweis

Die Detektion wurde analog zu dem unter 2.2.2.11 beschriebenen Verfahren durchgeführt, mit dem Unterschied, daß Puffer 1 0,15 M NaCl, 3 M Maleat, 0,3% Tween 20, pH 8.0 enthält.

2.2.4.7 Primer Extension

Mit Hilfe der Primer Extension können die Startpunkte der Transkription für exprimierte Gene festgelegt werden. Dies ist im besonderen für die Definition von Sequenz-Bereichen von Bedeutung, die Regulationsstellen der Transkription darstellen können.

Für die Primer Extension wurde zunächst RNS mit einem Antisense-Oligonukleotid für das *pyk*-Gen hybridisiert. Dieses Antisense-Oligonukleotid wurde dahingehend ausgewählt, daß bei der Hybridisierung keine störenden DNS-Sekundärstrukturen auftreten, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten.

Die Markierung des Oligonukleotids mit [γ -³²P]-ATP erfolgte in einer Reaktion mit 1 μ l T4-Polynukleotidkinase (PNK, 2 U/ μ l), 100 pmol des *pyk*-Antisense Oligonukleotids PK1PEX, 1,25 μ l 10-fach PNK-Puffer, 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP in einem Gesamt-Volumen von 12,5 μ l 60 min. bei 37°C. Die Reinigung des markierten Oligonukleotids erfolgte mit Hilfe des "Nucleotide Removal Kits" (QIAGEN), wobei das Elutionsvolumen 50 μ l betrug.

Für die Hybridisierung wurden 10 μ g RNS entweder von autotroph oder von heterotroph gezogenen Zellen in 10 μ l DEPC-H₂O gelöst, mit 6 μ l 10 x Hybridisierungspuffer (1,5 M KCl, 0,1 M Tris, pH 8,3, 10 mM EDTA), 4 μ l DEPC-H₂O und 10 μ l [γ -³²P]-ATP markiertem Primer PK1PEX vermischt. Nach einem Denaturierungsschritt (4 min. bei 80°C) erfolgte das Annealing der RNS und des Primers (1 Stunde bei 50°C). Anschließend wurde der Ansatz über Nacht mit 20 μ l DEPC-H₂O, 5 μ l 3 M Na-Acetat, pH 5,2, und 200 μ l EtOH abs. gefällt. Die Probe wurde daraufhin 10 min. 20.000 x g bei RT zentrifugiert, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und anschließend im Heizblock bei 37°C getrocknet.

Für die cDNA-Synthese wurde das Pellet in 19 μ l cDNA-Synthese-Reaktionsmix (4 μ l Erst-Strang-Puffer, 1 μ l 10 mM dNTP, 2 μ l 100 mM DTT, 2 μ l DMSO, 10 μ l DEPC-H₂O) aufgenommen und 2

min. bei 50°C vortemperiert. Die cDNA-Synthese wurde durch Zugabe von 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (Life Technologies, Eggenstein) gestartet und 30 min. bei 50°C durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz einer Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.2.2.2) unterzogen und der Überstand mit Ethanol gefällt (s. 2.2.2.3). Das Pellet wurde in 10 µl Stop-Puffer (Sequenase-Kit 2.0, USB) aufgenommen, 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C bis zum Auftrag auf das Sequenzgel eingefroren.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Gekoppelter Enzymtest der TIM in glycolytischer Richtung (modifiziert nach Plaut & Knowles, 1972)

Bei vorhergehenden Arbeiten (Kohlhoff et al., 1996) wurde zum Nachweis thermostabiler TIM-Aktivität in glycolytischer Richtung ein Enzymtest verwendet, bei dem eine in *E. coli* exprimierte phosphorylierende GAPDH aus *P. woesei* Arsenat und GAP zu 1-Arseno-3-phosphoglycerat umsetzt, welches instabil ist, zerfällt und damit dem Reaktionsgleichgewicht (DHAP-GAP) entzogen wird. Mit diesem Testsystem ist es lediglich möglich, die Affinität thermostabiler TIMs zum Substrat DHAP indirekt zu bestimmen, da Arsenat ein kompetitiver Inhibitor der TIM ist.

Durch den Einsatz einer nicht-phosphorylierenden GAPDH kann diese methodische Komplikation vermieden werden. Zum Nachweis der TIM aus hyperthermophilen Archaea in glycolytischer Richtung wurde als Hilfsenzym eine irreversible, nicht-phosphorylierende GAPDH aus *T. tenax* (Hensel et al., 1987; Brunner et al. 1998) eingesetzt. Die GAPDH-Reaktion wurde über die Reduktion von NAD⁺ zu NADH photometrisch durch die Zunahme der optischen Dichte bei λ= 366 nm verfolgt. Die TIM-Aktivität berechnete sich nach folgender Formel:

$$A = \frac{\Delta E/\text{min} * V_{\text{Test}}}{\epsilon * d * V_{\text{Enzym}}}$$

A: Enzymaktivität [U/ml], ΔE/min: Extinktionsänderung bei λ= 366 nm pro Minute, ε: molarer Extinktionskoeffizient für NAD⁺ bei 366 nm (ε_{NAD⁺}70 °C: 3,15 cm²/µmol), V_{Test}: Volumen des Testansatzes [ml], V_{Enzym}: Volumen der Enzymlösung [ml], d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Im Standardaktivitätstest wurden in einem Reaktionsvolumen von 1 ml 100 mM Tris-Puffer, pH 7.0 bei 70°C, 8 mM NAD⁺, 5 U NAD⁺-spezifische GAPDH aus *T. tenax* und TIM-Enzymlösung im vortemperierten Küvettenhalter auf die Reaktionstemperatur (70°C) gebracht. Der Reaktionsstart erfolgte durch Substratzugabe (4 mM DHAP).

2.3.2 Gekoppelter Enzymtest der Pyruvat-Kinase aus *T. tenax*

Da für diese Enzymreaktion kein geeignetes thermostabiles Hilfsenzym zur Verfügung stand, wurde die PK-Reaktion mit einer mesophilen L-LDH als Hilfsenzym nachgewiesen. Die LDH-Reaktion wurde durch die Abnahme der optischen Dichte bei $\lambda = 366 \text{ nm}$ als Folge der Oxidation von NADH zu NAD^+ verfolgt. Der Testansatz bei 50°C oder 60°C enthielt 100 mM HEPES-KOH (pH 7.0 bei der entsprechenden Reaktionstemperatur), 20 mM MgCl_2 oder 5 mM MnCl_2 , 10 mM ADP, 0,5 mM NADH, 20 mM Phosphoenolpyruvat, 4 U Lactat-Dehydrogenase in einem Reaktionsvolumen von 1 ml. Die Reaktion wurde durch Substratzugabe gestartet.

2.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Abhängigkeit des enzymatischen Umsatzes von der Konzentration verschiedener Reaktionskomponenten wurde in gekoppelten Tests gemessen. Dazu wurde die Initialgeschwindigkeit v unmittelbar nach Reaktionsstart herangezogen.

Die enzymkinetischen Parameter K_M und v_{\max} wurden mittels doppelt-reziproker Transformation nach Lineweaver & Burk (x-Achse: $1/[S]$; y-Achse: $1/v$; Lineweaver-Burk, 1934) als Achsenschnittpunkte (y-Achse: $1/v_{\max}$; x-Achse: $-1/K_M$) der Geraden ermittelt:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K}{V}\right) \times \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V}$$

Die Bestimmung der Kooperativität der einzelnen Effektoren erfolgte im Hill-Diagramm [x-Achse: $\log [S]$; y-Achse: $\log (v/V_{\max}-v)$] (Hill, 1925). In beiden Fällen wurden die experimentell ermittelten Daten mit Hilfe des Grafik-Programms SIGMAPLOT (Version 2.0, Jandel Scientific) ausgewertet.

2.3.4 Präparative Enzymreinigungen

Reinigung der TIM aus *T. tenax* und des in *E. coli* exprimierten Enzyms

Das Enzym wurde aus einer Zellcharge von 10 g autotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen isoliert. Nach Zellaufschluß in 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol wurde der Rohextrakt einer Hitzefällung unterzogen (30 min., 80°C) und anschließend zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat (40% Sättigung) auf Eis versetzt, gerührt (30 min.), zentrifugiert (30 min., $40000 \times g$) und das Sediment verworfen. Im nächsten Schritt wurde der Überstand weiter mit Ammoniumsulfat (50% Sättigung) versetzt, gerührt (30 min.) und zentrifugiert (30 min., $40000 \times g$), wonach sich ein Großteil der TIM-Aktivität im Sediment nachweisen ließ.

Die Proteinlösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM ME, dialysiert, anschließend auf Eis mit 1,4 M Ammoniumsulfat versetzt und auf eine mit 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM ME, 1,4 M Ammoniumsulfat äquilibrierte Phenylsepharose ff (80 ml Säulenvolumen, $\varnothing 2,5 \text{ cm}$, Flußrate 0,5 ml/min.) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem gegenläufigen Gradienten absteigender Ionenstärke (1,4 M Ammoniumsulfat \rightarrow 0 M Ammoniumsulfat) und zunehmender Ethylenglykolkonzentration (0% Ethylenglykol \rightarrow 30% Ethylenglykol).

Die Fraktionen mit TIM-Aktivität wurden nach Dialyse gegen 20 mM NaPi, 5 mM DTT auf eine Hydroxylapatit-Säule (30 ml Säulenvolumen, Ø 2 cm, mit 20 mM NaPi, 5 mM DTT äquilibriert) aufgetragen. In einem Stufengradienten wurde die Konzentration von NaPi schrittweise erhöht. Dabei verlief die Steigerung von 20 mM über 50 mM auf 100mM NaPi (jeweils 2 Säulenvolumina, gefolgt von Spülungen mit 2 Säulenvolumina HEPES-Puffer ohne NaPi), wobei das Maximum der TIM-Aktivität bei 100 mM eluierte.

Für die Reinigung des Proteins zur elektrophoretischen Homogenität wurden verschiedene Farbstoffsäulen getestet, von denen sich die Red120-Agarose als geeignetste erwies. Fraktionen, die nach dem Hydroxylapatit-Reinigungsschritt TIM-Aktivität enthielten, wurden gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM ME dialysiert und auf eine entsprechend äquilibrierte Red120-Agarose (5 ml Säulenvolumen, Ø 1 cm, Flußrate 0,3 ml/min.) aufgetragen. Nach intensivem Spülen (6 Säulenvolumina) mit Auftragspuffer wurde die TIM mit 10 mM KPi eluiert. Danach erwies sich das Protein als elektrophoretisch homogen.

Für die Reinigung des in *E. coli* exprimierten Enzym wurden 5 g Zellen in 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol resuspendiert und mittels dreimaliger Passage durch die FrenchPress-Zelle aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30 min., 40.000 x g) wurde eine Hitzefällung durchgeführt (30 min. bei 80°C), durch die ein Großteil der kontaminierenden *E. coli*-Proteine entfernt werden konnte. Nach Dialyse gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, wurde die Probe auf eine im gleichen Puffer äquilibrierte Red120-Agarose (5 ml, Ø 1 cm, Flußrate 0,3 ml/min.) aufgetragen. Nach intensivem Spülen (8 Säulenvolumina) wurde das Protein durch einen Puls mit 20 mM KPi eluiert. Die Kontrolle in einem SDS-PAGE ergab, daß nur noch eine kontaminierende Bande vorlag. Diese konnte durch Gelfiltration (Superose 6) entfernt werden, so daß das Protein in homogener Form vorlag und für die weiteren Analysen eingesetzt werden konnte.

Reinigung der in *E. coli* exprimierten TIM aus *M. fervidus*

10 g rekombinante *E. coli* BL21DE3-Zellen wurden in 20 ml 300 mM KPi, 30 mM ME resuspendiert und mittels dreimaliger Passage durch die FrenchPress-Zelle aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30 min., 40.000 x g) wurde eine Hitzefällung durchgeführt (30 min. 75°C). Die Probe wurde nach erneuter Zentrifugation gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, dialysiert und auf eine in gleichem Puffer äquilibrierte Q-Sepharose (5 ml, Ø 1 cm, Flußrate 0,3 ml/min.), aufgetragen. Es wurde ein linearer Gradient von 0-300 mM KCl angelegt und mit 6 Säulenvolumina Puffer ohne KCl gespült. Die TIM-Aktivität wurde durch einen Puls mit 400 mM KCl eluiert. Nach erneuter Dialyse gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, wurde der Proteinlösung gemörstertes Ammoniumsulfat vorsichtig bis zu einer Endkonzentration von 1 M im Eisbad zugegeben, die Probe auf eine mit 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 M Ammoniumsulfat äquilibrierte Phenyl-Sepharose (5 ml, Ø 1cm, Flußrate 0,3 ml/min.) aufgetragen und die TIM-Aktivität in einem gegenläufigen Gradienten (1→0 M Ammoniumsulfat; 0→30% Ethylenglykol) eluiert. Danach war das Protein elektrophoretisch homogen und konnte für die weiteren Analysen eingesetzt werden.

Reinigung der in *E. coli* exprimierten TIM aus *P. woesei*

5 g *E. coli*-Zellen wurden entsprechend der Vorschrift von Kohlhoff (1995) resuspendiert, aufgeschlossen und einer Hitzefällung unterzogen. Nach erneuter Zentrifugation und Dialyse wurde das Protein durch Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose gereinigt. Nach Spülen mit zweifachem Säulenvolumen wurde ein Vorpuls mit 50 mM KCl gegeben, erneut mit 2 Säulenvolumina gespült und die TIM-Aktivität durch einen Puls von 150 mM KCl eluiert. Das Protein erwies sich als elektrophoretisch homogen und wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Präparation der in *E. coli* exprimierten NAD-spezifischen GAPDH aus *T. tenax*

Anzucht, Präparation und Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde in Anlehnung an die Vorschrift, die in der Dissertation von Brunner (1998) beschrieben ist, durchgeführt.

Reinigung der PK aus *T. tenax* und des in *E. coli* exprimierten Enzyms

Die Reinigung der PK aus *T. tenax* wurde in Anlehnung an das Protokoll von Siebers (1995) durchgeführt. Bei der Reinigung der rekombinanten PK wurden 5 g *E. coli*-Zellen in 10 ml 10 mM KPi, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, resuspendiert und in der FrenchPress-Zelle aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (30 min., 40.000 x g), Hitzefällung (30 min., 80°C) und erneuter Zentrifugation wurde die Probe gegen 50 mM HEPES, pH 7.0, 10 mM 2-Mercaptoethanol dialysiert und auf eine in gleichem Puffer äquilibrierte AMP-Sepharose aufgetragen. Nach intensivem Spülen mit Auftragspuffer (8 Säulenvolumina), wurde ein Puls von 100 mM KCl gegeben, erneut mit 8 Säulenvolumina nachgespült und die PK-Aktivität mit 300 mM KCl eluiert. Danach war das Protein elektrophoretisch homogen und konnte für weitergehende Analysen eingesetzt werden.

2.3.5 Bestimmung der Thermostabilität von Proteinen über irreversible Inaktivierung

Zur Untersuchung der Thermostabilität wurden gereinigte Enzymfraktionen verwendet. Die Proteine wurden unter anaeroben Bedingungen dialysiert, in Glaskapillaren je nach Fragestellung mit potentiell thermostabilisierenden Effektoren versetzt und anschließend abgeschmolzen. Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die Bestimmung der Restaktivität erfolgte nach den angegebenen Standardmethoden (s. 2.3.1 und 2.3.2).

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µg wurde mit Hilfe des "Protein-Assays" der Fa. BioRad durchgeführt, welcher eine Modifikation der Methode von Bradford (1976) darstellt.

10 bis 100 µl entsprechend verdünnter Enzymlösung wurden mit A. bidest. auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl "Protein Assay"-Konzentrat 15 min. bei RT inkubiert. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard.

2.4.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Konzentration über Molekularsiebzentrifugation

Die Konzentrierung von Proteinlösungen unter nativen Bedingungen erfolgte mit Hilfe der Molekularsiebröhrchen Centriprep 30 (Amicon, Ausschlußvolumen 30 kDa).

Vor Gebrauch wurden die Röhrchen mit 2 x 2 ml A. bidest. gespült. Anschließend wurde die Proteinprobe mittels Zentrifugation (20 min., 3.500 x g, 4°C) in einem Ausschwingrotor bis zum gewünschten Volumen eingengt.

Konzentration über Acetonfällung

Proben mit geringem Proteingehalt (< 0,5 µg) wurden vor der Auftrennung über SDS-PAGE (s. 2.4.5) mit Aceton (Endkonzentration: 50%) versetzt. Nach 30 min. Inkubation bei -20°C wurde das präzipitierte Protein sedimentiert (20 min., 20.000 x g, 4°C), in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1 x Probenpuffer (60 mM Tris/HCl, pH 6.8; 10% Glycerin, 5% ME, 2% SDS, 0,05% Bromphenolblau) gelöst.

2.4.3 Bestimmung des Molekulargewichts unter nativen Bedingungen

Gelsiebchromatographie

Zur Bestimmung des Molekulargewichts unter nativen Bedingungen wurde Molekularsieb-Chromatographie im präparativen Maßstab mit HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Pharmacia) oder im analytischen Maßstab mit Superose 6 (Pharmacia) durchgeführt. Durch die Verwendung des Pharmacia Superloops konnten maximal 10 ml Proteinlösung auf die HiLoad 26/60 Superdex aufgetragen werden. Die Flußrate betrug 0,7 ml/min. und die Fraktionen (1,5 ml) wurden ab der 175. min. gesammelt. Die Eichproteine Ferritin (443.000 Da; 1 mg), Alkohol-Dehydrogenase (148.000 Da; 1.25 mg), D-Lactat-Dehydrogenase (78.000 Da; 0.118 mg) und Cytochrom c (12.500 Da; 2 mg) wurden vor dem Lauf gegen 50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM KCl dialysiert und anschließend der Proteinprobe (10 ml Endvolumen) zugesetzt. Bei analytischen Gelsiebchromatographien mit Superose 6 wurde die zu chromatographierende Proteinlösung (max. 200 µl) ebenfalls mit den dialysierten Eichproteinen (s.o.) versetzt, die Flußrate auf 0,4 ml/min. festgelegt und die Fraktionen (100 µl) ab der 15. min. gesammelt.

Nach der Gelfiltration wurden die Enzymaktivitäten bzw. die Absorption der Eichproteine bei RT wie folgt photometrisch vermessen:

Ferritin:	Absorption bei 217 nm
Alkohol-Dehydrogenase:	Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei 366 nm (Testreaktion bei RT: 0.1 M Tris/HCl, pH 7.0, 0,4 mM NADH, 2 mM Acetaldehyd)
D-Lactat-Dehydrogenase:	Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei 366 nm (Testreaktion bei RT: 0.1 M Tris/HCl, pH 7.0; 0,4 mM NADH, 2 mM Pyruvat)
Phosphoglycerat-Kinase:	Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei 366 nm (Testreaktion bei RT: 0.1 M Tris/HCl, pH 7.0; 0,4 mM NADH, 10 mM Mg ²⁺ -ATP, 10 mM 3-Phosphoglycerat, 2 U Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
Cytochrom c:	Absorption bei 416 nm

Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichtsläufe wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman XLA) bei RT durchgeführt. Sedimentationswerte (s -Werte) wurden bei 56.000 Upm in einer 12 mm Doppel-Sektor-Zelle bei Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml bestimmt. Die Sedimentation des Proteins wurde über einen UV-Scanner bei $\lambda = 234$ nm verfolgt. Bei Sedimentationsgleichgewichtsläufen, die zur Bestimmung des Molekulargewichts dienten, wurden unterschiedlichen Füllhöhen der Zellen und je nach anzunehmender Molekülmasse verschiedene Geschwindigkeiten zwischen 10.000 und 17.000 Upm verwendet. Die Berechnung der Molekülmassen erfolgten unter der Annahme eines partiellen spezifischen Volumens von $0,73 \text{ cm}^3/\text{g}$. Diese Arbeiten wurden von Ariel Lustig am Biozentrum Basel, AG Prof. Kirschner, durchgeführt.

2.4.4 Bestimmung des Molekulargewichts unter denaturierenden Bedingungen

Die Bestimmung des Untereinheiten-Molekulargewichtes von Proteinen erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE (2.4.5) über einen Molekulargewichtsstandard. Der Molekulargewichtsmarker SDS-7 enthält als Größenstandards folgende Proteine: Rinderserumalbumin (66.000 Da), Ovalbumin (45.000 Da), GAPDH aus Kaninchenmuskel (36.000 Da), Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (29.000 Da), Trypsinogen aus Rinderpankreas (24.000 Da), Trypsininhibitor aus Sojabohne (20.100 Da) sowie α -Lactalbumin aus Rindermilch (14.200 Da). Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, in der die logarithmierten Molekulargewichte der Markerproteine gegen ihre relative Mobilität aufgetragen wurden.

2.4.5 Proteintrennung durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

Die Proteinauftrennung mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese (Glycin-SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) in Mini-ProteanII-Kammern (Biorad) durchgeführt.

Zunächst wurde ein Trenngel (Endkonzentration: 10-12% Polyacrylamid; 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,03 Vol% APS; 0,005 Vol% TEMED) gegossen und mit H_2O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde darauf das Sammelgel (Endkonzentration: 4% Polyacrylamid; 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,03 Vol% APS; 0,005 Vol% TEMED) gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Die Zusammensetzung der Puffer erfolgte nach Laemmli (Polyacrylamidlösung: 29,2% Acrylamid, 0,8% Bis-Acrylamid; Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, 0,4% SDS; Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 0,4% SDS; Laufpuffer: 0,25 M Tris, 0,19 M Glycin, 0,1% SDS). Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel wurden vor Zugabe des Polymerisationsmittels (TEMED) gründlich entgast.

Vor dem Probenauftrag wurden die Proteine mit Probenpuffer (60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% Glycerin, 5% ME, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau) versetzt und 3 min. bei 94°C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde 1 h bei 10 mA und anschließend weitere 2 h bei 15-20 mA durchgeführt.

2.4.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow

Zur Auftrennung von Peptiden wurden Polyacrylamidgele nach Schägger und von Jagow (1987) verwendet, die eine besonders gute Auflösung im Bereich von 5-28 kDa ermöglichen. Bei diesem Gelsystem werden das ca. 10 cm hohe Trenngel (für 15 ml: 5 ml Acrylamid-Stammllösung [46,5% Acrylamid, 1,5% Bisacrylamid]; 5 ml Gelpuffer [3 M Tris-HCl, pH 8,4, 0,3% SDS]; 2 ml Glycerin; 3 ml H_2O ; 50 μl 10% APS; 5 μl TEMED) und ein zusätzliches Abstandsgel von 2-3 cm Höhe (für

15 ml: 3,05 ml Acrylamid-Stammlösung [48% Acrylamid, 1,5% Bisacrylamid]; 5 ml Gelpuffer [s.o.]; 6,95 ml H₂O; 50 µl 10% APS; 5 µl TEMED) ohne Entgasungsschritt direkt nacheinander gegossen und mit H₂O überschichtet. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurde das 2 cm hohe Sammelgel (für 6,25 ml: 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung [48% AA, 1,5% BAA]; 1,55 ml Gelpuffer [s.o.]; 4,2 ml H₂O; 50 µl 10% APS; 5 µl TEMED) gegossen, wobei die Lösung vor Zugabe des TEMED gut entgast wurde.

Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 20 µl Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 12% Glycerin, 0,01% Serva Blau G, 2% ME) aufgenommen, für 30 min. bei 40°C inkubiert und direkt aufgetragen.

Als Anodenpuffer wurde 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, und als Kathodenpuffer 0,1 M Tris, pH 8,2, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS verwendet. Die Elektrophorese wurde bei RT durchgeführt, wobei die Spannung für ca. 60 min. auf 36 V begrenzt wurde. Anschließend wurde die Spannung für 16-18 h auf 95 V erhöht.

2.4.7 Elektro-Proteintransfer

Der Proteintransfer aus der Gelmatrix auf ein festes Trägermaterial erfolgte mittels Elektroblothing nach dem von Eckerskorn et al. (1988) beschriebenen Semidry-Verfahren in einer CarboGlas Semidry-Transferkammer (Schleicher & Schuell). Als Trägermaterial wurden hydrophobe Membranen (Biodyne B) verwendet, die sich durch hohe Proteinbindungskapazität auszeichnen und direkt für die Sequenzanalyse eingesetzt werden können.

Das Proteingel wurde nach Beendigung der Elektrophorese vom Sammelgel getrennt und ebenso wie bereits zugeschnittene Filterpapiere (für Anode und Kathode je 3 Lagen Whatman 3MM-Papier) 5 min. in Transferpuffer (50 mM Borat, pH 9,0, 20% Methanol) äquilibriert, wobei für die kathodischen Filterpapiere zusätzlich 0,1% SDS zugegeben wurde. Die Äquilibrierung der Membran erfolgte für 10 min. in reinem Methanol. Der Aufbau des Blots erfolgte nach einer Arbeitsvorschrift von Schleicher & Schüll (Jungblut et al., 1990): Zuerst wurden drei passend zugeschnittene Filterpapiere (Whatman 3MM) tropfnaß auf die Anode gelegt. Darauf wurde die Membran positioniert und das äquilibrierte Gel luftblasenfrei aufgelegt. Drei weitere Filterpapiere, die in Kathodenpuffer äquilibriert waren, schlossen den Blotaufbau nach oben ab. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 0,8-1 mA/cm² Geloberfläche über 2-3 h durchgeführt, wobei die Kathode mit einem Gewicht von 2 kg beschwert wurde.

Anschließend wurde die Membran 1 Minute bei RT in 40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Serva Blau gefärbt, einige min. in reinem Methanol entfärbt und bei RT getrocknet.

2.4.8 Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung

Die Gele wurden nach der Elektrophorese direkt bei 50°C für 30 min. mit Coomassie-Lösung (40% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Serva Blau R) gefärbt und anschließend über mehrere Stunden in 7,5% (v/v) Essigsäure/5% (v/v) Methanol entfärbt (Laemmli, 1970).

Silberfärbung nach Heukeshoven & Dernick, 1985

Diese Färbemethode wurde in solchen Fällen angewendet, in denen geringe Proteinmengen analysiert werden mußten. Dazu wurde das Gel in Lösung 1 (100 ml Ethanol, 25 ml Essigsäure, 125 ml A. bidest.) für 30 min. fixiert, in Lösung 2 (75 ml Ethanol, 10,25 g Na-Acetat, 1,3 ml Glutaraldehyd, 0,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ pro 250 ml) ebensolange inkubiert und anschließend dreimalig für 5 min. in A. bidest. gewaschen. Das Gel wurde durch 40 minütige Inkubation in Lösung 3 (50 μl Formaldehyd, 0,25 g AgNO_3 pro 250 ml) gefärbt und danach in Lösung 4 (25 μl Formaldehyd, 6,25 g NaCO_3 pro 250 ml) entwickelt. Die Färbung konnte durch Zugabe von Lösung 5 (3,65 g EDTA pro 250 ml) gestoppt werden. Nach Abwaschen der Chemikalien durch Schwenken in A. bidest. (2 x 5-10 min.) konnten die Gele in 10% Glycerin gelagert werden.

2.4.9 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz durch automatisierten Edman-Abbau

Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau in einem Gasphasensequenator (Proteinsequenzer 473 A /Applied Biosystems). Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. Wüster am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (Sequenzierungen der TIMs) und von Dr. Roland Schmidt, Institut für Mikrobiologie der Universität Osnabrück, (Sequenzierung der PK von *T. tenax*) durchgeführt.