

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

# Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie

Daniel Alexander Breustedt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra

2. Univ.-Prof. B. Küster, Ph.D. (Univ. of Oxford/UK)

3. A.o.Univ.-Prof. Dr. B. Redl

(Universität Innsbruck/Österreich)

Die Dissertation wurde am 03.06.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.07.2008 angenommen.



*Meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline   | 1         |
| 1.2 Das humane Tränenlipocalin  | 6         |
| 1.3 Die humane Komplementkomponente C8 $\gamma$                                 | 7         |
| 1.4 Bakterielle Lipocaline  | 8         |
| 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit   | 10        |
| <b>2 Material und Methoden</b>  | <b>11</b> |
| 2.1 Material  | 11        |
| 2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, Vektoren und cDNA                        | 11        |
| 2.1.2 Oligodesoxynukleotide   | 12        |
| 2.1.3 Proteinreagenzien   | 13        |
| 2.1.4 Chemikalien   | 13        |
| 2.1.5 Standards, Kristallisations- <i>Screens</i> und Kits                      | 15        |
| 2.1.6 Geräte  | 16        |
| 2.1.7 Sonstiges Material  | 19        |
| 2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen                               | 21        |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden   | 25        |
| 2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen                | 25        |
| 2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA                         | 25        |
| 2.2.3 Isolierung von DNA aus <i>E. coli</i>                                     | 26        |
| 2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA                             | 26        |
| 2.2.3.2 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA                             | 27        |
| 2.2.4 <i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA                                    | 28        |
| 2.2.4.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen                                  | 28        |
| 2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen            | 29        |
| 2.2.4.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten              | 30        |
| 2.2.4.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung                        | 31        |
| 2.2.4.5 Ligierung von DNA-Fragmenten  | 31        |
| 2.2.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel                                   | 31        |
| 2.2.5 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA                                   | 32        |
| 2.2.5.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese                                   | 32        |
| 2.2.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten | 33        |
| 2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA  | 33        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>              | 34        |
| 2.3.1 Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben | 34        |
| 2.3.2 Produktion von Selenomethionin-markiertem Protein                           | 35        |
| 2.3.3 Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Laborfermenter | 36        |
| 2.4 Proteinchemische Methoden   | 38        |
| 2.4.1 Chromatographische Verfahren  | 38        |
| 2.4.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie                                    | 38        |
| 2.4.1.2 Größenausschlußchromatographie  | 38        |
| 2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                              | 39        |
| 2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen                                       | 40        |
| 2.4.4 Konzentrierung von Proteinen  | 40        |
| 2.5 Biophysikalische Methoden   | 41        |
| 2.5.1 Fluoreszenztitration  | 41        |
| 2.5.2 CD-Spektroskopie  | 45        |
| 2.6 Kristallographische Methoden  | 46        |
| 2.6.1 Proteinkristallisation  | 46        |
| 2.6.2 Datensammlung und Datenreduktion  | 46        |
| 2.6.3 Strukturlösung  | 47        |
| 2.6.4 Modellbau und Verfeinerung  | 47        |
| 2.7 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken                                  | 48        |
| <b>3 Ergebnisse</b>   | <b>49</b> |
| 3.1 Gentechnische Herstellung rekombinanter Lipocaline                            | 49        |
| 3.1.1 Konstruktion bakterieller Expressionsvektoren                               | 49        |
| 3.1.1.1 Amplifizierung der für die Lipocaline kodierenden Strukturgene            | 49        |
| 3.1.1.2 Klonierung der Strukturgene auf den Expressionsvektor<br>pASK75-strepII   | 51        |
| 3.1.1.3 Eliminierung freier Cysteinreste  | 53        |
| 3.1.2 Bakterielle Produktion und Isolierung der rekombinanten Proteine            | 54        |
| 3.1.2.1 Produktion im Schüttelkolben  | 54        |
| 3.1.2.2 Produktion des $\alpha_1$ -Mikroglobulins im Fermenter                    | 59        |
| 3.1.2.3 Reinigung der rekombinanten Lipocaline durch Gelfiltration                | 59        |
| 3.2 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Lipocaline                   | 61        |
| 3.2.1 CD-Spektroskopie  | 61        |
| 3.2.2 Liganden-Bindungsstudien mit Retinol  | 63        |
| 3.2.3 Liganden-Bindungsstudien mit Retinsäure                                     | 65        |
| 3.2.4 Bindungsstudien mit DAUDA   | 67        |
| 3.2.5 Bindungsstudien mit ANS   | 69        |
| 3.3 Röntgenstrukturanalyse des humanen Tränenlipocalins                           | 71        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.1 Optimierung der Kristallisation des Tränenlipocalins in der Raumgruppe C2                                      | 71         |
| 3.3.2 <i>In vivo</i> -Markierung des rekombinanten Tränenlipocalins mit Selenomethionin                              | 72         |
| 3.3.3 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung   | 73         |
| 3.3.4 Tertiärstruktur des in der Raumgruppe C2 kristallisierten Tränenlipocalins                                     | 76         |
| 3.3.5 Kristallisation des Tränenlipocalins in der Raumgruppe P2 <sub>1</sub>   | 80         |
| 3.3.6 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung   | 81         |
| 3.3.7 Vergleich der aus zwei unterschiedlichen Raumgruppen erhaltenen Strukturmodelle für das Tränenlipocalin        | 84         |
| 3.3.8 <i>Induced Fit</i> bei der Komplexbildung des humanen Tränenlipocalins mit einem artifiziellen Liganden        | 88         |
| 3.3.9 Struktureller Vergleich des Tränenlipocalins mit anderen Lipocalinen   | 88         |
| 3.4 Röntgenstrukturanalyse der Komplementkomponente C8 $\gamma$  | 91         |
| 3.4.1 Kristallisation und Datensammlung  | 91         |
| 3.4.2 Strukturlösung und Verfeinerung  | 92         |
| 3.4.3 Tertiärstruktur der Komplementkomponente C8 $\gamma$   | 93         |
| 3.4.4 Struktureller Vergleich des C8 $\gamma$ mit dem epididymalen Retinsäure-Bindungsprotein der Ratte              | 94         |
| 3.5 Kristallisation weiterer Lipocaline  | 96         |
| <b>4 Diskussion</b>  | <b>98</b>  |
| 4.1 Heterologe Produktion von Lipocalinen in <i>E. coli</i>  | 98         |
| 4.2 Funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Lipocaline: Vergleich der Liganden-Bindungseigenschaften        | 101        |
| 4.3 Die Struktur des humanen Tränenlipocalins  | 106        |
| 4.4 Strukturelle Flexibilität des humanen Tränenlipocalins und Komplexierung eines Liganden durch <i>Induced Fit</i> | 108        |
| 4.5 Protease-Inhibition durch das N-terminale Peptidsegment des humanen Tränenlipocalins?                            | 110        |
| 4.6 Die Struktur der humanen Komplementkomponente C8 $\gamma$  | 115        |
| <b>5 Zusammenfassung</b>   | <b>118</b> |
| <b>6 Literatur</b>   | <b>120</b> |
| <b>7 Abkürzungen</b>   | <b>135</b> |





# 1 Einleitung

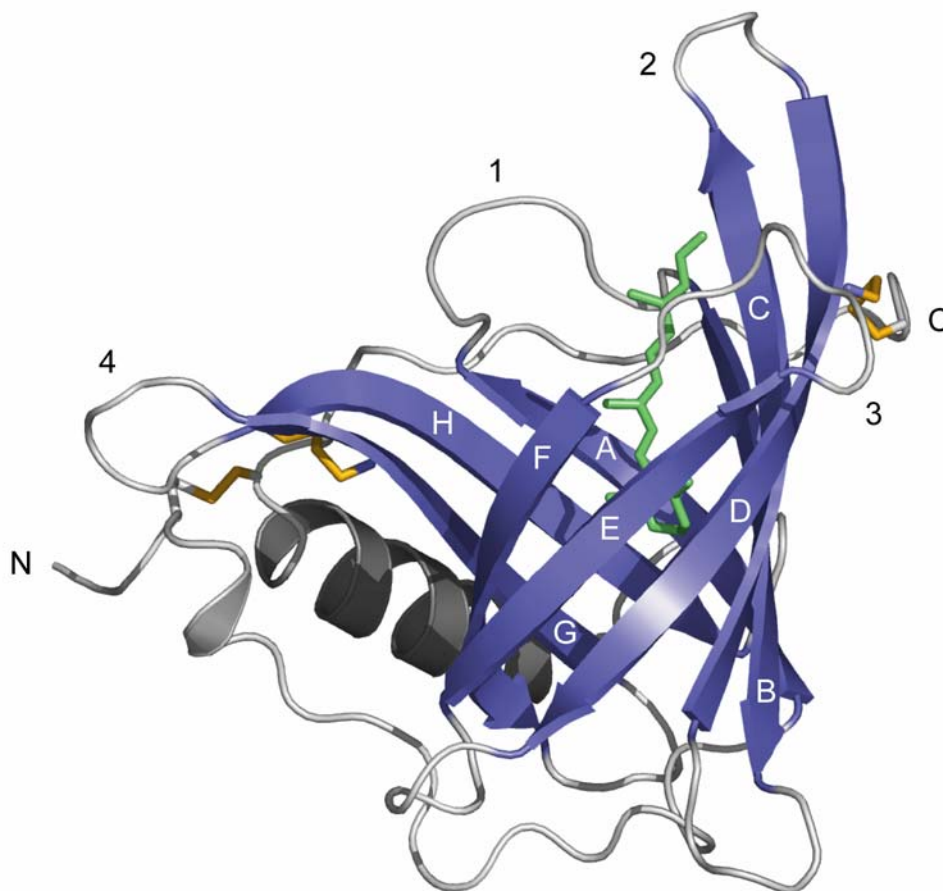
## 1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline

Seit ihrer Definition durch Pervaiz und Brew (1985) anhand der Homologie der Aminosäuresequenzen von  $\beta$ -Lactoglobulin (Blg), Retinol-Bindungsprotein (RBP) und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin ( $\alpha_1m$ ) ist die Proteinfamilie der Lipocaline stetig gewachsen, und sie umfasst mittlerweile etwa 200 Mitglieder (<http://www.jenner.ac.uk/Lipocalin/frontpage.htm>; Ganfornina *et al.*, 2000). Die Vertreter dieser Familie sind typischerweise kleine, aus etwa 150 bis 190 Aminosäuren bestehende, extrazelluläre Proteine, welche eine Vielzahl von physiologischen Funktionen erfüllen. Meist spielt dabei ihre Fähigkeit zur Komplexierung kleiner, in der Regel hydrophober Liganden im Inneren einer kelchartigen Bindungstasche, welche den Lipocalinen ihren Namen gab (griechisch *calyx* = Kelch; Pervaiz & Brew, 1987), eine wichtige Rolle. Neben dieser Funktion, welche ursprünglich zu ihrer Klassifizierung als Transportproteine führte, bilden einige Lipocaline kovalente wie auch nicht-kovalente Komplexe mit anderen löslichen Proteinen oder interagieren mit membranständigen Rezeptoren auf Zelloberflächen (Übersicht in Flower, 2000a). Zudem wurden verschiedene Lipocaline, die von Tieren sekretiert werden, als Auslöser allergischer Reaktionen des Menschen identifiziert. Unter anderem aufgrund dieser Befunde ist die Proteinfamilie der Lipocaline Gegenstand aktueller Forschung (Åkerström *et al.*, 2000a; Flower, 2003).

Eines der funktionell am besten charakterisierten Lipocaline ist das RBP, welches den Transport von Retinol im Plasma vermittelt (Raghu & Sivakumar, 2004). Es ist zugleich das erste Lipocalin, dessen dreidimensionale Struktur bestimmt werden konnte (Abbildung 1; Newcomer *et al.*, 1984), und somit der Prototyp dieser Proteinfamilie. Das zentrale Faltungsmotiv dieses Proteins wird durch ein achtsträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt gebildet, welches sich um eine zentrale Achse windet und dabei auf sich selbst zurückfaltet. An einem Ende dieser faßartigen Supersekundärstruktur werden die  $\beta$ -Stränge durch kurze Peptidschleifen verknüpft, und der Zugang zum Inneren des  $\beta$ -Barrels wird durch das unter dem Protein hindurchlaufende N-terminale Peptidsegment sowie durch dichte Packung von Aminosäureseitenketten verschlossen. Das gegenüberliegende Ende des  $\beta$ -Barrels ist zum Lösungsmittel geöffnet und bildet den Zugang zur Liganden-Bindungstasche. Mit Ausnahme des ersten, etwas längeren *Loops*, welcher die beiden (N-terminalen)  $\beta$ -Stränge A und B miteinander verknüpft und sich über die Öffnung des  $\beta$ -Barrels legt, sind die  $\beta$ -Stränge auch durch Haarnadelschleifen verbunden. Der Ligand Retinol wird im Zentrum des  $\beta$ -Barrels von der offenen Seite her gebunden und ist hauptsächlich von hydrophoben Aminosäureseitenketten umgeben, während seine Hydroxylgruppe dem Lösungsmittel ausgesetzt ist. Ein weiteres Strukturmerkmal des RBP ist die C-terminale  $\alpha$ -Helix, welche

seitlich gegen das  $\beta$ -Barrel gepackt ist und von einem nahezu gestreckten abschließenden Peptidsegment gefolgt wird.

In den letzten Jahren ist die Anzahl der durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Methoden bestimmten Lipocalinstrukturen kontinuierlich gestiegen (Flower, 2000b). Es zeigte sich, daß das zentrale Faltungsmotiv der Lipocaline, das achtsträngige  $\beta$ -Barrel, ein bei den Vertretern dieser Proteinfamilie hoch konserviertes Element der Proteinarchitektur darstellt (Skerra, 2000). Auch die C-terminale  $\alpha$ -Helix, welche nur wenig in ihrer Länge variiert, ist bei allen Lipocalinen vorhanden und immer in sehr ähnlicher Art und Weise zum  $\beta$ -Barrel orientiert. Im Gegensatz hierzu zeigen die vier *Loops* am Eingang der Liganden-Bindungstasche eine sehr hohe Variabilität, sowohl in ihrer Länge als auch in der Konformation.



**Abbildung 1:** Kristallstruktur des humanen Retinol-Bindungsproteins. Das Rückgrat dieses prototypischen Lipocalins (PDB-Eintrag 1RBP; Newcomer *et al.*, 1984) mit dem Verlauf der  $C\alpha$ -Atome ist als Bänder-Modell dargestellt. Zu sehen sind die acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstränge A bis H (blau), die als Supersekundärstruktur das  $\beta$ -Barrel ausbilden, und die C-terminale  $\alpha$ -Helix (grau). N und C bezeichnen die entsprechenden Termini der Polypeptidkette. Der Eingang zur zentralen Liganden-Bindungstasche, in welcher der gebundene Ligand Retinol als Stab-Modell dargestellt ist (grün), wird von den *Loops* 1 bis 4 flankiert. Die drei Disulfidbindungen des RBP sind als Stab-Modell in gelb dargestellt.

Trotz dieser großen Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Faltung weisen die verschiedenen Vertreter der Lipocaline eine ungewöhnlich niedrige Konservierung der Aminosäuresequenz

auf, so daß bei paarweisen Vergleichen die Sequenzidentität gewöhnlich unter 20 % liegt. Dennoch kann eine Zuordnung zu dieser Proteinfamilie anhand von einigen kurzen, hochkonservierten Sequenzsignaturen erfolgen, die, obwohl sie in der Primärstruktur weit auseinander liegen, im gefalteten Protein direkt miteinander in räumlichen Kontakt treten. Der erste dieser Sequenzbereiche liegt am N-Terminus der Polypeptidkette und besteht aus einer kurzen  $3_{10}$ -Helix und dem in allen Lipocalinen vorhandenen Gly-aa-Trp Motiv, welches im hydrophoben Kern des  $\beta$ -Barrels begraben liegt. Der zweite konservierte Sequenzbereich wird von den  $\beta$ -Strängen F und G sowie von der sie verbindenden kurzen Peptidschleife gebildet, während das dritte Motiv in der Peptidschleife zwischen dem  $\beta$ -Strang H und der C-terminalen  $\alpha$ -Helix liegt. Die Seitenkette des dort konservierten Arg- bzw. Lys-Rests schirmt dabei meist die Trp-Seitenkette des ersten Sequenzbereiches vom Lösungsmittel ab (Flower, 1996).

Die hohe Sequenzvariabilität in Verbindung mit der räumlichen Plastizität der Schleifenregion ermöglicht die Ausbildung von sehr unterschiedlich beschaffenen Liganden-Bindungstaschen bei den verschiedenen Lipocalinen. Dabei ist der für die Spezifität der molekularen Erkennung wichtige Bereich am offenen Ende des  $\beta$ -Barrels sehr gut an die physiologische Funktion des jeweiligen Proteins angepasst. Während das RBP mit seiner sehr schmalen, hydrophoben Bindungstasche den Liganden Retinol eng umschließt (siehe oben), besitzt das humane *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) beispielsweise eine weit geöffnete, trichterförmige und zudem positiv geladene Liganden-Bindungstasche (Goetz *et al.*, 2002). Auch diese ist optimal an die Komplexierung des natürlichen Liganden, eines negativ geladenen bakteriellen Siderophors (Flo *et al.*, 2004), adaptiert. Trotz ihrer sehr unterschiedlichen Form, Größe und Ladung werden die Liganden von ihren jeweiligen Lipocalin-Bindungspartnern spezifisch erkannt und mit mikromolaren bis nanomolaren Dissoziationskonstanten gebunden (Cogan *et al.*, 1976; Goetz *et al.*, 2002).

Die robuste Natur des zentralen  $\beta$ -Barrel-Faltungsmotivs, welches die vier strukturell hypervariablen *Loops* trägt, macht die Lipocaline auch zu einem vielversprechenden Protein-*Scaffold* (englisch *Scaffold* = Gerüst) für die Implementierung neuer Bindungsfunktionen durch kombinatorisches *Protein Engineering* (Schlehuber & Skerra, 2005; Skerra, 2001). So konnten durch den Austausch von Seitenketten in der Schleifenregion die Liganden-Bindungstaschen verschiedener Lipocaline so umgestaltet werden, daß artifizielle Bindungsstellen für neue Liganden entstanden. Diese künstlichen Bindungsproteine, sogenannte Anticaline, sind in der Lage, Haptene wie Fluorescein oder Digoxigenin, aber auch andere Proteine mit zum Teil nanomolaren Dissoziationskonstanten zu komplexieren (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber *et al.*, 2000; Vogt & Skerra, 2004).

Die natürlichen Lipocaline werden zusammen mit den Fettsäure-Bindungsproteinen (*Fatty Acid-Binding Proteins*, FABPs) und den Avidinen der Proteinsuperfamilie der Calycine

zugeordnet. Ähnlich wie die Lipocaline sind auch die anderen Vertreter der Calycine in der Lage, kleine hydrophobe Liganden zu binden, und auch sie weisen eine  $\beta$ -Barrel-Proteinarchitektur auf. Während die FABPs intrazellulär lokalisiert, in den Lipidstoffwechsel eingebunden und aus einem zehnsträngigen, diskontinuierlichen  $\beta$ -Barrel aufgebaut sind, weisen die Avidine ein den Lipocalinen ähnliches achtsträngiges  $\beta$ -Barrel auf. Im Gegensatz zu den Lipocalinen findet sich bei den anderen Vertretern der Calycine jedoch keine C-terminale  $\alpha$ -Helix. Zwei weitere Proteine, das Triabin (Fuentes-Prior *et al.*, 1997) und der Metallprotease-Inhibitor *Inh* (Baumann *et al.*, 1995), wurden kürzlich ebenfalls den Calycinen zugeordnet (Flower *et al.*, 2000). Diese beiden Proteine unterscheiden sich funktionell von allen anderen Calycinen, da sie zwar nicht zur Bindung von niedermolekularen Liganden befähigt sind, dafür aber inhibitorische Wirkung auf bestimmte Proteasen besitzen.

Abgesehen von ihrer weiten Verbreitung in Vertebraten und Nichtvertebraten, Pflanzen (Hieber *et al.*, 2000) und sogar Bakterien (siehe auch Abschnitt 1.4; Bishop, 2000) gibt es mindestens zehn verschiedene Mitglieder der Proteinfamilie der Lipocaline, welche im menschlichen Organismus vorkommen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese Lipocaline, ihre strukturellen und funktionelle Eigenschaften, und ihre Organlokalisierung. Neben diesen gut charakterisierten humanen Lipocalinen gibt es noch zwei potentielle Vertreter der Proteinfamilie im Menschen, das Apolipoprotein M (ApoM; Xu & Dahlbäck, 1999) und das epididymale Retinsäure-Bindungsprotein (*Epididymal Retinoic Acid Binding Protein*, ERABP; Hamil *et al.*, 2003). Während ApoM schon isoliert und teilweise charakterisiert werden konnte, wurde die Existenz eines humanen ERABP bisher lediglich genetisch und immunologisch nachgewiesen (Ong *et al.*, 2000).

Den humanen Lipocalinen werden verschiedene physiologische Funktionen zugeschrieben, unter anderem bei der Modulierung des Zellwachstums und Regelung des Stoffwechsels – für ApoD (Dilley *et al.*, 1990),  $\alpha_1\text{m}$  (Åkerström *et al.*, 2000b) und NGAL (Kjeldsen *et al.*, 2000), bei der Regulierung der Immunantwort – für AGP (Hocheppied *et al.*, 2003),  $\alpha_1\text{m}$  (Åkerström *et al.*, 2000b), Glycodelin (Seppala *et al.*, 2002) und C8 $\gamma$  (Schreck *et al.*, 2000), beim Transport von Retinol – für RBP (Newcomer & Ong, 2000), bei der enzymatischen Synthese von Prostaglandin D<sub>2</sub> – für PGDS (Urade & Hayaishi, 2000), und schließlich im Zusammenhang mit olfaktorischen Prozessen – für OBP (Briand *et al.*, 2002). Aufgrund dieser vielseitigen Funktionen finden Lipocaline medizinische Anwendung als diagnostische Marker. Während AGP und NGAL als Marker für Entzündungsprozesse dienen (Routledge, 1989; Venge, 1994), können anhand von  $\alpha_1\text{m}$  Fehlfunktionen der Niere (Kido *et al.*, 1985) und mittels Glycodelin die Schwangerschaft (Waites & Bell, 1989) diagnostiziert werden.

Tabelle 1: Die humanen Lipocaline

| Lipocalin   | Abkürzung   | Ort der Synthese                                 | Aminosäure-Reste | Disulfid-Brücken | Glykosylierung | Oligomerer Status | Physiologische Liganden   |
|---|-------------|--|------------------|------------------|----------------|-------------------|---|
| <i><math>\alpha_1</math>-Acid Glycoprotein</i>    | AGP         | Leber  | 183              | 2                | +              | M                 | Unbekannt   |
| $\alpha_1$ -Mikroglobulin                         | $\alpha_1m$ | Leber, Niere, Plasma                             | 183              | 1                | +              | M/H               | Häm   |
| Apolipoprotein D                                  | ApoD        | Milz, Plazenta, ZNS,<br>Niere                    | 169              | 2                | +              | M/H               | Progesteron,<br>Arachidonat   |
| Komplementkomponente<br>$\gamma_8$                | C8 $\gamma$ | Leber  | 182              | 1                | -              | H                 | Unbekannt   |
| Glycodelin  | Gly         | Endometrium,<br>Eierstock, Brust                 | 162              | 2                | +              | D                 | Unbekannt   |
| <i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i> | NGAL        | Neutrophile                                      | 178              | 1                | +              | M/D/H             | Enterobactin  |
| <i>Odorant-Binding Protein</i>                    | OBP         | Olfaktorisches<br>Epithelium                     | 155              | 1                | -              | M                 | Unbekannt   |
| Prostaglandin-D-Synthase                          | PGDS        | ZNS  | 168              | 1                | +              | M                 | Prostaglandin D   |
| Retinol-Bindungsprotein                           | RBP         | Leber  | 183              | 3                | -              | M/H               | Retinol   |
| Tränenlipocalin                                   | Tlc         | Tränendrüsen,<br>Prostata, Niere,<br>Thymus u.a. | 158              | 1                | -              | M/D               | Fettsäuren,<br>Fettsäurederivat<br>e, Cholesterin,<br>Triacylglycerin |

M: Monomer; D: Dimer; H: Heterodimer

## 1.2 Das humane Tränenlipocalin

Das Tränenlipocalin wurde ursprünglich als einer der Hauptbestandteile der Tränenflüssigkeit beschrieben, welcher 15 bis 33 % des Gesamtproteinanteils ausmacht und von den Tränendrüsen sekretiert wird (Bonavida *et al.*, 1969; Josephson & Lockwood, 1964). Danach konnte nachgewiesen werden, daß Tlc auch in einigen anderen Geweben synthetisiert wird, z. B. in sekretorischen Drüsen der Zunge, der Nasenschleimhäute und des Tracheobronchialtraktes, in Schweißdrüsen, in der Brustdrüse, der Nebenniere, der Hirnanhangdrüse sowie in Prostata, Thymus und Hoden (Lacazette *et al.*, 2000; Redl, 2000; Scalfari *et al.*, 1997; Wojnar *et al.*, 2002).

Die Klonierung und Sequenzierung seiner cDNA zeigte, daß das Tlc ein Mitglied der Proteinfamilie der Lipocaline ist und signifikante Homologie mit der Aminosäuresequenz von  $\beta$ -Lactoglobulin (Blg) besitzt (Redl *et al.*, 1992). Da ihm jedoch im Gegensatz zu diesem einer der drei für Lipocaline typischen, hochkonservierten Sequenzbereiche (siehe Abschnitt 1.1) fehlt, wurde das Tlc den *Outlier Lipocalins* zugeordnet. Diese „weiteren Lipocaline“, zu denen auch die *Odorant-Binding Proteins* (OBPs) und die  *$\alpha_1$ -Acid Glycoproteins* (AGPs) gehören, werden von den *Kernel Lipocalins* (engere Lipocaline) unterschieden, welche über alle drei Sequenzsignaturen verfügen. Dennoch wurde für das Tlc auf der Basis seiner Aminosäuresequenz und aufgrund von Daten aus einer Circular dichroismus-Analyse die typische Lipocalinfaltung vorhergesagt (Redl *et al.*, 1992; Glasgow *et al.*, 1998).

Zudem konnten mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden die Sekundärstrukturelemente des Tlc innerhalb der Primärstruktur lokalisiert und mit denen anderer Lipocalinen verglichen werden (Gasymov *et al.*, 2001). Auch in dieser Studie zeigte sich eine deutliche Homologie mit dem Blg, welches infolgedessen als Grundlage für die Konstruktion eines dreidimensionalen Modells des Tlc herangezogen wurde. Anhand der Massenbestimmung tryptischer Fragmente konnte zudem nachgewiesen werden, daß zwei der drei Cys-Reste des Tlc, Cys-61 und Cys-153, durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind, während Cys-101 als freies Cystein vorliegt (Glasgow *et al.*, 1998). Diese Disulfidbrücke ist in den meisten Lipocalinen konserviert und verbindet das  $\beta$ -Barrel, gewöhnlich den  $\beta$ -Strang D, mit dem C-terminalen Peptidsegment (Skerra, 2000). Die Reduktion dieser Disulfidbrücke hat keine signifikante Auswirkung auf die Sekundärstruktur, beeinflusst aber das Liganden-Bindungsverhalten des Tlc (Glasgow *et al.*, 1998).

Trotz seiner Zuordnung zur Proteinfamilie der Lipocaline besitzt das Tlc einige biochemische Aktivitäten, die auf einzigartige strukturelle Eigenschaften dieses Proteins schließen lassen. Wie die meisten Vertreter der Proteinfamilie bindet es kleine, hydrophobe Moleküle, zeigt im Vergleich zu anderen Lipocalinen jedoch eine ungewöhnlich breite Ligandenspezifität. So konnte eine große Zahl an lipophilen Substanzen aus verschiedenen chemischen Klassen, unter anderem der Fettsäuren, Phospholipide und Glycolipide sowie Cholesterin, Retinol und

Arachidonsäure und schließlich Isoprostane als Lipid-Peroxidationsprodukte in Tlc-Proben aus Tränenflüssigkeit bzw. humanen NT2-Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Glasgow *et al.*, 1995; Lechner *et al.*, 2001; Redl, 2000). Im Gegensatz zu anderen Lipocalinen korreliert bei der Bindung von Fettsäuren jedoch die Affinität mit der Länge der Kohlenwasserstoffkette, wobei die am schlechtesten wasserlöslichen Moleküle am stärksten komplexiert werden (Gasymov *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde kürzlich demonstriert, daß Tlc mikrobielle Siderophor-Eisen-Komplexe binden und so eine antimikrobielle Funktion ausüben kann (Fluckinger *et al.*, 2004). Schließlich bindet es das Antibiotikum Rifampin (Gasymov *et al.*, 2004a).

Die genaue physiologische Rolle des Tlc ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird diskutiert, daß dieses Lipocalin für die Stabilisierung der Integrität des Tränenfilms auf der *Cornea* verantwortlich ist. Der Tränenfilm besteht aus einer komplexen Mischung von Proteinen, Lipiden und anderen Komponenten, welche in Schichten angeordnet sind (Redl, 2000). Als wichtigstes Lipid-bindendes Protein der Tränenflüssigkeit (Glasgow *et al.*, 1995; Redl *et al.*, 1992) scheint Tlc hier eine zentrale Rolle beim Transport von Lipiden zu spielen. Gleichzeitig wird eine Funktion bei der Entfernung von schädlichen lipidartigen Substanzen und damit eine generelle Funktion für den Schutz von Epithelien vorgeschlagen (Holzfeind *et al.*, 1996), sowie eine antimikrobielle Aktivität aufgrund der Siderophor-Bindung (Fluckinger *et al.*, 2004). Abgesehen von seiner Liganden-Bindungsfunktion besitzt dieses Lipocalin noch zwei weitere, für Mitglieder dieser Proteinfamilie äußerst ungewöhnliche Eigenschaften. Tlc zeigt unspezifische Endonuklease-Aktivität (Yusifov *et al.*, 2000), und es kann *in vitro* die Cysteinprotease Papain inhibieren (van't Hof *et al.*, 1997; Wojnar *et al.*, 2001b).

### 1.3 Die humane Komplementkomponente C8 $\gamma$

Das humane C8 $\gamma$  ist eine Untereinheit der Komplementkomponente C8, die zusammen mit den Komplementkomponenten C5b, C6, C7 und C9 nach der Komplementaktivierung den zytolytischen Membranangriffskomplex (*Membrane Attack Complex*, MAC) bildet (Schreck *et al.*, 2000). Dies führt zu einer Störung der lokalen Membranorganisation und damit zu einer erhöhten Permeabilität der angegriffenen Membran. Im Gegensatz zu den anderen an der Porenbildung beteiligten monomeren Proteinen C5b, C6, C7 und C9 setzt sich C8 aus drei Polypeptidketten zusammen. Die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  werden dabei unabhängig voneinander in der Leber synthetisiert und in Form eines disulfidverknüpften C8 $\alpha$ - $\gamma$  Dimers, welches nichtkovalent mit C8 $\beta$  assoziiert ist, als trimeres C8 sekretiert (Ng *et al.*, 1987).

Die Komplementkomponenten C6, C7, C8 $\alpha$ , C8 $\beta$  und C9 sind genetisch und strukturell verwandte Proteine und werden daher zur MAC-Proteinfamilie zusammengefasst (Hobart *et al.*, 1995). Dagegen konnte C8 $\gamma$  anhand seiner von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz der Proteinfamilie der Lipocaline zugeordnet werden (Haefliger *et al.*,

1991; Ng *et al.*, 1987). Es wird hauptsächlich von Hepatozyten produziert, doch konnte seine Synthese auch in Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Astrozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden. Ähnlich wie das Tlc besitzt das unglycosylierte C8 $\gamma$  drei Cys-Reste, wobei das C-terminale Peptidsegment über Cys-168 mit dem im  $\beta$ -Barrel lokalisierten Cys-76 verknüpft ist. Über Cys-40 wird dagegen eine Disulfidbrücke zu Cys-164 des C8 $\alpha$  gebildet, welche das posttranslational assoziierte Heterodimer stabilisiert (Haefliger *et al.*, 1991).

Die physiologische Rolle des C8 $\gamma$  wurde intensiv untersucht, ist bisher jedoch weitgehend ungeklärt. So wurde eine Beteiligung an der Regulierung des MAC sowie der Schutz vor einer vorzeitigen Membranassoziation des C8 $\alpha$  vorgeschlagen, beide Hypothesen sind jedoch im Licht neuerer Ergebnisse nicht haltbar (zusammengefasst in Schreck *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise ist C8 $\gamma$  für die Ausbildung und Funktion des MAC nicht zwingend erforderlich, verstärkt dessen Aktivität jedoch erheblich. In einem hämolytischen Assay zeigte das C8 $\alpha$ - $\beta$  Dimer bloß etwa 15 % der Aktivität des intakten C8, durch Zugabe von rekombinantem C8 $\gamma$  konnte die volle Aktivität allerdings nahezu rekonstituiert werden (Schreck *et al.*, 1998). Ein vergleichbarer Effekt der An- bzw. Abwesenheit von C8 $\gamma$  wurde für die lytische Aktivität des MAC auf die äußere Membran Gram-negativer Bakterien nachgewiesen (Parker & Sodetz, 2002).

Von Interesse erscheint vor allem die Frage, weshalb ein Lipocalin Teil des MAC bildet. Dessen primäres Ziel scheinen Gram-negative Bakterien zu sein (Esser, 1994), und deren Lyse scheint auch in Abwesenheit von C8 $\gamma$  zu erfolgen. Dennoch wäre es denkbar, daß C8 $\gamma$  ein lipidartiges Molekül auf der Oberfläche eines solchen Bakteriums bindet und dadurch die Zusammenlagerung der anderen Komplementkomponenten zu einem funktionellen Komplex an der Membran stimuliert (Parker & Sodetz, 2002). Zudem wurde diskutiert, daß C8 $\gamma$  die lokale inflammatorische Antwort des befallenen Gewebes moduliert, indem es proinflammatorische Mediatoren komplexiert (Übersicht in Schreck *et al.*, 2000).

## 1.4 Bakterielle Lipocaline

Ursprünglich wurden die Lipocaline in Eukaryoten entdeckt, wo sie unter Vertebraten, Invertebraten und Pflanzen weit verbreitet sind (Flower *et al.*, 1993). Die Beschreibung des ersten bakteriellen Lipocalins (Bishop *et al.*, 1995) verdeutlichte jedoch, daß sich diese Proteinfamilie offenbar bereits in einem früheren Stadium der Evolution entwickelt hat.

Das bakterielle Lipocalin von *E. coli* (Blc; Bishop *et al.*, 1995) wird, reguliert durch den Sigma-Faktor  $\sigma^S$ , sowohl beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase als auch in Anwesenheit hoher Salzkonzentration (300 mM) synthetisiert. Während des exponentiellen Wachstums konnte dagegen nur basale Expression nachgewiesen werden. Blc ist daher anscheinend an der Anpassung der Bakterien an Hungerbedingungen und ungewöhnliche



osmotische Verhältnisse beteiligt, wobei Stress auf die bakterielle Hülle ausübt wird (Bishop, 2000). Das Protein wird kontranslational mittels einer Typ-2 Signalsequenz in den periplasmatischen Raum von *E. coli* sekretiert, wobei das Signalpeptid abgespalten und der N-terminale Cys-Rest des maturen Proteins zu einem als Membrananker dienenden *N*-acyl-*S*-*sn*-1,2-diacylglycerylcystein modifiziert wird. Durch Membranfraktionierung konnte nachgewiesen werden, daß das mature Blc an der äußeren Membran lokalisiert und vermutlich dem periplasmatischen Lumen zugewandt ist (Bishop *et al.*, 1995).

Interessanterweise besitzt Blc große Ähnlichkeit mit dem humanen ApoD (Bishop *et al.*, 1995). Zum einen zeigen die beiden Proteine mit über 30 % eine für Lipocaline ungewöhnlich hohe Sequenzhomologie, zum anderen liegt auch ApoD *in vivo* nicht als lösliches Protein vor, sondern es ist an der Phospholipidschicht von *High Density Lipoprotein*-Partikeln (HDL) lokalisiert. Basierend auf einem vom Bilin-Bindungsprotein (BBP) abgeleiteten, hypothetischen Strukturmodell des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) wurde die Vermutung angestellt, daß dieses Lipocalin durch hydrophobe Wechselwirkungen eines ausgedehnten Bereichs apolarer Aminosäureseitenketten auf seiner Oberfläche mit den HDL-Partikeln assoziiert ist. Die cDNA des homologen Proteins der Ratte konnte bemerkenswerterweise neben ihrer Lokalisation im Plasma auch in regenerierendem Nervengewebe nachgewiesen werden (Spreyer *et al.*, 1990).

Außer Blc und ApoD ist bisher nur ein weiteres Lipocalin bekannt, welches *in vivo* nicht als lösliches Protein sondern mit Membranen assoziiert vorliegt, das Lazarillo des Grashüpfers *Schistocerca americana* (Ganforina *et al.*, 1995). Dieses Protein ist mittels eines C-terminalen Glycosylphosphatidylinositol-Ankers in der Zellmembran verankert und scheint an der Regulation des axonalen Wachstums beteiligt zu sein. Alle drei membranassoziierten Lipocaline werden also im Zusammenhang mit der Reparatur oder Neubildung von Membranen exprimiert, was ihre aktive Beteiligung an diesen Prozessen denkbar erscheinen läßt (Bishop, 2000).

Kürzlich konnte die dreidimensionale Struktur des Blc durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (Campanacci *et al.*, 2004). Wie aufgrund seiner Primärsequenz vorhergesagt (Bishop *et al.*, 1995), zeigt das Protein die typische Lipocalinfaltung mit einem achtsträngigen, antiparallelen  $\beta$ -*Barrel* und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix (vergleiche Abschnitt 1.1). Es besitzt eine zum Lösungsmittel geöffnete Liganden-Bindungstasche, die sich tief in das Innere des  $\beta$ -*Barrels* erstreckt und in der Kristallstruktur nicht mit einem Liganden besetzt ist. Aufgrund eines Klonierungsartefaktes enthält das kristallisierte Blc jedoch mehr als zehn zusätzliche Aminosäurereste an seinem N-Terminus, welche einen im nativen Blc nicht vorkommenden  $\beta$ -Strang ausbilden. Es ist daher anhand dieses Strukturmodells nicht möglich, die Orientierung des nativen, an seinem N-Terminus verankerten Blc relativ zur Membran und damit eine eventuelle Beteiligung an der Membran-Biogenese vorherzusagen.

Inzwischen wurden durch Analyse genomischer Datenbanken über 20 weitere bakterielle Lipocaline identifiziert (Bishop, 2000), welche sich zum Teil grundlegend vom Blc aus *E. coli* unterscheiden. So besitzen einige dieser Proteine Paare konservierter Cys-Reste, so daß sie, im Gegensatz zum Blc von *E. coli*, Disulfidbrücken ausbilden könnten. Auch die zelluläre Lokalisation der Lipocaline scheint nicht auf die äußere bakterielle Membran beschränkt zu sein. Einige dieser Vertreter besitzen eine Typ-1 Signalsequenz und liegen daher wahrscheinlich als lösliches Protein im periplasmatischen Raum vor, während andere anscheinend an der inneren bakteriellen Membran verankert sind oder im Cytosol vorkommen. Interessanterweise wurden Vertreter der bakteriellen Lipocaline bisher allerdings nur in Gram-negativen Eubakterien gefunden, nicht jedoch in Gram-positiven Bakterien oder *Archaea*.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie sind an einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie z. B. der Komplexierung niedermolekularer Liganden, der Interaktion mit anderen Makromolekülen und sogar der enzymatischen Katalyse beteiligt. Von besonderem Interesse ist dabei, auf welche Art und Weise diese zum Teil sehr unterschiedlichen biochemischen Funktionen auf der Basis eines kompakten, hochkonservierten Faltungsmotifs realisiert sind. Hierfür ist jedoch ein tieferes Verständnis der Protein-Ligand-Interaktion auf molekularer Ebene, insbesondere durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, die Voraussetzung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Struktur-Funktions-Wechselwirkungen humaner Vertreter der Proteinfamilie der Lipocaline sowie des bakteriellen Lipocalins von *E. coli* untersucht werden. Hierzu mußte zunächst die gentechnische Produktion und Reinigung einiger dieser Proteine etabliert werden, um proteinchemische Analysen und Kristallisationsexperimente zu ermöglichen. Anschließend sollten die rekombinanten Proteine charakterisiert und mittels einer Bindungsstudie anhand von typischen Liganden ihre biochemische Aktivität verglichen werden. Weiterhin sollten einzelne Lipocaline kristallisiert und ihre dreidimensionale Struktur durch Röntgenkristallographie bestimmt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, Vektoren und cDNA

##### Escherichia coli-Stämme

|          |  |
|----------|--|
| CJ236i   | <i>dut, ung, thi, relA1</i> [F': <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔ15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i> ]<br>(Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987; Fiedler & Skerra, 1999)  |
| JM83     | <i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (=strA), Φ80, lacZΔM15</i><br>(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)   |
| W3110    | (Bachmann, 1990)   |
| XL1-Blue | <i>endA1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169</i> [F': <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔ15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i> ]<br>(Bullock <i>et al.</i> , 1987) |

Alle Stämme waren aus der Sammlung von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München.

##### Bakteriophagen

|         |  |
|---------|--|
| VCS-M13 | Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg |
|---------|--|

##### Vektoren

|                |  |
|----------------|--|
| pASK75-strepII | (Voss & Skerra, 1997)<br>von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München                         |
| pQE70/Lcn1     | (Holzfeind <i>et al.</i> , 1996)<br>von Prof. Dr. Bernhard Redl, Universität Innsbruck |
| pTUM4          | (Schlapschy <i>et al.</i> , 2006)<br>von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München             |

##### cDNA

|             |  |
|-------------|--|
| Leber       | Human MTC Panel I, Clontech, Heidelberg<br>erhalten von Hilke Zander, TU München           |
| Hirn        | Hergestellt am MPI für Neurobiologie, Martinsried<br>erhalten von Hilke Zander, TU München |
| Lymphozyten | Hergestellt am MPI für Neurobiologie, Martinsried<br>erhalten von Hilke Zander, TU München |

## 2.1.2 Oligodesoxynukleotide

**Tabelle 2:** Oligodesoxynukleotide

### a) für die Amplifizierung der Lipocalin-Strukturgene

|           |   |
|-----------|---|
| A1m-1     | 5' -CCG GCC CTG TGC CAA CGC CGC CCG ACA ATA TCC AAG<br>TGC-3' |
| A1m-2     | 5' -GCT TCT CGG GAT TAA GAT GGG CTC TGG-3'                    |
| B1c-1     | 5' -CCG CCA GTT CTC CTA CGC CGC CG-3'                         |
| B1c-2     | 5' -GCT ACC AGG CTG CTG TAC CC-3'                             |
| C8g-1     | 5' -CCC AGA AGC CTC AGA GGC CAC GCC-3'                        |
| C8g-2     | 5' -GCT CCT CAC TTC GTC CAG GAC GTG G-3'                      |
| NGAL-1    | 5' -CCC AGG ACT CCA CCT CAG ACC-3'                            |
| NGAL-2    | 5' -GCT GCC GTC GAT ACA CTG GTC GAT TGG G-3'                  |
| PDS-1     | 5' -CAG CAC CCG AGG CCC AGG TCT-3'                            |
| PDS-2     | 5' -GCT TTG TTC CGT CAT GCA CTT ATC GG-3'                     |
| hRBP-1    | 5' -CCG AGC GCG ACT GCC GAG TGA GC-3'                         |
| hRBP-2    | 5' -GCT CAA AAG GTT TCT TTC TGA TCT GCC ATC-3'                |
| TearLPC-3 | 5' -CCG CCT CAG ACG AGG AGA TTC AG-3'                         |
| TearLPC-2 | 5' -GCT CCC TGG AGA GCA GGT TTC GC-3'                         |

### b) für die ortsgerichtete Mutagenese

|           |   |
|-----------|---|
| A1m-3     | 5' -TCA GCC AGG GGC TGG TGG AAC CGA T-3'      |
| B1c-3     | 5' -GGT CCG GCC CGC TAA CCA GCG CAT G-3'      |
| C8g-3     | 5' -GCA GGA AAC GGC TAG CGG AGC CAA C-3'      |
| C8g-4     | 5' -CGA CAA CCA CGT GCA CAG CCC CTC G-3'      |
| NGAL-3    | 5' -CGC CGG GCT GGC TAC CTG GAA CAA AAG TC-3' |
| TearLPC-4 | 5' -AGC TCG CCC TCA GAG TAA AAG ATG TAG TG-3' |

### c) für die Sequenzierung

|        |                                   |
|--------|-----------------------------------|
| askD20 | 5' -CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'    |
| F-83   | 5' -AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3' |
| PR-1   | 5' -CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'     |

Die Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung standen im Labor vom Prof. Dr. Arne Skerra zur Verfügung. Alle anderen Oligodesoxynukleotide wurden von der INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm in HPLC-gereinigter Form bezogen.

### 2.1.3 Proteinreagenzien

|   |  |
|---|--|
| Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i> | USB, Cleveland, Ohio, USA  |
| Benzonase, Reinheitsgrad I (25 U/ $\mu$ L)      | E. Merck KGaG, Darmstadt   |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)      | Stratagene, Heidelberg   |
| Restriktionsendonukleasen                       | New England Biolabs GmbH, Schwalbach<br>MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| RNase A aus Rinderpankreas (89 U/mg)            | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz                                      |
| T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/ $\mu$ L)              | Promega Deutschland GmbH, Mannheim                                   |
| T4 DNA-Polymerase (3 U/ $\mu$ L)                | New England Biolabs GmbH, Schwalbach                                 |
| T4 Polynukleotidkinase (10 U/ $\mu$ L)          | New England Biolabs GmbH, Schwalbach                                 |

### 2.1.4 Chemikalien

|  |   |
|--|---|
| Aceton   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| N-Acetyl-L-Tryptophanamid  | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen                      |
| Acryamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 0,8 %<br>Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel 30) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Adenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz<br>(ATP)                              | Serva Feinbiochemika, Heidelberg                    |
| Agarose für Gelelektrophorese, Typ GTQ                                       | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Agarose, <i>low melting point</i>  | Boehringer Mannheim, Mannheim                       |
| Ammoniumacetat   | Applichem, Darmstadt                                |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)   | E. Merck KGaG, Darmstadt                            |
| Ampicillin, Natriumsalz (Amp)  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)                                       | Acros Organics, Geel, Belgien                       |
| 8-Anilino-1-naphtalinsulfonsäure (ANS)                                       | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen                      |
| Antifoam A-Stammlösung   | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen                      |
| Bacto Agar   | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA                |
| Bacto Tryptone   | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA                |
| Bacto Yeast Extract  | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA                |
| Blue Dextran   | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen                      |
| Bromphenolblau   | E. Merck KGaG, Darmstadt                            |
| Calciumchlorid, Dihydrat   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Chloramphenicol (Cam)  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Chloroform   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe                     |
| Coomassie Brilliantblau R-250  | Biomol Feinchemikalien, Hamburg                     |
| dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  | Amersham Pharmacia Biotech Europe<br>GmbH, Freiburg |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| D-Desthiobiotin   | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| 11-(5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-amino)undecansäure (DAUDA) | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Dimethylformamid (DMF)  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat                                  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)                  | AppliChem, Darmstadt            |
| Ethylenglykol   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Essigsäure, 99,9 %  | Riedel-de-Haën AG, Seelze       |
| Ethanol p.a., 99,9 %  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ethanol technisch   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)                                  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| D(+)-Glucose, Monohydrat  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Glycerin  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Glycin  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan-Sulfonsäure (HEPES)         | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)                          | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| Isoamylalkohol  | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| L-Isoleucin   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Isopropanol   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Kaliumchlorid   | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Kaliumdihydrogenphosphat  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| L-Leucin  | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| L-Lysin   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Magnesiumchlorid, Hexahydrat  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Magnesiumsulfat, Hydrat   | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| 2-Mercaptoethanol   | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| Methanol  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Mineralöl (Heavy White Oil) für die PCR                             | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| Natriumacetat   | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Natriumchlorid  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumcitrat   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat                                 | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Natriumhydrogencarbonat   | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat                                | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| Natriumhydroxid  | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Phenol, 99 %, redestilliert                                | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| L-Phenylalanin   | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)                          | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat<br>(Tween 20)           | Schuchardt & Co., Hohenbrunn    |
| Puffer-Standardlösungen für pH-Meter                       | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| <i>All-trans</i> Retinol                                   | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| <i>All-trans</i> Retinsäure                                | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| D(+)-Saccharose  | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| Salzsäure conc. (HCl)                                      | E. Merck KGaG, Darmstadt        |
| Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV                            | Linde, Weiterstadt              |
| L-Selenomethionin  | Acros Organics, Geel, Belgien   |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin<br>(TEMED)              | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| Thiaminhydrochlorid  | Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen  |
| L-Threonin   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan,<br>Ultra-Qualität (Tris) | Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe |
| L-Valin  | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Zinksulfat   | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |

### 2.1.5 Standards, Kristallisations-Screens und Kits

#### DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

1 kb DNA Leiter

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

#### Kristallisations-Screens:

*Crystal Screen*

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

*Crystal Screen 2*

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

*Crystal Screen Cryo*

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

*Magic Screen 1*

Biogenova, Ellicott City, USA

*Magic Screen 2*

Biogenova, Ellicott City, USA

#### Protein-Größenstandard:

SDS-PAGE Standard, *Low Range*

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

#### Kits zur DNA-Isolierung:

JETsorb Gel Extraction Kit

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

QIAprep Plasmid Midiprep Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Kit zur DNA-Sequenzierung:

DNA-Sequencing Kit, Big Dye  
Terminator Cycle Sequencing

Perkin Elmer, Applied Biosystems,  
Weiterstadt

### 2.1.6 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer

Perkin Elmer, Applied Biosystems,  
Weiterstadt

Varioklav Typ 500

H&P Labortechnik GmbH,  
Oberschleißheim

Bio-Mag 10 Magnetrührer

BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:

B 5060 EK

Heraeus Christ GmbH, Osterode

BM800

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Pelion

Bayer, Frankfurt/Main

CD-Spektropolarimeter Jasco J-810

Jasco, Tokyo, Japan

Drehtisch zum Ausplattieren

Gesellschaft für Laborbedarf mbH,  
Würzburg

Durchflußdetektoren:

UV/Vis Filter Photometer

Knauer, Berlin

Variable Wavelength Monitor

Knauer, Berlin

2138 Uvicord S

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

2138 Uvicord SII

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

UV/Vis UV-1 Photometer

Rainin, Woburn, MA, USA

Elektrophoresekammern

Biometra, Göttingen;  
Eigenbau

Fermenter:

5 u. 10 L-Fermentersystem mit  
Umwurfzylinder

Schütt Labortechnik, Göttingen

C Flow Durchfluß-Regelmodul

BCC Spezialgeräte, Göttingen

C pH Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte, Göttingen

C pO<sub>2</sub> Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte, Göttingen

C Pump D Schlauchpumpen-Modul

BCC Spezialgeräte, Göttingen

pH-Elektrode (Typ 465)

Ingold Meßtechnik, Steinbach

O<sub>2</sub>-Sensor (12/320 A-Type)

Mettler-Toledo, Steinbach

Fluoreszenzphotometer LS 50 B

Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA



## Fraktionssammler:

|                     |   |
|---------------------|---|
| Redi Frac           | Amersham Pharmacia Biotech Europe<br>GmbH, Freiburg |
| Multirac 2111       | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing                     |
| Superrac 2211       | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing                     |
| Ultrorac 7000       | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing                     |
| 2003 Slab Gel Dryer | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing                     |

## Heizrührer:

|                    |  |
|--------------------|--|
| IKA-Combimag       | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| IKAMAG RCT         | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| IKAMAG RET         | Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau |
| Variomag Monotherm | H & P Labortechnik GmbH, München       |

## HPLC:

|                         |                         |
|-------------------------|-------------------------|
| Dynamax SD-300 (Pumpe)  | Rainin, Woburn, MA, USA |
| Dynamax UV-1 (Detektor) | Rainin, Woburn, MA, USA |
| Gradientenmischer       | Rainin, Woburn, MA, USA |

## Metallblockthermostate:

|                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| Techne Dri-Block DB-2A     | Thermodux GmbH, Wertheim     |
| Metallblockthermostat 2116 | Gebrüder Liebisch, Bielefeld |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Millipore Synergy 185 Reinstwasser-Anlage | Millipore GmbH, Eschborn |
|---|--------------------------|

## Netzgeräte:

|                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| TN 300-120                | Heinzinger, West Germany        |
| Power Pack P25            | Biometra, Göttingen             |
| Power Pack P30            | Biometra, Göttingen             |
| LKB 2197 Power supply     | LKB Instrument GmbH, Gräfelfing |
| PCR-Gerät UNO-Thermoblock | Biometra, Göttingen             |

## Peristaltische Pumpen:

|            |   |
|------------|---|
| Miniplus 2 | Gilson, Villiers le Bel, Frankreich                 |
| P1         | Amersham Pharmacia Biotech Europe<br>GmbH, Freiburg |

## pH-Meter:

|                  |   |
|------------------|---|
| E512             | Metrohm, Herisau  |
| pH 526 und pH531 | Wissenschaftlich-Technische Werkstätten<br>GmbH, Weilheim |
| pH27             | Knick, Berlin   |

## Pipettierhilfen:

|              |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| Pipetus akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| accu-jet     | Brand GmbH & Co., Wertheim        |

## Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000

Abimed Analysen-Technik GmbH,  
Langenfeld

Polaroid-Kamera MP4

Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA

Rollenmischer IDL TRM-V

Kühn &amp; Bayer, Nidderau-Heldenbergen

## Röntgen-Generator:

RU-300 Drehanoden-Generator

Rigaku, Tokyo, Japan

Konfokale Optik

Osmic, Troy, MI, USA

Mar345 Detektor

MarResearch, Hamburg

Stickstoff-Kühlstrom

Oxford Cryosystems, Oxford, UK

## Signalschreiber:

REC 112

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

SE 120

ABB Goerz AG, Wien, Österreich

2210

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Knauer

Knauer, Berlin

## Schüttelapparate:

Wipptisch WT12

Biometra, Göttingen

Typ 3012

Gesellschaft für Labortechnik mbH,  
Burgwedel

Typ 3017

Gesellschaft für Labortechnik mbH,  
Burgwedel

## Schüttelinkubatoren:

Modell G25

New Brunswick Scientific Co., Inc.,  
Edison, New Jersey, USA

Modell TR-125/ITE-K

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

## Spektrophotometer:

Ultrospec 2000

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

Ultrospec 3000

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

## Speed-Vac-Konzentrator

UniEquip, Martinsried

Univapo UVC 150H

UV-Transilluminator TI3

Biometra, Göttingen

## Vakuumpumpen:

Drehschieberpumpe RD4

Vacuubrand GmbH &amp; Co, Wertheim

Drehschieberpumpe RD15

Vacuubrand GmbH &amp; Co, Wertheim

Membranpumpe MZ2C

Vacuubrand GmbH &amp; Co, Wertheim

Vortex-Genie 2

Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y.,  
USA

Waagen:

Micro m3p

Sartorius GmbH, Göttingen

PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C

W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

PAG Oerlikon Precisa 125 A

W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

R160P-\*D1

Sartorius GmbH, Göttingen

U5000D

Sartorius GmbH, Göttingen

Wasserbäder:

Haake F6/C25

Thermo Haake, Karlsruhe

Julabo PC/8A

Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Julabo UC/5B

Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Thermomix 1460

Braun Melsungen AG, Melsungen

Zentrifugen:

Biofuge A

Heraeus Christ GmbH, Osterode

J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10  
und JA-20

Beckman Instruments, München

Labofuge 6000

Heraeus Christ GmbH, Osterode

Sigma 4K10

Sigma GmbH, Osterode

Sorvall RC 3B Plus mit Rotor  
H-6000A/HBB-6

Kendro Laboratory Products GmbH,  
München

Sorvall RC 5B und RC 5C Plus  
mit Rotoren SS-34, SLA-1500  
und SLA-3000

Kendro Laboratory Products GmbH,  
München

Sorvall RMC 14

Sorvall Instruments, Bad Nauheim

Eppendorf 5415 C

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH,  
Hamburg

### 2.1.7 Sonstiges Material

Aquasil

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

Dialyseschläuche:

Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Typ 27, MWCO: 12-16 kDa

Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 mL

Braun Melsungen AG, Melsungen

Dispomed Witt oHG, Gelnhausen

Henke-Sass Wolf, Tuttlingen

## Größenausschlußchromatographie-Säulen:

Superdex 75 HR 10/30

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, FreiburgSuperdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade*Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

## Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

## Konzentratoren:

Vivaspin 4, MWCO: 10 kDa

Diagonal GmbH &amp; Co. KG

Vivaspin 15, MWCO: 10 kDa

Diagonal GmbH &amp; Co. KG

## Kunststoffröhrchen:

Kulturröhrchen, 13 mL

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

PP-Röhrchen, 15 mL

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

PP-Röhrchen, 50 mL

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

Cellstar PP-Röhrchen, 15 mL

Greiner Labortechnik GmbH,  
Frickenhausen

Cellstar PP-Röhrchen, 50 mL

Greiner Labortechnik GmbH,  
Frickenhausen

## Nylon-Schlaufen

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

## Paratone N

Hampton Research, Laguna Niguel, USA

## Petrischalen aus Polystyrol

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

## Pipetten-Spitzen:

kristallklar (0,5-10 µl)

VWR International GmbH

gelb (5-200 µl)

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

blau (200-1000 µl)

Gilson, Villiers le Bel, Frankreich

## Polaroidfilm 667

Polaroid Deutschland, Offenbach

## Quarzküvetten:

Typ 108.002 QS (Absorption)

Hellma, Müllheim, Baden

Typ 108 QS (Fluoreszenz)

Hellma, Müllheim, Baden

Typ 110 QS (CD)

Hellma, Müllheim, Baden

Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL und 2,0 mL  
(Safelock)

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

## SDS-PAGE:

Apparaturen, Glasplatten, Spacer,

Amersham Pharmacia Biotech Europe  
GmbH, Freiburg

Dichtungen, Kämme

Biometra, Göttingen

## Sterilfilter:

Filtropur (0,45 und 0,22 µm)

Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht

Millex HV (0,45 µm)

Millipore GmbH, Eschborn

Membransterilfilter (0,22 µm; 50 mm)

Schleicher &amp; Schuell, Dassel

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Spin-X (0,45 µm)   | Costar, Corning, NY, USA       |
| Whatman-Filterpapier 3MM   | Bender & Hobein AG, München    |
| Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren<br>JA-10 und JA-20, sowie für Sorvall-<br>Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000 | Nalgene Company, New York, USA |

### 2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore-Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

#### Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µM).

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Ampicillin (Amp)      | 100 mg/mL in Wasser<br>(1:1000 zum Medium)          |
| Chloramphenicol (Cam) | 30 mg/mL in 70 % Ethanol<br>(1:1000 zum Medium)     |
| Kanamycin (Kan)       | 35 mg/mL in Wasser<br>(1:500 zum Medium)            |
| Tetracyclin (Tet)     | 10 mg/mL in 70 % v/v Ethanol<br>(1:1000 zum Medium) |

Lagerung bei -20 °C

#### Induktor-Stammlösung:

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Anhydrotetracyclin (aTc) | 2 mg/mL und 5 mg/mL in DMF<br>(1:10000 zum Medium) |
|--------------------------|--|

Lagerung bei -20 °C

#### LB-Medium:

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Bacto Tryptone  | 10 g/L                         |
| Bacto Yeast Extract   | 5 g/L                          |
| NaCl  | 5 g/L                          |
| Bacto Agar  | 15 g/l (nur für Kulturplatten) |
| (Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklav sterilisiert.) |                                |

**Lösungen für die Fermentation:**Mineralsalzlösung:

|   |                  |
|---|------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 31 mM (5,51 g/L) |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 19 mM (2,58 g/L) |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$                              | 25 mM (1,33 g/L) |
| Na-Citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$               | 5 mM (0,47 g/L)  |

(Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9)

Glukoselösungen:

|         |            |
|---------|------------|
| Glukose | 20 % (w/v) |
|         | 50 % (w/v) |

(separat autoklaviert)

MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung:

|                 |     |
|-----------------|-----|
| $\text{MgSO}_4$ | 1 M |
|-----------------|-----|

(separat autoklaviert)

Thiamin-Stammlösung:

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Thiamin-Hydrochlorid | 10,0 mg/mL |
|----------------------|------------|

(sterilfiltriert)

FeCl<sub>3</sub>-Stammlösung:

|  |          |
|--|----------|
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 35,0 g/L |
|--|----------|

(mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)

Zn-Acetat-Stammlösung:

|  |         |
|--|---------|
| Zn-Acetat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 8,0 g/L |
|--|---------|

(sterilfiltriert)

Spurenelement-Stammlösung:

|  |         |
|--|---------|
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$                           | 3,0 g/L |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$                           | 0,3 g/L |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$  | 0,6 g/L |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$                           | 0,5 g/L |
| $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 1,2 g/L |
| EDTA   | 4 mM    |

Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v)  $\text{NH}_3$  zur pH-Regulierung

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

**Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:**TAE-Puffer:

|            |       |
|------------|-------|
| Tris       | 40 mM |
| Essigsäure | 20 mM |
| EDTA       | 1 mM  |

10× Auftragspuffer für Agarosegele:

|                |            |
|----------------|------------|
| Bromphenolblau | 1 mg/mL    |
| Xylencyanol    | 1 mg/mL    |
| Glycerin       | 50 % (v/v) |

**Puffer für die SDS-PAGE:**1× SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986):

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Tris                     | 50 mM  |
| Glycin                   | 190 mM |
| SDS                      | 1 g/L  |
| (pH 8,8 stellt sich ein) |        |

4× Lower-Tris:

|                  |       |
|------------------|-------|
| Tris/HCl pH 8,85 | 3 M   |
| SDS              | 4 g/L |

4× Upper-Tris:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Tris/HCl pH 6,8 | 0,5 M |
| SDS             | 4 g/L |

5× Auftragspuffer:

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| Tris/HCl pH 8,0    | 250 mM       |
| SDS                | 7,5 % (w/v)  |
| Glycerin           | 25 % (v/v)   |
| Bromphenolblau     | 0,25 mg/mL   |
| 2-Mercaptoethanol* | 12,5 % (v/v) |

\*(bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| Essigsäure                    | 10 % (v/v)   |
| Methanol                      | 40 % (v/v)   |
| Coomassie Brilliantblau R-250 | 0,25 % (w/v) |

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

|            |           |
|------------|-----------|
| Essigsäure | 7 % (v/v) |
| Glycerin   | 2 % (v/v) |

**Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:**Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol:

Kristallines Phenol  $\geq 99$  % (unter Schutzgas destilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit ½ Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

Mit Wasser gesättigtes Phenol (s. o.) wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4,8:

3 M Na-Acetat wird mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt.

**Sonstige Puffer:**Benzonase-Puffer:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris/HCl pH 8,0   | 100 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 5 mM   |

Periplasma-Aufschlußpuffer:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Saccharose      | 500 mM |
| Tris/HCl pH 8,0 | 100 mM |
| EDTA            | 1 mM   |

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer):

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris/HCl pH 8,0 | 100 mM |
| NaCl            | 50 mM  |
| EDTA            | 1 mM   |

RNase-Lösung:

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Tris/HCl pH 7,5 | 10 mM    |
| NaCl            | 15 mM    |
| RNase A         | 10 mg/mL |

Zur Inaktivierung von DNAsen 20 min im Wasserbad bei Siedehitze inkubieren, langsam abkühlen und bei -20 °C lagern.

TE-Puffer:

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Tris/HCl pH 8,0 | 10 mM |
| EDTA            | 1 mM  |



## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert und waren für bis zu 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendbar.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Es wurden Volumina von 4 mL in 13 mL Kulturröhrchen, 50 mL in 100 mL Kulturkolben mit belüfteter Metallkappe, sowie 2000 mL in 5 L Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 mL wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 L wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert.

Vorkulturen für die Proteinproduktion (siehe Abschnitt 2.3) wurden bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Bei den 2 L Kulturen fand die Inkubation bei 22 °C ebenfalls unter Schütteln bei 200 rpm statt. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) mit Hilfe eines Ultrospec 2000- oder Ultrospec 3000-Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Meßwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 mL hitzesterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Aufnahme von Plasmid-DNA müssen *E. coli*-Zellen in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die klassische  $CaCl_2$ -Methode (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca.  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA erhalten werden können.

50 mL LB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung kompetenter Zellen des Stammes CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.4.6) wurde dem LB-Medium das Antibiotikum Tetracyclin zugesetzt. Nach Erreichen einer optischen

Dichte von  $OD_{550} = 0,5$  wurde die Kultur in ein 50 mL Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) vom Medium getrennt. Das Zellsediment wurde in 40 mL eiskalter 100 mM  $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) wurde das erhaltene Sediment in 20 mL eiskalter 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 mL 50 mM  $CaCl_2$ , 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200  $\mu$ L entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt.

Zur eigentlichen Transformation wurden 200  $\mu$ L der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1 bis 5  $\mu$ L Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt, anschließend in 2 mL LB-Medium überführt und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100  $\mu$ L auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert. Die verbliebene Kultur wurde kurz abzentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 4K10, 4 °C, 2 min, 4.000 rpm), das Medium abgezogen, die Zellen im verbleibenden Flüssigkeitsrest resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Beide Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Isolierung von DNA aus *E. coli*

#### 2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA bei niedriger Ionenstärke.

**Analytischer Maßstab.** Für die Analyse von Transformanten nach der Neukonstruktion von Plasmiden erfolgte die Plasmid-Isolierung mittels des Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Genomed (Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit). Dazu wurde eine stationäre 3 mL Übernachtskultur verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt in 75  $\mu$ L TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug bei diesem Präparationsverfahren 5-10  $\mu$ g DNA.

**Präparativer Maßstab.** Für die präparative Plasmid-Isolierung wurde eine stationäre 50 mL Übernachtskultur verwendet und die Plasmid-DNA mittels eines Kits der Firma Qiagen

(Plasmid Midi Kit) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug gewöhnlich ca. 100 µg in 100 µL TE-Puffer.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert und konnte direkt zur Spaltung mit Restriktionsenzymen im analytischen Maßstab eingesetzt werden. Für die Verwendung in einem präparativen Restriktionsverdau wurde die isolierte Plasmid-DNA zunächst einer Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.4.4), um eventuell kontaminierende Exonukleasen zu entfernen.

### 2.2.3.2 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Für die ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel (siehe Abschnitt 2.2.4.6) wird zirkuläre einzelsträngige Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde, ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des filamentösen Phagen  $\phi$ 1 trugen, aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i nach der Methode von Geisselsoder (Geisselsoder *et al.*, 1987) präpariert. Dem ursprünglichen Stamm CJ236 war das zur Infizierbarkeit durch filamentöse Bakteriophagen des Typs M13 notwendige F'-Plasmid durch Konjugation mit dem Stamm XL1-Blue übertragen worden (Fiedler & Skerra, 1999). Die chromosomalen Mutationen *dut* und *ung* des *E. coli*-Stammes CJ236i bewirken den partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA, welcher bei der ortsgerichteten Mutagenese einen Selektionsdruck gegen den parentalen Strang liefert, da bei der Transformation eines *ung*<sup>+</sup>-Stammes (z. B. JM83, XL1-Blue) mit dem halbsynthetischen DNA-Hybrid der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert wird.

Durch Infektion des mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes CJ236i mit dem VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen wurde die Plasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemiden verpackt. Aus den sezernierten Phagemiden konnte die ssDNA daraufhin isoliert werden. Die dabei als Verunreinigung mitisolierte ssDNA des Helferphagen mit einem Anteil von < 5 % störte bei der Mutagenese nicht.

4 mL mit Ampicillin versetztes LB-Medium wurden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stammes CJ236i, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser stationären Kultur wurden 20 mL mit Ampicillin versetztes LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> = 0,26 (entsprechend ca. 1,6·10<sup>8</sup> Zellen/mL) geschüttelt. 1 mL der Kultur wurde entnommen, in ein steriles Kulturröhrchen überführt und mit VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer *moi* (*Multiplicity of Infection*) von 10 infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm wurde die 1 mL Kultur zu 20 mL LB-Medium gegeben. Diesem Medium wurde zur Selektion auf das Plasmid Ampicillin und zur Selektion auf Infektion durch den Helferphagen Kanamycin zugesetzt. Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C und 200 rpm über Nacht geschüttelt.

Von den in das Medium sezernierten Phagemiden wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (SS34-Rotor, 4 °C, 10 min, 10.000 rpm), und der Überstand mit 10 µL RNaseA (10 mg/mL) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagemidpartikel wurden daraufhin durch Zugabe von 5 mL einer frisch angesetzten Lösung von 3,5 M Ammoniumazetat, 20 % PEG 8.000 und Inkubation auf Eis für 30 min gefällt und anschließend durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 4 °C, 15 min, 12.000 rpm) präzipitiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, das Präzipitat in 200 µL Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden in einer weiteren Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 2 min, 14.000 rpm) abgetrennt und der Überstand mit den darin enthaltenen Phagemiden abgenommen.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine von der ssDNA wurde der Überstand zweimal mit 200 µL wassergesättigtem Phenol und je einmal mit 200 µL Phenol/Chloroform sowie mit 200 µL Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.4.4). Zur Minimierung der bei der Extraktion auftretenden Verluste an ssDNA wurden die organischen Phasen in der gleichen Reihenfolge mit 100 µL TE-Puffer rückextrahiert. Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 µL) und die ssDNA durch Zugabe von 30 µL 7,8 M Ammoniumazetat und 750 µL Ethanol für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Das nach der Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 15 min) erhaltene Präzipitat wurde nach vorsichtigem Abziehen des Überstandes mit 500 µL 70 % v/v Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 µL TE-Puffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Menge sowie den Reinheitsgrad der ssDNA abzuschätzen, wurde 1 µL einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Mit der beschriebenen Methode konnten bis zu 50 µg ssDNA isoliert werden.

## **2.2.4 In vitro-Modifizierung von DNA**

### **2.2.4.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktionsanalyse (Sambrook *et al.*, 1989) von Plasmiden und für die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Wahl des Puffersystems sowie der Temperatur für die enzymatische Reaktion erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Falls erforderlich, wurde zusätzlich eine BSA-Konzentration von 0,1 mg/mL in der Reaktionslösung eingestellt. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, so wurde ein Puffer gewählt, in dem möglichst alle Enzyme maximale Aktivität besaßen. Unterschieden sich die Reaktionsbedingungen der einzelnen Restriktionsendonukleasen stark voneinander, so

wurden die Reaktionen nacheinander entweder unter schrittweiser Erhöhung der Salzkonzentration oder nach zwischenzeitlicher Entfernung des Enzyms und der Puffersalze durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung der DNA (siehe Abschnitt 2.2.4.4) durchgeführt. Spaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Reaktionstemperaturen benötigten, wurden schrittweise durchgeführt. Zunächst wurde mit dem entsprechenden Enzym bei der höheren Temperatur inkubiert, der Ansatz dann kurz auf Eis abgekühlt, mit dem nächsten Enzym versetzt und bei dessen Reaktionstemperatur weiterinkubiert.

Die Restriktionsspaltung im analytischen Maßstab wurde mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und je 2 bis 5 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Volumen von 10 µL durchgeführt. Puffer und BSA-Lösung wurden jeweils als zehnfach konzentrierte Stammlösungen eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug typischerweise 1 bis 2 h bei der für die optimale Reaktion des Enzyms empfohlenen Temperatur. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in ähnlicher Weise durchgeführt, jedoch in Reaktionsvolumina von 50 µL mit 1 bis 3 µg Plasmid-DNA und jeweils 20 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease. Vor der Spaltung im präparativen Maßstab wurden die Plasmid-Lösungen durch Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung (siehe Abschnitt 2.2.4.4) von eventuell kontaminierenden Exonukleasen befreit.

#### **2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen**

Die Amplifizierung von DNA wurde mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Die dafür als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Von der Matrizen-DNA abweichende Sequenzen konnten gezielt erzeugt werden, indem Oligodesoxynukleotide verwendet wurden, die an definierten Positionen andere Basen aufwiesen. Da für die PCR immer die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) verwendet wurde, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten *Primer* vor der 3'-5' Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt. Dazu wurden modifizierte *Primer* eingesetzt, die an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphorthioatbindung trugen (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR mit der *Pfu* DNA-Polymerase enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µL 0,01-1 µg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µL 10× *Pfu*-Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8,8; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/mL BSA), 4 µL dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie 2,5 U der *Pfu*-Polymerase. Nach Auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 50 µL wurde der Reaktionsansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1.

Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 2 min (Polymerase-Reaktion).

Lag die Matrizen-DNA in Form von cDNA vor, so wurde der Zyklus in der Regel 35mal durchlaufen, während bei der Verwendung von Plasmid-DNA oder genomischer DNA aus *E. coli* typischerweise 25 Zyklen ausreichten, um das gewünschte DNA-Fragment in ausreichender Menge zu amplifizieren. Zur Vervollständigung der Syntheseprodukte wurde der Ansatz schließlich für 5 min bei 60 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

### 2.2.4.3 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden wurde zur Unterbindung intramolekularer Rezirkularisierung und der Bildung von Konkameren das Vektorfragment dephosphoryliert und das zu inserierende PCR-Fragment phosphoryliert. Die Dephosphorylierung des Vektorfragments wurde mit Alkalischer Phosphatase aus arktischen Garnelen durchgeführt, welche sich in der Hitze leicht inaktivieren läßt. Hierzu wurde der präparative Restriktionsansatz, der ca. 5 µg des geschnittenen Fragmentes enthielt, mit 5 U Alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und das dephosphorylierte Vektorfragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.5.2) isoliert.

Das zu inserierende PCR-Fragment wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Dazu wurde das isolierte Genfragment in einem Gesamtvolumen von 30 µL mit 3 µL 10× T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer (1 M Tris/HCl pH 8,0; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT), 3 µL 10 mM ATP sowie 5 U T4-Polynukleotid-Kinase versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die T4-Polynukleotid-Kinase durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung (Abschnitt 2.2.4.4) oder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

Oligodesoxynukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.4.6) mußten am 5'-Ende phosphoryliert werden, um die kovalente Verknüpfung durch die T4-DNA-Ligase mit dem 3'-Ende des bei der Polymerase-Reaktion neusynthetisierten Strangs zu ermöglichen. Dazu wurden 200 pmol des Oligodesoxynukleotids in einem Gesamtvolumen von 30 µL mit 3 µL 10× T4 Polynukleotid-Kinase-Puffer und 5 U der T4-Polynukleotid-Kinase für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und die Oligodesoxynukleotide direkt weiterverwendet.

#### 2.2.4.4 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

**Phenol/Chloroform-Extraktion.** Um die DNA im Anschluß an eine der oben beschriebenen Umsetzungen von Enzymen oder bei der Präparation von Plasmid-DNA von restlichen Zellproteinen (z. B. verbliebenen Exonukleasen aus dem *E. coli*-Stamm JM83) zu befreien, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µL 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 400 µL eingestellt. Nach Zugabe von 400 µL Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, RT, 4 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µL Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation wie zuvor abgetrennt.

**Ethanol-Fällung.** Für die Ethanol-Fällung wurde die wässrige Phase in einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL eiskaltem Ethanol gemischt und mindestens für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das nach Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µL 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Je nach weiterem Verwendungszweck wurde die DNA in 20-100 µL TE Puffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.2.4.5 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten oder durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Ligierungsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µL bei 16 °C für 2 bis 20 h durchgeführt. Für einen Standardansatz wurden dazu 2 µL 10× Puffer (Fertiglösung des Herstellers), 0,5 µL T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µL) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Insert der Ligierungsreaktion unterworfen. 5 µL des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

#### 2.2.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) entsprechend der Methode von Kunkel *et al.* (1987) angewendet. Dabei wird zunächst ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschten Substitutionen trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids hybridisiert, wobei es zur Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen kommt. In der sich anschließenden Polymerase-Reaktion dient das Oligodesoxynukleotid als *Primer* für die Synthese des zweiten DNA-Strangs, der mit Hilfe einer DNA-Ligase schließlich kovalent zirkularisiert wird. Da der parentale Strang

aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i stammt und daher zum Teil Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin enthält, wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*<sup>+</sup>-Stammes (z. B. JM83, XL1-Blue) mit dem halbsynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierte Mutation selektiert.

Die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA (Abschnitt 2.2.3.2) und phosphoryliertem Oligodesoxynukleotid (Abschnitt 2.2.4.3) wurde in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ L durchgeführt. Dazu wurden ca. 250 ng ssDNA und 0,5  $\mu$ L der Lösung des Oligodesoxynukleotids (ca. 3,3 pmol) mit 1  $\mu$ L Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>) gemischt und für 5 min im Metallheizblock auf 80 °C erwärmt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 3 bis 16 h langsam auf RT abgekühlt. Zur *in vitro* Synthese des Zweitstranges wurde der Ansatz auf Eis gestellt und mit 1  $\mu$ L Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM DTT; 10 mM ATP; 5 mM dATP; 5 mM dCTP; 5 mM dGTP; 5 mM dTTP), 1  $\mu$ L T4-DNA-Ligase (3 Weiss U) sowie 1  $\mu$ L T4 DNA-Polymerase (3 Weiss U) versetzt. Nach 5 min auf Eis und anschließend 5 min bei RT wurde der Ansatz für 90 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde *E. coli* JM83 oder XL1-Blue mit 5  $\mu$ L einer 1:10-Verdünnung des Ansatzes transformiert. Zur Kontrolle der *in vitro* Reaktion wurden 8  $\mu$ L des unverdünnten Reaktionsansatzes auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

## 2.2.5 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Größe wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab z. B. nach der Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

### 2.2.5.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden im allgemeinen Gele mit 1 % (w/v) Agarose verwendet. Dazu wurden 0,5 g Agarose Typ GTQ in 50 mL TAE-Puffer suspendiert und unter Rühren zum Sieden erhitzt, und die entstandene klare Lösung wurde anschließend zum Abkühlen stengelassen. Zu der noch gut handwarmen Lösung wurde 1/10000 Volumen Ethidiumbromid-Lösung (1 % (w/v)) gegeben. Die Flüssigkeit wurde zum Durchmischen kurz geschwenkt und sofort in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformern gegossen. Die Abmessungen des Gels betragen 10,5 cm in der Länge, 7,5 cm in der Breite und 0,5 cm in der Dicke. Nach dem Erstarren wurde das Agarose-Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, und der Geltaschenformer wurde entfernt. Die Beladung erfolgte mit 10  $\mu$ L der jeweiligen DNA-Lösung je Tasche. Die Proben



wurden vorher mit 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für eine Dauer von 50 min betrieben. Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

### **2.2.5.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab durchgeführt. Dabei wurde zur Herstellung des Gels 0,6 g *Low Melting Point*-Agarose und 60 mL TAE-Puffer verwendet. Nach dem Erhitzen der Suspension und der Zugabe von 1/10000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1 % (w/v)) wurde die Lösung bei 4 °C in eine Gelkammer gegossen. Das Gel wurde mit 2 cm breiten Taschen versehen, die mit der gesamten Reaktionsmischung aus DNA und Restriktionsenzym bzw. dem gesamten PCR-Ansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer gefüllt wurden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V für ca. 90 min durchgeführt. Um Strahlenschäden zu vermeiden, wurden die DNA-Fragmente in UV-Licht geringerer Intensität bei 312 nm sichtbar gemacht. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des JETsorb Gel Extraction Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 µL TE-Puffer eluiert. DNA-Konzentrationen wurden schließlich durch analytische Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines DNA-Größenstandards abgeschätzt, und die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei 4 °C gelagert.

### **2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA**

Durch PCR amplifizierte oder durch Mutagenese veränderte DNA-Abschnitte wurden der Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985) nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung eines ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) sequenziert. Bei diesem Verfahren werden basenspezifisch 3'-terminal fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente erzeugt, automatisiert durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Zur Herstellung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wird eine lineare PCR unter Verwendung der AmpliTaq-DNA-Polymerase FS (Tabor & Richardson, 1995) durchgeführt. Als Terminatoren kommen Didesoxynukleosidtriphosphate zum Einsatz, die basenspezifisch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (*BigDye Terminators*; Rosenblum *et al.*, 1997). Dadurch entsteht während der linearen PCR eine Serie unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die je nach ihrer 3'-terminalen Base unterschiedlich farbstoffmarkiert sind. Diese

DNA-Fragmente werden anschließend im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6, Applied Biosystems) aufgetrennt und ihre Fluoreszenzgruppen durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die basenspezifisch emittierte Fluoreszenz wird von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera detektiert und als digitales Signal an einen Power Macintosh G3 Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (DNA Sequencing Analysis 3.3, Applied Biosystems) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Die lineare PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{L}$  durchgeführt, wobei ca. 200 ng Plasmid-DNA und 2 pmol eines als Primer benutzten Oligodesoxynukleotides (siehe Abschnitt 2.1.2) mit 4  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung *Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems) vereinigt wurden. Diese Mischung enthielt Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxynukleotide sowie die fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide in geeigneten Konzentrationen. Nach Überschichtung mit Mineralöl wurden 25 Zyklen von 30 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C durchgeführt. Anschließend wurden nicht umgesetzte Komponenten abgetrennt. Dazu wurde der Ansatz mit 1  $\mu\text{L}$  3 M NaOAc pH 4,8 und 25  $\mu\text{L}$  Ethanol versetzt und zur Fällung für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (18500 g, RT, 30 min) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol vorsichtig gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 12  $\mu\text{L}$  *Template Suppressor Reagent* (TSR)-Puffer aufgenommen. Die erhaltene DNA-Lösung wurde für 30 s bei 95 °C denaturiert, anschließend in ein 0,5-mL Gefäß überführt, dieses mit einem Septum verschlossen und zur Analyse in das Sequenziergerät eingesetzt.

## **2.3 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli***

Durch die Verwendung von Expressionsvektoren, auf denen das Strukturgen des zu produzierenden Proteins als Fusion mit dem Gen für die bakterielle OmpA-Signalsequenz vorlag, erfolgte die Sekretion der jeweiligen Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli*. Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

### **2.3.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben**

Für die Produktion rekombinanter Proteine im 2 L Maßstab wurden 50 mL LB-Medium, das mit 100 mg/L Ampicillin versetzt worden war, mit einer Einzelkolonie eines mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Produktionskultur (2 L LB-Medium, versetzt mit 100 mg/L Ampicillin) wurde im Verhältnis 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 22 °C bis zu

einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  im Schüttler (200 rpm) kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{g/L}$  induziert (Skerra, 1994b), und die Bakterien wurden für weitere 2,5 bis 3 h im Schüttler kultiviert. In einigen Fällen wurden die Zellen mit einem zweiten Plasmid, pTUM4 (Schlupschy *et al.*, 2006), kotransformiert. Dieses Plasmid kodiert für die Faltungshelferproteine DsbA, DsbC, FkpA und SurA und vermittelt Chloramphenicol-Resistenz, weshalb das LB-Medium zusätzlich mit 30 mg/L dieses Antibiotikums versetzt wurde.

Zur Präparation der periplasmatischen Zellfraktion wurde die Kultur zentrifugiert (SLA3000, 4200 g, 4 °C, 15 min), der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 20 mL eiskaltem Periplasma-Aufschlußpuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Kunststoffröhrchen überführt und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 15 min). Nach erneuter Zentrifugation (SS34, 30000 g, 4 °C, 15 min) und abschließender Sterilfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) wurde der erhaltene periplasmatische Extrakt über Nacht gegen 2 L SA-Puffer dialysiert.

Zur späteren Analyse der Proteinproduktion durch SDS-PAGE wurden Proben des Gesamtzellproteins präpariert. Dazu wurde 1 mL der Kultur entnommen, zentrifugiert (18500 g, 4 °C, 2 min) und der Überstand abgezogen. Die Zellen wurden in 80  $\mu\text{L}$  Benzonase-Lösung (12,5 U/mL in Benzonase-Puffer) resuspendiert und mit 20  $\mu\text{L}$  5 $\times$  Auftragspuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE gemischt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis und Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) wurde das Gesamtzellprotein bei -20 °C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE verwendet.

### 2.3.2 Produktion von Selenomethionin-markiertem Protein

Die Produktion von Selenomethionin (SeMet)-markiertem Protein für die Röntgenstrukturanalyse (siehe Abschnitt 3.3.2) erfolgte im Schüttelkolben durch Unterdrückung der wirtseigenen Methionin-Biosynthese bei gleichzeitiger Zugabe des Methionin-Analogons SeMet (Gassner, 1998; van Duyne *et al.*, 1993).

Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in LB-Medium mit 100 mg/L Amp, welches mit einer Einzelkolonie des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft wurde. Zur Proteinproduktion wurden 2 L M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989), welches mit 0,4 % (w/v) Glukose, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 200 mg/L L-Pro, 10 mg/L Thiaminhydrochlorid und 100 mg/L Ampicillin supplementiert worden war, im Verhältnis 1:50 mit dieser Vorkultur angeimpft und bei 22 °C im Schüttler (200 rpm) kultiviert. Beim Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  wurde die Methionin-Biosynthese durch Zugabe von L-Lys, L-Thr, L-Phe (je 100 mg/L), L-Leu, L-Ile, L-Val (je 50 mg/L) unterdrückt und

gleichzeitig 25 mg/L L-SeMet zugegeben. Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurde die Produktion des rekombinanten Proteins durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 200 µg/L induziert (Skerra, 1994b), und die Bakterien wurden für weitere 14 h im Schüttler kultiviert. Die anschließende Isolierung der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte wie für das native Protein beschrieben (siehe Abschnitt 2.3.1).

### 2.3.3 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Laborfermenter

Für die Kristallisation wurden teilweise größere Mengen der rekombinanten Proteine benötigt, welche nach einer von Schiweck & Skerra (1995) etablierten Methode durch Fermentation von *E. coli* hergestellt wurden.

Die Bakterienzellen wurden dazu in einem 5 L bzw. 10 L Fermentergefäß in einem synthetischen Mineralsalzmedium kultiviert, dem Glucose als Kohlenstoff- und Ammoniak als Stickstoffquelle zugefüttert wurde. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde dabei der *E. coli* K12 Wildtyp W3110 (Bachmann, 1990) verwendet.

Als Initialkultur wurden morgens 2 mL LB/Amp-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 180 (360) mL Mineralsalzlösung (Angaben in Klammern gelten für den 8 L Maßstab), denen 20 (40) mL 20 % (w/v) Glucose, 2 (4) mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, 200 (400) µL Antibiotika-Stammlösung und 200 (400) µL Thiaminhydrochlorid-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde abends im Verhältnis 1:1000 mit der Initialkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD<sub>550</sub> = 2,0. Zur Bestimmung der Optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben im Verhältnis 1:10 mit der Mineralsalzlösung verdünnt und im Spektrometer bei 550 nm vermessen.

Das Kulturgefäß wurde mit 3,5 L (7 L) Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf der Magnetrührereinheit fixiert. Zunächst wurde das Medium auf 30 °C temperiert und über einen Trichter mit 400 (800) mL 20 %iger (w/v) Glucose, 40 (80) mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, je 4 (8) mL der Ampicillin-Stammlösung sowie der Thiaminhydrochlorid-Stammlösung, je 2 (4) mL FeCl<sub>3</sub>- und Zn-Acetat-Lösung, 5 (10) mL Spurenelement-Lösung sowie 100 (200) µL 30 %iger Antifoam A-Lösung versetzt. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, wobei dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck vor dem Animpfen der relative Wert 100 % zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. später reinem Sauerstoff auf einen Wert  $\geq 30$  % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-

Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts).

Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (200 bzw. 400 mL) abends angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und nochmals 300 (600) µL Antifoam A zugegeben. Die Bakterienkultur konnte nun bis zum Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{550} \approx 5,0$  am nächsten Morgen, maximal jedoch für acht Stunden unbeaufsichtigt gelassen werden. Um sie während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zudosiert:

|                                    |        |                    |
|------------------------------------|--------|--------------------|
| Ab einer Zelldichte von $OD_{550}$ | = 7,5  | Zugabe mit 14 mL/h |
|                                    | = 12,5 | Zugabe mit 20 mL/h |
|                                    | = 18,5 | Zugabe mit 30 mL/h |
|                                    | = 22,5 | Zugabe mit 40 mL/h |

Des Weiteren wurden der Kultur bei  $OD_{550} = 13$  nochmals je 2 (4) mL Fe- und Zn-Stammlösung sowie 5 (10) mL der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde – gewöhnlich am späten Vormittag – bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 20$  durch Zugabe von 500 µg aTc je L Kultur induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Batch-Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A- Rotor, 4 °C, 20 min, 5.000 rpm) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 600 (1000) mL Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlußpuffer für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug  $2 \text{ mL} \times \text{L}^{-1} \times \text{OD}_{550}^{-1}$ . Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg Lysozym/mL (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/mL in Aufschlußpuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluß zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500 Rotor, 4 °C, 20 min, 11.500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von Zellresten geklärt. Anschließend wurde der periplasmatische Proteinextrakt gegen SA-Puffer dialysiert (dreimal gegen 5 bzw. 10 L). Ausgefällene Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 30 min, 11.500 rpm) und Sterilfiltrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C portionsweise eingefroren.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Chromatographische Verfahren

#### 2.4.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Alle in dieser Arbeit produzierten Proteine lagen als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Skerra & Schmidt, 2000) vor und wurden daher mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* isoliert. Diese wurde dazu über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer – bei Fermentationen 3 mal gegen das etwa 10fache Volumen an SA-Puffer (siehe Abschnitt 2.3.3) – dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der kovalent immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 („StrepTactin“; Voss & Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/mL, wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie – anhand der Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) – mit SA-Puffer gespült. Dabei kamen, abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein, Säulen mit Bettvolumina von 2 mL, 4 mL oder 14 mL zur Anwendung, welche mit Flußraten von 20 mL/h, 40 mL/h bzw. 80 mL/h betrieben wurden.

Nach dem Auftragen der Periplasmafraktion auf die Säule wurde diese mit SA-Puffer gespült, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung von D-Desthiobiotin in SA-Puffer kompetitiv eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und üblicherweise bei 4 °C gelagert.

#### 2.4.1.2 Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer molekularen Abmessungen und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen sowie zum Pufferwechsel vor Liganden-Bindungsstudien verwendet. Die Chromatographie wurde mit einem Dynamax SD 300 HPLC-System betrieben, wobei die Absorptionsmessung mit Hilfe eines Dynamax UV-1 Durchflußdetektors erfolgte. Die verwendeten Chromatographie-Puffer wurden sterilfiltriert und durch Anlegen von Vakuum für 30 min unter Rühren entgast.

Zur Reinigung der Lipocaline zum Zweck der Kristallisation wurde die präparative Superdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule verwendet. Diese besitzt ein Säulen-Bettvolumen von 124 mL und einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa. Vor der Trennung der Proteine wurde die Säule bei einer Flußrate von 1 mL/min mit 2 Säulenvolumen Chromatographie-Puffer äquilibriert. Da sich  $\alpha_1\text{m}$  bei niedrigen Salzkonzentrationen in Lösung als relativ instabil erwies (siehe Abschnitt 3.5) wurde bei der Reinigung dieses Lipocalins ein Chromatographie-Puffer mit etwas höherer NaCl-Konzentration verwendet (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 200 mM NaCl) als bei der Reinigung von B1c, C8 $\gamma$  und T1c (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA). Die Proteinlösung wurde mittels einer 1 mL Probenschleife auf die Säule appliziert, und über einen Fraktionskollektor wurden Fraktionen von 4 mL gesammelt.

Vor Liganden-Bindungsstudien wurden die rekombinanten Proteine unter Verwendung einer analytischen Superdex 75 HR 10/30 Säule (Bettvolumen 24 mL, Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa) abschließend gereinigt und umgepuffert. Diese wurde mit Chromatographie-Puffer (25 mM Na-Phosphat pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) bei einer Flußrate von 0,5 mL/min äquilibriert. 100  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung wurden auf die Säule appliziert, und über einen Fraktionskollektor wurden Fraktionen von 100  $\mu\text{L}$  gesammelt.

Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert, und die Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert.

#### **2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Analyse von Proteinen und deren Mischungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling und Gregerson (1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird dabei durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht.

Die in der Regel 15 %igen Polyacrylamid-Gele waren 0,8 mm dick, wobei das Trenngel ein Format von 5,5 cm  $\times$  8,5 cm besaß. Zur Herstellung der Gele wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm  $\times$  8 cm) mit Abstandshaltern unter Verwendung einer Silikondichtung zusammengesetzt und mit Hilfe von Klammern fixiert. Die Polymerisation der Trenngelmischung, bestehend aus 5 mL einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 mL 4 $\times$  Lower Tris und 2,5 mL Wasser, wurde durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{L}$  TEMED und 50  $\mu\text{L}$  10 % (w/v) APS-Lösung gestartet. 4,5 mL dieser Mischung wurden zügig in die vertikale Gelkammer pipettiert und zwecks Luftabschluß mit 0,5 mL Wasser überschichtet, um eine gleichmäßige Trenngelgrenzfläche zu erzielen. Nach erfolgter

Polymerisation wurde das Wasser sorgfältig entfernt und die Sammelgelmischung, zusammengesetzt aus 1 mL einer 30 %igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 1,5 mL 4× Upper Tris und 3,5 mL Wasser, hergestellt. Durch Zugabe von 3 µL TEMED und 36 µL 10 % (w/v) APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet, die Sammelgelmischung wurde in die Gelkammer pipettiert, und ein Taschenformer eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Kammer gespannt, die mit Laufpuffer befüllt wurde.

Die Proteinproben wurden zu einem Volumen von 20 µL angesetzt, mit 5 µL 5× Auftragspuffer (reduzierend oder nicht reduzierend) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Entfernen des Taschenformers konnten die Proben mit Hilfe einer 20 µL Pipette aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA für eine Dauer von 160 min oder bis zum Austreten des Bromphenolblau-Markers aus dem unteren Ende des Trenngels durchgeführt. Anschließend wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Trenngel vom Sammelgel abgeschnitten und entwickelt.

Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliantblau wurde das Gel für 20 min in ca. 50 mL Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit mehrfach erneuerter Entfärbelösung bis zum Verblässen des Hintergrundes inkubiert. Das Gel wurde in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden Proteingele auf Whatman-Papier im Geltrockner bei 80 °C für 1 h unter Vakuum getrocknet.

### 2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration  $c$  von Proteinlösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) – in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke  $d = 1$  cm und unter Korrektur der Absorption des Puffers – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$A_{280} = \varepsilon \times c \times d$$

Hierzu wurde der jeweilige Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  des Proteins nach der Methode von Gill & von Hippel (1989) mit Hilfe der Computerprogramme TRANSLATE und PEPTIDESORT aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) berechnet. Dabei werden die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette (Gill & von Hippel, 1989) summiert.

### 2.4.4 Konzentrierung von Proteinen

Für die Kristallisation sind Lösungen mit Proteinkonzentrationen von 10-30 mg/mL erforderlich, welche durch Konzentrierung mittels Ultrafiltration erhalten werden können. Dazu wurde die gereinigte Proteinlösung unter Verwendung einer Vivaspin-Konzentratoreinheit mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa durch Zentrifugation (Sigma 4K10,



4 °C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in eine Spin-X Sterilfiltrationseinheit (0,45 µm) überführt, eventuell aggregiertes Protein entfernt (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 4 °C, 1 min, 14.000 rpm) und das Filtrat entnommen. Die Konzentration einer 1:100 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt, und die Proteinlösung wurde bei 4 °C aufbewahrt.

## 2.5 Biophysikalische Methoden

### 2.5.1 Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenztitration wurde angewandt, um die Bindungskonstanten verschiedener niedermolekularer Liganden zu den Lipocalinen zu bestimmen. Dabei macht man sich zunutze, daß sich bei der Bildung des Protein/Ligand-Komplexes die Fluoreszenzeigenschaften mindestens eines der Bindungspartner verändern. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzen einer Konzentrationsreihe ermöglicht die Ermittlung der Komplex-Dissoziationskonstante. So wurde die Bindung von *all-trans* Retinsäure untersucht, indem die Abnahme der intrinsischen Proteinfluoreszenz bei zunehmender Ligandenkonzentration gemessen wurde. Im Gegensatz hierzu wurde bei der Titration mit *all-trans* Retinol, 8-Anilino-1-naphthalin-sulfonsäure (ANS) und 11-(5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonylamino)undecansäure (DAUDA) die Zunahme der Fluoreszenz des Liganden in Abhängigkeit von dessen Konzentration gemessen. Die Messungen wurden mit einem Perkin Elmer LS 50 B Fluorimeter durchgeführt, welches mit einer auf 25 °C thermostatisierten und mit einem Rührer versehenen 1×1 cm<sup>2</sup> Quarzküvette ausgestattet war. Alle Proteinlösungen wurden zunächst durch Gelfiltration in den für die Messung verwendeten Phosphatpuffer (25 mM Na-Phosphat pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) überführt und sterilfiltriert (0,45 µm), und die gewünschte Konzentration wurde durch Verdünnung mit diesem Puffer eingestellt.

**Messung der Proteinfluoreszenz.** Bei der Titration mit *all-trans* Retinsäure wurde die intrinsische Fluoreszenz der Trp- und Tyr-Reste bei 280 nm (Spaltbreite 4 nm) angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 340 nm (Spaltbreite 4,5 nm) detektiert. Zur Messung wurden 2 mL der Proteinlösung (1 µM) in der Quarzküvette vorgelegt. Die Ligandenlösung (0,75 mM *all-trans* Retinsäure in DMF) wurde in Portionen von 1-8 µL zugesetzt und zwecks Gleichgewichtseinstellung jeweils für 1 min bzw. bei RBP und PGDS jeweils für 15 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend gemittelt über 10 s gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (bis zu 40 µL entsprechend 2 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Die durch die Titration

erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerte wurden nach Abzug der Fluoreszenz des Puffers um den inneren Filtereffekt des Liganden korrigiert (siehe unten) und auf 100 % skaliert.

**Korrektur des inneren Filtereffektes.** Aufgrund der nicht vernachlässigbaren Eigenabsorption von *all-trans* Retinsäure bei der für die Messung der Proteinfluoreszenz gewählten Anregungswellenlänge von 280 nm wurden die erhaltenen Meßdaten um diesen Effekt korrigiert. Die Verringerung der gemessenen Intensität der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an *all-trans* Retinsäure wurde durch Fluoreszenztitration einer geeignet konzentrierten Lösung von N-Acetyl-L-tryptophanamid (5 µM) mit dem Liganden ermittelt. Da *all-trans* Retinsäure nicht durch Komplexbildung mit N-Acetyl-L-tryptophanamid wechselwirkt, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei deren Zugabe in erster Linie auf die Eigenabsorption zurückzuführen.

Für die Fluoreszenz  $F$  eines Proteins  $P$  in verdünnter Lösung gilt allgemein:

$$F = f_p [P] I_{\text{Anregung}}^0 \quad (1).$$

Dabei sind  $f_p$  die molare Proteinfluoreszenz,  $[P]$  die Proteinkonzentration und  $I_{\text{Anregung}}^0$  die Intensität des ungeschwächten Anregungslichtes am Ort des Fokus für die Emission.

Durch die Eigenabsorption des Liganden in der Lösung – den sogenannten inneren Filtereffekt – wird die Intensität des Anregungslichtes am Ort des Fokus für die Emission in Abhängigkeit von seiner Konzentration vermindert. Es gilt daher für die gemessene, apparente Fluoreszenz  $F_{\text{app}}$  mit  $I_{\text{Anregung}}^0 > I_{\text{Anregung}}$ :

$$F_{\text{app}} = f_p [P] I_{\text{Anregung}} \quad (2).$$

Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz läßt sich für die Abschwächung des Anregungslichtes formulieren:

$$\log \frac{I_{\text{Anregung}}^0}{I_{\text{Anregung}}} = \varepsilon_L c_L d \quad (3).$$

Dabei ist  $\varepsilon_L$  der molare Extinktionskoeffizient des Liganden,  $c_L$  die Ligandenkonzentration und  $d$  die (unbekannte) Wegstrecke des Anregungslichtes von der Küvettenwand bis zum Emissions-Fokus. Die Umstellung von Gleichung (3) führt zu:

$$I_{\text{Anregung}} = I_{\text{Anregung}}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (4).$$

Damit ergibt sich aus Gleichung (2):

$$F_{\text{app}} = f_p [P] I_{\text{Anregung}}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (5)$$

bzw. unter Verwendung von Gleichung (1):

$$F_{\text{app}} = F \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (6).$$

Werden die bei der Titration mit N-Acetyl-L-tryptophanamid [Trp] mit *all-trans* Retinsäure erhaltenen Fluoreszenzsignale  $F_{\text{app}}$  halblogarithmisch gegen die Ligandenkonzentration  $c_L$  aufgetragen, kann der apparente Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_{\text{app}} = \varepsilon_L d$  als Steigung der Regressionsgeraden bestimmt werden:

$$\log F_{\text{app}} = \log F - \varepsilon_{\text{app}} c_L \quad (7).$$

Die Korrektur der bei der Titration von Proteinlösungen mit *all-trans* Retinsäure gemessenen Werte  $F_{\text{app}}$  erfolgt dann umgekehrt unter Verwendung dieses Parameters mittels:

$$F = F_{\text{app}} \cdot 10^{\varepsilon_{\text{app}} c_L} \quad (8).$$

**Messung der Ligandenfluoreszenz.** Bei der Titration mit *all-trans* Retinol, ANS bzw. DAUDA wurde die Fluoreszenz dieser Liganden bei 334 nm, 370 nm bzw. 345 nm (Spaltbreite jeweils 4 nm) angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 455 nm, 475 nm bzw. 490 nm (Spaltbreite jeweils 4,5 nm) detektiert. Zur Messung wurden 2 mL der Proteinlösung (1  $\mu\text{M}$ ; bzw. 5  $\mu\text{M}$  für die Titration mit DAUDA) in der Quarzküvette vorgelegt. Die Ligandenlösung (0,25 mM *all-trans* Retinol in Ethanol; 2 mM ANS in DMF; 1 mM DAUDA in DMF) wurde in Portionen von 1-8  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung zugesetzt und zwecks Gleichgewichtseinstellung jeweils für 1 min bzw. bei RBP und PGDS jeweils für 15 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend gemittelt über 10 s gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (20  $\mu\text{L}$  bzw. 40  $\mu\text{L}$ , entsprechend 1 % bzw. 2 %) wurde bei der Auswertung wiederum vernachlässigt.

**Bestimmung der Dissoziationskonstanten.** Die Bindungspartner Protein P und Ligand L stehen bei jedem Schritt der Fluoreszenztitration miteinander im chemischen Gleichgewicht. Das Verhältnis zwischen komplexierten und unkomplexierten Bindungspartnern wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben:



Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ergibt sich zu:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[P \bullet L]} \quad (10).$$

Hierbei bezeichnet  $[P]$  die Konzentration des unkomplexierten Proteins,  $[L]$  die Konzentration des nicht gebundenen Liganden und  $[P \bullet L]$  die Konzentration des Protein/Ligand-Komplexes. Substituiert man  $[P]$  durch  $[P]_t - [P \bullet L]$  und  $[L]$  durch  $[L]_t - [P \bullet L]$ , wobei  $[P]_t$  und  $[L]_t$  die Gesamtkonzentrationen des eingesetzten Proteins bzw. Liganden bei dem jeweiligen Titrationschritt sind, so erhält man:

$$K_D = \frac{([P]_t - [P \bullet L])([L]_t - [P \bullet L])}{[P \bullet L]} \quad (11).$$

Durch Lösen der gemischt-quadratischen Gleichung und Auflösen nach  $[P]$ ,  $[L]$  bzw.  $[P \bullet L]$  ergibt sich:

$$[P] = \frac{[P]_t - [L]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (12)$$

$$[L] = \frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (13)$$

$$[P \bullet L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (14).$$

Die gemessene Fluoreszenz  $F$  setzt sich aus den Fluoreszenzbeiträgen der im Gleichgewicht vorliegenden Spezies zusammen:

$$F = f_P [P] + f_L [L] + f_{PL} [P \bullet L] \quad (15).$$

Dabei stehen  $f_P$ ,  $f_L$  und  $f_{PL}$  für die jeweiligen molaren Fluoreszenzkoeffizienten. Werden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten durch die Ausdrücke der Gleichungen (12), (13) und (14) substituiert, so ergibt sich für die Gesamtfluoreszenz:

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([L]_t - [P]_t - K_D) \frac{f_L}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P + f_L - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (16).$$

Da *all-trans* Retinsäure bei der gewählten Wellenlänge keine Eigenfluoreszenz zeigt, konnte Gleichung (16) in diesem Fall durch das Einsetzen von  $f_L=0$  vereinfacht werden. Bei den Titrationsen mit *all-trans* Retinol, ANS bzw. DAUDA wurde dagegen  $f_P=0$  gesetzt. Hier wurde die konzentrationsabhängige lineare Zunahme der Ligandenfluoreszenz zunächst in

Abwesenheit von Protein ermittelt, indem  $f_L$  entsprechend der Steigung der Regressionsgeraden auf  $2,3579 \text{ M}^{-1}$ ,  $0,4872 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $3,4005 \text{ M}^{-1}$  gesetzt wurde.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte eines Titrationsexperimentes wurden durch Abziehen des Leerwertes um den Einfluß des Puffers und eventuell des Liganden (bei der Titration mit *all-trans* Retinsäure, siehe oben) korrigiert, auf 100 % skaliert (nur bei der Titration mit *all-trans* Retinsäure) und gegen die Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden aufgetragen. Die Anpassung der Kurve erfolgte gemäß Gleichung (16) durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“ unter Anpassung von  $f_{PL}$  und  $K_D$ .

### 2.5.2 CD-Spektroskopie

Cirkulardichroismus beschreibt die unterschiedliche Abschwächung von rechts- und linkshändig cirkular polarisiertem Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives, absorbierendes Medium, was durch verschiedene molare Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_R$  und  $\epsilon_L$  für die beiden Komponenten beschrieben werden kann. Bei Proteinen betrachtet man die Absorptionseigenschaften der Peptidbindungen im fernen UV-Bereich (180 nm bis 270 nm) oder die der aromatischen Seitenketten im nahen UV-Bereich (250 nm bis 350 nm). Durch Analyse des CD-Spektrums im Absorptionsbereich der Peptidbindungen kann man Aufschluß über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins erhalten. Die Messung des Cirkulardichroismus im Absorptionsbereich der aromatischen Seitenketten ermöglicht Aussagen über ihre molekulare Umgebung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt, um Information über die Sekundärstruktur der rekombinanten Lipocaline zu erhalten.

Zur Aufnahme der Spektren wurden die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigten Proteine zweimal gegen Messpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 50 mM Kaliumsulfat) dialysiert. Die Proteinlösung (ca.  $25 \mu\text{M}$  bis  $80 \mu\text{M}$ ) wurde in eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm gefüllt und für 20 min bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  im Probenhalter des Spektropolarimeters (Jasco J-810) temperiert. CD-Spektren wurden im Bereich von 190 bis 250 nm aufgezeichnet, wobei bis zu 20 Spektren akkumuliert wurden (Geräteeinstellungen: *response* = 1 s; *band width* = 1 nm; *data pitch* = 0,2 nm; *scan speed* = 50 nm/min).

Die in Grad gemessenen Werte für die Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  wurden für jedes Protein auf die molare Elliptizität pro Aminosäure  $\Theta_{\text{MWR}}$  mit Hilfe der folgenden Gleichung umgerechnet:

$$\theta_{\text{MWR}} = \frac{\theta_{\text{obs}} \times M_R}{c \times d \times N_A}$$

Dabei bezeichnet  $M_R$  die Molmasse des untersuchten Proteins,  $c$  dessen Konzentration in mg/mL,  $d$  die Schichtdicke in cm sowie  $N_A$  die Anzahl der Aminosäuren.

## 2.6 Kristallographische Methoden

### 2.6.1 Proteinkristallisation

Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen bei 4 °C, 12 °C und 20 °C durchgeführt. Für das *Screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *Sparse Matrix Sampling* (Jancarik & Kim, 1991) angewandt. Dabei wurde jeweils 1-3 µL Proteinlösung (10-30 mg/mL) mit 1 µL des Kristallisationspuffers auf einem Glasdeckplättchen vermischt. Die Deckplättchen waren zuvor zur Erzeugung einer hydrophoben Oberfläche im Ultraschallbad gereinigt (Wasser mit 10 g/L Neodisher Spülmittel), für 5 min mit 2 % (v/v) Aquasil behandelt und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült worden, um das Zerfließen der Kristallisationstropfen zu verhindern. Die Deckplättchen wurden umgedreht, über der Vertiefung einer mit Silikonöl am Rand beschichteten Linbro 24 Well Kristallisationsschale plaziert und gegen 500 µL der Reservoirolösung äquilibriert. Anschließend wurden die Ansätze für bis zu zwölf Monaten erschütterungsfrei gelagert und regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Typischerweise wurden *Crystal Screens* (1, 2 und *Cryo*) sowie *Magic Screens* (1 und 2) verwendet.

### 2.6.2 Datensammlung und Datenreduktion

Beugungsdaten von Proteinkristallen wurden nach der Oszillationsmethode bei Raumtemperatur oder 100 K gesammelt. Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei Raumtemperatur wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (0,7 mm Ø) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden anschließend mit etwas Reservoirolösung gefüllt und mit Wachs verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen unter Bestrahlung mit einer Kupfer-Drehanode (Rigaku RU-300 Drehanoden-Generator mit konfokaler Optik von Osmic; 50 kV, 100 mA) gesammelt. Die Messungen erfolgten mit monochromatischer CuK<sub>α</sub>-Strahlung ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) auf einer MAR345 *Imaging Plate*. Alternativ wurden *Cryo*-Datensätze bei 100 K aufgenommen. Dazu wurde ein Kristall in einer Nylon-Schleife aufgenommen, in einem geeigneten Cryoprotektans (z. B. Paratone N) äquilibriert und im Stickstoffstrom (Oxford Cryosystems) bei 100 K schockgefroren. MAD-Daten des humanen Tlc wurden an der *Beamline* BM14 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble aufgenommen.

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM (Abrahams & Leslie, 1996) und SCALA (CCP4, 1994) oder DENZO und SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). Die weitere Analyse der Daten wurde mit Programmen des CCP4-Pakets (de la Fortelle *et al.*, 1997b) oder des HKL-Pakets (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt.

### 2.6.3 Strukturlösung

Die Struktur des humanen Tlc in der Raumgruppe C2 wurde mittels multipler anomaler Dispersion (*Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*, MAD) mit SeMet als anomalem Streuzentrum gelöst. Die Bestimmung der Selen-Substruktur erfolgte mit Hilfe des Programms SnB (Weeks & Miller, 1999) unter Verwendung der am Synchrotron gesammelten anomalen *Peak*-Daten, wobei drei der vier erwarteten Selen-Positionen identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 3.3.3). Für die Berechnung der Phasen mittels SHARP (de la Fortelle *et al.*, 1997a) wurde das anomale Signal der *Peak*-, *Inflection point*- und *Remote*-Datensätze sowie die drei Selen-Positionen verwendet. Anschließend wurde *Solvent flattening* mittels SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) durchgeführt und die initiale Elektronendichte berechnet.

Die anderen Kristallstrukturen wurden durch molekularen Ersatz (Huber, 1965) gelöst, wobei die Programme EPMR (Kissinger *et al.*, 1999) und PHASER (McCoy *et al.*, 2005) verwendet wurden. Die gefundenen Lösungen wurden zunächst einer *Rigid body*-Verfeinerung mittels REFMAC 5 (CCP4, 1994) unterzogen und dann zur Berechnung initialer Phasen verwendet.

### 2.6.4 Modellbau und Verfeinerung

Ein partielles Modell des humanen Tlc in der Raumgruppe C2 wurde unter Verwendung des automatisierten Modellbau-Programms ARPwARP (Lamzin & Wilson, 1993) erstellt. Dieses Modell – bzw. die durch molekularen Ersatz in der Einheitszelle plazierte Suchmodelle – dienten als Ausgangspunkt für den weiteren Modellbau (siehe Abschnitte 3.3.3, 3.3.6 und 3.4.2).

Atomare Proteinmodelle wurden auf SILICON GRAPICS *Workstations* (Typ *Octane* und *Fuel*) mit dem Programm QUANTA (Oldfield, 2001) in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Atommodelle wurden mit REFMAC 5 (CCP4, 1994) oder CNS (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der kristallographische *R*-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter berücksichtigt wurden. Das Gewichtungsverhältnis zwischen kristallographischen und geometrischen Termen wurde dabei zu Beginn der Verfeinerung definiert und mit fortschreitender Qualität des Modelles schrittweise in Richtung der kristallographischen Terme erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, wurden 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als *Test-Set* nicht in die Verfeinerung einbezogen. Der so berechnete freie *R*-Faktor (Brünger, 1992), im Regelfall etwa 5 % höher als der kristallographische *R*-Faktor, warnt dabei vor einer falschen Anpassung des Atommodelles an die Daten.

Positionelle Verfeinerung und *Simulated-annealing* (SA) wurden abwechselnd mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen bis zu einem Absinken des *R*-Faktors auf 30 % durchgeführt. Wassermoleküle wurden unter Berücksichtigung möglicher

H-Brücken und Abstände dort eingebaut, wo die  $2F_O-F_C$ - bzw.  $F_O-F_C$ -Elektronendichte *Peaks* über  $1,0 \sigma$  bzw.  $3,5 \sigma$  aufwiesen. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung wurden zum Teil individuelle Temperaturfaktoren von Haupt- und Seitenketten-Atomen sowie von Wassermolekülen verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome, jeweils für Haupt- und Seitenketten verwendet. Bei Vorliegen von nicht-kristallographischer Symmetrie (*NCS*) wurden Einschränkungen der Positionen und Temperaturfaktoren für innerhalb der asymmetrischen Einheit äquivalente Atome berücksichtigt.

## 2.7 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse und Bearbeitung von DNA- und Protein-Sequenzdateien wurde das Programmpaket GCG (Devereux *et al.*, 1984; Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) unter dem Betriebssystem UNIX verwendet. Insbesondere kamen die Programme BESTFIT, MAP, MAPSORT, PEPTIDESORT, SEQED und TRANSLATE zum Einsatz.

Dreidimensionale Strukturen von Proteinen und kleineren Molekülen wurden mit den Programmen QUANTA (Oldfield, 2001) und INSIGHT II (BIOSYM/MSI/ACCELRYS), PYMOL (DeLano Scientific LCC) und MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) auf verschiedenen *Workstations* (*O2*, *Octane* und *Fuel*; SILICON GRAPHICS) unter UNIX analysiert und dargestellt. Dabei wurden Atomkoordinaten aus Kristallstrukturen verwendet, die der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) sowie der *Cambridge Structural Database* (CCD) entnommen wurden.

Die Auswertung von Meßdaten aus biophysikalischen Analysen erfolgte mit Hilfe des Programmes KALEIDAGRAPH (Synergy Software, Reading, USA) auf einem *Apple Macintosh PowerPC*.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gentechnische Herstellung rekombinanter Lipocaline

Die Produktion der humanen Lipocaline  $\alpha_{1m}$ , C8 $\gamma$ , NGAL, PGDS, RBP und Tlc sowie des bakteriellen Lipocalins von *E. coli* in homogener Form war Voraussetzung sowohl für eine vergleichende Analyse ihrer Liganden-Bindungseigenschaften als auch für Kristallisationsversuche. Daher sollte zunächst ein universelles Expressionssystem für die sekretorische Produktion dieser Lipocaline in *E. coli* etabliert werden.

#### 3.1.1 Konstruktion bakterieller Expressionsvektoren

##### 3.1.1.1 Amplifizierung der für die Lipocaline kodierenden Strukturgene

Die für die humanen Lipocaline sowie für das bakterielle Lipocalin von *E. coli* kodierenden Strukturgene wurden mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligodesoxynukleotide (Tabelle 2, siehe Abschnitt 2.1.2) amplifiziert. Als Matrize dienten cDNA-Proben aus Leber (im Fall von  $\alpha_{1m}$ , C8 $\gamma$  und RBP), Gehirn (im Fall von PGDS) oder Lymphocyten (im Fall von NGAL), während das für Tlc kodierende Strukturgen bereits als klonierte cDNA auf einem Plasmid vorlag (pQE70/Lcn1; Holzfeind *et al.*, 1996) und von diesem amplifiziert wurde. Im Fall des bakteriellen Lipocalins von *E. coli* diente genomische DNA als Matrize.

Die zur Amplifizierung eingesetzten Oligodesoxynukleotide wurden so konstruiert, daß sie einerseits zu den terminalen Sequenzabschnitten der entsprechenden Strukturgene komplementär waren und andererseits die einfache Klonierung der entstehenden PCR-Fragmente zuließen (Abbildung 2; siehe auch Abschnitt 3.1.1.2). Dabei war zu beachten, daß beim Restriktionsverdau des für die Klonierung verwendeten Vektors pASK75-strepII (Skerra, 1994a; Voss & Skerra, 1997) mit *StuI* und *Eco47III* zur Präparation des Vektorrückgrates sowohl zwei Basenpaare des 3'-terminalen Alanin-Kodons der OmpA-Signalsequenz als auch das 5'-terminale Serin-Kodon vor dem *Strep*-tag II deletiert werden. Daher wurden die am 5'-Ende der zu amplifizierenden Strukturgene hybridisierenden Oligodesoxynukleotide 5'-terminal um zwei Nukleotide verlängert, welche nach erfolgter Ligierung das 3'-terminale Alanin-Kodon der OmpA-Signalsequenz wiederherstellten. Mit den am 3'-Ende hybridisierenden Oligodesoxynukleotiden wurde ein glattes Ende mit einem Serin-Kodon erzeugt, um die Sequenz des *Strep*-tagII wieder zu vervollständigen.

In einigen Fällen wurden mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide gezielt Mutationen oder Deletionen eingeführt (Abbildung 2). So wurde das Kodon für den N-terminalen Aminosäurerest Cys-1 des muren bakteriellen Lipocalins von *E. coli*, welcher beim nativen Protein kovalent zu einem als Membrananker dienenden *N*-Acyl-*S*-sn-1,2-

```

pASK75-strepII ==><===== Lipocalin-Strukturgen =====><== pASK75-strepII

      StuI                                     Eco47III
GCTACCGTAGCGCAGGCCT...                   ...AGCGCTTGGTCTCACCCGAGTTCGAAAAATAA
CGATGGCATCGCGTCCGGG...                   ...TCGCGAACAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTATT
AlaThrValAlaGlnAla                           SerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
OmpA                                           Strep-Tag II

5'-CCGGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAATATCCAAAGTGC-3'
   GGCCCTGTGCCAACGCCGCCGACAACAATCCAAGTGCAG...GAACCAGAGCCCATCTTAATCCCAGAGA
   CCGGGACACGGTTGCGGGCGGCTGTTGTAGGTTCCAGTC...CTTGGTCTCGGGTAGAATTAGGGCTCT
                                           3'-GGTCTCGGGTAGAATTAGGGCTCTCG-5'
   GlyProValProThrProProAspAsnIleGlnValGln...GluProGluProIleLeuIleProArgSer
   1                                           183
                                            $\alpha$ m

5'-CCCAGAAGCCTCAGAGGCCACGCC-3'
   CAGAAGCCTCAGAGGCCACGCCGCCGATCCCCATC...CAGTCCACGTCCTGGACGAAGTGAGG
   GTCTTCGGAGTCTCCGGTGCAGCCGGGCTAGGGGGTAG...GTCAAGGTGCAGGACCTGCTTCACTCC
                                           3'-GGTGCAGGACCTGCTTCACTCCCG-5'
   GlnLysProGlnArgProArgArgProAlaSerProIle...GlnPheHisValLeuAspGluValArgSer
   1                                           181
                                           C8 $\gamma$ 

5'-CCCAGGACTCCACCTCAGACC-3'
   CAGGACTCCACCTCAGACCTGATCCCAGCCCCACTCTG...GTCCCAATCGACCAGTGTATCGACGGC
   GTCTTGAGGTGGAGTCTGGACTAGGGTTCGGGGTGGAGAC...CAGGGTTAGCTGGTACATAGCTGCCG
                                           3'-GGGTTAGCTGGTACATAGCTGCCGTCG-5'
   GlnAspSerThrSerAspLeuIleProAlaProProLeu...ValProIleAspGlnCysIleAspGlySer
   1                                           178
                                           NGAL

5'-CAGCACCCGAGGCCAGGTCT-3'
   GCACCCGAGGCCAGGTCTCCGTGCAGCCCAACTTCCAG...CAAACCGATAAGTGCATGACGGAACAA
   CGTGGGCTCCGGGTCCAGAGGCACGTCGGGTTGAAGGTC...GTTTGGCTATTACGTAAGTGCCTTGT
                                           3'-GGCTATTACGTAAGTGCCTTGTTCG-5'
   AlaProGluAlaGlnValSerValGlnProAsnPheGln...GlnThrAspLysCysMetThrGluGlnSer
   1                                           168
                                           PGDS

5'-CCGAGCGGACTGCCGAGTGAGC-3'
   GAGCGGACTGCCGAGTGAGCAGCTTCCGAGTCAAGGAG...GATGGCAGATCAGAAAGAAACCTTTTG
   CTCGCGCTGACGGCTCACTCGTCAAGGCTCAGTTCCTC...CTACCGTCTAGTCTTTCTTTGGAAAAC
                                           3'-CTACCGTCTAGTCTTTCTTTGGAAAACTCG-5'
   GluArgAspCysArgValSerSerPheArgValLysGlu...AspGlyArgSerGluArgAsnLeuLeuSer
   1                                           183
                                           RBP

5'-CCGCCTCAGACGAGGAGATTCAG-3'
   GCCTCAGACGAGGAGATTCAGGATGTGTCCAGGGACGTGG...AGGCAGAGCGAAACCTGCTCTCCAGGG
   CGGAGTCTGTCTCTAAGTCTACACAGTCCCTGCACC...TCCGTCTCGCTTTGGACGAGAGTCC
                                           3'-CGCTTGGACGAGAGTCCCTCG-5'
   AlaSerAspGluGluIleGlnAspValSerGlyThrTrp...ArgGlnSerGluThrCysSerProGlySer
   5                                           157
                                           Tlc

5'-CCGCCAGTTCTCTACGCCGCCG-3'
   TGCAGTTCTCTACGCCGCCGCGTGGCGTGACCGTAGTA...AAATTTATTTGGGTACAGCAGCCTGGT
   ACGTCAAGAGGATGCGGGCGGCACCGCACTGGCATCAT...TTTAAATAAACCCATGTCTCGGACCA
                                           3'-CCCATGTCTCGGACCATCG-5'
   AlaSerSerProThrProProArgGlyValThrValVal...LysPheIleTrpValGlnGlnProGlySer
   1                                           159
                                           Blc

```

**Abbildung 2:** Amplifizierung der Lipocalin-Strukturgene. Gezeigt sind die relevanten Ausschnitte der DNA-Sequenzen des Expressionsvektors pASK75-strepII und der muren Lipocaline  $\alpha$ m, C8 $\gamma$ , NGAL, PGDS, RBP, Tlc und Blc. Da beim Restriktionsverdau von pASK75-strepII mit *StuI* und *Eco47III* sowohl zwei Basenpaare des 3'-terminalen Alanin-Kodons der OmpA-Signalsequenz als auch das 5'-terminale Serin-Kodon des *Strep*-tag II deletiert werden (hier grau dargestellt), wurden die zur Amplifizierung der Lipocalin-Strukturgene als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide an ihren 5'-Enden jeweils so verlängert, daß nach erfolgter Ligierung sowohl das Alanin- als auch das Serin-Kodon wieder hergestellt sind. Nicht der Wildtyp-Sequenz entsprechende Nukleotide und die hieraus resultierenden Aminosäure-Substitutionen (siehe Text) sind fett bzw. kursiv dargestellt.

diacylglycerylcystein modifiziert wird (Bishop *et al.*, 1995), gegen ein Kodon für Alanin ausgetauscht, um das Entstehen einer freien Thiolgruppe zu vermeiden. Gleichzeitig diente der C-terminale Aminosäurerest Ser-159 des Blc zur Vervollständigung der Sequenz des *Strep*-tag II, so daß auf die Einführung eines weiteren Serinrestes verzichtet wurde. Im Gegensatz hierzu wurde bei der Amplifizierung des für C8 $\gamma$  kodierenden Strukturgens das Kodon für den C-terminalen Aminosäurerest Arg-182 gegen ein Serin-Kodon ausgetauscht. Bei der Amplifizierung des für Tlc kodierenden Strukturgens wurden die Kodons für die vier N-terminalen Aminosäurereste des maturen Proteins (His-1 bis Leu-4), welche partiell proteolytisch abgebaut werden (Prof. Dr. Bernhard Redl, persönliche Mitteilung), deletiert, um die Gewinnung homogener Proteinpräparationen zu gewährleisten. Des weiteren wurde das Kodon für den C-terminalen Aminosäurerest Asp-158 deletiert, so daß das Tlc-eigene Kodon Ser-157 die Sequenz des *Strep*-tag II komplettiert. Schließlich diente das am 5'-Ende des  $\alpha_1$ m-Gens lokalisierte Oligodesoxynukleotid zur Einführung einer stillen Punktmutation im Kodon von Asn-9 (AAC  $\rightarrow$  AAT), wodurch eine *Eco*K12-Restriktionsschnittstelle eliminiert wurde.

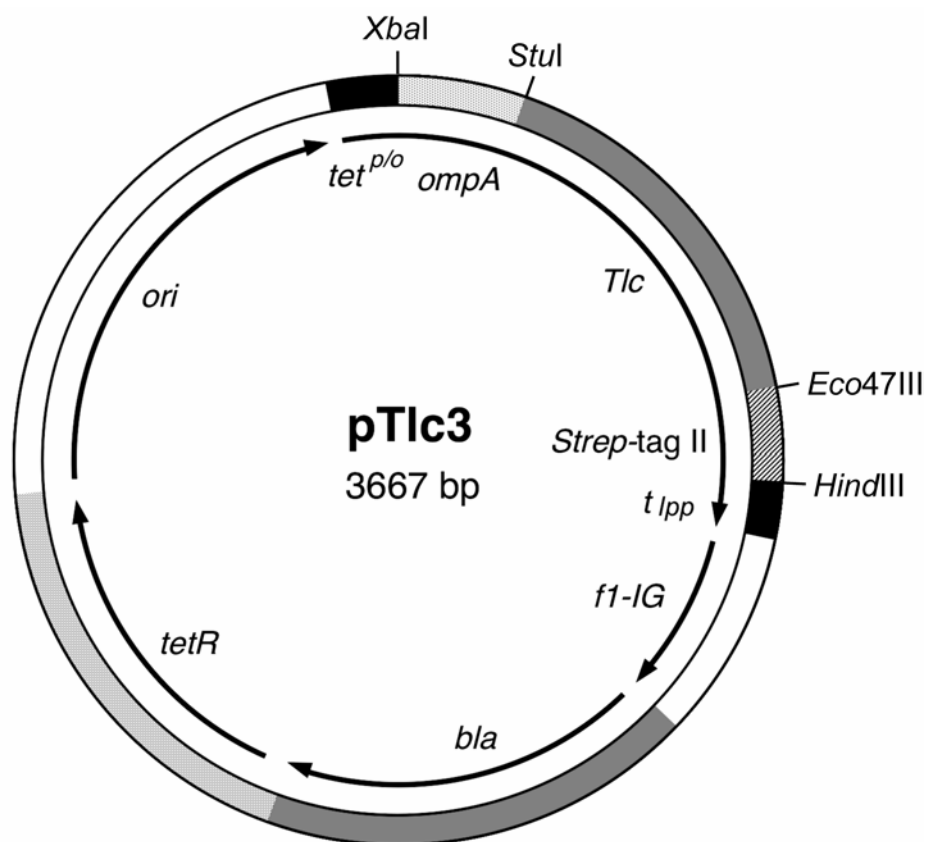
Um Fehler in den PCR-Amplifikaten zu vermeiden, wurde *Pfu*-DNA-Polymerase aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* verwendet, welche eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt und daher eine im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase deutlich niedrigere Fehlerrate aufweist (Lundberg *et al.*, 1991). Diese enzymatische Aktivität führt allerdings auch zu einem partiellen Abbau der als *Primer* verwendeten Oligodesoxynukleotide, welcher durch den Einbau einer Phosphothioat-Bindung anstelle der 3'-terminalen Phosphodiester-Bindung vermieden werden kann (Skerra, 1992). Alle für die Amplifizierungen der einzelnen Strukturgene verwendeten Oligodesoxynukleotide waren entsprechend synthetisiert worden.

### 3.1.1.2 Klonierung der Strukturgene auf den Expressionsvektor pASK75-strepII

Der universelle Expressionsvektor pASK75-strepII war für die Synthese rekombinanter Proteine in *E. coli* unter der transkriptionellen Kontrolle des chemisch induzierbaren *tetA* Promotor/Operator-Systems entwickelt worden (Skerra, 1994a), und wurde bereits erfolgreich für die gentechnische Produktion anderer Lipocaline eingesetzt (Schmidt *et al.*, 1998; Vogt & Skerra, 2001). Dieser Vektor diente zur Konstruktion aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Bei diesem Expressionssystem wird die kotranslationale Sekretion der rekombinanten Proteine in den periplasmatischen Raum von *E. coli* durch die bakterielle OmpA-Signalsequenz vermittelt, welche die ursprüngliche Signalsequenz am N-Terminus jedes rekombinanten Lipocalins ersetzt. Da alle in dieser Arbeit behandelten Lipocaline, abgesehen von dem bakteriellen Lipocalin von *E. coli*, mindestens eine Disulfidbindung enthalten, wurde diese Strategie gewählt, um die Ausbildung der Cystinbrücken unter den oxidativen Bedingungen in diesem Zellkompartiment sicherzustellen. Um die einfache Reinigung der Proteine aus der periplasmatischen Proteinfraction mittels Affinitäts-

Chromatographie zu ermöglichen, wurde zudem das *Strep*-tag II (Skerra & Schmidt, 2000) an den C-Terminus fusioniert (Abbildung 3).

Die bei der Amplifizierung der Strukturgene mittels *Pfu*-DNA-Polymerase mit hoher Effizienz erzeugten glatten Enden der PCR-Fragmente ermöglichten die Inserterung über die in der *Multiple Cloning Site* (MCS) vorhandenen singulären Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Stu*I und *Eco*47III. Hierzu wurde pASK75-strepII mit *Stu*I und *Eco*47III geschnitten, wodurch ebenfalls glatte Enden entstanden. Nach der Isolierung des Vektor-Rückgrates wurde dieses dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligierung sowie die Bildung von Konkameren zu verhindern, wohingegen die PCR-Fragmente phosphoryliert wurden.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Vektors pTlc3 für die gentechnische Produktion des Tlc in *E. coli*. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ( $tet^{p/o}$ ) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, Tlc und dem *Strep*-tag II.  $t_{Ipp}$ , *f1-IG*, *bla*, *tetR* und *ori* bezeichnen den rho-unabhängigen Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Bakteriophagen f1, das  $\beta$ -Lactamase-Gen (Amp-Resistenz), das Tetracyclin-Repressorgen und den Replikationsursprung des Vektors.

Nach erfolgter Ligierung kodierten die Plasmide für Fusionsproteine der verschiedenen Lipocaline mit der N-terminalen bakteriellen OmpA-Signalsequenz, welche während der Translokation des rekombinanten Proteins über die innere Membran des Wirtsbakteriums abgespalten wird, und dem C-terminalen *Strep*-tag II (Abbildung 3; siehe auch Abschnitt

3.1.1.1). Die Inserierung der PCR-Fragmente wurde durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *Hind*III und *Xba*I überprüft. Da die PCR-Fragmente bei dieser Klonierungsstrategie in zwei verschiedenen Orientierungen in den Vektor inserieren können, wurde ihre Ausrichtung mittels Restriktionsverdau anhand interner Schnittstellen analysiert. Klone, welche das Insert in der gewünschten Orientierung trugen, wurden unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide D-20, F-83 und PR-1 sequenziert, um die Identität der PCR-Fragmente zu bestätigen. Dabei zeigte sich, daß bei einigen der klonierten Strukturgene in allen jeweils sequenzierten Klonen Punktmutationen im Vergleich zu den publizierten Sequenzen auftraten (Tabelle 3). In einem Fall handelte es sich um eine stille Mutation, welche keinen Aminosäure-Austausch bewirkte. In den für C8 $\gamma$  und für RBP kodierenden Strukturgenen führten die Mutationen dagegen jeweils zum Austausch einer einzelnen Aminosäure.

Diese Missense-Mutationen (C8 $\gamma$ (H104N) und RBP(Q154H); Nummerierung der Aminosäuren bezogen auf die Sequenz der maturen Proteine) wurden mittels ortsgerechter Mutagenese (Geisselsoder *et al.*, 1987) unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide C8g-4 und NB-H154Q korrigiert. Die Rückmutation des RBP wurde im Rahmen einer Bachelor-Arbeit durchgeführt (Bischoff, 2003).

**Tabelle 3:** Punktmutationen und gerichtete Mutationen

| Gen          | Datenbank-<br>Nummer* | Punktmutation  | Seitenketten-<br>Substitutionen | Gerichtete<br>Mutation | Seitenketten-<br>Substitutionen |
|--------------|-----------------------|----------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| $\alpha_1$ m | NM_001633             | –              | –                               | T383A                  | C34S                            |
| C8 $\gamma$  | NM_000606             | C445A<br>C465T | H104N<br>–                      | T253A                  | C40S                            |
| NGAL         | NM_005564             | –              | –                               | T392A                  | C87S                            |
| PGDS         | NM_000954             | –              | –                               | T268A<br>T574A         | C43A<br>C145S                   |
| RBP          | NM_006744             | G600C          | Q154H                           | –                      | –                               |
| Tlc          | NM_002297             | –              | –                               | G414C                  | C101S                           |
| Blc          | U21726                | –              | –                               | T391A                  | C113S                           |

\* *Gene Bank Accession Number*

### 3.1.1.3 Eliminierung freier Cysteinreste

Alle hier behandelten Proteine außer dem RBP enthalten einen oder mehrere ungepaarte Cys-Reste, deren physiologische Funktion oft nicht klar ist. Um bei der Produktion der Lipocaline in *E. coli* oxidative Quervernetzung oder die Ausbildung unphysiologischer intramolekularer Disulfidbindungen zu vermeiden, wurden die Kodons für diese Cys-Reste mittels

ortsgerichteter Mutagenese (Geisselsoder *et al.*, 1987) gegen Kodons für Serin oder Alanin ausgetauscht (Tabelle 3). Unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide A1m-3, C8g-3, NGAL-3, TearLPC-4 und Blc-3 wurden die Mutanten  $\alpha_1m$ (C34S), C8 $\gamma$ (C40S), NGAL(C87S), Tlc(C101S) und Blc(C113S) erzeugt. Die Mutante der PGDS, welche die Substitutionen C43A und C145S trägt, wurde im Rahmen einer Bachelor-Arbeit durchgeführt (Distel, 2003). Die Einführung der gewünschten Mutationen wurde durch Sequenzierung der erhaltenen Klone unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide D-20, F-83 und PR-1 bestätigt.

### 3.1.2 Bakterielle Produktion und Isolierung der rekombinanten Proteine

#### 3.1.2.1 Produktion im Schüttelkolben

Die bakterielle Produktion der verschiedenen Lipocaline erfolgte zunächst im 2 L Maßstab im Schüttelkolben unter Verwendung des *E. coli* Stamms JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), welcher sich aufgrund seiner guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit einer effizienten Faltung rekombinanter Proteine empfahl. Dazu wurden Zellen von JM83 mit den Expressionsvektoren p $\alpha_1m$ 2, pBlc2, pC8g2, pHNGAL14, pHRBP-A, pPGDS(C43A/C145S) oder pTlc3 transformiert. Die proteinchemischen Eigenschaften der auf diesen Vektoren kodierten Lipocaline sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Biosynthese der rekombinanten Proteine wurde bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  durch Induktion des *tet*-Promotors mit 200  $\mu$ g aTc pro L Kulturmedium für drei h induziert, wobei sowohl vor Zugabe des Induktors als auch zum Zeitpunkt der Zellernte Proben des Gesamtzellproteins genommen wurden. Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraction von *E. coli*, welche das sekretierte rekombinante Protein enthielt, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben präpariert.

Bei der Produktion von  $\alpha_1m$ , RBP und PGDS trat nach Induktion der Genexpression Zell-Lyse auf, welche sich durch Kontamination der periplasmatischen Proteinfraction mit cytoplasmatischen Proteinen von *E. coli* äußerte. Dieser Effekt, welcher zuvor schon bei der bakteriellen Produktion des Schweine-RBP beobachtet worden war (Müller & Skerra, 1993), könnte auf einen toxischen Effekt der rekombinanten Proteine – möglicherweise in ungefaltetem oder aggregiertem Zustand – auf die Wirtszellen hinweisen. Außerdem waren diese drei Lipocaline nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie stärker als die anderen rekombinanten Proteine mit Disulfidisomeren verunreinigt, welche aufgrund ihrer verringerten Mobilität im SDS-Gel unter nichtreduzierenden Bedingungen identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Beide Effekte ließen sich bei der Produktion des Schweine-RBP und anschließend auch bei der Produktion des humanen RBP, welche jeweils drei intramolekulare Disulfidbrücken enthalten, durch die gleichzeitige Überexpression einer Disulfidisomerase vermeiden (Müller & Skerra, 1993; Bischoff, 2003).