

4. Material und Methoden

4.1. Abkürzungen

Amp	Ampicillin
Ara	Arabinose
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaare
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
Glc	Glucose
GdnHCl	Guanidin Hydrochlorid
Kan	Kanamycin
kb	kilo Base
kDa	kilo Dalton
LB	Luria broth
MMA	MinimalmediumA
rpm	Umdrehungen pro Minute
psi	pound force per square inch
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectomycin
Tet	Tetracyclin
Tre	Trehalose
U	Units

4.2. Materialien

4.2.1. Chemikalien, Kits und deren Bezugsquellen

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Medien und Enzyme wurden von den Herstellerfirmen Biolabs, Boehringer Mannheim, Difco, Merck, Pharmacia, Roth, Serva und Sigma bezogen. Wenn Chemikalien von anderen Herstellern eingesetzt wurden, sind diese gesondert vermerkt.

4.2.2. Medien

Als Medien wurden LB (Luria broth) und MinimalmediumA (MMA) verwendet. Ihre Zusammensetzung erfolgte nach den Angaben von Miller (Miller, 1972).

MMA enthielt als Kohlenstoffquelle entweder Glukose (MMAGlc), Trehalose (MMATre) oder 'Casaminoacids' (von Difco) in einer Endkonzentration von 0,4 %.

Es enthielt zusätzlich die Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin in einer Endkonzentration von jeweils 40 µg/ml, wenn die darauf angezogenen Kulturen die Deletion *araD139 Δ(ara-leu)* hatten oder *leu::Tn10* enthielten.

Wenn Antibiotika erforderlich waren, dann wurden diese in Vollmedien in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

- Ampicillin (Amp)	200 µg/ml
- Chloramphenicol (Cam)	30 µg/ml
- Kanamycin (Kan)	100 µg/ml
- Spectomycin (Spec)	50 µg/ml
- Tetracyclin (Tet)	5 µg/ml

In Minimalmedium A wurde ein Viertel der oben genannten Antibiotika-Endkonzentrationen eingesetzt.

Für Transduktionen mit den Bakteriophagen P1 bzw. λ und die anschließende Reinigung der Transduktanden enthielten die Selektionsplatten neben den erforderlichen Antibiotika 20 mM Natriumcitrat.

Zum Test auf Arabinose-Sensitivität wurden MacConkey Agar base Platten verwendet, die 1 % Arabinose enthielten.

4.2.3. Bakterienstämme

Tabelle 4.1. Bakterienstämme

Name	relevanter Genotyp	Referenz / Quelle
AD413	DHB3 <i>prlA4... Tn10 Kan^R, F⁺lacI^Q, lacI^Q Tet^R</i>	A. Derman
CLC198	MC4100 <i>degP::Tet^R</i>	C. Cosma
DHB3	<i>araD139 Δ(ara-leu) 7697 ΔlacX74 ΔphoA (pvull) phoR ΔmalF3 galE galK thi rpsL</i>	Boyd et al., 1987
JCB572	JCB502 <i>dsbA::Kan^R</i>	Bardwell et al., 1991
JCB586	MC4100 <i>rot::Kan^R</i>	Greenberg and Demple, 1986
KU62	DHB3 <i>treA::Spec^R</i>	diese Arbeit
KU64	MC4100 <i>ΔtreA ΔtreRBC...Tn10 Tet^R</i>	diese Arbeit
KU65	DHB3 <i>treA::Spec^R ΔtreRBC...Tn10 Tet^R</i>	diese Arbeit

Name	relevanter Genotyp	Referenz / Quelle
KU67	KU65 <i>degP</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU68	DHB3, <i>treA</i> ::Spec $\Delta treRBC... \Delta Tn10$, Tet ^S (gebochnert)	diese Arbeit
KU70	KU65 <i>rot</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU71	KU65 <i>dsbA</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU79	KU65 <i>clpB</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU82	KU65 <i>surA</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU92	KU68 $\Delta ara714... leu$::Tn10 Tet ^R	diese Arbeit
KU93	KU92 <i>prlA4...Kan</i> ^R	diese Arbeit
KU95	MC4100 <i>treA</i> ::Spec ^R (<i>treC-lacZ</i>) $\lambda \phi lacMu55$ Kan ^R $\Delta ara714... leu$::Tn10 Tet ^R	diese Arbeit
KU96	KU92 <i>treF</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
KU97	SF120 <i>treA</i> ::Spec ^R	diese Arbeit
KU98	DHB3 <i>degP</i> ($\Delta pst1$ -Kan ^R) <i>treA</i> ::Spec ^R	diese Arbeit
KU101	KU92 $\Delta ara714... leu$ ⁺	diese Arbeit
KU102	WG1 $\Delta fhua \Delta hhoAB \Delta htrA$, <i>treA</i> ::Spec ^R	diese Arbeit
KU104	KU101 <i>degP</i> ::Tet ^R	diese Arbeit
KU105	KU104 <i>prlA4...Kan</i> ^R	diese Arbeit
KU108	KU104 <i>dsbA</i> ::Kan ^R	diese Arbeit
LMG190	MC4100 $\Delta ara714... leu$::Tn10 Tet ^R	Wilcox et al., 1974
MC4100	$\Delta (araF-lac)$ U169 <i>rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5501 rbsR</i> , F ⁻	Casbadan, 1976
RHo14	MC4100 <i>treA</i> ::Spec ^R	Horlacher et al., 1996
RHo19	MC4100 <i>treA</i> ::Spec ^R (<i>treC-lacZ</i>) $\lambda \phi lacMu55$ Kan ^R	R. Horlacher, 1996
RHo60	RHo14 <i>treF</i> ::Kan ^R	Horlacher et al., 1996
SB600	WG1 $\Delta fhua \Delta hhoAB \Delta htrA/B$	Bass et al, 1996
SF120	$\Delta lacX74 \Delta phoA$ (Pvull) <i>galE kalK thi rpsL degP</i> ($\Delta Pst1$ -Kan ^R) <i>ptr-32</i> ::Cam ^R $\Delta ompT$	Banexy et al., 1991
UE36	MC4100 <i>zxy-713</i> ::Tn10 Tet ^R	Laborsammlung
WG1	Wildtyp, CGSC#5073	Lederberg
WK208	MC4100 $\Delta treA \Delta treRBC$	W. Klein, 1995
ZK126	ZK126 <i>surA</i> ::Kan ^R	Tormo et al., 1990
<i>surA</i> ::kan		

Alle Bakterienstämme sind Derivate von *E. coli* K-12.

4.2.4. Plasmide

Tabelle 4.2.: Plasmide

Plasmid	relevanter Genotyp	Resistenz	Referenz / Quelle
pAD135	pDHB5059-Derivat, Δ bp-20-+1- <i>phoA</i>	Amp	Derman et al., 1993b
pBAD22	<i>para</i> -Expressionsvektor, pBR322-Derivat	Amp	Guzman et al., 1995
pBADtreF	<i>wttreF</i> hinter <i>ara</i> -Promotor in pBAD22	Amp	diese Arbeit
p Δ sstreA	<i>treA</i> Δ AS1-35 + Met, Val, Leu hinter <i>ara</i> -Promotor in pBAD22	Amp	diese Arbeit
ptreA'-treF	wt <i>treF</i> in pTre11 nach bp691 von <i>treA</i>	Amp	diese Arbeit
p Δ sstreA'-treF	wt <i>treF</i> in p Δ sstreA nach bp659 von Δ sstreA	Amp	diese Arbeit
pTre11	<i>wttreA</i> unter eigenem Promotor in pBR322	Amp	Gutierrez et al., 1989
psstreF	<i>treF</i> mit Signalsequenz von <i>treA</i> in pTre11	Amp	diese Arbeit
psstreF24	psstreF-Selektionsderivat mit erhöhter Trehalase-Aktivität: TreF A ₈₂ ->T	Amp	diese Arbeit
psstreF25	psstreF-Selektionsderivat mit erhöhter Trehalase-Aktivität: TreF T ₁₇₂ ->I	Amp	diese Arbeit
pRHo600	<i>wttreF</i> in pACYC184	Tet	Horlacher et al., 1996
ptreA`-`treF	Selektionsplasmid für TreA`-`TreF-Hybride	Amp	diese Arbeit
ptre Δ sstreA`-`treF	Selektionsplasmid für TreA`-`TreF-Hybride ohne Signalsequenz	Amp	diese Arbeit
ptreA`-`treF1	<i>treA`-`treF</i> -Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ *)	Amp	diese Arbeit
ptreA`-`treF2	<i>treA`-`treF</i> -Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ *)	Amp	diese Arbeit
ptreA`-`treF8	<i>treA`-`treF</i> -Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ *)	Amp	diese Arbeit
ptreA`-`treF10	<i>treA`-`treF</i> -Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ *)	Amp	diese Arbeit
p Δ sstreA`-`treF1	Δ sstreA`-`treF-Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ in <i>prlA4</i> *)	Amp	diese Arbeit
p Δ sstreA`-`treF7	Δ sstreA`-`treF-Hybrid aus Selektion nach Tre ⁺ in <i>prlA4</i> *)	Amp	diese Arbeit

*) Die Fusionspunkte der Hybride sind in Abb. 5.18. dargestellt.

4.2.5. Bakteriophagen

Für die Stammkonstruktionen wurden P1-Lysate verwendet, die mit Hilfe eines MC4100-P1_{vir}-Starterlysates auf verschiedenen Stämmen nach Silhavy et al. (Silhavy et al., 1984) gezogen wurden (vergl. Stammkonstruktionen, Kapitel 4.3.2.).

4.3. Mikrobiologische Methoden

4.3.1. Allgemeine Techniken

4.3.1.1. Sterilisation

Die Medien wurden steril verwendet. Die Sterilisation erfolgte, wenn möglich, durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120°C und 1 bar. Hitze-labile Substanzen wurden entweder als konzentrierte Stammlösungen sterilfiltriert (Milliporefilter, 0,4 µm Porendurchmesser) oder hochkonzentriert in Lösungsmitteln wie Ethanol oder Dimethylformamid angesetzt. Sie wurden den auf ca. 50°C abgekühlten Medien separat zugesetzt.

4.3.1.2. Wachstumsbedingungen

Die Bakterienkulturen wurden gewöhnlich bei 37°C inkubiert. Bei Versuchsreihen mit Hitze-sensitiven Mutanten, wie z.B. *degP*-Mutanten, betrug die Wachstumstemperatur 28°C. Flüssigkulturen bis zu 10 ml wurden im Reagenzglas in einem Roller belüftet. Bei größeren Volumina fand die Inkubation in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schütteltisch statt.

4.3.1.3. Aufbewahrung der Zellen

Stammkulturen wurden entweder in 16 % Glycerin bei -20°C oder in 14 % Dimethylsulfoxid bei -80°C aufbewahrt.

4.3.1.4. Bestimmung der Zelldichte

Als Maß für die Zelldichte einer Bakterienkultur dient ihre optische Dichte (OD). Diese wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Nach Miller (Miller, 1972) entspricht eine OD₅₇₈ von 1 etwa 107 µg/ml Protein. Die Zellzahl dieser OD beträgt ungefähr 10⁹ Zellen pro ml.

4.3.2. Stammkonstruktionen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 4.1. aufgeführt. Neue Stämme wurden mit genetischen Standardmethoden (Silhavy et al., 1984) wie folgt konstruiert:

Der Stamm **KU62** (*treA::Spec^R*) entstand durch P1-Transduktion von DHB3 mit einem Lysat aus RHo14 (*treA::Spec^R*) und anschließende Selektion auf Spectomycin-Resistenz. **KU64** ($\Delta treA$, $\Delta treRBC...Tn10$ Tet^R) wurde als Hilfsstamm konstruiert, um die *treRBC*-Deletion aus WK208 ($\Delta treA$, $\Delta treRBC$) selektionierbar zu machen. Dazu wurde ein Transposon (*zxy-713::Tn10* Tet^R aus UE36) in WK208 transduziert und durch Test der Transduktanden auf Nichtwachstum auf Trehalose das Vorhandensein der *treRBC*-Deletion sichergestellt.

Zur Konstruktion von **KU65** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC...Tn10$ Tet^R) wurde KU62 (*treA::Spec^R*) mit einem P1-Lysat aus KU64 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC...Tn10$ Tet^R) transduziert. Zellen einer Tetracyclin-resistenten Kolonie, die nicht auf Trehalose wachsen konnten, waren KU65.

Die potentiellen Faltungshelfermutanten **KU67** (*degP::Kan^R*), **KU70** (*rot::Kan^R*), **KU71** (*dsbA::Kan^R*) und **KU82** (*surA::Kan^R*) wurden durch Transduktion von KU65 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC...Tn10$ Tet^R) mit den entsprechenden Lysaten (*degP::Kan^R*: SF120, Banexy et al., 1991; *rot::Kan^R*: JCB586, Greenberg and Demple, 1986; *dsbA::Kan^R*: JCB572, Bardwell et al., 1991) und Selektion auf Kanamycin-Resistenz konstruiert. Potentielle Faltungshelfermutanten wurden generell bei 28°C inkubiert.

Um einen Trehalose⁻-Stamm herzustellen, dessen Wachstum unempfindlich gegenüber Arabinose ist, wurde KU65 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC...Tn10$ Tet^R) zunächst durch Selektion auf nach Maloy und Nunn verändertem Bochner-Medium (Maloy und Nunn, 1981) Tetracyclin-sensitiv gemacht. Der daraus resultierende Stamm **KU68** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$) wurde dann mit einem P1-Lysat aus LMG190 ($\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) (Wilcox et al., 1974) transduziert. Tetracyclin-resistente Transduktanden, die in der Lage waren, auf MacConkey Arabinose zu wachsen, wurden **KU92** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) genannt.

Der *prlA4*-Stamm **KU93** (*treA::spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R, *prlA4...Kan^R*) wurde durch P1-Transduktion von KU92 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) mit einem P1-Lysat aus AD413 (*prlA4...Kan^R*, A. Derman) und anschließende Selektion auf Kanamycin-Resistenz hergestellt. Das Vorhandensein der *prlA4*-Mutation wurde anhand der Aktivität der ohne Signalsequenz exprimierten alkalischen Phosphatase (pAD135) überprüft (vergl. Emr und Bassford, 1982, Derman et al., 1993b).

In dem Stamm **KU96** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R, *treF::Kan^R*) sind beide *E. coli*-Trehalasen ausgeschaltet. Er wurde durch Transduktion von KU92 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) mit einem P1-Lysat aus RHo60 (*treF::Kan^R*, Horlacher et al., 1996) und Selektion auf Kanamycin-resistente Kolonien gewonnen.

Der Tetracyclin-sensitive Stamm **KU101** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu^+$) entstand durch P1-Transduktion von KU92 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) mit einem MC4100-Lysat (*leu⁺*). Transduktanden, die auf MMAGlc ohne Leucin wachsen konnten und zudem weiße Kolonien auf MacConkey Arabinose Platten bildeten, wurden KU101 genannt.

KU104 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu^+$, *degP::Tet^R*) ging aus KU101 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu^+$) hervor, der mit einem P1-Lysat aus CLC198 (*degP::Tet^R*, C. Cosma) transduziert und auf Tetracyclin-Resistenz selektioniert worden war.

KU105 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu^+$, *degP::Tet^R*, *prlA4...Kan^R*) entstand durch Transduktion der *prlA4*-Mutation in KU104 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta ara714...leu^+$, *degP::Tet^R*). Diese wurde entsprechend der Konstruktion von KU93 aus KU92 durchgeführt und kontrolliert.

KU95 (*treA::Spec^R* (*treC-lacZ*) $\lambda\phi placMu55$ Kan^R, $\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) wächst nur in Abhängigkeit einer zytoplasmatischen Trehalase auf Minimalmedium mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle. Er ist aus RHo19 (*treA::Spec^R* (*treC-lacZ*) $\lambda\phi placMu55$ Kan^R) durch P1-Transduktion mit einem LMG190-Lysat ($\Delta ara714...leu::Tn10$ Tet^R) als Tetracyclin-resistente Kolonie hervorgegangen, die auf MacConkey-Arabinose-Platten weiße Kolonien bildet.

Zur Herstellung von **KU108** (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta leu::Tn10$, *degP::Tet^R*, *dsbA::Kan^R*) wurde KU104 (*treA::Spec^R*, $\Delta treRBC$, $\Delta leu::Tn10$, *degP::Tet^R*) mit einem P1-Lysat aus JCB572 (*dsbA::Kan^R*, Bardwell et al., 1991) transduziert und anschließend auf Kanamycin-Resistenz selektioniert.

KU97 und **KU102** entstanden durch Transduktion von SF120 (*degP::Kan^R*, *ptr::Cam^R* $\Delta ompT$) bzw. SB600 ($\Delta hhoAB$, $\Delta htrA/B$) mit einem P1-Lysat aus RHo14 (*treA::Spec^R*) und anschließende Selektion auf Spectomycin-Resistenz.

4.3.3. Plasmidkonstruktionen

Tabelle 4.2. zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide. In Abb. 5.18. sind die Plasmid-codierten Trehalasen schematisch dargestellt. Bei allen in dieser Arbeit konstruierten Plasmiden handelt es sich um Derivate von pBR322 (Bolivar et al., 1977).

4.3.3.1. Konstruktion von p Δ streA

Das Plasmid p Δ streA codiert für die periplasmatische Trehalase TreA, die unter Arabinosekontrolle ohne ihre Signalsequenz exprimiert wird. Zur Konstruktion von p Δ streA wurde pBAD22 (Guzman et al., 1995) mit Asp178 verdaut, die entstandenen Enden mit dem Klenow-DNA-Polymerase-Fragment zu glatten Enden aufgefüllt und das Plasmid dann mit Pst1 weiterverdaut. Gleichzeitig wurde pTre11 mit Bsg1 geschnitten, die überlappenden Enden mit der T4-DNA-Polymerase abverdaut und dann ebenfalls mit Pst1 geschnitten. Anschließend wurde das 3546 bp große Fragment aus pBAD22 mit

dem 2704 bp Fragment aus pTre11 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in KU95 transformiert und die Ampicillin-resistenten Transformanten auf Arabinose-induzierbares Wachstum auf Trehalose getestet. Die Klonierung wurde durch geeignete Restriktionsverdau überprüft.

Durch die Klonierung wurden am N-Terminus von TreA die Aminosäuren Methionin, Val und Leu eingefügt, dafür fehlen die fünf N-terminalen Aminosäuren des reifen TreA: zweimal Glu, Thr, Pro und Val.

4.3.3.2. Konstruktion von pBADtreF

Um *treF* überexprimieren und seine Expression durch die Zugabe von Arabinose regulieren zu können, wurde *treF* aus pRHo600 (Horlacher et al., 1996) hinter den Arabinosepromotor von pBAD22 (Guzman et al., 1995) kloniert. Dazu wurde pRHo600 mit BamH1 verdaut, die Enden mit der Klenow-Reaktion aufgefüllt und dann mit NcoI weiterverdaut. Dieses 2704 bp große Fragment wurde in pBAD22 ligiert, das zuvor mit EcoRI geschnitten, aufgefüllt und mit NcoI weiterverdaut worden war. Nach der Ligation wurde der Ansatz in KU95 transformiert und - wie auch bei der Konstruktion von p Δ streA - die Ampicillin-resistenten Transformanten auf Arabinose-induzierbares Wachstum auf Trehalose getestet. Die Klonierung wurde wiederum durch geeignete Restriktionsverdau überprüft.

4.3.3.3. Konstruktion von Plasmiden für die Selektion von Trehalase-Hybriden

ptreA'-treF:

Um ein Hybridprotein aus TreA und TreF selektionieren zu können, wurde das 2271 bp EagI-Insert aus pTre11 in das Plasmid pBAD*treF* kloniert, welches zuvor mit EagI linearisiert worden war. Die Plasmide von Ampicillin-resistenten Transformanten, die nicht in der Lage waren, auf Trehalose zu wachsen, wurden geeigneten Restriktionsverdau unterzogen, um das Klonierungsergebnis zu überprüfen.

ptreA'-treF enthält die Sequenz für die ersten 404 Aminosäuren von Vorläufer-TreA unter eigenem Promotor sowie für den C-Terminus von TreF ab Aminosäure 165. Die *treF*-Sequenz ist nicht im Leseraster.

p Δ streA'-treF:

Für die Selektion eines Hybridproteins aus TreA ohne Signalsequenz und TreF wurde p Δ streA'-treF konstruiert. Dazu wurde das 3045 bp große EagI/ScaI-Fragment aus pBADtreF in das 4862 bp große EagI/ScaI-Fragment aus p Δ streA kloniert.

4.3.3.4. Konstruktion von preA'-treF

preA'-treF codiert für ein Fusionsprotein, in dem an die N-terminalen 263 Aminosäuren von preTreA das vollständige TreF fusioniert ist. Zur Konstruktion von preA'-treF wurde die *treF*-codierende Region von pBADtreF mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dabei wurden durch die Oligonukleotide am 5'-Ende von *treF* eine KpnI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Nach

Verdau des amplifizierten 1657 bp großen Fragmentes mit Kpn1 und EcoR1 konnte es in das 5270 bp große Fragment ligiert werden, welches aus dem Verdau von pTre11 mit Kpn1 und EcoR1 hervorging. Der Ligationsansatz wurde in KU93 transformiert und die Plasmide Ampicillin-resistenter Kolonien durch Restriktionsanalyse überprüft.

Folgende Oligonukleotide wurden für die PCR eingesetzt:

treF N-t.Kpn1: 5'-GGGGTACCatgctcaatcagaaaattcaaac- 3'
treF C-t.EcoR1: 5'-CGGAATTCttatggttcgccgtacaacc- 3'

(Die hybridisierenden Sequenzbereiche der Oligonukleotide sind in Kleinbuchstaben angegeben, die nichthybridisierenden Bereiche in Großbuchstaben. Die Schnittstellen sind fett hervorgehoben.)

4.3.3.5. Konstruktion von psstreF

Um TreF als Vorläuferprotein mit der Signalsequenz von TreA exprimieren zu können, wurde psstreF konstruiert. Dazu wurde von dem Plasmid pTre11 mittels PCR ein 789 bp großes Fragment vervielfältigt, welches für die Promotor-Region und die Signalsequenz von TreA codiert. Am 3'-Ende wurde durch das zur PCR-Reaktion eingesetzte Oligonukleotid 6 bp nach der die Signalpeptidase-Schnittstelle codierenden Sequenz eine Kpn1-Schnittstelle eingefügt. Dieses PCR-Produkt wurde gereinigt und mit BamH1 und Kpn1 zu einem 569 bp-Fragment verdaut, welches dann in das 5640 bp große Kpn1/BamH1-Fragment von ptreA'-treF ligiert wurde. Der Ligationsansatz wurde in KU101 transformiert und die Plasmide Ampicillin-resistenter Kolonien durch Restriktionsanalyse überprüft.

Für die PCR-Reaktion wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

ssstreF-Kpn1: 5'- GGG GTA CCt tct tct gcc tgc acc gat - 3'
pTre11/3786-07: 5'- aat ggt gca tgc aag gag atg g - 3'

(Die hybridisierenden Sequenzbereiche der Oligonukleotide sind in Kleinbuchstaben angegeben, der nichthybridisierenden Bereich in Großbuchstaben. Die Kpn1-Schnittstelle ist fett hervorgehoben.)

Durch die Klonierung ergab sich folgende Aminosäuresequenz im Bereich der Schnittstelle der Signalpeptidase:

...	Ser	Val	Gln	Ala	<u>Glu</u>	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Met</u>	Leu	Asn	Gln	Lys	...
	I				I		I				I			
	Signalsequenz				TreA		Kpn1*)				TreF			

*) Diese Aminosäuren werden durch die Kpn1-Schnittstelle codiert.

4.3.3.6. Konstruktion von p Δ streA'-treF

p Δ streA'-treF codiert für das gleiche Fusionsprotein wie ptreA'-treF mit dem Unterschied, daß das treA'-treF Fusionsprotein ohne Signalsequenz und unter Kontrolle des Arabinose-Promotors exprimiert wird.

p Δ streA'-treF wurde aus ptreA'-treF und p Δ streA subkloniert, indem das 2408 bp große Kpn1/Pst1-Fragment aus ptreA'-treF mit dem 4129 bp großen Kpn1/Pst1-Fragment aus p Δ streA ligiert wurde. Der Ligationsansatz wurde in KU101 transformiert und die Plasmide Ampicillin-resistenter Kolonien durch geeignete Restriktionsanalyse überprüft.

4.3.4. Herstellung von P1-Lysaten und P1-Transduktion

Durch Transduktion mit dem Bakteriophagen P1_{vir} können selektionierbare Wirts-DNA-Sequenzen von einem Bakterienstamm in einen anderen übertragen werden. Die Herstellung von P1-Lysaten und die Durchführung von P1-Transduktionen erfolgte nach Silhavy et al. (Silhavy et al., 1984).

4.3.5. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Die Einschleusung fremder DNA in Bakterienzellen nennt man Transformation. *E. coli*-Zellen können nur dann DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen, wenn sie zuvor darauf vorbereitet, d.h. kompetent gemacht, wurden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Herstellung kompetenter Zellen und zur Transformation eingesetzt. Wenn, wie bei der Klonierung und Mutantenselektion, eine hohe Transformationseffizienz erforderlich war, wurde die Elektroporation nach Ausubel et al. (Ausubel et al., 1992) durchgeführt. Spielte die Ausbeute der Transformanden eine untergeordnete Rolle, kam die von Chung et al. (Chung et al., 1989) beschriebene TSS-Transformation zur Anwendung. (TSS steht für transformation and storage solution.)

4.3.6. Positive Selektion auf Verlust der Tetracyclin-Resistenz

Um Tetracyclin-sensitive Derivate von *E. coli*-Stämmen zu erhalten, die durch eine Tn10-Insertion Tetracyclin-resistent sind, wurde die von Bochner et al. (Bochner et al., 1980) beschriebene Methode mit dem für *E. coli* optimierten Medium nach Maloy und Nunn (Maloy und Nunn, 1981) angewendet.

4.3.7. 2-Aminopurin-Mutagenese

Diaminopurin löst als Basenanalogon zu Adenin AT-GC Transitionen und kleine Deletionen aus (Knippers et al., 1990) und eignet sich daher als Mutagen. Zur Mutagenese des Plasmides psstreF wurde eine Übernachtskultur von KU101psstreF 1:10⁷ in LBamp, 600 µg/ml Diaminopurin verdünnt und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde anschließend das mutagenisierte Plasmid präpariert.

4.4. Biochemische Methoden

4.4.1. Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten

4.4.1.1. Bestimmung der Glukosekonzentration

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration einer Lösung wurde der Glukose-Peroxidase-Test (Glucose-God-PAP-Test von Merck, Nr.14365) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Nachweis geringer Glukosemengen wurden im Test statt 10 µl Probe bis zu 250 µl eingesetzt. Bei entsprechender Zusammensetzung des Glukose-Standards als Referenz wird die Meßgenauigkeit durch diese Volumenerhöhung nicht beeinträchtigt.

Da der Glukose-Peroxydase-Test gegenüber reduzierenden Agentien (ab ca. 0,5 mM Dithiotreitol (DTT)) empfindlich ist, wurden DTT-haltige Proben zur Alkylierung der freien SH-Gruppen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Jodacetamid inkubiert. Jodacetamid wurde jeweils in dreifachem molarem Überschuß gegenüber dem DTT eingesetzt. In diesen Konzentrationen beeinträchtigt es die Bestimmung der Glukosekonzentration nicht.

4.4.1.2. Bestimmung der Trehalase-Aktivität

Die Trehalose-Aktivität wurde indirekt quantifiziert, indem die Menge der durch die Trehalosespaltung entstehende Glukose durch einen zweiten Enzymtest, den Glukose-Peroxidase-Test (s.o.), bestimmt wurde. Die Aktivität der Trehalasen ist in Units angegeben. Ein Unit entspricht der Spaltung von 1 µmol Trehalose pro min und mg Protein.

- Testbedingungen für ganze Zellen:

Zellen einer LB-Übernachtskultur wurden zweimal mit MMA gewaschen und dann mit MMA auf eine Proteinkonzentration von 0,2 mg pro ml eingestellt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Trehalose (500 mM) zu 200 µl Zellen gestartet und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Aufkochen gestoppt. Nach 5 Minuten wurden die Proben abgekühlt und Zelltrümmer abzentrifugiert. 10 bzw. 100 µl des Überstandes wurden für die Glukosebestimmung mit dem Glukose-Peroxidase-Test verwendet.

- Testbedingungen für Zellextrakte:

Um die Trehalase-Aktivität von Zellextrakten zu bestimmen, wurden die Zellen von LB-Übernachtskulturen zweimal mit eiskaltem MMA gewaschen und dann mit MMA auf eine Proteinkonzentration von 10 mg pro ml eingestellt. Die Zellen wurden im Verlauf von drei Durchgängen durch eine French Pressure Minizelle (American Instrument Company, Silver spring, Maryland) bei 9000 psi (= ca. 60 bar) aufgebrochen. Verbleibende ganze Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verdünnt für die Bestimmung der Trehalase-Aktivität eingesetzt. Dabei wurde nach der Zugabe von 50 µl Trehalose zu 200 µl Zellextrakt das für ganze Zellen beschriebene Verfahren angewendet (s.o.).

- Testbedingungen für gereinigtes Enzym:

Die Trehalase-Aktivität wurde im allgemeinen ermittelt, indem die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Trehalose (10 bzw. 100 mM) zu 100 µl Probe gestartet wurde. Nach 5- bis 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Aufkochen (5 min) abgestoppt. Die Menge der entstandenen Glukose wurde mit Hilfe des Glukose-Peroxidase-Tests bestimmt.

Für die Charakterisierung des gereinigten Proteins enthielt die Probe in der Regel 20 ng TreF (für die Bestimmung der Substrataffinität (K_m) auch weniger) in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0). Abweichungen von den hier beschriebenen Bedingungen sind im Text vermerkt.

4.4.1.3. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

In diesem Enzymtest wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt, indem die Rate der para-Nitrophenyl-Phosphat-Hydrolyse in permeabilisierten Zellen spektrometrisch gemessen wird. Der Enzymtest wurde wie von Michaelis et al. (Michaelis et al., 1983) beschrieben durchgeführt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in Units berechnet und besagt, wieviel µmol Para-Nitrophenyl-Phosphat pro min und mg Gesamtzellprotein hydrolysiert wurden.

4.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Dabei wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt:

- Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford et al., 1976) beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250, an Proteine zu binden. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von rot (595 nm) nach blau (465 nm). Die Erhöhung der Absorption wird bei 595 nm gemessen. Sie korreliert in einem bestimmten Konzentrationsbereich mit der Proteinmenge der Probe. Diese kann anhand einer Eichgerade, die zuvor mit bekannten Proteinmengen erstellt wurde, ermittelt werden. Die Protein-Assay-Lösung wurde von der Firma BioRad (Pierce) erworben.

- Proteinbestimmung nach Gill und von Hippel (Gill und von Hippel, 1989)

Nach Gill und von Hippel lässt sich der Extinktionskoeffizient der Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm anhand der Aminosäurezusammensetzung des jeweiligen Proteins bestimmen. Die Absorption eines Proteines bei 280 nm lässt sich dann aus dem Quotienten aus Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient ermitteln. Für TreF wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon = 118640 \cdot \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet. Das Molekulargewicht beträgt 63,703 kDa. Eine Absorption von 1 entspricht dann 0,537 mg pro ml TreF.

4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen während der Proteinreinigung, der limitierten Proteolyse und zur Analyse von Zellkulturen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit 10 % -igen Polyacrylamidgelen.

Für die Proteinreinigung wurden 10 μg Protein und für die limitierte Proteolyse ca. 15 μg TreF pro Spur in SDS-Probenpuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 25 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 35 mM Dithiothreitol) aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch Färbung mit Coomassie-Brilliant blue sichtbar gemacht (vergl. Silhavy et al., 1984).

Zellkulturen wurden mit Hilfe des Photometers auf gleiche Zelldichten eingestellt. Dann wurden gleiche Volumina der Kulturen abzentrifugiert, die Zellen durch Erhitzen in SDS-Probenpuffer lysiert und die DNA auf dem Rüttler zerkleinert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden ca. 2 μg Zellprotein pro Bahn aufgetragen und nach der Auftrennung im Western Blot analysiert.

4.4.3.1. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterschied sich von der SDS-PAGE in drei Punkten: Erstens enthielten weder der Probenpuffer, noch das Gel, noch der Laufpuffer SDS. Statt dessen wurde dem Polyacrylamidgel zur Verbesserung des Laufverhaltens der Proben Comassie Blau zugesetzt. Zweitens wurden die Proben nicht gekocht. Durch diese Änderungen sollte die Denaturierung der Proteine verhindert werden.

Der dritte Unterschied bestand in einer längeren Laufzeit der Proteinproben bei einer höheren Stromstärke (100 V).

4.4.4. Immunoblot Analyse (Western Blot)

Der hochempfindliche, spezifische Nachweis bestimmter Proteine erfolgte nach ihrer elektrophoretischen Übertragung aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF-Membran, Immobilon, 0,45 µm Porengröße, von Millipore) durch eine immunologische Färbung nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Als erste Antikörper wurden polyklonale Kaninchen-Antiseren verwendet, die gegen die jeweils nachzuweisenden Proteine gerichtet waren. Als zweiter Antikörper diente Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G, welches mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist (von Sigma). TreA-, SecA-, bzw. MBP-Antikörper sowie die Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin G-Konjugate wurden in einer Verdünnung von 1 : 20000 eingesetzt. Die TreF-Antikörper wurden 1 : 10000 verdünnt verwendet.

Als Größenstandard wurde eine Mischung aus vorgefärbten Proteinen der Firma Biorad verwendet.

4.4.5. Dünnschichtchromatographie

Zur Bestimmung der Substratspezifität von TreF wurde je 1 µg gereinigtes Enzym für 16 Stunden mit 0,6 µmol Trehalose, Lactose, Maltose bzw. Saccharose in 30 µl 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend gekocht, zentrifugiert und 5 µl des Überstandes auf eine Kieselgel-Dünnschichtplatte (0,25 mm Durchmesser, Merck) aufgetragen. Die Saccharide liefen über Nacht in einer 2-Propanol-Ethanol-Wasser-Lösung (5 : 3 : 2 [Vol : Vol : Vol]). Sie wurden durch Eintauchen der Platte in Methanol mit 2 % H₂SO₄, Trocknen und Erhitzen auf 180°C sichtbar gemacht.

4.4.6. Reinigung von TreF

Für die Reinigung der zytoplasmatischen Trehalase TreF wurde pBAD*treF* (pBAD*treF* trägt *treF* unter dem Arabinose-Promotor (Guzman et al., 1995)) in den *treA*-Stamm KU68 transformiert. Der daraus resultierende KU68pBAD*treF* wurde in 4 l Minimalmedium (MMA, 0,4 % Casaminoacids, je 40 µg/ml Valin, Leucin und Isoleucin, 200 µg/ml Ampicillin) 1:20 von einer LB-Übernachtskultur, die Ampicillin enthielt, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von ca. 0,5 wurde die Transkription von *treF* durch Zugabe von 1 mM Arabinose induziert und die Inkubation für 2 Stunden fortgesetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (20 min bei 4200 x g und 4°C). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in 20 ml kaltem Puffer B (Kaliumphosphatpuffer, 20 mM, pH 6,0) aufgenommen und durch zwei Durchgänge durch die French-Press-Zelle bei 15000 psi (= ca. 100 bar) aufgeknackt. Zelltrümmer und verbleibende ganze Zellen wurden durch Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C) abgetrennt. Die im Extrakt befindlichen Nukleinsäuren wurden mit 2 % Streptomycinsulfat gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C)

sedimentiert. Der DNA-freie Zellextrakt wurde zu 40 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C) sedimentiert und in 8 ml Puffer A (Kaliumphosphatpuffer, 20 mM, pH 6,0, zu 10 % mit Ammoniumsulfat gesättigt) gelöst. Die unlöslichen Proteine wurden durch erneute Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C) entfernt.

Der so entstandene Überstand wurde auf eine 80 ml Phenylsepharosesäule (fast flow, low substituted, von Pharmacia) geladen, die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war. Nicht interagierende Proteine wurden mit 400 ml Puffer A (5 ml/min) heruntergewaschen. Anschließend wurden die verbleibenden Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Puffer B (Kaliumphosphatpuffer, 20 mM, pH 6,0) in einem Gesamtvolumen von 650 ml bei einer Flußrate von 5 ml pro min eluiert.

TreF eluierte bei zu ca. 6 % gesättigtem Ammoniumsulfat. Die Hauptfraktionen wurden zusammengefaßt, mit Hilfe des Vari Perm Kapillarsystems (von Bitop) gegen Puffer B umgepuffert und auf eine mit Puffer B equilibrierte 5 ml MonoQ Säule (von Pharmacia) geladen. Bei einem linearen Gradienten (20 ml) von 0 bis 0,5 M NaCl in Puffer B und einer Flußrate von 1 ml pro min eluierte TreF bei ca. 250 mM NaCl. Die TreF enthaltenden Proben wurden zusammengefaßt, das enthaltene Protein in einer zu 80 % gesättigten Ammoniumsulfatlösung gefällt, durch Zentrifugation (30 min, 27000 x g, 4°C) sedimentiert und in Puffer B gelöst. Das so gereinigte und konzentrierte TreF lag in einer Proteinkonzentration von 3 mg pro ml vor und wurde bis zur Verwendung in 0,2 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Die enzymatische Aktivität der Proteinproben wurde nach jedem Reinigungsschritt im Trehalase-Aktivitätstest gemessen, die Proteinmenge spektrometrisch bestimmt und die Proteingröße mittels SDS-PAGE überprüft.

4.4.7. Gelfiltration

Um zu untersuchen, ob TreF als Monomer, Dimer oder Multimer vorliegt, wurde sein Molekulargewicht durch Gelfiltration mit einer Superose 12 HR10/30 Säule (von Pharmacia) bestimmt. Die Säule hat ein Gesamtvolumen von 25 ml und ein Ausschlußvolumen von 8,75 ml. Je ca. 200 µg Protein wurden in einem Volumen von 150 µl auf die Säule aufgetragen und in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 6,0 mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min bei 4°C aufgetrennt. Folgende Proteine wurden als Molekulargewichtsstandards (Pharmacia) verwendet:

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht</u>
Bovine Katalase	240 kDa
β-Amylase	200 kDa
Alkohol Dehydrogenase	150 kDa
Bovine Serum Albumin	67 kDa
Egg Albumin	45 kDa

4.4.8. Gewinnung von TreF Antiserum

Antiserum gegen TreF wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit gereinigtem TreF gewonnen. Hierzu wurde zunächst das Ausgangsblut des Versuchskaninchens im Western Blot gegen *E. coli*-Extrakt getestet, um sicherzustellen, daß es nicht bereits über Antikörper verfügt, die mit *E. coli*-Proteinen reagieren.

Für die erste Immunisierung sowie die erste, zweite und dritte Nachimmunisierung (Boosterung) wurden dem Kaninchen jeweils ca. 150 µg gereinigtes TreF zusammen mit RAS-Adjuvans subcutan injiziert. Die Nachimmunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils 14 Tagen. 7 Tage nach jeder Immunisierung wurde eine Blutprobe des Kaninchens im Western Blot auf Antikörper gegen TreF getestet. Die Immunisierungen wurden in der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz von Frau Gast vorgenommen.

4.4.8.1. Aufbereitung des Serums des immunisierten Kaninchens

Nach dem Ausbluten wurde das Blut des Kaninchens zur Agglutinierung des Blutkuchens für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Blutkuchen abzentrifugiert (20 min, 1000 x g, 4°C), das Serum abgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung zum TreF-Nachweis bei -20°C eingefroren.

4.4.9. Probenaufarbeitung zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Für die Sequenzierung der Aminosäuren vom N-Terminus wurden die zu analysierenden Proben vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) übertragen, wobei der von P. Schwind (P. Schwind, 1993) vorgeschlagene Transfer-Puffer (10 % Methanol, 0,22 % CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid), pH 11,0) verwendet wurde.

Die Proteine wurden mit 0,1 % Serva Blue R250 in 40 % Methanol und 10 % Eisessig angefärbt, durch mehrmaliges Waschen mit H₂O sichtbar gemacht, ausgeschnitten, getrocknet und zur Sequenzierung verwendet. Die Aminosäure-Sequenzierungen wurden von Herrn L. Cobianchi (Fakultät für Biologie, Universität Konstanz) durchgeführt.

4.4.10. Limitierte Proteolyse

Da Verbindungsregionen zwischen zwei Proteindomänen in der Regel von mehreren verschiedenen Proteasen erkannt und schon bei geringer Proteaseaktivität gespalten werden, eignet sich die limitierte Proteolyse zur Untersuchung der Domänenstruktur eines Proteins.

Limitierte Proteolyse wurde an gereinigtem TreF mit Thermolysin, Proteinase K, Papain (Boehringer Mannheim) und Trypsin (TPCK-behandelt, Sigma) durchgeführt. Dazu

wurden je 15 µg TreF 1 : 1 mit verschiedenen Protease-Konzentrationen gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteasen wurden in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis zu 20 µg/ml eingesetzt, wobei die Konzentrationen schrittweise um den Faktor 5 erhöht wurden. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von einem Zehntel des Reaktionsvolumens an Stopplösung gestoppt, gekocht und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Im Folgenden sind die Puffer und Stopplösungen für die jeweiligen Proteasen aufgeführt:

Tabelle 4.3.: Reaktionsbedingungen für die limitierte Proteolyse

Protease	Reaktionspuffer ¹⁾	Stopplösung ¹⁾
Thermolysin	40 mM Tris/HCl, 20 mM Glycerin, 5 mM Ca ²⁺ , pH 7,8	10-fach Probenpuffer ²⁾ , 50 mM EDTA
Proteinase K	40 mM Tris, pH 7,0	10-fach Probenpuffer, Pefabloc SC(AEBSF) (Boehringer) 1 mg/ml
Trypsin	40 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, pH 7,8, +3 mM CaCl ₂	10-fach Probenpuffer, 35 mM DTT
Papain	40 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 20 % Glycerin, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, pH 7,8	10-fach Probenpuffer ohne DTT, 20 mM N-Ethylmaleimid

¹⁾ Stammkonzentrationen

²⁾10-fach Probenpuffer: 600 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % SDS, 40 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau, 35 mM Dithiothreitol (DTT)

Für die Bestimmung der aminoterminalen Sequenz ausgewählter Proteolyseprodukte wurden bestimmte Proteolyse-Reaktionen (0,54mg/ml Thermolysin sowie 0,016 und 0,08 µg/ml Proteinase K) in 5-fachem Maßstab wiederholt.

4.4.11. Kalte osmotische Schocks

Um die Translokationseffizienz von Proteinen zu untersuchen, wurden aus Zellen periplasmatische Proteine durch kalte osmotische Schocks nach der Beschreibung von Neu et al. (Neu et al., 1965) freigesetzt und von den restlichen Proteinen getrennt. Sediment und Überstand der kalten osmotischen Schock-Präparationen wurden im Western Blot analysiert.

4.5. Molekularbiologische Methoden

4.5.1. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit zwei verschiedenen Methoden präpariert, die beide auf der alkalischen Extraktion nach Birnboim et al. (Birnboim et al., 1979) basieren. Wenn viel DNA benötigt wurde, erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe von Quiagen-Säulen (100ml, Diagen GmbH, Hilden). Genügte geringere Plasmidmengen, dann wurde das Jet-prep Plasmid Miniprep Kit (von Genomed) verwendet.

4.5.2. Restriktionsanalysen und Klonierung

-Restriktionsanalysen wurden unter den von den Herstellern für die jeweiligen Restriktionsenzyme empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

-Modifikationen von DNA-Fragmenten, wie z.B. die Dephosphorylierung und der Abverdau von 5'-überhängenden Enden und das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden, erfolgten nach Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989).

-Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in der Agarose-Gelelektrophorese nach Maniatis et al. (Maniatis et al., 1982).

DNA-Fragmente wurden aus Agarose-Gelen mit Hilfe von Säulen aus dem Quiaquick Extraction Kit (Diagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben eluiert.

DNA-Fragmente mit kompatiblen überhängenden Enden oder geraden Enden können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Ligierungen erfolgten ebenfalls nach Maniatis et al. (Maniatis et al., 1982). Während die Ligierungsansätze von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden während der Ligierung von 17°C auf 4°C heruntergekühlt wurden, wurden DNA-Fragmente mit geraden Enden bei einem wiederholten Wechsel zwischen dem Temperaturoptimum der DNA-Hybridisierung und dem der Ligase-Reaktion ligiert. Nach Lund und Duch (Lund und Duch, 1996) soll dadurch die Ligationseffizienz erhöht werden.

4.5.3. Einfügen von Restriktionsschnittstellen und Amplifizierung eines DNA-Fragments mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente für die Konstruktion der Plasmide ptreA'-treF und psstreF mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Zum Teil wurden die Oligonukleotide so gewählt, daß durch die PCR geeignete Restriktionsschnittstellen an den Enden der zu amplifizierenden DNA-Fragmente eingefügt wurden (vergl. Plasmidkonstruktionen).

Die PCR-Reaktion wurde unter Standardbedingungen (Asubel et al., 1992) mit der Vent-DNA-Polymerase (Biolabs) durchgeführt. Das Aufschmelzen der Template-DNA fand bei 92°C, die Polymerisierung bei 72°C und die Hybridisierung der Oligonukleotide bei

61°C (für ptreA'-treF) bzw. 53°C (für psstreF) statt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden von der Polymerase gereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und durch Auftrennung in einem Agarose-Gel und anschließende Elution aus dem Gel gereinigt. Sie konnten so für die Klonierungen eingesetzt werden.

4.5.4. DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Sequenzierung von Doppelstrang-DNA beruht auf der wiederholten, von einer spezifischen Oligonukleotid-Bindestelle ausgehenden Neusynthese von DNA, die durch die Hitzestabilität der DNA-Polymerase möglich ist (PCR), und dem Kettenabbruch durch den Einbau von Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) (Sanger et al., 1977). Für die Probenvorbereitung wurde das Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (RPN2436) der Firma Amersham nach Gebrauchsanweisung verwendet. Pro Sequenzreaktion wurden ca. 1 µg Plasmid und 2 pmol/µl folgender 5'Cy5-markierter Oligonucleotide (von MWG) eingesetzt:

Für die Ermittlung der Fusionspunktes von TreA'-TreF8:

TreA449-472cy-5: 5'- TGC TCA TGA AAT AGA CAC TTA CG -3'

Für die Ermittlung der Fusionspunkte von TreA'-TreF1, TreA'-TreF2, TreA'-TreF10 sowie ΔssTreA'-TreF1 und ΔssTreA'-TreF7:

TreA837-858cy-5: 5'- AGC TCG CGC TGG ATG GAC AAC C -3'

Für die Sequenzierung der ssTreF-Mutanten:

ssstreF4465-4488: 5'- GGA GAA TGA TTG ATG AAA TCC C - 3'

ssstreF4939-4959: 5'- CCAGCG AGT ATG TAT CGG ACC - 3'

ssstreF5312-5334: 5'- CTA TCT CGA CCA CCT TAA AAT GG - 3'

ssstreF5777-5798: 5'- CAT CTA CCG CGA TTA CGA CTG G - 3'

Die Phasen der Hybridisierung und Strangverlängerung (30 sec, 60°C) und die der Denaturierung (30 sec, 95°C) wurden 25 mal durchlaufen.

Die Sequenzierung der Reaktionen wurden von Herrn Baur und Frau Englisch (Technologie Transfer Zentrum, Universität Konstanz) durchgeführt.

4.6. Computeranalysen und Homologieuntersuchungen von DNA- und Aminosäuresequenzen

Die DNA-Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Apple Macintosh Programme `DNA-Strider´ und `DNA Align´ erfaßt und ausgewertet.

Aminosäure-Sequenz-Homologien zu anderen Trehalasen wurden in Anfragen an die neuste Ausgabe aller verfügbarer Datenbanken des `Swiss-Prot Servers´^{*)} gefunden und mit dem ClustalV Programm dargestellt.

Für Sekundärstrukturvorhersagen wurden das Programm PHD^{**)} (Rost et al., 1994; Rost und Sander, 1994 a und b) verwendet.

^{*)} <http://expasy.hcuge.ch./sprot/sprot-top.html>

^{**)} <http://www.public.iastate.edu/~pedro/pprotein-query.html>