

# Universität Babes Bolyai

## Cluj Napoca

Fakultät für Biologie-Geologie

Fachbereich Biologie und Chemie

---

Klonierung und Expression des Serin/Threonin kinase rezeptor assoziierten Proteins

STRAP

– Diplomarbeit –

Name Emerich Mihai Gazdag  
Adresse Emil-Figgestr.37  
44227 Dortmund  
Studiengang Biologie Chemie

Diese Seite ist den Personen gewidmet, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit zu schreiben bzw. mich dabei unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Roger S. Goody

Dr. Wulf Blankenfeldt,

Ion Cirstea,

Petra Herde,

von Max Planck Institut für Molekulare Physiologie Dortmund

sowie

Lector Dr. Ing. Monica Ioana Tosa

von Universität Babes Bolyai, Fachbereich Biochemie Cluj Napoca

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen und Begriffe .....	4
2	Zusammenfassung .....	6
3	Einleitung .....	8
4	Ziel der Arbeit .....	12
5	Material und Methoden .....	13
5.1	Materialien .....	13
5.2	Primer .....	14
5.2.1	Primer für STRAP (MAWD) .....	14
5.2.2	Primer für 2WD40 .....	14
5.3	Restriktionsenzyme .....	15
5.4	Plasmide .....	16
5.5	Lösungen, Puffer und Gele .....	17
5.6	Methoden .....	20
5.6.1	Sterilisation durch Hitze .....	20
5.6.2	Sterilisation durch Filtration .....	21
5.6.3	Aufbau der Konstrukte mit STRAP-Gen .....	21
5.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	21
5.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten .....	23
5.6.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	25
5.6.7	Aufbau der Konstrukte mit dem 2WD40-Gen .....	26
5.7	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	29
5.8	Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	30
5.9	Elektroporation .....	30
5.10	Chemotransformation (Heat-Shock) .....	30
5.11	Expression des pET30-STRAP in E. coli .....	31
5.12	Methoden zum Nachweis der Expression .....	31
5.12.1	Messung der OD .....	31
5.12.2	T <sub>0</sub> und Tx-Proben .....	32
5.13	Löslichkeitstest .....	32
5.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
5.15	Färbung der Proteine .....	34
5.16	Optimierung der Expression von pET30-STRAP durch Variation von Temperatur und Zelllinien .....	34
5.16.1	Expression in E. coli BL21-DE3-RIL Zellen bei 37°C .....	34
5.16.2	Expression in E. coli BL21-DE3 Zellen bei 20°C .....	34
5.16.3	Expression in E.coli BL21 Rosetta Zellen bei 20°C .....	35
5.17	Expression: .....	35
5.18	Chromatografische Methoden-Affinitätschromatografie .....	35
5.19	Reinigung von STRAP mittels Ni-NTA .....	37
5.20	Reinigung mittels Anionentauscherchromatografie .....	37
5.21	Rückfaltung von STRAP .....	38
6	Ergebnisse .....	40
6.1	Klonierung von STRAP und 2WD40 .....	40
6.1.1	PCR für die DNA-Templates STRAP und 2WD40 .....	40
6.1.2	Linearisierung der Plasmide .....	42

---

6.1.3	Kolonie-PCR STRAP und 2WD40 .....	44
6.1.4	STRAP-pET30 Konstrukte .....	46
6.2	Expression von STRAP mittels pET30a-STRAP Konstrukt.....	46
6.2.1	Testexpression in verschiedene Zelllinien .....	46
6.2.2	Wachstumskurve der Zellkultur E. Coli-Rosetta.....	48
6.2.3	Extraktion des STRAP Proteins aus der „inclusion bodies“ .....	49
6.2.4	Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie .....	50
6.2.5	Reinigung mittels Gelfiltration .....	51
7	Literaturverzeichnis .....	53

# 1 Abkürzungen und Begriffe

2WD40	Fragment mit zwei WD40-Untereinheiten des STRAPs
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bac-to-Bac	Baculovirus-Expressionssystem
Bp	Basenpaare
β-ME	β-Mercaptoethanol
CellFectin-Reagens	lipidartiger Stoff, der bei der Transformation des Plasmids in Insektenzellen verwendet wird.
DH10Bac-Zellen	kompetente E.coli Zelllinie für Bac-to-Bac Expressionssystem
E. coli	Escherichia coli
FBS	Fetal bovine serum
LB	Luria Berta Agar Medium
LB-Amp-Cam	LB Medium mit Ampicilin und Cloramphenicol
LB-Kan-Cam	LB Medium mit Kanamicin und Cloramphenicol
MAWD=STRAP	Mitogen Activated WD40-containing Protein
MAWDBP	MAWD-binding protein
NED	N-terminale extrazelluläre Domäne
Ni-NTA	Nickelsäule für die Affinitätschromatografie
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Datenbank für Proteinstrukturen ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a> )

---

pET30a	IPTG-induzierbarer Plasmid von Novagen, das als Vektor für bakterielle Expression benutzt wird
pFastBac	Plasmid, das als Vektor im Baculovirus-Expressions-System benutzt wird
pIF	Plasmid, das als Vektor benutzt wird (Bakterielle Expression)
SDS	Natriumdodecylsulphat
Sf9	Insektenzelllinie
STRAP	Serine/Threonine kinase receptor associated protein
TEMED N,N,N.,N.	Tetramethylethylendiamin
XL1-Blue	Bakterielle Zelllinie für Klonierungen
Miniprep	Plasmidextraktion aus 5ml bakterielle Zellkultur
Midiprep	Plasmidextraktion aus mehr als 5ml (bis 50ml) Zellkultur

## 2 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Klonierung und Expression des Gens des Serine/Threonine kinase receptor assoziierten Proteins (STRAP). Expressionsversuche wurden in prokaryotischen E. coli Zellen durchgeführt. Hierfür wurde das folgende Konstrukt verwendet: pET30a-STRAP. Für die Erstellung dieser Konstrukte wurde das STRAP-Gen und das 2WD40-Gen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und nach einer Restriktionsverdau in den pET30a-Vektor eingeführt. Die dazu benötigten Restriktionsschnittstellen wurden bei der Amplifikation eingeführt.

Nach der Transformation in XL1-Blue Zellen (E. coli) konnten die Plasmide mittels Mini- und dann Midiprep gewonnen und die Identität der Inserte durch Kolonie-PCR, Testverdau und Sequenzierung bestätigt werden. Die Expression wurde unter Variation von Inkubationstemperatur, Inkubationszeit und Zelllinien durchgeführt, wobei nur eine geringe Menge an löslichem Protein erhielt. Die Klonierungsarbeit lieferte jedoch die Basis für weitere Umklonierungen in anderen Vektoren.

Aus einer 3l E. coli-Kultur wurde das STRAP (pET30a) gewonnen. Es folgte die Aufreinigung des Proteins mittels IMAC und Gelfiltration. Das Protein war nicht unmittelbar in wässriger Lösung löslich, jedoch unter Verwendung von Harnstoff. Hierbei kam es zu einer Denaturierung des Proteins. Somit war eine Renaturierung erforderlich. Rückfaltungsexperimente zeigten ein geringer Prozentanteil des denaturierten Proteins rückgefaltet werden kann. Theoretisch, kann eine weitere Erhöhung der Ausbeute durch Wiederholung des Refolding-Experiments erreicht werden.

Die Durchführung weiterer Expressionsversuche in Insektenzellen mittels Bacto-Bac Expressionssystem wurde vorbereitet. Hierfür wurde das STRAP-Template mittels PCR amplifiziert, in den pFastBacHb-Vektor umkloniert und in XL1-Blue Zellen transformiert. Später konnte das Plasmid mittels Miniprep gewonnen werden. Das so gewonnene Plasmid wird „pFastBac-Recombinant-

DNA“ bezeichnet und wurde weiterhin in DH10Bac-Zellen transformiert. Dabei kommt es zur Vermehrung der genetisch veränderten Baculovirus in den Insektenzellen. Das Plasmid, die „recombinant-bacmid-DNA“ wurde erneut mittels Miniprep gewonnen. Die Insektenzellen wurden mithilfe des Cellfectin-Reagens mit dem recombinant-bacmid-DNA transfiziert. Dabei kommt es zur Vermehrung der genetisch veränderten Baculovirus in den Insektenzellen. Im weiteren werden Expressionsversuche und Teste durchgeführt.

### 3 Einleitung

Krebserkrankungen haben umfangreiche sozioökonomische Folgen in unserer Gesellschaft.

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in der Erforschung biologischer und biochemischer Hintergründe der Krebserkrankungen verzeichnet werden. Dies erlaubt immer mehr die Entwicklung neuer, effizienterer Therapiemöglichkeiten. So könnten Substanzen, die mit genetischen Regulationsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren interagieren, als mögliche Anti-Krebs-Mittel in Betracht gezogen werden.

Viele Proteine die an Signaltransduktionsprozess beteiligt sind, enthalten sogenannte „WD40“-Domänen. Die Erforschung dieser Proteine könnte wichtige Erkenntnisse bei der Bekämpfung von Krebs liefern.

In diesem Zusammenhang ist die Entdeckung des häufigen Vorkommens von so genannten WD40-Proteindomänen in allgemeinen Krebszellen ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Forschungen.

Die WD40-Proteindomänen bestehen aus 6 bis 8 Untereinheiten und bilden eine propellerartige Struktur. Auch STRAP besitzt solche WD40-Proteindomänen. Zwei von den WD40-Untereinheiten des STRAPs binden sich an ein Protein: das so genannte MAWD binding protein (MAWDBP). Diese 2 WD40-Untereinheiten des STRAPs werden in dieser Arbeit 2WD40 genannt.

In der aktuellen Forschung in diesem Bereich sind noch etliche Fragen zu klären: Kann STRAP mit den WD40-Proteindomänen in der Cancerogenese oder Unterhaltung der Zellproliferation eine Rolle spielen? Wie entfaltet dieses Protein seine Wirkung? Spielt es als Rezeptor oder als lokaler Mediator eine Rolle? Erlaubt die exakte Beschreibung der Proteinstruktur die Entwicklung verbesserter Anti-Krebs Mittel? In einem aktuellen Projekt am Max Planck Institut in Dortmund wird versucht, diese Fragen zu beantworten.

Es wird vermutet, dass STRAP eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu einer Proteinsuperfamilie aufweist: die TGF- $\beta$ -Superfamilie (Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ ).

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie besteht aus einer großen Anzahl von strukturell verwandten, sezernierten, dimeren Proteinen. Sie wirken entweder als Hormone oder allgemein als lokale Mediatoren für die Steuerung eines weiten Bereichs biologischer Funktionen bei allen Tieren.

Die Superfamilie umfasst die TGF- $\beta$  selbst, die Activine und Knochenmark (Knochenmark=bone narrow) -Morphogeneseproteine(BMPs), wobei die Letzteren die größte Familie innerhalb der Superfamilie darstellen.

Alle diese Proteine fungieren über enzymgekoppelte Rezeptoren, bei denen es sich um Transmembranproteine mit einer Serin/Threonin-Domäne auf der zytologischen Seite der Plasmamembran handelt. Man unterscheidet zwei, strukturell ähnliche Typen dieses enzymgekoppelten Rezeptors: Typ I und Typ II.

Jedes Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie bindet an eine charakteristische Kombination von Typ I- und Typ II-Rezeptoren. Typischerweise bindet der Ligand zuerst an einen Typ II-Rezeptorhomodimer und aktiviert dieses. Das aktivierte Typ II-Rezeptorhomodimer rekrutiert, phosphoryliert und aktiviert dann ein Typ I-Rezeptorhomodimer, wobei ein aktiver tetramerer Rezeptorkomplex entsteht.

Rezeptoren spielen eine große Rolle in der Signalübertragung und sind wichtige Targets für Medikamente. Um wirksamere und nebenwirkungsfreiere Medikamente zu entwickeln, sind jedoch genauere Kenntnisse über die Struktur und Funktion von Rezeptoren notwendig.

Enzymgekoppelte Rezeptoren sind eine zweite Hauptklasse von Zelloberflächen-Rezeptoren. Sie wurden anfangs anhand ihres Verhaltens bei Antworten auf extrazelluläre Signalproteine erkannt, die das Wachstum, die

Vermehrung, die Differenzierung oder das Überleben von Zellen von tierischen Geweben fördern.

Eine weitere Hauptklasse von Zelloberflächen-Rezeptoren sind die G-proteingekoppelten Rezeptoren (z.B. G Proteingekoppelte Rezeptoren).

Strukturell ist die  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins das WD40-Wiederholungs-Protein. Diese Kette bildet eine propellerartige Struktur mit 7 Blättern, die aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter besteht. Jede WD40-Sequenzwiederholung bildet die ersten drei Falten aus dem ersten Blatt und eine vierte antiparallele Falte auf dem nächsten Blatt. Die letzte C-terminale WD40-Sequenzwiederholung beendet die Blattstruktur der ersten WD40 Wiederholung, um so die „Ring-Propeller-Struktur“ zu schließen. Die Struktur der  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins ist in Bild 1 zu erkennen.

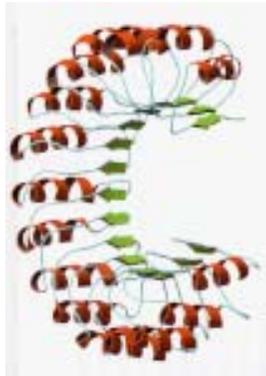


**Bild 1 Struktur eines WD40 Propellers**

Sowohl Pflanzen, als auch Tiere, verwenden Zelloberflächenrezeptoren im umfangreichen Maß. Während die meisten Zelloberflächenrezeptoren bei Tieren G-Protein gekoppelt sind, sind die meisten bisher in Pflanzen gefundenen Zelloberflächenrezeptoren enzymgekoppelt. Während bei Tieren die größte Klasse enzymgekoppelter Rezeptoren aus Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht, findet sich dieser Rezeptortyp ausgesprochen selten in Pflanzen.

Die Pflanzen scheinen sich auf die Transmembran-Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen zu stützen. Sie haben jedoch, wie die Rezeptoren in Tieren, eine

typische zytoplasmatische Domäne und eine typische extrazelluläre Domäne für die Ligandenbindung. Die häufigsten bisher identifizierten Typen haben eine Tandemanordnung extrazellulärer leucinreicher Wiederholungen und werden deshalb „Leucinreiche-Wiederholungs (repeats) -Proteine“ (LRR-Proteine) genannt. Die Struktur ist im Bild 2 dargestellt.



**Bild 2 Struktur von LRR-Serine/Threonin-Receptor-Kinase**

## 4 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil des in der Einleitung beschriebenen Projektes.

Ziel der Arbeit ist die Gewinnung des STRAP (MAWD) in möglichst reiner Form.

Um ausreichende Proteinmengen zu erhalten und somit die biochemische und biophysikalische Charakterisierung des STRAP zu ermöglichen, wurde das Protein in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen überexprimiert .

In dieser Arbeit wurde zunächst die Proteinexpression in prokaryotischen Zellen durchgeführt. Hierfür wurde das STRAP-Gen in T7-Promotor enthaltene pET-Vektoren kloniert und exprimiert. Anschließend wurde die Expression von löslichem Protein optimiert.

Das pET-System beinhaltet mehrere Vektoren für unterschiedliche Anwendungen. Dies bietet den Vorteil, dass durch Umklonierung die Inserte in verschiedenen Vektoren ligiert werden können. Dadurch können ggf. auf eine einfache Art und Weise weitere Expressionsvektoren gewonnen werden. Aus der Literatur (Alberts, Johnson, Lewis Ralf, Roberts, Walter; Molekularbiologie der Zelle;4 Auflage) ist bekannt, dass bei der Expression von extrazellulären Domänen der Rezeptoren in E. coli, häufig „inclusion bodies“ auftreten. Somit ist das Protein nicht unmittelbar in wässriger Lösung löslich. Unter Verwendung von Harnstoff ist zwar eine Befreiung des Proteins aus den „inclusion bodies“ möglich, es kommt aber gleichzeitig zu einer Denaturierung des Proteins. Für die Renaturierung sind Rückfaltungsexperimente notwendig.

Ferner wurden auch Expressionsversuche in eukaryotischen Insektenzellen mittels Bac-to-Bac System vorbereitet.

Als Fernziel soll innerhalb des übergeordneten Projektes die Strukturaufklärung des STRAP erfolgen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merk, Millipore, Bio Rad, Sigma, Pharmacia, Qiagen, Roche oder Gerbu bezogen. Die für die Klonierung und DNA-Linearisation benötigten Chemikalien, sowie die Enzyme NdeI, NcoI, XhoI, T4- DANN-Ligase wurden von der Firma Fermentas bezogen; SRP, High Fidelity DNA-Polymerase stammten von Roche.

Das LB-Medium und TB-Medium wurden selbst hergestellt.

Das benötigte LB-Medium wurde wie folgt zusammengesetzt:

10g/l Bacto-Trypton

5g/l Bacto-Hefeextrakt

10g/l NaCl pro Liter Miliporwasser

Zusammensetzung des benötigten TB-Mediums:

12g/l Bacto-Trypton

24g/l Bacto-Hefeextrakt

4gml/l Glycerin

12,54g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,31g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Das Bac-to-Bac Kit wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

Die für die DNA-Reinigung benötigten Kits sowie Miniprep, Midiprep, PCR-Purifikationskit, Gelextraktionskit, Micro-Spin-Column S-200 wurden von der Firma Qiagen bezogen.

Die verschiedenen E. coli-Stämme wurden von folgenden Firmen bezogen: XL1-Blue Zellen (Klonierungsstamm) von Stratagene und BL21 (DE3), BL21 (DE3) RIL, Rosetta von Novagen.

## 5.2 Primer

Die Primer wurden so konstruiert, dass die benötigten Restriktionsstellen den Templates angefügt wurden.

### 5.2.1 Primer für STRAP (MAWD)

#### NdeI-Primer forward

5' TAA TAA CAT ATG GCA ATG AGA CAG ACG C 3'

#### XhoI-Primer reverse

5' TAA TAA CTC GAG TCA GGC CTT AAC ATC AGG AG 3'

#### NcoI-Primer forward

5' TAA TAA CCA TGG CAA-GA GAC AGA CGC 3'

### 5.2.2 Primer für 2WD40

#### NdeI-forward

5' AGT GCA GTA CAT ATG GAC CCA ATT AAA TC 3'

#### XhoI-reverse

5' TAT GCT CGA GCC TCA GGC CTT AAC 3'

## T7-Promoter

## T7-Terminator

Die Primer wurden bei der Firma MWG BIOTECH bezogen.

### **5.3 Restriktionsenzyme**

NdeI, XhoI, NcoI

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die die Spaltung von Phosphatbindungen in beiden DNA-Strängen katalysieren. Für die Aktivität dieser Enzyme ist  $Mg^{2+}$  erforderlich. Die Enzyme bilden bei der Spaltung 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden. Die besondere Eigenschaft dieser Enzyme ist, dass sie jeweils an sehr spezifischen Basensequenzen schneiden. Restriktionsenzyme werden von verschiedenen Bakterien gebildet. Bisher sind etwa 1500 verschiedene Enzyme katalogisiert. Restriktionsenzyme werden nach dem Organismus benannt aus dem sie isoliert werden. Der erste Buchstabe bezeichnet das Genus gefolgt von zwei Buchstaben für die entsprechende Spezies. Verschiedene Subspezies einer Art werden durch einen zusätzlichen Buchstaben unterschieden. Unterschiedliche Subklassen einer Art werden mit einer römischen Zahl gekennzeichnet.

EcoRI *Escherichia coli*, Stamm RY13

BamHI *Bacillus amyloliquefaciens* H

HindIII *Haemophilus influenzae* Rd

XbaI *Xanthomonas badrii*

Ein Restriktionsenzym benötigt eine spezifische doppelsträngige Sequenz von Nukleotidbasen, um die DNA zu spalten. Diese so genannte Erkennungssequenz hat gewöhnlich eine Länge von 4 bis 8 Basenpaaren. Die Spaltung erfolgt innerhalb oder in der Nähe dieser Sequenz (im Folgenden durch Pfeile gekennzeichnet). Die Erkennungssequenzen sind häufig

symmetrisch (so genannte Palindrome), d.h., beide Stränge der Erkennungssequenz haben die gleiche Nukleotidabfolge in 5' – 3' Richtung gelesen.

EcoRI bildet so genannte überhängende Enden (auch kohäsive oder "sticky Ends" genannt).

5'-GAATTC-3' 5'-G▼AATTC-3'

3'-CTTAAG-5' 3'-CTTAA▲G-5'

## 5.4 Plasmide

pET30; pFastBachHb

Relativ einfache Organismen wie *E. coli* enthalten häufig extrachromosomale zirkuläre doppelsträngige DNA Moleküle, so genannte Plasmide. Diese Plasmide sind viel kleiner als die chromosomale DNA. Ihre Größe variiert von einigen 1000 bis einigen 100000 Basenpaaren. Plasmide besitzen einen eigenen Replikationsursprung und können so getrennt von der chromosomalen DNA im Bakterium vermehrt werden. Plasmide enthalten oft Gene, die Antibiotikaresistenzen kodieren und so den Wirt unempfindlich gegen dieses Antibiotikum machen. Die Plasmid-DNA kann leicht von der Chromosomalen-DNA abgetrennt und isoliert werden.

Diese speziellen Eigenschaften der Plasmide werden in der Molekularbiologie genutzt. Plasmide dienen hier als so genannte Vektoren, um fremde DNA Fragmente einzubauen (klonieren) zu selektieren und zu vermehren.

## 5.5 Lösungen, Puffer und Gele

Puffer	NaPi pH 8,0	Tris pH 8,0	NaCl	$\beta$ -ME	Imidazol	Harnstoff
A	50mM		0,3M	1mM		
B	50mM		0,3M	1mM	500mM	
C		50mM	0,3M			6M
D		50mM	0,3M			4M
E		50mM	0,3M			2M
F		50mM	0,3M			1M
G		50mM	0,3M			0,5M

**Tabelle 1 Säulenpuffer**

Dialyse Puffer:

50 mM Tris pH 8,0

40 mM NaCl

5-15% Glycerol

1-10 mM  $\beta$ ME

Elektrophoresepuffer:

0,1 M Tris Base

0,1 M Bicin

0,1 % (g/v) SDS, pH 8,3

Probenpuffer:

5 ml Glycerin

3 ml 1 % (g/v)

Bromphenolblau:

4 ml 10 % (g/v) SDS

2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 ml 0,5 M Bicin

0,2 ml 0,5 M Tris Base

5,6 ml H<sub>2</sub>O, pH 8,0

SDS-Lösung:

10% (g/v) Natriumdodecylsulfat in H<sub>2</sub>O

Bisacrylamidlösung:

30 % (g/v) Acrylamid; 0,8 % (g/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H<sub>2</sub>O

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris, 0,4% SDS mit HCl auf pH 8,8 titrieren

Sammelpuffer:

0,5 M Tris, 0,4% SDS mit HCl auf pH 6,8 titrieren

Peroxodisulfatlösung:

100 mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in H<sub>2</sub>O

Katalysator:

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) für die Polymerisation

Anfärbelösung:

0,2% (g/v) Coomassie Brillant Blau G-250 in 10% (v/v) Eisessig

45% (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung:

10% (v/v) Eisessig

40% (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O

Laufpuffer:

0,25 M Tris

1,9 M Glycin

Trenngel (16 ml, 15%):

7 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung

4 ml Trenngelpuffer

5 ml H<sub>2</sub>O bidest

32 µl TEMED

Sammelgel (6 ml, 5%):

1 ml Acrylamid/BiS-Stammlösung

1,25 ml Sammelgelpuffer

3,5 ml H<sub>2</sub>O bidest

24 µl TEMED

Ligationspuffer:

60 mM Tris-HCl pH 7,5

6 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

Proteinstandard (Marker):

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range von Bio-Rad (Art.-Nr. 161-0317) enthält:

Phosphorylase b (MW=97,400 D)

Serum Albumin (MW=66,200 D)

Ovalbumin (MW=45,000 D)

Carbonic anhydrase (MW=31,000 D)

Trypsin inhibitor (MW=21,500 D)

Lysozyme (MW=14,400 D)

Agarose:

Agarose für 1%; Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer): 0,09 M Tris-Base; 0,01 M EDTA; pH 8,3 stellt sich von selbst ein.

## 5.6 Methoden

### 5.6.1 Sterilisation durch Hitze

Glasgeräte wurden bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Geeignete Plastikgefäße und Lösungen sowie Zahnstocher wurden bei 121°C und 1 bar für 25 min autoklaviert. Um RNase-freie Glasgeräte zu erhalten, wurden diese

für 4 h bei 250°C erhitzt. Alle anderen Geräte wurden steril verpackt vom Hersteller bezogen.

### **5.6.2 Sterilisation durch Filtration**

Das Sterilisieren von Lösung, die sich für das Autoklavieren nicht eignen, wurde mittels Filtration (Porengröße: 0,2 µm) durchgeführt.

### **5.6.3 Aufbau der Konstrukte mit STRAP-Gen**

Folgende Konstrukte wurden kloniert: pIF, pET30a, pFastBacHb. Das mit entsprechenden Enzymen geschnittene STRAP PCR-Fragment (Insert) wurde mittels T4-Ligase in jeden Vektor ligiert.

Das Amplifizieren des STRAP-Templates erfolgte mittels PCR.

### **5.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR dient der spezifischen exponentiellen Amplifikation von cDNA zwischen zwei Primern. Für die PCR-Reaktion wurde der in Tabelle 2 aufgeführte Reaktionsansatz gewählt.

Das folgende Standard-PCR Programm wurde für alle PCR-Reaktionen verwendet, wobei die Zeiten für die Kettenelongation dem zu amplifizierenden PCR-Fragment (1 min/1000bp) und die Annealingtemperaturen den Anforderungen der Primer angepasst wurden. Die Anzahl der Zyklen richtete sich in erster Linie nach dem Template.

Durch Verwendung von verschiedenen Primerkonzentrationen wurde die PCR optimiert. Die zum positiven Fragment führenden Primerkonzentrationen können der Tabelle 2 entnommen werden.

<b>Substanz</b>	<b>PCR-Fragmente für STRAP</b>
10xPCR-Puffer (Roche)	10 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	10 $\mu$ L-20 $\mu$ M
5' Primer Forward	3 $\mu$ L-30 pmol
3' Primer Reverse	3 $\mu$ L-30 pmol
DNA-Template	1 $\mu$ L-20 $\mu$ M
Konz:1 $\mu$ g/ $\mu$ l	
Expand High Fidelity DNA- Polymerase (Roche)	1 $\mu$ L
Wasser	80 $\mu$ L

**Tabelle 2    Verwendete Ansätze für die STRAP-PCR (MAWD)**

Die PCRs wurden wie in der Tabelle 3 beschrieben durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
1 Denaturierung	94°C	3 min	1
2 Denaturierung	94°C	30 s	} 35
3 Annealing	53,7°C	30 s	
4 Elongation	72°C	1,5 min	
5 Elongation	72°C	7 min	1
6 Aufbewahrung	4°C	+ $\infty$	0

**Tabelle 3    Ablauf der PCR**

Die PCR Fragmente wurden mittels Quiaquick PCR-Purifikationskit gereinigt und durch die entsprechenden Enzyme mit folgendem Ansatz (Tabelle4) für je 1 h bei 37°C verdaut:

<b>STRAP Gen</b>	<b>DNA</b>	<b>NcoI</b>	<b>XhoI</b>	<b>R+ Puffer</b>	<b>Tango Puffer</b>	<b>Wasser</b>	<b>Bemerkungen</b>
STRAPfür pET30a	20 µL	1 µL	1 µL		3 µL	5 µL	Doppelveerdau
STRAPfür pFastBac	20 µL	1 µL	1 µL		3 µL	5 µL	Doppelveerdau
STRAPfür Testprobe	20 µL		1 µL	3 µL		6 µL	Testverdau
STRAPfür Testprobe	20 µL	1 µL			3 µL	6 µL	Testverdau

**Tabelle 4 Ansatz für die Restriktionsverdauung der PCR-Fragmente**

Die verdauten Testproben wurden untereinander ligiert (Selbstligation), und auf das Gel geladen, um den richtigen Ablauf der Verdau durch die einzelnen Enzyme zu überprüfen.

Erst danach wurden die verdauten Proben mittels präparativem 1% Agarose-Gel aufgereinigt, die Bande der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten und durch das Gelextraktionskit von den Gelrückständen befreit

### 5.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden wurden in einem 20 µl Ansatz 0,1-0,2 pmol eines gegebenenfalls zuvor dephosphorylierten Vektors mit 0,3-0,6 pmol eines DNA-Fragments ligiert. Die Ligation geschieht mit Hilfe der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C oder bei 22°C für 3 Stunden. Überstehende, komplementäre Enden werden relativ schnell und vollständig verknüpft, glatte 3'- und 5'-Enden erfordern eine höhere Enzymkonzentration.

Insert DNA STRAP	10 $\mu\text{L}$
Wasser	4 $\mu\text{L}$
T4 DNA 10x Ligase Puffer Fermentas	1,5 $\mu\text{L}$
T4-DNA-Ligase	1 $\mu\text{L}$

**Tabelle 5 Ansatz für die Selbstligation**

Nach einer Stunde wurden die Testproben auf das Gel geladen, um den richtigen Ablauf der Restriktion zu überprüfen.

Die Vektoren wurden ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen für 1h bei 37°C nach folgendem Ansatz verdaut:

Substanz	Plasmid	NcoI	XhoI	Tango Puffer	Wasser	Bemerkungen
pET30a	50 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	Doppelverda u
pFastBac	50 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	Doppelverda u

**Tabelle 6 Ansatz für den Restriktionsverdau der Plasmide pET30a und pFastBac.**

Das aus dem Vektor ausgeschnittene Fragment ist meist zu klein, sodass eine Dephosphorylierung des 5' Ende des Vektors notwendig ist. Durch Dephosphorylierung wird eine Selbstligation verhindert.

### 5.6.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

1-20 pmol DNA wurden in 100  $\mu$ l Dephosphorylierungspuffer (Boehringer, Mannheim) mit einer Einheit(1U) alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Zugabe von 5 mM EDTA und durch 30-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend durch Extraktion mit Phenol gereinigt und mit Ethanol/Natriumacetat präzipitiert. Anschließend wurde durch ein präparatives 1% Agarose-Gel auf dieselbe Art wie die PCR-Fragmente aufgereinigt. Eine einfachere Möglichkeit ist die Reinigung des geschnittenen Vektors mit dem PCR-Purifikationskit, das aber nur, wenn das ausgeschnittene Fragment kleiner als 100bp ist.

Der so entstandene linearisierte Vektor wird auf das 1% Agarose-Gel aufgetragen, um die richtige Linearisierung zu überprüfen und die Konzentration zu bestimmen.

Das STRAP PCR-Fragment wurden nach folgendem Ansatz in den geschnittenen pET30a- und pFastBac Vektoren ligiert und über Nacht bei 16°C oder bei 22°C für 1h inkubiert

Wasser	15 $\mu$ L	Zu beachten ist das stöchiometrische Verhältnis zwischen Insert und Vektor. Normal ist I:V/4:1
Insert DNA	4 $\mu$ L	
Vektor	2 $\mu$ L	
T4 DNA 10x Ligase Puffer Fermentas	2.5 $\mu$ L	
T4-DNA-Ligase	1.5 $\mu$ L	

**Tabelle 7 Ansatz für die Ligation der Vektoren: pET30a und pFastBac mit dem Insert: STRAP**

### 5.6.7 Aufbau der Konstrukte mit dem 2WD40-Gen

Das 2WD40-Template wurde mittels PCR amplifiziert

Durch Verwendung von verschiedenen Primerkonzentrationen wurde die PCR optimiert. Die zum positiven Fragment führenden Primerkonzentrationen können aus Tabelle 8 entnommen werden.

Substanz	PCR-Fragmente für STRAP
10xPCR-Puffer (Roche)	5 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	5 $\mu$ L-20 $\mu$ M
5' Primer Forward	1,5 $\mu$ L-30 pmol
3' Primer Reverse	1,5 $\mu$ L-30 pmol
DNA-Template	0,5 $\mu$ L-20 $\mu$ M
Konz:1 $\mu$ g/ $\mu$ l	
Expand High Fidelity DNA-Polymerase (Roche)	1 $\mu$ L
Wasser	35,50 $\mu$ L

**Tabelle 8**    **Verwendete Ansätze für die 2WD40-PCR**

Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1 Denaturierung	94°C	3 min	1
2 Denaturierung	94°C	25 s	} 35
3 Annealing	60°C	30 s	
4 Elongation	72°C	1 min 10 s	
5 Elongation	72°C	7 min	1
6 Aufbewahrung	4°C	+∞	0

**Tabelle 9 PCR thermal cycling conditions**

Die PCR Fragmente wurden mittels Quiaquick PCR-Purifikationskit gereinigt und durch die entsprechenden Enzyme mit folgendem Ansatz für je 1 h bei 37°C verdaut:

Substanz	DNA	Ndel	XhoI	R+Puffer	Wasser	Bemerkungen
2WD40 für pET30a	20µL	1µL	1µL	3µL	5µL	Doppelverdau
2WD40	20µL	1µL		3µL	6µL	Testverdau
2WD40	20µL		1µL	3µL	6µL	Testverdau

**Tabelle 10 Ansatz für die Restriktionsverdau der PCR-Fragmente.**

Die PLasmide wurden ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen für 1h bei 37°C nach folgendem Ansatz verdaut.

Substanz	Plasmid Vektor	NdeI	XhoI	R+Puffer	Wasser	Bemerkungen
pET30a	20 µL	1 µL	1 µL	3 µL	5 µL	Doppelverdau
pET30a	10 µL	0,5µL		1,5 µL	4,5 µL	Testverdau
pET30a	10 µL		0,5µL	1,5 µL	4,5 µL	Testverdau

**Tabelle 11 Ansatz für die Restriktionsverdauung der Plasmide: pET30a**

Die die entsprechenden Inserte enthaltenden Vektoren wurden zur Vermehrung in 50 µL XL1-Blue Zellsuspension (Klonierungsstamm) transformiert. Die Transformation kann entweder chemisch (Hitschock) oder elektrisch erfolgen, je nach der Vorbehandlung der XL1-Zelle. Die elektrische Transformation findet durch Elektroporation statt. Bei der chemischen Transformation wurde die Suspension bestehend aus Vektoren und Zellen 30 min auf Eis gestellt, 1 min auf 42°C erhitzt und wieder ca. 3 min auf Eis gestellt. Nach der Inkubation in LB für 30 min. Bei 37°C, wurden die transformierte Bakterien auf Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

In Abhängigkeit vom Plasmid und nach der Antibiotikumresistenz wurden die Agar-Platten mit Antibiotika wie folgt versetzt: Ampicillin (100mg Ampicillin/1l LB-Medium) für pFastBac oder Kanamycin (50mg Kanamycin/1l LB-Medium) für pET30a.

Davon wurden einzelne Bakterienkolonien ausgewählt und pro Vektor Kolonie-PCR durchgeführt. Der Ablauf der Kolonie-PCR ist identisch mit dem der STRAP-PCR (siehe Bild 10 S.43 und Bild 11 S.44).

Das Kolonie-PCR Produkt wird durch ein präparatives 1%-iges Agarose-Gel analysiert.

Die positiven Kolonien wurden in 5 ml Ampicillin-LB-Medium oder Kanamycin-LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 200 rpm

inkubiert. 5 ml der Zellsuspension wurden bei 6000 rpm zentrifugiert und die im Pellet enthaltene DNA durch das Miniprep-Kit gemäß Protokoll extrahiert und aufgereinigt.

### 5.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die zweite wichtige Standardelektrophorese neben der SDS-PAGE (zur Analyse von Proteinen) ist die Agarose-Gelelektrophorese (zur Analyse von DNA-Molekülen). Agarosegele sind im Gegensatz zu Polyacrylamidgelen ungiftig und einfach herzustellen. Sie eignen sich besonders zur Analyse von Molekülen über 100 kDa. Die Gele sind allerdings nicht ganz klar und zeigen bei sehr empfindlichen Nachweistechiken eine starke Hintergrundfärbung.

Die Agarose-Gelelektrophorese (nach Sambrook et al., 1989) ist eine Standardmethode zur Reinigung, Trennung und Identifizierung von Nukleinsäuren. Die Nukleinsäuren liegen im neutralen und schwach alkalischen Bereich als Polyanionen vor und wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Agarosekonzentration, den Pufferbedingungen, der Molekülgröße, der Konfiguration der Nukleinsäuren, sowie der angelegten Stromstärke und der Temperatur abhängig.

Das Agarose-Gel besteht aus mikroskopischen Poren, die wie ein Molekularsieb wirken, welches die DNA nach Größe und Form trennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA Moleküle ist abhängig von der Größe (umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  der Größe in Basenpaaren). Kleinere DNA Moleküle wandern im Gel schneller als Große. Das Ladung/Masse Verhältnis ist für unterschiedlich große DNA-Moleküle gleich.

Die Nukleinsäuren wurden durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches der heißen, flüssigen Agarose vor dem Abkühlen zugesetzt wurde. Ethidiumbromid fluoresziert orange, wenn es mit UV-Licht angeregt wird. Ethidiumbromid interkaliert zwischen DNA-Basenpaaren. Die Fluoreszenz des interkalierten EtBr ist längerwellig. Dies erlaubt die Identifikation der DNA Fragmente im Gel.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte auf 1-2%-igen Agarose-Gelen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet.

Die Gele wurden durch Mischen von fester, kristalliner Agarose mit TAE und anschließendem Aufkochen im Mikrowellenofen präpariert. Anschließend wurde die noch heiße Agaroselösung in eine Gelelektrophoresekammer eingebracht, wo sie abkühlte und ein festes Gel bildete.

### **5.8 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die Agarosegele wurden auf einen UV-Tisch mit langwelligem UV-Licht (356 nm) gelegt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die anschließende Elution der DNA erfolgte mit dem „Qiagen Quick Spin“-Kit nach Angaben des Herstellers.

### **5.9 Elektroporation**

50µl kompetente Zellen werden mit 1-5 µl Ligationsansatz (ca. 100 ng Vektor-DNA) in sterile, trockene und gekühlte Elektro-Transformationsküvetten gegeben und bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µFD und einem Widerstand von 200Ω transformiert. Sofort nach der Transformation wird 1 ml LB-Medium in die Küvette gegeben, gespült und in ein Kulturröhrchen überführt. Jeder Transformationsansatz wird für 0,5-1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden in 100 µl Portionen und/oder Verdünnungen auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mittels eines Spatels ausplattiert

### **5.10 Chemotransformation (Heat-Shock)**

1-5 µl(ca.100ng) Expressionsvektor (STRAP(pIF), und STRAP (pET30a)) wurde zu 50 µL BI21DE3-Ril, DI21DE3, Rosetta, E.coli-Zellen pipettiert und 30 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde 60 Sekunden auf 42°C erhitzt und

erneut 3 Minuten auf Eis gestellt. 50  $\mu\text{L}$  von der Suspension wurden mit 950  $\mu\text{L}$  LB-Medium gemischt und für 45 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Je 100  $\mu\text{L}$  wurden auf eine Ampicillin-Chloramphenicol-Agarplatte für STRAP (pFast-Bac) und 2WD40 (pIF), bzw. auf eine Kanamycin-Chloramphenicol-Agarplatte für STRAP und 2WD40 (pET30a) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.11 Expression des pET30-STRAP in *E. coli*

Von der BL21 (DE3) -Platte wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und damit eine 50 ml Vorkultur (LB-Medium, 50 mg/l Kanamycin) eingimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht (bis zur deutlichen Trübung der Kultur) bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Zelldichte der Vorkultur wurde über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) bestimmt (Nullwert mit LB-Medium, Messung einer 1:10-Verdünnung der Vorkultur mit LB-Medium, OD600: ca. 0,2-0,25). Die Hauptkultur (Erlenmeyerkolben, 500 ml LB-Medium, 50 mg/l Kanamycin) wurde so aus der Vorkultur eingimpft, so dass die OD600 der Hauptkultur etwa 0.1 betrug. Die OD muss überprüft werden (unverdünnt). Die Expressionskultur wurde auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert und die OD alle 30 min bestimmt. Bei einer Zelldichte von etwa 0.8 wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Nach Induktion wurde die Kultur noch weitere 4 h inkubiert, wobei weiterhin alle 30 min die Zelldichte bestimmt und anschließend eine Wachstumskurve (Bild 16 S.47) erstellt wurde. Schließlich wurden die Zellen durch Zentrifugation (25 min, 5000 rpm, 4°C) geerntet.

### 5.12 Methoden zum Nachweis der Expression

#### 5.12.1 Messung der OD

Die Optische Dichte der Zellkultur wurde mittels einer Bekman DU640 UV-visible Spektralfotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

### 5.12.2 T<sub>0</sub> und Tx-Proben

T<sub>0</sub>. Zur Kontrolle der Expression wurden vor der Induktion mit IPTG 1ml Probe entnommen.

Tx. Nach Abschluss der Expression wurden wieder 1ml Probe entnommen.

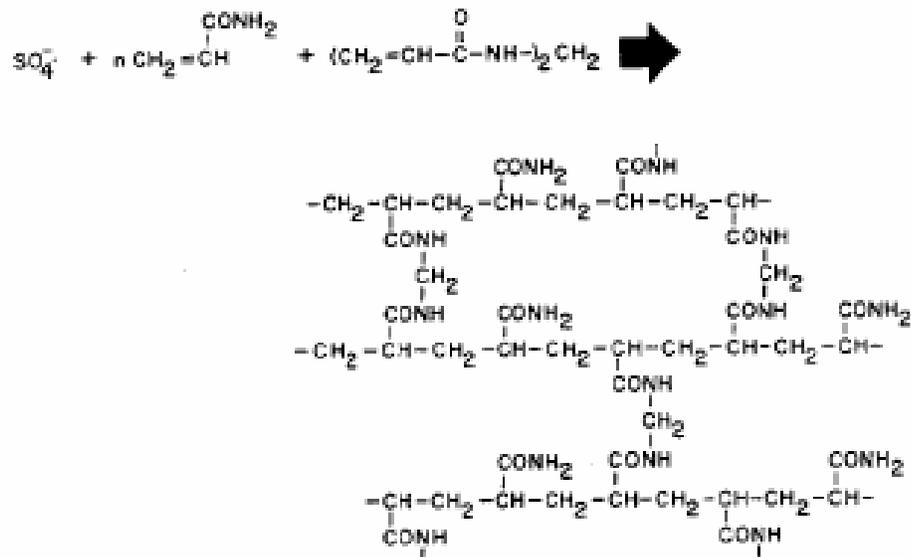
Die Proben wurden während 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 30 µL SDS-Puffer 6x aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und damit eine Gelelektrophorese durchgeführt.

### 5.13 Löslichkeitstest

Zur Überprüfung der Löslichkeit der exprimierten Proteine wurden von jeder Bakteriensuspension 1 ml 15 min bei 4000 rpm und 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Puffer A gut suspendiert und 3 mal 30 Sekunden mittels Ultraschallspitze behandelt. Anschließend wurde die Suspension bei 4000 rpm und 4°C während 10 min zentrifugiert. Die in Pellet und Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels 15% SDS-PAGE nachgewiesen. Dazu wurden 20 µL Überstand mit 20 µL SDS-dye 6x versetzt. Das Pellet wurde in 1ml Puffer A resuspendiert, 20 µL davon mit 20 µL SDS-dye 6x versetzt und auf das Gel aufgetragen. Vom Pellet wurde jeweils die 1/4fache Menge des Überstandes aufgetragen.

### 5.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Trägermaterialien für die Gelelektrophorese eignen sich hydrophile Medien, welche stabil und chemisch inert sind, und die Wanderung von kleinen Ionen in wässrigem Milieu nicht behindern. All diese Eigenschaften vereint Polyacrylamid, welches man durch Copolymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid erhält (**Bild 3**).



**Bild 3 Polymerisation und Vernetzung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid**

Der Vernetzungsgrad eines Polyacrylamid-Gels und damit seine Porengröße können durch die Konzentrationen und das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid variiert werden. Die lineare Verknüpfung der Acrylamid-Monomeren und die Quervernetzung mit N,N'-Methylen-Bisacrylamid wird durch radikalische Polymerisation mit Ammoniumperoxodisulfat gestartet.

Tetra-Methylethyldiamin (TEMED) wirkt dabei als Katalysator für die Bildung von Sulfatradikalen. Die SDS-Gelelektrophorese von Proteinen verbindet die Methoden der Gelfiltration und der Elektrophorese. Die Trennung erfolgt jedoch nur nach der Größe der Proteine (relative Molekülmasse), wenn die Form und die Ladung der Moleküle einheitlich ist. Diese Bedingungen werden ziemlich gut erfüllt, wenn die Tertiärstruktur der Proteine durch Einwirkung des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört wird. Die Dodecylsulfatanionen binden mit ihren hydrophoben Kohlenwasserstoffketten an hydrophobe Regionen eines Proteins, die ursprünglich im Inneren nativ gefalteter Proteine lokalisiert sind. Dabei werden nicht kovalent verknüpfte Untereinheiten dissoziiert und die geordnete Tertiärstruktur aufgelöst. Es werden etwa 1,4 g SDS/g Protein gebunden. Dadurch werden alle Proteine stark negativ geladen und die

Ladungsdichte (Ladung/Masse) wird für alle SDS-beladenen Proteine annähernd gleich. Die Laufstrecke während der SDS-Gelelektrophorese hängt also nur noch von der Größe des Proteins, d.h. von seiner relativen Molekülmasse ab.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine der wichtigsten Routinemethoden der Biochemie.

### **5.15 Färbung der Proteine**

Das SDS-Gel wurde in ein Plastikwännchen gelegt und mit 100 ml Anfärbelösung überschichtet und unter Schütteln 30 min angefärbt. Schließlich wurde das Gel mit H<sub>2</sub>O abgespült, mit 100 ml Entfärbelösung überschichtet und unter Schütteln entfärbt. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Entfärbelösung mehrere Male gewechselt.

Eine schnellere Methode ist das Erhitzen des Gels für 30 s in Comassie Blue in der Mikrowelle und das anschließende Inkubieren ca.10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Dann folgte die Entfärbung für 4 Stunden unter Schütteln mit Essigsäure 10%.

### **5.16 Optimierung der Expression von pET30-STRAP durch Variation von Temperatur und Zelllinien**

#### **5.16.1 Expression in E. coli BL21-DE3-RIL Zellen bei 37°C**

100 ml Ansatz: 1 µL(ca.150ng) Midiprep-DNA (pET30-STRAP) wurde in 50 µL E. coli (BL21DE3-RIL) Zellen transformiert und bei 37°C exprimiert, wobei die Induktionszeit auf 4 Stunden verkürzt wurde.

#### **5.16.2 Expression in E. coli BL21-DE3 Zellen bei 20°C**

100 ml Ansatz: 1 µL sequenziertes Plasmid wurde in 50 µL BL21 (DE3) Zellen transformiert.

10 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Kolonie eingimpft und bis zum Erreichen der OD von 0.8 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die

Zellkultur auf 20°C abgekühlt und die vierstündige Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet.

Zur Gewinnung der Zellen wurde die Zellkultur wie oben beschrieben aufgearbeitet (siehe S.31-5.11).

### **5.16.3 Expression in E.coli BL21 Rosetta Zellen bei 20°C**

100 ml Ansatz: 1 µL sequenziertes Plasmid wurde in 50 µL BL21 Rosetta Zellen transformiert.

10 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer Kolonie eingepflegt und bis zum Erreichen der OD von 0.8 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Suspension auf 20°C abgekühlt und die vierstündige Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet.

### **5.17 Expression:**

25 ml LB-Medium wurden mit einer von der Platte entnommenen E. coli - Kolonie beimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Dann wurden je 2 ml Bakteriensuspension in 100 ml LB-Amp-Cam bzw. LB-Kan-Cam-Medium transferiert und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer OD von 0.8 wurde die Suspension auf , 20°C abgekühlt, mit 0,5 mM und 1 mM IPTG versetzt und über Nacht inkubiert. Um das Bakterienpellet vom Medium zu trennen, wurden die Bakteriensuspensionen mittels einer Eppendorf Zentrifuge bei 4°C und 4000 rpm während 20 min zentrifugiert.

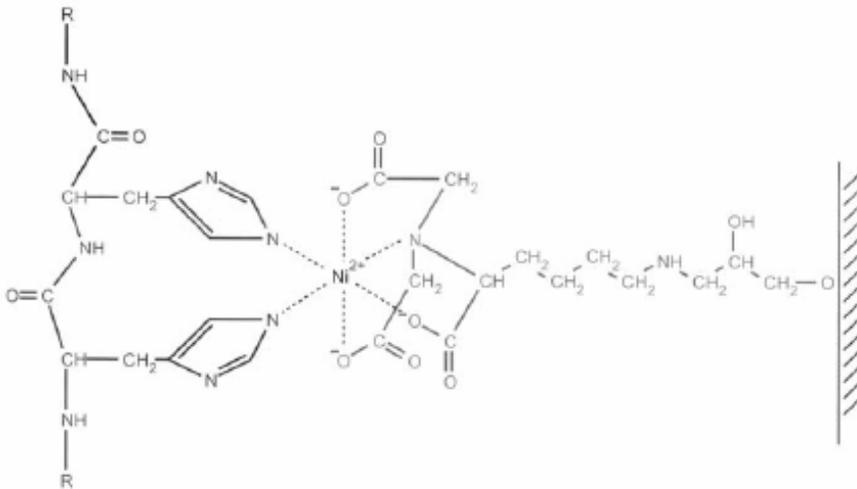
### **5.18 Chromatografische Methoden-Affinitätschromatografie**

Grundlage der Affinitätschromatografie ist die Modifikation des gewünschten Proteins mit einem „Affinitäts-Tag“. Eine Ausnahme hiervon bilden Proteine, welche bereits über spezifische, für diese Art der Aufreinigung geeignete

Eigenschaften verfügen, beispielsweise die nicht kovalente Bindung eines Kofaktors.

Der „Tag“ ist in der Lage, ein anderes Molekül oder Protein, welches auf einem geeigneten Trägermaterial (z.B. Agarose-Beads) immobilisiert ist zu binden. Ein Beispiel für solche Tags ist das in dieser Arbeit verwendete Histidin (His) -Tag (siehe **Bild 4** S.36). Auch andere Proteine können sich unspezifisch an die immobilisierte Matrix binden. Das Entfernen dieser Proteine erfolgt üblicherweise mit einem, kompetitiv an die Matrix bindenden Molekül (im Falle des His-Tags, Imidazol).

Das auf diese Weise gereinigte Protein wurde schließlich mit einer entsprechend hohen Konzentration (Stoß-Elution) oder über einen Konzentrationsgradienten von der Säulenmatrix eluiert. Die Abtrennung dieser für weitere Verwendung meist unerwünschten Substanz kann anschließend über andere chromatografische Methoden z.B. Gelfiltration, Entsalzung oder Dialyse erfolgen.



**Bild 4 Funktionsweise der Histidin-Tag-Aufreinigung**

### 5.19 Reinigung von STRAP mittels Ni-NTA

Rosetta Zellen mit STRAP(pET30) wurden wie unter 5.17 beschrieben aufgezogen, mit 0.5 mM IPTG induziert und 3 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C, 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet unter Schütteln in 10 ml Puffer A aufgenommen. Die homogene Zellsuspension wurde in einer French Press bei 1.6 kbar oder mit einem Mikrofluidiser aufgeschlossen.

Die lysierten Bakterien wurden in einer Beckman Coulter Ultrazentrifuge bei 35000 rpm und 4°C 45 min mit dem Rotor Ti 45 zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0.22 µm-Filter filtriert und mittels Äkta-Explorer der Firma Amersham durch Nickelaffinitätschromatografie über eine Hitrap™ Chelating-Säule (V=5 ml) der Firma Amersham aufgereinigt.

Flussrate: 2,5 ml / min

Gradient:

- 1) 100% Bindepuffer zum Auftragen der Proben ( PufferA)
- 2) 10% Elutionspuffer für 15 Säulenvolumina (PufferA 98%+ PufferB 2%)
- 3) 30% Elutionspuffer für 5 Säulenvolumina (PufferA 70%+ PufferB 30%)
- 3) 50% Elutionspuffer für 5 Säulenvolumina (PufferA 50%+ PufferB 50%)
- 4) 100% Elutionspuffer für 5 Säulenvolumina (PufferA 0%+ PufferB 100%)

Zum Nachwaschen der Säule wurde Bindepuffer verwendet. Die Proben wurden zur Kontrolle der Reinheit auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### 5.20 Reinigung mittels Anionentauscherchromatografie

Die mittels Ni-NTA aufgereinigten und Protein enthaltenden Proben wurden unter Aufkonzentrierung (4-10ml) mittels Centriprep und Verdünnung mit

Probenpuffer auf eine HighLoad Superdex 750 Säule aufgeladen und aufgereinigt.

Flussrate: 1,5 ml / min

### 5.21 Rückfaltung von STRAP

BI21-DE3 Zellen mit STRAP (pET30a) wurden wie unter „Expression“ (5.17) beschrieben, aufgezogen und mit 1 mM IPTG bei 20°C induziert und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C 20 min bei 4500 rpm zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde im 3 fachen Volumen von Puffer A resuspendiert und mittels French Press oder Fluidiser lysiert. Die Suspension wurde bei 4°C 20 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Noch zweimal wurde das lysierte Zellpelet gewaschen und abzentrifugiert, um die zerbrochenen Membranstücke und verschiedene Organelle zu entfernen.

Anschließend wurden die inclusion bodies mit einer 6 molaren Harnstofflösung gemischt und mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das unlösliche Material wurde durch Zentrifugation während 30 min bei 30000 g entfernt.

Das aufgelöste STRAP wurde mittels Ni-NT von anderen Verunreinigungen getrennt und am Ende mit verschiedenen Konzentrationen von Säulenpuffer B eluiert (50 mM Imidazol, 150 mM Imidazol, 250 mM Imidazol, 500 mM Imidazol). Vor Elution mit Säulenpuffer B wurde versucht, das Protein direkt auf der Ni-Säule zu renaturieren. Dafür wurde die Säule mit verschiedenen Puffern, die immer niedrige Konzentration an Harnstoff enthielten. So wurde die Ni-Säule und auf die Ni-Säule gebundenes Protein mit 5 M Harnstoff, 4M; 3M; 2M; 1M; 0,5M; 0,25M gespült. Je niedriger die Harnstoffkonzentration ist, desto kleiner muss auch die Arbeitstemperatur sein.

Die so gewonnene Proteinlösung wurde für 6 Stunden mit einem Dialysepuffer mit hoher Salzkonzentration dialysiert. Ein Wechsel des Dialysepuffers erfolgte alle 2 Stunden. So konnte auch die Reduzierung der Salzkonzentration erreicht

---

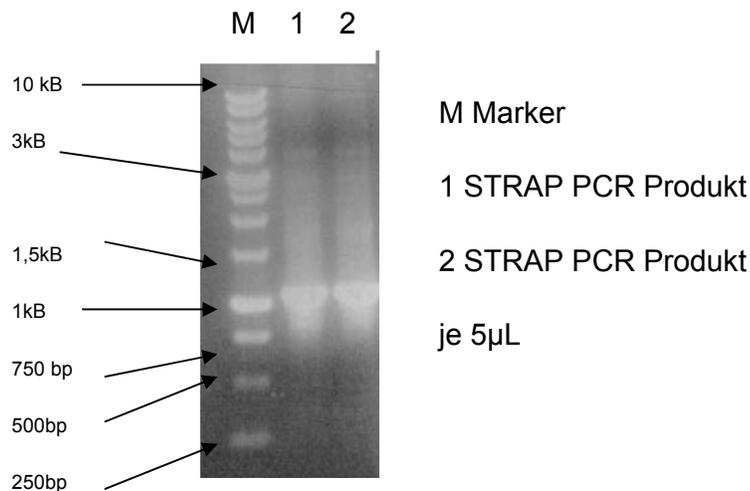
werden. Nach der Dialyse wird der Dialyseschlauch entleert und die Lösung abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 4-5 ml aufkonzentriert und auf die Gelfiltrationsäule Superdex 750 aufgetragen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Klonierung von STRAP und 2WD40

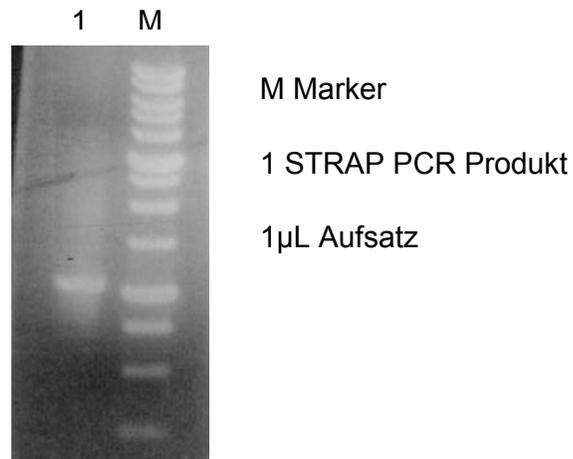
Für die Expression von STRAP und 2WD40 wurden die Konstrukte STRAP (pET30a) und STRAP (pFastBachHb) bzw. 2WD40 (pET30) erstellt. Hierfür wurden die DNA-Templates STRAP und 2WD40 durch PCR, mit der die Restriktionsseiten eingefügt wurden, amplifiziert. Die PCR wurde durch Variation der Primerkonzentrationen optimiert. Mit einer Primerkonzentration von 10 pmol konnten beide Konstrukte amplifiziert werden.

#### 6.1.1 PCR für die DNA-Templates STRAP und 2WD40

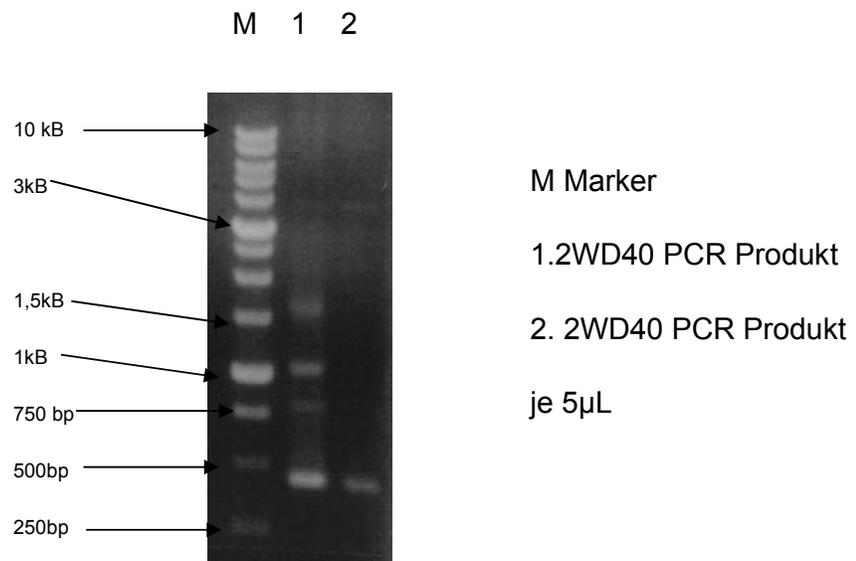


**Bild 5 STRAP(NcoI-XhoI) PCR Produkt**

Die 2 richtig prominente Streifen sind zu bemerken, Streifen die das PCR Produkt bezeichnen. Auf dem Gel kann man sehr gut erkennen dass das Produkt ziemlich rein ist. Trotzdem ist eine Reinigung mittels PCR-Purifications Kit notwendig, um alle andere störende Bestandteile des Produktes zu entfernen.



**Bild 6 Gereinigtes STRAP(NcoI-XhoI) PCR Produkt**

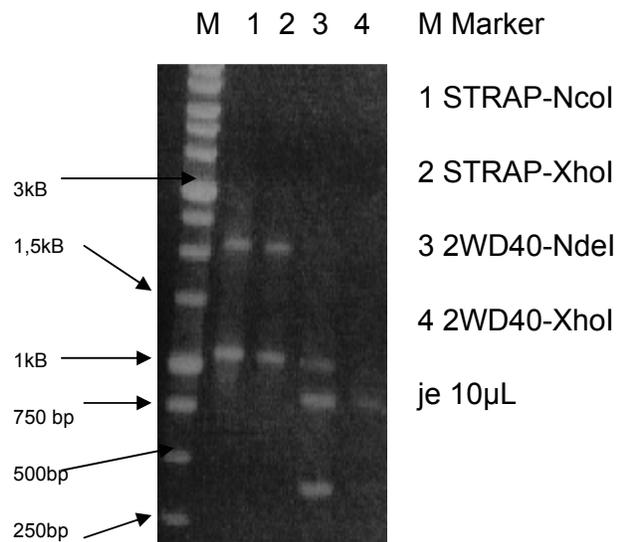


**Bild 7 2WD40(NdeI-XhoI) PCR Produkt**

Das PCR Produkt ist durch Nebenprodukte verunreinigt. (siehe Bild 7). Andere Nebenprodukte sind leicht zu erkennen. In diesen Fall eine Aufreinigung mittels PCR Purifikations Kit ist nicht genügend. Die Methode "Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen" 5.8 wurde benutzt, um das richtige Fragment aus dem PCR-Produkt zu gewinnen.

Die durch PCR gewonnenen Fragmente, wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in die Vektoren pET30a und pFastBac ligiert.

Die Selbstligation ist ein Kontrollversuch, um die Richtigkeit des verdauten Enden des Genes zu überprüfen. Wenn je eine Ende des Gens, mittels Endonukleasen NdeI, NcoI, XhoI richtig geschnitten sollten, nach Ligation (Methode 5.6.5), auf dem Gel 2 Banden erscheinen. Das bedeutet, dass je zwei Genfragmente die dieselbe Schnittstellen haben, miteinander verbunden sind.

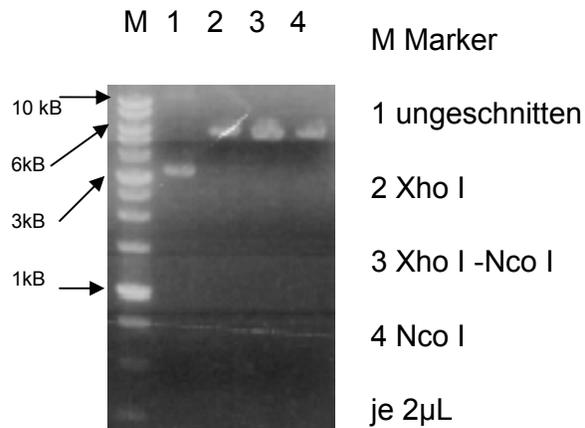


**Bild 8 Selbstligation von STRAP und 2WD40**

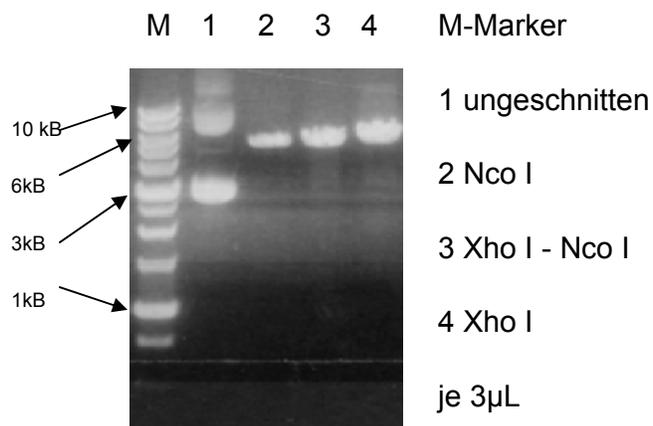
### 6.1.2 Linearisierung der Plasmide

Die Plasmide wurden mit den entsprechenden Enzymen für 1h bei 37°C verdaut. Die geschnittene Plasmide wurden in die Taschen 2, 3 und 4 des Geles aufgetragen (siehe Bild 9). Auf dem Gel, die Linearisierung der Plasmide ist deutlich zu erkennen, wobei die geschnittene DNA-Fragmente bei einer Größe von 6kB erscheinen, in vergleich zu den ungeschnittenen Plasmid, der bei 3-4kB vorkommt. Mittels Superspiralisierung, wird die Oberfläche der DNA verkleinert, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Agarose Poren

beeinflusst wird. In die Taschen 2 und 4 wurden die Proben geladen, die das einzeln geschnittene Plasmid enthalten. Tasche 3 enthält das doppelverdaute Plasmid. Obwohl alle 4 Proben auf das selbe Niveau erscheinen sollten, ist das nicht geschnittene Plasmid superspiralisiert und deswegen ist es beim ca.3KB zu sehen.



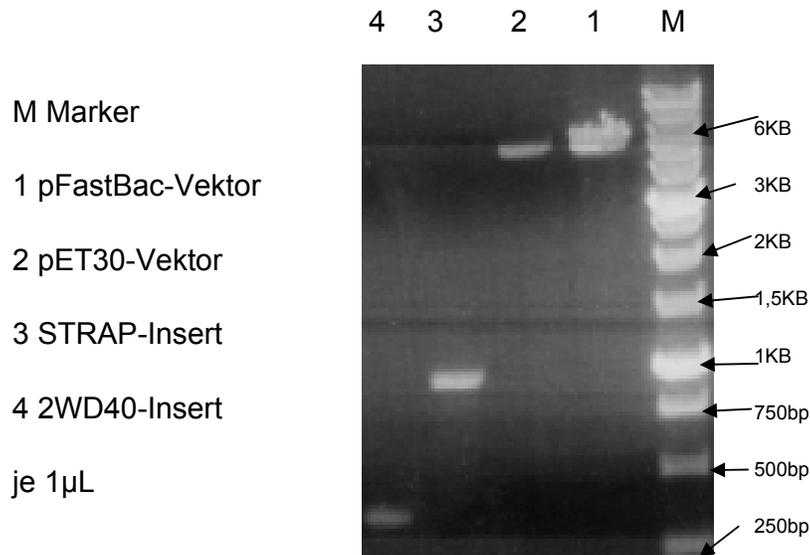
**Bild 9 pET30 linearisiertes Plasmid**



**Bild 10 pFastBac linearisiertes Plasmid**

Die Vermehrung erfolgte durch Transformation in XL1-Blue Zellen, die dann auf eine LB-Amp/LB-Kan Platte transferiert und bei 37°C inkubiert wurden. Von je 8 entnommenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Nach dem Erzielen eines positiven Ergebnisses wurden 5 ml Kultur hochgezogen. Die Reinigung und Isolierung der Konstrukte erfolgte durch Miniprep. Durch einen

Testverdau wurden die Inserts der richtigen Größe enthaltenden Vektoren identifiziert. Anschließend wurden diese in XL1-Blue Zellen transformiert. Die transformierten XL1-Blue Zellen wurden in 10 ml LB-Amp- bzw. 10ml LB-Kan-Medium gezüchtet, die Konstrukte mittels Miniprep aufgereinigt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt.

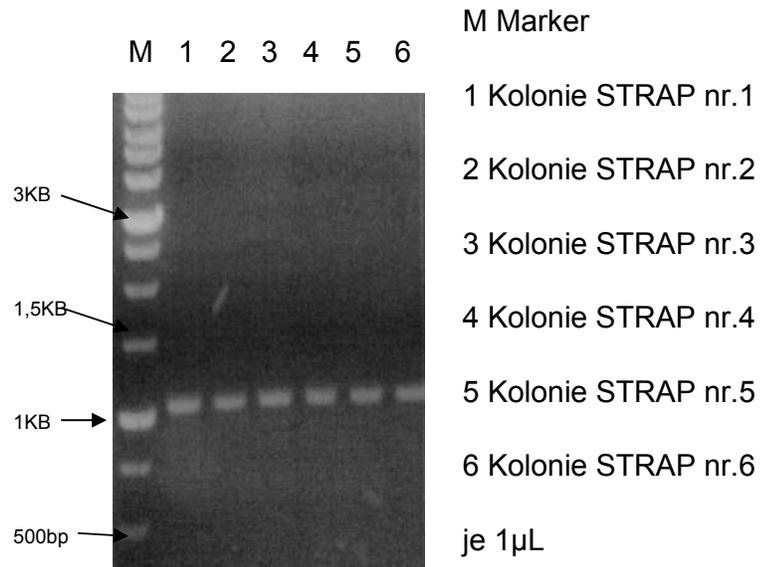
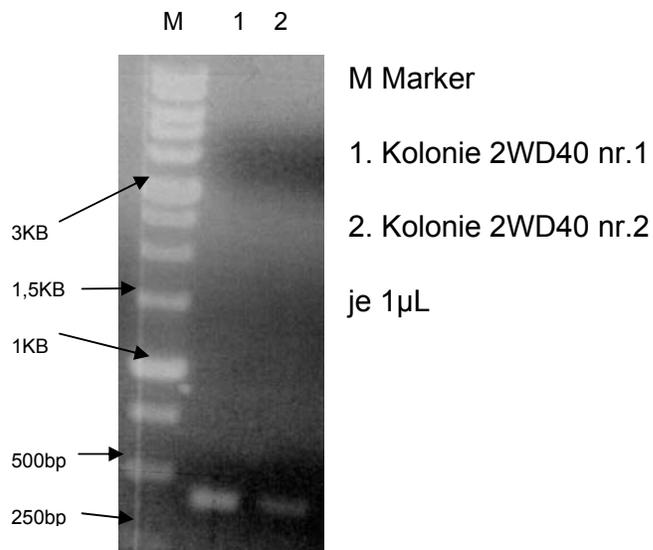


**Bild 11 linearisierte Vektoren und Inserts**

Bild 11 zeigt die Vektoren und die Inserts, die für die Ligation benutzt wurden. Gleichzeitig ist eine Bestimmung der DNA-Konzentration möglich. Es ist bekannt, dass die 1KB und 3KB Banden des Markers ca.200ng/µL enthalten. Alle andere Streifen enthalten nur ca.59 ng/µL

### 6.1.3 Kolonie-PCR STRAP und 2WD40

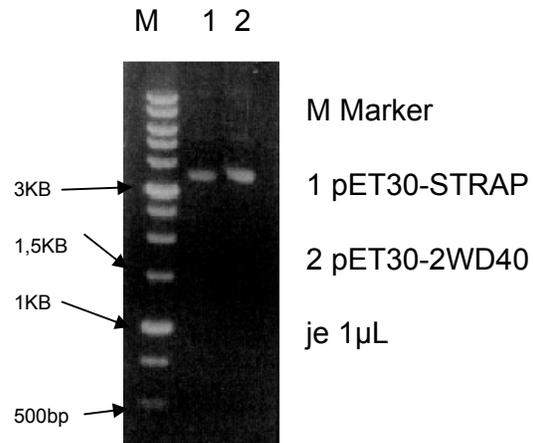
In Bild 12 die Bahnen 1 bis 6 zeigen die Kolonie-PCR, in der die Inserts aus den pET30a-STRAP mittels PCR amplifiziert wurden. Die Größe des Fragments ist 1053bp, was auf dem Bild auch zu sehen ist.

**Bild 12 Kolonie PCR STRAP****Bild 13 Kolonie PCR 2WD40**

Der definitive Nachweis der Richtigkeit der Konstrukte von STRAP (pET30a) und STRAP (pFastBachHb) bzw. 2WD40 (pET30) erfolgte durch Sequenzierung.

### 6.1.4 STRAP-pET30 Konstrukte

Nach der Transformation in XL1-Blue Zellen und anschließender Vermehrung in 5 ml Medium wurde das Konstrukt mittels Miniprep aufgereinigt.

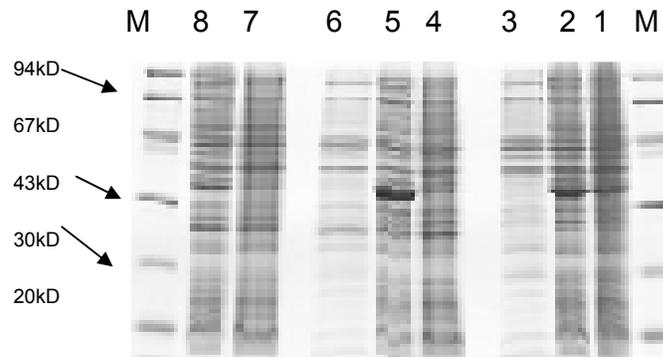


**Bild 14 Miniprep von Konstrukte**

## 6.2 Expression von STRAP mittels pET30a-STRAP Konstrukt

### 6.2.1 Testexpression in verschiedene Zelllinien

Durch die Expression von STRAP (pET30a) in verschiedenen E.coli-Stämmen wurde keine Löslichkeitsverbesserung erzielt. Weiterhin konnte auch durch die Zelllinienvariation kein Unterschied der Expression festgestellt werden.



**Bild 15 Expression von STRAP(pET30) in verschiedene Zelllinien**

M Marker

1.-IPTG BL21DE3

2.+IPTG BL21DE3

3. Supernatant BL21DE3

4.-IPTG BL21DE3 RIL

5.+IPTG BL21DE3 RIL

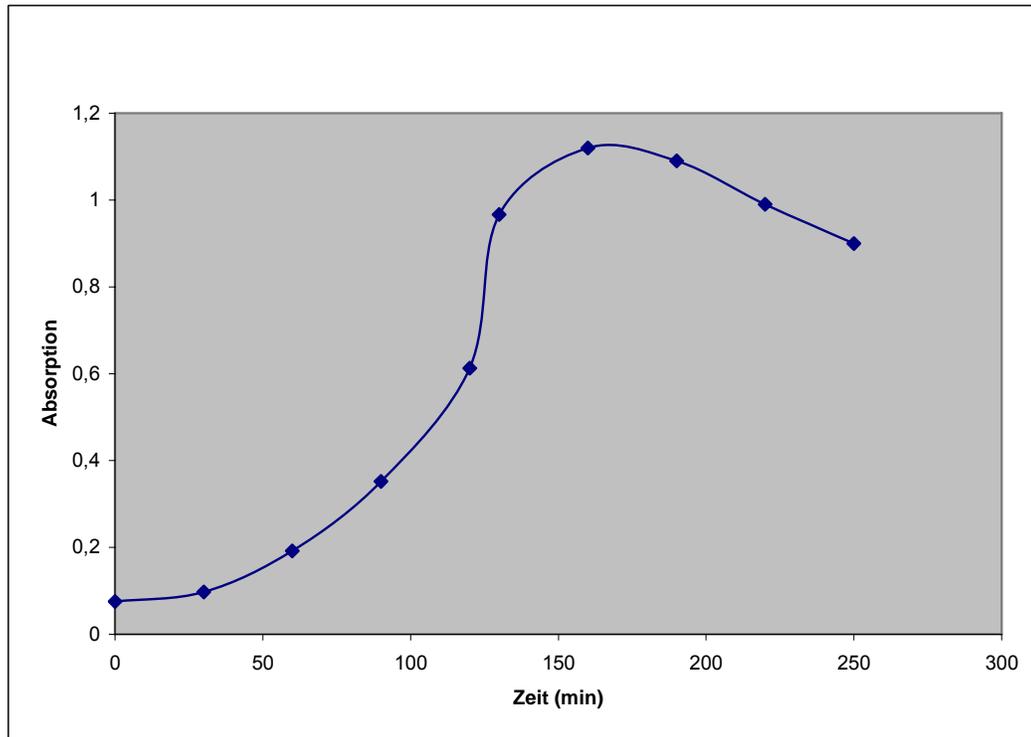
6.Supernatant BL21DE3RIL

7.-IPTG ROSETTA

8.+IPTG ROSETTA

Die Zellen wurden mit BugBuster Reagent aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Rosetta Zellen haben aber ein gelartiges Lysat gebildet und so war es unmöglich auf das SDS-Gel aufzuladen. Die fehlende Strap-Bande im Taschen 3 und 6 zeigt, dass das Protein sich nicht im Überstand( Supernatant) befindet. Es ist also auch nicht löslich.

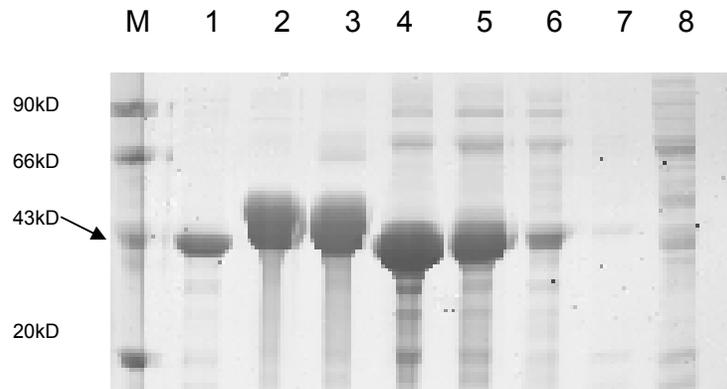
### 6.2.2 Wachstumskurve der Zellkultur E. Coli-Rosetta



**Bild 16 Wachstumskurve**

Die Wachstumskurve der E. coli. Rosetta Zellen zeigt ein exponentielles Wachstum, wobei die lag-Phase zwischen 0-50 zu sehen ist. Bei der Anlauf-Phase adaptieren sich die Zellen auf das neue Medium. Der Stoffwechsel stellt sich um, die Proteinsynthese beginnt und die Zellen beginnen, sich zu teilen. Die exponentielle oder log-Phase ist im Bild 16, zwischen 50min. und ca.150min. zu sehen, gefolgt von der stationären Phase 150-180min. In der stationären Phase ist das Medium durch den Substratzug der vordem gewachsenen Zellen erschöpft, die Zellen finden keine Nährstoffe mehr, das Wachstum wird eingestellt. Die letzte Phase, Absterbe-Phase fängt vor 200min. an, wobei die Zellen aufgrund von Substratmangel, exponentiell absterben. Die Wachstumskurve die in Bild 16 zu sehen ist, gehört zur eine induzierte Zellkultur. Nicht induzierte Zellen, können bis OD 4 wachsen.

### 6.2.3 Extraktion des STRAP Proteins aus der „inclusion bodies“



**Bild 17 Extraktion mittels Harnstoff**

M Marker

1. 6M Harnstoff (bis)

2. 6M Harnstoff

3. 5M Harnstoff

4. 4M Harnstoff

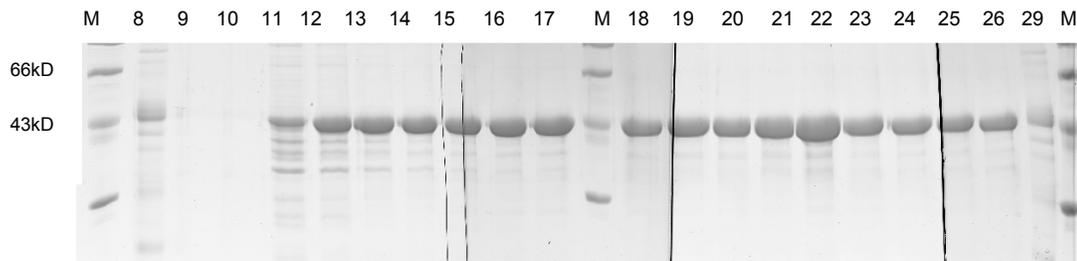
5. 3M Harnstoff

6. 2M Harnstoff

7. 1M Harnstoff

8. Waschpuffer A

Für das weitere Reinigungsverfahren wurde nur die Probe nr. 1 genommen. Obwohl diese Probe einen kleinen Anteil an Strap enthält, ist es am wenigstens beschmutzt und ist für die folgende Reinigungsprozeduren am besten geeignet. Das Ergebnis der Ni-NTA Chromatographie ist im Bild 18 dargestellt.



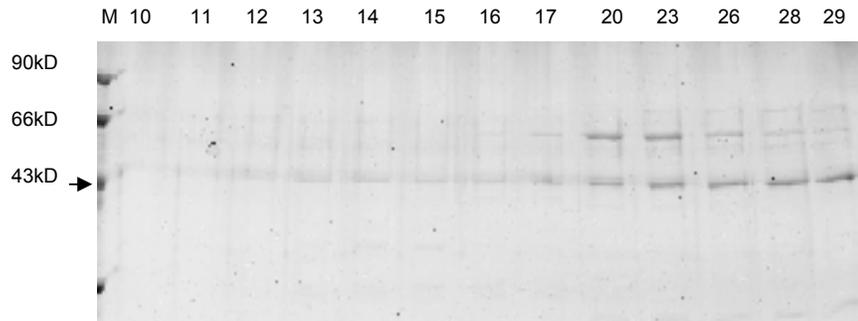
**Bild 18 Ni-NTA Chromatographie –Gradient**

In die Taschen 8, 9, 10 wurden Proben aufgetragen die unspezifisch zum Ni-NTA gebunden waren. Diese Proben enthalten von 80 mM bis 100 mM Imidazol. Erst nach die Elution mit einem Puffergemisch, der 110 mM Imidazol enthält, wurde das gewünschte Protein eingesammelt. In die Taschen 11 bis 29 wurden Proben aufgetragen, die aus den Fraktionen stammen. Die wachsende Proteinkonzentration ist hier zu bemerken. Je mehr Protein die Probe enthält, desto vorspringender der Streifen ist. Ein Maximum ist in der Geltasche nr. 22 zu sehen. Nur die am besten gereinigten Proben wurden weiter bearbeitet.

#### **6.2.4 Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie**

Eine andere wichtige und sehr häufig benutzte Reinigungsmethode ist die Anionenaustausch-Chromatographie.

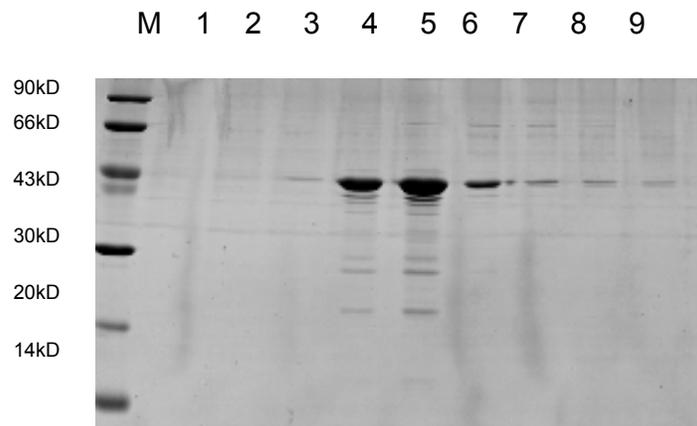
Das mittels Extraktion (6.2.3) erworbenes STRAP Protein wurde auch mittels Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Im Bild 19. sind die Ergebnisse der Reinigung vorgestellt. Im Vergleich zu der Ni-NTA Chromatographie hat diese Methode eine viel kleinere Ausbeute geliefert.



**Bild 19 Anionenaustausch-Chromatographie**

Ein SDS-Gel wurde mit kleinen Proben der Fraktionen von 10 bis 29 aufgeladen. Das Protein wurde aber sehr schwach zu der Sepharose-Matrix gebunden.

### 6.2.5 Reinigung mittels Gelfiltration



**Bild 20 Gelfiltration**

M Marker

Die Fraktionen 1 bis 9 enthalten mehr oder weniger das STRAP Protein. Dem Bild 20 entsprechend konnte man das STRAP Protein nicht vollständig reinigen. Die Analyse der Retentionszeit folglich der Gelfiltration zeigte, dass

das Protein bei einer Masse von ca. 100kD vorkommt. Die molare Masse des STRAP-Proteins ist 43kD.

Das STRAP-Protein wurde zwar aus der „inclusion bodies“ extrahiert und mittels chromatographische Methoden gereinigt, aber die bisher benutzten Methoden der Rückfal lieferten die erwartete Ergebnisse nicht. Mittels Gelfiltration wurde es bewiesen, dass das STRAP-Protein ein Aggregat mit einer Masse von ca. 100kD gebildet hat. Das agregiertes STRAP-Protein wurde auf eine Konzentration von 3,6 mg/ml eingestellt. Als Endprodukt wurden 5mg Protein mit einer Konzentration von 3,6mg/ml erworben.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Voet, Voet. Pratt: "Lehrbuch der Biochemie", WILEY-VCH, 2002  
2004, S. 61-S. 74
- (2) Alberts, Johnson, Lewis Ralf, Roberts, Walter; Molekularbiologie der Zelle;  
4 Auflage,
- (3) Waldmann, Janning: "Chemical Biology-A practical course", WILEY-VCH,
- (4) Brunsveld: Vorlesung: „Bioorganische Chemie WS 05/06“
- (5) Florin Dan Irimie: „Elemente de Biochimie I“ 1998
- (6) Sambrook and Russel: "Molecular Cloning, A laboratory manual" third Edition, Cold Sping Harbor, New York 2001
- (7) Ion Exchange Chromatography. Protein Purification, Principales, High resolution methods and Applications, Janson, J.C., Ryden, Publishers Inc. New York 1989
- (8) Protein Data Bank: [www.pdb.org/](http://www.pdb.org/)
- (9) Novagen: „pET System Manual“ 10-th Edition 2005
- (10) Novagen @ Calbiochem :” Sample Preparation”, Tools for Protein Research
- (11) Pharmacia Biotech: "Ion Exchange Chromatography" Principles and Methods,
- (12) Merk Biosciences: "Insect Direct System" Protein Expression @ Purification System 2004