

Synthetische Biologie – Ein Beispiel für Zukunftsmusik

Vorwort

Wer kennt folgendes Problem bei der Speicherung digitaler Daten nicht: Die Speicherkarte ist voll, keine fortlaufende Stromversorgung ist gewährleistet und das Laden der großen Datenmengen raubt die letzten Zeitreserven des Tages. Aber wohin mit den weltweit kursierenden drei Zettabyte ($3 \cdot 10^{21}$ Byte) an digitalen Daten?

Eine zurzeit diskutierte Lösungsvariante bietet die *Synthetische Biologie*. Genforscher des „European Molecular Biology Laboratory“ haben 154 Shakespeare-Sonette, sowie Teile der Martin Luther King-Rede "I have a dream" auf DNA gespeichert, wodurch 739 kB fehlerfrei, ohne Stromversorgung und mit riesigem Speicherpotenzial ewig haltbar und zugreifbar gemacht wurden.

Im Groben basierend auf den Naturwissenschaften Biologie, Chemie und Ingenieurwesen befasst sich die *Synthetische Biologie* mit dem Design von künstlichen, biochemischen Systemen mit neuen nützlichen und der Natur abgeleiteten Eigenschaften.

Als Beispiel in der roten Biotechnologie ist die Entwicklung von sogenannten „Anticalinen“ zu nennen. Dies sind Proteine, dessen Bindeeigenschaften von ihrem Vorbild - dem Antikörper, abgeleitet wurden. Anticaline können nützlichere Eigenschaften als die genannten Antikörper aufweisen und sind mittlerweile so weit entwickelt das sie in klinischen Studien an Patienten getestet werden.

Der studentische Wettbewerb iGEM

Der „*internationally Genetical Engineered Machines*“ Wettbewerb (iGEM) stellt einen weltweiten Studentenwettbewerb im Bereich der *Synthetischen Biologie* dar, der im Jahre 2004, ursprünglich nur für amerikanische Universitäten, vom MIT ins Leben gerufen wurde. Binnen eines halben Jahres arbeiten Studenten an einem von ihnen entwickelten Projekt, das im Rahmen der *Synthetischen Biologie* dem Zweck einer Problemlösung in verschiedenen Bereichen (z.B. Gesundheit, Medizin und Umwelt) dient. Neben der rein molekularbiologischen Arbeit werden vor allem auch Kategorien wie das Design der ebenfalls zu erstellenden Projektinternetseite zur Präsentation der Idee und der Ergebnisse des Projektes, die Kollaboration zwischen den Universitäten, oder der Human Practice Gedanke von einer internationalen Jury aus Wissenschaftlern beim Vorentscheid auf Kontinentalebene und beim Weltentscheid am Massachusetts Institute of Technology, kurz MIT, in Boston bewertet.

Unser Projekt

„*Physco Filter - clean different*“ lautet der Projekttitel des diesjährigen iGEM Teams der Technischen Universität München. Das Ziel ist das Moos (*Physcomitrella patens*) gentechnisch derart zu verändern, dass man es als Wasserfilter nutzen kann, der gezielt gewünschte Zielmoleküle bindet (Bioakkumulation) oder abbaut (Biodegradation), um dadurch eine biologische Lösungsvariante für die weltweite Wasserverschmutzung zu konstruieren. Durch künstliche Veränderung des Genoms des Moooses, unter Konstruktion und Einbau sogenannter Biobricks (Genbausteine), bildet das Moos Proteine mit denen Schadstoffe, wie Hormone, Antibiotika, oder phenolische Substanzen abgebaut oder gebunden werden. Nähere Informationen zu unserem Projekt erhalten Sie auf unserer Internetpräsenz:

www.2013.iGEM.org/Team:TU-Munich

Ziel des Educational Kits für „Synthetische Biologie an Schulen“

Um den Schülern einen praktischen und motivierenden Einblick in die Welt der *Synthetischen Biologie* zu geben, finden Sie in den experimentellen Anleitungen auf den folgenden Seiten detaillierte Beschreibungen für die Produktion von farbigen, leuchtenden und nach Bananenduft riechenden Bakterien. Dazu werden genetisch veränderten Expressions-Plasmiden, die von den Schülern selbst in einen *Escherichia coli* Bakterienstamm transformiert, die gentechnisch veränderten Bakterien isoliert, vermehrt und mit ihnen zugegebene Substrate umgesetzt. Die Schüler sollen somit den gesamten praktischen Pfad von der Transformation der Bakterien bis hin zur Substratumsetzung kennen lernen.

Auf den folgenden Seiten finden Sie zur Heranführung der Schüler an die Grundlagen der Molekularbiologie eine kleine inhaltliche Einführung und zur Durchführung aller Experimente sämtliche Protokolle. Die Experimentreihenfolge sollte eingehalten werden, um den didaktischen Nährwert des Educational Kits voll aus zu schöpfen!

1. Grundlagen der Molekularbiologie

Woraus besteht unsere Erbsubstanz?

Unsere Erbsubstanz besteht aus Nucleinsäuren, die eine zentrale Rolle bei der Speicherung genetischer Information hat und für die Expression, also die Herstellung von Proteinen, zuständig ist. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen an Nucleinsäuren, nämlich Ribonucleinsäuren (RNA) und Desoxyribonucleinsäuren (DNA). Die DNA hat die Hauptaufgabe der Speicherung der Erbinformation, wohingegen die RNA hauptsächlich als Zwischenschritt zur Produktion von Proteinen beteiligt ist.

RNA wie auch DNA sind aus Nucleotiden aufgebaut, die wiederum aus einem bis drei Phosphatresten, einem Zuckerbaustein und einer Base bestehen. Die RNA und DNA unterscheiden sich jeweils in einer Base und dem Zucker, der die Base und den Phosphatrest miteinander verbindet, wie man in Abbildung 1 sehen kann. Der Zucker nennt sich bei der DNA Desoxyribose und bei der RNA Ribose. Weiter beinhaltet die DNA die Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) wohingegen die RNA die Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Uracil (U) nutzt. Alle verwendeten Basen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die RNA enthält im Gegensatz zur DNA somit die Base Uracil (U) anstatt Thymin (T).

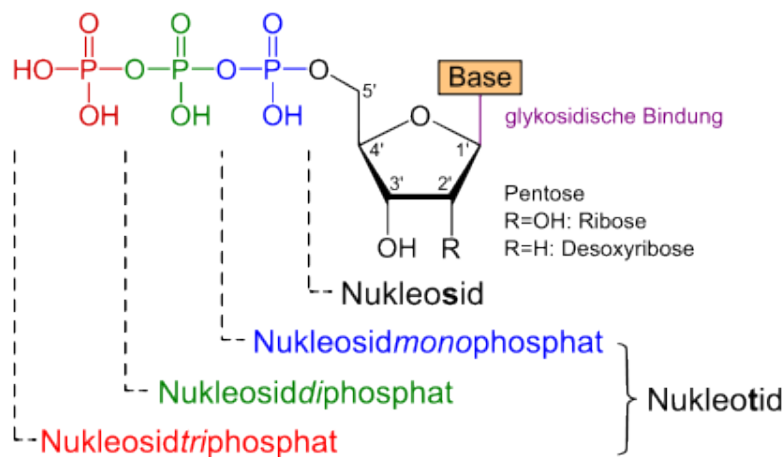


Abbildung 1: Aufbau Nucleotide¹

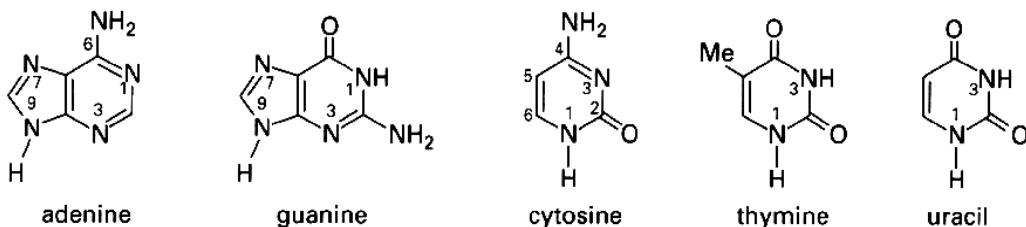


Abbildung 2: Basen der DNA und RNA²

¹ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nucleotide_nucleoside_general.svg

² http://www.guidobauersachs.de/genetik/base_num2.gif

Warum sind DNA und RNA unterschiedlich aufgebaut?

Durch die Verwendung von Thymin anstatt von Uracil, wird ein zusätzlicher Reparaturmechanismus der DNA gesichert. Weiter ist der verwendete Zuckerbaustein Desoxyribose in der DNA um einiges unempfindlicher als die Ribose der RNA. Durch diese Gegebenheiten ist die DNA um einiges stabiler aufgebaut als die RNA. Diese zusätzliche Stabilität macht die DNA unempfindlicher gegenüber Umwelteinflüssen und Mutationen. Die DNA dient dem Erhalt der in unseren Zellen gespeicherten Erbinformation und sichert somit das Überleben jedes einzelnen von uns.

DNA und RNA bestehen jeweils aus insgesamt vier unterschiedlichen Basen. Beide Nukleinsäuren liegen als Polymere, also als eine Verkettung der jeweiligen aus den vier Basen gebildeten Nukleotide, vor. Um ein Gefühl für die Polymerlänge der Erbinformation von Organismen zu bekommen, nenne ich die des Menschen. Die Erbinformation des Menschen ist eine Verkettung von circa drei Milliarden DNA-Basen, die auf insgesamt 46 Abschnitte, den so genannten Chromosomen, verteilt ist. In Abbildung 3 ist die lineare Verknüpfung von DNA-Basen dargestellt, in Abbildung 4 die Verknüpfung von RNA-Basen.

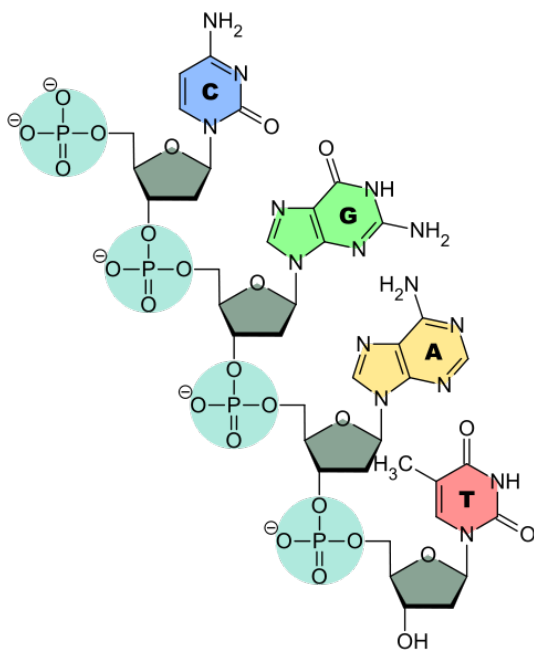


Abbildung 3: Verknüpfung Basen DNA³

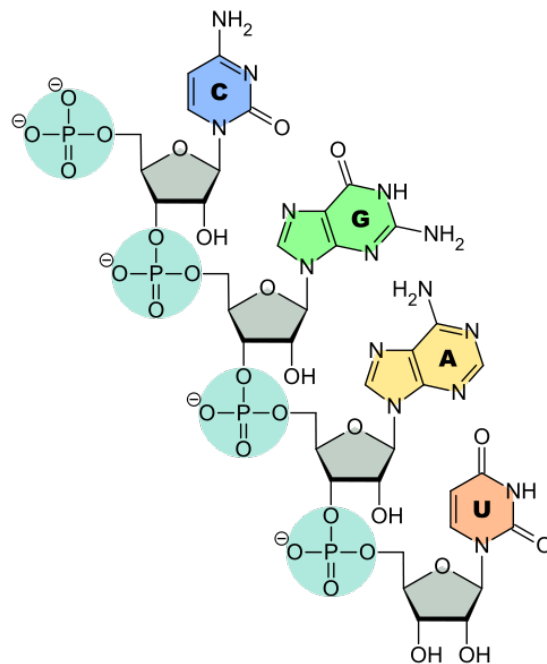


Abbildung 4: Verknüpfung Basen RNA⁴

Durch die Unterschiede der DNA und RNA bilden beide Nukleinsäurepolymere unterschiedliche 3D - Raumstrukturen im nativen, dem natürlichen, Zustand aus. Die DNA besteht im intakten, dem nativen, Zustand aus zwei jeweils antiparallel verlaufenden, zueinander komplementär gepaarten linearen Strängen, wobei jede Base eine andere Base des komplementären Stranges als festen Bindungspartner aufweist. Die Bindung der Bindungspartner erfolgt über nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen (WSBB). Bei der DNA sind jeweils A zu T und C zu G zueinander komplementär. Die RNA liegt meistens als Einzelstrang vor, wobei auch hier das Basenpaar C-G und

³ <http://de.wikipedia.org/wiki/Nukleinsäure>

⁴ <http://de.wikipedia.org/wiki/Ribonukleinsäure>

im Gegensatz zur DNA A-U miteinander eine Bindung miteinander eingehen können. Die Sicherstellung, dass die Basen nur in der genannten Art und Weise miteinander Basenpaarungen eingehen können, wird dadurch realisiert das zwischen Adenin und Thymin, beziehungsweise Adenin und Uracil nur zwei WSBB und zwischen Cytosin und Guanin 3 WSBB ausgebildet werden.

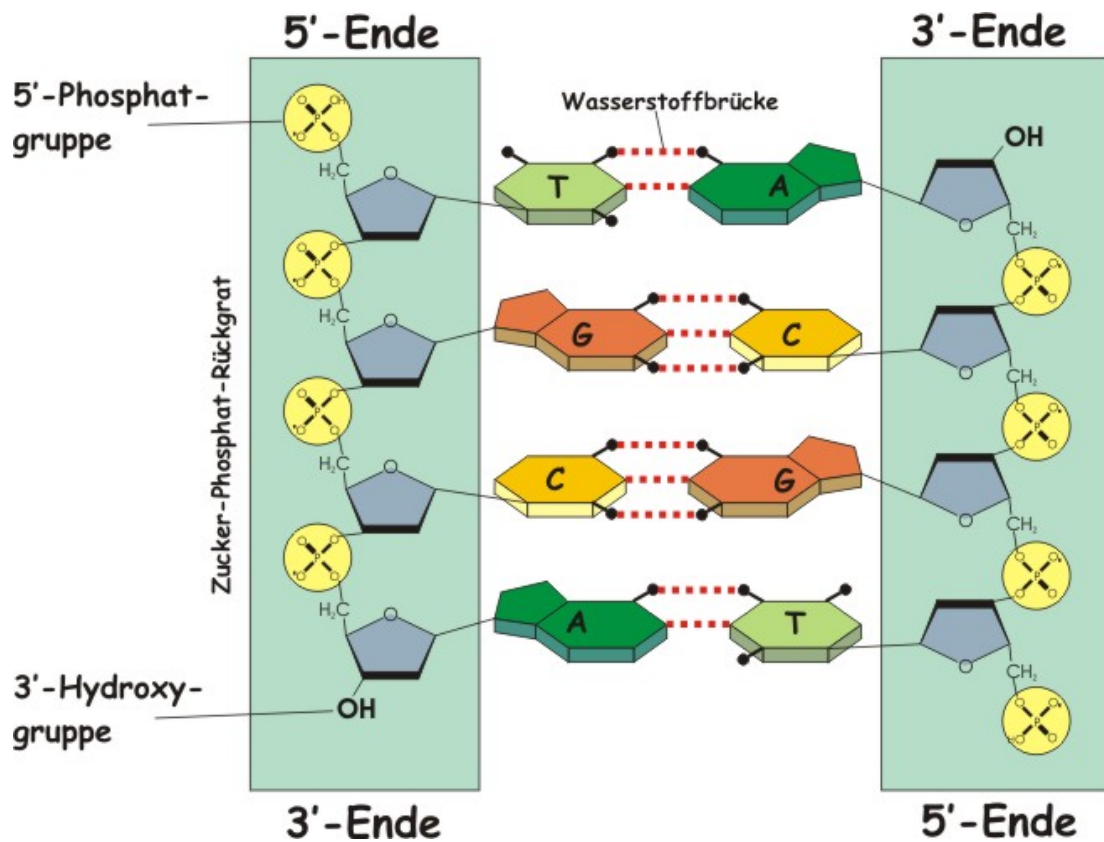


Abbildung 5: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basen⁵

Bei gepaarten, wie auch bei ungepaarten RNA- und DNA-Einzelsträngen liegt eine Polarität vor, aus der sich eine Nomenklatur ergibt, die den Start eines DNA-, beziehungsweise RNA-Einzelstranges, mit 5' und das Ende mit 3' bezeichnet. Ein gepaarter RNA- beziehungsweise DNA-Doppelstrang besteht aus jeweils zwei invers gepaarten RNA- beziehungsweise DNA-Einzelsträngen. Die doppelsträngige RNA, beziehungsweise DNA bildet durch ihre physikochemischen Eigenschaften eine RNA- beziehungsweise DNA-Doppelhelix aus, die zusätzliche Stabilität generiert.

Die RNA weist im Gegensatz zur DNA eine Vielzahl an unterschiedlichen Aufgaben in der Zelle auf. Diese erstrecken sich von der Funktion als Intermediat während der Proteinbiosynthese, bis zur katalytisch aktiven Proteinbildungsmaschinerie. Im Gegensatz zur DNA ist die RNA um einiges anfälliger für den Abbau, da eine zusätzliche -OH Gruppe des Zuckerbausteins Ribose der RNA, im Gegensatz zum Zuckerbaustein Desoxyribose der DNA, ihre Hydrolyseanfälligkeit durch basische Lösungen steigert. In Abbildung 6 sind alle der DNA und RNA zugehörigen Basen und die Doppelhelix- bzw die Einzelstrangmorphologie dargestellt.

⁵ <http://www.guidobauersachs.de/bio-ecke.html>

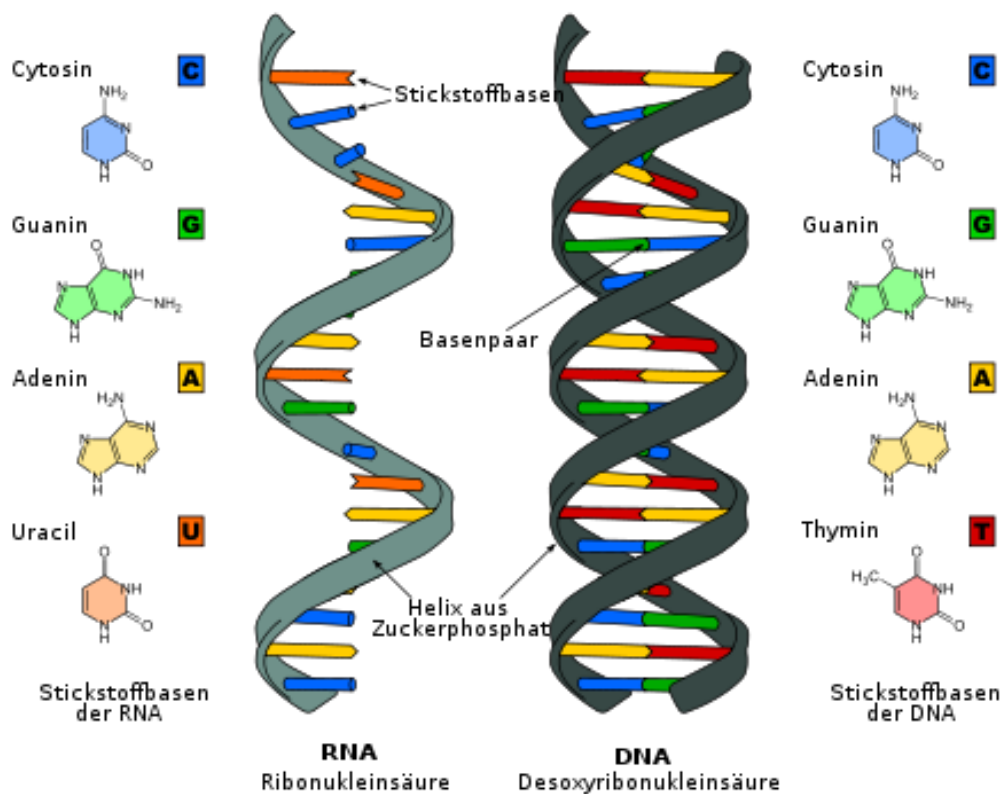


Abbildung 6: Vergleiche RNA und DNA⁶

Was ist ein Protein und wie ist es aufgebaut?

Jeder lebende Organismus enthält eine unglaubliche Anzahl an verschiedenen Proteinen mit verschiedensten Aufgaben, die vom Sauerstofftransport im Blut, bis zur Abwehr von Krankheitserregern und zur Sicherstellung der Bewegung jedes einzelnen Muskels in jedem Organismus reichen.

Proteine bestehen aus einem Polymer von Aminosäuren, bei dem die Monomere über eine so genannte Peptidbindung kovalent miteinander verbunden sind. Es gibt insgesamt 20 natürliche Aminosäuren, die jeweils verschiedenste physikochemische Eigenschaften besitzen. Manche haben ein größeres Volumen als andere, oder sind chemisch gesehen sauer, andere basisch. Durch diese unheimliche Variabilität in den Eigenschaften der Aminosäuren und deren, je nach Protein, spezifische Aneinanderreichungen ergeben sich für jedes Protein wiederum spezifische Eigenschaften, wie die 3D-Faltung und der vielfach daraus resultierenden Aufgaben von Proteinen.

⁶ www.Scienceprofonline.com

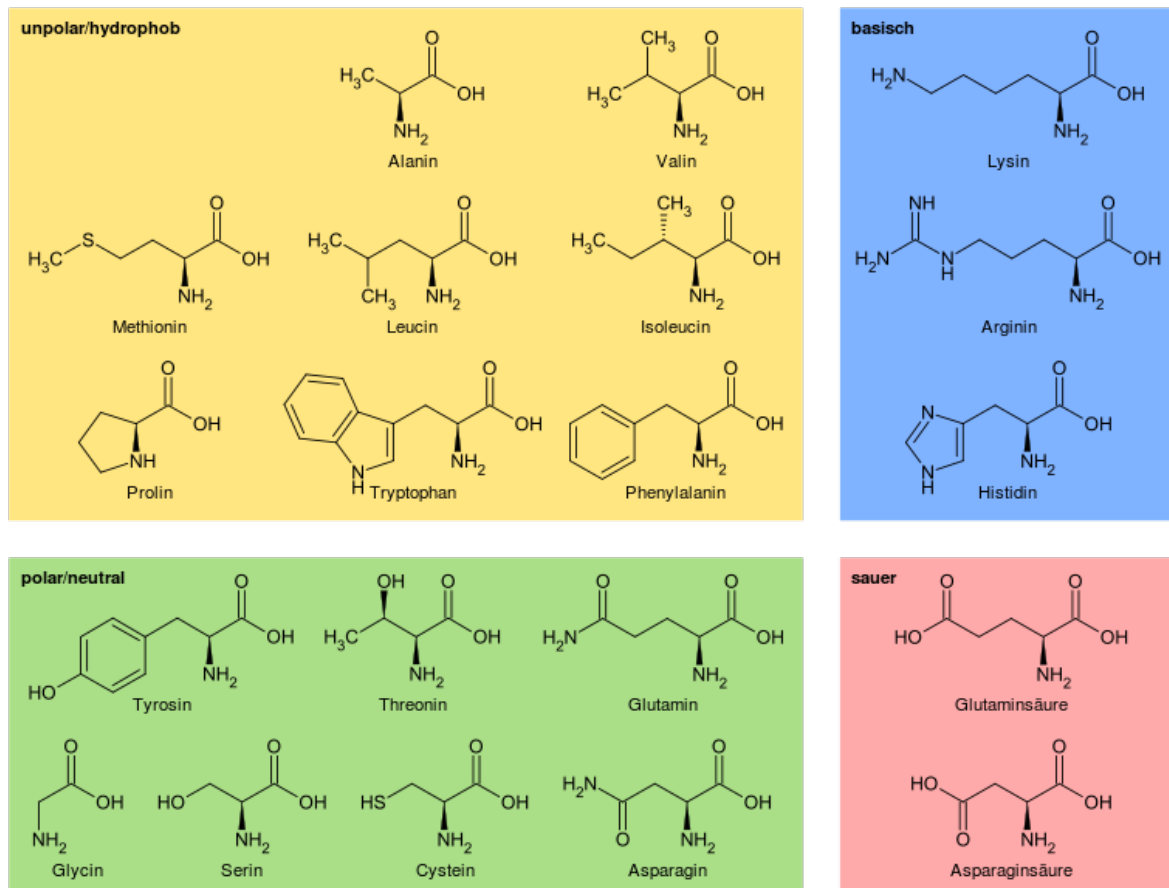


Abbildung 7: Übersicht aller 20 proteinogenen Aminosäuren⁷

Der Aufbau von Proteinen wird in verschiedenen hierarchisch geordneten Stufen beschrieben. Die erste dieser Stufen ist die Primärstruktur, die die lineare Aneinanderreihung von Aminosäuren beschreibt. Die zweite Stufe ist die Sekundärstruktur, die die spezifische Ausbildung von Strukturmotiven beschreibt. Zu den Strukturmotiven gehören grob unterteilt die Helix, das β -Faltblatt und Schleifen. Die Helix stellt das auffälligste Strukturmerkmal in Proteinen dar und beschreibt die schraubenförmige Anordnung der Aminosäuren in der Primärstruktur. Sie kann rechts- und linksdrehend vorkommen und wird in Abhängigkeit davon mit dem Präfix Alpha oder Beta versehen. Das Faltblatt beschreibt die regelmäßige Anordnung von Aminosäuren, gemäß eines gefalteten Papierblattes. Auch hier können die Faltblätter in paralleler oder antiparalleler Gestalt vorkommen, die wiederum mit Alpha und Beta unterschieden werden. Schleifen, so genannte Turns, beschreiben die Richtungsänderung der Aminosäuresequenz in einem Protein. Die Tertiärstruktur eines Proteins bezeichnet die Zusammenlagerung von Sekundärstrukturmerkmalen, die Quartärstruktur die Zusammenlagerung mehrerer Proteinuntereinheiten, die als Tertiärstruktur vorliegen. Ein sehr prominentes Beispiel für ein Protein das eine Quartärstruktur aufweist, ist das Hämoglobin. Es besteht aus insgesamt vier Untereinheiten und ist für den Sauerstofftransport im Blut zuständig.

⁷ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Overview_proteinogenic_amino_acids-DE.svg

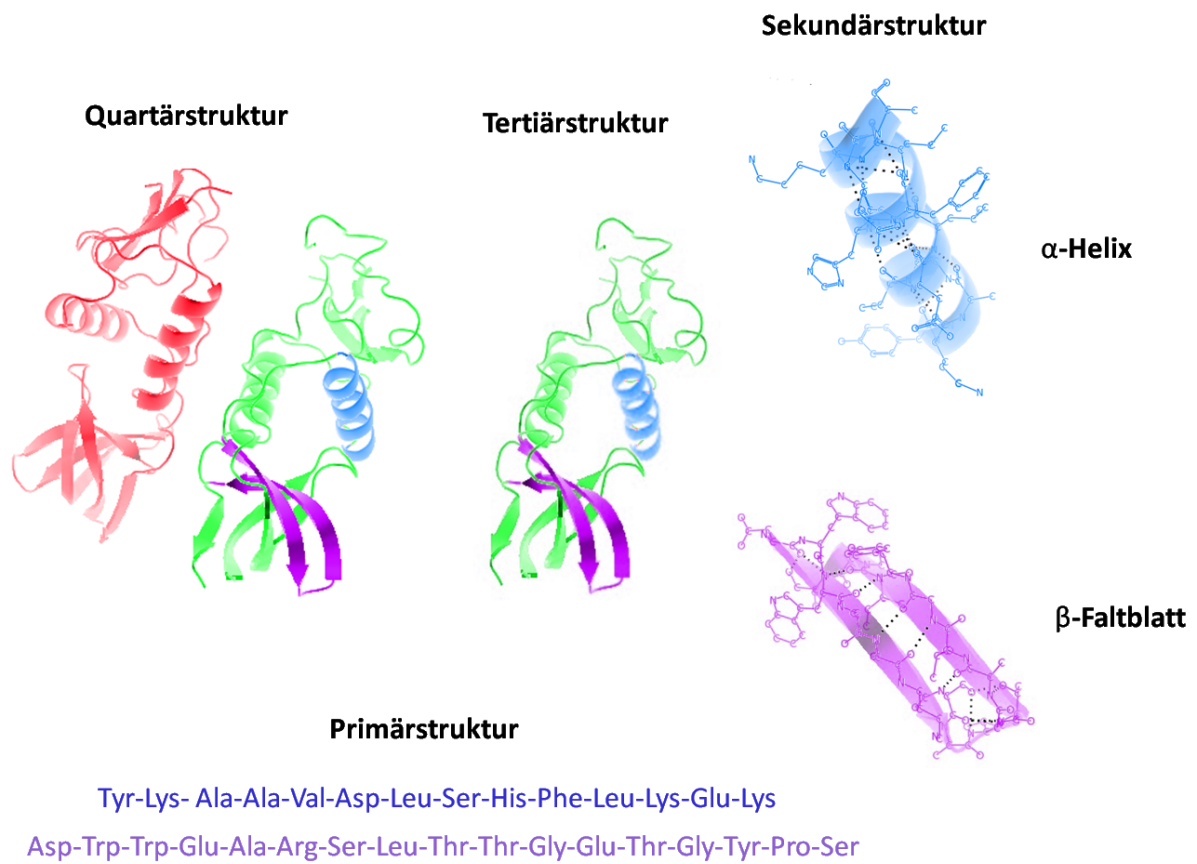


Abbildung 8: Hierarchische Ebenen des Proteinaufbaus⁸

Alle genannten Strukturmerkmale und Hierarchien sind durch die spezifischen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Aminosäuresequenz determiniert. Die Ausbildung der Strukturmerkmale des Proteins sind also vollständig in der Aminosäuresequenz gespeichert, die sich wiederum spontan in wässriger Lösung zu einem funktionalen Protein faltet.

Der gefaltete, aktive Zustand einer linearen Aminosäuresequenz eines Proteins beschreibt genau den Zustand den das Protein im 3D-Raum einnimmt, der das niedrigste Energieniveau aufweist. Somit ergeben sich für jedes Protein eine ganz eigene Struktur und Funktion, die in der Aminosäuresequenz determiniert ist. In allen beispielhaft aufgelisteten Proteinen erkennt man die soeben beschriebenen Sekundärstrukturmerkmale, also die Helices, die Faltblätter und die Schleifenstrukturen. Alle Proteine sind also ihrer funktionellen Tertiärstruktur gezeigt. Eine Ausnahme stellt das Hämoglobin dar. Dieses besteht, wie man der Abbildung entnehmen kann, aus insgesamt vier Untereinheiten. Jede der vier Untereinheiten weist ihre eigene Tertiärstruktur auf, die sich zur funktionstüchtigen Quartärstruktur des Hämoglobins zusammengelagert haben.

⁸ <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein-Struktur.png>

Das Hämoglobin findet man in den Erythrocyten, also den Sauerstofftransportierenden roten Blutzellen. Hämoglobin bindet Sauerstoff in der Lunge und kann ihn gezielt in sauerstoffarmem Gewebe wieder abgeben.

Das Myoglobin ist der intramuskuläre Sauerstofftransporter von Organismen und besteht, wie man sieht, ausschließlich aus Helices und Schleifen. Es weist im Gegensatz zum Hämoglobin nur eine Tertiärstruktur auf, es ist ein sogenanntes Monomer. Myoglobin übernimmt den vom Hämoglobin transportierten Sauerstoff und sichert so die Versorgung der Muskelzellen.

Das Green fluorescent Protein, kurz GFP stellt eines der wichtigsten Proteine in der molekularbiologischen Forschung dar, da es die Markierung von Proteinen innerhalb der Zelle und dadurch die Verfolgung des grün leuchtend markierten Proteins in der Zelle, live, ermöglicht. Man erkennt die charakteristische Barrel-Struktur des Proteins, die fast ausschließlich von Faltblättern gebildet wird.

Das Protein namens Beta-Lactamase ist in der Patientenversorgung gefürchtet. Es ermöglicht nämlich Bakterien Antibiotika, die Beta-Lactamringe beinhalten, abzubauen und sie dadurch unschädlich zu machen. Sobald Bakterien dieses Protein herstellen können, sind sie also immun gegen viele Antibiotika. An diesem Protein kann man sehr schön das Vorkommen der Struktur motive Helices und Faltblätter erkennen. Weiter erkennt man ein für die Katalyse essentielles koordiniertes Metallion.

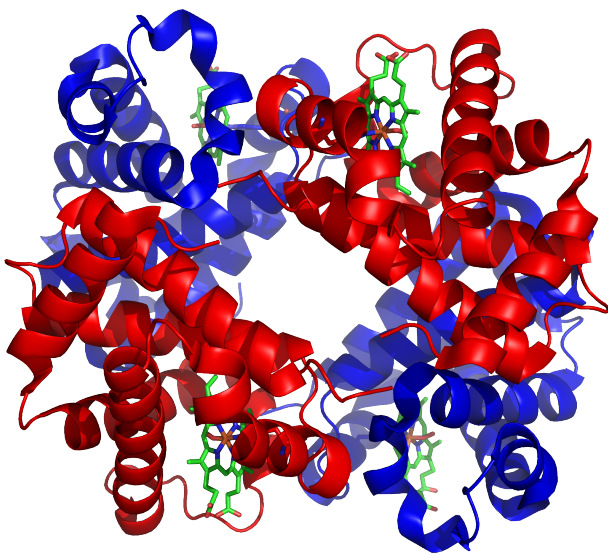


Abbildung 9: Hämoglobin⁹

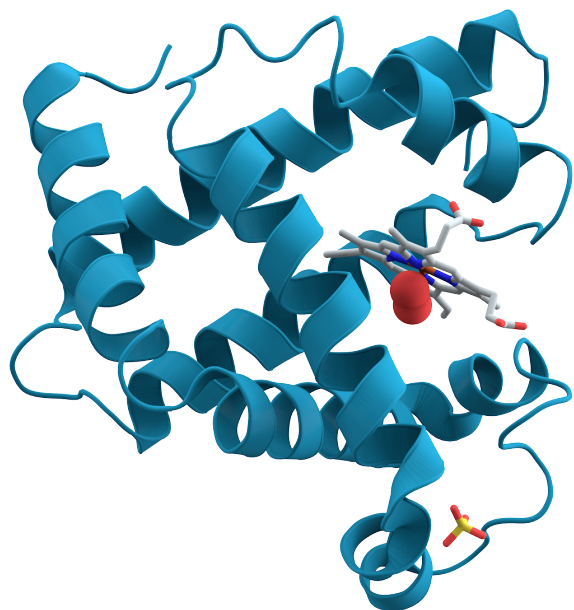


Abbildung 10: Myoglobin¹⁰

⁹ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:1GZX_Haemoglobin.png

¹⁰ <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myoglobin.png>

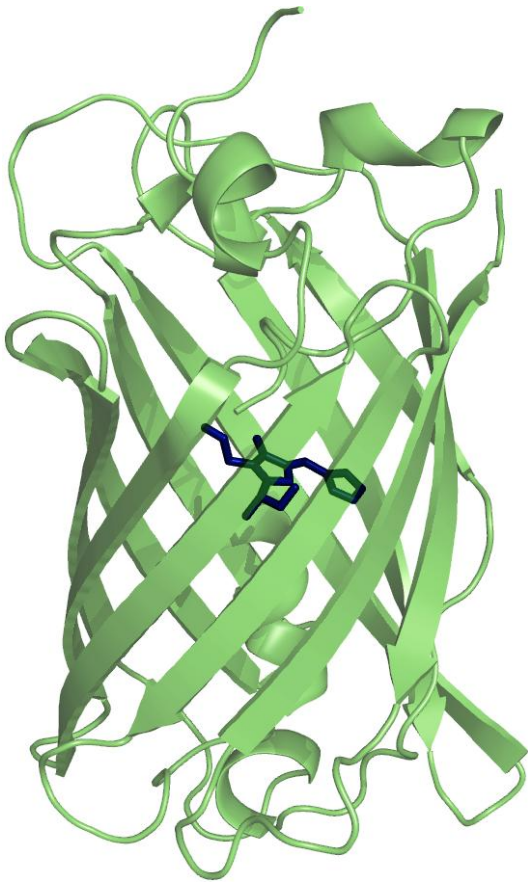


Abbildung 11: Green fluorescent Protein - GFP¹¹

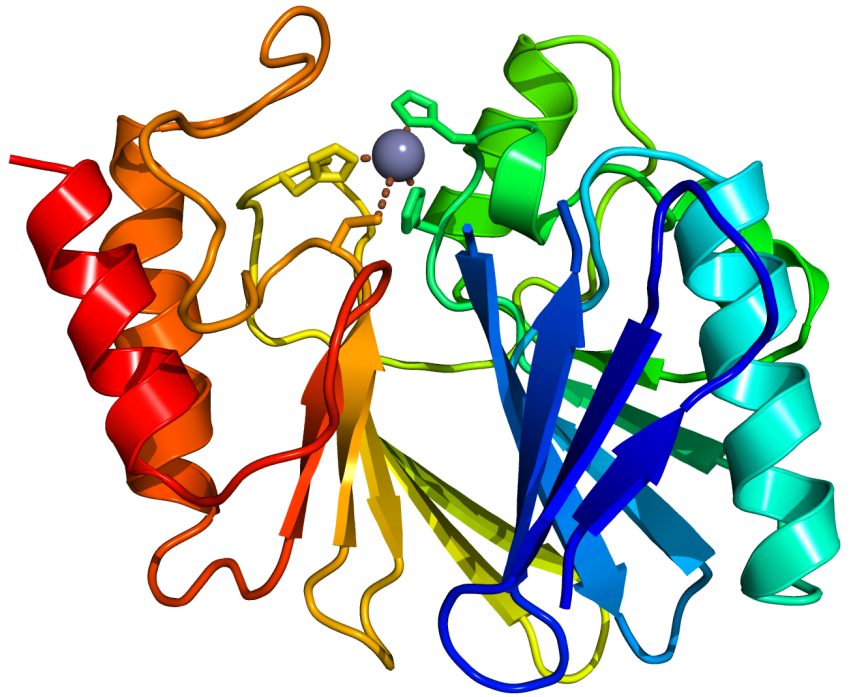


Abbildung 12: Beta-Lactamase¹²

¹¹ <http://www-jackson.ch.cam.ac.uk/research/images/BFP.j>

¹² <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/1BMC.png>

Wo sind Proteine codiert und wie werden sie hergestellt?

Proteine sind auf der DNA codiert. Es codieren jeweils drei aufeinanderfolgende Basenpaare für ein, so genanntes Codon, sprich für eine Aminosäure. Demnach gibt es 4^3 , also 64 mögliche Codierungen für Aminosäuren. Da es allerdings nur 20 natürliche Aminosäuren gibt, liegt eine Redundanz vor. Es codieren somit mehrere Tripletts für eine Aminosäure. Weiterhin gibt es Signale, die wiederum auf der DNA codiert sind, die der Proteinbildungsma­schinerie sagen wo sie mit dem Ablesen der DNA Sequenz für das Protein beginnen und wo sie damit aufhören soll. Die Signale werden Start- und Stopp-Codons genannt. Es gibt ein Start- und drei Stoppcodons. Alle möglichen Basenkombinationen für die Codierung von Aminosäuren können in einer „Codesonne“, siehe Abbildung 13, veranschaulicht werden. Diese wird von innen nach außen, also von 5' nach 3', gelesen. Wie oben schon gesagt ist die Proteinstruktur durch die Aminosäuresequenz determiniert. Da wiederum die Aminosäuresequenz durch die DNA-Sequenz determiniert ist, ist die Proteinstruktur durch die DNA-Sequenz bestimmt.

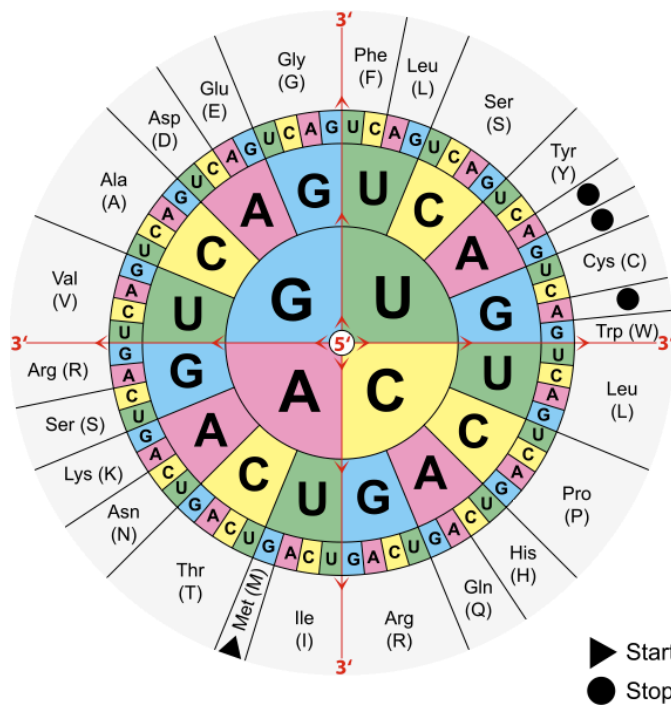


Abbildung 13: Codesonne¹³

Funktionsfähige Proteine sind somit auf der DNA-Sequenz zwischen Start- und Stopp Codons codiert. Sobald ein Protein hergestellt werden soll, wird eine riesige Proteinma­schinerie in Gang gesetzt, die den sehr komplexen Mechanismus der Proteinbiosynthese durchführt. Dazu wird als erstes der für das Protein codierende Abschnitt auf der DNA in eine RNA-Einzelstrangsequenz übersetzt, die man messenger RNA, kurz mRNA, nennt, da sie die Nachricht für das gewünschte Protein beinhaltet. Dies geschieht indem lokal die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix voneinander getrennt werden und nacheinander Nukleotide, die komplementär zu einem der DNA-Stränge sind, polymerisiert werden. Das Produkt ist folglich komplementär zu einem der DNA-Stränge. Nach erfolgter Polymerisation wird der RNA-Strang von der DNA abgelöst und die DNA bildet wieder ihre Helixstruktur aus.

¹³ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aminoacids_table.svg

Nachdem die mRNA-Einzelstrangsequenz synthetisiert wurde, wird dieser von einem Multiplorteinkomplex, dem so genannten Ribosom, erkannt. Dieses Ribosom erkennt ein Initiationssignal auf der mRNA und übersetzt nun wiederum den mRNA-Einzelstrang, gemäß der auf ihm codierten Codons, in eine Aminosäuresequenz, die sich schlussendlich im Idealfall zu einem aktiven Protein faltet.

Vereinfacht kann man sich den letzten Mechanismus wie folgt vorstellen: Die mRNA-Sequenz liegt auf einem Fließband das durch eine Maschine hindurchläuft, die das Ribosom darstellt. Arbeiter, die diese Maschine bedienen, schauen von oben in die Maschine hinein und können dadurch die mRNA-Sequenz sehen und lesen. Jeder Arbeiter kann allerdings nur genau ein Codon lesen und bringt, sobald das Codon erkannt wurde, eine Aminosäure zu der Maschine. Diese Arbeiter stellen in der Realität Transfer-RNA Moleküle, kurz tRNA, dar, die jeweils nur für eine einzige Aminosäure zuständig sind. Nun durchläuft diese mRNA-Sequenz auf dem Fließband die Maschine und die Arbeiter können jeweils die Codons auf der mRNA erkennen. Jeder Arbeiter bringt nun die passende Aminosäure sequentiell, gemäß der mRNA Sequenz, zu der Maschine und setzt diese in der entsprechenden Reihenfolge wie ein Puzzle zusammen. Nachdem die mRNA durch die Maschine durchgelaufen ist, legen die Arbeiter das fertig zusammengesetzte Puzzle, also die Aminosäuresequenz in ein Wasserbad, das das Cytosol, also das wässrige Milieu in der Zelle, darstellt. Durch die spezifischen physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuresequenz faltet sich das Protein spontan, Stück für Stück, bis es schließlich die energetisch niedrigste räumliche Anordnung der Aminosäuren gefunden hat. Diese Konformation stellt die aktive 3D-Struktur des Proteins dar.

Den erläuterten Gesamtprozess nennt man das „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“. Es beschreibt den gesamten Weg von der DNA bis zur nativen produzierten Protein.

Zentrales Dogma der Molekularbiologie



Abbildung 14: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

2. Plasmide als Genföhren

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die man in der Gentechnik und in der Synthetischen Biologie dazu nutzt, um einem Bakterium oder auch höher entwickelten Zellen zusätzliche Eigenschaften zu verleihen, indem man neue Gene in sie einbringt. Diese Eigenschaften können sehr unterschiedlich sein. Sie reichen von Antibiotikaresistenzen, über die Verbesserung der Stoffwechsellistung bis zur Produktion von Biopharmazeutika um nur ein Paar der möglichen Eigenschaften zu nennen. Das Prinzip dahinter beruht auf der im ersten Teil beschriebenen Proteinbiosynthesemaschinerie. Es ist möglich das Plasmid genau so konstruieren, wie man es haben will und macht sich die Natur der Molekularbiologie zu nutze in dem man zum Beispiel die DNA-Sequenz eines gewünschten Proteins in das Plasmid integriert. Diese DNA-Sequenz wird nun durch die vorhandene Proteinbiosynthesemaschinerie des Bakteriums von dem Plasmid abgelesen und das zugehörige Protein gebildet.

Ein typisches Plasmid das wir in unserem Projekt verwendet haben ist im Folgenden dargestellt:

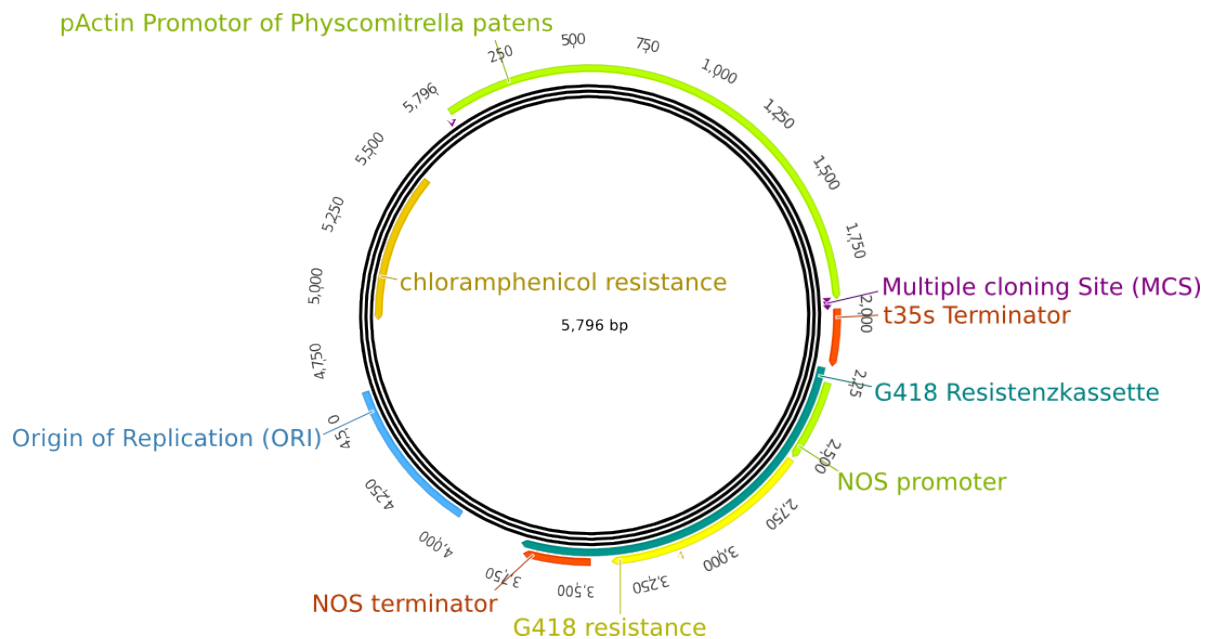


Abbildung 15: Plasmid

Die Länge des Plasmids beträgt 5796 Basenpaare. Man erkennt mehrere charakteristische, bewusst eingefügte Abschnitte auf dem Plasmid, die es dem Experimentator erlauben, das Plasmid nach seinen Wünschen zu verändern und zu nutzen. Vor jedem eingefügten Gen für ein Protein, muss auf der DNA ein Promotor angeordnet sein, hinter dem Gen für das Protein ein Terminator, damit das Gen insgesamt von der Proteinbiosynthesemaschinerie erkannt und abgelesen werden kann. Der Promotor dient der Initiation und der Terminator der Termination der Proteinbiosynthesemaschinerie. In dem oben gezeigten Plasmid liegen insgesamt drei Paare an Promotoren und Terminatoren vor, die jeweils spezifisch erkannt werden. Das erste Paar besteht aus dem pActin Promotor, der aus dem Moos *Physcomitrella patens* isoliert wurde und dem t35s Terminator. Beide Genabschnitte sind durch eine Multiple Cloning Site, kurz MCS, voneinander getrennt. Die MCS besteht aus einer Basensequenz, die von Restriktionsenzymen erkannt wird.

Restriktionsenzyme sind Proteine, die katalytisch aktiv sind und spezifische Basensequenzen auf der DNA erkennen und durchtrennen, wodurch das Plasmid linearisiert wird. Das Phänomen der Restriktionsenzyme macht man sich zu Nutze indem man das Plasmid, wie auch die DNA-Sequenz des zu integrierenden Proteins mit demselben Restriktionsenzym schneidet. Nun entstehen zwei lineare DNA-Sequenzen die an beiden Enden dieselben Schnittstellen aufweisen. Durch Zugabe eines weiteren Proteins, einer so genannten Ligase, die man mit einer molekularen Tube Sekundenkleber vergleichen kann, werden die beiden linearisierten DNA-Sequenzen gemäß der komplementären Basenpaarung miteinander verbunden. Das Resultat ist erneut ein zirkuläres Plasmid das die gewünschte DNA-Sequenz enthält.

Das zweite Promotor-Terminator Paar findet man in der G418 Resistenzkassette. Die G418 Resistenzkassette besteht aus dem NOS Promotor, dem G418 Resistenzgen und einem NOS Terminator. Eine Genkassette beschreibt somit das gesamte Genkonstrukt aus Promotor, der gewünschten DNA Sequenz und dem zugehörigen Terminator. Das G418 Resistenzgen codiert für ein Protein das die Zelle, die das Plasmid aufgenommen hat, gegen das Antibiotikum G418 resistent macht. Damit können Mooszellen, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben von solchen unterschieden werden, die kein Plasmid aufgenommen haben.

Das dritte Promotor-Terminator Paar ist auf der Chloramphenicolresistenz Genkassette codiert, dass der Zelle, die das Plasmid aufgenommen hat, eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol gewährleistet. Diese Resistenz wird verwendet, um das Plasmid in Bakterien vermehren zu können

Weiter findet man einen Abschnitt auf dem Plasmid namens Origin of Replication (ORI). Dieser Abschnitt des Plasmids dient dem Bakterium als Erkennungssequenz zur Replikation, das heißt Vermehrung, des gesamten Plasmids.

Alle hier verwendeten Promotoren sind für eine konstitutive Proteinexpression zuständig. Die konstitutive Proteinexpression ist dadurch charakterisiert, dass der Promotor durchgehend aktiv und von der Proteinexpressionsmaschinerie erkannt wird. Dadurch wird das Protein kontinuierlich hergestellt. Darüber hinaus gibt es auch induzierbare Promotoren, die erst durch die Zugabe eines Substrates aktiv werden. Dadurch kann man die Proteinproduktion gezielt von außen kontrollieren. Beide Promotorarten finden in den durchzuführenden Experimenten Anwendung.

3. Biologische Datenbanken

Biologische Datenbanken sind heutzutage ein unverzichtbares Werkzeug in allen Wissenschaftsdisziplinen die in Berührung mit der Molekularbiologie kommen. Durch die hohen Datenmengen, die sich durch die rasanten technischen Entwicklungen und experimenteller Analysemethoden ergeben haben, hat sich sogar ein neuer Forschungsbereich ergeben, der sich gezielt mit der Analyse der generierten Daten beschäftigt, die so genannte Bioinformatik. Zu der Aufgabe dieses Forschungsbereiches gehört beispielsweise die Verwaltung von Sequenzierungsergebnissen des Erbgutes unterschiedlicher Organismen, wie auch der Vergleich von Sequenzierungsergebnissen zwischen Organismen. Dieser Vorgehensweise ermöglicht zum Beispiel die Analyse von Mutationen im Genom in dem man die Sequenzierungsergebnisse zwischen krankem Gewebe und gesundem Gewebe vergleicht.

Weiterhin nutzt man die Bioinformatik heutzutage dazu Proteinstrukturen ausgehend von der DNA-Basensequenz zu berechnen und vorherzusagen. Dazu bedient man sich der Übersetzung der Aminosäurecodons auf der DNA-Basensequenz in die zugehörige Aminosäuresequenz. Um die Struktur eines unbekanntes Proteins zu bestimmen, vergleicht man dessen Aminosäuresequenz mit Aminosäuresequenzen von Proteinen, die bereits bekannte Strukturen aufweisen. Je ähnlicher sich die Proteine auf der Ebene der Aminosäuresequenzen sind, desto ähnlicher sind sie sich auch strukturell. Das heißt, dass man ein nahezu perfektes Ergebnis für die unbekanntes Struktur des Proteins errechnen kann, wenn man dazu Proteinstrukturen verwendet, deren zugehörige Aminosäuresequenzen annähernd identisch zu der Aminosäuresequenz des Proteins mit unbekannter Struktur sind.

Weiter kann man sehr viele Parameter aus der Aminosäuresequenz eines Proteins generieren. Nachdem man die Basensequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt hat, kann man nun durch verschiedene Programme die Aminosäurezusammensetzung, den isoelektrischen Punkt, der den pH wert beschreibt, bei dem die Summe der Ladungen eines Proteins gleich null ist, das Gewicht, die Hydrophobizität, den Ladungsgrad und viele weitere Parameter berechnen.

Im Weiteren nenne ich ausgewählte Open Source Datenbanken und Programme die jedem Wissenschaftler, der mit der Molekularbiologie in Berührung kommt, von großem Nutzen sind und bekannt sein sollten:

Datenbank Uniprot

Die Datenbank Uniprot enthält Informationen über Proteine aller Lebewesen. Sie stellt durch ihren Datengehalt die größte Proteindatenbank der Welt dar. Hier erhält man nur durch die Eingabe des Namens des gesuchten Proteins sämtliche Daten und Charakteristika, wie die Aminosäuresequenz, die Herkunft des Proteins, Strukturparameter und Verweise zu anderen Datenbanken, die dieses Protein vorzuweisen hat.

www.uniprot.org

RCSB Protein Data bank

Die RCSB Protein Data bank stellt die weltweit größte Datenbank für biologische Strukturdaten dar. Diese 3D-Proteinstrukturen werden durch die Anwendung biophysikalischer Messmethoden, wie der Röntgenkristallographie (X-Ray) und der Nuclear-Magnetic-Resonance Tomographie (NMR), einer Art MRT für Biomoleküle, gewonnen. Hier erhält man die Raumkoordinaten jedes einzelnen Atoms des Proteins. Daraus ergibt sich dann die gesamte Proteinstruktur inklusive der Sekundärstrukturen. Weiter wird auch die Auflösung der Proteinstruktur, also die Genauigkeit der Vorhersage der Proteinstruktur in der Einheit Ångström (10^{-10} m) angegeben. Je kleiner dieser Wert ist, desto genauer konnte die Proteinstruktur bestimmt werden.

www.rcsb.org

National Center for Biological Information

NCBI wird vom gleichnamigen National Center for Biological Information verwaltet und stellt die größte Datenbank für DNA- und Proteinsequenzen dar. Mithilfe dieser Datenbank kann man beispielweise DNA- und Proteinsequenzvergleiche zwischen Lebewesen durchführen, aber auch direkt mithilfe einer DNA-Sequenz Aminosäuresequenzvergleiche zwischen Lebewesen durchführen. Auch kann man kontrollieren in welchen Organismen sich bestimmte Gene, oder auch nur Teilabschnitte dieser, befinden.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Expasy

Als letztes möchte ich die Homepage Expasy vorstellen. Auch diese Seite stellt ein bioinformatisches Tool dar das sämtliche Berechnungen durchführen kann, die Aminosäure- und DNA-Sequenzen zulassen. Dazu gehören auf Homologie basierte Sequenzsuchen, die Auswertung von generierten Daten diverser Analysemethoden, sämtliche Parameter von Sequenzen, Strukturberechnungen über Aminosäuresequenzen und vieles mehr.

www.Expasy.org

Anleitung zur Herstellung von synthetisch veränderten Bakterien

Bereitgestellte Materialien

In diesem Kit finden Sie folgende Reagenzien zur Durchführung von insgesamt 2 Transformationen für jedes der drei mitgelieferten Plasmide (Genfähren), die jeweils parallel angesetzt werden sollten. Folgende Tabelle listet alle sich im Kit befindlichen und für das Experiment nötigen Reagenzien auf:

Nötige Reagenzien	Menge	Verfügbarkeit
LB - Flüssigmedium	Reagenzien für über 3L Medium sind vorhanden	Im Kit vorhanden
„Banana Odor“ - Plasmid	100 µl (Konzentration 10 ng/µl)	Im Kit vorhanden
„RFP-Generator“-Plasmid	100 µl (Konzentration 10 ng/µl)	Im Kit vorhanden
„Luciferase“-Plasmid	100 µl (Konzentration 10 ng/µl)	Im Kit vorhanden
Isoamyl Alkohol (100%)	10 ml	Im Kit vorhanden
Agarplatten (Resistenz: Kanamycin)	4 Stück	Im Kit vorhanden
Agarplatten (Resistenz: Chloramphenicol)	2 Stück	Im Kit vorhanden
Kompetente Zellen (150 µl)	6 Eppendorf Tubes á 150 µl	Selbst herzustellen/zu kaufen
Arabinose (500 mM)	3.76 g (50 ml)	Im Kit vorhanden
Kanamycin	25 ml	Im Kit vorhanden
Chloramphenicol	25 ml	Im Kit vorhanden

Wichtig:

Um eine hohe Expressionsrate des Enzyms zu gewährleisten, ist das Nutzen eines *E.coli* Stammes, der auf eine maximale Expressionsrate hin optimiert wurde, unabdingbar. Ein möglicher Stamm ist der so genannte BL21 competent *E.coli* Stamm.

Vorarbeiten

Tutorial: Proteincharakterisierung am Beispiel des „RFP“ – Red fluorescent protein

- Man öffne die Homepage www.uniprot.org .
- Nun gebe man den Namen des Proteins „Red fluorescent protein“ in die Query ein und drücke den Search-Button.
- Es erscheint nun eine ganze Liste an möglichen Proteinen die den Namen Red fluorescent protein tragen. Dies sind leicht veränderte Abkömmlinge des Ursprungproteins, die entweder engineered, oder aus verschiedenen Organismen gewonnen wurden.
- Man klicke das erste Protein, mit dem Code „Q9U6Y8“ an.
- Auf der folgend erschienenen Seite erhält man sehr viele Informationen über dieses Protein. Die Herkunft, die Aminosäuresequenz, die Struktur, der biotechnologische Nutzen, biophysikalische Parameter, der Aufbau der zugehörigen Sekundärstruktur, wie auch Referenzen zu Publikationen, aus denen die angegebenen Informationen gewonnen wurden, sind hier angegeben. Diese Seite muss von nun an geöffnet bleiben, da wir von hier verschiedene Informationen brauchen, um mit dem Tutorial weiterzufahren.
- Nun kopiere man den Code des Proteins. Dieser heißt: Q9U6Y8
- Man öffne die Homepage www.rcsb.org .
- Nun gebe man in die Suchzeile den Code des Proteins ein und drücke den Search-Button.
- Wie man erkennt, erhält man einige Treffer für diese Eingabe. Da unser Protein, laut der Uniprot-Proteindatenbank, aus dem Organismus *Discosoma sp.*, einer Seeanemone, kommt, drücken wir unter der Angabe „Organism“ auf *Discosoma sp.*, um alle zugehörigen Proteine aufzufinden. Dies sind insgesamt sechs Stück. Sie stellen unterschiedliche Varianten des Red fluorescent protein dar.
- Das von uns gesuchte Protein ist das fünfte von oben und trägt den Namen 1G7K - CRYSTAL STRUCTURE OF DSRED, A RED FLUORESCENT PROTEIN FROM DISCOSOMA SP. RED. Man klicke nun auf den Namen des Proteins, um nähere Informationen über die zugehörige 3D-Struktur zu erhalten.
- Im nächsten Schritt kopiere man die angegebene Aminosäuresequenz die unter dem Stichpunkt „Sequences“ auf der geöffneten Seite von www.rcsb.org zu finden ist.
- Man öffne nun die Homepage www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi .
- Hier klicke man unter dem Unterpunkt „Basic BLAST“ die Suchvariante „protein blast“ an. Diese Suchvariante erlaubt die Suche nach Proteinen mit homologer Aminosäuresequenz zu der, die man in die Suchmaschine eingibt. Es öffnet sich eine Seite, auf der sich ein Fenster befindet, in das man die kopierte Aminosäuresequenz eingibt.
- Während der Eingabe der kopierten Aminosäuresequenz in das Suchfeld muss sicher gestellt werden, dass sämtliche Leerzeilen und Zahlenangaben, die man gegebenenfalls durch die Angabe auf www.uniprot.org mitkopiert hat, entfernt wurden, da die Suchanfrage ansonsten nicht funktioniert. Anschließend klicke man auf den Button „BLAST“.
- An diesem Punkt kann es zu einer Verzögerung kommen, da die Suchmaschine nun alle Aminosäuresequenzen der Datenbank auf Homologie zu der eingegebenen kontrolliert. Das Resultat sind sehr viele Sequenzangaben, die eine hohe Homologie zu der eingegebenen aufweisen. Die Sequenz mit der höchsten Homologie steht ganz oben, die mit der geringsten ganz unten in der Auflistung.

- Nun klicke man auf den Namen der an erster Stelle aufgelisteten Sequenz und anschließend auf die zusätzlich aufgelistete Sequenz-ID. Auf dieser Seite erhält man wichtige Informationen über die ausgewählte Sequenz.
- Im letzten Schritt der Charakterisierung des Proteins in diesem Tutorial gehe man auf die Homepage www.expasy.org .
- Auf der linken Seite klicke man auf „proteomics“ und anschließend auf „protein characterisation and function“.
- Auf der rechten Seite der Homepage findet man sehr viele Tools zur Charakterisierung von Proteinen. Man klicke auf das Tool „ProtParam“ das die Berechnungen proteinphysikalischer und chemischer Parameter erlaubt.
- Hier gebe man erneut die Aminosäuresequenz des „Red fluorescent protein“ der Homepage www.uniprot.org in das zugehörige Textfeld ein und klicke auf den Button „Compute Parameters“. Man erhält nun Angaben über die Aminosäurezusammensetzung, das Molekulargewicht, Halbwertszeiten in verschiedenen Organismen und sehr viele andere nützliche Parameter, die für den Umgang mit dem Protein sehr wichtig sind.
- Alle beschriebenen Schritte kann man mit den beiden anderen zu verwendenden Proteinen auch durchführen, um Informationen über ihre Charakteristika zu erhalten. Dies ist definitiv zu empfehlen, da man über die Charakteristika der Proteine, mit denen man experimentell arbeitet, bescheid wissen sollte.

Herstellung LB-Medium (Reagenzien für 1L)

- Man löse 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 950 ml destilliertem oder vollentsalztem Wasser.
- Danach stelle man den pH Wert der Lösung mithilfe eines pH Meters und 1 M NaOH auf pH 7 ein.
- Nun wird die Lösung in einem Autoklaven sterilisiert.
- Die Lösung kann bei Raumtemperatur für mehrere Monate aufbewahrt werden.
- **Anmerkung:** Für alle im Folgenden beschriebenen Experimente sind in etwa 5 L LB-Medium nötig.

Herstellung Arabinose-Lösung (500mM)

- Die Arabinose in dem 50 ml Röhrchen wird mit deionisiertem, oder destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und geschüttelt bis sich der Zucker gelöst hat. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 35 mg/ml und kann nach der Verwendung bei -20°C bis zum nächsten Gebrauch gelagert werden.

Kaufen chemisch kompetenter BL21 competent *Escherichia coli* Zellen

- Für die Durchführung jedes der drei Experimente ist die Nutzung von zwei Röhrchen kompetenter Zellen nötig. In jedem Röhrchen sollten circa 150 µl chemisch kompetente Zellen vorhanden sein.

Experiment 1 – Transformation des RFP-Generator Plasmids

Schritt 1 – Transformation

- Zwei Röhrchen chemisch kompetenter Zellen, im Idealfall der Expressionsstamm *Escherichia coli* BL21, werden aus dem Gefrierschrank entnommen und langsam auf Eis aufgetaut
- 25 µl der Plasmid-DNA (10ng/µl) – RFP Generator Plasmid - werden zu jedem der zwei Röhrchen mit kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig miteinander vermischt.
- Die beiden Röhrchen werden für 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird das Röhrchen für 5 min bei 37°C inkubiert, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen zu ermöglichen. Dieser Vorgang nennt sich Hitzeschock!
- Nun wird 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum zu jedem Röhrchen Zellen gegeben und die Suspension durch auf- und nieder-pipettieren vermischt.
- Es folgt ein Inkubations-/ und Regenerationsschritt der Zellen für 45 min bei 37 °C, idealerweise in einem Zellkulturschüttler bei 180 rpm. In dieser Zeit vermehren die Zellen, die das RFP-Generator Plasmid aufgenommen haben, das DNA-Plasmid und bilden bereits die darauf codierte Chloramphenicol Resistenz aus. Dies ist essentiell, da auf diesem Plasmid ein Chloramphenicol-Resistenzgen liegt, das die anschließende Selektion der Zellen auf Chloramphenicol-Agarplatten ermöglicht. Nur die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, überleben diesen Selektionsprozess.
- **Bei Vorhandensein einer Tischzentrifuge:**
 - Die beiden Zellröhrchen werden nun für 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen.
 - Das entstandene Pellet, die Zellen die auf dem Röhrchenboden sind, wird jeweils in 100 µl LB-Medium resuspendiert (Schaumbildung ist völlig normal!!) und danach auf jeweils einer Agarplatte, versetzt mit Chloramphenicol, ausgestrichen.
- **Wenn keine Tischzentrifuge zur Verfügung steht:**
 - Von dem Medium mit den jetzt transformierten Zellen werden jeweils 150 µl auf einer Chloramphenicol-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte enthält das Antibiotikum Chloramphenicol, damit nur die Zellen auf der Platte wachsen, die das RFP-Generator Plasmid aufgenommen haben.
- Die beiden Chloramphenicol-Agarplatten werden nun bei 37 °C für circa 12-24 h inkubiert bis sich sichtbare Bakterienkolonien gebildet haben.

Schritt 2 – Wahrnehmen der mit dem RFP-Generator transformierten *E. coli* Zellen

- Das RFP-Generator Plasmid, das für das Protein namens Red fluorescent protein codiert, trägt einen konstitutiv aktiven Promotor, wodurch das RFP-Gen durchgehend von der Zelle abgelesen und dementsprechend das RFP-Protein gebildet wird.
- Es sollte eine klare Rotfärbung der Bakterienkulturen wahrzunehmen sein! Wenn dem nicht so ist, sollte man den Deckel der Petrischale mehrmals öffnen, da das Chromophor des RFP-Proteins Luftsauerstoff zur Ausbildung der roten Farbe benötigt.

Experiment 2 – Transformation des Luciferase-Plasmids und Proteinexpression

Schritt 1 – Transformation

- Zwei Röhrchen chemisch kompetenter Zellen, im Idealfall der Expressionsstamm *Escherichia coli* BL21, werden aus dem Gefrierschrank entnommen und langsam auf Eis aufgetaut
- 25 µl der Plasmid-DNA (10ng/µl) – Luciferase Plasmid - werden zu jedem der zwei Röhrchen mit kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig miteinander vermischt.
- Die beiden Röhrchen werden für 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird das Röhrchen für 5 min auf 37°C geheizt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen zu ermöglichen. Dieser Vorgang nennt sich Hitzeschock!
- Nun wird 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum zu jedem Röhrchen Zellen gegeben und die Suspension vermischt.
- Es folgt ein Inkubations-/ und Regenerationsschritt der Zellen für 45 min bei 37 °C, idealerweise in einem Zellkulturschüttler bei 180 rpm. In dieser Zeit vermehren die Zellen, die das Luciferase Plasmid aufgenommen haben, das DNA-Plasmid. Dies ist essentiell, da auf diesem Plasmid ein Kanamycin-Resistenzgen liegt, das die anschließende Selektion der Zellen auf Kanamycin-Agarplatten ermöglicht. Nur die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, überleben diesen Selektionsprozess.
- **Bei vorhanden sein einer Tischzentrifuge:**
 - Die beiden Zellröhrchen werden nun für 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen.
 - Das entstandene Pellet, Zellen die auf dem Röhrchenboden sind, wird jeweils in 100 µl LB-Medium resuspendiert (Schaumbildung ist völlig normal!!) und danach auf jeweils einer Agarplatte, versetzt mit Kanamycin, ausgestrichen.
- **Wenn keine Tischzentrifuge zur Verfügung steht:**
 - Von dem Medium mit den jetzt transformierten Zellen werden jeweils 150 µl auf einer Kanamycin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte enthält das Antibiotikum Kanamycin, damit nur die Zellen auf der Platte wachsen, die das Luciferase Plasmid aufgenommen haben.
- Die beiden Kanamycin-Agarplatten werden nun bei 37 °C für circa 12-24 h inkubiert bis sich sichtbare Bakterienkolonien gebildet haben.

Schritt 2 – Picken einer monoklonalen Bakterienkolonie

- Beide Platten werden nach der Inkubationszeit auf Bakterienkolonien inspiziert.
- Es wird nur eine einzige Bakterienkolonie von einer beider Kanamycin-Agarplatten mithilfe einer Pipettenspitze und einer Pipette aufgenommen und in ein geeignetes Kulturgefäß gefüllt mit LB-Medium, am besten ist ein 50 ml Erlenmeyerkolben, samt Pipettenspitze gegeben.
- Zu dem Gefäß, gefüllt mit LB-Medium, wird Kanamycin im Verhältnis von 1:500 gegeben. Wenn es sich zum Beispiel um ein 50 ml Gefäß handelt, werden 100 µl hinzugegeben.
- Der angeimpfte Kolben wird nun nach Möglichkeit in einem Zellkultur-Schüttler bei 37 °C und 180 rpm über Nacht, für mindestens 16h inkubiert.
- Um das Wachstum der Zellkultur zu bestimmen, kann die Absorption der Zellsuspension mithilfe eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Die gemessene Absorptionsrate sollte zur Durchführung des nächsten Schrittes optimaler Weise im Bereich von 0,7 bis 2,0 liegen, damit ausreichend Zellen vorhanden sind, diese aber noch vital genug sind und sich noch ausreichend verbliebene Nährstoffe im Medium finden.

Schritt 3 – Induktion der Proteinexpression

- Die zu induzierende Zellkultur sollte für diesen Schritt eine OD von 0,7 bis 2,0 aufweisen
- Um die Proteinexpression zu induzieren, muss nun die in 50 ml gelöste L-Arabinose zu der Zellkultur gegeben werden. Die zuzugebende Menge an L-Arabinose (500 mM) richtet sich nach dem Zellkulturvolumen. Es sind 1 % des Gesamtzellkulturvolumens an L-Arabinose Lösung (500 mM) hinzuzugeben. Dadurch wird der L-Arabinose abhängige Promotor induziert, der auf dem Plasmid, dem zu exprimierenden Protein, vorgeschaltet ist.
- Anschließend lässt man die Zellkultur für 4 h, nach Möglichkeit bei 25°C in einem Zellkultur-Schüttler bei 180 rpm stehen. Falls dieser nicht vorhanden ist, reicht es die Zellkultur bei Raumtemperatur für 4 h stehen zu lassen, wobei das Gefäß jede halbe Stunde vorsichtig durch schwenkende Bewegungen geschüttelt werden sollte.

Schritt 5 – Wahrnehmen der Luciferase

- Man dunkle das Zimmer, in dem man sich aufhält, ab und nehme das Luciferase-Protein in seiner Farbpracht wahr!

Experiment 3 – Transformation des Banana-Odor Plasmids , Proteinexpression und Substratumsetzung

Schritt 1 – Transformation

- Zwei Röhrchen chemisch kompetenter Zellen, im Idealfall der Expressionsstamm *Escherichia coli* BL21, werden aus dem Gefrierschrank entnommen und langsam auf Eis aufgetaut
- 25 µl der Plasmid-DNA (10ng/µl) – Banana-Odor Plasmid - werden zu jedem der zwei Röhrchen mit kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig miteinander vermischt.
- Die beiden Röhrchen werden für 30 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wird das Röhrchen für 5 min auf 37°C geheizt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen zu ermöglichen. Dieser Vorgang nennt sich Hitzeschock!
- Nun wird 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum zu jedem Röhrchen Zellen gegeben und die Suspension vermischt.
- Es folgt ein Inkubations-/ und Regenerationsschritt der Zellen für 45 min bei 37 °C, idealerweise in einem Zellkulturschüttler bei 180 rpm. In dieser Zeit vermehren die Zellen, die das Banana-Odor Plasmid aufgenommen haben, das DNA-Plasmid. Dies ist essentiell, da auf diesem Plasmid ein Kanamycin-Resistenzgen liegt, das die anschließende Selektion der Zellen auf Kanamycin-Agarplatten ermöglicht. Nur die Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, überleben diesen Selektionsprozess.
- **Bei vorhanden sein einer Tischzentrifuge:**
 - Die beiden Zellröhrchen werden nun für 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen.
 - Das entstandene Pellet, Zellen die auf dem Röhrchenboden sind, wird jeweils in 100 µl LB-Medium resuspendiert (Schaumbildung ist völlig normal!!) und danach auf jeweils einer Agarplatte, versetzt mit Kanamycin, ausgestrichen.
- **Wenn keine Tischzentrifuge zur Verfügung steht:**
 - Von dem Medium mit den jetzt transformierten Zellen werden jeweils 150 µl auf einer Kanamycin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte enthält das Antibiotikum Kanamycin, damit nur die Zellen auf der Platte wachsen, die das Luciferase Plasmid aufgenommen haben.
- Die beiden Kanamycin-Agarplatten werden nun bei 37 °C für circa 12-24 h inkubiert bis sich sichtbare Bakterienkolonien gebildet haben.

Schritt 2 – Picken einer monoklonalen Bakterienkolonie

- Beide Platten werden nach der Inkubationszeit auf Bakterienkolonien inspiziert.
- Es wird nur eine einzige Bakterienkolonie von einer beider Kanamycin-Agarplatten mithilfe einer Pipettenspitze und einer Pipette aufgenommen und in ein geeignetes Kulturgefäß gefüllt mit LB-Medium, am besten ist ein 50 ml Erlenmeyerkolben, samt Pipettenspitze gegeben.
- Zu dem Gefäß, gefüllt mit LB-Medium, wird Kanamycin im Verhältnis von 1:500 gegeben. Wenn es sich zum Beispiel um ein 50 ml Gefäß handelt, werden 100 µl hinzugegeben.
- Der angeimpfte Kolben wird nun nach Möglichkeit in einem Zellkultur-Schüttler bei 37 °C und 180 rpm über Nacht, für mindestens 16h inkubiert.
- Um das Wachstum der Zellkultur zu bestimmen, kann die Absorption der Zellsuspension mithilfe eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Die gemessene Absorptionsrate sollte zur Durchführung des nächsten Schrittes optimaler Weise im Bereich von 0,7 bis 2,0 liegen, damit ausreichend Zellen vorhanden sind, diese aber noch vital genug sind und sich noch ausreichend verbliebene Nährstoffe im Medium finden.

Schritt 3 – Induktion der Proteinexpression

- Die zu induzierende Zellkultur sollte für diesen Schritt eine OD von 0,7 bis 2,0 aufweisen
- Um die Proteinexpression zu induzieren, muss nun die in 50 ml gelöste L-Arabinose zu der Zellkultur gegeben werden. Die zuzugebende Menge an L-Arabinose (500 mM) richtet sich nach dem Zellkulturvolumen. Es sind 1 % des Gesamtzellkulturvolumens an L-Arabinose Lösung (500 mM) hinzuzugeben. Dadurch wird der L-Arabinose abhängige Promotor induziert, der auf dem Plasmid, dem zu exprimierenden Protein, vorgeschaltet ist.
- Anschließend lässt man die Zellkultur für 4 h, nach Möglichkeit bei 25°C in einem Zellkultur-Schüttler bei 180 rpm stehen. Falls dieser nicht vorhanden ist, reicht es die Zellkultur bei Raumtemperatur für 4 h stehen zu lassen, wobei das Gefäß jede halbe Stunde vorsichtig durch schwenkende Bewegungen geschüttelt werden sollte.

Schritt 4 – Zugabe von Isoamyl – Alkohol

- Die Zellkultur wird nun in mehrere kleine verschließbare Kulturgefäße überführt. Das Volumen der abgefüllten Zellkulturmenge sollte sich in etwa auf 10 ml belaufen.
- Anschließend wird in die Hälfte der abgefüllten Kulturgefäße 200 µl/L Isoamylalkohol gegeben. Alle Kolben werden danach fest verschlossen und mehrere Male vorsichtig geschwenkt.
- Nun findet die Substratumsetzung von Isoamylalkohol zu der nach Banane riechenden chemischen Verbindung statt. Der süßlich riechende Bananenduft ist schon nach etwa einer Stunde wahrzunehmen, eine längere Inkubationsdauer von etwa vier Stunden wäre optimal.

Schritt 5 – Genuss des Bananenduftes

- Es sind nach der Inkubation alle abgefüllten Zellkulturgefäße gleichzeitig zu öffnen. Der süßliche Geruch des Banana-Odor sollte nur in den Gefäßen wahrzunehmen sein, in denen auch Isoamylalkohol als Substrat hinzugegeben wurde.

Ende

Ich hoffe Sie hatten bei der Auseinandersetzung mit dem Educational Kit genauso viel Spaß, wie wir beim Verfassen des Educational Kits hatten.

Das Educational-Kit wurde vom iGEM Team 2013 der Technischen Universität München erstellt.