

# Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Chemie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Holger Steinlechner

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2003

(D F 1)

*Meiner lieben Frau Sigrid*

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels angefertigt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. J.W. Engels für die interessante Aufgabenstellung, die Durchsicht dieser Arbeit und die gute Betreuung.

Dank an Herrn Dr. Hüseyin Aygün für die anregenden Diskussionen und die erhaltenen Tips.

Meinen Laborkollegen Dr. Hüseyin Aygün, Dr. Peter Eschenbrenner und Dr. Itamar Goren spreche ich meinen Dank aus. Das grandiose Klima und die gute Zusammenarbeit kann ich nur jedem wünschen.

Für die Unterstützung bei analytischen sowie technischen Problemen bedanke ich mich bei Beate Conrady und Rainer Schmidt.

Die Benutzung von verschiedenen technischen Geräten wurde mir dankenswerterweise von der BioSpring GmbH ermöglicht.

Dem Arbeitskreis Engels sei gedankt für das angenehme Arbeitsklima.

Den Arbeitskreisen Griesinger und Göbel danke ich für die Nutzung von Geräten und Infrastruktur.

Last but not least will ich meinen Chefs und Kollegen bei der DREGIS GmbH danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Mutagenese . . . . .	1
1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion . . . . .	6
1.2.1	Denaturierung . . . . .	7
1.2.2	Annealing . . . . .	8
1.2.3	Verlängerung . . . . .	9
1.2.4	Thermostabile Polymerasen . . . . .	9
1.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion und Mutagenese . . . . .	12
1.3	Tendamistat, ein $\alpha$ -Amylase-Inhibitor . . . . .	13
1.4	Disulfidbrücken . . . . .	17
1.5	Streptomyceten . . . . .	20
1.5.1	Industrielle Bedeutung von <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	20
1.5.2	Biologie von <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	22
1.5.3	Proteinexpression in <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	23
1.6	Elektrophorese . . . . .	24
1.6.1	Allgemein . . . . .	24
1.6.2	Medien . . . . .	25
1.6.3	Varianten . . . . .	25
1.6.4	Bedingungen . . . . .	26
1.7	Vektoren . . . . .	26
1.7.1	Allgemein . . . . .	26
1.7.2	pT136 . . . . .	27
1.7.3	pAX5a . . . . .	28

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	iv
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Material . . . . .	30
3.1.1 Chemikalien . . . . .	30
3.1.2 Geräte . . . . .	33
3.1.3 Enzyme . . . . .	35
3.1.4 Organismen . . . . .	36
3.1.5 Plasmide . . . . .	36
3.1.6 DNA- und Protein-Marker . . . . .	36
3.2 Steriles Arbeiten . . . . .	37
3.3 Lösungen und Puffer . . . . .	38
3.4 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> . . . . .	43
3.4.1 Rollerkulturen . . . . .	43
3.4.2 Stammhaltung (Backup) . . . . .	44
3.4.3 Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	44
3.4.4 Transformation . . . . .	45
3.4.5 Isolation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse) . . . . .	45
3.4.6 Isolation von Plasmid-DNA (Phenolische Lyse) . . . . .	46
3.4.7 Isolation von Plasmid-DNA (Extraktionskit von Macherey und Nagel . . . . .	47
3.5 Arbeiten mit <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	48
3.5.1 Minipreparation . . . . .	48
3.5.2 Plattenstammhaltung . . . . .	48
3.5.3 Proteinexpression in <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	49
3.5.4 Herstellung von Protoplasten . . . . .	49
3.5.5 Transformation von Protoplasten . . . . .	51
3.6 Arbeiten mit DNA . . . . .	52
3.6.1 Analytik doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Agarosegelen	52
3.6.2 Analytik einzelsträngiger DNA mittels Polyacrylamidgелеlektrophorese . . . . .	53
3.6.3 Quantifizierung von dsDNA über UV-Spektrometrie . . . . .	54

3.6.4	Quantifizierung von ssDNA über UV-Spektrometrie . . . . .	54
3.6.5	Elektroelution von dsDNA aus Agarosegelen . . . . .	55
3.6.6	Isolierung von dsDNA aus Agarosegelen mittels DEAE-Membranen . . . . .	56
3.6.7	Isolierung von dsDNA aus Agarosegelen mittels Elutionskit	57
3.6.8	Phenol-Chloroform-Extraktion . . . . .	57
3.6.9	Ethanol-fällung . . . . .	58
3.6.10	Dephosphorylierung mit Calf Intestinal Phosphatase . . . . .	58
3.6.11	Ligation mit T4-Ligase . . . . .	59
3.6.12	Restriktion von DNA . . . . .	60
3.6.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	61
3.6.14	DNA-Sequenzierung . . . . .	63
3.7	Arbeiten mit Proteinen . . . . .	63
3.7.1	Proteinfällung mittels Aceton . . . . .	63
3.7.2	Proteinfällung mittels Ammoniumsulfat . . . . .	64
3.7.3	$\alpha$ -Amylase-Plattentest . . . . .	64
3.7.4	PEG-Behandlung von Coomassie-gefärbten Proteingelen . . . . .	65
3.7.5	Trocknung von Polyacrylamidgelen . . . . .	66
3.7.6	PAGE unter Nativ-Bedingungen . . . . .	67
3.7.7	Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand von <i>Streptomyces lividans</i> . . . . .	68
3.7.8	Schägger-Jagow-Gele (Tricine-SDS) . . . . .	69
3.7.9	Coomassiefärbung . . . . .	71
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>72</b>
4.1	Untersuchungen zur schnellen Unterscheidung von Tendamistatvarianten . . . . .	72
4.1.1	Allgemein . . . . .	72
4.1.2	Gelfiltration . . . . .	72
4.1.3	Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	72
4.1.4	Transversale Gele . . . . .	73
4.1.5	Gradientengele . . . . .	75

4.2	Strategien zur Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat	81
4.2.1	Strategie 1 . . . . .	81
4.2.2	Strategie 2 . . . . .	82
4.2.3	Strategie 3 . . . . .	84
4.3	Mutagenese . . . . .	85
4.3.1	Mutagenese unter Verwendung der PCR-Methode nach Nelson und Long [45, 68] . . . . .	85
4.3.2	Mutagenese unter Verwendung der Oligonukleotidsynthese in Kombination mit PCR . . . . .	93
4.3.3	Expression . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>108</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Mutagenese

#### Allgemein

Mutagenese ist der Prozeß der Veränderung von genetischem Material eines Organismus. Die Veränderungen werden Mutationen genannt und entstehen im Organismus sowohl durch dessen Vervielfältigungsapparat (endogene Faktoren), als auch künstlich durch die Umwelt und den Menschen (exogene Faktoren). Die dabei entstehenden Änderungen können einen positiven Einfluß haben, so daß der Organismus in seiner Umgebung einen Selektionsvorteil erhält. Hat die Änderung einen negativen Einfluß, so führt dies meist zu längeren Generationszeiten oder zum Tod des Organismus bzw. seiner Nachfahren. In den meisten Fällen aber haben Mutationen keinen oder keinen merklichen Einfluß. Tritt keine Veränderung im Phenotyp auf, sagt man, es handelt sich um eine stille Mutation. Daher sind Mutationen zunächst einmal ohne Wertung zu sehen, sie zeigen nur, daß die Information eines Lebewesens nicht statisch ist.

Mutationen können unterschiedlichen Ursprungs sein. Zum einen durch äußere Einflüsse wie Strahlung, insbesondere UV-Licht oder Chemikalien. Zum anderen entstehen sie innerhalb des Organismus, z.B. bei dessen Vermehrung oder bei fehlerhaften Reparaturen. Die Enzyme zur Zellteilung haben einen großen Anteil an den zelleigenen Mutationen. Dazu zählen die DNA-Polymerasen. Diese stellen Kopien der DNA her. Hierbei kommt es zu fehlerhaften Einbauten bei ca.



jeder  $10^9$ -ten Base. Diese Genauigkeit erreichen die Enzyme durch ein sogenanntes „proofreading“. Durch das Überprüfen der Einbauten wird die Geschwindigkeit des Kopiervorgangs herabgesetzt. Bei einer genaueren Überprüfung nimmt die Geschwindigkeit weiter ab. Die Vermehrungsrate ist also ein Kompromiss zwischen Geschwindigkeit des Kopiervorgangs und dessen Genauigkeit. Mit niedriger Geschwindigkeit wäre die Anzahl der Mutationen minimal, aber die Wachstumsgeschwindigkeit sehr gering. Das ist ein Nachteil in einer Umgebung mit anderen Organismen, welche die gleiche Nahrungsquelle bevorzugen. Daher sind Mutationen ein fester Bestandteil der Natur, sowie ein notwendiger Faktor für Evolution.

Der Mensch besitzt die Möglichkeit, Mutationen künstlich einzuführen. Er macht sich das zu nutze, um Organismen schneller oder auch gezielter zu verändern. Dazu gibt es die Methoden der Kreuzung von Organismen, das Aussetzen der Organismen mit Mutagenen oder Strahlung sowie mikrobiologische Ansätze. Die einzelnen Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Sie sind tabellarisch (Tabelle 1.1) dargestellt.

<b>Methode</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Kreuzung	funktioniert, ohne detailliertes Wissen über die Genstruktur	geringe Kontrolle, zeitintensiv
UV-Licht, Chemikalien	einfache Handhabung	ungleichmäßige Verteilung der Mutationen
Mikrobiologische Mutagenese	verschiedene Methoden, schnell	erfordert Informationen über das Genom

Tabelle 1.1: Vergleich verschiedener Mutagenesemethoden

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion zur Generation der Mutanten genutzt, da sie gute Möglichkeiten bietet, Gene zu verändern [45], sowie diese gleichzeitig zu vervielfältigen. Sie lässt sich sowohl für die gerichtete und ungerichtete, als auch für die statistische Mutagenese einsetzen.

### **Gerichtete Mutagenese**

Bei diesem Verfahren wird ein Genbereich (ein oder mehrere Coden) gezielt verändert. Dazu werden einzelne Basen gegen bestimmte ausgetauscht.

Die gerichtete Mutagenese eignet sich gut, um gezielt an definierten Bereichen der DNA Veränderungen einzuführen [68]. Der Vorteil hierbei ist die genaue Lokalisierung der Mutation. Dadurch ergeben sich gute Voraussetzungen für die Untersuchung und den Vergleich verschiedener Varianten. Der Nachteil ist der hohe Aufwand bei der Herstellung verschiedener Mutanten. Für jede einzelne muß der Mutageneseprozeß durchlaufen werden. Zeigt eine so konstruierte Variante nicht die gewünschten Eigenschaften, beginnt der Mutageneseprozeß von neuem. Dies ist ein enormer Zeitverlust, da in der Regel die Eigenschaften des Proteins von Interesse sind und nicht dessen Herstellung.

### **Ungerichtete Mutagenese**

Im Fall der ungerichteten Mutagenese werden nicht bestimmte Nukleotide ausgetauscht, sondern zufällig im gesamten Genom Veränderungen eingeführt.

In diesem Fall erhält man durch Auswahl geeigneter Bedingungen ziemlich schnell eine Mutante mit den gewünschten Eigenschaften [1, 66]. Da die Einführung der Mutation nicht gezielt an einer Stelle vorgenommen wird, ist die Mutante auf die Veränderung hin zu untersuchen. Da die Mutation nicht zwingend im untersuchten Gen liegt, ist eine Untersuchung recht aufwendig. Zudem ist es schwer eine Erklärung für den Effekt zu finden, wodurch weitere gerichtete Untersuchungen erforderlich sind.

Die in dieser Arbeit hauptsächlich angewendete Variante der Mutagenese möchte ich als statistische Mutagenese benennen.

### **Statistische Mutagenese**

Eine Kombination zwischen gerichteter und ungerichteter ist die statistische Mutagenese [49, 53]. Hier wird ein vorher definierter Bereich der Mutagenese unterzogen und nicht das gesamte Gen. Es werden im Gegensatz zur gerichteten Mutagenese möglichst viele Mutanten gleichzeitig erzeugt. In dieser Arbeit wurde

z.B. der Bereich von 2 Aminosäuren, also 6 Nukleotiden gewählt, um möglichst alle Varianten gleichzeitig zu untersuchen. Durch die Limitierung des Bereichs im Mutageneseexperiment ist die Anzahl der möglichen Varianten zu handhaben.

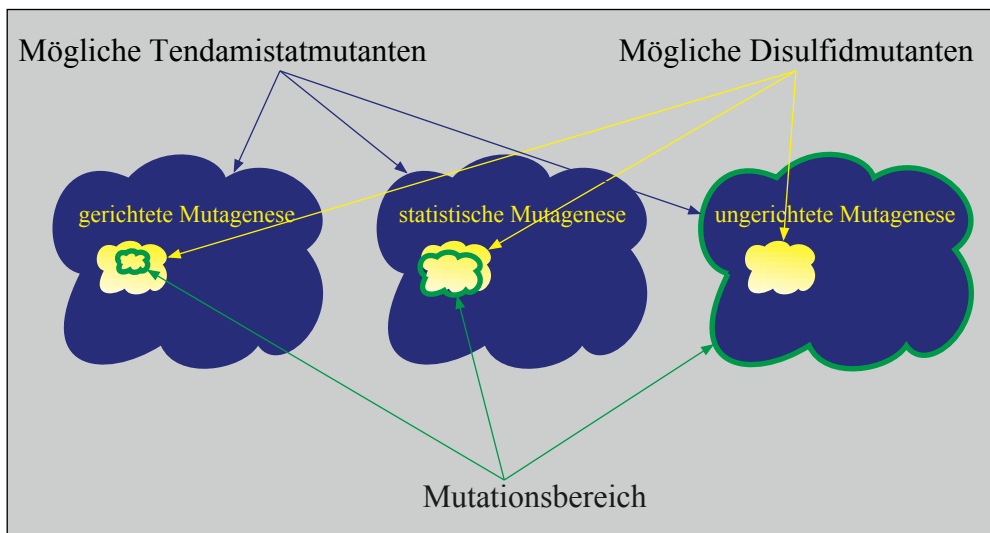


Abbildung 1.1: Vergleich der Mutagenesemethoden

Wie bei der ungerichteten Mutagenese ist es im Anschluß notwendig die einzelnen Varianten zu finden, zu isolieren und zu definieren.

alte Aminosäure	Codon	neues Codon	neue Aminosäure
Cys	UGY	NNN	alle
Cys	UGY	UNY	Phe/Ser/Tyr
Cys	UGY	UYU	Phe/Ser

Tabelle 1.2: Effekt auf Basenänderungen

Sinnvoll einsetzbar ist die statistische Mutagenese allerdings nur bei Proteinen mit hinreichend bekannter Struktur. Durch die Einschränkung des Bereiches an dem die Mutationen eingeführt werden, ergibt sich eine Vorauswahl, sowie eine zahlenmäßige Beschränkung der erhaltenen Varianten.

Beispielhaft ist in Tabelle 1.2 der Austausch von Cystein dargestellt. Der Aus-

tausch des Codons durch die Basen in der Spalte neues Codon ergibt die, in neue Aminosäuren dargesellten, Möglichkeiten. Im ersten Fall sind das 20 im zweiten, etwas eingeschränkten, 3. Zudem kann man auch beliebige andere Basenkombinationen verwenden, was zu einer weiteren Verkleinerung der Variantenzahl führt.

Die Möglichkeit die Mutagenesebereiche einzuengen, sowie die Art der Mutation zu bestimmen, macht die statistische Mutagenese so interessant. So lassen sich bei einem nicht zu großen Bereich annähernd alle Mutanten gleichzeitig herstellen. Wie in Abbildung (1.1) am Beispiel der Disulfidbrücke-Mutanten schematisch dargestellt, liegen bei Anwendung der statistischen Mutagenese alle Mutanten im gewünschten Bereich. Bei der gerichteten Mutagenese trifft dies auch zu, die Anzahl der Mutanten ist aber geringer. Im Fall der ungerichteten Mutagenese erhält man zu den interessanten Mutanten zusätzlichen Overhead. Dadurch erhöht sich der Aufwand bei der Selektion unnötig.

Damit ist der prozentuale Anteil der interessanten Varianten bei der statistischen im Vergleich zur ungerichteten Mutagenese deutlich erhöht.

Diese erhöhte Konzentration an gewünschten Mutanten ermöglicht den Verzicht auf große Roboterstraßen, was insbesondere für kleine Firmen sowie Forschungseinrichtungen interessant ist.

## **Selektion**

Um die gewünschten Mutanten aus dem Genpool zu isolieren, werden die einzelnen Klone Tests unterworfen. Es werden die interessanten Varianten aussortiert und untersucht. Hier wird deutlich, daß eine niedrige Klonzahl von großem Nutzen ist. Der Aufwand steigt mit der Anzahl der Varianten stark an. Der Overhead bei der ungerichteten Mutagenese führt demnach zu erhöhtem Aufwand.

Wird der zu verändernde Bereich klein gehalten, reduziert sich auch folgendes Problem. Da der genetische Code degeneriert ist, erzeugt man mehrfach den gleichen Phenotyp. Dies erhöht die Anzahl der zu untersuchenden Klone zusätzlich. Es ist also finanziell, wie auch zeitlich sinnvoll, das Experiment so zu planen, daß möglichst viele Varianten die gewünschten Eigenschaften haben.

## 1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction (PCR)) ist ein Verfahren zur in vitro Vervielfältigung von DNA. Sie wurde 1985 von K. Mullis [44] entwickelt, der ein Verfahren von Kleppe und Khorana durch den Einsatz einer thermostabilen Polymerase angepaßt hat. Daraus resultierte eine erhöhte Geschwindigkeit, sowie die Automatisierung des Verfahrens. Heute hat die Polymerase-Ketten-Reaktion ein breites Anwendungsspektrum. Einige der Anwendungen sind hier aufgelistet:

- Klonierung, Mutagenese
- Diagnose von HIV, Sichelzellenanämie und anderen Krankheiten, die sich mittels Genveränderungen nachweisen lassen
- Sequenzierung

Die Polymerase-Ketten-Reaktion gliedert sich grundsätzlich in drei verschiedene Phasen [32]. Die erste Phase (Denaturierung) trennt DNA-Doppelstränge von einander und löst die Überstrukturen der Primer. In der zweiten Phase (Annealing) lagern sich die Primer an die erzeugten Einzelstränge. Schließlich in der dritten Phase werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert. Durch einen zyklischen Ablauf dieser drei Phasen erhält man eine Vielzahl an DNA-Fragmenten, die durch die zwei eingesetzten Primer begrenzt werden. Das Schema einer Polymerase-Ketten-Reaktion ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Bei der PCR wird mit Hilfe einer Polymerase ein kurzes DNA-Stück (Primer) an einer Matrize (Templat) verlängert. Zur erfolgreichen Umsetzung des Verfahrens müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein. Der Primer muß sich an das Templat anlagern können. Besonders wichtig ist hierbei das 3'-Ende des Primers. Ist dies nicht exakt komplementär zum Templat ist eine Verlängerung nicht möglich (dies ist abhängig von der Polymerase). Das Templat muß einzelsträngig sein. Entweder es liegt schon als Einzelstrang vor, oder es muß durch Denaturierung in Einzelstränge aufgespalten werden. Weitere kritische Faktoren sind die Polymerase, die Nukleotidkonzentration, die Temperatur sowie die Menge und Art

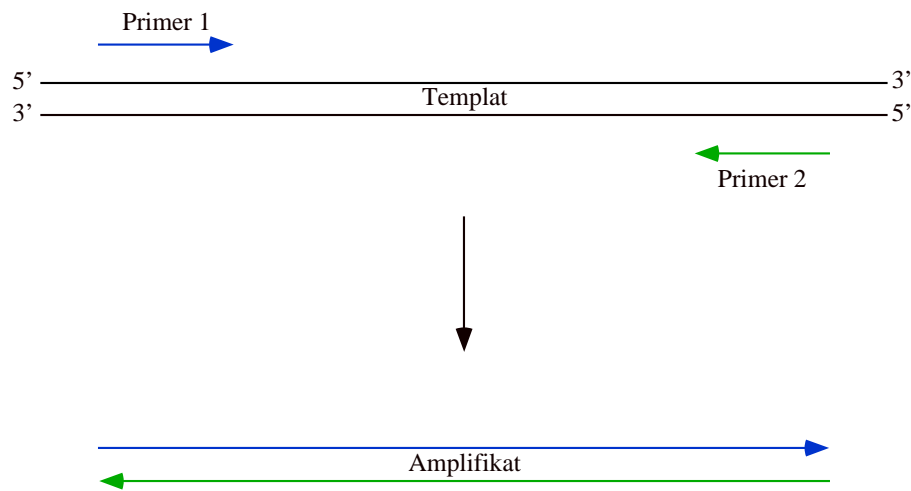


Abbildung 1.2: Ablauf einer Standard-PCR

des zweiwertigen Metallions (z.B.  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ). Die Polymerase-Ketten-Reaktion hat in allen drei Phasen ihre „Fallstricke“.

Die einzelnen Phasen der Polymerase-Ketten-Reaktion sind hier einzeln beschrieben.

### 1.2.1 Denaturierung

Diese Phase ist in den meisten Fällen die am wenigsten problematische. Hier werden die DNA-Doppelstränge von einander getrennt, sowie die Überstrukturen der Primer oder des DNA-Einzelstrangtemplats reduziert. Die Temperatur ist geeignet zu wählen. Sie hängt von verschiedenen Faktoren ab. Im einzelnen sind das, die Zusammensetzung der DNA, die Stabilität der Polymerase und die Zusammensetzung des Puffers. Besteht die DNA aus einem hohen Anteil an G und C, ist der Schmelzpunkt hoch. Es muß eine hohe Temperatur gewählt werden, sowie eine längere Inkubationszeit. Dies hat einen direkten Einfluß auf die Ausbeute. Zum einen ist die Renaturierung sehr schnell, was zu einer Verringerung des effektiven Templats führt. Auf der anderen Seite führen lange Inkubationszeiten zur schnelleren Zerstörung der Polymerase. Das führt zu Falscheinbauten, sowie zu Ausbeuteverlusten. Durch Zugabe von DMSO [5] oder Formamid kann die Schmelztemperatur herabgesetzt werden. Zu hohe Konzentrationen dieser Stoffe

können auch hier die Polymerase zerstören. Zudem wird auch die Annealingtemperatur abgesenkt, dies muß auch beim Primerdesign berücksichtigt werden.

### 1.2.2 Annealing

Beim Annealing gibt es viele Einstellungsmöglichkeiten. Es gilt die Temperatur, das Primerdesign, das Templat und den Puffer zu berücksichtigen. Ist die Temperatur zu hoch gewählt, binden zu wenig oder keine Primer am Templat. Bei zu niedrig gewählter Temperatur binden die Primer auch an anderen Bereichen. Außerdem ist die Konkurrenzreaktion, das Renaturieren der DNA oder die Bildung von Überstrukturen, stärker begünstigt.

Das Design der Primer ist ebenso wichtig. Es ist darauf zu achten, daß die 3'-Enden des Primers möglichst exakt auf das Templat passen. Bei Einführung von Mutationen mittels eines Primers sollte ein möglichst langer komplementärer 3'-Bereich vorhanden sein. Die Länge des Primers ist ebenfalls ein wichtiger Faktor. Bei zu kurzen Primern muß die Annealingtemperatur recht niedrig gewählt werden, mit den oben erwähnten Folgen. Ist der Primer zu lang, kommt es zu unspezifischen Bindungen am Templat. Zudem ist eine hohe Annealingtemperatur einzustellen. Dabei kommt es zur Lockerung der Bindung am 3'-Ende des Primers zum Templat. Da aber die Bindung des 3'-Endes essentiell für die Polymerase-Ketten-Reaktion bzw. deren Ausbeute ist, kommt es hier zu einer deutlichen Reduktion der Ausbeute. Eine Annealingtemperatur von ca. 50°C ist anzustreben. Übersichtsweise wird die Annealingtemperatur so bestimmt:

$$T_m = (A_n + T_n) \cdot 2^\circ\text{C} + (C_n + G_n) \cdot 4^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}$$

Für jedes A oder T werden 2°C und für jedes G oder C 4°C angenommen. Diese Formel läßt den Aufbau des Primers unberücksichtigt. Wie erwähnt ist der 3'-Bereich des Primers von entscheidender Bedeutung. Ebenso wichtig ist die lokale Zusammensetzung, also vorkommende Häufungen von G/C- oder A/T-Bereichen, gleichen Abfolgen oder mehrfaches Auftreten der gleichen Base nacheinander. Ein guter Primer hat möglichst gleichverteilt A/T- und G/C-Bereiche, sowie eine möglichst regellose Abfolge von Basen. So werden unspezifische Amplifikationen vermieden und die Fehlerrate niedrig gehalten.

### 1.2.3 Verlängerung

Die Qualität der Verlängerung ist entscheidend von der Denaturierung und dem Annealing abhängig. Die Temperatur im Verlängerungsschritt sollte im Optimum der Polymerase liegen, das meist bei 72°C liegt. Hier müssen die Primer immer noch gut binden. Die Prozeßdauer ist abhängig von der Geschwindigkeit der Polymerase. Sie sollte nicht zu kurz gewählt werden, da hier die Fragmente nicht in voller Länge erhalten werden, aber auch nicht zu lange, da sonst die Konzentration an Nukleotiden unnötig stark abnimmt, was zu Fehleinbauten führen kann.

Ein weiterer Aspekt ist die Qualität der Polymerase, ihre Hitzebeständigkeit, ihre Genauigkeit und die Empfindlichkeit. Durch zu langes Verweilen bei hohen Temperaturen werden die Polymerasen zerstört oder geschädigt. Hat die Polymerase eine hohe Hitzebeständigkeit, ist die Qualität und die Ausbeute höher. Sind die Polymerasen zerstört, ist die effektive Menge an Enzym und damit die Ausbeute gering. Bei einer teilweisen Zerstörung kann es zusätzlich zu Fehleinbauten kommen.

Die Genauigkeit ist ein weiteres Kriterium. Ist eine möglichst exakte Vervielfältigung gewünscht oder erforderlich, sind Polymerasen mit Fehlerkorrekturmechanismen zu bevorzugen. Handelt es sich aber um kurze Abschnitte oder sind Ungenauigkeiten erwünscht, kann man auf einfachere Polymerasen zurückgreifen.

Wie bei allen Proteinen reagiert auch die Polymerase empfindlich auf ihre Umgebung. Sind die Pufferbedingungen nicht richtig oder störende Verbindungen zugegen, erhöhen sich die Fehler oder die Polymerase-Ketten-Reaktion funktioniert nicht.

### 1.2.4 Thermostabile Polymerasen

#### Allgemein

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion werden thermostabile Polymerasen verwendet. Frühere Methoden arbeiteten mit hitzelabilen Polymerasen, was zur Folge hatte, daß nach jeder Denaturierung neues Enzym zugegeben werden mußte. Die-



ser enorme Enzymverbrauch machte dieses Verfahren sehr teuer. Mit dem Einsatz thermostabiler Polymerasen konnten die Kosten gesenkt und das Verfahren automatisiert werden. Zudem kommt eine deutliche Zeitersparnis, da die Versuche auch über Nacht durchgeführt werden können.

### Taq-Polymerase

Im Yellowstone Nationalpark in den USA wurde *Thermus aquaticus* isoliert. Dieser aus den dortigen heißen Quellen stammende Organismus enthält eine thermostabile Polymerase. Lawyer et al. [39] gelang es das Gen für die Polymerase zu isolieren, in *Escherichia coli* zu klonieren und zu exprimieren. Die Polymerase wurde nach ihrer Herkunft Taq-Polymerase genannt. Die Eigenschaften sind in Tabelle 1.3 dargestellt.

Eigenschaft	Wert
Masse	94kD
Temperaturoptimum	75-80°C
Geschwindigkeit	150bps
Halbwertszeit (95°C )	40min

Tabelle 1.3: Eigenschaften der Taq-Polymerase

Es gibt mittlerweile mehrere Mutanten der Taq-Polymerase mit angepassten Eigenschaften.

- AmpliTaq
- AmpliTaq Gold
- KlenTaq

### Vent-Polymerase

Eine weitere thermostabile DNA-Polymerase ist die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vent-Polymerase. Sie besitzt eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und er-

zielt somit eine deutlich höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase, durch sogenanntes „proofreading“. Sie wurde von Innis exprimiert und aufgereinigt. Sie ist sehr robust und präzise. Ihr Einsatz erfolgt, wenn hohe Genauigkeit verlangt wird.

<b>Eigenschaft</b>	<b>Wert</b>
Temperaturoptimum	72-75°C
Geschwindigkeit	größer 750bps
Halbwertszeit (95°C )	400min

Tabelle 1.4: Eigenschaften der Vent-Polymerase

### Weitere thermostabile Polymerasen

Neben den oben genannten gibt es noch ein Reihe weiterer thermostabiler Polymerasen (siehe Tabelle 1.5), wie Pfu. Sie alle verfügen über bestimmte Eigenschaften, die in Polymerase-Ketten-Reaktionen interessant sind und erweitern so die Auswahlmöglichkeiten.

<b>Name</b>	<b>5'-3'-Exonuklease</b>	<b>3'-5'-Exonuklease</b>	<b>Fehlerrate</b>
Tfl	+	-	k. A.
Tth	+	-	k. A.
Pfu	-	+	k. A.
Vent(exo-)	-	-	$190 \cdot 10^{-6}$
DeepVent	-	+	$190 \cdot 10^{-6}$
Vent	-	+	$57 \cdot 10^{-6}$
Taq	+	-	$285 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 1.5: Weitere thermostabile Polymerasen

Abschließend bleibt zu sagen, daß die Taq-Polymerase für Tests und Diagnosen auf Grund ihres Preises und der einfachen Handhabung vorrangig Verwen-

dung findet. Bei diffizileren Aufgaben oder der Notwendigkeit hoher Genauigkeit ist je nach Art der Anwendung die Verwendung anderer Polymerasen sinnvoll.

### **Vergleich der Polymerasen**

Die Taq-Polymerase hat aufgrund ihrer fehlenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität im Vergleich zur Vent-Polymerase eine erhöhte Fehlerrate. In Tabelle 1.5 sind die Werte mit aufgelistet. Eine falsch eingebaute Base kann die Taq-Polymerase nicht entfernen. Daher ist dafür Sorge zu tragen, daß möglichst wenige Fehleinbauten stattfinden. Dies läßt sich durch eine äquimolare Konzentration an dNTPs, sowie nicht zu niedriger Konzentration derselben, erreichen. Zudem ist es ratsam, nur kürzere Fragmente mit wenigen Zyklen zu amplifizieren. Durch gegenteiliges Verhalten ist man in der Lage, die Polymerase-Ketten-Reaktion zur Mutagenese zu verwenden. Die Vent-Polymerase arbeitet hingegen sehr genau, was zum Großteil auf die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zurückzuführen ist. Durch den Kontrollmechanismus ist die Vent-Polymerase länger (5-15mal) auf dem Templat (high fidelity) als die Taq-Polymerase. Die Eigenschaft der Taq-Polymerase an das 3'-Ende ein zusätzliches A anzuhängen, führt zu Problemen, wenn ein definiertes 3'-Ende notwendig ist.

### **1.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion und Mutagenese**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird schon seit längerem bei Mutageneseexperimenten eingesetzt, um mit mutagenen Primern Veränderungen einzuführen und diese zu amplifizieren. Im Unterschied dazu gibt es eine andere Methode: Sie nutzt gezielt die Fehler beim Einbau von Nukleotiden, um Mutationen in den ursprünglichen DNA-Strang einzuführen. Wie bereits unter Abschnitt 1.1 erwähnt führt dies zu einer ungezielten sehr hohen Anzahl von Varianten. Diese zu isolieren, erfordert einen hohen Aufwand an Material.

### 1.3 Tendamistat, ein $\alpha$ -Amylase-Inhibitor

Als extrazelluläres Peptid wurde Tendamistat (HOE 467) aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces tendae* 4158 isoliert [2, 61]. Das Peptid besteht aus 74 Aminosäuren. Zwei konsekutiv verbrückte Disulfide sind an den Positionen 11-27 und 45-73 zu finden. Die Sekundär- und Tertiärstruktur wurde durch Röntgenstrukturanalyse, sowie NMR-spektroskopisch ermittelt [33, 34, 47, 51]. Diese ergaben ein all- $\beta$ -Protein mit zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern. Beide Faltblätter bestehen aus 3 Strängen und ergeben zusammen ein sogenanntes  $\beta$ -barrel. Als weiteres Strukturmerkmal erkennt man ein exponiertes Triplet am Ende des ersten  $\beta$ -Faltblattes.



Abbildung 1.3: Darstellung von Tendamistat [47]

Zu den Eigenschaften des Tendamistats zählt die Inhibition von schweinepankreatischer  $\alpha$ -Amylase durch die Bildung eines 1:1-Komplexes mit einer pH-unabhängigen Inhibierungskonstante von  $K_i = 2 \cdot 10^{-10} \text{M}$  bis  $9 \cdot 10^{-12} \text{M}$ .

Neben der schweinepankreatischen werden die  $\alpha$ -Amylase des menschlichen Speichels, sowie von *Streptomyces limosus* inhibiert. Die Inhibition erfolgt in-

<b>Strukturtyp</b>	<b>Zugehörige Aminosäurebereiche</b>
1. $\beta$ -Faltblatt	12-17, 20-27, 52-58
2. $\beta$ -Faltblatt	30-37, 41-49, 67-73
non hairpin turn Typ I	10-11
non hairpin turn Typ II	50-51
hairpin turn	18-19, 37-41

Tabelle 1.6: Strukturmerkmale des Tendamistats

nerhalb einer Inkubationzeit von weniger als 60s. Der  $\alpha$ -Amylase-Tendamistat-Komplex wird erst bei einer Konzentration von 9M Harnstoff oder 10% SDS gelöst. Andere  $\alpha$ -Amylasen, z.B. aus *Bacillus amyloliquefaciens*, werden nicht oder nur leicht inhibiert (Tabelle 1.7).

<b>Inhibition</b>	<b>Bakterium</b>
nein	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Horedeum vulgare</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	$\beta$ -Amylase (Kartoffel)
ja	Homo sapiens (Speichel)
	Schweinepankreas
	<i>Streptomyces limosus</i>

Tabelle 1.7: Inhibierung von  $\alpha$ -Amylasen durch Tendamistat

Versuche zur proteolytischen Spaltung mit Pankreas-Protease, Elastase, Pappain und Kollagenase zeigen keinen nachweisbaren Effekt auf Tendamistat. Die Umsetzung mit Pepsin führt zu einem Aktivitätsverlust von 25% innerhalb einer Stunde. Ebenso erhält man einen Verlust an Aktivität von 10% mit den Proteasen Thermolysin, Trypsin und Chymotrypsin bei einer Exposition von einer Stunde.

Tendamistat kann außerdem 1min ohne Verminderung der Aktivität auf 90°C

erhitzt werden. Als spektroskopische Eigenschaft ist die maximale UV-Absorption bei 276nm mit einer Schulter bei 281nm zu nennen. Der Absorptionskoeffizient beträgt hierbei  $A_{1\text{cm},276\text{nm}}^{1\%} = 16,1$ , dies entspricht einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $A_{\text{molar}} = 12719\text{cm}^{-1}$ . Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,35.

Tendamistat gehört zu einer Gruppe von Polypeptiden, die ebenfalls  $\alpha$ -Amylasen inhibieren. In Tabelle 1.8 sind sie gezeigt.

Die konservierten Bereiche sind hervorgehoben. Deutlich sind die Parallelen im Aufbau zu erkennen. Die Disulfidbrücken, sowie das Triplet um Aminosäure 18-20 und der Bereich von 50-62 sind fast identisch. Die auffallenden Ähnlichkeiten legen den Schluß nahe, daß das Triplet sowie die anderen Bereiche bei der Bindung an  $\alpha$ -Amylasen eine entscheidende Rolle spielen [63]. Die Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase beruht auf der Bindung des Tendamisatats an deren „active site“.

Mittels kalorimetrischer Messungen an Tendamisat-Disulfidbrücken-Mutanten wurde der Beitrag der Disulfidbrücken zur Stabilität des Tendamisatats quantifiziert. Dabei wurden vier Mutanten am kleinen Loop (11-27) und eine am großen Loop (45-73) untersucht [57]. Die Messungen zeigen erhebliche Stabilitätsverluste, wobei die Öffnung des kleinen Loops im Vergleich zum großen Loop eine stärkere Destabilisierung zur Folge hat (siehe Abbildung 1.4 und 1.5).

## Anwendung

Auf Grund seiner  $\alpha$ -Amylase inhibierenden Wirkung, wurde Tendamisat als mögliches Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes mellitus untersucht. Durch die Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase, wäre die in der Nahrung vorhandene Stärke nicht abgebaut worden. Dies hätte eine Behandlung mit Insulin reduziert oder unnötig gemacht. Da Insulin gespritzt werden muß, hätte die orale Verabreichung des Tendamisatats, eine Erleichterung für die Patienten bedeutet. Aufgrund von Nebenwirkungen wie Durchfall und Allergien wurden die klinischen Studien abgebrochen [43, 42].

Desweiteren ist Tendamisat, bzw. Teile davon, als Transportprotein bei der gentechnischen Herstellung von Insulin im Gespräch gewesen [36]. Hier wurde sich die Expression des Tendamisatats in das Kulturmedium zu Nutze gemacht. Zudem erkannte man dabei, dass die Disulfidbrücken des Insulins auf diesem Weg in

Inhibitor	Sequenz														
	5					10					15				
Tendamistat	D	T	T	V	S	E	P	A	P	S	C	V	T	L	Y
PaimI				A	S	E	P	A	P	A	C	V	V	M	Y
HaimII						I	A	A	P	A	C	V	H	F	T
Z-2685			A	T	G	S	P	V	A	E	C	V	E	Y	F
AI-409		A	T	V	G	E	P	A	P	Q	C	V	E	Y	F
T-76			A	T	G	A	P	A	P	A	C	V	E	S	F
	20					25					30				
Tendamistat	Q	S	W	R	Y	S	Q	A	D	N	G	C	A	E	T
PaimI	E	S	W	R	Y	T	T	A	A	N	N	C	A	D	T
HaimII	A	D	W	R	Y	T	F	V	T	N	D	C	S	I	D
Z-2685	Q	S	W	R	Y	T	D	V	H	N	G	C	A	D	A
AI-409	Q	S	W	R	Y	T	D	V	H	N	G	C	L	V	A
T-76	Q	S	W	R	Y	T	D	V	H	N	G	C	S	E	T
	35					40					45				
Tendamistat	V	T	V	K	V	V	Y	E	D	D	T	E	G	L	C
PaimI	V	S	V	S	V	A	Y	Q	D	G	A	T	G	P	C
HaimII	Y	S	V	T	V	A	Y	G	D	G	T	D	V	P	C
Z-2685	V	S	V	T	V	E	Y	T	H	G	Q	W	A	P	C
AI-409	V	S	V	T	V	E	Y	T	N	G	Q	W	A	P	C
T-76	V	S	V	T	V	E	Y	T	N	G	Q	W	A	P	C
	50					55					60				
Tendamistat	Y	A	V	A	P	G	Q	I	T	T	V	G	D	G	Y
PaimI	A	T	L	P	P	G	A	V	T	T	V	G	E	G	Y
HaimII	R	S	A	N	P	G	D	I	L	T	F	P	-	G	Y
Z-2685	R	V	I	E	P	G	G	W	A	T	F	A	-	G	Y
AI-409	R	V	I	E	P	G	G	R	A	T	F	A	-	G	Y
T-76	V	T	I	Q	P	D	G	W	A	T	F	A	-	G	Y
	65					70					75				
Tendamistat	I	G	S	H	G	H	A	R	Y	L	A	R	C	L	
PaimI	L	G	E	H	G	H	P	D	H	L	A	L	C	P	S
HaimII	G	T	R	G	N	E	V	L	G	A	V	L	C	A	T
Z-2685	G	T	D	G	D	Y	V	T	G	L	H	T	C	D	P
AI-409	G	T	N	G	N	Y	Q	T	G	L	R	A	C	D	P
T-76	G	T	N	S	N	Y	V	T	A	V	K	T	C	D	P

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

Inhibitor										Sequenz
Tendamistat										
PaimI	S									
HaimII	D	G	S	A	L	P	V	D		
Z-2685	A	T	P	S						
AI-409	T	S	V	T	P					
T-76	A	A	T	A	S					

Tabelle 1.8: Vergleich der  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren

*Streptomyces lividans* richtig verknüpft werden. Eine einfache Nachverarbeitung ergab Humaninsulin. Allerdings wurde der Prozeß nicht großtechnisch umgesetzt. Die Aufkonzentrierung aus dem Kulturüberstand war zu aufwendig, zudem war inzwischen ein weiteres Verfahren zur Humaninsulingewinnung erarbeitet worden.

Als letzte Anwendung ist die Forschung zu nennen. Durch die geringe Größe, sowie der einfachen Gewinnung und unkomplizierten Handhabung, eignet sich Tendamiostat gut als Forschungsobjekt. Dafür sprechen zudem die hohe Stabilität gegenüber Proteasen und die Erkenntnisse über Struktur und Physik. Im Arbeitskreis von Prof. Engels wurden erste Untersuchungen zum Einfluss der Disulfidbrücken auf die Stabilität des Tendamiostats gemacht [19, 57]. Zudem werden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Kiefhaber Faltungsstudien durchgeführt.

## 1.4 Disulfidbrücken

Disulfidbrücken sind neben anderen Wechselwirkungen ein wichtiger Bestandteil zur Stabilisierung der Proteinkonformation. Während van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff- oder Salzbrücken nur vergleichsweise schwache Kräfte sind, stabilisiert eine Disulfidbrücke mit 8-20kJ/mol die vorhandene Konformation sehr deutlich [24, 48, 58]. Allerdings stellt die Disulfidbrücke starke sterische Ansprüche an die Umgebung im Protein. Die beiden Cysteine, aus denen sie gebildet wird,



müssen bestimmte Abstände und Winkel aufweisen, damit eine Disulfidbrücke ausgebildet wird [15, 60]. Dies wiederum zeigt, daß eine neu eingeführte Disulfidbrücke nur unter ganz bestimmten Umständen eine Stabilisierung des Proteins zur Folge hat [13, 14, 17, 59]. In den meisten Fällen ist das Protein sogar weniger stabil als vorher, da sich dabei ein anderer Teil des Proteins anders faltet und damit die Eigenschaften stark beeinflußt werden.

Da die Disulfidbrücke eine kovalente Bindung ist, wird sie unter den meisten Bedingungen zur Denaturierung nicht gelöst. Es werden reduzierende Bedingungen benötigt, um sie reversibel zu spalten. Hierzu werden Reagenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol verwendet. In den Zellen übernehmen Enzyme (Dsb) unter Zuhilfenahme von Glutathion [12, 31, 64] diese Aufgabe. Irreversible Spaltungen der Disulfidbrücke erhält man unter oxidativen Bedingungen, die zu Sulfin- bzw. zu Sulfonsäuren führen.

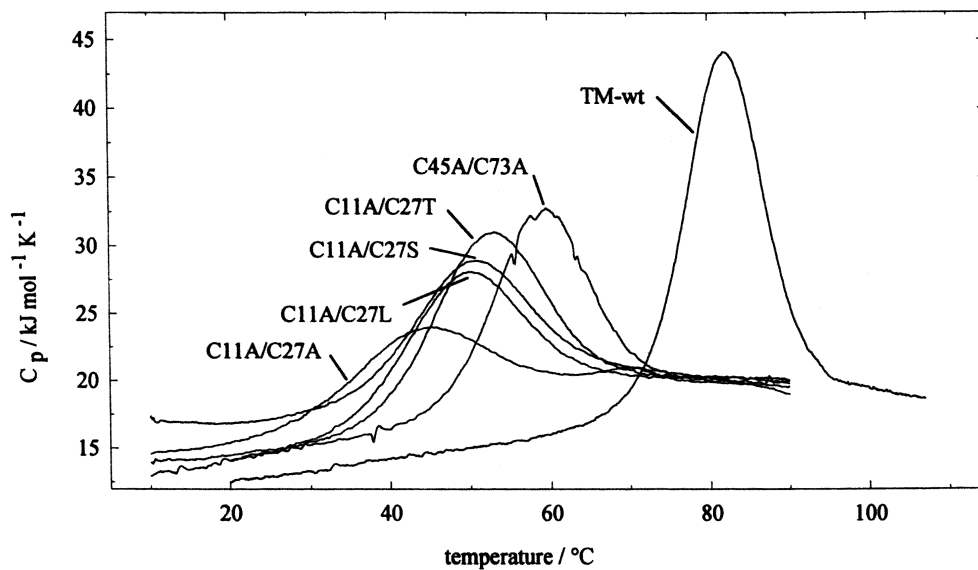


Abbildung 1.4: Kalorimetrische Messungen von M. Scharf [57]

Die Bildung von Disulfidbrücken erfolgt in vivo in der Regel spontan beim Übergang des Proteins vom reduzierenden Cytoplasma ins Periplasma bzw. in die Umgebung. Sind mehr als 2 Cysteine im Protein enthalten, führt die spontane Bildung nicht immer zur stabilen Form des Proteins. Enzyme, wie DsbA, öffnen die Disulfidbrücke reversibel, so daß die Disulfidbrücke erneut gebildet werden kann. Hier wird dann die thermodynamisch günstigste Variante gebildet.

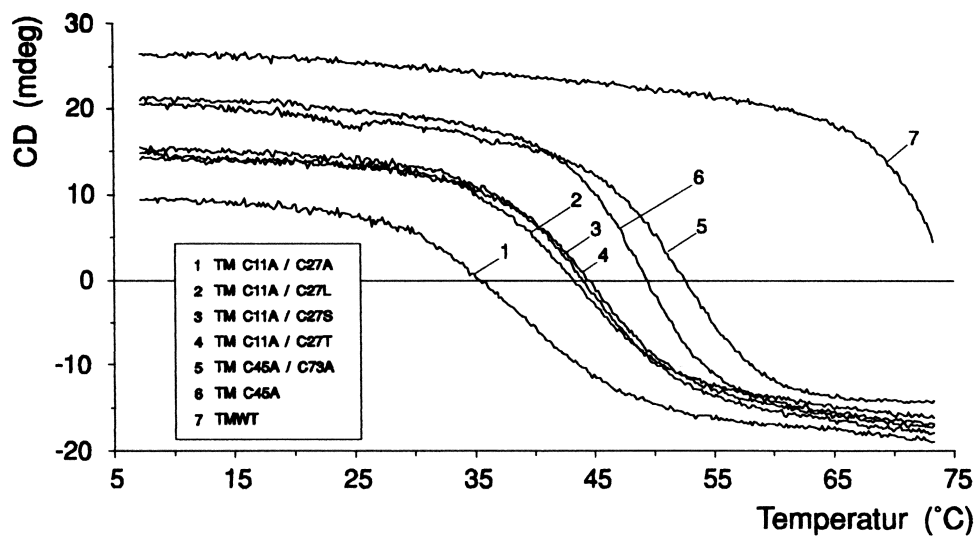


Abbildung 1.5: CD-Messungen von M. Scharf [57]

Einige Disulfidbrücken sind essentiell für die richtige Faltung des Proteins, wohingegen andere „nur“ die Stabilität des Proteins beeinflussen [4]. Bei letzteren kann man die zugehörigen Cysteine gegen andere Aminosäuren, wie Alanin austauschen. Dabei erhält man in der Regel ein Protein mit der gleichen Funktion wie das ursprüngliche. Der Austausch führt meist zu einer starken Destabilisierung des Proteins.

Die Ausführungen machen deutlich, daß Disulfidbrücken bei Faltungsexperimenten zu Problemen führen. Sie werden unter den meisten Bedingungen nicht geöffnet, so daß die Faltungsstudien den eigentlichen Ablauf bei der Faltung nicht gut nachbilden können. Werden aber Disulfidbrücken entfernt, die für das Protein essentiell sind, faltet es nicht richtig. Sind nur Disulfidbrücken betroffen, die für eine erhöhte Stabilität sorgen, hat man eine gute Näherung bei Faltungsexperimenten. Wird allerdings mehr als eine Brücke entfernt, kann die Destabilisierung ein Maß erreichen, bei dem kein gefaltetes Protein mehr vorhanden ist. Dies führt zu großen Schwierigkeiten bei der Darstellung wie auch bei der Isolierung des Proteines. Durch die nicht vorhandene bzw. falsche Faltung ist dieses Protein anfälliger gegenüber Proteaseabbau und Aggregation.

Verschiedene Theorien zur Stabilisierung des Proteins durch einen Loop, der durch zwei Disulfidbrücken aufgespannt wird, sind beschrieben. Bei Pace [46]

wird die Stabilitätserhöhung durch die Disulfidbrücke mit der Anzahl der Aminosäuren im Loop korreliert. Sie kommen zu dem Ergebnis, je größer der Loop ist, desto größer ist der Effekt bei der Öffnung auf die Stabilität. Ein großer Loop erfährt eine stärkere Destabilisierung beim Öffnen der Disulfidbrücke als ein kleiner. Allerdings ist das Tendamiostat mit seinen beiden Loops bereits ein gutes Gegenbeispiel. Durch die Arbeiten von M. Scharf [19, 57] wurde gezeigt, daß die Stabilität der beiden Loops genau entgegengesetzt zur Theorie ist. Dies zeigt, daß zumindest in unserem Fall die Korrelation zwischen Loopgröße und Stabilität, ein zu einfaches Modell ist. Es spielen viele zusätzliche Faktoren wie die Oberfläche und die Wasserzugänglichkeit eine Rolle.

In Abbildung 1.4 und 1.5 sind dargestellt, welche Mutanten vermessen wurden. Abgebildet sind die CD-Spektren, sowie die kalorimetrischen Messungen von M. Scharf an Disulfidmutanten. Zu sehen sind die verschiedenen Auswirkungen beim Austausch von Cystein mit verschiedenen Aminosäuren.

Die Unterschiede in der Stabilität sind sehr deutlich zu erkennen. So nimmt sie beim kleinen Loop (11-27) von A über L und S nach T zu. Beim großen Loop existiert leider nur eine Variante. Allerdings sieht man den Unterschied zum kleinen Loop sehr leicht. Eine Mutante ohne Disulfidbrücke konnte nicht erfolgreich exprimiert werden.

## 1.5 Streptomyceten

### 1.5.1 Industrielle Bedeutung von *Streptomyces lividans*

Die im Boden lebenden gram-positiven Streptomyceten gehören zur Gattung der Actinomycetales. Sie sekretieren eine Vielzahl an hydrolytischen Proteinen, um den Abbau von makromolekularen Nährstoffen in der Umgebung zu ermöglichen [40, 62]. Diese Eigenschaft macht die Streptomyceten zu einem interessanten Organismus für Proteinuntersuchungen. Der Organismus erleichtert die Reinigung des Proteins erheblich, da er durch die Sekretion desselben, dieses von den Proteinen im Zellinneren trennt. Zudem ist eine kontinuierliche Proteingewinnung möglich, das heißt die Zellen müssen nicht erst aufgeschlossen werden, um an das

Protein zu kommen. Man kann die Kultur in einem statischen Zustand halten, bei dem Medium hinzugegeben wird und verbrauchtes Medium abgenommen wird. Hieraus kann das Protein extrahiert werden. Außerdem sind Konstrukte wie Fusionsproteine meist unnötig. Eine Renaturierung der Proteine erübrigt sich in vielen Fällen ebenfalls, da diese in den Kulturbedingungen meist nativ vorliegen.

Für den industriellen Maßstab ist dieses Vorgehen nicht immer optimal. Da das Protein in großer Verdünnung vorliegt, müssen hohe Mengen an Lösemittel entfernt werden. Dadurch wird die kontinuierliche Proteingewinnung schnell unrentabel. Zudem treten Probleme mit der Zusammensetzung der Kultur auf. Da Streptomyceten recht langsam wachsen, ist die Gefahr von Kontaminationen mit schnell wachsenden Bakterien recht hoch. Die genetische Stabilität spielt ebenfalls eine Rolle. Wird die Kultur nicht ausreichend mit Antibiotikum versehen, entfernen die Bakterien vermehrt das einklonierte Genmaterial. Dies führt zu Ausbeuteverlusten.

Für die Industrie interessanter als die Möglichkeit Proteine in das Kulturmedium zu exprimieren, ist die Vielfalt an Sekundärmetaboliten. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Antibiotika, wie Streptomycin, Chloromycetin, Aureomycin und verschiedene Tetracycline [8, 29]. Auch verschiedene Polyketide sind von wirtschaftlichem Interesse.

In der Forschung findet die Möglichkeit der Sekretion Anwendung. Dabei wird dann das Protein meist nativ erhalten. Nicht zu unterschätzen ist der enorme Zeitgewinn bei der Aufreinigung im Vergleich zur Expression als Fusionsprotein in *Escherichia coli* sowie das Wegfallen der Rückfaltung. Dies ist insbesondere von Vorteil, wenn das Protein nur schlecht oder gar nicht zurückgefaltet werden kann.

Um den beschriebenen Vorteil trotz der langen Kulturdauer [30] von *Streptomyces lividans* zu nutzen, wurde in unserem Arbeitskreis ein Klonierungssystem entwickelt. Es besteht aus zwei Plasmiden, bei denen der eine Vektor (pT136) ein pUC19-Derivat und der andere ein Shuttlevektor (pAX5a [27]) ist. Letzterer wurde aus den Plasmiden pIJ702 [6] und pUC19 [67] konstruiert. pT136 wird sowohl zur Klonierung als auch zur Sequenzierung verwendet. Diese Schritte sind in *Escherichia coli* möglich. In pAX5a wird dann der gewünschte Bereich einklo-

niert und anschließend in Streptomyceten transformiert. Die so klonierten Proteine werden in das Kulturmedium sekretiert.

### 1.5.2 Biologie von *Streptomyces lividans*

Die Streptomyceten haben einen sehr komplexen Lebenszyklus, bei dem verschiedene Wuchsformen ausgebildet und Stadien durchlaufen werden. Sporen als Keime für neue Kulturen sind über Jahre hinweg lebensfähig [10, 28]. Aus ihnen geht die Kolonief orm, das Substratmycel, hervor, welches tief in den Kulturboden eindringt. Durch die Farbe, den Geruch und die Form des Mycels lassen sich einzelne Arten und Stämme unterscheiden. Das sich aus dem Substratmycel entwickelnde Luftmycel ist in seiner Form meist stark ausgeprägt. Es bilden sich hieraus durch Abschnürung aus den Lufthyphen (Sporophoren) die Sporen, die den Lebenszyklus (Abbildung 1.6) vervollständigen.

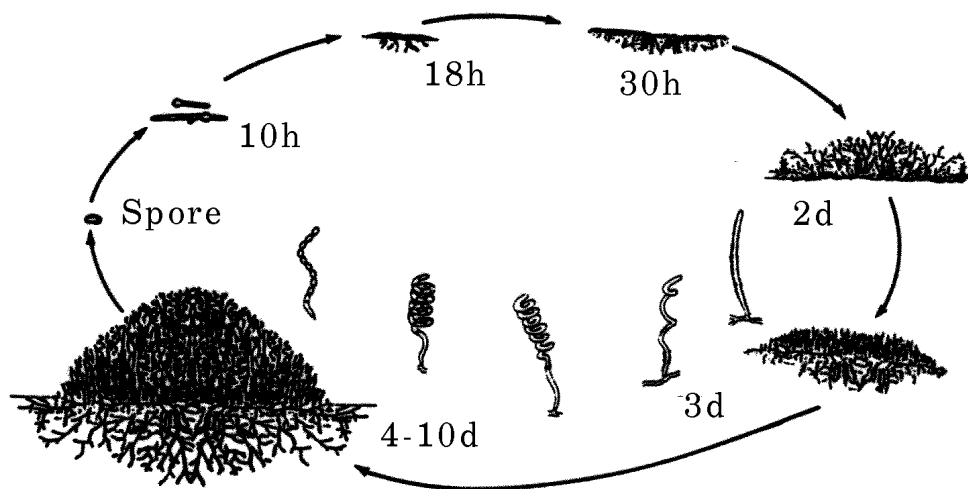


Abbildung 1.6: Lebenszyklus von Streptomyceten

Die Streptomyceten gehören im Gegensatz zu *Escherichia coli* zu den grampositiven Bakterien. Wie für diese Gruppe von Bakterien üblich, besitzen sie eine starke Mureinschicht und kein Periplasma. Ebenso fehlt ihnen eine äußere Membran, wodurch die oben erwähnte Fähigkeit zur Sekretion begründet ist.

Für Untersuchungen mit heterologen, nicht Streptomyceten-eigenen, Proteinen

ist dieses System gut geeignet. Bei eukaryontischen Proteinen kommt es allerdings oft zu Problemen. Als Beispiele sind nur Insulin und Hirudin genannt. Ersteres besteht aus zwei Peptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Hierfür gibt es in Prokaryonten keine Aufbaumöglichkeit. Über Umwege ist es allerdings gelungen, Insulin so zu erhalten [38, 37]. Hirudin besitzt 6 Cysteine, die 3 Disulfidbrücken bilden. Dies sind  $5 \cdot 3 \cdot 1 = 15$  Möglichkeiten wie die Disulfidbrücken verknüpft sein können. Die richtige Verknüpfung ist entscheidend für die richtige Faltung und somit für die Funktion. Versuche hierzu zeigten, daß das Hirudin hauptsächlich falsch gefaltet vorliegt [65]. Lösungsansätze sind die Zugabe von beispielsweise Glutathion ins Medium. Hier konnte gezeigt werden, daß natives Hirudin dargestellt werden kann. Erweiterungen sind die Koexpression von Reduktasen wie DsbA zusätzlich zur Zugabe von Glutathion.

Im Vergleich zu *Escherichia coli* (20min) ist die Generationszeit von *Streptomyces lividans* (2h) [30] deutlich länger. Es kommt leicht zu Kontaminationen in der Kultur, so daß sorgfältiges Arbeiten wichtig ist. Streptomyceten sind wegen der langen Generationszeit, aber auch wegen der Schwierigkeiten bei der DNA-Isolierung schlecht für Klonierungen geeignet. Es bietet sich eine Trennung von Klonierung und Expression an. Oben erwähntes Klonierungssystem beschleunigt die Entwicklung eines Expressionsvektors deutlich.

Damit ein Protein sekretiert wird, muß der Zelle diese Information mitgeteilt werden. Dies erfolgt mit Hilfe eines Signalpeptides [20]. Am N-Terminus des nativen Proteins ist dazu ein zusätzliches Peptid kodiert. Es gibt der Zelle die Information zum Transport in die Umgebung. Versuche zum Einfluß auf Ladung oder zur Herkunft wurden an anderer Stelle [21] durchgeführt.

### 1.5.3 Proteinexpression in *Streptomyces lividans*

Durch die Eigenschaft, daß *Streptomyces lividans* Proteine in die Umgebung abgeben kann, ist der Organismus interessant für die Proteinproduktion. Bei grampositiven Bakterien fehlt die Außenmembran, was zu einem einfachen System der Ausschleusung führt. Die Translokation bei *Escherichia coli* ist sehr viel komplizierter.

Zu exprimierende Proteine werden mit einer Signalsequenz versehen, die sozusagen den richtigen Weg weist [52]. Im Arbeitskreis von Prof. Engels wurde eine Kassetten (Abbildung 1.7 [27]) entwickelt, die für die Expression von Tendamistat und, sowie durch geeignete Schnittstellen ermöglicht, anderen Proteinen (z.B. Hirudin) geeignet ist.

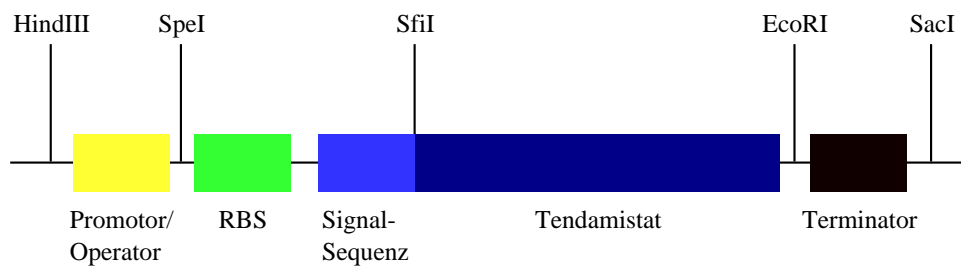


Abbildung 1.7: Kassetten zur Mutagenese [27]

Die Kassetten ist aus verschiedenen Teilen zusammengesetzt. Sie besteht aus dem Promotor/Operator-Bereich [7], der ribosomalen Bindungsstelle, der Signalsequenz [22, 35], dem Protein sowie dem Terminator [50]. Alle diese Bereiche sind so konstruiert, dass sie einzeln austauschbar sind. Verschiedene Promotoren, sowie Signalsequenzen stehen zur Verfügung. Durch geeignete Reinigung des Kulturüberstandes erhält man das gewünschte Protein.

Falsche Faltung bei heterologen Proteinen ist ein Problem [20, 65], insbesondere die fehlerhaften Verknüpfungen von Disulfidbrücken (z. B. Hirudin).

## 1.6 Elektrophorese

### 1.6.1 Allgemein

Mit Hilfe der Elektrophorese lassen sich Teilchen auf Grund ihrer Ladung und Größe trennen [41, 55, 54]. Die Elektrophorese ist im Prinzip in jedem leitenden Medium durchführbar. So reicht die Wahl des Mediums von der einfachen Flüssigkeit bis hin zu verschiedenen Trägern wie Gele und Papier. Die unterschiedliche Geschwindigkeit verschiedener Teilchen durch ein solches Medium ermöglicht die Trennung. Die treibende Kraft ist das Verhältnis von Ladung zu

Masse des Teilchens. Dem gegenüber steht der Widerstand im Medium, der durch das Volumen des Teilchens hauptsächlich bestimmt ist [18, 23]. Je größer das Volumen, desto größer ist der Widerstand, der gegenüber der Lösung überwunden werden muß.

In Flüssigkeit ist der Widerstand der Lösemittelteilchen ausschlaggebend. In Gelen kommen weitere Aspekte zum Tragen. Das Gel selbst besitzt eine dreidimensionale netzartige Struktur. Ein Teilchen muß sich einen Weg hindurch „suchen“. Je größer ein Teilchen ist, desto mehr Widerstand erfährt es im Gel. Zudem können Gelbestandteile in Wechselwirkung mit den Teilchen treten und so Einfluß auf die Geschwindigkeit desselben nehmen.

### 1.6.2 Medien

Elektrophorese in Flüssigkeiten wird kaum angewendet. Als Ausnahme gilt hier die Kapillarelektrophorese (CE). Aber auch hier werden vermehrt Gel-gefüllte Kapillaren (CGE) verwendet.

Der Grund für die eingeschränkte Anwendung in Flüssigkeiten ist das Vermischen der Probe nach dem Entfernen des elektrischen Feldes.

Medien für die Elektrophorese reichen von Zelluloseacetat über Stärke und Agarose bis zu Polyacrylamid. Agarose wird bei sehr großen Molekülen wie DNA und Nukleoproteinen eingesetzt. Stärke wird in der Untersuchung von Isoenzymen verwendet. Den größten Anwendungsbereich haben Gele aus Polyacrylamid.

Polyacrylamidgele sind stabil über einen weiten pH- und Temperatur-Bereich. Sie sind transparent, die Porengrößen können in einem weiten Bereich angepaßt werden. Zudem zeigen sie keine Wechselwirkungen mit Proteinen. Diese Eigenschaften machen die Polyacrylamidgele trotz der Giftigkeit von Acrylamid zu einem wichtigen Bestandteil bei der Analyse von Proteinen.

### 1.6.3 Varianten

Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Arten der Elektrophorese. Bei der einen Variante bewegen sich die Teilchen von einer Elektrode zur anderen. Hierzu gehört die CE, aber auch viele Varianten der Proteingele (Lämmli, Schägger,



etc.) Die Geschwindigkeit des Teilchens bleibt annähernd gleich. Bei der zweiten Methode ändert sich die Geschwindigkeit des Teilchens, oft bis zum Stillstand. Hierzu gehört die isoelektrische Fokussierung (IEF). Auch der Aufbau der Gele kann unterschiedlich aussehen.

### 1.6.4 Bedingungen

Neben den äußeren Bedingungen wie der Temperatur lassen sich verschiedene Parameter bei der Elektrophorese einstellen. Genannt seien der pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße.

Damit ein Protein im elektrischen Feld bewegt wird, muß es eine Nettoladung tragen. Demnach sind Pufferbedingungen mit einem pH-Wert nahe dem pI-Wert des Proteins nicht gut gewählt. Ist der pH-Wert höher als der pI-Wert besitzt das Protein eine negative Nettoladung und bewegt sich zur Anode und umgekehrt.

Die Ionenstärke hat einen Einfluß auf die Trennleistung des Gels. Durch mehr Ladungsträger erhöht sich die Laufzeit des Gels, da die Proteine einen geringeren Anteil am Ladungstransport haben und langsamer wandern. Die Banden werden schärfer. Allerdings können zu hohe Konzentrationen an Ladungsträgern das Gegenteil bewirken. Durch den erhöhten Stromfluß heizt das Gel auf (Jouleheating). Die resultierende Wärme führt zu vermehrter Diffusion der Proteine, also zur Verbreiterung der Banden. Zudem kann es zu Denaturierungen der Proteine kommen. Dies führt zu Problemen bei der Analyse, wie auch bei der Wiedergewinnung.

Die Porengröße muß an die Proteingröße angepaßt sein, um eine gute Trennung zu erhalten. Sind die Poren zu groß, hat das dreidimensionale Netz zu wenig Einfluß auf die Beweglichkeit der Proteine. Sind die Poren zu klein, dauert die Elektrophorese sehr lange, manche Proteine wandern nicht mehr.

## 1.7 Vektoren

### 1.7.1 Allgemein

Ein Vektor ist ein Transportmittel für DNA in Zellen. Er wird dazu benutzt, fremde DNA in Zellen einzuführen, die dort normalerweise nicht oder in mo-

difizierter Form vorliegt. Es gibt unterschiedliche Arten von Vektoren. Da sind zum einen die Plasmide. Hierbei handelt es sich um extrachromosomale zirkuläre DNA, die normalerweise für die Zelle nicht notwendig ist. Auf ihr werden keine lebenswichtigen Informationen bereitgehalten. Sie sind gut geeignete Vehikel für Fremd-DNA. Sie lassen sich gut vervielfältigen und handhaben. Es werden zur Übertragung vorbereitete Zellen benötigt. Plasmide lassen sich durch Transformation, Transfektion oder Elektroporation übertragen.

Zum anderen gibt es noch die Konjugation. Bei der Konjugation werden Erbinformationen mittels eines Pilus von einem Bakterium auf das andere übertragen. Dazu benötigt das Bakterium, das den Pilus ausbildet, ein spezielles Plasmid, den sogenannten F-Faktor.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung von Viren als Transportmittel. Viren sind gute Transporteure für DNA, haben aber einige Nachteile. Zum Beispiel ist die Größe des Genes eingeschränkt. Ist das Gen zu groß, werden die Viren nicht mehr richtig zusammengebaut. Zudem wird das Gen in das Wirtsgenom integriert, normalerweise unspezifisch.

### 1.7.2 pT136

Der Vektor pT136 ist ein pUC19-Derivat. In die multicloning-site ist das Ten-

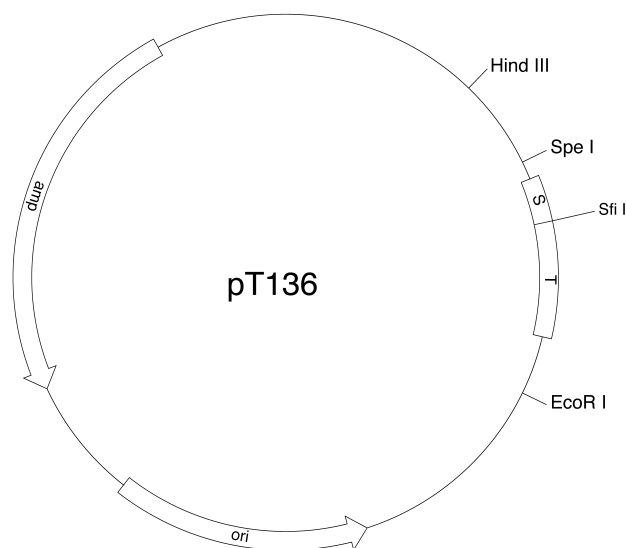


Abbildung 1.8: Plasmid pT136

damistat bzw. die Expressionskassette mit Wildtyp-Tendamistat einkloniert.

Es handelt sich um einen multicopy-Vektor, der in *Escherichia coli* repliziert wird. Er eignet sich gut zur Klonierung von verschiedenen Tendamiostatmutanten. Zur Expression in *Streptomyces lividans* wird die Kassette in pAX5a einkloniert.

### 1.7.3 pAX5a

Der Expressionsvektor pAX5a [27] wurde aus zwei Vektoren zusammengesetzt. Aus Teilen des *Escherichia coli*-Vektor pUC19 und des *Streptomyces lividans*-Vektor pIJ702 aufgebaut, ist der Vektor sowohl in *Escherichia coli* als auch in *Streptomyces lividans* vermehrbar (Shuttlevektor).

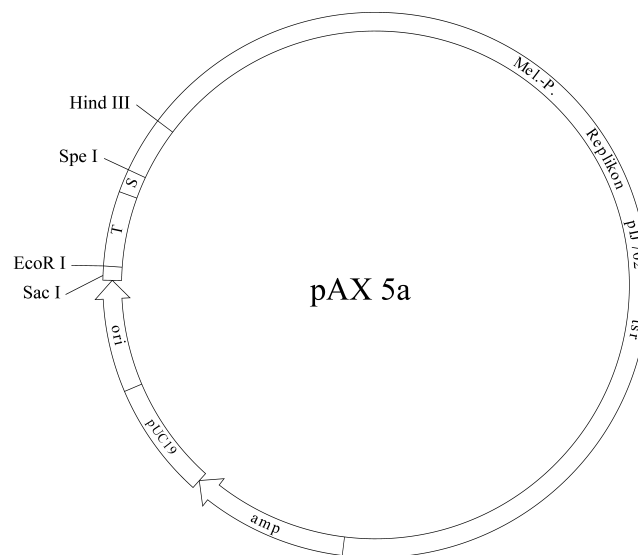


Abbildung 1.9: Plasmid pAX5a

Im pAX5a ist ein konstitutiver Promotor im Einsatz (ermEup), der aus *Saccharopolyspora erythraea* stammt. Gefolgt wird er von der Expressionskassette (siehe Abbildung 1.7) und dem aph-Terminator aus *S. fradiae*, der durch seine Selbstkomplementarität zu einem Hairpin führen soll, wodurch das Ribosom von der mRNA abspringt.

Eine Variante des pAX5a ist der pAX8, der einen induzierbaren Promotor besitzt.

# Kapitel 2

## Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat. Durch anschließende Klonierung in *Streptomyces lividans* soll die Expression des Proteins belegt werden.

Durch verschiedene Studien unserer Gruppe konnte gezeigt werden, daß das Entfernen einer Disulfidbrücke im Tendamistat möglich ist [25]. Die dabei gemessenen Stabilitätsverluste sind beträchtlich. Daher war eine Kombination der Mutanten an DSB 1 mit den Mutanten an DSB 2 nicht vielversprechend. Die folgenden Experimente zeigten, daß die entstandene Mutante entweder nicht exprimiert wurde oder zu instabil gegenüber Proteasen war.

Durch den Einsatz von statistischer und ungerichteter Mutagenese, soll die Stabilität der Mutanten an DSB 1 und 2 erhöht werden, so daß eine Kombination erfolgreich verlaufen kann. Zuerst sollen möglichst stabile Mutanten für jede Disulfidbrücke gefunden und anschließend kombiniert werden. Alternativ werden beide Disulfidbrücken gleichzeitig verändert. Als dritte Alternative steht der Aufbau einer instabilen Mutante zur Verfügung. Diese wird danach im gesamten Gen verändert, um einen stabilisierenden Effekt zu erreichen.

Eine Disulfidbrücken-freie Tendamistatmutante kann bei gleicher räumlicher Struktur weiteren Aufschluss über den Faltungsweg von Tendamistat und Proteinen im allgemeinen geben. Die Schwierigkeiten bei Faltungsexperimenten durch die Disulfidbrücken entfallen.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Roth
4-Aminobuttersäure (GABA)	Fluka
Ammoniak, 32%	Merck
Ammoniumacetat, p. a.	Fluka
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS), p. a.	Fluka
Ammoniumsulfat, p. a.	Fluka
Ampicillin	Fluka
Bactoagar	Gibco
Bactopepton	Gibco
Bactotrypton	Gibco
Beefextract	Gibco
Bisacrylamid	Roth

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau, Natriumsalz, rein	Serva
Bovine Serum Albumine (BSA), rein	Serva
3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure (CAPS)	Sigma
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Desoxiadenosintriphosphat (dATP)	Amersham
Desoxicytidintriphosphat (dCTP)	Amersham
Desoxiguanosintriphosphat (dGTP)	Amersham
Desoxithymidintriphosphat (dTTP)	Amersham
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka
Dimethylformamid (DMF)	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMSO, 99%	Janssen
Eisensulfat-heptahydrat	Merck
Eisentrichlorid-hexahydrat	Merck
Essigsäure	Riedel-de Haën
Ethanol	Roth Riedel-de Haën
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Dinatrium-Salz)	Serva
p-Formaldehyd	Merck
Formamid	Serva
D(+)-Glukose-monohydrat	Roth

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

---

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Glyzerin	Roth
Glyzin	Degussa
Harnstoff	Fluka
Isopropanol (destilliert)	Merck
Jod	Riedel-de Haën
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Kaliumjodid	Merck
Kaliumsulfat	Merck
Kalziumchlorid-hexahydrat	Merck
Kupferdichlorid-dihydrat	Merck
Lithiumchlorid	Fluka
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck
Mangandichlorid-dihydrat	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol (Chromatographie)	Merck
Methanol (tech.)	Merck
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck

---

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumhydroxid	Roth
Parafinöl DAB 8	Roth
Phenol/Chloroform	Roth
Polyethylenglykol (PEG), verschiedene Größen	Serva
Silbernitrat	Merck
Stärke, löslich	Roth
TEMED	Fluka
Thiostrepton	Fluka
Trichloressigsäure	Merck
Tricin	Serva
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva
Xylencyanol FF	Serva
Yeast Extract	Gibco
Zinksulfat-heptahydrat	Fluka

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

### 3.1.2 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Art</b>
Autoklaven	Fedegari FVB und FBS
Brutschränke	Heraeus Christ B5100E und B5090E
DNA-Synthesizer	Applied Biosystems 310 Perseptive Biosystems Expedite

Fortsetzung auf der nächsten Seite



Fortsetzung

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Art</b>
Elektrophorese (PAGE)	Hoefer, Mighty-Small II Biorad BRL-Nachbau für Gele bis 20cm x 20cm
Elektrophorese (AG)	BRL-Nachbau (Elektrodenabstand 34cm) für Gele bis 30cm
ELISA-Reader	Titertek Biosystems
Fluoreszenzphotometer	Hitachi F-4500
Geltrockner	Biotek Fischer
HPLC	Merck-Hitachi Sykam Perseptive Biosystems BioCAD
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Shaker G25
Kühlzentrifugen	Sorvall RC-5B
Kamera	Polaroid MP4 (Sofortbild) Kodak DC (Digital)
Spannungsgeber	Pharmacia ECPS 3000/150
Spektralphotometer	Varian, Cary 118
Sterile Werkbank	Heraeus, Lamin-Air
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge A
Trockensterilisator	Heraeus ST 6200
Ultraschallbad	Bransonic 32
Ultrazentrifuge	Beckman L8-70 M
UV-Lampe	CAMAG
UV-VIS Photometer	Varian, Cary 1
Vakuumkonzentrator	Bachofer Laboratoriumsgeräte

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Art</b>
Wasseraufbereitung	Millipore, Milli-Q
Western Blot-Apparatur	CTI GmbH

Tabelle 3.2: Verwendete Geräte

### 3.1.3 Enzyme

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -Chymotrypsinogen	Pharmacia
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	New England Biolabs
Lysozym, aus Hühnereiweiß, krist.	Serva
Ovalbumin, krist.	Pharmacia
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
RNase A aus Rinderpankreas	Boehringer
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Taq Polymerase	Perkin Elmer
Trypsin, sequencing grade	Sigma
Vent (exo-) Polymerase	New England Biolabs
Vent Polymerase	New England Biolabs

Tabelle 3.3: Verwendete Enzyme

### 3.1.4 Organismen

Organismus	Typ, Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$ recA1, thi-gyrA96, supE44
<i>Streptomyces lividans</i>	66TK24 str-b (Hopwood)

Tabelle 3.4: Verwendete Bakterien

### 3.1.5 Plasmide

Plasmide	Beschreibung
pT136	pUC19-Derivat, beinhaltet das natürliche Tendamistatgen, zusätzliche SpeI-Schnittstelle
pAX5a	Kombination aus pUC19 und pIJ702, enthält zusätzlich: ermEup Promotor, Signalsequenz, Tendamistatgen und Terminator

Tabelle 3.5: Verwendete Plasmide

### 3.1.6 DNA- und Protein-Marker

DNA-Marker	Größe (kb)
100bp-Marker	1,5; 1,2; 1,0; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1
1000bp-Marker	10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5
$\lambda$ -DNA/BstE II	8,45; 7,24; 6,36; 5,68; 4,82; 4,32; 3,67; 2,32; 1,93; 1,37; 1,26; 0,7; 0,22; 0,12,
$\lambda$ -DNA/EcoR I/Hind III	21,23; 5,2; 4,97; 3,5; 2; 1,9; 1,58; 1,38; 0,95; 0,83; 0,56,

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

DNA-Marker	Größe (kb)
pBluescript II KS+/Hae III	602; 458; 434; 290; 267; 243; 174; 142; 102; 80; 79; 60; 18; 11

Tabelle 3.6: Verwendete DNA-Marker

Protein-Marker	Größe (kDa)
PMW-Marker (Sigma)	17,2; 14,66; 10,8; 8,3; 6,4; 2,5
LR-Marker (Promega)	31; 20,4/19,7; 16,9; 14,4; 8,1; 6,2; 2,5
LMW-Marker (Sigma)	66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2

Tabelle 3.7: Verwendete Protein-Marker

## 3.2 Steriles Arbeiten

Geräte und Medien müssen für den Umgang mit Mikroorganismen sterilisiert werden. Dies hat den Zweck, die in der Umgebung vorhandenen unerwünschten Mikroorganismen abzutöten, damit nur die Organismen wachsen können, die auch gewünscht sind.

Hierzu verwendet man für Puffer oder Medien einen Autoklaven, bei dem in Wasserdampf bei 121°C unter Druck die Organismen innerhalb von 30min abgetötet werden. Alternativ kann man temperaturempfindliche Substanzen durch einen 0,22µm-Filter in eine sterile Flasche filtrieren. Glasflaschen und Metallgeräte werden in einem Sterilisator trocken für 2h bei 180°C keimfrei gemacht. Alternativ ist es möglich, die Geräte auch zu autoklavieren.

Impfösen werden im Bunsenbrenner ausgeglüht, Drigalskispatel in Ethanol getaucht und abgeflammt. Beim Umgang mit *Escherichia coli* kann man alle Arbeiten auch an einer Bunsenbrennerflamme durchführen, während bei *Streptomyces lividans* die Arbeiten in der sterilen Werkbank gemacht werden.

Nach dem Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen ist es notwendig diese abzutöten. Kulturen und Petrischalen werden autoklaviert, genauso wie kontaminierte Plastikware. Bakterien auf der Arbeitsfläche oder an der Kleidung werden mit Desinfektionsmittel abgetötet.

### **3.3 Lösungen und Puffer**

#### **Acrylamid/Bisacrylamid (40% T/5% C)**

380g Acrylamid werden mit 20g Bisacrylamid in 1l A. dest. gelöst und durch einen Faltenfilter in eine dunkle Flasche filtriert. Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### **Acrylamid/Bisacrylamid (49,5% T/3% C)**

480g Acrylamid und 15g Bisacrylamid werden in 1l A. dest. gelöst und durch einen Faltenfilter in eine dunkle Flasche filtriert. Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### **Acrylamid/Bisacrylamid (49,5% T/6% C)**

465g Acrylamid werden mit 30g Bisacrylamid in 1l A. dest. gelöst und durch einen Faltenfilter in eine dunkle Flasche filtriert. Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### **Agarose/Stärke (0,8%/1%)**

5g Stärke und 4g Agarose werden mit Phosphatpuffer (10mM) auf 500ml aufgefüllt. Die Lösung wird in der Mikrowelle aufgeköcht und bei 50°C temperiert.

#### **Ampicillin (25mg/ml)**

2,5g Ampicillin und 247,5mg NaOH werden auf 100ml mit A. dem. aufgefüllt. Nach dem Auflösen wird sterilfiltriert und auf 4ml aliquotiert. Die Lösung wird bei -20°C aufbewahrt. Für Flüssigmedium und Agarplatten stellt man auf eine Endkonzentration von 100µg/ml im Medium ein.

**APS (10%)**

1g APS werden auf 10ml mit A. dest. aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

**BIS-TRIS (20mM/pH 6,0)**

20mmol BIS-TRIS werden in 800ml Milli-Q-Wasser gelöst und mit HCl auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wird auf 1l aufgefüllt.

**BIS-TRIS/NaCl (20mM/1M/pH 6,0)**

20mmol BIS-TRIS und 1mol NaCl werden in 800ml Milli-Q-Wasser gelöst, mit HCl auf pH 6,0 eingestellt und auf 1l aufgefüllt.

**EDTA (0,5M/pH 8)**

186,1g EDTA (Dinatriumsalz) werden in ca. 600ml A. dem. gelöst und mit ca. 20g NaOH auf pH 8 eingestellt. Die Lösung auf 1l auffüllen und autoklavieren.

**KI/I<sub>2</sub>-Lösung**

300mg Kaliumiodid und 130mg Iod werden mit A. dem. auf 100ml aufgefüllt. Die Lösung wird über Nacht gerührt, bis sich alles löst. Die fertige Lösung wird bei 4°C im Dunkeln gelagert.

**Kalziumchlorid (70mM)**

15,34g CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O auf 1l A. dem. auffüllen und autoklavieren.

**LB-Medium**

10g Bactotrypton, 5g Yeast Extract und 10g NaCl werden mit Leitungswasser auf etwa 800ml gefüllt, mit 10 Tropfen 10N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit Leitungswasser auf 1l aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung ohne Antibiotikum bei RT, die Lösung mit Antibiotikum bei 4°C gelagert.

**LB-Platten**

siehe LB-Medium; zusätzlich gibt man 15g Bactoagar vor dem Autoklavieren hinzu. Bei Antibiotikazusatz temperiert man die Lösung auf 60°C, setzt das Antibiotikum hinzu, gießt die Platten und läßt selbige bei 37°C 1d trocknen. Die getrockneten Platten werden bei 4°C aufbewahrt.

**NL701-Platten**

3g Saccharose, 15g Dextrin, 0,5g NaCl, 0,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,01g FeSO<sub>4</sub>, 5g Trypton Soya Broth, 1g Beef Extract, 2g Yeast Extract und 22g Bacto Agar werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Die Lösung wird nach dem Autoklavieren bei 60°C temperiert, mit Resistenzgift versetzt und geschüttelt. Die Platten werden unter der Sterilbank gegossen.

**NaOH (2N)**

40g NaOH mit dest. Wasser auf 500ml auffüllen.

**Pankreatinlösung**

0,6g Pankeatin werden im 20ml eiskaltem Phosphatpuffer (pH 7,3) in einem SS34-Röhrchen 15 min auf Eis gerührt. Die Probe wird für 10min bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Der Überstand ist ca. 3%-ig an Pankreatin. Verdünnungen werden mit Phosphatpuffer hergestellt.

**Phenolstammlösung**

400g Phenol bei 68°C schmelzen und 400mg 8-Hydroxychinolin (0,1%) zugeben, dreimal mit 1M Tris-HCl (pH 8) und viermal mit 0,1M Tris HCl (pH 8) jeweils mit gleichem Volumen extrahieren. Der pH-Wert der wäßrigen Phase sollte größer 7,6 sein. Die Gebrauchslösung wird bei 4°C gelagert.

**Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)**

Eine Lösung aus 24Vol Chloroform und 1Vol Isoamylalkohol wird 1:1 mit Phenolstammlösung gemischt. Die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt.

**Probenpuffer (Agarosegele)**

12g Saccharose und 4ml EDTA (0,5M) werden mit TBE-Puffer (2,5x) auf 20ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung mit je 50mg Bromphenolblau und Xylencyanol FF versetzt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C bzw. bei 4°C für die Gebrauchslösung.

**R2YE-Platten**

103g Saccharose, 0,25g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10,12g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10g Glukosemonohydrat, 0,1g Casaminoacids und 22g Bactoagar (oder 25g) werden in 800ml A. dem. gelöst und autoklaviert. Zur heißen Lösung gibt man 100ml TES-Puffer (5,73%/pH7,2), 2ml Spurenelementlösung. Zudem kommen noch 80ml CaCl<sub>2</sub> (3,68%), 10ml einer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (0,5%), 15ml L-Prolin (20%), 50ml Yeast Extract (10%) und 5ml NaOH (1N) hinzu. Bei Bedarf wird das Medium mit Resistenzgift versehen, vermischt und die Platten gegossen.

**RNase A-Stammlösung**

500mg RNase A werden in 50ml einer Lösung, die 10mM an Tris-HCl und 15mM an NaCl (pH 7,5; in A. dest.) ist, gelöst, 15min bei 100°C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt. Anschließend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

**SDS (10%)**

25g SDS in 200ml A. dem. bei 68°C lösen und mit konz. HCl auf pH 7,2 einstellen. Anschließend auf 250ml auffüllen und bei RT lagern.



**SDS/NaOH (1%/0,2N)**

100ml 10%-ige SDS-Lösung und 100ml 2N NaOH werden auf 1l mit dest. Wasser aufgefüllt und bei RT gelagert.

**TBE-Puffer (10x)**

121,1g Tris, 51,4g Borsäure und 3,7g EDTA (Tetranatriumsalz) werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.

**TE-Puffer 5mM/0,1mM**

5ml 1M Tris-HCl pH 8 und 0,2ml 0,5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt, autoklaviert und bei RT gelagert.

**TE-Puffer 10mM/1mM**

10ml 1M Tris-HCl (pH 8) und 2ml 0,5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt, autoklaviert und bei RT gelagert.

**TE-Puffer (40mM/10mM/pH 8,0)**

40mmol TRIS und 10mmol EDTA werden in ca. 800ml Milli-Q-Wasser aufgelöst, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt und auf 1l aufgefüllt.

**TFA/Wasser (0,1%)**

1g TFA werden in 1l Milli-Q-Wasser gelöst.

**TFA/Acetonitril (0,1%)**

1g TFA werden in 1l Acetonitril gelöst.

**TSB-Medium**

30g Trypton Soya Broth werden in 1l A. dem. gelöst und autoklaviert. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

**Trisstammlösung (1M/pH 8)**

121,1g Tris werden in ca. 800ml A. dem. gelöst und mit konz. HCl auf pH 8 eingestellt. Nach dem Auffüllen auf 1l wird die Lösung autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

**YEME-Medium**

3g Yeast Extract, 5g Bacto Peptone, 3g Malt Extract, 10g Glukose und 340g Saccharose mit A. dem. auf 1l auffüllen und autoklavieren. Die Lösung wird mit 2ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung (2,5M) und Glyzin-Lösung (20%) supplementiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

## **3.4 Arbeiten mit *Escherichia coli***

### **3.4.1 Rollerulturen**

**Material**

LB-Medium, Antibiotikum

**Durchführung**

Rollerkulturen benutzt man, um Bakterien zu vervielfältigen, die anschließend einer Plasmidisolierung unterworfen werden. Die erhaltenen Mengen reichen in aller Regel für die normale Laborarbeit.

Wie auch bei den Backups kann man Rollerulturen ansetzen, um größere Ansätze zu starten, da sich gezeigt hat, daß eine Mindestkonzentration an Bakterien notwendig ist, um eine schnelle Vermehrung zu gewährleisten.

Kolonien einer LB-Platte werden mit einem sterilen Zahnstocher oder einer gelben Pipettenspitze abgenommen und in ein steriles Reagenzglas mit 2ml LB-Medium (je nach Anwendung mit oder ohne Antibiotikum) überführt. Bei 37°C wachsen die Bakterien innerhalb von 6-8h oder über Nacht in einem Rollinkubator heran.

### 3.4.2 Stammhaltung (Backup)

#### Material

Glyzerin (86%) wird im Autoklaven sterilisiert.

#### Durchführung

Zur Stammhaltung werden 800 $\mu$ l einer Rollerkultur mit 250 $\mu$ l sterilem Glyzerin (86%) durchmischt. Dies entspricht einer Endkonzentration von 20% an Glyzerin. Die Lagerung erfolgt bei -80°C nahezu unbegrenzt. Zur weiteren Verwendung nimmt man mit dem Zahnstocher o.ä. etwas von der gefrorenen Probe ab. Alternativ verwendet man die ganze Probe, um größere Kulturen anzuzüpfen.

### 3.4.3 Herstellung kompetenter Zellen

#### Material

Rollerkultur, CaCl<sub>2</sub> 70mM, Glyzerin, Kühlzentrifuge

#### Durchführung

Zur Transformation von Plasmiden oder Ligationsansätzen in *Escherichia coli* benötigt man sogenannte kompetente Zellen. Hier werden die Zellen so behandelt, daß sie DNA leichter aufnehmen.

Mit einer 5ml Rollerkultur werden 250ml des gleichen Medium angeimpft. Bei 37°C und 300Upm wird die angeimpfte Kultur inkubiert bis sie eine optische Dichte bei 600nm von 0,6 hat. Dabei sind die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Die optische Dichte wird anfänglich stündlich kontrolliert, wenn sich der Wert 0,6 nähert in immer kürzeren Abständen. In einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge werden die Zellen bei 4000g für 10min pelletiert. Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt und der Zentrifugenbecher auf Eis gehalten. Alle weiteren Arbeiten erfolgen auf Eis. Das Pellet wird mit 100ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird wieder vollständig entfernt und das Pellet erneut in 100ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach 30min auf Eis erfolgt eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wird nun in

10ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, die mit 20mM Glycerin versetzt wurde. Die Lösung wird in Portionen zu 100 oder 200µl aufgeteilt. Nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff werden die Zellen bei -80°C aufbewahrt.

### 3.4.4 Transformation

#### Material

Kompetente Zellen, LB-Medium, LB-Platten mit Antibiotikum

#### Durchführung

Die kompetenten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Sie sollten aber nicht zu lange auf Eis stehen, sondern möglichst schnell verarbeitet werden. Anschließend werden die Zellen so aufgeteilt, daß man für jeden Ansatz 50µl vorliegen hat. Die auf Eis stehenden Proben werden mit Plasmid-Lösung oder einem Ligationsansatz versetzt. Man sollte nicht mehr als 1/10Vol an Lösung hinzufügen, da dies die Ausbeute beeinträchtigt. Die Proben werden durch Ansnippen des Caps gemischt und für 30min auf Eis belassen. Die Proben werden jetzt abwechselnd 1min bei 42°C und 1min auf Eis gehalten. Dies wiederholt man 5 Mal. Danach gibt man 300µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzu, vermischt durch schütteln und stellt die Probe für 20min auf 37°C zur Zellwandregeneration. Der gesamte Ansatz wird auf eine LB-Platte mit Antibiotikum gegeben und gleichmäßig mit einem Drigalskispatel verteilt. Die Platten werden bei 37°C über Nacht bebrütet. Die Kolonien sollten nach 12-16h sichtbar sein. Zur Kontrolle werden von einigen Klonen Rollerulturen angesetzt und die isolierten Plasmide mit Hilfe einer Restriktion überprüft.

### 3.4.5 Isolation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

#### Material

TGE-Puffer, SDS/NaOH (1%, 0,2%), PCI (25/24/1), Kaliumacetat (pH 5,8, 2,5M)

### Durchführung

Bei der Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* ist darauf zu achten, daß man die Proteine sowie die chromosomale DNA gut abtrennen kann. Die Verschleppung wird minimiert, indem man die Scherkräfte versucht so gering wie möglich zu halten.

Eine Rollerkultur mit 2ml Medium wird angesetzt. Nachdem sie hochgewachsen ist, kann die gesamte Kultur durch Schütten in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Die Kultur wird bei 4000g 5min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer unter Vakuum stehenden Kännule abgezogen. Alternativ wird der Überstand abgegossen und der im Cap verbleibende Rest mit einer Pipette abgezogen. Das Medium sollte möglichst vollständig entfernt werden. Das Pellet wird in 200µl TGE-Puffer resuspendiert. Dies erfolgt am besten mit dem Vortexer. Hierbei kann es hilfreich sein, zwei Caps gleichzeitig zu benutzen, wobei sich das Pellet besser auflöst. Jetzt werden 200µl SDS/NaOH-Lösung hinzugegeben und durch schnicken vermischt, nicht gevortext. Hinzu kommen 150µl Kaliumacetatlösung. Auch hier wird nicht gevortext, sondern durch mehrmaliges Drehen auf den Kopf die Lösung vermischt. Der Überstand wird nach dem Zentrifugieren mit 13000g für 10min in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dies sollte möglichst ohne die Interphase erfolgen. Es folgt eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion sowie eine Ethanol-fällung. Die Probe wird in 50µl A. dest. aufgenommen und ein Aliquot davon (ca. 2µl) verdaut und auf einem Agarosegel analysiert.

### 3.4.6 Isolation von Plasmid-DNA (Phenolische Lyse)

#### Material

TGE-Puffer, PCI (25/24/1), TNEM-Puffer (10mM Tris-HCl pH8, 0,1M NaCl, 1mM EDTA, 0,1M MgCl<sub>2</sub> und 0,1mg/ml RNaseA), RNase, Ammoniumacetat (10M)

### **Durchführung**

Diese Art der Minipräparation führt zu sauberen Proben, die durchaus zur Sequenzierung geeignet sind. Bei größeren Leseweiten (mehr als 600 Basen) empfiehlt sich eine zusätzliche Entsalzung mittels Dialyse, oder die Anwendung eines Kits.

Eine Rollerkultur mit 2ml Medium wird angesetzt. Nachdem sie hochgewachsen ist, kann die gesamte Kultur durch Schütten in ein Eppendorfgesäß überführt werden. Die Kultur wird bei 4000g 5min zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer unter Vakuum stehenden Känüle abgezogen. Alternativ wird der Überstand abgossen und der im Cap verbleibende Rest mit einer Pipette abgezogen. Das Medium sollte möglichst vollständig entfernt werden. Das Pellet wird in 200 $\mu$ l GTE-Puffer resuspendiert. Es werden 200 $\mu$ l PCI zugegeben und bis zur Homogenität gevortext. Die Probe wird bei 13000g für 5min zentrifugiert. Vom Überstand werden ca. 150 $\mu$ l in ein neues Cap überführt und mit 1Vol TNEM-Puffer versetzt. Der TNEM-Puffer wurde zuvor mit RNaseA versetzt bis zu einer Endkonzentration von 0,1g/ml. Die Probe wird für 10min bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wird ohne Mitnahme des Pellets in ein neues Cap überführt. Es folgt eine Ethanol-fällung mit Zugabe von 0,5Vol Ammoniumacetat und 4Vol Ethanol.

### **3.4.7 Isolation von Plasmid-DNA (Extraktionskit von Macherey und Nagel)**

#### **Material**

NucleoSpin©Extract, Zentrifuge

#### **Durchführung**

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Kit beiliegender Anleitung.

## 3.5 Arbeiten mit *Streptomyces lividans*

### 3.5.1 Minipreparation

#### Material

GTE, NaOH/SDS (0,2%, 1%), PCI (25/24/1)

#### Durchführung

2,5 - 5ml Medium mit Antibiotikum werden mit einem Streptomycetenklon angeimpft. Nach ca. 7d überführt man die Kultur in ein Eppendorfgefäß und zentrifugiert bei 13000g für 5min. Das vom Überstand befreite Pellet wird in 1ml A. dest. resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Zum Pellet werden 1ml GTE (versetzt mit Lysozym) gegeben und vermischt. Bei 37°C steht die Lösung für 1h. Zugabe von 300µl NaOH/SDS und Inkubation bei 70°C für 15min folgen. Größere Plasmide (über 20kb) werden für 30min bei 55°C gehalten. Zweifache Extraktion mit PCI und eine Ethanol-fällung schließen sich an. In 50µl A. dest. aufgenommen und mit 2,5µl RNase versetzt, steht die Lösung bei 37°C für 30min. Die so erhaltene DNA ist für die Transformation in *Escherichia coli* ausreichend rein.

### 3.5.2 Plattenstammhaltung

#### Material

R2YE-Platten

#### Durchführung

*Streptomyces lividans* kann man auf Agarplatten für einige Wochen aufheben. Von diesen Platten lassen sich immer wieder Schüttelkulturen animpfen. Es sollte darauf geachtet werden, daß die Kulturen nicht sporulieren, da dies bei transformierten *Streptomyces lividans* zu drastischen Ausbeuteverlusten führt. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, transformiert man *Streptomyces lividans* jedesmal neu. Dies führt zwar zu einer Verlängerung von 3-4 Tagen, allerdings sind die Ausbeuten deutlich besser.

Die Platten sollten mit Parafilm abgedichtet werden, damit die Platte nicht austrocknet. Bei 4°C lassen sich die Platten für ca. 2-3 Monate aufbewahren.

### 3.5.3 Proteinexpression in *Streptomyces lividans*

#### Material

Erlenmeyerkolben, Expressionsmedium (MM, TSB), Antibiotikum

#### Durchführung

Proteine werden in *Streptomyces lividans* exprimiert. Dabei impft man einen mit Medium versetzten Erlenmeyerkolben an. Hierzu werden frisch transformierte Kolonien von *Streptomyces lividans* eingesetzt. Es können auch Kolonien von Stammhaltungsplatten genommen werden. Allerdings ist das nicht zu empfehlen, da diese relativ schnell die einklonierte DNA aus dem Genom entfernen.

Es wird von dieser Platte ca. 1-2cm<sup>2</sup> mit Hilfe einer Impföse ausgeschnitten und in den mit Medium befüllten Kolben überführt. Der Kolben wird bei 28°C für mehrere Tage inkubiert. Für Tendamistat ist eine Dauer von 4-7 Tagen in den meisten Fällen eine gute Wahl. In Einzelfällen inkubiert man bis zu 10 Tagen. Für empfindliche Varianten kann die Inkubationstemperatur auch bis auf 19°C herabgesetzt werden. Als Medium eignen sich MM und TSB. Vollmedien sollten vermieden werden, da diese bei Tendamistat zu einem starken Proteinhintergrund führen. Die Abtrennung des Hintergrundes erwies sich als problematisch.

Um eine höhere Ausbeute zu erreichen, gibt man Spiralfedern in den Kolben. Dadurch werden die Mycele von *Streptomyces lividans* zerschlagen, was zu einer größeren Oberfläche und so zu mehr Ausbeute führt. Ein weiterer Effekt der Spiralen ist eine stärkere Durchmischung des Mediums und ein höherer Sauerstoffeintrag.

### 3.5.4 Herstellung von Protoplasten

#### Material

Streptomycetenkultur, Glukoselösung, Lysozymlösung, P-Puffer



### Durchführung

Um Organismen zu transformieren, müssen diese vorbereitet werden. Man erhöht bei *Escherichia coli* die Durchlässigkeit der Zellwand, bei *Streptomyces lividans* geht man einen anderen Weg. Die Zellwand wird hier komplett entfernt, es entstehen Protoplasten. Die Qualität der Protoplasten hängt von verschiedenen Faktoren ab. Der Zeitpunkt der Protoplastierung ist einer davon. Die Kultur sollte in der exponentiellen Wachstumsphase sein. Die zu diesem Zeitpunkt protoplastierten Streptomyceten sind sehr effizient in der Aufnahme von DNA aus Lösung. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die sorgfältige Aufarbeitung der Kultur. Da der Zeitpunkt für die Ernte schwer zu bestimmen ist, werden mehrere Kulturen zu verschiedenen Zeiten angeimpft.

25ml YEME-Medium werden mit Sporen von *Streptomyces lividans* angeimpft. Die Anzahl der Sporen sollte im Bereich von  $3 \cdot 10^8$  liegen. Die Sporen von *Streptomyces lividans* entstammen natürlich eines nicht transformierten Stammes. Nun wird ca. alle 2 Stunden eine weitere Kultur angeimpft. 4 Kulturen sind in den meisten Fällen ausreichend. Auch hier wird zur Zerschlagung der Mycele eine Spiralfeder mit in die Kultur gegeben. 48h nach der Inkubation der ersten Kultur werden alle Kulturen bei 4°C zentrifugiert. Dazu werden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt und mit der Saccharoselösung aufgefüllt. Bei 6000g wird die Lösung für 10min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet in 15ml Saccharoselösung aufgenommen. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis oder bei 4°C in der Zentrifuge. Die aufgenommene Kultur wird erneut einer Zentrifugation bei 3500g für 10min unterworfen. Die Bakterien werden mehrfach resuspendiert und pelletiert, bis das Pellet möglichst klar, also von Medium befreit, ist. Jetzt werden die Streptomyceten im Lysepuffer für 75min bei 28°C belassen und im Schüttler bei 300g vermischt. Nun werden 10ml P-Puffer hinzugegeben und bei 4°C und 3000g für 10min zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Lysepuffers wird das Pellet in P-Puffer vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme in 3ml P-Puffer wird die Lösung aliquotiert (meist 200µl, es sind aber auch 50µl sinnvoll, da so das Aliquotieren nach dem Auftauen entfällt). Die abgefüllten Protoplasten werden auf Eis stehend bei

-80°C eingefroren.

Zur Überprüfung der Protoplasten werden wieder aufgetaute Lösungen transformiert und verglichen.

### 3.5.5 Transformation von Protoplasten

#### Material

R2YE-Platten, Antibiotikum, Protoplasten

#### Durchführung

Die Protoplasten werden mit Hilfe eines Detergenz-haltigen Puffers transformiert. Da die Doppellipidschicht chemisch sehr ähnlich den Detergentien ist, wird die DNA besonders gut aufgenommen. Allerdings führt ein zu langes Aussetzen zur Lyse der Protoplasten.

Die hergestellten Protoplasten werden auf Eis aufgetaut und auf 50µl aliquotiert. Die Protoplasten lassen sich auch unter fließendem Wasser (kalt) auftauen. Die einzelnen Portionen werden nun einzeln aufgearbeitet, da ein längeres Verweilen der Protoplasten im T-Puffer zur Lyse derselben führt. Jetzt werden ca. 1µg DNA in 5-20µl zu den Protoplasten gegeben. Zusätzlich kommen noch 400µl T-Puffer hinzu, die vorsichtig auf- und abpipettiert werden. Die Lösung wird dann auf eine R2YE-Platte ohne Antibiotikum pipettiert und mit Hilfe einer Impföse auf der Oberfläche verteilt. Im Gegensatz zu *Escherichia coli* wird die Lösung nicht ausplattiert, dies würde zur Zerstörung der Streptomyeten führen. Die Platten werden mit dem Deckel nach oben bei 28°C inkubiert. Nach ca. einem Tag zeigt sich eine Trübung (weißer Nebel) auf der Inkubationsplatte, die das Wachstum von *Streptomyces lividans* anzeigt. Dann können die Streptomyeten mit Antibiotikum versehen werden. Dazu vermischt man 50µl Thiostrepton-Stammlösung mit 2ml Wasser und verteilt das Gemisch gleichmäßig auf der Platte. Dies kann durch Schwenken erfolgen oder wie vorher mit der Impföse. Innerhalb von 2-4 Tagen sind die Platten bewachsen. Hiervon können Stammhaltungsplatten angelegt werden oder Schüttelkulturen beimpft werden.

## **3.6 Arbeiten mit DNA**

### **3.6.1 Analytik doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Agarosegelen**

Die Agarosegelelektrophorese eignet sich sehr gut zur einfachen Analytik von DNA-Doppelsträngen. Unter Einsatz eines Markers lassen sich die Fragmentgrößen gut abschätzen. Zudem lassen sich die Mengen der zu analysierenden Fragmente abschätzen, wenn die Mengen der Markerfragmente bekannt sind.

Beim Abschätzen der Größe ist zu beachten, daß die Laufstrecke der Fragmente proportional zum dekadischen Logarithmus ist. Eine genaue Bestimmung ist im Laboralltag zu aufwendig und durch die kurzen Laufzeiten der Fragmente zu ungenau. Sollte eine genaue Bestimmung notwendig sein, ist für eine ausreichende Laufzeit zu sorgen und möglichst eine geeignete Software zur Auswertung zu verwenden.

Zur Mengenbestimmung ist es möglich die Leuchtstärken der unterschiedlichen Banden mit einander zu vergleichen. Die gleiche Anzahl von Basenpaaren ergibt die gleiche Leuchtstärke. Das bedeutet, gleichstark leuchtende Banden haben ungefähr die gleiche Menge (Masse) an DNA. Zu bemerken ist, daß dies nur eine grobe Abschätzung ist, die allerdings meist ausreicht. Ist eine Menge genau zu bestimmen, sollte eine Quantifizierung über UV-Spektrometrie erfolgen.

#### **Material**

TBE-Puffer (0,5x), Probenpuffer 5x, Ethidiumbromidlösung, Agarose, Mikrowelle oder Magnetrührer, Transilluminator, Gelkammer, Gelträger, Probenkamm

#### **Durchführung**

Je nach Größe der zu untersuchenden Fragmente wird eine entsprechende Menge Agarose (0,8-3%) in den TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe und Verteilen von Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von  $0,5\mu\text{g/ml}$  wird die Lösung in den vorbereiteten Gelträgern gegossen und ein Probenkamm hineingesteckt. Nach den Erhärten (ca. 30min) kann das Gel ver-

wendet werden. Die aufzutragenden Proben sollten möglichst konzentriert sein. Das Gel wird in die Gelkammer gelegt, die den gleichen Puffer enthalten sollte. Nach dem Auftragen wird eine Spannung von 5V pro cm Elektrodenabstand angelegt. Der Verlauf der Auftrennung kann mit Hilfe eines Transilluminators sichtbar gemacht werden. Nach 0,5-1,5h ist die Elektrophorese im Normalfall zu Ende.

### **3.6.2 Analytik einzelsträngiger DNA mittels Polyacrylamidgелеlektrophorese**

#### **Material**

Acrylamidstammlösung (40T/5C), Harnstoff, APS (10%), TEMED, Probenpuffer (2x), Gelapparatur

#### **Durchführung**

Es werden je 10ml der benötigten Gellösung 4,8g Harnstoff (entspricht einer Endkonzentration von 8M) eingewogen. Hinzu gibt man die benötigte Menge der Acrylamidlösung, die sich nach der Größe der Oligonukleotide bestimmt, welche aufgetragen werden. Bei Oligonukleotiden mit einer Länge von ca. 20 Basen, stellt man ein Gel mit 12% Acrylamid her. Dies entspricht 3ml der obigen Stammlösung je 10ml Gellösung. Ein Bereich von 6-20% kann sinnvoll angewendet werden. Höhere Konzentrationen ergeben Gele, die zu starr werden und damit zu leicht zerbrechen, während Gele mit niedrigerer Konzentration zu wenig Stabilität haben.

Nachdem der Harnstoff und die Acrylamidlösung eingefüllt sind, stellt man auf das gewünschte Volumen ein. Zum Auflösen des Harnstoffs kann die Lösung erwärmt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die Lösung vor der Zugabe von APS (1/100Vol) und TEMED (1/1000Vol) nicht wärmer als Zimmertemperatur ist, da sonst die Polymerisation zu schnell erfolgt. Ist die Zugabe von APS und TEMED erfolgt, vermischt man die Lösung nocheinmal vorsichtig, damit keine Luftblasen entstehen. Jetzt füllt man die Lösung in die vorbereitete Gelapparatur und steckt den Probenkamm vorsichtig in die Apparatur. Dabei

sollte der Kamm nicht komplett mit seinen Zähnen eingesteckt werden. Die Zwischenräume werden mit Gellösung nochmals befüllt.

Die Proben (ca.  $0,05OD_{260}$ ) sollten nach Möglichkeit lyophilisiert sein und anschließend im Probenpuffer (ca.  $5\mu l$ ) gelöst werden. Ist dies nicht möglich, sollten Probe und Puffer 1:1 gemischt werden.

Nach Beendigung des Laufes kann man die Banden mittels DNA-Shading sichtbar machen. Es ist auch möglich die Banden irreversibel zu färben (Silberfärbung o.ä.). Ersteres ist schneller, gibt aber nicht immer die gewünschte Qualität an Auflösung.

### 3.6.3 Quantifizierung von dsDNA über UV-Spektrometrie

#### Material

Quarzküvetten, UV-Spektrometer

#### Durchführung

Zwei Küvetten werden mit dem reinen Lösemittel in ein Zweistrahl-spektrometer gestellt. Das Gerät wird bei 260nm auf 0 gestellt. Anschließend wird der Inhalt einer Küvette mit der Probe getauscht. Der gemessene Wert sollte nicht deutlich über 1 liegen, da sonst die Linearität zwischen der Konzentration und der Absorption nicht mehr gegeben ist. Es ist sinnvoll nur einen Teil der zu untersuchenden Substanz zu vermessen und dann die Verdünnung zu berücksichtigen. 1OD entspricht ca.  $50\mu g$  DNA. Die Reinheit der Probe lässt sich überprüfen, indem man die Absorption bei 280nm mit der bei 260nm vergleicht. Das Verhältnis (260/280) sollte bei ca. 2 liegen.

### 3.6.4 Quantifizierung von ssDNA über UV-Spektrometrie

#### Material

Quarzküvetten, UV-Spektrometer

**Durchführung**

Das Spektrometer wird analog zur Bestimmung von doppelsträngiger DNA vorbereitet. Von dem zu vermessenden Oligonukleotid wird eine 1:100 Verdünnung hergestellt und untersucht. Der erhaltene Extinktionswert wird mit 100 multipliziert und ergibt den OD-Wert. Durch Einsetzen in unten stehende Formel kann man die Konzentration der Lösung bestimmen.

$$1\text{nmol}(\text{ssDNA}) = \frac{100}{1,54 \cdot A_n + 1,17 \cdot C_n + 0,73 \cdot G_n + 0,88 \cdot T_n} \cdot 0,895 \cdot \text{OD}_{260}$$

Für die Variablen  $N_n$  trägt man die Anzahl der jeweiligen Nukleotide ein. Diese Formel berücksichtigt allerdings nur die Absorption der einzelnen Basen. Es hat sich herausgestellt, daß nicht allein die Zusammensetzung des Oligonukleotides die Absorption bestimmt. Vielmehr ist die Basenabfolge ein wichtiger Faktor.

Die so erhaltenen Konzentrationen sind bis auf ca. 10% genau. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 40 Basen ist die Formel nur noch mit Vorsicht anzuwenden.

**3.6.5 Elektroelution von dsDNA aus Agarosegelen****Material**

Dialyseschlauch, Klammern, TBE-Puffer (0,5x), Skalpell, Gelkammer

**Durchführung**

Um DNA aus einem Agarosegel wiederzugewinnen hat man verschiedene Möglichkeiten. Bei großen Mengen an DNA ist die Elektroelution eine gute Methode. Geringere Mengen lassen sich besser mit DEAE-Zellulose isolieren. Für beides gibt es mittlerweile günstige Elutionskits, die die Ausbeute erhöhen.

Eine Bande aus dem Agarosegel wird möglichst schnell an einem Transilluminator ausgeschnitten. Das Gelstück sollte möglichst klein sein. Es wird in ein aus einer Seite mit einer Klammer verschlossenen Dialyseschlauch eingeführt. Zugabe von 500 $\mu$ l TBE-Puffer und Verschließen des Dialyseschlauches beenden die Vorbereitung desselben. Der Schlauch sollte möglichst blasenfrei sein. Die

Probe wird in die Gelkammer gelegt. Dabei ist sie so auszurichten, wie die Bande ursprünglich gelaufen ist. Es sollte dafür gesorgt werden, daß die Probe nicht verrutschen kann.

Die Elektrophorese dauert ca. 30min und kann bei besonders großen Fragmenten verlängert werden. Sie ist beendet, wenn das Gelstück unter einer UV-Lampe nicht mehr leuchtet. Die Stromrichtung wird nach der Beendigung der Elektrophorese für 1min umgepolt, damit sich die DNA von der Membran löst. Der Puffer wird anschließend einer Ethanol-fällung unterzogen und in einer geeigneten Menge A. dest. aufgenommen.

### **3.6.6 Isolierung von dsDNA aus Agarosegelen mittels DEAE-Membranen**

#### **Material**

EDTA-Lösung (10mM/pH 8), NaOH-Lösung (0,5N), LS-Puffer, HS-Puffer, Natriumacetat (3M/pH 4,7)

#### **Durchführung**

Zur Isolation mittels DEAE-Zellulose sind besonders geringe Mengen an DNA von Vorteil, da die Membran nur eine limitierte Aufnahmefähigkeit besitzt. Dies begründet sich durch das Prinzip der Bindung. Es handelt sich bei der Membran um einen Anionenaustauscher, der bei pH-Werten über 4 in der Lage ist DNA reversibel zu binden. Mittels hoher Salzkonzentrationen kann die DNA wiedergewonnen werden.

Die Membran wird in geeignet große Stücke geschnitten. Zur Aktivierung legt man die Stücke für 5min in die EDTA-Lösung. Anschließend wird die Membran mit einer Pinzette in die NaOH-Lösung überführt und ebenfalls für 5min inkubiert. Danach werden die Membrane mehrfach mit A. dest. gespült. Am besten verwendet man die Membrane gleich, allerdings kann man sie bei 4°C auch mehrere Wochen in A. dest. lagern.

Nachdem die gewünschten Fragmente auf dem Gel isoliert sind, schneidet man unterhalb der Bande ein Stück Agarosegel heraus. Die Membran wird mit

Hilfe einer Pinzette unterhalb der Bande angebracht und mit dem Gelstück fixiert. Dies hat vorsichtig zu erfolgen, da sonst die Membran verrutscht. Nun wird die Elektrophorese fortgesetzt bis die DNA auf der Membran im UV-Licht sichtbar ist. Zur Entfernung von Agarose wird die Membran kurz in den LS-Puffer gelegt. In 200 $\mu$ l HS-Puffer wird die Membran für 30min bei 65°C belassen. Der Puffer wird aufbewahrt und durch frischen ersetzt. Die Probe wird erneut für 15min bei 65°C belassen und die Überstände vereinigt. Es erfolgt eine Phenol-Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanol-fällung unter Zugabe von 0,2Vol Natriumacetat.

### **3.6.7 Isolierung von dsDNA aus Agarosegelen mittels Elutions-kit**

#### **Material**

Elutionskit von Macherey und Nagel ©

#### **Durchführung**

Die Isolierung von doppelsträngiger DNA erfolgte, wie in der dem Kit beiliegenden Anleitung beschrieben.

### **3.6.8 Phenol-Chloroform-Extraktion**

#### **Material**

PCI (25/24/1), Chloroform-Isoamylalkohol (24/1)

#### **Durchführung**

Die zu extrahierende Lösung wird mit dem gleichen Volumen an PCI-Lösung versetzt und 1min gevortext. Nach dem Zentrifugieren bei 13000g für 2min wird die obere wäßrige Phase vorsichtig abgenommen. Zu beachten ist, daß möglichst nichts der anderen Phasen mitgenommen wird. Anschließend wird mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, um Phenolspuren aus der Probe zu entfernen. Dies erfolgt analog der ersten Extraktion. Abschließend sollte eine Ethanol-fällung durchgeführt werden.



### **3.6.9 Ethanolfällung**

#### **Material**

Vakuumkonzentrator, Ethanol (96%), Ethanol (70%), Natriumacetat (pH 4,7, 3M), Ammoniumacetat (pH 7, 10M), A. dest

#### **Durchführung**

Die Ethanolfällung ermöglicht unter gleichzeitiger Entsalzung die Konzentration von DNA-Proben. Zudem kann man mit ihr die Proben von verschiedenen wasserlöslichen Verunreinigungen befreien.

Zur Fällung werden bei doppelsträngiger DNA 2,2Vol Ethanol (96%) und 0,2Vol Natriumacetat zur Probe gegeben. Anschließend vortext man die Probe und stellt sie 30min auf Eis. Die DNA wird bei 13000g für ca. 10min zentrifugiert. Nun wird mit 1ml Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Die DNA wird dann in einer geeigneten Menge A. dest. aufgenommen. Wasser eignet sich zur längeren Lagerung besser als beispielsweise TE-Puffer.

Einsträngige DNA wird analog gefällt mit dem Unterschied, daß man hierbei Ammoniumacetat statt Natriumacetat verwendet.

### **3.6.10 Dephosphorylierung mit Calf Intestinal Phosphatase**

#### **Material**

CIP (NEB), CIP-Puffer, NEB-Puffer 1-4

#### **Durchführung**

Die Calf Intestinal Phosphatase (CIP) wird benutzt um 5'-Phosphatgruppen von einzel- und doppelsträngiger DNA zu entfernen. Bei einem durch Restriktion geöffneten Vektor zum Beispiel führt diese Vorgehensweise dazu, daß dieser Vektor bei einer Ligation nicht mehr geschlossen wird. Dies findet dann nur noch statt, wenn ein Fragment mit 5'-Phosphatgruppen vorhanden ist, welches dann

in den Vektor kloniert wird. Somit ist die Ausbeute an Vektor mit einkloniertem Fragment zu Vektor ohne Fragment deutlich erhöht.

Die Probe sollte ca.  $0,5\mu\text{g}/10\mu\text{l}$  DNA enthalten. Als Reaktionspuffer verwendet man den mitgelieferten Puffer oder einen der 4 Standardpuffer von NEB. Man setzt bei 5'-Überhängen je pmol freie 5'-Phosphate 0,1U CIP ein, bei blunt-ends oder 3'-Überhängen 1U CIP. Die Inkubation erfolgt bei  $37^\circ\text{C}$  für 1h. Zur Beendigung der Reaktion wird die Probe für 10min auf  $65^\circ\text{C}$  gehalten.

Als Probe kommen in Frage:

- gereinigte DNA
- Restriktionsansatz (sofern mit den Puffern 1-4 von NEB gearbeitet wurde)

Bei dem Restriktionsansatz erfolgt in den meisten Fällen eine Gelaufreinigung, während man bei der bereits aufgereinigten DNA eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchführen sollte.

### 3.6.11 Ligation mit T4-Ligase

#### Material

T4-Ligase, T4-Ligasepuffer

#### Durchführung

Bei der Ligation wird mit Hilfe von dATP eine Phosphatbrücke zwischen zwei DNA-Fragmenten gebildet. Hierzu muß ein Fragment an der Ribose eine freie 3'-OH-Gruppe haben und das andere am 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen. Die Ligase verbindet die beiden Enden miteinander, so daß ein intaktes DNA-Rückgrat entsteht.

Da zur anschließenden Transformation ca. 10-100ng Vektor in  $5\mu\text{l}$  benötigt werden, legt man die notwendige Menge fest. Man gibt äquivalente ng-Mengen von Fragment und geöffneten Vektor zusammen. Es werden 1/10 des Endvolumens an Ligasepuffer (enthält normalerweise dATP) zugesetzt. An Ligase werden 10-20U eingesetzt. Bei blunt-ends setzt man das 10-20fache an Ligase ein. Da die

Ligase in sehr hohen Konzentrationen geliefert wird, muß sie in einigen Fällen verdünnt werden. Dies kann bei sofortiger Umsetzung in Wasser geschehen. Das Endvolumen wird durch Zugabe an A. dest. erreicht. Die Probe wird über Nacht bei 16°C gehalten oder bei unproblematischen Ligationen 1-2h bei Raumtemperatur.

Als Kontrolle wird der gleiche Ansatz ohne Zugabe des Fragmentes durchgeführt. Nach der Transformation läßt sich die Qualität der Ligation ermitteln.

### 3.6.12 Restriktion von DNA

#### Material

Enzym (NEB), Enzympuffer NEB 1-4 oder unique, BSA

#### Durchführung

Die Restriktion von DNA erfolgt durch Endonukleasen. Es gibt drei Typen von Restriktionsendonukleasen Typ I, Typ II und Typ III. In der Molekularbiologie findet hauptsächlich der Typ II Verwendung, da bei diesem, im Gegensatz zu Typ I und III, der Schnitt innerhalb der Erkennungssequenz erfolgt. Dies erlaubt ein reproduzierbares Schneiden von DNA. Die Erkennungssequenz ist in aller Regel palindromisch. Es entstehen je nach Enzym unterschiedliche Enden. Entweder bleibt das 5'-Ende länger, das 3'-Ende (sticky-end) oder beide sind gleich lang (blunt-end).

Ein Restriktionsansatz besteht aus der Probe, dem Puffer, der Restriktionsendonuklease und eventuell BSA. Der Puffer wird mit dem Enzym geliefert und ist 10-fach konzentriert. Man nimmt ein 1/10 des Endvolumens an Puffer. Sollte zur Stabilität des Enzyms BSA benötigt werden, setzt man 1/100 des Endvolumens zu. Die Menge des Enzyms richtet sich nach der Menge an DNA in der Probe. Die Aktivität von Enzymen wird in U (Units) angegeben. 1U entspricht der Menge an Enzym, die innerhalb 1h 1µg DNA schneidet. Da dies nur ein ungefähres Maß ist, setzt man pro µg DNA ca. 2U an Enzym ein. Da viele Enzyme bei Konzentrationen von mehr als 5% Glycerin nicht mehr oder falsch schneiden, sollte

man darauf achten, daß die Zugabe von Enzym 1/10 des Endvolumens nicht übersteigt. Dies ist notwendig, da die Enzyme in 50% Glycerin geliefert werden.

Soll mit zwei oder mehr Enzymen gleichzeitig geschnitten werden, ist Verschiedenes zu beachten. Ist die Temperatur unterschiedlich oder sind die Puffer nicht identisch, ist ein gleichzeitiges Schneiden nicht möglich. Manchmal findet sich ein Puffer, in dem beide Enzyme schneiden; dieser sollte dann bevorzugt Verwendung finden. Allerdings sollten beide Enzyme gut in dem Puffer schneiden. Ist kein entsprechender Puffer zu finden, sollte zuerst mit dem Enzym geschnitten werden, das die niedrigere Salzkonzentration im Puffer hat. Danach gleicht man die Salzkonzentration aus und schneidet mit dem zweiten. Hierbei ist darauf zu achten, daß das erste Enzym deaktiviert oder entfernt wird.

Außerdem gibt es Enzyme, die mit einem eigenen Puffer geliefert werden. Diesen sollten man dann ausschließlich verwenden, da die Enzyme in anderen Puffern nicht oder unspezifisch schneiden.

### **3.6.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Zur Amplifikation von DNA oder DNA-Abschnitten bietet sich die Polymerase-Ketten-Reaktion an. Hierbei wird zuerst die vorhandene DNA aufgeschmolzen. Beim Abkühlen lagern sich dann entsprechend hergestellte Oligonukleotide an die DNA. Diese dienen als Startpunkte für die Verlängerung durch eine DNA-Polymerase.

Durch die hohe Temperatur sind hohe Forderungen an die Polymerase zu stellen. Neben dem möglichst fehlerfreien Einbau von Nukleotiden muß die Polymerase ihr Optimum im hohen Temperaturbereich haben, sowie thermostabil sein. Erfüllt die Polymerase diese Bedingungen, ist es möglich die Abfolge Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung zyklisch laufen zu lassen. So kommt es dann zu einem exponentiellen Wachstum des gewünschten DNA-Bereichs, der theoretisch bei Faktor 2 pro Zyklus, praktisch aber normalerweise bei 1,6 liegt. Die Zusammensetzung einer PCR-Reaktion ist in Tabelle 3.8 aufgeführt.

<b>Stoff</b>	<b>Menge</b>
Templat	10-100ng
Primer	je 1 $\mu$ mol
Puffer	1x
dNTPs	je 200nmol
Polymerase	1-5u
Wasser	zum Auffüllen

Tabelle 3.8: Zusammensetzung einer Standard-PCR

Durch Zusatz von Stoffen wie DMSO oder Formamid wird die Temperatur zum Aufschmelzen erniedrigt. Dies ist für Templat mit einer hohen Schmelztemperatur, wie DNA mit einem hohen GC-Anteil, hilfreich, da selbst thermostabile Polymerasen bei Temperaturen von über 95°C immer niedrigere Halbwertszeiten haben. Als Templat eignen sich geringe Mengen DNA aus fast allen Isolaten. Sie sollte vor dem Einsatz in der PCR entsalzt werden, da die meisten Polymerasen empfindlich auf Salz reagieren. Für die Primer ist es im Normalfall ausreichend, Oligonukleotide zu verwenden, die nicht speziell aufgereinigt wurden. Die Auswahl der Polymerasen hängt von der Länge des Fragments, der Genauigkeit des Ablesens sowie spezieller Parameter (z. B. definiertes 3'-Ende) in komplexen PCR-Reaktionen ab. Bei komplexeren PCR-Reaktionen oder bei der Notwendigkeit eines definierten 5'-Endes sollten die Oligonukleotide über HPLC aufgereinigt sein. Die Pufferzusammensetzung ist nicht für alle Polymerasen identisch, daher ist der mitgelieferte Puffer zu verwenden. Zum Auffüllen des PCR-Ansatzes ist steriles Milli-Q-Wasser zu verwenden. Die Temperaturen für Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung liegen normalerweise bei 95°C, 50°C und 72°C. Die Temperaturen geben nur einen Anhaltspunkt und müssen bei jedem Experiment optimiert werden. Die Schmelztemperatur der Primer sollte möglichst gleich sein und ungefähr 5°C über der Anlagerungstemperatur liegen. Bei Einsatz von DMSO oder Formamid werden die Temperaturen nach unten korrigiert (ca. 2-4°C).

### 3.6.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte außer Haus bei der Firma SeqLab in Göttingen. Hierzu müssen die DNA-Templat sehr rein sein. Am besten verwendet man entsprechende Kits. Sowohl die PCR-Produkte als auch die Plasmide wurden mit den jeweiligen Kits von Macherei und Nagel isoliert und zusätzlich auf einer Membran gegen Wasser dialysiert. Hierzu wird in einer Petrischale oder einem ähnlichen Gefäß Milli-Q-Wasser eingefüllt. Darauf wird die Membran plaziert und ca. 30 $\mu$ l DNA-Lösung auf die Membran möglichst zentral pipettiert. Nach ca. 30min wird die Lösung vorsichtig von der Membran abgenommen. Die Proben können jetzt zur Sequenzierung gegeben werden.

## 3.7 Arbeiten mit Proteinen

### 3.7.1 Proteinfällung mittels Aceton

#### Material

Aceton

#### Durchführung

Zum Fällen von Proteinen ist Aceton geeignet. Da die Proteine dabei denaturieren, sollte dieses Verfahren nur angewandt werden, wenn es keine Rolle spielt, ob das Protein nativ vorliegt oder nicht. Dies ist bei denaturierenden Gelen oder der Massenspektrometrie der Fall. Zur Probenvorbereitung aus Kulturüberständen eignet sich dieses Verfahren sehr gut. Da gleichzeitig eine Entsalzung stattfindet, erhöht es die Schärfe der Banden bei diskontinuierlichen Gelsystemen.

Die Probe wird mit 5Vol Aceton (-20°C) versetzt, vermischt und auf Eis für 10min belassen. Zentrifugation bei 13000g für 10min ergibt ein Pellet, das an der Luft oder im Brutschrank getrocknet wird. Das Trocknen im Vakuumkonzentrator erwies sich als nicht so gut, da hierbei Pellets regelmäßig, trotz langsamen und vorsichtigen Belüftens, verloren gingen.

### 3.7.2 Proteinfällung mittels Ammoniumsulfat

#### Material

TE-Puffer (40mM, 10mM, pH 8), Ammoniumsulfat

#### Durchführung

Es ist möglich Proteine über ihre Löslichkeit bei unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat zu trennen. Tendamtat fällt bei einer Konzentration von ca. 45% aus und erfährt so eine Vorreinigung. Bei einem unbekanntem Protein ist die Konzentration vorher zu ermitteln, indem man kleine Mengen mit unterschiedlichen Konzentrationen versetzt und diese über ein Gel analysiert.

In den meisten Fällen fällt man aus einem Kulturüberstand. Dieser muß von den vorhandenen Zellen abgetrennt werden. Dazu wird die Kultur zuerst bei ca. 10000g für 45min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und unter Vakuum filtriert. Unter portionsweiser Zugabe von Ammoniumsulfat wird das Protein bei 4°C aus dem Filtrat gefällt. Wird das Ammoniumsulfat auf einmal hinzugegeben, kommt es zu lokal höheren Konzentrationen an Ammoniumsulfat. Dabei würden auch Proteine gefällt werden, die erst bei höherer Ammoniumsulfatkonzentration fielen. Da diese normalerweise nicht mehr in Lösung gehen, wird die Probe verunreinigt.

Die nun trübe Lösung wird für 45min bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig abdekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Resuspendierung erfolgt in TE-Puffer bei 4°C über Nacht.

### 3.7.3 $\alpha$ -Amylase-Plattentest

#### Material

Stärke/Agarose-Lösung (1%, 0,8%), I<sub>2</sub>/KI-Lösung, NL701-Platten, Pankreatin, Phosphatpuffer

### Durchführung

Eine einfache Methode um festzustellen, ob eine *Sreptomycetes lividans*-Kultur Tendamistat produziert, ist der  $\alpha$ -Amylase-Plattentest. Hier wird über die Färbung von Stärke durch Iod ermittelt, ob die  $\alpha$ -Amylase inhibiert wurde oder nicht.

Es werden parallel auf drei NL-701-Platten mit einem Zahnstocher mehrere Kolonien aufgebracht (ca. 9 je Platte). Zwei dienen zum Test für unterschiedliche Pankreatinkonzentrationen, eine als Stammhaltung. Die Platten werden 2-3d bei 28°C inkubiert, bis die Kolonien ca. 2mm groß sind. Eine vorbereitete Pankreatinlösung (ca. 3ml) wird in unterschiedlichen Konzentrationen gleichmäßig auf den zwei Platten verteilt und für 30min inkubiert. Dies geschieht, weil die Inhibition der  $\alpha$ -Amylase durch Tendamistat kinetisch gehemmt ist. Es werden 7,5ml auf 50°C temperierte Stärke-Agarose-Lösung auf der Platte gleichmäßig verteilt. Dabei ist zügig zu arbeiten, da die Lösung relativ schnell fest wird. Die anschließende Inkubation bei 28°C für 30min läßt der  $\alpha$ -Amylase Zeit, die Stärke in der Lösung abzubauen. An den Stellen, an denen Tendamistat die  $\alpha$ -Amylase inhibiert hat, wird die Stärke nicht abgebaut. Durch die Zugabe von I<sub>2</sub>/KI-Lösung wird die verbliebene Stärke als blaugefärbte Stellen angezeigt. Solche Höfe um die Kolonien zeigen also Tendamistat an.

Die Größe der Höfe ist kein Maß für die Expressionsstärke der Kolonie. Die Blaufärbung ist nur eine qualitative Aussage, ob Tendamistat exprimiert wird oder nicht.

### 3.7.4 PEG-Behandlung von Coomassie-gefärbten Proteingelen

#### Material

PEG-Lösung

#### Durchführung

Polyacrylamidgele, die mit Coomassie gefärbt wurden, können mit Hilfe einer PEG-Lösung verkleinert werden. Durch das PEG wird dem Gel Wasser entzogen, wodurch dieses schrumpft. Dies läßt sich vielfach anwenden. Man kann das Gel



auf diese Weise besser entfärben, es deutlich einfacher zur Konservierung trocknen und Unterschiede zwischen verschiedenen Banden deutlicher hervorheben.

Ein bereits gefärbtes Gel wird in A. dest. vom Entfärber befreit. Das vom Wasser befreite Gel wird auf einem Taumler mit einer PEG-Lösung (70°C) übergossen und für 15min getaumelt. Das Gel kann auch über Nacht in der Lösung liegen. Die PEG-Lösung sollte ca. 50%-ig sein. Ist eine stärkere Verkleinerung gewünscht, kann man bis zu 80% PEG benutzen.

Das Gel kann mit Wasser wieder in die Originalgröße gebracht werden. Außerdem ist es in diesem Zustand geeignet zur Trocknung.

### **3.7.5 Trocknung von Polyacrylamidgelen**

#### **Material**

Gelrahmen, Cellophan

#### **Durchführung**

Bei dieser Trocknungsmethode reißen die Gele nicht so schnell, wie bei der herkömmlichen, bei der die Gele in Methanol und Glyzerin eingelegt werden. Zum einen sind die Gele kleiner und zum anderen sind sie bereits entwässert. Das heißt, das Gel verändert sich bei der Trocknung so gut wie nicht mehr in der Form. Trotzdem sollte vor dem Trocknen das Gel archiviert werden.

Das zu trocknende Gel wird einer PEG-Behandlung unterzogen. Das Cellophan wird ebenfalls in eine PEG-Lösung gelegt (nicht heiß). Nach dem Abkühlen des Geles legt man es zwischen zwei Folien in einen Gelrahmen. Luftblasen sollten vermieden werden. Die Folien werden straff in den Rahmen gespannt und mit Klammern fixiert. Zum Trocknen wird der Rahmen über Nacht in den Abzug gestellt. Die Folie wird anschließend aus dem Rahmen genommen und das Gel ausgeschnitten.

### 3.7.6 PAGE unter Nativ-Bedingungen

#### Material

Acrylamidlösung (49,5% T/6% C), Acrylamidlösung (49,5% T/3% C), APS, TEMED

#### Durchführung

Die Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen eignet sich, um Unterschiede zwischen Proteinen darzustellen, die sich auf den Nativzustand der Proteine beziehen. Hierzu gehören die Ladung sowie das Volumen des Proteins. Außerdem lassen sich damit die Bildung von Komplexen beobachten. Unter denaturierenden Bedingungen würden diese zerfallen. Durch Änderung verschiedener Parameter, wie die Gelkonzentration, das Verhältnis zwischen Crosslinker und Kettenbildner, der pH-Wert oder Zugabe von verschiedenen Mengen an Harnstoff kann man die Unterschiede stärker herausstellen. Im Allgemeinen geben diskontinuierliche Gelsysteme bessere Ergebnisse, da die Banden durch Konzentration schärfer werden. Allerdings kann die Konzentration so stark werden, daß das Löslichkeitsprodukt des Proteins überschritten wird und dasselbe ausfällt.

Die Gelapparatur wird vorbereitet und die Lösungen angesetzt. Die Gellösungen haben eine Zusammensetzung, wie in Tabelle 3.9 gezeigt.

Lösungen	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung	1,25ml	15ml
Sammelgelpuffer	2,5ml	-
Trenngelpuffer	-	3,75ml
APS	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Wasser	ad 12,5ml	ad 30ml

Tabelle 3.9: Zusammensetzung eines Nativ-Gels

APS und TEMED werden erst kurz vor dem Einfüllen in die Apparatur zugegeben. Eine allgemeine Anleitung zum Aufbau einer Gelapparatur und dem Gießen eines Geles steht unter Abschnitt (Schägger-Jagow-Gele). Maximal 20 $\mu$ l an Probe bei großen Gelen bzw. 10 $\mu$ l bei Minigelen wird aufgetragen. Bei maximaler Stromstärke wird das Gel bei 100V über Nacht laufen gelassen. Das Gel wird fixiert, gefärbt, archiviert und getrocknet.

### **3.7.7 Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand von *Streptomyces lividans***

#### **Material**

TE-Puffer (40mM, 10mM, pH 8), BIS-TRIS (20mM, pH 6), BIS-TRIS/NaCl (20mM, 1M, pH 6), TFA/Wasser (0,1%), TFA/Acetonitril (0,1%)

#### **Ammoniumsulfatfällung**

Der Kulturüberstand aus der Expression in Streptomyceten wird mit 10000g für 20min zentrifugiert. Die Lösung wird vom Niederschlag befreit und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend mit Ammoniumsulfat versetzt. Hierbei werden je 100ml Flüssigkeit 56,7g Ammoniumsulfat (entspricht einer zu 80% gesättigten Lösung) portionsweise bei 4°C unter Rühren zugesetzt. Nachdem sich alles Ammoniumsulfat gelöst hat, wird die Probe bei 9000g für 45min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in TE-Puffer (40mM, 10mM, pH 8,0) aufgenommen.

#### **Dialyse**

Die Dialyse erfolgt gegen BIS-TRIS (20mM, pH 6,0) in einer Amiconzelle. Es wird die Proteinprobe in die vorbereitete Amiconzelle gegeben und unter Druck aufkonzentriert. Bevor die Lösung eintrocknet, wird der Dialysepuffer hinzugefügt und erneut aufkonzentriert. Dies wird nochmals wiederholt und die Probe aus der Zelle pipettiert. Jetzt ist die Lösung bereit für die HPLC-Reinigung.

### **HPLC-Reinigung**

Die durch Dialyse vorbereitete Probe reinigt man über einen Anionenaustauscher auf. Verwendet werden als Equilibrierungspuffer BIS-TRIS (20mM, pH 6,0) und als Elutionspuffer BIS-TRIS/NaCl (20mM, 1M, pH 6,0). Als Säulenmaterial kommt Source 15Q zum Einsatz. Dieses Material erlaubt eine Flußrate von 10ml. Die Trennung wurde auf einem BioCAD-System durchgeführt. Für den Erfolg der Trennung ist es sehr wichtig, daß die Probe quasi salzfrei ist, da das Tendamatat bei niedriger Salzkonzentration eluiert. Es kommt als scharfe Bande bald nach dem Beginn des Gradienten bei ca. 4%.

Die Entsalzung der Proteine erfolgt mittels RP-HPLC. Hier benutzt man als Equilibrierungspuffer TFA in Wasser (0,1%) und als Elutionspuffer TFA in Acetonitril (0,1%). Die Probe wird portionsweise auf die Säule aufgebracht. Am Konduktivitätsmesser kann man eine Salzbande erkennen. Danach gibt man die nächste Portion auf. Dabei ist zu beachten, das die Säule nicht überladen wird. Nach der letzten Portion wird das Protein mit einem schnellen Gradienten von der Säule eluiert. Nach dem Trocknen in einem Vakuumkonzentrator ist die Proteinprobe für die meisten Untersuchungen rein genug.

### **3.7.8 Schägger-Jagow-Gele (Tricine-SDS)**

#### **Material**

Acrylamidlösung (49%T/6%C), Acrylamidlösung (49%T/3%C), Kathodenpuffer, Anodenpuffer, SDS-Gelpuffer, APS, TEMED

#### **Durchführung**

Die Gelapparatur wird vorbereitet, indem man die sauberen Glas- und Aluminiumplatten mit Ethanol abwischt und anschließend mit einem fusselfreien Tuch trockenreibt. Die beiden Platten werden mit den gesäuberten Seiten, durch saubere Spacer von einander getrennt, aufeinander gelegt. Der so erhaltene Sandwich wird am unteren Ende ausgerichtet, so daß die Spacer sowie die beiden Platten einen gemeinsamen Abschluß besitzen. Jetzt wird der Sandwich in den Gelcasser

geschoben und auch mit diesem ausgerichtet. Nach dem Befestigen wird das Gebilde in eine spezielle Vorrichtung gestellt und entsprechend befestigt. Bei Platten, die über die Apparatur hinaus stehen, werden zum Abdichten zwei Klammern angebracht.

Es werden die Gellösungen, wie in Tabelle 3.10 aufgelistet, zusammengegeben. Es ist darauf zu achten, daß die Lösungen vor der Zugabe von APS und TEMED vollständig homogenisiert sind.

<b>Lösungen</b>	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid (49% T/6% C)	3,3ml	-
Acrylamid (49% T/3% C)	-	1ml
Gelpuffer	3,3ml	1,6ml
A. dest.	ad 10ml	ad 12,5ml
APS (10%)	75 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Tabelle 3.10: Zusammensetzung Schagger-Jagow-Gel

Nachdem die Lösung in die Gelkassette gegossen wurde, überschichtet man die Lösung mit n-Butanol. Die Gelkante wird durch diesen Vorgang geglättet. Ca. 1h später ist die Lösung polymerisiert. Jetzt wird das Butanol abgegossen und zwischen den Glasplatten mit Wasser gespült. Nach dem Trocknen wird das Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Die Gellösung wird analog der ersten vorbereitet. Nach dem Gießen wird der Kamm in die Kassette gesteckt. Nach ca. 30min ist das Sammelgel polymerisiert und kann in die Gelapparatur eingespannt werden. Die mit Acetonfällung vorbereiteten Proben werden aufgetragen. Bei 100V werden die Proben 8h der Elektroporese unterzogen. Das Gel wird anschließend mit Coomassie oder Silber gefärbt.

### **3.7.9 Coomassiefärbung**

#### **Material**

Coomassie Brilliant Blue-R in Essigsäure (10%), Trichloressigsäurelösung (20%)

#### **Durchführung**

Das von den Glasplatten abgehobene Gel wird in TCA-Lösung (20%) für 20min fixiert. Anschließend wird gründlich mit Wasser gewaschen. Das Gel wird jetzt mit der Coomassiefärbelösung versetzt und ca. 2h (oder über Nacht) auf dem Taumler bewegt. Die Färbelösung kann wiederverwertet werden. Das Gel wird mit Wasser gewaschen und anschließend mit Essigsäure (10%) entfärbt. Dies erfolgt bis zum gewünschten Kontrast.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur schnellen Unterscheidung von Tendamistatvarianten

#### 4.1.1 Allgemein

Zur schnellen Unterscheidung von Disulfidbrücken-Varianten werden verschiedene Methoden untersucht.

#### 4.1.2 Gelfiltration

Neben der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde die Gelfiltration herangezogen, um verschiedene Mutanten zu unterscheiden. Es ließen sich Unterschiede im Laufverhalten der einzelnen getesteten Varianten zeigen. Trotz verschiedener Puffer und Säulen ließen sich die einzelnen Proteine nicht separieren. Es zeigte sich nur eine Verbreiterung der Banden, somit war die Trennleistung nicht hoch genug. Eine Basislinientrennung konnte in keinem Fall erreicht werden.

#### 4.1.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Als zweite Variante zur Unterscheidung zog ich die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) heran. Bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen laufen die Proteinvarianten unterschiedlich schnell. Dies läßt sich auf die Entfaltung bzw.

teilweise Entfaltung der Proteine zurückführen. Durch die Denaturierung ändert sich die Größe (das Volumen) des Proteins. Damit ändert sich auch dessen Mobilität im Gel (siehe Einleitung).

Diese Eigenschaft wurde auch von mir genutzt, um ein Verfahren zu entwickeln, mit dem es möglich ist, qualitativ Auskunft über die Stabilität von Tendamistat zu erhalten.

Für erste Untersuchungen wurden die vorhandenen Disulfidbrücken-Mutanten verwendet. Als Einstieg untersuchte ich das Laufverhalten in transversalen Gelen.

#### 4.1.4 Transversale Gele

Wie von Creighton [16] beschrieben, wurde ein Gel erzeugt, dessen Harnstoffkonzentration von links nach rechts zunimmt (siehe Abbildung 4.1).

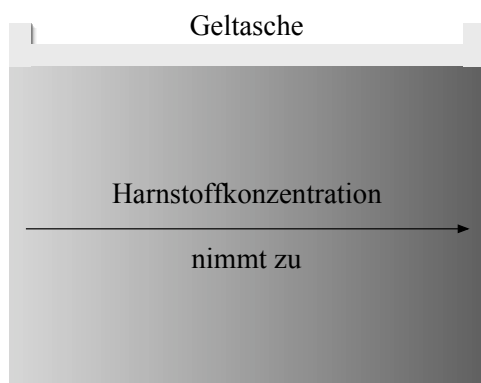


Abbildung 4.1: Transverses Gel

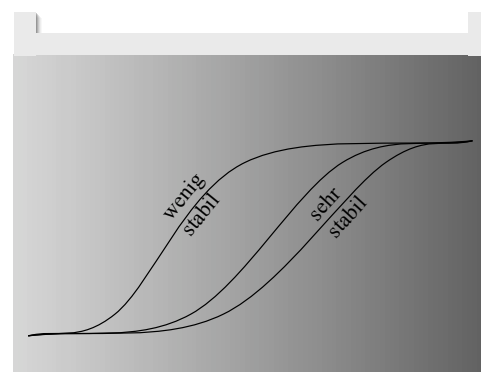


Abbildung 4.2: Gellauf

Die gesamte Oberkante des Gels dient als Auftragsbereich. Wird ein Protein dort aufgetragen, erhält man eine S-förmige Kurve im Gel (siehe Abbildung 4.2 und 4.3). Die Lage des Wendepunktes ist ein Maß für die Stabilität des untersuchten Proteins [11].

Bei von links nach rechts ansteigender Harnstoffkonzentration, liegt der Wendepunkt umso weiter rechts, je stabiler das Protein ist. Werden unterschiedlich stabile Varianten zusammen aufgetragen, entsteht eine Überlagerung der S-Kurven. Hier kann man einen Bereich abschätzen, bei der eine möglichst starke Trennung erfolgt. Diese wurde bei ca. 5M Harnstoff ermittelt.



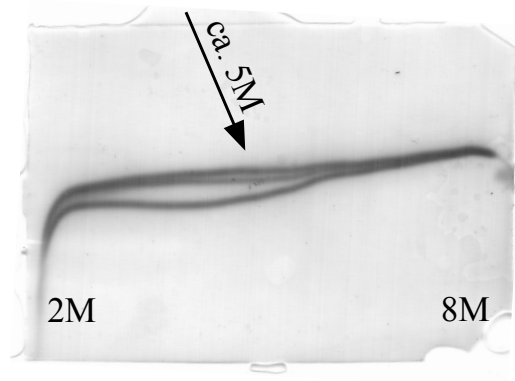


Abbildung 4.3: Transverses Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten (Harnstoff-Gradient)

Im Anschluß wurde dann ein Gel mit 5M Harnstoff hergestellt. Hier war die Gelkonzentration (10%-20%) quer zur Laufrichtung variiert. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, gab es keinen Unterschied in der Trennung der einzelnen Varianten in diesem Bereich. Es wurde für die weiteren Versuche die sonst verwendeten 16,5% Gelkonzentration eingesetzt.

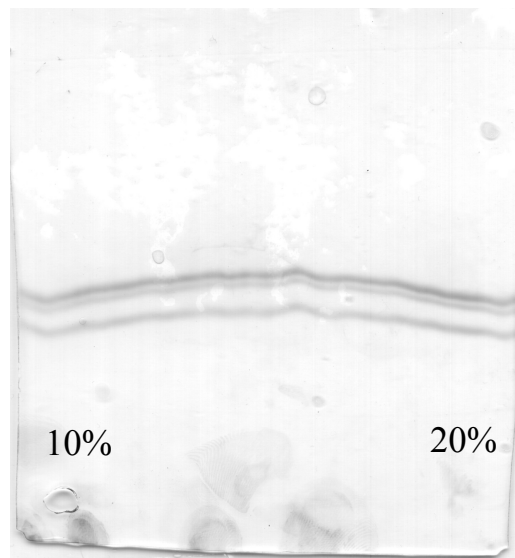


Abbildung 4.4: Transverses Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten (%T-Gradient)

In Abbildung 4.5 ist ganz deutlich eine Auftrennung der unterschiedlichen Varianten zu erkennen. Beim Auftragen auf ein 5M Harnstoffgel zeigten sich zwi-

schen Stabilität und Laufstrecke Parallelen. Die am wenigsten stabilen Varianten liefen am langsamsten, die stabilsten am schnellsten. Der Unterschied in der Trennung zwischen stabilen und weniger stabilen Varianten war sehr deutlich. Der zwischen den Varianten ähnlicher Stabilität war erkennbar, aber nicht groß.

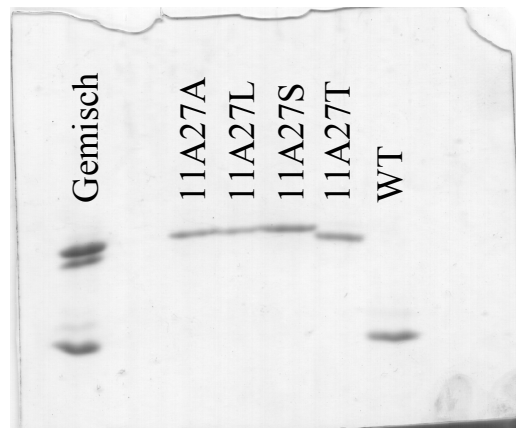


Abbildung 4.5: Isokratisches Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten

Um diesen Unterschied zu verstärken bzw. bessere Bedingungen zu ermitteln, wurden weitere Gradientengele untersucht.

### 4.1.5 Gradientengele

#### Allgemein

Gradientengele haben an unterschiedlichen Stellen des Geles verschiedene Eigenschaften. Dies können Unterschiede in der Porengröße oder der Konzentration sein. Hier werden neben Harnstoff- auch Konzentrationsgradienten untersucht. Die unterschiedlichen Bedingungen in den einzelnen Gelbereichen haben Einfluß auf die Laufeigenschaften des Proteins. Für Konzentrationsgradienten kann die Laufgeschwindigkeit mit der Formel (4.1) [41, 11] beschrieben werden.

$$\int_{x_0}^x e^{f(x)} dx \sim t \quad (4.1)$$

Die Funktion  $f(x)$  beschreibt hierin die Entwicklung des Konzentrationsgradienten im Gel. Durch Integration der Gleichung kann die Änderung der Laufstrecke

und somit der Geschwindigkeit abgeschätzt werden.

### Lineare Gradientengele

Bei linearen Gradienten nimmt die Gelkonzentration von oben nach unten zu. Durch die Erhöhung der Gelkonzentration verändern sich die Laufeigenschaften der Proteine im Verhältnis zueinander. Daraus resultiert eine im gesamten Gel unterschiedliche Trennleistung. Bei einer Proteinmischung ist dies ein guter Kompromiss. Bei der Trennung zweier Proteine ist dieser Weg suboptimal. Es gibt dann immer einen optimalen Konzentrationsbereich (siehe Abbildung 4.6) bei dem die Trennung am stärksten ist.

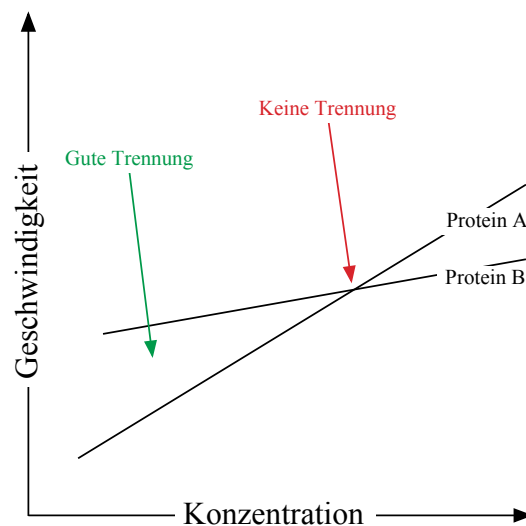


Abbildung 4.6: Optimaler Konzentrationsbereich

Im Falle mehrerer Disulfidbrücken-Varianten ist dies schlecht durchführbar. Man kann mit Hilfe raffinierter Gradienten, eine möglichst gute Trennung erreichen [56].

Bei einem linearen Gradienten wird mit zunehmender Zeit die Geschwindigkeit der Proteine immer geringer, da die Konzentration des Geles nach unten hin zunimmt. Dies führt zu einer geringeren Auflösung, da die Laufstrecke proportional zum natürlichen Logarithmus der Zeit ist.

$$f(x) = x$$

$$\int_{x_0}^x e^x dx \sim t \quad (4.2)$$

$$x \sim \ln t \quad (4.3)$$

Versuche hierzu zeigten auch diese Problematik. Bei einem linearen Gradienten aus Harnstoff ist die Auflösung geringer als bei einem isokratischen Gel.

Nutzt man dagegen ein inverses lineares Gel, erhöht sich die Auflösung. Hier nimmt die Konzentration im Gel nach unten hin ab. Die Laufstrecke wird durch Formel 4.5 beschrieben.

$$f(x) = C_1 - x$$

$$\int_{x_0}^x e^{C_1-x} dx \sim t \quad (4.4)$$

$$x \sim C_1 - \ln(C_2 - t) \quad (4.5)$$

Proteine legen die gleiche Laufstrecke in immer kürzerer Zeit zurück.

Das inverse Gel zeigte ebenfalls keine Verbesserung in der Auflösung. Dies ist jedoch auf die Konstruktion eines solchen Gels zurückzuführen. Da die Lösung mit dem höheren Harnstoffgehalt auch eine höhere Dichte besitzt, muß dies ausgeglichen werden, damit der Gradient durch die Dichteunterschiede nicht zerstört wird. Ein Zusatz an Glycerin oder Saccharose zur Lösung mit der geringeren Harnstoffkonzentration erfüllt diesen Zweck.

Zur Herstellung eines linearen oder invers linearen Geles verwendet man einen Gradientenmischer (siehe Abbildung 4.7).

Dieser besteht aus zwei Kammern, die miteinander verbunden sind. Diese Verbindung kann mit Hilfe eines Hebels geöffnet oder geschlossen werden. Eine der beiden Kammern hat außerdem einen Auslauf zum Gießen des Gels. Der wird, wie die Verbindung zwischen den Kammern, zu Beginn verschlossen. Bei einem linearen Gradientengel wird die Kammer am Auslauf mit der konzentrierten Lösung gefüllt. In die zweite Kammer wird das gleiche Volumen der niedrigkonzentrierten Lösung gefüllt. Das Gesamtvolumen beider Lösungen sollte dem Gelvo-

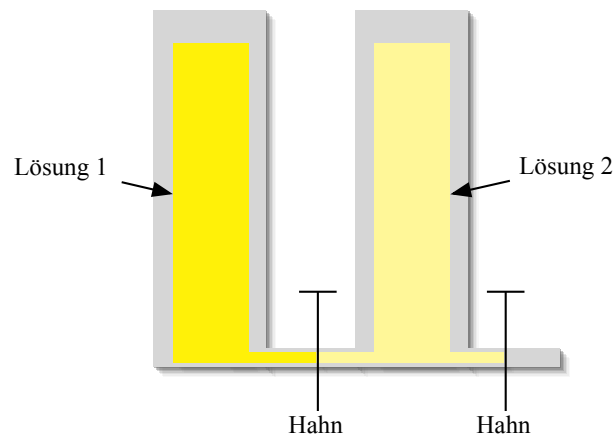


Abbildung 4.7: Aufbau eines Gradientenmischers

lumen entsprechen. Nur so erhält man schließlich einen linearen Gradienten mit der hohen und niedrigen Konzentration an den Enden des Geles.

Zum Gießen wird zuerst die Verbindung geöffnet und direkt danach der Ausfluß. Unter Rühren läuft die konzentrierte Lösung aus dem Auslauf. Dabei fließt aus der zweiten Kammer die niedrig konzentrierte Lösung nach. Dabei kommt es zu einer gleichmäßigen Verdünnung der Lösung in Kammer 1. Es entsteht ein linearer Gradient. Dieser bleibt durch die ebenfalls lineare Dichteverteilung stabil.

Ein invers lineares Gel wird auf die gleiche Weise gegossen. Die Lösungen in den Kammern sind allerdings vertauscht. Da nun der Dichtegradient der Schwerkraft entgegen laufen und somit zu einer Vermischung führen würde, wird dies durch Zusatzstoffe in der weniger konzentrierten Lösung ausgeglichen.

### **Nicht-lineare Gradientengele**

Die nächste Stufe war der Übergang zu nicht-linearen Gradientengelen. Es gilt grundsätzlich das gleiche wie bei linearen Gelen.

Durch den veränderten Konzentrationsverlauf im Gel, erhält man ein anderes Laufverhalten. Durch quadratische oder exponentielle Gradienten erhöht sich die Trennstärke oder die Trenngeschwindigkeit.

Ein Gel mit von oben nach unten ansteigender Konzentration zeigt die gleichen Probleme wie ein entsprechendes lineares Gel. Dies umso stärker, je schnell-

ler der Gradient nach unten ansteigt. Diese Gelvariante ist zur Unterscheidung schlechter geeignet, als ein entsprechendes lineares Gel.

Ein inverses Gel würde auch hier die Trennung verbessern.

$$f(x) = e^x$$

$$\int_{x_0}^x e^{e^x} dx \sim t \quad (4.6)$$

$$Ei(e^x) - Ei(e^{x_0}) \sim t \quad (4.7)$$

Eine Lösung des Integrals (4.7) lässt sich durch eine Substitution von  $e^x$  durch  $z$  erhalten [9]. Die Formel ist exemplarisch für die hier aufgeführten Gele. Die eigentliche Schwierigkeit besteht in der Herstellung eines solchen Geles. Im Vergleich zum linearen Gel ist es nicht möglich, die Lösungen im Gradientenmischer einfach zu vertauschen. Es würde ein unterschiedliches Konzentrationsprofil entstehen. In Abbildung 4.8 ist ein nicht lineares Gradientengel schematisch in der Konzentrationsverteilung dargestellt.

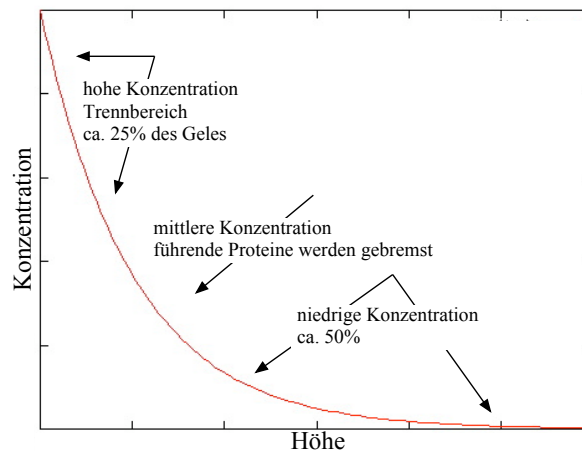


Abbildung 4.8: Exponentielles Gradientengel

Abbildung 4.9 zeigt den Zustand beim Vertauschen der Lösungen. Der Unterschied ist deutlich zu erkennen.

In Abbildung 4.8 ändert sich der Bereich der hohen Konzentrationen langsam, in Abbildung 4.9 die der niedrigen Konzentration. Um die in Abbildung 4.10 ge-

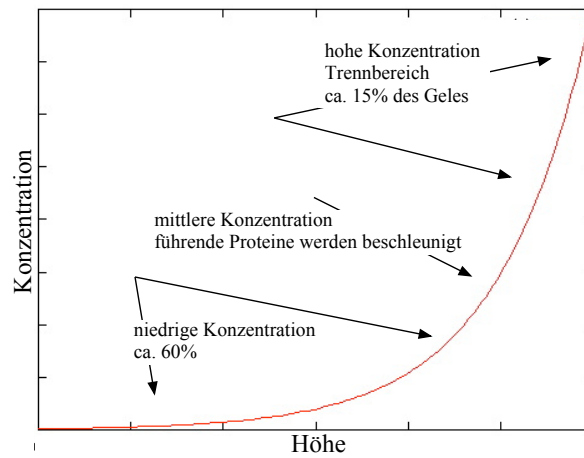


Abbildung 4.9: Exponentielles inverses Gradientengel (ungeeignet)

zeigte (richtige) Verteilung zu erhalten, müßte das Gel mit einer Maschine gegossen werden. Diese wäre in der Lage die Stammlösungen gezielt zu mischen, nicht wie im Gradientenmischer passiv.

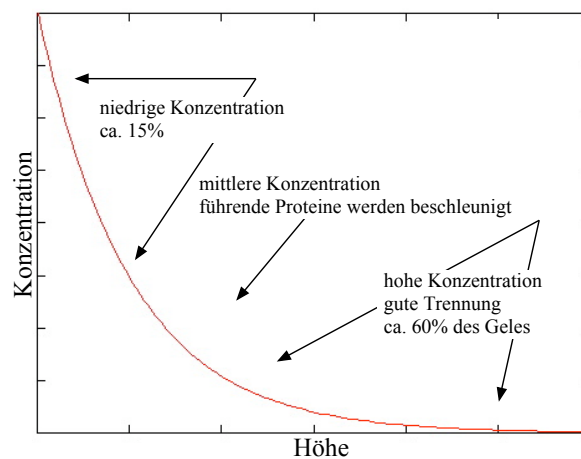


Abbildung 4.10: Exponentielles inverses Gradientengel (geeignet)

Alternativ könnte das Gel auch mit den Taschen nach unten gegossen werden. Beide Methoden wurden mangels vorhandener Technik nicht umgesetzt. Mit Hilfe eines Stufengeles sollte das umgangen werden. Hierbei wurde das Gel in gleiche Bereiche unterteilt. Jeder hatte eine andere Konzentration. Das Gel wurde nun Schicht für Schicht aufgebaut. Jede Schicht konnte dabei fertig polymerisie-

ren, und vermischte sich dadurch nicht. So konnte es umgangen werden, Zusatzstoffe zur Stabilisierung der Dichteverteilung einzusetzen. Trotzdem wurde das gewünschte Ergebnis nicht erhalten. Die Laufqualität litt durch die vielen Grenzflächen. Es kam zu Verschmierungen und zusätzlichen Banden.

Es zeigte sich, daß mit den vorhandenen Methoden, das isokratische 5M Harnstoffgel die beste Auflösung ergab.

## **4.2 Strategien zur Herstellung von Disulfidbrückenfreiem Tendamistat**

Zur Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat wurden verschiedene Strategien entwickelt. Nachfolgend sind sie vorgestellt und bewertet.

### **4.2.1 Strategie 1**

Als erste Strategie ergab sich die Darstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat durch Kombination bereits vorhandener Mutanten. Für die kleine Disulfidbrücke existierten zu diesem Zeitpunkt vier funktionale Mutanten (A11A27, A11L27, A11S27, A11T27), für die große eine (A45L73). Jede dieser Mutanten führt zu einer starken Destabilisierung des Proteins. Die wahrscheinlich beste Kombination wäre eine Mutante A11T27A45L73 gewesen, da die Proteinvariante des Tendamistats A11T27 die stabilste des kleinen Loops darstellt. Eine Variante A11A27A45A73 darzustellen, wurde bereits von Sigrid Haas-Lauterbach in Angriff genommen. Leider konnte kein Protein erhalten werden. Dieses Protein wurde entweder nicht exprimiert oder von Proteasen im Kulturmedium abgebaut. Auf Grund dieser Erfahrung und der theoretischen Destabilisierung war nicht zu erwarten, daß diese Mutante ein stabiles Tendamistat produziert.

Als weiterführender Schritt käme die ungerichtete Mutagenese ins Spiel. Eine Stabilisierung ist durch Mutationen, die mittels PCR eingeführt würden, zu erwarten. Die so erzeugten Mutationen, wären auf das Gen beschränkt. Allerdings sind die Veränderungen nicht mehr nur auf den Austausch der Cysteine zurückzuführen. Es wären zusätzliche Effekte bei späteren Untersuchungen zu berücksichti-



gen.

Auf Grund dieser Einschränkungen wurde diese Strategie zurückgestellt. Hierzu trug auch noch bei, daß die Tendamistatmutanten ausschließlich in dem Streptomycetenvektor pBC1 vorlagen. Dies hätte aufwendiges Umklonieren bedeutet, oder die erneute Darstellung der Varianten. Bei der erneuten Herstellung der Mutanten wäre jeweils nur eine spezielle Mutante erhalten worden; durch den statistischen Ansatz in Strategie 2 kann man bei gleichem Aufwand gleichzeitig 800 unterschiedliche Phenotypen erhalten und untersuchen.

In Abbildung 4.11 ist der Ablauf noch einmal schematisch dargestellt.

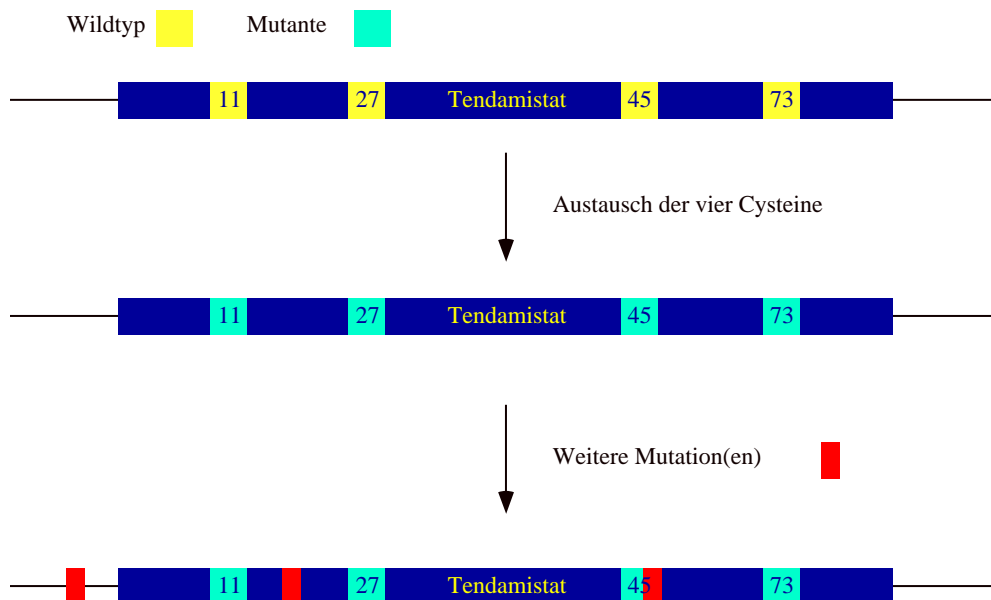


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Strategie 1

## 4.2.2 Strategie 2

Die Vorgehensweise ist die getrennte Mutagenese der beiden Disulfidbrücken. Durch statistische Mutagenese wird die möglichst stabilste Variante für jede Disulfidbrücke ermittelt. Anschließende Kombination der stabilsten Mutanten jedes Loops soll zu einem Disulfidbrücken-freiem Tendamistat führen.

Der Unterschied zur Strategie 1 liegt im Ausschöpfen von möglichen Stabilitätsreserven beim Austausch der Disulfidbrücke durch andere Aminosäuren. Auch

der Einsatz der ungerichteten Mutagenese, um weitere Stabilitätsgewinne zu erhalten ist hier nur optional.

Ein Erfolg bei der Suche nach weiteren stabilen Mutanten am ersten und zweiten Loop ist zu erwarten, da die bereits bekannten Varianten ohne „große Suche“ erhalten wurden. Da beim kleinen Loop nur ca. 1% aller Varianten und beim großen Loop sogar weniger als 1% der Varianten untersucht wurden, ist das Auffinden weiterer Mutanten ziemlich sicher, das Auffinden stabilerer Varianten wahrscheinlich. Eine Erhöhung der Stabilität bei jedem Loop um ca. 5°C würde zu einer temperaturstabilen Mutante führen, was auch die Stabilität gegenüber Proteasen erhöhen würde. In Abbildung 4.12 ist der Ablauf schematisch dargestellt.

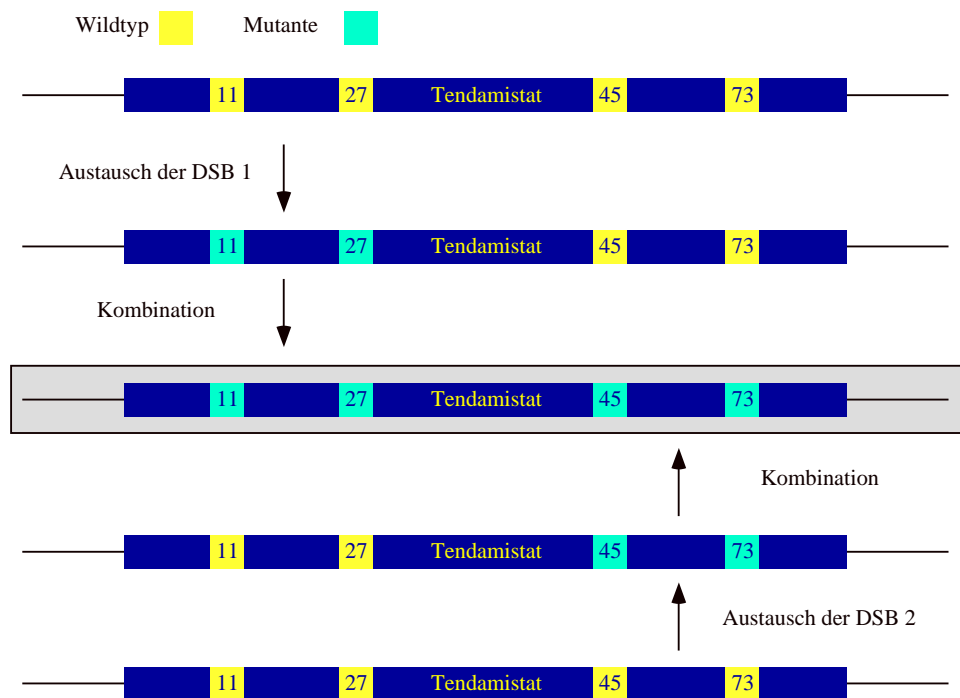


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Strategie 2

Da diese Strategie unter Berücksichtigung von Strategie 3 von mir verfolgt wurde, sind die einzelnen Schritte weiter unten detailliert behandelt.

### 4.2.3 Strategie 3

Die dritte Strategie ist eine ehrgeizigere Variante von Strategie 2. Hier werden nicht die einzelnen Loops getrennt variiert, sondern alle vier Cysteine auf einmal. Dies hat Vor- und Nachteile. Es werden alle möglichen Varianten erhalten ( $20^4 = 160000$ ) im Gegensatz zu Strategie 2. Bei dieser werden je Loop  $20^2$  also 400, insgesamt 800, Varianten untersucht. Aber genau diese Variantenvielfalt ist ein Problem bei der anschließenden Selektion. 400 oder 160000 Phenotypen zu unterscheiden, ist ein großer Unterschied. Zudem muss die Redundanz der Phenotypen beachtet werden. Somit hat man eine noch höhere Anzahl an Varianten bei den Genotypen ( $61^2 = 3721$  bzw.  $61^4 = 13,9 \cdot 10^6$ ). Während man 3721 Mutanten parallel bearbeiten kann, sind 14 Millionen zu viel. Das heißt, bei Strategie 2 werden alle theoretisch möglichen Mutanten ziemlich sicher erhalten, während Strategie 3 nur einen mehr oder weniger großen Bereich aller möglichen Varianten abdeckt. Ebenso wird die Selektion deutlich erschwert. Da beide Disulfidbrücken vermutlich keinen Einfluß auf die jeweilige andere haben, ist die Strategie 2, jene mit den größeren Erfolgchancen.

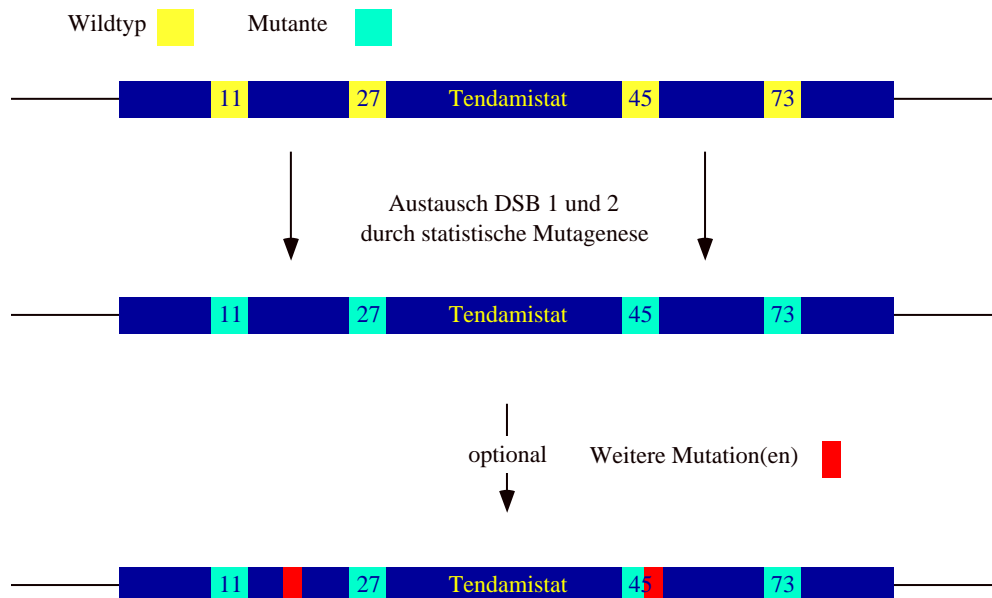


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der Strategie 3

Wie später beschrieben, ist es ohne große Veränderungen bei der Planung der

Oligonukleotidsequenzen für Strategie 2 möglich, die in Abbildung 4.13 dargestellte Strategie 3 mit zu berücksichtigen. Wie bei den anderen Strategien auch, ist eine anschließende ungerichtete Mutagenese optional.

## 4.3 Mutagenese

### 4.3.1 Mutagenese unter Verwendung der PCR-Methode nach Nelson und Long [45, 68]

#### Beschreibung

Als Einstieg zur Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat diene das Verfahren von Nelson und Long [45, 68]. Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, benötigt man für diese PCR-Variante drei Primer und einen mutagenen Primer. Die ersten drei Primer werden so gewählt, daß sie einen Bereich abdecken, in dem die Mutationen stattfinden sollen. Primer 1 und 2 entscheiden über die Größe des resultierenden PCR-Fragments. Primer 3 erhöht die Selektivität der PCR und, der vierte Primer ist für die Mutagenese zuständig.

Der Ablauf einer solchen Polymerase-Ketten-Reaktion ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

Als erstes findet eine PCR mit den Primern 2 und 4 statt. Das resultierende Fragment wird in einer zweiten PCR als Primer eingesetzt. Zusätzlich werden nun Primer 1 und 3 hinzu gegeben. Primer 1 setzt in Abbildung 4.14 links an und generiert, zusammen mit dem unteren Teil des aus der ersten PCR erhaltenen Fragments, das gewünschte DNA-Stück. Hier zeigt sich nun der Nutzen des Primer 3. Er bindet an das zusätzliche, nicht mit dem Templat komplementäre 3'-Ende. Dies führt zu einer Amplifikation des gewünschten Fragmentes unter Verbesserung des Mutanten/Wildtyp-Verhältnisses.

Könnte sich der Primer 3 direkt an das Templat binden, wäre eine Konkurrenzreaktion die Folge, bei der parallel der Wildtyp amplifiziert würde. Was bei einer Einzelmutation schon ärgerlich wäre, ist bei einer statistischen Mutagenese unbrauchbar, da die anschließende Selektion enorm erschwert wird.

Eine alternative Variante [26] wurde nicht weiter in Betracht gezogen. Hierbei

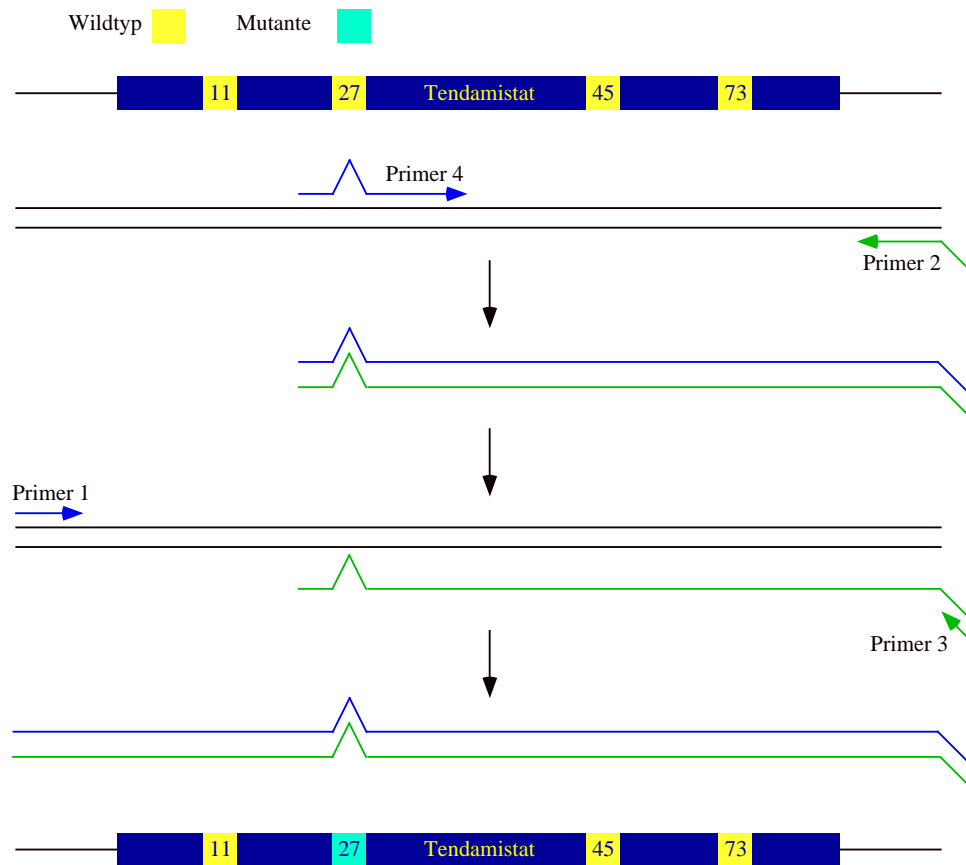


Abbildung 4.14: Mutagenese nach Nelson und Long

werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. In Abbildung 4.15 sieht man, wie die erhaltenen Fragmente in einer zweiten PCR eingesetzt werden.

Die eingeführten mutagenen Bereiche müssen komplementär sein, da sonst bei Einsatz der Vent-Polymerase (3'-5'-Exonukleaseaktivität) die eingebauten Mutationen entfernt werden. Die Komplementarität trifft aber bei der statistischen Mutagenese nicht oder nur in sehr begrenztem Umfang zu. Der Einsatz der Taq-Polymerase bringt für dieses Problem die Lösung. Allerdings zeigte sich [3], daß es hierbei zu weiteren Mutationen im Primerbereich kommt.

### Durchführung

Die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Primer wurden für den Einsatz des Verfahrens konstruiert und hergestellt.

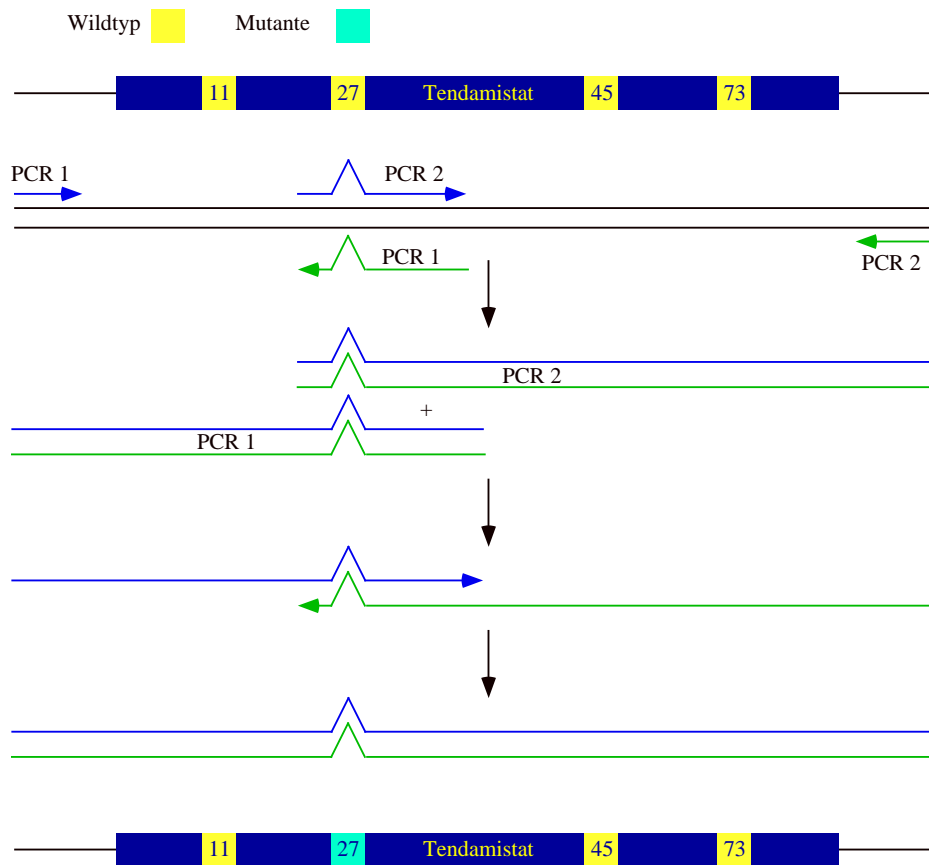


Abbildung 4.15: Mutagenesemethode nach Higuchi[26]

Primer	Sequenz
C11A	GCCCGCACCC TCCGCCGTGA CGCTCTAC
C11X	GCCCGCACCC TCCNNNGTGA CGCTCTAC
C27S	GGCCGACAAC GGCAGTGCCG AGACGGTG
C27X	GGCCGACAAC GGCNNNGCCG AGACGGTG
C45A	CGACACCGAA GGCCTGGCCT ACGCCGTCGC
C45X	CGACACCGAA GGCCTGNNNT ACGCCGTCGC
C73L	CGCTACCTCG CTCGCCTCCT TTAGCCCACA G
C73X	CGCTACCTCG CTCGCNNNCT TTAGCCCACA G

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
Nout3	CCATTGCGTA GGTTCACAC AGGAAACAGC [3]
Nout3Mut	CCATTGCGTA GGTTCAC [3]
Nout5	AACGCCAGGG TTTTCCCAG [3]

Tabelle 4.1: Eingesetzte Primer

Die PCR wurde wie folgt angesetzt (Tabelle 4.2) und mit in Tabelle 4.3 gezeigten Zyklus gefahren.

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
Nout3	5 $\mu$ l
C11A, C11X, C27S, C27X, C45A, C45X, C73L, C73X	5 $\mu$ l
Vent-Polymerase	1 $\mu$ l
ThermoPol-Puffer	5 $\mu$ l
dNTP	8 $\mu$ l
DMSO	1 $\mu$ l
A. dest.	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.2: PCR-Mischung

Zur Verbesserung der Ausbeute wurde der Ansatz einer vorgeschalteten Denaturierung unterzogen. Durch die Auftrennung der DNA und das Auflösen von Überstrukturen steigt die effektive Konzentration an einzelsträngiger DNA. Die Denaturierung wurde ohne Zusatz von Polymerase durchgeführt. Die Denaturierungsbedingungen hätten Einfluß auf die Qualität der Polymerase, wie in der Einleitung besprochen. Die Probe wurde für 5min bei 95°C belassen. Dafür eignet sich der Thermocycler. Der PCR-Ansatz wird nun durch Einstellen in Eiswasser abgeschreckt. Nach wenigen Minuten (mind. zwei) wird die Polymerase dem Ge-

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Vordenaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing	50°C	1min
Elongation	72°C	1min
Nachlauf	72°C	10min

Tabelle 4.3: PCR-Zyklus

misch zugefügt. Zwischenzeitlich wird das Programm im Thermocycler gestartet. Bei der Annealingtemperatur angekommen, wird das Programm angehalten und die Proben hinein gestellt. Nach ca. 1min wird das Programm mit dem Annealing-schritt fortgesetzt.

Nach Beendigung der Polymerase-Ketten-Reaktion wird die Probe mittels einer Agarosegelelektrophorese gereinigt. Das gewünschte Fragment wurde unter Zuhilfenahme von DEAE-Zellulose wiedergewonnen und einer Ethanol-fällung unterzogen.

In die zweite PCR wurde das erhaltene Fragment, wie in Tabelle 4.4 gezeigt, eingesetzt.

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
PCR_C11A, PCR_C11X, PCR_C27S, PCR_C27X, PCR_C45A, PCR_C45X, PCR_C73L, PCR_C73X	5µl
Nout5	5µl
Nout3Mut	5µl
Vent-Polymerase	1µl
ThermoPol-Puffer	5µl
dNTP	8µl
DMSO	1µl

Fortsetzung auf der nächsten Seite



Fortsetzung

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
A. dest.	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.4: PCR-Mischung II

Auch hier wurde zunächst eine Denaturierung durchgeführt und im Anschluss daran folgende Zyklen (Tabelle 4.5) durchlaufen.

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Vordenaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing	55°C	1min
Elongation	72°C	1min
Nachlauf	72°C	10min

Tabelle 4.5: PCR-Zyklus II

Die Reinigung erfolgte analog.

Eine vereinfachte Versuchsführung zeigte, daß das gewünschte Fragment auch durch eine einzige PCR (Tabelle 4.6) zu gewinnen war. Dazu wurde das Reaktionsgemisch wie folgt angesetzt:

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
Nout5	5 $\mu$ l
Nout3	5 $\mu$ l
Nout3Mut	5 $\mu$ l
C11A, C11X, C27S, C27X, C45A, C45X, C73L, C73X	5 $\mu$ l
Vent-Polymerase	1 $\mu$ l

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung	
<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>
ThermoPol-Puffer	5 $\mu$ l
dNTP	8 $\mu$ l
DMSO	1 $\mu$ l
A. dest.	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.6: PCR-Mischung III

Mit folgender Reaktionsführung (Tabelle 4.7) ergab sich das gleiche Ergebnis, wie bei einer zweistufigen PCR.

<b>Vorgang</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Vordenaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing	50°C	1min
Elongation	72°C	1min
Nachlauf	72°C	10min

Tabelle 4.7: PCR-Zyklus III

Bei ersten Versuchen hierzu wurden die beiden außenliegenden Primer erst nach fünf Zyklen zur PCR-Mischung gegeben. Dies erwies sich als nicht notwendig, so daß die einzelnen PCRs als „One-pot-Reaktion“ durchgeführt wurden.

Die jeweiligen Fragmente für Loop 1 und 2 wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe Tabelle 4.8) und in gleichartig geöffnete pT136 einkloniert. Dabei ist zu beachten, daß ein Verdau mit SfiI und BstEII nicht gleichzeitig erfolgen kann. Es wird zuerst mit SfiI verdaut, danach mit NaCl supplementiert und mit BstEII geschnitten.

Lösung	Menge	
	PCR_C11(X/A)	PCR_C45(X/A)
PCR	PCR_C11(X/A)	PCR_C45(X/A)
DNA (pT136)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
SfiI (50°C)	1 $\mu$ l (10u)	-
BstEII (60°C)	1 $\mu$ l (10u)	-
AccI (37°C)	-	1 $\mu$ l (10u)
SacII (37°C)	-	1 $\mu$ l (10u)
Puffer (10x)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
NaCl (1M) (BstEII)	5 $\mu$ l	-
BSA (100x)	0,5 $\mu$ l	-
A. dest.	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.8: Restriktionsansatz

Die durch Ligation erhaltenen Vektoren wurden in *Escherichia coli* transformiert und das Plasmid durch Minipräparation (Methode II) wiedergewonnen.

Da es sich bei den isolierten Plasmiden noch nicht um die endgültigen handelt, da nur ein Cystein entfernt wurde, musste der ganze Versuch nochmals mit einem zweiten mutagenen Primer durchgeführt werden. Der aus der ersten Mutagenese erhaltene Vektor dient nun als Templat.

Am Ende wurden folgende Mutanten erhalten:

Name	Mutation
11S27P	11 (Cys gegen Ser), (CGU gegen UCA)
	27 (Cys gegen Pro), (CGU gegen CCG)
11T27T	11 (Cys gegen Thr), (CGU gegen ACC)
	27 (Cys gegen Thr), (CGU gegen ACT)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

Name	Mutation
11V27L	9 (Pro gegen Pro), (CCC gegen CCT) 11 (Cys gegen Val), (CGU gegen GTC) 27 (Cys gegen Leu), (CGU gegen TTA)

Tabelle 4.9: Erhaltene Mutanten nach der Methode von Nelson und Long

Die Anzahl der Klone nach der zweiten Runde war recht klein; für eine statistische Mutagenese nicht geeignet. Trotzdem wurden einige Klone sequenziert, um zu zeigen, daß das Verfahren funktioniert (Tabelle 4.9).

Probleme bei der Mutagenese am zweiten Loop ließen mich dann das Verfahren wechseln. Trotz verschiedener Versuche, das Fragment in pT136 zu klonieren, gelang dies nicht. Zudem war der zweistufige Prozess zur Mutagenese eines Loops nicht geeignet, die breite Diversität bis ins Produkt zu halten. Es ist nicht auszuschließen, daß die erste Mutation Einfluss auf die zweite hat. Und, was noch wichtiger ist, eine Gleichverteilung der Genotypen nach der ersten Mutation ist nicht gewährleistet, da die unterschiedlichen Varianten durch einen Transformations-, Vermehrungs- und Minipräparationszyklus gelaufen sind.

Die im nächsten Abschnitt beschriebene Versuchsanordnung umgeht diese Limitierungen, da die Mutationen zwar mit Hilfe von PCR umgesetzt werden, aber die eigentliche Veränderung des Genoms mittels Oligonukleotidsynthese erfolgt.

### 4.3.2 Mutagenese unter Verwendung der Oligonukleotidsynthese in Kombination mit PCR

#### Beschreibung

Als weiterer Schritt in der Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamis-tat diente hier beschriebener Versuchsaufbau. Beginnend mit der erneuten Analyse der in der Einleitung beschriebenen Genkassette, wurde folgende Strategie gewählt [53]. Wie in Abbildung 4.16 beschrieben, sollte der Bereich von einer

singulären Schnittstelle zur nächsten mittels Oligonukleotidsynthese abgedeckt werden.

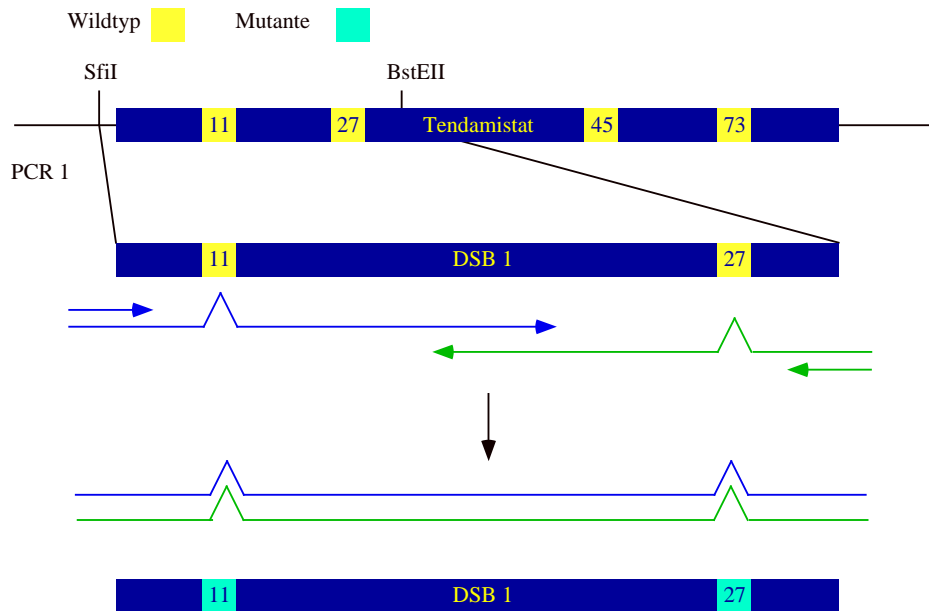


Abbildung 4.16: Beschreibung der Mutagenesemethode

Weil die beiden Schnittstellen aber 90 bzw. 150 Basen auseinander liegen, konnte dies nicht sinnvoll durch die Herstellung zweier komplementärer Oligonukleotide realisiert werden, da die Oligonukleotidsynthese bei langen Oligonukleotiden immer schlechter funktioniert. Wie schon oben (siehe Kapitel 4.2.1) beschrieben, ist aber auch eine Komplementarität mit Oligonukleotiden, die an mehreren Stellen undefiniert verändert sind, nahezu unmöglich.

Die Lösung ist die Konstruktion zweier Oligonukleotide, die am 3'-Ende komplementär sind. Diese lassen sich durch eine einfache PCR-Reaktion in einen Doppelstrang verwandeln.

Der Trick zur Einführung der Mutationen ist der Einbau nicht definierter Basen in die Oligonukleotide. Nicht definierte Basen bedeuten nicht eine neue Sorte von Nukleotiden, sondern, daß an diesen Stellen, wie unten beschrieben, zufällig eine Base eingebaut wird.

Die zu mutierenden Stellen liegen außerhalb des komplementären Bereichs. Dadurch werden in der PCR problemlos die zwei zueinander passenden Stränge

generiert.

Durch die Kombination von zwei Oligonukleotiden mit Sequenzdifferenzen zum Wildtyp erhält man in einer Reaktion eine Doppelmutante in Bezug auf die Cysteine. Zudem ist der Hintergrund an Wildtyp nicht hoch, da dieser wie alle Mutanten erst bei der PCR entsteht und nicht als Templat dient.

Auf Grund der unten beschriebenen Probleme mussten einzelne Oligonukleotide neu konstruiert werden. Hierbei wurde die zusätzliche Möglichkeit geschaffen, wie in Abbildung 4.17 gezeigt, beide Fragmente in der Art zu kombinieren, daß das gesamte Gen mittels dreier PCRs dargestellt werden kann.

Primer 1 und 2 dienen zur Amplifikation des durch Hybridisierung und Verlängerung erhaltenen Genabschnitts. Durch Anfügen von mehreren Basen am 5'-Ende der Primer wird eine Verlängerung des Genabschnitts erwirkt. Wie später beschrieben, ist die Synthese von Oligonukleotiden mit mehr als 50 Basen nicht ganz einfach. Ebenso stößt die Aufreinigung an Grenzen. Daher ist es effektiver, die Primer zu verlängern, als noch längere Oligonukleotide zu konstruieren.

### Durchführung

In Tabelle 4.10 sind die eingesetzten Primer und Oligonukleotide aufgelistet.

Primer	Sequenz
SfiI-Primer	CCCTGTCTCC CCTCGC
BsteII-Primer	CGTGAAGGTC GTCTACG
SfiI-11X	CCCTGTCTCC CCTCGCGGCC GGGCCGGCCT CCGCCGACAC GACCGTCTCC GAGCCCGCAC CCTCCTGCGT GACGCTCTAC CAGAGCTGGC GG
BsteII-27X	CGCTCTACCA GAGCTGGCGG TACTCACAGG CCGACAACGG CTGTGCCGAG ACGGTGACCG TGAAGGTCGT CTACG
AccI-Primer	CGGTGACCGT GAAGGT
SacII-Primer	ACGACGCGGG CTGCGC

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
AccI-45X	CGGTGACCGT GAAGGTCGTC TACGAGGACG
	ACACCGAAGG CCTGTGCTAC GCCGTCGCAC
	CGGGCCAGAT CACCACCGTC GGCGACGGCT
	ACATCGGCTC GCACGG
SacII-73X	GACGCGGGCT GCGCCGCGGA CGCCGAGGAG
	CAGCGCCGCG TGAAGGCGGC TGTGGGCTAA
	AGGCAGCGAG CGAGGTAGCG GGCGTGGCCG
	TGCGAGCCG

Tabelle 4.10: Eingesetzte Primer

Die Zusammenstellung der PCR sowie die Zyklen sind in Tabelle 4.11 bzw. Tabelle 4.12 dargestellt.

<b>Lösung</b>	<b>Menge</b>	
	<b>DSB 1</b>	<b>DSB 2</b>
SfiI-Primer	5 $\mu$ l	-
BstEII-Primer	5 $\mu$ l	-
SfiI-11X	5 $\mu$ l	-
BstEII-27X	5 $\mu$ l	-
AccI-Primer	-	5 $\mu$ l
SacII-Primer	-	5 $\mu$ l
AccI-45X	-	5 $\mu$ l
SacII-73X	-	5 $\mu$ l
Vent-Polymerase	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
ThermoPol-Puffer	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

Lösung	Menge	
	DSB 1	DSB 2
dNTP	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
DMSO	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
A. dest.	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.11: Zusammensetzung der PCR

Vorgang	Temperatur	Dauer
Vordenaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	1min
Annealing	65°C	1min
Elongation	72°C	1min
Nachlauf	72°C	10min

Tabelle 4.12: PCR-Zyklus

Das Schema (Abbildung 4.16) mit dem detaillierten Ablauf zeigt deutlich die Vorgehensweise. Die beiden Oligonukleotide werden bei einer Temperatur von 65°C aneinander gelagert. Anschließend wird durch den in Tabelle 4.12 gezeigten Zyklus eine Verlängerung der Oligonukleotide erreicht, die zu einem DNA-Doppelstrang führt. Durch die Zugabe der Primer nach dem fünften Zyklus erfolgt die Vervielfältigung.

Die Proben wurden mittels Ethanol gefällt und danach mit den Enzymen SfiI und BstEII bzw. AccI und SacII verdaut (Tabelle 4.13).



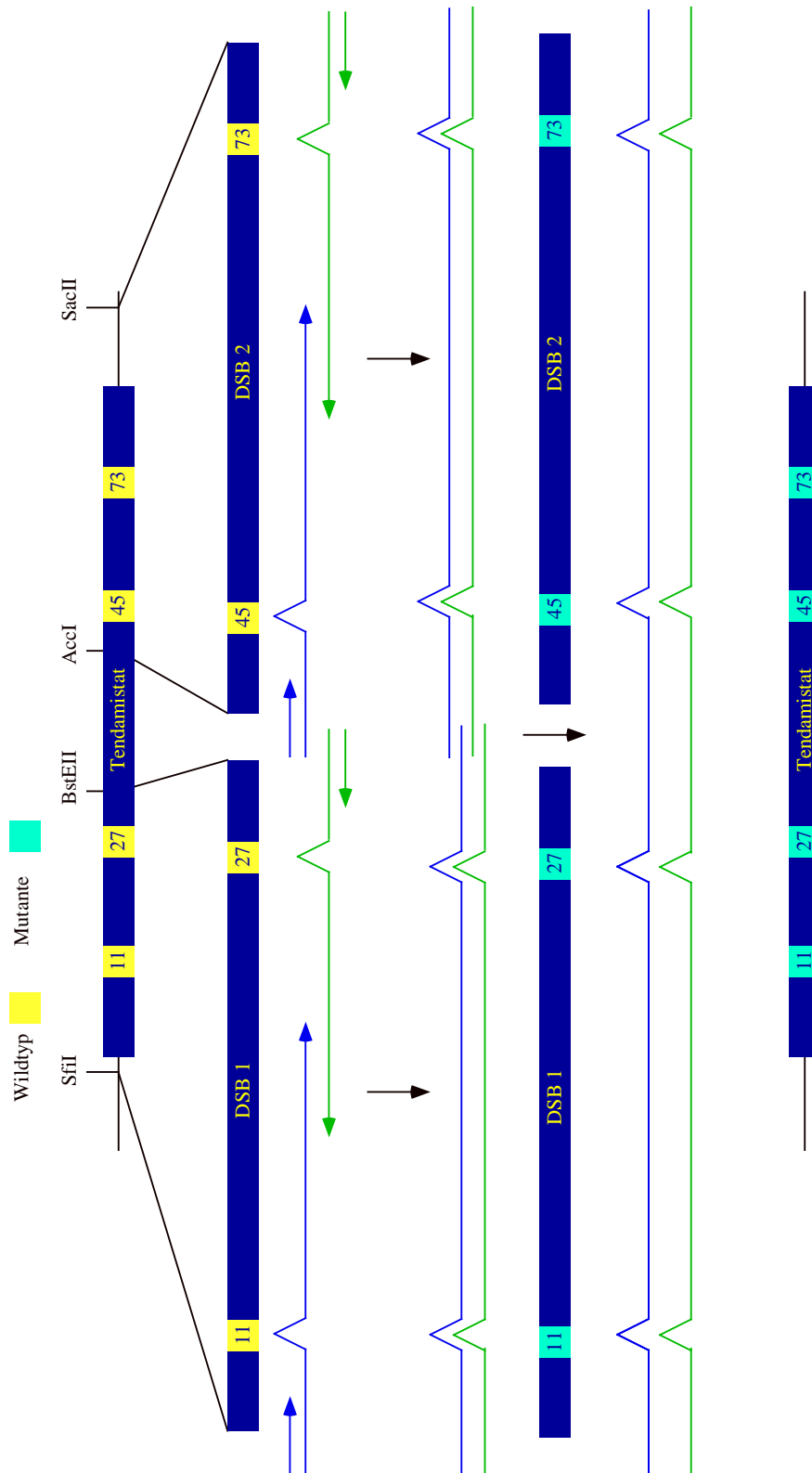


Abbildung 4.17: Kombination zweier PCRs zum Tandamistatgen

Lösung	Menge	
	PCR_11X27X	PCR_45X73X
SfiI (50°C)	1 $\mu$ l (10u)	-
BstEII (60°C)	1 $\mu$ l (10u)	-
AccI (37°C)	-	1 $\mu$ l (10u)
SacII (37°C)	-	1 $\mu$ l (10u)
Puffer (10x)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
NaCl (1M) (BstEII)	5 $\mu$ l	-
BSA (100x)	0,5 $\mu$ l	-
A. dest.	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

Tabelle 4.13: Restriktion der PCR-Probe

Ein entsprechend geöffneter Vektor pT136 diente als Basis zur Einklonierung. Trotz verschiedener Fällungs- und Aufreinigungsmethoden, Ligationsansätze, Dephosphorilierung und neuer Enzymchargen gelang es nicht, eine größere Menge an Klonen zu erhalten.

Das Problem lag wohl, wie später erkannt, in dem Bereich Fällung und Restriktion. Gegen Ende der Arbeit wurde nur noch mit einem Extraktionskit für PCR-Fragmente gearbeitet. Die dort erhaltenen Proben verschmierten nicht mehr auf dem Gel. Restriktionen funktionierten aber hier auch nur begrenzt. Dies lag unter anderem auch an den Enzymen, die eingesetzt werden konnten.

Trotzdem konnten unten aufgelistete Mutanten erhalten werden. Diese stammen alle nur vom kleinen Loop, da beim großen (45-73) das verwendete Restriktionsenzym SacII nicht schnitt. Der Grund dafür ist bei dem Sequenzvergleich der Mutante pT136/11S27P mit der dokumentierten Version des pT136 erkennbar. Liest man in der unten dargestellten Sequenz (Tabelle 4.14) nicht nur bis zum Ende des Gens, wird der Fehler in der Sequenz deutlich. Das Vorhandensein von zusätzlichen Gs im Erkennungsbereich der Restriktionsendonuklease verhindert das Öffnen des Vektors an dieser Stelle. Früher bekannte Schwierigkeiten mit dieser Schnittstelle im Arbeitskreis wurden auf die Salzkonzentration bzw. die

Empfindlichkeit von SacII zurückgeführt.

Name	Mutation
pT136	GGCGTCCG CGG CGCAGCCCCGC
pT136/11S27P	GGCGTCCG <b>G</b> CGG <b>G</b> CGCAGCCCCGC

Tabelle 4.14: Sequenzvergleich pT136 und pT136/11S27P

Als Ausweg wurden zwei unterschiedliche Methoden verfolgt. Zum einen wurde eine erneute Suche nach Schnittstellen in HUSAR vorgenommen, die sich als erfolgreich erwies. Zum anderen wurde ein Primer konstruiert, der die EcoRI-Schnittstelle beinhaltet. Da diese aber weit entfernt (130 Basen) vom Ende des Tendamistatgens lag, wurde auf den nichtkodierenden Bereich dazwischen verzichtet.

Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

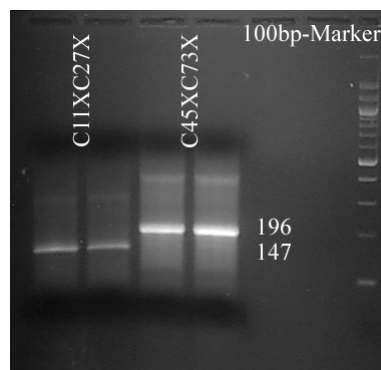


Abbildung 4.18: Ergebnis der PCR

Die Wiedergewinnung aus dem Agarosegel mit folgender Restriktion schloß sich an. Wie schon vorher waren die Banden nach der Restriktion leicht verschmiert. Die Klonierung in einen entsprechend geöffneten pT136 verlief ohne Erfolg. Die erhaltenen LB-Platten waren leer.

Probleme bei der Fällung der doch recht kurzen Fragmente konnten gezeigt werden (Abbildung 4.19).

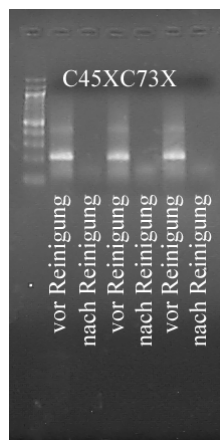


Abbildung 4.19: PCR nach Reinigung

Durch den Einsatz des Elutionskits von Machery und Nagel wurden die Ausbeuten an geschnittenem Fragment größer, allerdings ohne entscheidenden Einfluss auf die Anzahl der Kolonien.

Der Durchbruch gelang, nachdem ich eine weitere PCR anschloß. Die beiden PCR-Fragmente (Loop 1/Loop 2) ließen sich am komplementären 3'-Ende aneinander lagern und amplifizieren (Abbildung 4.17). Die daraus resultierende Bande wurde, wie schon vorher, verdaut und gereinigt. Einkloniert in pT136 ergaben sich ausreichend Kolonien zur Untersuchung. Drei davon wurden zur Sequenzierung gegeben und in den Expressionsvektor pAX5a einkloniert. Nach der Auswertung der Sequenzierergebnisse wurden die Mutanten exprimiert.

In Tabelle 4.15 sind die Sequenzierergebnisse zusammengefasst.

Name	Mutation
11H27N45S73D	11 (Cys gegen His), (CGU gegen CAC)
	27 (Cys gegen Asn), (CGU gegen AAC)
	45 (Cys gegen Ser), (CGU gegen AGT)
	73 (Cys gegen Asp), (CGU gegen GAC)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung

Name	Mutation
11H27I45R73T	11 (Cys gegen His), (CGU gegen CAC) 27 (Cys gegen Ile), (CGU gegen ATT) 45 (Cys gegen Arg), (CGU gegen AGG) 73 (Cys gegen Thr), (CGU gegen ACG)

Tabelle 4.15: Sequenziererergebnisse, Zusammenfassung

Beide Mutanten zeigen Veränderungen an allen vier Cysteinpositionen. Wenn man die Sequenz betrachtet, fällt auf, daß die Veränderungen über alle drei Positionen eines Triplets verteilt sind. Ein Hinweis für den erfolgten zufälligen Einbau der Basen bei der Oligonukleotidsynthese.

Vorher war zwar mittels Sequenzierung eines PCR-Fragments gezeigt worden, daß die Variabilität zwar vorhanden sein sollte, aber als Beweis konnte dies nicht durchgehen, da dort ein Mittel über alle Basen gebildet wurde. Die Zusammensetzung, die zu dem Mittel führt, ist aber nicht erkennbar (Abbildung 4.20).

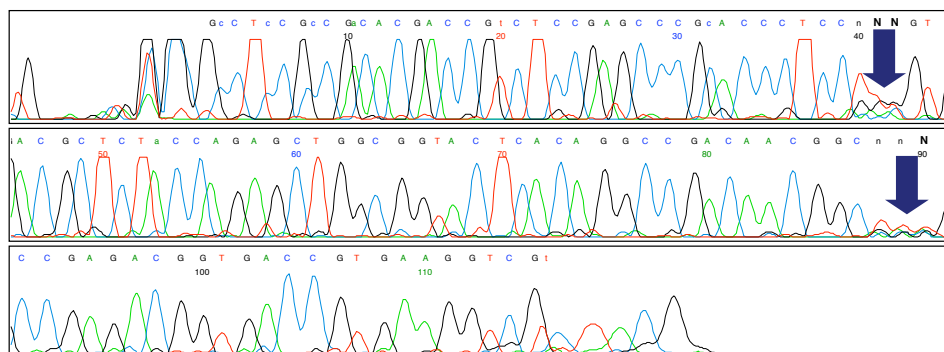


Abbildung 4.20: Sequenzierung einer PCR

### 4.3.3 Expression

Wie in Tabelle 4.15 gesehen, sind alle Mutanten nur im Bereich der Cysteine verändert. Daher wurden alle Varianten im pAX5a umklontiert, indem das Gen

mittels SpeI und EcoRI aus dem pT136-Varianten pT136/11X27X45X73X ausgeschnitten wurde. Anschließend Reinigung und Einklonierung in den entsprechend geöffneten pAX5a ergab die beiden Vektoren pAX5a/11H27I45R73T und pAX5a/11H27N45S73D.

Nach der Vervielfältigung in *Escherichia coli* wurden diese Vektoren in *Streptomyces lividans* transformiert. Zur Selektion wurde Thiostrepton verwendet. Von den resultierenden Kolonien wurden Teile abgenommen und im Minimalmedium herangezogen. Täglich wurde 1ml Kulturüberstand abgenommen, um den Fortschritt der Expression zu verfolgen.

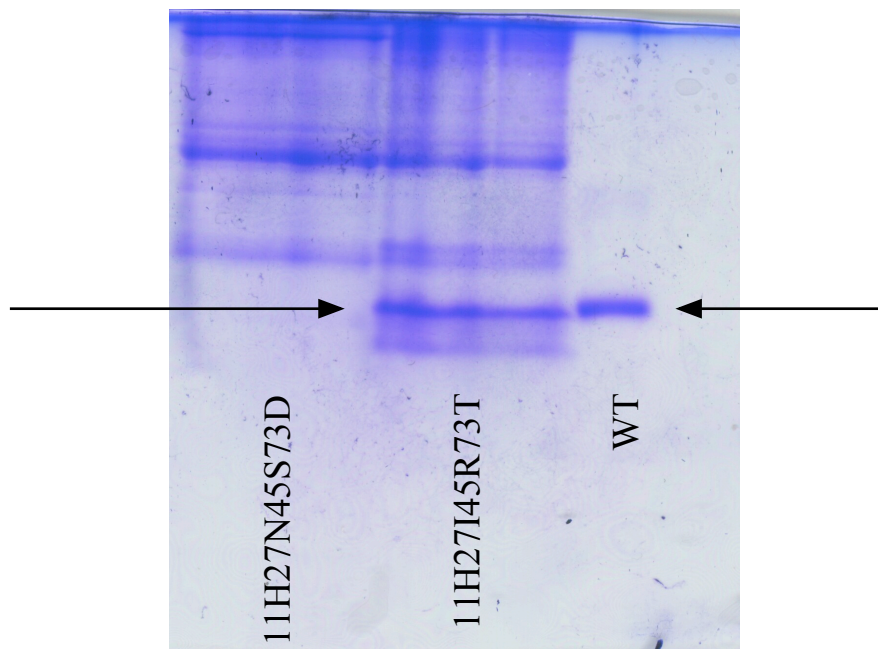


Abbildung 4.21: Expression von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat

Es zeigte sich, daß die Variante 11H27I45R73T auf der Höhe von Tendamistat Protein exprimierte (Abbildung 4.21). Die Mutante bildete also stabiles Tendamistat ohne Disulfidbrücken. Es ist ausreichend stabil, um vor Proteasen geschützt zu sein.

# Kapitel 5

## Diskussion

Das Ziel der Arbeit ist die Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat. Die zwei konsekutiv verbrückten Disulfidbrücke haben einen großen Anteil an der Stabilität des Proteins. Der Austausch gegen andere Aminosäuren, wie Alanin, Lysin, Threonin und Serin wurde in unserer Gruppe bereits gezeigt. Hier wurden für jede Disulfidbrücke stabile Mutanten erhalten. Eine Variante ohne Disulfidbrücke konnte aber nicht dargestellt werden, da die Stabilitätsverluste beim Entfernen einer Disulfidbrücke zu hoch waren.

Die 400 Proteine, die durch den Austausch der Cysteine einer Disulfidbrücke durch andere Aminosäuren, möglich sind, kann man nicht sinnvoll mit gerichteter Mutagenese untersuchen. Da schon in vorherigen Arbeiten die Aminosäuren ausgesucht wurden, die am aussichtsreichsten erschienen, ist der Einsatz eines zufälligen Verfahrens geeignet. Neben der Bedeutung für Faltungsstudien kann der zufällige Austausch der Aminosäuren auch mit interessanten Kombinationen an Aminosäurepaaren als Disulfidbrücken-Ersatz aufwarten. Kombinationen, die man nicht erwartet, können einen tieferen Einblick in die Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins geben.

Der Einsatz von Oligonukleotiden als „Mutagene“ beruht nicht nur auf dem in diesem Bereich vorhandenen Wissen, sondern vor allem auf der Möglichkeit, gezielt Bereiche zu verändern. In Kombination mit PCR ist diese Methode ein hervorragendes Werkzeug, Mutationen einzuführen. Andere Methoden, wie Chemikalien oder UV, lassen sich nicht auf bestimmte Bereich fokussieren, während

sich obige Kombination aus Oligonukleotiden und PCR auch für eine ungerichtete Mutagenese einsetzen lässt.

In dieser Arbeit wurden die Oligonukleotide zur Mutagenese und die PCR zum Vervollständigen von DNA sowie zu deren Vervielfältigung eingesetzt. Der Ort der Mutagenese wird sozusagen bei der Herstellung der Oligonukleotide bestimmt. Durch Änderungen in der Sequenz an geeigneter Stelle, werden später bei der PCR die Mutationen eingeführt. Die Sequenzänderungen erfolgten aber nicht durch den Austausch einer Base gegen eine andere. Die entsprechenden Basen wurden nicht definiert. An dieser Stelle der Oligonukleotidsynthese wurde ein Basengemisch eingesetzt. Es ist auch möglich, die Basen über den Synthesizer zu mischen; dieses Verfahren wurde aber verworfen, weil die Mischung nicht gleich verteilt an Nukleotiden ist.

Etablierte Methoden des Arbeitskreises erwiesen sich als nicht einsetzbar. Die Methoden können nur schwer auf die eigentlichen Anforderungen angepasst werden. Die Methode nach Nelson und Long ist durchaus geeignet, statistische Mutagenese zu betreiben. Allerdings gilt dies nur, wenn ein zusammenhängender Bereich der DNA verändert wird. Sind es, wie in meinem Fall, mehrere Bereiche, die auch noch verteilt über das Genom sind, versagt die Methode. Es müssen mehrere Mutagenesezyklen durchgeführt werden, um zum Ziel zu kommen. Das hat einen gravierenden Einfluss auf die Verteilung, die nicht mehr als zufällig zu definieren ist. Um dies zu gewährleisten, ist es erforderlich die Mutationen gleichzeitig an beiden Stellen einzuführen. Das ließe sich zwar über einen langen mutagenen Primer realisieren, was aber meist zu zusätzlichen Veränderungen führt, die bei einer gerichteten Mutagenese durch die Auswahl mehrerer Klone in den Griff zu bekommen ist, bei einer statistischen Mutagenese aber zu Ausbeuteverlusten führt.

Die Lösung war die Generierung zweier langer Oligonukleotide, von denen jedes die Mutation für ein Triplettrug. Durch Hybridisierung am komplementären 3'-Ende konnte das Konstrukt als Target für eine PCR eingesetzt werden. Durch geeignete Primerwahl war es möglich, die Länge der mutagenen Oligonukleotide im Rahmen zu halten; zu lange Oligonukleotide lassen sich nur schwer oder unter hohen Ausbeuteverlusten reinigen. Durch einen 5'-Überhang an den Primern konnte das Konstrukt jedoch verlängert werden.



Auf Grund einer Mutation im Vektor pT136 gab es aber Probleme mit dem obigen Verfahren. Die ausgewählte Schnittstelle war nicht mehr vorhanden. Dies führte zum Scheitern der Klonierung des Bereiches des zweiten Loops. Zusätzliche Schwierigkeiten bei der Rückgewinnung der PCR-Fragmente aus dem Agarsegel, ließen das Verfahren als nicht geeignet erscheinen. Durch Änderung des Reinigungsverfahrens sowie die Entdeckung der Fehlsequenz, der Neukonstruktion entsprechender Oligonukleotide und das Einführen einer dritten PCR es führte zum Ziel. Die dritte PCR kombinierte die PCR-Fragmente von Loop 1 und 2. Sie bildete somit die Grundlage für 4-fach-Mutanten.

Über diesen Weg ließen sich zwei Mutanten, die keine Disulfidbrücke mehr besaßen, gewinnen. Drei weitere Mutanten waren zuvor an der DSB 1 erhalten worden. Alle 4-fach Mutanten zeigten nach dem Umklonieren in pAX5a und der Transformation in *Streptomyces lividans* eine Proteinexpression, die auf Höhe des Tendamistats war. Somit war festzuhalten, daß die Proteinvarianten exprimiert werden und stabil sind. Ebenso zeigte sich, daß das Mutageneseverfahren erfolgreich umgesetzt werden konnte. Durch die Erreichung des Ziels, wurde eine der aufgeführten Strategien nicht umgesetzt. Diese von mir in der Hinterhand gehaltene Vorgehensweise hätte den Aufbau einer Disulfidbrücken-freien Mutante aus den vorhandenen Varianten bedeutet. Auf Grund der zu erwartenden Destabilität hätte eine ungerichtete Mutagenese im Anschluss erfolgen müssen. Dies ist mit ein Grund dafür, daß ich diese Strategie nicht bevorzugt habe. Durch die zusätzlichen Mutationen ist später die Beschreibung des Effekts schwieriger bis unmöglich.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Herstellung von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat erfolgreich war. Zudem konnte eine Mutagenesestrategie etabliert werden, die weitere Einblicke in die Struktur und die Faltung von Tendamistat verschaffen kann. Ohne die Disulfidbrücken sind Entfaltungs- und Faltungsexperimente einfacher durchzuführen. Die Zeiten für die Rückfaltung des Tendamistats erhöhen sich, so daß eine höhere zeitliche Auflösung der Faltungsvorgänge möglich sein dürfte.

Zusätzliche Untersuchungen, z.B. mit NMR, zeigen die Gemeinsamkeiten, sowie die Unterschiede in der Struktur bzw. der räumlichen Anordnung auf. Ebenso

lässt sich die Zugänglichkeit für Wasser untersuchen. Zudem lassen sich möglicherweise auch Aussagen darüber treffen, ob und unter welchen Umständen Disulfidbrücken essentiell für ein Protein sind. Ist eine Disulfidbrücke strukturbildend, oder wirkt sie nur stabilisierend.

Mit Hilfe der Mutagenesestrategie ist es zukünftig möglich, einzelne Bereiche entsprechend der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, was zu einem besseren Verständnis des Tendamistat, sowie Proteinen im Allgemeinen führt.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Durch Substitution der vier Cysteine des  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors Tendamistat wurden Disulfidmutanten erzeugt. Zur Herstellung wurde im Rahmen dieser Arbeit die statistische Mutagenese angewandt. Die beiden Mutanten 11H27I45R73T und 11H27N45S73D wurden mit einem kombinierten Verfahren aus Oligonukleotidsynthese und PCR erzeugt. Dieses hat als Grundlage die Genkassette, die in pT136 und pAX5a enthalten ist. Durch die gleichzeitige Veränderung beider Cysteine einer Disulfidbrücke sind Probleme mit der Einschränkung in der Variantenvielfalt nicht vorhanden, sowie mehrfache Mutationszyklen nicht notwendig.

Die 4-fach-Mutanten wurden in *Streptomyces lividans* kloniert und exprimiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß stabiles Tendamistat erhalten wird. Damit wurde Disulfidbrücken-freies Tendamistat erhalten, ohne zusätzliche Mutationen einführen zu müssen.

# Literaturverzeichnis

- [1] A. Arase, T. Yomo, I. Urabe, Y. Hata, Y. Katsube, and H. Okada. Stabilisation of xylanase by random mutagenesis. *FEBS Lett.*, 316(2):123–127, 1993.
- [2] H. Aschauer, I. Vértesy, and G. Braunitzer. Die Sequenz des  $\alpha$ -Amylase-inhibitors Hoe-467 A aus *Streptomyces tendae*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.*, 362:465–467, 1981.
- [3] H. Aygün. *Darstellung neuer Faltungsmutanten des  $\alpha$ -Amylaseinhibitors Hoe-467 A aus Streptomyces tendae*. PhD thesis, Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1995.
- [4] J. Balbach, S. Seip, H. Kessler, M. Scharf, N. Kashani-Poor, and J.W. Engels. Structure and Dynamic Properties of the Single Disulfide-Deficient  $\alpha$ -Amylase Inhibitor [C45A/C73A]Tendamistat: An NMR Study. *PROTEINS*, 33:285–294, 1998.
- [5] S.L. Berger. Rescue of Failed Polymerase Chain Reaction Catalysed by Vent or Deep Vent DNA Polymerase with 10Anal. *Biochem.*, 222:290–293, 1994.
- [6] V. Bernan, D. Filipula, W. Herber, M. Bibb, and E. Katz. The nucleotide sequence of the thyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterisation of the gene product. *Gene*, 37:101–110, 1985.
- [7] M. Bibb, G.R. Janssen, and J.M. Ward. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin-resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 38:215–226, 1985.
- [8] T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko, and J. Parker. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc., 7 Edition, 1994.

- [9] I.N. Bronstein and K.A. Semendjajew. *Taschenbuch der Mathematik*. BSB B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig und Verlag Nauka, Moskau, 22 edition, 1985.
- [10] K.F. Chater. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbiol. Development (eds. Losick und Shapiro)*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pages 89–116, 1984.
- [11] A. Chrambach and D.L. Wheeler. Capabilities and potentialities of transverse pore gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 15:1021–1027, 1994.
- [12] T.E. Creighton. Interactions between cysteine residues as probes of protein conformation: the disulfid bond between Cys-14 and Cys-388 of the pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 96:767–776, 1975.
- [13] T.E. Creighton. Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 33:231–297, 1978.
- [14] T.E. Creighton. Accessibilities and reactivities of cysteine thiols during folding and unfolding of reduced bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 151:211–213, 1981.
- [15] T.E. Creighton. Disulfid Bonds and Protein Stability. *BioEssays*, 8:57–63, 1988.
- [16] T.E. Creighton. *Proteins, structure and molecular properties*. W. H. Freeman and Company, 2nd edition, 1993.
- [17] T.E. Creighton and D.P. Goldenberg. Kinetic role of a meta-stable native-like two-disulfide species in the folding transition of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.*, 179:497–526, 1984.
- [18] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, 5:271–289, 1956.

- [19] J.W. Engels, S. Haas-Lauterbach, M. Scharf, B. Sprunkel, M. Neeb, and K.-P. Koller. High yield fermentation and purification of Tendamistat disulphide analogues secreted by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38:719–727, 1993.
- [20] J.W. Engels and K.-P. Koller. *Gene expression and secretion of eucaryotic foreign proteins in Streptomyces*. Transgenesis (ed. Murray J.A.H.) John Wiley & Cons, England, 1992.
- [21] S.H. Faß. *Proteinsekretion in Streptomyces am Beispiel des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors Tendamistat*. PhD thesis, Dissertation im Fachbereich Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1994.
- [22] S.H. Faß and J.W. Engels. Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. *J. Biol. Chem.*, 271:15244–15252, 1996.
- [23] K.A. Ferguson. Starch-Gel Electrophoresis-Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides. *Metabolism*, 13(10):985–1002, 1964.
- [24] P.T. Flory. Theory of elastic mechanisms in fibrous proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78:5822–5835, 1956.
- [25] S. Haas-Lauterbach. *Mutationen am Tendamistat und Sekretionsstudien der Tendamistat-Derivate in Streptomyces lividans*. PhD thesis, Dissertation im Fachbereich Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1992.
- [26] R. Higuchi, B. Krummel, and R. Saiki. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.*, 16:7351–7367, 1988.
- [27] H. Hoffmann. *Untersuchungen zur heterologen Genexpression in Streptomyces lividans*. PhD thesis, Dissertation im Fachbereich Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1992.

- [28] D.A. Hopwood, M.J. Bibb, K.F. Chater, G.R. Janssen, F. Malpartida, and C.P. Smith. Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1986.
- [29] D.A. Hopwood, M.J. Bibb, K.F. Chater, and T. Kieser. Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. *Methods Enzymol.*, 153:116–165, 1987.
- [30] D.A. Hopwood, M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiat, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. *Genetic manipulations of Streptomyces - A laboratory manual*. John Innes Foundation, Norwich, 1985.
- [31] J. Houk, R. Singh, and G.M. Whitesides. Measurement of thiol-disulfide interchange reactions and thiol  $pK_a$  values. *Methods Enzymol.*, 143:129–140, 1987.
- [32] M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. *PCR protocols, a guide to methods and application*. Academic Press, 1990.
- [33] A.D. Kline, W. Braun, and K. Wüthrich. Studies by  $^1\text{H-NMR}$  and distance geometry of the solution conformation of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.*, 189:377–382, 1986.
- [34] A.D. Kline and K. Wüthrich. Complete sequence-specific  $^1\text{H-NMR}$  assignments for the  $\alpha$ -amylase polypeptide inhibitor tendamistat from *Streptomyces tendae*. *J. Mol. Biol.*, 192:869–890, 1986.
- [35] K.-P. Koller, J.W. Engels, and E. Uhlmann. Gene amplification and overproduction of the  $\alpha$ -amylase inhibitor (Hoe-467 A, tendamistat) in *Streptomyces tendae*. In *Proceedings of the Third European Congress on Biotechnology, Vol. III*, pages 273–278. European Federation of Biotechnology, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- [36] K.-P. Koller, G. Ries, K. Sauber, E. Uhlmann, and H. Wallmeier. Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendamistat and proinsulin. *Biotechnology*, 7:1055–1059, 1989.

- [37] K.-P. Koller, G. Ries, K. Sauber, E. Uhlmann, and H. Wallmeier. The tendamistat expression-secretion system: synthesis of proinsulin fusion proteins with *Streptomyces lividans*. *Genetics and Product Formation in Streptomyces*, pages 227–233, 1991.
- [38] K.-P. Koller, G. Rieß, K. Sauber, E. Uhlmann, and H. Wallmeier. Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of Tendamistat and Proinsulin. *Biotechnology*, 7:1055–1059, 1989.
- [39] F.C. Lawyer, S. Stoffel, K. Saiki, K. Myambo, R. Drummond, and D.H. Gelfand. Isolation, characterization and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.*, 264:6427–6437, 1989.
- [40] C.M. Long, M.-J. Virolle, S.Y. Chang, S. Chang, and M.J. Bibb. The  $\alpha$ -amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequencs, expression motifs and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases. *J. Bacteriol.*, 169:5745–5754, 1987.
- [41] J. Lunney, A. Chrambach, and D. Rodbard. Factors Affecting Resolution, Band Width, Number of Theoretical Plates, and Apparent Diffusion Coefficients in Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 40:158–173, 1971.
- [42] B.H. Meyer, F.O. Muller, B.K. Clur, and H.G. Grigoleit. Effects of tendamistat (an  $\alpha$ -amylase inactivator) on starch metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 16:145–148, 1983.
- [43] B.H. Meyer, F.O. Muller, H.G. Grigoleit, and B.K. Clur. Inhibition of starch absorption by tendamistat (an  $\alpha$ -amylase inactivator). *S. Afr. Med. J.*, 64:284–285, 1983.
- [44] K.B. Mullis and F.A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335–350, 1987.



- [45] R.M. Nelson and G.L. Long. A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 180:147–151, 1989.
- [46] N.C. Pace, R. Gerald, J.A. Grimmsley, A. Thomson, and B.J. Barnett. Conformational Stability and Activity of Ribonuclease T1 with Zero, One, two Intact Disulfide Bonds. *Mol. Biol. Chem.*, 263:1820–1825, 1988.
- [47] J.W. Pflugrath, W. Wiegand, and R. Huber. Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the  $\alpha$ -amylase inhibitor Hoe-467 A. *J. Mol. Biol.*, 189:383–386, 1986.
- [48] D.C. Poland and H.A. Scheraga. Statistical mechanics of noncovalent bonds in polyamino acids. *Biopolymers*, 3:379–399, 1965.
- [49] K. Proba, A. Wörn, A. Honegger, and A. Plückthun. Antibody scFv Fragments Without Disulfide Bonds Made by Molecular Evolution. *J. Mol. Biol.*, 275:245–253, 1998.
- [50] D. Pulido and A. Jiménez. Optimization of gene expression in *S. lividans* by a transcription terminator. *Nucl. Acids Res.*, 15:4227–4270, 1987.
- [51] W. Qiwen, A. Kline, and K. Wüthrich. Amide proton exchange in the  $\alpha$ -amylase polypeptide inhibitor tendamistat studies by two-dimensional  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 26:6488–6493, 1987.
- [52] H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler. *Genetic fundamentals and genetic engineering*, volume 2. VCH, 1993.
- [53] J.F. Reidhaar-Olson, J. Bowie, R.M. Beyer, J.C. Hu, K.L. Knight, W.A. Lim, M.C. Mossing, D.A. Parsell, K.R. Shoemaker, and R.T. Sauer. Random Mutagenesis of Protein Sequences Using Oligonucleotide Cassettes. *Methods in Enzymology*, 208:564–586, 1991.
- [54] D. Rodbard and A. Chrambach. Estimation of Molecular Radius, Free Mobility, and Valence Using Polyacrylamid Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 40:95–134, 1971.

- [55] D. Rodbard, G. Kapadia, and A. Chrambach. Pore Gradient Electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 40:135–157, 1971.
- [56] U. Roth, G. Schönfeld, B. Schröder, and A. Schrattenholz. Membrane Protein Subunit Fractionation by Means of Inverse Pore Gradient Elution Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 233:67–70, 1996.
- [57] M. Scharf. *Disulfid-analoge Tendamistat-Derivate: Darstellung, Aufreinigung und Charakterisierung*. PhD thesis, Dissertation im Fachbereich Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1992.
- [58] J.A. Schellmann. The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim*, 29:230–259, 1985.
- [59] H. Schwarz, H.-J. Hinz, A. Mehlich, H. Tschesche, and H.R. Wenzel. Stability studies in derivatives of the bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 26:3544–3551, 1987.
- [60] R. Steudel. Properties of sulfur-sulfur bonds. *Angew. Chem. Internat. Ed.*, 14:655–664, 1975.
- [61] L. Vértesy, V. Oeding, R. Bender, K. Zepf, and G. Neesemann. Tendamistat (HOE 467 A), a tight-binding  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Streptomyces tendae* 4158. *Eur. J. Biochem.*, 141:505–512, 1984.
- [62] M.-J. Virolle, M.C. Long, S. Chang, and M.J. Bibb. Cloning characterisation and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*. *Gene*, 74:321–334, 1988.
- [63] G. Wiegand, O. Epp, and R. Huber. The crystal structure of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with the microbial inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.*, 247:99–110, 1995.
- [64] J.M. Wilson, R.J. Bayer, and D.J. Hupe. Structure-reactivity correlations for the thiol-disulfide interchange reaction. *J. Amer. Chem. Soc.*, 99:7922–7926, 1977.

- [65] S. Wojczewski. *Heterologe Genexpression in Streptomyces lividans*. PhD thesis, Dissertation im Fachbereich Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, 1999.
- [66] H. Xu, E.I. Petersen, S.B. Petersen, and M.R. El-Gewely. Random Mutagenesis Libraries: Optimization and Simplification by PCR. *BioTechniques*, 27(6):1102–1108, 1999.
- [67] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing. Improved M13 phage cloning vektors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vektors. *Gene*, 33:103–119, 1985.
- [68] L.-J. Zhao, Q.X. Zhang, and R. Padmanabhan. Polymerase chain reaction-based point mutagenesis protocol. *Methods Enzymol.*, 217:218–227, 1993.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleich der Mutagenesemethoden . . . . .	4
1.2	Ablauf einer Standard-PCR . . . . .	7
1.3	Darstellung von Tendamistat [47] . . . . .	13
1.4	Kalorimetrische Messungen von M. Scharf [57] . . . . .	18
1.5	CD-Messungen von M. Scharf [57] . . . . .	19
1.6	Lebenszyklus von Streptomyceten . . . . .	22
1.7	Kassette zur Mutagenese [27] . . . . .	24
1.8	Plasmid pT136 . . . . .	27
1.9	Plasmid pAX5a . . . . .	28
4.1	Transverses Gel . . . . .	73
4.2	Gellauf . . . . .	73
4.3	Transverses Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten (Harnstoff-Gradient)	74
4.4	Transverses Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten (% T-Gradient) . .	74
4.5	Isokratisches Gel mit Disulfidbrücken-Mutanten . . . . .	75
4.6	Optimaler Konzentrationsbereich . . . . .	76
4.7	Aufbau eines Gradientenmischers . . . . .	78
4.8	Exponentielles Gradientengel . . . . .	79
4.9	Exponentielles inverses Gradientengel (ungeeignet) . . . . .	80
4.10	Exponentielles inverses Gradientengel (geeignet) . . . . .	80
4.11	Schematische Darstellung der Strategie 1 . . . . .	82
4.12	Schematische Darstellung der Strategie 2 . . . . .	83
4.13	Schematische Darstellung der Strategie 3 . . . . .	84
4.14	Mutagenese nach Nelson und Long . . . . .	86

<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	118
4.15 Mutagenesemethode nach Higuchi[26] . . . . .	87
4.16 Beschreibung der Mutagenesemethode . . . . .	94
4.17 Kombination zweier PCRs zum Tendamistatgen . . . . .	98
4.18 Ergebnis der PCR . . . . .	100
4.19 PCR nach Reinigung . . . . .	101
4.20 Sequenzierung einer PCR . . . . .	102
4.21 Expression von Disulfidbrücken-freiem Tendamistat . . . . .	103

# Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich verschiedener Mutagenesemethoden . . . . .	2
1.2	Effekt auf Basenänderungen . . . . .	4
1.3	Eigenschaften der Taq-Polymerase . . . . .	10
1.4	Eigenschaften der Vent-Polymerase . . . . .	11
1.5	Weitere thermostabile Polymerasen . . . . .	11
1.6	Strukturmerkmale des Tendamistats . . . . .	14
1.7	Inhibierung von $\alpha$ -Amylasen durch Tendamistat . . . . .	14
1.8	Vergleich der $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren . . . . .	17
3.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	33
3.2	Verwendete Geräte . . . . .	35
3.3	Verwendete Enzyme . . . . .	35
3.4	Verwendete Bakterien . . . . .	36
3.5	Verwendete Plasmide . . . . .	36
3.6	Verwendete DNA-Marker . . . . .	37
3.7	Verwendete Protein-Marker . . . . .	37
3.8	Zusammensetzung einer Standard-PCR . . . . .	62
3.9	Zusammensetzung eines Nativ-Gels . . . . .	67
3.10	Zusammensetzung Schägger-Jagow-Gel . . . . .	70
4.1	Eingesetzte Primer . . . . .	88
4.2	PCR-Mischung . . . . .	88
4.3	PCR-Zyklus . . . . .	89
4.4	PCR-Mischung II . . . . .	90
4.5	PCR-Zyklus II . . . . .	90

<i>TABELLENVERZEICHNIS</i>	120
4.6 PCR-Mischung III . . . . .	91
4.7 PCR-Zyklus III . . . . .	91
4.8 Restriktionsansatz . . . . .	92
4.9 Erhaltene Mutanten nach der Methode von Nelson und Long . . .	93
4.10 Eingesetzte Primer . . . . .	96
4.11 Zusammensetzung der PCR . . . . .	97
4.12 PCR-Zyklus . . . . .	97
4.13 Restriktion der PCR-Probe . . . . .	99
4.14 Sequenzvergleich pT136 und pT136/11S27P . . . . .	100
4.15 Sequenziererergebnisse, Zusammenfassung . . . . .	102

---

---

### **Persönliche Daten**

---

Holger Steinlechner

28.11.1968, Frankfurt am Main

Österreichisch

Verheiratet

---

---

### **Schul- und Berufsausbildung**

---

02/1995 - 03/2003      Universität Frankfurt am Main  
Promotion im Fach Chemie  
Prof. Dr. J.W. Engels

---

02/1995                  Universität Frankfurt am Main  
Diplom im Fach Chemie  
Prof. Dr. J.W. Engels

---

10/1988 - 02/1995      Universität Frankfurt am Main  
Studium im Fach Chemie

08/1979 - 05/1988      Helmholtzgymnasium Frankfurt am Main  
Abitur

08/1975 - 06/1979      Pestalozzigrundschule Frankfurt am Main

---

---

### **Berufserfahrung**

---

04/2001 -                  DREGIS GmbH  
Systemadministration

03/1996 - 12/2000      BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH  
Geschäftsführender Gesellschafter

04/1995 - 12/1999      Universität Frankfurt am Main  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Prof. Dr. J.W. Engels

---

---