

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Applichem, Darmstadt
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Sigma, Steinheim
6-Carboxyfluoreszein-dArUdAdA- 6-Carboxytetramethylrhodamin (AUAA)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA
Coomassie Brilliant Blau G250, R250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
Epoxysuccinyl-Leucin-4-guanidinobutylamid (E-64)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Applichem, Darmstadt
Glycin	Applichem, Darmstadt
Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl, ultra pure)	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
4-Methylumbelliferon (MU)	Sigma, Steinheim
4-Methylumbelliferon-N-Acetyl- $\beta$ -D- Glucosaminid (MU-NAG)	Sigma, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Taufkirchen
Ribonukleinsäure (Gesamt-RNA aus Hefe)	Sigma, Steinheim
Saccharose	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton <sup>®</sup> X-100)	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
Benzyloxycarbonyl-Phenylalanyl-Arginin- 7-Amino-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC)	Sigma, Steinheim

Alle weiteren Chemikalien waren von höchster Reinheit. Es wurde ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet.

### 3.1.2 Proteine

DNase I (Rinderpankreas)	Applichem, Darmstadt
Lysozym (Hühnereiweiß)	Serva, Heidelberg
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Restriktionsendonukleasen ( <i>DpnI</i> , <i>HindIII</i> , <i>NotI</i> , <i>NdeI</i> )	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
RNase A	Sigma, Steinheim
Shrimp Alkalische Phosphatase	Amersham Biosciences, Freiburg
T4 DNA Ligase	Invitogen, Karlsruhe
Trypsin	Sigma, Steinheim

#### Markerproteine

LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	97,0 kDa
BSA	66,0 kDa
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45,0 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	30,0 kDa
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20,1 kDa
$\alpha$ -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,4 kDa

#### Antikörper

Anti-RNase A-Antikörper aus Kaninchen	Dr. H. Younus, Aligarh Muslim Universität, Indien
Anti-Kathepsin B-Antikörper aus Kaninchen	Biomol, Hamburg
Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper aus Maus	Sigma, Steinheim
Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege	Dianova, Hamburg

### 3.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 1, 3.2.2; Tabelle 4, 3.2.3) wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Metabion (Planegg-Martinsried) hergestellt. Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit IRD 800 modifiziert.

### 3.1.4 Plasmide

Das Plasmid pET22b(+) (Amp<sup>r</sup>; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach), welches das *ri*-Gen enthält, wurde freundlicherweise von Ronald T. Raines (WI, USA) zur Verfügung gestellt (Johnson et al., 2007). Das Plasmid pET26b(+) (Kan<sup>r</sup>; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach), welches das Gen für RNase A enthält, wurde freundlicherweise von Dr. Jens Köditz bereitgestellt.

### 3.1.5 *E. coli*-Stämme

<u>XL1-Blue</u> :	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sup>+</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] Stratagene, Heidelberg
<u>BL21 (DE3)</u> :	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal (DE3)</i> Stratagene, Heidelberg

### 3.1.6 Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen

<u>LB-Medium</u> ( <i>Lysogenic Broth</i> ):	10 g l <sup>-1</sup> NaCl 10 g l <sup>-1</sup> Trypton 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt
<u>LB-Agar</u> :	LB-Medium + 20 g l <sup>-1</sup> Agar-Agar
<u>TB-Medium</u> ( <i>Terrific Broth</i> ):	12 g l <sup>-1</sup> Trypton 24 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt 4% (v/v) Glycerin 2,13 g l <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 12,54 g l <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (separat autoklaviert)
<u>SOC-Medium</u> : ( <i>Super Optimal Catabolite Repression Broth</i> )	0,5 g l <sup>-1</sup> NaCl 20 g l <sup>-1</sup> Trypton 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt 10 ml l <sup>-1</sup> 1 M MgSO <sub>4</sub> (separat autoklaviert) 10 ml l <sup>-1</sup> 1 M MgCl <sub>2</sub> (separat autoklaviert) 20 ml l <sup>-1</sup> 20% (w/v) Glucose (separat autoklaviert)

Nach der Herstellung wurden die Medien bzw. der Agar autoklaviert und kurz vor der Benutzung mit Kanamycin (50 µg ml<sup>-1</sup> Endkonzentration) oder mit Ampicilin (200 µg ml<sup>-1</sup> Endkonzentration) versetzt.

### 3.1.7 Materialien für die Zellkultur

#### Verwendete Zelllinie

K562

Beschreibung:	humane Leukämiezellen (chronische myeloische Leukämie)
ATCC-Nr.:	CCL-243
Kultiviert in:	RPMI 1640 ( <i>dutch modification</i> ) 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 1% (v/v) GlutaMAX I 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin

#### Geräte

accu-jet® Pipettierhelfer	Brand GmbH, Wertheim
Behälter mit flüssigem Stickstoff (Typ GT35)	AIR LIQUIDE, Frankreich
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Sicherheitswerkbank HERAsafe (Klasse 2 TypH)	Heraeus, Hanau
Varioklav Dampfsterilisator Typ 250T	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Wasserbad Typ 1092	GFLmbH, Burgwedel

#### Zellkulturmaterial

Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Gestopfte Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Ilona Schubert Laborbedarf, Leipzig
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	TPP, Schweiz
Zellkulturtestplatten (96-well)	TPP, Schweiz
Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium ohne Glutamin ( <i>dutch modification</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Dulbecco's)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (10000 U ml <sup>-1</sup> / 10000 µg ml <sup>-1</sup> )	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX I-Supplement, 200 mM (gelöst in 0,85% NaCl)	Invitrogen, Karlsruhe
[Methyl- <sup>3</sup> H]-Thymidin (6,7 Ci mmol <sup>-1</sup> )	DuPont, Johnston, IA, USA

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Klonierung und Sequenzierung

#### 3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus dem *E. coli* Stamm XL1-Blue mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der reinen Plasmid-DNA betrug ca. 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

#### 3.2.1.2 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (*1 kb-DNA Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel (3.2.1.3). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm ( $A_{260} = 1$  entspricht ca. 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  doppelsträngiger DNA) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt.

#### 3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1%igen (w/v) Agarosegelen bei 80 V in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) horizontal in einer *EASY-CAST<sup>TM</sup>*-Gelelektrophoreseapparatur (OWL Separation Systems, Portsmouth, NH, USA). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) inkubiert. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden ließen sich im Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) identifizieren.

#### 3.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem *QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

#### 3.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden zur Spaltung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten nach einer Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Diese schneiden an spezifischen, meist 4 – 8 Basenpaaren langen Erkennungssequenzen. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Restriktionspuffern. Die Spaltung von DNA diente sowohl analytischen als auch präparativen Zwecken.

Üblicherweise wurden folgende Ansätze für eine Doppelrestriktionsspaltung pipettiert:

Für analytische Zwecke:

- 6 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl DNA aus Plasmidisolierung bzw. PCR (ca. 100 ng µl<sup>-1</sup>)
- 1 µl 10×Restriktionspuffer
- je 1 µl Restriktionsendonuklease (10 U µl<sup>-1</sup>)
- Inkubation bei 37°C für 3 h

Für präparative Zwecke:

- 50 µl DNA aus Plasmidisolierung bzw. PCR (ca. 100 ng µl<sup>-1</sup>)
- 6 µl 10×Restriktionspuffer
- je 3 µl Restriktionsendonuklease (10 U µl<sup>-1</sup>)
- Inkubation bei 37°C für 12 h

Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 20-minütige Inkubation bei 65°C. Die Spaltprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) aufgetrennt, analysiert und bei präparativen Ansätzen aus dem Gel extrahiert (3.2.1.4).

### 3.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten in das pET26b(+)-Plasmid

Nach Verdau des pET26b(+)-Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Nde*I erfolgte die Dephosphorylierung des 5'-Endes der Plasmid-DNA unter Nutzung der Alkalischen Phosphatase aus Shrimp (1 U) bei 37°C für 1 h. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Das linearisierte, dephosphorylierte Plasmid konnte nun für die Ligation eingesetzt werden. Die Ligation der verschiedenen DNA-Fragmente (3.2.2) in das pET26b(+)-Plasmid erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke für 4 h bei 16°C in Gegenwart von T4-Ligase (1 U). Fragment und Plasmid wurden in einem Stoffmengenverhältnis von ca. 3:1 eingesetzt. Anschließend wurden 5 µl Ligationsansatz in einer Suspension chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue aufgenommen und mittels Hitzeschock (3.2.4.2.2) transformiert.

### 3.2.1.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der verwendeten Plasmide erfolgte mit dem *CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit* (Fermentas GmbH, Leon-Rot) nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung eines LiCor 4000 DNA-Sequenziergeräts (MWG Biotech, Ebersberg) und der *BaseImagIR-Software* (Version 4, 1997) zur Auswertung. Für die Sequenzierung wurden die unten aufgeführten Oligonukleotide (IRD 800 markiert) und 200 fmol Plasmid-DNA eingesetzt.

T7 Promotor-Primer:	5´-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3´
T7 Terminator-Primer:	5´-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3´

### 3.2.2 PCR-Reaktionen zur Genverdopplung

Die Herstellung der RNase A-Tandemenzym-Varianten SGRSGRSG, SGSGSG und GP<sub>6</sub>G (4.1.2) erfolgte mit Hilfe dreier aufeinanderfolgender PCR-Reaktionen (4.1.3; Abb. 9). Die Sequenzen der verwendeten Mutageneseprimer sind in Tabelle 1 dargestellt.

Reaktionsansatz 1:  
(PCR-Produkt 1a)

10×Puffer (5 µl)  
50 ng DNA (pET26b(+)) mit *rnase A* Gen)  
10 pmol T7-Promotor-Primer  
10 pmol *rev*-Linker-Primer  
dNTP-Mix (1 µl; 10 mM)  
*Pfu*-Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl<sup>-1</sup>)  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Reaktionsansatz 2:  
(PCR-Produkt 1b)

10×Puffer (5 µl)  
50 ng DNA (pET26b(+)) mit *rnase A* Gen)  
10 pmol T7 Terminator-Primer  
10 pmol *fw*-Linker-Primer  
dNTP-Mix (1 µl; 10 mM)  
*Pfu*-Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl<sup>-1</sup>)  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR-Reaktionen wurde mit dem in Tabelle 2 angegebenen Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

**Tabelle 1: Oligonukleotide zur Erzeugung der *rnase A*-Gene mit den entsprechenden 5'- bzw. 3'-Linkersequenzen.**

Die gekennzeichneten und nummerierten Abschnitte der Oligonukleotide entsprechen den korrespondierenden Genabschnitten innerhalb des *rnase A*-Gens.

Linker	Oligonukleotide
GP <sub>6</sub> G	<i>fw</i> 5'-GGT CCT CCA CCG CCT CCA CCA GGT <sup>1</sup> <u>AAG-GAA ACT GCA GCA GCC</u> <sup>18-3'</sup> <i>rev</i> 5'-ACC TGG TGG AGG CGG TGG AGG ACC <sup>372</sup> <u>CAC TGA AGC ATC AAA GTG</u> <sup>355-3'</sup>
SGRSGRSG	<i>fw</i> 5'-CT TCA GTG TCT GGT CGT AGC GGC CGC TCT GGT <sup>1</sup> <u>AAG GAA AC</u> <sup>8-3'</sup> <i>rev</i> 5'-GT TTC CTT ACC AGA GCG GCC GCT ACG ACC AGA <sup>372</sup> <u>CAC TGA AG</u> <sup>365-3'</sup>
SGSGSG	<i>fw</i> 5'-TCT GGT TCT GGT TCT GGT <sup>1</sup> <u>AAG GAA ACT GCA GCA GCC</u> <sup>18-3'</sup> <i>rev</i> 5'-ACC AGA ACC AGA ACC AGA <sup>372</sup> <u>CAC TGA AGC ATC AAA GTG G</u> <sup>354-3'</sup>
T7prom	<i>fw</i> 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'
T7term	<i>rev</i> 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3'

**Tabelle 2: Thermocyclerprogramm der ersten beiden PCR-Reaktionen**

Programmschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1:00 min
2	30	95°C	0:30 min
		45°C	1:00 min
		68°C	1:30 min

Anschließend wurden die PCR-Produkte 1a und 1b durch ein präparatives Agarosegel (3.2.1.3) und nachfolgender Gelextraktion (3.2.1.4) mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* gereinigt. Die erhaltenen Produkte dienen in einer weiteren PCR-Reaktion als DNA-Ausgangsmaterial (*template*).

Reaktionsansatz 3:  
 (PCR-Produkt 2)      10×Puffer (5 µl)  
                           Produkt 1a (1 µl)  
                           Produkt 1b (1 µl)  
                           10 pmol T7 Promotor-Primer  
                           10 pmol T7 Terminator-Primer  
                           dNTP-Mix (1 µl, 10 mM)  
                           *Pfu*-Turbo-Polymerase (1 µl; 2,5 U µl<sup>-1</sup>)  
                           ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde mit dem in Tabelle 3 angegebenen Programm im Thermocycler durchgeführt.

**Tabelle 3: Thermocyclerprogramm der 3. PCR-Reaktion**

Programmschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	0:30 min
2	30	95°C	0:30 min
		55°C	0:30 min
		68°C	2:30 min

Das im 3. Schritt erhaltene PCR-Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese (3.2.1.3) und Gelextraktion (3.2.1.4) gereinigt. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Nde*I (3.2.1.5) und die Ligation in den pET26b(+)-Vektor (3.2.1.6).



### 3.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Mutageneseprimer sind unter Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Oligonukleotide zur schrittweisen Modifizierung der Linkersequenzen der *rnase A-tandemzym*-Gene.**

Ausgehend von den Genen der GP<sub>6</sub>G-, SGRSGRSG-, und SGSGSG-RNase A-Tandemzym-Varianten wurden die Linkersequenzen schrittweise modifiziert. Das amplifizierte Produkt aus der entsprechenden Modifizierungsreaktion (z.B. GP<sub>5</sub>G) diente in der nachfolgenden *QuikChange*-Reaktion als genetisches Ausgangsmaterial (*template*) zur Herstellung der in der Linkerregion um eine Aminosäure verkürzten Variante (z.B. GP<sub>4</sub>G). Die Oligonukleotide für G88R wurden zur Herstellung der RI-evasiven monomeren Kontrollvariante G88R-RNase A und zur Herstellung von zwei teilevasiven SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Varianten (G88R-SGR und G220R-SGR; 4.3.2.5) ausgehend vom *rnase A*-Gen (3.2.2) verwendet. Zur Herstellung der teilevasiven SGRSGRSG-RNase A-Tandemzym-Varianten wurde die G88R-Mutation einmal in die N-terminale RNase A-Einheit (G88R-SGR) oder in die C-terminale RNase A-Einheit (G220R-SGR) eingeführt.

Linker	Oligonukleotide
GP <sub>5</sub> G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT CGG TCC TCC TCC ACC AGG TA-3' <i>rev</i> 5'-TAC CTG GTG GAG GAG GAG GAC CGA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP <sub>4</sub> G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC TCC TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAG GAG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP <sub>3</sub> G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
GP <sub>2</sub> G	<i>fw</i> 5'-CTT TGA TGC TTC AGT AGG TCC ACC AGG TAA GG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CTG GTG GAC CTA CTG AAG CAT CAA AG-3'
SGSGRSG	<i>fw</i> 5'-CTT CAG TGT CTG GTA GCG GCC GCT CTG-3' <i>rev</i> 5'-CAG AGC GGC CGC TAC CAG ACA CTG AAG-3'
SGSRSG	<i>fw</i> 5'-CAG TGT CTG GTA GCC GCT CTG GTA AGG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CAG AGC GGC TAC CAG ACA CTG-3'
SGRSG	<i>fw</i> 5'-CTT CAG TGT CTG GTC GCT CTG GTA AGG-3' <i>rev</i> 5'-CCT TAC CAG AGC GAC CAG ACA CTG AAG-3'
(SG) <sub>3</sub> S	<i>fw</i> 5'-GTT CTG GTT CTG GTT CTA AGG AAA CTG CAG C-3' <i>rev</i> 5'-GCT GCA GTT TCC TTA GAA CCA GAA CCA GAA C-3'
G88R	<i>fw</i> 5'-CTG CCG TGA GAC CCG TTC TTC GAA GTA CCC CAA CTG-3' <i>rev</i> 5'-CAG TTG GGG TAC TTC GAA GAA CGG GTC TCA CGG CAG-3'

---

### 3.2.4 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

#### 3.2.4.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Die Stammhaltung von Mikroorganismen erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C bis zu ca. vier Wochen. Für langfristige Lagerung wurden die Mikroorganismen als Glycerinkulturen bei -80°C aufbewahrt. Hierzu wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 100 µl sterilem 99,5%igen Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf einem Horizontalschüttler bei 190 rpm und 37°C über Nacht. Die Flüssigkulturen wurden entweder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft.

#### 3.2.4.2 Transformation von Mikroorganismen

##### 3.2.4.2.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen für die Transformation mittels Hitzeschock

125 ml SOB-Medium wurden mit 1,25 ml sterilem MgCl<sub>2</sub> und 1,25 ml MgSO<sub>4</sub> versetzt, mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis inkubiert (10 min). Jeder der folgenden Arbeitsschritte erfolgte auf Eis oder bei 4°C in der Zentrifuge. Danach wurden die Zellen in einer Hettich Zentrifuge Rotofix 32 (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen) zentrifugiert (1000×g, 10 min) und das Zellpellet in sterilem TFB-Puffer (10 mM PIPES pH 6,7, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl und 55 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert (16 ml pro 50 ml Ausgangsmedium). Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (10 min) wurde erneut zentrifugiert (1000×g, 10 min). Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, wobei das Volumen auf 4 ml TFB-Puffer pro 50 ml Ausgangsmedium reduziert wurde. Anschließend wurden 0,3 ml DMSO zu dieser resuspendierten Zelllösung gegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots á 100 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

##### 3.2.4.2.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wurde auf Eis aufgetaut mit 1 µl Plasmid-DNA (100 ng µl<sup>-1</sup>) oder 5 µl Ligationsansatz gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Diese Bakteriensuspensionen wurden für 45 s auf 42°C erhitzt und anschließend abermals für 5 min auf Eis inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die *E. coli*-Zellen in 500 µl 37°C warmem SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 900 rpm geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Kan- oder LB-Amp-Agarplatten, um auf transformierte *E. coli*-Zellen zu selektieren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden selbstgefertigte Gele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt verwendet. Das Trenngel (12,0-17,5%) wurde mit einem Sammelgel (10%) überschichtet. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung einer *Mighty-Small II Elektrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, CA, USA) nach der Methode von Laemmli (1970) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 5×SDS-Probenauftragungspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,005% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) gemischt und 10 min bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei 20 mA. Die Visualisierung der Proteinbanden im Gel erfolgte durch Coomassie-Färbung nach einer Methode von Fairbanks et al. (1971) mit Coomassie Brilliant R250 oder durch Silberfärbung (Nesterenko et al., 1994). Als Molekularmassenstandard diente der LMW *Calibration Kit for SDS electrophoresis* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

##### 3.3.1.1 Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung

Proben geringer Proteinkonzentration wurden für die SDS-PAGE mit H<sub>2</sub>O auf 2 ml aufgefüllt und durch Zugabe von 10 µl einer 10%igen (w/v) NaDoc-Lösung und 50 µl einer 50%igen (v/v) Trichloressigsäure-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (20000×g, 4°C, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das NaDoc-Protein-Pellet in eiskaltem Ethanol resuspendiert und anschließend 30 min bei -20°C inkubiert. Diese Suspension wurde erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die Fällung Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl)-haltiger Proben wurden maximal 500 µl Probe mit 1,5 ml H<sub>2</sub>O verdünnt. Außerdem wurde zusätzlich vor dem Ethanolwaschschritt mit eiskaltem Aceton gewaschen.

#### 3.3.2 Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Die Proben wurden mit  $\frac{1}{4}$  Vol. SDS-freiem 5×Probenauftragungspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) gemischt und sofort auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.1 beschrieben unter Verwendung von Nativ-PAGE-Laufpuffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA) durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 wurde das Elektropherogramm densitometrisch (3.3.3) ausgewertet.

### 3.3.3 Densitometrische Evaluierung

Zur densitometrischen Evaluierung der Bandenintensität wurden die PAGE-Gele mit Coomassie Brilliant Blau R250 gefärbt und bei 595 nm unter Verwendung eines CD 60-Densitometers (Desaga, Heidelberg) vermessen.

### 3.3.4 Herstellung der RNase A-Varianten

#### 3.3.4.1 Expression

Die Herstellung der RNase A-Tandemenzym-Varianten und der G88R-RNase A erfolgte in Form von *inclusion bodies*. Für die Expression der jeweiligen *mase A-tandemenzym*-Gene sowie für die Expression des *g88r-mase A*-Gens wurde das Plasmid pET26b(+) mit dem entsprechenden Gen in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Kan-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen der Vorkultur (100 ml TB-Medium, 50 µg ml<sup>-1</sup> Kan) wurde eine einzelne Kolonie dieser Agarplatte verwendet. Ein Liter TB-Medium (50 µg ml<sup>-1</sup> Kan) wurde mit 10 ml dieser Übernachtsvorkultur inokuliert und bei 37°C und 190 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,8 wurde die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden 4 h nach der Induktion durch Zentrifugation (6000×g, 4°C, 12 min) geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 3.3.4.2 Isolierung der *inclusion bodies*

Die Isolierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph et al. (1997). 20 g Biofeuchtmasse (BL21(DE3)) wurden in 100 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) resuspendiert, mit 3 mg Lysozym pro Gramm Zellen versetzt und bei 4°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Hochdruckdispersion mittels einer Gaulin-Apparatur Lab 40 (APV, Lübeck) bei einem Druck von 1200 bar. Es wurden drei Passagen durchgeführt. Danach erfolgte durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> (3 mM Endkonzentration) und Benzonase (50 µl, 250 U µl<sup>-1</sup>, Merck, Darmstadt) der Verdau der DNA bei Raumtemperatur (1 h). Im nachfolgenden Schritt wurde die Suspension mit ½ Volumen 1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, 6% (v/v) Triton<sup>®</sup>X-100, pH 7,0, gemischt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 15 min) die Trennung der löslichen Fraktion der Suspension von den sedimentierten *inclusion bodies*. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit Puffer gewaschen. Dazu wurde die unlösliche Fraktion in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 20 mM EDTA mittels Ultra-Turrax T25 resuspendiert und anschließend zentrifugiert (48000×g, 4°C, 15 min). Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet (*inclusion bodies*) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.3.4.3 Solubilisierung der *inclusion bodies*

Die Solubilisierung erfolgte nach Rudolph et al. (1997). 1 g *inclusion bodies* (3.3.4.2) wurden mittels Ultra-Turrax T25 in 150 ml 6 M GdnHCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM DTT gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Absenken des pH-Werts auf 3,5 durch tropfenweise Zugabe von 1 N HCl-Lösung. Durch Zentrifugation (48000×g, 20°C, 30 min) wurden alle unlöslichen Bestandteile von den solubilisierten *inclusion bodies* abgetrennt. Im Anschluss wurden die gelösten *inclusion bodies* gegen 10 l einer 20 mM Essigsäurelösung dialysiert (über Nacht, 4°C). Nach der Dialyse wurden die solubilisierten *inclusion bodies* nochmals zentrifugiert (48000×g, 20°C, 30 min), um präzipitierte Proteine abzutrennen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration am Spektrophotometer (Ultrospec 3000). Die solubilisierten *inclusion bodies* wurden aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 3.3.4.4 Renaturierung

Die solubilisierten *inclusion bodies* (3.3.4.3) wurden dem Renaturierungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG) unter Rühren bei 4°C in 5 ml-Schritten bis zu einer maximalen Proteinkonzentration von 50 µg ml<sup>-1</sup> zugegeben. Die Renaturierung erfolgte bei 4°C im Kühlraum für ca. 72 h. Präzipitate wurden nach anschließender erfolgreicher Konzentrierung (3.3.4.5) durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 30 min) abgetrennt.

#### 3.3.4.5 Konzentrierung

Die Konzentrierung der renaturierten Proteine erfolgte zunächst mit Hilfe einer Filtrationsanlage (Verder, Haan) mittels einer 3K-Membran (Pall-Filtron GmbH, Karlstein) nach Angaben des Herstellers. Nach der Reduzierung auf ein Volumen von ca. 0,4 l erfolgte die weitere Konzentrierung in einer AMICON®-Rührzelle (Typ 8400 für 400 ml Lösung; Millipore GmbH, Eschborn) nach Angaben des Herstellers. Es wurden Ultrafiltrationsmembranen mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa und einem Durchmesser von 76 mm (Typ OMEGA; Pall-Filtron GmbH, Karlstein) verwendet.

#### 3.3.4.6 Reinigung

Die verschiedenen RNase A-Varianten wurden mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Dafür wurden die Proteinlösungen während der Konzentrierung (3.3.4.5) mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, gewaschen und auf eine FPLC-Säule SOURCE S (Amersham Biosciences), die mit einer inerten HPLC-Anlage (Detektor L-4250, Niederdruckgradientenpumpe L-6210, Merck Hitachi, Tokio, Japan) verbunden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten in der mobilen Phase (Laufmittel A: 50 mM Tris-HCl, pH 7,0; Laufmittel B: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl). Die Flussrate betrug 1 ml min<sup>-1</sup> und die Detektion erfolgte bei

278 nm. Die Reinheit der manuell gesammelten Fraktionen wurde anschließend durch Rechromatographie und SDS-PAGE (3.3.1) überprüft.

### 3.3.5 Herstellung des RI

#### 3.3.5.1 Expression

Die Herstellung des RI erfolgte in löslicher Form nach Johnson et al. (2007). Für die Expression des *ri*-Gens wurde das Plasmid pET22b(+) mit dem entsprechenden Gen in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (3.2.4.2.2). Die transformierten Zellen wurden auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Animpfen der Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie dieser Agarplatte verwendet. 200 ml TB-Medium (200 µg ml<sup>-1</sup> Amp) wurden mit 2 ml einer Übernachtsvorkultur inokuliert und bei 37°C und 190 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 2,8 wurde die Temperatur auf 15°C gesenkt und die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Induktion durch Zentrifugation (6000×g, 4°C, 12 min) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 3.3.5.2 Zellaufschluss nach der löslichen Expression

Das Zellpellet aus 1,2 l Kulturmedium wurde in 100 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,1 M NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 0,04 mM PMSF) resuspendiert (Ultra Turrax T25) und anschließend durch einen Homogenisator (Gaulin Lab40) in drei Passagen bei 1200 bar aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (48000×g, 4°C, 20 min) entfernt. Der im Überstand enthaltene RI wurde umgehend einer Affinitätschromatographischen Reinigung unterzogen (3.3.5.3).

#### 3.3.5.3 Reinigung

Der hRI wurde zunächst durch Affinitätschromatographie gereinigt. Hierfür wurde gereinigte RNase A (30 mg in 50 mM NaPhosphat-Puffer, pH 7,0) nach den Angaben des Herstellers an NHS-aktivierte Sepharose (3 ml; Amersham Biosciences) gekoppelt. Die RNase A-Sepharose-Gravitationschromatographiesäule wurde mit 50 ml Puffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) äquilibriert, bevor das zentrifugierte Zellhomogenat (3.3.5.2) aufgetragen und anschließend mit 50 ml Waschpuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4, 1 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,0, der 3 M NaCl, 10 mM DTT und 1 mM EDTA enthielt. Nach einer Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM DTT, 1 mM EDTA erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie. Hierfür wurde die Proteinlösung auf eine FPLC-Säule (Mono Q, Amersham Biosciences), die ebenfalls mit einer inerten HPLC-Anlage verbunden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten in der mobilen Phase (Laufmittel A: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM DTT, 1 mM EDTA; Laufmittel B: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) bei einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup>. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Reinheit der

manuell gesammelten Fraktionen wurde durch Rechromatographie und SDS-PAGE (3.3.1) überprüft.

### 3.3.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

#### 3.3.6.1 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Stammlösung wurde ein UV-Spektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen (Ultrospec 3000 Spektrophotometer) und die Extinktion bei 278 nm für die RNase A-Varianten bzw. bei 280 nm für den RI unter Berücksichtigung der Grundabsorption bestimmt. Die entsprechende Proteinkonzentration der RNase A-Lösungen wurde anschließend unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sela und Anfinsen, 1957) nach Gleichung 1 berechnet.

$$c = \frac{E_{278} \cdot M}{\varepsilon_{278} \cdot d} \quad (1)$$

$E_{278}$ : Extinktion bei 278 nm

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient der RNase A  
( $9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$d$ : Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$M$ : molare Masse der RNase A ( $13683 \text{ g mol}^{-1}$ )

Die so ermittelte Proteinkonzentration bezieht sich jeweils auf die „monomeren“ RNase A-Einheiten.

Die Proteinkonzentration der RI-Lösungen wurde unter Verwendung des theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon = 39470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>) und der molaren Masse von  $49973 \text{ g mol}^{-1}$  (<http://www.expasy.org/uniprot/P13489>) bei 280 nm bestimmt.

#### 3.3.6.2 Bradford-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten (10  $\mu\text{l}$  Probe, 100  $\mu\text{l}$  Bradfordreagens). Als Proteinstandard für die Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 0 bis 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  diente BSA. Die Detektion erfolgte bei 590 nm unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts MR 7000 (Dynatech, Denkendorf). Jede Proteinkonzentration stellt das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

Bradfordreagens:            10 mg Coomassie Brillant Blau G 250  
                                      5 ml Ethanol (96% v/v)  
                                      10 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85% v/v)  
                                      ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

### 3.3.6.3 Konzentrationsbestimmung mittels Nativ-PAGE

Die Oxidationsanfälligkeit des RI und der damit verbundene Verlust der Fähigkeit RNase A zu binden (Fominaya und Hofsteenge, 1992), erfordert die Bestimmung des intakten RI-Anteils. Hierfür wurden jeweils 40 pmol RI (spektroskopische Konzentrationsbestimmung) mit 0-100 pmol RNase A inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  für 15 min in 100 mM NaPhosphat-Puffer (pH 6,55) in Anwesenheit von 2 mM DTT. Nach der Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Nativ-PAGE-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 wurde das Elektropherogramm densitometrisch (3.3.3) ausgewertet. Als Kalibrierkurve diente der lineare Abschnitt der RI•RNase A-Komplexbildungskurve.

### 3.3.7 Bestimmung der RNase-Aktivität

Die verwendeten Puffer wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem  $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt. Hierzu wurde dem  $\text{H}_2\text{O}$  0,1% (v/v) DEPC zugesetzt, über Nacht unter Rühren inkubiert (irreversible Inhibierung eventuell vorhandener RNasen durch Alkylierung der Histidin-Seitenketten im aktiven Zentrum) und die Lösung anschließend autoklaviert. Das DEPC zerfällt dabei in die beiden flüchtigen Produkte  $\text{CO}_2$  und Ethanol.

Für die Bestimmung der Aktivität der RNase A-Tandemenzyme gegenüber Hefe-RNA als Substrat wurden 8 mg RNA zunächst in 500  $\mu\text{l}$  0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, gelöst. Die intakte RNA präzipitiert durch die Zugabe von drei Volumeneinheiten eiskaltem Ethanol. Die im Überstand verbleibenden Ribonukleotide wurden durch Zentrifugation (20000 $\times g$ , 4°C, 20 min) von der unversehrten RNA abgetrennt. Das Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol gewaschen und unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Anschließend wurde die intakte RNA erneut in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösung wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  entspricht (Sambrook et al., 1989). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, der 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  BSA enthielt, bei einer RNA-Konzentration von 3,3  $\text{mg ml}^{-1}$  und einer RNase-Konzentration von 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  bei 37°C. Dazu wurden 30  $\mu\text{l}$  Puffer (0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5) mit 20  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  BSA) gemischt und bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Substratlösung (4,4  $\text{mg ml}^{-1}$  Hefe-RNA in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5) gestartet und nach 15 min durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  einer eiskalten Stopplösung (22 mM  $\text{LaCl}_3 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,2 M Perchlorsäure) abgestoppt (Corbishley et al., 1984). Für die Referenzreaktionen wurde statt der RNase-Lösung Puffer mit BSA (0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  BSA) verwendet. Die abgestoppten Reaktionsansätze wurden zunächst für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (20000 $\times g$ , 4°C, 20 min). Die Konzentration an löslichen Ribonukleotiden im Überstand wurde durch



Absorptionsmessungen bei 260 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von  $10600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt (Corbishley et al., 1984).

Die Bestimmung der Aktivität gegenüber AUAA als Substrat erfolgte in Mikrotiterplatten (Fluotrac™, Greiner-Bio-One, Frickenhausen) bei 25°C. Dazu wurden 40 µl Puffer (200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl) mit 10 µl RNase-Lösung (25-100 pM RNase A bzw. 5-20 nM RNase A-Tandemenzym-Variante in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 200 µg ml<sup>-1</sup> BSA) gemischt und bei 25°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Substratlösung (100 nM AUAA in H<sub>2</sub>O) gestartet und nach 5 min durch Zugabe von 20 µl SDS-Lösung (12%; w/v) abgestoppt. Für die Referenzreaktionen wurde statt RNase-Lösung Puffer mit BSA zugegeben. Für die Bestimmung des Signals nach vollständigem Umsatz des Substrats wurden 49 µl Puffer-Lösung mit 1 µl einer 1 µM RNase-Lösung und 50 µl Substratlösung gemischt und ebenfalls nach 5 min durch Zugabe von 20 µl SDS-Lösung (12%; w/v) abgestoppt. Anschließend wurde die Fluoreszenz unter Verwendung eines POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegeräts (BMG Labtech, Offenburg) bestimmt. Dazu wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen. Die Bestimmung des  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werts erfolgte nach Gleichung 2.

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = \frac{m}{(\Delta F) \cdot [\text{RNase}]} \quad (2)$$

m:	Anstieg des Fluoreszenzsignals pro Sekunde
ΔF:	Änderung des Fluoreszenzsignals bei vollständigem Substratumsatz
[RNase]:	RNase-Konzentration in mol l <sup>-1</sup>

### 3.3.8 Bestimmung der RNase-Aktivität in Anwesenheit des RI

Die verwendeten Puffer wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (3.3.7) hergestellt.

Für den Aktivitätstest der RNase A-Tandemenzyme gegenüber Hefe-RNA als Substrat in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an RI wurde die RNA wie unter 3.3.7 beschrieben vorbereitet. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 10 mM DTT, 50 µg ml<sup>-1</sup> BSA bei einer RNA-Konzentration von 1,9 mg ml<sup>-1</sup> sowie einer RNase-Konzentration von 0,1 µg ml<sup>-1</sup> bei 37°C. Dazu wurden zunächst 30 µl RI-Lösung (0-1400 nM in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 16,7 mM DTT, 200 µg ml<sup>-1</sup> BSA) mit 20 µl RNase-Lösung (73 nM bezogen auf RNase A-Einheiten in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 200 µg ml<sup>-1</sup> BSA) gemischt und bei 37°C für 15 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Substratlösung (2,5 mg ml<sup>-1</sup> Hefe-RNA in 0,1 M NaAcetat-Puffer, pH 5,5, 10 mM DTT) gestartet und nach 15 min wie unter 3.3.7 beschrieben gestoppt und analysiert.

Die Bestimmung der Aktivität in Anwesenheit des RI gegenüber AUAA als Substrat erfolgte wie unter 3.3.7 beschrieben in Mikrotiterplatten bei 25°C in 100 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 50 µg ml<sup>-1</sup> BSA. Dazu wurden 40 µl RI-Lösung (0-250 nM in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 25 mM DTT und 100 µg ml<sup>-1</sup>

BSA) mit 10  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung (25-100 pM RNase A bzw. 5-20 nM RNase A-Tandemenzym-Variante in 200 mM Mes-NaOH, pH 6,0, 200 mM NaCl, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  BSA) gemischt und bei 25°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung (100 nM AUAA in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gestartet und nach 5 min wie unter 3.3.7 beschrieben abgestoppt und evaluiert.

### 3.3.9 Analyse der RI-Bindungsstöchiometrie mittels Nativ-PAGE

Die Stöchiometrie des RI•RNase A-Tandemenzym-Komplexes wurde durch den Vergleich zur Komplexbildung von RNase A und RI ermittelt. Hierfür wurden jeweils 40 pmol RI mit 20 pmol RNase A sowie 10 bzw. 20 pmol SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  für 15 min in 100 mM NaPhosphat-Puffer, pH 6,55, in Anwesenheit von 2 mM DTT. Nach der Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel (3.3.2). Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm (3.3.3).

### 3.3.10 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bei 25°C durchgeführt (Gesamtvolumen 200  $\mu\text{l}$ ). Dem bei 25°C vorinkubierten Puffer wurde das SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym (0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$  Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Proteaselösung (Trypsin,  $3 \times 10^{-4}$  mg  $\text{ml}^{-1}$  im Ansatz) gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden 15  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und mit 5  $\mu\text{l}$  Stoppreagens (50 mM PMSF in Isopropanol) gemischt. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator (SpeedVac®, Modell SC110A; Savant, NY, USA) getrocknet, in Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE (3.3.1) eingesetzt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm wie unter 3.3.3 beschrieben.

Für den proteolytischen Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms und dessen Varianten G88R-SGR und G220R-SGR (4.3.2.5) in Anwesenheit des RI wurde das entsprechende Tandemenzym (0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$  bzw. 3,6  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) mit 2-fachem molaren Überschuss an RI (0,36 mg  $\text{ml}^{-1}$  bzw. 7,2  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM DTT in einem Volumen von 180  $\mu\text{l}$  für 15 min bei 25°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Trypsin ( $1 \times 10^{-3}$  mg  $\text{ml}^{-1}$  Endkonzentration). Der tryptische Verdau wurde wie oben beschrieben abgestoppt und analysiert.

Der proteolytische Verdau des SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzyms und dessen Varianten G88R-SGR bzw. G220R-SGR in Anwesenheit des RI wurde ferner durch die Nativ-PAGE (3.3.2) untersucht. Hierfür wurden 40 pmol RI mit 40 pmol der SGRSGRSG-RNase A-Tandemenzym-Variante in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 mM DTT in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  für 15 min bei 25°C vorinkubiert und

durch Zugabe von Trypsin ( $3 \times 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> im Ansatz) für 60 min proteolysiert. Die Proben wurden nach Zusatz von 5 µl Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 15% (v/v) Glycerin und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) direkt auf ein 10%iges Nativ-PAGE-Gel (3.3.2) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm (3.3.3).

### 3.3.10.1 Bestimmung der Proteolysekonstanten

Die Proteolysekonstante  $k_p$  wurde aus der zeitabhängigen Abnahme der Peakfläche der Bande des intakten RNase A-Tandemenzyms in den gescannten SDS-PAGE-Gelen, welche einer Reaktion 1. Ordnung folgt, nach Gleichung 3 ermittelt.

$$A_t = A_0 \cdot \exp(-k_p \cdot t) \quad (3)$$

$A_0$ :	Messsignal zum Zeitpunkt $t = 0$ s
$A_t$ :	Messsignal zum Zeitpunkt $t$
$k_p$ :	Geschwindigkeitskonstante der Proteolyse

### 3.3.11 Kristallisation

Die Proteinkristallisation wurde zunächst nach der Methode der Gasphasendiffusion mit sitzendem Tropfen in 96-*well*-Kristallisationsplatten (*Crystalquick*-Platten, Greiner Bio-One, Frickenhausen) unter Verwendung des Pipettierroboters PixSys 4200 SynQuad (Genomic Solutions®, Huntingdon, UK) durchgeführt. Für einen ersten *screen* wurde der *JBScreen* (Jena Bioscience, Jena) mit insgesamt 240 verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet. Dafür wurden pro *well* 110 µl Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert und anschließend je 0,2 µl der Proteinlösung mit je 0,2 µl der Reservoirlösung durch den Pipettierroboter vermischt. Nach dem Befüllen wurden die Platten mit Klebefolie *CrystallClear* (Jena Bioscience) luftdicht verschlossen und bei 13°C inkubiert. Die RNase A-Tandemenzym-Konzentration wurde zwischen 10 und 40 mg ml<sup>-1</sup> (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0) variiert. Die fotografische Dokumentation erfolgte automatisch unter Verwendung des Oasis LS3 *Protein Crystal Imaging System* (Veeco, Mannheim). Für die Reservoirlösungen 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 20% (w/v) PEG-4000/200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konnte die Bildung streuender Kristalle beobachtet werden (4.4).

Für die Optimierung der Streueigenschaften der Kristalle wurde für die entsprechenden Kristallisationspuffer ein pH-Fein-*screening* (pH 5,0-6,0) durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte nun nach der Methode der Gasphasendiffusion mit hängendem Tropfen in 24-*well*-Kristallisationsplatten (*Crychem*<sup>TM</sup>-Platten, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) mit einer RNase A-Tandemenzym-Konzentration von 10 mg ml<sup>-1</sup> (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0). Dafür wurde 1 ml Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert, der Tropfen aus gleichen Volumina (je 2 µl) Proteinlösung und Kristallisationspuffer gebildet und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die Platten wurden nach dem Befüllen mit Klebefolie *CrystallClear* luftdicht verschlossen und wiederum bei 13°C inkubiert. Die Kristallisation wurde mit dem Mikroskop beobachtet und zur Dokumentation fotografisch aufgenommen.

#### 3.3.11.1 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte in der Abteilung „Physikalische Biotechnologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurde freundlicherweise von Dr. Piotr Neumann betreut. Die schockgefrorenen Kristalle wurden zunächst mit einer Gefrierschutzlösung (20% (v/v) Glycerin in der Reservoirlösung 30% (w/v) PEG-8000/200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) für ca. 15 s auf Eis inkubiert und dann direkt mittels eines *loops* (0,05–0,1 mm Ø; Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) auf dem Goniometerkopf angebracht. Der Kristall befand sich für die Messung in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom (110 K). Die Analyse der schockgefrorenen Proteinkristalle erfolgte an einem Drehanodengenerator (MicroMax 007; RigakuMCS, Kent, UK) bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å (Cu-K $\alpha$ -Strahlung) unter Verwendung eines R-Axis IV++-Detektors (RigakuMSC, Kent, UK). Raumgruppe und Zelldimension der Kristalle wurden mit dem Programm XDS bestimmt (Kabsch, 1993). Alle erhaltenen Daten wurden mit den Programmen MOSFLM und SCALA aus dem CCP4-Paket (*Collaborative Computational Project no. 4*; CCP4, 1994) integriert bzw. skaliert.

#### 3.3.11.2 Modellierung und kristallographische Verfeinerung

Die Strukturen der kristallisierten RNase A-Tandemenzym-Varianten wurden mit der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*; MR) gelöst. Dabei diente die Struktur der RNase A (PDB-Zugangscode 7RSA; Wlodawer et al., 1988) als Suchmodell. Die Verfeinerungen wurden freundlicherweise von Dr. Piotr Neumann mit dem Programm *PHASER* durchgeführt (McCoy et al., 2005). Die Lage der Aminosäuren wurde anschließend durch *eine simulated annealing composite omit map* validiert. Hierbei wird in einer Simulation die Energie (Temperatur) der Atome zuerst erhöht und dann langsam minimiert, so dass Energiebarrieren und somit lokale Energieminima, die nicht der realen Struktur entsprechen, überwunden werden. Auf jeden Verfeinerungszyklus folgten die Berechnung von Elektronendichtekarten und die manuelle Inspektion und Korrektur des Modells unter Nutzung der Programme *O* und *Coot* (Jones et al., 1991; Emsley und Cowtan, 2004). Danach wurden die Modelle mit dem Programm CNS weiter verfeinert (Brunger et al., 1998). Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter berücksichtigt wurden. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Modellbau- und Verfeinerungszyklen wurden die individuellen B-Faktoren verfeinert. Um ein objektives Kriterium über den Erfolg der Verfeinerung zu haben, wurden 5% zufällig ausgewählte Reflexe von der Verfeinerung ausgeschlossen. Der aus diesem Testsatz berechnete freie R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ), der im Allgemeinen 5% höher ist als der kristallographische R-Faktor (R), verhindert dabei eine Überfeinerung des Modells.

Nach dem automatischen Einbau von Wassermolekülen und deren manueller Überprüfung wurden finale R- und  $R_{\text{free}}$ -Faktoren von 0,1722 und 0,2155 erreicht. Die finale Verfeinerung erfolgte mit Hilfe des *REFMAC*-Programms aus dem CCP4-Paket (1994). Die Modelle wurden abschließend in Hinblick auf ihre Geometrie und zur Erstellung der Ramachandran-Diagramme mit dem Programm *PROCHECK* analysiert (Laskowski et al., 1993).

R-Faktor: allgemeiner kristallographischer R-Faktor (*residual-factor*), Maß für die Korrektheit der Struktur eines Modells:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

$R_{\text{free}}$ : freier R-Faktor, ist von der Verfeinerung unbeeinflusst, da die zur Berechnung dieses R-Faktors verwendeten Einzelreflexionen ( $hkl \subset T$ ) von der Verfeinerung ausgeschlossen sind:

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{\text{obs}}|}$$

$|F_{\text{obs}}|$ : beobachtete Strukturfaktoramplitude

$|F_{\text{calc}}|$ : berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells

$k$ : Skalierungsfaktor

$hkl \subset T$ : Einzelreflexe, die zum Testset T gehören

B-Faktor: Temperatur-Faktor oder Debye-Waller-Faktor, beschreibt das Maß der Abweichung der Elektronendichte und reflektiert somit die Mobilität eines Atoms; kann Fehler beim Modellieren aufzeigen (hohe B-Faktoren).

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2$$

$U_i^2$ : Durchschnittsabweichung der Atomschwingung des  $i$ -ten Atoms (*mean square displacement*)

## 3.4 Biophysikalische Methoden

### 3.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

Die Untersuchungen wurden an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Fullerton, USA) mit Doppelsektorzellen (für Probe und Puffer) bei 20°C durchgeführt (4.3.2.3). Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte mittels Sedimentationslauf über 4 h. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Gleichgewichtslauf über 36 h. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. H. Lilie (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) durchgeführt.

### 3.4.2 CD-Spektroskopie

#### 3.4.2.1 CD-Spektren

Die Messungen wurden an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt) bei 20°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, durchgeführt. Die CD-Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 0,1 nm aufgenommen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 20 nm min<sup>-1</sup> wurden 10 Einzelspektren akkumuliert. Für den Nah-UV Bereich (340-250 nm) wurden volumenreduzierte geschwärzte Quarzküvetten mit 1 cm Weglänge und für den Fern-UV Bereich (260-180 nm) Quarzküvetten mit 0,01 cm Weglänge verwendet. Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt (3.3.6.1). Die Molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  wurde nach Gleichung 4 berechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad (4)$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$ :	molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )
$\Theta$ :	Elliptizität (mdeg)
$M$ :	molare Masse des Proteins (g mol <sup>-1</sup> )
$c$ :	Proteinkonzentration (mg ml <sup>-1</sup> )
$d$ :	Schichtdicke der Küvette (cm)
$N_A$ :	Anzahl der Aminosäurereste im Protein

### 3.4.2.2 Thermische Entfaltung

Die temperaturinduzierten Übergangskurven der RNase A-Tandemenzym-Varianten und der RNase A wurden durch die Änderungen im CD-Signals an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter detektiert. Hierfür wurde das CD-Signal in Abhängigkeit von der Temperatur bei 278 nm in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, bei einer Heizrate von 1 K min<sup>-1</sup> und einer Äquilibrierungszeit von 1 min bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg ml<sup>-1</sup>. Für die Auswertung wurde die Elliptizität gegen die Temperatur aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression nach der für das reversible Zweizustandsmodell gültigen Gleichung (Pace et al., 1998; Gleichung 5) und wurde ausschließlich zur Bestimmung der Temperatur im Übergangsmittelpunkt ( $T_m$ ) genutzt.

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N \cdot T) - (y_D^0 + m_D \cdot T) \cdot \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}\right)} \quad (5)$$

$y$ :	Signal des Proteins (Elliptizität)
$y_N^0, y_D^0$ :	Signal des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins, extrapoliert auf 0 K
$m_N, m_D$ :	Anstieg des Signals des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur
$T$ :	Temperatur (K)
$T_m$ :	Temperatur im Übergangsmittelpunkt (K)
$\Delta H_m$ :	Enthalpie bei $T_m$
$R$ :	universelle Gaskonstante

### 3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der GdnHCl-induzierten Übergangskurven

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoro-Max-2® (Jobin Yvon, Grasbrunn) in 1,0 cm × 0,4 cm-Fluoreszenzquarzglasküvetten bei 25°C aufgenommen. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert und entgast (0,45 µm Filter, Roth, Karlsruhe). Die RNase A-Tandemenzyme (50 µg ml<sup>-1</sup>) wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, in Gegenwart von 0-6 M GdnHCl für 4 h bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Fluoreszenzspektren zwischen 290 und 350 nm. Die Anregung der Proben erfolgte bei 278 nm. Es wurden zunächst jeweils 10 Einzelspektren für den nativen (0 M GdnHCl) und den denaturierten Zustand (6 M GdnHCl) akkumuliert. Für die Anregung wurde eine Spaltbreite von 1 nm, für die Emission eine Spaltbreite von 10 nm verwendet. Zur Bestimmung der Übergangskurven wurde das Maximum des Differenzspektrums zwischen nativem und denaturiertem Protein bei 303 nm herangezogen, indem nach Einstellung der Gleichgewichtsbedingung das Fluoreszenzsignal (303 nm) über 40 s gemittelt wurde.

Nach Messung der Fluoreszenzsignale in Gegenwart von 0-6 M GdnHCl wurde die genaue Denaturationskonzentration refraktometrisch nach Gleichung 6 bestimmt (Shirley, 1995).  $\Delta N$  entspricht der Differenz des Brechungsindex mit und ohne Denaturans.

$$[\text{GdnHCl}] \text{ (M)} = 57,147 \times (\Delta N) + 38,68 \times (\Delta N)^2 - 91,6 \times (\Delta N)^3 \quad (6)$$

Für die Bestimmung der denaturationsinduzierten Übergangskurven wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgetragen und der betreffende Konzentrationsbereich nach einem Zweizustandsmodell (Santoro und Bolen, 1988) unter Verwendung von Gleichung 7 (Fersht, 1999) mittels nicht-linearer Regression angepasst. Die Fraktion des nativen Proteins ( $f_N$ ) wurde nach Gleichung 8 berechnet.

$$y = \frac{(y_N^0 + m_N[D]) + (y_D^0 + m_D[D]) \cdot \exp\left(-\frac{m_{\Delta G}([D]_{50\%} - [D])}{R \cdot T}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{m_{\Delta G}([D]_{50\%} - [D])}{R \cdot T}\right)} \quad (7)$$

$$f_N = \frac{y_D - y}{y_D - y_N} \quad \text{mit} \quad y_D = y_D^0 + m_D \cdot [D] \quad \text{und} \quad y_N = y_N^0 + m_N \cdot [D] \quad (8)$$

$y$ :	Signal des Proteins (Fluoreszenzintensität bei 303 nm)
$y_N^0, y_D^0$ :	Signal des Proteins im nativen bzw. denaturierten Zustand, extrapoliert auf den Wert in Abwesenheit von Denaturans
$m_N, m_D$ :	Anstieg des Signals des Proteins im nativen bzw. denaturierten Zustand in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration
$[D]$ :	Denaturationskonzentration (M)
$[D]_{50\%}$ :	Denaturationskonzentration im Übergangsmittelpunkt (M)
$m_{\Delta G}$ :	Anstieg der freien Enthalpie in Abhängigkeit von der Denaturationskonzentration (Kooperativität)
$R$ :	Allgemeine Gaskonstante
$T$ :	Temperatur (K)
$f_N$ :	Anteil an nativem Protein im Gleichgewicht



## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Kultivierung eukaryotischer K562-Zellen

Für die kontinuierliche Kultivierung der humanen Suspensionszelllinie K562 wurden T75-Zellkulturflaschen verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (HERAcell; Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre. Als Kultivierungsmedium diente RPMI 1640, das zusätzlich fötales Kälberserum (10%, v/v), Glutamax I (1%, v/v), sowie Penicillin (100 Units ml<sup>-1</sup>) und Streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>) als Antibiotika enthielt. Die Zellen wurden in Volumeneinheiten von 25-100 ml zu Zelldichten von 0,5-1×10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> aufgezogen. Die Subkultivierung der K562-Suspensionszelllinie erfolgte mittels Verdünnung der Zellsuspension mit Kultivierungsmedium. Dafür wurden 5 ml der gut gemischten Zellsuspension in 20 ml vorgewärmtem, frischen Medium inokuliert.

#### 3.5.1.1 Präparation von Kryokulturen

Die dauerhafte Lagerung eukaryotischer K562-Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden die Zellen einer 25 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 0,5-1×10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> geerntet (2000×g, 4°C, 5 min) und in 10 ml Gefriermedium (Kultivierungsmedium mit 5% (v/v) DMSO) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Aliquots zu 1 ml in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C in Isopropanol inkubiert, um den Zellen eine langsame Temperaturerniedrigung zu ermöglichen. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und darin gelagert.

#### 3.5.1.2 Reaktivierung von Kryokulturen

Zur Reaktivierung einer Kryokultur wurde ein Röhrchen mit Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend erfolgte mit dem kompletten Inhalt des Röhrchens die Inokulation einer T75-Zellkulturflasche mit frischem Medium. Nach 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO aus der Kultur zu entfernen.

### 3.5.2 Zytotoxizitätstest

Die zytotoxische Wirkung der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde durch die Messung des Einbaus von [*Methyl*-<sup>3</sup>H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA nachgewiesen (Kim et al., 1995a; Leland et al., 1998a). Dazu wurden zunächst 96-*well*-Zellkulturplatten mit 90 µl Zellsuspension einer Dichte von 5×10<sup>4</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> pro *well* inokuliert. Nachdem sich die Zellen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C für 2 h an die veränderten Kultivierungsbedingungen adaptieren konnten, erfolgte die Zugabe steriler Lösungen (10 µl) der RNase A-Tandemenzym-Varianten in PBS zu den Aliquots. Der Zusatz der RNase A-Tandemenzyme erfolgte in Konzentrationen von 1 nM-200 µM (Endkonzentration im

Medium). Nach 44 h bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator erfolgte ein 4 h-Puls mit [*Methyl*-<sup>3</sup>H]-Thymidin (0,2 µCi pro *well*). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des PHD *cell harvester* (Cambridge Technology; Watertown, MA, USA) auf Glasfaserfilter gepresst. Die Lyse der so geernteten Zellen erfolgte durch den Durchgang mehrerer Milliliter bidestillierten Wassers durch den Glasfaserfilter. DNA und andere zelluläre Makromoleküle werden durch den Glasfaserfilter zurückgehalten, während kleinere Moleküle wie das nicht eingebaute [*Methyl*-<sup>3</sup>H]-Thymidin beim Waschen des Filters entfernt wurden. Nach mehreren Waschschrritten wurde der Filter mit Methanol getrocknet und anschließend im Flüssigscintillationszähler (MicroBeta® TriLux; Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) vermessen. Aus den Ergebnissen der Scintillationsmessung wurde die prozentuale Proliferationsrate (S) berechnet. Dafür wurde der Scintillationswert für den [*Methyl*-<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die DNA der PBS-behandelten Kontrollzellen als Wert für einen 100%igen <sup>3</sup>H-Einbau (S = 100%) definiert. Die relative Proliferationsrate (S) ergibt sich aus dem Verhältnis des <sup>3</sup>H-Einbaus in die DNA der mit RNase A-Tandemenzymen behandelten Zellen zum <sup>3</sup>H-Einbau in die DNA der Kontrollzellen. Die prozentualen Proliferationsraten wurden gegen die entsprechenden RNase A-Tandemenzym-Konzentrationen (logarithmische Skalierung) aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf dieser Auftragung wurde der IC<sub>50</sub>-Wert der jeweiligen RNase A-Tandemenzym-Variante unter Verwendung von Gleichung 9 ermittelt (Haigis et al., 2002).

$$S = \frac{100\% \cdot IC_{50}}{(IC_{50} + [RNase])} \quad (9)$$

S:	prozentuale Proliferationsrate
IC <sub>50</sub> :	Konzentration an RNase A-Tandemenzym im Zellkulturmedium bei der 50% der Zellen überleben
[RNase]:	RNase-Konzentration (µM)

### 3.5.3 Subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Ultrazentrifugation

#### 3.5.3.1 Zentrifugation

Die subzelluläre Fraktionierung erfolgte mit kleineren Modifizierungen nach einem Protokoll von Schröter et al. (1999; Abb. 34). Die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise erfolgte ausschließlich bei einer Temperatur von 4°C oder auf Eis. Als Fraktionierungspuffer wurde 10 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,0, der 250 mM Saccharose enthielt, verwendet. Nach der Ernte von rund 1×10<sup>9</sup> Zellen durch Zentrifugation (2000×g, 10 min) wurden die erhaltenen Zellpellets dreimal mit dem Fraktionierungspuffer gewaschen. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 0,3 ml eiskaltem Fraktionierungspuffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (5 × 5 J; Vibra Cell, Bioblock Scientific, Lyon, Frankreich). Anschließend wurde das Zellhomogenat zentrifugiert (8000×g, 10 min), um intakte Zellen, Zellfragmente, Plasmamembranen und Zellkerne abzutrennen (Schröter et

al., 1999). Eine Probe dieses Überstands diente zur Visualisierung der totalen Internalisierung der RNase A-Varianten (Fraktion T). Der restliche Überstand wurde anschließend erneut zentrifugiert ( $100000\times g$ , 6 min), um Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen im Pellet zu isolieren (Fraktionen E and L). Der so erhaltene Überstand wurde nochmals zentrifugiert ( $130000\times g$ , 60 min), um die Mikrosomen ins Pellet abzutrennen (Fraktion M). Mit diesem letzten Zentrifugationsschritt erhält man reines Zytosol im Überstand (Fraktion Z). Die während dieser Arbeitsschritte erhaltenen Pellets wurden mit Fraktionierungspuffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Überstände dieser Waschschrte wurden verworfen.

### 3.5.3.2 Trennung von endosomaler und lysosomaler Fraktion

Lysosomen sind sensitiv gegenüber hypotoner Lyse und lassen sich somit leicht von den Endosomen abtrennen (Bohley et al., 1969). Nach einem Protokoll von Bohley et al. (1969) konnte die lysosomale Fraktion durch eine 20-minütige hypotone Lyse vom Pelletverband aus Fraktion E und L getrennt werden (Zugabe des 18-fachen Pelletgewichts an bidestilliertem Wasser). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ( $100000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 8 min) konnten die aufgeschlossenen Lysosomen (Fraktion L) als Überstand abgenommen werden, während die Mitochondrien und die Endosomen im Pellet isoliert blieben (Fraktion E). Die erhaltenen Pellets wurden wiederum mit Fraktionierungspuffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand des Waschschrts wurde verworfen und das Pellet in ca. 100  $\mu\text{l}$  Fraktionierungspuffer resuspendiert (Fraktion E).

### 3.5.3.3 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen

Die Qualität der Trennung wurde durch die Bestimmung der Aktivitäten sogenannter Markerenzyme verfolgt. Diese Markerenzyme sind die N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase ( $\beta$ -AGA, EC 3.2.1.30) sowie die Kathepsine B (EC 3.4.22.1), L (EC 3.4.22.15) und S (EC 3.4.22.27) (kat BLS) für die Lysosomen (Casciola-Rosen und Hubbard, 1991; Schmid et al., 1997) und die Laktatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) für das Zytosol (Storrie und Madden, 1990; Schröter et al., 1999). Die spezifische Aktivität der entsprechenden Markerenzyme in den Fraktionen L, E, Z und M werden in  $\mu\text{mol}$  umgesetzten Substrats pro Minute und g Protein ( $\text{U g}^{-1}$ ) angegeben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der subzellulären Fraktionen erfolgte nach 3.3.6.2.

#### 3.5.3.3.1 Bestimmung der N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidaseaktivität

Zur Bestimmung der  $\beta$ -AGA-Aktivität wurde ein fluorometrischer Test in Anlehnung an Schmid et al. (1993) verwendet. 95  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer (0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 1% (v/v) NP40, 0,8 mM MU-NAG als Substrat) wurden bei  $25^{\circ}\text{C}$  mit 5  $\mu\text{l}$  der subzellulären Fraktionen in Mikrotiterplatten (Fluotrac™) inkubiert. Die Produktbildung wurde durch Fluoreszenzspektroskopie an einem POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm kontinuierlich über 60 min verfolgt.

---

Zur Quantifizierung der Menge an gebildetem Endprodukt wurde aus einer MU-Stammlösung (10 mM MU in 0,5 M Glycin, pH 10,4, 0,5 M NaCl) durch Verdünnung in den Reaktionspuffer (0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 0,02% (w/v) BSA) eine Eichreihe im Konzentrationsbereich von 10-400  $\mu$ M MU erstellt.

#### 3.5.3.3.2 Bestimmung der Kathepsinaktivität

Die Bestimmung der kat BLS-Aktivität erfolgte mittels eines fluorometrischen Tests nach Schmid et al. (1997) in 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, der 4 mM DTT, 0,1% (w/v) BSA, 4 mM EDTA, und 6  $\mu$ M Aprotinin enthielt, gegenüber dem unspezifischen Substrat 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC (Olbricht et al., 1986). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l subzellulärer Fraktion zu 95  $\mu$ l Substratlösung gestartet und nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C durch die Zugabe von E-64 (10  $\mu$ M im Reaktionsansatz) abgestoppt (Schmid et al., 2002). Vor der Fluoreszenzmessung wurden die Ansätze mit 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, 200-fach verdünnt. Die Fluoreszenzemission des gebildeten Produkts AMC wurde anschließend an einem POLARstar Galaxy Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert (Anregung bei 360 nm). Zur Quantifizierung der Menge an gebildetem Endprodukt wurde aus einer 10 mM AMC-Stammlösung durch Verdünnung in den Reaktionspuffer eine Eichreihe im Konzentrationsbereich 2-20  $\mu$ M AMC erstellt. Die Herstellung der Stammlösungen von Z-Phe-Arg-AMC (6,25 mM), AMC (10 mM) und E-64 (10 mM) erfolgte in 100% (v/v) DMSO als Lösungsmittel. Die Aktivität der Kathepsine wird bis zu einem Anteil von 25% (v/v) DMSO nicht beeinflusst (Olbricht et al., 1986).

#### 3.5.3.3.3 Bestimmung der Laktatdehydrogenaseaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der LDH erfolgte in Anlehnung an Storrie und Madden (1990). Die Aktivität der LDH wurde in einer Mischung aus 150  $\mu$ l 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5, 0,31 mM NaPyruvat und 5  $\mu$ l einer 8 mM NADH-Lösung ermittelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l der jeweiligen subzellulären Fraktion gestartet. Die durch den NADH-Verbrauch verursachte Extinktionsänderung bei 340 nm (Abnahme) wurde an einem UV/VIS-Spektrophotometer (Ultrospec 3000) in einer 1 cm $\times$ 0,2 cm Küvette kontinuierlich über 60 s verfolgt. Die Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für NADH von 6300  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Sponholz und Wunsch, 1980).

### 3.5.4 Proteolyse in Gegenwart subzellulärer Fraktionen

Die Proteolyseempfindlichkeit der RNase A-Tandemenzym-Varianten wurde sowohl in Fraktion Z als auch in Fraktion L bei 37°C analysiert. Hierfür wurden die subzellulären Fraktionen wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben gewonnen und charakterisiert. Der proteolytische Verdau durch Fraktion Z erfolgte in 10 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,0, in Gegenwart von 250 mM Saccharose und 2 mM DTT. Die Proteolyse in Gegenwart von Fraktion L wurde in 0,1 M NaZitrat-Puffer, pH 5,0, in Gegenwart von 2 mM DTT durchgeführt. Die identische Zusammensetzung der Proteolyseansätze wurde durch die Verwendung einer spezifischen katalytischen Aktivität der Leitenzyme LDH (2,67 U  $\text{ml}^{-1}$ ) für Fraktion Z bzw. kat BLS (0,03 U  $\text{ml}^{-1}$ ) für Fraktion L im Reaktionsansatz gewährleistet. Dem

bei 37°C vorinkubierten Puffer wurde die entsprechende RNase A-Variante bzw. BSA als Kontrollprotein (0,1 mg ml<sup>-1</sup> Endkonzentration) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Volumens an subzellulärer Fraktion gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden 15 µl Probe entnommen und mit 5 µl Proteaseinhibitorcocktail (Complete™, Roche Diagnostics, Mannheim) gemischt. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator (SpeedVac®) getrocknet, in Probenpuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE (3.3.1) eingesetzt. Nach der Visualisierung der Banden mittels Coomassie R250 erfolgte die densitometrische Evaluierung des Bandenmusters im Elektropherogramm wie unter 3.3.3 beschrieben.

### 3.5.5 Immunoblotting

#### 3.5.5.1 Immunoblotting zur Quantifizierung der Internalisierung

Jeweils 10 ml einer K562-Zellsuspension mit 0,5-1×10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> wurden für 36 h mit 100 µM der monomeren RNase A-Variante (RNase A bzw. G88R-RNase A) oder 50 µM der RNase A-Tandemenzym-Variante (SGRSGRSG; SGSGSG, GP<sub>5</sub>G, GP<sub>4</sub>G bzw. GP<sub>3</sub>G) inkubiert. Ein PBS-behandeltes Aliquot dieser Zellen diente als Kontrolle, um mögliche Kreuzreaktivitäten des RNase A-Antikörpers mit intrazellulären RNasen zu detektieren. Nach der Ernte der Aliquots wurde die subzelluläre Fraktionierung wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Für jede subzelluläre Fraktion wurde jeweils die gleiche Menge an Protein (300 ng für Fraktion T, 60 ng für Fraktion E, 25 ng für Fraktion L und 250 ng für Fraktion C) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (3.3.1).

Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine (60 min bei 1 mA cm<sup>-2</sup>) auf eine Amersham Hybond™-ECL™ Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare Europe GmbH, München) mit einer *semi-dry*-Blotapparatur (VWR, Darmstadt) unter Verwendung des Drei-Puffer-Systems. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit PBS erfolgt die Absättigung von unspezifischen Bindestellen für mindestens 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver (Oxoid, Wesel) in PBS. Die Bindung der primären Antikörper (polyklonale Anti-RNase A-Antikörper [34 µg ml<sup>-1</sup>], monoklonale Anti-β-Aktin-Antikörper [2 µg ml<sup>-1</sup>] bzw. polyklonale Anti-Kathepsin B-Antikörper [10 µg ml<sup>-1</sup>]) erfolgte in Gegenwart von 2,5% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 bis 2 h. Vor der Zugabe der Sekundärintikörper wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Die Sekundärintikörper waren mit einer Peroxidase (*horse raddish peroxidase*, HRP) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Die Bindung der sekundären Antikörper Anti-*rabbit*-IgG-Peroxidase (Bindungspartner für polyklonale Antikörper) und Anti-*mouse*-IgG-Peroxidase (Bindungspartner für monoklonale Antikörper) erfolgte ebenfalls in Gegenwart von 2,5% (w/v) Magermilchpulver in PBS für 1 h.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die chemiluminometrische Detektion der sekundären Antikörper über die gekoppelte Peroxidase unter Verwendung des ECL-Systems (GE Healthcare, Freiburg) in einem Syngene-Detektionsgerät (Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK) nach Angaben des Herstellers. Die Blots wurden durch Quantifizierung der

Bandenintensitäten unter Verwendung der *Gene-Tools-Software* (Syngene Bio Imaging) semiquantitativ ausgewertet. Als interner Standard für den exakten Abgleich der detektierten Banden wurde  $\beta$ -Aktin (43 kDa) für die subzellulären Fraktionen T und C bzw. Kathepsin B (25 kDa) für die subzellulären Fraktionen E and L verwendet.

### 3.5.5.2 Immunoblotting zur Analyse der intrazellulären Stabilität

Jeweils 5 ml einer K562-Zellsuspension mit  $0.5-1 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden für 12-54 h mit 50  $\mu\text{M}$  GP<sub>3</sub>G-RNase A-Tandemenzym inkubiert. Nach der Ernte der Aliquots wurden die Zellen homogenisiert und zentrifugiert (3.5.3.1), um Fraktion T zu erhalten. Für jeden Zeitpunkt wurde jeweils die gleiche Menge an Protein (100 ng) auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (3.3.1) und elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Amersham Hybond™-ECL™ Nitrocellulose-Membran transferiert und wie unter 3.5.5.1 beschrieben visualisiert und quantifiziert.