

**Veränderung der Substratspezifität von Ribonuclease T1 und  
Einsatz des Enzyms in Immunotoxinen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

vorgelegt von

**Marc Struhalla**

aus Damme

Hamburg 2003

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Juli 1999 bis Februar 2003 am Institut für Biochemie der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. U. Hahn durchgeführt.

---

## Bibliographische Beschreibung

Struhalla, Marc

### **Veränderung der Substratspezifität von Ribonuclease T1 und Einsatz des Enzyms in Immunotoxinen**

Universität Hamburg, Dissertation

100 Seiten, 129 Lit., 32 Abb., 7 Tab., 6 Gleichungen

#### **Referat:**

Die Ribonuclease T1 (RNase T1) ist ein Enzym mit bemerkenswerten Eigenschaften. Auf der einen Seite stellt sie die Biowissenschaft vor schwierige Herausforderungen auf dem Gebiet des gerichteten Protein-Designs. Auf der anderen Seite stand RNase T1 häufig als Modellenzym zur Verfügung, wenn es darum ging, neuartige Methoden zu etablieren oder grundlegende Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Funktionalität von Proteinen zu gewinnen. Die hier vorliegende Arbeit befasste sich zum einen mit Experimenten, die zum Ziel hatten, die Substratspezifität der RNase T1 von Guanosin nach Adenosin zu verändern. In diesem Zusammenhang wurden zwei neue RNase T1-Varianten dargestellt, gereinigt und charakterisiert, die beide eine veränderte Substratspezifität aufweisen. Darüber hinaus wurde die Herausforderung einer Spezifitätsänderung der RNase T1 auch mit Methoden des evolutionären Protein-Designs angegangen. Hierbei konnte jedoch keine Verbesserung der Spezifitätsverschiebung erzielt werden, was vornehmlich durch ein nicht ausreichend effizientes *Screening*-Verfahren erklärt werden konnte. Aus diesem Grund wurde für zukünftige Experimente eine auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie beruhende *Screening*-Methode etabliert, welche unter Verwendung eines neuartigen, sehr einfach bereitzustellenden RNase-Substrates ein *Screening* von RNase-Bibliotheken mit mehr als 20.000 Klonen pro Platte möglich macht. Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Vorbereitung von Experimenten, in denen die Fähigkeit von bestimmten Peptiden getestet werden soll, durch kovalente Verknüpfung mit der RNase T1 in Zellen einzudringen und diese mit Hilfe der RNase-Aktivität abzutöten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNase T1 alle wichtigen Voraussetzungen für eine solche Anwendung erfüllt: Die freie RNase ist als Mediumbestandteil nicht toxisch, wird vom cytosolischen Ribonuclease Inhibitor nicht erkannt, lässt sich einfach chemisch modifizieren und wirkt in cytosolischer Lokalisation in geringen Mengen cytostatisch.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	V
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>1.1 Ribonuclease T1 (RNase T1)</b> .....	2
1.1.1 Die Substratspezifität von RNase T1 .....	3
1.1.2 Veränderung der Substratspezifität .....	4
<b>1.2 Evolutionäres Protein-Design</b> .....	6
1.2.1 DNA- <i>Shuffling</i> .....	7
<b>1.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)</b> .....	9
1.3.1 Zwei-Farben-FCS.....	11
1.3.2 Anwendungen der FCS .....	12
<b>1.4 RNasen als Chemotherapeutika</b> .....	13
1.4.1 Onconase <sup>®</sup> .....	13
1.4.2 ImmunoRNasen.....	14
<b>1.5 Zielstellung der Arbeit</b> .....	15
<b>2. MATERIAL</b> .....	16
<b>2.1 Technische Ausrüstung</b> .....	16
<b>2.2 Spezielle Software</b> .....	17
<b>2.3 Chemikalien</b> .....	18
<b>2.4 Bakterienstämme / Zelllinien</b> .....	18
<b>2.5 Enzyme und Proteine</b> .....	19
<b>2.6 Vektoren</b> .....	20
<b>2.7 Oligonucleotide</b> .....	22
<b>2.8 Kultivierungsmedien</b> .....	23
<b>2.9 QIAGEN-Reinigungs-Systeme</b> .....	24
<b>2.10 Molekulargewichtsstandards</b> .....	24
<b>3. METHODEN</b> .....	26
<b>3.1 Labortechnische Sicherheit</b> .....	26
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	26
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.2.1.1 Mutagene PCR .....	27
3.2.1.2 Primer-Überhang-Mutagenese .....	28
3.2.1.3 „Mega-Primer“-Mutagenese .....	28
3.2.2 DNA- <i>Shuffling</i> .....	29
3.2.2.1 DNase I-Fragmentierung.....	29

3.2.2.2 PCR ohne Primer .....	30
3.2.2.3 PCR mit Primern .....	30
3.2.3 Transformation .....	31
3.2.3.1 Präparation elektrokompeter Zellen .....	31
3.2.3.2 Elektroporation .....	31
3.2.4 Plasmidpräparation .....	32
3.2.4.1 Mini-Plasmidpräparation „alkalische Lyse“ .....	32
3.2.4.2 Plasmid-Isolation mittels kommerzieller Systeme .....	33
3.2.5 Konzentrierung und Reinigung von Nucleinsäuren .....	33
3.2.5.1 Alkohol-Fällung .....	33
3.2.5.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen .....	33
3.2.5.3 Reinigung von PCR-Produkten .....	34
3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	34
3.2.7 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen .....	34
3.2.8 Ligation von DNA .....	35
3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese .....	36
3.2.9.1 Native Agarose-Gelelektrophorese .....	36
3.2.9.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	37
3.2.10 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	37
3.2.11 DNA-Sequenzanalyse .....	38
<b>3.3 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Expression von RNase T1 in <i>E. coli</i> .....	38
3.3.2 Periplasma-Präparation .....	39
3.3.3 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie .....	39
3.3.4 Gelfiltration .....	40
3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
3.3.6 Bestimmung von RNase T1-Konzentrationen .....	41
3.3.7 Fluoreszenzmarkierung von RNase T1 .....	42
<b>3.4 Enzymologische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 RNase-Indikator-Platten .....	42
3.4.2 RNA-Hydrolyse .....	43
3.4.3 Zymogramm .....	44
3.4.4 Dinucleosidphosphat-Hydrolyse .....	44
3.4.4.1 Bestimmung der Basenspezifität mit Dünnschicht-Chromatographie .....	44
3.4.4.2 Michaelis-Menten-Kinetik .....	45
<b>3.5 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) .....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Allgemeiner Aufbau .....	46
3.5.2 Zweifarben-FCS .....	47
3.5.2.1 Geräteanordnung und -Konfiguration .....	47
3.5.3 Substrat-Hybridisierung .....	48
3.5.4 Versuchsdurchführung .....	49
3.5.4.1 Echtzeit-Messungen .....	49
3.5.4.2 Endpunkt-Messungen .....	50
<b>3.6 Zellkultur .....</b>	<b>50</b>
3.6.1 Kultivierung .....	50

3.6.2 Lipofectamin <sup>TM</sup> -Transfektion .....	51
3.6.3 Trypanblau-Färbung.....	51
3.6.4 Dokumentation .....	52
3.6.5 Fluoreszenzquantifizierung .....	52
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 RNase T1 Varianten E46N und Y45W/E46N .....</b>	<b>53</b>
4.1.1 Darstellung und Reinigung.....	53
4.1.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der isolierten Varianten.....	56
<b>4.2 Evolutionärer Ansatz zur Generierung von Spezifitätsvarianten .....</b>	<b>60</b>
4.2.1 Herstellung der Bibliotheken .....	60
4.2.2 <i>Screening</i> .....	62
<b>4.3 FCS-Messungen .....</b>	<b>65</b>
4.3.1 Substrat.....	65
4.3.2 Messung der Substrat-Spaltung in Echtzeit .....	68
4.3.3 Nachweisempfindlichkeit.....	69
4.3.4 Bibliotheks- <i>Screening</i> .....	70
4.3.4.1 Substratstabilität .....	71
4.3.4.2 Notwendigkeit RNase I-defizienter Stämme.....	71
4.3.4.3 Sensitivität des Screenings .....	74
<b>4.4 Einsatz von RNase T1 in Immunotoxinen.....</b>	<b>76</b>
4.4.1 RNase Inhibitor (RI).....	76
4.4.2 Chemische Modifizierung von RNase T1 .....	77
4.4.3 Toxizität von RNase T1 .....	79
4.4.4 Expression freier RNasen in Säugerzellen .....	79
4.4.4.1 Darstellung der Expressionsvektoren.....	80
4.4.4.2 Expression der RNasen in Zellkultur .....	82
4.4.5 Expression der RNasen als GFP-Fusionsproteine in Zellkultur.....	84
4.4.5.1 Darstellung der RNase-GFP-Expressionsvektoren .....	84
4.4.5.2 Expression der GFP-Fusionsproteine in Zellkultur.....	87
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin		galactopyranosid
Abb.	Abbildung	Kan	Kanamycin
Ac	Acetat	$k_{cat}$	Wechselzahl, molare Aktivität
Amp	Ampicillin	$K_M$	Michaelis-Konstante
ApC	Adenylyl-3',5'-cytidin	M	mol/l
APS	Ammoniumperoxydisulfat	$M_r$	relatives Molekulargewicht
Arg-Laser	Argon-Laser	min	Minute
AS	Aminosäuren	NTPs	Nucleosidtriphosphate
ATP	Adenosintriphosphat	OD	Optische Dichte
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser	p.A.	<i>pro Analysis</i>
bp	Basenpaar	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bzw.	beziehungsweise		
°C	Grad Celsius	pdb	Protein Datenbank
C	Cytosin	PEG	Polyethylenglykol
CTP	Cytidintriphosphat	RhG	Rhodamin Grün
Da	Dalton	Rh6G	Rhodamin 6G
DC	Dünnschichtchromatografie	RNA	Ribonucleinsäure
DEAE	Diethylaminoethyl	RNase	Ribonuclease
DEPC	Diethyldicarbonat	RSA	Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonucleinsäure	RT	Raumtemperatur
DNase	Desoxyribonuclease	s	Sekunde
d	Desoxy	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid	ss	Einzelstrang
ds	Doppelstrang	T	Thymin
DTT	Dithiothreitol	TAE	Tris/Acetat-EDTA-Puffer
E	Extinktion	TEMED	N,N,N',N',-Tetra-methylenethyldiamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EGFP	Optimiertes grün fluoreszirendes Protein	TTP	Thymintriphosphat
FBS	Fetales Rinderserum	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
FCS	Fluoreszenz Korrelations-Spektroskopie	U	Unit
		ü.N.	über Nacht
G	Guanin	Upm	Umdrehungen pro Minute
GFP	grün fluoreszierendes Protein	UV	Ultraviolett
GMP	Guanosinmonophosphat	v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
GpC	Guanylyl-3',5'-cytosin		
GTP	Guanosintriphosphat	w/v	Gewicht pro Volumen
h	Stunde	Wdh.	Wiederholung
HAc	Essigsäure	wt	Wildtyp
He/Ne-Laser	Helium/Neon-Laser		
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-		

**Tabelle 1:** Nomenklatur der Aminosäuren. Die aufgeführten verwendeten Drei- und Einbuchstaben-*Codes* der proteinogenen Aminosäuren entsprechen der IUPAC-Nomenklatur [1].

<b>Aminosäure</b>	<b>Drei- und Einbuchstaben- Code</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>Drei- und Einbuchstaben- Code</b>
Alanin	Ala / A	Leucin	Leu / L
Arginin	Arg / R	Lysin	Lys / K
Asparagin	Asn / N	Methionin	Met / M
Asparaginsäure	Asp / D	Phenylalanin	Phe / F
Cystein	Cys / C	Prolin	Pro / P
Glutamin	Gln / Q	Serin	Ser / S
Glutaminsäure	Glu / E	Threonin	Thr / T
Glycin	Gly / G	Tryptophan	Trp / W
Histidin	His / H	Tyrosin	Tyr / Y
Isoleucin	Ile / I	Valin	Val / V

## 1. Einleitung

Die Geschichte der Aufklärung von Funktion, Faltung und Aktivität von Proteinen ebenso wie die Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Manipulation und Produktion von Enzymen sind eng verknüpft mit der Untersuchung von Ribonucleasen. So war RNase A das erste Enzym, dessen Aminosäure-Sequenz bestimmt, und das dritte, dessen Struktur gelöst wurde. Eine Reihe von Ribonucleasen (RNase A, RNase T1, Barnase) stellt heutzutage die im Bezug auf Katalyse, Faltung und Stabilität mit am besten untersuchten Enzyme dar.

Ribonucleasen sind vornehmlich für ihre Fähigkeit bekannt, die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung des Ribonucleinsäure-Rückgrats zu katalysieren. Neben RNasen, die sequenzspezifisch einzelsträngige RNA-Substrate erkennen, wie z. B. das eine ribosomale RNA-Sequenz spaltende  $\alpha$ -Sarcin [2], sind gänzlich unspezifische ssRNA-spaltende Ribonucleasen wie die RNase I [3] oder Nucleotid-spezifische RNasen charakterisiert worden. Beispiele hierfür sind die Purin-spezifische RNase U2 [4] mit geringer Adenosin-Präferenz oder die Guanosin-spezifische RNase T1 [5]. In jüngerer Zeit sind des Weiteren eukaryotische doppelstrangspezifische RNasen wie z. B. RNase III aus Hefe [6] oder die spezifisch den RNA-Strang in RNA/DNA-Helices spaltenden RNase H-Domänen als Bestandteil viraler reverser Transkriptasen [7] identifiziert worden.

Ribonucleasen erfüllen in der Natur ein breit gefächertes Spektrum biologischer Funktionen und sind ubiquitär vorhanden. Sie spielen eine Rolle bei der Nahrungsverdauung (pankreatische Ribonucleasen), sowie in zellulären Ab- und Umbauprozessen (lysosomale Ribonucleasen). Sie sind von zentraler Bedeutung bei der tRNA- und rRNA-Prozessierung (RNase P, RNase III, RNase E) und sind an der Regulation der Proteinsynthese durch Steuerung der mRNA-Degradation beteiligt (Degradosom), [8].

Neben diesen eher klassischen Funktionen ribonucleolytischer Enzyme sind zusätzlich in den letzten Jahren eine Reihe von gänzlich neuen Eigenschaften von RNasen entdeckt worden. So z. B. die *bovine seminal ribonuclease*, welche immunsuppressiv wirkt und gegenüber Tumoren einen toxischen Effekt aufweist [9], oder Angiogenin, eine das Wachstum neuer Blut-Gefäße fördernde Plasma-Ribonuclease [10]. Des Weiteren wurden eine Reihe von Ribonucleasen mit cytotoxischen Eigenschaften (Ribotoxine) isoliert, die von verschiedenen Schimmelpilzen sekretiert werden und deren bekanntester Vertreter das  $\alpha$ -Sarcin ist [11].

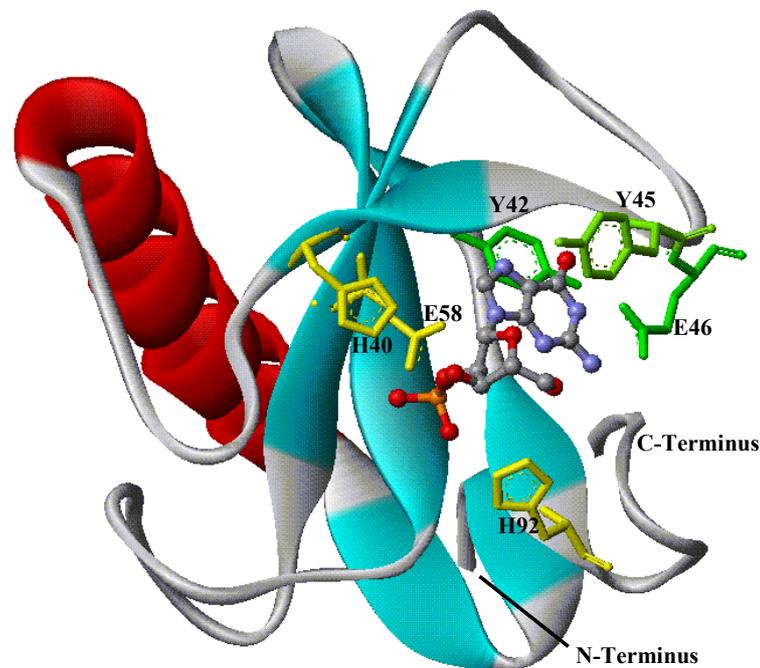
## 1.1 Ribonuclease T1 (RNase T1)

Ribonuclease T1 (EC 3.1.27.3) ist der bekannteste Vertreter einer Enzymfamilie aus ca. 25 verwandten mikrobiellen, extrazellulären Ribonucleasen und ist im Bezug auf Struktur und Katalyse eines der bestuntersuchten Enzyme überhaupt [12]. Die T1-Familie ist die am weitesten über evolutionäre Grenzen hinweg verbreitete Proteinfamilie, die RNasen sowohl prokaryotischen als auch eukaryotischen Ursprungs beinhaltet [13]. RNase T1, welche von dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* sekretiert wird, ist ein kleines, globuläres Eindomänen-Protein aus 104 Aminosäure mit einem relativen Molekulargewicht von 11085 Da. Das Enzym wurde erstmals aus einer als „Takadiastase“ bezeichneten Fraktion des Kulturüberstandes der Reisweingärung isoliert [14] und tritt in zwei Isoformen auf, die in Aminosäureposition 25 entweder ein Glutamin oder ein Lysin aufweisen [12]. In dieser Arbeit ist mit der Bezeichnung RNase T1 immer die Lys25-Isoform gemeint. RNase T1 ist ein sehr saures Protein ( $pI = 3,5$ ) mit hoher Resistenz gegenüber Temperatur- und pH-Schwankungen, sowie einer guten Wasserlöslichkeit [15]. Das Enzym spaltet ssRNA spezifisch nach Guanylsäure-Resten (vgl. 1.1.1). 1982 wurde die Tertiärstruktur der RNase im Komplex mit dem Inhibitor 2'-GMP gelöst [16]. Nachdem die Primärstruktur des Proteins 1965 publiziert wurde [17], gelang 1988 die chemische Gen-Synthese [18], was die Expression der RNase in *Escherichia coli* und damit die Bereitstellung großer Proteinmengen und den Beginn von Struktur/Funktions-Studien auf der Basis gezielter Punktmutationen ermöglichte [19]. Mittlerweile sind eine große Anzahl von Strukturen mittels Röntgenstruktur- und NMR-Analysen sowohl von der Wildtyp-RNase im freien Zustand [20, 21] und im Komplex mit verschiedenen Liganden [22-24], als auch von einer großen Anzahl von RNase T1-Varianten [25-27] gelöst worden.

Die dreidimensionale Struktur von RNase T1 (wt) zeigt das Enzym mit einer 4,5 Windungen langen  $\alpha$ -Helix und zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblattbereichen (Abb. 1). Zwei Disulfidbrücken zwischen Cys2 und Cys10 sowie zwischen Cys6 und Cys103 tragen zu der hohen Stabilität des Enzyms bei.

RNase T1 ist in einem weiten pH-Bereich aktiv und benötigt für die Aktivität keinerlei Cofaktoren. Die Katalyse der Spaltung von Phosphodiesterbindungen in einzelsträngigen RNA-Bereichen am 3'-Ende von Guanylsäure-Resten erfolgt in einer zweistufigen, Säure-Base-katalysierten Reaktion, an der die Aminosäuren Tyr38, His40, Glu58, Arg77 und His92 beteiligt sind. Während Arg77 und Tyr38 das Phosphat im katalytischen Zentrum positionieren und den Übergangszustand der Reaktion stabilisieren [28], stellt His92 die Säure [16] und Glu58 kooperativ mit His40 die Base im katalytischen Zentrum dar [29, 30]. Im ersten Katalyseschritt

erfolgt nach Abstraktion des Protons der 2'-OH-Gruppe durch Glu58/His40 eine Umesterung der Phosphodiesterbindung über einen pentakovalenten Übergangszustand unter Bildung eines zyklischen Guanylyl-2',3'-Phosphats, welches in einem zweiten Schritt hydrolysiert wird. Die Abgangsgruppe wird durch His92 protoniert [16, 31, 32].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von RNase T1 (wt) im Komplex mit 2'-GMP. Die Abbildung wurde mit der Software „WebLabViewer Lite“ und den Daten aus der pdb-Datei „1RNT“ [22] erstellt. Die Aminosäurekette ist als „solid ribbon“, das 2'-GMP als „ball and stick“ und Aminosäure-Seitenketten als „stick“ dargestellt. Farbkodierung: rot:  $\alpha$ -Helix; türkis:  $\beta$ -Faltblatt; gelb: an der Katalyse beteiligte AS-Seitenketten; grün: an der Guanin-Bindung beteiligte AS-Seitenketten. Das 2'-GMP ist in den Elementfarben dargestellt.

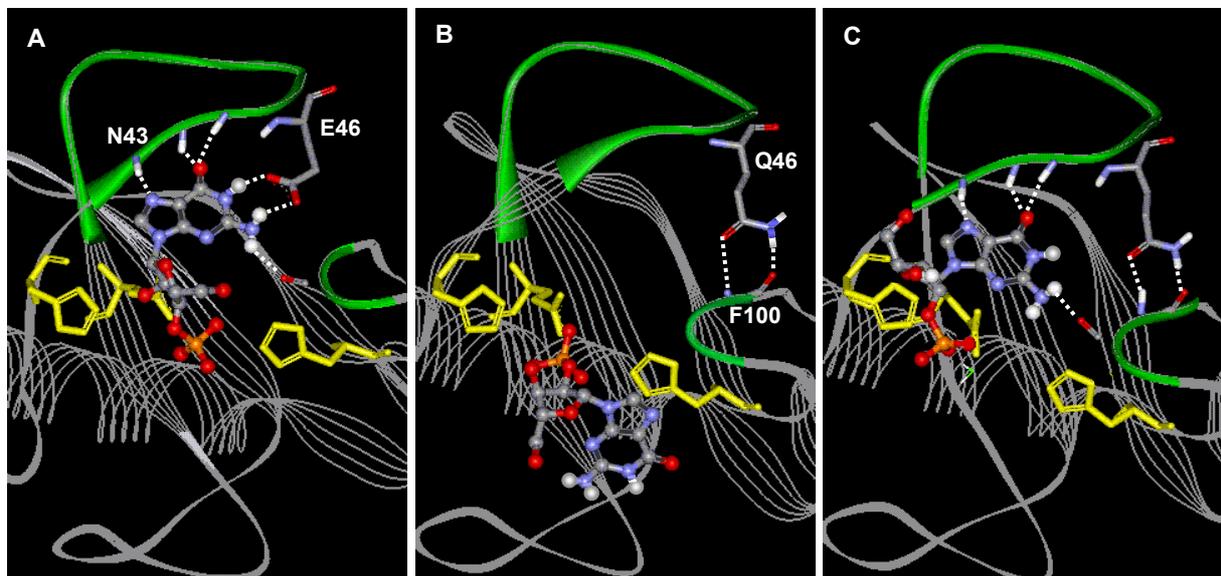
Aufgrund ihrer hohen Spezifität für Guanin wird RNase T1 für RNA-Sequenzierungen [33] und -Kartierungen [34], sowie für *Footprint*-Experimente [35] verwendet. Des Weiteren hat sie sich aufgrund der relativ kleinen Größe, ihres einfachen Aufbaus und ihrer hohen Stabilität zu einem Modellprotein zur Untersuchung von Enzymspezifität [36], Proteinstabilität [37] und Proteinfaltung [38, 39] entwickelt.

### 1.1.1 Die Substratspezifität von RNase T1

RNase T1 spaltet einzelsträngige RNA mit hoher Spezifität am 3'-Ende von Guanylsäure-Resten. Die Umsatzraten für die Minimal-RNA-Substrate GpC, ApC, CpC und UpC stehen im Verhältnis  $10^8:10^2:1$  (G:A:U/C), [40]. Die hohe Präferenz für Guanin erklärt sich, wenn man

einen Blick auf die Substrat-Bindungstasche des Enzyms wirft (Abb. 2A): Das Wasserstoffbrücken-Bildungspotential der Guanin-Base ist mit Ausnahme des N3 komplett mit Wechselwirkungen zum Proteinrückgrat und zur Seitenkette des Glu46 abgesättigt, wobei an der Guanin-Bindung neben dem Asn98 der von den Aminosäure 42-46 ausgebildete *Loop* beteiligt ist. Zusätzlich dazu ist im Wildtyp-Protein die Nucleotid-Base zwischen den beiden aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tyr42 und Tyr45 über hydrophobe Wechselwirkungen *sandwich*-artig eingeschlossen (Abb. 1), [16].

Ebenso wie für die primäre Bindungsstelle (n) besitzt RNase T1 außerdem eine Spezifität in der sekundären Bindungsstelle (n+1). Hier zeigt sich eine Bevorzugung von Cytidin-Resten (GpC > GpA > GpG > GpU; [41]).



**Abbildung 2:** Vergleich der GMP-Bindung in **A:** RNase T1 wt [28], **B:** RNase T1 E46Q [42] und **C:** RNase T1 9/5 [25]. Die Abbildungen wurden mit dem Programm „WebLabViewer Lite“ und den Daten aus den pdb-Dateien „1RGC“, „1RGL“ und „1CHO“ dargestellt. Aminosäure-Seitenketten sind als „stick“, Inhibitoren als „ball and stick“ und die Aminosäurekette als „line ribbon“ dargestellt. Die an der Guanin-Bindung beteiligten *Loops* sind grün, an der Katalyse beteiligte AS-Seitenketten gelb eingefärbt.

### 1.1.2 Veränderung der Substratspezifität

RNase T1 war immer wieder das Untersuchungsobjekt von Protein-Design-Studien, häufig mit dem Ziel, die Spezifität des Enzyms zu verändern. Aufgrund der spezifischen Natur seiner Seitenketten-Interaktion mit der Guanin-Base war die Aminosäure Glu46 der Hauptangriffspunkte für die Realisierung dieser Zielsetzung. Theoretische Strukturvorhersagen führten zu dem Postulat, dass ein Aminosäure-Austausch Glu46Gln zu einer höheren relativen Affinität zu Adenin führen sollte [43]. Die Amid-Gruppe der Glutamin-Seitenkette war dafür vorgese-

hen, N-H-Donoren für Wasserstoffbrücken mit dem N1 der Adenin-Base bereitzustellen. Die Darstellung und kinetische Charakterisierung dieser Variante ergab allerdings, dass sich zum einen die Aktivität des Enzyms stark reduzierte und zum anderen keine Veränderung in der Substratspezifität in Richtung einer Adenin-Bevorzugung zu beobachten war [42]. Außerdem konnten die Röntgenkristall-Strukturen der Variante im Komplex mit 2'-GMP und 2'-AMP gelöst werden [42]. Beide Nucleosidphosphate werden nicht in der primären Bindungsstelle gebunden und die Amid-Gruppe der Gln46-Seitenkette ist fest in einem zweizähligen Modus an die Proteinrückgrat-Gruppen des Phe100 gebunden (Abb. 2B).

Neben diesem und anderen Experimenten mit rationalem Protein-Design, die allesamt zu keiner RNase T1-Variante mit einer veränderten Substratspezifität führten, wurden auch kombinatorische Ansätze herangezogen. Ausgehend von einer RNase T1-Variante mit einem Stop-Codon in Aminosäure-Position 41 wurde eine Varianten-Bibliothek erstellt, in welcher der Guanin-Bindungs-*Loop* von AS-Position 41 – 46 durch Zufallsmutagenese randomisiert wurde. Unter 1,8 Millionen Klonen dieser Bibliothek konnten 180 aktive Klone identifiziert werden, von denen für eine Variante eine leicht erhöhte Aktivität nach Adenylsäure-Resten nachweisbar war, was durch Dinucleosid-Phosphat-Spaltungsexperimente gezeigt wurde [36]. Allerdings wies auch diese Variante (RNase T1 8/3) deutlich höhere Umsatzraten mit GpC als mit ApC als Substrat auf. Neben der Variante 8/3 wurde innerhalb der generierten Bibliothek eine weitere interessante RNase T1-Variante identifiziert, bei der die Wildtyp-*Loop*-Sequenz 41-KYNNYE-46 zu 41-EFRNWQ-46 mutiert ist (RNase T1 Variante 9/5). Die Variante ist Guanin-spezifisch und weist 1,8 % Wildtyp-Aktivität mit hochmolekularer RNA als Substrat auf [25]. Die Röntgenkristall-Struktur dieser Variante, in der das in der RNase T1-Familie hochkonservierte Glu46 wie in der oben beschriebenen Variante E46Q durch ein Glutamin ersetzt ist, konnte im Komplex mit 3'-GMP gelöst werden [25]. Bemerkenswerterweise ist hier der Inhibitor in der primären Bindungstasche gebunden, obwohl die Glutamin-Seitenkette ebenfalls aus der Bindungstasche heraus Wasserstoffbrücken zum Phe100 ausbildet (Abb. 2C), was im Fall der Variante E46Q für die Verkleinerung der Bindungstasche und damit für die Verdrängung des Inhibitors verantwortlich gemacht wurde.

Ein anderer kombinatorischer Ansatz, bei dem eine Randomisierung der Aminosäure-Position 46 kombiniert wurde mit der Erweiterung des Bindungs-*Loops* um eine, ebenfalls permutierte AS in der Position 47, konnte die RNase T1-Variante E46S(*insert*)Gly identifiziert werden [44]. Sie weist eine 9fach erhöhte ApC-Spaltung und stark reduzierte GpC-Spaltung auf, was zu einer Verschiebung des Spezifitäts-Verhältnisses ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{GpC}) / k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{ApC})$ ) im Vergleich zum Wildtyp um dem Faktor 3000 in Richtung Adenosin-Bevorzugung führt, so dass

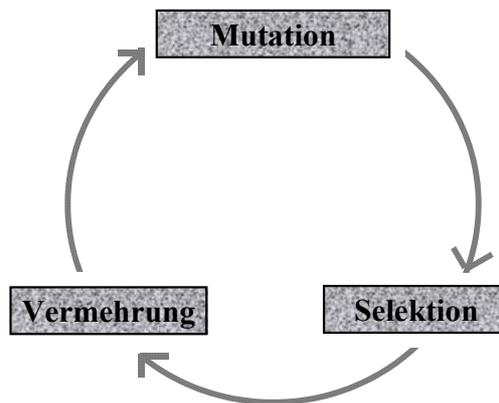
diese Variante GpC nur noch etwa 100 mal besser spaltet als ApC.

Unlängst wurde in unserer Arbeitsgruppe in der oben beschriebenen RNase T1 Variante 9/5 der Austausch Q46N vorgenommen, was einer Verkürzung der Seitenkette um eine Methylengruppe entspricht. Die kinetische Charakterisierung dieser Variante ergab eine 75-fach erhöhte ApC-Spaltung im Vergleich zum Wildtyp, die höchste Rate aller bisher charakterisierten RNase T1-Varianten. Sie geht einher mit einer starken Reduktion der GpC-Spaltung, was das Spezifitäts-Verhältnis um den Faktor 7800 verschiebt, so dass diese Variante GpC nur noch 40-mal besser als ApC spaltet [45]. Außerdem konnte die Röntgenkristall-Struktur des freien Enzyms gelöst werden, welche zeigt, dass die Amidgruppe der Asparagin-Seitenkette für eine Beteiligung an der Basenbindung in der Substrat-Bindungstasche bereit zu stehen scheint [45], sowie dies für die Glutamin-Seitenkette in der Variante E46Q postuliert wurde.

## 1.2 Evolutionäres Protein-Design

Die Voraussetzung für ein rationales Protein-Design ist die Kenntnis der Struktur des Proteins. Doch selbst wenn diese bekannt ist, und RNase T1 ist hierfür ein gutes Beispiel, ist der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion so komplex und die Vorhersage des Einflusses von Veränderungen der Primärstruktur eines Proteins auf seine Faltung so schwierig, dass ein rationales Protein-Design häufig nicht zu einer Veränderung der Protein-Eigenschaften in die gewünschte Richtung führt. Als Alternative zu einer rationalen Vorgehensweise können Protein-Bibliotheken verwendet werden, in denen die Variationen der Einzel-Klone durch zufällige Permutation zustande kommen. Ein Beispiel für diese Herangehensweise stellen die unter 1.1.2 beschriebenen kombinatorischen Experimente mit RNase T1 dar. Je größer hierbei die verwendete Bibliothek desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass in dieser eine Variante mit der gewünschten Eigenschaft vorhanden ist. Limitierender Faktor hierbei ist die Tatsache, dass in solchen Ansätzen jede Protein-Variante einzeln getestet werden muss. Um dieses Problem der Vereinzelung zu umgehen, sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, die es ermöglichen, den Phänotyp eines Proteins mit seinem Genotyp zu koppeln. Beispiele hierfür sind das „*phage display*“ [46] oder das „*ribosome display*“ [47]. Hierbei kann mit sehr großen Bibliotheken ( $10^8$  bis  $10^{11}$  Individuen) gearbeitet werden. Die Herausforderung liegt im Finden geeigneter Methoden, um die Varianten mit der gewünschten Eigenschaft aus der Bibliothek abzutrennen. Dies limitiert diese Methoden weitestgehend auf die Selektion von Bindungseigenschaften durch Affinitäts-basierte Trennungsv erfahren. Praktisch erfolgt das Reduzieren der komplexen Start-Bibliothek auf wenige individuelle Klone in einem dem Kreislauf der

biologischen Evolution (Abb. 3) ähnlichen, zyklischen Prozess aus Selektion und Amplifikation, der solange wiederholt wird, bis die Varianten, welche die Selektionskriterien am besten erfüllen, den selektierten *Pool* dominieren. Der auf DNA-Ebene ablaufende Vermehrungsschritt bietet hierbei die Möglichkeit der Einführung zusätzlicher Mutationen, worauf allerdings aufgrund der hohen Diversität der einsetzbaren Bibliotheken häufig verzichtet wird.



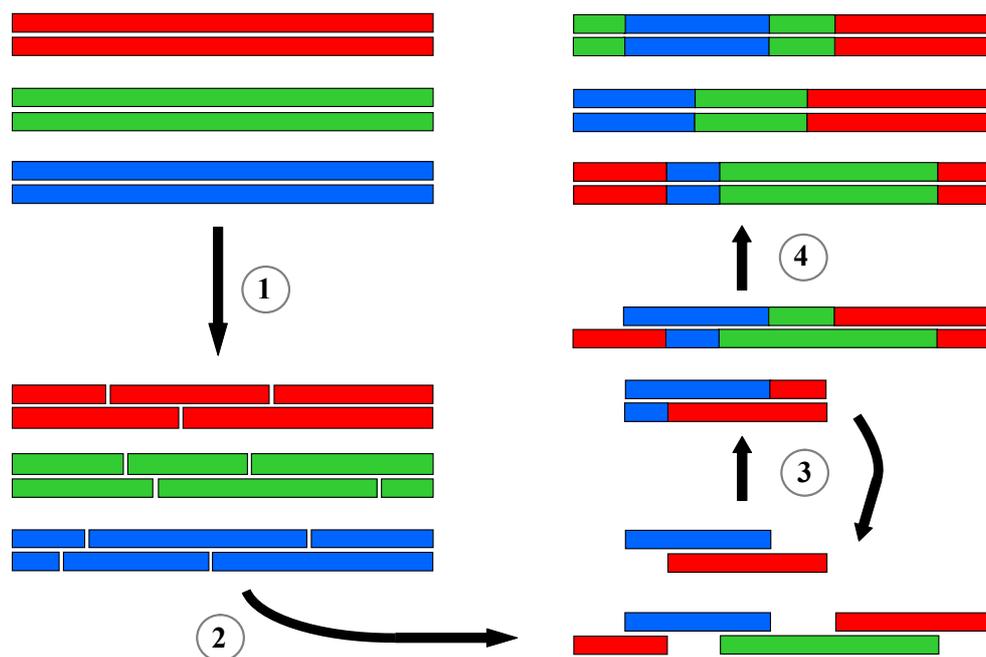
**Abbildung 3:** Kreislauf der biologischen Evolution.

Der Prozess der biologischen Evolution beinhaltet einen entscheidenden Aspekt, der in den bisher vorgestellten Methoden nicht enthalten ist: Die Rekombination. Mit der 1994 von Stemmer eingeführten Methode des DNA-*Shufflings* [48, 49], stand erstmalig ein relativ einfaches Protokoll zur Verfügung, mit dem eine homologe Rekombination auf DNA-Ebene möglich wurde.

### 1.2.1 DNA-*Shuffling*

Während der Vorteil von Methoden wie dem *phage display* oder dem *ribosome display* vornehmlich in der Größe der nutzbaren Komplexität und in der Tatsache liegt, dass ein individuelles Testen von Einzel-Klonen nicht nötig ist, liegt die Limitation dieser Methoden in dem Design eines geeigneten Selektionsverfahrens. So gibt es nur wenige Beispiele für eine erfolgreiche Selektion katalytischer Aktivitäten mit diesen Methoden [50, 51]. Eine Alternative weist die Idee der molekularen Evolution von Proteinen: Wiederholte Zyklen aus Punkt-Mutationen, Rekombination und Selektion. Computer-Simulationen („*genetic algorithms*“) haben gezeigt, dass für eine Evolution komplexer linearer Sequenzen neben Punktmutationen Rekombinations-Ereignisse essentiell sind [52]. Eine Rekombination von Sequenzbereichen ermöglicht zum einen eine Eliminierung nachteiliger Mutationen und zum anderen die

Kumulation vorteiliger Mutationen, was eine sukzessive Verbesserung der *Pool*-Eigenschaften im Sinne des Selektionskriteriums bewirkt. Die Effizienz dieses evolutionären Vorgangs führt dazu, dass die Größe der pro Runde getesteten Bibliotheken im Vergleich zu anderen Methoden deutlich kleiner sein darf, so dass ein individuelles Testen von Einzel-Klonen möglich ist. In vielen Fällen waren etwa 10000 Varianten pro Runde ausreichend [53, 54]. Abbildung 4 zeigt, wie die DNA-Rekombination homologer Sequenzen mit Hilfe des *DNA-Shufflings* im Labor realisiert wird.



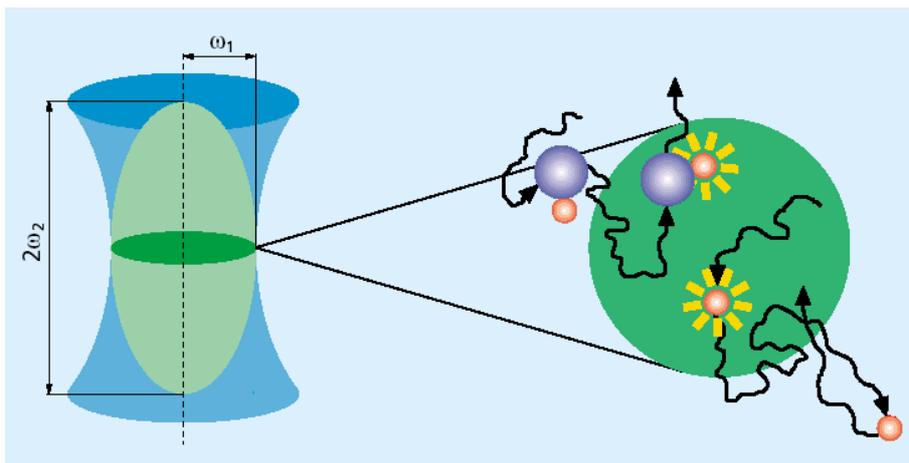
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des *DNA-Shuffling*-Protokolls. **1:** Ein *Pool* homologer Gene wird durch DNase I-Behandlung fragmentiert. **2:** Die Fragmente werden denaturiert. Es kommt zur Hybridisierung homologer Bereiche. **3:** Beim Durchlaufen eines PCR-Programmes ohne die Zugabe von Primern erfolgt ein Wiederaufbau der Gene zu ihrer ursprünglichen Länge, wobei es zu einer Rekombination von Sequenzblöcken der eingesetzten Gene kommt. Gleichzeitig entstehen Punktmutationen mit einer Mutationsrate von etwa 0,7 %. [48] **4:** In einer zweiten PCR bei der spezifische Primer zur Amplifikation des Gesamtlängen-Fragmentes zugesetzt werden, erhält man homogene, klonierbare PCR-Produkte.

Mittlerweile wurde das *DNA-Shuffling* für eine große Zahl von Anwendungen erfolgreich eingesetzt. Neben der molekularen Evolution von Enzymen mit veränderten Substrat-Spezifitäten [55, 56], erhöhter katalytischer Aktivität [57] oder mit erhöhter Thermostabilität [58], wurde beispielsweise auch eine substratabhängige Optimierung eines Faltungshelfer-Proteins [59] oder die Verbesserung der Expression eines Interleukins in Säuger-Zelllinien beschrieben [60].

### 1.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Grundlagen für das analytische Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurden schon in den Achtziger Jahren von Magde *et al.* [61] sowie Ehrenberg und Rigler [62] zur Untersuchung der Dynamik chemischer Gleichgewichtsreaktionen und molekularer Diffusionsprozesse gelegt, doch erst technische Entwicklungen im Bereich der Optik, der Rechen-technik und der Detektion ermöglichten dieser Methode in den letzten 10 Jahren den Durchbruch.

Basales Prinzip der FCS-Technologie ist die konfokale Detektion einer durch Laserlicht angeregten fluoreszenzmarkierten Probe (vgl. 3.5.1). Das Detektionsvolumen beträgt hierbei weniger als  $10^{-15}$  Liter, was in etwa der Größenordnung eines *Escherichia coli*-Bakteriums entspricht. Aufgrund der Kleinheit des Volumenelementes ist das Signal/Rausch-Verhältnis sehr hoch, was eine Diskriminierung eines Photonenschauers ausgehend von einem einzelnen Molekül gegen den Hintergrund erlaubt. Technisch realisierbar wurde eine derart sensitive Detektion durch die Entwicklung empfindlicher Einzelphotonenzähler (*Avalanche*-Photodioden). Fluoreszenzmarkierte Moleküle diffundieren aufgrund ihrer Brownschen Molekularbewegung in einer Lösung und durchqueren dabei das konfokale Volumen: Es kommt zur Emission von Fluoreszenz-Photonen für den Zeitraum der Aufenthaltsdauer des Moleküls im Volumenelement (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Das Messprinzip von FCS. Das Bild zeigt schematisch die Dimensionen des konfokalen Volumens ( $\omega_1 = 0,3 \mu\text{m}$ ,  $2\omega_2 = 1,5 \mu\text{m}$ ; Angaben für das ConfoCor 2). Diffundiert ein fluoreszenzmarkiertes Molekül durch das Volumenelement wird dieses angeregt und die abgegebene Fluoreszenzstrahlung wird durch die Optik einem Detektor zugeführt (Quelle: CARL ZEISS GmbH, Jena. URL: [www.zeiss.de/fcs](http://www.zeiss.de/fcs)).

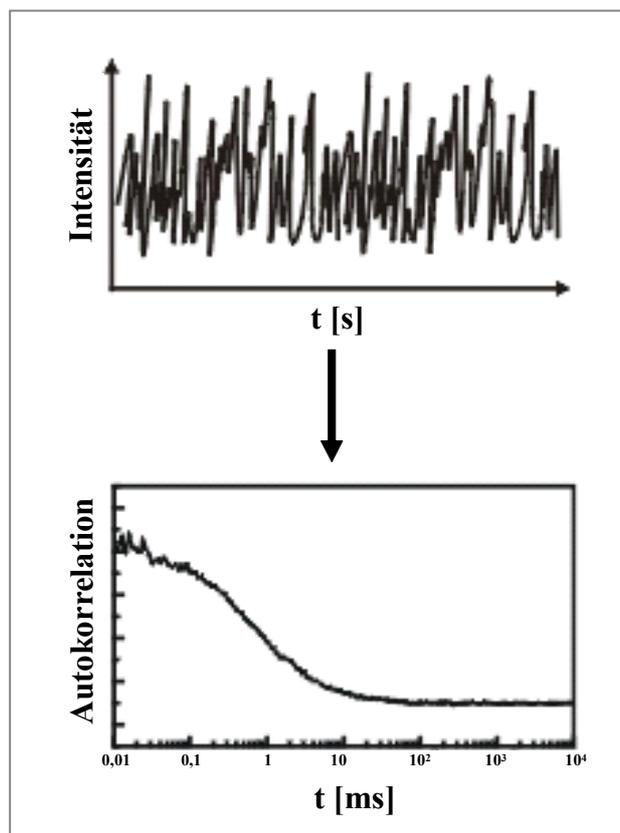
Wie viele Moleküle in das Detektionsvolumen hinein- oder herausdiffundieren unterliegt dem Zufall, was eine statistische Auswertung des Fluoreszenzsignals notwendig macht. Vorausset-

zung hierfür sind ausreichend viele Moleküldurchgänge, wobei bereits 100 Moleküldurchgänge ausreichen, um die charakteristische Diffusionszeit der Probenmoleküle und deren Anzahl im Volumenelement zu bestimmen. Die spezifische Diffusionszeit  $\tau_D$  einer Molekülsorte, die identisch ist mit deren durchschnittlicher Aufenthaltsdauer, hängt ab von der Größe des konfokalen Volumens und von der Diffusionskonstante  $D$ , und damit von der Größe des Moleküls. Die Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie beruht letztlich also auf dem Messen der molekülgrößen-abhängigen Diffusionsgeschwindigkeit. Es gilt:

$$\tau_{Diff} \sim \sqrt[3]{M_r} \quad (1)$$

Eine Verachtfachung der Masse eines Moleküls führt also zu einer Verdopplung der Diffusionszeit.

Das primäre Messsignal einer FCS-Messung besteht aus einer Fluoreszenzintensitätsfluktuation welche über einen gewissen Zeitraum hinweg aufgenommen wird (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Berechnung von Autokorrelationsfunktionen. Die gemessenen Intensitätsfluktuationen werden an Autokorrelationsfunktionen angepasst. Aus der Korrelationskurve ergeben sich der reziproke Wert der Anzahl der Moleküle im Detektionsvolumen  $1/N$  als Höhe der Amplitude zum Zeitpunkt  $\tau = 0$  und die charakteristische Diffusionszeit  $\tau_D$  als Wendepunkt der Kurve.

Die Auswertung der Primärdaten erfolgt dann durch ein spezielles statistisches Verfahren, der Autokorrelations-Analyse, welches dazu dient, charakteristische Zahlenwerte wie die Diffusionszeit und die mittlere Anzahl der Moleküle im Volumenelement zu gewinnen. Die Autokorrelationsfunktion beschreibt die Ähnlichkeit des Intensitäts-Signals mit sich selbst zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Autokorrelationsfunktion für ein ellipsoidförmiges Detektionsvolumen mit gaußförmiger Intensitätsverteilung für eine Sorte fluoreszierender Moleküle lautet:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{S^2} \cdot \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)}} \quad (2)$$

- N = mittlere Molekülanzahl im Detektionsvolumen
- $\tau$  = Korrelationszeit
- $\tau_D$  = charakteristische Diffusionszeit
- S =  $\omega_2/\omega_1$  Strukturparameter
- $\omega_1$  = Radius des Detektionsvolumens in Strahlrichtung
- $\omega_2$  = Radius des Detektionsvolumens senkrecht zur Strahlrichtung

Sind in der Probenlösung fluoreszenzmarkierte Moleküle unterschiedlicher Größe vorhanden, zum Beispiel aufgrund der Anwesenheit eines Bindungspartners, werden die Daten an modifizierte Autokorrelationsfunktionen für entsprechende Zwei-Komponenten- bzw. auch Drei-Komponenten-Systeme angepasst. Neben den spezifischen Diffusionszeiten lassen sich aus den angepassten Funktionen auch die Verhältnisse der Komponenten zueinander ableiten.

### 1.3.1 Zwei-Farben-FCS

Sollen mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie biophysikalische Phänomene untersucht werden, bei denen die Größenunterschiede der zu differenzierenden molekularen Zustände zu klein sind, bietet die Zwei-Farben-FCS eine Lösung. Hierbei kommen mit zwei Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Moleküle zum Einsatz, deren spektralen Eigenschaften deutlich voneinander trennbar sind. Das konfokale Volumen wird mit zwei Anregungs-Wellenlängen ausgeleuchtet und die Emissionssignale der beiden Farbstoffe werden optisch getrennt und in zwei voneinander unabhängigen Detektionskanälen registriert und miteinander korreliert (vgl. 3.5.2). Hierbei erfolgt zum einen die Autokorrelations-Analyse der beiden Einzelsignale und darüber hinaus eine Kreuzkorrelationsanalyse, die beschreibt, ob die Aufenthaltswahrscheinlichkeit beider Fluoreszenz-Farbstoffe im konfokalen Volumen in einem zeitli-

chen Zusammenhang stehen, ob also zweifach markierte Moleküle in der Lösung vorhanden sind und in welcher Menge. Die Amplitudenhöhe der Kreuzkorrelations-Funktion ist hierbei direkt proportional zur durchschnittlichen Anzahl doppeltmarkierter Moleküle im Volumenelement.

### 1.3.2 Anwendungen der FCS

Seitdem Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskope kommerziell vertrieben werden, kommt die FCS auch in den Biowissenschaften vielfältig zur Anwendung. Neben *in vitro*-Experimenten mit dem Ziel der Analyse molekularer Wechselwirkungen [63-65], enzymkinetischer Untersuchungen [66, 67] oder zu diagnostischen Zwecken [68, 69], sind mittlerweile auch eine Reihe von *in vivo*-Studien zum Beispiel von endocytotischen Prozessen [70] oder zur Rezeptor-Aggregation in Membranen durchgeführt worden [71].

In der Reihe der Zwei-Farben-FCS-Studien, die sich mit dem Nachweis und der Charakterisierung von Enzym-Aktivitäten beschäftigen (Übersichtsartikel: siehe [72]), wurde auch ein RNase-Assay auf der Basis einer *gapped* Heteroduplex etabliert [73]. Zwei fluoreszenzmarkierte (Cy5 und Rhodamin Grün) DNA-Oligonucleotide wurden mit einem RNA-Oligonucleotid hybridisiert, so dass in der Mitte des Konjugates ein einzelsträngiger Bereich mit einer RNase T1-Schnittstelle frei bleibt (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Substrat für die Messung von RNase-Aktivität mittels Zwei-Farben-FCS [73]. Es wurde eine *gapped* Heteroduplex bestehend aus einem Ribo-Oligonucleotid und zwei zu dessen Enden komplementären Desoxy-Oligonucleotiden verwendet. Eines der Oligonucleotide war mit Cy-5 und das andere mit Rhodamin Grün markiert. Die potentielle Schnittstelle für RNase T1 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Quelle: Dissertation Kerstin Korn 1999 [73].

Mittels Kreuzkorrelationsanalyse konnte eine Spaltung dieses Substrats durch RNase T1 mit einer Sensitivität von  $10^{-12}$  mol nachgewiesen werden. Als problematisch erwies sich die Verunreinigung der Substrat-Lösung sowohl durch freie Farbstoffmoleküle als auch durch die markierten DNA-Oligonucleotide trotz aufwändiger Reinigungsprozeduren, was eine

sensitivere Detektion verhinderte [73]. Indem einer der beiden Farbstoffe im Substrat durch einen Biotin-Rest ersetzt wurde, konnte eine Immobilisierung und damit auch gleichzeitig eine Reinigung des Substrats erzielt werden. Durch RNase T1-Zugabe konnte eine Spaltung des immobilisierten Substrates anhand des mittels Autokorrelation detektierten Photonenschauers detektiert werden [74]. Der fluoreszenzmarkierte Teil des Substrates wird hierbei von der Glasoberfläche abgespalten und diffundiert durch das oberhalb der Oberfläche positionierte Volumenelement. Die Sensitivität dieses Assays betrug  $10^{-21}$  mol, was in etwa 600 RNase T1 Molekülen entspricht [74].

## 1.4 RNasen als Chemotherapeutika

Ribonucleasen, die eine zeitlang als reine Verdauungsenzyme betrachtet wurden, sind in den letzten Jahren wieder stark in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da eine Reihe von Vertretern dieser Enzymklasse mit erstaunlichen Eigenschaften identifiziert werden konnten (vgl. 1). RNasen haben - eine cytosolische Lokalisation vorausgesetzt - aufgrund ihrer Fähigkeit den Abbau von RNA-Molekülen zu katalysieren ein hohes cytotoxisches Potential. So führt eine Mikroinjektion von RNase A, welche ansonsten in extrazellulärer Lokalisation weitestgehend unschädlich ist, in *Xenopus* Oozyten zum Abbruch der Protein-Synthese und letztlich zum Zelltod [75]. Darüber hinaus sind aber auch RNasen identifiziert worden, die *in vitro* und *in vivo* eine echte cytotoxische Wirkung zeigen. So zum Beispiel die bakteriellen Cytotoxine Colicin E3 [76] and Colacin Df13 [77] oder das von dem Schimmelpilz *Aspergillus giganteus* sekretierte  $\alpha$ -Sarcin [78]. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Ribotoxine ist die Onconase<sup>®</sup>. Onconase<sup>®</sup> ist eine Ribonuclease aus der RNase A-Familie und befindet sich zurzeit in klinischen Studien der Phase III als Chemotherapeutikum zur Behandlung bestimmter Krebsarten [79].

### 1.4.1 Onconase<sup>®</sup>

Onconase<sup>®</sup> ist eine zur RNase A homologe RNase, welche in den Oozyten und in den frühen Embryos des nördlichen Leopardenfrosches *Rana ripiens* anzufinden ist [80]. Ebenso wie RNase A katalysiert das Enzym die Spaltung von RNA-Molekülen am 3'-Ende von Pyrimidin-Nucleosiden. Doch bevor diese ribonucleolytische Aktivität überhaupt bekannt wurde, konnte eine Antitumor-Wirkung des Proteins nachgewiesen werden [81]. Die toxische Wirkung von Onconase<sup>®</sup> kommt gegenüber proliferierenden Zellen stärker zum Ausdruck, was die selektive

gegen bestimmte Krebsarten gerichtete antitumorale Wirkung teilweise erklärbar macht. Wie das Enzym die Plasmamembran seiner Zielzelle überwindet, um seine cytosolische Wirkung zu entfalten, ist noch weitgehend unklar. Neben der antitumoralen konnten zusätzlich auch eine antivirale Wirkung des Proteins nachgewiesen werden [82]. Neben der Onconase<sup>®</sup> sind mittlerweile noch einige weitere cytotoxische RNasen aus derselben Quelle [83] und aus anderen Froscharten isoliert worden [80].

Obwohl RNase A eine höhere katalytische Aktivität als Onconase<sup>®</sup> aufweist und beide Enzyme sich auch strukturell sehr ähnlich sind, ist RNase A weit weniger toxisch. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass dies auf den Ribonuclease Inhibitor RI zurückzuführen ist, der im Cytosol von Säuger-Zellen exprimiert wird [84]. Es ist der stärkste bekannte Inhibitor der RNase A, der allerdings Onconase<sup>®</sup> nicht zu hemmen vermag. Durch rationales Protein-Design ist es gelungen, RI-resistente RNase A-Varianten zu generieren, die eine deutlich erhöhte Cytotoxizität aufweisen [85].

#### **1.4.2 ImmunoRNasen**

Neben den unter 1.4.1 besprochenen RNasen mit direkter antitumoraler Wirkung gibt es noch einen weiteren chemotherapeutischen Ansatz, bei dem RNasen eine Rolle spielen. Krebszellen unterscheiden sich häufig von normalen Zellen dadurch, dass sie Oberflächen-Rezeptoren in unterschiedlicher Art und Weise exprimieren. Zum Beispiel werden die Neuropeptid Y-Rezeptoren von verschiedenen Neuroblastom-Krebsarten überexprimiert. Diese Tatsache macht sich das Konzept der Immunotoxine zu nutze, die definiert sind als Proteine bestehend aus einem Rezeptor-spezifischen Antikörper (oder einem Liganden) und einem Toxin [86]. Der Antikörper/Ligand dirigiert die Verbindung zum Zielgewebe, der Komplex wird internalisiert und das Toxin tötet die Zelle. Die eingesetzten Toxine weisen allerdings häufig eine relativ hohe Toxizität gegenüber anderen Geweben auf und rufen oft starke Immunantworten hervor. In ImmunoRNasen wird die Toxin-Komponente durch RNasen ersetzt, die ihre Toxizität erst im Cytosol entfalten und ansonsten für den Organismus unschädlich sind und sich zudem durch eine geringe Immunogenität auszeichnen [87]. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die humane pankreatische RNase 1 als Fusionsprotein mit verschiedenen Wachstumsfaktoren Zellen, die den entsprechenden Rezeptor exprimieren, spezifisch in ihrem Zellwachstum inhibieren können [88, 89]. In einem anderen Beispiel wurde ein scFv-Fragment, welches gegen den von vielen klinisch relevanten Krebsarten überexprimierten Tyrosinkinase-Rezeptor ErbB2 gerichtet ist, in Fusion mit einer humanen nicht-toxischen RNase eingesetzt. Das

Fusionsprotein induziert den Tod von Zellen, die den ErbB2-Rezeptor besitzen [90]. Des Weiteren wird zurzeit Onconase<sup>®</sup> als Fusionsprotein mit einem anti-CD22 Antikörper in ersten klinischen Studien als Therapeutikum gegen Krebserkrankungen des Lymphsystems getestet [91].

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Die RNase T1 Variante 9/5 Q46N (RV) weist die höchste Aktivität aller bisher charakterisierten T1-Varianten nach Adenosin-Resten auf und unterscheidet sich vom Wildtyp durch insgesamt 5 veränderte Aminosäure-Positionen. Ziel dieser Arbeit war zum einen, den Einfluss der Einführung des Asparaginrestes in die Position 46, die wesentlich an der Basenerkennung beteiligt ist, in die Wildtypsequenz zu untersuchen. Ebenso sollte ein weiterer AS-Austausch, nämlich das Ersetzen einer Tyrosin- durch eine Tryptophan-Seitenkette in der Position 45, im Bezug auf seine Bedeutung für die Spezifität des Enzyms untersucht werden. Die beiden Varianten E46N und Y45W/E46N sollten dargestellt, isoliert und kinetisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte versucht werden, mit evolutionärem Protein-Design unter Verwendung des herkömmlichen RNase T1-*Screenings*, der Kombination aus RNase-Indikator-Platten und DC-detektierter Dinucleosidmonophosphat-Hydrolyse, sowohl ausgehend vom Gen des Wildtyps, als auch der Variante RV, weiter in Richtung Adenosin-Bevorzugung veränderte RNase T1-Varianten zu generieren. Parallel hierzu sollte mittels FCS, in Fortführung entsprechender Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Prof. U. Hahn, ein neues, einfaches RNase T1-*Screening*-Verfahren etabliert werden, das es ermöglichen sollte, größere Bibliotheken in kürzerer Zeit untersuchen zu können.

Der letzte Teil der hier vorliegenden Arbeit war Teil einer Kooperation der Arbeitsgruppe Prof. U. Hahn mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Beck-Sickinger des Instituts für Biochemie, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig mit dem Ziel des Einsatzes der RNase T1 in Fusionsproteinen zur Untersuchung von peptid-gesteuertem, RNase-vermittelten Zelltod. Ziel dieser Arbeit war, nachzuweisen, dass RNase T1 als Werkzeug für die Untersuchung solcher Prozesse geeignet ist.

## 2. Material

### 2.1 Technische Ausrüstung

Brutschrank	WTC Binder, Tuttlingen
Chromatographie-Anlage	BIO-RAD, München
Chromatographie-Säulen	BIO-RAD, München
Dampsterilisator, Varioklav <sup>®</sup> Typ 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
DC-Laufkammer 120100	DESAGA, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen für:	
Agarose-Gele	KODAK, Rochester, USA
Polyacrylamid-Gele	BIO-RAD, München
Elektroporator, <i>E. coli</i> -Pulser	BIO-RAD, München
Fluoreszenz Korrelations Spektroskop:	
ConfoCor 2	CARL ZEISS GmbH, Jena
Gefriertrockner Christ-Alpha 1-2	CHRIST, Osterode
Gel-Dokumentationssystem DC120	KODAK, Rochester, USA
Kieselgelplatte Zellulose F	MERCK, Darmstadt
Küvetten:	
Elektroporationsküvetten (0,1 cm)	BIO-RAD, München
UV-Quarzküvetten (0,1-10 mm)	HELLMA, Mühlheim
Einmal-Plastik-Küvetten, 1,5 ml	BRAND, Wertheim
Mikroskop Axiovert 25 mit AxioCam MRm	CARL ZEISS GmbH, Jena
Mikrotiterplatten (96-Loch)	NUNC, Wiesbaden-Biebrich
Mikrowelle 7020	PRIVILEG, Fürth
Mixer VORTEX-2, Genie	SCIENTIFIC IND., Bohemia, USA
PCR-Cycler:	
Mini-Cycler <sup>™</sup>	MJ RESEARCH, Watertown, USA
Mastercycler personal	EPPENDORF, Hamburg
pH-Meter MV87	PRÄCITRONIC, Dresden
Photometer:	
Dioden-Array Spektrophotometer 8452A	HEWLETT PACKARD, Boise, USA
DU <sup>®</sup> 640B	BECKMAN-COULTIER, Fullerton, USA
Spectronic <sup>®</sup> 20 Genesys <sup>™</sup>	THERMO SPECTRONIC, Rochester, USA
Plattenreader SpectraFluor Plus	TECAN, Crailsheim
Probenträger (FCS)	
Deckgläschen Marienfeld, 24 x 60 mm	MERCK EUROLAB, Dresden
Probenkammern mit Deckel	NUNC, Wiesbaden-Biebrich

Reinstwasseranlage, Milli Q	MILLIPORE, Bedford, USA
Sequenzieranlage, LI-COR 4000	MWG BIOTECH, Ebersberg
Schüttelinkubatoren:	
CERTOMAT S	B. BRAUN BIOT. INT., USA
IRC-1-U	A. KÜHNER AG, Schweiz
Thermomixer 5436	EPPENDORF, Hamburg
Thermomixer <i>comfort</i>	EPPENDORF, Hamburg
Sterilbank, BDK4	BDK, Sonnenbühl-Gunkingen
Stromversorgungsgeräte:	
EPS 600	PHARMACIA BIOTECH, Freiburg
Mighty Slim SX 250	PHARMACIA BIOTECH, Freiburg
Thermoblock, Dri-Block® DB-3A	THERMO-DUX, Wertheim
Trockenschrank, UM 500	MEMMERT, Schwabach
Umkehr-Osmose-Anlage Typ 75 super	WIEGANDT, Krefeld
Waagen:	
Analysenwaage FA-210-4i	FAUST, Dresden
Laborwaage FA-3100-2	FAUST, Dresden
Wasserbäder:	
Multi Temp III	PHARMACIA BIOTECH, Freiburg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Mini-Zentrifuge C-1200	NATIONAL LABNET, Woodbridge, USA
Biofuge® fresco	HERAEUS, Hanau
Hochgeschwindigkeitszentrifuge RC5B Plus	SORVALL, Bad Homburg
Tischzentrifuge Super T21	SORVALL, Bad Homburg
Zentrifugenrotoren:	
SLA-3000, Festwinkelrotor	SORVALL, Bad Homburg
SLA1500, Festwinkelrotor	SORVALL, Bad Homburg
ST-H750, Ausschwingrotor	SORVALL, Bad Homburg
SL50-T Festwinkelrotor	SORVALL, Bad Homburg

## 2.2 Spezielle Software

WebLabViewer Lite	MOLECULAR SIMULAT. INC., USA
Clone Manager Professional Suite	SCIED, Durham, USA
Digital Science 1D 2.0	KODAK, Rochester, USA
AxioVision 3.1	CARL ZEISS GmbH, Jena
Mfold 2.3	M. Zuker, Washington University School of Medicine, USA

## 2.3 Chemikalien

Acrylamid	ICN, Meckenheim
Agarose SEAKEM LE	BMA, Rockland, USA
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	BIORAD, München
Ampicillin	BOEHRINGER, Mannheim
Bromphenolblau	FLUKA CHEMICA, Neu-Ulm
DEAE-Sepharose 6B	AMERSHAM, Buckinghamshire, UK
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI FERMENTAS, Vilnius, Litauen
Dithiothreitol (DTT)	INVITROGEN, Karlsruhe
Ethidiumbromid	FLUKA CHEMICA, Neu-Ulm
Gelfiltrations-Matrix G50	AMERSHAM, Buckinghamshire, UK
Kanamycin	ICN, Meckenheim
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	BIOTECH, St. Leon-Rot
Lipofectamin 2000™	INVITROGEN, Karlsruhe
NHS-Rhodamin	PIERCE, Rockford, USA
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	ICN, Meckenheim
RNA: 16S, 23S rRNA aus <i>E. coli</i>	ROCHE, Mannheim
RNA: Gesamt-RNA aus Hefe (höchstrein)	WORTHINGTON, Lakewood, USA
RNA: Gesamt-RNA aus Hefe	ROCHE, Mannheim
Xylencyanol	BIORAD, München

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A. und stammen entweder von SIGMA (Deisenhofen) oder MERCK (Darmstadt).

## 2.4 Bakterienstämme / Zelllinien

*E. coli* **TOP10F'** (INVITROGEN, Karlsruhe)

*Genotyp*: F' [lacIq Tn10(TetR)] mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Dieser Stamm wurde zur Plasmid-Vermehrung und für die Expression von RNase T1 verwendet.

***E. coli* D10:**

Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von Herrn W. Stiege zur Verfügung gestellt. Er wurde durch Mutations-Experimente aus dem Ausgangstamm AB301 (Hfr  $\text{met}^-\lambda^+$ ) erhalten und ist RNase I-defizient [92]. Dieser Stamm wurde für RNase-I-freie RNase T1-Präparationen verwendet.

**Humane Neuroblastoma Zelllinie SK-N-MC [93]:**

(American Type Culture Collection ATCC, Manassas, USA)

Wurde 1971 aus einer Metastase eines Neuroblastom-Tumors einer 14-jährigen Kaukasierin gewonnen. Wächst adhärent als Mono-Zellschicht mit Neuroblast-ähnlicher Morphologie. Konstitutive Überexpression verschiedener Rezeptoren (z.B. NPY-Y1-Rezeptor).

**Hamster-Nieren-Zelllinie BHK:**

(American Type Culture Collection ATCC, Manassas, USA)

Wurde 1961 ausgehend von den Nieren von 5 einen Tag alten syrischen Hamstern etabliert. Fibroblastoide Morphologie, wächst adhärent als Mono-Zellschicht. Lässt sich sehr gut transient transfizieren.

## 2.5 Enzyme und Proteine

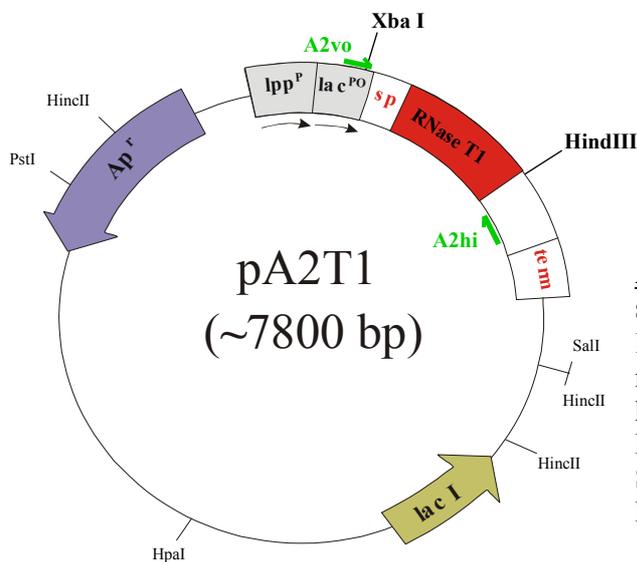
**Tabelle 2:** Verwendete Enzyme/Proteine und deren spezifische Daten.

Enzym / Protein	Herkunftsorganismus	Aktivität / Konzentration	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Arktische Garnelen ( <i>P. borealis</i> )	1 U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas
DNase I	Rinderpankreas	100 U/ $\mu\text{l}$	Boehringer
Ribonuclease A	Rinderpankreas	100 mg/ $\mu\text{l}$	Bio-Rad
RSA	Rinderblut	100 mg/ml	Amersham
T4-DNA-Ligase	<i>E. coli</i> C600 <i>pcl857 pPLc28 lig8</i>	5 Weiss U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>	1 U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas
Vent-Polymerase	<i>Thermococcus litoralis</i>	1 U/ $\mu\text{l}$	NEB
<i>Age</i> I A <sup>↓</sup> CCGGT	<i>Ruegeria gelatinovora</i>	5 U/ $\mu\text{l}$	NEB
<i>EcoR</i> I G <sup>↓</sup> AATTC	<i>E. coli</i> RY13	10 U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III A <sup>↓</sup> AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>D</sub>	10 U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas
<i>Xba</i> I T <sup>↓</sup> CTAGA	<i>Xanthomonas badrii</i>	10 U/ $\mu\text{l}$	MBI Fermentas

## 2.6 Vektoren

### pA2T1 [19]:

Dieser Expressionsvektor ist ein Derivat des pIN III ompA2-Vektors [94] in welchen das synthetisch hergestellte Gen von RNase T1 hinter die Sequenz des ompA-Signalpeptids inseriert wurde. Dieser Vektor wurde zur Überexpression von RNase T1 verwandt und diente als Matrize für die PCR-Amplifikation des RNase T1-Gens und wurde für die Expression mit anschließender Reinigung der Wildtyp-RNase T1 verwendet.

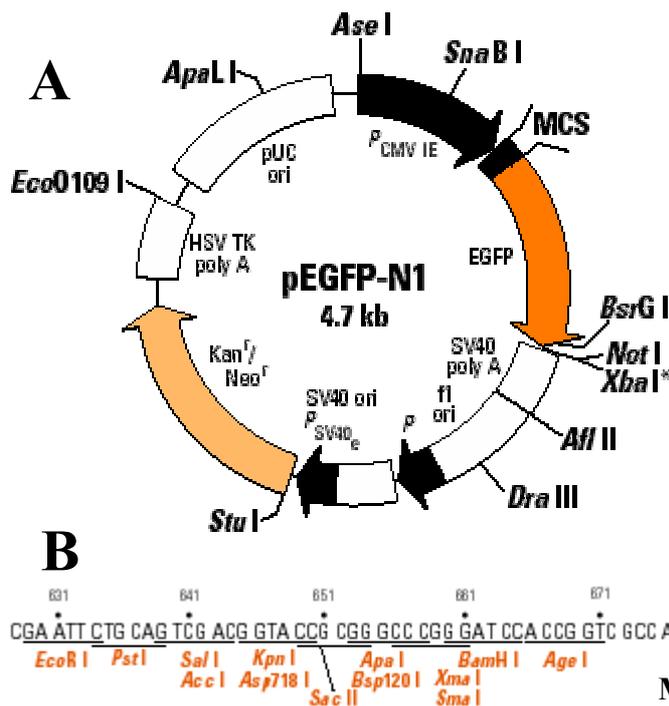


**Abbildung 8:** pA2T1-Vektorkarte.

sp - Signalpeptid; lac I - Gen des lac-Repressors; lac<sup>PO</sup> - Lac-Promotor-Operator; Ap<sup>r</sup> -  $\beta$ -Lactamase; lpp<sup>p</sup> - Lipoprotein-Promotor; term - Transkriptionsterminator. Eingezeichnet sind die Bindungsstellen (hellgrüne Pfeile) der beiden Standard-PCR-Primer zur Amplifikation des RNase T1-Gens.

### pEGFP-N1 (BD BIOSCIENCES CLONTECH, Palo Alto, USA):

Dieser Vektor erlaubt die Darstellung von GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Fusionproteinen in *E. coli* als Wirtssystem (Kanamycin Resistenz, pUC19-Replikationsursprung). Durch Übertragung des Plasmids in Säugetier-Zellen werden entsprechende Fusionsproteine konstitutiv exprimiert (CMV-Promotor). Der Vektor wurde dazu verwendet, RNase-GFP-Fusionsproteinen in BHK- und SK-N-MC-Zellen zu exprimieren.



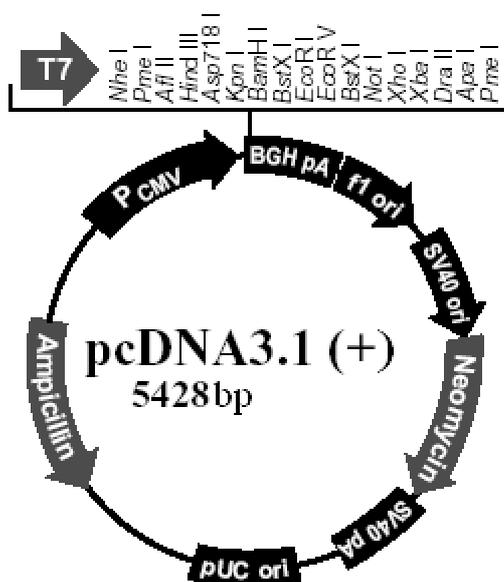
**Abbildung 9: A:** pEGFP-N1-Vektorkarte. ori - Replikationsursprung; P - Promotor; MCS - Multiple Klonierungsstelle; EGFP - Optimiertes grün fluoreszierendes Protein; SV40 poly A - Polyadenylierungs-Signal; Kan<sup>r</sup>/Neo<sup>r</sup> - Kanamycin/Neomycin Resistenzkassette.

**B:** Multiple Klonierungsstelle von pEGFP-N1. Die Abbildung zeigt alle singulären Schnittstellen der MCS und das Startcodon des EGFP-Gens.

(Quelle: BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA. URL: www.clontech.com).

**pcDNA3.1(+)** (INVITROGEN; Karlsruhe):

Dieser Vektor dient der konstitutiven Genexpression in Säugerzellen. Aufgrund der vorhandenen Ampicillin-Resistenz und des pUC19-Replikationsursprungs kann das Plasmid ebenfalls in *E. coli* vermehrt werden. Die Neomycin-Resistenz kann zu Generierung von stabil-transfizierten Zelllinien genutzt werden. Das Plasmid wurde verwendet um Ribonucleasen in BHK- und SK-N-MC-Zellen zu exprimieren.



**Abbildung 10:** pcDNA3.1-Vektorkarte.

T7 - T7-Promotor; P<sub>CMV</sub> - CMV-Promotor; pA - Polyadenylierungs-Signal; ori - Replikationsursprung (Quelle Invitrogen GmbH, Karlsruhe. URL: www.invitrogen.com).

**pIN III ompA2 [94]:**

Dieser Sekretionsvektor wurde für die Expression der RNase T1-Varianten bzw. -Bibliotheken verwendet (vgl. pA2T1).

**pUC18:**

Dieser Vektor wurde als Transformationskontrolle zur Bestimmung der Effizienz kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

**YEplWLRNaseA [95]:**

Aus diesem Vektor wurde das RNase A-Gen mittels PCR amplifiziert. Er wurde uns freundlicherweise von Ronald Raines überlassen.

**pA2T1H92A:**

Dieser Derivat des pA2T1, welches anstelle des Wildtyp-RNase T1-Gens das Gen der Variante H92A enthält, wurde für die Expression und anschließende Reinigung der inaktiven RNase T1-Variante genutzt.

**2.7 Oligonucleotide**

Alle Oligonucleotide stammten von der Firma MWG BIOTECH, Ebersberg bis auf die Hybridisierungsprimer, die von der Firma IBA GmbH, Göttingen bezogen wurden.

**Amplifizierungsprimer:**

RNase T1:	A2vo	5' -TACGGATTCACTGGAAGCTCTAGA-3'
	A2hi	5' -CATCTTAGCAGCCTGAACG-3'
	T1EukExvo	5' -AATAGAATTCGACATGGCATGCGACTACACTTGC-3'
	T1EukExhi	5' -TTATTCTAGATTATGTACATTCAACGAAGTTGTTACC-3'
	T1EGFPhi2	5' -GGTGGTACCGGTGGTGTACATTCAACGAAGTT-3'
RNase A:	AEukExvo	5' -AATAGAATTCGACATGGGCAAGGAACTGCAGC-3'
	AEGFPhi	5' -GGTGGTACCGGTGGCACTGAAGCATCAAAGTGG-3'

**Mutageneseprimer:**

T1E46N	5' -CACAGAGAAATCAAACCGTTGTAGTTGTTGTATTT-3'
T1Y45W/E46N	5' -CACAGAGAAATCAAACCGTTCCAGTTGTTGTATTT-3'

**Sequenzierprimer:**

pA2T1:	A2vo	IRD800-5' -TACGGATTCACTGGA ACTCTAGA-3'
	A2hi	IRD800-5' -CATCTTAGCAGCCTGAACG-3'
pcDNA3.1	T7promotor	IRD800-5' -TAATACGACTCACTATAG-3'
	pcDNA3-A2	IRD800-5' -CACCTACTCAGACAATGCG-3'
pEGFP-N1	EGFPvo	IRD800-5' -GCTGGTTTAGTGAAACCG-3'
	EGFPhi	IRD800-5' -ACCAGGATGGGCACC-3'

**Hybridisierungs-Oligonucleotide:**

Sub\_G:

Cy5-5' -TCCATACCAGCCAGCCACAAG (OH) CAAGCCACCGAAGCACAGATA-3' -RhG

Sub\_G\_ohne:

5' -TCCATACCAGCCAGCCACAAG (OH) CAAGCCACCGAAGCACAGATA-3'

T1\_Sub\_Li 5' -GTGGCTGGCTGGTATGGA-3'

T1\_Sub\_Re 5' -TATCTGTGCTTCGGTGGC-3'

**2.8 Kultivierungsmedien****Medien für die E. coli-Kultivierung:**

<b>2x YT-Medium:</b>	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl <i>ad 1 l Aqua dest.</i>	<b>LB-Medium:</b>	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl <i>ad 1 l Aqua dest.</i>
----------------------	--	-------------------	--

<b>SOC-Medium:</b>	2 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 20 mM Glucose 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM KCl	<b>LB-Festagar:</b>	15 g Agar 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl <i>ad 1 l Aqua dest.</i>
--------------------	---	---------------------	---

Bacto-Trypton, Trypton und Hefeextrakt wurden von INVITROGEN, Karlsruhe bezogen. Sollte bei der Kultivierung ein Selektionsdruck erzeugt werden, so wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C Antibiotikum zugesetzt. Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml.

**Medien für die Säugerzellen-Kultivierung (INVITROGEN, Karlsruhe):**

MEM ( <i>Minimal Essential Medium</i> )	GIBCO BRL, 10370-021
D-MEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	GIBCO BRL, 10938-025
OPTI-MEM <sup>®</sup> I (Minimal-Medium)	GIBCO BRL, 22600-050

**Medien-Zusätze:**

FCS (Fetales Rinder-Serum)	GIBCO BRL, 10082-139
NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren)	GIBCO BRL, 11140-068

**2.9 QIAGEN-Reinigungs-Systeme**

„QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit“ (Katalognummer 28106)

„HI Speed<sup>™</sup> Plasmid Midi Kit“ (Katalognummer 12643)

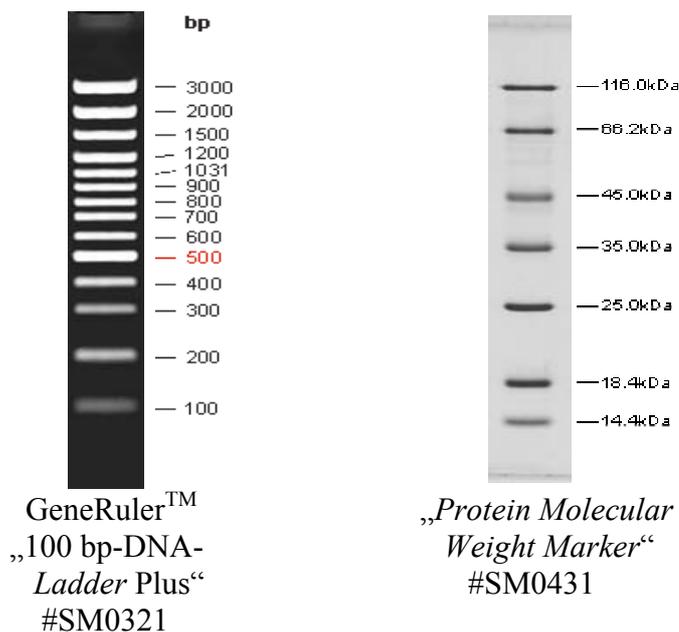
„QIAprep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep-Kit“ (Katalognummer 27104)

„QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Katalognummer 20021)

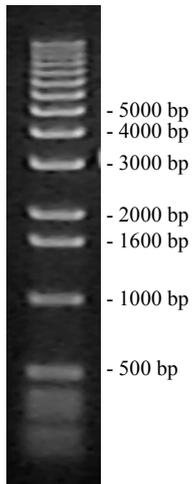
(QIAGEN GmbH, Hilden)

**2.10 Molekulargewichtsstandards**

Molekulargewichtsstandards von MBI FERMENTAS, Litauen:



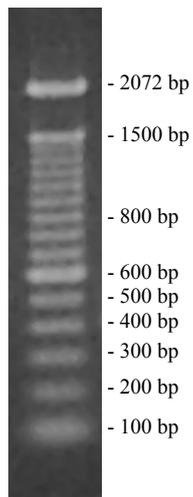
Molekulargewichtsstandards von INVITROGEN, Karlsruhe:



**1 kb-Leiter:**

„1 kb Plus DNA Ladder<sup>TM</sup>“ (10787-018).

12 Banden von 1000 bis 12000 bp im Abstand von 1000 bp, 1 Bande der Größe 1600bp und eine 500 bp-Bande. Mehrere Banden kleiner als 500 bp.



**100 bp-Leiter:**

„100 bp DNA Ladder“ (15628-019)

15 Banden von 100 bis 1500 bp im Abstand von 100 bp. 1 zusätzliche Bande der Größe 2072 bp.

### 3. Methoden

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Umkehr-Osmose-Wasser hergestellt und durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter) oder durch Autoklavieren (121 °C; 1,4 bar Dampfdruck) sterilisiert.

Beim Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen mit Diethylcarbonat (DEPC)-behandelten Puffern angesetzt. Diese wurden hierfür mit 0,1% DEPC versetzt, 12 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss 15 min auf 100 °C erhitzt.

Alle Arbeiten mit Säugetier-Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank ausgeführt.

#### 3.1 Labortechnische Sicherheit

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 entsprechend dem Gentechnikgesetz (1993) durchgeführt. Die Lagerung und Handhabung der Chemikalien entsprachen der Gefahrstoffverordnung (1999). Alle bakterien-, säugerzellen- und nucleinsäurehaltigen Abfälle wurden vor der Entsorgung autoklaviert (121 °C; 1,4 bar Dampfdruck).

#### 3.2 Molekularbiologische Methoden

##### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<b>PCR-Ansatz:</b>	20 mM Tris/HCl, pH 8,5
<b>(50 – 100 µl)</b>	10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,05 mg/ml BSA
	2 mM dNTP-Lösung
	2 µM Primer 1
	2 µM Primer 2
	x µl Matrizen-DNA
	2 U/100 µl Polymerase

Die 1986 von Mullis *et al.* entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche ermöglicht [96]. Das Prinzip der PCR basiert auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA-Matrize, an welche sich jeweils am 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches spezifische Oligonucleotidmoleküle (Primer) anlagern. Die Primer werden mit Hilfe von temperaturstabilen DNA-abhängigen DNA-

Polymerasen (z.B. *Taq*-Polymerase aus dem Stamm *Thermus aquaticus*) in Anwesenheit freier dNTPs elongiert [97]. Durch eine automatisierte, zyklische Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung und DNA-Synthese (Extension) kann somit im Optimalfall eine Verdoppelung der Matrize pro Zyklus erreicht werden. Als Matrize wurde in der Regel Plasmid-DNA in einer Konzentration von 0,2-10 ng/ $\mu$ l eingesetzt. Für PCR-Ansätze im Zuge von Klonierungen wurde aufgrund ihrer geringeren Fehlerrate Vent-Polymerase, für alle anderen Reaktionen *Taq*-Polymerase eingesetzt.

In einem programmierbaren Thermocycler wurde nach 2-minütiger Denaturierung bei 95 °C folgender Reaktionszyklus in 14 - 29 Wiederholungen durchgeführt:

1. Denaturierung der DNA 1 min 95 °C
2. Primeranlagerung 1 min 43 – 53 °C
3. Polymerisation 1 min 72 °C

Nach Durchlaufen dieses Programms erfolgte zur Vervollständigung begonnener Extensionsreaktionen eine zusätzliche Inkubation für 2 min bei 72 °C. Insofern der verwendete Thermocycler keine Deckelheizung besaß, wurden die Ansätze mit 40  $\mu$ l Mineralöl überschichtet, um Konzentrationsschwankungen durch Verdampfung zu vermeiden. Die Ansätze wurden bei 4 °C aufbewahrt und im Anschluss in der Regel mittels des PCR-Reinigungs-*Kits* (vgl. 3.2.4.2) aufgearbeitet.

### 3.2.1.1 Mutagene PCR

**Ansatz, mutagene PCR:**  
**(100  $\mu$ l)**

- 10 mM Tris/HCl pH 8,3
- 50 mM KCl
- 7 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM dATP/dGTP
- 1 mM dCTP/dTTP
- 2  $\mu$ M Primer 1
- 2  $\mu$ M Primer 2
- 50 ng Matrizen-DNA
- 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>
- 10 U *Taq*-Polymerase

Durch eine Modifizierung der Reaktionsbedingungen, die die Genauigkeit der *Taq*-Polymerase reduzieren, kann die PCR genutzt werden, um zufällige Punktmutationen in die amplifizierte DNA-Sequenz einzubauen ohne dabei die Amplifikationsrate wesentlich zu beeinträchtigen [98]. Neben dem Zusatz von Mn<sup>2+</sup>-Ionen bestehen diese Veränderungen hauptsächlich in einer

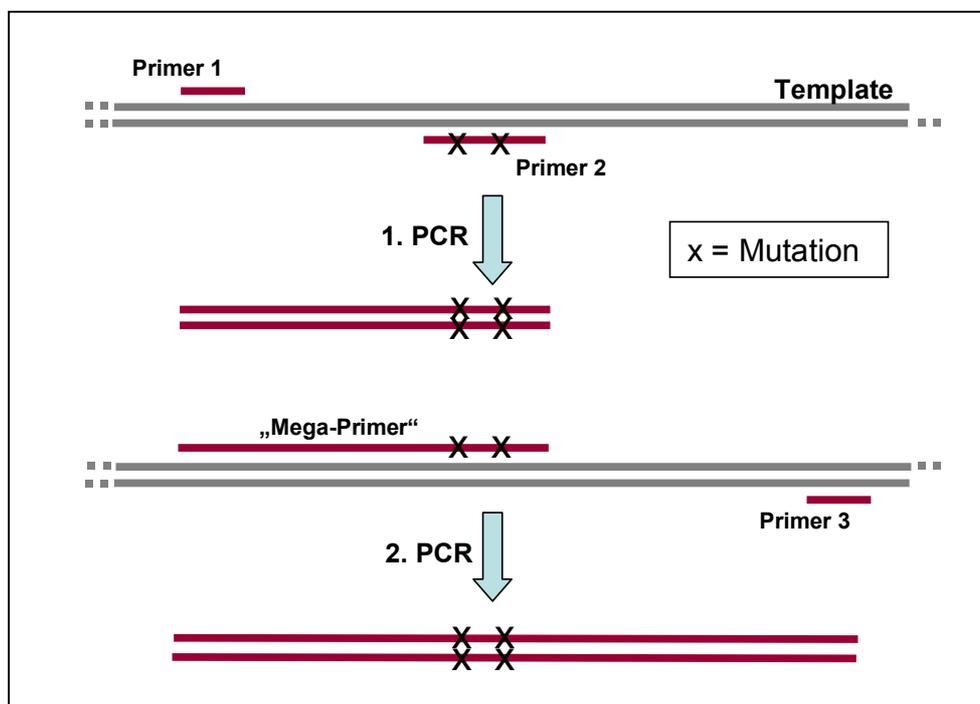
Verfünffachung der *Taq*-Polymerase-Konzentration und in einer Variierung der dNTP-Konzentrationen und führen zu einer Mutationsrate von  $\sim 0,7\%$  pro Basenposition [99]. Eine PCR unter Standardbedingungen mit *Taq*-Polymerase weist im Vergleich eine Mutationsrate von  $< 0,14\%$  auf.

Die Bedingungen des Reaktionszyklus sowie die Aufarbeitung der Reaktionsansätze erfolgten wie unter 3.2.1 beschrieben.

### 3.2.1.2 Primer-Überhang-Mutagenese

Durch die Verlängerung der bei der PCR zum Einsatz kommenden Oligonucleotide an ihren jeweiligen 5'-Enden lassen sich auf einfache Art und Weise die Termini des zu amplifizierenden DNA-Fragments modifizieren. Hervorragend geeignet ist diese PCR-Mutagenese um als Vorbereitung auf eine Klonierung das Insert mit zum Vektor passenden Restriktionsschnittstellen zu versehen.

### 3.2.1.3 „Mega-Primer“-Mutagenese



**Abbildung 11:** „Mega-Primer“ PCR-Mutagenese nach Landt *et al.* [100]. In einer ersten PCR werden über „Primer 2“ Mutationen in das PCR-Produkt eingeführt, welches dann in der zweiten PCR als Primer zum Einsatz kommt.

Die sogenannte „Mega-Primer“-Strategie ist eine PCR-Mutagenese-Methode, die es ermöglicht interne Mutationen in ein DNA-Fragment einzuführen [100]. Die Amplifikation des Gesamtfragmentes erfolgt in zwei aufeinander folgenden Polymerase-Kettenreaktionen, wobei der stromabwärts bindende Primer der ersten Reaktion Fehlpaarungen aufweist, die den gewünschten Mutationen im Fragment entsprechen (Abb. 11). Um die Primer der ersten PCR quantitativ abzutrennen, wurde das PCR-Produkt der ersten Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion (vgl. 3.2.5.2) gereinigt, und dann als vorderer Primer in einer Konzentration von  $\sim 50$  ng/ $\mu$ l in der zweiten PCR eingesetzt („Mega-Primer“). Die Durchführung der beiden PCRs erfolgte ansonsten unter Standard-Bedingungen (3.2.1).

### 3.2.2 DNA-Shuffling

Das DNA-Shuffling ist eine *in-vitro* DNA Rekombinations-Methode bei der homologe Sequenzen mit DNase I fragmentiert und diese Fragmente dann PCR-basiert wieder aneinandergefügt werden [49]. Hierbei kommt es nicht nur zu Rekombinationsereignissen, sondern gleichzeitig zur Einführung von Punktmutationen mit Mutationsraten von etwa 0,7 % pro Basenposition [48].

Ausgangspunkt für DNA-Shuffling-Experimente mit RNase T1-Genen waren mittels der Standard-Primer A2vo und A2hi amplifizierte PCR-Produkte, welche mit Hilfe des PCR-Reinigungs-Kits (vgl.3.2.5.3) gereinigt wurden.

#### 3.2.2.1 DNase I-Fragmentierung

**Reaktionsansatz:** 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
**(100  $\mu$ l)** 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,15 U DNase I  
etwa 1,5  $\mu$ g DNA-Substrat

Etwa 1,5  $\mu$ g des gereinigten PCR-Produktes wurden für 15 min bei RT mit 0,15 U DNase I inkubiert und der Ansatz im Anschluss für 10 min auf 80 °C zur Inaktivierung der DNase erhitzt. Die DNA-Fragmente wurden durch Ethanol-Fällung (vgl. 3.2.5.1) konzentriert und mittels eines 2%-igen Agarose-Gels (vgl. 3.2.9.1) gereinigt. Mit einem sterilen Skalpell wurden Fragmente im Größenbereich von 50 bis 100 bp ausgeschnitten und aus dem Gel mit dem Gel-Extraktions-Kit isoliert (vgl. 3.2.5.2) und photometrisch quantifiziert (vgl. 3.2.6).

### 3.2.2.2 PCR ohne Primer

<b>PCR-Ansatz:</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,3
<b>(100 µl)</b>	50 mM KCl
	2,2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,2 mM dNTP-Mix
	2,5 U <i>Taq</i> -Polymerase
	5-10 ng/µl DNA-Fragmente

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in den PCR-Ansatz verdünnt. Der Reaktionsansatz enthielt zu diesem Zeitpunkt keine Primer.

Folgendes PCR-Programm wurde durchlaufen:

60 s 95 °C; 30 s 95 °C, 30 s 52 °C, 30 s 72 °C (45 Wdh.); 5 min 72 °C

Das erfolgreiche Aneinanderfügen der Fragmente hin zum Gesamtlängen-Gen wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft (vgl. 3.2.9.1).

### 3.2.2.3 PCR mit Primern

<b>PCR-Ansatz:</b>	10 mM Tris/HCl pH 8,3
<b>(100 µl)</b>	50 mM KCl
	2 µM A2vo
	2 µM A2hi
	2,2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,2 mM dNTP-Mix
	2,5 U <i>Taq</i> -Polymerase
	1:40 Verdünnung der ersten PCR

#### **PCR-Programm:**

60 s 95 °C; 30 s 95 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C (14 Wdh.); 2 min 72 °C

Da die PCR ohne Primer aufgrund von einzelsträngigen Sequenzüberhängen an den Enden [49] zu Produkten mit heterogenen Molekulargewichten führt, wurde eine zweite PCR angeschlossen, die durch Verwendung der beiden Standard-Primer A2vo und A2hi zur Amplifikation eines einheitlichen PCR-Produktes der richtigen Größe führt. Dieses wurde dann im Anschluss gereinigt (vgl. 3.2.5.3) und in den Expressionsvektor pIN III-ompA kloniert.

### 3.2.3 Transformation

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden mittels Elektroporation transformiert [101]. Die Methode beruht darauf, dass kurze Hochspannungspulse „Löcher“ in der Zellhülle verursachen, durch welche dann exogene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Die zu transformierende DNA muss sich zur Vermeidung eines elektrischen Durchschlags in einer weitgehend Ionen-befreiten Lösung befinden.

#### 3.2.3.1 Präparation elektrokompetenter Zellen

200 ml LB-Medium wurden mit einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes angeimpft (1:100) und in einem Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6 wachsen gelassen. Die Zellsuspension wurde dann durch 15 minütiges Schwenken in Eiswasser abgekühlt und durch Zentrifugation (ST-H750, 15 min, 4200 Upm, 4 °C) sedimentiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit 200 ml eiskaltem Wasser und sukzessive mit 100 ml und 50 ml 10%igem Glycerin gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschritten zentrifugiert wurde (10 min), um einen Wechsel der Waschlösungen vornehmen zu können. Im Anschluss wurde das Pellet in 1 ml 10 prozentigem Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl bei -70 °C gelagert.

#### 3.2.3.2 Elektroporation

Ein Aliquot der eingefrorenen elektro-kompetenten Zellen wurde im Eis aufgetaut und durch einmaliges Auf- und Abpipettieren mit DNA-Lösung versetzt. Bei nativen Plasmiden wurden in Abhängigkeit von der Größe zwischen 1 und 10 ng gereinigte DNA eingesetzt. Ligationsansätze (vgl. 3.2.8) wurden ungereinigt eingesetzt (maximal 5 µl). Der Ansatz wurde dann in eine eiskalte Küvette überführt und die Elektroporation in einem Elektroporator der Firma BIO-RAD GmbH (München) nach Vorschrift mit 1,8 kV durchgeführt. Mit 1 bis 2 ml SOC-Medium wurden die Zellen anschließend aus der Küvette gespült und zur Ausbildung der spezifischen Antibiotika-Resistenz 1 h bei 37 °C im Schüttler (200 Upm) inkubiert. Anschließend wurden 10% des Transformationsansatzes auf einer LB-Festagar-Platte, die Antibiotika zur Selektion enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Rest des Transformationsansatzes wurde kurz zentrifugiert (Biofuge<sup>®</sup> fresco, 1 min, 13000 Upm, 4 °C), das Zellpellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer LB-Festagar-Platte ausgestrichen und inkubiert.

### 3.2.4 Plasmidpräparation

In der Regel wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* nach der untenstehenden Methode „alkalische Lyse“ isoliert. Im Falle von Plasmid-Präparationen im Zuge von DNA-Sequenzierungen und im Falle von hohem Bedarf an gereinigtem Plasmid (> 100 µg) wurden entsprechende kommerzielle Kits der Firma QIAGEN, Hilden verwendet.

#### 3.2.4.1 Mini-Plasmidpräparation „alkalische Lyse“

**Lösung 1:** 25 mM Tris/HCl pH 8,0  
10 mM EDTA  
50 mM Glucose  
4 mg/ml Lysozym  
20 µg/ml RNase A  
(DNase-frei: 10 min 90 °C)

**Lösung 2:** 0,2 N NaOH  
1,0 % SDS (w/v)  
1,0 mM EDTA

**Lösung 3:** 3 M KAc pH 4,8

Plasmid-DNA kann aus *E. coli* durch Lyse der Zellen und Ausfällen aller anderen Zellbestandteile gewonnen werden [102]. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass hochmolekulare, chromosomale DNA selektiv alkalisch denaturiert wird.

1,5 ml einer LB-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (Biofuge<sup>®</sup> fresco, 1 min, 13000 Upm, 4 °C), der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µl der Lösung 1 resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden für die Lyse der Zellen 200 µl der Lösung 2 zugegeben und so lange durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt bis die Suspension klar wurde. Nach einer weiteren Inkubation bei RT für 5 min wurde die Probe mit 150 µl eiskalter Lösung 3 neutralisiert. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Biofuge<sup>®</sup> fresco, 1 min, 13000 Upm, 4 °C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Organische und wässrige Phase wurden im Anschluss mit einem Vortexer gründlich gemischt und anschließend durch Zentrifugation (Biofuge<sup>®</sup> fresco, 5 min, 13000 Upm, 4 °C) voneinander getrennt. Hierbei befanden sich in der Interphase Zelltrümmer, freigesetzte Proteine und sonstige Partikel. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Alkohol-Präzipitation (vgl. 3.2.4.1) konzentriert.

#### 3.2.4.2 Plasmid-Isolation mittels kommerzieller Systeme

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* kamen die beiden kommerziellen Systeme der Firma QIAGEN, „Mini-“ und „Midi-Plasmid Purification Kit“, zum Einsatz. Die Zellen werden hierbei durch alkalische Lyse aufgeschlossen und denaturiert und die Plasmid-DNA wird im Anschluss durch Anionenaustauschersäulen unterschiedlicher Größe gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit den im *Kit* enthaltenen Lösungen. Die im Eluat befindliche Plasmid-DNA wurde durch Fällung mit Isopropanol (vgl. 3.2.4.1) konzentriert.

### 3.2.5 Konzentrierung und Reinigung von Nucleinsäuren

#### 3.2.5.1 Alkohol-Fällung

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren oder um einen Pufferwechsel durchzuführen wurden Alkohol-Fällungen durchgeführt [103]. Hierfür wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumina 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) und 2 Volumina eiskaltem Ethanol bzw. 0,7 Volumina Isopropanol versetzt und gut vermischt. Im Falle von Lösungen mit sehr hohem Salzgehalt bzw. sehr hohen DNA-Konzentrationen wurde auf die KAc-Zugabe verzichtet. Nach Inkubation für mindestens 20 min bei -20 °C bei Verwendung von Ethanol und bei RT bei Isopropanol wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (10000 g, 20 min, 4 °C) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10000 g, 5 min, 4 °C) und der alkoholische Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in TE-Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen.

#### 3.2.5.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Systems „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN, Hilden nach Herstellerangaben. Die entsprechende DNA-Bande wurde auf einem UV-Tisch mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Isolierung aus der Agarose erfolgte dann durch Auflösen der Agarose und Binden der DNA an eine Matrix-Suspension unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Lösungen. Die DNA wurde im letzten Schritt mit 20 µl Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) von der Matrix eluiert.

### 3.2.5.3 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Ansätzen mit dem Ziel der Isolierung des PCR-Produktes unter Abtrennung der Primer und Reaktionsbestandteile kam das kommerzielle System „*PCR Purification Kit*“ der Firma QIAGEN zum Einsatz. Die Durchführung erfolgte mit den bereitgestellten Lösungen nach Herstellerangaben. In der Regel wurde das gereinigte PCR-Produkt im letzten Schritt des Protokolls mit 30 µl Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) von der Anionenaustauscher-Säule eluiert.

### 3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration von Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei wurden für die Berechnung folgende Zusammenhänge angenommen [103]:

dsDNA	1,0 OD <sub>260nm</sub> ≈ 50 µg/ml
ssDNA	1,0 OD <sub>260nm</sub> ≈ 33 µg/ml

Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten an einem Dioden-Array-Spektrophotometer. Durch Bestimmung des Quotienten aus OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>, wobei 260 nm dem Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren und 280 nm dem von Proteinen entspricht, konnte zusätzlich der Reinheitsgrad der DNA-Probe bestimmt werden. Die Absorptionsverhältnisse sollten in einem Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen, um zu gewährleisten, dass keine Kontamination der DNA mit Proteinen vorliegt.

### 3.2.7 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonucleasen

Die enzymatische Spaltung doppelsträngiger DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen diente der Vorbereitung von Insert und Vektor für Ligationsreaktionen. Durch das Verwenden von überhängenden Enden in der PCR (vgl. 3.2.1.2) konnte an die zu klonierenden DNA-Fragmente zu den entsprechenden Vektoren passende Restriktionsschnittstellen eingeführt werden. In der Regel wurden Doppelspaltungen durchgeführt, das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und nach Inkubation bei 37 °C wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 70 °C hitzeaktiviert. Die folgende Tabelle gibt wieder, welche Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Vektorsysteme gewählt wurden:

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Restriktionsenzym-Systeme.

Klonierung in	Restriktionsenzyme	Pufferbedingungen	Inkubationszeit
pIN-III-ompA	<i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III Je 20 U	M-Puffer, 0,01 % BSA	2 h 37 °C
pcDNA3.1	<i>EcoR</i> I, <i>Xba</i> I Je 10 U	M-Puffer, 0,01 % BSA	4 h 37 °C
pEGFP-N1	<i>EcoR</i> I, <i>Age</i> I Je 10 U	NEB1	4 h 37 °C

<b>10x M-Puffer:</b>	100 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT	<b>10x NEB1:</b>	100 mM Bis Tris- propan HCl pH 7,0 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT
----------------------	--	------------------	--

Restriktionsansätze mit PCR-Produkten wurden nach Hitzeinaktivierung in der Regel durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.2.9.1) und anschließende Gelextraktion (vgl. 3.2.5.2) der entsprechenden Fragmente gereinigt und im Anschluss in Ligationen eingesetzt (vgl. 3.2.8).

Plasmide wurden im Anschluss an die Restriktion mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation nur einfach geschnittener Vektormoleküle zu verhindern. Da dieses Enzym in den beiden verwendeten Restriktions-Puffern 100% Aktivität aufweist, konnte auf eine Umpufferung verzichtet werden. In die 20 µl Restriktionsansätze wurden direkt 1 µl alkalische Phosphatase (10 U) pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und der Ansatz 20 min auf 65 °C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Die so linearisierten und dephosphorylierten Vektoren wurden ohne weitere Reinigung in Ligationen eingesetzt.

### 3.2.8 Ligation von DNA

<b>2x Ligationspuffer:</b>	60 mM Tris/HCl pH 7,8 20 mM MgCl <sub>2</sub> 20 mM DTT 2 mM ATP 10 % PEG (w/v)	<b>Ligationsansatz:</b>	200-500 ng Vektor-DNA 400-1000 ng Insert-DNA 1 U T4-DNA-Ligase 10 µl 2x Ligationspuffer <i>ad</i> 20 µl <i>Aqua dest.</i>
----------------------------	--	-------------------------	---

Eine Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA wurde enzymatisch mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. In Abhängigkeit von der Größe wurde das zu insertierende DNA-Fragment in zwei- bis vierfachem Überschuss eingesetzt.

Ligationsansätze wurden für 16h bei 16 °C inkubiert, im Anschluss für 20 min auf 65 °C erhitzt (Hitzeinaktivierung des Enzyms) und konnten anschließend direkt zur Transformation eingesetzt werden.

### 3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Unter dem Begriff „Elektrophoresen“ werden Methoden zusammengefasst, die die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zu deren Trennung ausnutzen. Bei Gelelektrophoresen erfolgt dies in einem polymerisierten Träger, so dass dessen Siebeffekt zusätzlich zur Ladung zur Trennung beiträgt [104].

#### 3.2.9.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

<b>TAE-Puffer:</b> 40 mM Tris-Acetat pH 7,8 2 mM EDTA	<b>Probenpuffer:</b> 50 % Saccharose (w/v) 0,1% Orange G (w/v) in TAE-Puffer
---	--

Die native Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen oder präparativen Trennung von dsDNA aus Nucleinsäuregemischen. Je nach Größe der zu trennenden DNA (Trennbereich 100 bp bis 6000 bp) variiert man die Agarosekonzentration von 3 bis 0,7 %.

Eine entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurde die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach Erhärten des Gels wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer so weit gefüllt bis die Geloberfläche gerade eben bedeckt war. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Volumina Probenpuffer versetzt, in die Probenaschen pipettiert und etwa 1 h mit 10 V/cm Gel einer Elektrophorese unterzogen. Als Größenstandards dienten 750 ng einer 100 bp-Leiter bzw. 1 µg einer 1kbp-Leiter der Firma MBI FERMENTAS, Vilnius, Litauen. Die DNA-Banden wurden im Anschluss an den Elektrophorese-Lauf nach 10-minütigem Färben in einer Ethidiumbromidlösung (4 µg/ml in TAE-Puffer) zur Dokumentation bzw. Isolation einzelner Gelbanden auf einem UV-Tisch (312 nm) sichtbar gemacht [105].



Für die Herstellung von Vorkulturen wurde LB-Medium, zu dem unter Umständen entsprechende Antibiotika zugefügt wurden, mit jeweils einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler (200 Upm) bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.11 DNA-Sequenzanalyse

Zur Überprüfung neu konstruierter Vektoren bzw. zur Ermittlung von Mutationsraten permu- tierter PCR-Produkte wurden DNA-Abschnitte nach der Didesoxymethode [107] unter Ver- wendung des Sequenziersystems „*Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing kit*“ (Amersham, Buckinghamshire, UK) von Frau Brigitte Wolff sequenziert. Als Sequenzieranla- ge wurde das LI-COR Model 4000 der Firma MWG BIOTECH AG, Ebersberg verwendet. Sequenzen sind mit der geräteeigenen Software gelesen und mit dem Programm „*Clone Mana- ger Professional Suite*“ ausgewertet worden.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Expression von RNase T1 in *E. coli*

Die Expression als auch die anschließende Reinigung von RNase T1 wt, der inaktiven als Kontrolle verwendeten RNase T1 H92A und von neuen RNase T1 Varianten wurde weitestge- hend nach dem für das Wildtyp-Protein etablierten Standardprotokoll durchgeführt [19].

Ausgangspunkt aller Expressionsexperimente waren immer frisch transformierte TOP10F'- Zellen. Mit Einzelkolonien von LBA-Festagar-Platten wurden 7 ml LBA-Vorkulturen ange- impft, welche über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler (200 Upm) inkubiert wurden. Um zu kontrollieren, dass entsprechende Vorkulturen auch sekretierte RNase T1 enthielten, wurden diese auf blauen Test-Agarplatten auf RNase-Aktivität überprüft (vgl. 3.4.1). Mit 3 positiven Vorkulturen wurden dann 3 mal 660 ml 2x YTA-Kulturen im Verhältnis 1:100 angeimpft, welche dann für etwa 3 h bei 37 °C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 - 0,7 geschüttelt wurden. Hatten die Zellen diese optische Dichte erreicht, würde die Überexpression von RNase T1 durch IPTG-Zugabe (0,1 mM Endkonzentration) induziert, die Wachstumstemperatur auf 30 °C reduziert und die Kultur weitere 14 – 16 h geschüttelt.

Für das *Screening* von RNase T1-Bibliotheken wurde die Kultivierung der Einzel-Klone unter den gleichen Bedingungen, aber in kleinerem Maßstab durchgeführt. Die Anzucht der Vorkul- turen erfolgte in 96-*well* Mikrotiterplatten im 200 µl-Maßstab, wobei die Inkubation bei 37 °C

in einem Brutschrank erfolgte. Die Hauptkulturen wurden in sterilen 15 ml-Röhrchen mit 5 ml 2xYTA-Medium angezogen. Ein Testen der Vorkulturen auf RNase Aktivität wurde nicht durchgeführt. Auch wurde für jeden Klon nur eine Vorkultur angezogen.

### 3.3.2 Periplasma-Präparation

**TES-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA  
15 % Saccharose (w/v)

**TE50:** 50 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM EDTA

Die Periplasma-Freisetzung aus *E. coli* erfolgte durch osmotischen Schock. Nach Ermittlung der OD<sub>600nm</sub> und Zell-Ernte durch Zentrifugation (6000 g, 20 min, 4 °C) wurde das erhaltene Pellet in hypertonischen TES-Puffer resuspendiert, wobei die optische Dichte auf 200 eingestellt wurde. Die Suspension wurde dann unter Kühlung in einem Eisbad für 30 min geschwenkt. Im Anschluss wurde der osmotische Schock durch Zugabe des 4 fachen Volumens eiskalten TE50-Puffers ausgelöst, der Ansatz kurz gemischt und sofort zentrifugiert (6000 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet erneut in demselben Volumen TES suspendiert, für weitere 30 min im Eisbad geschwenkt und erneut zentrifugiert (6000 g, 15 min, 4 °C). Die vereinigten Überstände nach osmotischem Schock und Waschen mit TES wurden durch 1-stündige Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C von den verbliebenen Zellresten befreit.

### 3.3.3 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Eine Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE Sepharose 6B diente als erster Anreicherungsschritt zur Reinigung von RNase T1 Varianten aus periplasmatischen Proben. Die Chromatographie wurde in einer Kühlzelle bei 4 °C an einem Chromatographie-System der Firma BIO-RAD durchgeführt.

Periplasmafraktionen wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Säule (Ø 2,5 cm, 100 ml, in TE50 äquilibriert) aufgetragen und mit 380 ml 50 mM NaCl in TE50 und einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min gewaschen. Die Elution des Enzyms von der Säule erfolgte mit 350 mM NaCl in TE50, wobei das Eluat in 2 ml-Fractionen gesammelt wurde. RNase-aktive Fraktionen wurden mit Hilfe von RNase-Indikator-Platten (vgl. 3.4.1) identifiziert, vereint und über Nacht bzw. mindestens 4 h bei 4 °C

gegen Wasser dialysiert (Membran-Ausschlussvolumen 3500 Da). Nach der Dialyse wurde die RNase T1-haltige Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Rundkolben lyophilisiert.

### 3.3.4 Gelfiltration

Im Zuge der Reinigung von RNase T1 diente eine Sephadex G50-Gelfiltration als zweiter chromatographischer Trennungsschritt, der ebenfalls bei 4 °C an der BIO-RAD-Anlage durchgeführt wurde. Ebenso wurde die Methode genutzt, um RNase T1-Lösungen von niedermolekularen Bestandteilen zu befreien (vgl. 3.3.7).

Das nach der DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie erhaltene Lyophilisat wurde in 1,5 ml 50 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer aufgenommen und auf eine G50-Säule (Ø 1 cm, 100 ml, in 50 mM NH<sub>4</sub>Ac äquilibriert) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min mit dem gleichen Puffer, wobei 2 ml Fraktionen gesammelt wurden. Nach Identifizierung RNase T1 enthaltenden Fraktionen mit Hilfe der RNase-Indikator-Platten erfolgte deren Lyophilisation wie oben beschrieben.

Die Kontrolle der Reinheit der präparierten Fraktionen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (vgl. 3.3.5). Die Identität der Proteine wurde anhand der Sequenzierung der Ausgangsplasmide sowie durch die Aufnahme von MALDI-Spektren überprüft, die freundlicherweise von Frau Regina Reppich an einem PerSeptive Voyager RP-DE durchgeführt wurden.

### 3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**Trenngel:** 15 % Acrylamid/N,N'-  
Bismethylacrylamid (29:1)  
0,1 M Tris/HCl, pH 8,8  
0,1 % SDS (w/v)  
0,05 % APS (w/v)  
0,001 % TEMED (v/v)

**Sammelgel:** 4 % Acrylamid/N,N'-  
Bismethylacrylamid (29:1)  
0,1 M Tris/HCl, pH 6,8  
0,1 % SDS (w/v)  
0,05 % APS (w/v)  
0,001 % TEMED (v/v)

**Probenpuffer:** 0,625 M Tris/HCl pH 6,8  
0,1 % Bromphenolblau (w/v)  
0,2 % SDS  
20 % Saccharose (w/v)

**Laufpuffer:** 190 mM Glycin  
5 mM Tris  
0,1 % SDS (w/v)

Die analytische Gelelektrophorese von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen [108]. Eine Komplexierung der Proteine mit SDS führt zu einem konstanten Ladung/Masse-Verhältnis, welches eine Trennung der Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht möglich macht.

Die Gelplatten wurden vor Benutzung gründlich mit Ethanol gereinigt. Die Trenngel-Lösung wurde bis zu  $\frac{4}{5}$  der maximalen Gelhöhe zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nach Aushärtung des Trenngels und Entfernung des Isopropanols wurde über das Trenngel das Sammelgel geschichtet, in das ein Probenkamm eingesetzt wurde.

Die zu untersuchenden Protein-Lösungen wurden mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Gelapparatur mit 80 V solange, bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte, und dann für ca. 1 $\frac{1}{2}$  h mit 120 V bis der Farbstoff geradeso aus dem Gel herausgewandert war.

**Färbelösung:**            55 % Methanol (v/v)  
                                 10 % Essigsäure (v/v)  
                                 0,1 % Coomassie Brilliant Blau R250 (w/v)

**Entfärber:**                5 % Methanol  
                                 7,5 % Essigsäure

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel 1 h in etwa 100 ml der Färbelösung gefärbt. Die Proteinfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* R250 erlaubt eine semiquantitative Färbung, was eine Abschätzung des Proteingehaltes der im Gel aufgetragenen Proben ermöglicht [109]. Nach Inkubation in der Färbelösung wurde das Trenngel intensiv mit destilliertem Wasser gespült und in 100 ml Entfärber-Lösung bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

### 3.3.6 Bestimmung von RNase T1-Konzentrationen

Die Ermittlung der Konzentration reiner RNase T1-Lösungen erfolgte für das Wildtyp-Protein und für Varianten ohne chromophore Aminosäure-Austausche mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{280\text{nm}} = 17300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [30]. Für Varianten mit veränderter Zusammensetzung an aromatischen Aminosäuren wurde der Extinktionskoeffizient berechnet [110].

### 3.3.7 Fluoreszenzmarkierung von RNase T1

RNase T1-Lösungen (10 mg/ml) wurden mit  $1/10$  Volumen NHS-Rhodamin-Lösung (5/6-Carboxytetramethylrhodamin, Succinimidylester; 1 mg/ml in DMSO) versetzt und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die Abtrennung des freien Farbstoffes erfolgte mittels G50 Gel-filtration (vgl. 3.3.4). Im Anschluss wurden die gesammelten Fraktionen auf RNase Indikatorplatten aufgetragen, aktive Fraktionen vereint und lyophilisiert. Das Modifizierungs-Verhältnis von Farbstoff/RNase T1 wurde photometrisch nach unten aufgeführten Gleichungen berechnet. Mittels des spezifischen Absorptionskoeffizienten des Fluoreszenzfarbstoffes wird hierbei dessen Konzentration errechnet und durch die Konzentration des Proteins geteilt, wobei dessen Extinktionswert um den Anteil der Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes bei 280 nm korrigiert wird. Die farbstoffspezifischen Angaben wurden dem Produktkatalog der Firma PIERCE (Rockford, USA) entnommen.

$$V_{\text{Mod}} = \frac{E_{556\text{nm}} \cdot M_r(\text{RNase T1})}{[\text{RNase T1}] \cdot \epsilon_{556\text{nm}}(\text{TMR})} \quad (3)$$

$$\text{mit } [\text{RNase T1}] = \frac{(E_{280\text{nm}} - E_{556\text{nm}} \cdot \text{KF}_{\text{TMR}})}{\epsilon_{280\text{nm}}(\text{RNase T1})} \quad (4)$$

$V_{\text{Mod}}$	= Modifizierungsverhältnis Farbstoff/RNase T1
$M_r(\text{RNase T1})$	= 11089 Da
$\epsilon_{280\text{nm}}(\text{RNase T1})$	= $17300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (vgl. 3.3.6)
$\epsilon_{556\text{nm}}(\text{TMR})$	= $65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
$\text{KF}_{\text{TMR}}$	= 0,3 (Farbstoffspezifischer Korrekturfaktor)

## 3.4 Enzymologische Methoden

### 3.4.1 RNase-Indikator-Platten

Der semiquantitative Nachweis von RNase-Aktivitäten erfolgte mittels Toluidinblau-O-Indikatorplatten, welche den metachromatischen Effekt von Toluidinblau-O mit Polyanionen ausnutzen [111]. Der Farbstoff bildet im Komplex mit Agar eine rote Farbe, während er sich unter Anwesenheit von RNA in diese einlagert und die Farbe von rot nach blau wechselt. Es wurden LBA-Fest-Agar-Platten (vgl. 2.9) verwendet, welche mit 80 mg/l Toluidinblau-O und 2 g/l Hefe-RNA versetzt wurden, wobei die RNA erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C hinzugegeben wurde. Diese RNase-Indikator-Platten wurden zum einen zur

Identifikation von RNase T1-sekretierenden *E. coli*-Kolonien verwendet, die auf den ansonsten blauen Platten rote Höfe ausbilden, und zum anderen zur schnellen Identifikation von RNase-Aktivitäten in Lösungen. Diese wurde für diesen Zweck in zuvor in den Agar gestanzte Löcher pipettiert. Nach Inkubationszeiten bei 37 °C von 20 min bis mehreren Stunden bildeten sich in Abhängigkeit von der RNase-Konzentration rote Höfe um die Löcher.

### 3.4.2 RNA-Hydrolyse

**Reaktionspuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 6,0  
2 mM EDTA

**Fällungsmittel:** 2,5 % Lanthannitrat (w(v))  
30 % Perchlorsäure (v/v)

**Substratlösung:** 6 mg/ml Hefe-RNA  
in Reaktionspuffer

Die spezifische Aktivität von RNase T1-haltigen Proteinproben wurde nach der Methode von Anfinsen [112] mit einigen Modifikationen durchgeführt.

Die Methode basiert auf der spektrophotometrischen Bestimmung von säurelöslichen Nucleotiden bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm. Für die Reaktion wurden 500  $\mu$ l der Substratlösung mit 400  $\mu$ l Reaktionspuffer und 100  $\mu$ l RNase-Lösung gemischt. Die Enzymkonzentrationen variierten hierbei von 10-30 nM für Wildtyp RNase T1 bis zu 3  $\mu$ M für weniger aktive Varianten. Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 250  $\mu$ l eiskaltem Fällungsmittel versetzt. Die Fällung der hochmolekularen RNA erfolgte durch 20-minütige Inkubation auf Eis. Die Trennung der gefällten Komponenten von den säurelöslichen Oligonucleotiden wurde durch Zentrifugation (Biofuge® fresco, 13000 Upm, 15 min, 4 °C) erreicht.

Die Zentrifugations-Überstände wurden 1:10 in Wasser verdünnt und anschließend ihre Extinktion bei 260 nm bestimmt. Als Leerwerte wurde ein Reaktionsansatz ohne Enzym mitgeführt. Die spezifische Aktivität ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{spez. Akt.} = \frac{[E_{260\text{nm}}(\text{Probe}) - E_{260\text{nm}}(\text{LW})] * 25}{\text{mg Protein im Ansatz}} \quad (5)$$

wobei eine Enzymeinheit (1 U) als die Menge Enzym definiert ist, die unter Standardbedingungen säurelösliche Oligonucleotide, äquivalent einem Extinktionswert von  $E_{260\text{nm}} = 1$ , freisetzt.

### 3.4.3 Zymogramm

**Renaturierungslösung:** 10 mM Tris/HCl pH 6,0  
25 % Isopropanol (v/v)

**10x Waschlösung:** 100 mM Tris/HCl pH 6,0

Zymogramme kombinieren die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen mit einem Aktivitätsnachweis einzelner Banden [113], was im Rahmen der vorliegenden Arbeit dazu genutzt wurde, RNase-haltige Banden im SDS-Polyacrylamid-Gel nachzuweisen. Der Trenngel-Lösung wurden hierfür 0,9 mg/ml Hefe-RNA als Substrat hinzugefügt, ansonsten erfolgte die Vorbereitung des Gels sowie die Probenaufbereitung wie unter 3.3.5 beschrieben. Um eine Hydrolyse der im Gel befindlichen RNA während des Gellaufs zu verhindern, erfolgte derselbige bei 4 °C. Laufpuffer und Gelkammer wurden vorgekühlt. Ein Teil des Gels kann nach der Elektrophorese abgetrennt und herkömmlich mit Coomassie Brilliant Blau R250 (vgl. 3.3.5) gefärbt werden, zum Beispiel um einen Molekulargewichtsstandard verwenden zu können. Der Rest des Gels wurde zweimal 15 min in Renaturierungslösung geschwenkt, um die Proteine durch Auswaschen des SDS mit Isopropanol zu renaturieren. Das Isopropanol wurde durch zweimaliges Waschen und jeweils 5-minütigem Schwenken mit Waschlösung entfernt und in einer 2-stündigen Inkubationszeit in 10x Waschlösung bei 37 °C erfolgte die Hydrolyse der im Gel befindlichen RNA in Bereichen von RNase-Banden. Nach 10-minütiger Inkubation in Waschlösung wurde das Gel 30 min in einer 0,2 %-igen Toluidinblau-O-Lösung (w/v) in Waschlösung) gefärbt. Durch die interkalierenden Eigenschaften des Farbstoffs wurden RNA-haltige Bereiche in Gel blau gefärbt, während Bereiche, in denen die RNA durch dort vorhandene RNase-Aktivitäten gespalten wurde, weiß verblieben.

### 3.4.4 Dinucleosidphosphat-Hydrolyse

#### 3.4.4.1 Bestimmung der Basenspezifität mit Dünnschicht-Chromatographie

**Laufmittel:** 158 ml heißgesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung  
38 ml 100 mM MES pH 6,1  
4 ml Isopropanol  
(Verhältnis 79:19:2)

Zur Ermittlung der Basenspezifität einzelner RNase T1-Varianten wurden die Hydrolyseprodukte der 4 NpC-Dinucleosidphosphate (GpC, ApC, CpC und UpC) dünnschichtchromatographisch nachgewiesen [31]. Hierfür wurden 10 µl Periplasmafraktion der entsprechenden Variante (vgl. 3.3.2) bzw. verdünnte Lösungen der gereinigten Enzyme mit 1 µl Substratlösung (1 mg/ml in *Aqua dest.*) für 15 min bis 4 h bei 37 °C bzw. bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Trennung der Spaltprodukte auf Zellulose F-Glasplatten der Abmessung 20 x 20 cm in einer Laufmittel-gesättigten Kammer für etwa 1<sup>1/2</sup> Stunden solange bis die Lauf-front in etwa die Hälfte der Plattenhöhe erreichte hatte. Dann wurden die Platten getrocknet und die Spaltprodukte wurden unter UV-Licht (258 nm) detektiert.

#### 3.4.4.2 Michaelis-Menten-Kinetik

**Messpuffer:** 100 mM MES pH 6,0  
100 mM NaCl  
2 mM EDTA

Die kinetische Charakterisierung von RNase T1 und ihren Varianten erfolgte nach dem von Michaelis und Menten im Jahre 1913 eingeführten allgemeinen Formalismus für Ein-Substrat-Reaktionen:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} ; \quad k_{\text{cat}} = V_{\max}/[E] \quad (6)$$

Als spezifische Substrate kamen hierbei Gyanylyl-3',5'-Cytidin (GpC) und Adenylyl-3',5'-Cytidin (ApC) zum Einsatz. Die kinetischen Parameter der Dinucleosid-Monophosphat-Hydrolyse wurden spektrophotometrisch an einem Beckmann Spektrophotometer DU<sup>®</sup> 640B mit temperierbarem Küvettenhalter bei einer konstanten Temperatur von 25 °C bestimmt.

Zur Bestimmung der initialen Hydrolyse-Geschwindigkeiten wurde der hyperchrome Effekt infolge der Aufhebung der Basenstapelung bei der Umesterung von GpC bzw. ApC zu zyklischem Guanosin- bzw. Adenosin-Monophosphat genutzt:

$$\text{GpC: } \epsilon_{280\text{nm}} = 12600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \quad \Delta \epsilon_{280\text{nm}} = 2200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad [114]$$

$$\text{ApC: } \epsilon_{268\text{nm}} = 19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \quad \Delta \epsilon_{268\text{nm}} = 2120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad [115]$$

Über die Zunahme der Absorption wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen im Fall von GpC für 10 min und im Falle von ApC für 30 min gemessen. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen wurden abgestimmt auf die spezifische Aktivität der RNase T1 Variante. Durch Variation der Enzymkonzentration wurde überprüft, dass Michaelis-Menten-Bedingungen gelten.

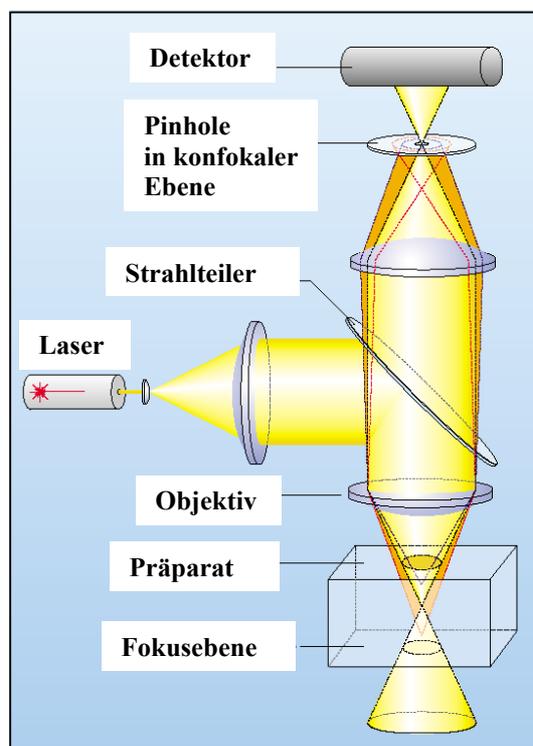
Vor jeder Messung wurden die Reaktionsgemische zunächst ohne Enzym für einige Minuten inkubiert und photometrisch kontrolliert, um ein Autohydrolyse des Substrates auszuschließen. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Enzymzugabe und schnelles Mischen in der Küvette gestartet.

Für die Messungen wurden Halbmikro-Küvetten mit Schichtdicken von 10, 2 und 1 mm verwendet. Aufgrund der hohen Eigenabsorptionswerte der Substrate wurde für die höchsten Substratkonzentrationen die Küvette mit dem kürzesten Lichtweg verwendet.

Für jede Substratkonzentrationen wurden mindestens drei Messungen durchgeführt.

## 3.5 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

### 3.5.1 Allgemeiner Aufbau



**Abbildung 12:** Das konfokale Prinzip. Laserlicht wird über einen Strahlteiler und ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Das von dieser ausgehende Fluoreszenzlicht kann den Strahlteiler ungehindert passieren und gelangt über eine Lochblende, dem sogenannten *Pinhole*, zum Detektor. Das *Pinhole* bewirkt, dass nur Licht aus der Fokusebene den Detektor erreicht. (Quelle: CARL ZEISS GmbH, Jena. URL: [www.zeiss.de/fcs](http://www.zeiss.de/fcs))

Das analytische Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie basiert auf der konfokalen Detektion einer mit Laserstrahlen angeregten fluoreszenzmarkierten Probe. Das Laserlicht wird nahezu beugungsbegrenzt über einen dichroitischen Strahlteiler durch ein hochnumerisches Objektiv in die Probe fokussiert (Abb. 12).

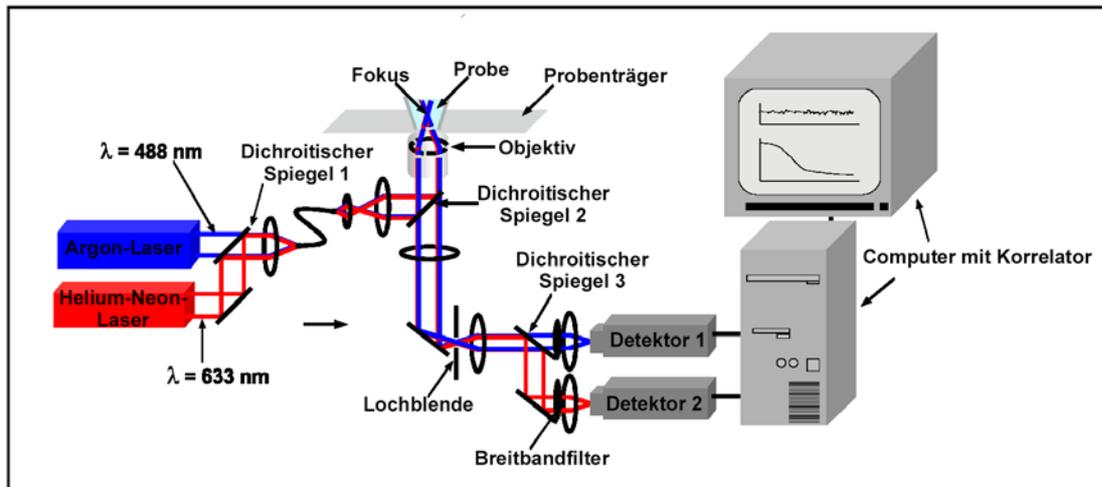
Dieser Fokus wird über dasselbe Objektiv und weiterer Optik auf einer Lochblende (*Pinhole*) abgebildet, die nur Licht aus einem kleinen Volumen der Fokusebene zum Detektor passieren lässt und damit als Raumfilter wirkt (konfokale Abbildung). Das Detektionsvolumen beträgt etwa  $10^{-15}$  Liter (1 Femtoliter) und ermöglicht zusammen mit einem empfindlichen Einzelphotonenzähler (*Avalanche-Photo-Diode*) eine statistische Auswertung von Konzentrationsfluktuationen fluoreszierender Moleküle bis hinunter in den Einzelmolekülbereich.

### 3.5.2 Zweifarben-FCS

Bei der Zweifarben-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie kommen zweifach fluoreszenzmarkierte Moleküle zum Einsatz. Das konfokale Volumenelement wird mit zwei auf die Farbstoffe abgestimmten Wellenlängen ausgeleuchtet und die entsprechenden Fluoreszenzsignale werden in zwei voneinander unabhängigen Detektionskanälen registriert und miteinander korreliert. Beide Anregungswellenlängen werden über dasselbe Objektiv in das System eingekoppelt und das Emissionslicht wird hinter der Lochblende optisch getrennt und auf die Detektoren geleitet (vgl. Abb. 13).

#### 3.5.2.1 Geräteanordnung und -Konfiguration

Die Zweifarben-FCS-Messungen wurden am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (CARL ZEISS GmbH, Jena) durchgeführt. Wie in Abb. 13 dargestellt, wurden zwei Laser (Argon- und Helium-Neon-Laser) zur Anregung von zwei verschiedenen Farbstoffen (Cy5 mit  $\lambda_1 = 633$  nm und *Rhodamine* Grün mit  $\lambda_2 = 488$  nm) verwendet. Das Emissionslicht beider Farbstoffe wurde optisch voneinander getrennt und unabhängig voneinander auf die beiden Detektoren gelenkt (Emissionswellenlängen: 528 und 670 nm; primärer dichroitischer Strahlenteiler: HFT 488/633; sekundärer dichroitischer Strahlenteiler: NFT 635, Filter [Kanal 2] BP505-550; Filter [Kanal 1]: LP650).



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskops Confo-Cor 2 (CARL ZEISS GmbH, Jena). Quelle: Dissertation Kerstin Korn 1999 [73].

### 3.5.3 Substrat-Hybridisierung

**Ansatz:** 1  $\mu$ M Sub\_G  
**(100  $\mu$ l)** 1,2  $\mu$ M T1\_Sub\_Li  
 1,2  $\mu$ M T1\_Sub\_Re  
 20 mM MES pH 6,0

Das RNase-Substrat für die Zweifarben-FCS-Messungen bestand aus drei Komponenten: Ein langes DNA/RNA-Hybrid-Oligonucleotid mit einer Cy5-Modifizierung am 5'-Ende, einer Rhodamin Grün-Modifizierung am 3'-Ende und einem internen 3'-Hydroxyl-Guanosin-Rest (Spaltstelle) und zwei kurzen DNA-Oligonucleotiden:

#### Sub\_G

5' - **Cy5** - TCCATACCAGCCAGCCACAAG (OH) CAAGCCACCGAAGCACAGATA - **RhG** - 3'  
 3' - AGGTATGGTCCGGTCGGTG CCGTGGCTTCGTGTCTAT - 5'

**T1\_Sub\_Re**

**T1\_Sub\_Li**

Das markierte Hybrid wurde von der Firma IBA GmbH bezogen, die eine Reinigung mittels präparativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchführten. Alle drei Komponenten wurden in oben aufgeführtem Ansatz in einem Thermocycler assembliert. Die Probe wurde zunächst für 10 s auf 94 °C erhitzt und dann auf 25 °C mit 0,1 °C/s auf 25 °C abgekühlt. Nach Hybridisierung wurde das Substrat bei 4 °C aufbewahrt.

Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt und Fluoreszenzfarbstoff-haltige Lösungen wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

### 3.5.4 Versuchsdurchführung

**2x FCS-Puffer:**                    200 mM MES pH 6,0  
    200 mM NaCl  
    4 mM EDTA

Zu Beginn eines jeden Messtages wurde eine *Pinhole*-Justierung mit einer Rhodamin6G-Lösung (10 ng/ml) im Zweifarben-FCS-Messmodus (vgl. 3.5.2.1) unter Argon-Laser-Anregung (488 nm) durchgeführt. Das Emissionsspektrum dieses Standard-Farbstoffes liefert ausreichend breit gefächertes Fluoreszenzlicht, um eine Signalloptimierung in beiden Detektionskanälen vorzunehmen. Im Anschluss wurden farbstoff- und gerätespezifische Parameter, wie z.B. die Diffusionszeit des Farbstoffes, die statistische Anzahl der Moleküle im Volumenelement, der Strukturparameter oder die Tripletzeit, für obige Rhodamin6G-Lösung bestimmt, um die Gerätekonfiguration zu überprüfen und eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Der so ermittelte Strukturparameter wurde in allen folgenden Messungen konstant gehalten.

Alle Messungen wurden in 1x FCS-Puffer auf Deckgläschen als Probenträger oder in FCS-Probenkammern mit Deckel (NUNC, Wiesbaden-Biebrich) vermessen. Der Laserfokus wurde innerhalb des Tropfens auf einen Abstand von 200  $\mu\text{m}$  von der Glasoberfläche justiert. Die Substratkonzentration (vgl. 3.5.3) wurde in der Regel auf 10 nM eingestellt und die Messzeit betrug 30 bis 60 s.

Prinzipiell wurden zwei unterschiedliche Messarten angewendet: entweder wurde Substrat vorgelegt und die Substratspaltung nach Enzymzugabe kontinuierlich verfolgt (3.5.4.1) oder Substrat und Enzym wurden einen definierten Zeitraum vorinkubiert und die FCS-Messungen erfolgten im Anschluss (3.5.4.2).

#### 3.5.4.1 Echtzeit-Messungen

Echtzeit-Messungen wurden in der Regel in den NUNC-Probenkammern mit einem Probenvolumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt, da die Messungen über einen größeren Zeitraum erfolgten und aufgrund der Verschlussbarkeit der Kammern Verdunstung nicht zu einer Konzentrierung der Probe führen konnte. Das Substrat (vgl. 3.5.3) wurde in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt und eine Nullpunktmessung (60 s) durchgeführt. Nach der Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  RNase T1-haltiger-Lösung wurde die Substratlösung durch aufeinander folgende 30-60 s-Messungen in einem Zeitraum von bis zu 90 min verfolgt.

### 3.5.4.2 Endpunkt-Messungen

Für die Endpunkt-Messungen wurden RNase-haltige Lösungen 1:1 mit Substratlösung (vgl. 3.5.3) vermischt und für einen definierten Zeitraum (10 min bis 4 h) bei 37 °C inkubiert. Die Substratkonzentration betrug dabei im Reaktionsansatz 0,5 µM. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden die Proben im Anschluss in ein Eisbad gestellt und für die FCS-Messung 1:50 in 1x FCS-Puffer verdünnt. 20 µl dieser Verdünnung (Substratkonzentration 10 nM) wurden auf ein Deckgläschen aufgebracht und vermessen (3x 60 s).

## 3.6 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Säugetier-Zelllinien wurden in einem separaten Zellkultur-Labor durchgeführt. Es wurde prinzipiell auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet.

Verwendet wurde zum einen die Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-MC, sowie aus Hamsternieren abgeleitete BHK-Zellen (*Baby Hamster Kidney*).

Die Lagerung und das Passagieren der Zelllinien wurden freundlicherweise von Hella Späthe und Christina Dammann (Arbeitsgruppe Prof. Annette Beck-Sickinger) durchgeführt.

### 3.6.1 Kultivierung

#### Medien (vgl. 2.8):

<b>SK-N-MC-:</b>	D-MEM plus 10 % FBS 4 mM Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essentielle AS	<b>BHK:</b>	MEM plus 10 % FBS
------------------	--	-------------	----------------------

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> angezogen, bis sie auf dem Flaschenboden einen konfluenten Rasen bildeten. Der Medienüberstand wurde abgegossen und die Zellen wurden 2-mal mit 10 ml Dulbecco's PBS (GIBCO™ INVITROGEN, Karlsruhe) gewaschen. Um die Zellen von dem Flaschenboden abzulösen, wurde der Zellrasen mit 1 ml Trypsin-EDTA (INVITROGEN, Karlsruhe) bedeckt und für 3-5 min unter der Sterilbank stengelassen. Die Zellen wurden im Anschluss vom Boden durch Klopfen gelöst und in 5 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellkonzentration dieser Suspension wurde unter einem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer [116] bestimmt. Nach entsprechender

Verdünnung mit Medium wurden die Zelllinien in sterilen 96-Loch-Platten neu ausgesät, wobei die Zellzahl auf 30000 und 100000 pro Loch eingestellt wurde.

### **3.6.2 Lipofectamin™-Transfektion**

Um eukaryotische Zellkulturen transient zu transfizieren wurde ein System angewandt, das auf dem Prinzip der Lipofektion beruht [117]. Hierbei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nucleinsäure an Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellmembran endocytotisch zu passieren [118].

Die zu transformierenden Zellen wurden am Tag zuvor in 96-Loch-Platten ausgesät und über Nacht bebrütet. Optimalerweise sollten die Zellkulturen vor der Transfektion etwa 60-80% Konfluenz erreicht haben.

75 µl OPTIMEM I-Minimalmedium (vgl. 2.8) wurden mit 1,5 µl Lipofectamin 2000™ (INVITROGEN, Karlsruhe) versetzt, gemischt und für 30 min bei RT zur Liposomenausbildung stehen gelassen. Es wurde 1 µg Plasmidlösung in OPTIMEM I zugegeben und erneut 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden jeweils mit 200 µl OPTIMEM-Medium pro Loch gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes mit 150 µl des Transfektionsansatzes versetzt. Nach 4- bis maximal 5-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Überstand wieder entfernt und frisches Vollmedium (vgl. 3.6.1) zugegeben. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am darauf folgenden Tag ausgewertet.

### **3.6.3 Trypanblau-Färbung**

Mit Hilfe der Trypanblau-Färbung lässt sich sehr schnell die Vitalität von Zellen überprüfen. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der durch die defekte Zellmembran toter Zellen in das Cytosol andringt und dieses durch Interaktion mit Zellproteinen tiefblau färbt. In lebenden Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen. Nach Abnehmen des Mediums wurden die zu färbenden Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einer frisch 1:1 in PBS-Puffer verdünnten Trypanblau-Lösung (0,5 % (w/v) in 0,9 % NaCl (w/v)) versetzt und für 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (vgl. 3.6.4).

### **3.6.4 Dokumentation**

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen, als auch Aufnahmen unter Fluoreszenzanregung, wurden mit einem Axiovert 25-Mikroskop (CARL ZEISS GmbH, Jena) in Kombination mit der computergesteuerten Digitalkamera AxioCam MRm durchgeführt. Für die Aufnahmen unter Fluoreszenzanregung wurde der Zeiss-Filtersatz 09 (450-490/515 nm) verwendet.

### **3.6.5 Fluoreszenzquantifizierung**

Im Falle von GFP-exprimierenden Zellen konnte die Fluoreszenzintensität der einzelnen Kavitäten einer 96-Loch-Platte mit dem Platten-Fluoreszenz-Lesegerät SpectraFluor Plus (TECAN, Crailsheim) quantifiziert werden. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit Dulbecco's PBS (GIBCO™ INVITROGEN, Karlsruhe) gewaschen, so dass im Anschluss die Platte ausgelesen werden konnte.

In jeder Kavität wurde die Fluoreszenzintensität an 5 Messpunkten bestimmt und gemittelt. Es wurde der Messmodus „von unten“ mit dem GFP-spezifischen Filtersatz (Anregungsfilter: 485 nm; Emissionsfilter: 510 nm) verwendet.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

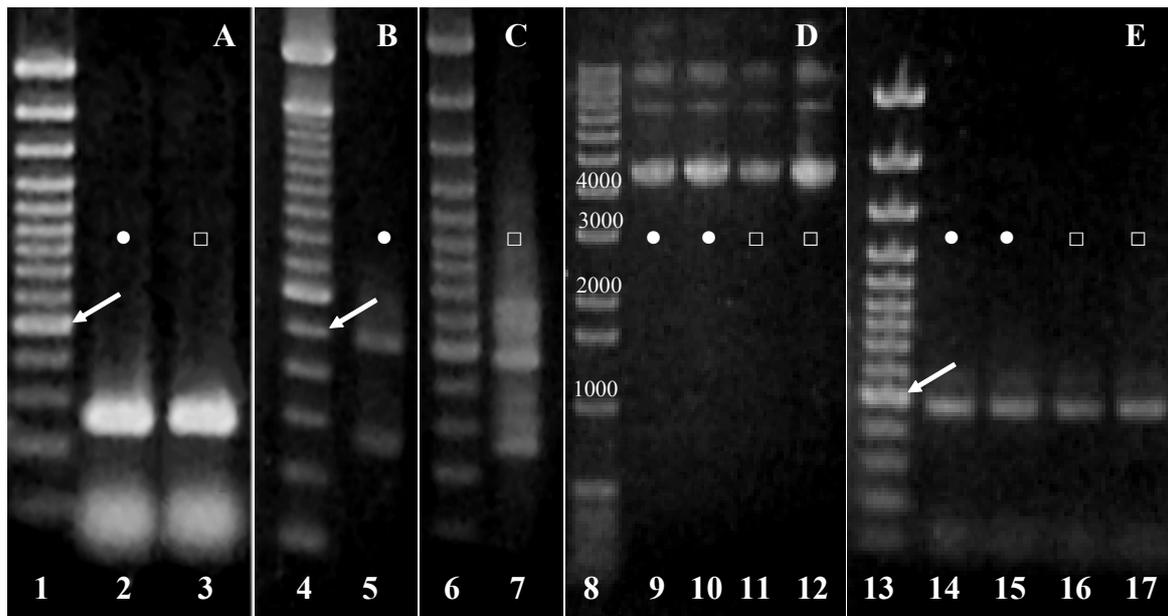
### 4.1 RNase T1 Varianten E46N und Y45W/E46N

#### 4.1.1 Darstellung und Reinigung

RNase T1 9/5 E46N (RV) ist die RNase T1-Variante, mit der die bisher stärkste Spezifitätsänderung in Richtung einer Adenosin-Bevorzugung gelungen ist. Die G-Spaltung erfolgt nur noch etwa 40-mal besser als die A-Spaltung [45]. Um die Bedeutung der in der Variante RV enthaltenen AS-Austausche einzuschätzen, sollte der AS-Austausch E46N alleine und in Kombination mit dem Austausch Y45W in die Wildtyp-Sequenz eingeführt und die entsprechenden Varianten gereinigt und kinetisch charakterisiert werden.

Die Darstellung der Varianten erfolgte mit der PCR-basierten „Mega-Primer“-Mutagenese (3.2.1.3). Mit Hilfe des Standard-Primers A2vo und der beiden Mutagenese-Primern T1E46N und T1Y45W/E46N wurden in der ersten PCR (20 ng Matrize, Anlagerungs-Temperatur: 55 °C, 25 Zyklen) die entsprechenden Punktmutationen in das 3'-Ende der Amplifikate eingeführt (Abb. 13, Gel I). Diese wurden nach Reinigung als „Mega-Primer“ zusammen mit dem Standard-Primer A2hi in der zweiten PCR (20 ng Matrize, Anlagerungs-Temperatur 48 °C, 25 Zyklen) zur Amplifikation des Gesamtlängen-RNase T1-Gens eingesetzt wurden (Abb. 14, Gel II und III). Die Sequenzen der Oligonucleotide sind unter 2.7 zu finden. Die hierbei im Falle der Y45W/E46N-Klonierung auftretenden Nebenprodukte konnten weder durch Variation der Anlagerungs-Temperatur noch der Zyklenanzahl beseitigt werden. In allen Mutagenese-PCRs diente das RNase T1 (wt)-Expressionsplasmid pA2T1 als Matrize. Die PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Reinigungs-Kit (3.2.5.3) gereinigt und in Vorbereitung der Klonierung in den pIN-III-ompA-Sekretionsvektor mit den Restriktionsenzymen Xba I und Hind III behandelt (3.2.7). Die Reinigung der geschnittenen PCR-Produkte erfolgte mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion der Fragmente mit der korrekten Größe. Hierdurch konnten auch die aufgetretenen Nebenprodukte der 2. PCR abgetrennt werden. Der Zielvektor wurde wie unter 3.2.7 beschrieben für die Ligationen vorbereitet. Nach Durchführung der Ligationen wurden elektrokompetente TOP10F'-Zellen mit je 5 µl der Ligationsansätze transformiert und auf LBA-Platten selektiert. Einige der erhaltenen Klone wurden durch Ausstreichen auf RNase-Indikatorplatten auf das Vorhandensein exprimierter, aktiver RNase T1 überprüft und von jeweils 2 positiven Klonen wurden Kulturen für Plasmid-Präparationen angesetzt (3.2.4). Die korrekte Größe der isolierten Plasmide wurde mittels nativer Agarose-

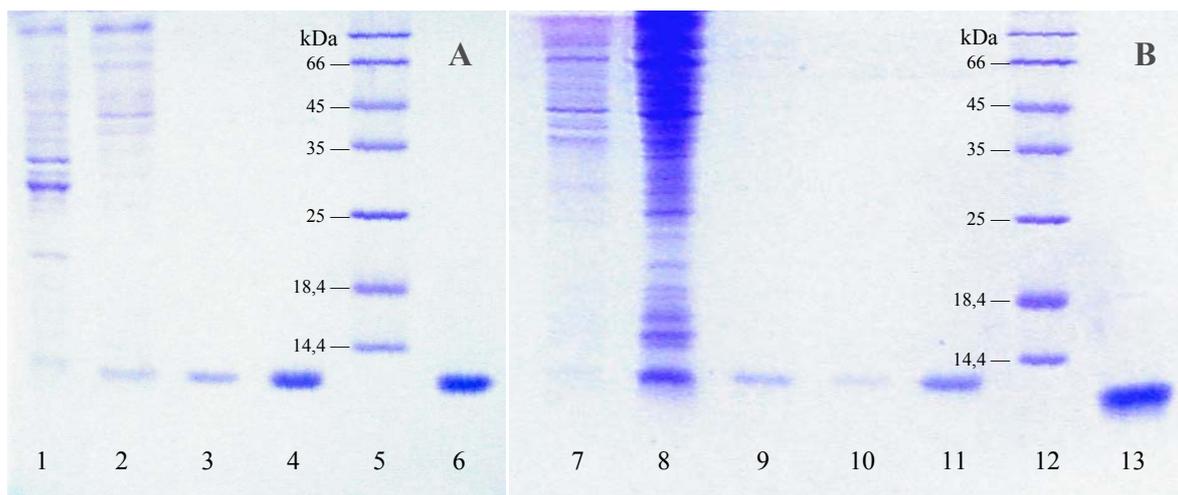
Gelelektrophorese überprüft (Abb. 14, Gel IV) und das Vorhandensein des RNase T1-Inserts wurde in einer Kontroll-PCR (0,5 µg Plasmid, 50 °C Anlagerungs-Temperatur, 12 Zyklen) mit dem Primerpaar A2vo/A2hi und anschließender Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (Abb. 14, Gel V). Zur Absicherung der Klonierung wurde von je einem Klon beider Varianten eine Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode mit den entsprechend fluoreszenzmarkierten Sequenzier-Primern A2vo und A2hi durchgeführt (3.2.11). Beide Sequenzen waren richtig und die korrespondierenden Plasmide wurden mit pA2T1E46N und pA2T1Y45WE46N bezeichnet.



**Abbildung 14:** Konstruktion von pA2T1E46N und pA2T1Y45W/E46N. Die einzelnen Schritte der Darstellung der Expressionsvektoren für beide RNase T1-Varianten wurden mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese verfolgt. Proben der E46N-Klonierung sind mit einem Punkt, die der Y45W/E46N-Klonierung mit einem Quadrat gekennzeichnet. Gel A-C und Gel F: 2 %ige Agarose; Gel D: 0,9 %ige Agarose. Bahn (1,4,13), 750 ng 100 bp-DNA-Fragment-Leiter. Die 500 bp-Bande ist jeweils mit einem Pfeil markiert; Bahn (8), 1 µg 1 kbp-DNA-Fragment-Leiter. Die Größen ausgesuchter Markerbanden sind über den Banden in bp angegeben; (2+3), 10 µl der 1. Mutagenese-PCR-Ansätze; (5+7), Teil des Produktes der 2. Mutagenese-PCR nach Reinigung; (9-12), 5 µl der Plasmid-Präparationen der konstruierten Vektoren; (14-17), 10 µl der Kontroll-PCR.

Im Folgenden sollten die beiden Varianten mit Hilfe der dargestellten Expressionsvektoren in *E. coli* exprimiert und im Anschluss gereinigt werden. In dem mit einer Ampicillin-Resistenz versehenen Vektor stehen die RNase T1-Gene unter der Kontrolle eines lac-Promotors und mittels des ompA-Signalpeptids erfolgte die Sekretion der RNasen ins Periplasma. Frisch mit den Plasmiden pA2T1E46N und pA2T1Y45WE46N transformierte *E. coli* TOP10F<sup>-</sup>-Einzelkolonien wurden gleichzeitig durch Ausstreichen auf RNase-Indikatorplatten auf Aktivität kontrolliert und zum Animpfen von Vorkulturen verwendet. Mit diesen Vorkulturen wurden

2 l Hauptkulturen angeimpft, welche wie unter 3.3.1 beschrieben kultiviert wurden. Die Kulturen beider Varianten erreichten nach ü.N.-Inkubation eine  $OD_{600nm}$  von etwa 6,0. Nach Freisetzung der RNase T1-haltigen Periplasmafraktion durch osmotischen Schock (3.3.2) erfolgte die Reinigung der RNase T1-Varianten durch DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (3.3.3) und eine sich anschließende G50-Größenausschluss-Chromatographie (3.3.4). Die Elutionsfraktionen, die während beider Chromatographie-Schritte auf RNase-Indikatorplatten weniger als 50% der maximalen RNase-Aktivität aufwiesen, wurden verworfen. Im Falle der RNase T1 Variante Y45W/E46N wurde der Gelfiltrationsschritt noch einmal wiederholt, da die erste Präparation noch Verunreinigungen aufwies. Aus zwei Liter Kultur konnten von dieser Variante 7,5 mg und von der Variante E46N 12 mg gereinigtes Protein gewonnen werden. Die Präparation des Wildtyps erfolgte auf gleiche Art und Weise und ergab 25 mg sauberes Protein. Die Homogenität der präparierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Reinigung der RNase T1-Varianten E46N (A) und Y45W/E46N (B). 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele, Coomassie-gefärbt. Bahn (5+12), Protein-Standard; Bahn (1+7), 10  $\mu$ l Periplasma-Präparation; Bahn (2+8), 10  $\mu$ l der vereinigten Fraktionen nach DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie; Bahn (3+9), 10  $\mu$ l der vereinigten Fraktionen nach Gelfiltration; Bahn (10), 10  $\mu$ l der vereinigten Fraktionen nach der zweiten Gelfiltration; Bahn (4+11), Spatelspitze der lyophilisierten RNase-Präparationen; Bahn (6+13), 10  $\mu$ g RNase T1 (wt).

Der SDS-PAGE-Auftragpuffer enthielt kein Mercaptoethanol, wodurch das Laufverhalten von RNase T1 ihrem Molekulargewicht entspricht. Enthält der Puffer Mercaptoethanol weist RNase T1 ein apparentes Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamid-Gelen von etwa 18 kDa auf [73]. Während sich die RNase T1-Variante E46N in ihrem Laufverhalten kaum vom Wildtyp unterscheidet, läuft die Variante Y45W/E46N ein wenig langsamer. Beide Varianten konnten also ohne wesentliche Änderungen mit demselben Protokoll wie das Wildtyp-Protein

exprimiert und gereinigt werden.

Zur Überprüfung der Identität der Proteine wurden zusätzlich zu den durchgeführten Sequenzierungen der klonierten Plasmide von Frau Regina Reppich MALDI-Spektren der Proteinpräparationen aufgenommen (vgl. 3.3.4). Die ermittelten Molekülmassen waren mit den theoretisch errechneten identisch.

#### 4.1.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der isolierten Varianten

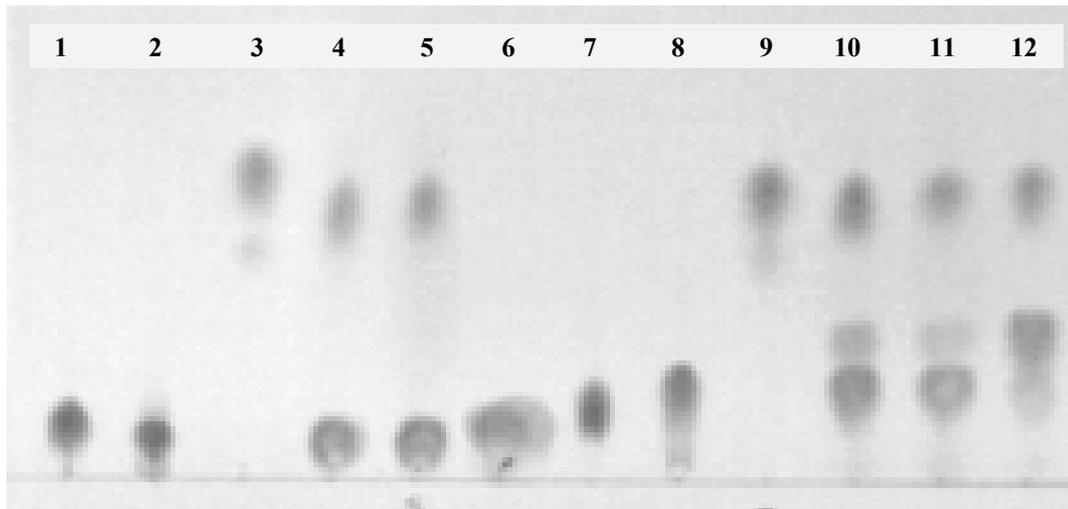
Zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der gereinigten RNase T1-Varianten E46N und Y45W/E46N kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz: Die spezifische Aktivität der Varianten wurde mit Hefe-RNA als Substrat bestimmt, mittels Dünnschicht-Chromatographie wurde die Hydrolyse von Dinucleosidmonophosphaten zur Bestimmung der Substratspezifität überprüft und photometrisch erfolgte die Bestimmung kinetischer Parameter für die Substrate ApC und GpC.

Die Aktivitätsbestimmung für die RNA-Hydrolyse erfolgte mit einem modifizierten Protokoll nach Anfinsen *et al.* (3.4.2), bei der durch Hydrolyse freigesetzte, säurelösliche Oligonucleotide quantifiziert werden. Für beide Varianten wurde die spezifische Aktivität für drei Enzymkonzentrationen im Bereich 0,5-2  $\mu\text{M}$  ermittelt. Die errechneten, gemittelten spezifischen Aktivitäten betragen:

$12600 \pm 1800 \text{ U/mg}$	für Variante E46N
$14200 \pm 1550 \text{ U/mg}$	für Variante Y45W/E46N

Diese Werte entsprechen 3,3 bzw. 3,7 % der Wildtyp-Aktivität (356000 U/mg).

Zur Bestimmung der Basenspezifität wurden Lösungen des Wildtyps und der beiden Varianten in einer Konzentration von 0,1 mg/ml mit den vier Dinucleosidmonophosphat-Substraten GpC, ApC, UpC und CpC wie unter 3.4.4.1 beschrieben für 15 bzw. 30 min bei RT inkubiert und die Hydrolyse-Produkte dünnschicht-chromatographisch nachgewiesen. Für die Substrate UpC und CpC konnte nach 30 min in keinem Fall eine Hydrolyse beobachtet werden. Beide Varianten sowie auch der Wildtyp zeigen nach 15 min eine Spaltung des GpC-Substrates und für die RNase T1-Varianten E46N und Y45W/E46N konnten nach 30 min Inkubationszeit Spaltprodukte mit ApC als Substrat nachgewiesen werden (Abb. 16).



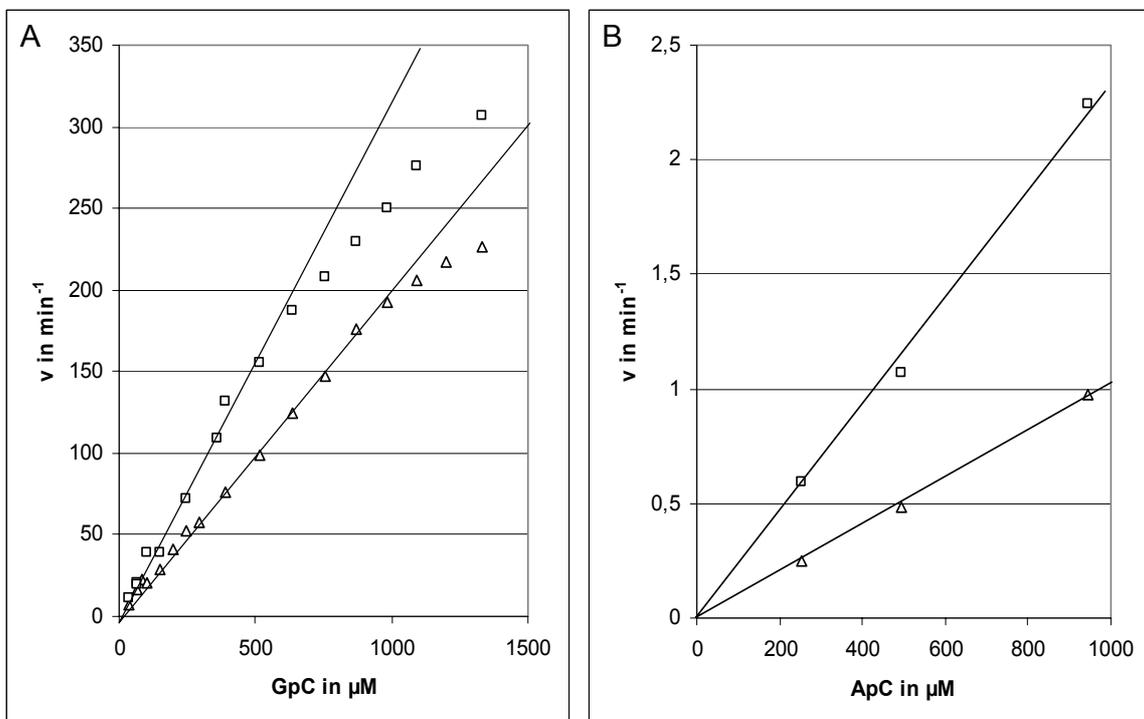
**Abbildung 16:** Dünnschicht-chromatographische Analyse der GpC- und ApC-Spaltung durch RNase T1 (wt) und die Varianten E46N und Y45W/E46N. 1  $\mu\text{g}$  Protein wurden mit 10  $\mu\text{g}$  Dinucleosidmonophosphat-Substrat für 15 min (GpC) bzw. 30 min (ApC) in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  inkubiert. Die Hydrolyseansätze wurden auf eine Zellulose F-DC-Platte aufgetragen und die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 nm). (1), 10  $\mu\text{g}$  ApC; (2), 10  $\mu\text{g}$  AMP; (3), 10  $\mu\text{g}$  C; (4-6), ApC-Hydrolyse-Ansätze: 4: E46N, 5: Y45W/E46N, 6: Wildtyp; (7), GpC; (8), GMP; (9), C; (10-12), GpC-Hydrolyse-Ansätze, 10: E46N, 11: Y45W/E46N, 12: Wildtyp.

Zur genaueren Charakterisierung der kinetischen Eigenschaften der RNase T1-Varianten sollten die Michaelis-Menten-Parameter für die Substrate ApC und GpC photometrisch bestimmt werden. Dies erfolgte wie unter 3.4.4.2 beschrieben, wobei der durch die Umesterung der Dinucleosidmonophosphate in die entsprechenden zyklischen Mononucleotide cGMP und cAMP auftretende hyperchrome Effekt genutzt wird, um die Reaktion zu verfolgen und Initialgeschwindigkeiten zu ermitteln. Die Enzymkonzentrationen betragen bei der GpC-Spaltung 80 nM für die Variante E46N und 120 nM für die Variante Y45W/E46N und bei der ApC-Spaltung 880 nM und 700 nM in derselben Reihenfolge. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration für verschiedene Substratkonzentrationen wurde gezeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit gegeben ist. Abbildung 17 zeigt die Michaelis-Menten-Diagramme der Substratspaltung für beide Varianten. Aufgrund der hohen Eigenabsorption der Substrate war es nicht möglich in noch höheren Substratkonzentrations-Bereichen zu messen. Messungen oberhalb von etwa 600  $\mu\text{M}$  waren überhaupt erst dadurch möglich, dass Quarzküvetten mit nur 0,1 cm Schichtdicke verwendet wurden. Schon bei der GpC-Spaltung (Abb. 17A) konnte der Substrat-Sättigungsbereich der Umsetzung nicht erreicht werden, so dass nur die katalytische Konstante  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  aus dem initialen Anstieg der Kurve unter der Voraussetzung  $[\text{S}] \ll K_{\text{M}}$  bestimmt werden konnte (vgl. 3.4.4.2, Gleichung 3). Das gleiche Bild ergab sich für die ApC-Hydrolyse, bei der die Messzeit aufgrund der

geringeren Umsatzraten auf 30 min verlängert wurde. Für die aufgeführten Messpunkte wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, auf Messungen der ApC-Hydrolyse bei weiteren Substratkonzentrationen wurde verzichtet. Für beide Substrate kann zumindest qualitativ festgestellt werden, dass der  $K_M$ -Wert deutlich größer als 1 mM sein dürfte. Die aus den Steigungen der in Abbildung 17 dargestellten Tangenten ermittelten katalytischen Konstanten  $k_{cat}/K_M$  betragen:

	GpC	ApC
RNase T1 E46N	$195 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$1000 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$
RNase T1 Y45W/E46N	$310 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$2280 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Die Aktivität mit GpC als Substrat ist im Vergleich zum Wildtyp ( $k_{cat}/K_M = 75 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; [44]) deutlich auf 2,6 % bzw. 4,1 % erniedrigt ähnlich wie dies auch schon für die spezifischen Aktivitäten mit Hefe-RNA als Substrat festgestellt werden konnte (s. o.). Die Spezifität beider Varianten ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich in Richtung einer Adenosin-Präferenz verschoben. Während das Spezifitätsverhältnis im Wildtyp noch 284000 [44] beträgt, spalten die beiden RNase T1-Varianten GpC nur noch 195-mal (E46N) bzw. 137-mal (Y45W/E46N) besser als ApC. Dies entspricht einer Spezifitätsverschiebung um den Faktor 1500 bzw. 2100 [119].



**Abbildung 17:** Michaelis-Menten-Diagramme der GpC- und ApC-Hydrolyse für die RNase T1-Varianten E46N und Y45W/E46N. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei Messungen. ( $\Delta$ ) RNase T1 E46N; ( $\square$ ) RNase T1 Y45W/E46N.

Tabelle 4 fasst die für die Varianten E46N und Y45W/E46N bestimmten kinetischen Parameter zusammen und vergleicht sie mit einigen relevanten RNase T1-Varianten aus der Literatur.

Es wird ersichtlich, dass unter allen Varianten mit veränderter Substrat-Spezifität die Variante 9/5 Q46N (RV) diejenige mit der deutlich höchsten ApC-Spaltungs-Aktivität ist. Die nur noch 40-fache Bevorzugung von GpC könnte eine Nutzung der A-Aktivität für Anwendungen wie *Footprinting*-Experimente oder RNA-Sequenzierungen möglich machen.

**Tabelle 4:** Kinetische Parameter der RNase T1-Varianten E46N und Y45W/E46N im Vergleich mit anderen Varianten mit veränderter Spezifität und mit RNase T1 wt.

Enzym	RNA-Hydrolyse <sup>c</sup>	GpC			ApC			Spezifitätsverhältnis
	Spez. Aktivität (U/mg)	K <sub>M</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (min <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (min <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (GpC) / k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> (ApC)
RNase T1 (wt) <sup>d</sup>	384000 (100)	135	10200	75000 x 10 <sup>3</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	264	284000
Variante E46N	12640 (3,3)	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	195 x 10 <sup>3</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	1000	195
E46NY45W	14180 (3,7)	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	312 x 10 <sup>3</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	2280	137
Variante 8/3 <sup>h</sup>	4608 (1,2)	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	1380 x 10 <sup>3j</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	1980 <sup>j</sup>	697
E46S(insert)47G <sup>d</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	222 x 10 <sup>3</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	2280	97
Variante E46Q <sup>e</sup>	nb <sup>a</sup>	116	20	171 x 10 <sup>3</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	
Variante Y45W <sup>i</sup>	nb <sup>a</sup>	171	18600	109000 x 10 <sup>3</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	
Variante 9/5 <sup>f</sup>	7091 (1,8)	979	444	454 x 10 <sup>3</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	nb <sup>a</sup>	
9/5Q46N <sup>g</sup>	5644 (1,5)	418	327	783 x 10 <sup>3</sup>	803	16	19800	40

<sup>a</sup>Nicht bestimmt. <sup>b</sup>Nur k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> konnte bestimmt werden. <sup>c</sup>Die prozentualen Werte im Vergleich zum Wildtyp finden sich in Klammern. <sup>d</sup>Kumar *et al.* 2001 [44]. <sup>e</sup>Granzin *et al.* 1992 [42]. <sup>f</sup>Hoschler *et al.* 1999 [25]. <sup>g</sup>[119]. <sup>h</sup>Hubner *et al.* 1999 [36]. <sup>i</sup>Grunert *et al.* 1993 [120]. <sup>j</sup>Berechnet aus den Zeitverlaufskurven der ApC-Spaltung [44].

Interessant ist der Vergleich der Variante E46Q mit der hier vorgestellten Variante E46N, die sich nur durch eine Verkürzung der Seitenkette der Aminosäureposition 46 um eine Methylengruppe unterscheiden. Auch wenn die katalytische Konstanten beider Varianten für GpC fast identisch sind, wird aus dem Michaelis-Menten-Diagramm der Variante E46N deutlich, dass deren K<sub>M</sub>-Wert im Vergleich zur E46Q (K<sub>M</sub> = 116 μM) stark erhöht ist, was durch vielfach höhere Umsatzraten wieder ausgeglichen wird. Gleichzeitig weist die Variante E46N im Vergleich zum Wildtyp 4-fach erhöhte Umsatzraten mit ApC auf, während für die Variante E46Q keinerlei ApC-Aktivität nachgewiesen werden konnte [42]. Die zusätzliche Einführung eines Tryptophans anstelle des Tyrosins in Position 45 führt zu einer etwas stärker ausfallenden Erhöhung der ApC-Spaltung im Vergleich zur Erhöhung der GpC-Spaltung, so dass insgesamt das Spezifitäts-Verhältnis der Variante Y45W/E46N etwas kleiner ist. Der Y45W-Austausch in der Wildtyp-Sequenz führt zu einer leichten Erhöhung des K<sub>M</sub>-Wertes und einer deutlichen Erhöhung des k<sub>cat</sub> (Tab. 4) für GpC als Substrat. Ein ähnlicher Effekt lässt sich auch anhand des Michaelis-Menten-Diagramms (Abb. 17) für die Variante Y45W/E46N im Vergleich zur

E46N vermuten. Für die RNase T1-Variante Y45W konnte ebenfalls qualitativ eine leicht erhöhte ApC-Spaltung nachgewiesen werden [121], was sich gut mit den hier gezeigten Daten deckt.

Beide in der Variante Y45W/E46N enthaltenen Punktmutationen sind auch in der Variante RV enthalten. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass beide Mutationen zu der in der Variante RV erreichten Spezifitäts-Verschiebung wesentlich beitragen. Die drei zusätzlichen Mutationen K41E, Y42F und N43R in der Variante führen zu einer weiteren 9-fachen Erhöhung der ApC-Spaltung und zu einer gleichzeitigen 2,5-fachen Erhöhung der GpC-Spaltung. Bisher ist die Lösung der Kristallstruktur der Variante nur ohne gebundene Nucleotide in der Bindungstasche gelungen [45]. Weitere Kristallisationsversuche sind zurzeit im Gange. Die Lösung von Strukturen der Variante mit entsprechenden Substrat-ähnlichen Verbindungen könnte erneut Ansätze für ein weitergehendes rationales Protein-Design liefern, mit dem Ziel, die Spezifität von RNase T1 weiter in Richtung Adenosin-Bevorzugung zu verschieben.

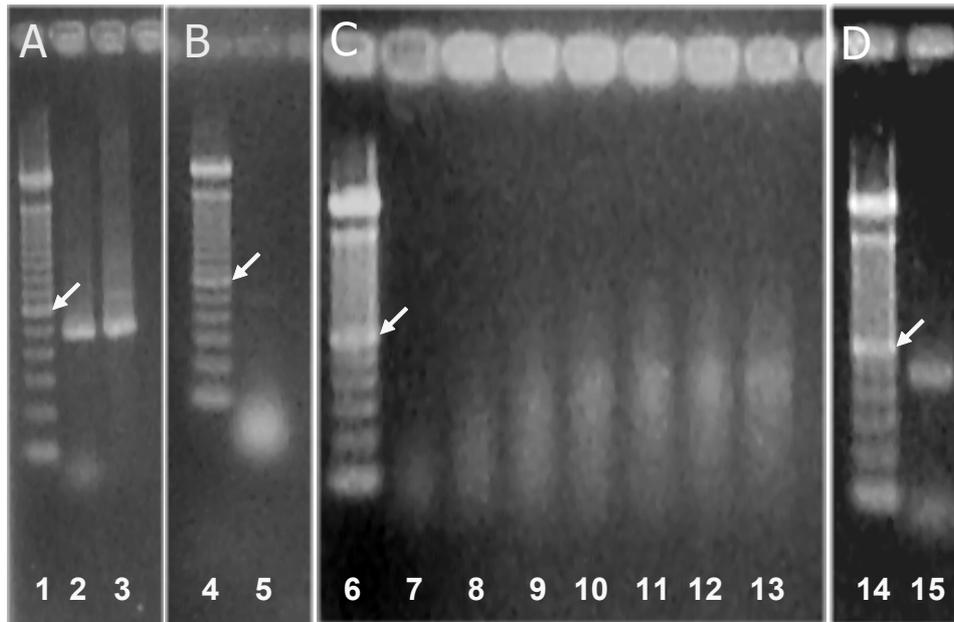
## 4.2 Evolutionärer Ansatz zur Generierung von Spezifitätsvarianten

Die Herausforderung einer Veränderung der Spezifität von RNase T1 in Richtung einer Adenosin-Bevorzugung sollte mittels eines evolutionären Lösungsansatzes angegangen werden. Das *DNA-Shuffling* stellt hierfür eine Methodik bereit, welche im Amplifikations-Schritt Rekombinations-Ereignisse mit dem Auftreten von zusätzlichen Punktmutationen vereint (vgl. 1.2.1). Im Zuge des Bibliotheken-*Screenings* sollten zunächst mittels RNase-Indikatorplatten aktive Varianten identifiziert und diese dann in *E. coli* exprimiert und auf Periplasma-Ebene auf ihre Spezifität hin untersucht werden.

### 4.2.1 Herstellung der Bibliotheken

Ausgangspunkt für die evolutionären Protein-Design Experimente waren sowohl das Gen der Wildtyp-RNase T1, als auch das Gen der Variante 9/5 Q46N (RV), welche schon eine deutlich erhöhte Aktivität nach Adenosin-Resten aufweist. Da RNase T1 mit 11085 Da ein sehr kleines Protein ist, sollte die Mutationsrate bei der Erzeugung der initialen Permutations-Bibliotheken relativ hoch sein, weswegen hierfür das *DNA-Shuffling* in Kombination mit einer PCR-Amplifikation der RNase T1-Gene unter mutagenen Bedingungen eingesetzt wurde. Beide Verfahren alleine führen zu Mutationsraten von etwa je 0,7 % [49, 98]. Bei einer Kombination beider Methoden wäre also eine Fehlerrate im Bereich von 1,4 % zu erwarten, was durch-

schnittlich 4,4 Punktmutationen im 312 b langen RNase T1-Gen entspricht. Die RNase-Gene wurden unter mutagenen Bedingungen amplifiziert und gereinigt (3.2.1.1) und durch DNase I-Behandlung fragmentiert (3.2.2.1). Im Anschluss wurden die Fragmente dann unter Einführung neuer Mutationen mit Hilfe der beiden DNA-*Shuffling*-PCRs wieder aneinandergesetzt (3.2.2.2 und 3.2.2.3). In Abbildung 18 sind die einzelnen Schritte der Bibliotheks-Erstellung zusammengefasst.



**Abbildung 18: DNA-*Shuffling* von RNase T1-Genen.** Die einzelnen Schritte der Methode wurden mittels 2%-iger Agarose-Gelelektrophoresen verfolgt und sind hier am Beispiel des RNase T1 Wildtyp-Gens dargestellt. (1,4,6,14), 750 ng 100 bp-DNA-Fragment-Leiter. Die 600 bp-Bande ist jeweils mit einem Pfeil markiert. **A:** PCR-Amplifikation des RNase T1-Gens. Zur Erhöhung der Mutationsrate kann die PCR unter mutagenen Bedingungen durchgeführt werden. 10 µl der PCR-Ansätze vor (2) und nach (3) Reinigung. **B:** DNase I-Genfragmentierung. (5), RNase T1-Gen nach DNase I-Behandlung. **C:** PCR ohne Primer. 10 µl der „Wiederaufbau-PCR“ nach 20 (7), 25 (8), 30 (9), 35 (10), 40 (11), 45 (12) und 50 (13) Zyklen. **D:** PCR mit Primern. 1:40 Verdünnung der PCR ohne Primer. (15), 10 µl der PCR mit den Standard-Primern A2vo und A2hi nach 15 weiteren Zyklen.

Die finalen PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Reinigungs-Kit (3.2.5.3) gereinigt und zur Vorbereitung der Klonierung in den pIN-III-ompA-Sekretionsvektor mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Hind* III behandelt (3.2.7). Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die geschnittenen PCR-Produkte direkt zur Ligation verwendet. Der Zielvektor wurde wie unter 3.2.7 beschrieben für die Ligationen vorbereitet. Nach Durchführung der Ligationen wurden elektrokompente TOP10F'-Zellen mit je 5 µl der Ligationsansätze transformiert und auf LBA-Platten selektiert. Zur Überprüfung wurden von 12 Klonen der ersten vom RNase T1 Wildtyp-Gen ausgehenden Bibliothek Plasmid-Präparationen angefertigt (3.2.4.2) und von

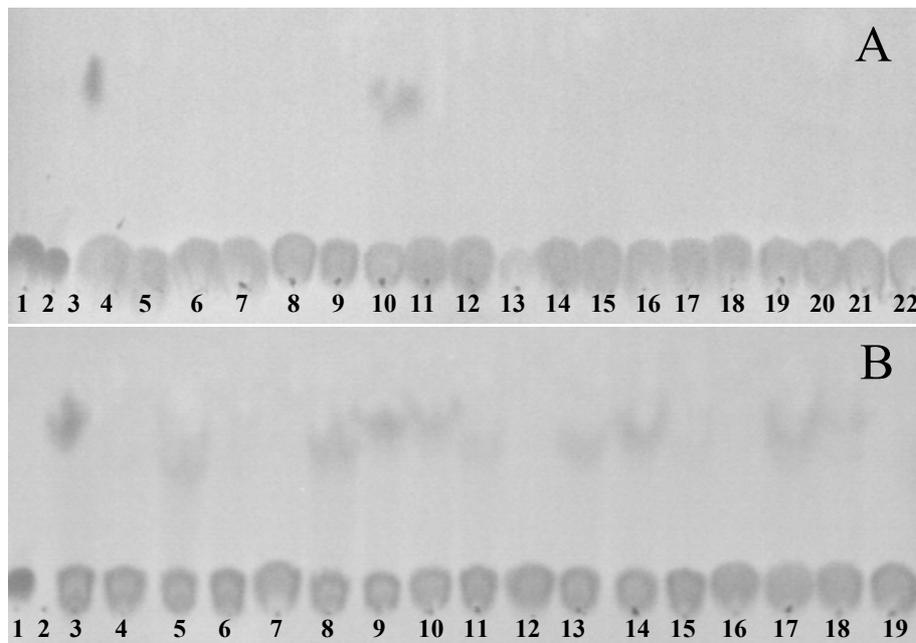
Frau Brigitte Wolff nach der Didesoxy-Methode jeweils mit den fluoreszenzmarkierten Sequenzier-Primern A2vo bzw. A2hi sequenziert (3.2.11). Die durchschnittliche Mutationsrate in allen 12 Klonen konnte mit 1,5 % bestimmt werden (4,7 Mutationen/RNase T1-Gen), was bei einem Prozentsatz stiller Mutationen von 40 % nicht ganz drei Aminosäureaustauschen auf Protein-Ebene entspricht.

#### 4.2.2 Screening

Zu Beginn des *Screenings* der generierten Bibliotheken nach Varianten mit erhöhter ApC-Spaltung wurden die Transformationsansätze auf Ampicillin-haltigen RNase-Indikatorplatten ausgestrichen und bei 37 °C ü.N. inkubiert. Die Kolonienanzahl wurde dabei auf etwa 1000 pro Petri-Schale (Ø 9 cm) eingestellt. So konnten die Varianten identifiziert werden, die in aktiver Form periplasmatisch exprimiert werden. Deren Anteil betrug sowohl bei den Bibliotheken ausgehend vom Wildtyp-Gen, als auch bei denen der Variante RV etwa 1 %. Im Vergleich dazu wurde als Kontrolle eine RNase T1 (wt)-Bibliothek erstellt, bei der das RNase T1-Gen unter nicht-mutagenen Bedingungen amplifiziert und einem DNA-*Shuffling* unterzogen wurde. Nach Klonierung in pIN-III-ompA betrug der Anteil der aktiven Varianten bei einer Mutationsrate von 0,7 % noch 30 %. Die Ausbildung der roten Höfe um die Kolonien war in einem Zeitfenster von 12-20 Stunden nach Beginn der Platten-Inkubation zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass die Aktivität der enthaltenen Varianten stark variierte. Aktive Varianten wurden dann wie unter 3.3.1 beschrieben in 5 ml Hauptkulturen exprimiert und von diesen Kulturen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen Periplasma-Präparationen durchgeführt. Die Vorkulturen wurden in Mikrotiterplatten angezogen. Nach Animpfen der Hauptkulturen wurden die verbleibenden 150 µl der Vorkulturen mit 1 Volumen sterilem 100%-igen Glycerin versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Periplasma Präparationen wurden mit dem ApC-Substrat bei 37 °C inkubiert, wobei die Inkubationszeit von Wildtyp-Bibliotheken, zunächst 30 min und dann in einer Wiederholung 60 min, die von Variante RV abgeleiteten Bibliotheken 20 min betrug (vgl. 3.4.4.1). Die Ansätze wurden dann mit einer Multikanal-Pipette auf Zellulose F-DC-Platten aufgetragen, entwickelt und unter UV detektiert (Abb. 19). Insgesamt sind ausgehend vom Wildtyp etwa 19000 Varianten getestet worden, von denen 194 Aktivität zeigten. Innerhalb der ausgehend von Variante RV dargestellten Bibliotheken wurden etwa 29000 Klone getestet, von denen 284 aktiv waren. Innerhalb der Wildtyp-Periplasma-Bibliotheken konnte keine einzige Variante identifiziert werden, bei der nach 60 min Inkubationszeit mit dem ApC-Substrat eine Aktivität

nachweisbar war, bis auf eine Ausnahme: Die Variante wt25 zeigte schon nach 15 min signifikante Mengen der Hydrolyse-Produkte (Abb. 19A). Eine Sequenzierung dieser Variante ergab jedoch, dass sie mit der Variante RV identisch ist. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Variante RV in 5 Aminosäurepositionen vom Wildtyp unterscheidet, kann es sich dabei eigentlich nur um eine Kontamination der Wildtyp-Bibliothek handeln. Es zeigt aber, dass das *Screening* in der Lage ist, innerhalb der erzeugten Varianten solche mit veränderter Spezifität zu identifizieren. Ausgehend vom Wildtyp wurde darüber hinaus noch eine weitere Bibliothek generiert, bei der die Mutationsrate noch einmal erhöht wurde. Zwei aufeinander folgende PCRs unter mutagenen Bedingungen wurden mit einem DNA-*Shuffling* verknüpft. Auf eine Sequenzierung einiger Vertreter dieser Bibliothek wurde verzichtet. Der Prozentsatz aktiver Varianten sank auf 0,1 %. Von 52000 Variante waren 55 aktiv, allerdings war auch unter diesen keine mit signifikanter ApC-Aktivität.



**Abbildung 19:** *Screening* der RNase T1-Bibliotheken auf ApC-Spaltung mittels Dünnschicht-Chromatographie. Exemplarisch sind Ausschnitte entsprechender DC-Platten unter UV-Detektion gezeigt. **A:** Bibliothek ausgehend vom Wildtyp. (1), 10 µg ApC; (2), 10 µg AMP; (3), 10 µg C; (4-22), 19 Periplasma-Proben nach 30 min Inkubation mit ApC; (10), Variante wt25. **B:** Bibliothek ausgehend von Variante RV. (1), 10 µg AMP; (2), 10 µg C; (3-19), 17 Periplasma-Proben nach 20 min Inkubation mit ApC; (14), Referenz: Periplasma der Variante RV.

Beim *Screening* der Bibliotheken ausgehend von Variante RV ergab sich ein grundsätzlich anderes Bild, da hier die Ausgangs-Aktivität schon eine ApC-Spaltung aufwies. Zunächst wurde die Verlässlichkeit der Methode überprüft, indem 10 die Variante RV-exprimierende Klone parallel dem *Screening*-Ablauf unterworfen wurden. Nach DC-Auswertung konnte für

alle Klone eine vergleichbare ApC-Spaltungs-Aktivität nachgewiesen werden, so dass eine Vergleichbarkeit der einzelnen Präparationen gegeben war. Innerhalb der Präparationen der Bibliotheken wurden zudem immer einige RV-Kontrollen mitgeführt (Abb. 19B). Unter den 284 auf RNase-Indikatorplatten aktiven Varianten zeigten noch etwa 40 % eine mehr oder weniger starke ApC-Aktivität. Keine der Variante war mit ApC als Substrat signifikant aktiver als die Ausgangsvariante RV, ebenso konnte für alle Varianten eine hohe GpC-Spaltung dünn-schicht-chromatographisch nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung von drei der mit ApC als Substrat aktivsten Varianten ergab, dass sie mit der Variante RV identisch sind.

In der Summe haben also 48000 Varianten mit einer Mutationsrate von 1,5 % nicht ausgereicht, um eine Erhöhung der ApC-Spaltungs-Aktivität der Ausgangs-RNasen zu bewirken [119], obwohl in der Literatur ähnliche Anwendung eines evolutionären Protein-Designs mit vergleichbaren Mutationshäufigkeiten pro Gen mit deutlich geringeren Bibliotheks-Größen erfolgreich waren [53, 54]. Natürlich ist man mit solchen Variabilitäten weit davon entfernt, den gesamten Sequenzraum möglicher Mutationskombinationen auch nur annähernd abzudecken, vor allem dann, wenn man Mutationen im ganzen Gen zulässt. Das war aber auch nicht Ziel der Experimente. Stattdessen sollte eine Reihe von RNase T1-Varianten mit leicht veränderter Substrat-Spezifität identifiziert werden, die dann in mehreren Evolutionsrunden, unter Rekombination positiver und Eliminierung negativer Mutationen, kumulativ verbessert werden sollten (vgl. 1.2.1). Offensichtlich sind aber für einen solchen Ansatz größere Bibliotheken notwendig, was auch mit der funktionalen Perfektion der RNase T1, die sie im Laufe der Evolution erreicht hat [44], zu tun haben mag. Das hier verwendete *Screening* ist für das Durchsuchen von noch größeren Bibliotheken nur sehr schlecht geeignet. Jede aktive Variante muss einzeln kultiviert, präpariert und auf eine Spezifitäts-Änderung hin getestet werden. Aus diesem Grunde ist das hier verwendete *Screening* auch nicht geeignet, Bibliotheken mit kleinerer Mutationsrate zu testen, da diese zu einem höheren Prozentsatz aktiver Varianten führt und damit den Arbeitsaufwand vervielfacht. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Nichtgelingen der hier vorgestellten Experimente liegt nämlich darin, dass bei drei Aminosäure-Austauschen pro Gen positive von negativen Mutationen aufgehoben worden sind.

Ein neuartiger *Assay* wäre also wünschenswert, welcher ein direktes *Screening* von größeren RNase T1-Bibliotheken auf die gewünschte, enzymatische Eigenschaft ohne den Umweg über die Aktivitäts-Platten erlaubt und damit auch die Verwendung von geringeren Mutationsraten möglich macht.

### 4.3 FCS-Messungen

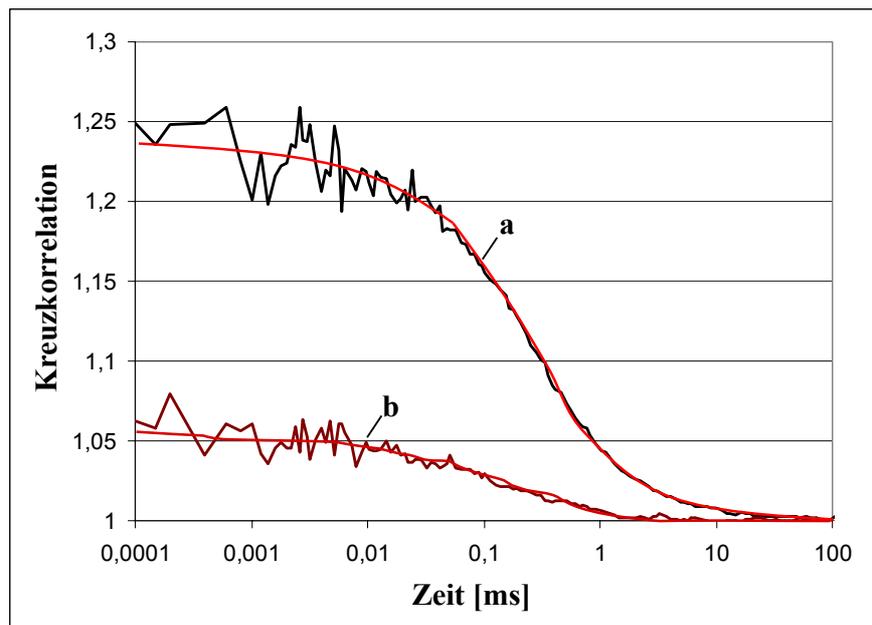
Die für die kinetische Charakterisierung und für die Bestimmung der Substratspezifität von Ribonucleasen routinemäßig verwendeten Dinucleosidmonophosphate sind eigentlich eher ungeeignete Substrate, da sie zum einen den natürlichen Substraten nur bedingt ähnlich sind und zum anderen der Nachweis der Spaltung dieser Minimalsubstrate eher unsensitiv ist (vgl. 3.4.4.2). Die unspezifische *E. coli* RNase I zum Beispiel erkennt Dinucleosidphosphate überhaupt gar nicht als Substrate, konnte aber in *E. coli* Rohextrakten für 99 % der detektierbaren RNase-Aktivität mit hochmolekularer RNA als Substrat verantwortlich gemacht werden [122]. Von Kelemen *et al.* wurden 1999 neuartige RNase-Substrate vorgestellt, die aus kurzen Desoxy-Oligonucleotiden mit einem einzigen zentralen Ribonucleotid bestehen und die an den Enden eine Fluorescein- und eine Rhodamin-Markierung tragen [123]. Eine Spaltung der Substrate an der singulären Schnittstelle kann dann durch eine Aufhebung des Fluoreszenz-*Quenchings* detektiert werden. Eine weitere Alternative wurde im Rahmen ihrer Promotion in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Kerstin Korn aufgezeigt, die einen RNase-*Assay* unter Nutzung der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie etabliert hat (vgl. 1.3.2).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Zusammenarbeit mit der Nachwuchsgruppe „Protein-Engineering“ von Herrn Dr. Thomas Greiner-Stöffele, Institut für Biochemie, Universität Leipzig, ein FCS-basierter RNase T1-Aktivitäts-Assay, der Elemente der beiden obigen Arbeiten miteinander kombiniert, etabliert und seine Leistungsfähigkeit untersucht werden. Hierbei sollte auch die Frage adressiert werden, ob ein solcher Test für ein *Screening* von großen RNase T1-Bibliotheken geeignet ist.

#### 4.3.1 Substrat

In Weiterführung der Arbeiten von Frau Dr. Kerstin Korn bestand die grundlegende Idee für das Design des hier verwendeten FCS-RNase-Substrates darin, die Farbstoffmarkierungen und die RNase-Schnittstelle auf einem Molekül zu vereinen. Bei der Firma IBA GmbH, Göttingen wurde ein 42b langes Desoxy-Oligonucleotid bestellt, welches zum einen eine interne 2'-OH-Modifizierung am Guanosin 21 aufweist und zum anderen an beiden Enden Fluoreszenzmarkierungen trägt, die für Zwei-Farben-FCS-Anwendungen geeignet sind (Abb. 20).





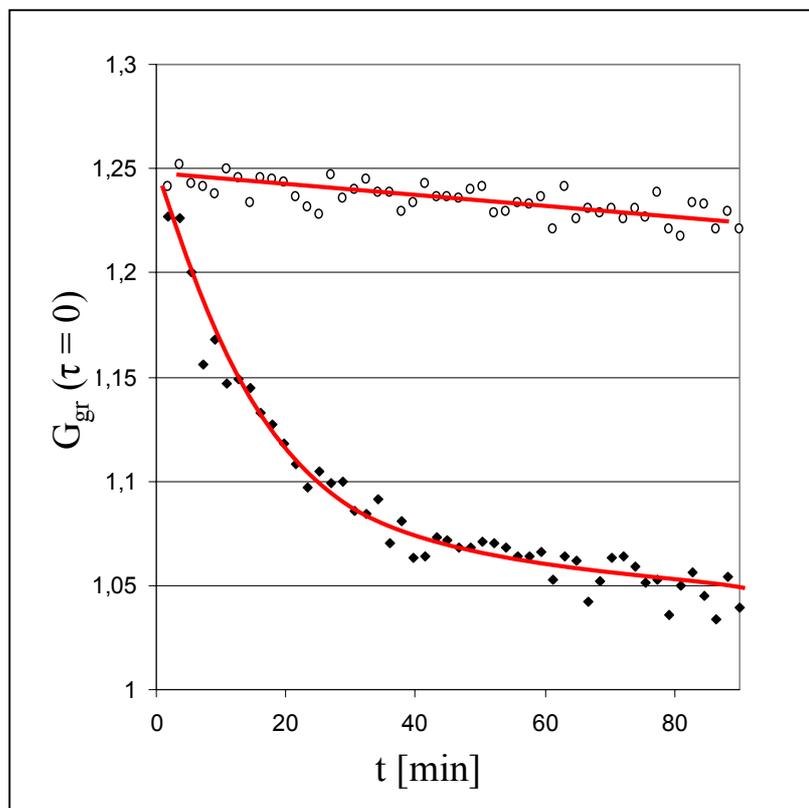
**Abbildung 21:** Zwei-Farben-FCS-Messungen des Substrates vor (a) und nach (b) der Zugabe von RNase T1. Die Messungen erfolgten jeweils für 60 s. Dargestellt sind die gemessenen und die berechneten Kreuzkorrelations-Kurven.

Auch bei längerer Inkubationszeit und bei noch weiter erhöhter RNase T1-Menge konnte das Kreuzkorrelationssignal jedoch nicht komplett aufgelöst werden. Die Ursache hierfür liegt vermutlich im *cross-talk*, womit die Tatsache gemeint ist, dass das Emissionslicht des Rhodamin Grün-Farbstoffs auch in eingeschränktem Maße in den zweiten, langwelligeren Detektor kanal einstrahlt [67, 73]. Der *cross-talk* wurde in dieser Arbeit bei der Auswertung der Daten nicht weiter berücksichtigt, da hier nur qualitative Aussagen getroffen werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass nicht alle Sub\_G-Oligonucleotide mit je einem Molekül T1\_Sub\_Li und T1\_Sub\_Re assoziiert waren, so dass ein Teil der Moleküle Sekundärstrukturen ausbildet, die dazu führen, dass die Spaltstelle für RNase T1 nicht zugänglich war. Eine Erhöhung des Verhältnisses der Hybridisierungs-Oligonucleotide zu Sub\_G führte allerdings zu keiner Verringerung der verbleibenden Kreuzkorrelation.

Das hier vorgestellte Substrat umgeht also auf sehr einfache Art und Weise das wesentliche Problem der bisherigen FCS-RNase-Substrate [73]: Eine Verunreinigung der Substratlösung mit freien Fluoreszenzfarbstoffen und mit fluoreszenzmarkierten Hybridisierungs-Oligonucleotide, die durch aufwendige Reinigungsprozeduren nicht beseitigt werden konnten und die Kreuzkorrelations-Messungen wesentlich beeinträchtigt haben, spielt hier keine Rolle mehr. Darüber hinaus konnte die Spaltstelle durch das zur Verfügung stellen von nur einer einzigen 2-OH-Gruppe spezifischer gestaltet werden.

### 4.3.2 Messung der Substrat-Spaltung in Echtzeit

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die enzymatische Spaltung des FCS-Substrates auch in Echtzeit durch eine kontinuierliche Messung des Kreuzkorrelations-Signals möglich ist. Um hierbei die Substratkonzentration variieren zu können wurde das Oligonucleotid Sub\_G ohne Fluoreszenzmarkierung bestellt (Sub\_G\_ohne) und den Reaktionsansätzen nach Hybridisierung mit den Gegenstrang-Oligonucleotiden zugesetzt. Denn der Variierung der Konzentration der Fluoreszenzmoleküle sind in der FCS aufgrund der statistischen Natur der Datenauswertung sehr enge Grenzen gesetzt. Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis einer solchen Echtzeitmessung (3.5.4.1).



**Abbildung 22:** Zwei-Farben-FCS-Messung der Substrat-Spaltung in Echtzeit. Jeder Punkt entspricht einer 60 s-Messung. Aufgetragen sind die Y-Achsen-Schnittpunkte der Kreuzkorrelationsfunktionen  $G_{gr}(\tau = 0)$  gegen die Reaktionszeit. Eingesetzte Substratkonzentrationen: Sub\_G: 10 nM, Sub\_G\_ohne: 40 nM. (○), Kontrolle ohne den Zusatz von Enzym. (◆), Ansatz mit 5 nM RNase T1.

Die Substratkonzentration betrug 50 nM (10 nM markiertes Sub\_G), die RNase T1-Konzentration 5 nM und die Nullpunktmessung ergab einen Y-Achsen-Schnittpunkt der berechneten Kreuzkorrelation von 1,248. Die Höhe der Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion in der Zwei-Farben-FCS ist direkt proportional der Konzentration an zweifach markierten

Molekülen im Messansatz und in der Tat entspricht die Abnahme der Amplitudenhöhe (Y-Achsenabschnitt der Kreuzkorrelationsfunktion) in Abb. 22 einer Reaktion erster Ordnung, wie sie für die von RNase T1 katalysierte Reaktion zu erwarten ist. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Enzym für 90 min vermessen.

Unter den Voraussetzungen, dass zum einen die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Enzymkonzentration und zum anderen die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig vom Verhältnis markiertes zu unmarkiertem Substrat ist, ließe sich mit der Zwei-Farben-FCS und dem hier vorgestellten Substrat auch eine Michaelis-Menten-Kinetik der RNase T1 aufnehmen, so wie dies für die Restriktionsendonuclease *EcoR* I von Ketting *et al.* erstmalig gezeigt werden konnte [67]. Erste Vorversuche haben gezeigt, dass beide oben genannten Voraussetzungen gegeben zu sein scheinen. Die Messungen unterliegen allerdings noch relativ starken Schwankungen. Für exakte kinetische Messungen müsste eine Möglichkeit der Temperierung möglichst des Probenraums des Fluoreszenz Korrelations Spektroskops geschaffen werden. Leider war diese Voraussetzung an unserem Spektroskop nicht erfüllt, so dass sich diese Arbeit auf qualitative Aussagen beschränkt und viele Messungen als Endpunktbestimmungen durchgeführt wurden.

### 4.3.3 Nachweisempfindlichkeit

Zur Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit der Methode wurden RNase T1 (wt)-Lösungen verschiedener Konzentration 1:2 mit Substrat-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert (Gesamtvolumen 20 µl) und im Anschluss wie unter 3.5.4.2 beschrieben in Endpunktbestimmungen vermessen. Von allen Proben wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Amplitudenhöhe der Referenzprobe, in der das Substrat nur mit Pufferlösung versetzt wurde, wurde gleich 100 %, die der Probe mit der höchsten RNase-Konzentration (35 µM im Inkubationsansatz) gleich 0 % gesetzt. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

**Tabelle 5:** Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit des FCS-RNase T1-Aktivitätstests.

[RNase T1] im Inkubationsansatz	35 µM	0	10 µM	5 nM	1 nM	0,2 nM	0,02 nM
Relative Amplitudenhöhe der Kreuzkorrelation	0 %	100%	1,6 %	8,4 %	36,4 %	87,6 %	96,1 %

Es zeigt sich also, dass unter den gewählten Bedingungen eine RNase-Konzentration von 1 nM mit mehr als 60 % Substratumsatz noch sehr gut nachweisbar ist. Dies entspricht dem Nachweis von  $2 \cdot 10^{-14}$  mol RNase T1. Die Nachweisempfindlichkeit des FCS-*Assays* konnte also durch die Veränderungen am Substrat und die daraus resultierende einfachere Bereitstellung um den Faktor 50 verbessert werden (vgl. 1.3.2), [73]. Eine Möglichkeit die Sensitivität noch weiter zu erhöhen, läge in einer Verlängerung der Inkubationszeit, da gezeigt werden konnte, dass das Substrat bis zu 24 h bei 37 °C in gepufferter Lösung stabil ist.

#### 4.3.4 Bibliotheks-*Screening*

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der FCS-RNase T1-Aktivitäts-*Assay* für ein *Screening* von RNase T1-Bibliotheken mit dem Ziel der Identifikation von Varianten mit veränderter Aktivität/Spezifität genutzt werden kann (vgl. 4.3). Die wichtigste Anforderung an den *Assay* in diesem Zusammenhang ist, dass möglichst große Bibliotheken in möglichst kurzer Zeit mit möglichst geringem Aufwand getestet werden können. Einen großen Gewinn stellt die vergleichsweise sehr unproblematische Bereitstellung des Substrates dar, welches, ohne dass zusätzliche Reinigungsschritte nötig geworden wären, ohne Fluoreszenz-Kontamination zur Verfügung steht. Die grundlegende Idee hinter einem FCS-*Screening*, welches auf Arbeiten von Frau Dr. Kerstin Korn aufbaut, basiert darauf, dass zunächst hunderte oder sogar tausende von RNase T1-Varianten gleichzeitig getestet werden und dann nach Vereinzelung der Varianten in positiv getesteten Gemischen, diejenigen identifiziert werden, die für die gesuchte Aktivität in den positiven Proben verantwortlich waren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in Bibliotheken von mehreren 10000 Varianten keine mit der gesuchten Aktivität zu finden waren (4.2.2). Wenn also zum Beispiel in  $10^4$  Varianten eine einzige mit der gewünschten Eigenschaft wäre, könnte man die gesamte Bibliothek gleichzeitig auf Vorhandensein von aktiven Varianten *screenen*, wenn man die Aktivität der einen gegen den Hintergrund von 9999 Varianten diskriminieren kann. Innerhalb eines FCS-*Screenings* sollten die Varianten-Gemische auf Periplasma-Ebene getestet werden können, da das den präparativen Aufwand minimieren und das *Screening* an sich beschleunigen würde. Die Sensitivität des *Assays* bestimmt hierbei die Anzahl der Varianten, die pro Gemisch untersucht werden können. Wichtigste Voraussetzung ist aber, dass die Hintergrund-Aktivität möglichst gering ist, dass also die Stabilität des Substrats im Periplasma, in dem keine im Bezug auf das *Screening*-Substrat aktive RNase T1-Varianten vorhanden sind, sehr hoch ist.

Um die Sensitivität und die Substratstabilität – als wesentliche Voraussetzung für den Einsatz

in einem Bibliotheks-Screening – des FCS-Assays zu bestimmen, wurde alle Experimente in dieser Arbeit mit dem Substrat mit Guanosin-spezifischer Spaltstelle durchgeführt.

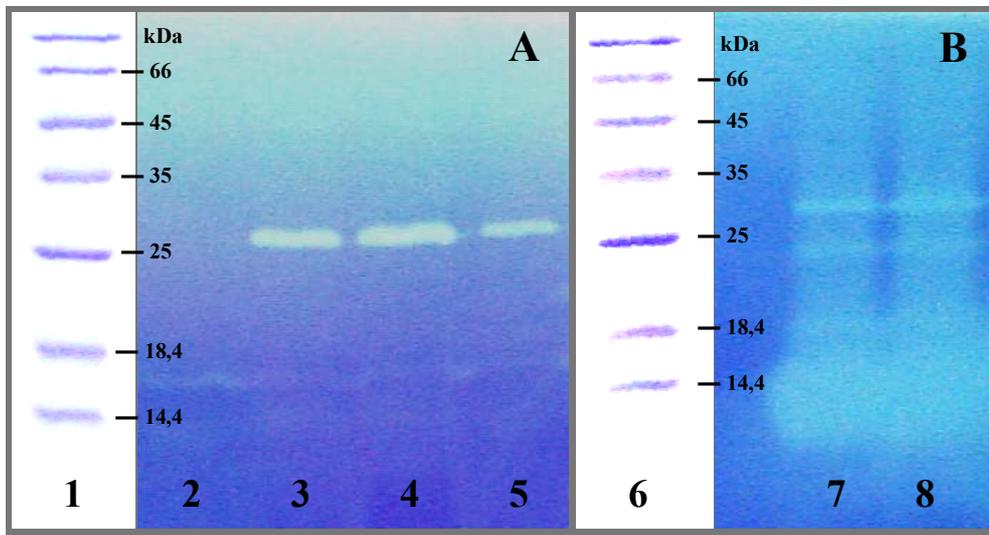
#### 4.3.4.1 Substratstabilität

Um zu überprüfen, ob der hier vorgestellte FCS-Assay für das Testen von RNase T1-Bibliotheken auf Periplasma-Ebene geeignet ist, wurde das FCS-Substrat in ersten Versuchen mit Periplasma-Proben (3.3.2) versetzt, welche von *E. coli*-Kulturen gewonnen wurden, die kein RNase T1-Expressionsplasmid enthielten. 10 µl Periplasma von *E. coli* TOP10F' wurden wie unter 3.5.4.2 beschrieben mit 10 µl Substratlösung (1 µM) für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend am ConfoCor 2 gemessen. Schon nach dieser 15-minütigen Inkubationszeit war kein Kreuzkorrelationssignal mehr messbar (vgl. Echtzeitmessung unter 4.3.4.2). Ebenso wurden weitere gebräuchliche *E. coli* Stämme (BL21(DE3) und Tuner<sup>®</sup>) getestet, die alle das gleiche Ergebnis zeigten. Offensichtlich sind in den Periplasma-Proben RNasen enthalten, die den FCS-Assay erheblich stören. Die einzige bekannte periplasmatisch lokalisierte Ribonuclease ist die RNase I. Es lag also die Vermutung nahe, dass diese RNase für die nachgewiesene Aktivität verantwortlich ist.

#### 4.3.4.2 Notwendigkeit RNase I-defizienter Stämme

Die getesteten, wie unter 3.3.2 beschrieben präparierten, periplasmatischen Proben von herkömmlichen, untransformierten *E. coli*-Stämmen wiesen RNase-Kontaminationen auf, die den RNase T1-FCS-Assay erheblich störten. Um die Verursacher dieser Aktivität zu identifizieren, wurden die entsprechenden Periplasma-Proben in einer Zymogramm-SDS-Gelelektrophorese getrennt, bei der im Anschluss eine Aktivfärbung RNase-haltiger Proteinbanden erfolgte. Hierbei wird hochmolekulare RNA als Substrat in das SDS-Gel einpolymerisiert und nach Renaturierung der Proteine, werden die Gelbereiche, die noch intakte RNA enthalten, durch interkalierenden Farbstoff angefärbt (3.4.3). RNase-Banden lassen sich also als weiße Gelbereiche identifizieren. Um eine Größenbestimmung von Banden durchführen zu können, wurde ein Protein-Standard aufgetragen, der im Anschluss von dem Rest des Geles abgetrennt und auf herkömmliche Art und Weise mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt wurde (3.3.5). Wie schon unter 4.3.4.1 geschildert, lag die Vermutung nahe, dass die periplasmatisch lokalisierte RNase I für die Hintergrund-Aktivität verantwortlich sein könnte. Deswegen wurde der *E. coli*-Stamm D10, in dem diese RNase deletiert worden ist, als Kontrolle mitgeführt. Als weitere

Kontrolle dienten zwei *E. coli* Stämme, die mit dem RNase T1 Expressionsplasmid pA2T1 transformiert und wie unter 3.3.1 beschrieben kultiviert wurden.



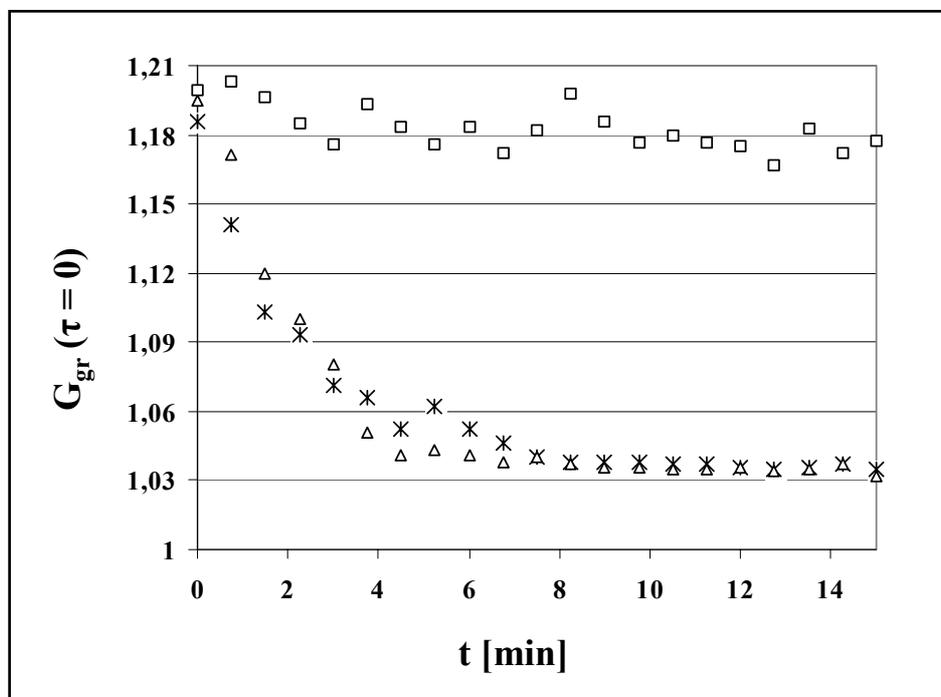
**Abbildung 23:** Zymogramm-Gelelektrophorese zum Nachweis von RNasen in Periplasma-Proben. Aufgetragen sind jeweils 10 µl der Periplasma-Proben der verschiedenen *E. coli*-Stämme. (1,6), Protein-Standard. Die Bahnen wurden vom Rest des Gels abgetrennt und Coomassie-gefärbt. Gel A: (2), D10; (3), TOP10F'; (4), BL21(DE3); (5), Tuner®. Gel B: (7), TOP10F' (pA2T1); (8), Tuner® (pA2T1).

In Abbildung 23A wird deutlich, dass in allen drei *E. coli*-Periplasma-Präparationen, in denen im FCS-Assay wie unter 4.3.4.1 beschrieben, eine Aktivität nachgewiesen werden konnte, eine einzige RNase-Bande mit einem Molekulargewicht von etwas größer als 25 kDa nachweisbar war. In dem D10-Stamm ist demgegenüber keine solche RNase-Aktivität nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass in der Tat die unspezifische RNase I (Molekulargewicht = 27 kDa) für die störende Aktivität im FCS-Assay verantwortlich gemacht werden kann.

Um den hier vorgestellten FCS-Aktivitätstest für ein RNase T1-Varianten-Screening verwenden zu können, müsste also ein *E. coli* Expressionstamm verwendet werden, in dem die RNase I deletiert ist. Als erstes sollte überprüft werden, ob der *E. coli*-Stamm D10, der dieser Anforderung genügt, für eine Expression von RNase T1 geeignet ist. Hierfür wurde der Stamm mit dem RNase T1 Expressionsplasmid transformiert und wie unter 3.3.1 beschrieben kultiviert. Als Kontrolle wurde der bisher für die Expression verwendete Stamm TOP10F' mitgeführt. Bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit und der erreichten optischen Dichten waren zwischen beiden Stämmen keine Unterschiede festzustellen. Von entsprechenden Expressionskulturen wurde Periplasma präpariert, von denen die spezifische Aktivität der Proteinextrakte bestimmt wurde (3.4.2). Sie lag bei 35400 U/ml für TOP10F' und 33700 U/ml für D10. Der *E. coli*-Stamm D10 scheint also sehr gut für die Expression von RNase T1 verwendbar zu sein

und erreicht ähnliche Expressionslevel für das rekombinante Protein wie der bisher verwendete Expressions-Stamm TOP10F'.

Im nächsten Schritt wurde die Stabilität des FCS-Substrates im D10-Periplasma am ConfoCor 2 vermessen, um zu überprüfen, ob die Deletion der RNase I die Substratstabilität verbessert. Es konnte gezeigt werden, dass das Substrat, welches im TOP10F'-Periplasma schon nach 15 min komplett gespalten wurde (4.3.4.1), unter den gleichen Bedingungen der Endpunkt-Messung (3.5.4.1) bis zu 4 h bei 37 °C stabil ist. In den entsprechenden Ansätzen konnte kein zeitabhängiger Abfall des Kreuzkorrelationssignales beobachtet werden. Um die Substratstabilität weitergehend zu dokumentieren wurden zusätzlich Echtzeitmessungen durchgeführt (3.5.4.1). Hierfür wurde zunächst Periplasma von einer mit dem Expressionsplasmid der inaktiven Variante H92A (pA2T1H92A) transformierten Kultur des *E. coli*-Stammes D10 präpariert (3.3.2). Das hybridisierte Substrat (3.5.3) wurde in einem Volumen von 50 µl und einer Konzentration von 10 nM vorgelegt, eine Nullpunktmessung durchgeführt und die Reaktion nach Versetzen der Probe mit 1 µl der entsprechenden Periplasma-Präparation für 15 min durch kontinuierliches Messen verfolgt (20 Messungen à 45 s). In Abbildung 24 sind die Zeitverläufe der Abnahme der Amplitudenhöhen der Kreuzkorrelationssignale verschiedener Ansätze zusammengefasst.



**Abbildung 24:** Zwei-Farben-FCS-Messung der Substrat-Stabilität in verschiedenen Periplasma-Proben. Jeder Punkt entspricht einer 45 s-Messung. Aufgetragen sind die Y-Achsenabschnitte der Kreuzkorrelationsfunktionen  $G_{gr}(\tau = 0)$  gegen die Reaktionszeit. (□), Periplasma-Präparation von *E. coli* D10 (pA2T1H92A); (\*), Periplasma-Präparation von TOP10F' (untransformiert); (Δ), Periplasma-Präparation von D10 (pA2T1).

Während in dem D10-Ansatz mit exprimierter inaktiver RNase T1 H92A innerhalb von 15 min kein signifikanter Signalabfall zu beobachten war, war sowohl im Falle der Zugabe der Periplasma-Präparation von untransformierten TOP10F<sup>2</sup>-, als auch im Falle von Wildtyp-exprimierenden D10-Zellen innerhalb von wenigen Minuten das gesamte Substrat gespalten. Während im ersten Fall die im Periplasma dieser Zellen vorhandene RNase I verantwortlich gemacht werden kann, ist im zweiten Fall die Aktivität alleine auf die exprimierte RNase T1 zurückzuführen. Hier ist also genau die Situation realisiert, die für einen Einsatz des *Assays* in einem sensitiven *Screening* benötigt wird.

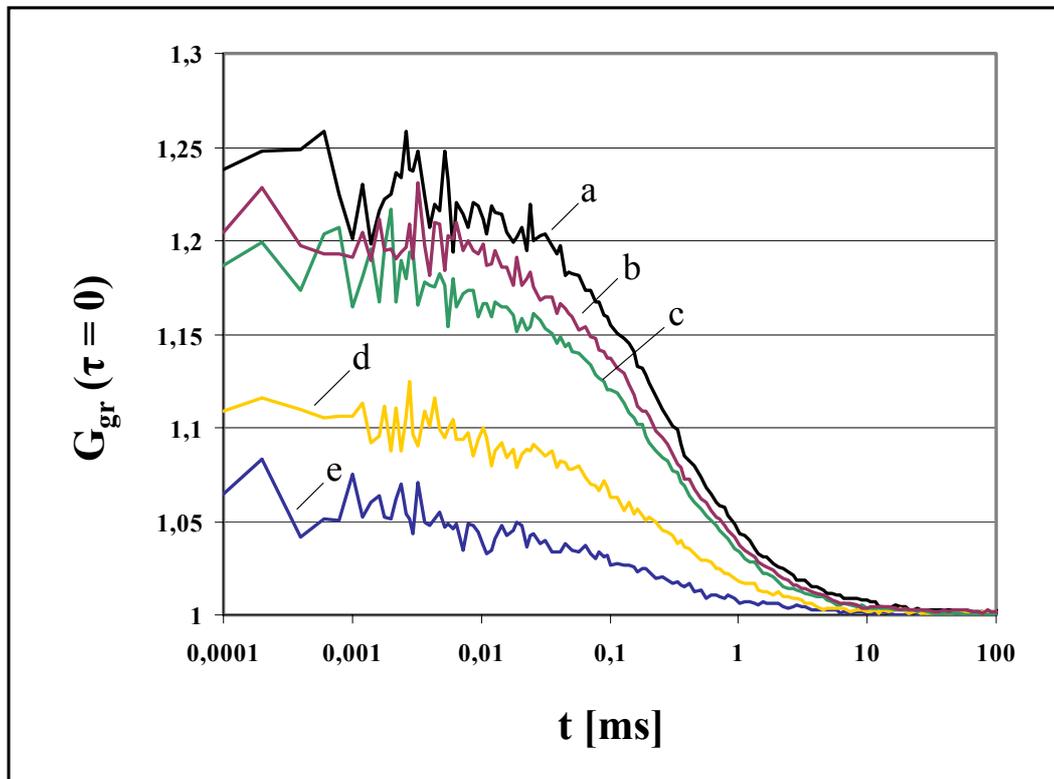
Der minimale Rückgang der Kreuzkorrelationssignale auch in der D10-H92A-Probe könnte auf ein Ausbleichen eines der Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen sein, da in den Endpunktmessungen selbst nach 4 h bei 37 °C keine Substratspaltung nachgewiesen werden konnte.

Durch den Einsatz des RNase I-defizienten *E. coli*-Stammes D10 konnte also die RNase Hintergrund-Aktivität praktisch vollkommen eliminiert werden. In periplasmatischen Proben wies das RNase-Substrat in Abwesenheit der RNase I eine bemerkenswerte Stabilität auf, so dass eine wichtige Voraussetzung für eine Nutzung des *Assays* für ein Bibliotheks-*Screening* erfüllt war.

#### 4.3.4.3 Sensitivität des Screenings

Nachdem das Problem der RNase-Kontamination beseitigt werden konnte, stellte sich die Frage, wie sensitiv der *Assay* ist. Um ein *Screening* einer RNase T1-Varianten-Bibliothek zu simulieren wurden Periplasma-Präparationen von D10-Kulturen, die einmal das Wildtyp-Enzym und einmal die inaktive RNase T1-Variante H92A exprimieren in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Hierbei sollte herausgefunden werden, unter wie vielen von der RNase T1 H92A-repräsentierten inaktiven Varianten man die eine aktive wieder finden kann. Die Mischungsverhältnisse betragen 1:10 bis 1:50000 (Wildtyp:H92A). Wie unter 3.5.4.2 beschrieben wurden 10 µl der hybridisierten Substratlösung (3.5.3) mit 10 µl der Periplasma-Gemische für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss am ConfoCor 2 vermessen. Abbildung 25 fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. Die Kurve e (Verdünnung 1:100) in Abbildung 25 spiegelt eine vollständige Substratspaltung wieder (vgl. Abbildung 21). Auch bei einer Verdünnung des RNase T1 (wt)-haltigen Periplasmas von 1:1000 (Kurve d) ist die Amplitude der Kreuzkorrelationskurve im Vergleich zur Kontrolle (Kurve a) noch um etwa 75% reduziert. Die Nachweisgrenze erreicht man dann im Bereich der Verdünnungen 1:5000 und 1:10000. Während die 1:5000 Verdünnung noch deutlich von der Kontrolle unterschieden

werden kann, trifft dieses auf die 1:10000 Verdünnung nur noch sehr bedingt zu. Es wurde auch noch eine 1:50000 Verdünnung gemessen, die von der Kontrolle überhaupt gar nicht mehr zu unterscheiden war.



**Abbildung 25:** Zwei-Farben-FCS-Messungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze des FCS-Assays. Die Messungen erfolgten jeweils für 60 s. Dargestellt sind die gemessenen Kreuzkorrelations-Kurven nach Inkubation des Substrats mit Periplasma-Gemischen von RNase T1 Wildtyp-exprimierenden *E. coli* D10-Kulturen mit solchen, die die Variante H92A enthalten. Mischungsverhältnis Wildtyp-Periplasma zu H92A-Periplasma: 1:10 (e), 1:1000 (d), 1:5000 (c), 1:10000 (b). Kontrolle (a) H92A-Periplasma.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass mit den hier vorgestellten Ergebnissen wesentliche Anforderungen an ein FCS-basiertes *Screening* von RNase T1-Bibliotheken erfüllt sind. Neben der sehr leichten Bereitstellung und der hohen Stabilität des Substrates, konnte eine hohe Sensitivität des Assays nachgewiesen werden. Würde man eine RNase T1-Bibliothek ohne Hintergrundaktivität auf Varianten durchsuchen wollen, die ebenso aktiv wie der Wildtyp sind, könnte man in einem 96 Loch-Mikrotiterplatten-Maßstab knapp  $5 \times 10^5$  ( $96 \times 5000$ ) Varianten pro Platte gleichzeitig testen. Würde man beispielsweise in einer RNase T1-Bibliothek nach einer Adenosin-spezifischen Variante mit 5% der Wildtyp-Aktivität nach Guanosin suchen und die Spaltstelle im FCS-Substrat entsprechend adaptieren, könnte man immer noch knapp 25000 Varianten pro 96-Loch-Platte gleichzeitig testen und würde, selbst

wenn die Bibliothek nur eine einzige Variante enthielte, die diesen Ansprüchen genüge, diese einzelne Variante in der Bibliothek identifizieren können.

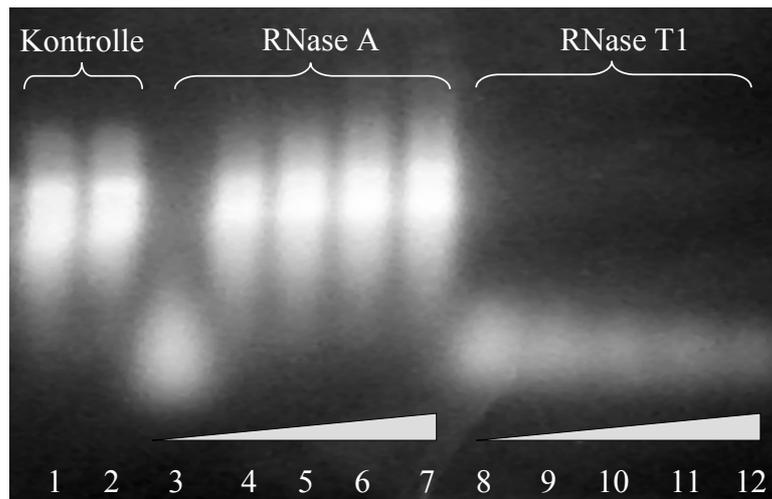
#### **4.4 Einsatz von RNase T1 in Immunotoxinen**

Im Rahmen des Beginns einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Annette Beck-Sickinger des Instituts für Biochemie der Universität Leipzig sollte die Eignung von RNase T1 für den Einsatz als „Toxin“-Komponente in Immunotoxinen überprüft werden. Die innerhalb der Kooperation zunächst geplanten Projekte befassen sich zum einen mit der Fusion von RNase T1 mit dem Neuropeptid Y, dessen Rezeptor von bestimmten Gehirn-Krebsarten überexprimiert wird, für die die Neuroblastoma Zelllinie SK-N-MC als Modellsystem zur Verfügung steht. Der Peptidligand soll die rezeptorvermittelte Aufnahme des Fusionsproteins in die Krebszelllinie bewirken, wobei die RNase-Komponente dann für das Absterben der Zellen sorgt (vgl. 1.4.2), [125]. Zum anderen sollen im weiteren Verlauf des Projekts die Untersuchungen auf Carrierpeptiden im Allgemeinen ausgedehnt werden, die die Aufnahme von Proteinen in Zellen bewirken können [126]. Hier soll RNase T1 als Modellsystem genutzt werden, bei dem über den cytotoxischen Effekt die Effizienz der Carrierpeptide und gleichzeitig die cytosolische Verfügbarkeit der Fusionsproteine nach Aufnahme in die Zelle beurteilt werden sollen. An die RNase werden hierbei folgende Anforderungen gestellt: Sie sollte in freier Form eine möglichst geringe Toxizität aufweisen, sie sollte sich auf einfache Art und Weise, möglichst auf chemischem Wege mit anderen Proteinen/Peptiden verknüpfen lassen und sollte bei Aufnahme in lebende Zellen in möglichst geringen Konzentrationen cytostatisch und damit cytotoxisch wirken. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte RNase T1 auf diese Anforderungen hin untersucht werden, um zu klären, ob RNase T1 als Modellsystem für die formulierten Projekte nutzbar ist.

##### **4.4.1 RNase Inhibitor (RI)**

Der Ribonuclease Inhibitor (RI) ist ein 50 kDa großes Protein, welches im Cytosol von Säugerzellen anzutreffen ist. RI hemmt eine Reihe von RNasen (z.B. RNase A) durch die Ausbildung eines nicht-kovalenten 1:1 Komplexes [84, 127]. Es wird vermutet, dass die Funktion von RI in der Bewahrung der Integrität zellulärer RNA beim Eindringen sekretierter RNasen in die Zelle zu sehen ist [128]. Durch eine Blockade des katalytischen Zentrums reduziert RI die Cytotoxizität der RNasen, die er als Ligand erkennt [85]. Eine Voraussetzung für den Einsatz

der RNase T1 in Immunotoxinen wäre also, dass sie möglichst nicht vom Ribonuclease Inhibitor erkannt und damit nicht in ihrer Aktivität gehemmt wird. Um dies zu untersuchen, wurden 4 µg hochmolekulare *E. coli*-RNA (ROCHE, Mannheim) mit 10 ng RNase T1 in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 15 min bei 37 °C inkubiert (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM DTT), wobei steigende Mengen RI zugesetzt wurden. Als Kontrolle diente RNase A. Die Ansätze wurden im Anschluss wie unter 3.2.9.2 beschrieben durch eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese analysiert.



**Abbildung 26: RNase Inhibitor Assay.** 4 µg hochmolekulare *E. coli*-RNA, 10 ng RNase wurden mit 0 - 80 Units Ribonuclease Inhibitor versetzt, für 15 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. Kontrolle: Ansätze ohne RNase ohne [1] und mit [2] 37 °C-Inkubation. RNase A-Ansätze: Mit 0 [3], 20 [4], 40 [5], 60 [6] und 80 [7] Units RI. RNase T1-Ansätze: Mit 0 [8], 20 [9], 40 [10], 60 [11] und 80 [12] Units RI.

Abbildung 26 zeigt, dass die Aktivität der RNase A schon bei der Zugabe von 20 Units RI komplett gehemmt ist. Bei den RNase T1-Ansätzen hingegen ist selbst bei der Zugabe von 80 Units RI keinerlei Hemmung der Enzymaktivität zu erkennen. Der Ribonuclease Inhibitor ist also nicht in der Lage RNase T1 als Liganden zu erkennen und sollte somit auch die cytosolische Toxizität der RNase nicht beeinflussen können.

#### 4.4.2 Chemische Modifizierung von RNase T1

Die Peptide, die im Rahmen der geplanten Experimente der unter 4.4 vorgestellten Projekte eingesetzt werden sollen, weisen teilweise Modifizierungen auf, die nur auf chemischem Wege eingeführt werden können. So ist beispielsweise das Neuropeptid Y nur als C-terminales Amid biologisch aktiv. Des Weiteren sollen verzweigte Carrierpeptide und Peptide mit Fluoreszenzmarkierungen zur einfachen Detektion der Aufnahme der Verbindungen in Zellen zum Einsatz

kommen. Aus diesen Gründen ist es notwendig, die Kopplung der Peptide an RNase T1 auf chemischem Wege durchzuführen, wobei die Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigt werden darf. Für diesen Zweck sollen kommerziell erhältliche, heterobifunktionale Reagenzien zum Einsatz kommen, die zum einen einen  $\text{NH}_2$ -reaktiven N-Hydroxy-Succinimidylester (NHS-Ester) und zum anderen ein SH-reaktives Maleimid aufweisen. Bei der chemischen Synthese der Peptide kann sehr leicht ein Cystein-Rest in die Sequenz eingebaut werden. Die Frage war also, ob es möglich ist, RNase T1 mit einem NHS-Ester umzusetzen, ohne die Aktivität des Enzyms zu beeinflussen. Als Testsystem wurde hierfür RNase T1 (wt) mit dem aktivierten Fluoreszenzfarbstoff NHS-Rhodamin (5/6-Carboxytetramethylrhodamin, Succinimidyl-ester) umgesetzt. RNase T1 weist zwei oberflächlich lokalisierte Lysin-Reste auf, so dass zusammen mit dem N-Terminus drei  $\text{NH}_2$ -Funktionen für eine Reaktion mit dem NHS-Ester in Frage kommen. Für den Lysinrest in Position 41 konnte gezeigt werden, dass eine chemische Modifizierung desselbigen zu einer starken Inhibition der Aktivität der RNase T1 führt [129], so dass eine Beteiligung dieses Lysinrestes an der Kopplungsreaktion vermieden werden sollte. Die  $\text{NH}_2$ -Gruppe des zweiten Lysinrestes K25 zeigt zum Proteininneren und bildet zwei feste Wasserstoffbrückenbindungen aus, so dass dieser Rest unter normalen Umgebungsbedingungen chemisch nicht zugänglich ist [129]. Da sich  $\text{pK}_s$ -Werte von Lysin-Seitenketten von dem des N-Terminus unterscheiden und die  $\text{NH}_2$ -Funktion für die Reaktion in protonierter Form vorliegen muss, kann eine spezifische Modifizierung der RNase T1 über die Steuerung des pH-Wertes erreicht werden (persönliche Mitteilung Thomas Greiner-Stöffe). RNase T1-Lyophilisat wurde in unterschiedlichen Phosphat-Puffern (50 mM, pH 6,5 bis 9) aufgenommen und wie unter 3.3.7 beschrieben mit dem NHS-Rhodamin umgesetzt und vom freien Farbstoff befreit. Von den erhaltenen Proteinlösungen wurden dann zum einen die spezifische Aktivität (3.4.2) und zum anderen das Kopplungsverhältnis von Tetramethylrhodamin zu RNase T1 (3.3.7) bestimmt. Es stellte sich heraus, dass mit einem pH-Wert von 8,3 die besten Ergebnisse erzielt wurden. Das Kopplungsverhältnis von Enzym zu Farbstoff betrug exakt 1,0 und es war praktisch kein Aktivitätsverlust durch die Modifizierung zu beobachten (spez. Akt. der modifizierten RNase = 375000 Units/mg). Obwohl das NHS-Rhodamin in großem molaren Überschuss eingesetzt wurde, besaß jedes RNase T1-Molekül nur eine Fluoreszenz-Markierung. Es steht zu vermuten, dass dies auf eine ortsgerichtete, spezifische Modifizierung des N-Terminus des Proteins zurückzuführen ist.

Es konnte somit ein einfaches Protokoll zur  $\text{NH}_2$ -Modifizierung von RNase T1 mittels NHS-Estern ohne Beeinträchtigung der Aktivität des Enzyms etabliert werden, was eine Verknüpfung von Cystein-haltigen Peptiden mit der RNase T1 mittels der oben beschriebenen heterobi-

funktionalen Reagenzien ermöglichen sollte.

#### **4.4.3 Toxizität von RNase T1**

In ersten Zellkultur-Experimenten wurde überprüft, ob RNase T1 als freies Enzym nach Zugabe ins Kulturmedium einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Hierfür kamen die beiden Zelllinien SK-N-MC und BHK zum Einsatz, deren Lagerung und Passagierung von Hella Späthe und Christina Dammann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Annette Beck-Sickinger durchgeführt wurden. Alle hier beschriebenen Zellkultur-Experimente wurden ausgehend von in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen konfluent gewachsenen Kulturen beider Stämme durchgeführt.

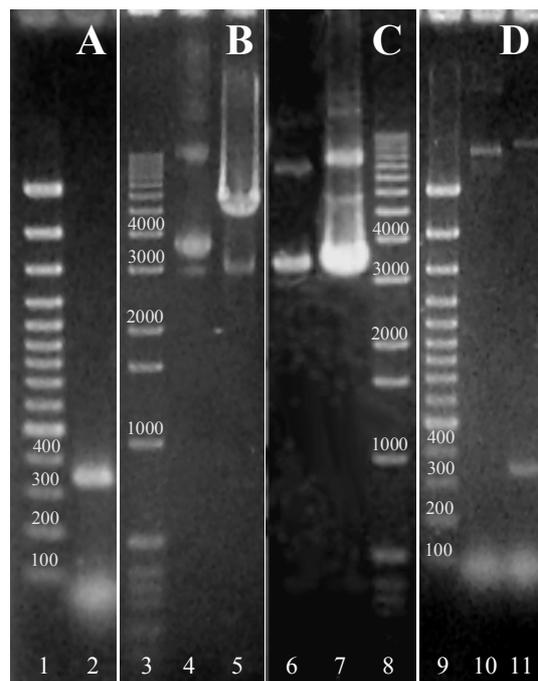
Wie unter 3.6.1 wurden die Zellen von konfluent gewachsenen Kulturen vom Flaschenboden abgelöst, gezählt, mit Vollmedium verdünnt und in einer 96-Loch-Platte neu ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert bis etwa 40% Konfluenz erreicht war. Im Anschluss wurde das Medium abgezogen und durch RNase T1-Verdünnungen in den entsprechenden Vollmedien ersetzt. Für beide Zelllinien wurde ein Konzentrationsbereich von 0,1 bis 200 µM eingesetzt, wobei für jeden Wert eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Sowohl für die SK-N-MC- als auch für die BHK-Zellen konnte keinerlei Wachstumsbeeinträchtigung durch die zugesetzte RNase T1 festgestellt werden. Für alle Ansätze konnte nach 2 Tagen Inkubation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) ein konfluenter Zellrasen beobachtet werden. Offensichtlich hat RNase T1 zumindest auf diese beiden Zelllinien keinerlei cytotostatische, geschweige denn cytotoxische Wirkung, so dass eine erste Voraussetzung für die Durchführung der unter 4.4 beschriebenen Experimente gegeben ist.

#### **4.4.4 Expression freier RNasen in Säugerzellen**

Zur Untersuchung des cytotoxischen Potentials der RNase T1 sollte diese intrazellulär zum einen in der Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-MC, welche den Neuropeptid Y-Rezeptor überexprimiert (vgl. 4.4), und zum anderen in BHK-Zellen exprimiert werden, die sich durch besonders hohe Transfektionsraten auszeichnen. Dies sollte zunächst in Form des freien Enzyms realisiert werden, so dass das RNase T1-Gen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1 kloniert werden sollte. Als Kontrollen wurden des Weiteren das Gen der inaktiven RNase T1 Variante H92A und das Gen der RNase A in den Expressionsvektor kloniert.

#### 4.4.4.1 Darstellung der Expressionsvektoren

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA 3.1 erlaubt die konstitutive Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen auf hohem Niveau (vgl. 2.6). Die drei Ribonuclease-Gene von RNase T1, RNase T1 H92A und RNase A wurden auf dieselbe Art und Weise in diesen Vektor kloniert. Die Abbildung 27 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Überprüfung der einzelnen Schritte der Klonierung am Beispiel des RNase T1 Wildtyp-Gens.



**Abbildung 27:** Klonierung der RNase-Gene in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 am Beispiel des RNase T1 (wt)-Gens. Die einzelnen Schritte der Klonierung wurden mittels Ethidiumbromid-gefärbter 1%-igen (B +C) bzw. 2%-igen (A + D) Agarose-Gele überprüft. Die Größen ausgesuchter Markerbanden sind über den Banden in bp angegeben. [1, 9], 750 ng 100 bp-DNA-Fragment-Leiter; [3, 8], 1 µg 1 kbp-DNA-Fragment-Leiter; [2], 10 µl des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des RNase T1-Gens; [4], 5 µl des pcDNA 3.1 Restriktionsansatzes; [5, 6], 0,7 µg pcDNA 3.1 (unbehandelt); [7], 5 µl Plasmid-Präparation des dargestellten Vektors; [10], 10 µl der Test-PCR-Kontrolle mit pcDNA 3.1 als Matrize; [11], 10 µl der Test-PCR zum Nachweis des Inserts.

Während uns die beiden RNase T1-Gene auf laboreigenen Konstrukten (pA2T1 und pA2T1H92A) zur Verfügung standen, wurde uns freundlicherweise das RNase A-Gen auf dem Vektor YEpWL.RNaseA von Prof. Ronald Raines (Madison, Wisconsin, USA) überlassen. Mittels PCR wurden die RNase-Gene zunächst aus den Vektoren amplifiziert, wobei für die RNase T1 Gene die Primer T1EukExvo und T1EukExhi und für das Gen der RNase A die Primer AEukExvo und AEukExhi zum Einsatz kamen (Sequenzen der Oligonucleotide unter 2.7). Die Oligonucleotide wurden so konstruiert, dass die Signalpeptid-Sequenzen durch Ein-

führung eines neuen Startcodons unter Berücksichtigung der Kozak-Translations-Initiations-Sequenz deletiert werden. Mittels überhängender 5'-Enden der Oligonucleotide wurden die für die Klonierung ausgewählten Restriktionsschnittstellen *EcoR* I (stromaufwärts) und *Xba* I (stromabwärts) eingeführt, die beide in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors enthalten sind. Die PCR erfolgte unter Standardbedingungen (3.2.1) mit 20 ng Matrizen-Plasmid pro Ansatz, einer Anlagerungs-Temperatur von 53 °C und 20 Wiederholungen unter Verwendung der Vent-Polymerase (vgl. Abb. 27). Die PCR-Produkte wurden gereinigt (3.2.5.3) und im Anschluss ebenso wie der Zielvektor mit den beiden Restriktionsendonucleasen *EcoR* I und *Xba* I wie unter 3.2.7 beschrieben gespalten. Der linearisierte Vektor wurde zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt und alle Ansätze wurden zur Inaktivierung der Enzyme auf 70 °C erhitzt (3.2.7). Die geschnittenen PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion der DNA (3.2.5.2) aus den Gelbanden der korrekten Größe gereinigt. Da der geschnittene Vektor eine weitere DNA-Bande aufwies, die auch in der kommerziell bezogenen, unbehandelten pcDNA3.1-Lösung nachweisbar war (Abb. 27/B), wurde der linearisierte Vektor ebenfalls durch Agrose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion gereinigt. Die so gereinigten DNA-Fragmente konnten dann unter Verwendung der T4-DNA-Ligase verknüpft werden. Als Kontrolle zur Ermittlung des Vektorhintergrunds wurde ein Ligationsansatz mitgeführt, der nur die linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA enthielt (3.2.8). Elektrokompente TOP10F<sup>'</sup>-Zellen wurden dann mit je 5 µl der nicht weiter behandelten Ligationsansätze transformiert und auf Ampicillin-haltigen Platten ausgestrichen (3.2.3.2). Das Auszählen der Kolonien ergab folgendes Bild:

Anzahl der Kolonien pro Transformations-Ansatz:

Vektorhintergrund pcDNA 3.1	320
Ligation RNase T1 wt-Gen	1620
Ligation RNase T1 H92A-Gen	2830
Ligation RNase A-Gen	1930

Die Kolonienanzahl der Ligationen war also in allen Fällen deutlich höher als für die Referenz-Ligation zur Ermittlung des Vektorhintergrunds. Ausgehend von jeweils 5 Kolonien pro Klonierung wurden Plasmidpräparationen durchgeführt (3.2.4.1) und die Größe der isolierten Plasmide wurde elektrophoretisch mit der Größe des Ausgangsplasmids pcDNA 3.1 verglichen (pcDNA 3.1: 5428 bp; theoretische Größe der zu klonierenden Vektoren: 5728 bp [RNase T1] bis 5881 bp [RNase A]). Plasmide deren Laufverhalten im Vergleich zum Ausgangsvektor auf eine höheres Molekulargewicht schließen ließen, wurden ausgewählt und mittels der oben aufgeführten Klonierungs-Primer wurde die Anwesenheit der RNase-Gen-Insertion in einer

Test-PCR (3.2.1) nachgewiesen (1 µg Plasmid, 10 Zyklen, 53 °C Anlagerungs-Temperatur). Jeweils von einem ausgewählten Klon pro Klonierung wurden dann mit Hilfe der Didesoxy-Methode unter Verwendung der Sequenzierprimer pcDNA3-A2 und T7promotor beide Stränge sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Software “*Clone Manager Professional Suite*“ ausgewertet und überprüft. Sie stimmten in allen drei Fällen mit den *in-silico* generierten theoretischen Vektorsequenzen überein. Die Plasmide wurden wie in Tabelle 6 angegeben bezeichnet.

**Tabelle 6:** Konstruierte RNase-Expressionsvektoren abgeleitet von pcDNA 3.1.

Klonierte RNase	Quell-Plasmid	Bezeichnung des Konstruktes
RNase T1 (wt)	pA2T1	pT1EE
RNase T1 H92A	pA2T1H92A	pT1EEH92A
RNase A	YEpWL.RNaseA	pAEE

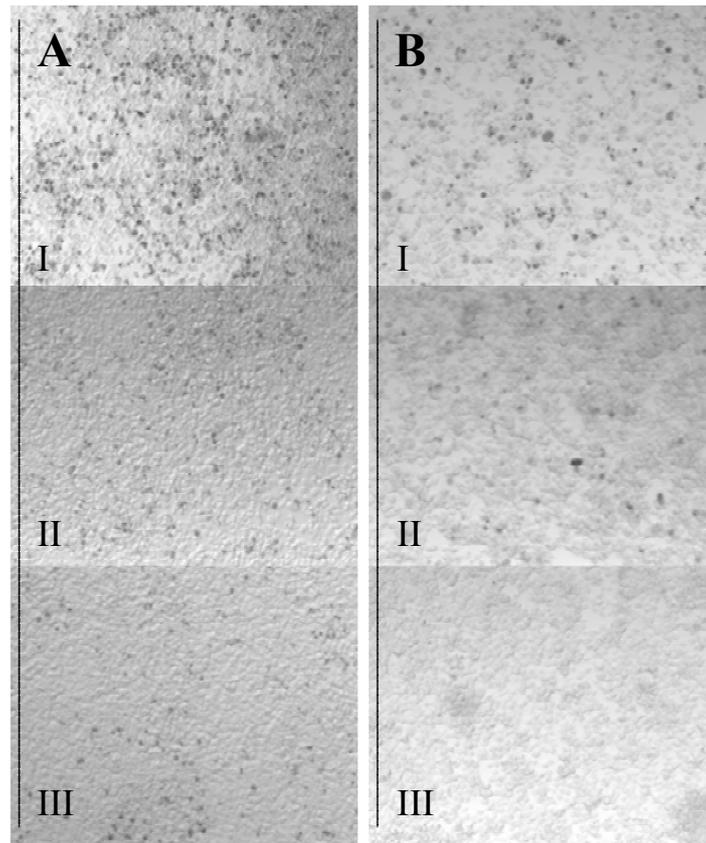
#### 4.4.4.2 Expression der RNasen in Zellkultur

Nach der erfolgreichen Darstellung der drei Expressionsvektoren pT1EE, pT1EEH92A und pAEE der drei RNasen sollten diese genutzt werden, um die Wirkung einer intrazellulären Expression der Proteine zu untersuchen. Konfluent gewachsene Kulturen der beiden Zelllinien BHK und SK-N-MC wurden auf 96-Loch-Platten passagiert und bis zu einer Konfluenz von etwa 70-80 % in einem Brutschrank mit 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden dann wie unter 3.6.2 beschrieben mittels Lipofektion mit den drei Expressionsvektoren transient transfiziert, wobei alle Ansätze mindestens dreimal durchgeführt wurden. Nach der Transfektion wurden die Zellen wieder mit dem entsprechenden Vollmedium versehen und ü.N. bei 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Als Kontrolle wurden immer mehrere Ansätze mitgeführt, in denen die Zellen nur mit den verwendeten Lösungen ohne den Zusatz von Plasmid-DNA versetzt wurden. Zur Abschätzung der Transfektionsraten wurden auf jeder 96-Loch-Platte zwei Transfektionen mit dem Plasmid pEGFP-N1 durchgeführt, welcher die cytosolische Expression des EGFP, einer Variante des grün fluoreszierenden Proteins, bewirkt, so dass über die Anzahl der fluoreszierenden Zellen in Relation zu den nicht-fluoreszierenden Zellen die Effizienz der Lipofektion abgeschätzt werden konnte (vgl. Abb. 30/A und 31/A).

Eine lichtmikroskopische Auswertung ergab zunächst keine eindeutigen Befunde. Während sich die transfizierten SK-N-MC-Kulturen, der die drei RNasen T1, T1 H92A und A exprimie-

renden Zellen, die in allen Fällen eine homogenen, konfluenten Rasen ausbildeten, phänomenologisch nicht voneinander unterschieden, konnte für die BHK-Zellen zumindest konstatiert werden, dass im Falle der exprimierten aktiven RNasen geringere Zelldichten zu beobachten waren (vgl. Abb. 28). Die Transfektionsraten lagen für die BHK-Zellen im Bereich von 30%, für die SK-N-MC-Zellen dagegen bei unter 5 %. Sowohl eine Erhöhung der eingesetzten Plasmid-Menge in Relation zur eingesetzten Menge an Lipofectamin™, als auch eine Erhöhung beider Komponenten brachte keine Verbesserung der Transfektionsraten. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Ansätze einer Trypanblau-Färbung unterzogen, um den Anteil der toten Zellen zu bestimmen (3.6.3). Hierbei ergab sich ein etwas aufschlussreicheres Bild (Abb. 28): In den Ansätzen, in denen die Zellen RNase T1 Wildtyp-Protein exprimieren, ist die Anzahl der abgestorbenen Zellen im Vergleich zu den Ansätzen der inaktiven Variante H92A und der Kontrollen deutlich erhöht. Dies traf für beide Zelllinien zu. Die RNase A-exprimierenden Zellen unterschieden sich von denen der RNase T1 (wt) nicht, weswegen auf eine Darstellung dieser Ansätze in der Abbildung verzichtet wurde. Die Aussagekraft dieser Beobachtungen ist allerdings eher als gering einzustufen, da eine Quantifizierung der beobachteten Unterschiede nicht möglich war. Dies hängt damit zusammen, dass bei Transfektionsraten in dem beschriebenen Bereich, die in guter Übereinstimmung mit vorherigen Transfektions-Experimenten an diesen beiden Zelllinien stehen (persönliche Mitteilung Michaela Dinger), zwei Phänomene eine wesentliche Rolle spielen: Zum einen wachsen beide Zelllinien adhärent, wobei abgestorbene Zellen dazu neigen sich von der Zelloberfläche abzulösen [125]. Dies könnte zwar die größeren Lücken im Falle der RNase T1/A-exprimierenden BHK-Zellen erklären, in dem die intrazelluläre Präsenz der aktiven RNasen durch einen RNA-Abbau zum Zusammenbruch des Stoffwechsels der Zellen und damit zum Zelltod führt, aber aufgrund der während der Trypanblau-Färbung essentiellen Waschschriffe ist der Anteil der weggeschwemmten, toten Zellen ein nicht aus dem Weg zu räumender Unsicherheitsfaktor. Der zweite, eine Rolle spielende Faktor ist in der Tatsache zu sehen, dass bei den erzielten Transfektionsraten von etwa 30 % bzw. deutlich unter 5 % die verbleibenden untransfizierten Zellen in ihrem Wachstum nicht eingeschränkt sind. Unter der Annahme, dass die Zellen, die rekombinante, aktive RNasen exprimieren, sich nicht weiter vermehren können, würden die nicht-transfizierten Zellen die Kulturen nach der eintägigen Inkubationszeit dominieren.

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse der Expressionsexperimente mit den freien RNasen wurden entschieden, die drei RNasen als EGFP-Fusionsproteine zu exprimieren, um mit der Fluoreszenz ein zusätzliches, quantifizierbares Signal zu erhalten.



**Abbildung 28:** Lichtmikroskopische Aufnahmen Trypanblau-gefärbter SK-N-MC- (A) und BHK-Zellen (B) zur Untersuchung der Cytotoxizität von RNase T1. [I], mit dem RNase T1 (wt)-Expressionsplasmid pT1EE transfizierte Zellkulturen; [II], mit dem RNase T1 H92A-Expressionsplasmid pT1EEH92A transfizierte Zellkulturen; [III], Kontrollen mit untransfizierten Zellen.

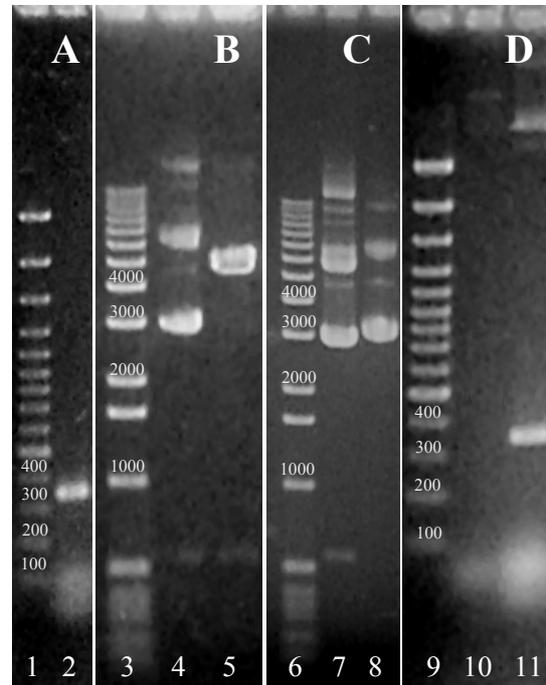
#### 4.4.5 Expression der RNasen als GFP-Fusionsproteine in Zellkultur

Um den cytotoxischen Effekt der intrazellulären Expression der RNase T1 besser beurteilen zu können, sollte das RNase T1-Wildtyp-Enzym, sowie die beiden Kontrollen RNase T1 H92A und RNase A, als Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein exprimiert werden. Um dies zu realisieren wurden die entsprechenden Gene der RNasen in den kommerziellen Vektor pEGFP-N1 (2.6) kloniert.

##### 4.4.5.1 Darstellung der RNase-GFP-Expressionsvektoren

Der Vektor pEGFP-N1 enthält eine im Bezug auf die Fluoreszenzintensität und des Expressionsniveaus in Säugerzellen optimierte Variante des GFP, die als optimiertes GFP (EGFP) bezeichnet wird. Die multiple Klonierungsstelle des Vektors ist zwischen einem CMV-Promotor und dem EGFP-Gen lokalisiert und erlaubt die Expression von insertierten Genen als

N-terminales Fusionsprotein des EGFP. Die Gene der drei RNasen wurden auf die gleiche Art und Weise kloniert. Die Abbildung 29 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Überprüfung der einzelnen Schritte der Klonierung am Beispiel des RNase T1 Wildtyp-Gens.



**Abbildung 29:** Klonierung der RNase-Gene als GFP-Fusionsproteine in den Expressionsvektor pEGFP-N1 am Beispiel des RNase T1 (wt)-Gens. Die einzelnen Schritte der Klonierung wurden mittels Ethidiumbromid-gefärbten 1%-igen (**B + C**) bzw. 2%-igen (**A + D**) Agarose-Gele überprüft. Die Größen ausgesuchter Markerbanden sind über den Banden in bp angegeben. [**1, 9**], 750 ng 100 bp-DNA-Fragment-Leiter; [**3, 6**], 1 µg 1 kbp-DNA-Fragment-Leiter; [**2**], 10 µl des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des RNase T1-Gens; [**4, 7**], 1 µg pEGFP-N1 (unbehandelt); [**5**], 5 µl des pEGFP-N1-Restriktionsansatzes; [**8**], 5 µl Plasmid-Präparation des dargestellten Vektors; [**10**], 10 µl der Test-PCR-Kontrolle mit pEGFP-N1 als Matrize; [**12**], 10 µl der Test-PCR zum Nachweis des Inserts.

Nach PCR-Amplifikation der Gene (3.2.1; Anlagerungs-Temperatur 53 °C, 20 Wiederholungen, 20 ng Plasmid, Vent-Polymerase) aus den Ursprungsvektoren (vgl. 4.4.2.1) mit Hilfe der Oligonucleotid-Paare T1EukExvo/T1EGFPhi2 im Falle der RNase T1-Gene und AEukExvo/AEukExhi für das RNase A-Gen (Oligonucleotid-Sequenzen unter 2.7), wurden die PCR-Produkte wie unter 3.2.5.3 beschrieben gereinigt. Die Primersequenzen wurden unter Berücksichtigung der Kozak-Translations-Initiations-Sequenz und unter Deletion der Signalpeptide konstruiert, wobei überhängende Enden eine Einführung der beiden Restriktionschnittstellen für die Enzyme *EcoR* I (stromaufwärts) und *Age* I (stromabwärts) ermöglichten. Aus der Auswahl der Restriktionsschnittstellen resultierte die folgende Sequenz des Peptidsegments, welches die RNasen mit dem EGFP auf Proteinebene verknüpft: Pro-Pro-Val-Ala-Thr. Die gereinigten PCR-Produkte wurden, ebenso wie der Zielvektor pEGFP-N1 mit den beiden

Restriktionsendonucleasen *EcoR* I und *Age* I geschnitten (3.2.7). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender DNA-Extraktion aus den Banden der korrekten Größe gereinigt (3.2.5.2). Die Vektor-DNA, die nach Abschluss der Restriktion noch dephosphoryliert wurde, wurde nach Hitzeinaktivierung der Enzyme ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet (3.2.7). Die so vorbereiteten RNase-Gene konnten dann wie unter 3.2.8 beschrieben mit T4-DNA-Ligase ligiert werden, als Kontrolle zur Bestimmung des Vektorhintergrunds wurde ein Ligationsansatz nur mit geschnittener Vektor-DNA mitgeführt. Elektrokompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen wurden im Anschluss direkt mit 5 µl der Ligationsansätze transformiert und die Transformationsansätze wurden auf Kanamycin-haltigen Platten ausgestrichen (3.2.3.2). Es ergab sich folgendes Bild:

Anzahl der Kolonien pro Transformations-Ansatz:

Vektorhintergrund pEGFP-N1	110
Ligation RNase T1 wt-Gen	920
Ligation RNase T1 H92A-Gen	740
Ligation RNase A-Gen	650

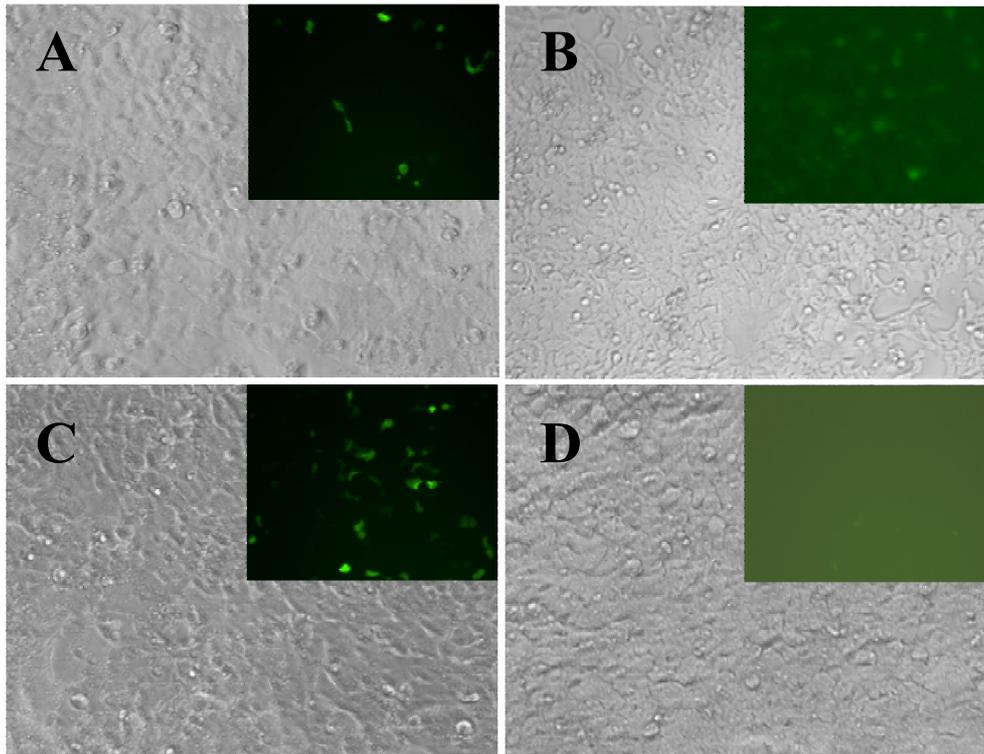
Die Transformationsausbeute der Ligationsansätze war also ausreichend höher als in der Kontrolle. Von jeweils 5 Kolonien jeder Klonierung wurden Kulturen für eine Plasmid-Präparation angeimpft (3.2.4.2). Die Größe der isolierten Plasmide wurde elektrophoretisch mit der Größe des Ausgangsvektors pEGFP-N1 (4733 bp) verglichen (vgl. Abb. 29/C). Die durch die RNase-Gen-Insertion verursachte Vergrößerung des Vektors beträgt etwa 300 bp im Falle der RNase T1-Gene und etwa 450 bp im Falle des RNase A-Gens. Plasmide, deren elektrophoretische Mobilität im Vergleich zum Ausgangsvektor reduziert erschien, wurden ausgewählt und mittels der oben aufgeführten Klonierungs-Primer wurde das Vorhandensein der RNase-Gen-Insertionen in einer Test-PCR (3.2.1) nachgewiesen (1 µg Plasmid, 10 Zyklen, 53 °C Anlagerungs-Temperatur). Jeweils von einem ausgewählten Klon wurden dann mit Hilfe der Didesoxy-Methode unter Verwendung der Sequenzierprimer EGFPvo und EGFPphi beide Stränge sequenziert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen mit Hilfe der Software "*Clone Manager Professional Suite*" ergab, dass sie in allen drei Fällen mit den *in-silico* generierten theoretischen Vektorsequenzen übereinstimmten. Die Plasmide wurden wie in Tabelle 7 angegeben bezeichnet.

**Tabelle 7:** Konstruierte RNase-EGFP-Expressionsvektoren abgeleitet von pEGFP-N1.

Klonierte RNase	Quell-Plasmid	Bezeichnung des Konstruktes
RNase T1 (wt)	pA2T1	pT1GFP
RNase T1 H92A	pA2T1H92A	pT1GFPH92A
RNase A	YEpWL.RNaseA	pAGFP

#### 4.4.5.2 Expression der GFP-Fusionsproteine in Zellkultur

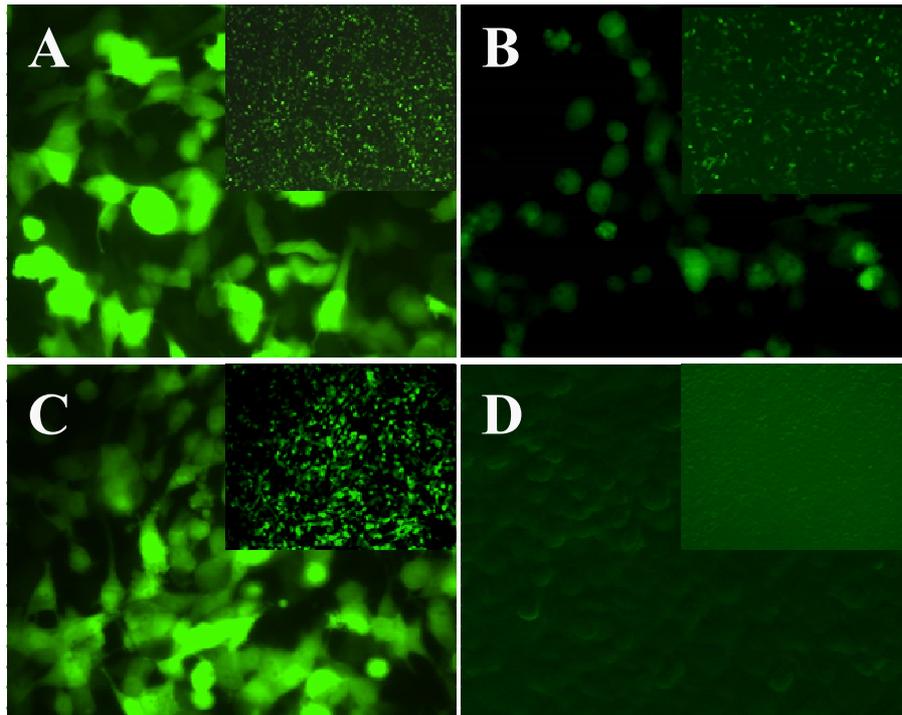
Nach der Darstellung der drei GFP-Fusionprotein-Expressionsvektoren mit RNase T1 (wt), der inaktive RNase T1-Variante H92A und RNase A wurden Expressionsexperimente mit den beiden Zelllinien SK-N-MC und BHK in analoger Form zu den unter 4.4.2.2 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Nach Aussäen der Zellen auf 96-Loch-Platten wurden die Transfektions-Ansätze mit den drei dargestellten Plasmiden durchgeführt, der EGFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 diente wiederum als Kontrolle. Die Abbildung 30 zeigt die mit den SK-N-MC-Zellen erzielten Ergebnisse. Abbildung 31 fasst die Ergebnisse der Experimente mit den BHK-Zellen zusammen. Die Transfektionsrate war wie schon bei den vorherigen Experimenten für die SK-N-MC Zellen (< 5 %) immer deutlich geringer als für die BHK-Zellen (ca. 30 %). Phänomenologisch ergab sich jedoch für beide Zelllinien dasselbe Bild, obwohl die Effekte an den BHK-Zellen mit den höheren Transfektionsraten natürlich deutlicher ausfielen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Zellen, die das RNase T1 H92A-EGFP-Fusionsprotein exprimierten, in ihrer Fluoreszenzintensität nicht von denen, die das unmodifizierte EGFP-exprimierten, unterschieden werden (Abb. 30+31/A+C). Im Falle der aktiven RNasen ergab sich jedoch ein völlig anderes Bild: Während für das RNase A-GFP-Fusionsprotein in beiden Zelllinien noch eine schwache, im Vergleich zur EGFP-Kontrolle aber drastisch reduzierte Fluoreszenz sichtbar war (Abb. 30+31/B), konnte im Falle des RNase T1(wt)-EGFP-Fusionsproteins keinerlei Fluoreszenz innerhalb der Zellen nachgewiesen werden. Die Farbin-tensität der Zellen in den Abbildungen können nicht quantitativ miteinander verglichen werden, da die Belichtungszeiten der einzelnen Aufnahmen nicht identisch waren. Dies gilt insbesondere für die Ansätze B und D, bei denen die Belichtungszeiten um ein vielfaches höher waren.



**Abbildung 30:** Expression von RNase-EGFP-Fusionsproteinen in SK-N-MC-Zellen. Die großen Fotografien zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Zellkulturen. Die kleinen Fotografien zeigen die gleichen Bildausschnitte unter Fluoreszenzanregung mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Die Ansätze wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert: [A], pEGFP-N1 (Kontrolle); [B], pAGFP (RNase A-EGFP-Expression); [C], pT1GFPH92A (RNase T1 H92A-EGFP-Expression); [D], pT1GFP (RNase T1 (wt)-EGFP-Expression).

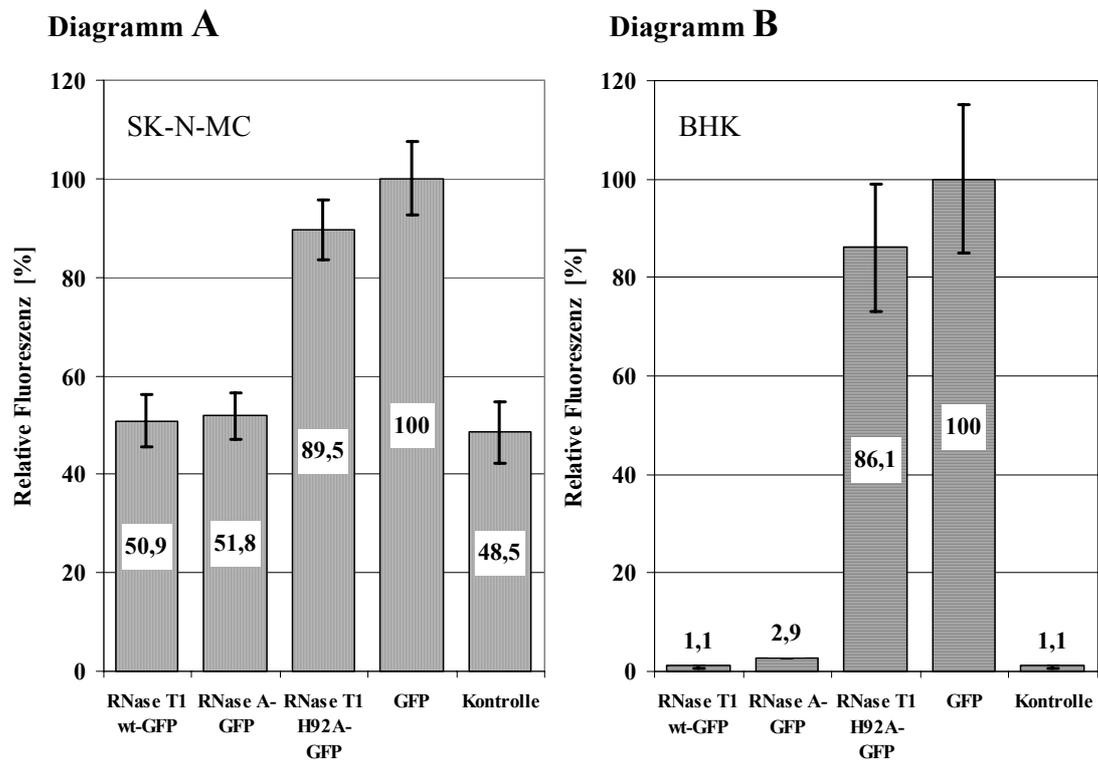
Während die Expression der inaktiven RNase T1-Variante H92A die Proteinsynthese in den Zellkulturen erwartungsgemäß gar nicht beeinflusst, scheint die Expression des Wildtyp-Enzyms in so geringen Mengen den Stoffwechsel der Zelle zu blockieren, dass diese Mengen über die Fluoreszenz des EGFP nicht nachweisbar waren (Abb. 30+31/D). Im Falle der RNase A liegt dieser Zusammenhang ein wenig anders. Hier werden zwar bei weitem nicht die Fluoreszenzintensitäten der beiden anderen Kontrollen erreicht (vgl. Abb. 32), aber es sind schwach grün fluoreszierende Zellen sichtbar (Abb. 30+31/B). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die RNase A durch den cytosolischen Ribonuclease Inhibitor RI (vgl. 4.4.1) erkannt wird. Erst wenn das Fusionsprotein in solcher Menge produziert wurde, bis die vorhandene Menge des Inhibitors überschritten ist, sorgt die RNase durch den Abbau zellulärer RNA für einen Abbruch der Protein-Synthese.

Für eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurden die 96-Loch-Platten mit einem Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Lesegerät (3.6.5) vermessen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 32 zusammengefasst.



**Abbildung 31:** Expression von RNase-EGFP-Fusionsproteinen in BHK-Zellen. Die gezeigten Aufnahmen wurden unter Fluoreszenzanregung mit unterschiedlichen Belichtungszeiten gemacht. Es wurden je zwei Bilder mit unterschiedlicher Vergrößerung aufgenommen. Die Ansätze wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert: [A], pEGFP-N1 (Kontrolle); [B], pAGFP (RNase A-EGFP-Expression); [C], pT1GFPH92A (RNase T1 H92A-EGFP-Expression); [D], pT1GFP (RNase T1 (wt)-EGFP-Expression).

Die Fluoreszenzintensität der EGFP-exprimierenden Zellkulturen wurden gleich 100 % gesetzt und alle anderen Werte wurden auf diesen bezogen. Augenfällig wird zunächst, dass sich die EGFP-Fluoreszenz von der Hintergrund-Fluoreszenz (Abb. 32/A, Kontrolle) im Falle der SK-N-MC-Zellen aufgrund der geringeren Transfektionsraten weitaus weniger abhebt, als bei den BHK-Zellen. Die Fluoreszenz der Kontrolle macht annähernd 50 Prozent der EGFP-Fluoreszenz aus. Die unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbare, schwache Fluoreszenz der RNase A-EGFP exprimierenden Zellen ließ sich aufgrund des hohen relativen Hintergrunds und der damit hohen Standardabweichung nicht von der Kontrolle differenzieren. Ein viel eindeutigeres Bild ergab sich für die BHK-Zellen, da hier die absoluten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Ansätze aufgrund der vielfach besseren Transfektionsraten wesentlich höher lagen. Die Hintergrund-Fluoreszenz der Kontrolle macht hier nur noch etwa 1 % der EGFP-Fluoreszenz aus (Abb. 32/B). Wie schon mikroskopisch beobachtet, lässt sich auch hier die Fluoreszenz der RNase T1 wt-EGFP exprimierenden Zellen vom Hintergrund nicht unterscheiden. Signifikant nachweisbar ist im Falle der BHK-Zellen allerdings die Fluoreszenz des RNase A-EGFP-Fusionsproteins. Sie macht zwar nur 2,9 % des EGFP-Wertes aus, ist aber immerhin um den Faktor 2,6 größer als der Kontroll-Wert.



**Abbildung 32:** Fluoreszenzintensitäten von RNase-EGFP-Fusionsproteinen exprimierenden Zellkulturen. Diagramm A zeigt die mit SK-N-MC-Zellen erzielten Ergebnisse, Diagramm B die der BHK-Zellen. Die Fluoreszenzintensität der GFP-exprimierenden Zellkulturen wurden gleich 100 % gesetzt. Die angegebenen Messwerte entsprechen den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Eingezeichnet sind als Fehlerbalken die Standardabweichungen der Messungen. Die Kontrollen entsprechen untransfizierten Zellen.

Die Expressionsexperimente der RNasen als freie Enzyme und als GFP-Fusionsproteine zusammenfassend kann gesagt werden, dass RNase T1 in cytosolischer Lokalisation in sehr geringen Mengen eine cytostatische Wirkung auf den Stoffwechsel der getesteten Säugerzelllinien hat und damit die wesentliche Bedingung für den Einsatz des Enzyms in Immunotoxinen erfüllt ist. Nebenbei konnte auf neuartige Weise die intrazelluläre Präsenz des Ribonuclease Inhibitors und seine inhibitorische Wirkung *in vivo* auf die RNase A nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasste sich auf der einen Seite mit Experimenten, mit dem Ziel die Substratspezifität der RNase T1 von Guanosin nach Adenosin zu verändern. Hierfür wurden zunächst zwei neue RNase T1-Varianten dargestellt, gereinigt und charakterisiert, deren Spezifität deutlich in Richtung einer Substratspaltung nach Adenosin-Resten verschoben ist. Beide Varianten enthalten Aminosäureaustausche, die auch in der Variante RV enthalten sind, der RNase T1 Variante mit der bisher größten Spezifitätsverschiebung, die bisher erreicht worden ist. Die wesentliche Bedeutung des Asparagins in Position 46 konnte hierbei deutlich gemacht werden. Neben diesen Experimenten, die dem rationalen Protein-Design zuzuordnen sind, wurde die Herausforderung einer Spezifitätsänderung der RNase T1 auch mit Methoden des evolutionären Protein-Designs angegangen. Hierbei konnte jedoch keine weitere Verstärkung der Spezifitätsverschiebung erreicht werden, was vornehmlich durch ein nicht ausreichend effizientes *Screening*-Verfahren erklärt werden konnte. Aus diesem Grunde wurde für zukünftige Experimente eine auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie beruhende *Screening*-Methode etabliert, welche unter Verwendung eines neuartigen, sehr einfach bereitzustellenden RNase-Substrates im Mikrotiterplattenmaßstab ein *Screening* von RNase T1-Bibliotheken mit Komplexitäten größer 20000 pro Platte ermöglicht macht.

Die andere Seite dieser Arbeit befasste sich mit der Vorbereitung von Experimenten, in denen die Fähigkeit von Peptiden, durch kovalente Verknüpfung mit Proteinen deren Transport in Zellen zu bewirken, mit Hilfe der RNase T1 untersucht werden soll. Die Aufnahme der Fusionsproteine soll an Säugerzelllinien untersucht werden, wobei die Aufnahme in die Zellen anhand der cytotoxischen Wirkung des RNase detektiert werden soll. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNase T1 alle wichtigen Voraussetzungen erfüllt, um als Modellenzym für diese Anwendungen eingesetzt zu werden: RNase T1 lässt sich auf einfachste Art und Weise spezifisch am N-Terminus durch den Umsatz mit NHS-Estern ohne Aktivitätsverlust modifizieren und kann damit praktisch mit beliebigen kupplungsfähigen Peptidsequenzen verknüpft werden. Die Ribonuclease zeigt bei Zugabe ins Kulturmedium von Säugerzellen auch in sehr hohen Konzentrationen als freies Enzym keinerlei toxische Effekte auf die Zellen. Des Weiteren entgeht RNase T1 einer Hemmung durch den ubiquitär vorhandenen cytosolischen Ribonuclease Inhibitor, da sie von diesem nicht erkannt wird. Und schließlich erfüllt die Ribonuclease auch die wohl wichtigste Voraussetzung für einen Einsatz als Toxin-Komponente in den Fusionsproteinen: In cytosolischer Lokalisation wirkt sie schon in geringen Menge cytostatisch und damit toxisch.

## 6. Literaturverzeichnis

1. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* **138** (1984), 9-37.
2. Schindler, D. G. and Davies, J. E., Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha sarcin. *Nucleic Acids Res* **4** (1977), 1097-1110.
3. Zhu, L. Q., Gangopadhyay, T., Padmanabha, K. P. and Deutscher, M. P., *Escherichia coli* rna gene encoding RNase I: cloning, overexpression, subcellular distribution of the enzyme, and use of an rna deletion to identify additional RNases. *J Bacteriol* **172** (1990), 3146-3151.
4. Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C. and Matsuzaki, T., Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **34** (1995), 15583-15591.
5. Sato, K., Studies on Ribonucleases in Takadiastase II. Specificity of Ribonuclease T1. *J Biochem* **46** (1959), 31.
6. Elela, S. A., Igel, H. and Ares, M., Jr., RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* **85** (1996), 115-124.
7. Boeke, J. D., Reverse transcriptase, the end of the chromosome, and the end of life. *Cell* **61** (1990), 193-195.
8. Carpousis, A. J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C. and Krisch, H. M., Copurification of *E. coli* RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76** (1994), 889-900.
9. D'Alessio, G., Di Donato, A., Mazzarella, L., Piccoli, R., "Seminal ribonuclease: the importance of diversity" in *Ribonucleases: Structures and Functions* (Ed.: D'Alessio, G., Riordan, J. F.), Academic Press, New York (1997), 383-423.
10. Riordan, J. F., "Structure and function of Angiogenin" in *Ribonucleases: Structures and Functions* (Ed.: D'Alessio, G., Riordan, J. F.), Academic Press, New York (1997), 445-489.
11. Olmo, N., Turnay, J., Gonzalez de Buitrago, G., Lopez de Silanes, I., Gavilanes, J. G. and Lizarbe, M. A., Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem* **268** (2001), 2113-2123.
12. Heinemann, U. and Hahn, U., "Structural and functional studies of ribonuclease T1" in *Protein-Nucleic Acid Interaction* (Ed.: Saenger, W. and Heinemann, U.), Maximillan Press, London (1989), 111-141.
13. Steyaert, J., A decade of protein engineering on ribonuclease T1 - atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur J Biochem* **247** (1997), 1-11.

14. Sato, K. and Egami, F., Studies on ribonucleases in Takadiastase. *J Biochem* *44* (1957), 753-767.
15. Takahashi, K., Moore, S., "Nucleic Acids" in *The Enzymes XV* (Ed.: Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K.), Academic Press, New York (1982), 435-468.
16. Heinemann, U. and Saenger, W., Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanlic acid complex: an X-ray study. *Nature* *299* (1982), 27-31.
17. Takahashi, K., Chemical structure of ribonuclease T1 - elucidation of its complete amino acid sequence. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* *10* (1965), 1277-1293.
18. Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blöcker, H. and Hahn, U., Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem.* *173* (1988), 617-622.
19. Quaas, R., Grunert, H.-P., Kimura, M. and Hahn, U., Expression of Ribonuclease T1 in *Escherichia coli* and rapid purification of the enzyme. *Nucleosides & Nucleotides* *7* (1988), 619-623.
20. Arni, R. K., Pal, G. P., Ravichandran, K. G., Tulinsky, A., Walz, F. G., Jr. and Metcalf, P., Three-dimensional structure of Gln25-ribonuclease T1 at 1.84-Å resolution: structural variations at the base recognition and catalytic sites. *Biochemistry* *31* (1992), 3126-3135.
21. Martinez-Oyanedel, J., Choe, H. W., Heinemann, U. and Saenger, W., Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* *222* (1991), 335-352.
22. Arni, R. K., Heinemann, U., Tokuoka, R. and Saenger, W., Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9 Å resolution. *J Biol Chem* *263* (1988), 15358-15368.
23. Arni, R. K., Watanabe, L., Ward, R. J., Kreitman, R. J., Kumar, K. and Walz, F. G., Jr., Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with an isosteric phosphate substrate analogue of GpU: alternate substrate binding modes and catalysis. *Biochemistry* *38* (1999), 2452-2461.
24. Koepke, J., Maslowska, M., Heinemann, U. and Saenger, W., Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with guanylyl-2',5'-guanosine at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* *206* (1989), 475-488.
25. Hoschler, K., Hoier, H., Hubner, B., Saenger, W., Orth, P. and Hahn, U., Structural analysis of an RNase T1 variant with an altered guanine binding segment. *J Mol Biol* *294* (1999), 1231-1238.
26. Koellner, G., Grunert, H. P., Landt, O. and Saenger, W., Crystal structure of the Tyr45Trp mutant of ribonuclease T1 in a complex with 2'-adenylic acid. *Eur J Biochem* *201* (1991), 199-202.
27. Pletinckx, J., Steyaert, J., Zegers, I., Choe, H. W., Heinemann, U. and Wyns, L., Crystallographic study of Glu58Ala RNase T1 x 2'-guanosine monophosphate at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* *33* (1994), 1654-1662.

28. Heydenreich, A., Koellner, G., Choe, H. W., Cordes, F., Kisker, C., Schindelin, H., Adamiak, R., Hahn, U. and Saenger, W., The complex between ribonuclease T1 and 3'GMP suggests geometry of enzymic reaction path. An X-ray study. *Eur J Biochem* **218** (1993), 1005-1012.
29. Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L. and Stanssens, P., Histidine-40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalytic base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry* **29** (1990), 9064-9072.
30. Grunert, H. P., Zouni, A., Beineke, M., Quaas, R., Georgalis, Y., Saenger, W. and Hahn, U., Studies on RNase T1 mutants affecting enzyme catalysis. *Eur J Biochem* **197** (1991), 203-207.
31. Backmann, J., Doray, C. C., Grunert, H.-P., Landt, O. and Hahn, U., Extended kinetic analysis of ribonuclease T1 variants leads to an improved scheme for the reaction mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **199** (1994), 213-219.
32. Heinemann, U. and Saenger, W., Crystallographic study of mechanism of ribonuclease T1-catalysed specific RNA hydrolysis. *J Biomol Struct Dyn* **1** (1983), 523-538.
33. Simoncsits, A., Brownlee, G. G., Brown, R. S., Rubin, J. R. and Guilley, H., New rapid gel sequencing method for RNA. *Nature* **269** (1977), 833-836.
34. Donis-Keller, H., Maxam, A. M. and Gilbert, W., Mapping adenines, guanines, and pyrimidines in RNA. *Nucleic Acids Res* **4** (1977), 2527-2538.
35. Sayer, N., Ibrahim, J., Turner, K., Tahiri-Alaoui, A. and James, W., Structural characterization of a 2'F-RNA aptamer that binds a HIV-1 SU glycoprotein, gp120. *Biochem Biophys Res Commun* **293** (2002), 924-931.
36. Hubner, B., Haensler, M. and Hahn, U., Modification of ribonuclease T1 specificity by random mutagenesis of the substrate binding segment. *Biochemistry* **38** (1999), 1371-1376.
37. Sieber, V., Pluckthun, A. and Schmid, F. X., Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat Biotechnol* **16** (1998), 955-960.
38. Balbach, J., Steegborn, C., Schindler, T. and Schmid, F. X., A protein folding intermediate of ribonuclease T1 characterized at high resolution by 1D and 2D real-time NMR spectroscopy. *J Mol Biol* **285** (1999), 829-842.
39. Qu, Y. and Bolen, D. W., Efficacy of macromolecular crowding in forcing proteins to fold. *Biophys Chem* **101-102** (2002), 155-165.
40. Walz, F. G., Jr., Osterman, H. L. and Libertin, C., Base-group specificity at the primary recognition site of ribonuclease T for minimal RNA substrates. *Arch Biochem Biophys* **195** (1979), 95-102.
41. Osterman, H. L. and Walz, F. G., Jr., Subsite interactions and ribonuclease T1 catalysis: kinetic studies with ApGpC and ApGpU. *Biochemistry* **18** (1979), 1984-1988.

42. Granzin, J., Puras-Lutzke, R., Landt, O., Grunert, H. P., Heinemann, U., Saenger, W. and Hahn, U., RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'GMP and 2'AMP at the 3' subsite. *J Mol Biol* 225 (1992), 533-542.
43. Hirono, S. and Kollman, P. A., Relative binding free energy calculations of inhibitors to two mutants (Glu46-Ala/Gln) of ribonuclease T1 using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *Protein Eng* 4 (1991), 233-243.
44. Kumar, K. and Walz, F. G., Jr., Probing functional perfection in substructures of ribonuclease T1: double combinatorial random mutagenesis involving Asn43, Asn44, and Glu46 in the guanine binding loop. *Biochemistry* 40 (2001), 3748-3757.
45. Czaja, R., Struhalla, M., Saenger, W., Strater, N., Hahn, U., RNase T1 variant RV cleaves single stranded RNA after purines due to specific recognition by the Asn46 amide. *J Mol Biol* (eingereicht).
46. Smith, G. P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228 (1985), 1315-1317.
47. Hanes, J. and Pluckthun, A., *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), 4937-4942.
48. Stemmer, W. P., Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370 (1994), 389-391.
49. Stemmer, W. P., DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), 10747-10751.
50. Demartis, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G. and Neri, D., A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *J Mol Biol* 286 (1999), 617-633.
51. Pedersen, H., Holder, S., Sutherlin, D. P., Schwitter, U., King, D. S. and Schultz, P. G., A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), 10523-10528.
52. Forrest, S., Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation. *Science* 261 (1993), 872-878.
53. Zhang, J. H., Dawes, G. and Stemmer, W. P., Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), 4504-4509.
54. Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C. and Johnsson, K., Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 39 (2000), 10790-10798.
55. Yano, T., Oue, S. and Kagamiyama, H., Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), 5511-5515.

56. Williams, G. J., Domann, S., Nelson, A. and Berry, A., Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003), 3143-3148.
57. Wang, L. J., Kong, X. D., Zhang, H. Y., Wang, X. P. and Zhang, J., Enhancement of the activity of l-aspartase from *Escherichia coli* W by directed evolution. *Biochem Biophys Res Commun* **276** (2000), 346-349.
58. Oh, K. H., Nam, S. H. and Kim, H. S., Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamyl-d-amino Acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng* **15** (2002), 689-695.
59. Wang, J. D., Herman, C., Tipton, K. A., Gross, C. A. and Weissman, J. S., Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell* **111** (2002), 1027-1039.
60. Leong, S. R., Chang, J. C., Ong, R., Dawes, G., Stemmer, W. P. and Punnonen, J., Optimized expression and specific activity of IL-12 by directed molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (2003), 1163-1168.
61. Magde, D., Elson, E. L. and Webb, W. W., Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* **13** (1974), 29-61.
62. Ehrenberg, M. and Rigler, R., Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. *Q Rev Biophys* **9** (1976), 69-81.
63. Azoulay, J., Clamme, J. P., Darlix, J. L., Roques, B. P. and Mely, Y., Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *J Mol Biol* **326** (2003), 691-700.
64. Kinjo, M. and Rigler, R., Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Res* **23** (1995), 1795-1799.
65. Schurer, H., Buchynskyy, A., Korn, K., Famulok, M., Welzei, P. and Hahn, U., Fluorescence correlation spectroscopy as a new method for the investigation of aptamer/target interactions. *Biol Chem* **382** (2001), 479-481.
66. Kohl, T., Heinze, K. G., Kuhlemann, R., Koltermann, A. and Schwille, P., A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2002), 12161-12166.
67. Kettling, U., Koltermann, A., Schwille, P. and Eigen, M., Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (1998), 1416-1420.
68. Oehlenschläger, F., Schwille, P. and Eigen, M., Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996), 12811-12816.
69. Pitschke, M., Prior, R., Haupt, M. and Riesner, D., Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* **4** (1998), 832-834.

70. Licht, S. S., Sonnleitner, A., Weiss, S. and Schultz, P. G., A rugged energy landscape mechanism for trapping of transmembrane receptors during endocytosis. *Biochemistry* **42** (2003), 2916-2925.
71. Pick, H., Preuss, A. K., Mayer, M., Wohland, T., Hovius, R. and Vogel, H., Monitoring expression and clustering of the ionotropic 5HT3 receptor in plasma membranes of live biological cells. *Biochemistry* **42** (2003), 877-884.
72. Rarbach, M., Kettling, U., Koltermann, A. and Eigen, M., Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for monitoring the kinetics of enzyme-catalyzed reactions. *Methods* **24** (2001), 104-116.
73. Korn, K., Aktivitätsnachweis Ribonuclease-präsentierender Phagen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (1999). Dissertation, Universität Leipzig.
74. Korn, K., Wennmalm, S., Foerster, H. H., Hahn, U. and Rigler, R., Analysis of the RNase T1 mediated cleavage of an immobilized gapped heteroduplex via fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* **381** (2000), 259-263.
75. Rybak, S. M., Saxena, S. K., Ackerman, E. J. and Youle, R. J., Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *J Biol Chem* **266** (1991), 21202-21207.
76. Konisky, J. and Nomura, M., Interaction of colicins with bacterial cells. II. Specific alteration of *Escherichia coli* ribosomes induced by colicin E3 *in vivo*. *J Mol Biol* **26** (1967), 181-195.
77. de Graaf, F. K., Niekus, H. G. and Klootwijk, J., Inactivation of bacterial ribosomes *in vivo* and *in vitro* by cloacin DF13. *FEBS Lett* **35** (1973), 161-165.
78. Endo, Y. and Wool, I. G., The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem* **257** (1982), 9054-9060.
79. Vogelzang, N. J., Aklilu, M., Stadler, W. M., Dumas, M. C. and Mikulski, S. M., A phase II trial of weekly intravenous ranpirnase (Onconase), a novel ribonuclease in patients with metastatic kidney cancer. *Invest New Drugs* **19** (2001), 255-260.
80. Irie, M., Nitta, K. and Nonaka, T., Biochemistry of frog ribonucleases. *Cell Mol Life Sci* **54** (1998), 775-784.
81. Darzynkiewicz, Z., Carter, S. P., Mikulski, S. M., Ardelt, W. J. and Shogen, K., Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet* **21** (1988), 169-182.
82. Youle, R. J., Wu, Y. N., Mikulski, S. M., Shogen, K., Hamilton, R. S., Newton, D., D'Alessio, G. and Gravell, M., RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), 6012-6016.
83. Ardelt, W., Vidunas, E., Saxena, S., Lee, H.S, Saxena, A., Viera, A., Shogen, K., A novel cytotoxic Ribonuclease from amphibian oocytes. Sixth international Meeting on Ribonucleases. **2002**. Bath, UK.

84. Lee, F. S., Fox, E. A., Zhou, H. M., Strydom, D. J. and Vallee, B. L., Primary structure of human placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* 27 (1988), 8545-8553.
85. Leland, P. A., Schultz, L. W., Kim, B. M. and Raines, R. T., Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), 10407-10412.
86. Pastan, I. I. and Kreitman, R. J., Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 31 (1998), 53-88.
87. Rybak, S. M. and Newton, D. L., Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp Cell Res* 253 (1999), 325-335.
88. Psarras, K., Ueda, M., Yamamura, T., Ozawa, S., Kitajima, M., Aiso, S., Komatsu, S. and Seno, M., Human pancreatic RNase1-human epidermal growth factor fusion: an entirely human 'immunotoxin analog' with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas. *Protein Eng* 11 (1998), 1285-1292.
89. Futami, J., Seno, M., Ueda, M., Tada, H. and Yamada, H., Inhibition of cell growth by a fused protein of human ribonuclease 1 and human basic fibroblast growth factor. *Protein Eng* 12 (1999), 1013-1019.
90. De Lorenzo, C., Nigro, A., Piccoli, R. and D'Alessio, G., A new RNase-based immun-conjugate selectively cytotoxic for ErbB2-overexpressing cells. *FEBS Lett* 516 (2002), 208-212.
91. Rybak, S., Newton, D., Shoge, K., Mikulski, S., Sausville, E., RN321: Onconase based targeted therapeutic. Sixth International Meeting on Ribonucleases. 2002. Bath, UK.
92. Gesteland, R. F., Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 16 (1966), 67-84.
93. Biedler, J. L., Helson, L. and Spengler, B. A., Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33 (1973), 2643-2652.
94. Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Msau, Y. and Inouye, M., Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *EMBO J* 3 (1984), 2437-2442.
95. delCardayre, S. B., Ribo, M., Yokel, E. M., Quirk, D. J., Rutter, W. J. and Raines, R. T., Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng* 8 (1995), 261-273.
96. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 (1986), 263-273.
97. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988), 487-491.
98. Cadwell, R. C. and Joyce, G. F., Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl* 3 (1994), S136-140.

99. Cadwell, R. C. and Joyce, G. F., Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* 2 (1992), 28-33.
100. Landt, O., Grunert, H.-P. and Hahn, U., A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96 (1990), 125-128.
101. Taketo, A., DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta* 949 (1988), 318-324.
102. Birnboim, H. C. and Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (1979), 1513-1523.
103. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Ed.: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1989)),
104. Berthram, S. and Gassen, H. G., *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (Ed.: Gustav Fischer Verlag, Jena (1991)),
105. Sharp, P. A., Sugden, B. and Sambrook, J., Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12 (1973), 3055-3063.
106. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual* (Ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)),
107. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1977), 5463-5467.
108. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), 680-685.
109. Weber, K. and Osborn, M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244 (1969), 4406-4412.
110. Edelhoch, H., Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6 (1967), 1948-1954.
111. Quaas, R., Landt, O., Grunert, H.-P., Beineke, M. and Hahn, U., Indicator plates for rapid detection of ribonuclease T1 secreting *Escherichia coli* clones. *Nucleic Acids Res* 17 (1989), 3318.
112. Anfinsen, C. B., Redfield, R. R., Choate, W. L., Page, J. and Carroll, W. R., Studies on the cross structure, cross-linkages and terminal sequences in ribonuclease. *J Biol Chem* 207 (1954), 201-210.
113. Bravo, J., Fernandez, E., Ribo, M., de Llorens, R. and Cuchillo, C. M., A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal Biochem* 219 (1994), 82-86.
114. Zabinski, M. and Walz, F. G., Jr., Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T: kinetic studies using GpC and GpU as substrates. *Arch Biochem Biophys* 175 (1976), 558-564.

115. Imazawa, M., Irie, M. and Ukita, T., Substrate specificity of ribonuclease from *Aspergillus saitoi*. *J Biochem (Tokyo)* 64 (1968), 595-602.
116. Henning, N., *Klinische Laboratoriumsdiagnostik* (Ed.: München (1996)),
117. Felgner, P. L. and Ringold, G. M., Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337 (1989), 387-388.
118. Duzgunes, N. and Felgner, P. L., Intracellular delivery of nucleic acids and transcription factors by cationic liposomes. *Methods Enzymol* 221 (1993), 303-306.
119. Struhalla, M., Czaja, R., Hahn, U., Addressing the Challenge of Changing the Specificity of RNase T1 with Rational and Evolutionary Approaches. *Chem Bio Chem* (eingereicht).
120. Grunert, H. P., Landt, O., Zirpel-Giesebrecht, M., Backmann, J., Heinemann, U., Saenger, W. and Hahn, U., Trp59 to Tyr substitution enhances the catalytic activity of RNase T1 and of the Tyr to Trp variants in positions 24, 42 and 45. *Protein Eng* 6 (1993), 739-744.
121. Nishikawa, S., Morioka, H., Kimura, T., Ueda, Y., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E. and Ikehara, M., Increase in nucleolytic activity of ribonuclease T1 by substitution of tryptophan 45 for tyrosine 45. *Eur J Biochem* 173 (1988), 389-394.
122. Subbarayan, P. R. and Deutscher, M. P., Escherichia coli RNase M is a multiply altered form of RNase I. *Rna* 7 (2001), 1702-1707.
123. Kelemen, B. R., Klink, T. A., Behlke, M. A., Eubanks, S. R., Leland, P. A. and Raines, R. T., Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Res* 27 (1999), 3696-3701.
124. Zuker, M., On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244 (1989), 48-52.
125. Langer, M., Kratz, F., Rothen-Rutishauser, B., Wunderli-Allenspach, H. and Beck-Sickinger, A. G., Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy. *J Med Chem* 44 (2001), 1341-1348.
126. Machova, Z., Muhle, C., Krauss, U., Trehin, R., Koch, A., Merkle, H. P. and Beck-Sickinger, A. G., Cellular internalization of enhanced green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *Chembiochem* 3 (2002), 672-677.
127. Lee, F. S., Shapiro, R. and Vallee, B. L., Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* 28 (1989), 225-230.
128. Wu, Y., Mikulski, S. M., Ardelt, W., Rybak, S. M. and Youle, R. J., A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem* 268 (1993), 10686-10693.
129. Takahashi, K., The structure and function of ribonuclease T1. XXIII. Inactivation of ribonuclease T1 by reversible blocking of amino groups with cis-aconitic anhydride and related dicarboxylic acid anhydrides. *J Biochem (Tokyo)* 81 (1977), 641-646.



## **Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Ulrich Hahn für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Hahn für die freundliche und freie Arbeitsatmosphäre, die stetige Unterstützung und die fachlichen Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Thomas Greiner-Stöflele möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die vielen Ideen zur Lösung wissenschaftlicher Probleme bedanken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei ihm für das geflissentliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Eberhard Reddig danke ich für das Wecken einer Begeisterung für das „richtige“ Fach und für seine Beteiligung an entscheidenden Weichenstellungen.

Bei Frau Brigitte Wolff bedanke ich mich für die zuverlässige Hilfe bei allen Arten von Sequenzierungen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts, „meinen“ Diplomanden und „HiWis“ so wie allen Doktoranden, mit denen ich zusammen in einem Labor gearbeitet habe, für die freundschaftliche Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die stetige Unterstützung jeder Art während meines Studiums und dieser Dissertation. Sie waren für mich immer der Rückhalt, den man sich wünschen würde.

Ein kleiner Dank geht an meine Tochter Nele, weil ein kleines Lächeln oft mehr motiviert als tausend gut gemeinte Worte.

Nicht zuletzt gehört mein besonderer Dank meiner Verlobten Kathrin Hesselbarth. Ihre moralische Unterstützung und ihre Geduld mit mir, sind wohl gegen nichts aufzuwiegen.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet.

Hamburg, den 26.05.2003

Marc Struhalla