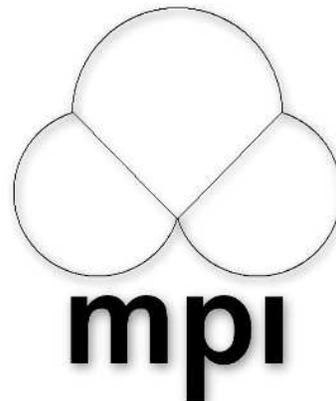
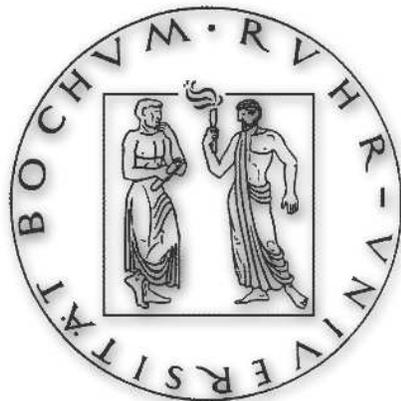


Bachelorarbeit

Charakterisierung einer Bindetasche der PAS-Domäne in *mouse* Period 2

vorgelegt von Christian Seifert



Ruhr-Universität Bochum / Max-Planck Institut für
molekulare Physiologie Dortmund

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ii
1 Einleitung	1
1.1 Cirkadianer Rhythmus	1
1.2 Der Regelzyklus auf molekularer Ebene	1
1.3 Struktur und Rolle von <i>mouse</i> PERIOD 2	3
1.4 Fragestellung	3
2 Material und Methoden	4
2.1 Geräte	4
2.2 Mikroorganismen	4
2.3 Oligonukleotide	4
2.4 Vektor	5
2.5 Lösungen und Puffer	6
2.6 Quantitative analytische Methoden	10
2.6.1 Bestimmung der Zelldichte	10
2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	10
2.7 Kultivierung von <i>E. coli</i>	11
2.7.1 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	11
2.7.2 Wachstum in Flüssigkultur zur Expressionsanalyse	12
2.8 Molekularbiologische Methoden	12
2.8.1 Überlappende PCR	12
2.8.2 Hitze-Schock-Transformation	12
2.8.3 Ligation eines DNA-Doppelstranges in einen Vektor	13
2.8.4 Reinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden	13
2.8.5 DNA-Sequenzanalyse	13
2.9 Proteinreinigung	13
2.9.1 Aufschluss	13
2.9.2 Aufreinigung	13
2.9.3 Precision-Verdau	13
2.9.4 Analytische Gelfiltration	14

3	Ergebnisse	15
3.1	Präparation der Vektoren	15
3.2	Expressionstest und Löslichkeit	15
3.3	Thermische Stabilität	18
3.4	Analyse der quartären Struktur	18
4	Diskussion	21
5	Zusammenfassung	22
A	Abbildungsverzeichnis	22
B	Tabellenverzeichnis	23
C	Literaturverzeichnis	25

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AS	Aminosäure
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Rinderserumalbumin (engl. Bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CH	Schweiz
CKI ϵ	Casein-Kinase-I ϵ
<i>cry</i>	Cryptochrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dPER	<i>Drosophila</i> PERIOD
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
MCS	multi cloning site (DNA-Bereich mit vielen spezifischen Zielen für DNA-Restriktionsendonukleasen)
mPer2	<i>mouse</i> PERIOD 2
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
<i>per</i>	Period
<i>per^S</i>	short-Period
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
SCN	suprachiasmatischer Nukleus
Std1	Standard I Medium
TB	Terific-Broth-Medium
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
U	Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Cirkadianer Rhythmus

Viele Lebewesen zeigen im Verlauf eines Tages unterschiedliche Verhaltensweisen, die ausschließlich von der Tageszeit abhängen. Darunter fallen z.B. Schlafgewohnheiten und Fresszeiten. Ursache für diese rhythmisch auftretenden Aktionen sind Konzentrationsänderungen bestimmter Proteine. Wiederholt sich dieser Rhythmus täglich, so spricht man von einem *circadianen* Rhythmus. Dieser Ausdruck stammt von den lateinischen Worten *circa*, zu deutsch: ungefähr und *dies*, dem Tag. Der Zyklus wird durch externe Reize (Umweltreize) synchronisiert und entspricht damit dem Modell eines endogenen Regelzyklus.

Beschrieben wurde die endogene Uhr 1971 von R.J. Konopka [1], der bei gentechnischen Experimenten Fliegen isolieren konnte, die bei konstanter Dunkelheit einen 19 h-, statt einen 24 h-Zyklus, beibehielten. Konopka machte das zugehörige Gen ausfindig und nannte es *short period* (per^S).

Im Säuger unterscheidet man zwischen der zentralen Uhr, die im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) des Hypothalamus angelegt ist, und den peripheren Oszillatoren, die in anderen Geweben vorkommen. Es wird vermutet, dass sich in nahezu allen Geweben periphere Oszillatoren befinden [3]. Nachgewiesen wurde dies bereits für Leber [2], Herz und Niere [4]. Periphere Uhren sind keine unabhängigen Oszillatoren, sondern werden durch die zentrale Uhr synchronisiert. Im Gegensatz zu den Oszillatoren im SCN klingen die peripheren Oszillatoren nach einer Zeit ab, wenn sie kein Signal des suprachiasmatischen Nucleus bekommen.

1.2 Der Regelzyklus auf molekularer Ebene

Der circadiane Tag startet mit der Aktivierung der Uhren-Gene *Period* ($per1/2$) und *Cryptochrom* (cry) durch den heterodimeren Transkriptionsfaktor CLOCK-BMAL1. PER2 wird im Cytosol durch die Casein-Kinase-I ϵ ($CKI\epsilon$) phosphoryliert, im Komplex mit CRY in den Kern transportiert. CRY wandert - nach verzögerter Synthese - mittels eines CRY/PER-Komplexes in den Zellkern und stoppt die Transkription seiner eigenen Gene. Weiterhin wird die BMAL1-Transkription PER vermittelt aktiviert. Die Expression von *bmal1* ist durch diese Rückkopplungs-Schleifen maximal, wenn diejenige der *per*- und *cry*-Gene am niedrigsten ist. BMAL1 kann so erneut Dimere mit dem konstant synthetisierten CLOCK formieren, die dann die Transkription von *per* und *cry* wieder anwerfen: Der circadiane Zyklus beginnt von vorn. Das ebenfalls tageszyklisch exprimierte PER3 überträgt die oszillierenden Signale des zentralen Taktgebers an nachgeschaltete Ausgabesysteme. [6]

1.3 Struktur und Rolle von *mouse* PERIOD 2

Die Struktur vom dPER-Fragment der Aminosäuren 232 bis 599 konnte von Yildiz *et al.* aufgeklärt werden. Es besteht aus 2 PAS-Domänen (PAS-A und PAS-B) und zwei zusätzlichen α -Helices (α E und α F), die im Kristall, in Lösung und in der Zelle ein Homodimer bilden [7]. Dabei ragt aus der PAS-B-Domäne ein Tryptophan des einen Monomers in die PAS-A-Domäne des anderen Monomers. Außerdem wird der Komplex von der α F-Domäne in einer Art Klammer zusammengehalten. Fehlt die α F-Domäne, so kommt das dPER-Fragment nur als Monomer vor [5].

Da die Struktur von *mouse* PERIOD 2 (mPer2) noch nicht aufgeklärt ist, wurde ein Sequenzvergleich mit dPER und eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt. Demnach sind auch in mPer2 zwei PAS-Domänen vorhanden. Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass mPer2 auch ohne eine α -Helix, die als Klammer fungiert, ein Dimer bildet. Entsprechend der Annahme, dass die Bindung der beiden mPer2-Moleküle zum Dimer auf die gleiche Weise wie im *Drosophila* Homolog stattfindet, wurde ein Tryptophan (welches äquivalent zum Tryptophan in dPER liegt) zum Glutamat mutiert. Das mutierte mPer2 trat als Monomer auf.

1.4 Fragestellung

Aus der Strukturvorhersage und der Monomerisierung der mPer2 W419E-Mutante ergibt sich die Überlegung, ob mPer2 eine ähnliche Bindetasche wie dPER aufweist. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit verschiedene Mutationen in die hypothetische Bindetasche eingefügt. Voruntersuchungen in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine T241E-Mutante weiterhin ein Dimer bildet. Da eine geladene Aminosäure in der Bindetasche nicht zur gewünschten Monomerenbildung geführt hat, wurden in dieser Arbeit aufgrund struktureller Überlegungen folgende Mutanten untersucht:

- T241Y, sterische Hinderung durch aromatischen Ring
- T241F, sterische Hinderung durch aromatischen Ring; hydrophober (um die Löslichkeit zu steigern)
- Doppelmutante T241F/F237W weitere sterische Hinderung
- Doppelmutante T241F/V232W weitere sterische Hinderung

Für diese Untersuchungen sollen:

- die Expressionsbedingungen optimiert und die Löslichkeit gesteigert,
- lösliche Proteine gereinigt und
- der Oligomerisierungsgrad mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Die folgenden Geräte wurden für die beschriebenen Experimente verwendet:

Gerät	Quelle/Fa.
Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg (BRD)
Tischzentrifuge Heraeus instruments Biofuge 13 mit Rotor 3757	Heraeus, Hanau (BRD)
Laborzentrifuge Hettich Universal 32 R mit Rotor 1619	Hettich, Bäch (CH)
Ultrazentrifuge Beckmann 32-HS Centrifuge mit Rotor JA 201	Beckmann Instruments, München (BRD)
Feinwaage Mettler PM480 Delta Range	Mettler-Toledo, Giessen (BRD)
Schüttler Infors Multitron	Infors HT GmbH, Bottmingen (CH)
Gelkammern BioRad Power PAC 300	BioRad, München (BRD)
Branson sonifier 450	Branson, Danbury (USA)
Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg (BRD)
Amersham pharmacia biotech ÄKTA prime	Amersham Pharmacia, Freiburg (BRD)
Amersham pharmacia biotech ÄKTA explorer	Amersham Pharmacia, Freiburg (BRD)

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.

2.2 Mikroorganismen

Die folgenden *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme wurden für die beschriebenen Experimente verwendet.

<i>Escherichia coli</i>	
Stamm	Genotyp
TG1	<i>supE hsdδ5 thi δ(lac-proAB) F'[traD36proAB⁺ lac^I lacZδM15]</i>
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)</i>

Tabelle 2.2: Verwendete *E. coli* Stämme.

2.3 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die beschriebenen Experimente verwendet. Alle Oligonukleotide wurden von Fa. Metabion, Martinsried (BRD) synthetisiert.

Name	Sequenz
Primer mPer2 [128-473] T241F _s	5'-GTGTGTTCCACAGCTACTTCACCCCTTACAAGCTTC-3'
Primer mPer2 [128-473] T241F _{as}	5'-GAAGCTTGTAAGGGGTGAAGTAGCTGTGGAACACAC-3'
Primer mPer2 [128-473] F237W-T241F _s	5'-GTGTGTGGCACAGCTACTTCACCCCTTACAAGCTTC-3'
Primer mPer2 [128-473] F237W-T241F _{as}	5'-GAAGCTTGTAAGGGGTGAAGTAGCTGTGCCACACAC-3'
Primer mPer2 [128-473] Flankierend _s	5'-GCTGGCGGCCGCTATGAATGGATACGTGGAC-3'
Primer mPer2 [128-473] Flankierend _{as}	5'-TGGCCTCGAGTCACGTCTGGGCCTCTATCCTG-3'

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide.

2.4 Vektor

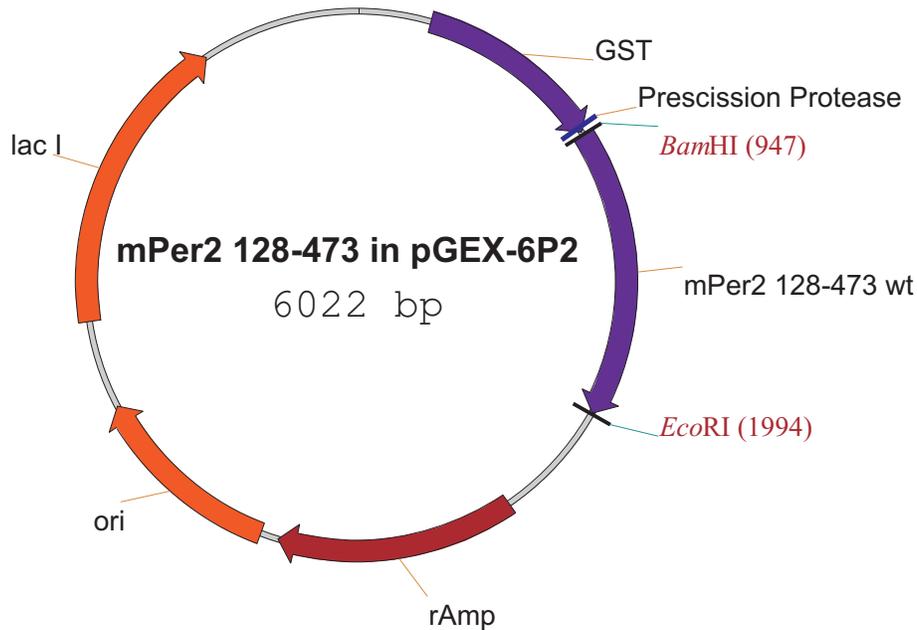


Abbildung 2.1: Vektorkarte von pGEX-6P2 mit integriertem Fragment [128-473] aus mPer2.

Der verwendete Vektor pGEX-6P2 hängt an das, in die MCS eingefügte, Genfragment eine GST-Bindedomäne über einen Linker mit einer Schnittstelle für die Protease Precission an. Bei der Translation entsteht somit ein Fusionsprotein aus dem gewünschten Protein und GST. Lässt man dieses Fusionsprotein über eine GSH-Säule laufen, so bindet es über schwache Wechselwirkungen an die Säule und kann mit GST eluiert werden. Um aus dem Fusionsprotein wieder das reine Protein zu gewinnen, kann der Linker zwischen beiden Proteinteilen mit der Protease Precission geschnitten werden.

Der *lac I* Bereich im Vektor ermöglicht die Induzierung einer Überexpression mittels IPTG. Ohne IPTG wird die Expression nicht gestartet. Der *origin of replication*, *ori* bildet den Startpunkt für die Replikation des Vektors, damit dieser bei der Zellteilung an Tochterzellen weitergegeben werden kann.

Der mit *rAmp* bezeichnete Bereich sorgt in *E. coli* für eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin in dem ansonsten anfälligen *E. coli*-Stamm. Lässt man transformierte *E. coli* auf einem Nährboden mit Ampicillin wachsen, so können nur die Mikroorganismen überleben, die auch den Vektor aufgenommen haben.

Vektor	Quelle/Fa.
pGEX-6P2-mPer2	AG Wolf, Dortmund
pGEX-6P2-mPer2-W419E	AG Wolf, Dortmund
pGEX-6P2-mPer2-T241Y	AG Wolf, Dortmund
pGEX-6P2-mPer2-V232W	AG Wolf, Dortmund
pGEX-6P2-mPer2-T241F	diese Arbeit
pGEX-6P2-mPer2-T241F-F237W	diese Arbeit
pGEX-6P2-mPer2-T241F-V232W	diese Arbeit

Tabelle 2.4: Verwendete Vektoren.

2.5 Lösungen und Puffer

4×SDS-Probenpuffer

Substanz	Konzentration		Menge für 10 ml	
Tris-Cl	250	mM	0,30	g
Glycerin	40	% (w/v)	4,00	g
SDS	8	% (w/v)	0,80	g
DTT	20	% (v/v)	2,00	ml
Bromphenolblau	0,2	% (w/v)	0,02	g

- ad 10 ml
- HCl bis pH 6,8

Tabelle 2.5: 4×SDS-Probenpuffer.

5×-DNA-Probenpuffer

Substanz	Konzentration		Menge für 10 ml	
87% Glycerin	50	% (w/v)	5,00	g
Bromphenolblau	0,1	% (w/v)	0,10	g

- ad 10 ml (TBE-Puffer)

Tabelle 2.6: 5×-DNA-Probenpuffer.

10×Maniatis SDS-Laufpuffer

Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
Tris-Cl	250	mM	30,30	g
Glycin	1,92	M	144,00	g
20% SDS	1	%	50,00	ml

- ad 1 l
- HCl bis pH 8,9

Tabelle 2.7: 10×SDS-Laufpuffer.

10×-TBE-Puffer

Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
Tris-Cl	900	mM	108,90	g
Borsäure	900	mM	55,62	g
EDTA	4	mM	1,49	g

- ad 1 l
- HCl bis pH 8,0

Tabelle 2.8: 10×-TBE-Puffer.

50×TAE-Laufpuffer			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
Tris	200	M	24,20 g
Aceton	0,8	M	57,10 ml
EDTA	0,25	M	50,00 ml
- ad 1 l			
- HCl bis pH 8			

Tabelle 2.9: 50×TAE-Laufpuffer.

100×PMSF-Stocklösung		
Substanz	Konzentration	
PMSF	100	mM
- in Ethanol		

Tabelle 2.10: 100×PMSF-Stocklösung.

Auftragspuffer-Proteinreinigung-Gelfiltration			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
Tris-Cl	50	mM	6,10 g
NaCl	400	mM	23,40 g
β -Mercaptoethanol	7	mM	0,50 ml
Glycerol	5	% (v/v)	50,00 ml
- ad 1 l			
- HCl bis pH 7,7			

Tabelle 2.11: Auftragspuffer-Proteinreinigung-Gelfiltration.

Auftragspuffer-Proteinreinigung-Anionenaustauschchromatographie			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
HEPES	25	mM	6,00 g
NaCl	50	mM	3,00 g
β -Mercaptoethanol	14	mM	1,00 ml
Glycerol	10	%	100,00 ml
- ad 1 l			
- HCl bis pH 6,8			

Tabelle 2.12: Auftragspuffer-Proteinreinigung-Anionenaustauschchromatographie.

Ampicillin-Stocklösung (1:2000)			
Substanz	Konzentration		Menge für 10 ml
Ampicillin	200	mg/ml	2,00 g
- ad 10 ml			

Tabelle 2.13: Ampicillin-Stocklösung.

Blocking-Puffer			
Substanz	Konzentration		Menge für 100 ml
10x PBS	1x		10,00 ml
10% Tween 20	0,2	% (v/v)	0,20 ml
Milchpulver	2	% (w/v)	2,00 g
- ad 100 ml			
- pH 7,5			

Tabelle 2.14: Blocking-Puffer.

Bradford-Lösung			
Substanz	Konzentration		Menge für 100 ml
Coomassie Blue G250	0,01	% (w/v)	0,10 g
Ethanol	50	% (v/v)	50,00 ml
H_3PO_4	8,5	% (v/v)	85,00 ml
- ad 1 l			

Tabelle 2.15: Bradford-Lösung.

Coomassie-Färbelösung				
Substanz	Konzentration		Menge für 100 ml	
Ethanol	40	% (v/v)	40,00	ml
Coomassie Blue R250	0,3	% (w/v)	0,30	g
Coomassie Blue G250	0,3	% (w/v)	0,30	g
- ad 100 ml				

Tabelle 2.16: Coomassie-Färbelösung.

Dialysepuffer				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
HEPES	25	mM	6,00	g
<i>NaCl</i>	50	mM	2,93	g
β -Mercaptoethanol	14	mM	1,00	ml
Glycerin	10	%	100,00	ml
- ad 1 l				
- <i>HCl</i> bis pH 6,8				

Tabelle 2.17: Dialysepuffer.

Elutionspuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
HEPES	25	mM	6,00	g
<i>NaCl</i>	400	mM	23,40	g
β -Mercaptoethanol	14	mM	1,00	ml
Glutathion	20	mM	6,20	g
- ad 1 l				
- <i>HCl</i> bis pH 6,8				

Tabelle 2.18: Elutionspuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose.

Entfärbelösung				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
Methanol	10	% (v/v)	100,00	ml
Essigsäure	7	% (v/v)	70,00	ml
- ad 1 l				

Tabelle 2.20: Entfärbelösung.

Entwicklerlösung		
Substanz	Menge für 0,5 l	
Natriumcarbonat (anhydr.)	30,00	g
37% Formaldehyd	250,00	μ l
Natriumthiosulfat $\cdot 5H_2O$	2,00	mg
- ad 0,5 l Millipore		
- bei 4°C verwenden		

Tabelle 2.21: Entwicklerlösung.

Elutionspuffer-Proteinreinigung-Anionenaustauschchromatographie				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
HEPES	25	mM	6,00	g
<i>NaCl</i>	1	M	58,50	g
β -Mercaptoethanol	14	mM	1,00	ml
Glycerol	10	%	100,00	ml
- ad 1 l				
- <i>HCl</i> bis pH 6,8				

Tabelle 2.19: Elutionspuffer-Anionenaustauschchromatographie.

Lysispuffer-Proteinreinigung I				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
HEPES	25	mM	6,00	g
<i>NaCl</i>	400	mM	23,40	g
β -Mercaptoethanol	20	mM	6,20	g
EDTA	1	mM	0,30	g
- ad 1 l				
- <i>HCl</i> bis pH 6,8				

Tabelle 2.22: Lysispuffer-Proteinreinigung I.

Lysispuffer-Proteinreinigung II				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
<i>Tris-Cl</i>	50	mM	6,10	g
<i>NaCl</i>	400	mM	23,40	g
β -Mercaptoethanol	14	mM	1,00	ml
EDTA	1	mM	0,30	g
- ad 1 l				
- <i>HCl</i> bis pH 7,7				

Tabelle 2.23: Lysispuffer-Proteinreinigung II.

Sammelgelpuffer				
Substanz	Konzentration		Menge für 100 ml	
<i>Tris-Cl</i>	0,5	M	6,10	g
SDS	0,4	% (w/v)	0,40	g
- ad 100 ml				
- <i>HCl</i> bis pH 6,8				

Tabelle 2.24: Sammelgelpuffer.

SOC-Medium				
Substanz	Konzentration		Menge für 0,1 l	
Hefeextrakt	0,5	% (w/v)	0,5	g
Trypton	2,0	% (w/v)	2,0	g
4M <i>NaCl</i>	10	mM	250	μ l
1M <i>KCl</i>	2,5	mM	250	μ l
1M <i>MgCl</i> ₂	10	mM	1,0	ml
1M <i>MgSO</i> ₄	10	mM	1,0	ml
Glukose	20	mM	0,4	g
- ad 100 ml				

Tabelle 2.25: SOC-Medium.

TG-Puffer				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
Tris	0,25	M	30,30	g
Glycin	1,92	M	144,00	g
- ad 1 l				

Tabelle 2.26: TG-Puffer.

Trenngelpuffer				
Substanz	Konzentration		Menge für 100 ml	
Tris-Cl	1,5	M	18,20	g
SDS	0,4	% (w/v)	0,40	g
- ad 100 ml				
- HCl bis pH 8,8				

Tabelle 2.27: Trenngelpuffer.

Waschpuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
Tris-Cl	50	mM	6,10	g
NaCl	400	mM	23,40	g
β -Mercaptoethanol	7	mM	0,50	ml
- ad 1 l				
- HCl bis pH 7,7				

Tabelle 2.28: Waschpuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose

Waschpuffer-Pulldown-GSH-Beads				
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l	
HEPES	25	mM	6,00	g
NaCl	200	mM	11,70	g
DTE	2	mM	0,30	g
- ad 1 l				
- HCl bis pH 7,7				

Tabelle 2.29: Waschpuffer-Pulldown-GSH-Beads.

2.6 Quantitative analytische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei ca. 1×10^9 *E. coli*-Zellen pro ml.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bestimmungen der Proteinkonzentration wurden mit dem Bradford-Assay durchgeführt. 1 ml Bradfordlösung (s. Lsg. 2.15) wird mit 1-10 μ l der Proteinlösung gemischt, OD bei 595 nm gemessen und Konzentration an Hand einer BSA-Kalibrierkurve bestimmt.

2.7 Kultivierung von *E. coli*

2.7.1 Medien zur Anzucht von *E. coli*

Die autoklavierten Medien wurden in den in Tabelle 2.31 und 2.32 angegebenen Mischungen zur Verfügung gestellt. Bei Medien, in denen transformierte Stämme eingesetzt wurden, wurde außerdem eine Ampicillinkonzentration von $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ eingestellt. Das Antibiotikum lag in einer 500×Stocklösung vor.

Standard I Nährbouillon			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
Spezialpepton	1,56	%(w/v)	15,6 g
Hefeextrakt	0,28	%(w/v)	2,8 g
<i>NaCl</i>	0,56	%(w/v)	5,6 g
D(+)-Glukose	0,10	%(w/v)	1,0 g
- ad 1 l			

Tabelle 2.30: Standard I Nährbouillon.

Standard I Medium			
Substanz	Konzentration		Menge für 1,5 l
Nährbouillon	2,5	%(w/v)	37,5 g
Vitamin B1	1	%(w/v)	1 Spatelspitze
Thymin	1	%(w/v)	1 Spatelspitze
- ad 1,5 l			

Tabelle 2.31: Standard I Medium.

TB-Vollmedium			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
1			
Trypton	1,2	%(w/v)	12 g
Hefeextrakt	2,4	%(w/v)	24 g
Glycerin	0,1	%(v/v)	4 ml
- ad 900 ml			
2			
KH_2PO_4	170	mM	2,31 g
K_2HPO_4	720	mM	12,54 g
- ad 100 ml			
- nach autoklavieren 1 und 2 mischen			

Tabelle 2.32: TB-Vollmedium.

LB-Vollmedium			
Substanz	Konzentration		Menge für 1 l
Hefeextrakt	0,5	%(w/v)	5,00 g
Bacto Trypton	1,0	%(w/v)	10,00 g
<i>NaCl</i>	1,0	%(w/v)	10,00 g
- ad 1 l			
- <i>NaOH</i> bis pH 7,5			

Tabelle 2.33: LB-Vollmedium.

2.7.2 Wachstum in Flüssigkultur zur Expressionsanalyse

Der *E. coli* Stamm wurde in Erlenmeyerkolben im Brutschüttler bei 37°C über 14 h angezogen. Die Kolbengröße richtete sich nach dem Kulturvolumen und entsprach ca. einem Drittel des Gefäßvolumens.

Zur Induktion der heterologen Expression wurden transformierte *E. coli* BL21-(DE3)-Zellen 2.2 aus einer Glycerinkultur oder direkt nach Transformation aus einer Kolonie verwendet. Damit wurde eine 100 bis 300 ml Vorkultur unter selektiven Bedingungen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Beimpfen der Hauptkultur von 5 oder 10 l TB-Vollmedium erfolgte mit der Vorkultur auf eine optische Dichte (bei 600 nm) von 0,1. Nach etwa 4 Stunden erfolgte die Induktion mit 0,1-0,3 mM sterilfiltriertem IPTG bei einer optischen Dichte (bei 600 nm) von ungefähr 0,7. Die Kulturen wurden über Nacht bei 18°C im Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 4°C, 4000 rpm für 15 Minuten. Anschließend wurde das Zellsediment bei -20°C gelagert.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Die Mutationen wurden mittels überlappender PCR(2.8.1) in das Genfragment(Aminosäuren 128 bis 473) von mPer2 eingefügt. Das mutierte Fragment wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten, in den Vektor pGEX-6P2 ligiert(2.8.3) und in einen TG1-Stamm(2.2) transformiert(2.8.2). Nach anschließender Reinigung(2.8.4) und Sequenzierung(2.8.5) wurde das Plasmid zur Proteinexpression verwendet.

2.8.1 Überlappende PCR

Bei einer PCR (Polymerase Kettenreaktion) werden mittels DNA-Polymerasen und Nukleotiden Genfragmente amplifiziert. Damit die Polymerase arbeiten kann, müssen sogenannte Primer dem Gemisch hinzugefügt werden. Ein Primer setzt ein flankierendes Ende des zu amplifizierenden Fragmentes, deshalb müssen zwei Primer zugesetzt werden, die auf gegenüberliegenden Strängen die beiden Enden des Fragmentes bilden.

In einer ersten PCR wurden in zwei Reaktionsgefäßen, mit jeweils einem flankierenden und einem mutagenen Primer, Mega-Primer hergestellt, die schon die gewünschte Mutation enthielten. Es folgte eine Aufreinigung der DNA mittels PCR purification set der Fa. GENOMED (Löhne, BRD). Die beiden erstellten Mega-Primer wurden mit den flankierenden Primern zusammengegeben und erneut eine PCR gestartet. Die erhaltenen DNA-Doppelstränge besitzen die gewünschte Punktmutation.

2.8.2 Hitze-Schock-Transformation

Um den Vektor in die Zelle zu transportieren, wurde eine Hitze-Schock-Transformation benutzt. Dabei nutzt man die Eigenschaft der verwendeten Organismen, bei plötzlicher Temperaturänderung genetisches Material aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und im Falle eines geeigneten Vektors, diesen zu integrieren. Dafür wurden

die Zellen 30 min auf Eis gelagert, anschließend für 45 sec auf 42°C erhitzt und sofort wieder für 5 min auf Eis gegeben. Zur Regeneration wurden 500 μ l SOC-Medium zugegeben und für 30 min auf 37°C erhitzt.

2.8.3 Ligation eines DNA-Doppelstranges in einen Vektor

Die Ligationsansätze enthielten ca. 50 ng Vector-DNA, ca. die dreifache Menge an DNA-Fragmenten, Ligasepuffer und 1 U T4-DNA-Ligase der Fa. Gibco (BRD) bei einem Ansatzvolumen von 20 μ l. Die Reaktion wurde für 16 h bei 16°C inkubiert.

2.8.4 Reinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Die DNA-Fragmente wurden entsprechend der Anleitung zur PCR Purification mit einem Kit der Fa. GENOMED (Löhne, BRD) durchgeführt.

2.8.5 DNA-Sequenzanalyse

Zur Verifizierung der klonierten Gene wurden DNA-Sequenzierungen mittels fluoreszenzmarkierten Nukleotiden bei der Fa. Qiagen (Hilden, BRD) in Auftrag gegeben.

2.9 Proteinreinigung

2.9.1 Aufschluss

Der Aufschluss geschah sonorisch mit einem Branson sonifier 450. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde der Aufschluss auf Eis durchgeführt und die Dauer auf anfängliche 1,5 min und anschließende 5 \times 30 sec, unterbrochen von kurzen Durchmischungen, begrenzt.

2.9.2 Aufreinigung

Nach Ultrazentrifugation für 1 h bei 28000 rpm in Beckmann 32-HS Zentrifuge mit einem JA 201 Rotor wurde der Überstand vom Sediment dekantiert und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde in eine 25 ml-(Fast-Flow)-GSH-Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ gegeben und mit Waschpuffer (Tab. 2.28) gereinigt. Die Elution erfolgte mittels Elutionspuffer (Tab. 2.18) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$.

2.9.3 Precission-Verdau

Die Protease Precission trennt den Linker zwischen den beiden Teilen des Fusionsproteins. Sie wird in 3,3 \times facher Masse zum gereinigten Fusionsprotein zugegeben und bei 4°C über 4 h inkubiert.

2.9.4 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration fand an einer Amersham pharmacia ÄKTA explorer statt. Die Absorption wurde bei 280 nm und 220 nm gemessen.

3 Ergebnisse

Um eine schnelle und kontrollierbare Expression zu garantieren, wurde ein BL21(DE3)-*E. coli*-Stamm(Kap. 2.2) mit pGEX-6P2(Kap. 2.4) verwendet.

3.1 Präparation der Vektoren

Der Vektor pGEX-6P2-mPer2-T241Y war in der Arbeitsgruppe schon vorhanden, so dass nur noch die Vektoren pGEX-6P2-mPer2-T241F, pGEX-6P2-mPer2-T241F-F237W und pGEX-6P2-mPer2-T241F-V232W angefertigt werden mussten. Die dafür benötigten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Für die T241F/V232W-Doppelmutante wurde der Vektor pGEX-6P2-mPer2-V232W als Vorlage verwendet.

Die Konstruktion geschah entsprechend Kapitel 2.8.

3.2 Expressionstest und Löslichkeit

Um ideale Expressionsbedingungen für das gesuchte Protein zu finden, wurden Kombinationen aus Temperatur und IPTG-Konzentration herangezogen. Dabei wurden Temperaturen von 18°C, 25°C und 30°C und IPTG-Konzentrationen von 0,03 mM, 0,1 mM und 1 mM verwendet. Die Inkubationszeiträume wurden entsprechend vorheriger Annahmen auf 4 h, 8 h und 16 h gesetzt. Dabei wurde der in Kapitel 2.2 beschriebene BL21-Stamm von *E. coli* verwendet. Die verwendete Kultur enthielt den Vektor pGEX-6P2 (siehe 2.4) mit eingefügtem mPer2-Fragment (Aminosäuren 128 bis 473) und der T241Y-Punktmutation. Das Anzuchtvolumen betrug in allen Fällen 100 ml.

Die Anzucht der Zellen, die Expression und die Aufreinigung wurde entsprechend der Angaben in Kapitel 2.7.2 angezogen und entsprechend Kapitel 2.9 gereinigt. Der Vorgang ist in Abb. 3.1 anschaulich gemacht worden. Abbildung 3.2 zeigt die Aufreinigung des Proteins in sechs Schritten. Die erste Bande zeigt die Zellbestandteile. Nach Zentrifugation sind im Überstand(**2**) und im Sediment(**3**) einzelne Banden voneinander zu unterscheiden. Auffällig ist, dass im Bereich von 60 kDa im Sediment(**3**) eine hohe Konzentration an Proteinen zu erkennen ist. Da für weitere Untersuchungen gelöstes mPer2 benötigt wird, sollte die Konzentration an präzipitiertem mPer2 möglichst gering sein. Das Eluat der GSH-Sepharosematrix in Spalte **6** wird in drei Banden aufgetrennt.

Aus Abbildung 3.3 ist zu entnehmen, dass die höchste Ausbeute an verwertbarem Protein bei einer 16 h Expression mit einer IPTG-Konzentration von 0,03 mM in auf 18°C temperiertem TB-Medium die höchste Ausbeute erbringt.

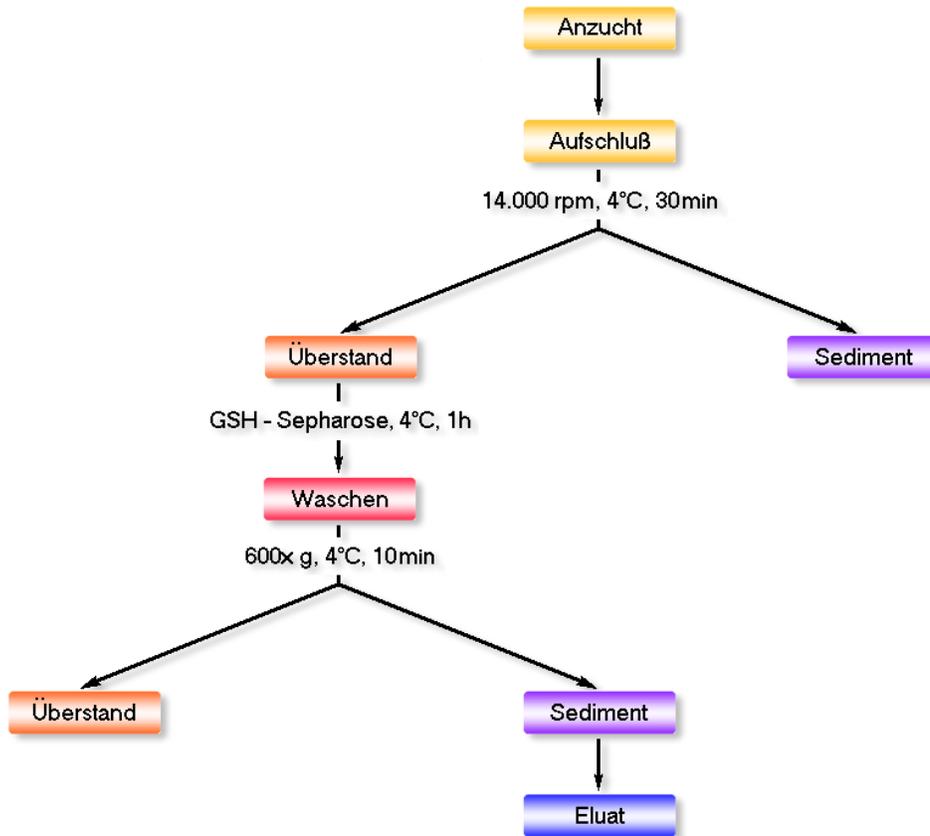


Abbildung 3.1: Schematischer Verlauf des Expressionstests.

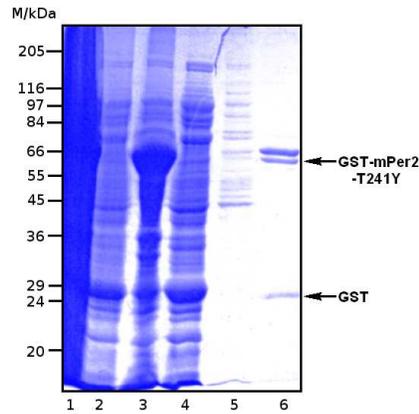


Abbildung 3.2: Reinigungsverlauf der T241Y-Mutante von mPer2 bei 18°C Inkubation über 8 h und einer Expressionsinduktion mit 0,1 mM IPTG. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassiefärbung. **1:** Zellbestandteile nach Induktion, **2:** Überstand nach 15000×g Zentrifugation über 1 h, **3:** Sediment, **4:** Überstand nach Zentrifugation der GSH-Sepharosematrix, **5:** letzter Waschschritt, **6:** Eluat.

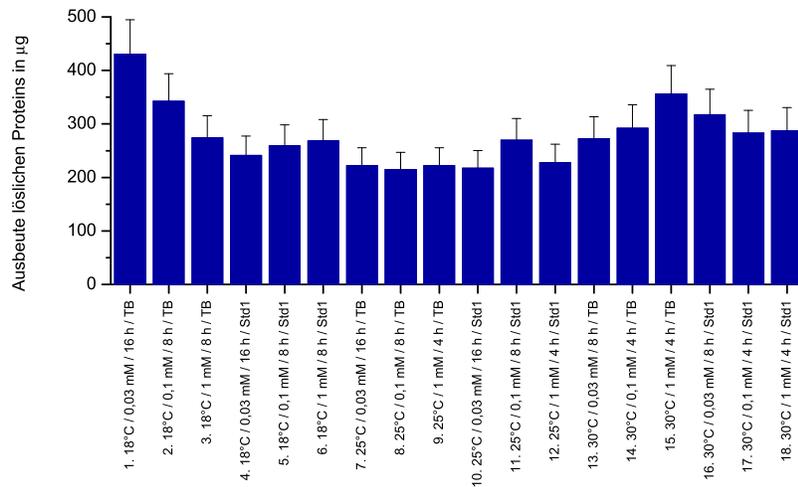


Abbildung 3.3: Ausbeute löslichen Proteins in µg für einen Ansatz von 100 ml Medium bei den angegeben Bedingungen. Die Beschriftung ist wie folgt geschlüsselt: Ansatz / Temperatur / IPTG-Konzentration / Expressionsdauer / Medium.

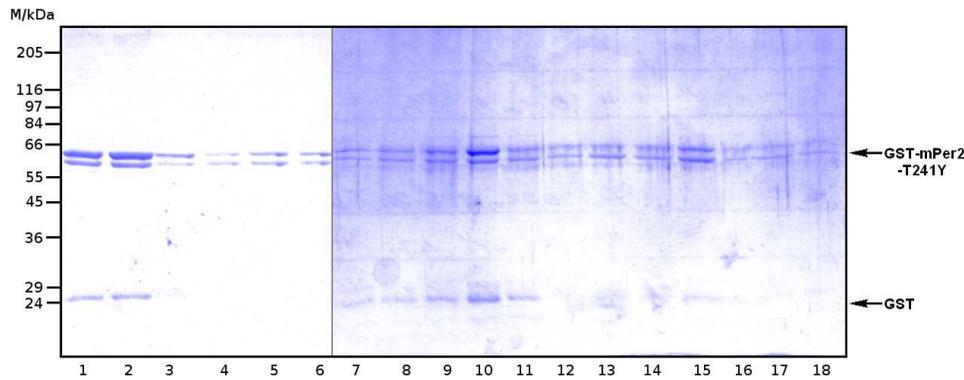


Abbildung 3.4: Eluate der T241Y-Mutante von mPer2. Darstellung von zwei 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen mit anschließender Coomassiefärbung. Die Nummerierung ist aus Abbildung 3.3 zu entnehmen.

3.3 Thermische Stabilität

Viele Proteine sind sehr anfällig gegenüber thermischer Zersetzung und Proteasen. Damit das unter optimalen Bedingungen gewonnene Protein nicht bei weiteren Schritten auf Grund dieser Anfälligkeiten verloren geht, wurde ein Stabilitätstest durchgeführt, der Aufschluss über die thermische Belastbarkeit geben soll. Abbildung 3.5 zeigt die T241Y-Mutante von mPer2 bei verschiedenen Bedingungen. In Abbildung 3.5 ist in der ersten Spur eine unbehandelte Probe aufgetragen. Die Proben in den Spalten zwei bis vier wurden über 16 h bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Die gefrorene und wieder aufgetaute Probe ist in Spalte zwei zu erkennen. In Spalte drei befindet sich mPer2, welches über 16 h bei Raumtemperatur, in Spalte vier bei 4°C gelagert wurde. Zu erkennen ist, dass die eingefrorene Probe die gleiche Intensität wie die Referenzprobe aufweist. Spalte vier zeigt leichte Abbauspuren, die sich durch eine schwächere Intensität auszeichnen. In Spalte drei ist dies noch stärker der Fall.

3.4 Analyse der quartären Struktur

Zu Beginn wurde die T241Y-Mutante analysiert. Die Expression aus einem 5 l Ansatz war zuvor durch die Arbeitsgruppe geschehen, so dass diese Arbeit mit der Aufreinigung des Proteins aus einem gefrorenen Zellsediment begann. Entsprechend der in Kapitel 2.9.2 beschriebenen Methode fand die Aufreinigung an einer 25 ml GSH-(Fast Flow)-Säule bei einer Durchlaufrate von $2 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ statt. Eluiert wurde mit $1 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ Glutathion in 4 ml Fraktionen. Entsprechend einer Konzentrationsbestimmung nach Bradford, konnten 6,34 mg Protein aufgefangen werden. Es wurde $1 \mu\text{l}$ Precision zugegeben und auf eine Proteinkonzentration von $1,8 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ eingengt. Dabei war zu beobachten, dass ein Versuch der weiteren Einengung zum Präzipitieren des Proteins führt. Abbildung 3.2 zeigt Proben vom Verlauf der Aufreinigung in einem 15%igen Gel. Eine Analyse des Oligomerisierungsgrades war auf Grund der geringen Konzentration und

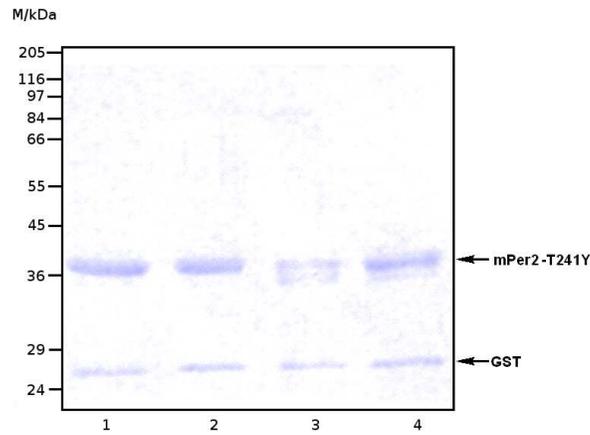


Abbildung 3.5: Stabilitätstest der T241Y-Mutante von mPer2. Darstellung eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels mit anschließender Coomassiefärbung. **1:** Referenz, **2:** gefroren und aufgetaut, **3:** 16 h bei Raumtemperatur, **4:** 16 h bei 4°C.

Masse mittels Größenausschlusschromatographie nicht möglich.

Unter der Annahme, dass die in Kapitel 3.2 gewonnen idealen Expressionsbedingungen auch für die T241F-Mutante gültig sind, wurde die Expression entsprechend durchgeführt. Die Aufreinigung geschah unter obigen Bedingungen. Das Ergebnis der Gelfiltration für diese Mutante ist in einer vergleichenden Grafik in Abbildung 3.6 aufgetragen. Der in blau aufgetragene Wildtyp des mPer2-Fragments[128-473] tritt nach 13,61 ml Elutionsvolumen maximal aus. Dabei handelt es sich um ein Homodimer. Die in grün aufgetragene W419E-Mutante ist als Vergleich für das Monomer aufgetragen. Die T241F-Mutante ist rot dargestellt. Sie schneidet zwar die Fläche der W419E-Mutante, liegt jedoch mit 15,65 ml Elutionsvolumen unter den 16,73 ml der W419E-Mutante.

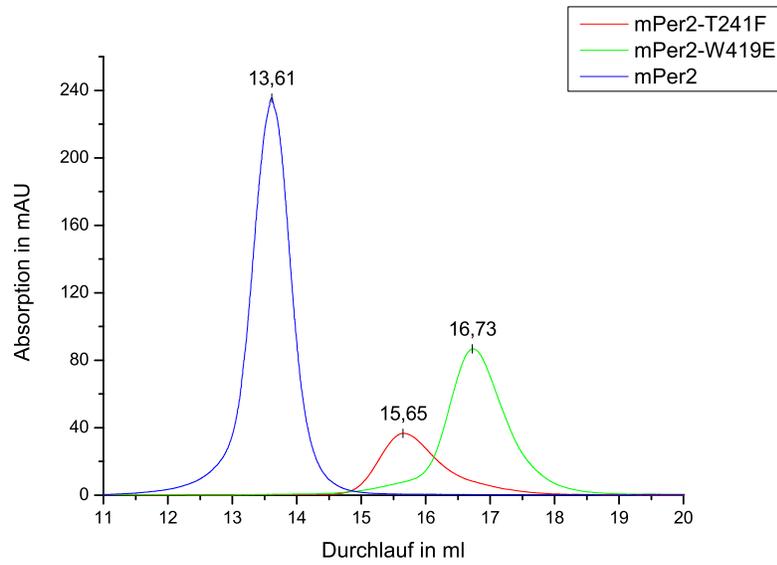


Abbildung 3.6: Laufverhalten bei der analytischen Größenausschlusschromatographie. Aufgetragen sind Mutationen und der Wildtyp des mPer2-Fragments [128-473].

4 Diskussion

Im Hinblick auf die großen Gemeinsamkeiten im Sequenzvergleich(alignment), zwischen dem in *Drosophila* vorkommenden dPER und mPer2, besteht die große Wahrscheinlichkeit, dass die in dPER nachgewiesene Bindetasche auch in mPer2 zu finden ist. Die bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass ausschließlich die W419E-Mutante in monomerer Form *in vitro* auftritt. Da eine bei Aminosäure 241 durchgeführte Punktmutation von Threonin zu Glutamat ein gänzlich unlösliches Protein hervorbringt, wurde versucht an dieser bedeutsamen Stelle weniger polare Aminosäuren zu verwenden, um die Löslichkeit zu steigern. Eine genaue Zuordnung der T241Y-Mutante des mPer2-Fragments zu einem Oligomerisierungsgrad ist jedoch auf Grund der geringen Menge und Konzentration nicht möglich. Eine Expression in größerem Volumenmaßstab wird nicht zu einer genaueren Analyse führen, da auch in diesem Fall keine Konzentration von über $1,8 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ erreicht werden kann.

Auch die T241F-Mutante war nur schlecht löslich, jedoch scheint die hydrophobe Gruppe des Phenylalanins die Löslichkeit zu steigern. Eine klare Zuordnung zum Monomer kann jedoch nicht geschehen, da die Elution in diesem Falle erst nach einem Volumen von ca. 16 ml geschehen sollte.

Die beiden Doppelmutanten werden von der Arbeitsgruppe weiter bearbeitet und analysiert.

Die in Kapitel 3.2 gewonnenen Ergebnisse zu idealen Expressionsbedingungen scheinen sich auf andere Mutanten übertragen zu lassen, da in anderen Versuchen mit diesen Werten auch hinreichend gute Ergebnisse erzielt wurden. Eine Expression über 16 h bei 18°C mit einer IPTG-Konzentration von 0,03 mM scheint somit für das mPer2-Fragment der Aminosäuren 128 bis 473 ideal zu sein.

5 Zusammenfassung

Betrachtet man den circadianen Zyklus der Maus, so stellt sich heraus, dass *mouse PERIOD 2* eine Schlüsselposition in diesem einnimmt. Dabei spielt vor allem die Komplexbildung und die Oligomerisierung eine entscheidene Rolle, da hierüber verschiedene Mechanismen miteinander verschaltet werden können. Da eine Strukturaufklärung am Kristall bei diesem Protein bisher erfolglos blieb, wurde in dieser Arbeit die Charakterisierung einer möglichen Bindestelle auf molekulargenetischem Wege untersucht.

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die Aminosäure Tryptophan-419 im untersuchten mPer2 Fragment[128-473] maßgeblich an der Bildung eines Homodimers beteiligt ist. Es ist anzunehmen, dass sich dieses wie bei dPER in einer Bindetasche einer PAS-Domäne befindet. Mutationen innerhalb der hypothetischen Bindetasche haben bisher keine Homodimerisierung verhindert. Dabei wurde eine genaue Charakterisierung erschwert, da die meisten Mutationen nur unzureichend lösliche Proteine bildeten. Um dennoch eine Charakterisierung zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit optimale Expressionsbedingungen für eine der untersuchten Mutanten entdeckt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Organisation der molekularen Uhr im SCN eines Säugers. Modifiziert nach [3].	2
2.1	Vektorkarte von pGEX-6P2 mit integriertem Fragment [128-473] aus mPer2.	5
3.1	Schematischer Verlauf des Expressionstests.	16
3.2	Reinigungsverlauf der T241Y-Mutante von mPer2 bei 18°C Inkubation über 8 h und einer Expression bei 0,1 mM IPTG.	17
3.3	Ausbeute löslichen Proteins in μg für einen Ansatz von 100 ml Medium bei den angegebenen Bedingungen. Die Beschriftung ist wie folgt geschlüsselt: Ansatz / Temperatur / IPTG-Konzentration / Expressionsdauer / Medium.	17
3.4	Eluate der T241Y-Mutante von mPer2. Darstellung von zwei 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen mit anschließender Coomassiefärbung.	18
3.5	Stabilitätstest der T241Y-Mutante von mPer2. Darstellung eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels mit anschließender Coomassiefärbung. 1 : Referenz, 2 : gefroren und aufgetaut, 3 : 16 h bei Raumtemperatur, 4 : 16 h bei 4°C.	19
3.6	Laufverhalten bei der analytischen Größenausschlusschromatographie. Aufgetragen sind Mutationen und der Wildtyp des mPer2-Fragments [128-473].	20

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte.	4
2.2	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	4
2.3	Verwendete Oligonukleotide.	4
2.4	Verwendete Vektoren.	6
2.5	4×SDS-Probenpuffer.	6
2.6	5×-DNA-Probenpuffer.	6
2.7	10×SDS-Laufpuffer.	6
2.8	10×-TBE-Puffer.	6
2.9	50×TAE-Laufpuffer.	7
2.10	100×PMSF-Stocklösung.	7
2.11	Auftragspuffer-Proteinreinigung-Gelfiltration.	7
2.12	Auftragspuffer-Proteinreinigung-Anionenaustauschchromatographie.	7
2.13	Ampicillin-Stocklösung.	7
2.14	Blocking-Puffer.	7
2.15	Bradford-Lösung.	7
2.16	Coomassie-Färbelösung.	8
2.17	Dialysepuffer.	8
2.18	Elutionspuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose.	8
2.20	Entfärbelösung.	8
2.21	Entwicklerlösung.	8
2.19	Elutionspuffer-Anionenaustauschchromatographie.	9
2.22	Lysispuffer-Proteinreinigung I.	9
2.23	Lysispuffer-Proteinreinigung II.	9
2.24	Sammelgelpuffer.	9
2.25	SOC-Medium.	9
2.26	TG-Puffer.	10
2.27	Trenngelpuffer.	10
2.28	Waschpuffer-Proteinreinigung-GSH-Sepharose	10
2.29	Waschpuffer-Pulldown-GSH-Beads.	10
2.30	Standard I Nährbouillon.	11
2.31	Standard I Medium.	11
2.32	TB-Vollmedium.	11
2.33	LB-Vollmedium.	11

Literaturverzeichnis

- [1] **R.J. Konopka und S. Benzer**, *Clock mutants of Drosophila melanogaster.*, Proc Natl Acad Sci U S A. **68(9)** (1971), 2112-2116;
- [2] **B. Kornmann, N. Preitner, D. Rifat, F. Fleury-Olela und U. Schibler**, *Analysis of circadian liver gene expression by ADDER, a highly sensitive method for the display of differentially expressed mRNAs.*, Nucleic Acids **29** (2001), E51-1;
- [3] **M. P. Pando und P. Sassone-Corsi**, *Signaling to the mammalian circadian clocks: In pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor.*, Science's stke **107** (2001), 1-9;
- [4] **D. Whitmore, N. S. Foulkes und P. Sassone-Corsi**, *Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock.*, Nature **404** (2000), 87-91;
- [5] **Ö. Yildiz, M. Doi, I. Yujnovsky, L. Cardone, A. Berndt, S. Hennig, S. Schulze, C. Urbanke, P. Sassone-Corsi und E. Wolf**, *Crystal Structure and Interactions of the PAS Repeat Region of the Drosophila Clock Protein PERIOD.*, Molecular Cell **17** (2005), 69-82;
- [6] **H. Zähringer**, *Circadiane Uhr-Gene*, Laborjournal **04** (2001);
- [7] **H. Zeng, Z. Qian, M. P. Myers und M. Rosbash**, *A light-entrainment mechanism for the Drosophila circadian clock.*, Nature **380** (1996), 129-135;