

BIOCHEMISCHES PRAKTIKUM

Fassung vom Januar 2013

Universität Kaiserslautern

Fachbereich Chemie

Prof. Dr. W. E. Trommer

Inhaltsverzeichnis

Zeitplan zum Biochemie-Praktikum für Master of Biosciences und Vertiefungspraktikum Life Science für Chemiker vom WS 2012/13	3
Anmerkungen zum Praktikum.....	4
Isolierung von Gelonin aus den Samen von <i>Gelonium multiflorum</i>	5
Isolierung von rekombinantem Gelonin aus <i>E.coli</i>	8
Genetischer Fingerabdruck mittels der Tetranukleotid Tandem Repeat Polymorphismen D3S1358 und D8S1179	13
Isolierung und Aufreinigung von MBP.....	30
ESR-Untersuchungen mit Spin-Label-Cofaktoren.....	37
Erzeugung eines 3-dimensionalen Computermodells für menschliches Renin mit Hilfe von Homology-Modeling	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Zeitplan zum Biochemie-Praktikum für Master of Biosciences und Vertiefungspraktikum Life Science für Chemiker vom WS 2012/13

Datum	Gruppen 1 + 2 (Chemiker)	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Mo. 21.01.2013	Mo. 14:00 Uhr, 54-582: ESR (Wolfgang Trommer)	Mo. 9:00, 54-573: Gelonin aus Samen von <i>Gelonium multiflorum</i> inkl. Charakterisierung (Elke Litmianski, Nicole Kiweler)	Mo. 9:00, 54-576: Gelonin aus <i>E. coli</i> inkl. Charakterisierung (Doreen Knochenhauer, Christian Kopp)	
Di. 22.01.2013	Di. 10:00 Uhr, Foyer: ESR (Wolfgang Trommer)			
Mi. 23.01.2013				Mo. 9:00 Uhr, 54-578: Computermodell von Renin (Reinhard Philipp)
Do. 24.01.2013	Do. 15:00, 54-572: Vorbereitung f. MBP (Mohammed Chakour)			
Fr. 25.01.2013				
Mo. 28.01.2013	Isolierung von MBP (Mohammed Chakour)	Mo. 9:00 Genetischer Fingerabdruck (Doreen Knochenhauer, Christian Kopp)		Mo. 14:00, 54-576: Gelonin aus <i>E. coli</i> inkl. Charakterisierung (Kathrin Stegmaier, Maximilian Stutz)
Di. 29.01.2013				
Mi. 30.01.2013				
Do. 31.01.2013	Charakterisierung v. MBP (Mohammed Chakour)			
Fr. 01.02.2013				

Anmerkungen zum Praktikum

- Sollten Sicherheitsregeln im Labor nicht befolgt werden, können Praktikant(inn)en vom Praktikum oder dem Versuchstag ausgeschlossen werden.
- Protokolle zu den einzelnen Versuchen sind spätestens 1 Woche nach Beendigung des Versuchs beim Versuchsassistenten / der Versuchsassistentin abzugeben.
- Alle verwendeten Messwerte etc. sind im jeweiligen Protokoll anzugeben.
- Rechenwege sind nachvollziehbar darzulegen.
- Protokolle sind in Papierform abzugeben.
- Nach dem Praktikum findet eine Praktikumsklausur statt.
- Zulassung zur Praktikumsklausur bzw. Ausstellung des Scheins nur nach erfolgreicher Abgabe und evtl. Korrektur aller Protokolle.
- Hinweis: Master of Biosciences müssen noch die Klausuren zu den Vorlesungen Biochemie II (CHE-400-020-V-0) und Biochemie IV (CHE-400-040-V-5) bestehen, um das Modul abzuschließen. Die Modulnote errechnet sich je zur Hälfte aus der Praktikumsklausur und der besseren Note der zwei Vorlesungsklausuren.

Isolierung von Gelonin aus den Samen von *Gelonium multiflorum*

Gelonin, ein Glykoprotein aus der indischen Pflanze *Gelonium multiflorum* ist ein sehr potentes Gift, das allerdings an intakten Zellen wirkungslos bleibt, da es die Zellwand nicht durchdringen kann. Toxische Wirkung zeigt es deshalb erst nach Kopplung an membranbindende Substanzen. Diese Eigenschaft des Gelonins wird in unserem Arbeitskreis ausgenutzt, um eine antigenspezifische Immunsuppression zu erzielen: An ein bestimmtes Antigen gekoppelt, soll Gelonin selektiv nur die Zellen (Lymphozyten) treffen, die Rezeptoren für dieses spezielle Antigen tragen und das Antigen-Toxin-Konjugat durch Endozytose inkorporieren können. Gelonin deaktiviert dann katalytisch die Ribosomen dieser Zellen, so dass die Proteinbiosynthese lahmgelegt wird, die Zellen abgetötet werden, und die Immunantwort gegen das verwendete Antigen gehemmt wird.

Arbeitsgang:

1. Tag:

Regenerierung des Kationenaustauschers (Fraktogel TSK CM 650 S):

Ca. 80 ml des Trägermaterials werden in 500 ml 1 M NaCl suspendiert, 30 min unter zeitweiligem Aufschlännen stehengelassen und anschließend über einer Nutsche (Porengröße 2) mit ca 2 l dest. Wasser gewaschen. Danach wird das Gel in 2 l 0,5 M NaOH aufgenommen und nach 30 min mit dest. Wasser neutral gewaschen. Die gleiche Prozedur wird mit 0,5 M HCl wiederholt. Anschließend wird mit ca 5 l 5 mM Phosphatpuffer, 5 mM EDTA pH 6,5 gewaschen (bis Waschlösung pH 6,5) und in die entsprechende Säule gefüllt.

Aufarbeitung der Samen:

23 g geschälte Samen werden mit 400 ml kaltem 5 mM Phosphatpuffer, 0,14 M NaCl pH 7,4 (bidest. Wasser) versetzt und mit einem Haushaltsmixer bei 4 °C in Abständen von etwa 30 sec zerkleinert (milchige Brühe, mit Samenstückchen). Das Homogenat wird über Nacht im Kühlraum gerührt.

2. Tag:

Die groben Bestandteile des über Nacht gerührten Homogenats werden mit einem Mulltuch (oder Teefilter) abfiltriert und die Suspension anschließend bei $30\,000 \times g$ 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert (Rotor JA-14, 14 000 rpm). Nach Abschöpfen des Fetts mit einem Plastiklöffel wird der Überstand 6 \times 50 min gegen je 5 l 5 mM Phosphatpuffer, 5 mM EDTA, pH 6,5 dialysiert. Zwischenzeitlich wird die Säule im Kühlraum mit bidest. Puffer equilibriert. Das bei der Dialyse entstandene Präzipitat wird bei $30\,000 \times g$ abzentrifugiert und auf die vorbereitete Säule aufgetragen (3,3 ml/min). Man spült über Nacht mit Puffer, bis das Durchflussphotometer keine Proteinabsorption mehr anzeigt.

3. Tag:

Man legt einen Gradienten von 0 - 0,3 M NaCl im gleichen Puffer (2 \times 500 ml) an und eluiert (Fraktionssammler ca. 6 min pro Glas).

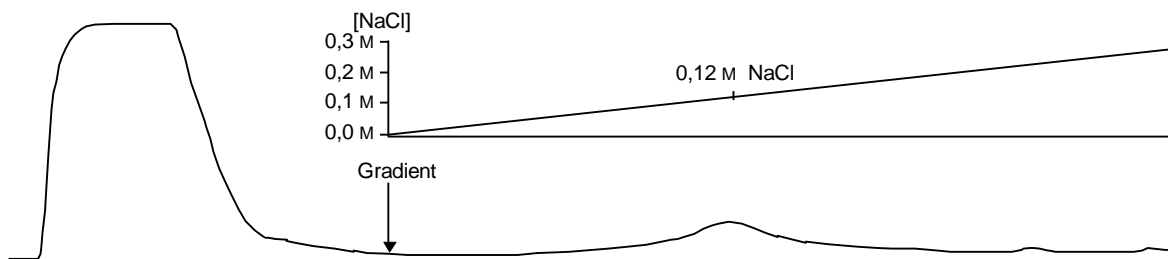


Abb. 1: Elutionsdiagramm von Gelonin

Das bei 0,12 M NaCl eluierte Protein wird gesammelt und der Proteingehalt bestimmt.

UV - Absorption: Die Absorption von 1 mg/ml Protein beträgt bei 278 nm 0,67.

Man erhält hier 30-40 mg Gelonin. Die Lösung wird mit Hilfe einer Centriprep-10 (Cut-Off: 10 000 D) eingeeengt auf mind. 4 mg/ml. Verlust durch Einengen: 10-15%

3. und 4. Tag:

Das Molekulargewicht und die Reinheit des Proteins wird mit Hilfe der SDS-Page bestimmt (Acrylamid 12,5 %).

Genaue Proteinbestimmung erfolgt durch BCA-Test:

50 Teile Reagenz A, das den Farbstoff 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin (Na-Salz) enthält, werden mit einem Teil Reagenz B (4% Kupfersulfat) gemischt. Als Standard wird eine Verdünnung von Sigma BSA-Standard verwendet (oder eine Stammlösung selbst hergestellt) dessen Konzentration zwischen 50 und 250 $\mu\text{g/ml}$ liegt. 50 μl dieses Standards (Verdünnungsreihe) werden mit 1 ml Reagenzlösung versetzt und bei 60 °C ca 45 min inkubiert. Danach wird schnell abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm bestimmt. Mit Hilfe eines Computerprogramms wird eine Ausgleichsgerade für die Standardwerte errechnet und damit die Proteinkonzentration in der Probe ermittelt.

Isolierung von rekombinantem Gelonin aus *E.coli*

Einleitung

Gelonin ist ein sog. Ribosomen-inaktivierendes Protein, das aus den Samen von *Gelonium multiflorum* isoliert werden kann (siehe Vorschrift zur Isolierung von Gelonin aus den Samen von *Gelonium multiflorum* in diesem Skript). Mit Hilfe des Plasmides pET-gel (siehe Abb. 1), das für Gelonin kodiert und so dessen Expression ermöglicht, kann Gelonin in großen Mengen aus *E. coli* isoliert werden. Zur Erleichterung der Aufreinigung wird bei der Translation ein N-terminaler HisTag an das Protein fusioniert. Der HisTag ist ein Oligopeptid und besteht u.a. aus Histidinresten, einer Schnittstelle für Thrombin und ermöglicht so die Bindung des Proteins an Metallionen und die leichte Abspaltung des His-Tags.

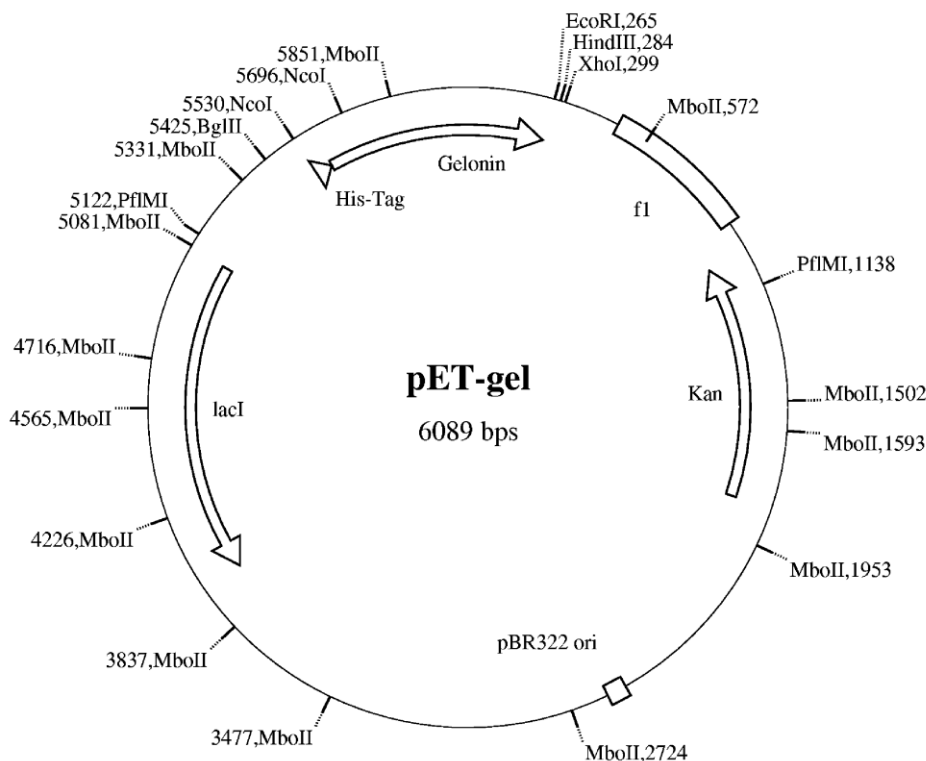


Abb 1 – Plasmidkarte von pET-gel

Versuchsbeschreibung

Tag 0: Vorbereitungen

Mit einer sterilen Impföse wird von einer gefrorenen Glycerinkultur (auf Eis) eine kleine Menge Zellen BL21(DE3) pET-gel abgekratzt und auf einer frischen LBK-Agarplatte als Verdünnungsausstrich ausgestrichen. Die Agarplatte wird über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag sind Kolonien vorhanden.

Mit je einer dieser Kolonien wird jeweils 25ml LBK-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 280 U/min im Luftschüttler inkubiert.

Tag 1 +2: Expression und Zellaufschluß

Benötigte Puffer und Lösungen:

- | | |
|--|--|
| 1) Pellet-Waschpuffer | 20mM Tris (121,14g/mol)
ad 250ml
pH 7,2 |
| 2) Kanamycin-Stammlösung | 45 mM Kanamycinsulfat (582,58g/mol)
ad 5ml H ₂ O
über 0,22µm steril filtrieren |
| 3) Bindungspuffer
(=Resuspendierungspuffer) | 20 mM Natrium-dihydrogenphosphat (137,99g/mol)
20 mM Imidazol (68,08g/mol)
500 mM Natriumchlorid (58,44g/mol)
ad 500ml H ₂ O
pH 7.2 |
| 4) Lysozym-Stammlösung | 10mg/ml Lysozym
ad 5ml Tris 100mM, pH 8 |
| 5) IPTG-Stammlösung | 1M IPTG (238,30g/mol)
ad 5ml H ₂ O
über 0,22µm steril filtrieren |

Zur Bestimmung des Zellwachstums in den Übernachtskulturen wird die optische Dichte bei 600nm (OD600) bestimmt. Dazu werden 500µl Übernachtskultur im UV-Spektrometer bei 600nm vermessen. Als Blank für die Messung dient LB-Medium.

Mit je 15ml der am besten gewachsenen Kulturen werden 2-mal je 500ml LBK-Medium angeimpft und im Luftschüttler bei 37°C und 200U/min inkubiert. Dabei wird die OD600 alle Stunde getestet. Erreicht die OD600 einen Wert zwischen 0,7 und 1,0 werden die Zellen mit 500µl IPTG-Stammlösung induziert. Die Zellen werden weiterhin unter den gleichen Bedingungen inkubiert und die OD600 bestimmt. Erreichen die Zellen die stationäre Wachstumsphase, wird die Expression durch 30 minütige Inkubation auf Eis gestoppt.

Durch Zentrifugation (7000 U/min, 4°C, 20min) werden die Zellen vom Nährmedium abgetrennt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen aufgetaut und 2-mal mit 25ml Pellet-Waschpuffer gewaschen. Anschließend in 25ml Bindungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 2,5ml der Lysozym-Stammlösung mit Ultraschall lysiert (70-80% Leistung, 12x10sec im Eisbad). Dabei ist darauf zu achten, daß es nicht zur Schaumbildung kommt. Die löslichen Zellbestandteile werden von den Zelltrümmern und inclusion bodies durch Zentrifugation abgetrennt (13000 U/min, 4°C, 30min) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

Tag 3: Isolation mit Nickel-Affinitätschromatographie

Benötigte Puffer und Lösungen:

- | | |
|------------------------|--|
| 1) Nickelsulfat-Lösung | 0,2M Nickelsulfat (262,85g/mol)
ad 10ml H ₂ O |
| 2) Waschpuffer | Bindungspuffer mit 100mM Imidazol
ad 250ml H ₂ O |
| 3) Elutionspuffer | Bindungspuffer mit 500mM Imidazol
ad 250ml H ₂ O |
| 4) Dialysepuffer | 20mM Natrium-dihydrogenphosphat
ad 5l H ₂ O
pH 7,2 |
| 5) Regenerationspuffer | 20mM Tris
50mM EDTA-Na-Salz (372,24g/mol)
500mM Natriumchlorid
ad 50ml H ₂ O
pH 8.0 |

Die aufgetauten Zellbestandteile werden mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert, um kleinere unlösliche Aggregate abzutrennen (60.000U/min, 4°C, 30min).

In der Zwischenzeit wird die HiTrap Chelating Affinitätssäule vorbereitet. Alle Schritte werden dabei mit dem Durchflußphotometer protokolliert. Alle auf die Säule aufgetragenen Puffer müssen steril über 0,45µm filtriert werden. Die Flußrate darf 2ml/min nicht übersteigen, da bei größerem Druck das Säulenmaterial zerstört wird. Alle von der Säule eluierten Fraktionen sind aufzufangen und zu lagern.

Die Säule wird mit 10ml Wasser gespült, mit 2ml der Nickelsulfat-Stammlösung aktiviert und anschließend wieder mit 10ml Wasser gespült. Danach wird mit 10ml Bindungspuffer equilibriert.

Nach beendeter Zentrifugation der Zellbestandteile wird der Überstand steril filtriert und direkt auf die Säule aufgetragen. 100µl werden für die abschließende Analyse durch BCA, ELISA und SDS-PAGE gelagert. Nach der Auftragung der Zellproteine wird die Säule mit Bindungspuffer gewaschen, bis alle nicht gebundenen Proteine von der Säule gewaschen wurden und die Baseline wieder erreicht ist. Die unspezifisch gebundenen Proteine werden mit 10ml Waschpuffer von der Säule entfernt und das gewünschte rekombinante Gelonin anschließend mit Elutionspuffer eluiert.

Die Elutionsfraktion wird danach über Nacht gegen 5l Dialysepuffer dialysiert, um das Imidazol aus der Probe zu entfernen. Am nächsten Tag wird der Dialysepuffer gewechselt und noch 1-mal für 3 Stunden dialysiert.

Zur Regeneration der Säule wird diese mit 10ml Regenerationspuffer gespült, anschließend mit 10ml Wasser gewaschen und danach in 20%iger ethanolischer Lösung gelagert.

Tag 4: Charakterisierung (BCA, SDS-PAGE, ELISA)

Zur Charakterisierung wird der BCA-Test (siehe Skript S. 24-25) durchgeführt. Ist die Konzentration an Protein in der Elutionsfraktion zu gering (< 0,1mg/ml) muss die Probe anschließend aufkonzentriert werden.

Zur weiteren Charakterisierung wird ein ELISA nach Vorschrift (siehe Skript S.34-36) durchgeführt. Pro Napf werden 20µg Protein aufgetragen. Als Positivkontrolle dient rekombinantes Gelonin. Als Negativkontrolle BSA.

Tag 5: Charakterisierung (SDS-PAGE, ELISAII)

Der ELISA wird durchgeführt. Als Primärantikörper werden Anti-His-Antikörper (Maus) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Sekundärantikörper werden Anti-Maus-Antikörper verwendet, die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt sind. Substrat ist p-Nitrophenylphosphat.

Auf dem SDS-PAGE (12%iges Trenngel) werden folgende Proben aufgetragen: Zellproteine, Durchlauf, Waschfraktion und Elutionsfraktion. Die SDS-PAGE wird nach Vorschrift durchgeführt (siehe Skript S. 23-27).

Literatur

Li, Z.-Y., Shi, Y.-W., Hossann, M., Kreilinger, U., Büttner, J., Vogel, P. D., Yuan, J.-M., Wise, J. G., Trommer, W. E. (2003), *Eur. J. Biochem.*, submitted

Genetischer Fingerabdruck mittels der Tetranukleotid Tandem Repeat Polymorphismen D3S1358 und D8S1179

1. Einleitung.....	14
2. Bedeutung von genetischen Markern	14
2.1. Molekulargenetische Marker	15
3. Short Tandem Repeat Loci.....	17
3.1. Chromosomenlokalisierung.....	17
3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	19
4. Aufgabenstellung.....	22
4.1. Zusammenfassung	22
4.2. Versuchsdurchführung.....	23
4.3. Auswertung.....	29
4.4 Anhang :	29

1. Einleitung

Während der letzten Jahre sind auf dem Gebiet der Chromosomenanalyse zahlreiche DNA-Marker in das Zentrum wissenschaftlicher Studien gerückt. Aufgrund von Längenvariationen, die durch repetitive Sequenzen verursacht werden, weisen genetische Marker teilweise einen erheblichen Polymorphismus auf. Dabei lassen sich zwei Gruppen von DNA-Markern unterscheiden: die VNTRs (*variable number of tandem repeats*), welche vornehmlich in der Telomerregion der Chromosomen vorkommen und die STRs (*short tandem repeats*), welche nahezu überall im menschlichen Genom verteilt sind und im Durchschnitt alle sechs bis zehn Kilobasen auftreten. STRs lassen sich mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizieren und finden Anwendung in der Genkartenerstellung und der pränatalen Diagnostik vieler genetischer Erbkrankheiten, wie beispielsweise der Zystischen Fibrose oder der Muskeldystrophie. Mit der Funktion eines „genetischen Fingerabdrucks“ werden STR-Marker überwiegend auch in der forensischen Medizin zur Identifizierung von Individuen und bei der Abstammungsbegutachtung eingesetzt.

2. Bedeutung von genetischen Markern

Zur Feststellung des biologischen Vaters eines Kindes bedient sich das Gericht im Streitfall abstammungsgenetischer Gutachten. Unterschieden werden hierbei Blutgruppengutachten, Anthropologisch-erbbiologische Gutachten und die Begutachtung des Chromosomenpolymorphismus („Genetischer Fingerabdruck“).

Wichtigstes und eindeutigstes Hilfsmittel bei der Klärung strittiger Abstammung ist derzeit die Analyse des Polymorphismus bestimmter Genorte („Vaterschaftstest“). Hierbei lässt sich die Vaterschaft eines Mannes mit einer prozentualen Wahrscheinlichkeit feststellen oder sicher ausschließen.

Seltener werden anthropologisch-erbbiologische Gutachten erstellt. Hierbei handelt es sich um einen Ähnlichkeitsvergleich zwischen Kind und möglichem Erzeuger, wobei die gesamte körperliche Erscheinung der Menschen berücksichtigt wird. Das Mindestalter für eine solche Untersuchung beträgt allerdings drei Jahre.

Einst häufig angewendet, nehmen Blutgruppenuntersuchungen inzwischen einen geringeren Stellenwert ein. Bei dieser Methode dürfen zur Klärung von Abstammungsfragen nur Eigenschaften des Blutes verwertet werden, deren Vererbung übersichtlich und Erbgang gesichert ist (Erythrozyten-, Serum- oder Enzymsysteme).

2.1. Molekulargenetische Marker

Um eine Vaterschaft mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachweisen zu können, ist entsprechend den Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten eine kombinierte Allgemeine-Vaterschafts-Ausschluß-Chance (AVACH) von 99,99 % notwendig. Solch ein Wert kann mittels molekulargenetischen Markern erreicht werden. Die in Zellkernen enthaltene Desoxyribonukleinsäure (DNA) lässt sich aus allen kernhaltigen Zellen gewinnen. Unter Verwendung locuspezifischer Primer können Fragmente molekulargenetischer Marker, die von Mensch zu Mensch meist unterschiedlich sind, über die Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mittels dieser Analyseverfahren werden Erbmerkmale sichtbar gemacht, die bei Mutter, Kind und Vater mit bisherigen serologischen Verfahren nicht zu erfassen waren.

Von besonderer Bedeutung sind zwei Klassen genetischer Marker, die VNTRs (*variable number of tandem repeats*) und die STRs (*short tandem repeats*). Diese DNA-Marker weisen einen beachtlichen Polymorphismus auf, der durch Variationen in der Allellänge und der Allelsequenz hervorgerufen wird.

2.1.1. Variable Number of Tandem Repeats

VNTRs (*variable number of tandem repeats*) sind Genloci mit kurzen, sich in unterschiedlicher Anzahl wiederholenden Sequenzmotiven. Wegen ihrer hohen Heterozygotenraten und großen Allelzahlen kommen VNTRs als genetische Marker in der biologischen und biomedizinischen Forschung zur Anwendung.

Basierend auf der Größe der Repeateinheit lassen sich VNTRs in drei Gruppen einteilen: Mikrosatelliten (1-2 bp), Short Tandem Repeats (STRs; 2-6 bp) und Minisatelliten (>10 bp). Weiterhin können VNTRs nach ihrer Allellänge klassifiziert werden. Zunächst wurden vor allem Allele der langen VNTRs über den Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) bestimmt. In den letzten Jahren hat sich jedoch auch die Untersuchung kürzerer VNTRs mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) zunehmend durchgesetzt. Von Vorteil ist hierbei, dass bei den Mikrosatelliten bzw. STRs eine präzisere Allelbestimmung als bei den längeren VNTRs möglich ist.

2.1.2. Short Tandem Repeats

Loci von Short Tandem Repeats (STR) sind eine Untergruppe der VNTRs und bestehen aus zwei bis sechs Basen-paar langen Sequenzmotiven, die in unterschiedlicher Anzahl wiederholt werden. Ihre Verteilung reicht nahezu über das gesamte menschliche Genom, in dem sie als Di-, Tri- oder Tetra-nukleotidrepeats etwa alle 20 kb (Kilobasen) vorkommen. Über die Hälfte der STR-Loci weisen einen Polymorphismus in der Anzahl ihrer Repeats auf, was sie zu einer wertvollen Quelle von genetischen Markern macht. Polymorphe STR-Sequenzen sind sowohl in genetischen als auch extragenetischen Regionen zu finden. Innerhalb genetischer Regionen treten sie in Introns, flankierenden Sequenzen und kodierenden Abschnitten auf. Aufgrund ihrer geringen Allellängen (meist 130-300 bp) sind STRs ideal zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung locuspezifischer Primer geeignet. Selbst der spezifische Nachweis eines individuellen Allel-Profiles durch Analyse alter oder schlecht gelagerter Proben, welche nur degradierte genomische DNA enthalten, ist möglich.

Die Analyse von Short Tandem Repeat (STR) Loci mittels PCR hat gezeigt, dass diese Marker aufgrund ihres hohen Repeatpolymorphismus sehr informativ für eine Vielzahl von Anwendungsbereichen sind. Wegen ihres häufigen Auftretens innerhalb des Genoms werden Dinukleotidrepeat Loci zur Erstellung von Genkarten genutzt. Die Tetranukleotide werden in der forensischen Medizin und der abstammungsgenetischen Begutachtung verwendet.

Die PCR-Amplifikation der STR-Systeme erfolgt unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer. Anschließend werden die Produkte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese in einem automatischen DNA-Sequenzier aufgetrennt. Anhand der Längenzuordnung eines internen Standards können DNA-Fragmente bis zu einem Basenpaar genau bestimmt werden.

Neben der Anwendung als Singleplex lassen sich STR-Marker auch als Multiplex bearbeiten. Hierbei erfolgt die Amplifikation mehrerer Genorte in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-farbmarkierungen an den Primern können sogar Loci mit überlappenden Allelgrößen zusammen bestimmt werden.

Bei Untersuchungen von Dinukleotid STRs ist häufig ein „enzymatischer Slippage“ während der Amplifikation beobachtet worden, welcher sich in Form artifizieller *stutter peaks* oder Stotterbanden im Elektropherogramm darstellte. Diese Peaks sind um ein oder mehrere Repeateinheiten kürzer als das Hauptallel und erschweren eine eindeutige Allelbestimmung. Tri- und Tetranukleotidrepeats dagegen, welche einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Allelen besitzen, neigen weniger zum „Slippage“ und sind daher besser zur Identifikation von Personen geeignet.

Die Repeatstruktur von STR-Allelen kann in unterschiedlicher Weise variieren. Variationen können in der Länge der individuellen Repeateinheit, in der Anzahl von Repeateinheiten und durch Unterschiede im Repeatmuster einzelner Allele auftreten. *Simple repeats* enthalten Einheiten identischer Länge und Sequenz, *compound repeats* bestehen aus einem oder mehreren zusammengesetzten einfachen (*simple*) repeats und *complex repeats* sind durch unterschiedliche Blöcke von variabler Länge, die zusätzlich noch von mehr oder weniger variablen Sequenzen unterbrochen werden können, gekennzeichnet.

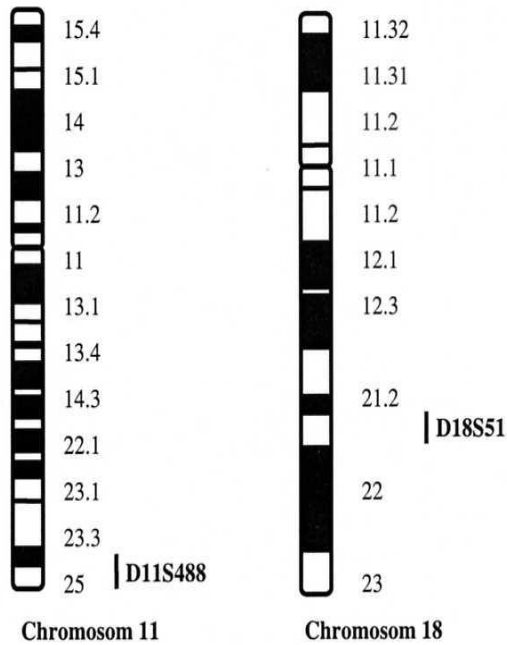
Voraussetzung zur genauen Allelbestimmung sind Kenntnisse zur Sequenzstruktur der STR-Loci. Erst nach eingehenden Untersuchungen ist ein Einsatz der Marker zur Personenidentifikation (mind. 5 Loci) und Vaterschaftsbegutachtung (16 Loci) möglich.

3. Short Tandem Repeat Loci

3.1. Chromosomenlokalisierung

Die Abbildung 1 zeigt zwei unterschiedliche, aber übliche, Darstellungsweisen der Lokalisation von Markern:

- a. Lokalisation der zwei STR-Marker D11S488 (11q24.1-q25) und D18S51 (18q21.3) auf ihren Chromosomen.



- b. Lokalisation des STR-Markers D8S1179, der in unserem Experiment verwendet wird, dargestellt als Basensequenz. Der blau unterlegte Bereich entspricht der zu amplifizierenden Zielsequenz. In diesem Beispiel wird die *Simple-Repeat*sequenz „TCTA“ insgesamt 12 x wiederholt.

D8S1179:

5'	11	21	31	41	51
1 TGGCAACTTA ACCGTTGAAT	TATGATTTT ATACATAAAA	TGTATTTTCA ACATAAAGTA	GTGTACATTC CACATGTAAG	GTATCTATCT CATAGATAGA	ATCTATCTAT TAGATAGATA
61 CTATCTATCT GATAGATAGA	ATCTATCTAT TAGATAGATA	CTATCTATCT GATAGATAGA	ATTCGCCACA TAAGGGGTGT	GTGAAAATAA CACTTTTATT	TCTACAGGAT AGATGTCCTA
121 AGGTAAATAA TCCATTTATT	ATTAAGGCAT TAATTCCGTA	ATTCACGCCAA TAAGTGCCTT	TGGGATACGN ACCCTATGCN	TACAGTGATG ATGTCACTAC	AAAATGAACT TTTTACTTGA

Chromosomale Lokation: 8q24.1-24.2

Repeats: 12 x TCTA (von Base 44 bis 91), **96 bp** insgesamt.

PCR-Primer Sequenzen:

Primer 1: **D8S1179-1** (25 Basen lang)

5' – TTT TTG TAT TTC ATG TGT ACA TTC G – 3' (von Base 17 bis 41).

Primer 2: **D8S1179-2** (25 Basen lang)

5' – CGT AGC TAT AAT TAG TTC ATT TTC A – 3' (von Base 193 bis 169).

Der Primer 1 (P1) entspricht dem Forward-Primer (also in 5' → 3'-Richtung) und der Primer 2 (P2) dem Reverse-Primer (also in 3' → 5'-Richtung).

3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) handelt es sich um eine *in vitro*-Technik, die 1985 von Kary Mullis entwickelt wurde. Seitdem wird diese Arbeitstechnik vielfach in den Labors angewendet.

3.2.1 Prinzip der PCR

Mittels PCR werden gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Abschnitte vervielfältigt, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen, den Primern, eingerahmt werden.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der PCR



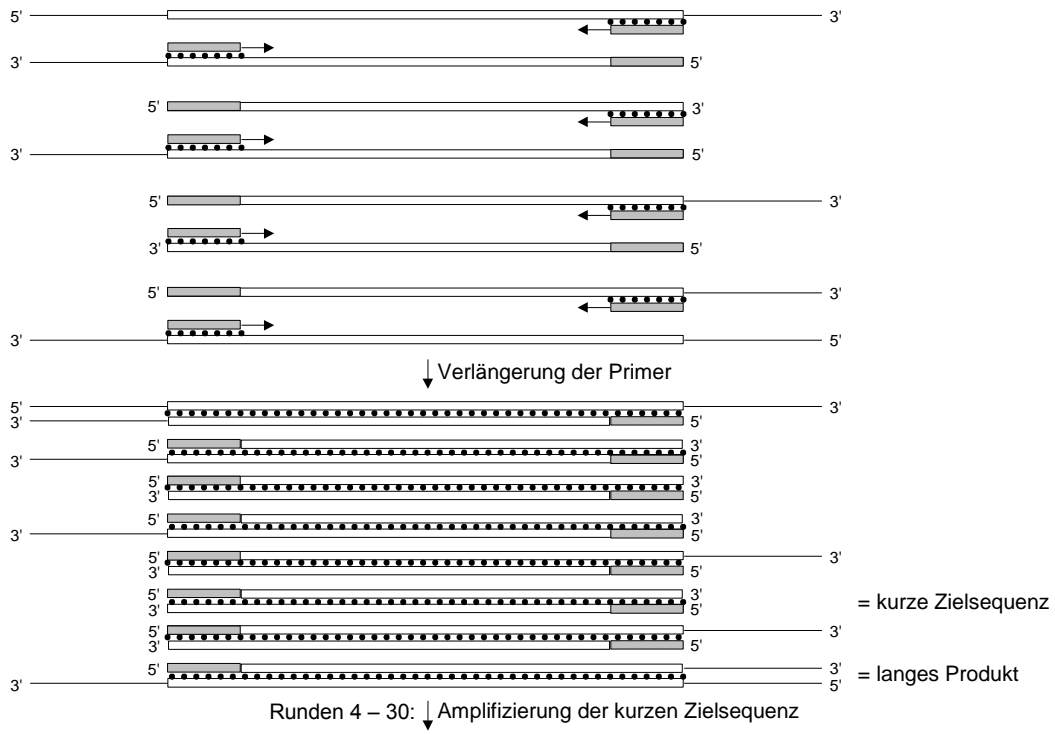
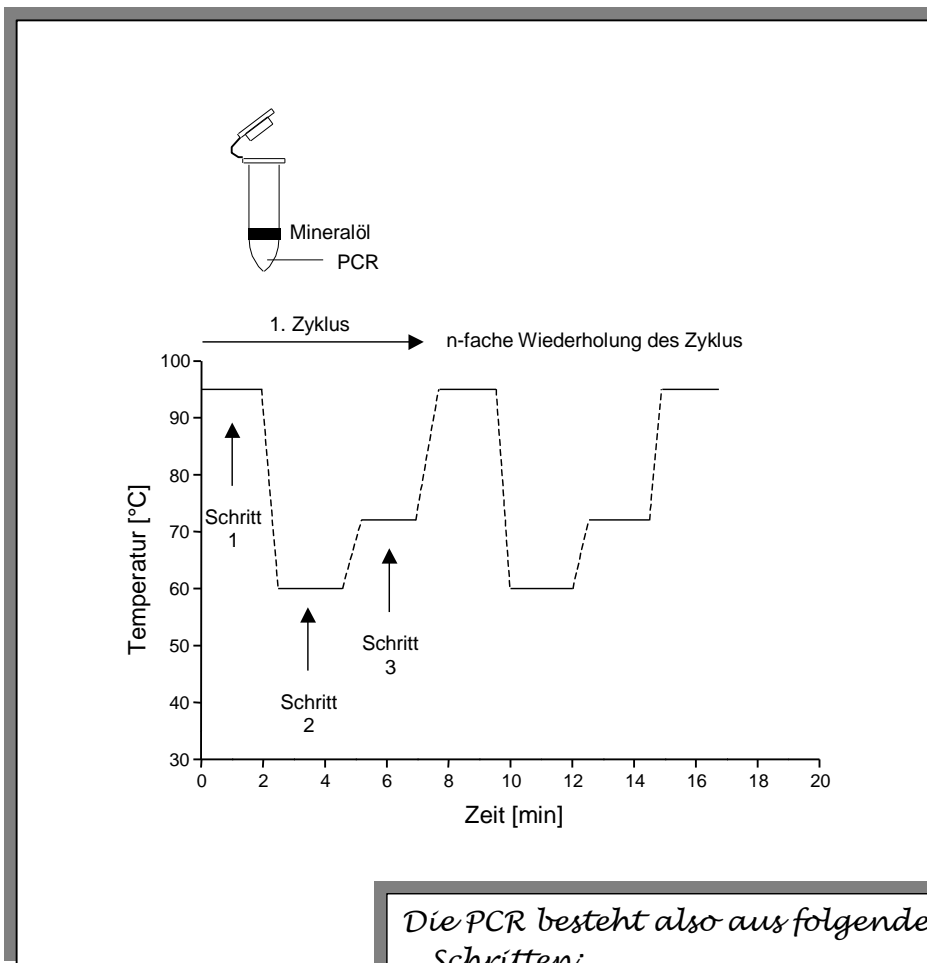


Abbildung 3: Temperaturverlauf einer PCR-Reaktion



Die PCR besteht also aus folgenden drei Schritten:

- 1. Denaturierung der dsDNA (95 °C)*
- 2. Annealing der Primer (55-65 °C)*
- 3. DNA-Synthese unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z. B. 72 °C)*

Die DNA, eine Doppelhelix, besteht aus zwei DNA-Strängen, die antiparallel verlaufen und durch komplementäre Basen miteinander verbunden sind. Über Wasserstoffbrücken bindet Adenin (A) mit Thymin (T) und Guanin (G) mit Cytosin (C). Jede Base ist mit einer Desoxyribose verbunden. Die 5'- und 3'-Kohlenstoffatome benachbarter Ribosen sind über Phosphatgruppen miteinander verknüpft. Hierdurch erhält die einzelsträngige (ss)-DNA ein 5'- und ein 3'-Ende.

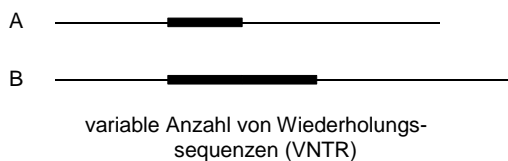
Um mittels PCR die DNA amplifizieren zu können, werden als Starthilfe Oligonukleotidprimer benötigt. Hierbei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (*template*) sind. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen verlängert eine DNA-Polymerase, in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), die Primer entlang der denaturierten und somit einzelsträngigen DNA-Matrize. Es werden neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist, synthetisiert. Am Ende der Reaktion liegen die DNA-Moleküle als Doppelstränge (ds-DNA) vor. Bei einer Wiederholung der Synthese müssen die Doppelstränge erneut durch Hitze aufgeschmolzen werden (*denaturing*), damit sich die Primer nach dem Abkühlen an die DNA-Einzelstränge anlagern (*annealing*) können. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer (*extension*). Die neusynthetisierten DNA-Stränge können nun ebenfalls als Matrize dienen. Die Ziel-Sequenz vermehrt sich exponentiell, wodurch nach 20 PCR-Zyklen eine Vermehrung um etwa das 220fache stattgefunden hat. In der Regel wird der Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und -verlängerung, 20- bis 40mal wiederholt.

4. Aufgabenstellung

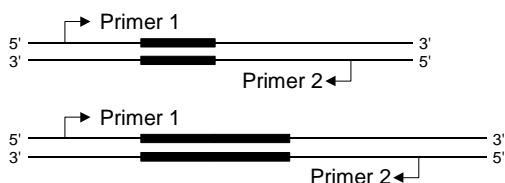
4.1. Zusammenfassung

Abbildung 4: VNTR-Analyse mittels PCR.

a) native DNA



b) Polymerase-Kettenreaktion



c) Gelelektrophorese



Isolierung der eigenen DNA aus Mundschleimhautzellen mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit und Bestimmung von zwei Loci (VNTR-Regionen) auf unterschiedlichen Chromosomen mittels PCR.

Die VNTR-Regionen werden mittels PCR-Primer amplifiziert, welche die polymorphe Region D3S1358 und D8S1179 flankieren. Die PCR-Produkte werden anschließend elektro-phoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Die entstandenen Bilder werden durch einen Vergleich der Bandenmuster ausgewertet.

4.2. Versuchsdurchführung

Tag 1:

Vorbesprechung zum Tagesablauf

Wichtig!

Zur Vermeidung von Kontamination durch „eigene“ DNasen (d.h. DNA-abbauende Enzyme) ist bei sämtlichen PCR-Arbeitsschritten das Tragen von Einmalhandschuhen erforderlich.

4.2.1. Isolierung der DNA aus Mundschleimhautzellen

a. Probengewinnung:

Zur Gewinnung von DNA aus Mundschleimhautzellen ist es wichtig, dass die Versuchsperson mindestens 1h vor Entnahme nichts gegessen oder getrunken hat, um eine Verunreinigung der Probe mit Speiseresten zu vermeiden.

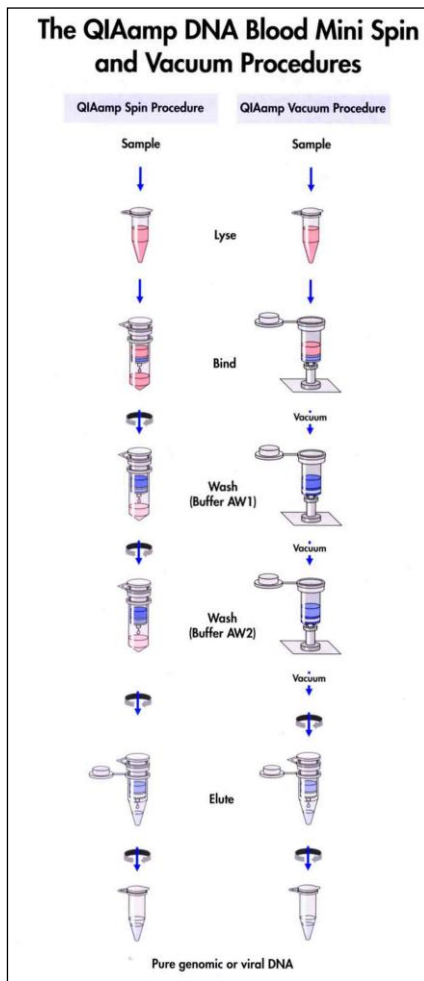
Gewinnung der Zellen:

- Ein steriles Q-tip aus dem Röhrchen nehmen (Handschuhe tragen) und damit 6x kräftig an der Innenseite der Backe entlang streichen.
- Q-tip 2h trocknen lassen.

b. Isolierung der DNA:

Die DNA aus den Blutzellen wird mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kit isoliert. Die allgemeine Vorgehensweise ist in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5: DNA-Isolierung aus Blut mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Vorgehensweise:

•	Thermomixer auf 70°C vorheizen.
•	Die Wattespitze des Q-tip mit dem anhaftenden Mundschleimhautzellen abschneiden und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß geben. Anschließend 400µl PBS zupipettieren.
•	Zuerst 25µl Protease, dann 400µl Puffer AL zugeben (die Protease muss zuerst zugegeben werden), sofort gründlich vortexen (10sec).
•	10 min bei 70°C inkubieren. Ebenfalls die benötigte Menge AE-Puffer vorwärmen.
•	Proben abkühlen lassen und dann 400µl Ethanol (absolut) zugeben.
•	700µl der Ethanol/Protease/DNA-Mischung in ein vorbereitetes Spin-Säulchen (spin-column) geben und 1min bei 8000 rpm zentrifugieren. Das Eluat verwerfen und die rest-lichen 500µl der Mischung wie oben durchzentrifugieren. Die DNA bleibt dabei an der Membran der spin-column hängen. Das Eluat erneut verwerfen.

•	500µl Puffer AW1 (Waschpuffer) zugeben und 1min wie oben zentrifugieren und das Eluat verwerfen.
•	500µl Puffer AW2 zugeben und jetzt 3min bei voller Drehzahl zentrifugieren.
•	Die Spin-column aus dem 2ml Auffanggefäß entnehmen und in ein 1.5ml Eppendorf einsetzen. 150µl Elutionspuffer AE (vorgeheizt auf 70°C) zugeben und 1min bei Raum-temperatur inkubieren. 1min bei 8000rpm zentrifugieren. Die DNA befindet sich jetzt im Eluat des Eppendorfgefäßes. Die Spin-column verwerfen.

Anmerkung:

Der DNA-Gehalt einer menschlichen somatischen Zelle in Ruhephase liegt bei etwa 7 pg pro Zelle (46 Chromosomen). Die Anzahl der kernhaltigen Zellen (Leukozyten) im Blut ist nicht konstant und liegt im Durchschnitt bei 6000/µl Blut. 1 ml Blut enthält somit ca. 6 Millionen Zellkerne, aus denen DNA isoliert werden kann. Die gesamte DNA entspricht einer Masse von 0,000042 g, also 42 µg DNA. Diese 42 µg DNA beinhalten jedes Gen 12 Mio. mal (6 Mio. väterlicher- und 6 Mio. mütterlicherseits).

4.2.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

•	Die DNA wird im Verhältnis 1:2 in einem Eppendorfgefäß mit Wasser verdünnt (das Endvolumen soll 70µl sein).
•	Die Extinktion (OD) wird im Spektralphotometer bei 260 nm und bei 280 nm gegen H ₂ O vermessen und die entsprechende DNA-Konzentration angezeigt (Für die Konzentrationsbestimmung gilt: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA).
•	Bestimmung der Reinheit: Das angezeigte Verhältnis von E_{260nm} / E_{280nm} (Ratio) soll zwischen 1,65 und 1,90 liegen. Ein niedrigeres Verhältnis weist auf eine Proteinkontamination hin, die zum Abbau der DNA führen kann.

4.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Jeder PCR-Ansatz für eine Probe besteht aus einem Gesamtvolumen von 50µl.

Um die Ungenauigkeit der einzelnen Pipettierschritte zu minimieren sollte ein Mastermix (MM) angesetzt werden. Dieses enthält alle Komponenten, welche die PCR-Reaktionen gemeinsam haben. In unserem Experiment unterscheiden sich die Reaktionsansätze nur durch die genomische DNA.

Der Mastermix für vier Proben am Loci D8S1179 bzw. D3S1358 sieht folgendermaßen aus:

Komponente	Volumen pro Einzelreaktion	Mastermix (x 4)
Primer 1 (10 pmol)	3,0 µl	12,0 µl
Primer 2 (10 pmol)	3,0 µl	12,0 µl
10 mM dNTP-Mix	2,0 µl	8,0 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl	20,0 µl
genomische DNA (100 ng)	10,0 µl	(wird einzeln zugegeben)
Taq-DNA-Polymerase (1U/µl)	2,5 µl	10,0µl
Aqua dest.	24,5 µl	98,0 µl
	50,0 µl	160,0 µl (= 40,0 µl pro Probe)

Jeweils 40,0µl Mastermix werden in jedes der PCR-Tubes pipettiert. Der Rest wird verworfen. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt!

Nun die entsprechende Template-DNA in das dazugehörige (beschriftete) Tube pipettieren. Die Deckel gut verschließen und eventuell vorhandene Luftblasen am Boden des Tubes durch anschnippen an die Oberfläche steigen lassen. Die Reaktionsansätze werden dann umgehend in den Thermocycler gestellt und das entsprechende Programm gestartet.

Die PCR-Bedingungen sind:

Für D8S1179 und D3S1358

Temp.	Zeit	Zyklus
95°C	3 min.	x 1
95°C	30 sec.	x 30
55°C	1 min.	

72°C	1 min.	
72°C	3 min.	x 1
4°C		

Tag 2:

Vorbesprechung zum Tagesablauf

4.2.4. Herstellung der Gele für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um eine Trennung der PCR-Produkte voneinander zu erreichen, werden die Proben über ein 12%iges natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt.

Zunächst wird der Gießstand vorbereitet. Hierzu werden die Glasplatten gründlich mit vergälltem Ethanol abgerieben und anschließend in die Apparatur eingespannt. An der Unterseite wird zusätzlich mit Parafilm abgedichtet.

Gelherstellung:

Folgende Komponenten in einem kleinen Becherglas mischen:

• Wasser (bidest.)	5,25 ml
• 10 x TBE	3,75 ml
• Acrylamide Rotiphorese Gel 30	6,00 ml
• TEMED	30,00 µl

Durch die Zugabe von

• APS (10%)	75,00 µl
-------------	----------

wird die Polymerisation gestartet. Deshalb sehr zügig weiterarbeiten!

Mittels einer Pasteurpipette wird die angesetzte Gellösung luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gefüllt und anschließend der Kamm eingesteckt. Bis zur vollständigen Polymerisation vergehen ca. 30 Minuten.

4.2.5. Vorbereitung von Gebrauchsmitteln

Herstellung von 10 x TBE-Puffer (500 ml):

•	Tris	0,89 M
•	Borsäure	0,89 M
•	EDTA	0,02 M

Der pH-Wert wird kontrolliert (eventuell einstellen) und sollte bei pH 8,3 liegen.

Für die Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird dieser Puffer als Laufpuffer verwendet und muss hierfür auf 1x TBE mit Aqua dest. verdünnt werden.

4.2.6. Nachweis der amplifizierten DNA mittels Acrylamid-Gelelektrophorese

a. Aufbau der Apparatur

Die Acrylamid-Gele in die Elektrophorese-Apparatur einspannen und das Pufferreservoir mit 1xTBE als Laufpuffer auffüllen. Den Kamm (falls dieser noch nicht entfernt wurde) vorsichtig aus dem Gel ziehen und die Taschen mittels einer Pipette gut ausspülen.

b. Beschicken des Polyacrylamidgels

Pro Probe werden in einem separatem Eppi 25 µl des PCR-Produktes mit 4 µl Gelladepuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert. In eine Tasche werden 8µl des 100bp DNA-Längenstandards geladen. Die Elektrophorese dauert bei 15 mA ca. 3,5 h.

c. Färben und Fotografieren

Das Gels wird nach vollendeter Elektrophorese mit dem Fluoreszenzfarbstoff GelRed gefärbt.

Hierfür wird die konzentrierte 10000x Stammlösung mit H₂O zu einer 3x konzentrierten Färbelösung verdünnt.

Das Gel wird in einer Schale unter Schütteln mit der gebrauchsfertigen Färbelösung ca.1h gefärbt. Die Aufnahme erfolgt unter UV-Licht.

4.3. Auswertung

Die Auswertung soll folgende Informationen enthalten:

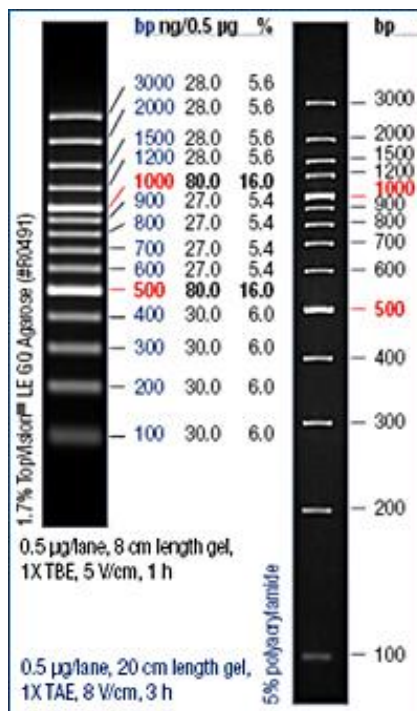
•	Kurze, stichpunktartige Wiedergabe der Vorgehensweise im Labor (sind Probleme aufgetreten? Kam es zu Abweichungen vom Versuchsprotokoll? Ziel des jeweiligen Arbeitsschrittes?...)
•	Darstellung (Abbildung der Gele) und Diskussion (Was ist zu sehen?) der Ergebnisse.

4.4 Anhang :

100 bp DNA Marker

Konz.: 0.1 µg/µl

Gelauftrag: 8µl



Isolierung und Aufreinigung von MBP

Einleitung:

Das Maltose-Bindeprotein MalE (MBP) ist Teil des Maltodextrin-Transportsystems in *E. coli*. Es wird allgemein als ein Träger-Protein für die Produktion von rekombinanten Fusionsproteinen verwendet. Die Maltodextrine diffundieren durch die LamB-Pore in der äußeren Membran in das Periplasma. Hier wird der Zucker an MalE gebunden und damit eine Rückdiffusion nach außen verhindert. MalE gibt den Zucker an einen Komplex aus MalF und MalG in der Cytoplasmamembran ab, wo der aktive Transport in das Cytoplasma unter Beteiligung der ATPase MalK stattfindet (Abbildung 1).

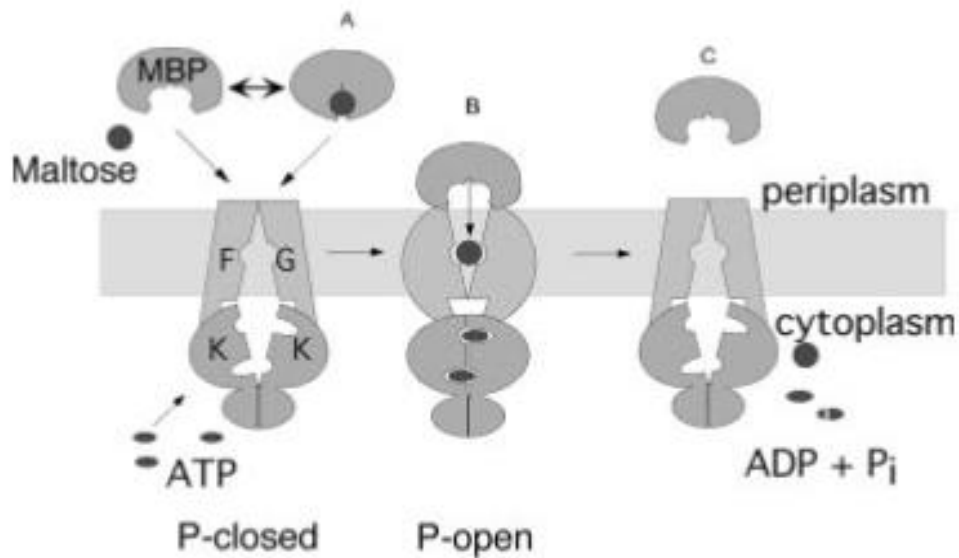


Abbildung 1: **Modell des Maltosetransports** (Chen *et al.*, 2003)

A) MBP bindet Maltose wodurch es zu einer Konformationsänderung von der offenen zur geschlossenen Form kommt. Dies führt zu der Bildung einer hochaffinen Substratbindestelle. Das MBP bindet an MalFGK2 und initiiert somit den Transport und die ATP-Hydrolyse.

B) In der Übergangsphase kommt es zur starken Bindung von MBP an MalFGK2. Dabei kommt es auch zur Öffnung und zur gegenseitigen Exponierung der Substratbindestellen von beiden Proteinen. Die Öffnung von MBP in der Übergangsphase führt zur Schwächung der Interaktion von MBP mit der Maltose, wodurch der Transfer an die schwächere Substratbindestelle im MalFGK2-Komplex ermöglicht wird.

C) Die Maltose wurde nun schon durch die Membran transportiert und MBP wird, nach der Reorientierung der MalFGK2-Substratbindestelle, in Richtung Cytoplasma wieder freigegeben.

Darüber hinaus interagiert substratbeladenes MBP nicht nur mit MalF und MalG sondern auch mit dem Chemotaxis-Sensor-Protein TAR und ermöglicht dem Bakterium so eine chemotaktische Antwort auf Maltose- und Maltodextrinkonzentrationsgradienten im Medium (Koiwai *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 1992).

Das MBP gehört zur Proteinfamilie die im periplasmatischen Raum von Gram-negativen Bakterien gefunden wird. Es ist das zweitgrößte Protein dieser Familie, hat eine relative Molekülmasse von 40,6 kDa und besteht aus 370 Aminosäuren (Duplay *et al.*, 1984). Die allgemeine Form von MBP ist durch eine tiefe Furche - welche das Protein in zwei globuläre Domänen unterteilt - gekennzeichnet, wie durch Röntgen-Kristallographie gezeigt wurde (Spurlino *et al.*, 1991). In jeder der beiden Domänen sind sekundäre Strukturelemente eingebaut, dazu gehören sowohl die Amino (N)-und Carboxy(C)-terminale Hälfte des Proteins (Abb. 2). Die Maltose-Bindungsstelle ist in der Furche zwischen den beiden Domänen. Die gebundene Maltose hingegen ist dann von den beiden Domänen bedeckt und fast vollständig unzugänglich für Lösungsmittel. Die Spalte ist zudem voll von polaren und aromatischen Gruppen. Diese Gruppen gehen mit dem Substrat umfangreiche Wasserstoffbrückenbindungen und Van der Waals-Wechselwirkungen ein (Spurlino *et al.*, 1991). Aus den kristallographischen Daten ist auch bekannt, dass das gebundene MBP eine wesentliche Konformationsänderung erfährt, bei welcher sich der Winkel zwischen den beiden Domänen um 35 Grad zwischen offen und geschlossen ändert (Sharff *et al.*, 1992).

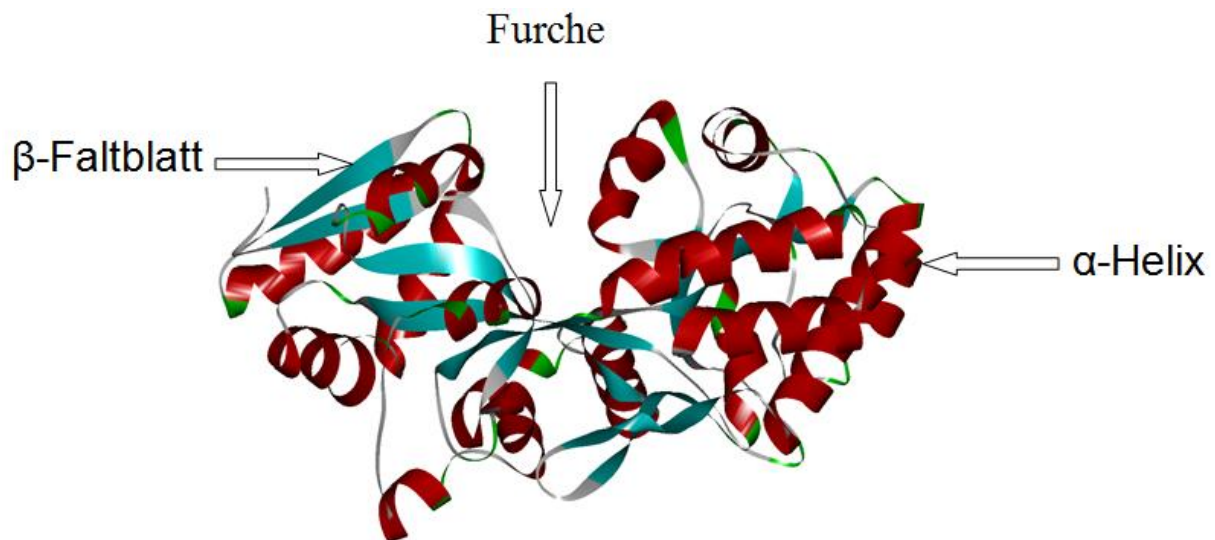


Abb. 2: Kristallstruktur von MBP; hier sind die α -Helices in rot und die β -Faltblätter in blau gefärbt. In der Mitte des MBP ist die Bindungsstelle für Maltose.

Durchführung

Vorbereitungen:

Benötigte Lösungen und Puffer:

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml):

2 g ad 20 ml H₂O_{dd}, steril filtrieren (0,2 μ m Filter); 1 ml Aliquots; Lagerung bei –20°C.

Agar-Platten:

12,5 g LB-Medium

7,5 g Agar-Agar

ad 500 ml H₂O_{dd}, autoklavieren, auf unter 40 °C abkühlen lassen, steril mit 500 μ l Ampicillin-Stammlösung versetzen und zum Erkalten in Petrischalen gießen; Lagerung bei 4 °C.

Nährmedien für die Übernacht- und Large-Scale-Kulturen:

0,625 g/12,5 g LB-Medium ad 25 ml/500 ml H₂O_{dd}, autoklavieren und nach dem Abkühlen steril mit 20 µl/500 µl Ampicillin-Stammlösung versetzen; (1µl Ampicillin/ml Medium) Lagerung bei 4 °C.

Amylosesäulenpuffer:Waschpuffer (1l):

20mM Tris-HCl

200 mM NaCl

1ml PMSF (0,31g PMSF aufgelöst in

2,36 ml Isopropanol)

pH 7.4 mit HCl auf pH 7.4 titrieren

bei 4°C

Elutionspuffer (1l):

20mM Tris-HCl

25 mM NaCl

1ml PMSF

10mM Maltose

pH 7.4 mit HCl auf pH7.4 titrieren

bei 4 °C

Regenerierungspuffer (1l)

0,1% SDS : 1g in 1l H₂O_{dd}

Alle Puffer sind steril filtriert (0,20 µm Filter) und werden bei 4°C (nur der Regenerierungspuffer wird bei Raumtemperatur) gelagert.

Alle Arbeitsschritte der Expression werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt !!

Mit Hilfe einer Impföse wird ein Verdünnungsausstrich der Glycerinkulturen auf den

vorbereiteten, Ampicillin-haltigen Agar-Platten vorbereitet. Die Platten werden kopf-über im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird eine einzelne gewachsene Zellkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und damit die Nährlösung der Übernachtskulturen angeimpft. Die Inkubation erfolgt im Luftschüttler bei 37 °C und 200 rpm ebenfalls über Nacht.

1. Tag: Large-Scale-Kulturen

Die Large-Scale-Kulturen werden mit je 12,5 ml der Übernachtskulturen angeimpft und wiederum bei 37 °C und 200 rpm im Luftschüttler inkubiert, bis die Zellsuspension eine OD₆₀₀ zwischen 0,4 – 0,5 erreicht hat (Blank: LB-Medium; Proben: 1:10-Verdünnung, d. h. 900 µl LB-Medium + 100 µl Zellkultur), und die Zellen werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 wachsen gelassen. Anschließend folgt die Induktion mit 1,0 mM IPTG (500 µl der 1M IPTG Stammlösung auf 500 ml Kulturmedium) und die Inkubation wird unter gleichbleibenden Bedingungen über Nacht fortgesetzt.

In den Wartezeiten werden 12 %ige SDS-Gele, die für die spätere Charakterisierung des Proteins benötigt werden, vorbereitet.

2. Tag: Abernten der Zellen und Zellyse

Das Wachstum der Large-Scale-Kulturen wird durch 15-minütige Inkubation auf Eis gestoppt und die OD₆₀₀ erneut kontrolliert. Die Trennung der Zellen vom Nährmedium erfolgt sukzessiv durch 20-minütige Zentrifugation bei 4420 x g (6000 rpm; 4 °C; J2-21 Beckman). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet zum Re-suspendieren in 25 ml Waschpuffer aufgenommen.

Die Zellen werden mittels Ultraschall im Eisbad aufgeschlossen (ein Ultraschall-Puls von 10 s und 20 s warten, das ganze 10 mal wiederholen). Um das Zelllysate (Inhalt des Cytosols) von den Zelltrümmern zu befreien, erfolgt eine 20- bis 30-minütige Zentrifugation bei 18900 x g (12500 rpm; 4 °C; J2-21 Beckman). Das klare Lysat wird in 20 ml Aliquots schockgefroren und bis zum nächsten Tag bei –80 °C gelagert.

3. Tag: Die Affinitätschromatographie

3.1 Prinzip

Eine Säulenchromatographie, dient der Isolierung und Anreicherung von Proteinen oder Nucleinsäuren aus komplexen Gemischen. Ihr Prinzip beruht auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei zueinander gehörigen Reaktionspartnern, wie sie gegeben sind für Protein und Ligand, Antikörper und Antigen, Enzym und Coenzym, Enzym und Substrat oder Nucleinsäure und dazu komplementäre Nucleinsäure. Die Säulenmatrix enthält einen kovalent gebundenen Liganden, an den der zu isolierende Stoff spezifisch bindet und von der er spezifisch eluiert werden kann.

3.2 Reinigung der Proteine mit Hilfe einer Amylosesäule

Das Zielprotein bindet über den MBP-Fusionsanteil an Amylose (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a.M.), welche kovalent an Partikel gekoppelt ist und wird nach dem Waschen der Säule mit gebundener Maltose eluiert.

Dazu wird 20 ml des Überstandes einer 500 ml Expressionskultur auf eine mit 50 ml durch Waschpuffer äquilibrierte 15 ml Amylose-Säule [XK16/20, AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg) geladen. Die Flussgeschwindigkeit wird über eine Pumpe (*Pharmacia Biotech Pump P-1*) eingestellt und die Absorption der Proteine wird bei 280 nm verfolgt. Die Säulenmatrix wird solange mit Waschpuffer gewaschen, bis keine Absorption der Moleküle mehr zu erkennen ist. Anschließend wird das MBP-Fusionsprotein mit Elutionspuffer eluiert und alle Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

3.3 Regeneration einer Amylosesäule

Die Amylosesäule wird mit 2 Säulenvolumen $H_2O_{dd.}$, 2 Volumen 0.1% SDS und wiederum 1 Volumen $H_2O_{dd.}$ und zu guter letzt mit 2 Volumen Waschpuffer regeneriert. Anschließend wird die Säulenmatrix zur Lagerung in 20% Ethanol (2 Volumen) überführt.

Die Proteinkonzentration des reinen MBP's wird durch einen BCA-Test bestimmt und die Reinheitsbestimmung erfolgt wie oben mittels SDS-PAGE. Das restliche Protein wird aliquotiert, schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

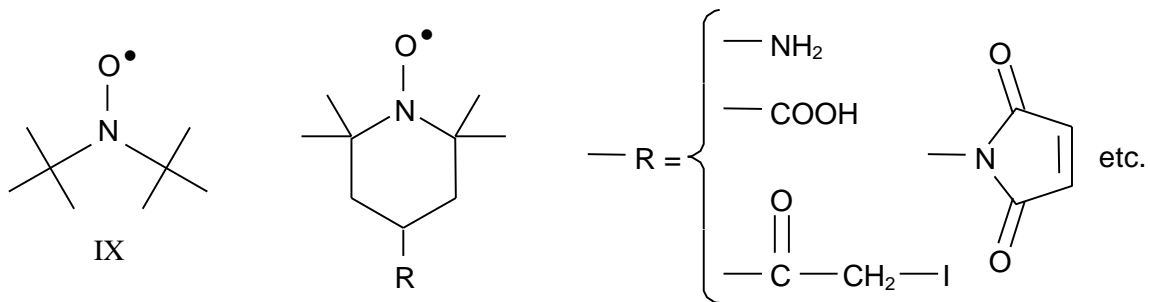
Literatur

1. VALERY NOVOKHATNY AND KENNETH INGHAM (1997) Thermodynamics of maltose binding protein unfolding. *Protein Science*, 6:141-146.
2. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/bza/kanal/transp/mbp/3mbpm>
3. Chen, J. Lu, G., Lin, J., Davidson, A. L., and Quiocho, F. A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell*, 12:651-661

ESR-Untersuchungen mit Spin-Label-Cofaktoren

Die Spin-Label-Technik und ihre Verwendung bei der Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Unter den von McConnell eingeführten Spin-Labels versteht man Substanzen mit einem stabilen ungepaarten Elektron, die sich von dem Di-*tert*-butylnitroxylradikal (IX) ableiten und die über eine reaktive Gruppe R kovalent an das zu untersuchende Molekül gebunden werden können¹⁾.



Nitroxylradikale zeigen durch Kopplung des ungepaarten Elektrons mit dem Stickstoffkern eine dreifache Aufspaltung ihrer Resonanzabsorption im äußeren Magnetfeld H_0 (Abb. 1). Abb. 1a-c zeigt Spektren von IX in molekular einheitlicher Orientierung in einem Fremdkristall, wobei H_0 jeweils parallel zu einer der Hauptachsen des Spin-Koordinatensystems steht. Abb. 1d zeigt das Spektrum derselben Verbindung frei beweglich in Lösung. Bei freier Beweglichkeit mitteln sich die jeweiligen Orientierungen des lokalen Magnetfelds zu H_0 aus, man erhält drei Linien mit einheitlicher Kopplungskonstante (A -Wert) und Verschiebung (g -Wert).

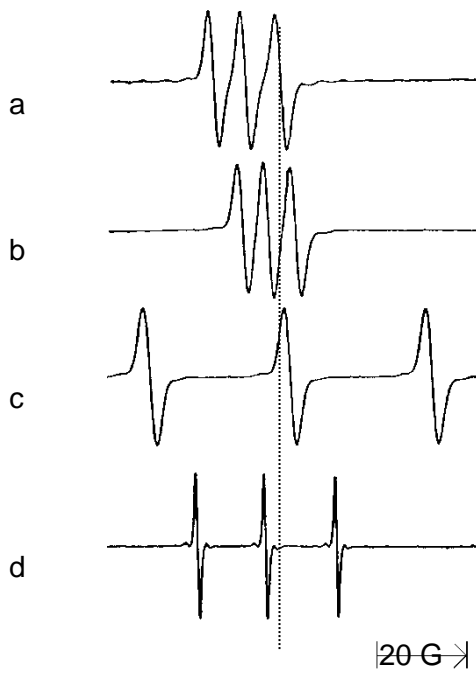


Abb. 1

Wird die Viskosität der Lösung erhöht oder der Label an ein Makromolekül gebunden, so sinkt die Rotationsrate, und die Spektren werden anisotrop, da sich die A - und g -Werte der Einzelspektren der verschiedenen orientierten Moleküle zeitlich nicht mehr mitteln, sondern sich die Amplituden der verschiedenen Signale aufsummieren. Dabei wird die Linienbreite der feldhöchsten Absorption am stärksten erhöht.

Abb. 2a-b zeigt Spektren eines Nitroxid-dotierten Wirtskristalls in zwei nur wenig verschiedenen Orientierungen, Abb. 2c zeigt die Summe der Spektren aus a und b.

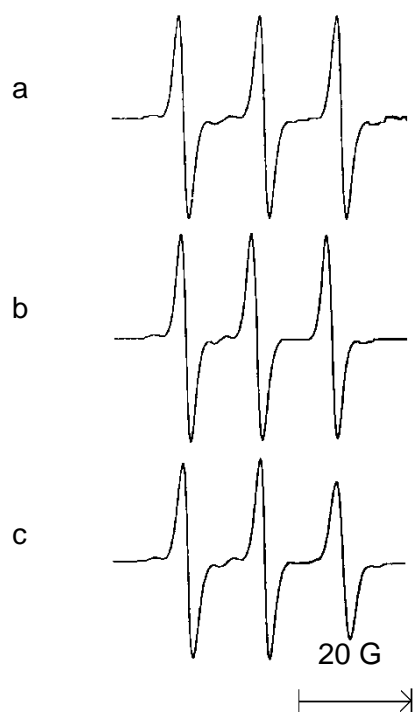


Abb. 2

In Abb. 3a-d sieht man vier Lösungsspektren bei abnehmender Temperatur (zunehmender Viskosität, zunehmender Immobilisierung). Das völlig immobilisierte Spektrum 3d kann dabei als Summe der Spektren aus Abb. 1a-c sowie aller dazwischenliegender Orientierungen angesehen werden.

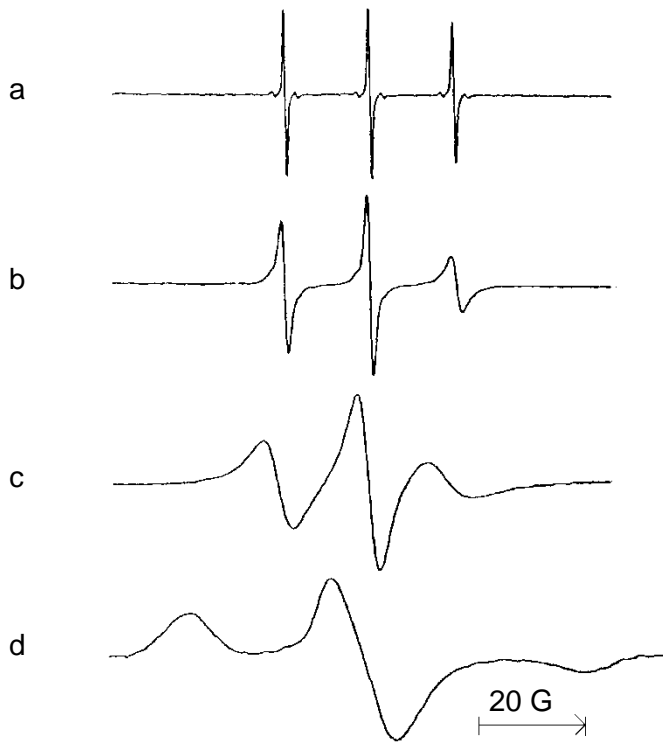


Abb. 3

Abb. 4 zeigt den Vergleich zwischen dem Spektrum von SL-ADP frei in Lösung (Spektrum a) und gebunden an Kreatinkinase (Spektrum b, 12,5fach verstärkt gegenüber a). Im Maximum der feldhöchsten Linie des freibeweglichen Labels zeigt das Signal bei Immobilisierung kaum Absorption (senkrechter Pfeil).

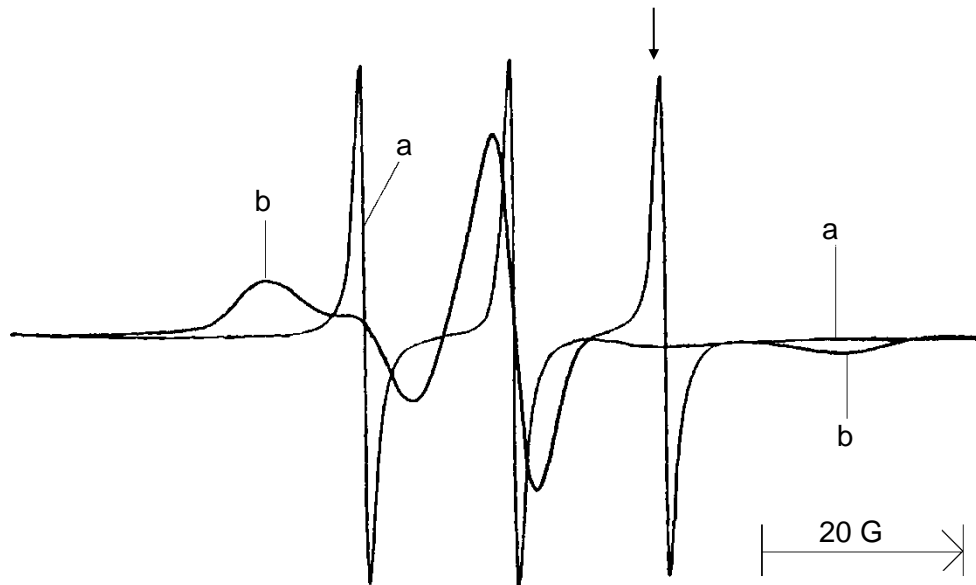


Abb. 4

Hieraus ergibt sich eine Reihe möglicher Anwendungen auf biochemische Fragestellungen. Bei der Durchführung von Spin-Label-Experimenten kann man prinzipiell zwei Wege beschreiten, je nachdem, ob man den Label an das Makromolekül oder an seine niedermolekularen Liganden bindet.

Bindung an das Makromolekül dient in erster Linie der Untersuchung durch Ligandenbindung induzierter Konformationsänderungen, da sich dabei der Immobilisierungsgrad des Labels und damit dessen ESR- Spektrum ändern kann.

Die Verknüpfung des Labels mit Liganden dient hauptsächlich Bindungsstudien dieser Substanzen an ihre Rezeptoren. Durch Komplexbildung des Spin-Label-Liganden mit dem jeweiligen Makromolekül wird das Radikal meist weitgehend immobilisiert. Die Rotationskorrelationszeiten liegen oft nur wenig unter denen des Biopolymeren selbst. Wie erwähnt, zeigt ein solches Spektrum praktisch keine Absorption im Bereich des Hochfeldpeaks des freien Labels. Die Intensitätsabnahme dieses Peaks ist ein direktes Maß für den gebundenen Anteil des Spin-Label-Liganden, bzw. die Restabsorption liefert die absoluten Konzentrationen des freien Liganden.

Literatur

1. J. C. P. Smith, in: Biological Application of Electron Spin Resonance (H. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg, eds.), 1. Auflage, S. 483 - 539, Wiley-Interscience, New York, 1972
2. L. J. Berliner, Spin Labeling, Theory and Application, Academic Press, New York, 1976

Aufgabe

Untersuchungen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie:

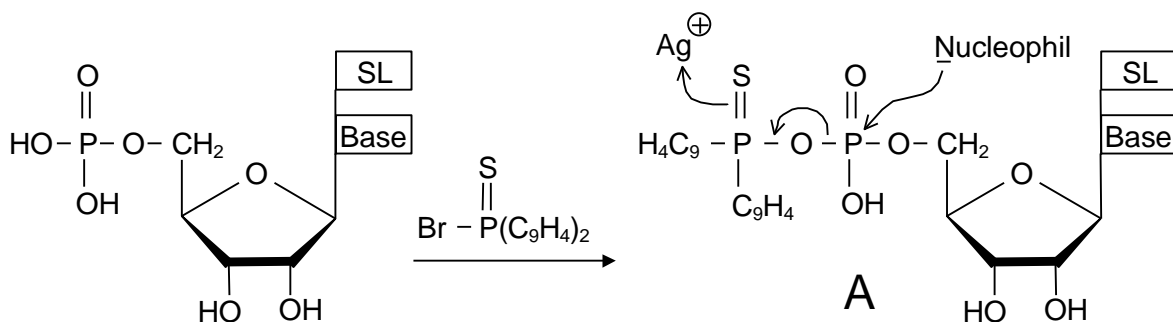
- a) Bestimmung des Molekulargewichts von SL-AMP
- b) Bestimmung der Dissoziationskonstanten des binären Komplexes aus Lactatdehydrogenase und SL-NAD⁺
- c) Bestimmung des Gehalts an enzymatisch inaktivem Isomeren mit α -glykosidischer Bindung im SL-NAD⁺

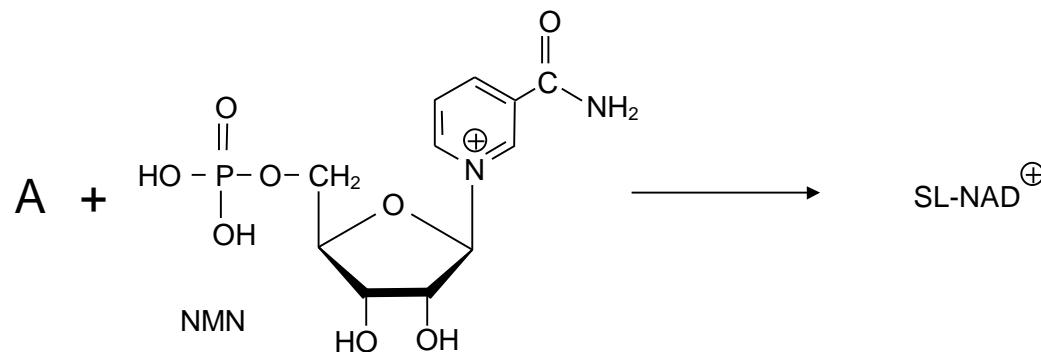
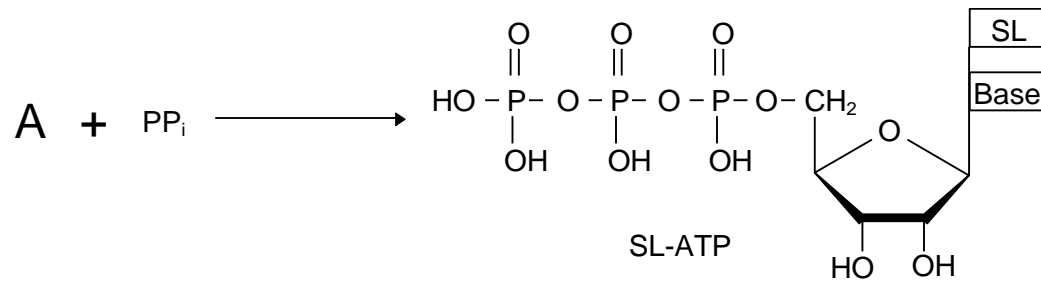
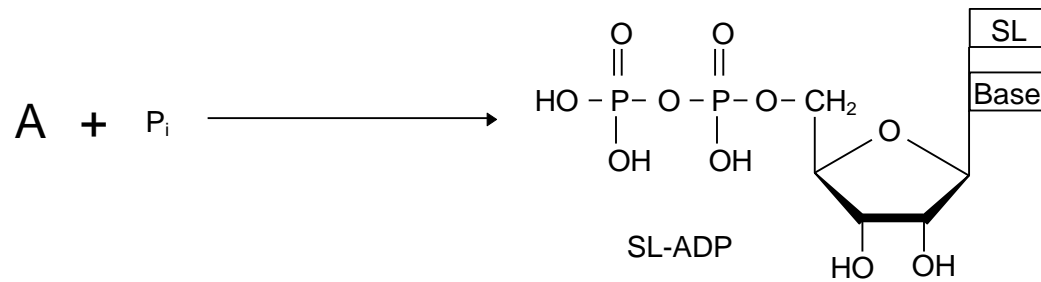
Durchführung

ESR-Untersuchungen mit Hilfe der Spin-Label-Technik

Vorbemerkungen

SL-AMP ist nicht nur ein mit einer „Reporter-Gruppe“, dem Spin-Label, versehenes Analogon des in biologischen Systemen überaus wichtigen AMP, sondern darüber hinaus auch eine wertvolle Zwischenstufe für die Synthese weiterer spin-markierter Coenzyme wie SL-ADP, SL-ATP und SL-NAD⁺. Alle diese Verbindungen lassen sich nach einem gemeinsamen Syntheschema gewinnen, das kurz dargestellt werden soll:





Vergleicht man die ESR-Spektren der einzelnen SL-Derivate und das des 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyls, so findet man eine mit dem Molekulargewicht zunehmende Verbreiterung der feldhöchsten Linien, in denen sich die mit steigender Molekulargröße erfolgende Hinderung der freien Beweglichkeit ausdrückt. Trägt man die Verhältnisse der Signalamplituden der Mittelfeldlinien zu denen der entsprechenden Hochfeldlinien gegen die Logarithmen der Molekulargewichte auf, so erhält man eine annähernd lineare Beziehung.

SL-NAD⁺ ist ein aktives Coenzym der Lactatdehydrogenase. Das Enzym erreicht mit diesem Coenzymanalogen 70 % der maximalen Umsatzzahl des natürlichen Systems. Die Michaelis-Konstanten von NAD⁺ und SL-NAD⁺ unterscheiden sich überhaupt nicht. Bindungskonstanten, die mit Hilfe von SL-NAD⁺ gemessen werden, können deshalb auf NAD⁺ übertragen werden. Da die Dissoziationskonstante aber relativ groß ist, ist selbst bei der maximal erreichbaren Enzymkonzentration immer nur ein relativ kleiner Anteil des gesamten SL-NAD⁺ an das Enzym gebunden. Um das Spektrum des vollständig immobilisierten SL-NAD⁺ aufnehmen zu können, kann zu einem Gemisch aus Lactatdehydrogenase und SL-NAD⁺ der substratanaloge Inhibitor Oxalat gegeben werden, in dessen Gegenwart sich ein äußerst stabiler ternärer Komplex ausbildet, in dem SL-NAD⁺ eine wesentlich kleinere apparente K_D besitzt. Ist das Enzym im Überschuss vorhanden, so wird praktisch das gesamte SL-NAD⁺ gebunden, und das für hohen Immobilisierungsgrad typische Spektrum kann gut beobachtet werden.

Allerdings ist das verwendete SL-NAD⁺ mit einigen Prozent des enzymatisch inaktiven Isomeren mit α -glykosidischer Bindung zwischen Nicotinamidring und Ribose verunreinigt. Dieser Anteil zeigt weiterhin das Spektrum von in Lösung frei beweglichem SL-NAD⁺. Aus diesem Restsignal lässt sich der Anteil an α -Isomerem berechnen.

Reagenzien

Phosphatpuffer, M/15, pH=7,2	100 ml
4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl, 10^{-4} M in Phosphatpuffer ^{a)}	0,2 ml
SL-AMP, 10^{-4} M in Phosphatpuffer ^{a)}	0,2 ml
Lactatdehydrogenase H ₄ , ca. 10 mg/ml in Phosphatpuffer ^{b)}	0,2 ml
SL-NAD ⁺ , 10^{-4} M in Phosphatpuffer ^{c)}	0,2 ml
Kaliumoxalat, 40 mg/ml in Phosphatpuffer	0,1 ml
Glycinpuffer, 0,1 M, pH=9,5, 0,5 M an Ethanol	5 ml
Alkoholdehydrogenase aus Hefe, Lyophilisat	0,5 mg

Arbeitsvorschrift

a) Bestimmung des Molekulargewichts von SL-AMP

Die ESR-Spektren der etwa 10^{-4} -molaren Lösungen von SL-AMP, SL-NAD⁺ und 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl werden aufgenommen, und aus den Verhältnissen der Signalamplituden und den als bekannt angenommenen Molekulargewichten von SL-NAD⁺ und des Aminopiperidins wird das Molekulargewicht von SL-AMP berechnet.

b) Bestimmung der Dissoziationskonstanten des binären Komplexes

SL-NAD⁺/Lactatdehydrogenase

Das ESR-Spektrum eines Gemisches gleicher Volumina der Enzymlösung und der 10^{-4} M SL-NAD⁺-Lösung wird verglichen mit dem Spektrum von SL-NAD⁺ gleicher Konzentration in Puffer. Aus der Abnahme der Signalamplitude des Hochfeldpeaks in Gegenwart des Enzyms wird der gebundene Anteil an SL-NAD⁺ und daraus, unter Annahme einer Bindungsstelle je Untereinheit des Enzyms, die Dissoziationskonstante berechnet. Molekulargewicht je Untereinheit: 36 000.

c) Bestimmung des Gehalts an enzymatisch inaktivem Isomeren mit α -glykosidischer Bindung im SL-NAD⁺

Zu dem unter b) hergestellten Gemisch aus SL-NAD⁺ und Lactatdehydrogenase in der ESR-Küvette wird 1 μ l der Oxalatlösung gegeben und wiederum das ESR-Spektrum aufgenommen. Aus der Größe des Restsignals des freien SL-NAD⁺ wird der enzymatisch inaktive Anteil an α -Isomeren berechnet. Unter Berücksichtigung dieser Verunreinigung wird die Dissoziationskonstante erneut berechnet.

Anmerkungen

- a) Die Konzentrationen werden UV-spektroskopisch bestimmt. Die molare Extinktion beträgt für das Aminopiperidin $\epsilon_{241} = 2000$ und für SL-AMP $\epsilon_{268} = 21\,500 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- b) $E_{0,1\%}$, die Extinktion einer 0,1%igen LDH-Lösung (1 mg/ml) beträgt 1,34 pro cm Schichtdicke.
- c) Die Konzentration wird enzymatisch mit Alkoholdehydrogenase und Ethanol bestimmt. Das Enzym katalysiert die Reduktion des aktiven SL-NAD⁺ zum entsprechenden NADH-Derivat, dessen Konzentration sich dann aus der molaren Extinktion von $\epsilon_{340} = 6300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ergibt. Die Testküvette enthält (1-x) ml 0,1 M Glycinpuffer, pH 9,5, 0,5 M an Ethanol, und x ml (meist 50 μ l) der SL-NAD⁺-Stammlösung. Die Reduktion wird durch Zugabe von 0,2 mg fester ADH aus Hefe gestartet.

Erzeugung eines 3-dimensionalen Computermodells für menschliches Renin mit Hilfe von Homology-Modeling

Einleitung

Das Protein

Renin ist eine saure oder Aspartat-Proteinase, so benannt, da am Katalyse-Mechanismus der Proteinspaltung durch Renin zwei Aspartat-Reste beteiligt sind. Es wird aus der Niere bei niedrigem Blutdruck ausgeschüttet und katalysiert die Spaltung des Proteins Angiotensinogen zum Peptid-Hormon Angiotensin I (10 Aminosäurereste), das nach weiterer enzymatischer Umsetzung zu Angiotensin II (8 Aminosäurereste) eine Erhöhung des Blutdrucks bewirkt. Aufgrund dieser Zusammenhänge sind Renin-Inhibitoren als Blutdruck-regulierende Arzneimittel potentiell interessant.

Molecular Modeling

Die Erzeugung von Computer-Modellen biologischer Makromoleküle (z. B. Proteine) wird sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Arzneimittel-Entwicklung (computer-aided drug design) benutzt, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu veranschaulichen. Da nur ein Bruchteil der Raumstrukturen der natürlich vorkommenden Proteine experimentell (z. B. durch Röntgenstruktur-Analyse) aufgeklärt ist, bemüht man sich um die theoretische oder semiempirische Vorhersage der Strukturen. Dabei ist man heute oft noch darauf angewiesen, zur Modellierung der 3D-Struktur eines bestimmten Proteins experimentell bestimmte Strukturen sequenzverwandter (homologer) Proteine heranzuziehen (homology modeling).

Aufgabe

Mit Hilfe des Computer-Programms Discovery Studio (Version 2.5 – Accelrys Inc.), im Folgenden als DS abgekürzt, soll für menschliches Renin, dessen Primärstruktur bekannt ist, ein dreidimensionales Modell erstellt werden, wobei die Röntgenstrukturdaten homologer Aspartat-Proteinasen zugrunde gelegt werden.

Obgleich im Allgemeinen nicht ganz korrekt, werden hier der Einfachheit halber die Begriffe „Verwandtschaft“, „Ähnlichkeit“ und „Homologie“ gleichbedeutend verwendet.)

Aus Platzgründen können hier nicht alle Einzelaktionen am Computer beschrieben werden. Die Einarbeitung in die Bedienung der Software erfolgt mit Hilfe des Assistenten.

In einem Protokoll werden Beobachtungen und Ergebnisse festgehalten.

Versuchsverlauf

1. In einer Datenbank wird nach Strukturen dem Renin verwandter Proteine gesucht. Die gefundenen Proteinstrukturen werden in den Programmspeicher geladen und auf ihre Verwendbarkeit als Vorlagenproteine (template proteins) in Augenschein genommen.
2. Die Vorlagenproteine werden sequenzmäßig aneinander ausgerichtet (alignment) und räumlich überlagert.
3. Die Sequenz des Renins wird dazu in Beziehung (alignment) gebracht.
4. Mit dem integrierten Programm MODELER wird ein Modell des Renins erzeugt, d. h. den Atomen des Renins werden Raumkoordinaten zugewiesen.
5. Das Reninmodell wird inspiziert und durch Kraftfeldrechnungen verfeinert.

Datenbank-Suche nach homologen Proteinen

Für die Suche nach homologen Strukturen steht in der Datei „renin.fasta“ die Sequenz des Renins zur Verfügung. Sie wird in den Programmspeicher geladen. Innerhalb von DS wird das Suchprogramm BLAST aufgerufen (Protocols > Sequence Analysis > BLAST Search (DS Server)). Mit dessen Hilfe wird in einer Strukturdatenbank (PDB_nr95) nach Proteinstrukturen mit Sequenz-Ähnlichkeit (Homologie) zu Renin gesucht. Die Raumstrukturdaten sind in der „Protein Data Bank“ (PDB) niedergelegt und meist durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt worden.

Es ist wünschenswert, mehrere homologe Strukturen (Vergleichs- oder Vorlagenproteine, engl. templates) zu selektieren, wenn sie vergleichbar gute Ähnlichkeit zum Renin, aber untereinander größere Sequenzunterschiede aufweisen. Gewöhnlich besitzen sie nämlich im Inneren des Moleküls relativ große Übereinstimmung, weisen aber beträchtliche Unterschiede in der Ausdehnung und Konformation peripherer Polypeptidschleifen auf. So

mag Renin im einen Schleifenbereich gut mit dem einen Vorlagenprotein korrespondieren, im anderen mit einem anderen. Die Verwendung mehrerer Templates ermöglicht es, zum Modellieren in einem Bereich dieses Vorlagenprotein zu verwenden, in einem anderen jenes.

Die Raumstrukturen können unter <http://www.rcsb.org/pdb/> gefunden und geladen werden. Sie werden mit Hilfe von DS und eines Texteditors in Augenschein genommen und auf Besonderheiten hin (z. B. fehlende Koordinaten, enthaltene Liganden- und Solvensmoleküle, kovalente Modifizierung, Zahl der Protein-Ketten und Nummerierung ihrer Aminosäure-Reste, Propeptid-Anteile, Disulfid-Brücken, Kristall-Fehlordnung, *cis*-Peptidbindungen usw.) inspiziert. Geben Sie im Protokoll diese Besonderheiten an! Von den Strukturdaten wird das Wesentliche (in der Regel die reine Polypeptid-Kette) für das Modeling-Projekt gespeichert. Zur späteren Verwendung werden auch Sekundärstruktur-Informationen mit abgespeichert.

Alignment der Vorlagenproteine mit der Renin-Sequenz

Um festzustellen, welche Aminosäurereste der Vergleichsproteine konserviert sind, werden die Sequenzen aufgrund ihrer Homologie aneinander ausgerichtet (Alignment), so dass möglichst viele ähnliche Aminosäure-Reste in der *Sequenztafel* spaltenweise untereinander zu liegen kommen. Das Programm führt zu diesem Zweck auch Lücken in der Tabelle ein (evolutionär wohl durch Insertionen und Deletionen entstanden) und überlagert die konservierten Bereiche automatisch auch in der Raumstruktur (nicht nur in der Sequenztafel).

Dabei wird zuerst die *Sequenz-Homologie* (Protocols > Sequence Analysis > Align Multiple Sequences) und dann, ausgehend von diesem Alignment, die *Ähnlichkeit der Raumstrukturen (Struktur-Homologie)* (Protocols > Protein Modeling > Align Structures (MODELER)) zugrunde gelegt. Beide Alignments werden miteinander verglichen. Außerdem wird überprüft, ob Aminosäurereste ähnlicher Hydrophobizität im Alignment untereinanderliegen und ob entsprechende Sekundärstruktur-Elemente in der Tabelle miteinander korrespondieren. Wichtig ist auch die Erhaltung konservierter Disulfid-Brücken.

Aus grundsätzlichen Erwägungen und weil im Bereich des N-Terminus signifikante Unterschiede (woher stammen diese?) in den Alignments zu erkennen sind, wird mit dem Struktur-Alignment weitergearbeitet. Die Sequenz des Renins wird an dem vorhandenen Struktur-Alignment ausgerichtet. Dabei wird vom Programm ein „Sequenz-Profil“ des

Struktur-Alignments erstellt, bei dem die konkreten Aminosäuren durch die Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens an den einzelnen Positionen ersetzt werden; an diesem Sequenz-Profil wird dann das Renin (aus technischen Gründen eigentlich: das Sequenz-Profil des Renins) so ausgerichtet, dass die Modellsequenzen nicht mehr relativ zueinander verschoben werden (`Protocols > Protein Modeling > Align Sequence to Templates`).

Das Alignment wird noch von Hand korrigiert, um die Anzahl der Lücken (Insertionen und Deletionen) zwischen Renin und den ausgewählten Struktur-Vorlagen zu verringern, wobei auch darauf geachtet wird, dass die Disulfid-Brücken bildenden Cysteinreste an äquivalenten Positionen bleiben.

Erzeugung des Homologie-Modells des Renins

Ausgehend vom korrigierten Alignment, wird ein Homologie-Modell mit dem Programm MODELER erstellt, das als Unterprogramm in DS integriert ist (`Protocols > Protein Modeling > Build Homology Models`). Mutmaßliche Disulfid-Brücken und cis-Proline werden dabei von uns als Parameter angegeben.

Die Modellgenerierung in MODELER erfolgt automatisch.

Für Bereiche, wo das Alignment lückenlos ist, gilt:

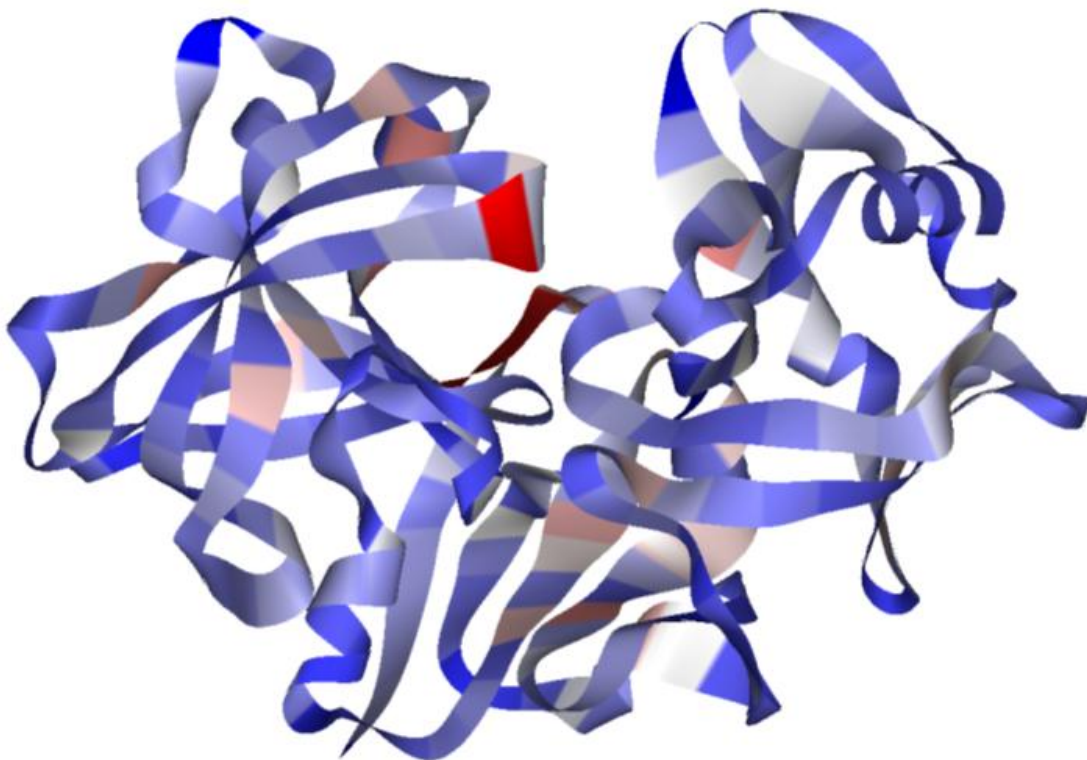
Für die Startkonformation des iterativen Verfahrens werden die Positionen der Atome der Vorlagenproteine verwendet, soweit äquivalente Atome an derselben Position des Alignments im Modell (hier: Renin) ebenfalls vorkommen. Dabei werden bei unterschiedlichen Seitenketten die Koordinaten nur soweit anwendbar übernommen und ansonsten aus einer Seitenketten-Bibliothek ergänzt.

Für die Zielkonformation werden strukturelle Einschränkungen definiert., die Bindungslängen, C_{α} - C_{α} -Abstände, Bindungswinkel, Diederwinkel, Bindungsgeometrien (tetraedrisch, planar) betreffen, die aus allgemeinen Strukturdatenbanken stammen. Zusätzlich einschränkend können Abstände nicht direkt verbundener Atome, z. B. zwischen Seitenketten verwendet werden, soweit sie aus den Templates entnommen werden können. Diese Einschränkungen fließen in Form von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (probability density functions, PDFs) in die Rechnungen ein.

Nachdem noch eine Zufallskomponente eingebaut wird (Verschiebung aller Atompositionen um zufällige Werte bis zu 4 Å) werden dann iterativ diese PDFs bzw. ihre

Logarithmen mit dem Verfahren der konjugierten Gradienten (conjugate gradients) optimiert. Durch Wiederholung dieser „Aufmischung“ und Iteration erhält man unterschiedliche Modelle.

Bereiche mit Lücken werden (einschließlich von je 2 Resten vor und nach der Lücke) als sogenannte Loops definiert und gesondert behandelt. Für diese Bereiche können keine Daten aus den Templates bezogen werden. Die Loop-Strukturen sind daher mit größeren Unsicherheiten behaftet.



In der Abbildung eines Modells des Renins ist das Rückgrat durch ein Band unterschiedlicher Breite und wechselnder Färbung dargestellt. Rote Farbtöne bedeuten Versetzungen der Einschränkungsbedingungen. Breite Stellen bedeuten Unsicherheiten in der Modellstruktur.

Verfeinerung des Modells

Zur Verbesserung des Modells steht die Funktion `Protocols > Protein Modeling > Loop Refinement (MODELER)` zur Verfügung. Dadurch können weitere Loop-Konformationen erzeugt und diejenigen mit der niedrigsten PDF-Energie (d. h. diejenigen, die die Einschränkungsbedingungen am wenigsten verletzen) ausgewählt werden.

Alternativ können Proteinbereiche (wie die Loops) im CHARMM-Kraftfeld optimiert werden. Einfache Minimierung der potentiellen Energie sind dabei wenig wirksam, da zwischen den möglichen Konformationen Energiebarrieren überschritten werden müssen. Man verwendet daher am besten die Methode des Simulated Annealing, bei der eine molekulardynamische Simulation durchgeführt wird, wobei zunächst Energie zugeführt („Aufheizen“) und dann wieder entzogen wird „Abkühlen“.

Validierung

Zur Validierung des Proteins kann die Funktion `Tools > Validate Protein Structure > Check Structure` aufgerufen werden.