

**Aufbaupraktikum WS2004/05**

# **Genexpression in Umweltbakterien**

**MPI für marine Mikrobiologie**

Betreuer

Dr. Rabus, Ralf (Tel. 2028-736; Email: [rrabus@mpi-bremen.de](mailto:rrabus@mpi-bremen.de))

Dr. Schüler, Dirk (Tel. 2028-746; Email: [dschuele@mpi-bremen.de](mailto:dschuele@mpi-bremen.de))

und Mitarbeiter

## Einleitung

In ihren natürlichen Habitaten leben Bakterien nicht unter konstanten und optimalen Wachstumsbedingungen, wie man es von ihrer Kultivierung im Labor kennt. Vielmehr sind sie vielfältigen Änderungen der Umweltparameter, wie z.B. Temperatur, Nährstoffe, Redox-Gradienten, sowie allgemeinen Mangelbedingungen ausgesetzt. Diese Veränderungen treten im Tages- und Jahresgang auf. Für das Verständnis ökologisch relevanter Prozesse ist es wichtig zu verstehen, mit welchen molekularen Strategien Bakterien auf die Veränderungen der Umweltparameter reagieren können. Besteht ihre Reaktion in einer differentiellen Genexpression, oder werden alle relevanten Gene konstitutiv exprimiert? So kann die spezifische Expression von Genen unter definierten physiologischen Bedingungen einen ersten Hinweis auf ihre Funktion geben.

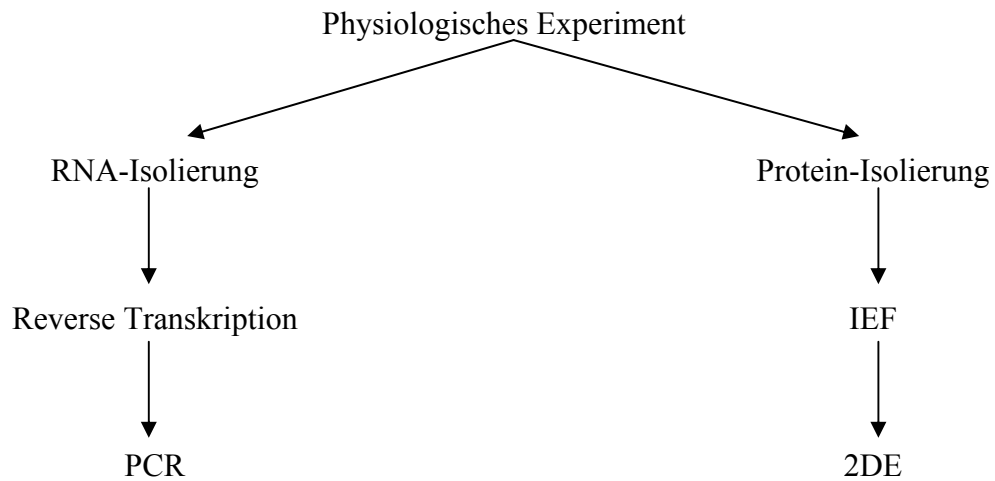
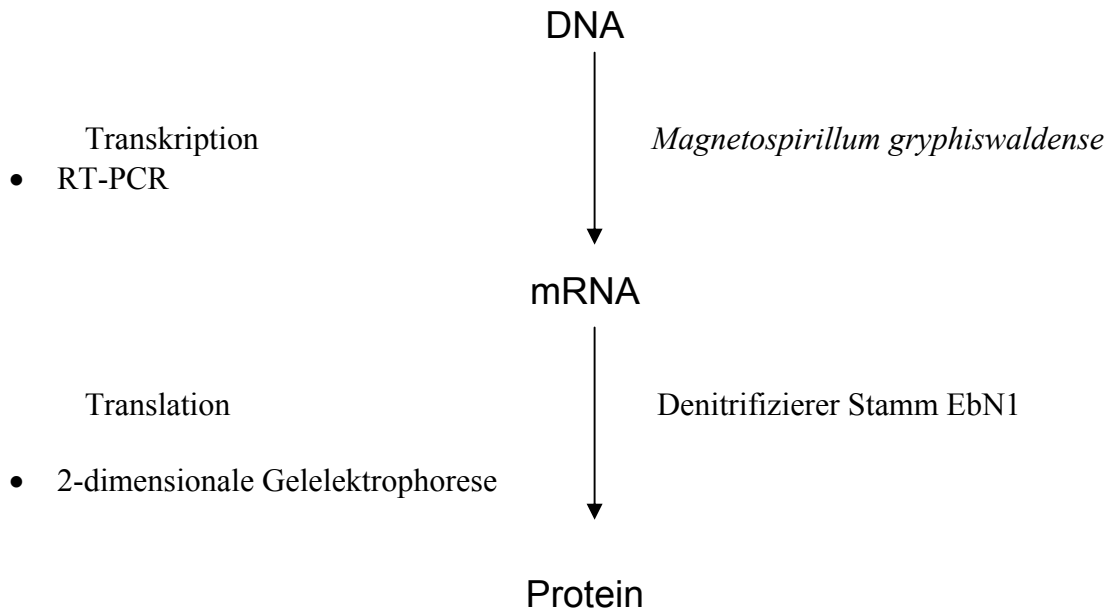
Die Expression von Genen verläuft in einem 2-stufigen Prozeß: (1) Bildung von messenger RNA (mRNA) durch Transkription der Gene, und (2) Synthese der Proteine durch Translation der mRNA. Aus natürlichen Habitaten isolierte Umweltbakterien sind häufig wegen ihrer neuartigen StoffwechsellLeistungen interessant, meist aber biochemisch und genetisch kaum charakterisiert. Für diese Umweltbakterien gibt es daher oft keine entwickelten genetischen Systeme, wie man sie von klassischen Modellorganismen wie z. B. *Escherichia coli* kennt. Stattdessen ist man darauf angewiesen, die Synthese von mRNA, z.B. durch RT-PCR, oder von Proteinen, z.B. durch 2-dimensionale Gelelektrophorese (2DE), als Maß für die Expression der kodierenden Gene direkt zu bestimmen.

In diesem Praktikum sollen diese Methoden der Expressionsanalyse am Beispiel von zwei verschiedenen Bakterien vorgestellt werden:

Teil A: Untersuchung der Expression von Magnetosomen-spezifischen Genen im magnetotaktischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* bei unterschiedlichen Wachstums-Bedingungen durch RT-PCR (D. Schüler).

Teil B: Regulation des Aromatenabbaus im Denitrifizierer Stamm EbN1 durch 2DE (R. Rabus).

## Genexpression



**Teil A: Untersuchung der Expression eines Magnetosomen-spezifischen Gens im magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen durch RT-PCR**

Betreuung:

Dr. Dirk Schüler mit Katja Junge, André Scheffel, Ekaterina Schmidt

1. Wissenschaftlicher Hintergrund
2. Versuchsablauf
3. Versuchsdurchführung
4. Auswertung

## 1. Wissenschaftlicher Hintergrund:

Magnetotaktische Bakterien, die in Sedimenten vieler Gewässer vorkommen, bilden zur Magnetfeldorientierung intrazelluläre Strukturen ("Magnetosomen"), die aus Kristallen eines magnetischen Eisenminerals (meist Magnetit,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) bestehen. Die perfekten magnetischen und kristallinen Eigenschaften der Magnetosomen machen diese z. B. für verschiedene biotechnologische Anwendungen interessant.

Von besonderem Interesse sind die molekulargenetischen und biochemischen Grundlagen, die die Biomineralisation der Magnetosomen im magnetotaktischen Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* steuern. Die Magnetitpartikel sind von einer Lipidhülle umgeben, die spezifische Proteine enthält. Die genaue Funktion dieser Proteine ist noch unbekannt, sie spielen jedoch eine essentielle Rolle bei der biologischen Kontrolle der Magnetitbildung. Viele der Gene für Magnetosomenproteine sind gemeinsam in der sogenannten Magnetosomeninsel im Genom lokalisiert.

Die Magnetosomenpartikel werden in den Bakterien nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen gebildet (niedriger Sauerstoffpartialdruck, Eisenkonzentration im Medium  $>$  ca.  $1 \mu\text{M}$ ). Es soll daher untersucht werden, ob die Expression zweier Magnetosomen-Gene (*mamC/mamB*) durch diese Umweltbedingungen reguliert wird.

Eine sehr empfindliche Methode zur Untersuchung der Transkription bestimmter Gene ist die sogenannte RT-PCR ("Reverse Transkription"-PCR). Dabei wird durch eine reverse Transkriptase-Reaktion eine vorhandene messenger-RNA zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert und nachgewiesen wird. Die Methode ermöglicht Aussagen über die Expression von Genen und eine Abschätzung der Häufigkeit bestimmter Transkripte. Voraussetzung ist allerdings die Kenntnis der DNA-Sequenz des untersuchten Gens, um spezifische Primer für die RT- bzw. PCR-Reaktion synthetisieren zu können.

### Literatur:

Schüler, D. Die Biomineralisation von magnetischen Nanokristallen in magnetotaktischen Bakterien.

Biospektrum, 2000, 6: S. 445-449.

Amplifikation von RNA (RT-PCR), S. 679-681, in: Lottspeich, F. & Zorbas, H. (Hrsg.): Bioanalytik, Spektrum-Verlag 1998

## **2. Versuchsablauf:**

### **1. Tag (Di)**

- Einweisung und Versuchsbesprechung
- Animpfen der Kulturen

### **2. Tag (Mi)**

- Mikroskopische Charakterisierung der Kulturen
- Bestimmung von Magnetismus und OD
- Probenahme für intra-/extrazelluläre Eisenbestimmung
- Isolierung von Gesamt-RNA
- DNase-Behandlung der RNA-Präparation
- Quantifizierung der isolierten RNA durch UV-Spektroskopie
- RNA-Gelelektrophorese
- Durchführung der Reversen Transkriptions-Reaktion
- Ansetzen der PCR

### **3. Tag (Do)**

- Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte
- Bestimmung des intra-/extrazellulären Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektroskopie

### **4. Tag (Fr)**

- Auswertung

### 3. Versuchsdurchführung

#### Anzucht von *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1 u. MSR-1B)

Im Experiment werden die beiden Stämme *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 (Wildtyp) und MSR-1B (nichtmagnetische Mutante) untersucht. Beide Stämme werden unter vier verschiedenen Wachstumsbedingungen, entweder in Eisen (Fe)-freiem oder Fe-haltigem Medium sowie unter aeroben oder mikroaeroben Bedingungen angezogen. Jede Arbeitsgruppe impft zwei verschiedene Medien in vorbereiteten Kulturflaschen an.

Gruppe	Stamm	50 µM Fe	Belüftung
1	a) MSR-1	+	aerob
	b) MSR-1	+	mikroaerob
2	a) MSR-1	+	mikroaerob
	b) MSR-1	-	mikroaerob
3	a) MSR-1	+	mikroaerob
	b) MSR-1B	+	mikroaerob
4	a) MSR-1	-	aerob
	b) MSR-1	+	mikroaerob
5	a) MSR-1B	-	mikroaerob
	b) MSR-1	+	mikroaerob
6	a) MSR-1B	+	aerob
	b) MSR-1	+	mikroaerob

## Zusammensetzung des Mediums für *M. gryphiswaldense*

(sterile Medien werden zur Verfügung gestellt)

HEPES pH 7.0	10	mM
Na-Pyruvat	27	mM
NaNO <sub>3</sub>	4	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,74	mM
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,6	mM
Fe(III)-Citrat	(+/-) 50	µM
Spurenelemente	1	ml/L
Soja-Pepton	3	g/L
Hefeextrakt	0,1	g/L

Mit NaOH wird der pH-Wert des Mediums auf 7,0 eingestellt. Den “eisenfreien” Ansätzen wurden zur Komplexbildung des restlichen, in Spuren vorhandenen Eisens im Medium zusätzlich 10 µM 2,2'-Dipyridyl zugesetzt.

### Animpfen und Kultivierung

Die Kultivierung erfolgt in 100 ml Medium in 250 ml Duranflaschen. Für die aerobe Anzucht werden die Flaschen nur locker mit einem Deckel verschlossen, so daß ein freier Gasaustausch mit der Umgebung möglich ist. Zur mikroaeroben Anzucht werden die Duranflaschen mit einem Butylgummistopfen verschlossen und der Gasraum durch ein 1%iges Sauerstoffgemisch ausgetauscht.

An der Sterilbank werden die Ansätze mittels einer Spritze mit einer frischen 10 ml Fe-freien, mikroaeroben Vorkultur inokuliert. Anschließend werden die Kulturen über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler (100 rpm) inkubiert.

### Probenahme und Charakterisierung der Zellen

Mittels einer Pipette werden 2 ml Probe entnommen und jeweils in ein Eppendorf-Cup (Eppi) überführt. Folgende Wachstumsparameter werden bestimmt:

a) Mikroskopische Charakterisierung:

Zur mikroskopischen Beobachtung der Bakterien Probe entnehmen (ca. 5 µl), Phasenkontrast-Mikroskopie mit 40x Objektiv (=400fache Vergrößerung). Beurteilung von Reinheit, Schwimmverhalten u. magnetische Reaktion (richten sich die Zellen im Magnetfeld aus?-dazu Stabmagneten in die Nähe der Probe bringen).

b) Optische Dichte:

1 ml der Bakterienkultur in Küvette pipettieren, OD Messung (ohne Magnet!) bei 565 nm gegen unbeimpftes Medium

c) Messung der magnetischen Ausrichtung ("Magnetismus") über die Lichtstreuung

*Prinzip:* Suspensionen von magnetischen Bakterien streuen das Licht in Abhängigkeit vom Winkel der magnetischen Feldlinien zum Lichtstrahl: Parallel zum Lichtstrahl orientierte Zellen zeigen eine maximale Streuung, während im rechten Winkel zum Lichtstrahl orientierte Bakterien das Licht minimal streuen. Da der Grad der Ausrichtung proportional zur Zahl der Magnetosomenpartikel pro Zelle ist, läßt sich über einfache Extinktionsmessungen (OD) in unterschiedlich orientierten magnetischen Feldern der durchschnittliche "Magnetismus" der Zellpopulation bestimmen.

*Durchführung:* Ein starker Dauermagnet wird nacheinander parallel und senkrecht zum Strahlengang des Photometers gebracht (markierte Positionen). Dabei wird jeweils die OD von 1 ml Bakteriensuspension bei 565 nm bestimmt. Als relatives Maß für den Magnetitgehalt dient der Quotient der erhaltenen Werte, vereinfacht bezeichnet als "Magnetismus" M:

$$M = (E_{\max}/E_{\min}) - 1.$$

d) Intra- und extrazelluläre Eisenkonzentration:

Die Bildung von Magnetosomen ist verbunden mit einer starken intrazellulären Eisenakkumulation sowie einer Abnahme der Eisenkonzentration im Wachstumsmedium. Über die Bestimmung des intrazellulären und extrazellulären Eisengehalts mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) kann die Magnetitbildung genau verfolgt werden.

*Probenvorbereitung zur AAS-Messung:*

1 ml der Probe wird in ein 'Safe-Twist'-Eppi gefüllt und für 5 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt. 900 µl des Überstandes werden in ein "normales" Eppi gefüllt und der Rest verworfen. Das Pellet und der Überstand werden wie folgt weiterbearbeitet (Abzug!):

Überstand

+ 10 µl 65%ige HNO<sub>3</sub>  
(Vorsicht ätzend,  
Handschuhe, Schutzbrille!)

Pellet

+ 100 µl 65 %ige HNO<sub>3</sub>, Pellet  
resuspendieren

für 3 h bei 98 °C

aufschließen

Nach Abkühlen auf Raumtemp.! mit  
900 µl Aqua bidest. auffüllen

*Bestimmung der Fe-Konzentration mittels AAS:*

Für sechs definierte Eisenstandardlösungen wird die Absorption am AAS ( $\lambda=248,7$  nm) gemessen und daraus eine Bezugsgrößenreihe erstellt (Eisenstandardlösungen werden gestellt). Anhand der sich daraus ergebenden Kalibrierfunktion können die Absorptionswerte der Proben in ppm [mg/l oder µg/ml] Eisen berechnet werden. Die extrazelluläre Eisenkonzentration wird in µM angegeben (Molmasse Fe: 55,847 g/mol). Um die in den verschiedenen Wachstumsansätzen akkumulierten Eisenmengen untereinander vergleichen zu können, müssen die gemessenen intrazellulären Fe-Konzentrationen [ppm] auf die jeweils erreichte Biomasse bezogen werden. Dazu wird der gemessene Wert für die optische Dichte (OD<sub>565nm</sub>) in folgende Gleichung eingesetzt:

$$OD_{565} \times 0,39 - 0,0011 = \text{Trockengewicht [mg/ml]}$$

Um den intrazellulären Eisengehalt in [µg/mg TG] zu erhalten, muß der gemessene Fe-Wert [ppm] auf den errechneten Wert für die Trockenmasse bezogen werden.

## Allgemeine Regeln für das Arbeiten mit RNA

**Achtung!!! RNA ist sehr anfällig für enzymatisch katalysierte Hydrolyse. RNAsen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung (z. B. durch Autoklavieren!) wieder renaturieren. Daher sind besondere Vorkehrungen erforderlich. Beispielsweise sind die Hände eine Quelle von RNAsen, daher stets Handschuhe tragen! Steriles Plastikmaterial verwenden (Eppis, Spitzen, etc.), RNase-freies Reinstwasser ("PCR-H<sub>2</sub>O") verwenden, alle Arbeitsschritte möglichst auf Eis!**

## **Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen)**

(Prinzip und Zusammensetzung der Lösungen siehe Herstellervorschrift)

- vor der Probenahme: 500 µl TE-Puffer mit 0,4 mg/ml Lysozym herstellen, Lysozym-Stammlösung (20 mg/ml) wird gestellt
- 2 ml aus der Kultur entnehmen und in 2 ml Eppi überführen, 3 min bei maximaler Drehzahl zentrifugieren, Überstand vollständig abnehmen und verwerfen, Pellet sofort auf Eis stellen und zügig weiterarbeiten. Wenn die gemessene OD<sub>565</sub> der Kultur < 0,5, weitere 2 ml entnehmen und in das gleiche Eppi geben, erneut zentrifugieren.
- Zellpellet in 100 µl Lysozym-TE-Puffer resuspendieren
- 3-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (*Lyse der Zellwand*)

*Alle weiteren Schritte bei Raumtemperatur durchführen*

- 350 µl Puffer RLT zugeben und gründlich vortexen (*Zellaufschluß, Scheren der genomischen DNA; Achtung: Puffer RLT enthält chaotropes Salz!*)
- 250 µl 96% Ethanol zugeben und mischen durch auf- und ab-pipettieren
- RNeasy Mini Spin-Säule auspacken und die gesamte Probe (700 µl) auf die Säule geben, Säule in Sammelgefäß plazieren, 15 Sekunden zentrifugieren (*RNA bindet an*

*Membran), Durchfluss verwerfen (wegschütten), Säule und Sammelgefäß weiterverwenden*

- 700 µl Puffer RW1 auf die Säule geben, 15 Sekunden zentrifugieren (*Waschen*)

*Durchfluss und Sammelgefäß verwerfen*

- Säule in ein neues 2 ml-Sammelgefäß plazieren, 500 µl Puffer RPE auf die Säule geben, 15 Sekunden zentrifugieren (*Waschen*)

*Durchfluss verwerfen, Sammelgefäß weiterverwenden*

- 500 µl Puffer RPE auf die Säule geben, 2 Minuten bei max. Geschwindigkeit zentrifugieren (*Membran trocknen*), *Durchfluss verwerfen*
- Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß plazieren, 30 µl H<sub>2</sub>O direkt auf die Membran auftragen, 1 Minute zentrifugieren
- weitere 30 µl H<sub>2</sub>O direkt auf die Membran auftragen, 1 Minute zentrifugieren

*(Elution der RNA)*

- Eppi mit RNA auf Eis, Ansatz teilen: 1/3 aufbewahren (dient später als DNA-haltige Kontrolle bei RNA-Elektrophorese sowie bei der PCR), 2/3 (ca. 40 µl) für DNase-Behandlung

## DNASE-BEHANDLUNG DER ISOLIERTEN RNA

- 40 µl der RNA-Lösung in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- 0,1 Vol. 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase zugeben und sanft mischen
- 20-30 Minuten bei 37°C inkubieren
- Inkubation für 5 min bei 65° C zur thermischen Inaktivierung der DNase
- Proben auf Eis

## QUANTIFIZIERUNG DER RNA (Absorptionsmessung bei 260 nm)

– Verdünnungen der RNA-Proben herstellen: z. B. 75 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl Probe, kann direkt in der Küvette erfolgen, gut mischen (auf- u. abpipettieren), auf Lufblasenfreiheit achten!

– Photometer-Einstellungen:

- **RNA**                   setzt Wellenlänge auf 260 nm
- **BLANK**               Messung des Blindwerts von H<sub>2</sub>O in UV-durchlässiger Kunststoffküvette
- **DILUTION**           Eingabe des Probe/Diluent Verhältnis (5:75 µl)
- **SAMPLE**            Messung der verdünnten Probe, Extinktion<sub>260</sub> soll > 0.1 sein

## **AGAROSE-GELELEKTROPHORESE (natives MOPS-Gel für RNA)**

- jeweils 2 Gruppen teilen sich ein Gel, 2 Kämme pro Gel verwenden
- Gießen des Agarosegels
  - 30 ml 1,5%ige Agarose-Lösung herstellen: Agarose in 100 ml-Duranflasche einwiegen, 30 ml 1x MOPS-Puffer zugeben
  - vor und nach dem Aufkochen wiegen, Verdunstungsverlust mit H<sub>2</sub>O auffüllen (Spritzenflasche)
  - Agarose in der Mikrowelle (440 W, 2-3 Minuten) vollständig lösen, beim Erhitzen: Duranflasche locker mit Deckel verschließen, ständig beobachten und mehrfach schütteln, um Überkochen zu vermeiden! Schutzhandschuhe tragen!
  - Gellösung auf ca. 60°C abkühlen (Wasserbad!) und in die Apparatur gießen, 2 Kämme einstecken, Gel ca. 15-30 Minuten erstarren lassen, Laufpuffer einfüllen (1x MOPS), Kämme ziehen
- RNA-Lösung (beide RNA-Präps vor u. nach DNase-Verdau): 5 µl mit 2 µl Ladepuffer versetzen
- als Größen-Standard *E. coli* 16S + 23S rRNA (0,5 µg und 1 µg) auftragen (Standard mit 0,1 µg RNA /µl wird gestellt)
- Proben submers auftragen, Elektrophorese bei 75 V ca. 50 min
- Gel in Ethidiumbromidlösung färben (ca. 15 min), ca. 15 min in Wasser entfärben (Achtung: Ethidiumbromid ist stark giftig! Blaue Handschuhe!)
- unter UV-Licht anschauen u. fotografieren

## **REVERSE TRANSKRIPTION (Erststrang-cDNA-Synthese)**

Die RNA-abhängige Reverse Transkriptase benötigt einen DNA-Primer zum Start der DNA-Synthese. Im Versuch werden random-Primer (Gemisch aus Hexanucleotiden unterschiedlicher Sequenz) verwendet, die "zufällig" an die RNA binden und zu einem Pool unterschiedlich langer cDNAs führen.

### Durchführung:

- 20 µl-Reaktion (Endvolumen) in 1,5 ml Eppendorfgläsern ansetzen (nur von DNase behandelten Präp.). Als Kontrolle auf DNA-Kontaminationen: parallel zu jeder RNA-Probe einen identischen Ansatz ohne das Enzym Reverse Transkriptase herstellen (anstelle des Enzyms gleiches Volumen H<sub>2</sub>O zusetzen) und inkubieren.
- 1 µg RNA mit PCR-H<sub>2</sub>O auf 10 µl auffüllen und 1 µl Primer-Lösung zufügen (*Boehringer hexanucleotide mixture 1:50*). 10 Minuten bei 70°C denaturieren, zum Abkühlen auf Eis stellen, anschließend kurz zentrifugieren.
- Folgende Reagenzien zufügen:
  - 4 µl 5x RT-Puffer
  - 4 µl 2,5 mM dNTP (Endkonzentration = 500 µM)
- 2 Minuten bei 37° C inkubieren
- 1 µl Reverse Transkriptase (M-MLV-RT [200 U/µl]) zufügen und 1 Stunde bei 37° C inkubieren.
- Proben erhitzen auf 95°C für 5 Minuten (Abstoppen der Reaktion), zum Abkühlen auf Eis stellen, anschließend kurz zentrifugieren. RT-Mix einfrieren.

## PCR-Amplifikation

Mit Hilfe der PCR wird ein Fragment des *mamC* bzw. *mamB*-Gens amplifiziert (wird gruppenweise durch die Betreuer spezifiziert).

Primer:

F-Primer für *mamC* (AGmamC-f/Sonde)

R-Primer für *mamC* (ASmamDC\_r)

F Primer für *mamB*: mamB-MSR1-fw

R-Primer für *mamB*: mamB-MSR1-rv

Identische Reaktionen mit folgenden Templates sind anzusetzen:

- pro Wachstumsbedingung je ein Aliquot aus RT-Ansatz mit und ohne RT-Enzym
- pro Wachstumsbedingung je ein Aliquot der RNA-Präparation vor der DNase-Behandlung (dient als DNA-haltige Positivkontrolle)
- als Negativkontrolle: ein Ansatz ohne Template (stattdessen 2 µl H<sub>2</sub>O)

Jeweils 25 µl-Reaktion (Endvolumen) in 0,5 ml PCR-Eppis, für einen Ansatz:

1x PCR-Pre-Mix	12,5 µl 2x PCR-Pre-Mix*
0,8 µM F-primer	2 µl F-primer [10 µM]
0,8 µM R-primer	2 µl R-primer [10 µM]
Template	2 µl
H <sub>2</sub> O	6,5 µl

Für die PCR einen "MasterMix" herstellen, d.h. entsprechende Menge PCR-Reagenzien für alle Proben(ohne Template) sowie eine zusätzliche Probe (als Ausgleich für Pipettierungenauigkeiten) zusammenpipettieren (d. h. Reagenzien in Eppi mit 2x PCR-Pre-Mix\* (Promega) ansetzen, 100 µl Pre-Mix sind bereits vorgelegt), in 23 µl-Portionen auf 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße verteilen, dann 2 µl des jeweiligen Templates zugeben.

\*Pre-Mix enthält bereits dNTPs, Puffer, Magnesium, sowie die Taq-Polymerase in der entsprechenden Konzentration

PCR-Programm:

- 30 sec 94 °C (Denaturieren)
- 30 sec 55 °C (Annealing)

- 2 min 72° C (Extension)
- Zyklus 29x wiederholen
- 10 min 72 °C
- hold 20° C

## DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

- jeweils 2 Gruppen teilen sich ein Gel, 2 Kämme pro Gel verwenden
- Gießen des Agarosegels
  - 30 ml 2%ige Agarose-Lösung herstellen: Agarose in 100ml-Duranflasche einwiegen, 30 ml 1x TAE-Puffer zugeben
  - vor und nach dem Aufkochen wiegen, Verdunstungsverlust mit H<sub>2</sub>O auffüllen (Spritzenflasche)
  - Agarose in der Mikrowelle (440 W, 2-3 Minuten) vollständig lösen, beim Erhitzen: Duranflasche locker mit Deckel verschließen, ständig beobachten und mehrfach schütteln, um Überkochen zu vermeiden! Schutzhandschuhe tragen!
- Lösung auf ca. 60°C abkühlen und in die Apparatur gießen, 2 Kämme einstecken, Gel ca. 15-30 Minuten erstarren lassen, Laufpuffer einfüllen (1x TAE), Kämme ziehen
- 25 µl PCR-Ansatz mit 5 µl Ladepuffer versetzen, davon jeweils 10 µl sowie Längenstandard (5 µl) auftragen
- Elektrophorese bei 75 V ca. 50 min
- Gel in Ethidiumbromidlösung färben (ca. 15 min), kurz in Wasser entfärben (Achtung: Ethidium-Bromid ist stark giftig! Handschuhe!)
- unter UV-Licht betrachten u. fotografieren

#### **4. HINWEISE ZUR AUSWERTUNG DES VERSUCHS**

- Charakterisierung von Wachstum, Mikroskopie, Magnetismus, Eisengehalt, Vergleich zwischen Stamm MSR-1 und MSR-1B, Unterschiede zwischen Wachstumsbedingungen
- Qualität und Ausbeute der RNA-Präparation?
- Ergebnis der PCR-Amplifikation: Welche Rückschlüsse lassen sich in Bezug auf die Transkription und Regulation von *mamC* bzw. *mamB* ziehen?
- Diskussion der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Ergebnissen der anderen Gruppen

## **Teil B: Regulation des Aromatenabbaus im Denitrifizierer Stamm EbN1 durch 2DE**

Betreuung: Dr. Ralf Rabus mit Lars Wöhlbrand und Daniela Lange

1. Einleitung
  - Eigenschaften aromatischer Verbindungen
  - Allgemeine Eigenschaften von Stamm EbN1
  - Genom von Stamm EbN1
  - Fragestellung
2. Proteomics, Prinzip der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2DE)
3. Ablaufschema einer 2DE-Analyse
4. Protokoll: Bradford-Assay
5. Protokoll: Silber-Färbung
6. Scannen der Gele
7. Zeitplan

## 1. Einleitung

### Eigenschaften und Abbau aromatischer Verbindungen

Aromatische Verbindungen sind häufige Produkte höherer Pflanzen und Hauptbestandteile von Rohöl. Die anthropogene Freisetzung von Öl-basierenden Akybenzolen und phenolischen Verbindungen belastet die Umwelt. Daher ist der mikrobielle Abbau von aromatischen Verbindungen seit langem von ökologischem und mikrobiologischem Interesse. Aromatische Verbindungen zeichnen sich durch hohe chemische Stabilität (aromatisches System) und strukturelle Vielfalt aus. Daher ist eine Vielfalt von Enzymen am Abbau der verschiedenen Aromaten beteiligt. Einige dieser Enzyme haben Potential für biotechnologische Anwendungen.

Am natürlichen Standort kommt es durch Aktivität aerober Mikroorganismen häufig zum vollständigen Verbrauch von Luftsauerstoff und damit zu einem Gradienten von oxischen hin zu anoxischen Bedingungen. Aerobe Abbauer verwenden Luftsauerstoff nicht nur als terminalen Elektronenakzeptor, sondern auch als hochreaktives Co-Substrat für die Hydroxylierung und Spaltung der aromatischen Ringe. Der anaerobe Aromatenabbau ist erst seit einigen Jahren bekannt und beinhaltet eine Vielzahl neuartiger Reaktionen bzw. Enzyme.

### Allgemeine Eigenschaften von Stamm EbN1

Stamm EbN1 wurde Anfang der 90er Jahre aus Sedimenten von Gräben und der Weser (Bremen) mit Ethylbenzol als einziger organischer C-Quelle und Nitrat als Elektronenakzeptor isoliert. Die Energiegewinnung erfolgt durch O<sub>2</sub>-Respiration oder Denitrifikation. Stamm EbN1 kann folgende aromatische Verbindungen abbauen:

#### ANAEROB:

Toluol, Ethylbenzol, Phenylalanin, Phenylacetat, *p*-Cresol, Phenol, 4-Hydroxybenzoat, *R/S*-1-Phenylethanol, Acetophenon, 3-Hydroxybenzoat, Benzoat

#### AEROB:

Benzoat, Phenylacetat, 2-Aminobenzoat, Gentisat

Stamm EbN1 gehört zu einem neuen Cluster von Betaproteobakterien. Es enthält die Mehrzahl aller bislang bekannten Denitrifizierer, die anaerob Aromaten, *n*-Alkane oder Monoterpene abbauen können. Dieses Cluster wird in Zukunft als neue Gattung beschrieben. Diese „neuen“ Abbauer sind nahe verwandt zu den N<sub>2</sub>-fixierenden Pflanzen-Endosymbionten der Gattung *Azoarcus* und zu den anaeroben Abbauern der Gattung *Thauera*.

### Genom von Stamm EbN1

Das Genom von Stamm EbN1 wurde vor kurzem bestimmt (2004). Es ist das erste eines Vertreters der *Azoarcus/Thauera* Verwandtschaftsgruppe. Das Genom besteht aus einem zirkulären Chromosom (4.3 Mb) und 2 Plasmiden (0,21 und 0,22 Mb), und enthält 4603 vorhergesagte ORFs. Auf dem Chromosom werden 10 anaerobe und 4 aerobe Aromaten-Abbauwege kodiert, wobei die Gene eines Abbauweges meist in Clustern vorliegen. Die metabolische Vielseitigkeit von Stamm EbN1 spiegelt sich auch im Vorkommen multipler respiratorischer Komplexe wider. Das Genom enthält auch eine grosse Zahl an regulatorischen Proteinen, inkl. mehr als 30 zwei-Komponenten Regulatorsysteme und mehrere FNR-Typ Regulatoren. Daher scheint Stamm EbN1 über ein fein abgestimmtes Regulationssystem zu verfügen, um sich wechselnder Verfügbarkeit von organischen Substraten und Elektronenakzeptoren in der Umwelt anzupassen.

### Literatur

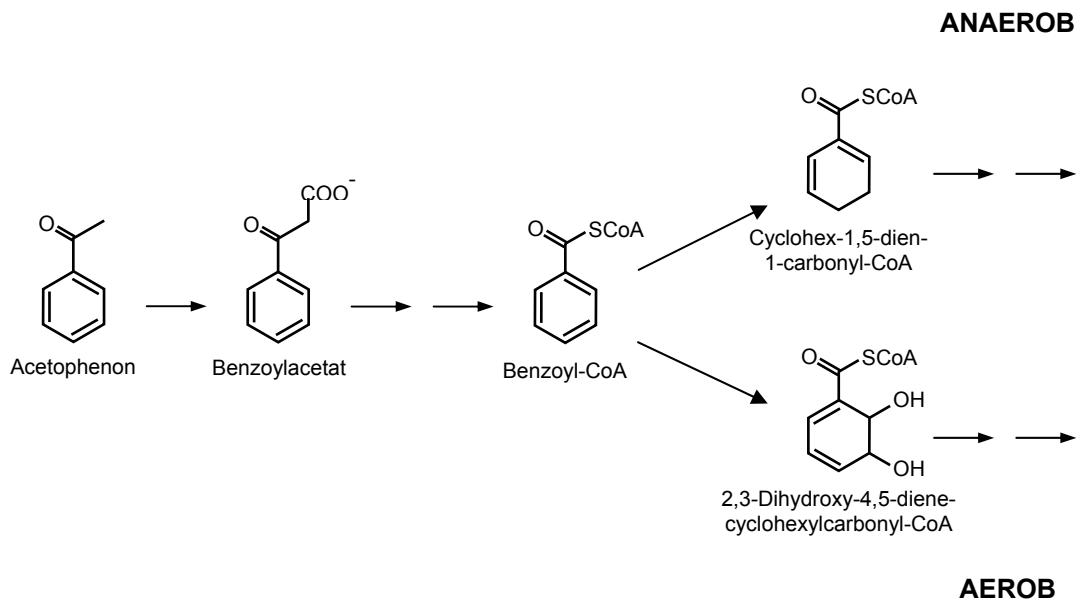
Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. Arch Microbiol 163:96-103

Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F, Reinhardt R (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. Arch Microbiol 183:27-36

## Fragestellung

Im Rahmen des Praktikums soll der Abbau von Acetophenon (bekannter Pflanzenmetabolit und Intermediat des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol) bei aerobem und anaerobem Wachstum mit Hilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese untersucht werden. Dabei soll zwei Fragen nachgegangen werden (siehe auch Abbildung):

1. Wird unter beiden Bedingungen die gleiche hinführende Reaktion von Acetophenon zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA beschritten? D.h. wird die vom anaeroben Abbau bekannte Acetophenon-Carboxylase auch unter aeroben Bedingungen gebildet?
2. Ist der weiterführende Abbau von Benzoyl-CoA Sauerstoff-abhängig reguliert (anaerobe reduktive Dearomatisierung versus aerobe Ringhydroxylierung mit Luftsauerstoff)?



## **2. Proteomics, Prinzip der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2DE)**

Mit der Sequenzierung des ersten bakteriellen Genoms (*Haemophilus influenzae*) im Jahr 1995 erhielt die mikrobielle Genomforschung enormen Aufschwung. Seither nimmt die Zahl der sequenzierten Bakteriengenome rasant zu. Durch die funktionale Genomanalyse (Annotation der Genomsequenz, genomweite Expressionsanalyse mit Hilfe von Mikroarrays und 2DE) sollen nun den Sequenzen einzelne biologische Funktionen zugewiesen werden.

Durch Proteomics wird genomweite Expressionsanalyse auf Protein-Ebene durchgeführt. Das Proteom besteht aus der Summe aller Proteine, die vom Genom eines Organismus unter definierten Bedingungen exprimiert werden. Eine Schlüsseltechnik in der Proteomforschung ist die 2-dimensionale Gelelektrophorese (2DE). Die 2DE ist zur Zeit die einzig verfügbare Methode, die es erlaubt, aus einem Proteingemisch (hunderte bis tausende verschiedener Proteine) hochauflösend einzelne Proteinspecies zu isolieren.

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung müssen Proteine aus den Zellen des Probenmaterials extrahiert werden. Der Aufschluß der Zellen durch Ultraschall oder French-Press erfolgt bereits unter denaturierenden Bedingungen (hohe Konzentration von Harnstoff). Durch differentielle Zentrifugation können verschiedene Fraktionen (z.B. Cytoplasma oder Membranen) hergestellt werden. Von diesen Fraktionen werden definierte Proteinmengen in die 2DE eingesetzt.

Die 2DE stellt eine Kombination zweier gelelektrophoretischer Methoden dar: (1) die isoelektrische Fokussierung (IEF) und (2) die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).

Der isoelektrische Punkt (IP) eines Proteins ist der pH-Wert, bei dem das Protein ladungsneutral ist. Während der IEF wandern Proteine in einem pH-Gradienten zu dem pH-Wert, der ihrem IP entspricht; dort werden sie fokussiert. Die IEF bezeichnet man auch als die erste Dimension der 2DE.

Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes (MW) können den selben IP haben. Um diese Proteine voneinander zu trennen, wird im Anschluß an die IEF eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Proteine nach ihrem MW aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE bezeichnet man auch als die zweite Dimension der 2DE. Nach Auftrennung durch 2DE müssen die einzelnen Proteinspecies detektiert und identifiziert werden.

Für die Detektion der aufgetrennten Proteine stehen verschiedene Farbstoffe bzw. Färbeverfahren zur Verfügung:

1. Coomassie
2. Silber
3. Fluoreszenz
4. Isotopenmarkierung

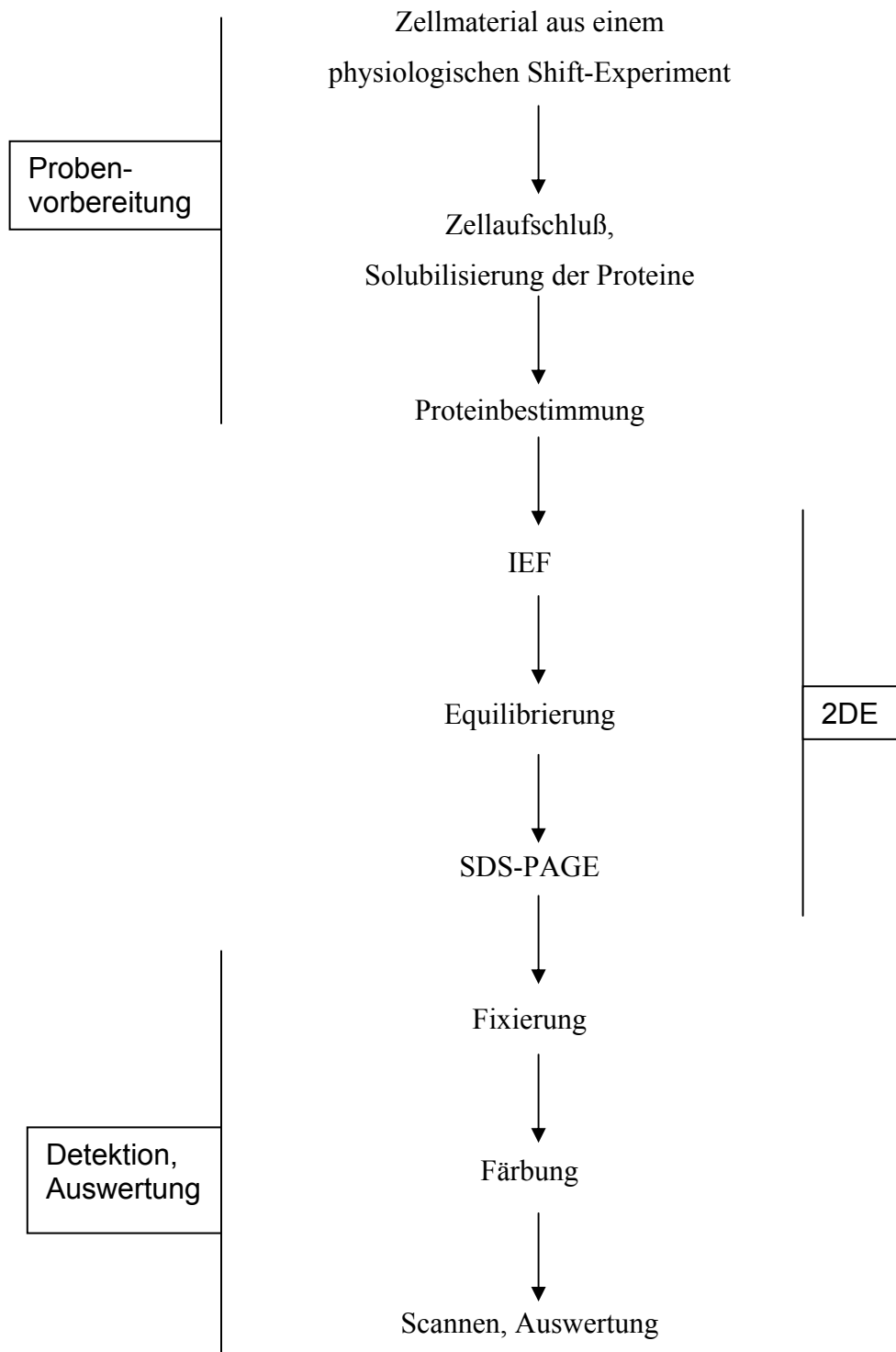
Der Einsatz von speziellen Software-Tools erlaubt eine weitestgehend automatische Spot- und Mustererkennung.

Die Identifizierung der detektierten Proteine erfolgt im Wesentlichen über 2 Methoden:

1. Direkte Sequenzierung der Aminosäuren (N-terminal oder intern)
2. Massenspektrometrie (insbes. MALDI-TOF)

Aminosäure-Sequenzen bzw. Ergebnisse aus der Massenspektrometrie erlauben den Abgleich mit der genomischen Sequenz und damit die Identifizierung der kodierenden Gene.

### 3. Ablaufschema einer 2DE-Analyse



Innerhalb der uns täglich zur Verfügung stehenden Zeitfenster während des Aufbaupraktikums ist es nicht möglich eine 2DE-Analyse ausgehend vom physiologischen Experiment bis hin zur computergestützten Auswertung der Proteinmuster durchzuführen. Um dennoch einen Eindruck von der Methodik der 2DE vermitteln zu können, werden von den Studenten und Betreuern unterschiedliche Schritte des Gesamtablaufes (siehe vorherige Seite) durchgeführt bzw. vorbereitet.

1. Stamm EbN1 wurde bei 24 °C mit Acetophenon bzw. Benzoat als einziger Kohlenstoffquelle unter Nitrat-reduzierenden sowie aeroben Bedingungen angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Zellmaterial wurde bis zur Herstellung der Zellextrakte bei -80°C gelagert (Betreuer).
2. Das Zellmaterial wurde in Harnstoff/Thioharnstoff/CHAPS-haltigem Solubilisierungspuffer resuspendiert und durch Behandlung mit einem Mörser aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation wurden Zelltrümmer und Membranen entfernt. Die so erhaltenen Extrakte der löslichen Proteine wurden bis zum Beginn des Praktikums ebenfalls bei -80°C gelagert (Betreuer).
3. Die Studenten erstellen eine BSA-Eichkurve und bestimmen den Proteingehalt der Zellextrakte mit Hilfe des Bradford-Assays. An Hand des Proteingehaltes berechnen die Studenten in welchen Verdünnungen die Zellextrakte in die IEF eingesetzt werden können.
4. Die Betreuer führen die IEF und SDS-PAGE in 12 Parallelen durch. Die Studenten können vor Beginn bzw. am Ende der entsprechenden Praktikumstage diese Schritte gerne mitverfolgen.
5. Die Studenten führen im Anschluß an die Elektrophorese eine Silber-Färbung zur Detektion der Proteinspots durch. Parallel dazu werden Gele von den Betreuern mit Coomassie gefärbt.
6. Die Studenten digitalisieren die gefärbten Gele durch Scannen.

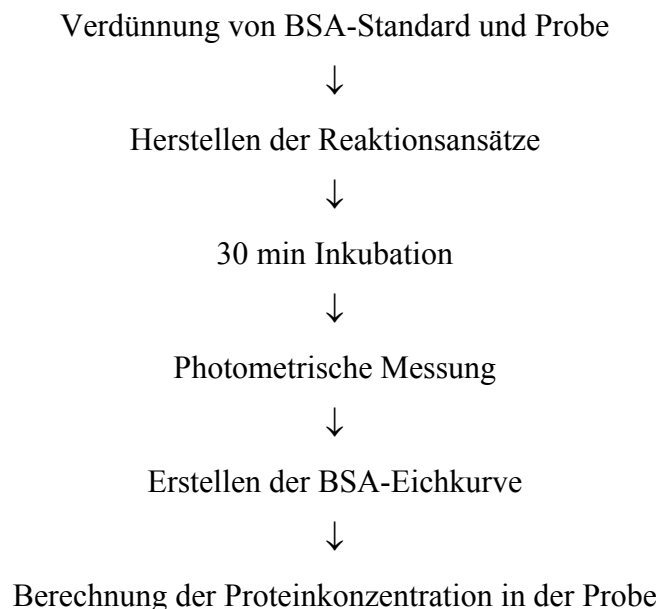
## 4. Protokoll: Bradford-Assay

### Theoretischer Hintergrund

Der Bradford-Assay basiert auf der unspezifischen Bindung von blauen Säurefarbstoffen (Coomassie-Brillantblau; polyaromatisch, Sulfonat-Gruppen) an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Am wichtigsten ist die Wechselwirkung mit Arginin. Im sauren Milieu liegt das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffes bei 595 nm. Zur Einstellung des sauren Milieus enthält das Bradford-Reagenz Phosphorsäure. Bei der Analyse von 2DE-Gelen mit Hinblick auf differentielle Genexpression wird die Proteinmenge einzelner Spots quantifiziert. Dafür ist entscheidend von den zu vergleichenden Proteinproben für die IEF gleiche Mengen an Gesamtprotein einzusetzen.

Der Coomassiefarbstoff kann auch zur Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen verwendet werden. Im Vergleich zur Silberfärbung ist die Färbung mit Coomassie um den Faktor 100 weniger sensitiv.

### Ablaufschema



Bradford-Assay:

1. 0,8 ml verdünnte Probe bzw. Standardlösung
2. 0,2 ml Bradford-Reagenz
3. gut mischen
4. 30 min Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
5. Messung der Absorption bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$

Eichkurve:

- Jede Gruppe erstellt eine Eichkurve
- Konzentration des BSA-Stammlösung: 1,24 mg/ml
- Von der 20 $\mu\text{g/ml}$  Vorverdünnung sollen 4 ml hergestellt werden: Wieviel  $\mu\text{l}$  der Stammlösung werden benötigt?
- 3 Parallelen; Verdünnungen in einem Gesamt-Volumen von 800  $\mu\text{l}$
- Blank ist Probe ohne BSA
- Eichgerade auf Millimeterpapier
- Durchschnittswerte auftragen

<b>BSA-Konzen. [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>20 <math>\mu\text{g/ml}</math> BSA-Vorverd. [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Absorption bei <math>\lambda = 595 \text{ nm}</math></b>		
0					
1					
2					
4					
6					
8					
10					

Proben:

- Jede Gruppe bestimmt den Proteingehalt einer Probe
  - Gruppe 1+2: Anzucht auf Acetophenon (anaerob)
  - Gruppe 3+4: Anzucht auf Acetophenon (aerob)
  - Gruppe 5+6: Anzucht auf Benzoat (anaerob)
  - Gruppe 7+8: Anzucht auf Benzoat (aerob)
- Absorptionswerte für die Proben müssen im linearen Bereich der Eichkurve sein. Deshalb wird die Probe verdünnt.
- 3 Parallelen; Verdünnungen in einem Gesamt-Volumen von 800  $\mu\text{l}$

<b>Verd. Der Probe</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Probe bzw. verd. Probe [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>Absorption bei <math>\lambda = 595 \text{ nm}</math></b>		
1:100			-	-	-
1:1000					
1:2000					
1:5000					
1:10000					

Proteinkonzentration berechnen durch:

1. Abgleich der Absorptionswerte (Durchschnittswerte) mit der Eichkurve
2. Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors

Berechnung der Probemenge für die IEF:

- Das Probevolumen für die IEF (24 cm lange IPG-strips) beträgt 450  $\mu\text{l}$ .
- Die Proteinmenge pro Gelstreifen soll 50  $\mu\text{g}$  betragen.
- Wieviel  $\mu\text{l}$  Probe muß in die IEF eingesetzt werden?

## 5. Protokoll: Silber-Färbung

### Theoretischer Hintergrund

Die Silberfärbung ist die sensitivste (< 1 ng Protein pro spot), nicht-radioaktive Färbemethode für Proteine. Silber-Ionen binden an Proteine. Durch funktionelle Gruppen und die Peptidbindungen werden die Silber-Ionen zu metallischem Silber reduziert und sogenannte Kristallisationskeime gebildet. Während der Entwicklung findet die Reduktion von Silber-Ionen zu metallischem Silber bevorzugt an diesen Kristallisationskeimen statt. Deshalb werden Proteinspots schneller durch das Silber gefärbt (braun bis schwarz) als der Hintergrund. Um eine zu starke Färbung des Hintergrunds zu vermeiden, muß die Entwicklung rechtzeitig durch Absenken des pH-Wertes gestoppt werden.

Wegen der hohen Empfindlichkeit der Silberfärbung muß auf genaues Einhalten der Inkubationszeiten, Schnelligkeit beim Stoppen des Entwicklungs-Schrittes sowie insgesamt auf hohe Sauberkeit (z.B. Tragen von Handschuhen und Verwendung von reinsten Chemikalien und Reinstwasser) geachtet werden. Dies ist wichtig für die Reproduzierbarkeit der Silberfärbung und die Vermeidung eines hohen Hintergrundes.

Die Methode der Silberfärbung besteht im Wesentlichen aus 5 Schritten:

1. Durch Fixierung werden die Proteine immobilisiert ("Fixierung" der Position der einzelnen Proteinspots) und störende Begleitsubstanzen (z.B. SDS, Carrier Ampholyte) aus dem Gel entfernt.
2. Die Sensitivierung dient dazu die anschließende Silberfärbung zu verstärken. Alle sensitivierenden Reagenzien (z.B. Glutaraldehyd) binden an das Protein und binden entweder Silber-Ionen, oder reduzieren Silber-Ionen zu metallischem Silber oder bilden Silbersulfid.
3. Sättigung der Gele mit Silber-Ionen durch Inkubation der Gele in Silbernitrat.
4. Entwicklung der Gele. Bei Gelen, die mit Silbernitrat behandelt wurden, enthält die Entwicklerlösung Formaldehyd, Carbonat und Thiosulfat. Formaldehyd reduziert das

ionische Silber zur metallischen Form. Carbonat dient zur Entfernung von überschüssigen Silber-Ionen. Durch Thiosulfat wird der Hintergrund reduziert.

5. Stoppen der Entwicklung durch Absenken des pH (Zugabe von Essigsäure).

### Lösungen

- pro Gel werden von jeder Lösung 400 ml eingesetzt.
- Fixativ 1: Ethanol, Essigsäure
- Inkubations-Lösung: Ethanol, Na- Acetat, Na-Thiosulfat
- Silbernitrat: Silbernitrat
- Waschlösung: Na-Carbonat
- Entwickler: Formalin, Na-Carbonat, Na-hydrogencarbonat, Thimerosal
- Stop: Titriplex III

### Durchführung

- 400 ml Lösung pro Gel
  - Raumtemperatur
  - langsames Schütteln
1. **Fixieren** der Gele für mind. 2 h (Betreuer)
  2. Gele für 1 h in **Inkubations-Lösung** inkubieren
  3. Gele 2 × 10 Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> **waschen**
  4. Gele für 1h in **Silbernitrat-Lösung**
  5. Gele **waschen** für 1 min in H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub>
  6. Gele für 1 min in **Na-Carbonat-Lösung** spülen
  7. Gele in **Entwickler-Lösung** legen bis Spots sichtbar werden (ca. 5-8 min; max. 20 min)
  8. Gele für 10 min in **Stop-Lösung** legen
  9. Gele 1 × mit H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> waschen, dann in H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> in Färbeschalen über Nacht liegen lassen.

## 5. Scannen der Gele

Die Identifizierung von Unterschieden in den Proteinmuster von 2DE-Gelen unterschiedlicher Proteinproben (unterschiedlicher physiologischer Kontext) ist der nächste Schritt in der Analyse der Genexpression auf der Ebene des Proteoms.

Spotidentifizierung, Mustererkennung und Vergleich der Proteinmuster mit Hilfe von Auswertesoftware setzt eine Digitalisierung der Gele voraus. Dies geschieht durch Scannen der Gele.

Die gefärbten Gele liegen in Wasser in den Färbeschalen. Die Gele werden mit einem Durchlicht-Scanner gescannt.

### Arbeitsschritte:

1. Die Glasoberfläche des Scanners wird mit etwas Wasser benetzt (Gele sollen auf der Glasoberfläche verschiebbar sein).
2. Das Gel wird auf die Glasoberfläche gelegt (Vorsicht: die Gele können leicht einreißen).
3. Luftblasen zwischen Glasoberfläche und Gel entfernen.
4. Vorderes Glasfenster abwischen.
5. Plastikstreifen vor das vordere Glasfenster legen.
6. Deckel schließen.
7. Scannen mit dem Programm Labscan.
8. Ausdrucken des gescannten Bildes.

## 7. Zeitplan

### 1<sup>ter</sup> Tag (Di)

Versuchsbesprechung  
12:30-17:00 Bradford-Assay; Start IEF

### 2<sup>ter</sup> Tag (Mi)

10:00-10:30 Theorie zu den Prinzipien von IEF, Equilibrierung und SDS-PAGE  
ca. 13:30 Demonstration von IPGPhor und SDS-PAGE Apparaturen

### 3<sup>ter</sup> Tag (Do)

10:00-10:30 Silber-Färbung I  
11:30-12:00 Silber-Färbung II  
13:00-14:30 Silber-Färbung III  
  
ab 14:30 Scannen der Gele und Sauber machen

### 4<sup>ter</sup> Tag (Fr)

8:00-9:00 Ergebnis-Diskussion