

**Rekombinantes Cytochrom c_6 aus
Synechocystis PCC 6803:
Produktion und Untersuchung seiner Rolle
im respiratorischen Elektronentransport.**

DIPLOMARBEIT

*zur Erlangung des akademischen Grades Diplomingenieur
eingereicht von
Markus Feichtinger*

Durchgeführt an der
Universität für Bodenkultur Wien, Department für Chemie,
Abteilung für Biochemie, Metalloprotein Research Group

Wien, Jänner 2007

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer am Department für Chemie der Universität für Bodenkultur Wien, Herrn Prof. Christian Obinger für die Ermöglichung und Unterstützung der Diplomarbeit bedanken.

Dank gebührt auch Herrn Prof. Florian Rüker und seinem Team für die Unterstützung bei den mikrobiologischen Arbeiten.

Ganz besonders danke ich Dr. Martina Paumann, Dr. Christa Jakopitsch und Prof. Paul Furtmüller für die ausgezeichnete Betreuung während der praktischen Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cyanobakterien (aerobe, oxygene, phototrophe Bakterien).....	1
1.1.1	Morphologie der Cyanobakterien.....	1
1.1.2	Atmung und Photosynthese.....	3
1.2	Cytochrome	5
1.2.1	Cytochrom <i>c</i>	6
1.2.2	Cytochrome <i>c</i> Reifung	9
2	Problemstellung.....	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Amplifizierung des Cytochrom <i>c</i> ₆ -Genes.....	12
3.1.1	Methodik	12
3.1.2	Durchführung	12
3.1.3	Geräte und Reagenzien.....	14
3.2	Präparation des Vektors pET-27b(+)	17
3.2.1	Methodik	17
3.2.2	Durchführung	18
3.2.3	Reagenzien	19
3.3	Präparation des Plasmids pEC86.....	21
3.3.1	Methodik	21
3.3.2	Durchführung	22
3.3.3	Reagenzien	22
3.4	Schneiden des pET-Vektors und der PCR-Produkte.....	23
3.4.1	Methodik	23
3.4.2	Durchführung	23
3.4.3	Reagenzien	24
3.5	Ligation	24
3.5.1	Methodik	24
3.5.2	Durchführung	24
3.5.3	Reagenzien	25
3.6	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
3.6.1	Methodik	26
3.6.2	Durchführung	26
3.6.3	Reagenzien	27
3.7	Transformation in <i>E. coli</i> Top 10 F'-Zellen.....	27

3.7.1	Methodik	27
3.7.2	Durchführung	27
3.7.3	Geräte und Reagenzien.....	28
3.8	Überprüfung der Klonierung.....	28
3.8.1	PCR Screening	28
3.8.2	Isolierung (Mini-Prep) und Restriktionsscreening der Plasmid-DNA.....	30
3.9	Transformation in den Expressionsstamm	32
3.9.1	Ohne <i>E. coli</i> Cytochrom <i>c</i> -Reifungsgene.....	32
3.9.2	Mit <i>E. coli</i> Cytochrom <i>c</i> -Reifungsgene.....	33
3.9.3	Geräte und Reagenzien.....	34
3.10	Cytochrom <i>c</i> ₆ -Expression.....	34
3.10.1	Methodik	34
3.10.2	Durchführung	34
3.10.3	Geräte und Reagenzien.....	36
3.11	SDS-Page	38
3.11.1	Methodik	38
3.11.2	Durchführung	38
3.11.3	Geräte und Reagenzien.....	39
3.11.4	Coomassie Blue-Färbung	40
3.12	Sequenzierung	41
3.12.1	Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung.....	41
3.12.2	Sequenzierungsreaktion	41
3.13	Proteinreinigung.....	41
3.13.1	Reinigung von Cytochrom <i>c</i> ₆ mit His-Tag (b und c Klone)	41
3.13.2	Reinigung von Cytochrom <i>c</i> ₆ ohne His-Tag (a Klon).....	45
3.13.3	Aufkonzentrieren mittels Centriprep.....	49
3.13.4	Reduzieren bzw. Oxidieren von Cytochrom <i>c</i> ₆	50
3.13.5	Entsalzung mit PD-10 Entsalzungssäulen.....	50
3.14	Spektralphotometrische Untersuchungen.....	51
3.14.1	Photometrische Charakterisierung von Cytochrom <i>c</i> ₆	51
3.14.2	Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizient	53
3.15	MALDI-TOF-MS	54
3.15.1	Methodik	54
3.15.2	Durchführung	54
3.15.3	Geräte und Reagenzien.....	55

4	Ergebnisse	56
4.1	Klonierung.....	56
4.1.1	Amplifizierung des Cytochrom c_6 -Genes.....	56
4.1.2	Präparation der Inserts und des Vektors.....	57
4.1.3	Ligation	57
4.2	Transformation in <i>E. coli</i> Top 10 F'-Zellen.....	58
4.3	Überprüfung der Klonierung.....	59
4.3.1	PCR Screening	59
4.3.2	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	60
4.4	Transformation und Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	62
4.4.1	Cytochrom c_6 -Expression.....	62
4.5	Transformation und Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) Star	65
4.5.1	Cytochrom c_6 -Expression ohne <i>E. coli</i> Cytochrom c -Reifungsgene	65
4.5.2	Transformation des pEC86 Plasmides in die Klone b4 und c5.....	66
4.5.3	Expression der Klone b4 und c5 mit Cytochrom c -Reifungsgenen	66
4.5.4	Gleichzeitige Transformation der a-Klone 5/6/8 mit dem pEC86-Plasmid.....	67
4.5.5	Expression der a-Klone 5/6/8 mit Cytochrom c -Reifungsgenen	67
4.6	Sequenzierung	68
4.7	Spektralphotometrische Untersuchungen.....	70
4.7.1	Photometrische Charakterisierung von Cytochrom c_6	70
4.7.2	Ermittlung der molaren Extinktionskoeffizienten.....	72
4.8	Reinigung	74
4.8.1	Reinigung von Cytochrom c_6 mit His-Tag (b- und c- Klone).....	74
4.8.2	Reinigung von Cytochrom c_6 ohne His-Tag (a Klon).....	75
4.8.3	Reduzieren bzw. Oxidieren von Cytochrom c_6	76
4.9	MALDI-TOF-MS.....	76
5	Diskussion	78
6	Literatur.....	81

1 Einleitung

1.1 Cyanobakterien (aerobe, oxygene, phototrophe Bakterien)

Cyanobakterien kommen ubiquitär vor. Im Besonderen sind sie in Süß- und Meerwasser, in Thermalquellen, in oberen Bodenschichten, auf Gesteinen und auf der Oberfläche von Pflanzen zu finden.

Früher wurden Cyanobakterien wegen gemeinsamer physiologischer Eigenschaften zu den Pflanzen gezählt. Da die Cyanobakterien mit Algen und höheren Pflanzen eine mit Sauerstoffentwicklung einhergehende Photosynthese, sowie den Besitz von Chlorophyll a und anderen Pigmenten gemeinsam haben, wurden sie als Blaualgen den Algen zugeordnet. Heute werden sie aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeiten und wegen ihrem Zellteilungsmechanismus zu den Bakterien gezählt.

Cyanobakterien sind Prokaryonten, die eine aerobe, oxygene (d. h. Sauerstoff freisetzende) Photosynthese betreiben. Sie gedeihen als obligat oder fakultativ photoautotrophe Organismen schon alleine durch die Verfügbarkeit von Wasser, Licht, Kohlendioxid und essentiellen Mineralstoffen und stützen ihre Energieversorgung im wesentlichen auf die Photophosphorylierung. Darüberhinaus sind sie aber auch fähig aerob zu atmen (oxidative Phosphorylierung).

Cyanobakterien sind die größte, formenreichste und am weitesten verbreitete Gruppe der photosynthetisch tätigen Prokaryonten und durch ihre Befähigung, an extremen Standorten wachsen und molekularen Stickstoff fixieren zu können, im Naturhaushalt von großer Bedeutung.

Sie waren wahrscheinlich auch die ersten Organismen, die überhaupt oxygene Photosynthese betrieben und so vor etwa 3,3 Milliarden Jahren durch ihre Sauerstoffproduktion (Wasserspaltung am Photosystem II) entscheidend dazu beigetragen haben, dass eine sauerstoffhaltige Biosphäre entstanden ist.

1.1.1 Morphologie der Cyanobakterien

Hinsichtlich der Feinstruktur der Zelle stimmen die Cyanobakterien mit den Gram-negativen Bakterien weitgehend überein. Der Protoplast ist von einer Zellwand umgeben, die auf der Peptidoglykanschicht eine äußere Membran mit einer Lipopolysaccharidschicht trägt. Manche Cyanobakterien können auch zusätzlich eine Schleimschicht synthetisieren. Zum Cytosol hin schließt die Zellwand mit der cytoplasmatischen Membran (CM) ab.

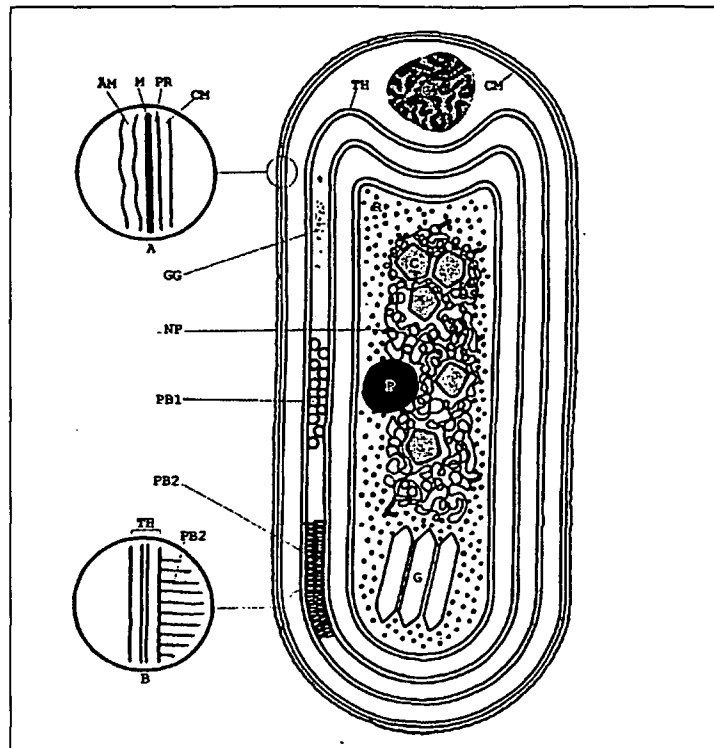


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer cyanobakteriellen Zelle: ÄM, Äußere Membran; M, Murein; PR, Periplasmatischer Raum; CY, Cyanophycinkörnchen; NP, Nucleoplasma mit Kernäquivalent; CM, cytoplasmatische Membran; TH, Thylakoidmembran (ICM); R, Ribosomen; C, Carboxysomen; P, Polyphosphatgranulum; G, Gasvesikel. A, Darstellung der Zellwand; B, Darstellung der Thylakoidmembranen mit angelagerten Phycobilisomen (PB1, PB2).

Wie die äußere Membran besteht die chlorophyllfreie Cytoplasmamembran aus einer Phospholipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen. Sie fungiert als Hauptpermeabilitätsschranke und enthält die Komponenten für den respiratorischen Elektronentransport.

Der Photosyntheseapparat der Cyanobakterien liegt in Form von Thylakoiden vor, die entweder parallel zur Cytoplasmamembran oder vielfach gewunden im peripheren Protoplasmaraum liegen. Die Thylakoide besitzen sowohl die Komponenten für den photosynthetischen als auch den respiratorischen Elektronentransport.

Wobei sich die beiden Elektronentransportketten den Plastochinon-Pool, den Cytochrom *b₆f*-Komplex und die löslichen Elektronentransferproteine Cytochrom *c*₆ (Cyt *c*₆) und Plastocyanin (PC) teilen.

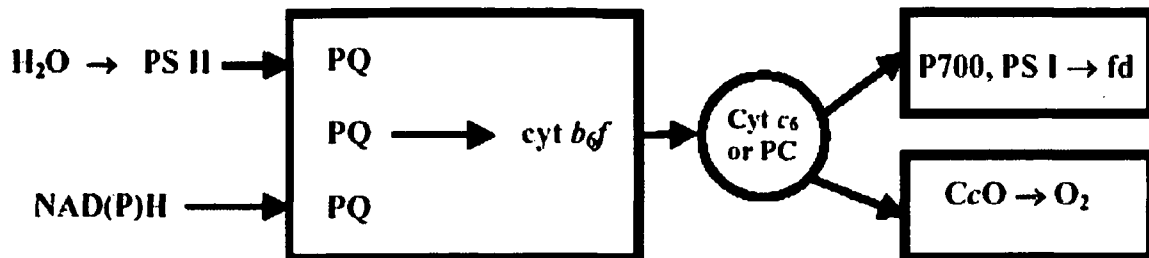


Abbildung 2: Schema zur Doppelfunktion diverser Komponenten im photosynthetischen und respiratorischen Elektronentransport cyanobakterieller Thylakoidmembran. CcO, Cytochrom *c* Oxidase; fd, Ferredoxin; PQ, Plastochinon; PSI, Photosystem I; PSII, Photosystem II.

Die Thylakoidmembran (intra-cytoplasmatische Membran, ICM) enthält Chlorophyll *a*, β -Carotin und verschiedene Oxocarotinoide. Darüber hinaus befinden sich an ihrer Oberfläche die sogenannten Phycobilisomen, die als Antennenpigmente der Cyanobakterien dienen. Die von den Phycobilisomen absorbierte Energie wird hauptsächlich an das Photosystem II abgegeben.

1.1.2 Atmung und Photosynthese

Cyanobakterien sind die einzigen Prokaryonten, die oxygene Photosynthese und aerobe Atmung in einer Zelle durchführen können.

Die Tatsache, dass die Thylakoidmembran 90% der Gesamtmembran ausmacht und dass mehr als 90% des Elektronenflusses im Licht durch P700 und nicht durch die Cytochrom *c* Oxidase läuft, verdeutlicht die Dominanz der Photosynthese. Jedoch erzeugen sogar obligat phototrophe Arten während der Dunkelheit ATP durch Atmung. Gereinigte Membranen von über 20 verschiedenen Cyanobakterienarten haben gezeigt, dass sowohl die cytoplasmatische als auch die Thylakoidmembran alle Komponenten für den respiratorischen Elektronentransport besitzen: NAD(P)H-Dehydrogenase, Plastochinon, Cytochrom *b₆f*-Komplexe und Cytochromoxidasen (Moser et al., 1991).

An der oxygenen Photosynthese sind zwei unterschiedliche, photosynthetisch aktive Proteinkomplexe beteiligt, die unabhängig voneinander Lichtenergie zur Ausbildung eines ladungstrennten Zustandes nutzen können. Sie werden Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII) genannt. Vier membranständige Proteinkomplexe und verschiedene kleinere Elektronentransportproteine oder -moleküle sind an der oxygenen Photosynthese beteiligt.

Beide Photosysteme, das PSII und das PSI, sind photosynthetische Reaktionszentren. Sie können nach der Anregung eines primären Elektronendonors, P, eine gerichtete Ladungstrennung durchführen, wobei ein Elektron auf die stromale Seite des Komplexes transportiert wird. Das fehlende Elektron des P^+ wird im PSII durch die Oxidation von Wasser ersetzt. Dabei werden sowohl H^+ ins Lumen abgegeben als auch O_2 als Nebenprodukt freigesetzt. Im PSI hingegen wird das fehlende Elektron vom Plastocyanin oder Cytochrom c_6 ersetzt, die über den Cytochrom b_6/f -Komplex und den Plastchinon/Plastochinol-Pool, indirekt vom PSII reduziert werden. An der stromalen Seite des PSI werden die löslichen Transportproteine Ferredoxin (Fd) oder Flavodoxin (Flv) reduziert, die die Elektronen über die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) auf NADP⁺ übertragen. NADP⁺ wird zu NADPH reduziert. Durch die Reaktionen kommt es zu einer erhöhten Protonenkonzentration im Lumen. Der resultierende Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP genutzt.

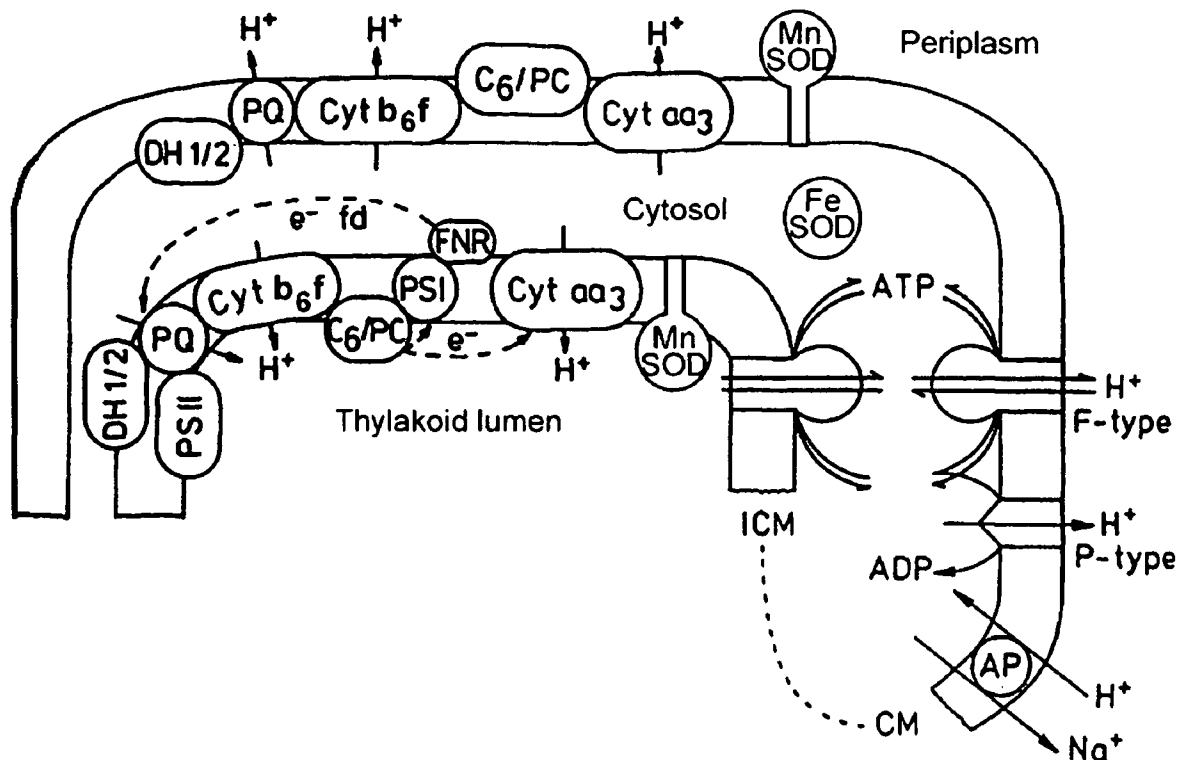


Abbildung 3: Schematische Darstellung der momentanen Vorstellung über den respiratorischen und den photosynthetischen Elektronentransport in den Cyanobakterien. CM, cytoplasmatische Membran; ICM, Thylakoidmembran; PSI, Photosystem I; PSII, Photosystem II; DH, NAD(P)H-Dehydrogenase; PQ, Plastochinon; PC, Plastocyanin; c_6 , Cytochrom c_6 ; Cyt b_6f , Cytochrom b_6f -Komplex; Cyt aa_3 , Cytochrom c Oxidase; fd, Ferredoxin; FNR, Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase; Ap, Na⁺/H⁺-Antipporter; MnSOD, manganhaltige Superoxiddismutase; FeSOD, eisenhaltige Superoxiddismutase.

1.2 Cytochrome

Cytochrome sind elektronenübertragende Proteine, die ein Häm als prosthetische Gruppe enthalten. Das Häm besteht aus einem organischen Teil und einem Eisenatom. Der organische Teil (Protoporphyrin) besteht aus vier Pyrrolringen, die durch Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolysystem verknüpft sind.

Cytochrome sind z. B. am respiratorischen und photosynthetischen Elektronentransport und an zahlreichen enzymatischen Redoxreaktionen beteiligt.

Es sind mehr als 50 Cytochrome bekannt, die durch ihre physikalischen und besonders ihre spektroskopischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Die Eisenporphyrine, die in Hämproteinen vorhanden sind, sind Häm a , b , c , d und f .

Unterschiedliche Cytochrome werden nach dem Häm-Typ benannt, den sie enthalten (z. B. Cytochrom *a* oder Cytochrom *c*). Um verschiedene Proteine mit demselben Häm-Typ zu unterscheiden, wird ein Index neben dem Häm-Typ gebraucht. In bestimmten Cytochromen, wie z. B. Cytochrom *c*₂, *c*₅ oder *c*₆, gibt der Index die historische Reihenfolge der Entdeckung wieder. In anderen Cytochromen, wie z. B. *c*₅₅₁, *c*₅₅₄ zeigt der Index die Lage der maximalen Absorption des α -Peaks in seiner reduzierten Form. Unabhängig vom Häm-Typ sind verschiedene axiale Liganden für das Häm in Cytochromen möglich.

1.2.1 Cytochrom *c*

Cytochrom *c* ist ein relativ kleines Protein mit ca. 100 Aminosäureresten und ungefähr 12 kDa. Cytochrom *c* ist ein peripheres Membranprotein, das leicht an die Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran gebunden ist.

Mitochondriales Cytochrom *c* transferiert Elektronen zwischen Proteinen, die in viele biologische Prozesse involviert sind. In der Atmungskette fungiert es als Elektronenüberträger zwischen der Cytochrom *c* Reduktase (auch Q-Cytochrom *c* Oxidoreduktase) und der Untereinheit II der Cytochrom *c* Oxidase. Dabei werden Elektronen vom Cytochrom *c*₁ der Cytochrom *c* Reduktase auf Cytochrom *c* übertragen und an das Cu_A-Zentrum in der Untereinheit II abgegeben. Cytochrome *c* enthalten ein Häm *c* und haben zumindest einen Histidin-Liganden.

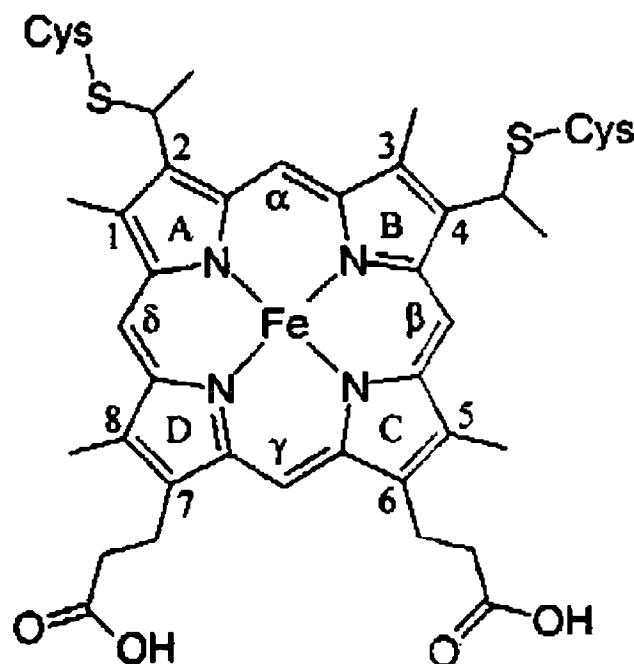


Abbildung 4: Häm *c* mit den kovalenten Verknüpfungen an die Cystein-Reste.

Charakteristisch für Cytochrome *c* ist das Sequenzmotif C-X-X-C-H. Die zwei Cystein-Reste sind kovalent mit dem Häm verbunden und das Histidin fungiert als axialer Ligand. Cytochrome *c* sind in vier Klassen eingeteilt:

Klasse I enthält Monohäm Cytochrome *c* mit der Häm-Anlagerungsstelle nahe dem N-Terminus. Klasse II enthalten Monohäm Cytochrome *c* mit der Häm-Anlagerungsstelle nahe dem C-Terminus. Klasse III beinhalten Multihäm Cytochrome *c* mit 2 Histidinen als axiale Liganden. Klasse IV beinhalten Multihäm Cytochrome *c* mit 2 Histidinen oder einem Histidin und einem Methionin als axiale Liganden.

1.2.1.1 Klasse I Cytochrome *c* – Cytochrom *c*₆ (Cyt *c*₆)

Die Klasse I der Cytochrome *c* Familie enthält Monohäm Cytochrome *c* mit der Häm-Anlagerungsstelle nahe dem N-Terminus. Ein Mitglied dieser Klasse ist das Protein **Cytochrom *c*₆**.

Cytochrom *c*₆ ist in Cyanobakterien im periplasmatischen Raum und im Lumen der Thylakoide lokalisiert und dient dort als Elektronencarrier in der Atmungskette bzw. Photosynthese. Cytochrom *c*₆ fungiert als löslicher Elektronencarrier zwischen den membrangebundenen Komplexen Cytochrom *b*₆*f* und Cytochrom *c* Oxidase in der Atmungskette und als intrathylakoidaler Elektronenüberträger zwischen Cytochrom *b*₆*f* und Photosystem I in der Photosynthese. Cytochrom *c*₆ oxidiert hierbei die ins Lumen exponierte Untereinheit Cytochrom *f* vom Cytochrom *b*₆*f*-Komplex und reduziert das Reaktionszentrum P700 des Photosystemes I.

Cytochrom *c*₆ wird in vielen Cyanobakterien und in verschiedenen Arten von fast allen Klassen der eukaryotischen Algen gefunden. Höhere Pflanzen synthetisieren hingegen nur Plastocyanin (PC). Das Monokupferprotein Plastocyanin und Cytochrom *c*₆ ähneln sich sowohl in ihren physikochemischen Eigenschaften als auch in der Struktur ihrer Oberflächen und können sich daher gegenseitig ersetzen (vgl. Abbildung 2). Deren Synthese wird durch die Verfügbarkeit von Kupfer reguliert. Zellen produzieren in Anwesenheit von Kupfer Plastocyanin, wohingegen bei Abwesenheit Cytochrom *c*₆ synthetisiert und als Elektronencarrier genutzt wird.

Cytochrom c_6 ist hauptsächlich charakterisiert durch die hochkonservierte N-terminale Hämkoordinationssequenz C-X-X-C-H und dem Low-Spin Häm, mit Methionin- und Histidin-Resten als axiale Liganden.

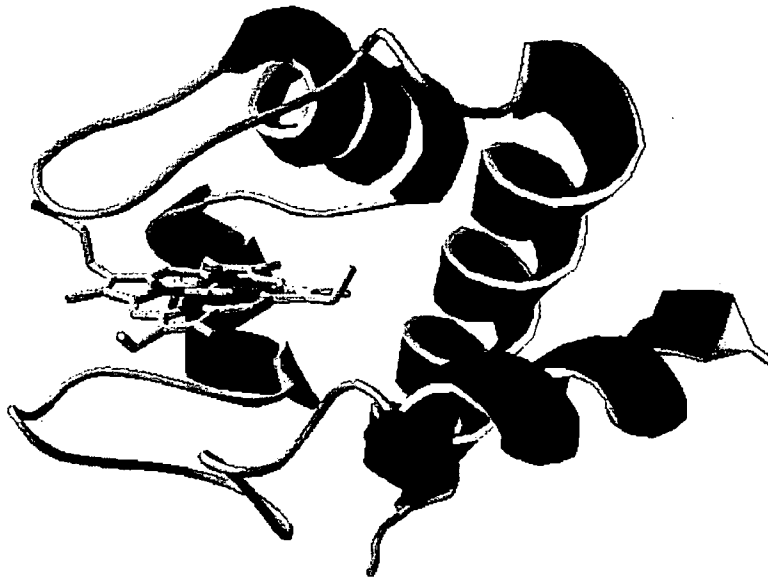


Abbildung 5: 3D-Struktur von Cytochrom c_6 aus *Synechocystis* Pasteur Culture Collection (PCC) 6803; modelliert nach *Porphyra yezoensis* Cytochrom c_6 (PDB code 1GDV).

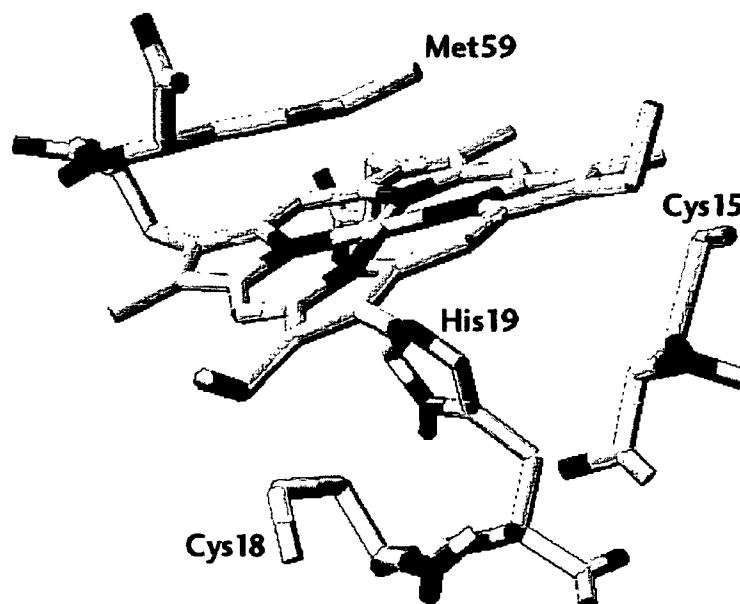


Abbildung 6: Aktives Zentrum von *Synechocystis* PCC6803 Cytochrom c_6 mit axialen Liganden (Methionin- und Histidin-Reste).

1.2.2 Cytochrome *c* Reifung

Cytochrome *c* werden in eukaryontischen Organellen und in extracytoplasmatischen Kompartimenten von Bakterien und Archaeobakterien gefunden. Sie sind auf der p-Seite der Membran lokalisiert (p-Seite = Intermembranraum von Mitochondrien, Chloroplast-Lumen und das Periplasma von Bakterien). Der letzte Schritt der Hämbiosynthese passiert auf der n-Seite (n-Seite = mitochondriale Matrix, Chloroplast-Stroma oder das Cytoplasma von Bakterien). Es ist bekannt, dass die kovalente Bindung des Häms auf der p-Seite der Membran stattfindet. Dafür müssen das Apocytochrom und das Häm zuerst durch die Membran transportiert werden (Thöny-Meyer, 2000).

Die Cytochrome *c* Reifung erfordert also einige posttranslationale Prozesse für die korrekte kovalente Knüpfung der prosthetischen Gruppe an das Apoprotein.

Dazu gehört die Translokation des Polypeptides (Apoprotein) und des Häms (prosthetische Gruppe) durch eine Membran, bevor es im richtigen subzellulären Kompartiment zur kovalenten Verknüpfung zwischen dem Apoprotein und seiner prosthetischen Gruppe kommt.

Die kovalente Verknüpfung beruht auf der Bildung von Thioetherbindungen zwischen den Häm-Vinylgruppen und den Cysteinen des Proteins, welche Teil der typischen Hämbindungssequenz C-X-X-C-H sind.

In Cyanobakterien kodiert das *petJ*-Gen für den Elektronencarrier Cytochrom *c₆*. Die Biosynthese von Häm und von Preapoprotein erfolgt im Cytoplasma, wohingegen die posttranslationale Reifung von Cytochrom *c₆* im thylakoidalen Lumen bzw. im periplasmatischen Raum von Cyanobakterien stattfindet.

1.2.2.1 Cytochrome *c* Reifung mittels Chaperone (Reifungsgene)

Die ersten Gene, die in der Cytochrom *c* Reifung involviert sind, wurden unabhängig voneinander in den α -Proteobakterien *Rhodobacter capsulatus* und *Bradyrhizobium japonicum* entdeckt und nachfolgend noch in vielen anderen α - und γ -Proteobakterien.

In *E. coli* sind die Cytochrom *c* Reifungsgene CcmABCDEFGH (Ccm, cytochrome *c* maturation) in einem Operon organisiert.

Eine Schlüsselrolle in der Cytochrom *c* Reifung spielt CcmE. CcmE fungiert durch die Bindung des Häms als periplasmatisches Häm-Chaperon, schützt das Häm vor unspezifischen Interaktionen mit anderen Proteinen und Lipiden, und bringt es zum Apocytochrom. Der Hämtransfer von CcmE zum Apocytochrom *c* benötigt einerseits CcmF und andererseits CcmG/H. CcmG und CcmH sind in die Aktivierung der Häm-Bindungsseite des Apocytochromes involviert, indem sie die Cystein-Reste reduziert halten. CcmF bringt CcmE und Apocytochrom *c* in engen Kontakt, und fördert so die Ligationsreaktion (Thöny-Meyer, 2000).

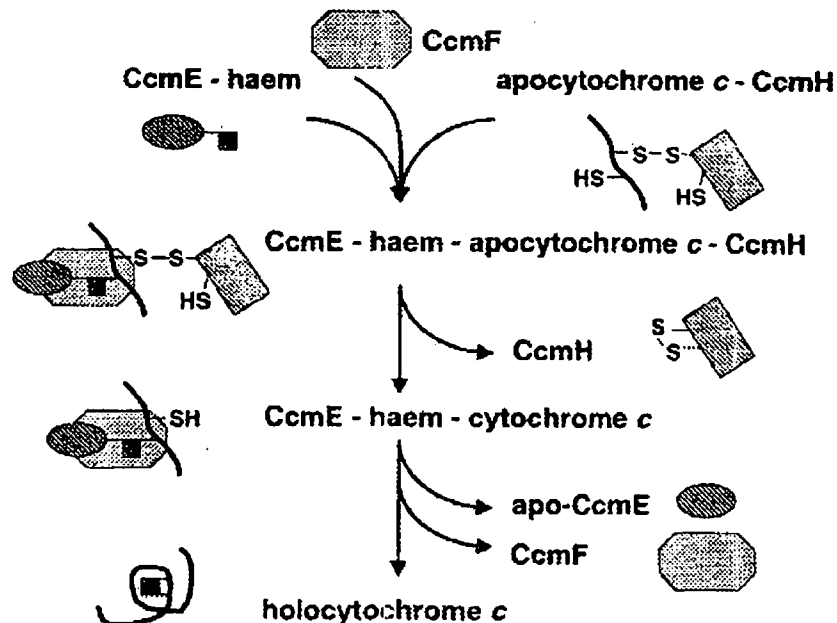


Abbildung 7: Mutmaßlicher Mechanismus für die Häm-Abgabe von CcmE an das Apocytochrom *c*.

2 Problemstellung

In der Metalloprotein Research Group auf der BOKU wird unter anderem auch auf dem Gebiet der Elektronentransportprozesse in Cyanobakterien geforscht. Damit diese Prozesse besser verstanden werden können, ist es erforderlich, die daran beteiligten Enzyme und Proteine zu charakterisieren.

Eines der Proteine, nämlich Cytochrom c_6 , hat hier die Aufgabe als mobiler löslicher Elektronencarrier sowohl in der Photosynthese als auch in der Atmungskette zu fungieren. Cytochrom c_6 überträgt Elektronen zwischen den membrangebundenen Komplexen Cytochrom b_6f und Cytochrom c Oxidase in der Atmungskette und zwischen Cytochrom b_6f und dem Photosystem I in der Photosynthese.

Um Cytochrom c_6 entsprechend charakterisieren zu können, war das Ziel dieser Arbeit, dieses Protein mit einem möglichst hohen Ertrag rekombinant herzustellen. Hierzu sollte das *petJ*-Gen (kodiert für Cytochrom c_6) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803 mittels PCR vermehrt und mit Hilfe eines Vektors in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Die Aufreinigung des gebildeten Cytochrom c_6 sollte anschließend mit diversen chromatographischen Mitteln erfolgen. Mit Hilfe des rekombinanten Proteins sollte in weiterer Folge dessen Rolle im respiratorischen Elektronentransport untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Amplifizierung des Cytochrom *c*₆-Genes

3.1.1 Methodik

Dies erfolgte mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Für diese Reaktion werden 2 Oligonukleotide (Primer) benötigt, die antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA hybridisieren können. Die DNA und die beiden Primer werden gemischt und die DNA wird thermisch denaturiert, sodass die Oligonukleotide beim Abkühlen an die passenden komplementären Sequenzen binden können (Annealing-Reaktion). Durch Zugabe der DNA-Polymerase kommt es dann zur DNA-Synthese und Verlängerung der Primer (Extension-Reaktion). Nach mehreren Zyklen (Denaturierung, Annealing, Extension) liegt das gewünschte DNA-Fragment in sehr hoher Kopienzahl vor (Knippers et al., 1990).

3.1.2 Durchführung

Folgende Primer wurden für die PCR verwendet:

Cytochrom <i>c</i> ₆ Primer	DNA Sequenz
Primer 1 (Cyt <i>c</i> ₆ p_pr1)	5' CAT GCC ATG GCG GAC CTA GCC CAC GGT AAA GCT ATC 3' 36 Basen
Primer 2 (Cyt <i>c</i> ₆ p_pr2)	5' CGC GGA TCC CTA CCA GCC CTT TTC AGC TTG ATC 3' 33 Basen
Primer 3 (Cyt <i>c</i> ₆ p_pr3)	5' CAT GCC ATG GGG CAC CAC CAT CAC CAC CAT GCT GAC CTA GCC CAC GGT AAA GC 3' 54 Basen
Primer 4 (Cyt <i>c</i> ₆ p_pr4)	5' CGC GGA TCC CTA ATG GTG GTG ATG GTG GTG CCA GCC CTT TTC AGC TTG ATC 3' 51 Basen

Tabelle 1: Primer 1-4

Klon	5' Primer	3' Primer	Klonierungsprodukt
a	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr1	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr2	Ohne Histidin Schwanz (His-Tag)
b	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr1	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr4	His-Tag am C- terminalen Ende
c	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr3	Cyt <i>c</i> ₆ p_pr2	His-Tag am N- terminalen Ende

Tabelle 2: Die einzelnen Primerpaare für die spätere Klonierung

PCR Reaktionsmix

Template	1 µl
(Kryostock <i>Synechocystis</i> PCC6803 abzentrifugiert; gewaschen in 1 ml BG11-Medium; abzentrifugiert und in dest. H ₂ O aufgenommen)	
5'-Primer [10 pmol/µl]	3 µl
3'-Primer [10 pmol/µl]	3 µl
dNTPs [2,5 mM]	12 µl
MgSO ₄ [50mM]	2 µl
10x Pfx Puffer	10 µl
Platinum Pfx DNA Polymerase [1000 bp/min]	0,8 µl
dest. H ₂ O	<u>68,2 µl</u>
	100 µl

Negativkontrollen: ohne Template, 69,2 µl dest. H₂O

Thermocycler Bedingungen

<u>1x</u>	<u>95°C</u>	<u>2 min</u>
	94°C	30 sec
30x	55°C	30 sec
	<u>68°C</u>	<u>30 sec</u>
1x	68°C	10 min

Die PCR-Reaktion wurde am Biometra Trio-Thermo-Block durchgeführt. Es wurde ein Hotstart durchgeführt. D.h. es wurde kurz vor Beginn des ersten Zyklus die Polymerase zugegeben, wobei zu diesem Zeitpunkt die DNA zur Gänze denaturiert vorlag und auch kein Annealing der Primer stattfinden konnte.

Die Kontrolle der gebildeten PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit 1xTAE als Elektrophorese-Puffer (Gellauf bei 120 Volt) verwendet. DNA ist negativ geladen und lässt sich somit im elektrischen Feld auftrennen. Als Trennmedium diente ein Gel aus Agarose, das ein Netzwerk aus Poren aufweist. Die Ladung ist einheitlich und so erfolgt die Auftrennung nur nach Form und Größe der Fragmente. Ethidiumbromid ist ein Acridinfarbstoff, der sich in die DNA einlagert und im UV-Licht

fluoresziert. Dieser Farbstoff wird den Gelen und dem Laufpuffer zugesetzt und ermöglicht die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel noch mit dem 6x Gel-loading buffer vermischt, damit der Verlauf der Elektrophorese beobachtet werden konnte.

3.1.2.1 Reinigung mittels Invisorb Spin PCRapid Kit for purification of PCR-fragments

Laut Protocol 2: Purification of PCR-Products from PCR reaction mixtures >50 µl up to 200 µl:

- 300 µl Puffer P werden zum PCR-Reaktionsmix gegeben. Transfer der Suspension auf einen Spin Filter. 1 min inkubieren
- 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- 700 µl Waschpuffer auf Spin Filter geben und 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren
- Filtrat wird verworfen
- 3 min bei voller Geschwindigkeit (12.000-14.000 rpm) zentrifugieren
- Spin Filter in neues Eppendorfhütchen geben
- 50 µl dest. H₂O auf den Spin Filter pipetieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren

3.1.3 Geräte und Reagenzien

BG-11 Medium	Stanier et al., 1971
Primer	genXpress, Maria Wörth, Österreich
Trioblock T3 Thermocycler	Biometra
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Syntheseleistung 1000 bp/min	
Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitak

50xTAE Puffer

2 M Tris-HCL
1 M Na-Acetat
0,1 M EDTA
Mit Eisessig auf pH 7,8

1%iges Agarosegel

1% Agarose
50x TAE
Mit Wasser auf das gewünschte Volumen
auffüllen.
In der Mikrowelle aufkochen und
abkühlen lassen.
Zugabe von 3 μ l/100 ml Ethidiumbromid
und sofortiges Gießen in Formen.

1%iges Ethidiumbromid

1 g Ethidiumbromid
100 ml dest. H₂O
60 Minuten rühren und im Dunkeln
aufbewahren.

6x Gel-loading buffer (BX)

50 mg Bromphenolblau (0,25%)
50 mg Xylencyanol FF (0,25%)
6,6 ml 89%iges Glycerin (30%)
Mit dest. Wasser auf 20 ml auffüllen.
Proben werden mit BX-Puffer versetzt,
sodass dieser 1:6 verdünnt ist.

λIII-Marker

Herstellung der λ-DNA/*Eco*RI+*Hind*III:

166,7 µl λ-DNA (300 µg/ml)

100 µl 10x Puffer B

15 µl *Hind*III (10 U/µl)

15 µl *Eco*RI

703 µl H₂O

90 Minuten bei 37°C inkubieren

10 Minuten bei 65°C inkubieren

Aliquotieren in Eppendorfhütchen zu je 200 µl

Vor Gebrauch Zugabe von 40 µl 6x BX

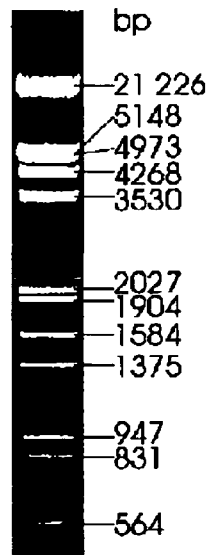


Abbildung 8: λIII-Marker

3.2 Präparation des Vektors pET-27b(+)

3.2.1 Methodik

Das pET System von Novagen ist ein sehr weit verbreitetes System für die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*. Bei den pET-Vektoren wird die Ziel-DNA unter Kontrolle eines T7-Promotors exprimiert. Zur Selektion trägt der pET-27b(+) ein Kanamycin-Resistenzgen.

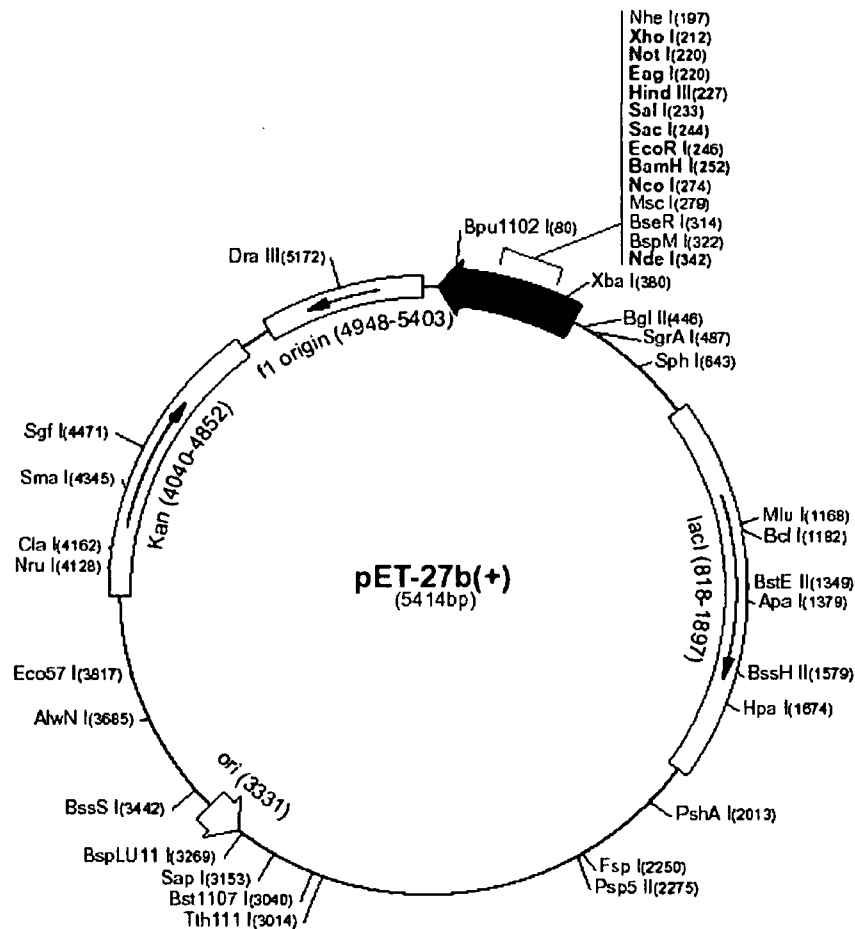


Abbildung 9: Expressionsvektor pET-27b(+). Der gefüllte schwarze Pfeil zeigt die möglichen Klonierungsstellen („multiple cloning site“). Der leere Pfeil zeigt den Ursprung der Replikation („ori“).

Dadurch, dass das Zielgen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, kann man die Expression des Zielgenes mittels der T7-RNA-Polymerase induzieren. In λ DE3 Lysogenen steht die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5 Promotor.

Die Induktion des Promotors kann durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

erfolgen.

Da jede Zelle eine Basiskonzentration an T7-RNA-Polymerase hat, können die Wirtszellen zur noch stärkeren Kontrolle zusätzlich ein pLysS- oder pLysE-Plasmid tragen. Diese Plasmide kodieren für das T7-Lysozym, das ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase ist. Zellen mit pLysS produzieren im Vergleich weniger T7-Lysozym als Zellen mit pLysE. Zur Selektion enthalten die Plasmide zusätzlich ein Chloramphenicol-Resistenzgen.

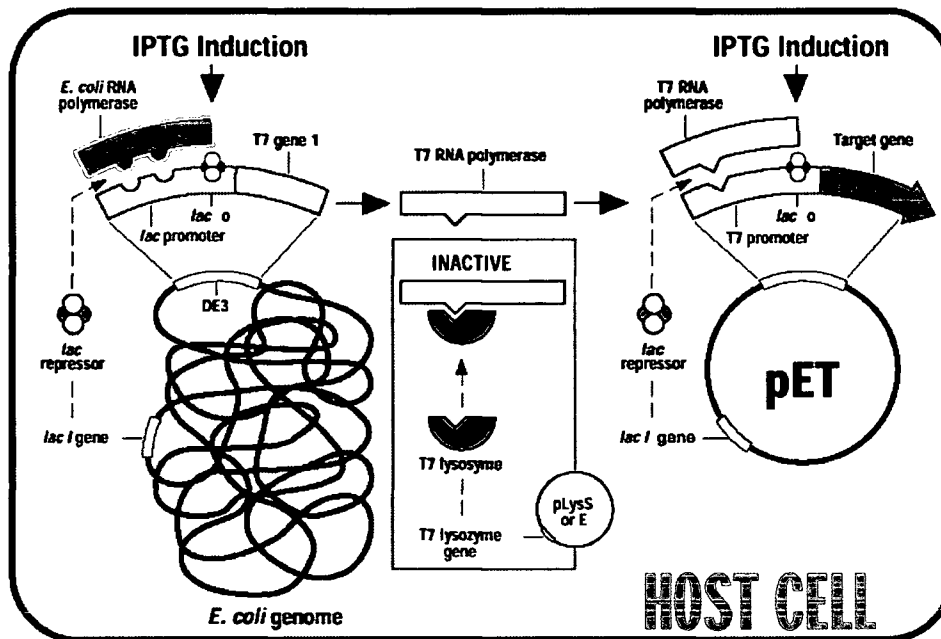


Abbildung 10: pET-Expressionssystem. Durch IPTG-Zugabe wird im E. coli-Genom T7-RNA-Polymerase gebildet, die im pET-Vektor an den T7-Promotor bindet und so die Expression des Zielgens startet.

3.2.2 Durchführung

Der Vektor pET-27b(+) wurde zuerst mittels Elektroporation in *E. coli* Top10F'-Zellen transformiert. Die Vektorpräparation erfolgte dann mittels QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi Kit.

Elektroporation:

- 0,8 μ l pET-27b(+) in Elektroporationsküvette auf Eis vorgelegt, mit 100 μ l Top10F' Zellen überschichtet
- Elektroporation (1000 Ohm, 25 μ F)
- 1000 μ l SOC-Medium dazu, 30 min 37 °C Erholung

- Ausplattiert auf LB-Kan [50 µg/ml] Platten
- Bebrüten bei 37 °C (über Nacht)

HiSpeed Plasmid Midi Kit:

- Ansetzen einer *E. coli* Top10F'-pET-27b(+) Einzelkolonie in 50 ml LB-Kan [50 µg/ml]
- Wachstum über Nacht am Schüttler bei 37°C
- Abzentrifugieren der Zellen bei 7000 rpm für 10 min
- Resuspendieren der Zellen in 6 ml Puffer P1
- Zugabe von 6 ml Puffer P2 und vorsichtiges Mischen. Die Lösung wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert
- Zugabe von Puffer P3 und vorsichtiges Mischen
- Das Lysat wird in das QIA Filter Säulchen gegeben. Bei Raumtemperatur 10 min inkubieren
- In der Zwischenzeit wird eine Säule mit 4 ml Puffer QBT equilibriert
- Das Lysat wird mit einem Stempel durch das Filter gedrückt und über die equilibrierte Säule geschickt
- Die Säule wird mit 20 ml Puffer QC gewaschen
- Die DNA wird mit 5 ml Puffer QF eluiert
- Die Plasmid-DNA wird mit 3,5 ml Isopropanol gefällt. Mischen und bei Raumtemperatur 5 min stehen lassen
- Die Lösung wird durch ein Filter gedrückt und die Plasmid-DNA bleibt im Filter hängen
- Plasmid-DNA wird mit 500 µl dest. H₂O eluiert

3.2.3 Reagenzien

LB-Medium	NaCl	10 g
	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	dest. H ₂ O	1000 ml

Wird bei 120°C autoklaviert.

SOC Medium	Bactotrypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,03 g
	Glucose x H ₂ O	3,96 g
	MgSO ₄ x H ₂ O	2,46 g
	dest. H ₂ O	ad 1000 ml

Wird bei 120°C autoklaviert.

LB-Agar	NaCl	10 g
	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Agar -Agar	15 g
	dest. H ₂ O	1000 ml

Wird bei 120°C autoklaviert

Kanamycin (Kan)	Sigma
	50 mg/ml
	Sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C
	Gebrauchskonz. für <i>E. coli</i> : 50 µg Kanamycin/ml (1:1000)

HiSpeed Plasmid Midi Kit	QIAGEN
pET-27b(+)-Vektor	Novagen

3.3 Präparation des Plasmids pEC86

3.3.1 Methodik

Das pEC86 Plasmid beinhaltet die *E. coli* Cytochrom *c* Reifungsgene *ccmABCDEFGHIH*. Diese Reifungsgene (Chaperone) spielen bei der kovalenten Verknüpfung der Häm-Gruppe mit dem Apocytochrom eine wesentliche Rolle. Zur Selektion trägt das Plasmid ein Chloramphenicol-Resistenzgen.

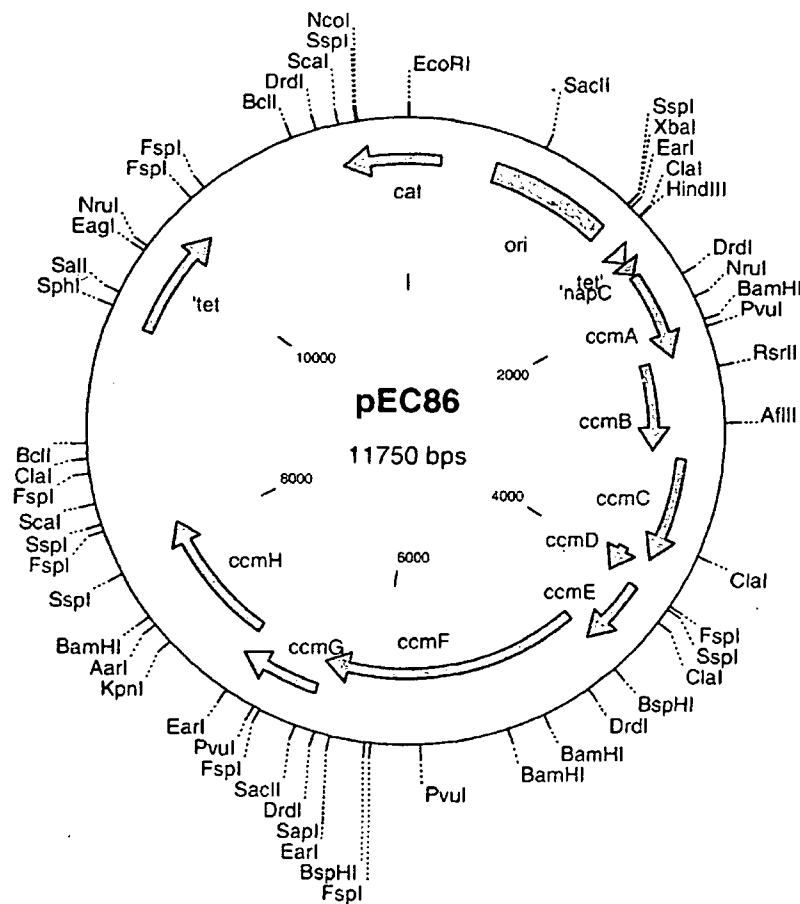


Abbildung 11: pEC86 Plasmid

3.3.2 Durchführung

Das pEC86 Plasmid wurde zuerst mittels Elektroporation in *E. coli* XL1 Blue-Zellen transformiert. Die Vektorpräparation erfolgte dann mittels QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi Kit.

Elektroporation:

- 0,8 µl pEC86 in Elektroporationsküvette auf Eis vorgelegt, mit 100 µl XL1 Blue-Zellen überschichtet
- Elektroporation (1000 Ohm, 25 µF)
- 1000 µl SOC-Medium dazu, 30 min 37 °C Erholung
- Ausplattiert auf LB-Cam [25 µg/ml] Platten
- Bebrühen bei 37 °C (über Nacht)

HiSpeed Plasmid Midi Kit:

- Ansetzen einer *E. coli* XL1 Blue-pEC86 Einzelkolonie in 50 ml LB-Cam [25 µg/ml]
- Weitere Durchführung siehe 3.2.2

3.3.3 Reagenzien

LB-Medium siehe 3.2.3

SOC Medium siehe 3.2.3

LB-Agar siehe 3.2.3

Chloramphenicol (Cam) Sigma
25 mg Chloramphenicol/ml Ethanol [96%]
Lagerung bei -20°C
Gebrauchskonz. für *E. coli*:
25 µg Chloramphenicol/ml (1:1000)

HiSpeed Plasmid Midi Kit QIAGEN

pEC86 Plasmid Arslan et al., 1998

3.4 Schneiden des pET-Vektors und der PCR-Produkte

3.4.1 Methodik

DNA-Fragment und Vektor mussten mit Restriktionsenzymen geschnitten werden. Das DNA-Fragment wurde in den Vektor mit Hilfe des Enzyms Ligase eingefügt. Damit der Vektor ohne Insert nicht religiert werden konnte, setzte man daher nach der Restriktion des Vektors das Enzym alkalische Phosphatase zu. Dieses Enzym entfernt die 5`Phosphate an den Schnittenden. Der Vektor kann somit nur durch Einfügen des DNA-Fragmentes geschlossen werden. Durch das Einfügen des DNA-Fragmentes erhält man ein rekombinantes DNA-Molekül.

3.4.2 Durchführung

Schneiden der PCR Produkte mit *NcoI* und *BamHI*:

PCR Produkte a,b und c:

45 µl PCR DNA [50 ng/µl] **2,25 µg** gesamt
3 µl *NcoI* [10 U/µl]
1,5 µl *BamHI* [20 U/µl]
15 µl 10x Puffer 2
85,5 µl dest. H₂O
150 µl

Schneiden der pET-27b(+) Midi-Prep mit *NcoI* und *BamHI*:

50 µl pET-27b(+) Midi-Prep [100 ng/µl] **5 µg** gesamt
5 µl *NcoI* [10 U/µl]
2,5 µl *BamHI* [20 U/µl]
25 µl 10x Puffer 2
167,5 µl dest. H₂O
250 µl

37 °C, über Nacht inkubieren

Für die folgende Ligation wurde der Vektor mit einer alkalischen Phosphatase behandelt:
Zugabe von 3 µl CIP (Alkalische Phosphatase) [10 U/µl] und Inkubation bei 37 °C
(2 Stunden).

Invisorb-Reinigung (siehe 3.1.2.1) des verdauten Vektors und der verdauten PCR Produkte
(*NcoI*, *BamHI*). Elution mit 45 µl dest. H₂O.

3.4.3 Reagenzien

<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>	New England Biolabs
Puffer 2	New England Biolabs
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	New England Biolabs
Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitak

3.5 Ligation

3.5.1 Methodik

Das DNA-Fragment und der Vektor wurden mittels Restriktionsenzymen genau so geschnitten, dass die jeweiligen Restriktionsschnittstellen danach mit Hilfe der Ligase ligiert werden konnten.

3.5.2 Durchführung

Zur Feststellung der benötigten Mengen an Vektor und Insert wurden Aliquote von beiden auf ein Agarosegel aufgetragen, um deren Konzentrationen abzuschätzen.

Es wurde ein molares Verhältnis Insert zu Vektor von mindestens 10:1 eingesetzt.

Ligationsansätze

Für Insert a und b:

- 3 µl pET-27b(+) [30 ng/µl]
- 9,5 µl Insert a bzw. b [8 ng/µl]
- 1 µl T-4 DNA Ligase [400 U/µl]
- 1,5 µl 10x Ligasepuffer
- 15 µl

Für Insert c:

3 µl pET-27b(+) [30 ng/µl]
3 µl Insert c [25 ng/µl]
1 µl T4-DNA-Ligase [400 U/µl]
1,5 µl 10x Ligasepuffer
6,5 µl dest. H₂O
15 µl

Es wurde auch eine Ligationsnegativkontrolle durchgeführt, indem anstelle des Inserts die adäquate Menge dest. H₂O zugegeben wurde.

Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

Invisorb-Reinigung (siehe 3.1.2.1) der Ligationen. Elution mit 50 µl dest. H₂O.

3.5.3 Reagenzien

T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
10x Ligasepuffer	New England Biolabs
Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitak
1%iges Agarosegel	

3.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

3.6.1 Methodik

E. coli-Zellen wurden in 1 mM Hepes aufkonzentriert, damit sie sich in einem Medium geringerer Ionenstärke befanden. Der Strom bei der Elektroporation würde nämlich sonst über die Ionen und nicht durch die Zellen geleitet werden. Auf diese Weise werden die Zellwände durchlässig und Plasmide können aufgenommen werden.

3.6.2 Durchführung

Für die Transformation der pET-27b(+)-Cytochrom c_6 -Konstrukte wurden *E. coli* Top 10 F'-Zellen verwendet.

- Ansetzen einer 20 ml LB-Medium Flüssigkultur, bebrüten im Schüttler bei 37°C über Nacht
- 1 Liter LB-Medium mit 10 ml der Flüssigkultur beimpfen
- Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen lassen, auf 3 saubere JA10-Zentrifugenröhrchen aufteilen und 15-30 Minuten auf Eis stellen
- Kühlkette darf ab nun nicht mehr unterbrochen werden
- 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet in 500 ml 1 mM Hepes (eisgekühlt) resuspendieren und 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet in 250 ml 1 mM Hepes (eisgekühlt) resuspendieren und wie oben zentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet in 100 ml 1 mM Hepes (eisgekühlt) resuspendieren und wie oben zentrifugieren
- Überstand abgießen, Pellet in 30 ml 10%igem Glycerin (eisgekühlt) resuspendieren und 10 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet in 3-5 ml 10%igem Glycerin resuspendieren
- Zellsuspension in 100 μ l-Aliquoten auf eiskühlte Eppendorfhütchen aufteilen und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- Lagern bei -80°C

3.6.3 Reagenzien

LB-Medium	siehe 3.2.3
1m M Hepes pH 7,0	238,3 mg Hepes 1000 ml dest. H ₂ O
10%iges Glycerin	5,75 ml Glycerin 87% 44,25 ml dest. H ₂ O

3.7 Transformation in *E. coli* Top 10 F'-Zellen

3.7.1 Methodik

Das pET-27b(+)-Cytochrom *c*₆-Konstrukt wurde in die Zielzelle eingebracht und diente somit als Träger des Zielgens. Der Vektor vermehrt sich in der Zelle und produziert somit eine Vielzahl identischer Kopien des Konstruktes.

Wenn sich die Wirtszelle teilt, werden Kopien von Vektor und Insert an die Nachkommen weitergegeben. Nach vielen Teilungen bildet sich eine Kolonie identischer Wirtszellen. Jede Zelle in einer Kolonie enthält eine oder mehrere Kopien des rekombinanten DNA-Moleküles.

3.7.2 Durchführung

Die Transformation wurde mittels Elektroporation bei 1000 Ohm, 25 µF Kapazität und 2,5 kV durchgeführt.

Je 15µl des jeweiligen pET-27b(+)-Cytochrom *c*₆-Konstruktes (a,b und c) wurden mit 100 µl elektrokompetenten *E. coli* Top 10 F' in einer Elektroporationsküvette auf Eis vereinigt und dann der elektrischen Spannung ausgesetzt.

Für die Elektroporationsnegativkontrolle wurde die Transformation mit 1 µl dest. H₂O durchgeführt. 1µl pET-27b(+) Midi-Prep-DNA diente als Elektroporationspositivkontrolle.

Zur Erholung wurde nach der Transformation sofort 600 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf LB-Kan-Platten [50 µg/ml] ausplattiert. (150 µl auf eine Platte, den Rest abzentrifugiert, in

wenig Medium aufgenommen und dann auf eine zweite Platte ausplattiert).

Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.7.3 Geräte und Reagenzien

Gene Pulser	Bio-Rad
1 ml Elektroporationsküvetten	
SOC Medium	siehe 3.2.3
LB-Medium	siehe 3.2.3
LB-Agar	siehe 3.2.3
Kanamycin (Kan)	siehe 3.2.3

3.8 Überprüfung der Klonierung

3.8.1 PCR Screening

3.8.1.1 Methodik

Zur Überprüfung, ob nach der Klonierung und Transformation tatsächlich ein Insert im Vektor vorlag, wurde neuerlich eine PCR mit dem entsprechendem Primerpaar (siehe Tabelle 2) durchgeführt.

3.8.1.2 Durchführung

Mittels PCR wurde kontrolliert, ob die transformierten Klone auch wirklich das gewünschte Insert enthielten. Das PCR Screening wurde mit 16 c-Klonen durchgeführt, da ein vorangegangenes Restriktionsscreening mit je 8 Klonen (a,b und c) kein positives Ergebnis ergab.

PCR-Reaktionsmix:

5' Primer [10 pmol/μl]	12 μl
3' Primer [10 pmol/μl]	12 μl
dNTPs [2,5 mM]	12 μl
10x Spice Puffer	60 μl
Spice DNA-Polymerase [1000 bp/min]	6 μl
dest. H ₂ O	<u>298 μl</u>
	400 μl

Pro PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 μl PCR-Reaktionsmix vorgelegt. Die jeweiligen Klone wurden in 50 μl dest. H₂O suspendiert und je 10 μl davon dienten als Template.

Positivkontrolle gleicher Ansatz mit 9 μl dest. H₂O und 1 μl eines mit Restriktionsenzymen (*Bam*HI und *Nco*I) behandeltes PCR-Produkt (siehe 3.4.2).

Negativkontrolle gleicher Ansatz ohne Template (10 μl dest. H₂O)

Thermocycler Bedingungen

<u>1x</u>	<u>95°C</u>	<u>2 min</u>
	94°C	30 sec
28x	55°C	30 sec
	<u>72°C</u>	<u>30 sec</u>
1x	72°C	10 min

Die Kontrolle der gebildeten PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit 1xTAE als Elektrophorese-Puffer (Gellauf bei 120 Volt) verwendet. Die Banden waren unter UV-Licht sichtbar.

3.8.1.3 Geräte und Reagenzien

Trioblock T3 Thermocycler	Biometra
Spice DNA-Polymerase Syntheseleistung 1000 bp/min	IAM, rekombinante DNA-Polymerase (keine proofreading Funktion)
10x Spice Puffer	
1%iges Agarosegel	

3.8.2 Isolierung (Mini-Prep) und Restriktionsscreening der Plasmid-DNA

3.8.2.1 Methodik

Als zusätzliche Kontrolle wurde die aus Kolonien des Ligationsansatzes isolierte Vektor-DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nco*I geschnitten. Durch die Restriktionsenzyme wurde das Insert herausgeschnitten. Als Positivkontrolle wurde ein mit den selben Restriktionsenzymen behandeltes PCR-Produkt (siehe 3.4.2) verwendet.

3.8.2.2 Durchführung

Mini-Prep

Die mittels PCR Screening ermittelten positiven c-Klone und je 8 zufällig ausgewählte a- und b-Klone wurden in 2 ml LB-Kan [50 µg/ml] angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Zellyse

- 1,5 ml Zellsuspension in ein Eppendorfhütchen überführen und bei Höchstgeschwindigkeit 30 Sekunden zentrifugieren (Mikrozentrifuge)
- Resuspendierung des Pellets in 150 µl Lösung I
- 150 µl Lösung II zugeben und vorsichtig mischen
- 300 µl Lösung III zugeben und vorsichtig mischen
- 5 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit (Raumtemperatur) zentrifugieren

DNA Reinigung

- Der Überstand wird in ein GFX-Säulchen überführt und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert
- 30 Sekunden bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren
- 400 ml Waschpuffer werden auf das GFX-Säulchen gegeben
- Eine Minute bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugieren
- Säulchen in ein frisches Eppendorfhütchen geben
- Filter 15 Minuten trocknen lassen
- 50 µl dest. H₂O werden auf den Filter des Säulchens getropft
- Eine Minute bei Raumtemperatur inkubieren und danach eine Minute bei Höchstgeschwindigkeit abzentrifugieren

Restriktionsverdau des Plasmids

Restriktionsverdau

Plasmid-DNA nach Mini-Prep	8 µl
<i>Bam</i> HI [20 U/µl]	0,2 µl
<i>Nco</i> I [10 U/µl]	0,5 µl
10x <i>Bam</i> HI Puffer	1,2 µl
BSA [10mg/ml]	0,12 µl
dest. H ₂ O	<u>2 µl</u>
	12,02 µl

Zwei Stunden bei 37°C inkubieren.

Die Kontrolle der gebildeten PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit 1x TAE als Elektrophorese-Puffer (Gellauf bei 120 Volt) verwendet. Banden waren unter UV-Licht sichtbar.

3.8.2.3 Reagenzien

GFX Micro Plasmid Prep Kit	Pharmacia
Restriktionsenzyme <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I	New England Biolabs
<i>Bam</i> HI Puffer	New England Biolabs
BSA	New England Biolabs

3.9 Transformation in den Expressionsstamm

3.9.1 Ohne *E. coli* Cytochrom *c*-Reifungsgene

Die nach dem Restriktionsscreening als positiv bewerteten pET-27b(+)-Cytochrom *c*₆-Konstrukte wurden in den vorgesehenen Expressionsstamm transformiert.

3.9.1.1 Durchführung

Für die Transformation wurden elektrokompetente Zellen der Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3)pLysS und *E. coli* BL21(DE3) Star hergestellt (siehe 3.6.2).

Die Transformation wurde mittels Elektroporation bei 1000 Ohm, 25 µF Kapazität und 2,5 kV durchgeführt.

Je 1 µl der jeweiligen Mini-Prep-DNA der pET-27b(+)-Cytochrom-*c*₆-Konstrukte wurde mit 100 µl elektrokompetenten Zellen in einer Elektroporationsküvette auf Eis vereinigt und dann der elektrischen Spannung ausgesetzt.

Für die Elektroporationsnegativkontrolle wurde die Transformation mit 1 µl dest. H₂O durchgeführt. 1 µl pET-27b(+) Midi-Prep-DNA diente als Elektroporationspositivkontrolle.

Zur Erholung wurde nach der Transformation sofort 600 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml]-Platten (bei *E. coli* BL21(DE3)pLysS) und auf LB-Kan-Platten [50 µg/ml] (bei *E. coli* BL21(DE3) Star) ausplattiert (150 µl auf eine Platte, der Rest wurde abzentrifugiert, in wenig Medium aufgenommen und dann auf eine zweite Platte ausplattiert).

Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.9.2 Mit *E. coli* Cytochrom *c*-Reifungsgene

Die nach dem Restriktionsscreening als positiv bewerteten pET-27b(+)-Cytochrom *c*₆-Konstrukte wurden gleichzeitig mit dem pEC86 Plasmid in den vorgesehenen Expressionsstamm transformiert.

3.9.2.1 Durchführung

Für die Transformation wurden elektrokompente Zellen des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) Star hergestellt (siehe 3.6.2).

Die Transformation wurde mittels Elektroporation bei 1000 Ohm, 25 µF Kapazität und 2,5 kV durchgeführt.

Je 1 µl der jeweiligen Mini-Prep-DNA der pET-27b(+)-Cytochrom-*c*₆-Konstrukte und je 1 µl der Midi-Prep-DNA des pEC86 Plasmids wurden mit 100 µl elektrokompenten *E. coli* BL21(DE3) Star in einer Elektroporationsküvette auf Eis vereinigt und dann der elektrischen Spannung ausgesetzt.

Für die Elektroporationsnegativkontrolle wurde die Transformation mit 1 µl dest. H₂O durchgeführt.

1 µl pET-27b(+)-Midi-Prep-DNA und 1 µl pEC86-Midi-Prep-DNA dienten als Elektroporationspositivkontrollen.

Zur Erholung wurde nach der Transformation sofort 600 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml]-Platten ausplattiert (150 µl auf eine Platte, der Rest wurde abzentrifugiert, in wenig Medium aufgenommen und dann auf eine zweite Platte ausplattiert).

Die Elektroporationspositivkontrollen wurden je nach Selektionsdruck auf LB-Kan [50 µg/ml] oder LB-Cam [25 µg/ml] ausplattiert.

Die Inkubation der Platten erfolgte ca. 24 Stunden bei 37°C.

3.9.3 Geräte und Reagenzien

Gene Pulser	Bio-Rad
1 ml Elektroporationsküvetten	
SOC Medium	siehe 3.2.3
LB-Medium	siehe 3.2.3
LB-Agar	siehe 3.2.3
Kanamycin (Kan)	siehe 3.2.3
Chloramphenicol (Cam)	siehe 3.3.3

3.10 Cytochrom c_6 -Expression

3.10.1 Methodik

Die Cytochrom c_6 -Expression der positiv gescreenten Klone wurde mit einer kleinen Expression getestet. Kleine Expressionsansätze dienten der Ermittlung tatsächlich exprimierender Klone und der Optimierung der Expressionsbedingungen. Große Expressionsansätze dienten der Gewinnung von Cytochrom c_6 .

3.10.2 Durchführung

3.10.2.1 Ohne pEC86 Plasmid

3.10.2.1.1 Kleine Expression (mit Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS)

2 ml LB-Kan [50 $\mu\text{g/ml}$]/Cam [25 $\mu\text{g/ml}$] wurden mit positiv gescreenten Klonen mittels Zahnstocher angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

20 ml Expressionsmedium M9ZB-Kan [50 $\mu\text{g/ml}$]/Cam [25 $\mu\text{g/ml}$] wurde mit 200 μl der Flüssigkultur angeimpft.

Nach 3 Stunden begann die Expression des Cytochrom c_6 -Genes durch deren Induktion mittels IPTG ([0,1 mM], [0,2 mM] bzw. [1 mM]) und gleichzeitiger Zugabe von 0,8 mg Hämin. Die Expression wurde bei 37°C in 4 Stunden und bei 16°C bzw. Raumtemperatur über Nacht am Schüttler (200 U/min) durchgeführt.

Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.10.2.1.2 Große Expression (mit Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS)

20 ml LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] wurden mit dem aus der kleinen Expression für geeignet befundenen Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

1 l Expressionsmedium M9ZB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] wurde mit 12 ml der Flüssigkultur angeimpft.

Bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,9 (nach ca. 3 Stunden) begann die Expression des Cytochrom *c*₆-Genes durch deren Induktion mittels IPTG ([0,2 mM] bzw. [1 mM]) und gleichzeitiger Zugabe von 40 mg Hämin. Die Expression wurde über Nacht bei 16°C bzw, Raumtemperatur am Schüttler (200 U/min) durchgeführt.

Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.10.2.2 Mit pEC86 Plasmid

3.10.2.2.1 Kleine Expression (mit Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) Star)

2 ml LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] wurden mit positiv gescreenten Klonen mittels Zahnstocher angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

20 ml Expressionsmedium LB-Kann [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] wurde mit 300 µl der Flüssigkultur angeimpft.

Bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 1,3 (nach ca. 5¹/₂ Stunden) begann die Expression des Cytochrom *c*₆-Genes durch deren Induktion mittels IPTG [1 mM] und gleichzeitiger Zugabe von Glycerin [0,1 %]. Die Expression wurde bei 37°C in 4 Stunden und bei 16°C bzw. Raumtemperatur über Nacht am Schüttler (200 U/min) durchgeführt.

Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.10.2.2.2 Große Expression (mit Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) Star)

20 ml LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] wurden mit dem aus der kleinen Expression für geeignet befundenen Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet.

1 Liter Expressionsmedium M9ZB-Kan [50µg/ml]/Cam [25µg/ml] bzw. LB-Kan [50µg/ml]/Cam [25µg/ml] wurde mit 17 ml der Flüssigkultur angeimpft.

Bei einer OD₆₀₀ von ungefähr 1,6 (nach ca. 7 Stunden) begann die Expression des Cytochrom

c_6 -Genes durch deren Induktion mittels IPTG [1 mM] und gleichzeitiger Zugabe von Glycerin [0,1%]. Die Expression wurde bei 16°C (bzw. Raumtemperatur) über Nacht am Schüttler (200 U/min) durchgeführt.

Nach der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 4000 rpm) und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.10.3 Geräte und Reagenzien

M9ZB Medium

Lösung A	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	NH ₄ Cl	1 g
	dest. H ₂ O	ad 800 ml

Lösung B	KH ₂ PO ₄	12 g
	Na ₂ HPO ₄	24 g
	dest. H ₂ O	ad 400 ml

Lösung C	Glucose	16 g
	dest. H ₂ O	ad 400 ml

Lösung D	MgSO ₄ x7H ₂ O	12,3 g
	dest. H ₂ O	ad 50 ml

Mischung der 4 Lösungen

<i>Grosser Expressionsansatz</i>	Lösung A	800 ml
	Lösung B	100 ml
	Lösung C	100 ml
	Lösung D	1 ml

Kleiner Expressionsansatz

Lösung A 12 ml

Lösung B 1,5 ml

Lösung C 1,5 ml

Lösung D 15 μ l

LB-Medium

siehe 3.2.3

Kanamycin (Kan)

siehe 3.2.3

Chloramphenicol (Cam)

siehe 3.3.3

IPTG Stock:

1 M IPTG

238,3 mg IPTG /ml dest. H₂O;

(Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid)

Sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C

Hämin

40 mg Hämin (Bovine)

400 μ l NaOH

vorlösen des Hämins in NaOH

+ 10 ml dest. H₂O

+ 150 μ l 1 M HCL

tropfenweise Zugabe von 0,5 M NaOH

bis pH ~9-10 bei Messung mit pH-Meter

3.11 SDS-Page

3.11.1 Methodik

Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart des anionischen Detergens Na-Dodecylsulfat (SDS) ermöglicht die Trennung von Protein-Untereinheiten und die Bestimmung des Molekulargewichts. β -Mercaptoethanol wirkt reduzierend und bricht damit Disulfidbrücken auf.

Das Molekulargewicht des Proteins wird durch Vergleich mit der Wanderungstrecke von bekannten Markerproteinen durchgeführt.

3.11.2 Durchführung

Gelpräparation: Vernetzungsgrad: 1:37,5; 15%ig

	Trenngel	Sammelgel
Monomerkonz.	15%	4%
Acrylamid/Bis	5,00 ml	670 μ l
1,5 M Tris-HCl	2,50 ml	-
0,5 M Tris-HCl	-	1250 μ l
10% (w/v) SDS	100 μ l	50 μ l
10% APS	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l
dest. Wasser	2,29 ml	2,97 ml
Total	10,0 ml	5,0 ml

- Gießen des 15%igen Trenngels und mit wenig 2-Butanol überschichten
- 30-45 min polymerisieren lassen
- Butanol ableeren, mit dest. Wasser spülen und mit Filterpapier trockensaugen
- Gießen des 4%igen Sammelgels (Höhe 1 cm) und Einsetzen des Kammes mit 10 Slots
- 30-45 min polymerisieren lassen
- Entfernen des Kammes
- Zusammenbau der Elektrophorese-Apparatur
- Gele in die Elektrophoresekammer stellen und mit Laufpuffer auffüllen

- Proben in gleichem Volumen *2x Sample buffer* aufnehmen, 4 min bei 95°C erhitzen und etwa 1 min zentrifugieren
- Proben mit einer Hamilton-Spritze auftragen (15-20 µl)
- Anschließen an die Spannungsquelle (konst. 200 V und max. 70 mA)

3.11.3 Geräte und Reagenzien

Acrylamid/Bis (30%T, 2,67%C, 1:37,5):

146,0 g Acrylamid

4,0 g Bis

mit dest. Wasser auf 500 ml, filtrieren

und im Dunkeln bei 4°C lagern.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer)

54,45 g Tris-Base

120 ml dest. Wasser

mit 6 N HCl auf pH 8,8 einstellen;

mit dest. Wasser auf 300 ml auffüllen

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Sammelgelpuffer)

6,00 g Tris-Base

60 ml dest. Wasser

mit 6 N HCl auf pH 6,8 einstellen;

mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen

10% (w/v) Ammonpersulfat (APS):

50 mg Ammonpersulfat

500 µl dest. Wasser

5x Running buffer pH 8,3:

15,15 g Tris-Base

72,0 g Glycin

5,00 g SDS

mit dest. Wasser auf 1000 ml;

bei 4°C lagern und vor Gebrauch 1:5

verdünnen.

1x Running buffer pH 8,3:

160 ml 5x Running buffer pH 8,3

640 ml dest. Wasser

Stock-2xSample buffer:

2,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

1,6 ml Glycerin (20%)

3,2 ml 15% SDS (6%)

0,4 ml 0,5% (w/v) Bromphenolblau

2xSample buffer:

900 µl Stock-2x Sample buffer

100 µl β-Mercaptoethanol

10% (w/v) SDS:

1,0 g SDS

10 ml dest. Wasser

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
(TEMED)

Marker; Sigma, wide range, M-4038

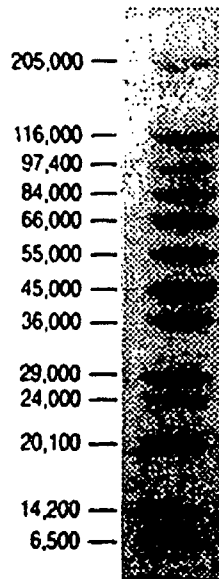


Abbildung 12: Sigmamarker

Bio-Rad Mini-Protean II Dual Slab Cell

Spacer: 0,75 mm oder 1,00 mm

Spannungsquelle:

Bio-Rad Power Supply, Modell 500/100

3.11.4 Coomassie Blue-Färbung

- 30 Minuten in Färbelösung
- mit dest. Wasser abspülen
- Eine bis drei Stunden in Entfärbelösung (bis Gelhintergrund farblos ist)

Färbelösung

0,1% Coomassie Blue R-250

40% Methanol

10% Eisessig

50% dest. Wasser

Entfärbelösung

40% Methanol

10% Eisessig

50% dest. Wasser

3.12 Sequenzierung

Positiv gescreente, und gut exprimierende Klone wurden für die Sequenzierung des Cytochrom c_6 -Genes verwendet. Die Sequenzierung wurde durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die rekombinante DNA zu 100% der Wildtyp-DNA von *Synechocystis* PCC 6803 entspricht.

3.12.1 Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung

Mini-Prep

- Ansetzen einer 10 ml LB-Kan [50 µg/ml]/Cam [25 µg/ml] Flüssigkultur von Klon **a6** (ohne His-Tag), Klon **b4** (C-terminales His-Tag) und Klon **c5** (N-terminales His-Tag). Bei allen Klonen handelte es sich um *E. coli* **BL21(DE3) Star Zellen (incl. pEC86 Plasmid)**.
- Bebrütet wurde über Nacht bei 37°C.
- Mit jedem Klon wurde eine Mini-Prep (siehe 3.8.2.2) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl dest. H₂O eluiert.

3.12.2 Sequenzierungsreaktion

Die eigentliche Sequenzierung wurde von der Firma IBL (Wagramerstr. 93/5/13, 1220 Wien) durchgeführt. Als Primer wurde der T7-Terminator-Primer verwendet.

3.13 Proteinreinigung

3.13.1 Reinigung von Cytochrom c_6 mit His-Tag (b und c Klone)

3.13.1.1 Aufschluß für Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (MCAC)

3.13.1.1.1 Methodik

Bei dieser Methode wurden sowohl die äußere Zellmembran als auch die Cytoplasmamembran der *E. coli*-Zellen zerstört. Da das Protein nun frei zugänglich für Proteasen wäre, wurden sofort Proteaseinhibitoren zugesetzt. Zur Verringerung der Viskosität durch hohe DNA-Konzentration wurde der Aufschluss einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Durch die anschließende Zentrifugation wurden Zellreste und unlösliche Proteine abgetrennt. Im Überstand befanden sich neben dem rekombinanten Cytochrom c_6 jede Menge

andere lösliche *E. coli*-Proteine, welche chromatographisch abgetrennt werden mussten.

3.13.1.1.2 Durchführung

Das Pellet von einem Liter *E. coli*-Zellkultur wurde in 40 ml Aufschlußlösung resuspendiert. Leupeptin, Pepstatin und PMSF wurden zugesetzt, um Proteasen zu inhibieren.

Die Ultraschallbehandlung des Lysates erfolgte 2 x 40 Sekunden bei 50% Puls. Zwischen den 2 Behandlungen wurde das Lysat 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Lösung sollte bei der Ultraschallbehandlung immer auf Eis stehen, um eine starke Erwärmung zu verhindern.

Anschließend wurde die Lösung bei 4°C, 18 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (SS-34 Rotor).

3.13.1.1.3 Geräte und Reagenzien

Zentrifuge Model RC5C	Sorvall Instruments	
Ultraschallgerät Vibra-Cell Model CV17	Sonics & Materials Inc.	
Aufschlußlösung	50 mM Tris/HCL pH 8,0	2 ml [1 M]
	2 mM EDTA pH 8,0	160 µl [0,5 M]
	Triton X-100	40 µl
	Auf 40 ml mit dest. H ₂ O	
	+	
	5 µM Leupeptin	200 µl [1 mM]
	5 µM Pepstatin	200 µl [1 mM]
1 mM PMSF	200 µl [200 mM]	
Leupeptin	Hemisulfat-Salz, Sigma L 8511; Inhibitor von Cystein-Proteasen	
Pepstatin A	Sigma P4265; Inhibitor von sauren Proteasen	
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma Inhibitor von Serin Proteasen	

3.13.1.2 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (MCAC)

3.13.1.2.1 Methodik

Bei dieser Art der Chromatographie werden Proteine nach ihrer unterschiedlichen Bindungsfähigkeit für Metall-Ionen aufgetrennt. An die Sepharose wird ein Metall-Chelat-formender Ligand gekoppelt. Dazu verwendet man zweiwertige Metallionen (z.B. Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ...). Die Bindung an das Metall-Chelat ist hauptsächlich vom Histidinhalt des Proteines abhängig. Somit ist diese Methode sehr effizient für die Reinigung von rekombinanten Proteinen, die einen Poly-Histidin-Schwanz enthalten. Die Histidine bilden bei neutralem pH-Wert einen Komplex mit den Metallionen. Die Elution erfolgt durch Absenken des pH-Wertes sowie der Ionenstärke des Puffers, durch Zugabe von EDTA im Puffer oder durch Verwendung eines ansteigenden Imidazol-Gradienten.

3.13.1.2.2 Durchführung

Packen der Säule:

Gelsuspension aufschütteln, in einer Nutsche mit 10-fachem Volumen dest. Wasser waschen und vor dem Füllen 10-20 Minuten unter Vakuum in einer Absaugflasche (mit Filter) entgasen.

Einige ml dest. Wasser mit Hilfe einer Spritze von unten in den Säulenboden pressen, den Säulenboden montieren und den Puffer einige Male hin - und herbewegen, um Luftblasen zu entfernen.

Säule 45° neigen und die Gelsuspension einfüllen.

Säule senkrecht justieren, die Spritze entfernen und das Wasser langsam durchlaufen lassen.

Laufend oben Gelsuspension mit einem Glasstab nachfüllen bis zu einem Bettvolumen von 20 ml.

Unteren Auslauf mit Metall-Stopper verschließen und oberen Stempel Luftblasen-frei aufsetzen, bis die Fritte des Stempels auf der Oberfläche des Gelbettes aufliegt.

- Säule beladen mit 20 ml 5 mg/ml $ZnCl_2$ bei einem Fluss von 1 ml/min
- Spülen mit 50 ml dest. Wasser bei 2 ml/min
- Spülen mit 50 ml 1 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0) bei 2 ml/min
- Probe mit $\frac{1}{3}$ Volumen 4 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0) mischen und $\frac{1}{50}$ Volumen 1 M Imidazol zugeben

- Probe-Lösung mittels Nalgene-Filtertrichter filtrieren und im Vakuum mittels Vakuumflasche 5-10 Minuten entgasen
- Probe auftragen bei 1 ml/min
- Säule mit 200 ml 20 mM Imidazol waschen bei 2 ml/min
- Elution der gebundenen Proteine mit 100 ml eines 20-500 mM Imidazol-Puffergradienten (50 ml 20 mM Imidazol und 50 ml 500 mM Imidazol im Gradientenmischer) bei 1 ml/min Elutionsgeschwindigkeit und 2,5 ml-Fraktionen (Fraktionsgröße: 2,5 min; Papiervorschub: 6 cm/h, Sensitivity: 2,0)
- Säule mit 50 ml 50 mM EDTA, 50 ml dest. Wasser (und 50 ml 20% Ethanol) waschen bei 2 ml/min

3.13.1.2.3 Geräte und Reagenzien

67 mM Phosphat pH 7,0:

21,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

7,044 g KH_2PO_4

mit dest. Wasser auf 2000 ml auffüllen,
pH-Wert prüfen bzw. nachjustieren

1 M Imidazol:

6,81 g Imidazol (1,0 M)

5,85 g NaCl (1,0 M)

auf 100 ml mit 67 mM PP pH 7,0
pH 7,0 prüfen bzw. nachjustieren

4 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0):

93,6 g NaCl

4,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,41 g KH_2PO_4

auf 400 ml mit dest. Wasser
pH-Wert prüfen bzw. nachjustieren

20 mM Imidazol:

8,0 ml 1 M Imidazol

392 ml 1 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0)

500 mM Imidazol:

50 ml 1 M Imidazol

50 ml 1 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0)

1 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0):

125 ml 4 M NaCl (in 67 mM PP pH 7,0)

375 ml 67 mM Phosphat pH 7,0

50 mM EDTA:

930 mg Na_2EDTA

auf 50 ml mit 1 M NaCl (in 67 mM PP
pH 7,0)

5 mg/ml ZnCl_2 :

500 mg ZnCl_2

auf 100 ml mit dest. Wasser;
mit 1-2 Tropfen verd. HCl lösen

20% Ethanol:

216 ml 92,4% Ethanol

784 ml dest. Wasser

Chelating Sepharose Fast Flow

Pharmacia Biotech

gequollen in 20 % Ethanol

Kapazität: 30 $\mu\text{mol Zn}^{2+}$ / ml Gel

Peristaltische Pumpe (Peristaltic Pump P-1; i.d. 3,1 mm)

Pharmacia

Fraktionskollektor LKB 2111 MultiRac

Pharmacia

Säule (1,6 x 10 cm) mit Stempel

Pharmacia

Gradient Former Model 385 (Kapazität: 30 - 100 ml)

BioRad

Isco UA-5 Absorbance/Fluorescence Detector und Schreiber mit Type 6 Optical Unit

Membran-Vakuumpumpe (vacuubrand CVC 2)

Nalgene Filtertrichter 315-0047 mit Klammer

Millipore-Filter HVLP04700 (Pore size 0,45 μm)

3.13.2 Reinigung von Cytochrom c_6 ohne His-Tag (a Klon)

3.13.2.1 Aufschluß (periplasmatischer Aufschluß)

3.13.2.1.1 Methodik

Ziel dieser Methode war die ausschließliche Zerstörung der äußeren Zellmembran der *E. coli*-Zellen zur Freisetzung der periplasmatischen Proteine, um im Vorfeld der chromatographischen Trennung die Proteine aus dem Cytosol durch eine Zentrifugation abtrennen zu können. Um die Proteine während des periplasmatischen Aufschlusses vor Proteasen zu schützen, wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt.

3.13.2.1.2 Durchführung

Das Pellet von einem Liter *E. coli*-Zellkultur wurde in 100 ml Aufschlußpuffer (mit je 400 μl Leupeptin, Pepstatin und PMSF) resuspendiert.

Resuspension ca. 2 Stunden auf Eis stellen.

Anschließend bei 4°C und 8 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert (SS-34 Rotor).

3.13.2.1.3 Geräte und Reagenzien

Zentrifuge Model RC5C

Sorvall Instruments

Aufschlußpuffer(100 ml):

200 mM NaBorat-Puffer pH 8.0

130 mM NaCl (0,76 g NaCl)

5 mM EDTA (1 ml EDTA-Lösung [0,5 M])

200 mM NaBorat-Puffer pH 8.0 (500 ml):

6,18 g H₃BO₃

0,6 g NaOH

mit 6 N NaOH auf pH 8 eingestellt

Proteaseinhibitoren

siehe 3.13.1.1.3

4 µM Leupeptin

400 µl [1 mM]

4 µM Pepstatin

400 µl [1 mM]

0,8 mM PMSF

400 µl [200 mM]

3.13.2.2 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC)

3.13.2.2.1 Methodik

Proteine besitzen mehr oder weniger hohe Anteile hydrophober Oberflächenstrukturen. Durch Lösen eines Salzes und Erhöhung der Ionenstärke des Mediums sind sie daher in der Lage sich an hydrophobe Adsorbentien zu heften. Die Trennung der Proteine erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität. Durch Erniedrigung der Salzkonzentration werden die hydrophoben Wechselwirkungen zunehmend geringer. Je stärker hydrophob ein Protein ist, desto später wird es eluiert.

Für die Matrix werden Zellulose, quervernetztes Dextran und quervernetzte Agarose verwendet, an denen entsprechende Liganden (Butyl-, Oktyl-, Phenyl- oder Alkylreste) gebunden sind. Adsorbentien mit Phenylresten sind in ihrer Hydrophobizität etwa in der Mitte einzuordnen und für die meisten Proteine geeignet.

3.13.2.2.2 Durchführung

- Maximaler Druck bei XK16 Säulen: 0,5 MPa
- Waschen des Gels mit ca. zweifachen Säulenvolumen (= 80 ml) dest. Wasser
- Äquilibrieren mit ca. zweifachen Säulenvolumen 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)
- Probe durch Zugabe von festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bringen, mittels Nalgene-Filtertrichter filtrieren und im Vakuum mittels Saugflasche entgasen
- Auftragen der Probe auf die Säule mit 2 ml/min Elutionsgeschwindigkeit
- Waschen der Säule mit ca. zweifachen Säulenvolumen 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), um nichtgebundene Proteine zu entfernen
- Elution des rekombinanten Cytochrom c_6 mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) in 5 ml Fraktionen
- Reinigen des Gels mit 30 ml dest. Wasser bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 2 ml/min
- Waschen mit zweifachen Säulenvolumen entgastem 20% Ethanol bei 2ml/min Elutionsgeschwindigkeit

3.13.2.2.3 Geräte und Reagenzien

0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) aus Stocklösung verdünnt

0,5 l Stocklösung:

50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) + 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

132 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

3,4 g KH_2PO_4

mit NaOH pH eingestellt

Ethanol [20%]:

211 ml 95% Ethanol

789 ml dest. Wasser

Phenyl-Sepharose High Performance Pharmacia Biotech, [gequollen in 20% Ethanol]

Säule XK 16 (1,6 x 20 cm) Pharmacia

ÄKTApurifier Pharmacia

Membran-Vakuumpumpe (vacuubrand CVC 2)

Nalgene Filtertrichter 315-0047 mit Klammer
Millipore-Filter HVLP04700 (Pore size 0,45 µm)

3.13.2.3 Gelfiltrationschromatographie

3.13.2.3.1 Methodik

Diese Technik beruht auf der Verwendung von Gelen, deren Partikel definierte Porengrößen aufweisen. Beim Durchlaufen einer Säule aus derartigen Gelen diffundieren kleinere Moleküle in die Hohlräume der Gelpartikel hinein, während größere Moleküle sich nur im Lösungsmittel zwischen den Gelpartikeln aufhalten. Aus diesem Grund wandern größere Moleküle schneller durch die Säule und erscheinen früher im Eluat. Als Gelfiltrationsmaterialien werden Partikel aus hydrophilen Polymeren eingesetzt, die möglichst inert, druckstabil, ungeladen und von uniformer Größe sein sollen.

3.13.2.3.2 Durchführung

- Maximaler Druck bei HR 10/30 Säulen: 1,8 MPa
- Waschen des Gels mit ca. zweifachen Säulenvolumen (= 48 ml) dest. Wasser
- Äquilibrieren mit ca. zweifachen Säulenvolumen SEC-Puffer
- Vorm Auftragen Probe bei 14000 rpm für 4 min bei RT abzentrifugiert
- Auftragen der Probe mit der 100 µl Probenschleife
- Auftragen der Probe mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,8 ml/min
- Waschen mit zweifachen Säulenvolumen entgastem Ethanol [20%]

3.13.2.3.3 Geräte und Reagenzien

Superdex TM 75	Pharmacia Biotech, [gequollen in 20% Ethanol]
Säule HR 10/30 (1,0 x 30 cm)	Pharmacia
ÄKTApurifier	Pharmacia

SEC-(Size Exclusion Chromatography)-Puffer:

67 mM Phosphatpuffer (pH 7)	10,95 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
	3,52 g KH ₂ PO ₄
+	+
150 mM KCl	11,18 g KCl
	mit dest. H ₂ O auf 1000 ml
Ethanol [20%]	211 ml 95% Ethanol
	789 ml dest. Wasser

3.13.3 Aufkonzentrieren mittels Centriprep

3.13.3.1 Methodik

Centripreps sind zum Umpuffern und Einengen von Lösungen geeignet. Centripreps bestehen aus einem zylindrischen Zentrifugenbecher mit einem inneren Einsatz, der herausnehmbar und von dem äußeren Becher durch eine Membran mit einer bestimmten Ausschlußgrenze getrennt ist. Der äußere Becher wird mit der entsprechenden Lösung angefüllt. Durch Zentrifugation werden alle Komponenten unterhalb der Ausschlußgrenze in den inneren Einsatz abgetrennt. Auf diese Weise können Lösungen eingeeengt werden.

3.13.3.2 Durchführung

Zentrifugiert wurde jeweils 30 min im GSA-Rotor bei 4°C und 3800 rpm. Vor der eigentlichen Verwendung erfolgte eine Zentrifugation mit dest. Wasser, um den zur Lagerung verwendeten 20%igen Ethanol zu entfernen.

3.13.3.3 Geräte

Amicon Centripreps
YM-3 mit 3 kDa - Ausschlußgrenze

3.13.4 Reduzieren bzw. Oxidieren von Cytochrom c_6

3.13.4.1 Methodik

Für diverse Messungen braucht man das Cytochrom c_6 in vollkommen reduzierter oder oxidiertes Form. Zu diesem Zweck wird nach dem Aufkonzentrieren die Cytochrom c_6 -Lösung mit einem Reduktionsmittel bzw. Oxidationsmittel im Überschuß versetzt.

3.13.4.2 Durchführung

Über die Absorption des α -Peaks (553 nm, $\epsilon = 23.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurden die jeweiligen Konzentrationen der zu reduzierenden bzw. oxidierenden Proteinlösungen bestimmt. Anschließend wurden die Lösungen durch Zugabe von Natriumascorbat bzw. Kaliumhexacyanoferrat(III) in zehnfachem Überschuß reduziert bzw. oxidiert.

Danach wurden die Lösungen für 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend entsalzt.

Bedingt durch die nachfolgende Entsalzung durfte das Gesamtvolumen einer reduzierten bzw. oxidierten Lösungen 2,5 ml nicht überschreiten.

3.13.4.3 Reagenzien

Natriumascorbat	$\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na}$
Kaliumhexacyanoferrat(III)	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

3.13.5 Entsalzung mit PD-10 Entsalzungssäulen

3.13.5.1 Methodik

Die mit Sephadex G-25 gepackten Säulen sind zum Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen geeignet. Der Durchfluß durch die Säule erfolgt aufgrund der Erdgravitation und das maximale Probenvolumen beträgt 2,5 ml.

3.13.5.2 Durchführung

- Equilibrieren der Säule mit ungefähr 25 ml des gewünschten Puffers
- Auftragen der Probelösung (max. 2,5 ml)
- Eluieren der Proteinlösung mit 3,5 ml des gewünschten Puffers
- Säule mit ca. 25 ml dest. Wasser waschen

3.13.5.3 Geräte

PD-10 Entsalzungssäule

Pharmacia

3.14 Spektralphotometrische Untersuchungen

3.14.1 Photometrische Charakterisierung von Cytochrom c_6

Um ein Hämprotein charakterisieren zu können sollte man unter anderem die Lage der einzelnen Peaks kennen. Mittels des Dioden Arrays konnten Spektren des oxidierten und auch reduzierten Cytochrom c_6 aufgenommen werden. Man konnte beobachten, wie sich die Lage der Peaks zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand veränderte. Außerdem konnte man anhand der Spektren (Gesamtspektren im UV-VIS Bereich (200 - 800 nm)) die Proteinkonzentration und die Reinheitszahl bestimmen.

3.14.1.1 Methodik

Tritt Licht einer bestimmten Wellenlänge durch eine Probelösung, so geht dieses Wechselwirkungen mit den in Lösung befindlichen Atomen bzw. Molekülen ein. Valenzelektronen werden unter Absorption von Licht angeregt, und die eingestrahlte Lichtintensität I_0 wird dadurch auf den Wert I erniedrigt. Der Anteil der Strahlung, der von der Probelösung durchgelassen wird, wird Transmission T genannt:

$$T = I / I_0$$

I Intensität der austretenden Strahlung

I_0 Intensität der einfallenden Strahlung

Das Ausmaß der Absorption der Strahlung wird üblicherweise aber als Absorption A oder Extinktion E bezeichnet, sie ist dem Logarithmus der reziproken Transmission gleich.

$$A = E = \log 1/T = \log I_0/I$$

Da der Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration zwischen einer Absorption von 0 - 1 linear ist, kann von der Extinktion auf die Probenkonzentration geschlossen werden. Es gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- E Extinktion
- ε Molarer Extinktionskoeffizient
- c Molare Konzentration
- d Schichtdicke (1 cm)

- **Lage der Cytochrom c_6 Peaks laut Literatur**

Lage der für Cytochrom c_6 charakteristischen Peaks in oxidiertem und reduziertem Zustand. Folgende Tabellen enthalten Daten von Cytochrom c_6 aus *Synechocystis* 6803 (Moser et al., 1991) und *Scenedesmus obliquus* (Reuter and Wiegand, 2001).

Peak	oxidiert	reduziert
α -Peak		553
β -Peak		522
γ -Peak	410	416

Peak	oxidiert	reduziert
α -Peak		553
β -Peak		523
γ -Peak	413	418
δ -Peak	361	320

Tabelle 3: Lage der Peaks von Cytochrom c_6 in oxidiertem und reduziertem Zustand.
(Links: Moser et al., 1991; Rechts: Reuter and Wiegand, 2001)

- **Reinheitszahl für reduziertes Cytochrom c_6**

Die Reinheitszahl gibt das Verhältnis der Menge des gereinigten Häm-Proteins zur Menge des Gesamtproteins wieder und stellt somit ein entscheidendes Qualitätskriterium dar. Errechnet wird die Reinheitszahl aus dem Quotienten der Absorption bei der für das gereinigte Protein charakteristischen Wellenlänge (416 nm für Cytochrom c_6) und der Absorption bei 280 nm. Die bei der Wellenlänge von 280 nm gemessene Absorption spiegelt den Gesamtproteingehalt wieder, da alle Proteine durch das Vorhandensein von aromatischen Aminosäuren bei dieser Wellenlänge zur Absorption beitragen.

3.14.1.2 Durchführung

Nach jeder Reinigung wurde von Cytochrom c_6 ein Spektrum aufgenommen, aus dem nachfolgend sowohl die Reinheitszahl wie auch die Konzentration der Lösung bestimmt wurden. Die Konzentration des gelösten Proteins wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ , der für Cytochrom c_6 $23300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 553 nm beträgt, und der dem Lambert-Beerschen Gesetz folgenden Formel $E = \epsilon_{553} \cdot c \cdot d$ bestimmt.

Nur die Fraktionen, deren Reinheitszahl \geq betrug, wurden vereinigt (= gepoolt). Das gereinigte Cytochrom c_6 wurde auf -80°C gelagert.

3.14.1.3 Geräte und Reagenzien

Für alle Messungen wurden Quarzküvetten verwendet.

Photometer

Diode Array Spectrophotometer Specord S10 (Zeiss)

3.14.2 Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizient

3.14.2.1 Methodik

Mit Hilfe der Extinktion und des Lambert-Beerschen Gesetzes kann man die Konzentration einer Cytochrom c_6 -Proteinlösung ermitteln. Die dafür notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten der Proteinlösung für die entsprechenden Wellenlängen müssen experimentell ermittelt werden.

3.14.2.2 Durchführung

Es wurden die molaren Extinktionskoeffizienten von rekombinantem reduziertem Cytochrom c_6 bestimmt. In einer Doppelbestimmung wurden zu diesem Zweck mit dem Dioden Array Spektren verschiedener Cytochrom c_6 -Konzentrationen aufgenommen. 10, 15, 20, 25 und 30 μM Cytochrom c_6 -Lösungen dienten für die Ermittlung der molaren Extinktionskoeffizienten bei 553 nm (α -Peak), 522 nm (β -Peak), 318 nm (δ -Peak) und 280 nm. 2, 3,5, 5, 6,5 und 8 μM Cytochrom c_6 -Lösungen verwendete man für die Ermittlung bei 416 nm (γ -Peak). Die Absorptionsmittelwerte aus den jeweiligen Doppelbestimmungen wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen. Die daraus resultierende Steigung der Geraden entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten.

3.14.2.3 Geräte

Photometer

Diode Array Spectrophotometer Specord S10 (Zeiss)

3.15 MALDI-TOF-MS

3.15.1 Methodik

MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) ist eine Methode, die Verdampfung und Ionisierung biologischer Proben von einer Festkörperphase direkt in die Gasphase zulässt.

Diese Technik wird für die Detektion und Charakterisierung von Biomolekülen, wie z. B. Proteinen, Peptiden, Oligosacchariden und Oligonucleotiden, die ein Molekulargewicht zwischen 400 und 350.000 Da besitzen, verwendet.

Die Matrix spielt eine Schlüsselrolle in dieser Technik, indem sie die Laserlichtenergie aufsaugt und den Teil des belichteten Substrates veranlaßt zu verdunsten.

Sobald die Probe mit Laser beschossen und dadurch ionisiert wird, wird sie elektrostatisch in ein *Time of Flight-Massenspektrometer (TOF-MS)* gebracht, wo sie von den Matrixionen getrennt wird. Sie werden entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt.

3.15.2 Durchführung

MALDI-TOF-MS wurde an einem DYNAMO MALDI-TOF-MS von der Research group of glycobiology (Department of Chemistry; Muthgasse 18, 1190 Wien) durchgeführt.

Als Matrix diene eine Sinapinsäurematrix. Das Spektrum wurde im „dynamic extraction mode“ (setting 0,1) aufgenommen und mit Hilfe von Lysozym (14,3 kDa) kalibriert.

Eine 1 %ige Matrixlösung (in 70 %igen Acetonitril gelöst) wurde mit der Proteinlösung vermischt und 1 μ l dieser Mischung wurde auf einer „sample plate“ luftgetrocknet und in das Massenspektrometer gegeben.

3.15.3 Geräte und Reagenzien

DYNAMO MALDI-TOF-MS

Thermo BioAnalysis

Cytochrom c_6

M = 9643,9 g/mol (b-Klon)

10 μ l [60 μ M] Cytochrom c_6 in 20 mM Phosphatpuffer pH 7

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung

4.1.1 Amplifizierung des Cytochrom c_6 -Genes

Das *petJ*-Gen, das für Cytochrom c_6 codiert, wurde vom *Synechocystis* PCC 6803 Genom mittels PCR amplifiziert (siehe 3.1). Es wurden drei Primerkombinationen verwendet.

- a Cytochrom c_6 ohne His-Tag
- b Cytochrom c_6 mit C-terminalem His-Tag
- c Cytochrom c_6 mit N-terminalem His-Tag

Im folgenden wird die Benennung der drei PCR-Produkte a, b und c beibehalten und später auch für die Bezeichnung der korrespondierenden Klone verwendet.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel untersucht. Von den PCR-Produkten wurden 5 μ l + 5 μ l dest. H₂O + 2 μ l BX aufgetragen. Vom Marker wurden 10 μ l aufgetragen.

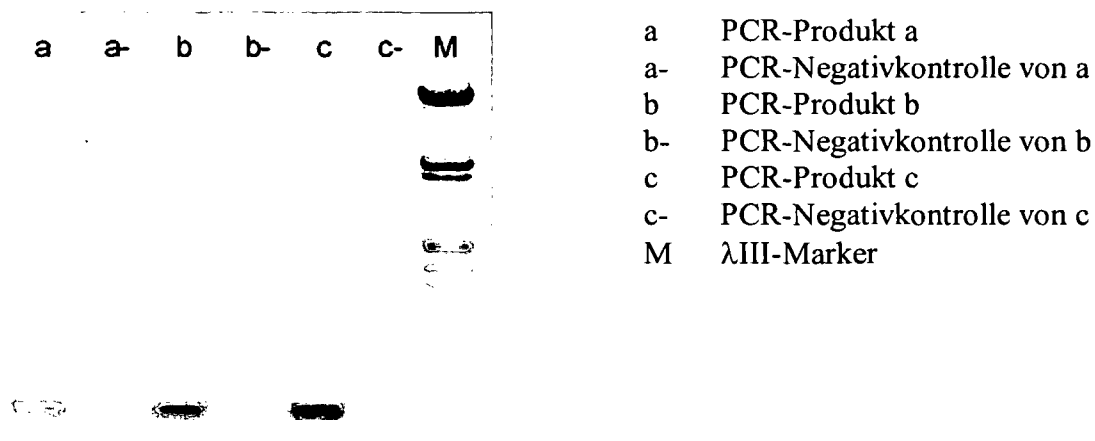


Abbildung 13: Agarose-Gel des amplifizierten Cytochrom c_6 -Genes von *Synechocystis* PCC 6803.

Alle drei Primerkombinationen lieferten die erwarteten Produkte. Die drei PCR-Produkte wurden mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit gereinigt und mit 50 μ l H₂O eluiert.

4.1.2 Präparation der Inserts und des Vektors

Der Vektor und die Inserts a, b und c wurden mit *Nco*I und mit *Bam*HI verdaut (siehe 3.4). Der Vektor wurde nach dem Schneiden mit dem Enzym alkalische Phosphatase dephosphoriert, um ein Rezirkularisieren zu vermeiden. Mittels Agarosegelen wurden die PCR-Produkte und die Vektor-DNA vor der Ligation quantifiziert.

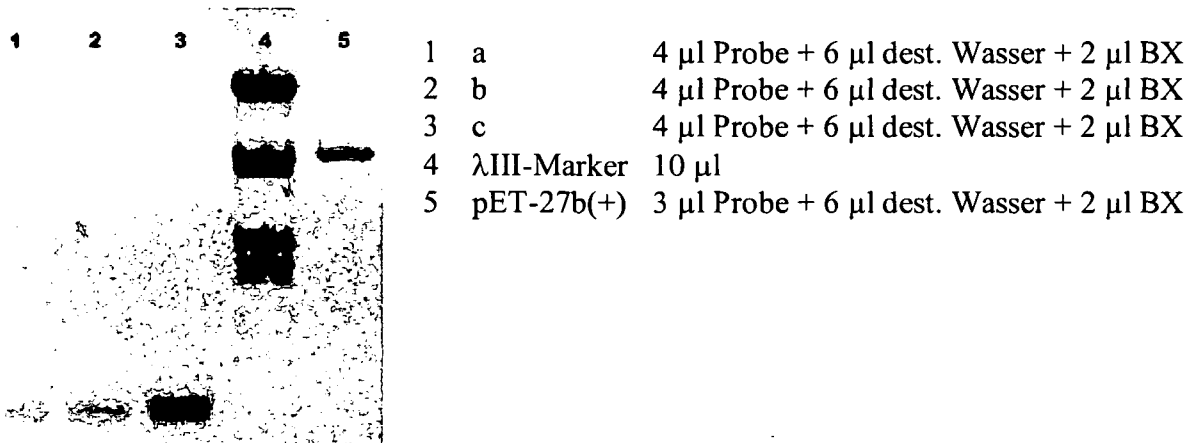


Abbildung 14: Agarose-Gel zur Bestimmung der für die Ligation notwendigen Mengen an Vektor- und Insert-DNA.

Abschätzung der DNA-Menge:	pET-27b(+)	30 ng/µl
	a	8 ng/µl
	b	8 ng/µl
	c	25 ng/µl

4.1.3 Ligation

Vektor und Insert wurden im molaren Verhältnis 1:10 mit der T4-DNA-Ligase ligiert (siehe 3.5) und anschließend mit dem Invisorb Spin PCRapid Kit gereinigt.

4.2 Transformation in *E. coli* Top 10 F'-Zellen

Ergebnis der Transformation:

Negativkontrolle

Die elektrokompetenten Zellen wurden nur mit dest. Wasser transformiert. Hiermit wurden die Zellen auf Kontamination mit einem Fremdplasmid getestet. Gleichzeitig wurde das Wasser, mit dem gearbeitet wurde, auf Kontamination überprüft. Es waren keine Kontaminationen vorhanden.

Positivkontrolle

Hier wurden die elektrokompetenten Zellen mit dem zirkulären pET-27b(+)-Vektor versetzt. Es wurde somit überprüft, ob die Zellen kompetent sind und ob die Elektroporation funktionierte. Es waren unzählige Kolonien zu sehen, d.h. die Elektroporation an sich war erfolgreich.

Ligationsnegativkontrolle

Die elektrokompetenten Zellen wurden nur mit dem präparierten pET-27b(+)-Vektor transformiert. Dies diente zur Überprüfung des Hintergrundes durch religierten und nicht vollständig bzw. nicht geschnittenen Vektor. Es konnten einige Kolonien gezählt werden, allerdings wesentlich weniger als bei den eigentlichen Ligationsansätzen.

Ligationsansatz (Vektor + Insert)

Auf den Platten mit b- und c-Klonen waren deutlich mehr Kolonien zu sehen als bei der Ligationsnegativkontrolle. Die Platte mit a-Klonen war etwas weniger dicht bewachsen als die der anderen Klone.

4.3 Überprüfung der Klonierung

4.3.1 PCR Screening

Nach einer ersten gescheiterten Restriktionsanalyse mit jeweils 8 Klonen (a,b und c) wurde ein PCR-Screening mit 16 weiteren c-Klonen durchgeführt. Die Entscheidung c-Klone zu verwenden, wurde nach dem Zufallsprinzip getroffen. Mit der Spice-Polymerase wurde auf Anwesenheit des Cytochrom c_6 -Genes im Vektor-Plasmid gescreent (siehe 3.8.1). Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel kontrolliert, wobei jeweils 10 μ l Probe + 2 μ l BX aufgetragen wurden. Vom λ III-Marker wurden 10 μ l eingesetzt.

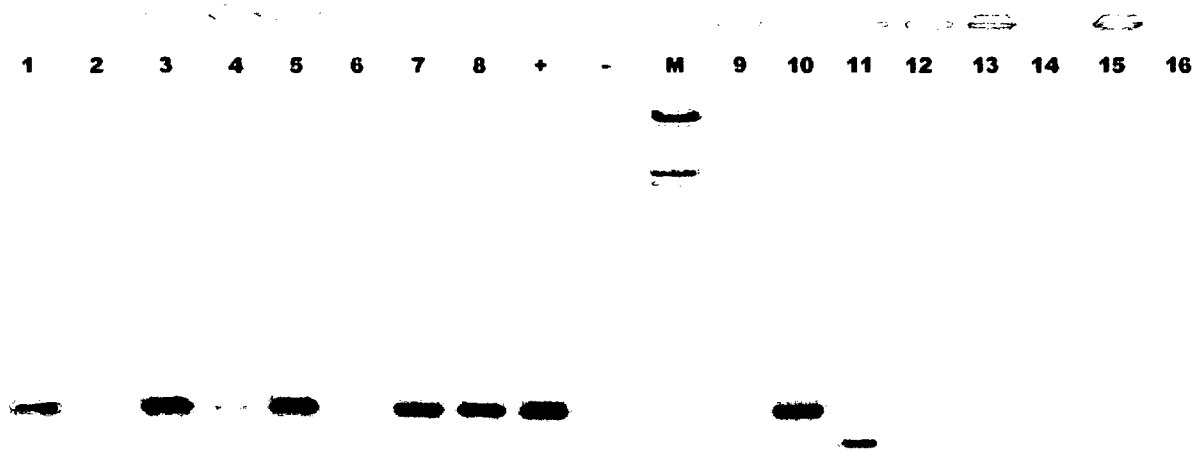


Abbildung 15: Agarose-Gel: PCR-Screening mit Spice-Polymerase

- 1-8 Klone c1-8
- + Positivkontrolle (siehe 3.8.1.2)
- Negativkontrolle (siehe 3.8.1.2)
- M λ III-Marker
- 9-16 Klone c9-16

Positive c-Klone: 1/3/4/5/7/8/10/16

4.3.2 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

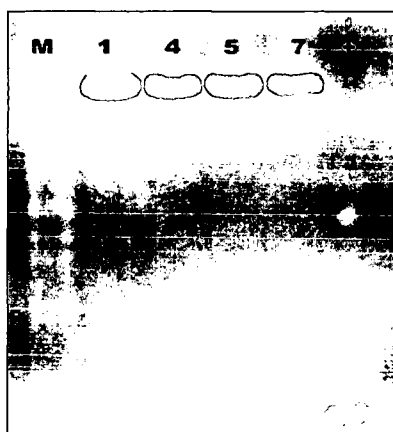
Aus den mittels PCR Screening ermittelten positiven c-Klone und je 8 zufällig ausgewählten a- und b-Klonen wurde mittels Mini-Prep die Vektor-DNA isoliert und auf Vorhandensein des Inserts geprüft (siehe 3.8.2).

Größe des Vektors und der Inserts:

pET-27b(+)-Vektor	5414 bp
Insert a-Klone	276 bp
Insert b-Klone	294 bp
Insert c-Klone	297 bp

Durch die Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* wurde das Insert herausgeschnitten. Dadurch hatte man die Kontrolle, ob der Vektor auch wirklich das entsprechende Insert enthielt. Der erste Restriktionsverdau mit dem 8 positiven c-Klonen aus dem PCR-Screening schlug fehl.

Durch einen weiteren Restriktionsverdau mit den c-Klonen 1/4/5/7 konnte eine erfolgreiche Klonierung angenommen werden. Vom λ III-Marker wurden 10 μ l, von den einzelnen Proben wurden jeweils 10 μ l + 2 μ l BX und von der Positivkontrolle (ein mit *NcoI* und *BamHI* behandeltes PCR-Produkt) wurden 3 μ l + 7 μ l dest. H₂O + 2 μ l BX aufgetragen.

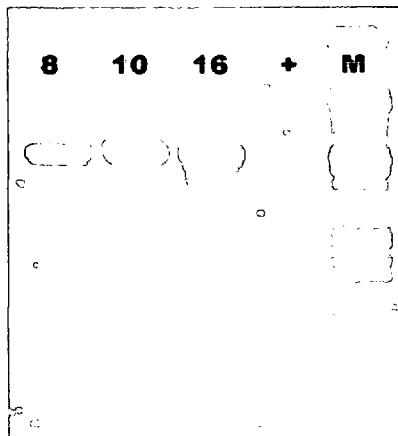


- M λ III-Marker
- 1 Klon c1
- 4 Klon c4
- 5 Klon c5
- 7 Klon c7
- + Positivkontrolle (ein mit *NcoI* und *BamHI* behandeltes PCR-Produkt)

Abbildung 16: Agarose-Gel: Restriktionsverdau der Plasmid-DNA (c-Klone 1/4/5/7)

Aufgrund des Vergleiches mit der Positivkontrolle konnte man davon ausgehen, daß die c-Klone 1/5/7 das gewünschte Insert enthielten.

Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit den c-Klonen 8/10/16 und den je 8 ausgewählten a- und b-Klonen durchgeführt.



- 8 Klon c8
- 10 Klon c10
- 16 Klon c16
- + Positivkontrolle (ein mit *NcoI* und *BamHI* behandeltes PCR-Produkt)
- M λ III-Marker

Abbildung 17: Agarose-Gel: Restriktionsverdau der Plasmid-DNA (c-Klone 8/10/16)

Die c-Klone 8/16 wurden als positiv bewertet.

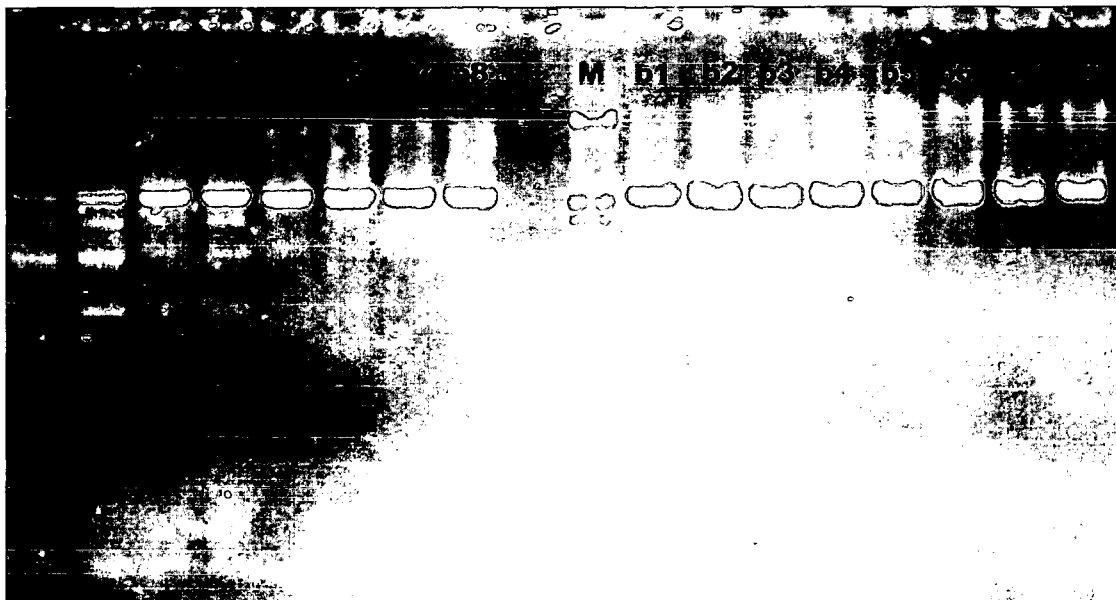


Abbildung 18: Agarose-Gel: Restriktionsverdau der Plasmid-DNA (je 8 a-Klone u. b-Klone)

- a1-a8 Klone a1-8
- + Positivkontrolle (ein mit *NcoI* und *BamHI* behandeltes PCR-Produkt)
- M λ III-Marker
- b1-b8 Klone b1-8

Für positiv befunden wurden die a-Klone 5/6/8 und die b-Klone 3/4/5.

4.4 Transformation und Expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Als erster Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS verwendet. Durchgeführt wurde die Transformation (siehe 3.9) mit den a-Klonen 5/6/8, den b-Klonen 3/4/5 und den c-Klonen 1/5/7:

Negativkontrolle und Positivkontrolle (vgl. 4.2)

Die Platte mit der Positivkontrolle war dicht bewachsen und auf der Platte mit der Negativkontrolle waren keine Kolonien zu sehen.

Klone

Die Elektroporationen mit den verschiedenen Klonen ergab jeweils eine Vielzahl von Einzelkolonien.

4.4.1 Cytochrom c_6 -Expression

Nach einer erfolgreicher Klonierung und Transformation der Klone, wurde die Überprüfung des klonierten Genes auf Cytochrom c_6 -Expression durchgeführt.

Zur Ermittlung der tatsächlich exprimierenden Klone wurden mit den a-Klonen 5/6/8, den b-Klonen 3/4/5 und den c-Klonen 1/5/7 erste kleine Expressionsversuche (siehe 3.10.2.1) bei 37°C und 16°C durchgeführt.

Den *E. coli*-Zellen wurde von außen Häm zugeführt, so daß während bzw. nach der Synthese des rekombinanten Cytochroms c_6 genug Häm in den Zellen vorhanden war, um ein aktives rekombinantes Protein zu erhalten. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG.

Zur Überprüfung wurde nach dem Zellaufschluß und anschließender Zentrifugation eine SDS-Page (siehe 3.11) durchgeführt. Aufgetragen wurden sowohl der Überstand des Aufschlusses nach der Zentrifugation als auch das Pellet.

Die Elektroporationspositivkontrolle (unpräparierter, elektroporierter pET-27b(+)-Vektor ohne Insert) wurde als Expressionsnegativkontrolle verwendet. Auf ein 15%iges SDS-Gel wurden Aliquote der Überstände und Pellets (in 200 µl dest. H₂O aufgenommen) aufgetragen.

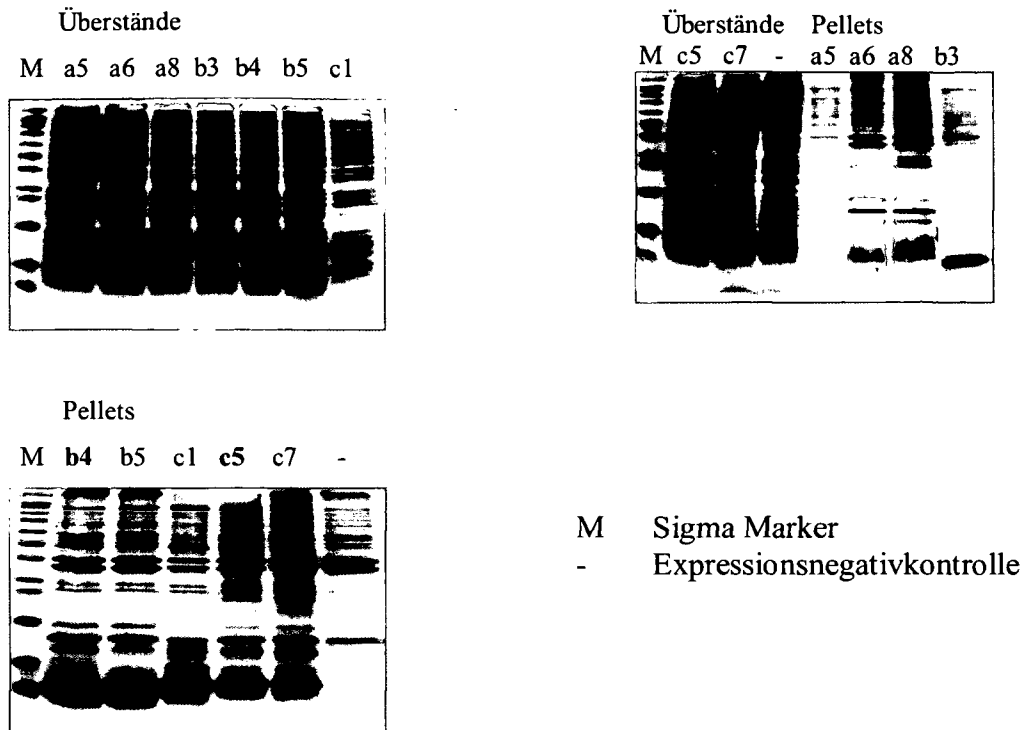


Abbildung 19: SDS-Page: Kleine Expression positiver Klone bei 37°C (4 µl Marker und jeweils 20 µl Probe wurden aufgetragen)

Die starken Banden in den Pelletfraktionen der induzierten Klone bei ca. 9,6 kDa (b-Klone) bzw. 9,7 kDa (c-Klone) deuteten auf eine erfolgreiche Expression von Cytochrom c_6 . Da das Protein in den Pelletfraktionen lag, konnte man auf die Bildung von unlöslichen Einschlußkörpern (sogenannten „inclusion bodies“) schließen.

Für eine anschließende Aufreinigung des Proteins hätte es allerdings in seiner löslichen Form vorliegen sollen, d.h. die starken Banden hätten in den Überstandfraktionen liegen sollen.

Die SDS-Page der bei 16°C durchgeführten kleinen Expression lieferte keine aussagekräftigen SDS-Gele.

Man hat nun trotz der „inclusion bodies“ (siehe Abbildung 19) die Klone **b4** und **c5** für weitere kleine Expressionsversuche gewählt, um mögliche bessere Expressionsbedingungen herauszufinden.

Mit beiden Klonen wurden bei 37°C, 16°C und bei Raumtemperatur (RT) kleine Expressionsversuche (siehe 3.10.2.1) mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen durchgeführt.

SDS-Gele:

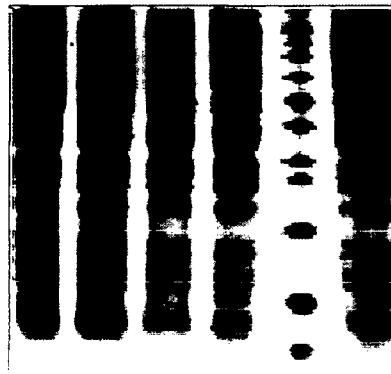
	Überstand							
	b4	b4	b4	b4	M	b4	b4	c5
Temperatur	16°	RT	RT	RT		37°	37°	16°
IPTG [mM]	1,0	0,1	0,2	1,0		0,1	0,2	1,0
Auftragsvolumen [µl]	7	7	7	7	4	10	10	7



M Sigma Marker

Abbildung 20: SDS-Page: Kleine Expression der Klone b4 und c5 (Überstandsfraktionen)

	Überstand					
	c5	c5	c5	c5	M	c5
Temperatur	RT	RT	RT	37°		37°
IPTG [mM]	0,1	0,2	1,0	0,1		0,2
Auftragsvolumen [µl]	10	10	10	10	4	10



M Sigma Marker

Abbildung 21: SDS-Page: Kleine Expression des c5-Klones (Überstandsfraktionen)

Aufgrund der Gele wurde für eine spätere große Expression für den Klon b4 eine Expressionstemperatur von 16°C und eine 1 mM IPTG-Konzentration gewählt (siehe Abbildung 20). Für den Klon c5 wurde eine 0,2 mM IPTG-Konzentration bei Raumtemperatur gewählt (siehe Abbildung 21).

4.5 Transformation und Expression in *E. coli* BL21(DE3) Star

Die Ausbeute an Cytochrom c_6 bei der Expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (ca. 160 $\mu\text{g/l}$) war allerdings nicht zufriedenstellend und deshalb wurde jeweils die Mini-Prep-DNA von b4 und c5 (siehe 3.8.2) in einen neuen Expressionsstamm (*E. coli* BL21(DE3) Star) transformiert.

4.5.1 Cytochrom c_6 -Expression ohne *E. coli* Cytochrom c -Reifungsgene

Nach erfolgreicher Transformation wurden wieder kleine Expressionsversuche durchgeführt (vgl. 3.10.2.1; Zum Unterschied zu den *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen benötigten die *E. coli* BL21(DE3) Star-Zellen kein Chloramphenicol (Cam) als Selektionsdruck).

	Überstand				
	c5	c5	c5	c5	M
Temperatur	RT	RT	37°	37°	
IPTG [mM]	0,2	1,0	0,2	0,1	
Auftragsvolumen [μl]	20	20	20	20	4

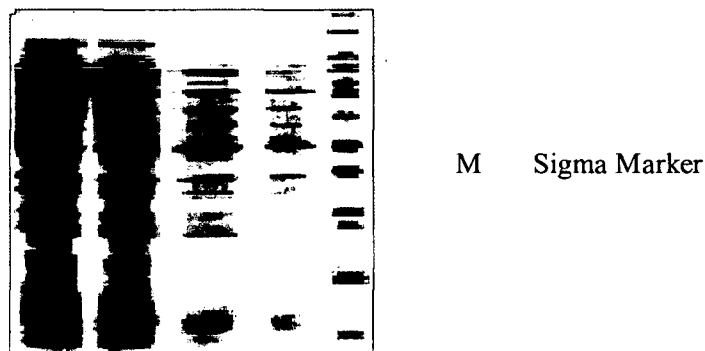


Abbildung 22: SDS-Page: Auszug aus der kleinen Expression (ohne Cytochrom c -Reifungsgene)

Eine anschließende große Expression mit dem c5-Klon wurde bei Raumtemperatur und einer IPTG-Konzentration von 0,2 mM durchgeführt.

Die Ausbeute an Cytochrom c_6 (ca. 360 $\mu\text{g/l}$) hatte sich zwar gegenüber der Expression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS erhöht, doch sie war noch immer deutlich unter den Erwartungen geblieben.

4.5.2 Transformation des pEC86 Plasmides in die Klone b4 und c5

Die *E. coli* BL21(DE3) Star-Zellen mit den bereits inkludierten pET-27b(+)-Cytochrom c_6 -Konstrukten von b4 bzw. c5 wurden elektrokompentent (siehe 3.6) gemacht. Anschließend wurde jeweils das pEC86 Plasmid hineintransformiert.

4.5.3 Expression der Klone b4 und c5 mit Cytochrom c -Reifungsgenen

Jeder kleine Expressionsansatz (siehe 3.10.2.2) wurde sowohl mit als auch ohne Hämin-Lösung durchgeführt. Nach erfolgter Zentrifugation war bereits zu diesem Zeitpunkt ein Unterschied im Vergleich zur Expression ohne Cytochrom c -Reifungsgene erkennbar. Es war nämlich zu einer durch das Cytochrom c_6 optisch sichtbaren rosa Färbung der Pellets gekommen.

	Überstand						
	b4	b4	b4	b4	M	b4	b4
Hämin-Lösung	-	+	-	+		-	+
Temperatur	16°	16°	RT	RT		37°	37°
IPTG [mM]	1,0	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0
Auftragsvolumen [μ l]	20	20	20	20	4	10	10



M Sigma Marker
 - Ohne Hämin
 + Mit Hämin

Abbildung 23: SDS-Page: Auszug aus der kleinen Expression (mit Cytochrom c -Reifungsgenen)

Der Klon b4 lieferte bei einer Expressionstemperatur von 16°C, einer IPTG-Konzentration von 1 mM und ohne Zugabe von Hämin bei der Induktion die eindeutigste Bande im Bereich von 9,7 kDa.

Eine erste große Expression wurde daher mit dem Klon b4 unter diesen Bedingungen in einem M9ZB-Kan [50 μ g/ml]/Cam [25 μ g/ml]-Medium durchgeführt. Die Ausbeute an Cytochrom c_6 konnte zwar auf diese Weise erheblich gesteigert werden (ca. 1 mg Cytochrom c_6 pro einem Liter Expressionsansatz), doch die größte Steigerung wurde erst später mit der zusätzlichen Änderung auf das LB-Kan [50 μ g/ml]/Cam [25 μ g/ml] Expressionsmedium erreicht.

4.5.4 Gleichzeitige Transformation der a-Klone 5/6/8 mit dem pEC86-Plasmid

Nun wurde nach erfolgreicher Produktion von rekombinanten Cytochrom c_6 mit His-Tag versucht das Protein ohne His-Tag in ausreichender Menge zu produzieren. Das His-Tag könnte nämlich bei späteren Untersuchungen von Proteinwechselwirkungen eventuell als störender Faktor auftreten.

Zu diesem Zweck wurde die Mini-Prep-DNA von a5, a6 und a8 gleichzeitig mit dem pEC86 Plasmid in den Expressionsstamm (*E. coli* BL21(DE3) Star) transformiert (siehe 3.9.2).

4.5.5 Expression der a-Klone 5/6/8 mit Cytochrom *c*-Reifungsgenen

Wie bei allen bisherigen Expressionen wurden auch in diesem Fall die günstigsten Expressionsbedingungen mit einer kleinen Expression (siehe 3.10.2.2) ermittelt. Wie bei den Klonen b4 und c5 waren auch hier die Pellets durch das Cytochrom c_6 deutlich rosa gefärbt.

Das beste Ergebnis lieferte der Klon a6 bei einer Expression auf Raumtemperatur und einer 1 mM IPTG-Konzentration bei der Induktion.

Die folgenden großen Expressionen wurden daher mit dem Klon a6 bei diesen Bedingungen durchgeführt.

4.6 Sequenzierung

Mit den Klonen a6, b4 und c5 wurde eine Sequenzierung (siehe 1.12) durchgeführt und anschließend mit den entsprechenden Ausgangssequenzen verglichen.

Ausgangssequenzen:

Um Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Primers möglichst zu verhindern wurden gewisse Basen ausgetauscht. Bei diesen sogenannten stillen Mutationen sind die neu eingefügten Basen in den folgenden Abbildungen fett gedruckt und die ursprünglichen Basen jeweils oberhalb dieser angeführt.

a-Klone

```

          NcoI      T              T      primer1
+          M      A D L A      H G K      A I F      A G N C      A A C
1 CATGCCATGG CGGACCTAGC CCACGGTAAA GCTATCTTTG CCGGTAACTG TGCCGCTTGT
  GTACGGTACC GCCTGGATCG GGTGCCATTT CGATAGAAAC GGCCATTGAC ACGGCGAACA

+3 H N G      G L N A      I N P      S K T      L K M A      D L E
61 CATAATGGGG GCCTTAATGC CATCAACCCC AGCAAAACCT TAAAAATGGC AGACTTGGAA
  GTATTACCCC CGGAATTACG GTAGTTGGGG TCGTTTTGGA ATTTTTACCG TCTGAACCTT

+3 A N G      K N S V      A A I      V A Q      I T N G      N G A
121 GCCAATGGTA AAAATTCCGT GCGCGCAATT GTGGCCCAGA TCACCAATGG TAATGGCGCT
  CGGTTACCAT TTTTAAGGCA CCGCCGTTAA CACCGGGTCT AGTGGTTACC ATTACCGCGA

+3 M P G      F K G R      I S D      S D M      E D V A      A Y V
181 ATGCCTGGCT TTAAGGGTCG CATCAGTGAC AGCGACATGG AAGATGTGGC GGCCTACGTG
  TACGGACCGA AATTCCCAGC GTAGTCACTG TCGCTGTACC TTCTACACCG CCGGATGCAC

          G              BamHI
+3 L D Q      A E K G      W @
241 CTTGATCAAG CTGAAAAGGG CTGGTAGGGGA TCCGCG
  GAACTAGTTC GACTTTTCCC GACCATCCCT AGGCGC
          primer 2

```

Abbildung 24: Ausgangssequenz a-Klone

b-Klone

```

      NcoI                primer 1
      M   A D L A H G K A I F A G N C A A C
1  CATGCCATGG CCGACCTAGC CCACGGTAAA GCTATCTTTG CCGGTAAC TGCCGCTTGT
   GTACGGTACC GCCTGGATCG GGTGCCATTT CGATAGAAAC GGCCATTGAC ACGGCGAACA

+3  H N G G L N A I N P S K T L K M A D L E
61 CATAATGGGG GCCTTAATGC CATCAACCCC AGCAAAACCT TAAAAATGGC AGACTTGGAA
   GTATTACCCC CGGAATTACG GTAGTTGGGG TCGTTTTTGA ATTTTTTACC TCTGAACCTT

+3  A N G K N S V A A I V A Q I T N G N G A
121 GCCAATGGTA AAAATTCCTG GCGGCAATT GTGGCCCAGA TCACCAATGG TAATGGCGCT
   CGGTTACCAT TTTTAAGGCA CCGCCGTAA CACCGGTCT AGTGGTTACC ATTACCGCGA

+3  M P G F K G R I S D S D M E D V A A Y V
181 ATGCTGGCT TTAAGGGTCG CATCAGTGAC AGCGACATGG AAGATGTGGC GGCCTACGTG
   TACGGACCGA AATTCCCAGC GTAGTCACTG TCGTGTACC TTCTACACCG CCGGATGCAC
      G
+3  L D Q A E K G W H H H H H H @
241 CTTGATCAAG CTGAAAAGGG CTGGCACCAC CATCACCACC ATTAGGGATC CGCG
   GAACTAGTTC GACTTTTCCC GACCGTGGTG GTAGTGGTGG TAATCCCTAG GCGC
      primer 4

```

Abbildung 25: Ausgangssequenz b-Klone

c-Klone

```

      NcoI                primer 3
      M   G H H H H H H A D L A H G K A I F
1  CATGCCATGG GGCACCACCA TCACCACCAT GCTGACCTAG CCCACGGTAA AGCGATCTTT
   GTACGGTACC CCGTGGTGGT AGTGGTGGTA CACTGGATC GGTGCCATT TCGCTAGAAA

+3  A G N C A A C H N G G L N A I N P S K T
61 GCCGGTAAC GTGCCGCTTG TCATAATGGG GGCTTAATG CCATCAACCC CAGCAAAACC
   CGGCCATTGA CACGGCGAAC AGTATTACCC CCGGAATTAC GGTAGTTGGG GTCGTTTTTG

+3  L K M A D L E A N G K N S V A A I V A Q
121 TAAAAAATGG CAGACTTGGG AGCCAATGGT AAAAATTCCTG TGGCGGCAAT TGTGGCCAG
   AATTTTTTACC GTCTGAACCT TCGGTTACCA TTTTAAAGG ACCGCCGTTA ACACCGGGTC

+3  I T N G N G A M P G F K G R I S D S D M
181 ATCACCAATG GTAATGGCGC TATGCCTGGC TTTAAGGGTC GCATCAGTGA CAGCGACATG
   TAGTGGTTAC CATTACCGCG ATACGGACCG AAATTCCCAG CGTAGTCACT GTCGCTGTAC
      G
+3  E D V A A Y V L D Q A E K G W @ BamHI
241 GAAGATGTGG CGGCCTACGT GCTTGATCAA GCTGAAAAGG GCTGGTAGGG ATCCGCG
   CTTCTACACC GCCGGATGCA CGAAGTAGTT CGACTTTTCC CGACCATCCC TAGGCGC
      primer 2

```

Abbildung 26: Ausgangssequenz c-Klone

Die Sequenzierungen der Klone a6, b4 und c5 wurde mittels NCBI-Website (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) mit den jeweiligen Ausgangssequenzen verglichen.

Zu diesem Zweck wurden von den Ausgangssequenzen nur die jeweils interessanten

Genabschnitte zwischen dem Methionin (grün gefärbt in den Abbildungen) und dem Stoppcodon (rot gefärbt) herangezogen.

Alle drei Klone wiesen eine 100%ige Sequenzübereinstimmung auf.

Aus der Aminosäuresequenz wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Gene Runner 3.0 (Hastings Software, Inc.) Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt (pI) der verschiedenen Klone von Cytochrom c_6 kalkuliert:

	Klon a	Klon b	Klon c
Molekulargewicht (Da)	8820,9	9643,9	9700,9
Isoelektrischer Punkt (pI)	5,55	6,76	6,76

Tabelle 4: Molekulargewicht und pI der verschiedenen Klone

4.7 Spektralphotometrische Untersuchungen

4.7.1 Photometrische Charakterisierung von Cytochrom c_6

Mit Hilfe der Spektren wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Cytochrom c_6 -Lösungen bestimmt.

Berechnung der Cytochrom c_6 -Konzentration und Menge

$$\frac{\text{Absorption von Cytochrom } c_6 \text{ bei } 553 \text{ nm} \cdot \text{Verdünnung}}{23300} = \text{Konzentration [M]}$$

$$n = c \cdot V$$

$$m = n \cdot M \quad n = \text{Stoffmenge [mol]}$$

$$m = \text{Menge an Protein [g]}$$

$$M = \text{Molekulargewicht von Cytochrom } c_6 \text{ [g/mol]} \text{ (siehe Tabelle 4)}$$

Reinheitszahl

Dividiert man die gemessene Absorption bei 416 nm durch die Absorption bei 280 nm erhält man die Reinheitszahl. Die höchsten berechneten Reinheitszahlen des rekombinanten Proteins aus verschiedenen Reinigungen lagen in etwa bei 7.

Lage der für Cytochrom c_6 charakteristischen Peaks

Peak	rekombinantes Cytochrom c_6		Literatur	
	oxidiert	reduziert	oxidiert	reduziert
α -Peak		553		553
β -Peak		522		522
γ -Peak	409	416	410	416
δ -Peak		318		320

Tabelle 5: Vergleich der Lage der Peaks von Cytochrom c_6 in oxidiertem und reduziertem Zustand (Literatur: α -, β - und γ -Peak, Moser et al., 1991; δ -Peak, Reuter and Wiegand, 2001.

Vgl. Tabelle 3 in Kapitel 3.14.1.1).

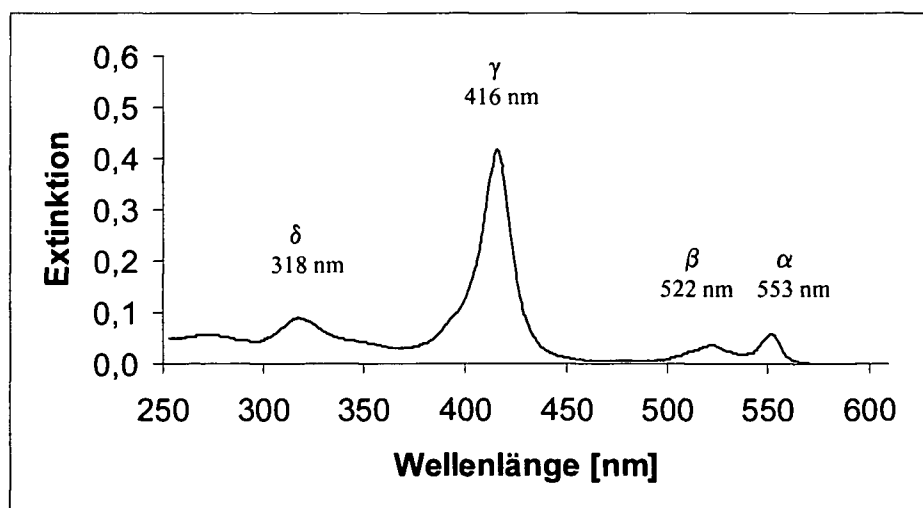


Abbildung 27 Spektrum von reduziertem Cytochrom c_6 aus dem b4-Klon

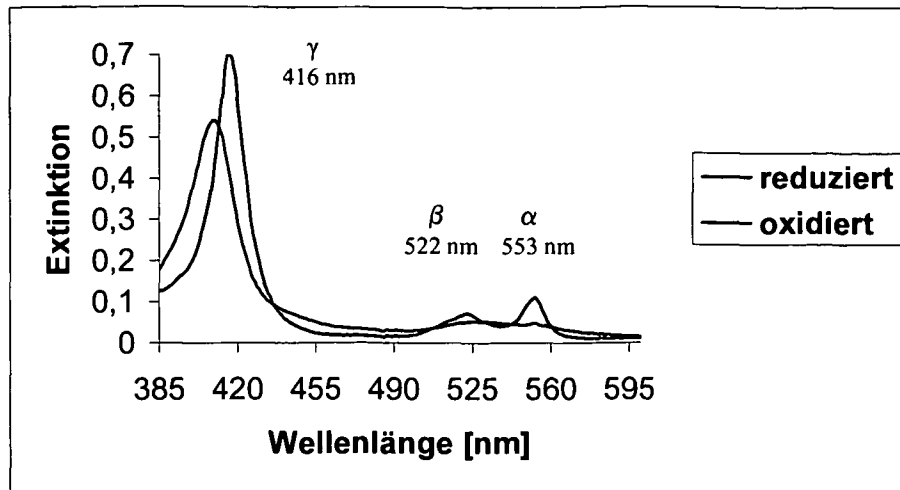


Abbildung 28: Spektrum von Cytochrom c_6 aus dem c5-Klon. Vergleich von reduziertem und oxidiertem Spektrum (vgl. 4.8.3).

4.7.2 Ermittlung der molaren Extinktionskoeffizienten

Alle Bestimmungen wurden mit dem gereinigten reduzierten rekombinanten Cytochrom c_6 aus dem b4-Klon (Expresionsstamm: *E. coli* BL21(DE3) Star mit Cytochrom c -Reifungsgenen) durchgeführt. Stellvertretend für die Auswertung aller Extinktionskoeffizienten wird die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge (553 nm) im Detail angeführt.

553 nm (α -Peak)

Doppelbestimmung bei verschiedenen Cytochrom c_6 -Konzentrationen incl. der entsprechenden Mittelwerte:

Cytochrom c_6 [μ M]	Messung 1	Messung 2	Mittelwert
10	0,2231	0,2175	0,2203
15	0,3493	0,3480	0,3487
20	0,4841	0,4751	0,4796
25	0,5831	0,5882	0,5857
30	0,7068	0,6762	0,6915

Tabelle 6: Absorptionmesswerte bei 553 nm

Die ermittelten Absorptionsmittelwerte wurden anschließend gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen:

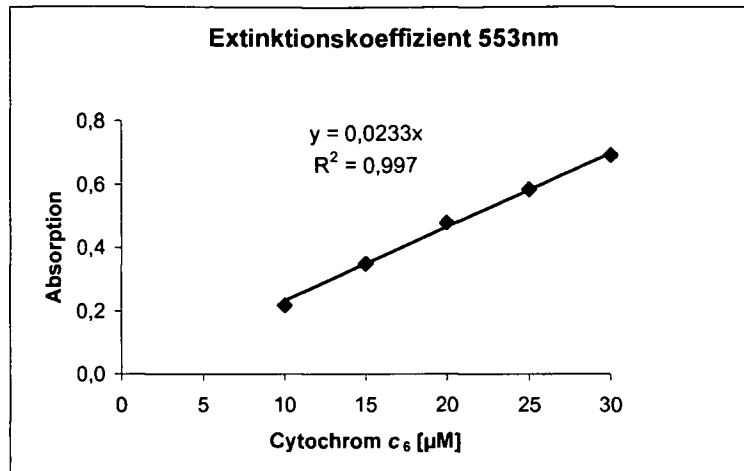


Abbildung 29: Darstellung der Absorptionsmittelwerte bei 553 nm gegen die entsprechenden Cytochrom c_6 -Konzentrationen.

Zusammenfassung der molaren Extinktionskoeffizienten:

	Rekombinantes Cytochrom c_6
ϵ_{553} (α -Peak)	$23300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ϵ_{522} (β -Peak)	$15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ϵ_{416} (γ -Peak)	$129500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ϵ_{318} (δ -Peak)	$35900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Tabelle 7: Molare Extinktionskoeffizienten vom reduzierten rekombinanten Cytochrom c_6

4.8 Reinigung

Nach diversen großen Expressionen von Cytochrom c_6 (siehe 4.5) wurden jeweils entsprechende Reinigungen des rekombinanten Proteins durchgeführt (siehe 3.13).

4.8.1 Reinigung von Cytochrom c_6 mit His-Tag (b- und c- Klone)

Nach dem Zellaufschluß der b- und c-Klone wurde der Überstand mit Hilfe einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographiesäule gereinigt. Diese Art der Reinigung beruhte auf dem vorhandenen Histidin-Schwanz (His-Tag). Da die Säule mit Zn^{2+} -Ionen beladen war, bildeten die Histidine einen Komplex mit den Metallionen.

Stellvertretend für alle durchgeführten Reinigungen aus den b- und c-Klonen wird hier die Reinigung mit der besten Ausbeute genauer beschrieben:

Gereinigt wurde das rekombinante Enzym aus dem b4-Klon nach Expression in LB-Medium bei 16°C und einer Induktion mit 1 mM IPTG und 0,1 % Glycerin.

Nach der Reinigung wurde von den durch die Häm-Gruppe typisch leicht rötlich gefärbten Fraktionen mit dem Dioden Array Spektren aufgenommen und die sieben Fraktionen (je ca. 3 ml) mit der höchsten Reinheitszahl (A_{416}/A_{280}) zu einem Pool vereinigt. Dieser Pool wurde anschließend mittels Centripreps aufkonzentriert und mit Natriumascorbat ($C_6H_7O_6Na$) reduziert (siehe 3.13.4).

Nach Entsalzung mit einer PD-10 Entsalzungssäule wurde abschließend noch einmal ein Gesamtspektren im UV-VIS Bereich (200 - 800 nm) aufgenommen.

Die gereinigte und reduzierte Cytochrom c_6 -Lösung hatte letztendlich eine Konzentration von 250 μ M aufgewiesen, was bei einem Endvolumen von 4 ml einer Ausbeute von 9,65 mg Cytochrom c_6 pro Liter Expressionsansatz entsprach. Die Reinheitszahl betrug 7,7.

4.8.2 Reinigung von Cytochrom c_6 ohne His-Tag (a Klon)

Nach dem periplasmatischen Zellaufschluß der a-Klone wurde der Überstand mit Hilfe einer hydrophoben Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC) und einer Gelfiltrationschromatographie (GPC) gereinigt (siehe 3.13.2).

Die Reinigung mit der besten Ausbeute wird hier genauer beschrieben:

Gereinigt wurde das rekombinante Enzym aus dem a6-Klon nach Expression in LB-Medium bei Raumtemperatur und einer Induktion mit 1 mM IPTG und 0,1 % Glycerin.

Nach der HIC-Säule wurden die sieben am stärksten gefärbten Fraktionen (je ca. 5 ml) zu einem Pool vereinigt und ein Spektrum aufgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, daß laut der spezifischen Absorptionsmaxima das Cytochrom c_6 nach der HIC-Säule bereits im völlig reduzierten Zustand vorlag.

Der Pool wurde daraufhin mittels Centripreps aufkonzentriert. Anschließend wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Gelfiltrationschromatographie (GPC) durchgeführt. Um den Reinigungseffekt der GPC zu überprüfen wurde eine SDS-Page gemacht.

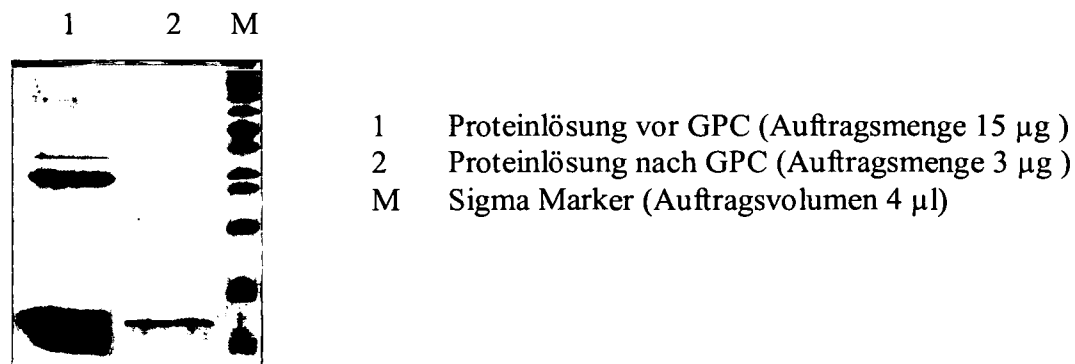


Abbildung 30: Cytochrom c_6 -Fraktionen vor und nach GPC

Wie man aus der obigen Abbildung erkennen kann, zeigte sich nach der Gelfiltration eindeutig nur mehr eine einzige Bande und zwar in dem für das Cytochrom c_6 zu erwartenden Bereich.

Aus dem abschließenden Gesamtspektrum im UV-VIS Bereich (200 - 800 nm) ging eine Reinheitszahl (A_{416}/A_{280}) von 7,1 und eine Ausbeute von 8,9 mg Cytochrom c_6 pro Liter Expressionsansatz hervor.

4.8.3 Reduzieren bzw. Oxidieren von Cytochrom c_6

Das rekombinante Enzym aus dem b4-Klon nach Expression in LB-Medium bei 16°C und einer Induktion mit 1 mM IPTG und 0,1 % Glycerin wurde mit Natriumascorbat bzw. Kaliumhexacyanoferrat(III) in zehnfachem Überschuß reduziert bzw. oxidiert (siehe 3.13.4). Es wurde von der reduzierten und oxidierten Form jeweils ein Spektrum aufgenommen und die beiden Spektren wurden überlagert. Hierbei konnte einerseits gut beobachtet werden wo sich der spezifische Hämpeak (Soret-Peak) der jeweiligen Form befand (oxidiert: 409 nm, reduziert: 416 nm) und andererseits das die weiteren spezifischen Peaks (α (553 nm), β (522 nm) und δ (318 nm)) für das reduzierte Cytochrom c_6 deutlich ausgeprägt waren (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 28).

4.9 MALDI-TOF-MS

Durchgeführt wurde die Messung mit dem Cytochroms c_6 aus dem b4-Klon (nach Expression in LB-Medium bei 16°C und einer Induktion mit 1 mM IPTG und 0,1 % Glycerin).

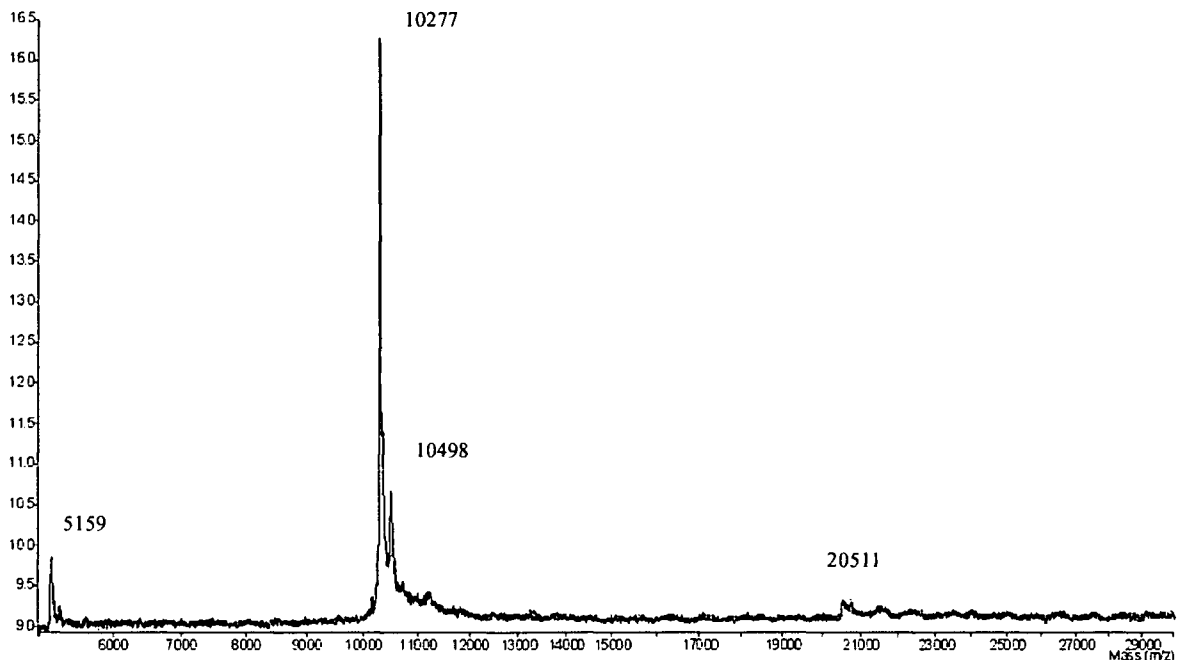


Abbildung 31: MALDI-TOF-MS von Cytochrom c_6

Protein	Einfach geladen [Da]	Zweifach geladen [Da]	Dimerbildung [Da]
Cytochrom c_6	10277	5159	minimal sichtbar ~ 20500

Tabelle 8: Werte aus dem MALDI-TOF-MS Spektrum

Protein	M_r [Da]	Prothetische Gruppe (Häm)	abgespaltenes H_2O	M_r [Da]	Differenz zu MALDI
Cytochrom c_6	9643.9	652.0	- 36 g/mol	10259.9	- 17.1

Tabelle 9: Auswertung MALDI-TOF-MS

Wenn also zum Molekulargewicht des Cytochroms c_6 (9643,9 Da) das Molekulargewicht der prosthetische Gruppe (652 g/mol) addiert und gleichzeitig das Molekulargewicht der bei der kovalenten Bindung der prosthetischen Gruppe abgespaltenen H_2O Moleküle subtrahiert wurde, dann kam man zu einem theoretischen Molekulargewicht von 10259,9 Da.

Daraus ergab sich im Bezug auf die durchgeführte Messung eine Differenz von 17,1 Da (Abweichung von 0,17 %). Der Wert aus der durchgeführten Messung stimmte also mit dem theoretisch berechneten Wert weitgehend überein.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit lag also darin, Cytochrom c_6 aus *Synechocystis* PCC6803 in größeren Mengen zu produzieren und entsprechend zu reinigen, um anschließend seine Rolle im respiratorischen Elektronentransport zu untersuchen. Aufgrund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit von *E. coli* wird die Gewinnung von großen Mengen des Proteins durch die Expression cyanobakterieller Proteine in *E. coli* wesentlich vereinfacht.

Wichtige Erkenntnisse für einen möglichen Erfolg dieser Arbeit lieferten Diaz et al. (1994): Sie haben das *petJ*-Gen, das für Cytochrom c_6 codiert, in *E. coli* kloniert und dabei festgestellt, daß *E. coli* das Protein richtig expremierte und daß das produzierte Protein mit dem aus Cyanobakterien gewonnen Cytochrom c_6 identisch war.

Da die bisherigen Versuche in der Arbeitsgruppe, Cytochrom c_6 in größeren Mengen zu produzieren, leider nicht den erwarteten Erfolg brachten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Klonierung des Proteins noch einmal von Neuem begonnen.

Die Enzyme, die für die kovalente Bindung des Häms an das Protein verantwortlich sind, sind im Periplasma zu finden (Thöny-Meyer et al., 1995). Daher wurde das *petJ*-Gen in den pET-27b(+)-Vektor kloniert, da dieser eine Signalsequenz produziert, die es ermöglicht das Zielprotein in den periplasmatischen Raum zu transportieren. Es wurden drei verschiedene Klone hergestellt: Klon a (ohne His-Tag), Klon b (C-terminales His-Tag) und Klon c (N-terminales His-Tag).

Die erste Expressionen erfolgte unter Verwendung des pET-27b(+)-Vektors in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen. Die *petJ*-Expression wurde bei Raumtemperatur [0,2 mM IPTG] induziert, wobei bei dieser Expression Hämin zum Expressionsmedium gegeben wurde, da man annahm, daß die Häm-Biosynthese des Expressionsstammes nicht ausreiche, um den Bedarf an Häm für die Produktion großer Mengen an rekombinantem Cytochrom c_6 zu decken. Nach Reinigung mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (MCAC) erhielt man mit einem c-Klon eine Ausbeute von ca. 160 µg Cytochrom c_6 pro Liter Expressionsansatz.

Da diese Ausbeute aber keineswegs zufriedenstellend war, wurde versucht, diese mit Hilfe des *E. coli* BL21(DE3) Star Expressionsstammes zu verbessern. Dieser Stamm beinhaltet eine Mutation im *rne*-Gen, welches für die Endonuclease RNaseE kodiert. RNaseE ist eine Schlüsselkomponente eines Proteinkomplexes, welcher für den Abbau von mRNA

verantwortlich ist. Somit wird in diesen Zellen eine höhere mRNA Stabilität erreicht und das wiederum sollte zu einer höheren Ausbeute an rekombinantem Protein führen. Mit denselben Expressionsbedingungen und demselben c-Klon wie oben wurde der Ertrag auch tatsächlich um mehr als das Doppelte höher, allerdings war dieser mit ca. 360 µg pro Liter Expressionsansatz auch deutlich unter den Erwartungen geblieben.

Auf Grund dieser Tatsache ist man dann im nächsten Schritt dazu übergegangen *E. coli* BL21(DE3) Star-Zellen noch zusätzlich mit dem pEC86 Plasmid, welches die *E. coli* Cytochrom *c* Reifungsgene *ccmABCDEFGH* beinhaltet, zu transformieren.

Interessanterweise hat sich hier bei der Ermittlung der geeigneten Expressionsbedingungen herausgestellt, daß die Zugabe einer Hämin-Lösung das Ergebnis nicht positiv beeinflusste.

Zum ersten Mal wurde nun mit Hilfe dieses pEC86 Plasmides eine Ausbeute im mg-Bereich pro Liter Expressionsansatz erreicht.

Doch wirklich zufriedenstellend war dieses Ergebnis auch nicht und man versuchte weiter die Expression zu optimieren. Der Umstieg von einem M9ZB-Expressionsmedium auf ein LB-Expressionsmedium brachte dann letztendlich das erhoffte Ergebnis, welches bei ca. 9 mg Cytochrom *c*₆ pro Liter Expressionsansatz lag. Wobei erwähnt werden sollte, daß dieses Ergebnis, aufgrund von möglichen Störungen des His-Tags bei den anschließenden Untersuchungen, mit einem a-Klon erzielt wurde. Durch die aufwendigere Reinigung in zwei Schritten (hydrophoben Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC) mit anschließender Gelfiltrationschromatographie) war der Verlust an Protein im Zuge dieser Reinigung sicher größer als bei der Reinigung der b- und c-Klone.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein jeweils mit Hilfe von Natriumascorbat reduziert und mit dem ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten (23300 M⁻¹ cm⁻¹) spektralphotometrisch bei 553 nm bestimmt. Das Absorptionsverhältnis A₄₁₆/A₂₈₀ wurde mit 7,1 berechnet, was die Reinheit und die hohe Häm-Bindung des rekombinanten Cytochrom *c*₆ unterstreicht. Darüber hinaus waren die Absorptionsmaxima des rekombinanten Proteins sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand geradezu ident mit den Literaturwerten (vgl. 4.7).

Die anschließende Untersuchung des rekombinanten Cytochrom *c*₆ mit dem Massenspektrometer lieferte ebenfalls ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen dem theoretisch berechneten und dem experimentell ermittelten Wert, so daß man zusammenfassend von einer erfolgreichen heterologen Expression sprechen konnte.

Bezüglich der Rolle von Cytochrom c_6 im respiratorischen Elektronentransport möchte ich abschließend noch auf die kinetischen Untersuchungen des Elektronentransfers zwischen Cytochrom c_6 und der löslichen cyanobakteriellen Cu_A Domäne der Cytochrom c Oxidase verweisen (Paumann et al., 2004, FEBS Lett. 576, 101-106).

Hier wurden Messungen mit der Stopped-Flow-Technik durchgeführt, um die Kinetik des Elektronentransfers zwischen den beiden Proteinen zu untersuchen. Durch die Stopped-Flow-Technik ist es möglich, die Reaktionsvorgänge direkt am aktiven Zentrum von Enzymen zu messen. Mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik können Reaktionskinetiken im Millisekunden-Bereich gemessen werden, was Messungen vor der Einstellung des Fließgleichgewichtes, d.h. im pre-steady-state, ermöglicht. Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen deuteten stark auf einen direkten Elektronentransfer zwischen Cytochrom c_6 und der Cytochrom c Oxidase hin.

6 Literatur

Arslan E., Schulz H., Zufferey R., Künzler P. and Thöny-Meyer L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-Type Cytochrome Subunits of the *cbb₃* Oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 744–747.

Diaz A., Navarro F., Hervas M., Navarro J. A., Chavez S., Florencio F. J., De la Rosa M. A. (1994) Cloning and correct expression in *E. coli* of the *petJ* gene encoding cytochrome *c₆* from *Synechocystis* 6803. *FEBS Lett.* 347, 173-177.

Goldfuhs J. (2002) Heterologe Expression von Cytochrom *c₆* aus *Synechocystis* sp. PCC6803 in *Escherichia coli* und physikochemische Charakterisierung. Diplomarbeit, Universität Wien.

Knippers R., Philippsen P., Schäfer KP., Fanning E. (1990) *Molekulare Genetik*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Manna P., Vermaas W. (1997) Lumenal proteins involved in respiratory electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Mol. Biol.* 35, 407-416.

Molina-Heredia F. P., Balme A., Hervas M., Navarro J. A., De la Rosa M. (2002). A comparative structural and functional analysis of cytochrome *c_M*, cytochrome *c₆* and plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett.* 517, 50-54.

Moser D., Nicholls P., Wastyn M. and Peschek G. (1991) Acidic cytochrome *c₆* of unicellular cyanobacteria is an indispensable and kinetically competent electron donor to cytochrome oxidase in plasma and thylakoid membranes. *Biochemistry Int.* 24, 757-768.

Paumann M., Feichtinger M., Bernroither M., Goldfuhs J., Jakopitsch C., Furtmüller P. G., Regelsberger G., Peschek G. A., Obinger C. (2004) Kinetics of interprotein electron transfer between cytochrome *c₆* and the soluble Cu_A domain of cyanobacterial cytochrome *c* oxidase. *FEBS Lett.* 576, 101 - 106.

Paumann M., Lubura B., Regelsberger G., Feichtinger M., Köllensberger G., Jakopitsch C., Furtmüller P. G., Peschek G. A., and Obinger C. (2004) Soluble Cu_A Domain of Cyanobacterial Cytochrome *c* Oxidase. *J. Biol. Chem.* 279, 10293-303.

Reincke B., Thöny-Meyer L., Dannehl C., Odenwald A., Aidim M., Witt H., Rüterjans H., Ludwig B. (1999) Heterologous expression of soluble fragments of cytochrome *c*₅₅₂ acting as electron donor to the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 114-120.

Reuter W., Wiegand, G. (2001) Cytochrome *c*₆. In *Handbook of metalloproteins* (Messerschmidt A., Huber R., Poulos T., Wieghardt K., eds.), 87-97, John Wiley and sons, LTD.

Schlegel, Hans G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, 7., überarb. Aufl. / unter Mitarb. von Christiane Zaborosch, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., and Cohen-Bazier G. (1971) Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.*, Vol. 35, No. 2, 171-205.

Thöny-Meyer L. (2000) Haem-polypeptide interactions during cytochrom *c* maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 316-324.

Thöny-Meyer L., Fischer F., Künzler P., Ritz D., Hennecke H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrom *c* maturation. *J. Bacteriol.* 177, 4321-4326.

Turano P., Lu Yi. (2001) Iron in heme and related proteins. In *Handbook on metalloproteins* (Bertini I., Sigel A., Sigel H.), pp. 271-342, Marcel Dekker Inc., New York.

Wörterbücher der Biologie (1991) *Biotechnologie*, hrsg. von D. Schlee und H.-P. Kleber, 1. Aufl., Gustav Fischer Verlag Jena.