

EPOXYQUEUOSIN-REDUKTASE IN *ESCHERICHIA COLI*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

DISSERTATION

von

Diplom-Biochemikerin

Nadia Bouhzam

aus Mulhouse (Frankreich)

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Rétey

2. Gutachter: Prof. Dr. W. G. Zumft

Mündliche Prüfungen im Zeitraum: 26. Juli – 6. August 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe (TH), unter der Leitung von Prof. Dr. J. Rétey in der Zeit von Mai 2001 bis Mai 2004 angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Rétey und Frau Dr. Birgid Langer danke ich für die interessante Themenstellung und die freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. W. G. Zumft danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Bereitschaft zur Diskussion.

Für wertvolle Ideen und die Bereitstellung der Laboreinrichtungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Manfred Focke.

Für die Laboreinrichtung, Bereitstellung des PCs und ihre Freundlichkeit bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Anne Ulrich.

Für die klare Einführung bei MALDI-TOF Messungen danke ich Herrn Dr. H. Körner.

Für die Bereitschaft zu zahlreichen Diskussionen bezüglich der Bioinformatik-Untersuchungen bedanke ich mich sehr bei Frau Dr. A. Hotz-Wagenblatt.

Für die Evaluation der Affinität des Protein-Kofaktor-Substrats bedanke ich mich bei Herrn Dr. Ingolf Sommer.

Für die schnellen und effizienten Beseitigungen der Microsoft-Betriebsstörungen bedanke ich mich bei Andreas Sigrist und Ralf Eisenhut.

Für die geduldige Korrektur zahlreicher Grammatik- und der Formulierungsfehler bedanke ich mich ganz herzlich bei Marietheres Krome, Marco Hassmann, Christian Lange, Wafa Souayah, Sebastian Hofmann, Sandra Viergutz, Martin Heimberger, Stefanie Vollmer, Dorit Grasnack, Sonja Müller und nicht zuletzt bei Stefan Grage.

Für die angenehme, motivierte und motivierende Arbeitsatmosphäre danke ich Sandra, Andi, Heimi, Steffi, Csaba, Gaby, Christian, Tayseer und der gesamten Arbeitsgruppe von Anne.

Der europäischen Kommission und dem Land Baden Württemberg danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Mein Dank geht an meinen lieben Klaus, der mich bis hierher geführt hat.

Mein Dank geht auch an meinen lieben älteren Brüder, mein Vorbild, an meinen lieben jüngsten Bruder, meine Energiequelle, und an meinen lieben Eltern für die Vermittlung ihrer Werte, wie Willenskraft und Freude am Leben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner lieben Freunde-Familie für die umfassende Unterstützung, manche für ihre Brüderlichkeit, andere für ihre Mütterlichkeit, für die Ermutigungen.

Konzentriere dich nicht so stark darauf, einen Fuß vor den anderen zu setzen, dass du darüber vergisst, zu schauen, wo du hinläufst.

Spruchwort

Meine Familie, meine Freunde.

1	<u>EINLEITUNG</u>	8
2	<u>THEORIE UND AUFGABENSTELLUNG</u>	9
2.1	THEORIE	9
2.1.1	COBALAMIN	9
2.1.1.1	Adenosylcobalamin: das Coenzym (AdoCobI)	9
2.1.1.2	Aufnahme von Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	9
2.1.1.3	Biologische- und Mangel-Wirkung des Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	10
2.1.1.4	Strukturen von Cyano- und Adenosyl- Cobalamin	11
2.1.1.4.1	„Base-on-mode“	12
2.1.1.4.2	„Base-off-mode“	12
2.1.2	ADENOSYLCOBALAMIN-ABHÄNGIGE ENZYME	13
2.1.2.1	Klasse I	14
2.1.2.2	Klasse II	14
2.1.2.3	Klasse III	14
2.2	AUFGABENSTELLUNG	15
3	<u>VERWENDETE MATERIALIEN UND METHODEN</u>	18
3.1	GERÄTE, CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	18
3.1.1	HÄUFIG VERWENDETE GERÄTE	18
3.1.2	HÄUFIG VERWENDETE CHEMIKALIEN	20
3.1.3	LÖSUNGEN	23
3.1.3.1	Lösungen für die Mikrobiologische Arbeitsmethoden	23
3.1.3.1.1	Medien für die Anzuchten	23
3.1.3.1.2	Lösungen für den Aufschluss	23
3.1.3.2	Lösungen für die Proteinchemischen Arbeitsmethoden	24
3.1.3.2.1	Lösungen für MALDI-TOF MS Messungen	24
3.1.3.2.2	Lösungen für die Chromatographische Behandlung	25
3.1.3.2.3	Lösungen für die PAGE	28
3.1.3.2.4	Lösungen für Färbungen	32
3.1.3.2.5	Lösungen für Proteinbestimmung	34
3.1.3.2.6	Blotting	35
3.1.3.3	Lösungen für die Nukleinsäure Arbeitsmethoden	38
3.1.3.3.1	Lösungen und die Nukleinsäurechemische Arbeitsmethoden	38

3.1.3.3.2	Lösungen für die DNA-fragment Klonierung	38
3.1.3.3.3	Lösungen für das Plasmid Isolierung	38
3.1.3.3.4	Lösungen für die DNA Verdau	39
3.1.3.3.5	Lösungen für die PCR	39
3.1.3.3.6	Lösungen und Medien für DNA-Fragment Isolierung aus Agarose Gel	39
3.1.3.3.7	Lösungen für das A-Tailing	39
3.1.3.3.8	Lösungen für Elektrophorese auf Agarose	40
3.1.3.3.9	Restriktionsenzyme für die DNA Verdau	40
3.1.3.3.10	Lösungen für die DNA-Hybridisierung	41
3.1.3.3.11	Lösungen für die tRNA Isolierung	44
3.1.3.3.12	Verdau und Dephosphorylierung	45
3.1.3.3.13	Lösungen für die Chromatographische Behandlung	46
3.2	METHODEN	47
3.1.4	MIKROBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	47
3.1.4.1	Steriltechnik	47
3.1.4.2	Glycerinkultur	47
3.1.4.3	Ausstrich einer Glycerinkultur auf einer Agarplatte	47
3.1.4.4	Vorkultur von E. coli MRE600	48
3.1.4.5	Anzucht von E. coli MRE600	48
3.1.4.6	Anzucht von E. coli MRE600 mit markierte [⁵⁷ Co]	48
3.1.4.7	Vorbereitung von E. coli XL1 Wirtszellen für die Hybridisierung	49
3.1.4.8	Zellenaufschluss mit Ultraschall	50
3.1.5	PROTEINCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN	50
3.1.5.1	Gelfiltrationschromatographie mit ein Bio SEC-S 2000 Säule	50
3.1.5.2	Gelfiltrationschromatographie mit ein Biosep SEC-S 3000 Säule	51
3.1.5.2.1	Erstes Verfahren	52
3.1.5.2.2	Zweites Verfahren	52
3.1.5.3	Anionenaustauschchromatographie mit einer Q-Sepharose-Säule	53
3.1.5.3.1	Erstes Verfahren	53
3.1.5.3.2	Zweites Verfahren	54
3.1.5.4	Affinitätschromatographie mit B ₁₂ -Agarose Kügelchen	55
3.1.5.4.1	Batch Verfahren	55
3.1.5.4.2	FPLC Verfahren	56
3.1.5.4.3	Schwerkraft-Säule Verfahren	57
3.1.5.5	Puffer steril filtrieren	57
3.1.5.6	Radioaktivitätsmessungen	57
3.1.5.6.1	Radioktivitätsmessung einer Proteinlösung	57

3.1.5.6.2	Radiktivitätsmessungen einer Polyacrylamidgel	58
3.1.5.7	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen	58
3.1.5.7.1	Aufkonzentrierung mit Rührzellen	58
3.1.5.7.2	Aufkonzentrierung mit Centricongefäßen	58
3.1.5.8	Polyacrylamidgele (PAG)	59
3.1.5.8.1	Nativ – PAGE	59
3.1.5.8.2	SDS - PAGE	61
3.1.5.8.3	Zweidimensionale Elektrophorese	64
3.1.5.9	Färbungen	64
3.1.5.9.1	Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels	64
3.1.5.9.2	Silberfärbung eines Polyacrylamidgel	65
3.1.5.10	Blotting	66
3.1.5.10.1	Tankblotting	66
3.1.5.10.2	Semi-dry-Blotting	67
3.1.5.10.3	Immunodetektion	68
3.1.5.11	Proteinbestimmung	69
3.1.5.11.1	Warburg- und Christian-Methode	69
3.1.5.11.2	Lowry-Methode	69
3.1.5.12	MALDI-TOF-MS	71
3.1.5.12.1	Probenvorbereitung	71
3.1.5.12.2	Messungen	72
3.1.5.12.3	Auswertungen	72
3.1.6	RIBONUKLEINSÄURECHEMISCHE ARBEITSMETHODEN	72
3.1.6.1	DNA-Fällung	72
3.1.6.2	Polymerase Kettenreaktion	73
3.1.6.2.1	Der PCR Ansatz	73
3.1.6.2.2	Das PCR-Programm	74
3.1.6.3	PCR-Screening von <i>E. coli</i> <i>XL1</i> Bakterienkolonien und künstliche Phagen-Plaques (<i>E. coli</i> <i>MRE600</i> genomische Bibliothek)	75
3.1.6.4	Sequenzierung des PCR-Produkts	76
3.1.6.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf einem Agarose-Gel	76
3.1.6.6	Isolierung von DNA aus dem Agarose-Gel	77
3.1.6.7	DNA-Konzentrationsbestimmung	78
3.1.6.7.1	Die Visuelle- Methode der DNA Konzentrationsbestimmung	78
3.1.6.7.2	Das Spektroskopische Methode DNA Konzentrationsbestimmung	78
3.1.6.8	Verdau mit Restriktionsenzymen der DNA	79
3.1.6.9	A-Tailing von DNA-Fragmenten	80

3.1.6.10	Klonierung des PCR DNA-Produkts in einem pGEM-T-Vektor-----	81
3.1.6.11	Einführung von fremder DNA in Zellen-----	82
3.1.6.11.1	Die Transformation-----	82
3.1.6.11.2	Die Transduktion -----	84
3.1.6.12	Isolierung der Plasmide aus <i>E. coli JM109</i> Zellen -----	84
3.1.6.13	Umgang mit Phagen-Plaques-----	86
3.1.6.13.1	Verdünnung künstliche Phagen. Die <i>E. coli MRE 600</i> genomische Bibliothek -----	86
3.1.6.13.2	Vorbereitung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde-----	86
3.1.6.13.3	Hybridisierung von Plaques auf Agarplatten mit einer digoxigeninmarkierten Sonde --	86
3.1.6.13.4	Isolierung einer Plaques -----	89
3.1.6.14	Umgang mit tRNA -----	89
3.1.6.14.1	Isolierung der gesamte tRNA aus <i>E. coli MRE600</i> Zellen -----	89
3.1.6.14.2	tRNA-Mengenbestimmung -----	90
3.1.6.14.3	tRNA Verdau -----	90
3.1.6.14.4	Chromatographische Trennungen -----	91
4	<u>ERGEBNISSE</u> -----	95
4.1	[⁵⁷Co] COBALAMIN-PROTEIN-KOMPLEX -----	95
4.1.1	VERLAUF DER VERSUCHE -----	95
4.1.2	ERSTER REINIGUNGSPROZESS -----	96
4.1.2.1	Erste Gelfiltrationschromatographie-----	96
4.1.2.2	Zweite Gelfiltrationschromatographie-----	98
4.1.2.3	Anionenaustausch-FPLC-----	100
4.1.2.4	Nativ-PAGE-Verfahren -----	102
4.1.3	ZWEITER REINIGUNGSPROZESS-----	102
4.1.3.1	Gelfiltrationschromatographie-----	103
4.1.3.2	Anionenaustauscher -----	104
4.1.3.3	Nativ-PAGE-Verfahren -----	106
4.2	IMMUNOBLOTTING MIT ANTIKÖRPERN GEGEN COBALAMIN -----	108
4.2.1	VERLAUF DER VERSUCHE-----	108
4.2.2	ANIONAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE -----	109
4.2.3	PAGE UND IMMUNOBLOT -----	109
4.2.3.1	PAGE-----	110
4.2.3.2	Immunoblot-----	110
4.2.4	VARIANTE DES IMMUNOBLOTS-----	111
4.3	WESTERN-BLOT VON [⁵⁷Co] COBALAMIN-PROTEIN-KOMPLEX -----	111

4.3.1 VERLAUF DER VERSUCHE-----	111
4.3.2 [⁵⁷ Co] UNTERSUCHUNGEN DES WESTERN-BLOT DES NATIV-PAGE -----	112
4.3.3 [⁵⁷ Co] UNTERSUCHUNGEN DES WESTERN-BLOT DES SDS-PAGE -----	112
4.3.4 [⁵⁷ Co] UNTERSUCHUNGEN DES WESTERN-BLOT DES 2D-PAGE -----	113
4.4 DIE COBALAMIN-AGAROSE-BINDEPROTEINE. -----	114
4.4.1 DIE THEORIE UND VERSUCHSABLAUF -----	114
4.4.2 DIE ERGEBNISSE -----	114
4.4.2.1 Analyse der Ergebnisse mittels PAGE-----	114
4.4.2.2 Analyse der Cobalaminbindenden Proteine mittels MALDI-TOF -----	116
4.4.2.3 Auswertungen der Massenspektren -----	116
4.4.2.4 Analyse der gefischte Agarose bindenden Proteine: Hypothetical protein ybiB, Histidine-binding periplasmic protein precursor, D-galactose-binding periplasmic protein precursor, Hypothetical 21.9 kDa protein. -----	118
4.4.2.4.1 Aminosäuresequenzanalysen -----	118
4.4.2.4.2 Dreidimensionale Strukturanalyse -----	119
4.4.2.5 „Genome Annotation“ -----	119
4.5 ISOLIERTE YAAJ UND LPXC GENE MIT DEM „BASE-ON-MODE“ COBALAMIN- BINDUNGSMOTIV -----	121
4.5.1 THEORIE UND VERSUCHSABLAUF -----	121
4.5.2 ANALYSE DER PCR PRODUKTE AUF AGAROSE-GEL -----	123
4.5.3 GEFISCHTE 98 BASEN-----	124
4.5.4 UNTERSUCHUNGEN VON <i>YAAJ</i> UND <i>LPXC</i> -----	127
4.5.4.1 Gen-Produkte und Funktion von <i>yaaJ</i> und <i>lpxC</i> -----	127
4.5.4.2 Untersuchungen der Aminosäuresequenzen von <i>yaaJ</i> und <i>lpxC</i> entsprechenden Proteinen --	127
4.5.4.3 Untersuchungen der dreidimensionalen -Struktur von <i>yaaJ</i> und <i>lpxC</i> entsprechenden Proteine -----	128
4.5.5 „GENOME ANNOTATION“ -----	129
4.6 DER SOUTHERN-BLOT -----	130
4.7 UNTERSCHIEDLICHE BIOINFORMATIK-UNTERSUCHUNGEN -----	130
4.7.1 DAS NEUE GEFUNDENE „BASE-OFF-MODE“ COBALAMIN ENZYM BINDUNGSMOTIV IN DDH, GDH UND RNTR -----	130
4.7.1.1 Theorie -----	130
4.7.1.2 Ergebnisse -----	133
4.7.1.2.1 Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den α -Untereinheiten -----	133
4.7.1.2.2 Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den β -Untereinheiten -----	135
4.7.2 UNTERSUCHUNGEN DES UNBEKANNTEN GENS <i>YAJB</i> , DAS SICH NEBEN <i>QUEA</i> UND <i>TGT</i> BEFINDET -----	137

4.7.2.1 Aminosäuresequenz-Analyse -----	137
4.7.2.2 Dreidimensionale Struktur-Analyse-----	138
4.7.3 UNTERSUCHUNGEN DER GENE DIE MIT <i>TGT</i> UND <i>QUEA</i> WECHSELWIRKEN-----	138
4.7.3.1 “STRING” Applikation -----	138
4.7.3.1.1 Benachbarte Gene des <i>Tgt</i> -----	138
4.7.3.1.2 Benachbarte Gene des <i>QueA</i> -----	138
4.8 DAS SUBSTRAT: EPOXYQUEUOSIN -----	138
4.8.1 CHEMISCHE SYNTHESE VON QUEUOSIN-----	139
4.8.1.1 Theorie -----	139
4.8.1.2 Die Organische Synthese -----	139
4.8.2 ISOLIERUNG VON QUEUOSIN AUS EINE <i>E. COLI MRE600</i> NUKLEOSIDE- MISCHUNG -----	139
<u>5 DISKUSSION -----</u>	<u>141</u>
5.1 [⁵⁷ Co] COBALAMIN-PROTEIN-KOMPLEX-----	141
5.2 IMMUNOBLOTTING MIT ANTIKÖRPER GEGEN COBALAMIN-----	142
5.3 WESTERN-BLOT VON [⁵⁷ Co] COBALAMIN-PROTEIN-KOMPLEX -----	142
5.4 DIE COBALAMIN-AGAROSE-BINDEPROTEINE -----	142
5.5 ISOLIERTE <i>YAAJ</i> UN <i>LPXC</i> GENE MIT DEM „BASE-OFF-MODE“ COBALAMINBINDUNGSMOTIV -----	143
5.6 DER SOUTHERN BLOT-----	143
5.7 UNTERSCHIEDLICHE BIOINFORMATIK-UNTERSUCHUNGEN -----	143
5.7.1 DAS MOTIV -----	143
5.7.2 DAS GEN <i>YAJB</i> -----	144
5.8 DAS SUBSTRAT-----	145
5.8.1 DIE ORGANISCHE SYNTHESE-----	145
5.8.2 DIE ISOLIERUNG VON OQ -----	145
<u>6 ZUSAMMENFASSUNG -----</u>	<u>145</u>
<u>7 ZUKÜNFTIGE ARBEITEN -----</u>	<u>147</u>
7.1 LAUFENDE ARBEITEN -----	147
7.2 WEITERE PLÄNE -----	147
<u>8 LITERATUR-----</u>	<u>150</u>

9	<u>ANHANG</u>	<u>153</u>
9.1	GDH	153
9.2	DDH	155
9.3	RNTR	156
9.4	ZAP-VEKTOR	158
9.5	P-GEM-T	159
9.6	MASS FINGENPRINT	160
9.7	YAAJ UND LPXC	163
9.8	TGT UND <i>QUEA</i> BENACHTBARTE GENE	165
9.9	ORGANISCHE SYNTHESE VON QUEUINE, DER FREIEN BASE	167
10	<u>VERZEICHNIS DER HÄUFIG VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN</u>	<u>171</u>
11	<u>AUSBILDUNG</u>	<u>176</u>

1 Einleitung

Krebs gehört zu den wichtigen Themen der medizinischen Forschung. Hier versucht man die molekularen Vorgänge zu verstehen um die Grundlagen für Krebstherapien entwickeln zu können. Eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung spielt hierbei das Nucleoside Queuosin (Q). Es ist zum Beispiel festgestellt worden, dass für Säugetiere die Menge an Q-enthaltender tRNA von der Zelldifferenzierung und Tumorgenese abhängig ist. Die tRNAs der Q-Familie fast aller Tumorzellen sind Queuin (q)-defizient. Sie haben ein Guanin (G) anstatt Q [4] und diese Tatsache ist ein möglicher Ansatzpunkt zur Bekämpfung von Krebs und die momentane Grundlagenforschung könnte im Endeffekt zu einer wirksamen Therapie für krebserkrankte Menschen führen.

Ein Charakteristikum der tRNA ist ihr hoher Anteil an posttranskriptionalen Modifikationen der vier Nucleoside Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G) und Uridin (U). Es sind über 90 modifizierte Nucleoside charakterisiert worden, davon 80 in tRNAs. Die genaue Funktion dieser Veränderungen ist oft unklar.

Was nun von Interesse ist, ist die besondere tRNA-Modifikation des Queuosin (Abb. 2-4). Dieses hypermodifizierte Nucleosid besetzt die erste Position des Anticodons der Q-tRNAs-Familie: tRNA^{His}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}. Das q wird auch Wobble-Base genannt, da es die Wobble-Position besetzt [3].

Zur Q-Familie gehörende tRNAs sind in vielen Prokaryoten und Eukaryoten zu finden (Ausnahme: Archaeobakterien und Hefen). In den Eukaryoten ist q als freie Base zu finden, da sie nicht in der Lage sind, Q de novo zu synthetisieren. Es muss als Bestandteil ihrer Nahrung oder durch die Darmflora bereitgestellt werden. Dabei wird q über ein Transportsystem in die Zelle aufgenommen und in einer Basenaustauschreaktion für G in die entsprechenden tRNAs eingebaut [3].

Wie schon erwähnt, ist die Biosynthese (Abb. 2-4) von Q in Bakterien eigentlich eine posttranskriptionale Modifikation. PreQ₁ ersetzt ein G, das ursprünglich die Position 34 der tRNA besetzt.

In *E. coli* MRE 600 wurde manchmal Epoxyqueuosin (oQ) anstelle von Q gefunden. Es ist in tRNA^{tyr} identifiziert worden [7]. Kersten et al. haben oQ entdeckt und nachgewiesen, dass oQ der Prekursor von Q ist, und dass Vitamin B₁₂ für diese

letzte Stufe der Biosynthese notwendig ist. Sie haben unterschiedliche Mikroorganismen untersucht und festgestellt, dass *E. coli MRE 600* die größte Menge an oQ oder Q enthielt [3].

2 Theorie und Aufgabenstellung

2.1 Theorie

2.1.1 Cobalamin

Die Struktur von Vitamin B₁₂, wurde 1964 von Fr. Hodgkin entschlüsselt. Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) ist biologisch inaktiv. Adenosyl-, methyl-, hydroxy- Cobalamin sind die biologisch aktiven Formen Cyanocobalamin: das Vitamin (CyanoCobl).

Vitamin B₁₂ ist essentiell für die menschliche Ernährung. Es kann ausschließlich von Mikroorganismen synthetisiert werden. *E. coli* ist eine Ausnahme, da es kein Vitamin B₁₂ synthetisieren kann. Wir haben dennoch diesen Organismus ausgewählt, weil er einen großen Anteil an Epoxyqueuosin enthaltenden tRNA, dem natürlichen Substrat der Epoxyqueuosin-Reduktase, aufwies.

2.1.1.1 **Adenosylcobalamin: das Coenzym (AdoCobl)**

E. coli, unser Versuchs-Organismus, wird Cyanocobalamin (CNcobl) als Vitamin aufnehmen und in Adenosylcobalmin umwandeln (AdoCobl, Abb. 2-1).

2.1.1.2 **Aufnahme von Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)**

Herbivore wie etwa Wiederkäuer besitzen im Darm Rezeptoren, mit denen sie eine ausreichende Menge des bakteriell gebildeten Vitamin B₁₂ aufnehmen können.

Karnivore sind deshalb auf Zufuhr des B₁₂ von außen angewiesen. Vitamin B₁₂ findet sich selten in der freien Form in natürlichen Quellen. Fast immer ist es an Carrier-Proteine oder Enzyme gebunden.

Vitamin B₁₂ wird aus der Nahrung durch Erhitzen, durch Ansäuern oder zum Teil durch ein Bindeprotein (auch R-Binder oder Haptocorrin genannt) freigesetzt. Dieses Protein tritt bereits im Speichel in Aktion. Im Magen wird Vitamin B₁₂ dann vollständig aus der Nahrung gelöst und komplett vom Haptocorrin gebunden. Die Nebenzellen der Magenschleimhaut setzen ein Glykoprotein frei, das als „intrinsic factor“(IF) bezeichnet wird. Dieses sorgt dafür, dass B₁₂ im Darm resorbiert wird.

Im sauren Milieu des Magens konkurriert der „intrinsic factor“ nicht mit dem Haptocorrin. Stattdessen begleitet er den Haptocorrin/Cobalamin-Komplex auf seinem Weg durch den Verdauungstrakt. Erst in einem bestimmten Teil des Dünndarms, dem Ileum, wird das Vitamin B₁₂ durch Proteolyse wieder aus dem Haptocorrin-Komplex freigesetzt. In diesem Bereich des Verdauungstraktes herrschen basische Bedingungen vor. Dies führt zur Ablösung des Vitamin B₁₂ vom Haptocorrin und zur Anbindung an den intrinsic factor. Der IF/Cobalamin-Komplex tritt mit Rezeptoren in den Darmschleimhautzellen in Wechselwirkung, wo Vitamin B₁₂ an ein primäres Serumtransportprotein, das Transcobalamin II, übertragen wird und so letztlich ins Cytoplasma gelangt. Das Vitamin wird schließlich durch Proteolyse aus dem Transcobalamin-Komplex freigesetzt. Sobald das Cobalamin ins Cytoplasma gelangt ist, wird das Kobaltion schrittweise von der Oxidationsstufe +3 zur Oxidationsstufe +1 reduziert. Ein Teil des reduzierten Cobalamins wird in Methylcobalamin umgewandelt. Durch die Übertragung von Adenosin wird das restliche Cobalamin in den Mitochondrien zu Adenosylcobalamin konvertiert, das Coenzym B₁₂.

2.1.1.3 *Biologische und Mangel-Wirkung des Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂)*

Die beiden biologisch wirksamsten Formen des B₁₂, Methylcobalamin und Adenosylcobalamin, kommen in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen zum Einsatz.

Wenn dem Organismus nicht genügend Vitamin B₁₂ zugeführt wird, sind die cobalaminabhängigen Enzyme inaktiv. Vor allem wird die Umsetzung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA verhindert. Das sich ansammelnde Methylmalonyl-CoA wird zu Methylmalonsäure hydrolysiert. Es kommt zu einer

größeren Ansammlung von Methylmalonsäure im Blut und im Harn, was einen Hinweis auf eine Veränderung im Vitamin B₁₂-Stoffwechsel geben kann.

Zum anderen kommt die Methylierungsreaktion von Homocystein zu Methionin zum Erliegen. Dies führt wiederum dazu, dass die N-Methyl-Tetrahydrofolsäure nicht zu Tetrahydrofolsäure regeneriert werden kann. Die Tetrahydrofolsäure ist jedoch unbedingt nötig für die Übernahme einer Formiminogruppe von Formimino-Glutaminsäure unter Bildung von N-Formimino-Tetrahydrofolsäure. Die sich anstauenden Stoffwechsel-Zwischenprodukte Homocystein und Formimino-Glutaminsäure sammeln sich im Harn. Das Fehlen der N-Formimino-Tetrahydrofolsäure wirkt sich besonders auf die DNA und RNA-Synthese aus, da sie an der Bildung von Purinbasen beteiligt ist. Daher sind bei einem Vitamin B₁₂-Mangel zuerst Gewebe mit hoher Zellteilungsrate betroffen.

Ein Mangel an Vitamin B₁₂ kann viele Ursachen haben. Die perniziöse Anämie bezeichnet eine verminderte Vitamin B₁₂-Resorption infolge einer zu niedrigen oder fehlenden Sekretion des intrinsic Factors.

Zu ernährungsbedingten Mangelerscheinungen kommt es oft bei strengen Vegetariern, insbesondere den Veganern, die auf den Verzehr jeglicher tierischer Produkte verzichten. Wenn ein Mensch seine Ernährungsgewohnheiten zur veganen Ernährung umstellt, dauert es allerdings relativ lange, bis sich ein Vitamin B₁₂-Mangel zeigt. Der Tagesbedarf liegt bei 2-3 µg. Da die Leber große Mengen an Vitamin B₁₂ speichern kann, treten erst nach ein bis zwei Jahren akute Mangelerscheinungen auf. Ein sehr großes Problem liegt vor, wenn Kinder von vegan lebenden Müttern gestillt werden, oder sogar von Müttern, die unwissentlich an perniziöser Anämie leiden. Der Vitamin B₁₂-Mangel überträgt sich auf das Kind, was schwere Wachstumsstörungen und vor allem Nerven- und Verhaltensstörungen zur Folge haben kann, die sich auch bei späteren Behandlungen nicht mehr beheben lassen.

2.1.1.4 *Strukturen von Cyano- und Adenosyl- Cobalamin*

Das Cobalamin besteht aus einem Corrinring mit einem zentralen Kobaltatom und einem Loop. Das 5,6-Dimethylbenzimidazol ist ein axialer Ligand auf der α-Seite und

der obere axiale Ligand, auf der β -Seite des Rings (Abb. 2-1) befindet sich im Fall des Vitamin B₁₂ eine Cyano-Gruppe und im Fall des Coenzym eine 5'-Desoxyadenosyl-Gruppe.

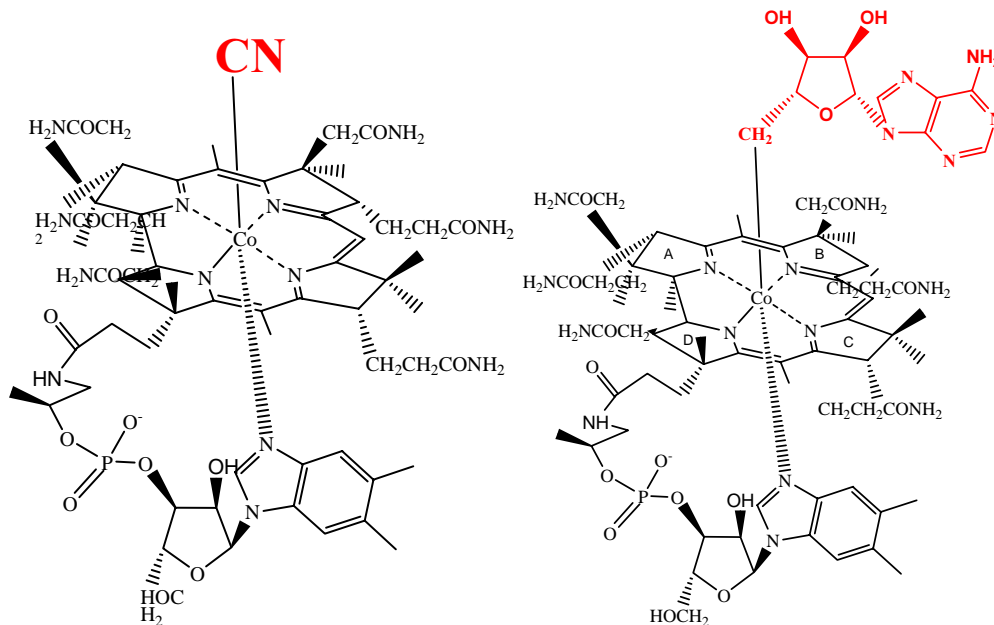


Abb. 2-1: Rechts Vitamin B₁₂ (Cyanocobalmin oder CNCobl) und links das Coenzym B₁₂ (Adenosylcobalamin oder AdoCobl)

2.1.1.4.1 „Base-on-mode“

Das Coenzym B₁₂ ist in verschiedenen Enzymen unterschiedlich gebunden. Im sogenannten „base-on-mode“ bleibt die α -Seite (Abb. 2-2) durchgehend mit 5,6-Dimethyl-benzimidazol koordiniert. Dies ist der Fall bei DDH, RNTPR, GDH und EAL.

2.1.1.4.2 „Base-off-mode“

Im „base-off-mode“ können die Enzyme die befreite Koordinationsstelle am Kobalt durch ein Histidin (Imidazolrest) des Enzyms besetzen (Abb. 2-2).

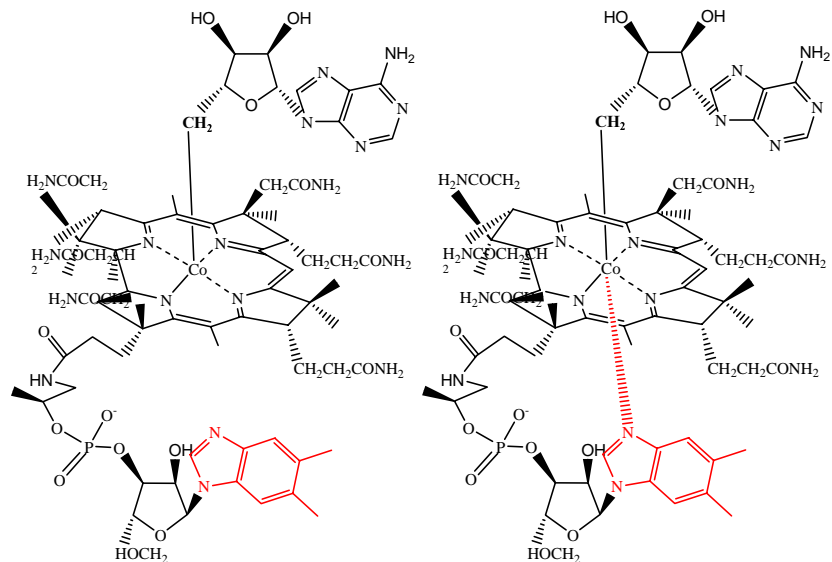


Abb. 2-2: Links “Base-off” und Rechts “Base-on”

2.1.2 Adenosylcobalamin-abhängige Enzyme

Die in Mikroorganismen vorkommenden B₁₂-abhängigen Enzymreaktionen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Reaktionen, bei denen 5'-Desoxyadenosylcobalamin eine 1,2-Umlagerung katalysiert, und Prozesse, bei denen Methylcobalamin als Methylgruppenüberträger (Synthese des Methionins) fungiert. Die überwiegende Anzahl B₁₂-abhängiger Enzyme vermittelt jedoch Umlagerungsreaktionen.

Coenzym B₁₂ wird vom Enzym in einer spezifischen Bindungstasche aufgenommen und verbleibt dort für alle weiteren katalytischen Reaktionszyklen. Das Enzym beschleunigt somit auf mechanische Weise diese Homolyse um einem Faktor von bis zu 10¹². Durch eine Wechselwirkung des Apoenzyms mit dem Adenosylcobalamin kommt es zu einer Aktivierung der Kobalt-Kohlenstoff-Bindung, das Coenzym verbleibt jedoch weitgehend undissoziiert. Deswegen haben wir die Affinitäts-Methode für Cobalamin (putativer Cofaktor) zur Isolierung von Epoxyqueuosin-Reduktase (putatives Apoenzym) ausgewählt.

Diese Enzyme, die radikalische Umlagerungen katalysieren, können wie folgt in drei große Hauptgruppen eingeteilt werden.

2.1.2.1 Klasse I

Enzyme dieser Klasse (Glutamat-Mutase, 2-Methylglutamat, Methylenmalonyl-CoA-Mutase) katalysieren Kohlenstoff-Skelett-Umlagerungen.

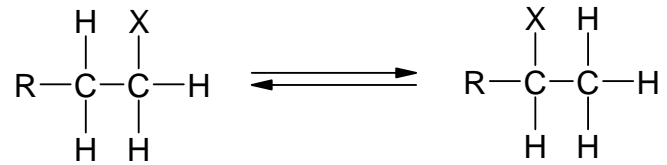


Abb. 2-3: Darstellung der wandernden Gruppe (X) katalysiert durch adenosylcobalaminabhängige Enzyme

X ist die wandernde Gruppe und ein Carboxyle-Gruppe.

2.1.2.2 Klasse II

Dieser Klasse ist für unsere nächsten Untersuchungen wichtig: Es handelt sich um Enzyme, die eine Umlagerung und Eliminierungsreaktion von Heteroatomen katalysieren.

Eine NH₂- oder OH-Gruppe wandert an ein C-Atom, an dem bereits eine Hydroxy-Funktion besteht. Es entsteht ein geminales Diol, bzw. ein geminaler Aminoalkohol. Solche Verbindungen sind instabil und eliminieren Wasser bzw. Ammoniak, wobei ein Aldehyd entsteht.

Die Ribonucleotid-Reduktase wandelt Ribose in 2'-Desoxyribose in Ribose um.

2.1.2.3 Klasse III

Diese Klasse umfasst solche Enzyme, die intramolekulare Aminogruppenwanderungen katalysieren.

Hier wandert eine Amino-Gruppe zu einem benachbarten Kohlenstoffatom. Diese Enzyme spielen eine Rolle beim Abbau des Lysins.

2.2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll mittels Cobalamin-Affinitäts-Material versucht werden, das Enzym zu isolieren, das die Reduktion von oQ zu Q katalysiert.

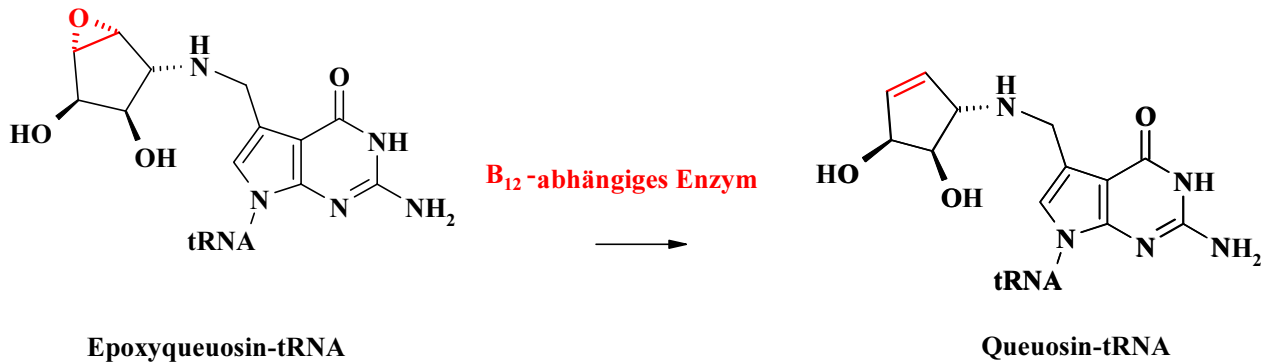


Abb. 2-4: Reduktion von oQ zu Q

Nachfolgend wird die Biosynthese von Q in Bakterien zusammengefasst (Abb. 2-5). Die Biosynthese beginnt mit der Bildung eines Deazaguanosin-Derivats. Das Enzym, das diese Stufe katalysiert, ist noch nicht isoliert worden. Im ersten Schritt wird GTP in einem eisenabhängigen Prozess in preQ1 verwandelt. Das Enzym könnte Ähnlichkeiten mit Cyclohydroxylasen haben.

Der zweite Schritt der Biosynthese ist eine Basenaustauschreaktion. Hier nimmt preQ1 (7-Amino-7-deazaguanin) die Stelle von G ein, das Position 34 der tRNA besetzt. Diese ganze Reaktion wird von der tRNA-G-Transglycosylase (Tgt) katalysiert.

Während des dritten Schritts wird am Aminomethyl-Ende der preQ1 der tRNA ein Ribosyl-Ring eingefügt. Es handelt sich um eine 1,2-Epoxycyclopentan-4,5-cis-diol-Einheit. Das Enzym, das für diese Stufe verantwortlich ist, ist die tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) mit S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Cofaktor. Für die letzte Stufe der Biosynthese ist ein B₁₂-abhängiges Enzym verantwortlich. Dadurch wird der Epoxyd-Ring der 1,2-Epoxycyclopentan-4,5-cis-diol-Einheit reduziert. Es ist zu vermuten, dass ein cobalaminabhängiges Enzym, das zur zweiten Klasse cobalaminabhängiger Reaktionen gehört, dafür verantwortlich ist. Dieses wurde 1988 von Kersten und Frey beobachtet [3].

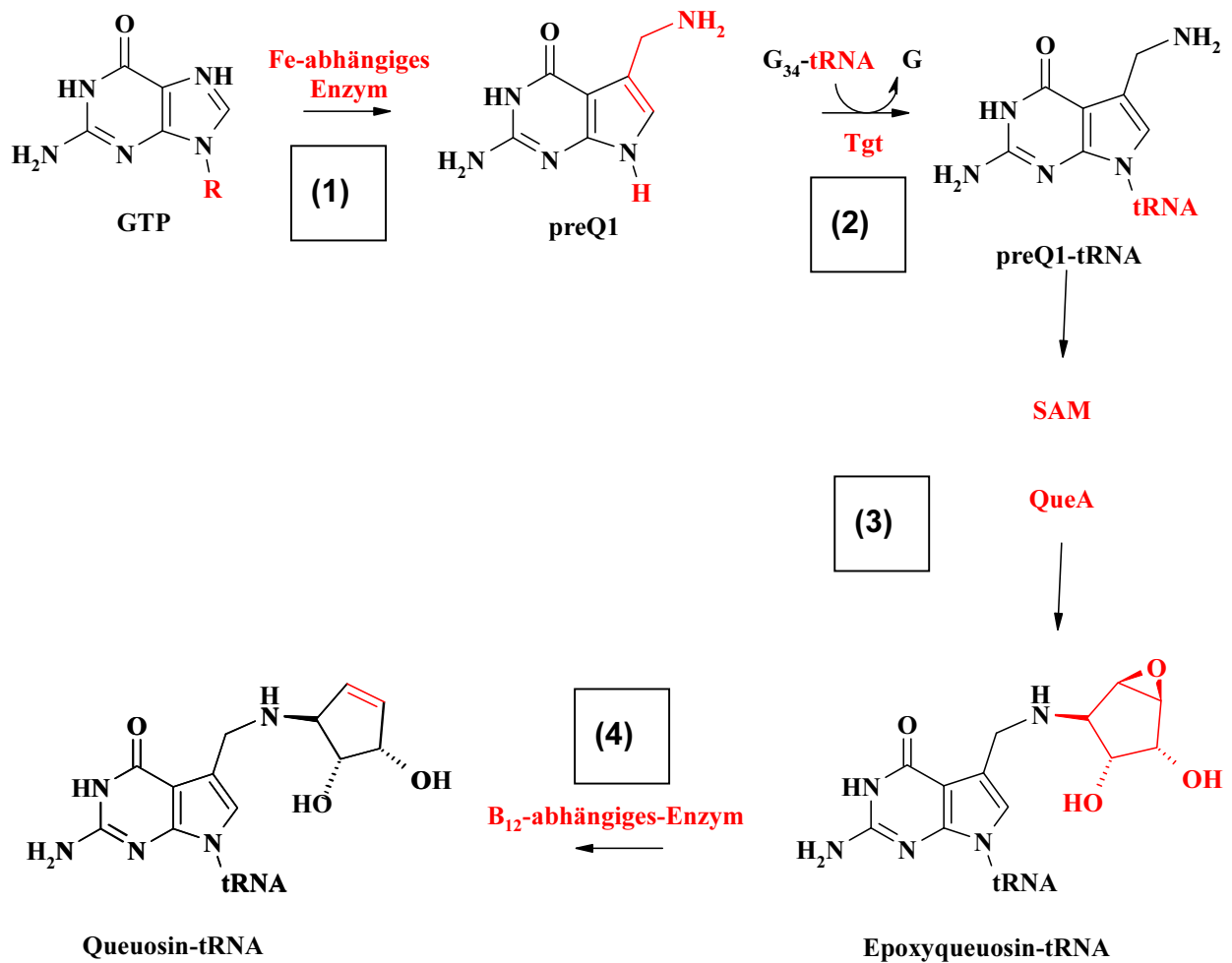


Abb. 2-5: Biosynthese von Q in *E. coli*

(1): Enzyme mit theoretisch vorhergesagter Fe-Abhängigkeit.

(2): Tgt: tRNA-Guanosyl-Transglycosylase.

(3): queA: tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase. SAM: S-Adenosyl-Methionin als Cofaktor.

(4): Enzyme mit theoretisch vorhergesagter Adenosylcobalaminabhängigkeit.

Hier ist der von Golding und Buckel vorgeschlagene Mechanismus (Abb. 2-6) aufgeführt, in dem Cobalamin an einer Reduktionsstufe beteiligt ist:

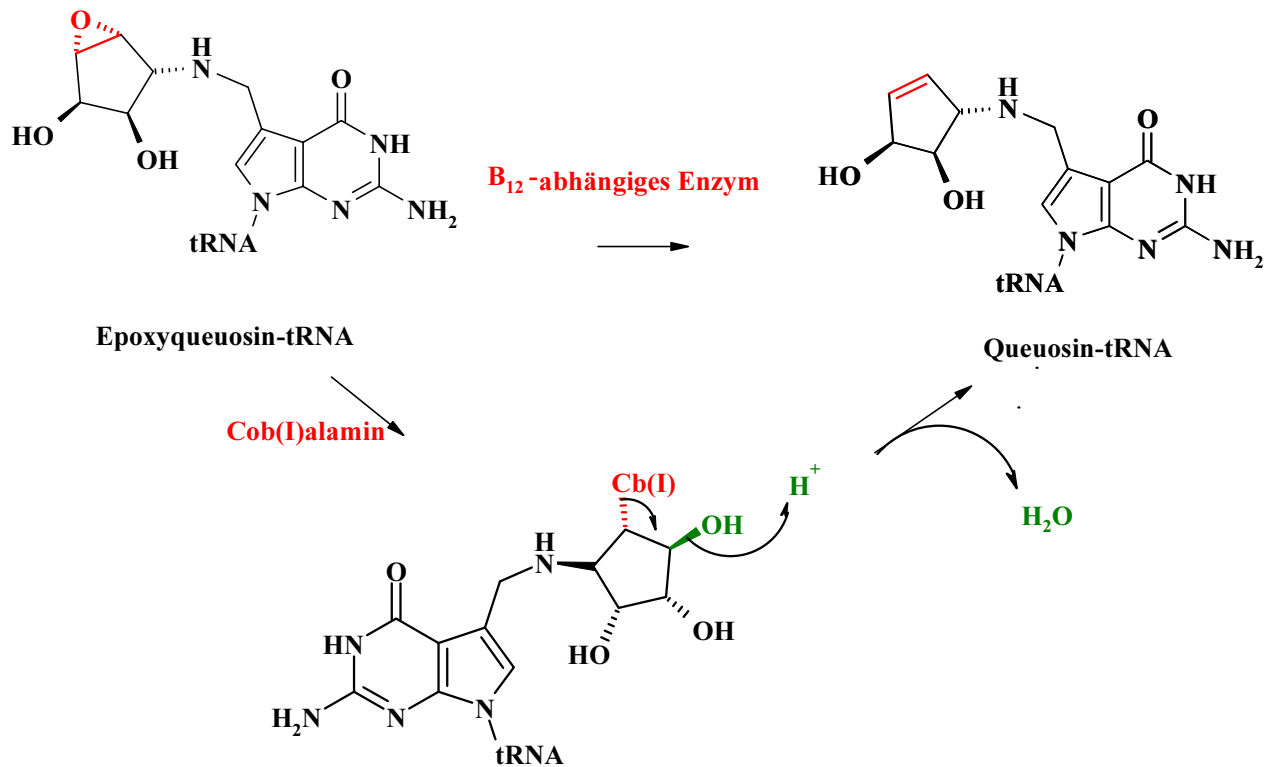


Abb. 2-6: Von Golding und Buckel vorgeschlagener Mechanismus der Reduktion von oQ zu Q.

3 Verwendete Materialien und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

3.1.1 Häufig verwendete Geräte

Anionenaustauschersäule	Pharmacia Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance XK16
Autoklav	Varioklav typ 400 und Wolf Sanoklav S-ECZ
Brutschrank	Heraeus KB 500
Zentrifugegefäße	Ausschlussgrößen 10 und 50 kDa Millipore Ultrafree PF-60
Einmalspritzen	1, 5, 10, 20 ml Hencke Sass Wolf GmbH
Eppendorfgefäße	1.5, 2 ml Sarstedt
Falcon-Tubes	15, 50 ml Sarstedt
FPLC-Gerät	Pharmacia LKB-P 500
Gelfiltrationssäule	Pharmacia Hiload 26/16 Superdex 200 prep grade XK26P Phenomenex Biosep SEC-S3000 600x21.2 mm mit Vorsäule 60x21,2 mm Phenomenex Biosep SEC-S2000 300x7.8mm

	mit Vorsäule 30x7.8 mm
HPLC-Gerät	Hewlett-Packard HP series 1050 Pharmacia LKB-System 2249
Inkubator	New Brunswick Scientific Incubator Shaker G 25
Kühlzentrifugen	Beckman J 2-21 Sorvall RC 5 B plus und RC 2-B
Lyophilisator	Christ, Alpha I-6
Magnetrührer	Heidolph MR 2002
Membranfilter	Ausschlussgröße 0.45 µm Schleicher and Schuell BA 85
Petrischalen	Sarstedt
PH Messgerät	WTW pH 96
Pipetten	20, 100, 200 µl Gilson Pipetman 40, 200 µl, 1 ml Finnpipette Labsystem 5 ml Finnpipette Digital
Pipettenspitzen	200 µl, 1 ml Sarstedt
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Biometra Minigel-System Joel gel casting system
Reinraumbank	Ehret ET 130V/UV

Rührzelle	Ausschlussgrößen 50 und 10 kDa Filtron
Schüttler	Bühler Laborgeräte Typ KL
Scintillationszähler	Packard TRI-CARB 2100 TR
Speed-vac	Univapo 100 H
Sterilfilter	Ausschlussgröße 0.22 µm Millipore Millex-GP
Tischzentrifugen	Sorvall Super T 21 Eppendorf 5414 S Heraeus Biofugefresco Sigma 2002 MK
Ultraschallgerät	Bandelin sonoplus HD 220 und S 72
Ultrazentrifuge	Beckman L8-60 M
UV/VIS Spektralphotometer	Perkin Elmer Lamda 2
Vials	LumacxLSC
Vortex	Bender and Hobein AG vortex-genie™
Wasserbad	Julabo U3-7A

3.1.2 Häufig verwendete Chemikalien

Agar	Difco Laboratories, Michigan, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Biorad, München
Bactotrypton	Difco Laboratories, Michigan, USA

Bactoyeast	Difco Laboratories, Michigan, USA
Benzamidin	Merck, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Coenzym B ₁₂	Fluka, Neu-Ulm
Comassie Brillant Blue R 250	Fluka, Neu-Ulm
[⁵⁷ Co] Cyanocobalamin, 10.5 µCi in 6 ml Boratpuffer (pH 9.6)	ICN, Eschwege
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HCl	Fluka, Neu-Ulm
K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	Fluka, Neu-Ulm
KCl	Fluka, Neu-Ulm
Lösung für wässrige radioaktive Proben	Lumisafe Plus
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
NaOH	Fluka, Neu-Ulm

Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonyl-fluorid)-hydrochlorid	Boehringer, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Biorad, München
Tris	ICN, Eschwege

Die weiteren Chemikalien wurden aus der Chemikalienausgabe des Institutes für Organische Chemie der Universität bezogen.

3.1.3 Lösungen

3.1.3.1 *Lösungen für die Mikrobiologische Arbeitsmethoden*

3.1.3.1.1 *Medien für die Anzuchten*

LB Medium
10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefe auf 500 ml b. H₂O
mit NaOH pH 7.5 einstellen
mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

LB Platten
1 l LB Medium
20 g Agar

M9-Minimalmedium
(alle Lösungen sind steril)
200 ml 5x M9-Salz
2 ml 1 M MgSO₄
100 µl 1 M CaCl₂
100 µl 0.1 M FeSO₄
20 ml 20%ige Glucose-Lösung
1 ml 50 mg/ml Methionin-Lösung
mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Salz 5x
64 g Na₂HPO₄·7H₂O
15 g KH₂PO₄
5 g NH₄Cl
2.5 g NaCl
mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

3.1.3.1.2 *Lösungen für den Aufschluss*

Aufschluss Puffer 1x
9.8 ml 50 mM, pH 7.0 Phosphat-Puffer
100 µl 750 mg/ml Benzamidin
100 µl 4.8 mg/ml Pefabloc
5 µl 25 U/µl Benzonase

mit bidest. W. auf 110 ml auffüllen

Pefabloc-Lösung	20 nM	4.8 mg Pefabloc in 1 ml H ₂ O lösen
-----------------	-------	---

Benzamidin-Lösung	0,5 mM	75 mg in 1 ml bidest. Wasser lösen
-------------------	--------	---------------------------------------

3.1.3.2 *Lösungen für die Proteinchemischen Arbeitsmethoden*

Alle Lösungen sind steril filtriert. Für FPLC-Verfahren sind sie zudem noch entgast.

3.1.3.2.1 Lösungen für MALDI-TOF MS Messungen

Tris-HCl-Lösung	1 mM	0.12 g Tris mit HCl pH 7.5 einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
-----------------	------	--

Trypsin-Puffer	40 mM NH ₄ CO ₃ 10 % CH ₃ CN	3.12 g NH ₄ CO ₃ 10 ml CH ₃ CN mit bidest. W. auf 100 auffüllen
----------------	--	--

Trypsin-Lösung	200 µg/ml	20 µg Trypsin in 100 µl 1 mM Tris-HCl-Lösung lösen
----------------	-----------	---

Trypsin-Lösung	20 µg/ml	100 µl 200µg/ml Trypsin-Lösung mit 900 µl Trypsin-Puffer auffüllen
----------------	----------	---

„Wetting“-Lösung	50 % CH ₃ CN	50 ml CH ₃ CN mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
------------------	-------------------------	---

„Equilibration“-Lösung	0.1 % TFA	100 µl TFA mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
„Wasch“-Lösung	50 % CH ₃ CN 0.1 % TFA	150 ml CH ₃ CN 300 µl TFA mit bidest. W. auf 300 ml auffüllen
„Elutions“-Lösung	0.1 % TFA 50% CH ₃ CN	100 µl TFA 50 ml CH ₃ CN mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Matrix-Puffer	70 % CH ₃ CN 0.1 % TFA	21 ml CH ₃ CN 30 µl TFA mit bidest. W. auf 30 ml auffüllen
„Matrix“-Lösung,		30 mg α-cyano-4-hydroxymizsäure in 30 ml Matrix-Puffer lösen immer frisch ansetzen

3.1.3.2.2 *Lösungen für die chromatographische Behandlung*

3.1.3.2.2.1 Anionenaustauschchromatographische Lösungen

Kalium-Phosphat-Puffer	50 mM	5.05 g K ₂ HPO ₄ 2.86 g KH ₂ PO ₄
	pH 7.0	pH einstellen mit bidest. H ₂ O auf 1 l auffüllen

Kalium-Phosphat-Puffer	400 mM	53.2 g K_2HPO_4 12.9 g KH_2PO_4 pH 7.4	pH eistellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
KCl	1 M	74.7 g KCl	mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
NaCl	1 M	58.5 g NaCl	mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
EtOH 20 %		200 ml 100 % iges EtOH	mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

3.1.3.2.2 Gelfiltrationschromatographische Lösungen

Kalium-Phosphat-Puffer
50 mM, pH 7.0

NaN_3	0.02 %	200 mg NaN_3	mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
SDS	0.5 %	5 g SDS	mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

3.1.3.2.3 Affinitätschromatographische Lösungen

Puffer A Kalium-Phosphat-Puffer 2.8 g K_2HPO_4

	20 mM	0.5 g KH_2PO_4
	pH 7.0	mit HCl pH 7.0 einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer A'	Kalium-Phosphat-Puffer	0.85 g K_2HPO_4
	10 mM	0.7 g KH_2PO_4
	pH 7.0	mit HCl pH 7.0 einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer A''	Kalium-Phosphat-Puffer	siehe oben
	50 mM	
	pH 7.0	
Puffer B	Kalium-Phosphate-Puffer	63 g K_2HPO_4
	400 mM	5.2 g KH_2PO_4
	pH 7.7	mit HCl pH 7.7 einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer B'	Kalium-Phosphate-Puffer	60 g K_2HPO_4
	400 mM	7.6 g KH_2PO_4
	pH 7.5	mit HCl pH 7.5 einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer C	1 M NaCl	siehe 3.1.3.2.2.1
Puffer C'	2 M NaCl	117 g NaCl

mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

Gesättigte Vit. B₁₂-Lösung

6 g Vitamin B₁₂

in 100 ml bidest. W. gelöst

3.1.3.2.3 *Lösungen für die PAGE*

3.1.3.2.3.1 **Lösungen für das Nativ-PAGE Verfahren**

Tris-Stammlösung	0.5 M	30.3 g Tris
	pH 6.8	mit HCl pH 6.8 einstellen
		in 125 ml bidest. W. lösen
Native-PAGE-	0.1 M Tris	15,15 g Tris
Laufpuffer, 10x	0.77 M Gly	0.72 g Gly
	pH 8.3	keine pH Einstellung
		mit bidest. W. auf 500 ml auffüllen
Native PAGE-	0.0625 M Tris	1 ml Tris-Stammlösung
Probenpuffer, 4 x	10 % Glycerin	0.8 g Glycerin
	10 % BPB	0.025 g BPB
		mit bidest. W. auf 8 ml auffüllen
Native PAGE-	0.075 M Tris	9.1 g Tris in 40 ml bidest. W. lösen
Puffer A	pH 8.8	mit HCl pH 8.8 einstellen
		mit bidest. W. auf 50 ml auffüllen

Native PAGE- Puffer B	0.025 M Tris pH 6.8	3 g Tris in 40 ml bidest. W. lösen mit HCl pH 6.8 einstellen mit bidest. W. auf 50 ml auffüllen
Native PAGE- Puffer C		fertige Lösung fertige Lösung 30 % Acrylamid 0.8 % Bisacrylamid
APS 20 %		20 mg Ammoniumperoxodisulfat mit bidest. W. auf 100 µl auffüllen frisch ansetzen

3.1.3.2.3.2 Lösungen für das SDS-PAGE Verfahren

Tris Stammlösung	1 M	121,1 g Tris in 1 l W. lösen
SDS-PAGE- Laufpuffer 4x	0.2 M Tris 1.5 M Gly pH 8.8 0.4 % SDS	24 g Tris 115 g Gly mit HCl pH 8.8 einstellen 8 g SDS oder 40 ml 20 % ige SDS-Lösung mit bidest. W. auf 2 l auffüllen
SDS-PAGE- Probenpuffer 2x, Red	0.0625 M Tris 2 % SDS	3.21 g Tris 2.0 g SDS

	0.8 % DTT	0.8 g DTT
	0.01 % BPB	0.01 g BPB
	1.35 %	1.35 ml Eisessig
	10 %	10 ml Glycerin
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Polyacrylamid-Lösung		fertige Lösung
SDS-PAGE- Puffer A	0.15 M Tris pH 8.8	8.3 g Tris in 40 ml bidest. W. lösen mit HCl pH 8.8 einstellen mit bidest. W. auf 50 ml auffüllen
SDS-PAGE- Puffer B	pH 6.8	9.6 ml Tris-Stammlösung 1 M mit bidest. W. auf 40 ml auffüllen mit HCl pH 6.8 einstellen mit bidest. W. auf 50 ml auffüllen
APS 20 %		siehe 3.1.3.2.3.1
TEMED		fertige Lösung

3.1.3.2.3.3 Lösungen für den Blau-Nativ-PAGE Verfahren

Probenpuffer enthält eine Spitze Commassie-Blau

Für andere Puffer siehe 3.1.3.2.3.1

Lösungen für den IEF Verfahren

PHi Protein Marker

goldene Kappe: $3.5 < \text{pHi} < 9.3$

rote Kappe: $2.8 < \text{pHi} < 6.55$

blaue Kappe: $5.2 < \text{pHi} < 10.25$

Ampholyt-Lösungen

fertig gekaufte Lösungen

$3 < \text{pHi} < 10$

$5 < \text{pHi} < 8$

$2 < \text{pHi} < 4$

APS-Lösung

20 %

siehe 3.1.3.2.3.1

TEMED-Lösung

siehe 3.1.3.2.3.1

Glycerin-Lösung

fertig-Lösung

PA-Lösung

fertig-Lösung

Kathode-Puffer

0.1 M NaOH

0.2 g NaOH

in 50 ml bidest. W. lösen

Anode-Puffer

0.04 M D,L-Asn

0.13 g D,L-Asn

in 100 ml bidest. W. lösen

Fixierungslösung

30 % EtOH

300 ml EtOH

5 % Essigsäure

50 ml Essigsäure

10 %	100 ml TCE
5 %	50 g Sulfosalzylsäure mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

Comassie-Blau Färbelösung siehe 3.1.3.2.4.1

Entfärbungslösung siehe 3.1.3.2.4.1

3.1.3.2.4 *Lösungen für Färbungen*

3.1.3.2.4.1 Lösungen für die Coomassie-Färbung

Coomassie-blau-Lösung	0.02 % CB	200 mg Coomassie R 250
	45 % EtOH	450 ml EtOH
	45 % W.	450 ml bidest. W.
	10 % HAc	100 ml HAc

Entfärbungslösung	10 % HAc	100 ml Essigsäure
	45 % W.	450 ml bidest. W.
	45 % EtOH	450 ml EtOH

Glycerin	20 %	10 ml 100 %ige Glycerin-Lösung in 40 ml W. verdünnen
----------	------	---

3.1.3.2.4.2 Lösungen für die Silber-Färbung

Formaldehyd-Lösung	0.02 %	200 µl Formaldehyd
--------------------	--------	--------------------

Entwicklungspuffer		In 1 l bidest. W. Verdünnen
--------------------	--	-----------------------------

AgNO ₃	0,1 %	100 mg AgNO ₃ in 100 ml W. lösen
EtOH-W.-HAc 4,5-4,5-1		siehe 3.1.3.2.4.1
EtOH 10 %		100 ml 100 % ige EtOH-Lösung in 1 l bidest. W. verdünnen
Entwicklungslösung	3 %	3 g Na ₂ CO ₃ in 100 ml Entwicklungslösung lösen

3.1.3.2.4.3 Lösungen für die 5 min Silber-Färbung

Fixierungslösung	20 % TCE	200 ml TCE mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Waschlösung	45 % MeOH 45 % H ₂ O 10 % HAc	450 ml MeOH 450 ml bidest. W. 100 ml HAc
Glycerin-Lösung	0.75 %	8 ml Glycerin mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Silberfärbelösung A		25 g Na ₂ CO ₃ mit bidest. W. auf 500 ml auffüllen

Silberfärbelösung B		1 g NH_4NO_3 1 g AgNO_3 5 g Wolframatokieselsäure 7 ml 37 % ige Formaldehyd-Lösung mit bidest. W. auf 500 ml auffüllen
---------------------	--	---

Stope-Lösung	1 % HAc	10 ml HAc mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
--------------	---------	---

3.1.3.2.5 Lösungen für Proteinbestimmung

CuSO_4	4 %	0,8 g CuSO_4 in 20 ml bidest. W. lösen
-----------------	-----	--

Folincioaltheusreagenz	50 %	50 ml Folincioaltheusreagenz in 50 ml bidest W. verdünnen
------------------------	------	--

Lowry A	2 % Na_2CO_3	10 g Na_2CO_3
---------	------------------------------	-------------------------------

Stammlösung	0,1 M NaOH	2 g NaOH in 500 ml bidest.W. lösen
-------------	------------	---------------------------------------

Na-K-Tartrat 4 %		800 mg Na-K-Tartrat
In 20 ml W. lösen		

Lowry A-Mischung		100 ml Lowry A-Stammlösung 2 ml 2 %ige NaK Tartrat-Lösung 2 ml CuSO_4 4 % ige Lösung
------------------	--	---

Na-Desoxycholat	2 %	400 mg Na-Desoxycholat in 20 ml W. lösen
SDS	5 %	0.5 g SDS in 10 ml W. lösen
TCE	30 %	300 ml TCE-Lösung in 1 l bidest. W. verdünnt
ZnCl ₂ -Lösung	10 mM	68 mg in ZnCl ₂ in 50 ml bidest. W. lösen frisch ansetzen

3.1.3.2.6 *Blotting*

3.1.3.2.6.1 Lösungen für Tankblotting

Lösungen für Tank-Westernblot auf Nitrocellulose

Elektrophoresepuffer	1x	2.25 g Tris 11.3 g Gly mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
----------------------	----	---

Lösungen für Tank-Westernblot auf PVDF-Papier

Transfer-Puffer 10x	1.92 M Gly	144 g Gly
Stammlösung	0.25 M Tris	30 g Tris
Transfer-Puffer	1x	100 ml 10x Elektrophorese-Puffer

	15 % MeOH	150 ml MeOH
		mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
PVDF-Papier Aktivierungslösung		100 % ige MeOH-Lösung

3.1.3.2.6.2 Lösungen für das semi-dry blotting

Lösungen für den semi-dry-Westernblotting auf PVDF-Papier

SDS- Stammlösung	10 %	10 g SDS
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Anode puffer I	0.3 M Tris	0.369 g Tris
	20 % MetOH	20 ml MetOH
	pH 10.4	mit NaOH pH einstellen
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Anode Puffer II	0.025 M Tris	3 g Tris
	20 % MetOH	20 ml MetOH
	pH 10.4	mit NaOH pH einstellen
		mit Bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Kathoden Puffer	0.025 M Tris	3 g Tris
0.04 M 6-amino-n-caproicsäure		5.25 g
	0.01 % SDS	1 ml 10 % ige SDS-Stammlösung
	10 % MeOH	100 ml MeOH
	pH 9.4	pH 9.4 einstellen
		mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
MeOH		fertig-Lösung

3.1.3.2.6.3 Lösungen für die immunodetektion

RSA	3 %	1.5 g RSA mit Puffer A auf 50 ml auffüllen
Puffer A	10x	99.3 g NaCl 12.1 g Tris mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer B	1x	1 l Puffer A 500 µl TWEEN
Primärantikörperlösung	1x	6 µl Mon. Anti-Vit. B ₁₂ -AK-Lösung
Mouse Mon. Anti-Vit. B ₁₂ -IgG-Lösung		15 ml Puffer B bei 4 ° C oder – 20 °C lagern
Anti-Maus Antikörper aus Ziege IgG		16 µl IgG
Fc Spezifisch mit Peroxidase konjugiert		16 ml Puffer B
Sekundärantikörperlösung	1x	bei 4 ° C oder – 20 °C lagern
Detektionslösung		25 mg 4-Chloro-1-naphthol 8 ml MetOH mit bidest. W. auf 50 ml auffüllen
H ₂ O ₂ -Lösung	30 %	fertige Lösung

3.1.3.3 *Lösungen für die Nukleinsäure Arbeitsmethoden*

3.1.3.3.1 Lösungen und die Nukleinsäurechemische Arbeitsmethoden

3.1.3.3.1.1 Lösungen und Medien für die Transformation

LB Medium		siehe 3.1.3.1.1
SOC Medium		2 g Tryptone
		0.5 g Hefe
	1 M NaCl	1 ml
	0.25 M KCl	1 ml
	2 M Mg ²⁺	1 ml
	2 M Glucose	1 ml
		mit bidest W. auf 100 ml auffüllen
Agarplatten		siehe 3.1.3.1.1

3.1.3.3.2 Lösungen für die DNA-fragment Klonierung

T4 DNA-Ligase	3 U/μl	fertige Lösung
Puffer	2x	fertige Lösung
Plasmid Lösung		ungefähr 50 ng pro 10 μl Ansatz

3.1.3.3.3 Lösungen für die Plasmid-Isolierung

Fertiges Kit

Lösung II mit gekühlter- fertiger RNase-Lösung versetzen und bei 4 °C lagern

3.1.3.3.4 *Lösungen für den DNA-Verdau*

Fertige gestellte Kit Lösungen

3.1.3.3.5 *Lösungen für die PCR*

Taq Polymerase 5 U/μl fertige Lösung

Puffer 10x fertige Lösung

Primer

Primer	Sequenz
T7 Promotor	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
SP6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT-3'
B ₁₂ „Base-off mode“ Bindungsmotiv	5'-CCI III AGT GII IAG TC-3'
Methionine Synthase	5'-TTC GTT CAG TCG ATA ACT CTG-3'

3.1.3.3.6 *Lösungen und Medien für DNA-Fragment-Isolierung aus Agarose Gel*

Fertig kit Lösungen

W. 7.5 < pH < 8.5

8 ml bidest. W.

mit NaOH pH 8 einstellen

3.1.3.3.7 *Lösungen für das A-Tailing*

Taq Polymerase fertige Lösung

dATPs fertige Lösung

Puffer enthält MgCl₂ fertige Lösung

3.1.3.3.8 Lösungen für Elektrophorese auf Agarose

TAE Puffer 50x 242 g Tris
57.1 ml 100%ige Essigsäure-Lösung

0.4 M 125 ml, pH8.8 EDTA-Lösung
mit bidest W. auf 1 l auffüllen

BET-Lösung 2 mg BET
in 2 ml bidest. W. lösen

Probenpuffer 20x 0,025 g Bromphenolblau
4 g Saccharose
mit bidest. W. auf 10 ml auffüllen

3.1.3.3.8.1 DNA Marker

peggold DNA-sizer III 0.5 mg/ml. Fertige Lösung

peggold DNA-sizer XII 0.5 mg/ml. Fertige Lösung

pUC18 DNA Hae III digest 20 µg. Fertig Lyophilisat

3.1.3.3.9 Restriktionsenzyme für den DNA-Verdau

Fau NDI 8-12 U/µl

Nco

Puffer 10x fertigen Lösungen

3.1.3.3.10 Lösungen für die DNA-Hybridisierung

3.1.3.3.10.1 Denaturierende Lösungen

NaCl 1.5 M 87.75 g NaCl
mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

NaOH 0.5 M 20 g NaOH
mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

3.1.3.3.10.2 Neutralisierende Lösungen

NaCl 1.5 M 86.7 g NaCl
mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

Tris-HCl 0.5 M 60.6 g Tris
pH 8 mit HCl pH 8 einstellen
mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

3.1.3.3.10.3 Waschlösungen

Tris-HCl 0.2 M 24.3 g Tris
pH 7.5 mit HCl pH einstellen
mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

SSC 2x 17.5 g NaCl
8.8 g Natrium Citrate
pH 7 mit NaOH pH einstellen

mit bidest. W. auf 1 auffüllen

SSC	20x	175.3 g NaCl
		88.2 g Natrium Citrate
	pH 7	mit NaOH einstellen
		mit Bidest. W. auf 1 auffüllen

3.1.3.3.10.4 Prehybridisierungspuffer und Lösungen

SDS	10 %	10 g SDS
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen

Dig-Blockierungslösung	10 %	25 g Blockierungsreagenz
		mit Dig-Puffer 1 auf 250 ml auffüllen (siehe unten)

Prehybridisierungspuffer		250 ml SSC, 20x
		100 ml 10 % ige Blockierungslösung
		1 g Sarkosine
		2 ml 10%iges SDS-Lösung
		mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
		bei 4°C lagern

3.1.3.3.10.5 Hybridisierungspuffer und Lösungen

Sarkosine	10 %	1 g Sarkosine
		mit bidest. W. auf 10 ml auffüllen

bei 4 °C lagern

SDS	10%	10 g SDS
	pH 8	pH einstellen
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen

SDS	0.1 %	1 ml 10%iges SDS-Lösung
	pH 8	pH einstellen
		mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen

Dig-Hybridisierungspuffer		10 ml Prehybridisierungspuffer
		25 ng Dig-markierte ss DNA-Sonden
		bei 4 °C lagern

Dig-Hybridisierungspuffer	¼	250 ml Prehybridisierungspuffer
		3 µg Dig-markierte ss DNA-Sonden
		bei -20 °C lagern

Dig-Puffer 1		17.6 g NaCl
	pH 7.5	23.2 g Maleinsäure
		mit NaOH pH einstellen
		mit bidest. W. auf 2 l auffüllen

Dig-Puffer 2		900 ml Dig-Puffer 1
		100 ml dig-blockierungslösung

Dig-Puffer 3		12.1 g Tris 5.3 g NaCl 10.2 g MgCl ₂ mit HCl pH einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
	PH 7.5	
Dig-Puffer 4		1.2 g Tris 0.37 g Na ₂ EDTA mit HCl pH einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
	pH 8	
TWEEN 20	10 %	4 ml 100 %ige TWEEN 20-Lösung mit bidest. W. auf 40 l auffüllen
TWEEN 20	0.3 %	30 ml 10 % ige TWEEN 20-Lösung mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen
Dig-Puffer 1/ TWEEN 0.3 %		30 ml 10 % ige TWEEN 20-Lösung 970 ml Dig-Puffer 1
Dig-Färbelösung		30 ml 10 % ige TWEEN-Lösung 10 ml Dig-Puffer 3 200 µl NBT/X-Phos. Mix

3.1.3.3.11 *Lösungen für die tRNA-Isolierung*

Lysozyme-Lösung	1 mg/ml	fertige Lösung
-----------------	---------	----------------

NaOH	0.2 M	8 g NaOH
SDS 1 %		1 g SDS mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

KAc, pH 4	3 M	
-----------	-----	--

RNAse frei bidest. W.

3.1.3.3.12 *Verdau und Dephosphorylierung*

RNAse frei W.

tRNA, 400 µg

ZnSO ₄	20 mM	0.27 g ZnSO ₄
	pH 5.3	pH einstellen mit bidest. W. auf 100 ml auffüllen

Nuklease P1	1 mg/ml	Fertige Lösung
Tris	0.5 M	60 g Tris
	pH 7.9	mit HCl pH einstellen mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
BAP oder CiAP	1 U/µl	fertige Lösungen

3.1.3.3.13 *Lösungen für die chromatographische Behandlung*

Puffer A	MOPS	50 mM	10.5 g MOPS
		15 % EtOH	150 ml EtOH
		pH 7	mit NaOH pH einstellen
			mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer B	MOPS	50 mM	10.5 g MOPS
		15 % EthOH	150 ml EtOH
		NaCl 0.75 M	43.8 g NaCl
		pH 7	mit NaOH pH einstellen
			mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer A'	(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.01 M	1.15 g (NH ₄)H ₂ PO ₄
		2.5 % MeOH	25 ml MeOH
		pH 5	pH einstellen
			mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer B'	(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.01 M	1.15 g (NH ₄)H ₂ PO ₄
		20 % MeOH	200 ml MeOH
		pH 5.3	pH einstellen
			mit bidest. W. auf 1 l auffüllen
Puffer C	MOPS	50 mM	10.5 g MOPS
		15 % EtOH	150 ml EtOH
		2 M NaCl	116.9 g NaCl
			mit bidest. W. auf 1 l auffüllen

3.2 Methoden

3.1.4 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.1.4.1 *Steriltechnik*

Glasgeräte werden 2 h lang im Trockenschrank erhitzt.

Alle Lösungen, die unempfindlich gegen Hitze sind, werden im Autoklaven bei einem Druck von 1.5 bar und einer Temperatur von 121° C für die Dauer von 20 min sterilisiert.

Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien werden ebenfalls 20 min lang bei einem Druck von 1.5 bar und einer Temperatur von 121° C behandelt.

3.1.4.2 *Glycerinkultur*

Die Glycerinkultur dient in erster Linie der Konservierung von Zellen.

Hierzu werden 700 µl einer Kultur mit 300 µl einer sterilen, 50%igen kühlen Glycerinlösung vermischt und gleich bei -80° C eingefroren. Wegen der hohen Viskosität der Glycerinlösung ist der Mischvorgang mit besonderer Sorgfalt durchzuführen, um eine homogene Mischung zu erhalten. Die Mischung wird bei -80° C gelagert. Auf diese Weise bleiben die Zellen 1 bis 2 Jahre lebensfähig.

3.1.4.3 *Ausstrich einer Glycerinkultur auf einer Agarplatte*

Der Ausstrich wird unter einer Reinraumbank durchgeführt. Die *E. coli* MRE600 Glycerinkultur bleibt in einem auf -20 °C gekühlten Metallbehälter. Eine ausgeglühte Platinöse wird vorsichtig in die Glycerinkultur eingetaucht und es werden einige Zellen entnommen. Diese sind auf einer LB-Medium Agarplatte in drei parallelen Strichen anzubringen. Anschließend wird die Platinöse wieder erhitzt und der Vorgang zweimal wiederholt, wobei die Platte jedes Mal um 60 ° gedreht wird, so dass ein Dreieck entsteht. Anschließend wird die Agarplatte kopfüber in den Brutschrank gelegt und bei 37 ° C über Nacht inkubiert. Die Kolonien sollten eine Größe von ungefähr 2 mm erreichen. Sie sind bei 4 ° C einen Monat haltbar.

3.1.4.4 Vorkultur von *E. coli* MRE600

In einem sterilen Erlenmeyerkolben werden unter Reinraumbedingungen 20 ml des Anzuchtmediums (M9-Minimalmedium) mit einer Bakterienkolonie, *E. coli* MRE600, angeimpft. Dieses angeimpfte Medium sowie ein weiterer Erlenmeyerkolben mit 200 ml nicht angeimpftem M9-Minimalmedium werden über Nacht bei 37 ° C und 250 rpm geschüttelt. Das zweite nicht angeimpfte Medium dient in diesem Schritt zur Kontrolle der Sterilität. Nur wenn es am folgenden Tag noch durchsichtig ist, wurde steril gearbeitet.

3.1.4.5 Anzucht von *E. coli* MRE600

200 ml M9 Minimalmedium, das mit 600 µl einer gesättigten Vitamin B₁₂-Lösung angereichert wurde, wird mit *E. coli* MRE600 Vorkultur unter sterilen Bedingungen angeimpft und bei 37°C inkubiert. Um das Wachstum der Zellen zu überprüfen, wird jede halbe Stunde die OD bei 600 nm gemessen. 1 h nachdem die exponentielle Wachstumsphase überschritten wurde, werden die Zellen 10 min bei 4 ° C und bei einer Drehzahl von 5000 rpm geerntet. Im Anschluss werden die dabei entstandenen Zellpellets bei –20 ° C eingefroren, so dass sie bis zu zwei Wochen haltbar sind. Sind genügend Aufzuchten vorhanden, werden die gewonnenen Zellpellets, wie im Folgenden beschrieben, in einem Aufschlusspuffer suspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (siehe 3.1.4.8.).

3.1.4.6 Anzucht von *E. coli* MRE600 mit markiertem [⁵⁷Co]

Zur Anzucht der Bakterien (*E. coli* MRE600) wird neben den beiden Medien radioaktives Cyanocobalamin verwendet. Die Anzucht dient dazu, möglichst viele Zellen zu produzieren, um daraus einen verbundenen Enzym-Cofaktor-Komplex zu erhalten, also den gesuchten Enzym-Cobalamin-Komplex zu isolieren. Hierzu sind in der Regel über 10 Aufzuchten nötig; jede Aufzucht dauert im Allgemeinen 3-5 h.

Den 200 ml Minimalmedium werden im Isotopenlabor 600 µl radioaktives Cyanocobalamin (2,34.10⁶ cpm) zugeführt. Anschließend werden die 20 ml der angeimpften Vorzucht beigemischt. Die Mischung wird bei Raumtemperatur so lange geschüttelt, bis die Zellen 90 % des radioaktiven Cyanocobalamins aufgenommen haben - allerdings nicht länger als 1 h nach der exponentiellen Wachstumsphase der

Zellen. Diese Zeit sollte nicht überschritten werden, um die Bildung eines zu großen Anteils an Fremdproteinen zu verhindern. Man hat festgestellt, dass Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, Q-defizient sind. Die prozentuale Aufnahme an Radioaktivität wird stündlich überprüft. Dazu werden 500 µl der Anzucht entnommen und bei einer Temperatur von 4° C für 5 min bei einer Drehzahl von 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird mit 10 ml Lösung für wässrige radioaktive Proben gemischt und für zwei min im Scintillationszähler überprüft. Der Scintillationszähler misst die Radioaktivität des [⁵⁷Co], welches im Cyanocobalamin enthalten ist.

Haben die Zellen ausreichend Radioaktivität aufgenommen, werden sie bei 9 ° C in einer Zentrifuge für 10 min bei einer Drehzahl von 5000 rpm von der Lösung getrennt. Im Anschluss werden die dabei entstandenen Zellpellets bei -20 ° C eingefroren, so dass sie bis zu zwei Wochen haltbar sind. Sind genügend Aufzuchten vorhanden, werden die gewonnenen Zellpellets, wie im Folgenden beschrieben, in einem Aufschlusspuffer suspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (siehe 3.1.4.8).

3.1.4.7 Vorbereitung von *E. coli* XL1 Wirtszellen für die Hybridisierung

Es werden *E. coli* XL1 Zellen verwendet. Eine Vorkultur wird ÜN bei 30°C in LB-MgSO₄-Maltose-Medium angesetzt. Maltose induziert die Bildung von Phagen-Rezeptoren an der Bakterienoberfläche. Die Anzucht erfolgt bei 30 °C, um die Anzahl toter Zellen niedrig zu halten. Am folgenden Tag werden 50 ml eines frischen LB-MgSO₄-Maltose-Mediums mit 50 µl Vorkultur eingimpft und das Wachstum der Zellen wird bei 37°C verfolgt. Die OD der Bakterienzellen wird regelmäßig bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Es dauert zwischen 2 und 4 h, bis die OD an 600 nm einen Wert von 1.0 erreicht. Die Zellkonzentration wird dann sofort mit frischem LB-Medium halbiert. Die Wirtszellen sind dann bereit für die sofortige Transduktion (Siehe 5.11.2.).

Sofern sie nicht sofort weiterverarbeitet werden, werden sie bei 5000 rpm und 4°C 10 min lang abzentrifugiert. Dann können sie entweder bei -20 °C mehrere Wochen, oder nach Resuspension in einer 10 mM MgSO₄-Lösung bei 4 °C mehrere Stunden aufbewahrt werden.

3.1.4.8 Zellenaufschluss mit Ultraschall

Der Aufschlusspuffer enthält zwei Proteaseinhibitoren und eine Nuclease. Die Proteaseinhibitoren verhindern den Abbau von Proteinen, so dass das cobalaminabhängige Enzym nicht abgebaut wird. Die Nuclease dagegen baut die störenden Desoxyribonuklein- und Ribonukleinsäuren ab.

Die Proteaseinhibitoren bestehen aus Pefabloc und Benzamidin; die Nuclease ist die Benzonase: In 10 ml Aufschlusspuffer sind 100 µl Pefabloc (mit einer Konzentration von 4.8 mg/ml), 100 µl Benzamidin (mit einer Konzentration von 75 mg/ml) und 5 µl Benzonase (25 U) enthalten.

Die im Aufschlusspuffer resuspendierten Bakterien werden anschließend in einen speziellen eisgekühlten Ultraschallbehälter gegossen.

Je nach Volumen der Bakterienkultur stehen zwei Ultraschallgeräte zur Verfügung: Für große Mengen (10 bis 15 ml) das HD 2200, für kleine Mengen das MS 72. In beiden Fällen beträgt die Beschallungsdauer 4 min, und zwar, je nach Gerät, mit 75 % bzw. 25 % der maximalen Leistung. Dabei beobachtet man, dass sich die trübe Suspension klärt.

Die nicht lysierten Zellen oder Bruchstücke von Zellen werden bei 4 ° C für 30 min in der Zentrifuge bei einer Drehzahl von 18000 rpm abgetrennt. Aus dem Überstand wird in den nächsten Arbeitsschritten versucht, das gesuchte Protein zu isolieren.

3.1.5 Proteinchemische Arbeitsmethoden

Die Säulen sind an ein HPLC-Gerät angeschlossen. Anfangs wurde eine Phenomenex Biosep SEC-S 2000 Säule verwendet, die zum Schutz der Hauptsäule eine Vorsäule besitzt. Später wurde eine Phenomenex Biosep SEC-S 3000 Säule (ebenfalls mit Vorsäule) benutzt.

3.1.5.1 Gelfiltrationschromatographie mit ein Bio SEC-S 2000 Säule

Nach dem Aufschluss wird der Rohextrakt mit Hilfe von Centrifongefäßen auf 10 ml aufkonzentriert.

Die Eigenschaften der ersten Säule sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Säule	Biosep SEC S 2000
Verfahren	HPLC
Ausschlussgröße	130-1 kDa
Volumen der Säule	14.4 ml
Volumen der Vorsäule	1.44 ml
Maximaler Druck	66 bar
Volumen der Proben	10 ml: 100x100 µl
Laufdauer	20 min
Elutionspuffer	Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7.0
Fluss	1 ml/min
Volumen der Fraktionen	1 ml
Reinigung	SDS 0.5 % und Wasser
Konservierung	NaN ₃ 0.02 %

Um einer Verstopfung des HPLC-Geräts durch eventuell vorhandene Partikel vorzubeugen, wird die Probe unmittelbar vor dem Durchlauf bei einer Drehzahl von 14000 rpm für 5 min bei einer Temperatur von 4 ° C zentrifugiert. Es werden 100 µl-Proben verwendet, da dadurch eine bessere Trennung möglich ist.

3.1.5.2 Gelfiltrationschromatographie mit einer Biosep SEC-S 3000 Säule

Nachfolgend sind die Eigenschaften der chromatographischen Auftrennung aufgeführt.

3.1.5.2.1 Erstes Verfahren

Säule	Biosep SEC S 3000
Verfahren	HPLC
Ausschlussgröße	5-800kDa, aber trennt nur 5-500kDa
Volumen der Säule	212 ml
Volumen der Vorsäule	21.2 ml
Maximaler Druck	70 Bar
Volumen der Proben	900 µl: 9x100 µl
Durchlaufdauer	20 min
Elutionspuffer	Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7.0
Fluss	1 ml/min
Volumen der Fraktionen	1 ml
Reinigung	SDS 0.5 % und Wasser
Konservierung	NaN ₃ 0.02 %

3.1.5.2.2 Zweites Verfahren

Säule	Biosep SEC S 3000
Verfahren	FPLC
Ausschlussgröße	800-5 kDa
Volumen der Säule	212 ml
Volumen der Vorsäule	21.2 ml

Maximaler Druck	70 bar
Volumen der Proben	4x6 ml
Durchlaufdauer	400 min
Elutionspuffer	Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7.0
Fluss	1.5 ml/min
Volumen der Fraktionen	4.5 ml
Reinigung	SDS 0.5 % und Wasser
Konservierung	NaN ₃ 0.02 %

Die Proben werden weiter bearbeitet.

3.1.5.3 *Anionenaustauschchromatographie mit einer Q-Sepharose-Säule*

Hier werden die geladenen Moleküle am Säulenmaterial gebunden und durch eine steigende Ionenkonzentration verdrängt, um vorhandene RNA-, bzw. DNA-Reste zu entfernen.

Die Elution der Proteine kann anhand der Absorption der Proteine bei 280 nm dargestellt werden. Die Eigenschaften sind in folgender Tabelle aufgezeigt.

3.1.5.3.1 *Erstes Verfahren*

Säule	Q-Sepharose
Verfahren	starker Anionenaustauscher
Volumen der Säule	5 ml
Maximaler Druck	40 bar
Volumen der Proben	8 ml

Durchlaufdauer	96 min
Elutionspuffer	A: Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7.0
	B: Phosphat-Puffer 400 mM, pH 7.2
Fluss	3 ml/min
Gradient	0-6 min 100 % A
	6-90 min 0-100 % B
	90-96 min 100 % B
Volumen der Fraktionen	6 ml
Reinigung	KCl oder NaCl 1 M und Wasser
Konservierung	Ethanol 20 %

3.1.5.3.2 Zweites Verfahren

Säule	Q-Sepharose
Verfahren	starker Anionenaustauscher
Volumen der Säule	5 ml
Maximaler Druck	40 bar
Volumen der Proben	50 ml
Durchlaufdauer	96 min
Elutionspuffer	A: Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7.0
	B: Phosphat-Puffer 400 mM, pH 7.4
Fluss	3 ml/min

Gradient	0-6 min 100 % A 6-90 min 0-100 % B 90-96 min 100 % B
Volumen der Fraktionen	6 ml
Reinigung	KCl oder NaCl 1 M und Wasser
Konservierung	Ethanol 20 %

Die Proben werden weiter bearbeitet.

3.1.5.4 Affinitätschromatographie mit B₁₂-Agarose Kügelchen

Die Affinitätschromatographie ist eine äußerst effiziente Methode, um gezielt Proteine zu reinigen. Dazu werden selektive, (hoch)affine Liganden, wie Vitamin B₁₂, die das Zielprotein erkennen, an die Säulenmatrix gebunden. Die Wechselwirkung zwischen dem Zielprotein und den Liganden wird durch Kompetitorsubstanzen, wie z. B. freies Vitamin B₁₂, wieder aufgehoben. Ein Aliquot der Rohproteinlösung wird aufbewahrt.

3.1.5.4.1 Batchverfahren

Die Bindung der in 10 ml Rohproteinlösung enthaltenen affinen Proteine an die B₁₂-Agarose erfolgt durch Inkubation für 16 h bei 4 °C unter schonendem Umschütteln. Die Agarose-Kügelchen werden dann bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen wird aufbewahrt. Es stellt entweder einen Überschuss an Proteinlösung oder Proteine, die weniger Affinität mit Cobalamin haben dar.

Dann kann ein Waschschrift des Gels mit 25 ml Phosphatpuffer 50 mM pH 7.0 erfolgen. Die Waschfraktion wird mit dem vorherigen Überstand gesammelt. Es ist die erste Fraktion (ungefähr 50 ml).

Dann werden die gebundenen Proteine mit ungefähr 25 ml einer gesättigten-Vitamin B₁₂-Lösung unter starkem Umschütteln während 16 h bei 4°C von dem Gel

heruntergelöst. Dazu sollte das gesuchte Enzym gehören. Es befindet sich in der zweiten Fraktion (ungefähr 30 ml).

Die zwei verschiedenen Fraktionen werden mit Hilfe von Centricon-Gefäßen für die weitere Analyse auf 500 bis 1000 µl aufkonzentriert.

3.1.5.4.2 FPLC Verfahren

Die Bindung der affinen Proteine, enthalten in 3 ml Rohproteinlösung, an die B₁₂-Agarose-Kügelchen des Gels erfolgt nicht durch schonendes Umschütteln sondern durch Auftragen auf eine B₁₂-Agarose-Säule. Es wird ein Affiniäts-FPLC-Verfahren durchgeführt. Die Bedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Verfahren	Affinität-FPLC
Material der Säule	B ₁₂ -Agarose
Volumen der Säule	20 ml
Maximaler Druck	0.3 MPa (sind 3 bar)
Auftragungsfluss	1 ml/min
Volumen der Probe	2 bis 6 ml
Trennungsfluss	2 ml/min
Auftragungspuffer	20 mM Phosphat Puffer pH 7.0
Elutionspuffer	Puffer A: 20 mM Phosphat Puffer pH 7.0
	Puffer B: 400 mM Phosphat Puffer pH 7.9
	Puffer C: 1 M NaCl
Gradient 1	0 bis 80 min: 100 % Puffer A 80 bis 140 min: 100 % A→100 %Puffer B 140 bis 200 min: 100 % B→100 % C 200 bis 240 min. 100 % C

oder Gradient 2	0 bis 100 min: 100 % Puffer A 100 bis 200 min: 100 % Puffer A→100 % Puffer C
oder Gradient 3	0 bis 50 min: 100 % Puffer A 50 bis 110 min. 100 % Puffer A→100 % Puffer B
Regenerierungspuffer	1 M NaCl
Lagerungspuffer	1 M NaCl

Es wurde in manchen Experimenten Puffer A' anstatt Puffer A verwendet.

Es wurde ebenso Puffer C' anstatt Puffer C verwendet. (siehe 3.1.3.2.2.3)

3.1.5.4.3 *Schwerkraft-Säule Verfahren*

Es wurde ein dem zweiten ähnliches Verfahren verwendet.

3.1.5.5 **Puffer steril filtrieren**

Puffer, die für ein FPLC- oder HPLC-Gerät gebraucht werden, müssen entgast werden. Die Gasbläschen beschädigen das Säulenmaterial. Heutzutage sind meistens HPLC- und FPLC-Geräte, die ein integriertes Entgasungssystem haben, zu finden. Alle Puffer werden unter Vakuum steril filtriert. Die Porengröße des Filters ist 0,45µm. Die Lösung gelangt direkt in ein Gefäß, das einen Rührfisch enthält. Wenn die gesamte Lösung filtriert ist, wird das Vakuum abgestellt und der Filter durch einen Gummi-Deckel ersetzt. Dann wird die filtrierte Lösung gerührt und unter Vakuum 20 min lang entgast. Daraufhin wird die Lösung sorgfältig in eine Flasche gegossen und abgekühlt für das folgende FPLC-Verfahren.

3.1.5.6 **Radioaktivitätsmessungen**

3.1.5.6.1 *Radiaktivitätsmessung einer Proteinlösung*

Zusätzlich zur Chromatographie werden nach jedem Durchlauf jeder gesammelten Fraktion 100 µl oder 200 µl entnommen und mit 10 ml Lösung (Lumisafe) verdünnt.

In einem Scintillationszähler werden diese verdünnten Proben auf die Radioaktivität des [⁵⁷Co] gemessen. Diese Untersuchung dauert 2 min pro Probe und soll die Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie bestätigen.

3.1.5.6.2 *Radiktivitätsmessungen eines Polyacrylamidgels*

Das Trocknen ist ein Verfahren, womit das Polyacrylamid-Gel als Dokumentationsmaterial aufbewahrt oder nach [⁵⁷Co] untersucht werden kann. Es wird an der Luft unter dem Abzug durchgeführt. Die nassen Gele, die auf der silanisierten Kunststoffolie liegen, werden, mit einer Cellophanmembran überdeckt und dann getrocknet. Es muss darauf geachtet werden dass das Gel nicht zerreißt oder sich rollt. Es wird dann in einem Scanner nach [⁵⁷Co] untersucht.

3.1.5.7 ***Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen***

3.1.5.7.1 *Aufkonzentrierung mit Rührzellen*

Die Rührzellen können bis 250 ml Proteinlösung auf 10 ml aufkonzentrieren. Die Rührzelle enthält eine Membran aus Nitrocellulose, durch welche Puffer und kleinere Proteine geleitet werden. Dazu wird auf die Rührzelle Stickstoff mit maximal 3,5 bar geleitet und mit einer Rührgeschwindigkeit von 150 rpm in einem Eisbad eingengt. Es muss darauf geachtet werden, dass die Rührzelle nicht trockenläuft, da sonst die Membran porös werden kann. Die Aufschlussgröße ist unterschiedlich und weist Werte von 5, 10 und 50 kDa auf.

3.1.5.7.2 *Aufkonzentrierung mit Centricongefäßen*

Diese Methode dient dazu, die Proteinkonzentration zu erhöhen und als Entsalzverfahren. Das Centricongefäß hat eine Membran mit einer festgelegten Porengröße, die den Ausschlussbereich bestimmt.

Die Aufkonzentrierung kann mittels zweier Verfahren erfolgen. Zum einen unter Druck in einer Stickstoffatmosphäre und mit Eis gekühlt, zum anderen für einige Stunden in einer Zentrifuge bei 4°C (in diesem Fall kann nur die Hälfte des maximalen Volumens verwendet werden).

Es wurden sechs verschiedene Arten von Centricongefäßen verwendet, die sich hinsichtlich Ausschlussgröße (5, 10, und 50 kDa) und Kapazität (4, 15 und 70 ml) unterscheiden.

Im Gegensatz zu den Rührzellen sind die Filter so aufgebaut, dass durch ein Restvolumen ein Trockenlaufen verhindert wird.

3.1.5.8 Polyacrylamidgele (PAG)

3.1.5.8.1 Nativ – PAGE

3.1.5.8.1.1 Kleine Native- PAGE

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Ladung und Größe eingesetzt. Sie gibt aber keine Auskunft über die Proteingröße. Da die Proteine nicht denaturieren, zeigen Enzyme, die aus einem Heterodimer bestehen, nur ein Bande auf dem nativen Gel (aber mehrere auf einem SDS-Gel).

Die Glasplatten werden gründlich mit Ethanol entfettet. Auf die größere getrocknete Platte wird in manche Fällen eine silanisierte Folie aufgebracht, worauf das Gel polymerisiert. Auf diese Art und Weise kann das Gel ohne Schrumpfen getrocknet werden. Dieser Schritt ist notwendig für Radioaktivitätsmessungen am Gel.

Die Platten werden mit Abstandhaltern aufeinandergelegt und in den Gießstand gespannt. Ein Trenngel wird eingegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach ungefähr 30 min ist es auspolymerisiert und die Wasserschicht wird entfernt. Anschließend wird das 5 %ige Sammelgel eingegossen und vor dem Verfestigen ein Kamm der gewünschten Taschengröße eingeschoben. Nach ungefähr 30 min ist es auspolymerisiert, und der Kamm wird sehr vorsichtig entfernt. Die entstehenden Taschen werden mit dem Elektrophoreselaufpuffer gründlich gespült, um verbleibende Gelreste zu entfernen. Danach wird die Apparatur dem Gießstand entnommen und in die Elektrophoreseanlage eingespannt. Die Elektrophoreseanlage wird in ein Pufferbad gelegt. Der Lauf dauert circa 50 min bei einem Gleichstrom von 20 mA und einer maximalen Spannung von 300 V. Die Anfangsspannung muss ungefähr einen Wert von 100 V haben.

Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenol-Blau markiert die Wanderungsfront der Proteine.

Im Fall radioaktiver Proteinproben werden nach der Elektrophorese die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und das Gel mit Hilfe der Folie abgelöst und auf [⁵⁷Co] untersucht. Da Proteine farblos sind, werden sie mit Hilfe von Coomassie-Blau oder Silber sichtbar gemacht. Es werden dann ein Scan (siehe 3.1.5.6.2), in manchen Fällen ein Bild gemacht. Das entstandene Gel wird in einigen Fällen auch auf eine Membran geblottet.

Zur Durchführung der Nativ-PAGE benötigt man:

Gel	Trenngel 8 %	Sammelgel 5 %
bidest. Wasser	4,8	2,00
Puffer A (ml)	2,5	0,00
Puffer B (ml)	0	1,20
Lösung C	2,7	0,84
TEMED (µl)	5,00	5,00
APS (µl)	20,00	20,0

3.1.5.8.1.2 Große Nativ-PAGE

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Ladung und Größe eingesetzt. Siehe 3.1.5.8.2.1 für die Methode und den Ablauf. Unten folgen die Reagenzzusammensetzungen, die benötigt werden.

Gel	Trenngel 8 %	Sammelgel 5 %
bidest. Wasser	4.8	2.9
Puffer A (ml)	2.5	0

Puffer B (ml)	0	1,2
Lösung C	2.7	0,84
TEMED (µl)	10	10
APS (µl)	30	30

Der Lauf dauert ungefähr 14 h bei einem Gleichstrom von 12 mA und einer maximalen Spannung von 500 V. Nach dem Lauf wird entweder das Gel gefärbt, getrocknet oder geblottet.

3.1.5.8.2 SDS - PAGE

3.1.5.8.2.1 Kleine SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient der Analyse der Reinheit komplexer Proteinmischungen und ermöglicht die Bestimmung des schnelle Proteinmolekulargewichts.

SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinuntereinheiten so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt, und so die Tertiär- und die Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Denaturierung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cys werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), aufgespalten, wodurch die Quartärstruktur aufgelöst wird. So wird gewährleistet, dass nur die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt. Der SDS-Proteinkomplex wandert im elektrischen Feld Richtung Anode. Die Elektrophorese erfolgt in einem von U.K. Laemmli eingeführten diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel. Diese Gele unterscheiden sich auch in ihren pH Werten.

Der pH Wert des Sammelgels, pH 6.8, liegt sehr nahe am isoelektrischen Punkt von Glycin. Dadurch hat Glycin zu Beginn der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität; es wird Folgeion genannt. Die Chloridionen in den Puffern haben hingegen eine sehr hohe Mobilität; diese werden Leitonen genannt

Die Mobilität der Proteine liegt zwischen den Folgeionen und Leitonen. Beim Anlegen des elektrischen Feldes beginnen in diesem diskontinuierlichen System alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern. Im Bereich der Ionen mit hoher Mobilität (Leitonen) stellt sich eine niedrige Feldstärke ein. Im Bereich der Ionen mit niedriger Mobilität (Folgeionen) ist die Feldstärke sehr hoch. Somit befinden sich die Proteine in einem Feldstärkegradienten und bilden während der Elektrophorese einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten („stacking-Effekt“). Dadurch erfolgt eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinklassen beim Start. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, was zur weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin ist vom Reibungswiderstand nicht beeinflusst. Im Trenngel, das einen pH Wert von 8.8 besitzt, wird es zum Glycinat und wandert am schnellsten und überholt die Proteine. Im Trenngel wird nun auf alle Proteine die gleiche Feldstärke erwirkt und somit ist ausschließlich die Größe für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend.

In der folgenden Tabelle sind die Gelzusammensetzungen zusammengefasst:

Reagenz %	T in	5	7.5	10	12
Bidest.Wasser, in ml		1.2	3.05	2.65	2.3
Puffer A, pH 8.8, in ml		/	0.63	0.63	0.63
Puffer B, pH 6.8, in ml		0.5	/	/	/
Polyacrylamidlösung, in ml		0.33	1.25	1.68	2.0
SDS 20 %, in µl		/	25	25	25
TEMED, in µl		5	5	5	5
APS, in µl		10	15	20	20

Nach dem Lauf wird entweder das Gel gefärbt, (siehe 3.1.5.9) oder für die enthaltenden [⁵⁷Co]-Messungen untersucht. (siehe 3.1.5.6).

3.1.5.8.2.2 Große SDS-PAGE

Das Ziel und Verfahren ist ähnlich wie bei der kleinen SDS-PAGE (siehe 3.1.5.8.2.). Vorteil ist, dass eine größere Menge an Protein aufgetragen und aufgetrennt werden kann. Die Auflösung ist dadurch verbessert, weil das Gel genau so dick sein kann, aber breiter und länger als kleine Gele. Je nach Bedarf ist es möglich, Gele zwischen 0.5 und 1.5 mm Dicke herzustellen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der Gelansätze ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Reagenz	T in %	5	7.5	10	12
Bidest.Wasser, in ml		7.2	18.3	15.8	11.4
Puffer A, pH 8.8, in ml		/	3.78	3.78	3.78
Puffer B, pH 6.8, in ml		3	/	/	/
Polyacrylamidlösung, in ml		1.98	7.5	10.08	15
SDS 20 %, in μ l			150	150	150
TEMED, in μ l		30	30	30	30
APS, in μ l		30	50	50	50

Das entstandene Gel wird weiter verarbeitet.

3.1.5.8.2.3 Molekulargewichtsbestimmung

Um die Größe der reinen Protein-Untereinheiten bestimmen zu können, muss man pro Gel einen Molekulargewicht-Marker mit auftrennen. Es ist eine Mischung aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht. Die relative Mobilität der Proteine im SDS-Gel ist proportional zu dem Logarithmus ihres Molekulargewichts. Anhand der relativen Laufstrecke zu den Markerbanden lässt sich das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins somit bestimmen. Spezielle Bildverarbeitungssoftware kann genaue Auskunft über Molekulargewicht und Konzentration geben.

3.1.5.8.3 Zweidimensionale Elektrophorese

Die erste Dimension ist eine Nativ-PAGE. Die Methode ist im Abschnitt 3.1.5.8.3 beschrieben. Dann wird eine Spur ausgeschnitten und ein paar Minuten in einer SDS-Lösung inkubiert und zwischen zwei Glassplatten eingebaut. Sie sollte am obersten Teil der Glassplatten eingebaut werden, so dass eine Öffnung verbleibt. Dann wird ein SDS-Polyacrylamidgel darunter gegossen (siehe Abschnitt 3.1.5.8..2.). Dies ermöglicht die Elektrophorese in der zweiten Dimension.

3.1.5.9 Färbungen

3.1.5.9.1 Coomassie-Färbung eines Polyacrylamidgels

Coomassie ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, von dem es mehrere Derivate gibt. Es wurde Coomassie-Blau R-250 benutzt.

Die Fixierung verursacht eine Proteinfällung durch Denaturierung oder eine chemische Verbindung zwischen den einzelnen Proteinmolekülen. Für die Fixierung wird eine Mischung aus Alkohol, Essigsäure und Wasser verwendet.

Beim Färben verbinden sich Coomassie-Brillantblau R 250 (auch acid blue genannt) und die Proteine.

Durch das Entfärben wird der Hintergrund des Trennmediums durchsichtig, so dass nur die gefärbten Proteinbanden zu sehen sind. Zu langes Entfärben führt zum Verschwinden der schwachen Proteinbanden.

Die Empfindlichkeit der Färbung liegt bei 100 ng Protein pro Bande.

Die Durchführung erfolgt folgendermaßen:

Coomassie Färbung	Bemerkungen
Fixierung und Färbung gleichzeitig	mindestens 1 Stunde
Entfärbung	mehrmals 20 min
Trocknung	Tage
Konservierung	in 20 % Glycerin

Anschließend wird das Gel entweder sofort photographiert oder in manchen Fällen wird es zusätzlich getrocknet, nach [⁵⁷Co] untersucht und photographiert (siehe 3.1.5.6.2.)

3.1.5.9.2 Silberfärbung eines Polyacrylamidgels

Die Silberfärbung ist um das 10-bis 100-fache empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 1 bis 0.1 ng Protein pro mm² Bandenfläche. Die Mechanismen der Silberfärbung von Proteinen ähneln denen des fotografischen Prozesses und verlaufen nach folgendem Schema:

Fixieren, Sensibilisieren, Entwickeln, Stoppen, Trocknen.

Schritte	verwendete Lösungen	Dauer
Fixierung	Ethanol-Wasser-Essigsäure- 4,5-4,5-1	3 h
Waschen	Ethanol 10 %	2x10 min
Waschen	Bidest. Wasser	3x10 min
Sensibilisierung	AgNO ₃ -Lösung 0,1 %	30 min
Waschen	Bidest. Wasser	10 sec
Entwicklung	Na ₂ CO ₃ -Wasser-Formaldehyd- 3-96,08-0,02	5 bis 10 min
Stoppen	Essigsäure 1 %	10 min
Waschen	Bidest. Wasser	3x 10 bis 15 min
Konservierung	vorsichtig trocknen	mehrere Tage

3.1.5.10 Blotting

3.1.5.10.1 Tankblotting

3.1.5.10.1.1 Tankblotting auf Nitrocellulose

Bei der Methode des Western-Blotting werden auf einem SDS- oder Nativ-Gel aufgetrennte Proteingemische auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf dieser Membran können anschließend bestimmte Proteine mit für sie spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, indem die Antikörperreaktion mit einer Farbreaktion gekoppelt wird. Der Vorteil ist die hohe Spezifität der eingesetzten Antikörper und die hohe Empfindlichkeit der Nachweismethode.

Dazu wird zuerst ein Sandwich hergestellt, welches aus einem Polyethylenrost, einem Kunststoff, drei Lagen Filterpapier, dem SDS- o. Nativ-Gel, der Nitrocellulosemembran, gefolgt von drei Lagen Filterpapier, Kunststoffolie und Polyethylenrost, aufgebaut ist. Die einzelnen Komponenten sollten vor dem Packen in Transfer-Puffer getränkt werden. Das Sandwich wird in eine Blotting-Apparatur gestellt, die anschließend mit Transfer-Puffer gefüllt wird. Die Nitrocellulosemembran muss dabei in Richtung der Anode orientiert sein, so dass die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran geblottet werden. Die Apparatur wird an das Elektrophorese Netzgerät angeschlossen und das Blotten erfolgt über Nacht bei 25 V unter Eiskühlung oder 1h bei 350 mA.

3.1.5.10.1.2 Tankblotting auf PVDF

Bei der Methode des Western-Blotting werden auf einem SDS- oder Nativ-Gel aufgetrennte Proteingemische auf PVDF transferiert. Auf dieser Membran können anschließend bestimmte Proteine mit für sie spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, indem die Antikörperreaktion mit einer Farbreaktion gekoppelt ist (siehe 3.1.5.10.3). Die Unterschiede zum Tankblotting auf Nitrocellulose sind:

- Die PVDF-Membran muß in 100 % iger Methanol-Lösung ein paar Sekunden aktiviert werden.
- der Transfer-Puffer enthält Methanol.

Der Vorteil dieser PVDF-Membran ist, dass die Möglichkeit besteht, eine N-terminale Sequenzierung durchzuführen.

3.1.5.10.2 *Semi-dry-Blotting*

3.1.5.10.2.1 Semi-dry-Blotting auf Nitrocellulose

Es wird ein ähnliches Verfahren wie beim semi-dry-Blotting auf einer PVDF-Membran durchgeführt. Die Unterschiede sind:

- Es ist ungeeignet für eine Peptid-Sequenzierung
- Die Membran wird nicht aktiviert sondern nur in Anoden-Puffer-II equilibriert.

Es kann eine Immunodetektion folgen (siehe Abschnitt 3.1.5.10.3).

3.1.5.10.2.2 Semi-dry-Blotting auf PVDF

Hier werden die Proteine auf PVDF Membran geblottet. Im Vergleich zum Tankblotting benötigt man viel weniger Puffer und eine geringere Protein-Übertragungsdauer. Es verläuft folgendermaßen:

Die PVDF-Membran wird aktiviert durch ein Bad in 100 %iger Methanol-Lösung. Die Membran sollte halb durchsichtig werden. Dann wird diese Membran zwei Minuten in bidest. Wasser gelegt und dann in dem Puffer II equilibriert.

Parallel dazu wird das SDS- oder Nativ-Polyacrylamidgel fünf Minuten in dem Kathoden-Puffer equilibriert und dann wird eine Ecke des Gels abgeschnitten.

Es werden auf die Anode zwei mit Anode-Puffer-I getränkte Filterpapiere gelegt, dazu ein in Puffer-II getränktes Filterpapier, die vorbereitete PVDF-Membran, gefolgt von dem PAG, dann drei in Kathoden getränkte Filterpapiere und zuletzt die Kathode.

Es sollten keine Luftblasen zwischen den unterschiedlichen Lagen entstehen. Zur Vorsorge, bzw. falls welche entstanden sind, werden sie mit Hilfe einer Pasteur-Pipette, die über jede Lage gerollt wird, entfernt.

Es können mehrere Blots gleichzeitig durchgeführt werden. Dafür sollte ein in Kathoden getränktes Filterpapier auf das Gel gelegt werden, dazu eine Dialyse-Membran, gefolgt von einem in Anode-Puffer-II getränkten Filterpapier und sofort

darauf die nächste vorbereitete PVDF Membran. Ganz am Schluss werden drei in Kathoden-Puffer getränkte Filterpapiere daraufgelegt, gefolgt von der Kathode.

Die elektrophoretische Proteinübertragung dauert etwa 20 bis 30 min bei einer Stromstärke von 2.5 mA/cm^2 PVDF-Membran.

Nach dem Lauf wird das Ganze auseinandergebaut und die PVDF Membran weiter behandelt, entweder für das Immunoblotting (siehe Abschnitt: 3.1.5.10.3.) oder für Lagerung.

3.1.5.10.3 Immunodetektion

Zur Detektion wird die Nitrocellulose-Membran 60 min mit 50 ml 3 %-igem Rinderserumalbumin in Puffer A behandelt, um leere Membranstellen zu sättigen, und 2x5 min mit Puffer B gewaschen. Der Primärantikörper, Anti-cobalamin IgG, wird in 10 ml Puffer B gelöst, so dass er eine Konzentration von 10 mg/ml Puffer besitzt.

Die Membran wird zusammen mit der 10 ml Primärantikörperlösung (Überschuss an Antikörpern) in Plastikfolie eingeschweißt und 2 h inkubiert. Man erwartet, dass diesen die Primärantikörper Cobalamin-Proteine als Komplex binden. Dann wäscht man 2x10 min mit je 50 ml Puffer B und schweißt wieder die Membrane zusammen mit 10 ml Sekundärantikörperlösung (Überschuss an Antikörper) aus Ziege IgG, Fc spezifisch mit Peroxidase konjugiert- in Folie ein. Letzterer sollte die primären Antikörper erkennen und binden. Nach 1 h wäscht man 2x5 min mit 50 ml Puffer B und einmal mit 50 ml Puffer A. Es sollten überflüssige Antikörper entfernt und die Membran für den folgenden Schritt vorbereitet werden. Die Membran kann nun in 50 ml Detektionslösung, die H_2O_2 und β -Chlornaphthol enthält, belassen werden, bis die Signale, blau-violette Farbentwicklung, deutlich zu sehen sind. H_2O_2 sollte kurzfristig vor der Detektion zugegeben werden. Während dieses Schrittes geschieht folgendes: H_2O_2 , das Substrat der Peroxidase, wird in naszierendem Sauerstoff gespalten und ermöglicht die Oxidation von β -Chlornaphthol zu einem blauen Farbstoff. Zum Schluss wird die Färbereaktion durch zweimaliges Wässern abgebrochen, die Membran getrocknet und zur Aufbewahrung in Alufolie verpackt. Die Farbe ist lichtempfindlich.

3.1.5.11 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwandt, zum einen die Methode nach Warburg und Christian und zum anderen die Lowry-Methode. Beide werden im Folgenden näher beschrieben.

3.1.5.11.1 Warburg- und Christian-Methode

Die Absorption einer Proteinlösung wird bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Sie sollte im Bereich von 0,1 bis 2,0 liegen. Einige Proteinlösungen mussten verdünnt oder aufkonzentriert werden. Die Proteinlösung sollte außerdem so rein wie möglich sein, da Nukleinsäuren bei diesen Wellenlängen ebenfalls absorbieren können.

Die Proteinmenge berechnet sich nach folgender Formel:

Proteinkonzentration [mg/ml] = $(1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

3.1.5.11.2 Lowry-Methode

Bei der Methode nach Lowry benötigt man eine Eichkurve, um die Proteinkonzentration der verwendeten Probe zu bestimmen.

Zur Aufstellung der Eichkurve werden verschiedene Konzentrationen an RSA verwendet. Dazu wird eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml gebildet. In neun Eppendorfgefäßen werden je 1 ml Wasser und verschiedene Mengen der Proteinlösung gegeben (im ersten 1 ml Wasser als Blindprobe ohne RSA, im zweiten 1 µl RSA, im 3. 2 µl, im 4. 5 µl, im 5. 10 µl, im 6. 20 µl, im 7. 40 µl, im 8. 80 µl, im 9. 160 µl). Den Eppendorfgefäßen werden je 50 µl Na-desoxycholat (2 %) zugegeben und die Mischung wird geschüttelt. Durch die Zugabe von 200 µl 30 % TCE fällen die Proteine aus und werden für 20 min bei einer Drehzahl von 9000 rpm abzentrifugiert.

Der entstehende Überstand wird verworfen. Den verbleibenden Pellets in den Eppendorfgefäßen werden je 1,5 ml der sogenannten Lowry A Mischung zugegeben, außerdem werden noch 100 µl 5 % SDS zugeführt und so lange mittels Vortex gemischt, bis sich der Niederschlag gelöst hat. Anschließend werden 200 µl 1:1 Wasser-Folincioalceusreagenz-Mischung beigemischt und 30 min im Dunkeln

stehen gelassen. Von jeder Probe wird 1 ml entnommen, um die Absorption bei 650 nm zu messen.

Daraus entsteht die Eichkurve (siehe Abbildung 3-1). Auf die Absorption bei 650 nm wird gegen die Proteinmenge aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteinmenge der gereinigten Proben des gesuchten Proteins wird mit 5 µl der Probe genauso verfahren, wie mit den Proben für die Eichkurve. Anschließend wird ebenfalls deren Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen.

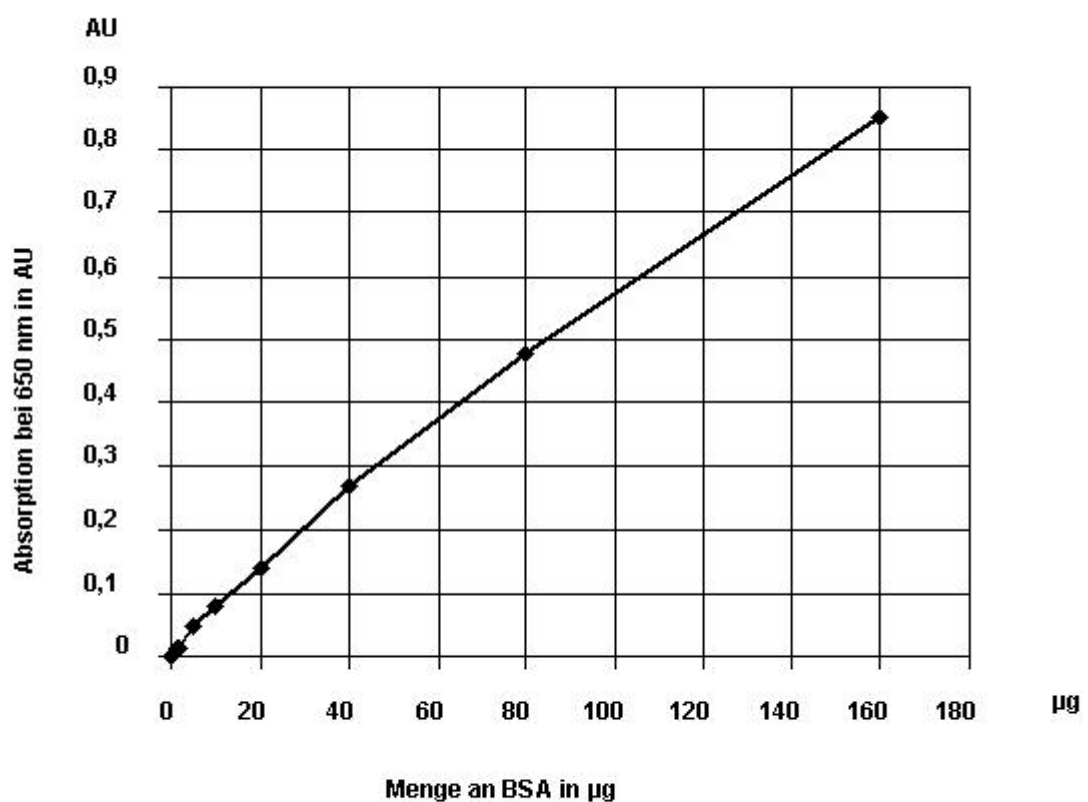


Abb. 3-1: Eichkurve zur Bestimmung der Proteinmenge nach Lowry. Intensität der Niederschlagsabsorption bei 650 nm als Funktion der BSA-Menge in µg.

Die zugehörige Proteinmenge kann dann an der Abszisse des Graphen der Eichkurve abgelesen werden.

3.1.5.12 MALDI-TOF-MS

3.1.5.12.1 Probenvorbereitung

3.1.5.12.1.1 In-Gel-Verdau

Die Identifizierung von Proteinen wird heute zunehmend mit Methoden der Massenspektrometrie durchgeführt. Dazu werden die Proteine zunächst in definierte Peptide gespalten. Hier hat sich das Enzym Trypsin bewährt, weil damit Proteine an definierten Schnittstellen (C-terminal hinter Lysin und Arginin) gespalten werden und weil die entstandenen Fragmente am C-terminalen Ende eine positive Ladung tragen. Das Ensemble der proteolytischen Fragmente („mass fingerprint“) reicht oft schon zur Identifizierung in einer Datenbank aus. Zusätzliche Sicherheit kann bei der Identifizierung dadurch erzielt werden, daß ein tryptisches Peptid im Massenspektrometer fragmentiert wird. Das Fragmentierungsmuster ergibt zusätzliche Sequenzinformation und damit eine eindeutige Zuordnung in der Datenbank („peptide sequence tag“).

Für den In-Gel-Verdau der Proteine ist die Verwendung von modifizierten Proteasen in hochreiner Form (modified sequencing grade) erforderlich.

1. Tag: Verdau

Ausschneiden von Proteinen aus dem Nativ-Gel. Die Gelstücke wurden in 1mm² kleine Stückchen zerlegt und in 200 µl 200 mM NH₄HCO₃/50 % CH₃CN, 45 min lang bei 37°C entfärbt.

Wenn die Gelstücke nicht vollständig entfärbt sind, kann man diese Entfärbungsstufe wiederholen.

Dann werden die Gelstücke mit Hilfe einer Speedvac ein paar min getrocknet.

Eine 20 µg/ml Trypsin-Lösung ist in 40 mM NH₄HCO₃/10 % CH₃CN pH 8.1 vorbereitet.

Die Gelstücke werden mit 20 µl dieser Lösung 1 h lang bei RT rehydratisiert. Dann sind zusätzlich 50 µl diese Lösung zugegeben und dann kann der tryptische Verdau bei 37°C ÜN (16-17 h) im Wasserbad stattfinden.

3.1.5.12.1.2 Peptid-Extraktion

2. Tag: Extraktion der Peptide, Probenvorbereitung für MALDI-MS, Identifizierung der Peptide mit Hilfe von Massenspektrometrie und Datenbanksuche.

Die Überstände wurden vereinigt und mit Hilfe von ZipTip Pipettentips konzentriert.

Die Proben wurden mit einer gesättigter Matrixlösung (4-Hydroxy-zimtsäure in 0,1 % TFA/ 50 % CH₃CN)) gemischt.

3.1.5.12.1.3 Probenauftragung

1 µl Matrix wird auf eine MALDI-Platte aufgetragen und an der Luft getrocknet. 2 µl von jedem Peptidgemisch wird mit 2 µl gesättigter Matrix versetzt. Hiervon werden jeweils 2 µl auf die Matrix aufgetragen. Die Probe wird an der Luft getrocknet.

3.1.5.12.2 Messungen

MALDI Messungen müssen grundsätzlich kalibriert werden. Dazu wird ein Standard, der genau so wie die Probe vorbereitet wird, in die Nähe der zu untersuchenden Proben aufgetragen.

Anschließend werden die Proben im MALDI-TOF-Massenspektrometer gemessen.

3.1.5.12.3 Auswertungen

Die Massenspektren werden verfeinert. Dann wird die Datenbank SwissProt angewandt und für *E. coli* die Webseite Matrixsciences nach passenden tryptischen verdauten Proteinen von *E. coli* untersucht.

3.1.6 Ribonukleinsäurechemische Arbeitsmethoden

3.1.6.1 DNA-Fällung

Diese Methode wird hier benutzt, um die unerwünschte DNA aus dem zu untersuchenden Protein-Gemisch zu entfernen.

Dies geschieht durch Zugabe des positiv geladenen Antibiotikums Streptomycin. Es bildet mit den negativen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates einen Komplex, was zur Verklumpung und schließlich zur Ausfällung der DNA führt.

Zu 10 ml des Rohaufschlusses wird langsam bei 4 °C eine Lösung von 300 mg Streptomycinsulfat in 100-150 µl bidestilliertem Wasser getropft. Dies entspricht einer Endkonzentration von 3 % Streptomycinsulfat in der Lösung. Nach Rühren der Mischung für 30 min bei 4 °C wird für 30 min bei 39 000 g ultrazentrifugiert (ungefähr 20 000 rpm mit Rotor SW28). Das Pellet, das die ausgefällte DNA enthält, wird verworfen. Der Überstand wird einer weiteren Proteinreinigung zugeführt. Mit Hilfe von B₁₂-Agarose wird der Überstand weiter verarbeitet (siehe 3.1.5.4.).

3.1.6.2 *Polymerase Kettenreaktion*

Man benötigt die DNA-Polymerase zwei kurze Stücke einzelsträngiger DNA oder RNA, um die Synthese zu beginnen, und eine Matrize. Somit kann der Startpunkt der Synthese festgelegt werden. Dieser Primer lagert sich an der komplementären Stelle der Matrize an.

Ein gewünschter DNA-Bereich kann durch die geschickte Auswahl von Primern gezielt synthetisiert und im weiteren Verlauf der Reaktion mittels PCR-Temperaturen und Zyklen-Programmierung sehr spezifisch vermehrt werden. Seit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion wurden eine Reihe spezieller Varianten der PCR-Technik und damit vielfältigste Anwendungsgebiete etabliert.

3.1.6.2.1 *Der PCR Ansatz*

In der folgenden Tabelle sind unsere beiden PCR-Ansätze zusammengefasst:

Reagenzien	Konzentration	Menge in µl für 50 µl Ansatz	Menge in µl für 100 µl Ansatz
DNA-Template	Spuren	X	X
bidest. Wasser	/	40-X	83-X
X entspricht 5 – 30 µl			
PCR-Puffer	10x	5	10
dNTPs	40 mM	2	4

Forward primer	10 pmol/μl	1	1
Reverse primer	10 pmol/μl	1	1
<i>Taq</i> - Polymerase	5 U/μl	1	1

In zwölf eisgekühlten PCR-Gefäßen wurden Wasser, DNA-Template, dNTPs und die Primer vermischt und unmittelbar vor der PCR wird kühl aufbewahrte *Taq*-Polymerase zugegeben.

3.1.6.2.2 Das PCR-Programm

Damit wird die PCR sofort im vorgeheizten und vorprogrammierten Thermocycler gestartet.

In der folgenden Tabelle ist das Programm für *Taq*-Polymerase zusammengefasst:

1 Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in s	Reaktion
Stufe 1	94	30	Denaturierung von DNA und Phagenhülle
Stufe 2	T _m	40	Anlagerung der Primer an Einzelstrang-DNA-template
Stufe 3	72	240	Synthese des komplementären Strangs ab der Primerstelle
Stufe 4	0	0	DNA Renaturierung

Der Thermocycler ermöglicht es, die Versuche mit einem Gradienten um T_m durchzuführen, das heißt in den zwölf Gefäßen herrschten in Stufe 2 des Zyklus Temperaturen von T_m + n Grad, wobei der Unterschied zwischen minimaler und

maximaler Temperatur höchstens 15 Grad betrug. So wird ein identischer Ansatz unterschiedlichen Temperaturen unterworfen. Dadurch wird die Stringenz variiert. Diese steigt mit zunehmender Temperatur.

Taq-Polymerase hat ein Aktivitäts-Optimum bei etwa 72°C. Sie fügt 1000 Basen/min ein. Des Weiteren hat sie keine 3'→5' Exonukleaseaktivität, weswegen Falschbasenpaarungen entstehen können.

Es werden zwischen 25 und 30 Zyklen programmiert. Die Vermehrung der Zielsequenz erfolgt dabei – wie bei vielen Wachstumsprozessen – exponentiell. Die Reaktion dauert mehrere Stunden. Der Ansatz kann dann untersucht werden. Es wird entweder der ganze Ansatz oder ein Aliquot auf einem Agarose-Gel analysiert (siehe 3.1.6.5).

3.1.6.3 PCR-Screening von *E. coli* XL1 Bakterienkolonien und künstliche Phagen-Plaques (*E. coli* MRE600 genomische Bibliothek)

Einer Bakterienkolonie oder einer Plaque wird eine kleine Probe entnommen und direkt in 10 µl bidestilliertes Wasser enthaltende PCR-Reaktionsgefäße gegeben. In der folgenden Tabelle sind die PCR-Bedingungen zusammengefasst:

Reagenzen	Konzentration	Menge in µl für 50 µl Ansatz	Menge in µl für 100 µl Ansatz
Kolonie oder Plaque	10 ⁶ pfu/ml	10	10
Bidest. Wasser	/	30	73
PCR-Puffer	10x	5	10
forward primer	10 pmol/µl	1	1
reverse primer	10 pmol/µl	1	1
dNTPs	40 mM	2	4
<i>Taq</i> -	5 U/µl	1	1

Polymerase			
------------	--	--	--

Das Programm ist im Abschnitt 3.1.6.2.2 zu finden.

3.1.6.4 Sequenzierung des PCR-Produkts

Die Sequenzierung von PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten wird von der Firma MWG durchgeführt. 50 bis 100 ng an lyophilisiertem PCR-Produkt wird für die Sequenzierung benutzt. Es wurde die „Value Read“-Sequenzierungs-Methode ausgewählt. Auf diese Weise können bis 900 Basen sequenziert werden. Dafür wird zuerst die Bestimmung der DNA-Konzentration durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.6.7).

Dann werden zwischen 50 und 100 ng PCR-Produkt folgendermaßen lyophilisiert. Unter dem Abzug wird bei 50°C in einem offenen 1.5 ml-Gefäß die passende Menge einige Stunden inkubiert, bis die DNA lyophilisiert ist. Um ein hartes DNA-Pellet zu verhindern, sollte kein „speed vac“ verwendet werden. Zudem würde es den Ablauf der Sequenzierung beeinträchtigen.

Diese Sequenz hat es ermöglicht, Bioinformatik-Untersuchungen durchzuführen.

3.1.6.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf einem Agarose-Gel

Für ein kleines 1%iges Agarosegel werden 0.5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer versetzt. Für ein großes Gel wird 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer vermischt. Die Agarose wird mit Hilfe einer Mikrowelle 2 bzw. 5 min lang bei hoher Leistung gelöst. Ihr Schmelzpunkt liegt zwischen 35 und 75 °C. Beim Kochen löst sich die Agarose im Puffer. Dann wird auf ungefähr 50 °C abgekühlt und es werden sorgfältig (mit Spezialhandschuhen) 2,5 µl bzw. 5 µl BET, einem krebserregendem Fluoreszenzfarbstoff, zugefügt. Die Lösung wird in eine dafür vorbereitete Kammer gegossen und es dauert ca. 20 bis 30 min bis das Gel erstarrt. Nun kann der Plastikamm, dessen Zähne die Taschen für die Probe bilden, entfernt werden. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überdeckt. Die Taschen sind auf die Kathoden-Seite zu legen, da die negativ geladenen Proben unter Spannung Richtung Anode wandern. 5 bis 100 µl der vorbereiteten Probe und 2.5 µl eines Molekulargewicht-Markers werden mit 2.5 µl Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Dann wird eine Spannung zwischen 80 und 160 V eingestellt und die

Elektrophorese wird gestartet. Wenn die Lauffront ca. zwei Drittel der Strecke zur Anode erreicht hat, was ca. 30 bis 100 min dauert wird das Gel mit einer UV-Licht-Lampe durchleuchtet und mit UV-Schutz-Brille betrachtet. BET lagert sich zwischen den gestapelten Basenpaaren von Doppelstrang-DNA ein. Die planar strukturierten, aromatischen BET-Ringe binden die Nukleotidbasen mit hoher Effizienz. BET fluoresziert bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 300 nm schwach bei 590 nm. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 ng Doppelstrang-DNA. Dann wird das Gel sofort photographiert, was mit der entsprechenden Technik die Möglichkeit quantitativer Auswertungen bietet. Der Vergleich zwischen den Proben und dem Molekulargewicht-Marker gibt Auskunft über die Reinheit der Probe sowie die Menge und Länge der untersuchten DNA.

Zum Schluss wird das Gel nach Vorschrift entsorgt oder weiter bearbeitet.

3.1.6.6 *Isolierung von DNA aus dem Agarose-Gel*

Hierzu wurde das QIAquick Gel Extraktion Kit verwendet. Man kann damit 400 mg Agarose-Gel-Stücke zur Isolierung von DNA-Fragmenten von 70 Bp bis 10 kDa verwenden.

Es folgt den Verfahren:

Gewicht der DNA enthaltenden Agarose in mg	Zugegebene Lösung	Menge der Lösung in µl	Reaktion/Bemerkung/zutun
X	QG	3 x	
<p>Das Ganze wird bei 50 °C 10 min inkubiert und gelegentlich gevortext bis die Agarose ganz schmilzt und die DNA in Lösung geht.</p> <p>QG enthält einen Farbindikator, der gelb verbleiben sollte. Wenn er blau-violett werden sollte, dann sind 10 µl NaAc zuzugeben, um den pH-Wert unter 7.5 zu bringen, den optimalen pH-Wert für DNA-Adsorption auf der Mini-Säule.</p>			
	Isopropanol	X	Nur für DNA Fragment < 500 Bp und > 4 kBp

Maximal 800 µl Probe werden auf eine Mini-Säule aufgetragen, 1 min lang bei 11000 rpm abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Man kann auf eine einzige Mini-Säule mehrmals 800 µl auftragen.			
	QG	500	1 min abzentrifugieren, um die Agarose-Bestandteile zu entfernen.
	PE	750	1 min abzentrifugieren, um die DNA zu reinigen
Eine zusätzliche min abzentrifugieren um die DNA zu trocknen.			
	TE oder bidest. Wasser mit 7.0 < pH < 8.5	30 bis 50	Elution der DNA

3.1.6.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

3.1.6.7.1 Die visuelle Methode der DNA Konzentrationsbestimmung

Im Folgenden sollen die beiden verwendeten Methoden vorgestellt werden. Die eine stellt ein elektrophoretisches Verfahren dar, die zweite ein spektroskopisches.

Bei der elektrophoretischen Methode handelt es sich um eine visuelle Auswertung durch Gegenüberstellung mit einem bekannten Marker. Man benötigt also eine passende DNA-Molekulargewicht-Marker-Mischung, die zusammen mit den zu untersuchenden DNA-Fragmenten oder Plasmiden aufgetragen wird. Der Vergleich gibt Auskunft über die Menge und die Größe.

3.1.6.7.2 Die spektroskopische Methode der DNA Konzentrationsbestimmung

Bei der spektroskopischen Methode handelt es sich um eine Absorptionsmessung der Basen. Man benötigt eine reine DNA-Lösung, ein Spektralphotometer und ein bis zwei Quarz-Küvetten. Die optische Dichte, besser gesagt die Absorption der

doppelsträngigen DANN, wird bei 260 und 280 nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes berechnet.

Hierbei gilt:

$$OD_{\lambda} = A = \log_{10} I_0/I = \epsilon \cdot l \cdot c$$

OD_{λ} : Optische Dichte bei λ nm

A: Absorption

I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes

I: Intensität des austretenden Lichtes

c: Konzentration der absorbierenden Substanz in mol/l

l: Schichtdicke der Lösung in cm

ϵ : dekadischer oder molarer Absorptionskoeffizient in l/mol.cm oder Extinktionskoeffizient

Die Werte von **A** sollten im Bereich von 0.1 bis 1.5 (höchstens 2) liegen, um verlässliche Werte für **c** zu erhalten.

Bei bekanntem ϵ -Wert folgt **c** unmittelbar aus der Formel.

Bei unbekanntem ϵ -Wert kommt zur Anwendung, dass $A_{260} = 1$ einem **c** von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht. Aus dem beschriebenen linearen Zusammenhang lässt sich nun für ein bestimmtes A_{260} die Konzentration doppelsträngiger DNA bestimmen.

Wichtig ist, dass das Verhältnis A_{260}/A_{280} bei 1.8 liegt. Höhere Werte signalisieren eine RNA-Kontaminierung und niedrigere eine Protein-Kontaminierung.

3.1.6.8 Verdau mit Restriktionsenzymen der DNA

Der DNA-Verdau erfolgt für 1 bis 1,5 h bei passender Temperatur im Wasserbad mit ein bis zwei Restriktionsenzymen in einem geeigneten Puffer in einem Reaktionsgefäß von 1.5 ml Fassungsvermögen.

Wichtig ist bei einem Doppelverdau die Wahl des passenden Puffers, in dem beide Restriktionsenzyme 100 % ihrer Verdau-Geschwindigkeit erreichen. Sollte kein geeigneter Puffer existieren, ist es in manchen Fällen möglich, dies auszugleichen,

indem die Verdaudauer verlängert wird oder die Menge der Restriktionsenzyme erhöht wird.

In folgender Tabelle sind die Bedingungen zusammengefasst:

Reagenz	Konzentration	Volumen in μl
Bidest. Wasser	/	12
Puffer	10x	2
Restriktionsenzyme	10 U/ μl	1
DNA	max. 250 ng/ μl	5

Für einen Doppelverdau sind nur 11 μl Wasser zuzugeben und 1 μl von jedem Restriktionsenzym.

Dann werden 10 μl mit 2.5 μl Elektrophoreseprobenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen, um die Elektrophorese durchzuführen (siehe Abschnitt 3.1.6.5).

Dies gibt Auskunft über den Verdau-Ablauf. Danach sind mehrere Versuchswege möglich.

3.1.6.9 *A-Tailing von DNA-Fragmenten*

Hierbei handelt es sich um die Polyadenylierung des 5'-Endes, um die Wahrscheinlichkeit der Einklonierung von DNA-PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor zu erhöhen. Dies geschieht folgendermaßen:

Reagenz	Konzentration	Menge in μl für 10 μl Ansatz
Bidest. Wasser	/	7-X
Puffer	10x	1
PCR-Produkt	/	X

X entspricht 1 bis 7 μl . Das gereinigte Produkt sollte einer mit *Pfu* durchgeführten

PCR entstammen.		
dATP	2 mM	1
<i>Taq</i> Polymerase oder Pfu	5 U/μl	1

Der Ansatz wird für 15 bis 30 min bei 70 °C inkubiert, entweder in einem Wasserbad oder im „Thermocycler“. Dann kann die Einklonierung des adenylierten Fragments erfolgen (siehe Abschnitt 3.1.6.10).

3.1.6.10 Klonierung des PCR DNA-Produkts in einem pGEM-T-Vektor

Das Klonieren ermöglicht die Speicherung einer Kopie eines beliebigen DNA-Fragments und dessen Produktion in fast unbegrenzter Menge. Hochentwickelte Plasmid-Vektoren besitzen zahlreiche Attribute, die ihre Verwendung bei recht unterschiedlichen molekulargenetischen Techniken ermöglichen.

Der pGEM-T-Vektor hat, nach dem Schneiden mit *EcoRV*, einen 3'-terminalen Thymidin-Baustein an jedem der beiden entsprechenden Strangenden. Diese beiden Überhänge ermöglichen eine effiziente, direkte Ligation eines PCR-Produkts, welches ein einzelnes Deoxyadenosin am 3'-Ende des amplifizierten Fragments aufweist. Sehr oft sind die die DNA-Fragmente an ihren 5'-Ende polyadenyliert um die Einklonierung Effizienz zu erhöhen. In pGEM-T-Vektoren sind auch PCR-Produkte mit glattem Ende, wie sie von *Pfu*-und *Pwo*-DNA-Polymerase produziert werden, klonierbar.

Die zum Einbau des DNA-Fragments verwendete T4-Ligase ist frei von Exonuklease-Aktivität, denn diese würde den terminalen Thymidin-Überhang vom Vektor abspalten.

In der folgenden Tabelle sind die Reaktionsbedingungen zusammengefasst:

Reagenz	Konzentration	Volumen in μl für 10 μl Ansatz
Bidest. Wasser	/	1
Puffer	2x	5

T4-DNA-Ligase	3 U/μl	1
pGEM-T-Vektor	55 ng/μl	1
A-tailed PCR-Produkt	/	2

Für eine erfolgreiche Ligation wird der Ansatz gut vermischt. Er wird dann 1 h lang bei Raumtemperatur stehen bevor er über Nacht bei 4°C inkubiert wird.

Im Reaktionsansatz verhindert ein Überschuss an DNA-Fragmenten die Rezirkularisierung des Vektors. Dagegen wirksam ist eine Phosphatase-Behandlung des linearisierten Plasmids, wodurch die 5'-Phosphat-Gruppe abgetrennt wird. Vor der Ligation muss die Phosphatase entfernt werden. Die Größe des zu klonierenden PCR-Produkts liegt zwischen 500 Bp und 2000 Bp.

Danach folgt eine Transformation mit passenden Wirtszellen. *E. coli JM 109* garantieren eine hohe Transformationseffizienz und bieten die Möglichkeit der Selektion des Transformierten (siehe Abschnitt 3.1.6.11.1).

3.1.6.11 Einführung von fremder DNA in Zellen

3.1.6.11.1 Die Transformation

3.1.6.11.1.1 Transformation durch Elektroporation

Dieses Verfahren ermöglicht die Aufnahme fremder DNA in die Bakterienzellen und liefert eine höhere Ausbeute an Transformanten als durch die Hitzeschrittmethod (siehe abschnitt 3.1.6.11.1.2). Die fremde DNA wird über ein Plasmid zugeführt. Für die Transformation müssen die Zellen durch verschiedene Lösungsmittel kompetent gemacht werden. Die Zellwände sollen nur für kurze Zeit durchlässig werden. Die Selektion der transformierten Bakterienzellen erfolgt über die Antibiotikaresistenz, die durch das Plasmid verliehen wird.

200 μl kompetenter Zellen werden in einem Eisbad aufgetaut. Daraus werden 70 μl entnommen und in eine vorgekühlte, in einem Eisbad stehende Transformationsküvette gegeben. Dieser werden 1 bis 15 μl des entsprechenden Plasmids, ungefähr 75 ng, zugesetzt, welches den Zellen die Antibiotikaresistenz verleiht. Anschließend wird die Transformationsküvette in ein vorgekühltes

Transformationsgerät gestellt, wo sie einem Spannungsimpuls ausgesetzt wird, welcher die Transformation verursacht. (Bedingungen: Spannung: 1.25 kV, Kapazität: 25 μ F, Widerstand: 200 Ohm, Zeitkonstante: 4 bis 5 ms).

Nach dem kurzen Spannungsimpuls wird der Inhalt in 1 ml vorgewärmten SOC-Mediums gegossen und 1 h bei 37° C inkubiert.

3.1.6.11.1.2 Die Hitzeschritt-Methode

Diese Methode ist weniger effizient als die Elektroporation, benötigt aber keine besondere Apparatur.

Wirtszellen sollen einen Plasmid-Vektor aufnehmen, der ein beliebiges DNA-Fragment enthält. Die Wirtszellen müssen kompetent sein. Es wurden hoch kompetente Zellen von *E. coli JM 109* verwendet. In einem eisgekühlten Reaktionsgefäß von 1.5 ml Fassungsvermögen werden 1 μ l Plasmidlösung und 50 μ l kompetente Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird die Temperatur genau 45 Sekunden lang auf 42°C erhöht. Dieser Hitzeschock fördert die Aufnahme des Plasmid-Vektors entscheidend. Dann werden die transformierten Zellen 2 min lang auf Eis gelegt. Danach wird 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben, woraufhin 1 h lang bei 37 °C inkubiert wird, damit die Zellen die Antibiotika-Resistenz ausbilden können. Von dieser Bakteriensuspension werden dann 500 μ l auf Agarmedium ausplattiert, das X-Gal und ein für die Selektion des Transformanten geeignetes Antibiotikum enthält. Nach dem Trocknen des Agarmediums wird ÜN bei 37 °C inkubiert.

Dies ermöglicht die Vermehrung des Plasmids, und damit eines beliebigen DNA-Fragments, und gibt – mit Hilfe des verwendeten Antibiotikums – Auskunft über den Transformationsverlauf. Im Weiteren sind unterschiedliche Versuchswege möglich.

Die Blau - Weiß Selektion dient als Kontrollschritt, um zu überprüfen, ob echte positive Klone vorliegen. Das Medium sollte X-Gal enthalten und das in die Zellen eingefügte Plasmid einerseits das Gen, dass den Zellen die Antibiotika-Resistenz verleiht und andererseits die β —Galactosidase. Echte positive Klone enthalten das Plasmid (die Zellen wachsen trotz des Antibiotikums), welches das beliebige DNA-Fragment enthält (weiße Kolonie). Falsche positive Klone hingegen enthalten

beispielsweise nur ein Bruchstück des DNA-Fragments in dem Plasmid oder eine Mutation des CDS.

3.1.6.11.2 Die Transduktion

3.1.6.11.2.1 Transduktion von *E. coli XL1* mit künstlichen Phagen: die *E. coli MRE600* genomische Bibliothek

In einem frischen, sterilen 12 ml-Plastikreaktionsgefäß oder einem 15 ml-Reagenzglas werden – auf Eis – 200 µl frisch vorbereiteter Zellen mit 1 oder 10 µl der verdünnten Phagenlösung gut gemischt. Anschließend erfolgt eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend – evtl. unter leichten Bewegungen des Reaktionsgefäßes – ankern die Phagen an der Bakterienoberfläche. Dann werden 3 ml einer geschmolzenen Top-Agarlösung zugegeben, vermischt und die Mischung auf ein NZY-Agar-Medium ausplattiert. Diese lässt man ungefähr 20 min erstarren und inkubiert daraufhin 8 bis 10 h bei 37°C.

3.1.6.12 Isolierung der Plasmide aus *E. coli JM109* Zellen

Die Plasmid enthaltenden Wirtszellen *E. coli JM109* werden ÜN in 5 ml eines geeigneten flüssigen Mediums gezüchtet. Am folgenden Vormittag werden zwei 2ml-Reaktionsgefäße mit jeweils 2 ml dieser Anzucht aufgefüllt. Dann werden die Zellen bei 4°C und 5000 rpm 1 min lang pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden mit einem Plasmidisolierungskit weiterbehandelt.

Zuerst werden 500 µl der Lösung I des Kits den pelletierten Zellen zugegeben. Wichtig ist, die Zellen nicht zu vortexen, sondern sorgsam zu suspendieren. Daraufhin wird diese Suspension dem zweiten Zellenpellet zugefügt, womit es resuspendiert wird.

Die weiteren Schritte der Isolierung sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

Zugegebene Substanz	Menge in µl	Enthält/zu tun	Reaktion
Lösung II	250	Alkalisches	Lysiert

		Medium, Detergens, RNase	Zellenmembran, zerstört RNA, denaturiert DNA und Proteine
Lösung III	350	Kaliumacetat 1 min stehen lassen und Reaktionsgefäß 4 bis 6 x umdrehen, nicht vortexen	Fällt große Chromosomal-DNA und Proteine aus
Das Präzipitat wird 1 min, bei 4°C, 10000 rpm pelletiert und verworfen. Der Überstand enthält das gewünschte kleine Plasmid (höchstens 15 kBp).			
850 µl des Überstands werden so oft wie nötig auf ein Hibind-Säulchen aufgetragen und 1 min lang bei 4°C und 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird jedes Mal verworfen. Die Plasmid-DNA bindet das Säulchen-Material. Es kann höchstens 25 µg Plasmid binden.			
HB-Puffer	500	13 000 rpm, 4°C, 1 min, Durchfluss entsorgen	Waschschritt, um pufferlösliche Moleküle zu entfernen
DNA-Waschpuffer	750	13 000 rpm, 4°C, 1 min, Durchfluss entsorgen	Waschschritt
Das Säulchen wird 3 min lang bei 4°C, 13 000 rpm zentrifugiert.			Trocknungsschritt
Das Säulchen wird auf ein frisches 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt.			Vorbereitung für die Plasmid-Elution
Bidest. Wasser	100	13 000 rpm, 4°C, 1	Plasmid-Elution

oder TE-Puffer		min	
----------------	--	-----	--

Danach wird ein 10 µl Eluat-Aliquot mit 2.5 µl Elektrophorese-Probepuffer vermischt und eine Elektrophorese mit einem passenden Molekulargewicht-Marker durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.5.8.2.). Dieser Schritt dient zur Überprüfung des Plasmid-Isolierungsablaufs und zur Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt 3.1.6.7.1). Was die Konzentrationsbestimmung angeht, besteht eine Alternative in der Absorptions-Messung bei 260 nm (siehe Abschnitt 3.1.6.7.2).

3.1.6.13 Umgang mit Phagen-Plaques

3.1.6.13.1 Verdünnung künstlicher Phagen: Die E. coli MRE 600 genomische Bibliothek

Die gesamte Arbeit ist unter sterilen Bedingungen durchzuführen. Es werden 10 nummerierte, auf Eis gekühlte 1.5 ml-Reaktionsgefäße mit 450 µl sterilem, gekühltem SM-Puffer aufgefüllt. Die Kühlung ist besonders wichtig für die Bewahrung der Phagenproteinhülle. Dann werden dem ersten Gefäß 50 µl Stammphagenlösung zugegeben und mit der Pipettenspitze sorgfältig mit dem Puffer vermischt. Dieser Schritt ist entscheidend für eine erfolgreiche Verdünnungsreihe. Dann werden dem Gefäß 50 µl entnommen und mit dem Inhalt des jeweils nächsten Gefäßes sorgfältig vermischt, bis man schließlich beim zehnten angekommen ist. Die Stammphagenlösungskonzentration wird also nach jedem Schritt 10-fach verdünnt, insgesamt also um den Faktor 10^{10} .

3.1.6.13.2 Vorbereitung einer digoxigeninmarkierten DNA-Sonde

3.1.6.13.3 Hybridisierung von Plaques auf Agarplatten mit einer digoxigeninmarkierten Sonde

Digoxigenin ist ein steroides Hapten. Ein dUTP wird mittels einer alkali-labilen Ester-Bindung mit Digoxigenin markiert. Es entsteht dig-11-dUTP. Der Vorteil besteht sowohl darin, dass, obwohl es sich nicht um eine radioaktive Markierung handelt, die Grenzdetektion bei 1 µg DNA liegt, als auch darin, dass es beim Kochen einfach ist, das Dig-11-dUTP zu denaturieren, und dadurch einen erneuten Hybridisierungsversuch mit einer anderen Sonde durchzuführen.

Die Plaque-Hybridisierung ermöglicht die Lokalisierung eines beliebigen DNA-Fragments auf einer Agarplatte mit einer geeigneten DNA-Sonde, die komplementär zu dem zu untersuchenden DNA-Fragment ist.

Die Länge der digoxigeninmarkierten Sonden sollte zwischen 200 und 1000 Basen betragen, im Folgenden wird jedoch mit Sonden einer Länge von 100 Basen gearbeitet. Die Membran sollte 5 mm Abstand zum Rand der Petrischale haben, von der ein Abdruck gemacht wird.

Die Plaques darin sollten genügend Abstand voneinander und einen minimalen Durchmesser von 1 mm haben. Der Abdruck wird auf einer Nylon-membran gemacht, die dann gemäß der folgenden Tabelle behandelt wird. Diese wird vollständig mit den unterschiedlichen Lösungen bedeckt und in Schalen, in eingeschweißten Tüten oder in Hybridisierungsrohren behandelt. Bei jedem Schritt wird leicht geschüttelt. Die verwendeten Reagenzmengen sind von der Größe der Membran und des Behälters abhängig. Es wurden zwei unterschiedliche Membrangrößen benutzt: 150 mm und 90 mm Durchmesser. Zur Identifikation relevanter Plaques sind Membran und Petrischale entsprechend zu kennzeichnen.

Der praktische Ablauf ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Reagenz	Konzentration	Dauer in min	Effekt
NaCl/NaOH	1.5 M/0.5 M	5	Denaturierung
NaCl	1.5 M	5	Neutralisierung
NAOH	0.5 M	5	Neutralisierung
SSC	2x	15	
Die Membran wird bei 120 °C inkubiert		20	DNA-Fixierung
Die Membran ist in diese Zustand lagerfähig.			
Vorgewärmte Blockierungslösung 37 bis 42°C	Fertig gekauft	30	Blockierung der freien Stellen der Nylonmembran

Hybridisierungslösung	5 bis 25 ng DNA vorbereitete Sonde 3.5 ml/100 cm ⁻² Nylonmembran Hybridisierungslösung	240 bis ÜN	Hybridisierung
SSC/SDS	2x/0.1 %	2 x 5	Überflüssige Sonde wegspülen und Stringenz erhöhen
SSC/SDS	0.2 x/0.1 %	2 x 15	Idem
SSC/SDS	0.5 x/0.1 %		Idem
Dig-Puffer 1/TWEEN	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	1	Detektion vorbereiten
Dig-Puffer 2	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	30	Detektion vorbereiten
Detektionslösung	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	30	Anti-Dig AK erkennt Digoxigenin bzw. DNA Sonde bzw. gewünschtes DNA-Fragment
Dig-Puffer 1/ oder Dig Puffer 1/TWEEN	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	20 oder 2 x 15	Überflüssige Anti- dig-AK wegspülen
Dig-Puffer 3/oder Dig- Puffer 3 MgCl	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	2	Detektion vorbereiten
Färbelösung in Dunkel durzuführen	siehe Abschnitt 3.1.3.3.10	Paar min bis 16 h	Ausfall von NBT BCIP

Dig-Puffer Wasser	4 oder	siehe 3.1.3.3.10	Abschnitt 5	Stoppt die Farbreaktion
----------------------	--------	---------------------	----------------	-------------------------------

Dann wird ein Abbild erstellt. Die Membran kann für „Stripping“ und Detektion mit einer anderen DNA-Sonde wieder verwendet, aufbewahrt oder einfach entsorgt werden.

3.1.6.13.4 Isolierung einer Plaque

Mit Hilfe der Kennzeichnung der Agarplatte kann über den Vergleich mit der Nylonmembran die relevante Phagenplaque lokalisiert werden. Diese wird dann mit einer umgedrehten gelben 200 µl-Spitze aus der Agarplatte herausgeschnitten und in eine SM-Lösung gegeben. Diese wird zur Isolierung der Phagen und deren Vermehrung weiterverwendet.

3.1.6.14 Umgang mit tRNA

3.1.6.14.1 Isolierung der gesamte tRNA aus *E. coli* MRE600 Zellen

Zunächst werden 200 ml *E coli* MRE 600 gezüchtet. (siehe Abschnitt 3.1.4.4.). Die Zellen werden in 20 ml TE-Puffer resuspendiert. Dann wird die gesamte tRNA so isoliert, wie es in der folgenden Tabelle zusammengefasst ist:

Reagenz	Konzentration	Menge in ml	Dauer in min	Effekt
Lysozym-Lösung	5 mg.ml	20	30	Lyse der Zellmembran
NaOH/SDS	0.2 M/ 1 %	40	5, auf Eis	Lyse der Zellmembran, Myzel-Bildung
KAc	3 M	30	30, auf Eis	Ausfall von chromosomaler DNA und Proteinen

Isopropanol	100 %	90	ÜN, - 20 °C	
UZ, bei 28 000 rpm, bei 4 °C. Das Pellet wird entsorgt. Das ÜS Volumen beträgt ungefähr 100 ml.			60	Reinigungsschritt
RNAse-freies bidest. Wasser	/	4 bis 7	/	Verdünnungsschritt

Man hat nun eine tRNA-Mischung isoliert. Das anschließende Verfahren dient der Isolierung der relevanten tRNA. Es folgt dann ein RP18-chromatographisches Trennverfahren. (siehe Abschnitt 3.1.6.14.4.).

3.1.6.14.2 tRNA-Mengenbestimmung

Zur Durchführung eines tRNA-Verdaus ist es erforderlich, die Menge der vorliegenden tRNA genau zu kennen.

Die tRNA-Menge wird photospektrometrisch bestimmt, indem die Absorption bei 260 nm gemessen wird. Man weiß, dass eine Absorption von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

Ein Verhältnis von A_{260}/A_{280} von 2 lässt auf eine reine Probe schließen.

3.1.6.14.3 tRNA Verdau

tRNA-Dephosphorylierung mit BAP und tRNA-Verdau mit Nuklease P1

Ziel ist, die tRNA Mischung zu verdauen. Es entstehen Nukleoside. In der folgenden Tabelle sind die Verdau-Bedingungen dargestellt:

Reagenz	Konzentration	Menge in µl	Kommentare
RNAse frei bidest. Wasser	/	12	
tRNA	Ingesamt 400 µg	8	Je nach Konzentration

ZnSO ₄	20 mM, pH 5.3	2	Optimal für Nuklease-P1-Verdau
Nuklease P1	1 mg.ml	10	
Ansatz wird bei 55°C 1 bis 1,5 h inkubiert.			
Tris	0.5 M, pH 7.9	15 µl	pH-Wertänderung auf pH 7.9, optimal für BAP-Verdau
BAP	1U/µl	2	
Ansatz wird bei 60 °C 1 bis 1,5 h inkubiert.			

Dann werden die Enzyme aus dem Ansatz entfernt. Dies geschieht folgendermaßen: Der Ansatz wird in ein Microcon gegeben und bei 9 000 rpm, 4°C, 99 min zentrifugiert. Die Enzyme werden im Microcon mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa abgesondert und der Durchfluss, der die Nukleoside enthält, wird weiter verarbeitet.

3.1.6.14.4 Chromatographische Trennungen

3.1.6.14.4.1 Isolierung der oQ enthaltene-tRNA^{tyr} aus einer tRNA Mischung

Ein Weg zu überprüfen, ob das richtige Substrat synthetisiert worden ist, ist es, das natürliche Substrat aus *E. coli* zu isolieren und als Referenz, für das chemisch synthetisierte Substrat zu verwenden. Es steht fest, dass *E. coli* MRE600 eine große Anteil an oQ enthaltene tRNAs^{Tyr, Asp, Asn} enthält.

Unten folgen die chromatographischen Experimentbedingungen.

Verfahren	FPLC
------------------	-------------

Säule	Benzoylated-DEAE-Cellulose
Dimension der Säule	26 x 400 mm/ ungefähr 160 ml
Fluß	1.5 ml/min
Detektion erfolgt bei	260 nm
Equilibrierungspuffer	50 mM CH ₃ COONa pH 5 10 mM MgCl ₂ 400 mM NaCl
Startpuffer A	1l 1.1 M NaCl
Endpuffer B	300 ml 50 mM CH ₃ COONa pH 5 10 mM MgCl ₂ 1.1 M NaCl 9,5 % (v/v) Ethanol

3.1.6.14.4.2 Isolierung der oQ aus einer Nukleosiden-Mischung

Ziel ist die Isolierung von oQ aus tRNA^{tyr, Asp, Asn}. Dies wird durch Verdau der tRNA-Mischung und Dephosphorylierung der Nukleotide erreicht. (siehe Abschnitt 3.1.6.14.3.). Dann werden die Nukleoside voneinander getrennt. Die Auftrennungsbedingungen stehen in der folgenden Tabelle:

Verfahren	HPLC
------------------	-------------

Säule	Supelcosil-RP18
Volumina der gesamten aufgetragenen Probe	4 ml
Volumina der aufgetragenen Probe pro Lauf	100 bis 150 µl
Maximaler Druck	350 Bar
Minimaler Druck	10 Bar
Fluss	1 ml/min
Laufdauer	40 min
Elutionsspuffer	A: MOPS 50 mM pH 7 EtOH 15 %
	B: MOPS 50 mM pH 7 EtOH 15 % NaCl 0.75 M
Gradient	0→2 min 100 % A 2→12 min 0→25 % B 12→20 min 25→58 % B 20→23 min 58→61 % B 23→27 min 61→100 % B 27→38 min 100 % B
Säulenreinigungspuffer	MOPS 50 mM pH 7 EtOH 15 % NaCl 2 M bidest. Wasser
Säulenlagerungspuffer	MeOH 100 %

Die Absorption wird bei 222, 254 und 270 nm gemessen.

4 Ergebnisse

Das Ziel ist es, mittels der Affinität für Cobalamin, dem putativen Epoxyqueuosin-Reduktase-Cofaktor, das Enzym zu isolieren. Es wurde eine Strategie entwickelt, die auf der putativen Affinität des Cofaktors Cobalamin für die putative Epoxyqueuosin-Reduktase basiert.

Das erste Verfahren basierte auf radioaktiv markiertem [^{57}Co].

Das zweite Verfahren basierte auf einem Antikörper, der gegen das Cobalamin gerichtet ist.

Das dritte Verfahren beruhte auf einem bekannten Cobalaminbindungsmotiv.

Das vierte Verfahren basierte auf Agarose - Cobalamin- K ugelchen

Um das dritte und vierte Verfahren zu ergänzen, wurden Bioinformatik-Applikationen verwendet. Diese Bioinformatik-Applikationen erbrachten interessante Ergebnisse.

4.1 [^{57}Co] Cobalamin-Protein-Komplex

Die in diesem Versuch proteinchemischer Arbeit diente der Reinigung des gesuchten Enzym-Cobalamin-Komplexes. Hierzu kamen Methoden der Chromatographie zum Einsatz. Die Aufreinigung wurde durch die Markierung des in enthaltenen Cobalamin mit radioaktivem Kobalt vereinfacht, da hierbei der [^{57}Co]-markierten Fraktion gefolgt werden konnte.

4.1.1 Verlauf der Versuche

Für die Versuche, die in den folgenden Abschnitten beschrieben sind, wurden Gelfiltrationssäulen verwendet, um fremde Proteine und Moleküle abzutrennen, und Anionenaustauscher dienten der Absonderung von DNA und RNA. Um das Volumen für die Gelfiltrationssäule klein zu halten, wurde hierbei zunächst das Protein mit Hilfe von Rührzellen oder von Zentricongef ssen aufkonzentriert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration standen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei sich die Methode von Warburg und Christian als besonders schnell herausstellte. Abschließend wurde eine Auftrennung mit Hilfe des Native-PAGE Verfahrens durchgeführt.

Zur Auftrennung wurden zwei Gelfiltrationssäulen und ein Anionenaustauscher verwendet. Bei den Gelfiltrationssäulen erfolgt eine isokratische Trennung nach Molekulargewicht. Es wurden in kurzen Zeitintervallen (ein bis zwei min) Fraktionen gesammelt. Von den Fraktionen wurden 100 µl bzw. 200 µl abgetrennt und deren durch das [⁵⁷Co] hervorgerufene Radioaktivität gemessen. Die gesammelten Fraktionen wurden sofort auf Eis gekühlt, da Proteine sehr temperaturempfindlich sein können. Um die Fraktionen vor Sauerstoff zu schützen, wurden sie für das weitere Vorgehen sofort wieder vereint.

Es wurden zwei Verfahren angewendet, die auf HPLC und FPLC Gelfiltrationschromatographie basieren. Das erste Verfahren erlaubte die Trennung von kleinen Mengen, die FPLC hingegen ermöglichte die Behandlung von größeren Mengen.

Die Zellen wurden für beide Verfahren gemäß Abschnitt 3.1.4.6. angezogen, dann gemäß Abschnitt 3.1.4.8. aufgeschlossen.

4.1.2 Erster Reinigungsprozess

4.1.2.1 *Erste Gelfiltrationschromatographie*

Für die Gelfiltration wurde die Säule Biosep SEC S 2000 gemäß Abschnitt 3.1.5.1 verwendet und 100 x 100 µl aufgetragen. Die folgende Abbildung zeigt die Elutionsprofile einer 100 µl-Probe bei verschiedenen Wellenlängen (280 nm, 360 nm und 430 nm). Die Ordinate zeigt die Absorption der Proteine und des Cobalamins, die Abszisse die Elutionszeit in min. Alle anderen 100 Durchläufe sind ähnlich.

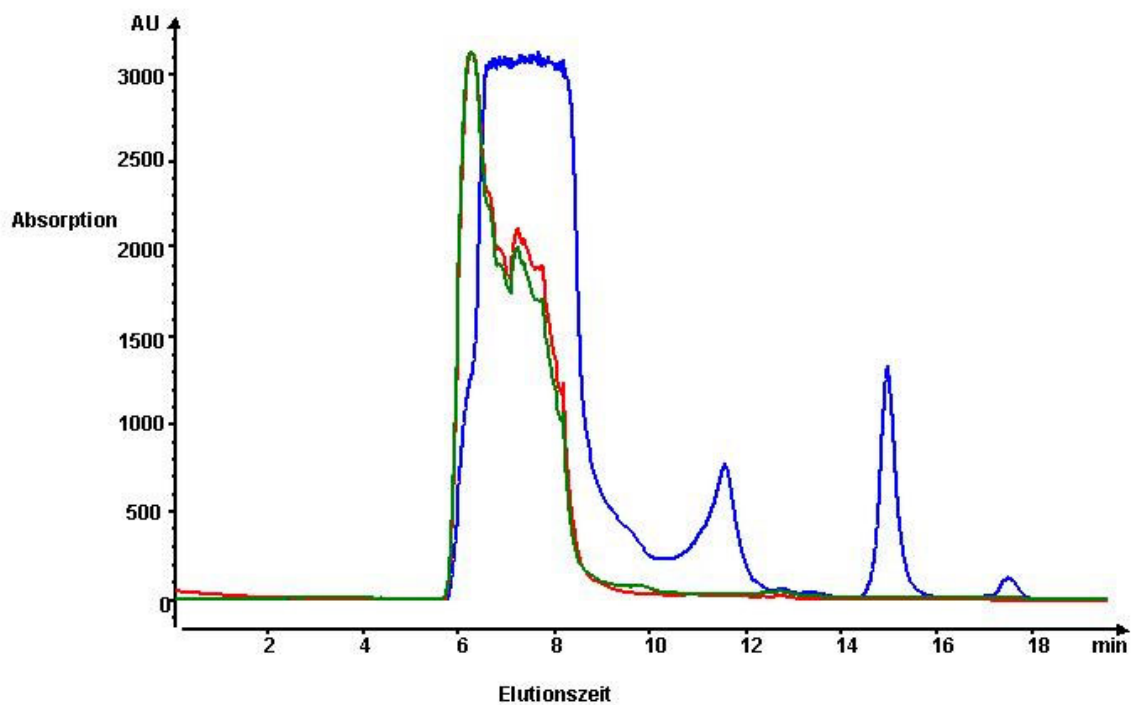


Abb. 4-1: Elutionsprofil der HPLC-Gelfiltrationschromatographie von 100 μ l Proteinsrohaufschluss. Absorption der Proteine bei 280 nm (rot) und Cobalamin bei 360 nm (blau) bei 430 nm (grün) in Absorptionseinheiten (AU), als Funktion der Zeit in min.

Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Absorption der Proteine bei 280 nm und der Absorption des Cobalamins bei 360 nm und 430 nm ist im Diagramm zwischen 5 und 9 min deutlich zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass es sich um einen Protein-Cobalamin-Komplex handelt.

Die untenstehende Abbildung (Abb.4-2) zeigt die Radioaktivität des [^{57}Co] in cpm als Funktion der Elutionszeit in min und gibt daher Auskunft über die Konzentration des [^{57}Co] (siehe Abschnitt 3.1.5.6.1).

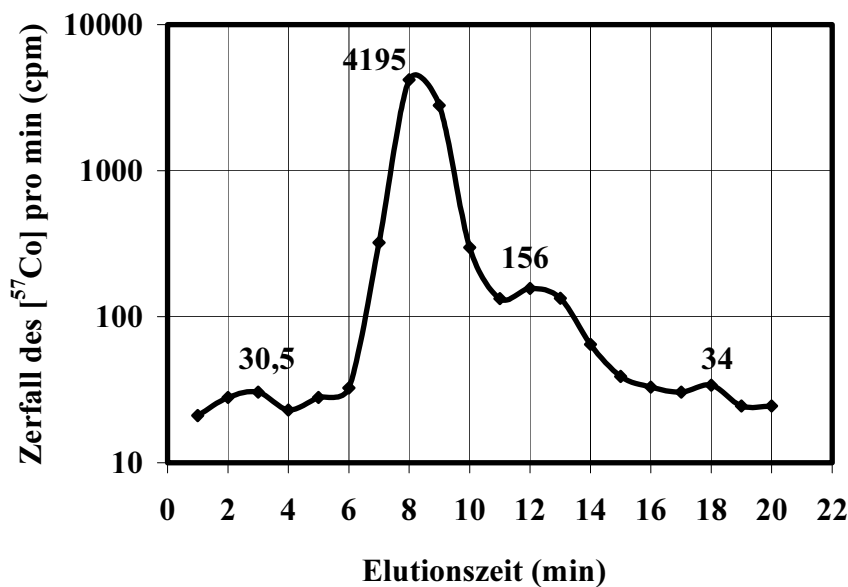


Abb. 4-2: Elutionsprofil der HPLC-Gelfiltrationschromatographie der ^{57}Co enthaltenden in 200 μl entnommenen Probe der gesammelten 1 ml Fraktionen (siehe 4-1). Darstellung des ^{57}Co -Zerfalls in cpm als Funktion der Zeit in min.

Man sieht zwei radioaktive Elutionspeaks, einen zwischen 6 und 10 min und einen weiteren, wesentlich schwächeren, zwischen 11 und 14 min. Im Folgenden wird nur mit dem Hauptpeak weitergearbeitet, da in den während des zweiten Peaks gesammelten Fraktionen nicht genügend ^{57}Co enthalten ist. Die Elutionszeit des ^{57}Co zeigt denselben zeitlichen Zusammenhang wie die Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie.

4.1.2.2 Zweite Gelfiltrationschromatographie

Die Probe wird gemäß Abschnitt 3.1.5.2 mit Hilfe von Centrifongefäßen von 56 ml gesammelter Proteinlösung auf 900 μl aufkonzentriert. Anschließend werden je 100 μl der Lösung zentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4°C) und auf die Säule aufgetragen.

Die folgende Abbildung (Abb. 4-3) zeigt die Elutionsprofile einer 100 μl Probe bei verschiedenen Wellenlängen (280 nm, 360 nm und 530 nm). Die Ordinate

repräsentiert die Absorption der Proteine und des Cobalamins, die Abszisse die Elutionszeit in min.

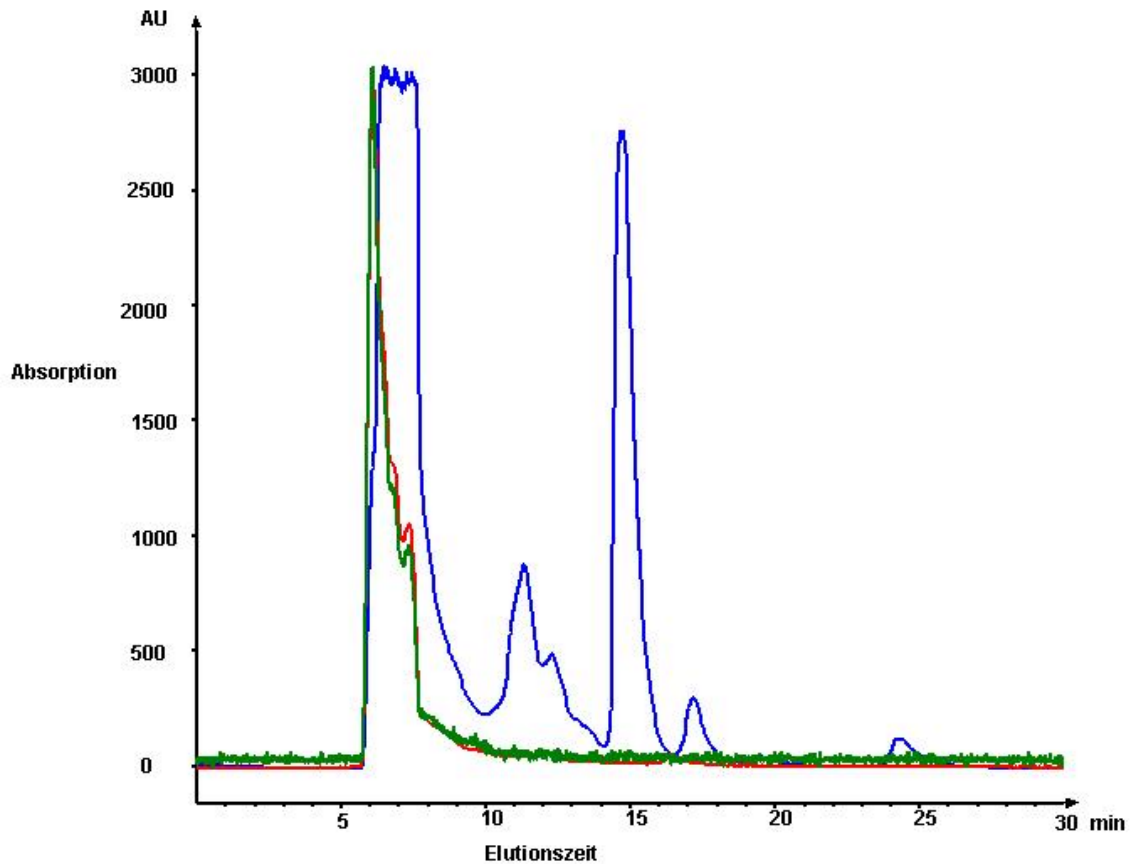


Abb. 4-3: Elutionsprofil der HPLC-Anionenaustauschchromatographie der auf 8 ml aufkonzentrierten, am stärksten radioaktiven Proteinlösungsfraktionen (eluiert zwischen 6 und 10 min, Abb. 4-1). Absorption der Proteine bei 280 nm und des Cobalamins bei 360 nm (blau) bei 430 nm (grün) in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min.

Das Vorgehen entspricht der vorherigen Gelfiltrationschromatographie, nun wurden den 1 ml-Fractionen jedoch 200 µl entnommen und nach $[^{57}\text{Co}]$ untersucht (siehe Abschnitt 3.1.5.6.1.).

Die folgende Abbildung (Abb. 4-4) zeigt die Radioaktivität des $[^{57}\text{Co}]$ als Funktion der Elutionszeit und gibt daher Auskunft über die Konzentration des $[^{57}\text{Co}]$.

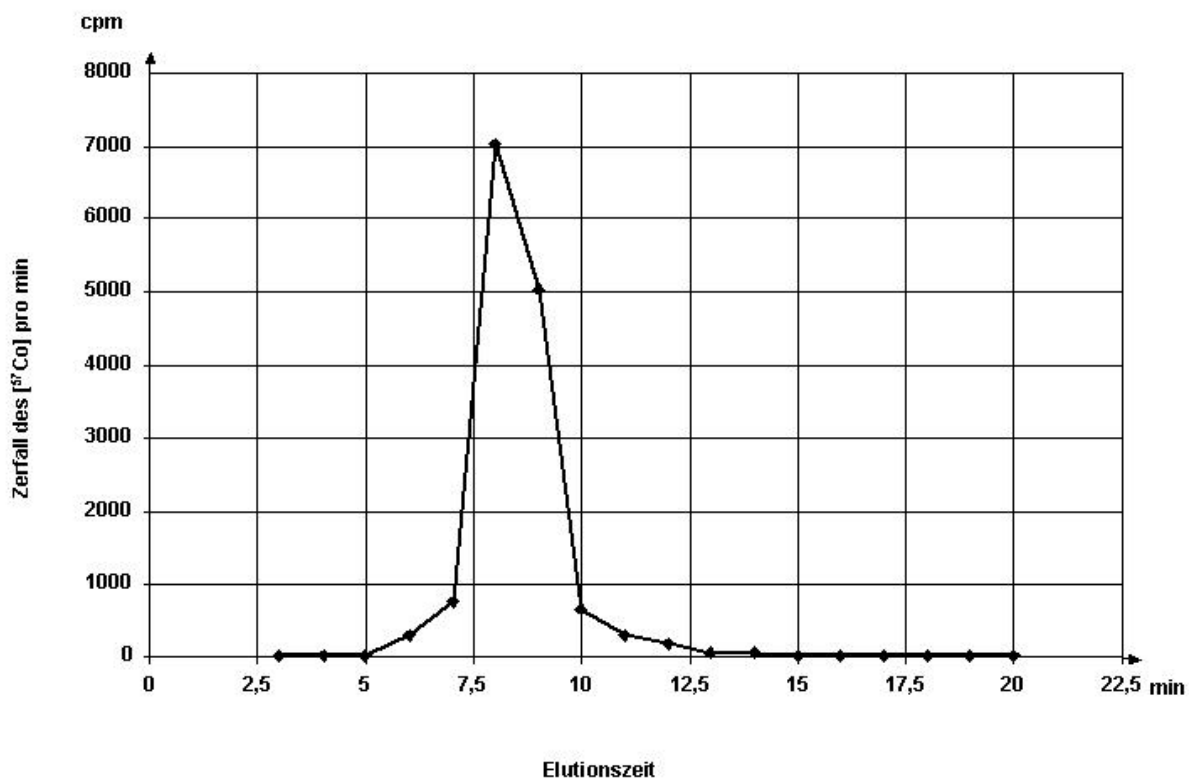


Abb. 4-4: Elutionsprofil der HPLC-Anionenaustauschchromatographie der ^{57}Co -enthaltenden in 200 μl entnommenen Probe der gesammelten 1 ml Fraktionen (siehe 4-3). Darstellung des ^{57}Co -Zerfalls in cpm als Funktion der Zeit in min.

Der zeitliche Zusammenhang ist erneut derselbe wie zuvor. Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Absorption der Proteine bei 280 nm und der Absorption des Cobalamin bei 360 nm und 430 nm ist im Diagramm deutlich zu erkennen.

Alle radioaktiven Fraktionen wurden mit Hilfe von Centrifongefäßen auf 8 ml aufkonzentriert (siehe Abschnitt 3.1.5.6.1.)

4.1.2.3 Anionenaustausch-FPLC

In der folgenden Abbildung (Abb.4-5) ist die Absorption der Proteine für 280 nm als Funktion der Zeit (min) dargestellt. Die Methode ist in Abschnitt 3.1.5.6.1 beschrieben.

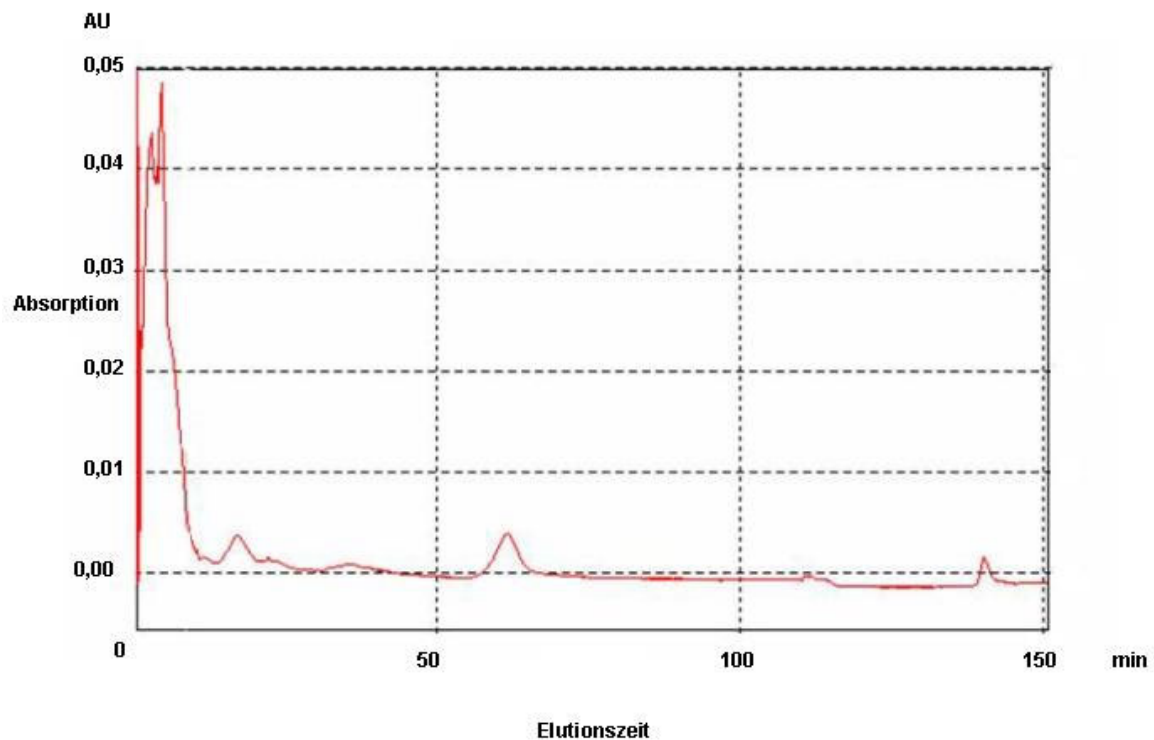


Abb. 4-5: Elutionsprofil der FPLC-Anionenaustauschchromatographie der auf 8 ml gelfiltrationschromatographiegereinigten, aufkonzentrierten, am stärksten radioaktiven Proteinslösungsfraktionen (eluiert zwischen 5 und 12 min. Abb. 4-4). Absorption der Proteine bei 280 nm in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min.

Nach diesem Durchlauf wurden den gesammelten Fraktionen (6 ml) 200 µl entnommen und mit 10 ml Lumisafe-Lösung verdünnt. In einem Scintillationszähler wurde die Radioaktivität dieser verdünnten Proben gemessen (siehe Abschnitt 3.1.5.6.1.).

Die folgende Abbildung (Abb. 4-6) zeigt erneut die Radioaktivität des $[^{57}\text{Co}]$ als Funktion der Elutionszeit und gibt Auskunft über die Konzentration des $[^{57}\text{Co}]$.

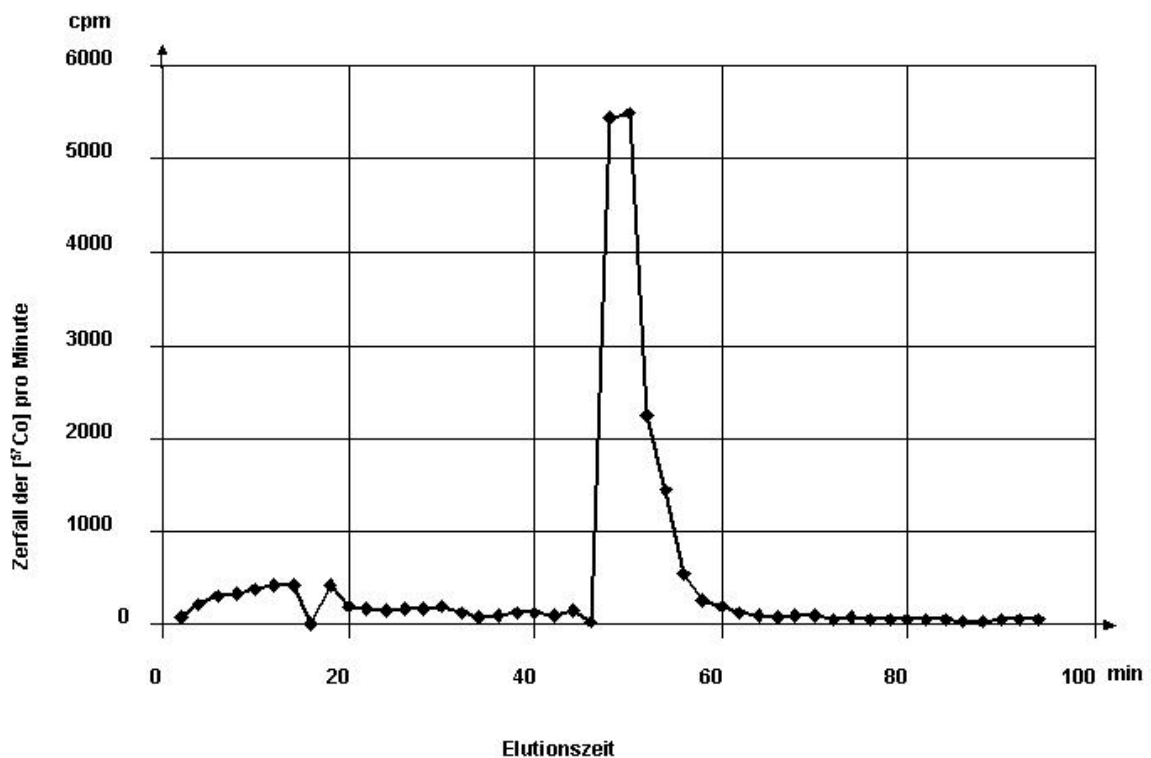


Abb. 4-6: Elutionsprofil der FPLC-Anionenaustauschchromatographie der ^{57}Co enthaltenden in 200 μl entnommenen Probe der gesammelten 6 ml-Fractionen (siehe 4-5). Darstellung des ^{57}Co Zerfalls in cpm als Funktion der Zeit in min.

Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht von den vorherigen. Der zeitliche Zusammenhang zwischen den Proteinen und ^{57}Co weist auf einen Cobalamin-Protein-Komplex hin. Die radioaktiven Fraktionen wurden gesammelt und eingengt (siehe 3.1.5.7.).

4.1.2.4 Nativ-PAGE-Verfahren

Die Probe ist unrein (siehe 3.1.5.8.1), obwohl viele Reinigungsstufen durchgeführt wurden. Es wird deshalb ein zweiter kurzer Reinigungsprozess ausprobiert.

4.1.3 Zweiter Reinigungsprozess

Die Zellen werden wie bei dem ersten Reinigungsprozess angezogen (siehe 3.1.4.6) und aufgeschlossen (siehe 3.1.4.8). In diesem Fall wurden eine Biosep SEC S 3000

Gelfiltrationssäule und wieder ein Anionenaustauscher verwendet, wobei hier 4 x 6 ml aufgetragen wurden.

4.1.3.1 Gelfiltrationschromatographie

Die Methode ist in 3.1.5.2 beschrieben. Die folgenden Abbildungen zeigen die Elutionsprofile einer 6 ml-Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Ordinate repräsentiert die Absorption der Proteine, die Abszisse die Elutionszeit in min. (Abb. 4-7).

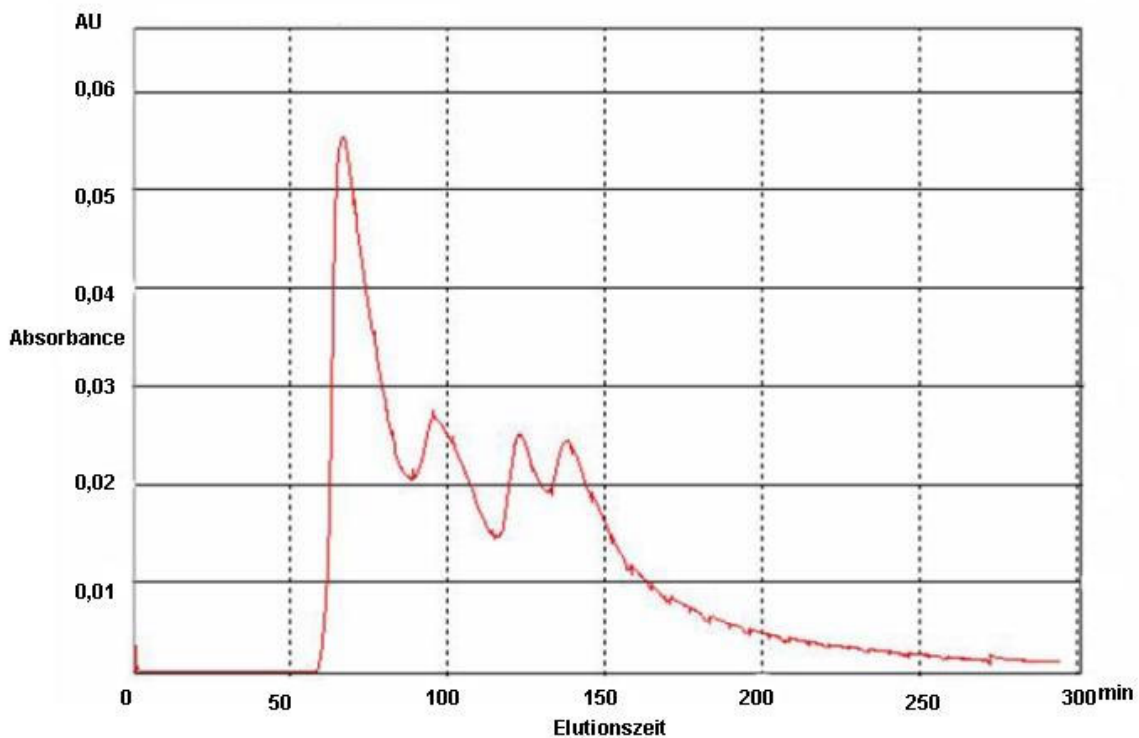


Abb. 4-7: Elutionsprofil der FPLC-Gelfiltrationschromatographie der 6 ml Proteinrohaufschluss. Absorption der Proteine bei 280 nm (rot) und des Cobalamins bei 360 nm (blau) und bei 430 nm (grün) in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min.

Nach jedem Durchlauf wurden jeder gesammelten Fraktion (4.5 ml) 100 µl entnommen und auf Radioaktivität des [⁵⁷Co] untersucht (siehe 3.1.5.6.1.).

Die folgende Abbildung zeigt die Radioaktivität von $[^{57}\text{Co}]$ als Funktion der Elutionszeit und (Abb 4-8.) gibt daher Auskunft über die Konzentration von $[^{57}\text{Co}]$.

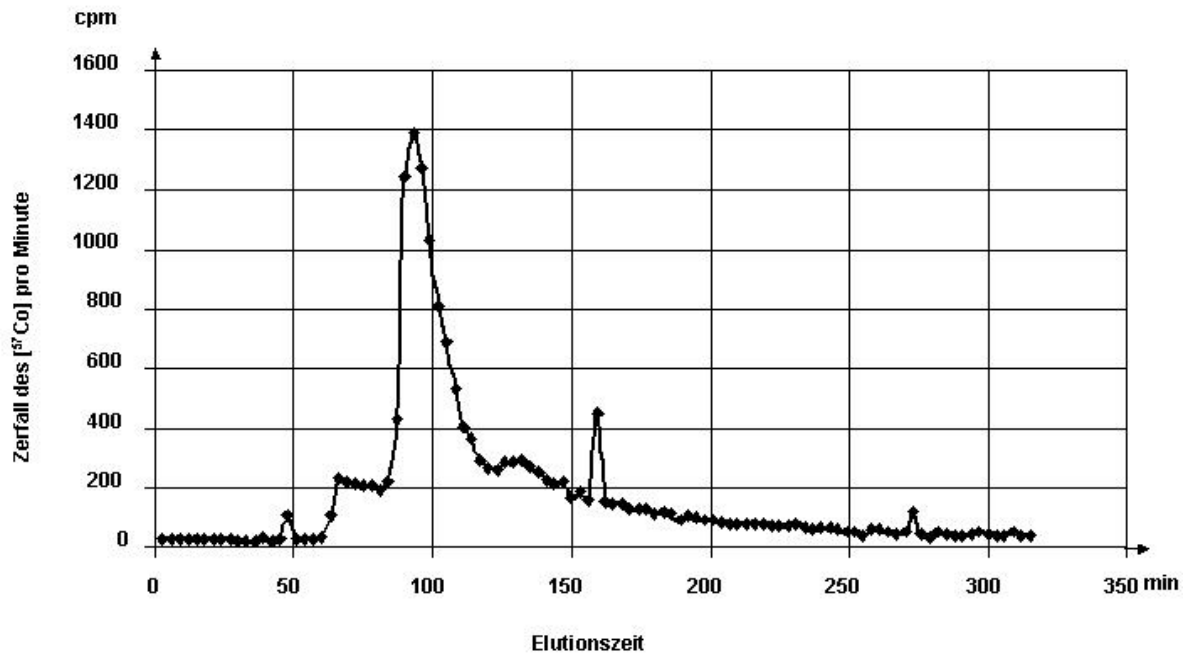


Abb. 4-8: Elutionsprofil der FPLC-Gelfiltrationschromatographie der $[^{57}\text{Co}]$ enthaltenden aus 100 μl entnommenen Probe der gesammelten 4.5 ml Fraktionen (siehe 4-7). Darstellung des $[^{57}\text{Co}]$ Zerfalls in cpm als Funktion der Zeit in min.

Die Ergebnisse entsprechen den vorherigen (siehe 6.1.1.1). Zur weiteren Aufreinigung wird die Proteinprobe auf einen Anionenaustauscher aufgetragen.

4.1.3.2 Anionenaustauscher

Die Methode ist in 3.1.5.3. beschrieben. Die folgende Abbildung zeigt die Absorption der Proteine bei 280 nm als Funktion der Elutionszeit in min.

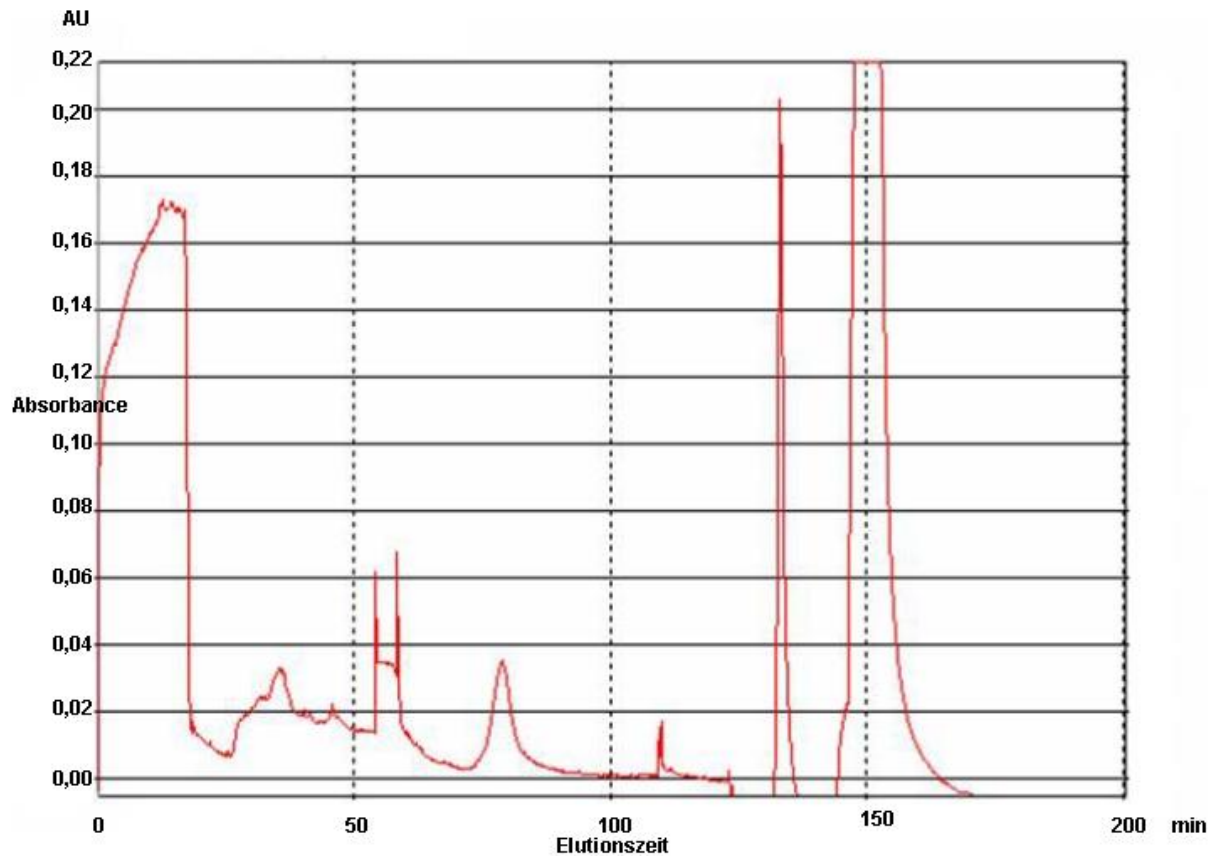


Abb. 4-9: Elutionsprofil der FPLC-Anionenaustauschchromatographie der auf 8 ml gelfiltrationschromatographiegereinigten, aufkonzentrierten, am stärksten radioaktiven Proteinslösungsfraktion (eluiert zwischen 50 und 150 min, Abb. 4-8). Absorption der Proteine bei 280 nm in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min.

Die folgende Abbildung (Abb. 4-10) zeigt die Radioaktivität von [^{57}Co] über der Elutionszeit und gibt daher Auskunft über die Konzentration von [^{57}Co] (siehe 3.1.5.6.1).

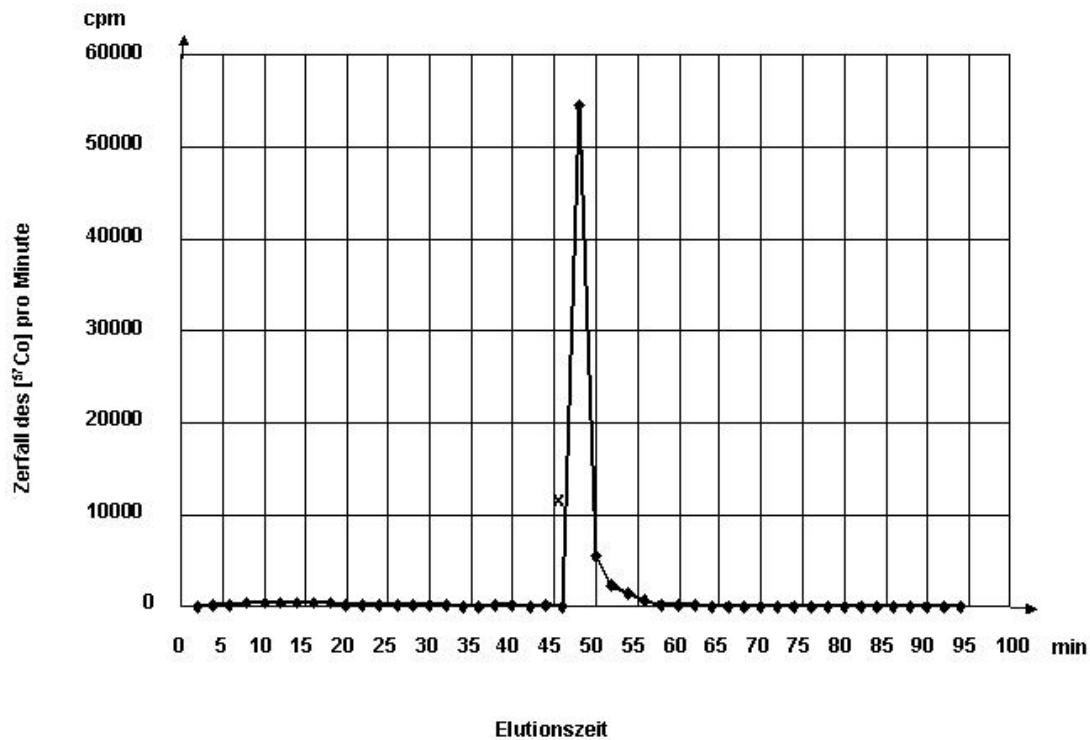


Abb. 4-10: Elutionsprofil der FPLC-Anionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 4-9) der [⁵⁷Co] enthaltenden aus 200 µl entnommenen Probe der gesammelten 4.5 ml Fraktionen. Darstellung des [⁵⁷Co] Zerfalls in cpm als Funktion der Zeit in min.

Die Ergebnisse stimmen erneut mit den vorherigen überein (siehe 4.1.2.1). Die radioaktiven Fraktionen wurden gesammelt und aufkonzentriert.

4.1.3.3 *Nativ-PAGE-Verfahren*

Hierzu wurde in die Gel-Taschen Proteinlösung mit 10.000 bis 20.000 cpm [⁵⁷Co] pro Probe aufgetragen (optimale Bedingungen für die Radioaktivitätsmessung).

Bei der ersten Probe wurden 20 µl einer Konzentration von 7 µg/µl aufgetragen, was einem Wert von 7150 cpm entspricht bei der zweiten 6 µl einer Konzentration von 8 µg/µl (10.000 cpm). Die Konzentration der Proben wurde mit der Lowry-Methode ermittelt. Die Methode ist im Abschnitt 3.1.5.11.2 und die Radioaktivitätsmessungen im Abschnitt 3.1.5.6.1 beschrieben.

Schon nach der Silberfärbung kann man aufgrund der vielen Banden sehen, dass trotz der unterschiedlichen „Reinigungsstufen“ die Proben noch zu unrein sind (Abb. 4-11, links). Das Gel wird vorsichtig getrocknet. Wenn das Gel trocken ist, wird es gescannt und die Radioaktivität des [^{57}Co] gemessen (Abb. 4-11, recht), um die radioaktiven Banden, die den Enzym-Cobalamin-Komplex enthalten, zu identifizieren. Die Methode ist im Abschnitt 3.1.5.6.2 beschrieben. Die Untersuchung der Radioaktivität zeigt folgende Ergebnisse:

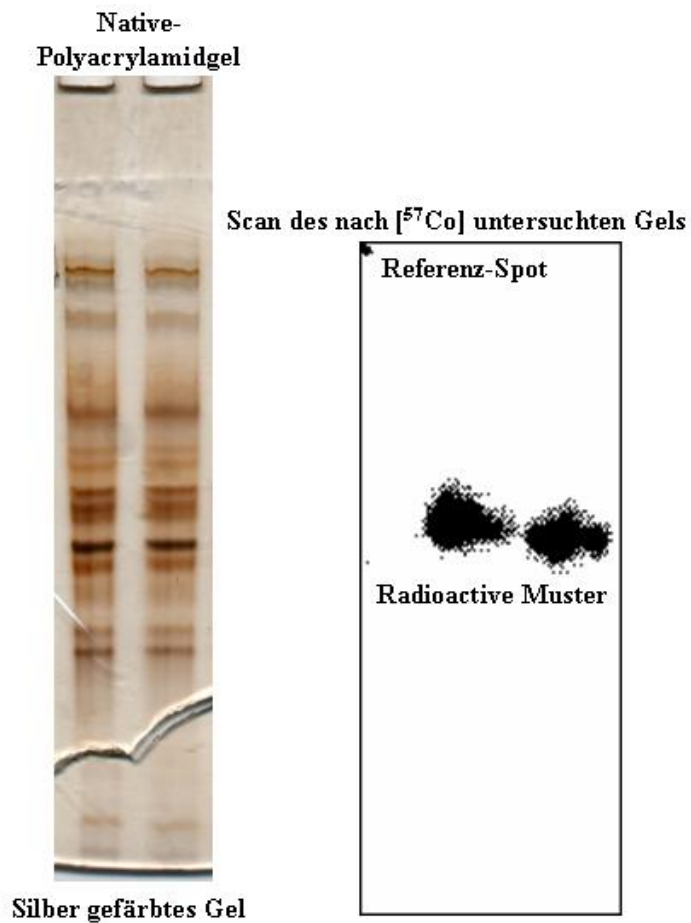


Abb. 4-11, links: silbergefärbtes Polyacrylamidgel einer durch Gelfiltration- und Anionenaustausch-Chromatographie gereinigten, aufkonzentrierten, am meisten radioaktiven Proteinlösungsfraktion (eluiert zwischen 45 und 55 min., Abb. 4-10).

Rechts: Dasselbe silbergefärbte Polyacrylamidgel getrocknet und auf [^{57}Co] untersucht.

Da der radioaktive Bereich mehrere Banden abdeckt, ist es schwierig, den gesuchten Bereich von den anderen zu unterscheiden.

Die silbergefärbten [⁵⁷Co] Cobalamin-Proteinbanden wurden ausgeschnitten und auf [⁵⁷Co] untersucht. Es wurde keine Radioaktivität detektiert.

Ermutigend ist es, festzustellen, dass die Affinität für Cobalamin einen geeigneten Weg darstellt, einen stabilen Cobalamin-Protein-Komplex zu isolieren. Infolgedessen wird mit einem Antikörper gegen Cobalamin weitergearbeitet. Dies führt uns zu dem zweiten Teil der Doktorarbeit:

4.2 Immunoblotting mit Antikörpern gegen Cobalamin

Der Ziel ist mittels Antikörper gegen Cobalamin gerichtet ein Cobalamin-Protein-Komplex auf ein Nitrocellulose oder PVDF Membrane zu detektieren.

4.2.1 Verlauf der Versuche

Mit dieser Versuchsreihe wurden die B₁₂-Protein-Komplexe mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierzu wurde ein Immunoblotting mit Antikörpern gegen Cobalamin durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die Zellen wurden gemäß 3.1.4.5 ohne radioaktives Cobalamin 3 bis 5 h angezogen; dann wurden die Zellen gemäß 3.1.4.8 aufgeschlossen.

Erst erfolgte eine Anionenaustausch-FPLC, um die DNA des Protein-Rohextraktes abzutrennen. Während der Proteinelution wurden die Proteine in sieben unterschiedlichen Fraktionen nach Ladung aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen kam erst ein Überschuss an aufgetragenem Proteinrohauflschluss und positiv-neutrale-geladenen Proteinen, dann folgten die schwach negativ geladenen Proteine, und anschließend die stark negativ geladenen Proteine. Anschließend wurden die sieben Protein-Fraktionen konzentriert.

Dann wurden zwei SDS- und zwei Native-PAGE durchgeführt, wobei jeweils ein Gel mit Coomassieblau gefärbt wurde und ein Gel für die Immunodetektion auf eine Membran transferiert wurde.

4.2.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Methode ist in 3.1.5.3 beschrieben. Unten folgt das Elutionsprofil:

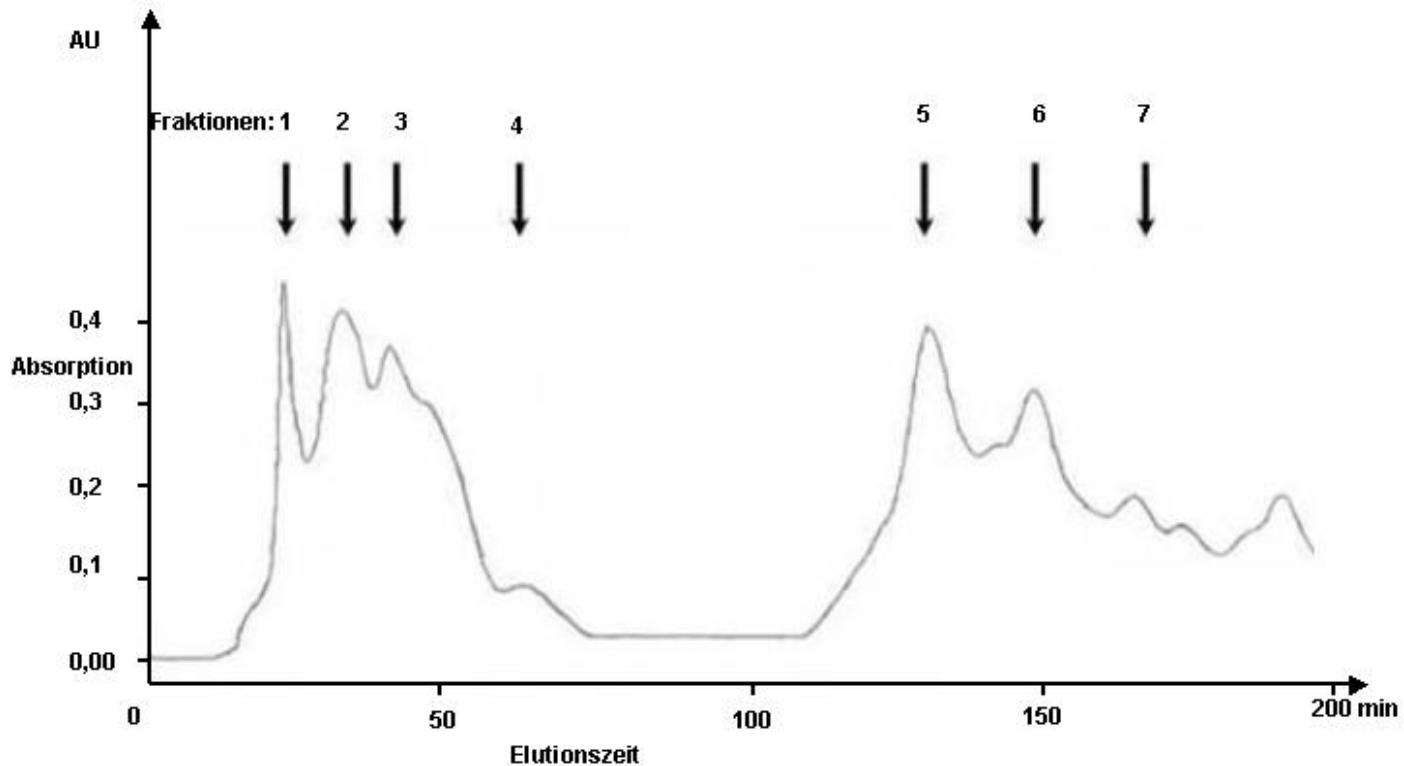


Abb. 4-12: Elutionsprofil der FPLC-Anionenaustauschchromatographie eines Proteinrohaufschlusses. Absorption der Proteine bei 280 nm in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min.

Von links nach rechts: Fraktion: 1,2,3,4,5,6,7.

4.2.3 PAGE und Immunoblot

Die sieben Protein-Fraktionen werden konzentriert, wie in 3.1.5.7 beschrieben ist.

Dann werden zwei SDS- und zwei Native-PAGE durchgeführt, wie in Abschnitt 3.1.5.8.1 und 3.1.5.8.2 beschrieben ist.

Dann wird jeweils ein Gel mit Coomassieblau gefärbt, wie es in der Methode im Abschnitt 3.1.5.9.1. beschrieben ist. Die zwei anderen Gele werden für die

Immunodetektion auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Siehe Abschnitt 3.1.5.10.

4.2.3.1 PAGE

Unten sind die beiden gefärbten Gele dargestellt.

Nativ-PAGE, 5-12%

SDS-PAGE, 5-12%

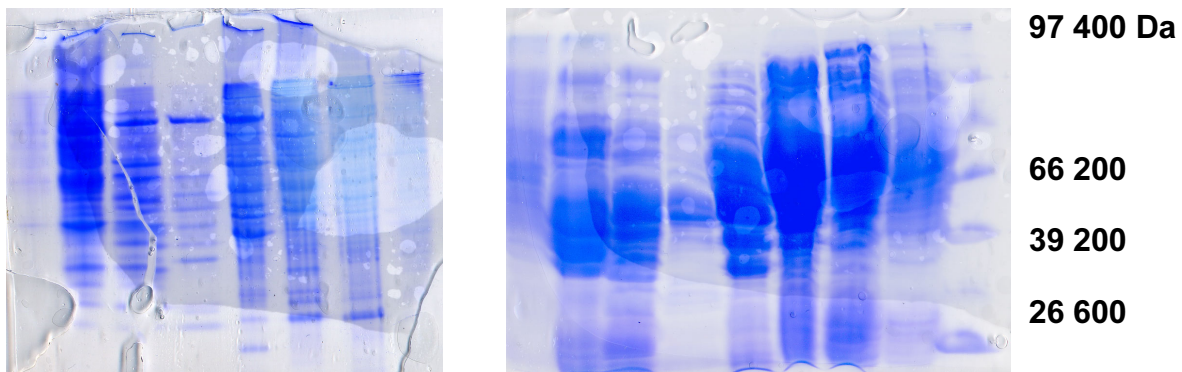


Abb. 4-13: links: Abbildung eines Commassieblau-gefärbten nativen Polyacrylamidgels der durch FPLC-Anionenaustauschchromatographie gereinigten, aufkonzentrierten Proben.

Von links nach rechts: Aufgetragene Probe: Rohaufschluß, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Rechts: Abbildung eines commassieblaugefärbten SDS-Polyacrylamidgels.

Von links nach rechts: Aufgetragene Probe Rohaufschluss, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Marker.

4.2.3.2 Immunoblot

Der Primärantikörper ist ein monoklonaler AK aus Maus Antiadenosyl- oder Antimethyl-Cobalamin. Der Sekundärantikörper ist eine Antimaus-IgG, welche mit Peroxidase gekoppelt und gegen das Fc-Ende des Primärantikörpers gerichtet ist. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und β -Chlornaphthol.

Der Westernblot zeigte keine Bande.

4.2.4 Variante des Immunoblots

Ein weiteres Westernblot-Experiment wurde ausgeführt. Es wurde bis zu der Sättigung der freien Membranstellen mit Magermilchpulver gearbeitet. Die Methode ist in 3.1.5.10.3 beschrieben. Dann wurde die Membran für mehrere Stunden inkubiert in eine [⁵⁷Co]-Cobalamin-Lösung, sorgfältig gewaschen, getrocknet und nach [⁵⁷Co] untersucht.

Es wurde keine Radioaktivität detektiert.

4.3 Western-Blot von [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex

Ziel dieses Versuchs war es, den markierten [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex auf einer Membran zu immobilisieren und zu detektieren. Dabei werden auch weitere Untersuchungen das Protein zu identifizieren ermöglicht (z.B. N-terminale Sequenzierung).

4.3.1 Verlauf der Versuche

Die Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.1.4.6 angezogen, dann gemäß Abschnitt 3.1.4.8 aufgeschlossen. Der Protein-Rohaufschluss wurde dann einer nativen, denaturierenden PAGE und einer 2D PAGE unterworfen. Die Methoden sind im Abschnitt 3.1.5.8 beschrieben. Dann erfolgte ein Western-Blot auf PVDF. Die Methode ist im Abschnitt 3.1.5.10 beschrieben.

4.3.2 [^{57}Co] Untersuchungen des Western-blot des Nativ-PAGE

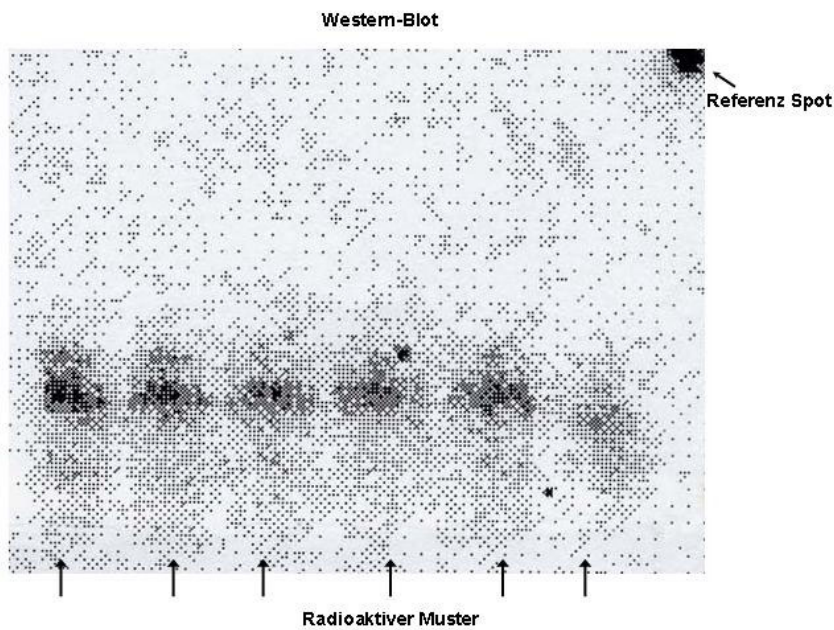


Abb. 4-14: Es wurde ein natives Polyacrylamidgel geblottet und nach [^{57}Co] untersucht. Proteinrohaufschluss mehrmals aufgetragen.

Der Protein-Cobalamin-Komplex war auf einer PVDF-Membran immobilisierbar.

4.3.3 [^{57}Co] Untersuchungen des Western-blot des SDS-PAGE

Der Scan des SDS-PAGE zeigte keine [^{57}Co].

4.3.4 [⁵⁷Co] Untersuchungen des Western-blot des 2D-PAGE

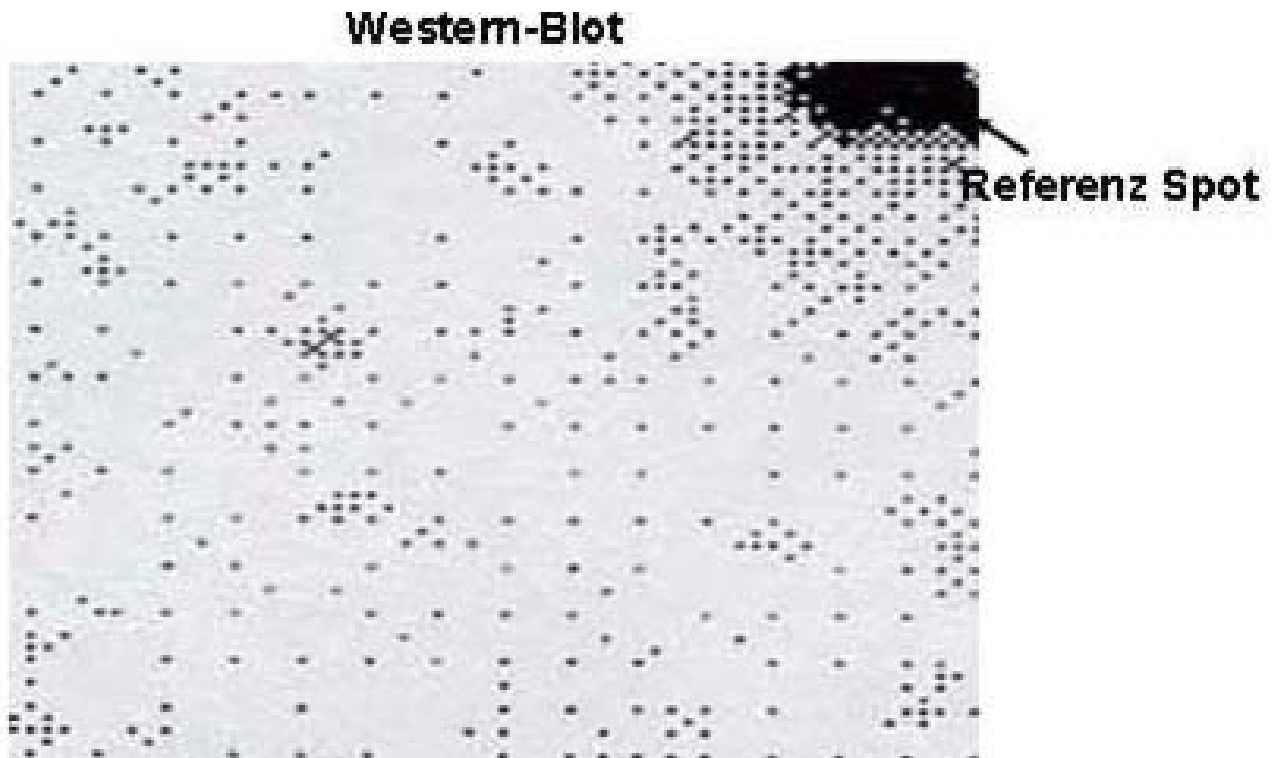


Abb. 4-15: Es wurde nach der zweiten Dimension des 2D-PAGE das Polyacrylamidgel geblottet und nach [⁵⁷Co] untersucht. Abbildung der PVDF-Membran.

Proteinrohaufschluss mehrmals aufgetragen.

Als erste Dimension wurde ein radioaktives [⁵⁷Co]-Muster auf der PVDF Membran detektiert. Die zweite Dimension zeigte kein radioaktives Muster des [⁵⁷Co].

Um den Cobalamin-Protein-Komplex zu charakterisieren wurde ein anderes Experiment ausgearbeitet. Hierzu wurde ein Material verwendet, das hohe Affinität mit unserem gesuchten cobalaminabhängigen Enzym haben sollte, B₁₂-Agarose-kügelchen. Dies wurde in der nächsten Versuchsreihe getestet.

4.4 Die Cobalamin-Agarose Bindeproteine

4.4.1 Die Theorie und Versuchsablauf

Es wurde beschlossen, auf einer Protein-Ebene mit einer selbstgepackten Affinitätssäule aus Cobalamin-Agarose zu arbeiten. Das Ziel dieser Versuchsreihe ist, die Proteine, die an Cobalamin-Agarose binden, zu identifizieren.

Zuerst wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt, um die DNA aus dem Proteinrohaufschluss abzutrennen und die Proteine in zwei Gruppen zu teilen, die positiv-neutral geladenen Proteine und die negativ geladenen Proteine. Die Methoden sind in Abschnitt 3.1.5.3 beschrieben.

Dann sind die getrennt gesammelten Protein-Fractionen zu entsalzen. Die Methoden sind im Abschnitt 3.1.5.7. beschrieben.

Dann folgen zwei Affinitäts-Chromatographien auf Agarose-B₁₂-Säulen (bzw. zwei Affinitätschromatographie-Schwerkraftsäulen oder zwei Affinitätschromatographien in 50 ml-Gefäßen), jeweils mit den positiv-neutral-geladenen und negativen geladenen Proteinen bei gleich bleibenden Bedingungen. Die Methode steht im Abschnitt 3.1.5.4 beschrieben. Es entstehen vier Fraktionen, die konzentriert wurden (siehe Abschnitt 3.1.5.7.). Pro Gruppe werden zwei Proben unterschieden: erstens diejenigen, bei denen entweder ein Überschuss an Proteinlösung besteht oder unter den gegebenen Bedingungen keine Affinität besteht, zweitens diejenigen, die eine Affinität besaßen. Diesen wurden jeweils 2 x 20 bis 30 µl entnommen und der Elektrophorese unterworfen. Abbildung 4-16 zeigt das Ergebnis.

4.4.2 Die Ergebnisse

4.4.2.1 Analyse der Ergebnisse mittels PAGE

Das entstandene Polyacrylamid Gel ist unten dargestellt.

Comassieblau-gefärbte mini Nativ-PAGE, 5-12%

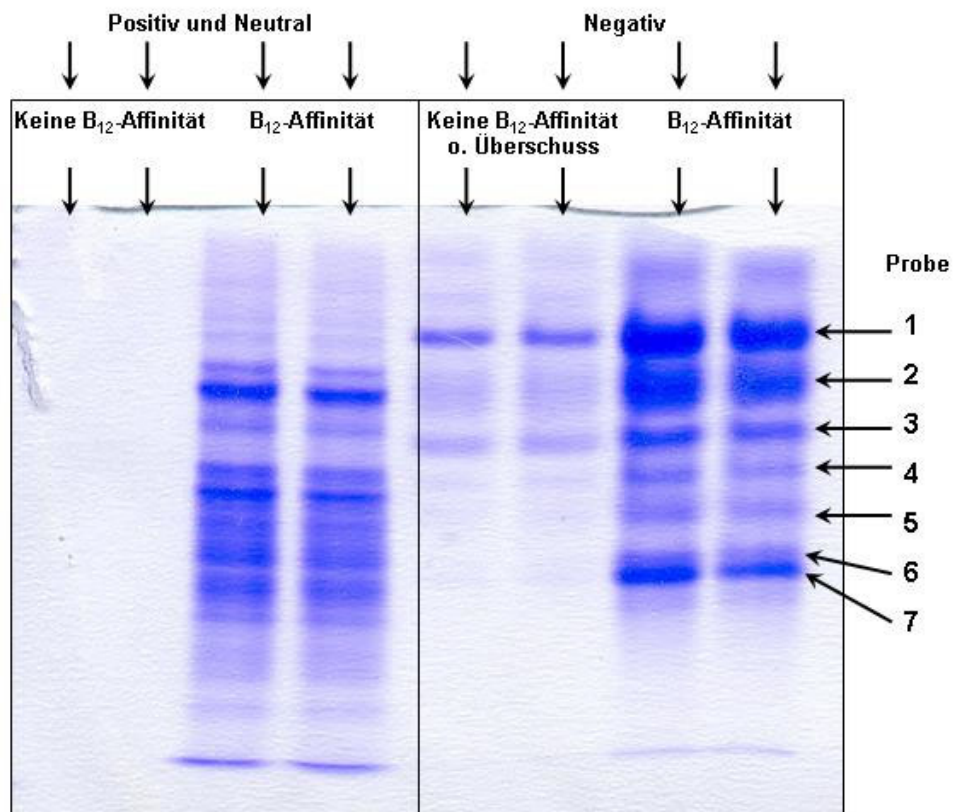


Abb. 4-16: Abbildung eines commassieblaugefärbten nativen Polyacrylamidgels nach FPLC-Anionenaustausch- und Affinitäts-Chromatographie eines roteinrohaufschlusses.

Von links nach rechts:

Spur 1,2: Proteine positiv oder neutral und ohne Affinität für Cobalamin.

Spur 3,4: Proteine positiv oder neutral, mit Affinität für Cobalamin

Spur 5,6: Proteine negativ, ohne Affinität für Cobalamin

Spur 7,8: Proteine negativ, mit Affinität für Cobalamin

Man stellt fest, dass alle positiv-neutralen Proteine unter den oben genannten Bedingungen eine Affinität für Cobalamin zu haben scheinen.

Bei den negativ geladenen Proteinen ist es unterschiedlich. Einige haben keine Affinität, was auch auf einen Überschuss an aufgetragenem Protein hinweisen könnte, und andere haben eine Affinität für Cobalamin.

4.4.2.2 Analyse der Cobalaminbindenden Proteine mittels MALDI-TOF

Es wurde aufgrund ihrer unterschiedlichen B₁₂-Affinität mit den negativ geladenen Proteinen weitergearbeitet, um damit weitere Experimente durchzuführen. Diejenigen, die in ausreichender Menge für die weitere Verarbeitung vorliegen und eine Affinität für Cobalamin haben, wurden nun mit Trypsin „In-Gel“ verdaut. Dann wurden sie MALDI-TOF-MS-Messungen unterworfen. Die Methode ist im Abschnitt 4.1. beschrieben. Es entsteht ein Massenspektrum pro Probe.

4.4.2.3 Auswertungen der Massenspektren

Die Massenspektren stellen die Masse der Peptide, die durch den Verdau entstanden sind. Für die Identifikation der entstandenen Peptide des verdauten Proteins, „peptide mass fingerprint“ (siehe Anhang) genannt, wird die Datenbank „Swissprot“ untersucht. Dies geschieht mit Hilfe der „Matrixscience“ Webseite, angewandt auf *E. coli*. Die Applikation heißt „Mascott“.

Die Untersuchungsparameter für die entstandenen Peptide sind alle gleich:

Type of search: Peptide Mass Fingerprint

Enzyme: Trypsin

Mass values: Monoisotopic

Protein Mass: Unrestricted

Peptide Mass Tolerance: ± 5 Da

Peptide Charge State: 1+

Max Missed Cleavage: 1

Restricted to *E. coli* Swissprot database

Abb 4-17: Die „Mascott“ Applikationsuntersuchungsparameter der Datenbank „Swissprot“ angewandt auf *E. coli* (Bioinformatik).

Es folgen die Ergebnisse der Probe 1

Number of queries: 15 Queries matched: 9

Top Score: 31 for P30177, Hypothetical protein ybiB

Mass: 35026 Da Score: 31 Expect: 5.3

Abb: 4-18: Ergebnis der „Mascott“ Applikationsuntersuchungen mit der Probe 1. Identifizierung des „Hypothetical protein ybiB“ (Bioinformatik).

9 der 15 entstandenen Peptide könnten aus ybiB stammen.

Die Ergebnisse der Probe 2

Number of queries: 11 Queries matched: 7

Top Score: 28 for P39182, Histidine-binding periplasmic protein precursor (HBP)

Mass: 28466 Da Score: 36 Expect: 1.8

Abb: 4-19: Ergebnis der „Mascott“ Applikationsuntersuchungen mit der Probe 2. Identifizierung des „Histidine-binding periplasmic protein precursor“ (Bioinformatik).

7 der 11 entstandenen Peptide könnten aus HBP stammen.

Die Ergebnisse der Probe 3

Number of queries: 27 Queries matched: 20

Top Score: 32 for P02927, D-galactose-binding periplasmic protein precursor

Synonym GBP

Synonym D-galactose/ D-glucose binding protein

Synonym GGBP

Mass: 35690 Score: 32 Expect: 3.6

Abb: 4-20: Ergebnis der „Mascott“ Applikationsuntersuchungen mit der Probe 3. Identifizierung des „D-galactose/ D-glucose binding protein“ (Bioinformatik).

20 der 27 entstandenen Peptide könnten aus GPB stammen.

Ergebnisse der Probe 7

Number of queries: 10 Queries matched: 5	
Top Score: 34 for P21323, Hypothetical 21.9 kDa protein	
Synonym	ORFI
Synonym	Retron EC67
Mass: 21884 Score: 34 Expect: 2.8	

Abb: 4-21: Ergebnis der „Mascott“ Applikationuntersuchungen mit der Probe 3. Identifizierung des „Hypothetical 21.9 kDa protein“ (Bioinformatik).

5 der 10 entstanden Peptide könnten aus ORFI stammen.

Die Probe 1 zeigt Ähnlichkeiten mit einem unbekanntem Protein. Der Proben 3 mit dem Histidine-binding periplasmic Protein precursor (HBP). Die Proben 4 und 5 und 6 ergaben keine Ergebnisse. Der Probe 7 zeigt Ähnlichkeiten mit einem Hypothetical 21.9 kDa protein.

Die beobachteten Peptid-Set-Sequenz-Ähnlichkeiten könnten Zufälle sein, weil ihr „top score“-Wert sich unter 66 % befindet.

Der nächste Schritt ist das intensivere Studium diesen Proteine.

4.4.2.4 Analyse der gefischten Agarose bindenden Proteine: Hypothetical protein ybiB, Histidine-binding periplasmic protein precursor, D-galactose-binding periplasmic protein precursor, Hypothetical 21.9 kDa protein.

4.4.2.4.1 Aminosäuresequenzanalysen

Suche nach „base-off-mode“ Cobalaminbindungsmotiv (DXHXXG) in den oben gelisteten Proteine mit der Applikation „ Scanprosite“.

Die erzielten Ergebnisse für alle Proteine:

Pattern: DXHXXG No hits found

Abb. 4-22: Ergebnis der „scanprosite“ Applikation (Bioinformatik).

Das „base-on-mode“ Bindungsmotiv ist im Prozess.

4.4.2.4.2 Dreidimensionale Strukturanalyse

Es ist eine sehr interessante Aufgabe für erfahrene Bioinformatiker. Wenn die dreidimensionale Struktur unbekannt ist, ist das so genannte Docking mit putativem Substrat oQ enthaltender-tRNA und mit putativem Cofaktor, Cobalamin, durchzuführen.

Die dreidimensionale Struktur Hypothetical protein ybiB ist unbekannt, die von D-galactose-binding periplasmic protein precursor ist bekannt; hypothetical 21.9 kDa protein ist unbekannt.

Diese Docking-Versuche sind in Arbeit bei der Arbeitsgruppe von Dr. Ingolf Sommer, im Institut für Bioinformatik (Max-Planck-Institut, in Saarbrücken).

4.4.2.5 „Genome Annotation“

Es ist interessant, die Gene dieser gefunden Proteine auf *E. coli* Chromosomen zu lokalisieren, weil sich Gene, die für eine Biosynthese verantwortlich sind, in Bakterien oft (nicht immer) auf einem einzigen Operon befinden.

Ziel ist es, die Position der entsprechenden Gene zu finden. Dies geschieht mittels Untersuchung der EcoGen Datenbank. Unten sind die Ergebnisse aufgelistet.

Probe 1: P30177, Hypothetical protein ybiB

Left End: 834471 bp Right End: 835433 bp Minute or Centisome (%) = 17.99'

4-23: Ergebnis der *ybiB* „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Gens *ybiB* auf *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

Probe 2: P39182, Histidin-binding periplasmic protein precursor

Left End: 2424026 bp Right End: 2424808 bp Minute or Centisome (%) = 52.25'

4-24: Ergebnis der Histidin-binding periplasmic protein precursor entsprechende Gen „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Gens Histidin-binding periplasmic protein precursor entsprechende Gen auf *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

Probe 3 und 6: for P02927, D-galactose-binding periplasmic protein precursor

Left End: 2237370 bp Right End: 2238368 bp Minute or Centisome (%) = 48.23'

4-25: Ergebnis des D-galactose-binding periplasmic protein precursor entsprechende Gen „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des D-galactose-binding periplasmic protein precursor entsprechende Gen auf *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

Probe 7: P21323, Hypothetical 21.9 kDa protein

“Transposable Element, mobile DNA”

4-26: Ergebnis des Hypothetical 21.9 kDa protein „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Hypothetical 21.9 kDa protein auf *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

QueA befindet sich genau an Nukleotid-Position 424,235 bis 425,305 (9.14') und *Tgt* befindet sich an Nukleotid-Position 425,361 bis 426,488 (9.17'). Die identifizierten Proteine befinden sich weiter entfernt von den zwei bekannten an der Biosynthese des Q-enthaltende-tRNAs beteiligt Enzymen. Das schließt nicht aus, dass diese Proteine an der Reduktion von oQ zu Q beteiligt sind.

Es wird nun mit einem Cobalaminbindungsmotiv auf der DNA Ebene weitergearbeitet. Dies führt uns zu dem nächsten Teil der Doktorarbeit:

Isolierung des in DNA-Fragmenten enthaltenen B₁₂-Bindungsmotivs.

4.5 Isolierte yaaJ und lpxC Gene mit dem „base-on-mode“ Cobalamin- Bindungsmotiv

4.5.1 Theorie und Versuchsablauf

Mit Hilfe einer DNA-Sequenz und passender Werkzeuge kann man ein gesamtes Gen, das das Cobalaminbindungsmotiv enthält, isolieren. Das Gen könnte dann in einen Expressionsvektor einkloniert werden. Dies würde die Produktion großer Mengen des entsprechenden Enzyms ermöglichen. Die Mengen, die dadurch produziert werden können, sind wesentlich höher als die Mengen an Enzymen, die aus einem Rohproteinaufschluss „gereinigt“ werden, vorausgesetzt, dass es ein zuverlässiges Reinigungsverfahren gibt.

Ein allgemeines Cobalaminbindungsmotiv, eine Consensus-Sequenz, wurde von bekannten cobalaminabhängigen Enzymen abgeleitet. Bei diesen Enzymen bindet ein Histidin das Cobalamin-cobalt im sogenannten „base-off-mode“-Bindungsart anstelle des eigenen Cobalamin-5,6-Dimethylbenzimidazols. Dieser „base-off-mode“-Bindungsart wurde in folgenden Enzymen beobachtet:

- 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase
- Leucin 2,3-Aminomutase
- Glutarat-Mutase
- Methylmalonyl-CoA-Mutase
- 2-Methylenglutarat-Mutase

Es wurde in der genomischen *E. coli* Datenbank nach dem Cobalaminbindungsmotiv gesucht. Hier folgt als Beispiel die spezifische Cobalaminbindungsdomän für die 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase:

DVHDIGKNIVGVVLQCNNYEIVDLGVMVPAEKILRTAKE
VNADLIGLSGLITPSLDEMNVNAKEM ERQGFTIPLLIGG

Abb. 4-27: Cobalaminbindungsdomän der 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase

Die Cobalamin bindende Aminosäure-Consensus-Sequenz, die bei anderen oben genannte Enzymen auch zu finden ist, ist in rot dargestellt.

D-X-H-X-X-G

Abb. 4-28: Cobalamin bindende Consensus-Aminosäure-Sequenz der „base-off-mode“

Diese Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des *E. coli* „Codons-usage“ in eine Nukleotid-Sequenz rückübersetzt, um die Erforschung auf DNA-Ebene zu ermöglichen. X steht für eine beliebige Aminosäure.

Die entstandene Desoxyribonukleotidsequenz:

5-'GA(T,C) III CA(T,C) III III GG(T,C,A,G)-3'

Abb. 4-29: ermittelte Desoxynukleotidsequenz (siehe Abb. 4-28)

Die benutzte Ribonukleotidsequenz:

5'-YCC III III RTG III RTC-3'

Abb. 4-30: ermittelte Ribonukleotidsequenz (siehe Abb. 4-29)

I steht für Inosin, die universelle Base, die sich mit allen Basen paaren kann. R steht für Thymin oder Cytosin und Y steht für Thymin, Cytosin, Adenin oder Guanin. Es spiegelt die Redundanz des genetischen Codes wider. Wegen dieser Redundanz stehen mehrere entsprechende Anticodonsequenzen, anders gesagt, entsprechende

tRNAs, für eine bestimmte Aminosäure zur Verfügung. Daher sind mehrere Rückübersetzungen möglich. Dies führt zu mehreren Primern. Um deren Anzahl auf 4 anstelle von 16 zu verringern, haben wir die erste variable Base ausgeschlossen. Unten folgt die verwendete Primer-Sequenz:

5'-CC III III RTG III RTC-3'

Abb. 4-31: benutzte Ribonukleotidsequenz (siehe Abb. 4-28)

In den Experimenten wird mit einer genomischen Bibliothek aus *E. coli*, der oben genannten Cobalamin bindenden Primer-Mischung und einem anderen passenden Primer, pT7 (der am ZAP-Vektor bindet, welcher *E. coli* MRE600 4000 Bp Fragmente enthält, siehe Anhang 9.4), mehrere Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Die Zusammensetzungen und PCR-Programme sind im Abschnitt 3.1.6.2.2 beschrieben.

Unterschiedliche Schmelztemperaturen, von 41 °C regelmäßig steigend bis auf 56 °C, wurden gleichzeitig getestet und abschließend wurde eine Elektrophorese durchgeführt (Abschnitt 3.1.6.5). Abbildung 4-22 zeigt das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese.

4.5.2 Analyse der PCR produkte auf Agarose-Gel

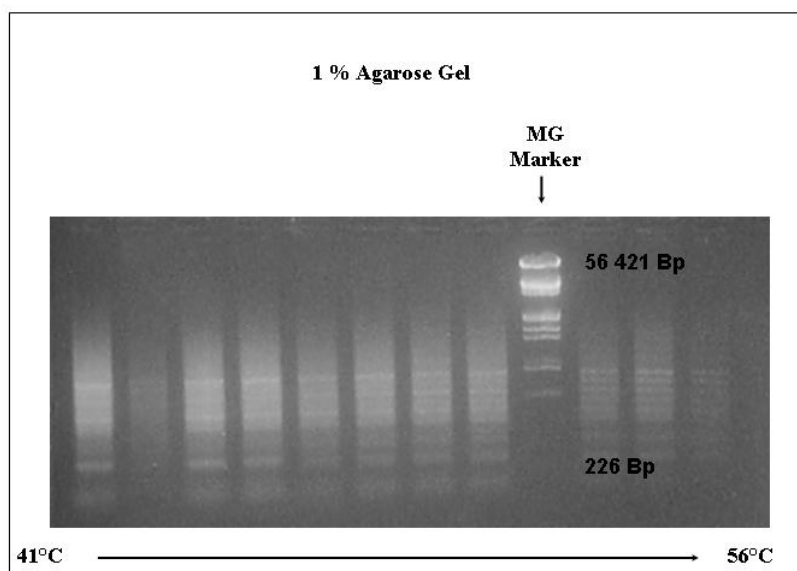


Abb. 4-32: Abbildung eines UV-bestrahlten Agarose-Gels.

T_m von links nach recht: 41° bis 56°C

Es wurden von jeder getesteten Temperatur 40 µl Amplifikat aufgetragen. Es sind mehrere amplifizierte Banden zu sehen, deren Größe unter 800 Bp liegt. Das bedeutet, dass es mehrere DNA-Fragmente gibt, die komplementär zu der rückübersetzten Sequenz sind und amplifiziert werden konnten.

Das Experiment wurde mehrmals wiederholt. Die Elektrophoresedauer wurde für eine bessere Amplifikat-Trennung verlängert. Die Banden wurden aus dem Gel heraus geschnitten, und die DNA gereinigt (siehe Abschnitt 3.1.6.6.) und einer zweiten PCR unterworfen, um die Menge an Amplifikat zu erhöhen. Dann wurden die DNA-Fragmente sequenziert. Eine der zahlreichen durchgeführten Sequenzierungen war erfolgreich, was bedeutet, dass die entstandene Sequenz zuverlässig war und lange genug, um erste Bioinformatik-Untersuchungen durchführen zu können und dann, je nach Ergebnis ein Southern-Blot (siehe Abschnitt 3.1.6.13 und Anhang 9.4) oder eine PCR (3.1.6.2), um das gesamte entsprechende Gen zu isolieren. Danach könnte es in einen Expressionsvektor kloniert (siehe Abschnitt 3.1.6.10) und große Mengen des Proteins produziert und mit Aktivitätstest überprüfen werden, ob es die Reduktion von oQ verursacht. Unten folgt die isolierte Sequenz. Die zuverlässige Sequenz ist 98 Bp lang. Die 98 Basen-Sequenz eines einzelnen Stranges von die Firma MWG wurde wie folgt ermittelt:

```
5'-TCCCGGCATCAATGATTTTTTTGTTCTGAATCATGAATGGGGTTACCCAA
TGAAAATACCGGCGATTTCTGCAAATTTGCCATTTTTGCGCCTGAACG-3'
```

Abb. 4-33: DNA-Sequenz der durch die Polymerase-Kette-Reaktion gefischten 98 Basenlange Probe.

4.5.3 Gefischte 98 Basen

Erst war die genaue Position der Sequenz auf das *E. coli* Chromosom definiert und dann die Sequenz-enhaltende-Gene.

Am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) wurden mit Hilfe von „Unix Sequence Analysis Resources“ (HUSAR), Applikation „BLAST“, diese 98 Basen auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert. Sie befinden sich an zwei unterschiedlichen Stellen auf dem negativen Strand, genaue Positionen **107,177** bis **107,080** und Positionen **7,177** bis **7,080**.

Abb. 4-34 zeigt das Ergebnis der Sequenz-Suche

```
ecoli:NC_000913_03 Continuation (4 of 47) of NC_000913 from base
300001 (NC_000913 Escherichia coli K12, complete genome. 3/2003)
Length = 110000
Score = 194 bits (98), Expect = 1e-50 Identities = 98/98 (100%)
Strand = Plus / Minus
Query: 1      tcccggcatcaatgattttttgttctgaatcatgaatggggttaccaatgaaaataccg
60
          |||
Sbjct: 107177 tcccggcatcaatgattttttgttctgaatcatgaatggggttaccaatgaaaataccg
107118

Query: 61     gcgatttctgcaaaaatttgccatttttgcgctgaacg 98
          |||
Sbjct: 107117 gcgatttctgcaaaaatttgccatttttgcgctgaacg 107080
```

Abb. 4-34: Ergebnis der Untersuchung einer *E. coli* Genbibliothek mit der 98 Basen langen Proben (Genlokalisierung, Bioinformatik).

```
ecoli:NC_000913_04 Continuation (5 of 47) of NC_000913 from base
400001 (NC_000913 Escherichia coli K12, complete genome. 3/2003)
Length = 110000
Score= 194 bits (98), Expect = 1e-50 nIdentities= 98/98 (100%)
Strand = Plus / Minus
Query: 1      tcccggcatcaatgattttttgttctgaatcatgaatggggttaccaatgaaaataccg 60
          |||
Sbjct: 7177   tcccggcatcaatgattttttgttctgaatcatgaatggggttaccaatgaaaataccg
7118

Query: 61     gcgatttctgcaaaaatttgccatttttgcgctgaacg 98
          |||
Sbjct: 7117   gcgatttctgcaaaaatttgccatttttgcgctgaacg 7080
```

Abb. 4-35: Ergebnis der Untersuchung einer *E. coli* Genbibliothek mit der 98 Basen langen Proben (Genlokalisierung, Bioinformatik).

Die Applikation "FASTA" wurde auch verwendet und hat die Ergebnisse bestätigt. Weiterhin musste untersucht werden, in welchem Leserahmen sich die

Sequenz befindet. Die Sequenz ist an zwei unterschiedlichen Stellen des Chromosoms zu finden.

Mit Hilfe des „Sequence Retrieval System“ und der Applikation „Gene Annotation“ für *E. coli* wurden die Gene identifiziert. Die Positionen **7,177** bis **7,080** gehören zu dem Gen *yaaJ*.

Die Ergebnisse sehen folgendermaßen aus:

ECOLI	FTKey	FTBegin	FTEnd	GeneName
ECOLI:F14	gene	6529	7959	yaaJ

Abb. 4-36: Ergebnis der „genome Annotation“ Applikation („Sequenz Retrieval System“) des *E. coli* Chromosoms. (Identifizierung des Gens *yaaJ*, Bioinformatik).

Die Positionen **107,177** bis **107,080** gehören zu dem Gen *lpxC*. Die Ergebnisse sehen folgendermaßen aus:

ECOLI	FTKey	FTBegin	FTEnd	GeneName
ECOLI:F194	gene	106557	107474	lpxC

Abb. 4-37: Ergebnis der „genome Annotation“ Applikation („Sequenz Retrieval System“) des *E. coli* Chromosoms. (Identifizierung des Gens *lpxC*, Bioinformatik).

Der nächste Schritt ist das intensivere Studium von *yaaJ* und *lpxC*.

4.5.4 Untersuchungen von *yaaJ* und *lpxC*

4.5.4.1 Gen-Produkte und Funktion von *yaaJ* und *lpxC*

Ein *yaaJ* entsprechendes Protein ist unbekannt. Es hat Ähnlichkeiten mit der „Natrium-Alanine Symporter familie“. Diese scheinen Na⁺ und Ala im Symport in die Zelle zu transportieren (siehe Anhang 9.7).

Das zu *LpxC*, auch *envA* genannt, gehörende Protein ist bekannt. Es hat zwei Funktionen: Einerseits ist es ein „surface polysaccharides and Antigens“, andererseits fungiert es als Enzym. Das Gen *lpxC* ist an der Biosynthese von „lipid A“, einem phosphorylierten Glycolipid, beteiligt, welches die Lipopolysaccharide an der äußeren Zellmembran verankert (siehe Anhang 9.7).

Diese Hydrolase-Funktion ist relevant. Siehe den vorgeschlagen Mechanismus der oQ-Reduktase (Abbildung 2-6).

4.5.4.2 Untersuchungen der Aminosäuresequenzen von *yaaJ* und *lpxC* entsprechenden Proteinen

Es wurde nach dem „base-off-mode“ Cobalaminbindungsmotiv in der Aminosäuresequenz beider Enzyme gesucht. Dafür wurden die Applikationen „Scanprosite“, die sich auf „expasy“-Webseite befinden, verwendet (www.Expasy.org).

In den Aminosäure-Sequenzen ist das „base-off-mode“ Cobalaminbindungsmotiv nicht zu finden.

D-X-H-X-X-G

Abb. 4-38: Cobalaminbindung Consensus Aminosäure Sequenz der „base-off-mode“ „base-on-mode“ abgeleitetes Cobalaminbindungsmotiv:

Y-X(n)-L-X-X-C-X(n)-T-E-X(n)-T-X(n)-G-X(n)-A-X-XX-A-
X(n)-S-X(n)-E-X(n)-L-X(n)-I-T-K-X(n)-G-X(n)-E-X(n)-I-X(n)-N

Abb. 4-39: Neues „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv von Diol-Dehydratase, Glycerol-Dehydratase und Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase α -Untereinheiten (Bioinformatik).

4.5.4.3 Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur von *yaaJ* und *lpxC* entsprechenden Proteine

Es ist möglich, dass die dreidimensionalen Strukturen durch die Proteinfaltung dieser Enzyme das Cobalaminbindungsmotiv zusammenbringen.

Um zu beantworten, ob dies für *yaaJ* und *lpxC* zutrifft, ist es notwendig, die dreidimensionalen Strukturen sorgfällig zu untersuchen.

Eine dreidimensionale Struktur von **yaaJ** ist nicht vorhanden. Es besteht die Möglichkeit sie zu modellieren. Swiss Model bietet eine „modelling“ Applikation, vorausgesetzt, einige Kriterien sind erfüllt. Die Ergebnisse sehen folgendermaßen aus:

Your modeling request could not be carried out. Please look at the TraceLog file issued by the server.

The degree of similarity of your sequence with proteins of known 3D structure may be to low.

At present, SWISS-MODEL will generate models for sequences which respond to these criteria:

BLAST search P value: < 0.00001

Global degree of sequence identity (SIM): > 25 %

Minimal projected model length = 25 aa.

Abb. 4-40: Ergebnis der „Swiss-modelling“ Applikation untersucht mit *yaaJ* und *lpxC* Proteinen (Bioinformatik). Die Voraussetzungen für ein Proteinmodellierung sind nicht erfüllt.

Die Voraussetzungen, zur „modelling“ einer zuverlässigen dreidimensionalen Struktur wurden nicht erfüllt: Es gibt weniger als 25 % Sequenzähnlichkeiten oder $P < 0,00001$.

Eine dreidimensionale Struktur von *LpxC* ist bekannt.

Hierfür sollten Docking-Experimente mit Cobalamin durchgeführt werden. Sie sind gerade im Prozess in der Arbeitsgruppe von Dr. Ingolf Sommer, im Institut für Bioinformatik, Max-Planck-Institut, in Saarbrücken. Es ist eine interessante Aufgabe für erfahrene Bioinformatiker.

4.5.5 „Genome Annotation“

Ziel ist festzustellen, ob *QueA*, *Tgt*, *lpxC* und *yaaJ* benachbarte Gene sind, denn in Bakterien befinden sich meistens Gene, die an der Biosynthese eines bestimmten Moleküls beteiligt sind, auf einem einzigen Operon.

QueA befindet sich genau an den Nukleotid Positionen 424,235 bis 425,305.

Left End: 424235 bp Right End: 425305 bp Minute or Centisome (%) = 9.14'
--

Abb. 4-41: Ergebnis der *QueA* „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Gens *QueA* auf dem *E. coli* Chromosom Bioinformatik)

Tgt befindet sich an Nukleotid Position 425,361 bis 426,488.

Left End: 425361 bp Right End: 426488 bp Minute or Centisome (%) = 9.17'
--

Abb. 4-42: Ergebnis der *Tgt* „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Gens *Tgt* auf *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

YaaJ befindet sich an Nukleotid Position 7,959 bis 6,529.

Left End: 6529 bp Right End: 7959 bp Minute or Centisome (%) = 0.14'
--

Abb. 4-43: Ergebnis der *YaaJ* „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. (Lokalisierung des Gens *YaaJ* auf dem *E. coli* Chromosom, Bioinformatik)

LpxC befindet an Nukleotid Position 106,557 bis 107,474.

Left End: 106557 bp Right End: 107474 bp Minute or Centisome (%) = 2.3'

Abb. 4-44: Ergebnis der *LpxC* „Genome annotation“ Applikation in *E. coli*. Lokalisierung des Gens *LpxC* auf dem *E. coli* Chromosom, Bioinformatik).

Die Gene *yaaJ* und *lpxC* sind entfernt von *queA* und *tgt*. Das schließt nicht aus, dass diese Gene an der Reduktion von oQ zu Q beteiligt sind.

4.6 Der Southern-Blot

Es wurde ein Southernblot durchgeführt mit einer markierten DNA-Sonde, die komplementär ist zu einem Teil des Methioninesynthasegens. Die Methode ist im Abschnitt 3.1.6.13.3 beschrieben.

4.7 Unterschiedliche Bioinformatik-Untersuchungen

Das Hauptziel war es, ein oder mehrere ähnliche Enzyme mit oQ-Reduktase (oder die oQ-Reduktase selbst!) zu finden. Diese sollten dann gründlich untersucht werden. Zur Gewinnung ausreichender Information stehen mehrere Bioinformatik-Werkzeuge zur Verfügung, die zu unserem gesuchten Enzym führen könnten.

4.7.1 Das neue gefundene „base-off-mode“ Cobalamin-Enzym Bindungsmotiv in DDH, GDH und RNTR

4.7.1.1 Theorie

Die cobalaminabhängigen Enzyme sind unten aufgelistet. Es wurden erst auf der Expaty-Webseite die Datenbanken trEMBL und Swiss-Prot alle cobalaminabhängigen Enzyme gesucht.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Search in ENZYME for: Cofactor Cobalamin	
2.1.1.13	Methionine synthase
4.2.1.28	Propanediol dehydratase
4.2.1.30	Glycerol dehydratase
4.3.1.2	Methylaspartate-ammonia-lyase
4.3.1.7	Ethanolamine-ammonia-lyase
5.4.3.3	Beta-lysine 5,6-aminomutase
5.4.3.4	D-Lysine 5,6-aminomutase
5.4.3.5	D-Ornithine 4,5-aminomutase
5.4.3.7	Leucine 2,3-aminomutase
5.4.99.1	Methylaspartate-mutase
5.4.99.2	Methylmalonyl-CoA-mutase
5.4.99.4	2-Methyleneglutarate-mutase

Abb. 4-45: Liste der cobalaminabhängigen Enzyme (Swissprot Datenbank wurde untersucht, Bioinformatik)

Es ist bekannt, dass noch andere cobalaminabhängige Enzyme existieren. Sie wurden nicht mit dieser Recherche gefunden. Es handelt sich um:

- die Ribonukleosid Triphosphate Reduktase (Klasse II) RNTR,
- die Isobutyryl-CoA Mutase ICM.

Dann wurden unten von B₁₂-abhängigen Enzymen einige ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren wie folgt:

- Die Proteine sollten bekannt sein.
- Ihre dreidimensionale Struktur soll bekannt sein.
- Sie sollten eine Dehydratation oder Reduktion katalysieren.

Dies trifft auf die unten genannten Enzyme zu. Diese cobalaminabhängigen Enzyme enthalten nicht die Consensus-Sequenz (**Asp-X-His-X-X-Gly**) in ihrer Primärsequenz. Dies ist meistens der Fall bei der „base-off-mode“ Enzym-Cofaktor-Bindungsart, wo der 5,6-Dimethylbenzimidazol-Ligand am Kobalt nicht bindet und daher frei ist, um eine Imidazol -Gruppe eines Histidins zu binden. Der „base on-mode“ ist in folgenden Enzymen vorhanden:

- Diol - Dehydratase (DDH),
- Glycerol - Dehydratase (GDH),
- Ribonucleosid - Triphosphat-Reduktase (Klasse II, RNTR).

In diesem „base-off-mode“ bindet das Cobalamin - 5,6 - Dimethylbenzimidazol das Kobalt. Diese drei Enzyme stammen aus verschiedenen Organismen. Sie reduzieren ihr Substrat.

Relevante Informationen bezüglich der drei Enzyme sind im Anhang 9.1-9.3 zusammengefasst.

Um ein Muster ableiten zu können, wird ein „alignment“ der Cobalaminbindungsdomäne, die in diesen drei Enzymen enthalten sind, erstellt. Dies wird mit Hilfe der Applikation „Clustal“ von HUSAR erreicht.

Die Untersuchungsparameter sind:

Pairwise similarity parameter:	
K-Tuple length:	1
Gap penalty:	3
Number of diagonals:	5
Diagonal window size:	5
Scoring method:	Percentage
Gap opening penalty:	10.00
Gap extension penalty:	0.10
Protein weight matrix:	blosum
Multiple alignment parameter:	

Gap penalty (fixed):	10.00
Gap penalty (varying):	0.05
Gap separation penalty range:	8
Percent. identity for delay:	40%
List of hydrophilic residue:	GPSNDQEKR
Protein weight matrix:	blosum
Colors:	
Blau: Identical Amino acids	

Abb. 4-46: Parameter für den folgenden Sequenzvergleich zusammengefasst (Bioinformatik)

4.7.1.2 Ergebnisse

4.7.1.2.1 Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den α -Untereinheiten

Die Untersuchungsparameter bezüglich der α -Untereinheiten sind:

Forschungsparameter:

α -Untereinheiten, B₁₂-Bindungsdomän

sw:	Q59490	Begin:565	End:724	Type: P
trembl:	Q59470	Begin:172	End:373	Type:P
trembl:	Q59476	Begin:144	End:336	Type:P

Abb. 4-47: Cobalaminbindungsdomän der α -Untereinheiten von Diol-Dehydratase (Q59470), Glycerol-Dehydratase (Q59476), Ribonucleosid-Triphosphat-Reduktase (Q59490) („base-on-mode“ Enzym-Cobalaminbindungsart, Bioinformatik).

Die erzielten Ergebnisse sind:

α -Untereinheiten, B₁₂-Bindungsdomän

α -Untereinheiten, B ₁₂ -Bindungsdomän
Name: Q59490
Name: Q59470

Das folgende Muster kann abgeleitet werden:

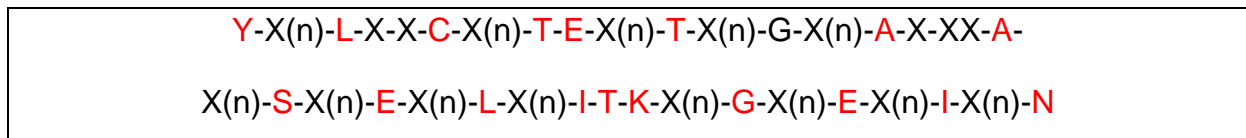


Abb. 4-49: Neuer „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv von Diol-Dehydratase, Glycerol-Dehydratase und Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase- α -Untereinheiten (siehe Abb. 4-38, Bioinformatik)

4.7.1.2.2 Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den β -Untereinheiten

Die Forschungsparameter β -Untereinheiten sind:

LIST: β -Untereinheiten, B₁₂-Bindungsdomän

sw: Q59490	Begin:565	End:724	Type:P
trembl: Q59471	Begin:112	End:200	Type:p
trembl: o08505	Begin:122	End:155	Type:p

Abb. 4-50: Cobalaminbindungsdomän der β -Untereinheiten der Diol-Dehydratase (trEMBL: 59471), Glycerol-Dehydratase (trEMBL: o08505), Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase (swiss: Q59490). Das „base-on-mode“ Enzyme-Cobalaminbindungsart, Bioinformatik).

Die erzielten Ergebnisse sind:

β -Untereinheiten, B₁₂ Bindungsdomän

β Untereinheiten, B ₁₂ Bindungsdomän	
Name:	Q59490
Name:	Q59471
Name:	O08505
//	
	1 50
Q59490	HYGAYLIQRI RFQDS DPLLP ALKACGYRTE ADIY TENTTC VEFPIKAVGA
Q59471	~~~~~ ~DVA FVA VE GNL LSGSGIS IGI QSKGTTV LHQQGLPPLS
O08505	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
	51 100
Q59490	DNPNFASAGT VSI AEFATQ AFLQTYWSDN AVSCTITFQD SEG DQVESLL
Q59471	NLELFPQAPL LTLETYRQIG KNAARYAKRE SPQPVPTLND QMARPKYQAK
O08505	~~~~~SQAPL LTLETYRQIG KNAARYARKE SPSPVFV~ ~~~~~
	101 150
Q59490	RQYRFITKST SLLPYFGGSL QQAPKEPIDK ETYEKRSQEI TGNVEEVFSQ
Q59471	S~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
O08505	~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~
	151
Q59490	LNSDVKDLEL
Q59471	~~~~~
O08505	~~~~~

Abb. 4-51: Sequenzvergleichergebnis der Cobalaminbindungsdomänen der β -Untereinheiten von Diol-Dehydratase (trEMBL: 59471), Glycerol-Dehydratase (trEMBL: o08505), Ribonukleotid-Triphosphate-Reduktase (Q59490).

In Blau sind die in allen drei Domänen identischen Aminosäuren dargestellt (Bioinformatik).

Das folgende Muster kann abgeleitet werden:

A-X(n)-Y

Abb. 4-52: Neues „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv von Diol-Dehydratase, Glycerol-Dehydratase und Ribonukleotide-Triphosphat-Reduktase-β-Untereinheiten (siehe 4-41, Bioinformatik).

4.7.2 Untersuchungen des unbekanntes Gens *yajB*, das sich neben *queA* und *tgt* befindet

In *E. coli* befindet sich *yajB* neben *queA* und *tgt*, deswegen wird *yajB* untersucht (Es ist bekannt, dass die Gene eines Bakteriums die an einer bestimmte Biosynthese beteiligt sind, sich auf einem einzigen Operon befinden).

4.7.2.1 Aminosäuresequenz-Analyse

Suche nach dem „base-off-mode“ Cobalaminbindungsmotiv auf der Protein-Ebene

DxHxxG

Abb. 4-53: cobalaminbindende Consensus-Aminosäure-Sequenz der „base-off-mode“ Cobalaminbindungsart

In der Aminosäure-Sequenz ist es nicht zu finden.

Scan a sequence with a PROSITE pattern or profile

Sequence: P21515, Hypothetical protein *yajB* [Escherichia coli] (193 AA)

Pattern: DXHXXG

No Hits found

Abb. 4-54: Ergebnis des untersuchten *yajB*-Proteins nach Cobalaminbindung Consensus Aminosäure-Sequenz der „base-off-mode“ Cobalaminbindungsart („Prosit“ Applikation von Swissprot, Bioinformatik).

Das „base-on-mode“ Bindungsmotiv ist noch in Arbeit.

4.7.2.2 Dreidimensionale Struktur-Analyse

Die Struktur des yajB-Proteins ist unbekannt. Wie zuvor sind hier Docking-Versuche mit dem putativen Substrat erforderlich, Modellversuche mit oQ-enthaltender tRNA und putativem Cofaktor Cobalamin sind in der Arbeitsgruppe von Dr. Ingolf Sommer im Prozess.

4.7.3 Untersuchungen der Gene die mit *Tgt* und *QueA* im Wechsel wirken

4.7.3.1 "STRING" Applikation

Applikation „**STRING**“ wurde ebenfalls angewandt. Dadurch erhält man Informationen über benachbarte Gene, die im Raum und phylogenetisch betrachtet mit *queA* und *tgt* gebunden sind.

*4.7.3.1.1 Benachbarte Gene des *tgt**

Es folgt eine schematische Darstellung. Die Farben und die Breite der Striche geben Auskunft über die Art der Bindung zwischen *tgt* (in der Mitte) und den anderen Genen (in Anhang 9.8 gezeigt).

*4.7.3.1.2 Benachbarte Gene des *queA**

Es folgt wie zuvor die schematische Darstellung zwischen *queA* und benachbarten (im Raum und phylogenetisch betrachtet) Genen. Die Legende ist gleich (siehe Anhang 9.8).

4.8 Das Substrat: Epoxyqueuosin

Hier sind die unterschiedlichen Wege um das Substrat Epoxyqueuosin herzustellen geschildert.

4.8.1 Chemische Synthese von Queuosin

4.8.1.1 Theorie

Es wurden in verschiedenen Forschungsgruppen unterschiedliche chemische Synthesewege für Queuosin benutzt. Diese wurden von Dr. Csaba Paizs untersucht um einen günstigeren und schnelleren Weg der Synthese von Epoxyqueuosin und Queuosin zu finden.

4.8.1.2 Die Organische Synthese

Die Organische Synthese von Queuin, der freien Base, ist im Anhang 9.9 geschildert. Ein günstigerer Weg für die Synthese von Queuosin wurde gefunden, allerdings ist es bis jetzt nicht gelungen, den Epoxidring einzufügen, ohne den restlichen Teil des Moleküls zu ändern.

4.8.2 Isolierung von Queuosin aus einer *E. coli* MRE600-Nukleoside-Mischung

Das spezifische tRNA ist nach Abschnitt 3.1.6.14.4 aus der tRNA-Mischung isoliert. Dann wird das tRNA verdaut (siehe Abschnitt 3.1.6.14.3). Daraufhin werden die Nukleosiden nach der Methode im Abschnitt 3.1.6.14.4 voneinander getrennt. Das Queuosin ist nach 13 min eluiert (siehe Abb. 4-4).

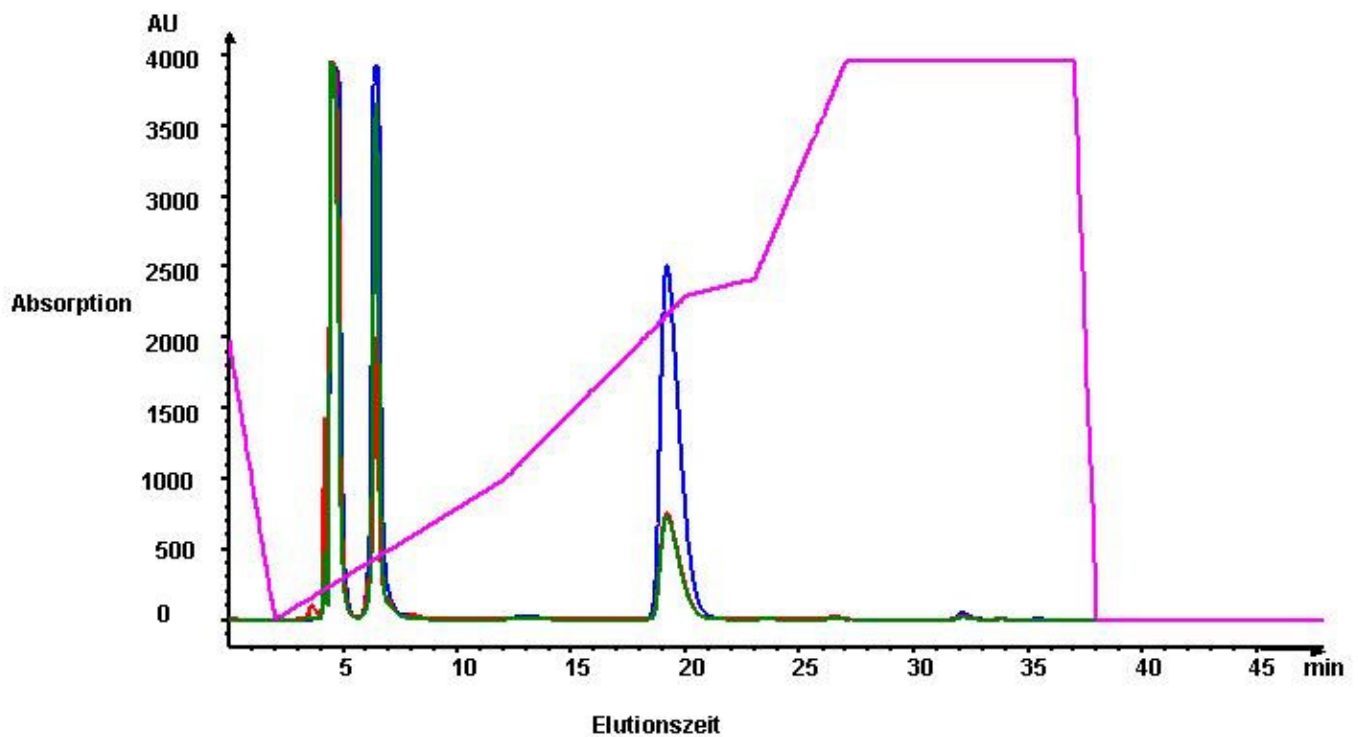


Abb. 4-55: Elutionsprofil der HPLC-Reversephase-Chromatographie einer Nucleosid-Mischung. Absorption der Basen bei 222 nm (rot) bei 254 nm (blau) bei 235 nm (grün) in Absorptionseinheiten (AU) als Funktion der Zeit in min. Queuosin ist zwischen 13 und 14 min eluiert.

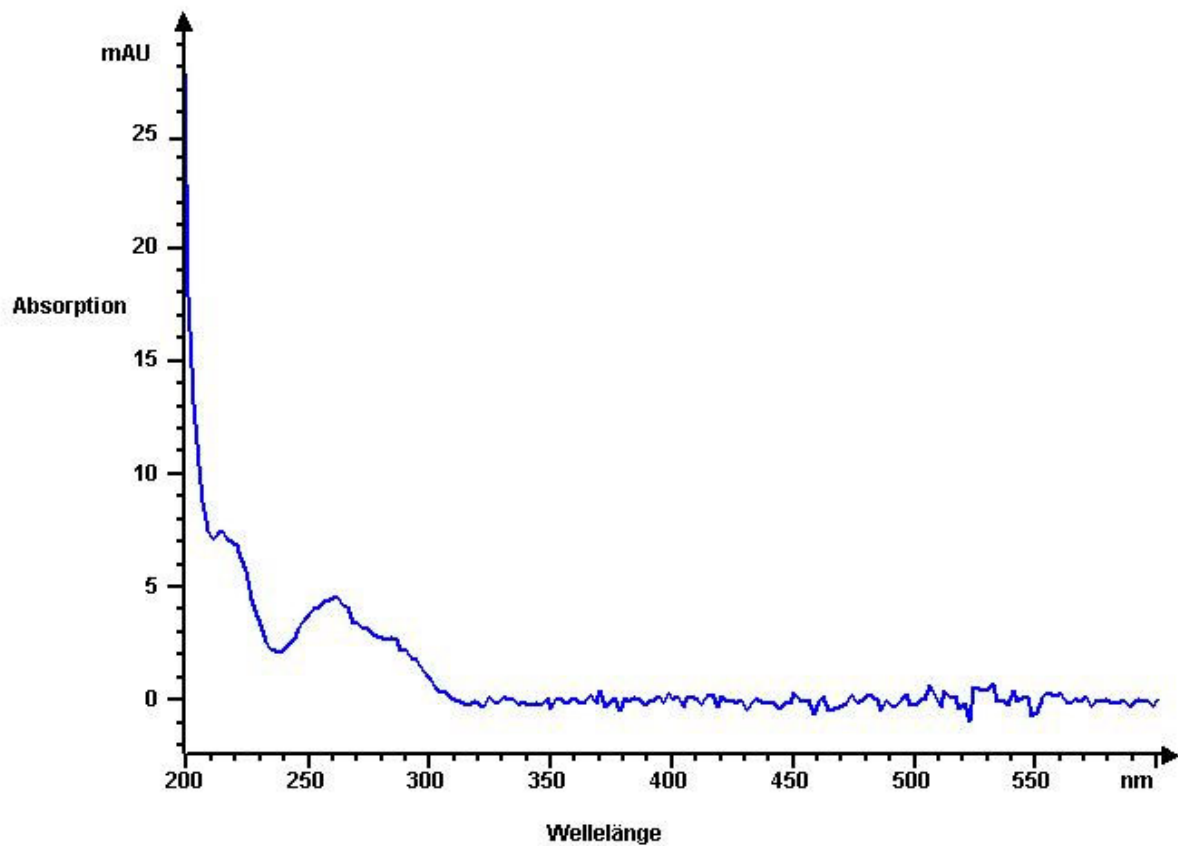


Abb. 4-56: „Snapshot“ des „Queuosin Peak“ (zwischen 13 und 14 min).

5 Diskussion

5.1 [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex

Da das [⁵⁷Co] Cobalamin sehr klein ist, würde es während der Elektrophorese aus dem Gel laufen. Es muss folglich an dem Protein gebunden sein, damit im Gel Radioaktivität messbar ist.

Außerdem konnte ein stabiler Cobalamin-Protein-Komplex teilweise gereinigt werden.

Die Tatsache, dass im ausgeschnittenen Gel keine Radioaktivität messbar war, weist darauf hin, dass mehrere Proteinbanden für die im vollständigen Gel gemessene γ -Strahlungen verantwortlich sind.

5.2 Immunoblotting mit Antikörper gegen Cobalamin

Die Tatsache, dass der Immunoblot der Nativ-PAGE keine Banden zeigte, bedeutet, dass es kein Cobalamin oder kein zugängliches Cobalamin gab. Dies ist bei den nativen Proteinen sehr wahrscheinlich der Fall.

Die Tatsache, dass der Immunoblot der SDS-PAGE keine Banden zeigte, bedeutet entweder, dass das Cobalamin nicht zugänglich war oder während der Probearbeitung für die SDS-PAGE, während des Blottens oder während der Immunodetektion verloren gegangen ist.

5.3 Western-Blot von [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex

Die Tatsache, dass das Blotten des SDS-Polyacrylamidgels und das 2D-Polyacrylamidgel keine Radioaktivität aufwies, bestätigt die mit dem Immunoblotting mit Antikörper gegen Cobalamin erhaltenen Ergebnisse.

Wenn man annimmt, dass es einen [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex in dem Nativ-Polyacrylamidgel und nicht in dem denaturierten Polyacrylamidgel gibt, und daher das Cobalamin in dem geblotteten nativen und denaturierten Polyacrylamidgel nicht zugänglich ist, kann man daraus schließen, dass sich das Cobalamin

-innerhalb des Proteins befindet,

-während der Probearbeitung für das SDS-PAGE, wenn das Protein in Untereinheiten zerlegt ist, Cobalmin verloren geht.

5.4 Die Cobalamin-Agarose-Bindeproteine

Die Epoxyqueuosin-Reduktase sollte die Reduktion eines Epoxyd-Rings katalysieren, der sich auf einer Ribose befindet (siehe Einleitung).

Es wurden Proteine aus einem *E. coli*-Protein-Rohaufschluss, mit interessanten Eigenschaften, wie Affinität für Zucker, isoliert: die „D-Galactose-binding periplasmic protein precursors auch D-Galactose/ D-Glucose binding protein GGBP“ genannt. Da die putativen Proteine yaaJ, ybiB und yajB ganz unbekannt sind, verbleibt die Möglichkeit, dass sie die Reduktion von oQ katalysieren.

5.5 Isolierte *yaaJ* un *lpxC* Gene mit dem „base-off-mode“ Cobalaminbindungsmotiv

Isolierte Gene:

Das yaaJ Protein ist unbekannt.

Das lpxC Enzym weist eine Hydrolase-Aktivität auf.

Beide Proteine könnten multifunktionell sein und für die Reduktion von Epoxyqueuosin zu Queuosin verantwortlich sein.

5.6 Der Southern Blot

Durch die Etablierung einer Methode zur Vorbereitung für die Isolierung und Klonierung des oQ-Reduktase entsprechenden Gens konnte die Grundlage gelegt werden. Nachdem einige potentielle Kandidaten gefunden wurden, wurden weitere Untersuchungen unternommen, wie PCRs mit dem Cobalamin-“base-off-mode“-Bindungsmotiv, die Anwendung von Bioinformatik, und die Organische Synthese des Substrat Epoxyqueuosin (von Dr. Csaba Paizs übernommen).

5.7 Unterschiedliche Bioinformatik-Untersuchungen

5.7.1 Das Motiv

Das in diesen drei Enzymen (DDH, GDH, RNTPR) gefundene Motiv enthält eine Vielzahl konservierter Aminosäuren:

Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den α -Untereinheiten

Y-X(n)-L-X-X-C-X(n)-T-E-X(n)-T-X(n)-G-X(n)-A-X-XX-A-
X(n)-S-X(n)-E-X(n)-L-X(n)-I-T-K-X(n)-G-X(n)-E-X(n)-I-X(n)-N

Abb. 5-1: Neuer „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv von Diol-Dehydratase, Glycerol-Dehydratase und Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase- α -Untereinheiten (siehe 4-38, Bioinformatik).

Cobalaminbindungsmuster abgeleitet von den β -Untereinheiten

A-X(n)-Y

Abb. 5-2: Neuer „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv von Diol-Dehydratase, Glycerol-Dehydratase und Ribonukleotid-Triphosphat-Reduktase β -Untereinheiten (siehe 4-41, Bioinformatik).

Da die DDH aus *Klebsiella oxytoca*, die GDH aus *Klebsiella pneumonia* und RNTR aus *Lactobacillus leichmanii* aus drei unterschiedlichen Mikroorganismen stammen und die DDH-GDH und RNTR Enzyme sehr unterschiedliche dreidimensionale Strukturen haben, sind diese konservierten Aminosäuren des neuen „base-on-mode“ Bindungsart Cobalaminbindungsmotivs besonders wichtig.

Da die RNTR den Ribose-Zucker zu Desoxyribose reduziert, die Diodehydratase 1,2 Ethandiol, 1,2 Propandiol und Glycerol zu Acetaldehyd, Propionaldehyd bzw. 3-Hydroxypropionaldehyd umsetzt und die Glyceroldehydratase Glycerol in 3-Hydroxypropionaldehyd umsetzt, ist es möglich, dass die oQ-Reduktase einen ähnlichen Katalyse-Ablauf aufweist.

5.7.2 Das Gen *yajB*

Das Gen *yajB* befindet sich neben *queA* und *tgt*, den zwei bekannten Genen, die in der Biosynthese von Q direkt beteiligt sind. Deren Produkt ist unbekannt. Es könnte sehr wahrscheinlich an der Biosynthese von Q enthaltenden tRNA beteiligt sein.

5.8 Das Substrat

5.8.1 Die organische Synthese

Die Epoxyqueuosin-Reduktase sollte das Epoxyqueuosin zu Queuosin in tRNA umsetzen. Das Produkt Queuosin, wurde als freie Base synthetisiert. Allerdings war die Einführung des Epoxyd-Rings in den Ribose schwierig (Anhang 9.9), weil hierbei auch der Stickstoff des Purinrings oxidiert wird. Keines der zahlreichen unterschiedlichen Oxidationsmittel, die probiert wurden, hat dies erreicht ohne gleichzeitige Oxidation des Stickstoffs des Purins.

5.8.2 Die Isolierung von oQ

Die Menge des auf diesem Weg gereinigten oQ war so niedrig, dass sie keine Untersuchungen (Aktivitätstest, weitere RP18-HPLC Trennungsv erfahren, MALDI-TOF-MS Analyse...) mit den Geräten in unserem Labor zuließ.

Die oQ Isolierung konnte etabliert werden und stellt eine gute Methode dar, um oQ in einer Basenmischung nachzuweisen.

6 Zusammenfassung

[⁵⁷Co] Cobalamin-Protein-Komplex:

Mittels Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie wurde ein [⁵⁷Co] Cobalamin-Protein Komplex aus einem *E. coli*-Rohaufschluss teilweise gereinigt und auf einem Nativ-Polyacrylamidgel detektiert. Der Komplex wurde allerdings nicht auf dem SDS-Polyacrylamidgel beobachtet.

Immunoblotting mit Antikörper gegen Cobalamin:

E. coli MRE600 Zellen wurden in Minimalmedium gezüchtet und der Protein-Rohaufschluss wurde mit PAGE und Immunoblotting untersucht.

Mittels Antikörper gegen Methyl- und Adenosylcobalamin konnte kein Cobalamin in dem geblotteten nativen oder denaturierten Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

Western-Blot des [⁵⁷Co]Cobalamin-Protein-Komplexes:

E. coli MRE600 Zellen wurden in einem radioaktiven [⁵⁷Co]-Cobalamin enthaltenden Medium gezüchtet und der Protein-Rohaufschluß wurde mit PAGE untersucht und zusätzlich auf einer Membran immobilisiert.

Hier wurde ein radioaktives [⁵⁷Co] Muster des geblotteten nativen Polyacrylamidgel gefunden. Dies war nicht der Fall für das geblottete SDS-Polyacrylamidgel.

Die Cobalamin-Agarose-Bindeproteine:

E. coli MRE600 Zellen wurden in einem Minimalmedium gezüchtet und der Protein-Rohaufschluss wurde mittels Anionenaustausch- und Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend mit PAGE analysiert. Es konnten vier Proteine isoliert werden:

- das putative Protein *ybiB*,
- der „histidin-binding periplasmic protein precursor HBP“,
- die D-Galactose bindenden periplasmatischen Proteinvorläufer, auch D-Galactose/ D-Glucose bindenden Protein „GGBP“ genannt,
- das „putative 21.9 kDa Protein ORF1“.

Isolierte *yaaJ* und *lpxC* Gene mit dem „base-on-mode“ Cobalaminbindungsmotiv:

Mittels PCR von vier rückübersetzten Primern des B₁₂ „base-off-mode“ Bindungsmotivs und der genomischen Bibliothek *E. coli MRE600* des Genoms wurden zwei Gene gefunden: *yaaJ* und *lpxC*.

YaaJ Produkt ist ein unbekanntes Protein, das Ähnlichkeiten mit Alanin-Natrium Symporter aufweist.

Das *LpxC* Produkt ist eine Hydrolase.

Der Southern Blot:

Die Methode wurde etabliert.

Unterschiedliche Bioinformatik-Untersuchungen:

Ein „base-on-mode“ Bindungsmotiv ist mittels der Applikation „Clustal“ von „HUSAR“ identifiziert worden.

7 Zukünftige Arbeiten

7.1 Laufende Arbeiten

Auswertung der Affinität der isolierten Proteine mit dem Substrat oQ und Cofaktor Cobalamin:

Es handelt sich um einen virtuellen Versuch mit den Proteinen (oder den Proteinen entsprechenden Genen), dem Substrat oQ und dem Cofaktor Adenosylcobalamin. Es wird im MPI gerade durchgeführt. Dies ist eine anspruchsvolle Aufgabe, wenn die dreidimensionale Struktur unbekannt ist, was oft der Fall ist.

7.2 Weitere Pläne

Konstruktion von „knock-out“ *E. coli*-Stämmen und Aktivitätstest:

Um zu überprüfen, ob die isolierten Proteine und Gene in der Reduktion von oQ zur Q beteiligt sind, sollen knock-out *E. coli*-Stämme konstruiert werden. Es entstehen dann 7 unterschiedliche Stämme. Es soll zusätzlich ein Reporter gen enthalten, dessen Promotor nur von Queuosin enthaltenden tRNA induzierbar sein sollte. Zum Beispiel wäre die β -Galactosidase ein hervorragendes Reporter gen und ihr Promotor in einer Sequenz enthalten, die für ein Poly-His, Poly-Asp, Poly-Asn oder Poly-Tyr codieren sollte. Es sind die Aminosäuren, die von den tRNAs getragen sind, die Queuosin enthalten. Dann sollen die Stämme auf einem Medium, das X-Gal enthält, gezüchtet und ausplattiert werden. Dies würde ein einfaches Screening erlauben.

Für die „knock-out“-blau-Kolonien wird das „knock-out“-Gen nicht für die Reduktion notwendig sein. Wenn weiße Kolonien entstehen, dann kann man ausschließen, dass das „knock-out“ Gen notwendig ist für die Q-Biosynthese.

Falls alle sieben „knock-out“ Stämme blau sein sollten, würde es bedeuten, dass keines dieser Gene für die Reduktion von oQ zu Q notwendig ist.

Alternative zur Konstruktion von „knock-out“ *E. coli*-Stämmen:

Es könnte das gesamte *E. coli* Genom, ungefähr $5 \cdot 10^6$ Bp, durch 10 geteilt werden (Verdau mit Restriktionsenzymen) und entsprechende „knock-out“-Stämme konstruiert werden. Dies ergäbe 10 unterschiedliche Stämme.

Sie wären genauso konstruiert wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass in jedem „knock-out“-Stamm 9/10 des *E. coli* Genoms entfällt.

Das $5 \cdot 10^8$ Bp DNA-Fragment der weißen Kolonie solle wieder verdaut werden, so daß 10 weitere „knock-out“-Stämme daraus resultieren werden und dies kann nach dem selben Verfahren wiederholt werden, bis das Gen genau identifiziert ist.

Eine Variante dieser Methode wäre, die *E. coli* Genom-Bibliothek zu benutzen, um Zellen zu transduzieren, die nur ein Plasmid mit einem Reporter gen enthalten, deren Promotor von Q-enhaltender-tRNA induzierbar wäre.

Enzymatische Synthese von Epoxyqueuosin mit Aktivitätstest:

Enzyme beschleunigen hochspezifische Reaktionen. Deshalb wäre es ein sehr interessanter Weg, das Epoxyqueuosin-Reduktase-Substrat, Epoxyqueuosin, enzymatisch zu synthetisieren. Das Substrat könnte zudem radioaktiv markiert werden. Dies könnte die Reinigung der Epoxyqueuosin-Reduktase und den Aktivitätstest vereinfachen.

Erst sollte preQ1 chemisch synthetisiert werden. Die Enzyme, die an dieser ersten Reaktion beteiligt sind, sind unbekannt. Man vermutet, dass es eine GTP-Cyclohydrolase-ähnliche Reaktion ist.

Das preQ1 sollte enzymatisch mit Hilfe von tRNA-Guanosin-Transferase-Isomerase (*Tgt*) und Ribosyl-Transferase-Isomerase (*QueA*) (beide Enzyme sind von mehreren Forschungsgruppen untersucht worden und ihre Gene sind kloniert worden) zur oQ-enhaltenden tRNA, dem Substrat der Epoxyqueuosin-Reduktase, führen.

Ablauf:

Es solle das Enzym *Tgt* gereinigt werden. Das Enzym fügt preQ1 anstelle des Guanin ein, das sich in Position 34 in tRNA^{Glu, Asp, Asn, His} befindet.

Der Basenaustausch mit der passenden Menge preQ1 (in mg Mengen synthetisiert), tRNA^{Glu}, tRNA^{Gln}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn} oder tRNA^{His} (käuflich), *Tgt*, Puffer, sollte in-vitro durchgeführt werden. Dann würde eine Abtrennung der *Tgt* von der preQ1-tRNAs mit Hilfe eines Microcons erfolgen.

Danach würde eine RP18-HPLC mit der modifizierten tRNA und einer unmodifizierten tRNA als Standard durchgeführt. Die Identifizierung der modifizierten tRNA enthaltenden Fraktion kann mit MALDI-TOF-MS erfolgen.

Falls preQ1 markiert ist, ist ein RP18-HPLC-tRNA Reinigungsschritt, gefolgt von der Identifizierung der produkthaltigen Fraktion und MALDI-TOF-MS-Analyse, ausreichend. Dafür ist es nötig, eine einzige von den 4 tRNAs als Substrat zu nehmen, um den kleinen Massenunterschied zwischen Substrat (Guanosin enthaltende-tRNA) und Produkt (preQ1 enthaltende-tRNA) festzustellen.

Wenn es eine ausreichende Menge an modifizierter tRNA gibt, sollte der zweite In-vitro-Biosyntheseschritt folgen, die Ringeinfügung des Ribosyl-Rings. Dafür benötigt man das Enzym queA.

Bis jetzt standen die *tgt* und *QueA* enthaltenden Plasmide für uns nicht zur Verfügung, um diesen Weg zu untersuchen. Deswegen haben wir uns entschieden, mit der Affinität der oQ-Reduktase zu Cobalamin zu arbeiten.

Synthese von oQ mit Hilfe eines „Ribonucleotide Synthesizer“:

Es verbleibt die Möglichkeit, mit Hilfe eines Ribonukleotid-Synthesizers die oQ oder Q Synthese zu versuchen. In dem Institut für Organische Chemie ETH Lausanne hat Prof. Dr. Stefan Pitsch die Möglichkeit, diesen Weg zu untersuchen.

8 Literatur

[1] Barnett, C. J., Grubb, L. M. (2000), Total synthesis of Q Base (Queuine), *Tetrahedron* 56, 9221-9225.

[2] French, B. T., Dawn, E. P., Grever, R. M., Trewyn, R. W. (1991), Queuine a tRNA anticodon wobble base, maintains the proliferative and pluripotent potential of HL-60 cells in the presence of the differentiating agent 6-thioguanine, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 370-374.

[3] Frey, B. McCloskey, J. A., Kersten, W., Kersten, H. (1988), New function of vitamin B₁₂: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *J Bact* 170, 2078-2082.

[4] Langgut, W. (1996), Modulation of the proliferation and metabolism of tumor cells by the nutrition factor queuine, *Endobiocyt. C. Res.* 3, 393-398.

[5] Niroshima, S. (1983), structure, biosynthesis, and function of queuosine in transfer RNA, *Pro. Nucleic Acids Res. Mol Biol.* 28, 49-73.

[6] Ovaa, H., Jeroen, D. C., Lastdrager, B., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. (1998), A stereoselective and efficient Route to (3R, 4S, 5S)-4,5-Dihydroxycyclopent-1-3-ylamine: the side chain of the hypermodified nucleoside Q, *Tetrahedron Lett* 39, 7987-7990.

[7] Phillipson, D. W. (1987), Isolation and structure elucidation of an epoxide derivative of the hypermodified nucleoside queuosine from *Escherichia coli* transfer RNA, *J Biol Chem* 262, 3462-3471.

- [8] Reuter, K., Slany, R. K., Ullrich, F., Kersten, H. (1991), Structure and organization of *Escherichia coli* genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuosine, a nutrient factor for eucaryotes, *J Bact* 173, 2256-2264.
- [9] Rist, W. (1999), Untersuchungen zur cobalamin-abhängigen Reduktion von Epoxyqueuosine zu Queuosine sowie die Herstellung einer Genbibliothek von *Escherichia coli*, Diplomarbeit.
- [10] Slany, R. K., Kersten, H. (1994), Genes, enzymes and coenzymes of queuosine biosynthesis in procaryotes, *Biochem* 76, 1178-1182.
- [11] Escalante-Semerena, J. C., Roth, J. R. (1987), Regulation of cobalamin biosynthetic operons in *Salmonella typhimurium*, *J Bact* 169, 2251-2258.
- [12] Pawelkiewicz, J., Sroga, G. E., Starzynska, E., Zawielak, J (1986), Formation of queuine-containing tRNA^{Tyr} in higher plants, *Plant Sci* 47, 83-89.
- [13] Reyniers J. P., Katze J., Farkas, W. R. (1989), The absence of the diet-derived 7-deazapurine, queuine in artificial liquid diets, *JPEN* 13, 542-544.
- [14] Cmarik, J. L., Min, H., Hegameyer, G., Zhan, S., Kulesz-Martin, M., Yoshinaga, H., Matsushashi, S., Colburn, N. H. (1999), Differentially expressed protein pdcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14037-14042.
- [15] Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L. F., Hawighorst, T., Bornstein, P., Detmar, M. (1999), Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor and growth angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14888-14893.

[16] Haumont, E., Droogmans, L., Grosjean, H. (1987), Enzymatic formation of queuosine and glycosyl queuosine in yeast tRNAs microinjected xenopus laevis oocytes. The effect of anticodon loop sequence, *Eur J Biochem* 168, 219-225.

[17] Mueller, S. O., Slany, R. K. (1995), Structural analysis of the tRNA modifying enzymes Tgt and queA with a substrate tRNA, *FEBS Letters* 361, 259-264.

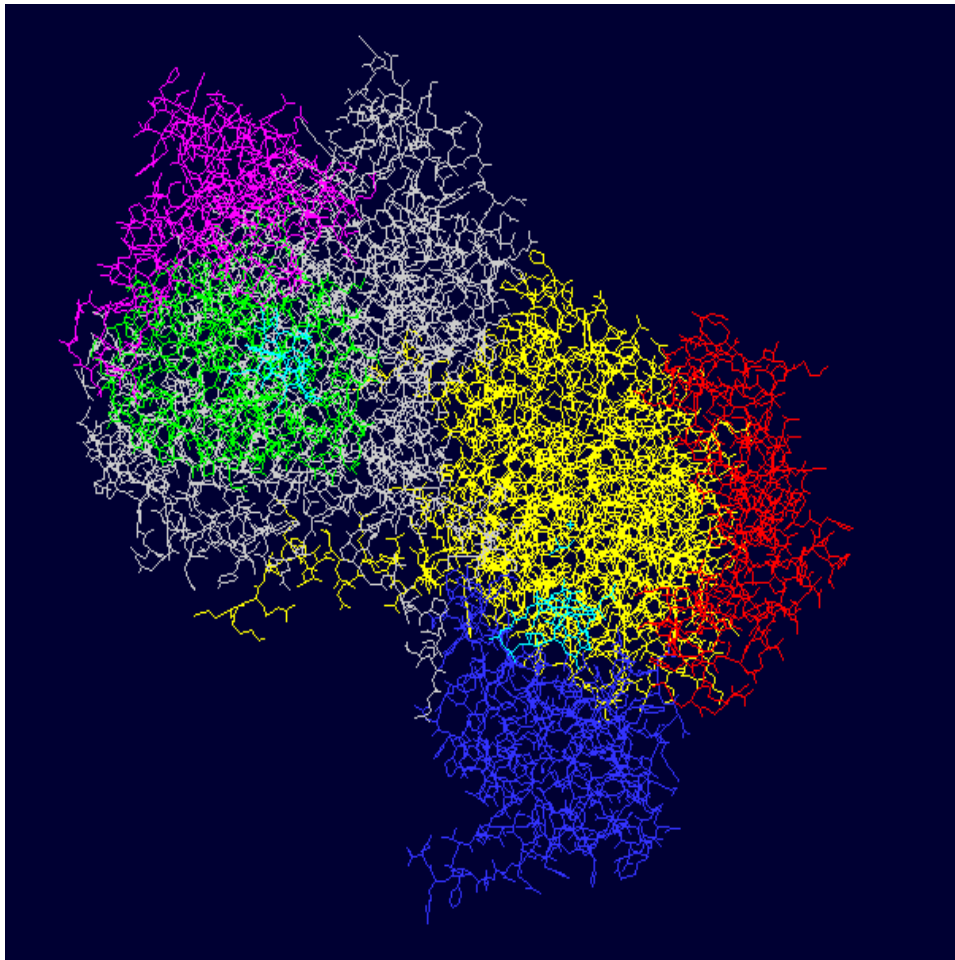
[18] Kushino, Y., Kimura, K., Akimoto, H., Nomura, H., Akita, N., Nishimura, S. (1987), Preparation and characterization of Monoclonal antibodies for the Base, queuine, *Proc Jap Acad* 63, 393-396.

[19] Akimoto, H., Imamiya, E., Hikata, T., Nomura, H. (1988), Synthesis of queuine, the base naturally occurring hypermodified nucleoside (queuosine and its analogues), *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1637-1644.

9 Anhang

9.1 GDH

Glycerol dehydratase-B₁₂, ($\alpha\beta\gamma$)₂, pdb: 1IWP



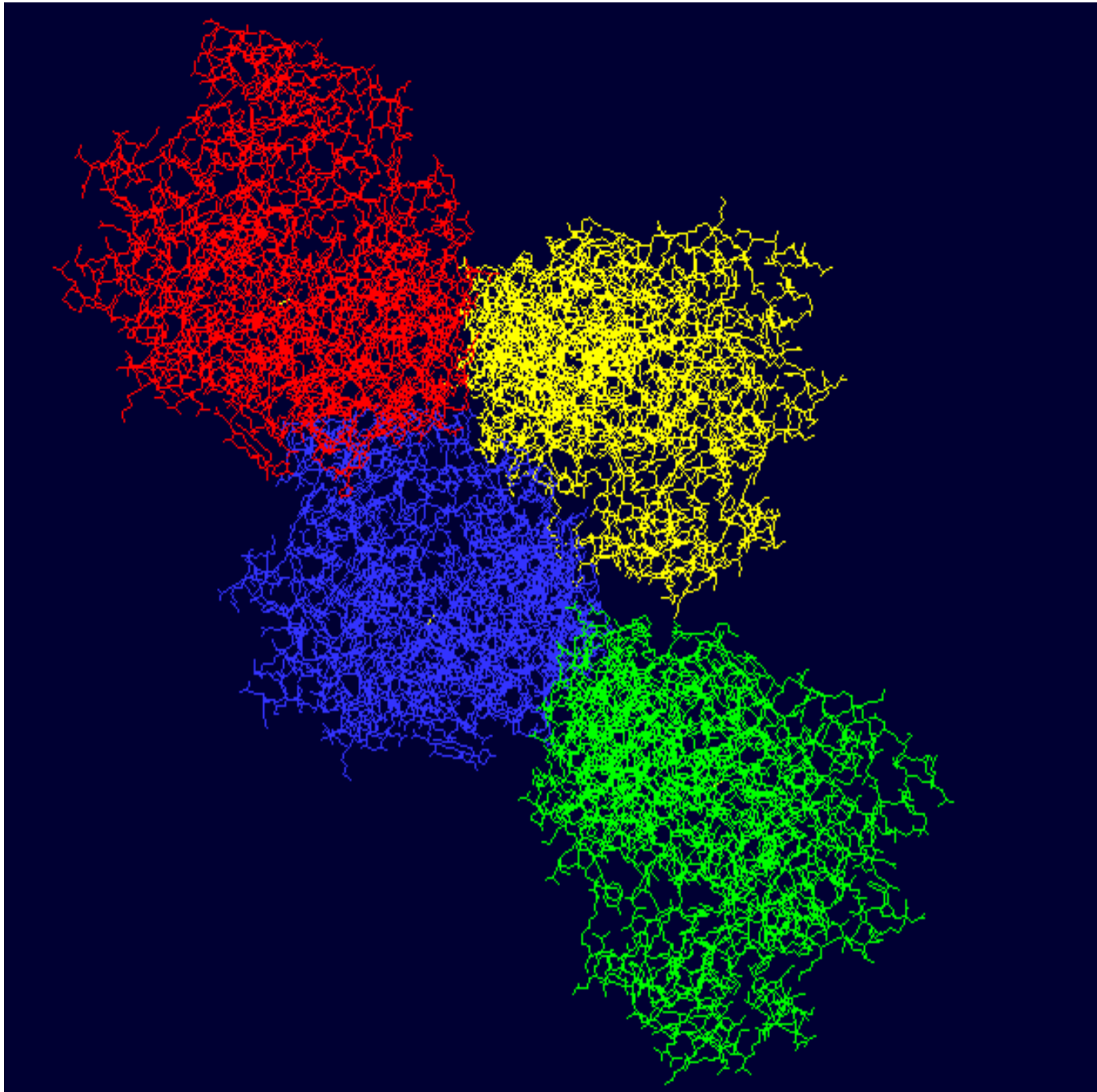
Enzymname	Glycerol Dehydratase
Abkürzung	GDH
E. C.	4.2.1.30
Organismus	Klebsiella Pneumonia
Gencode	gldABC
EMBL ID	KP30903
Länge der Gene	7926 Bp
Untereinheiten Verteilung	($\alpha\beta$) ₂
PDB	1 IWB, 1MMF
Sw oder trEMBL	trEMBL: Large α : Q59476, Medium: Q59474, β : O08505, small: Q59475
Aminosäurezahl und Molekulargewicht	555 as/60659 Da, 607 as/63594 Da, 184 as/21355Da, 141 as/ 16104 Da
Beste(r) Cofaktor	Adenosyl cobalamin with K ⁺ , Mg ²⁺ , Rb ⁺ , SO ₃ ²⁻ . (Inhibitor: Cyanocobalamin)
Cobalamin bindende Aminosäuren	α : H144, E171, Q297, D336; β : S122, P155
Bindungsbereich	α : as H144 bis D336; β : as S122 bis P155
Cofaktor Bindungsmodell	Base-on mode
Katalysierte Reaktion	Propane-1,2-diol \rightleftharpoons Propanal + H ₂ O

9.2 DDH

Enzymname	Diol Dehydratase
Abkürzung	DDH
E. C.	4.2.1.28
Organismus	Klebsiella oxytoca
Genname	DDRA (Diol Dehydratase Reactivating Factor Large Subunit) und DDRB (DDH RF Small Subunit), PDDA (α) Pddb (β) und PDDC (γ)
EMBL ID	AF017781 für DDRA und DDRB, D45071 für PDDA Pddb PDDC
Länge der Gene	2640 BP für AF017781 und 3240 BP für D45071
Untereinheiten Verteilung	Large (Ls) und small (Ss) subunits, ($\alpha\beta\gamma$) ₂
PDB	1IWB, IDIO...
Sw oder trEMBL	trEMBL: Ls: o68195, Ss: o68196, α : Q59470, β : Q59471, γ : Q59472
Aminosäurezahl und Molekulargewicht	Ls: 610 as/ 64 266 Da Ss: 125 as/ 13 620 Da, α : 554 as/ 60 348 Da β : 224 as/ 24 114 Da und γ : 173 as/ 19 172 Da
Beste(r) Cofaktor	Adenosyl-Cobalamin (Coenzyme B12) mit Cs+, K+, Na+, NH ₄ ⁺ , Rb+ or Ti+
Cobalamin bindende Aminosäuren	α : T172 E205 T222 D234 M373, β : D112 N150 Q156 mit Cobalamin Ring, β : T137 K135, P155, S200 mit Loop
Bindungsbereich	α : T172 bis M373 und β : D112 bis S200
Cofaktor Bindungsmodell	Base-on mode
Katalysierte Reaktion	Propane-1,2-diol \rightleftharpoons Propanal + H ₂ O

9.3 RNTR

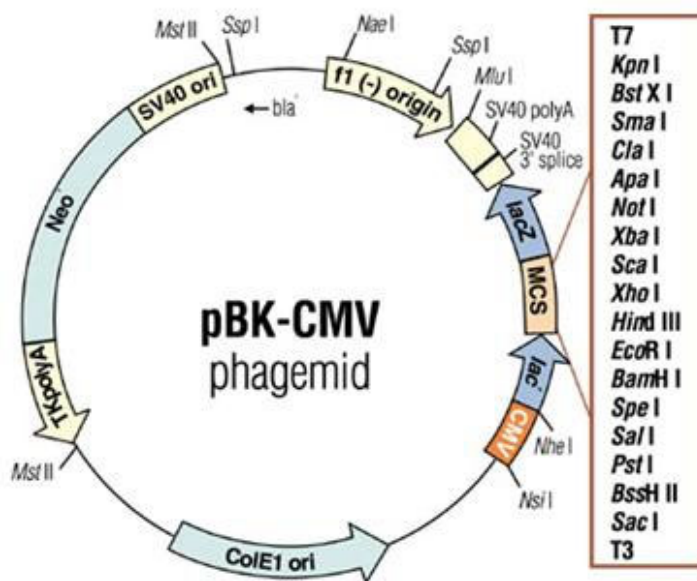
Die Ribonukleotide-Triphosphate-Reduktase, α_4 , pdb: 1L1L



Enzymname	Ribonucleoside Triphosphate Reductase
Abkürzung	RTPR
E. C.	1.17.4.2
Organismus	Lactobacillus Leichmannii
Gencode	kein
EMBL ID	L20047
Länge der Gene	2220 Bp
Untereinheitenverteilung	α_4
PDB	1L1L
Sw oder trEMBL	Sw: Q59490
Aminosäurezahl und Molekulargewicht	738 Aminosäure/ 81 851 Da
Beste(r) Cofaktor	Adenosyl-cobalamin (Coenzyme B12) mit Cs+, Li+, K+
Cobalamin bindende Aminosäuren	R32/ Aminosäure 565 bis 626/ Aminosäure 685 bis 724
Bindungsbereich	Keine andere Untereinheit
Cofaktor Bindungsmodell	Base-on mode
Katalysierte Reaktion	2'-Deoxyribonucleoside Triphosphate + oxidiert Thioredoxin \rightleftharpoons Ribonucleoside Triphosphate + reduziert Thioredoxin + H ₂ O

9.4 ZAP-Vektor

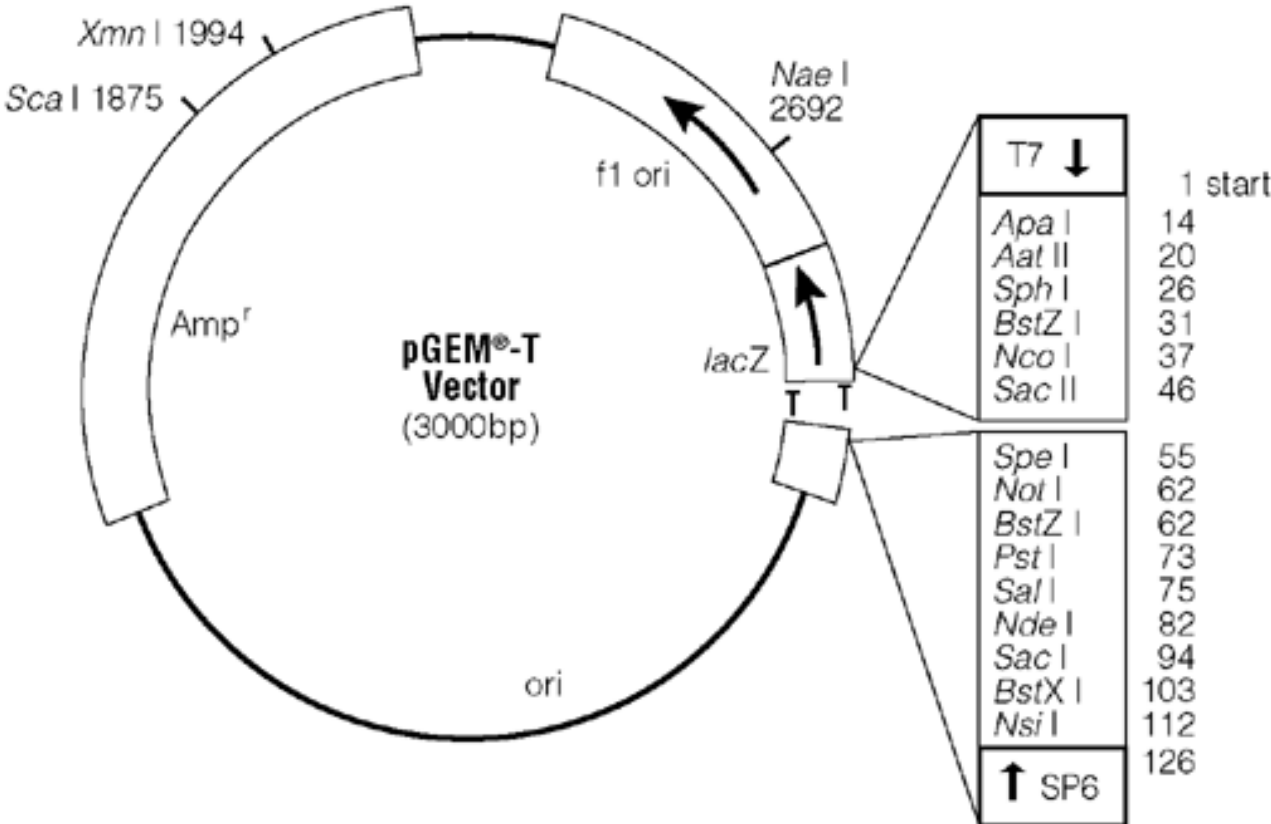
METHODS



1. Genomic DNA is digested with the restriction enzyme Sau3A and delivered 5000 till 10000 base pairs fragments.
2. These fragments were inserted in the BamHI (complementary ends for Sau3A generated ends) cloning site of ZAP express vector.
3. these cloned fragments are then packaged in a phage λ protein envelop. This is the *E. coli* MRE 600 genomic library.

pBK-CMV phagemid vector 4518 bp: ZAP Vector

9.5. P-GEM-T



0356VAw4.gif

9.6. "Mass Fingerprint"

Probe 1

804.036652 41263.000000

805.015464 34787.000000

832.147353 7821.000000

833.145397 5089.000000

1035

1210

1710

1720

2095.521200 2589.000000

2143.518211 2643.000000

2194.638097 2957.000000

2374.527158 1783.000000

2495.304385 2035.000000

2550

2575

Probe 2

782.271237 0.000000

810

1110

1125

1209.599220 2265.000000

1840

2150

2165

2197.783339 10880.000000

2297.875251 12483.000000

2355

Probe 3

790.230619 1818.000000

791.251498 1753.000000

792.255460 2416.000000

794.229683 1880.000000

803.249686 2420.000000

804.770808 3962.000000
806.264598 15916.000000
807.299502 6555.000000
808.249283 2979.000000
836.283638 1613.000000
842.241013 5911.000000
843.260092 3707.000000
844.253444 2549.000000
845.340429 1804.000000
880.204990 6411.000000
881.212864 3415.000000
882.205557 2546.000000
917.288717 2003.000000
918.287818 1828.000000
1114.509105 3704.000000
1115.513738 3022.000000
1233.579966 3224.000000
1234.559017 2570.000000
1639.626532 6431.000000
1640.584171 6648.000000
1798.726706 3576.000000
2377.122411 4390.000000

Probe 6

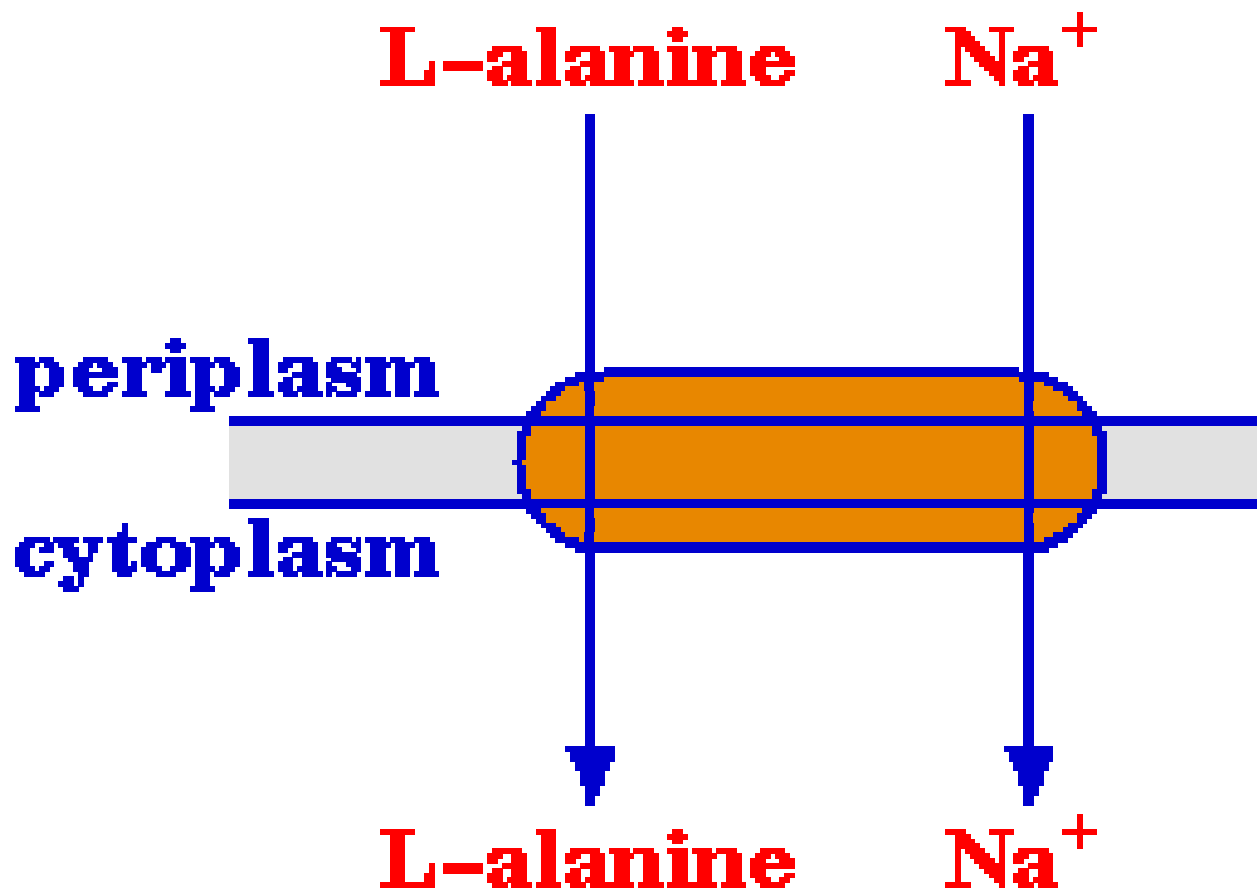
790.230619 1818.000000
791.251498 1753.000000
792.255460 2416.000000
794.229683 1880.000000
803.249686 2420.000000
804.770808 3962.000000
806.264598 15916.000000
807.299502 6555.000000
808.249283 2979.000000
836.283638 1613.000000
842.241013 5911.000000
843.260092 3707.000000

844.253444 2549.000000
845.340429 1804.000000
880.204990 6411.000000
881.212864 3415.000000
882.205557 2546.000000
917.288717 2003.000000
918.287818 1828.000000
1114.509105 3704.000000
1115.513738 3022.000000
1233.579966 3224.000000
1234.559017 2570.000000
1639.626532 6431.000000
1640.584171 6648.000000
1798.726706 3576.000000
2377.122411 4390.000000

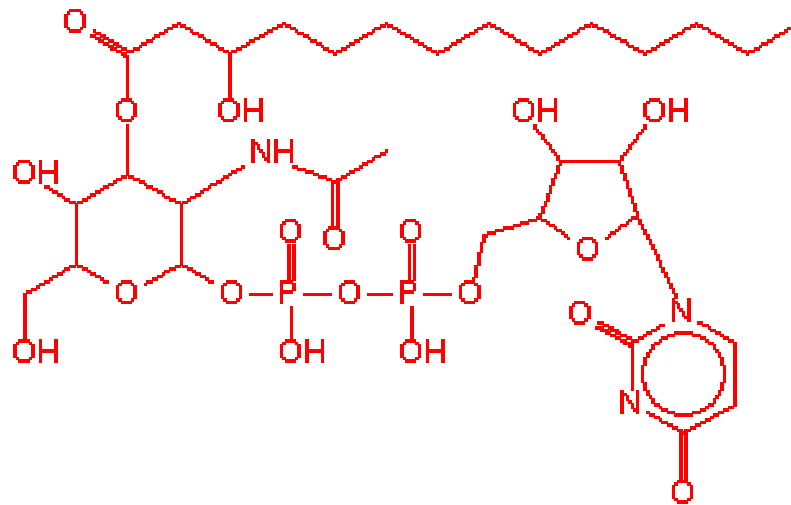
Probe 7

782.271237 0.000000
1310
1450
1595
1556.548766 6714.000000
2331.271073 6078.000000
2345
2365
2385
2645

9.7. YaaJ



LpxC

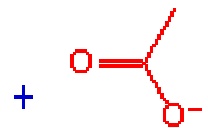


+ H₂O

UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine

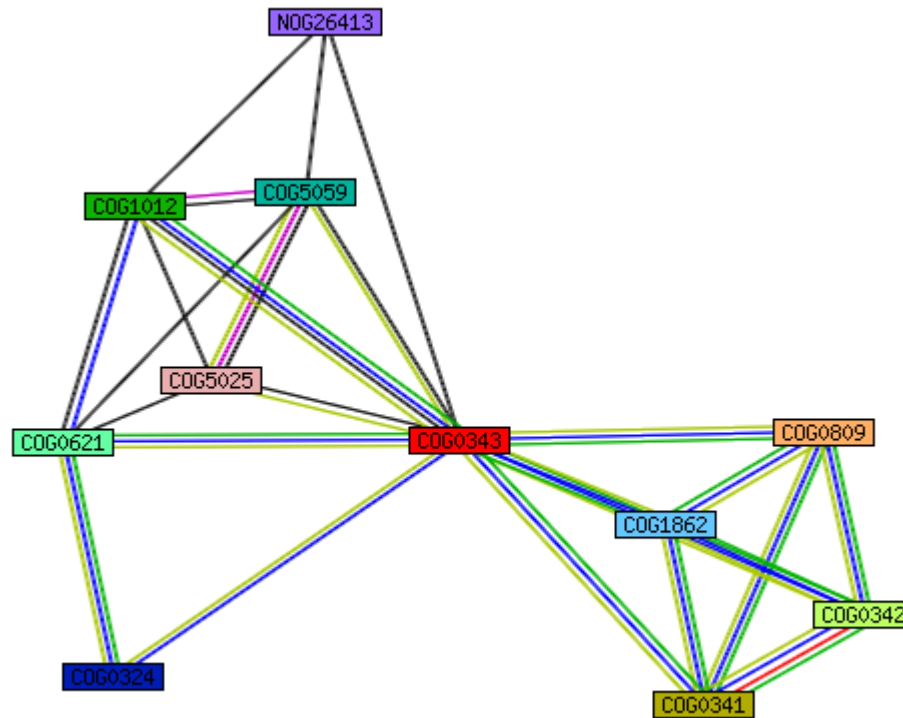


UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine



acetate

9.8. *Tgt* benachbarte Gene



Your Input:

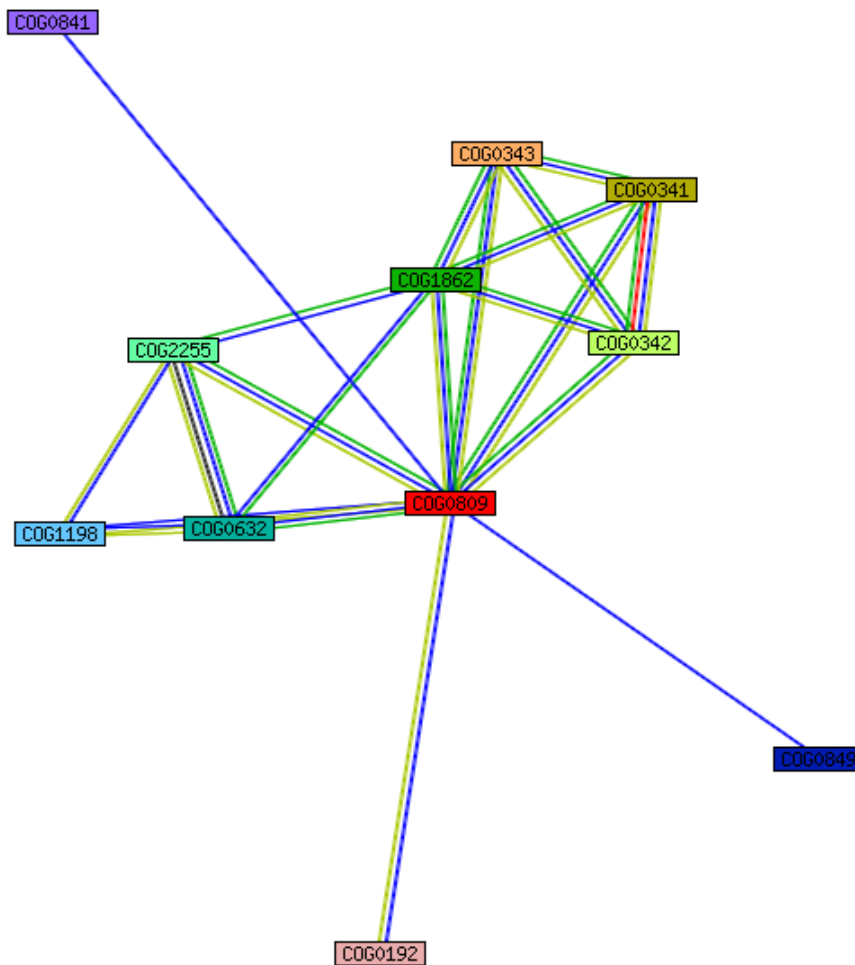
■ COG0343 - Queuine/archaeosine tRNA-ribosyltransferase

Predicted Functional Associations:

■	COG0809	- S-adenosylmethionine-tRNA-ribosyltransferase-isomerase (queuine synthe [...])
■	COG0341	- Preprotein translocase subunit SecF
■	COG0342	- Preprotein translocase subunit SecD
■	COG1012	- NAD-dependent aldehyde dehydrogenases
■	COG0621	- 2-methylthioadenine synthetase
■	COG5059	- Kinesin-like protein
■	COG1862	- Preprotein translocase subunit YajC
■	COG0324	- tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase
■	NOG26413	- non supervised orthologous group
■	COG5025	- Transcription factor of the Forkhead/HNF3 family

Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	Score
●	●	●	●	●	●	●	0.931
●	●	●	●	●	●	●	0.851
●	●	●	●	●	●	●	0.837
●	●	●	●	●	●	●	0.816
●	●	●	●	●	●	●	0.790
●	●	●	●	●	●	●	0.772
●	●	●	●	●	●	●	0.757
●	●	●	●	●	●	●	0.733
●	●	●	●	●	●	●	0.691
●	●	●	●	●	●	●	0.652

QueA benachbarte Gene



Your Input:

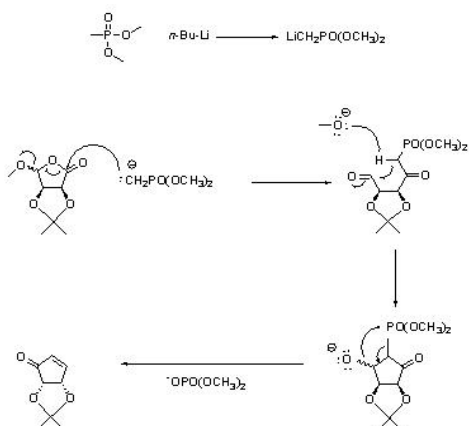
COG0809 - S-adenosylmethionine-tRNA-ribosyltransferase-isomerase (queuine synthe [...])

Predicted Functional Associations:

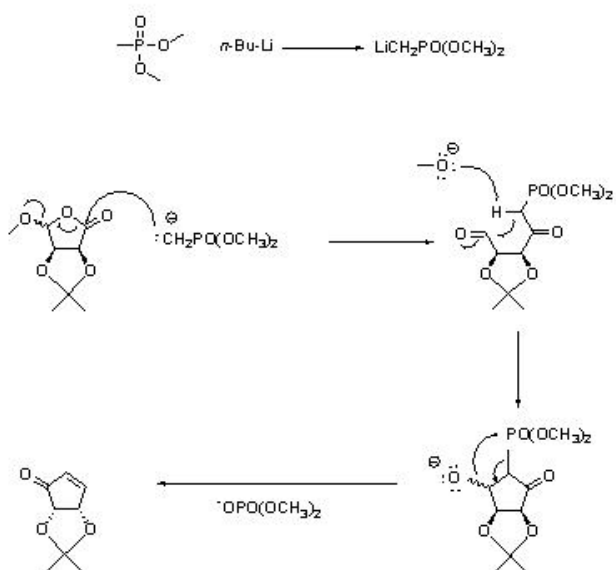
	Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	Score
COG0343 - Queuine/archaeosine tRNA-ribosyltransferase	●						●	0.931
COG0341 - Preprotein translocase subunit SecF	●						●	0.905
COG0342 - Preprotein translocase subunit SecD	●						●	0.902
COG1862 - Preprotein translocase subunit YajC	●						●	0.869
COG2255 - Holliday junction resolvasome, helicase subunit	●						●	0.836
COG0632 - Holliday junction resolvasome, DNA-binding subunit	●						●	0.811
COG1198 - Primosomal protein N (replication factor Y) - superfamily II helicase							●	0.678
COG0849 - Actin-like ATPase involved in cell division			●					0.459
COG0841 - Cation/multidrug efflux pump			●					0.426
COG0192 - S-adenosylmethionine synthetase							●	0.416

9.9. Organische Synthese von Queuin, der freien Base

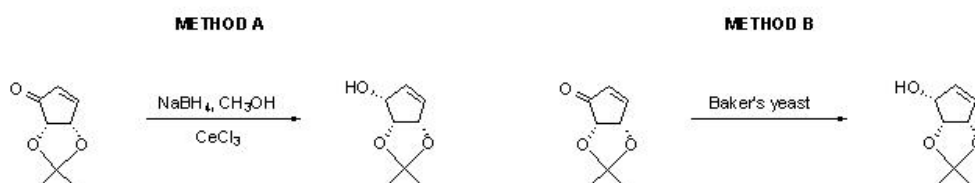
Transformation of the protected lactone into cyclopentenone



Transformation of the protected lactone into cyclopentenone

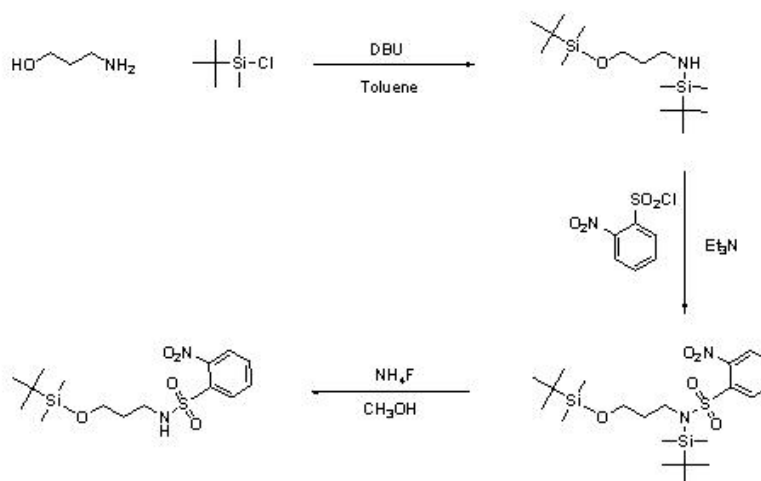


Stereoselective reduction of cyclopentenone

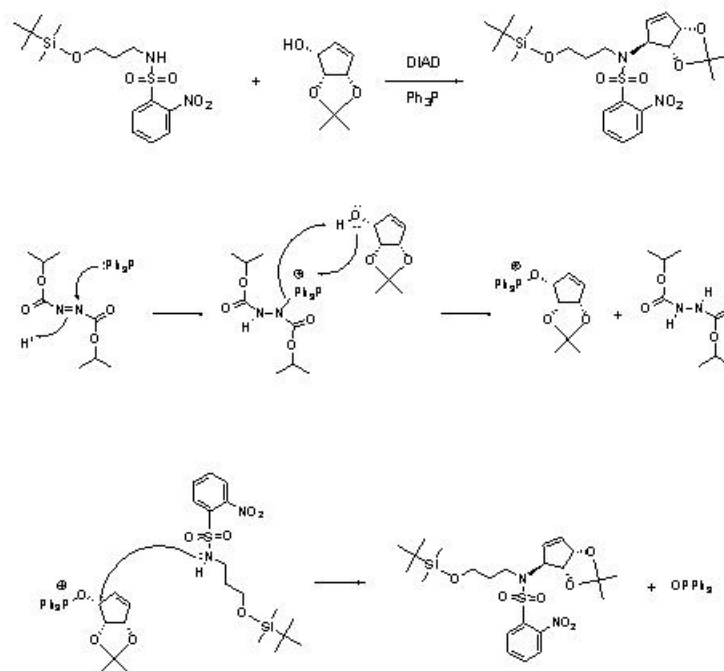


Nr.	Reagent	Conditions	Time (min.)	Yield (%)	e.e. (%)
1	NaBH ₄	Methanol- CeCl ₃	30	87	88
2	Baker's yeast	Fermentative	40	85	67
3	Baker's yeast	Non-fermentative	90	82	91
4	Baker's yeast	Fermentative in pres. of β-cyclodextrin	40	79	99
5	Baker's yeast	Non-fermentative in pres. of β-cyclodextrin	90	76	99

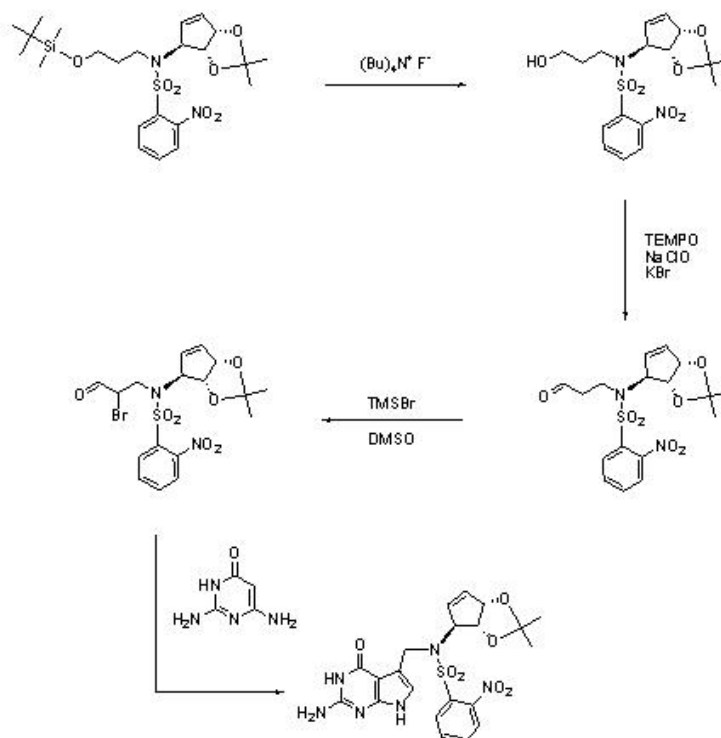
Synthesis of nosyl amine



Mitsunobu reaction

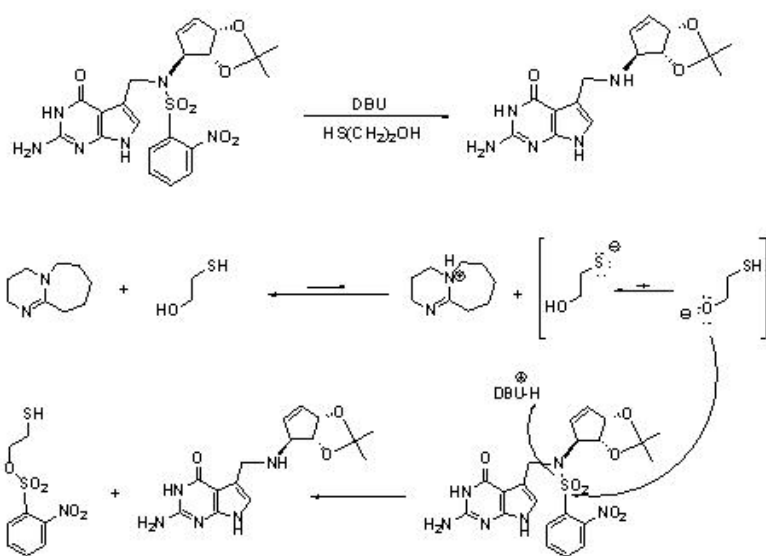


Synthesis of the protected Q Base



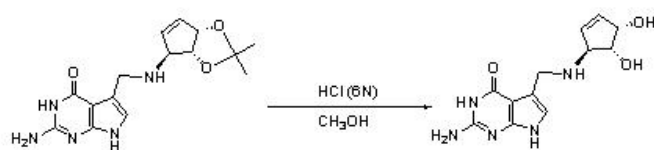
Elimination of the protective groups

1. Denosylation



Elimination of the protective groups

2. Ketal hydrolysis



10. Verzeichnis der häufig verwendeten Abkürzungen

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfate
Dig	Digoxygenine
Anti-dig AK	Nti-Digoxygenine Antikörper
dUTP	Desoxyribose-Uridin-triphosphate
TE	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan -Ethylendiamintetraacetat
UZ	Ultrazentrifuge
ÜS	Überstand
EtOH	Ethanol
MeOH	Methanol
BAP	Bovine Alkalische Phosphatase
CiAP	Cow i. Alkalische Phosphatase
Mon. Anti-Vit. B ₁₂ -IgG- Lösung	Monoklonal Anti-Vitamin B ₁₂ Immunoglobulin G-Lösung
IEF	Isoelektrische Fokussierung

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
PA	Polyacrylamide
TCE	Trichloroessigsäure
HAc	Essigsäure
pH	Potentia Hydrogenii
Gly	Glycin
Asnsäure	Asparaginsäure
Cys	Cystein
APS	Ammoniumpersulfat $-(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
MALDI-(TOF)-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (Time of Flight) Mass Spectrometry
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP18-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
RNA	Ribonukleinsäure

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	isoelektrischer Punkt
CB	Commassie-Blau
o.	oder
APS	Ammoniumperoxodisulfate
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
° C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro min
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure

h(s)	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	KiloDalton
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
OD600	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
oQ	Epoxyqueuosin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
preQ1	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
Q	Queuosin,7-(5-((4,5-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl)amino)methyl)-7-deazaguanosin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSA	Rind Serum Albumin
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1, 3-diol
tRNA	transfer-Ribonucleinsäure
Tyr	Tyrosin

U	Internationale Enzymeinheit (μmol Substrat umgewandelt pro min)
UV	Ultraviolett
MgSO ₄	Magnesium Sulfate
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Ressources
Pdb	Protein Database

Name, Vorname: Bouhzam, Nadia
geboren am: 6 April 1974
Staatsangehörigkeit: französisch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

1992: Naturwissenschaftliches Abitur
Baccalauréat D
Scheurer Kestner Gymnasium, Thann, Frankreich

1994: Vordiplom in Bio-Physico-Chemie
Diplome d'Etudes Universitaires Générales de Bio-physico-chimie
Louis Pasteur Universität (U.L.P.), Straßburg, Frankreich

1995: Austauschstudentin im Rahmen des ERASMUS Programms
Liverpool Universität, England

1996: Vertiefung in Virologie, Mikrobiologie und Biochemie
Licence de Biochimie
Louis Pasteur Universität, Straßbourg, Frankreich

1998: Diplom in Biochemie
Maîtrise de Biochimie
Vertiefung in Molekular-, Zellular-, Mikro- und Virologie
Nebenfach: Neurochemie
Louis Pasteur Universität, Straßbourg, Frankreich

1999: Aufbau Studium
Europäisches Diplom in biomedizinischer Technik
Diplôme Universitaire Européen d'Ingénierie Biomédicale
Fakultät der Pharmazie, Nantes, Frankreich

Seit Oktober 1999: Diplomarbeit und Doktorarbeit beschäftigt mit den Themen
„Epoxyqueuosin-Reduktase in *Escherichia coli*“.