
Molekularbiologischer Teil

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

E. coli Stamm BI21(DE3)
E. coli Stamm DH10
E. coli Stamm DH5 α
E. coli Stamm AM943(met⁻)

Alle Bakterienstämme entstammten der institutseigenen Stammsammlung.

2.1.2 Expressionsvektoren

pBT288 von Herrn Dr. Alonso (Madrid) zur Verfügung gestellt.
(*Pma* CI - *Mn*I I Fragment aus pSM19035 in pT712 ligiert)
pT712 Genbankzugriffsnummer: L08949
pQE60 (Qiagen, Hilden)
pTrc99A (Stratagene, La Jolla, CA92037 USA)

Alle Expressionsvektoren besaßen ein Ampicillinresistenzgen, deshalb wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum eingesetzt.

2.1.3 Primer (Oligonukleotide)

In der folgenden Auflistung sind die *Primer*-Sequenzen wiedergegeben. Von der Originalsequenz des pBT288 abweichende Sequenzen sind unterstrichen, Schnittsequenzen sind fett dargestellt, Start- und Stopkodons sind schattiert;

pQE60 _{Std. for.}	ggcgatcaccgagggcccttcg	5' <i>Primer</i> bindet 100 bp entfernt von <i>Nco</i> I Schnittstelle von pQE60
pQE60 _{Std. rev.}	ccgagcgttctgaacaaattcag	3' <i>Primer</i> bindet 100 bp entfernt von <i>Bam</i> HI Schnittstelle von pQE60
pTrc99A _{Std. for.}	ccggctcgataatgtgtgg	5' <i>Primer</i> bindet 100 bp entfernt von <i>Nco</i> I Schnittstelle von pTrc99A
pTrc99A _{Std. rev.}	ccgcaaaacagccaagcttgc	3' <i>Primer</i> bindet 100 bp entfernt von <i>Bam</i> HI Schnittstelle von pTrc99A
ϵ _{for.}	<u>cgccatgg</u> gcagttacgtatgaaaaacattg	5' <i>Primer</i> bindet über Startkodon von Gen ϵ ; Mutation zu <i>Nco</i> I Schnittstelle
ζ _{for.}	gagaaagtggtaccatggcaaatatagtcaatt	5' <i>Primer</i> bindet über Startkodon von Gen ζ ; Mutation zu <i>Nco</i> I Schnittstelle
ζ _{rev.}	<u>cgggatccttata</u> aatacctggaagtttaggtgtttggg	5' <i>Primer</i> bindet über Startkodon von Gen ζ ; Mutation zu <i>Nco</i> I Schnittstelle
$\epsilon\zeta$ _{mut (K46A)for.}	ccagggtcaggggcaaccagtttgcgatc	5' Mutations <i>primer</i> für ζ (K46A)
$\epsilon\zeta$ _{mut (K46A)rev.}	gatcgcaaaactggtgcccctgaccctgg	3' Mutations <i>primer</i> für ζ (K46A)

$\epsilon\zeta$ mut_{(R171S)for.} caatgacagccagcgcaacaccaaacaagc
 $\epsilon\zeta$ mut_{(R171S)rev.} gcttggtttggtgtgctgctggctgtcattg
 $\epsilon\zeta$ mut_{(V234Stop)rev.} cgggatccttatttacgattcaattcttttctaag

5' Mutationsprimer für ζ (R171S)
 3' Mutationsprimer für ζ (R171S)
 3' Mutationsprimer für ζ (V234Stop)
 Mutation zu Stopkodon nach Val ζ 234 und
 anschließender BamHI Schnittstelle

2.1.4 Nährmedien zur Zellanzucht

LB-Medium (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989)

Pepton von Casein	10 g
Hefeextrakt SERVABACTER®	5 g
NaCl	5 g

mit entionisiertem H₂O auf 1l aufgefüllt, gelöst und für 20 min bei 121°C sterilisiert;

2 x YT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Pepton von Casein	16 g
Hefeextrakt SERVABACTER®	10 g
NaCl	5 g

mit entionisiertem H₂O auf 1l aufgefüllt, gelöst und für 20 min bei 121°C sterilisiert;

NMM-Medium (Budisa *et al.*, 1995)

(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 mM	Lactose	22 mM
KH ₂ PO ₄	55.0 mM	Biotin	10 mg.l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	100.0 mM	Thiamin	10 mg.l ⁻¹
NaCl	8.5 mM		
CuSO ₄	1 µg.l ⁻¹		
MnCl ₂	1 µg.l ⁻¹		
ZnCl ₂	1 µg.l ⁻¹		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 µg.l ⁻¹		
CaCl ₂	1 mg.l ⁻¹		
FeCl ₂	1 mg.l ⁻¹		

für NMM/Met⁺
 D,L-Methionin 0.3 mM

für NMM/Se-Met⁺
 Seleno- D,L-Methionin 0.3 mM

Außer Thiamin, Biotin und D,L-Methionin bzw. Seleno-D,L-Methionin, die sterilfiltriert wurden, wurden alle Komponenten als Stammlösungen getrennt für 20 min bei 121°C autoklaviert. Kurz vor der Anzucht zusammen mit zweifach-entionisiertem, autoklavierten Wasser in den entsprechenden Konzentrationen hergestellt wurde das Medium in einen sterilen Fermenter gefüllt und auf 37°C temperiert.

Agarplatten:

5.1 g Agar-Agar wurden in Glasflaschen gefüllt, mit LB-Medium auf ein Endvolumen von 300 ml gefüllt und für 20 min bei 121°C sterilisiert. Abgekühlt auf ca. 60°C wurde gelöstes Ampicillin (100 mg.l⁻¹) zupipettiert. In steriler Umgebung in Einweg-Petrischalen gegossen, kühlten diese ab, gelierten und wurden bei 4°C gelagert. Für die Herstellung der NMM-Agarplatten kam *p. a.* Agar-Agar zum Einsatz, das mit ca. 100 ml zweifach-entionisiertem H₂O in Flaschen für 20 min bei 121°C autoklaviert wurde. Entsprechend den Konzentrationen des NMM-Mediums wurden alle Komponenten zupipettiert, mit zweifach-entionisiertem Wasser aufgefüllt und im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Die weitere Verarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie die Herstellung von LB-Agarplatten.

2.1.5 Pufferlösungen

HP_{LAUF} 50 mM Tris-HCl pH 7.5

HP_{ELUT} 50 mM Tris-HCl pH 7.5
1 M NaCl

PE_{LAUF} 50 mM Tris-HCl pH 7.5
1.4 M (NH₄)₂SO₄

PE_{ELUT} 50 mM Tris-HCl pH 7.5

QS_{LAUF} 50 mM Tris-HCl pH 8.0

QS_{ELUT} 50 mM Tris-HCl pH 8.0
1 M NaCl

2.2 Allgemeine Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese:

Agarosegel (1 %):
1 % Agarose NEEO (w/v)
40 mM Tris
1.142 % Eisessig (v/v)
1 mM EDTA (pH 8.0)

Kurz bevor das geschmolzene Gel gegossen wurde, erfolgte die Zugabe von 50 µg.ml⁻¹ Ethidiumbromid.

DNA-Probenpuffer (6x):

- 0.25 % Bromphenol Blau (w/v)
- 0.25 % Xylen Cyanol (w/v)
- 40 % D(+)-Saccharose (w/v)

Elektrophoresepuffer (1x):

- 40 mM Tris
- 1.142 % Eisessig (v/v)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)

Bei allen Agarosegel-Elektrophoresen wurde die Spannung auf 150 V beschränkt.

SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970):

Trenngel (17.5 %):

- 375 mM Tris-HCl pH 8.8
- 0.1 % Laurylsulfat (w/v)
- 58.3 % Rotiphorese[®] Gel30 (v/v)

Sammelgel (4 %):

- 125 mM Tris-HCl pH 6.8
- 0.1 % Laurylsulfat (w/v)
- 13.4 % Rotiphorese[®] Gel30 (v/v)

Die Polymerisation erfolgte mit 0.05 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyldiamin und 0.05 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Probenpuffer (5x):

- 50 mM Tris-HCl pH 7.0
- 10 % Laurylsulfat (w/v)
- 0.1 % Bromphenolblau (w/v)
- 1 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
- 14 % 1,4-Dithiothreitol (w/v)
- 10 % Glycerin (v/v)

Proben wurden mit 5xProbenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt und für 2 min bei 65°C inkubiert.

Elektrophoresepuffer:

- 25 mM Tris-HCl pH 8.3
- 1.44 % Glycin (w/v)
- 0.1 % Laurylsulfat (w/v)

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte bei einer max. Spannung von 220 V und einer Leistungsbeschränkung von 10 mA bis die Farbmarker kurzzeitig aus dem Gel gelaufen waren.

Färbelösung:

0.5 %	Coomassie Brilliant Blue G250 (w/v)
6.25 %	Ethanol, techn. (v/v)
4.25 %	Perchlorsäure (v/v)

Das Gel wurde für ca. 30 min gefärbt und durch Aufkochen in Wasser in der Mikrowelle entfärbt.

2.2.2 Molekularbiologische Reaktionsansätze

PCR-Ansatz:

1 μ l	Matrix-DNA
1 μ l	5'-Primer
1 μ l	3'-Primer
1 μ l	Vent-Polymerase (\equiv 2 U)
2 μ l	dNTP-Mischung (50mM dATP, 50mM dTTP, 50mM dGTP, 50mM dCTP)
7 μ l	Formamid
10 μ l	Thermopolpuffer
77 μ l	H ₂ O (zweifach-entionisiert und autoklaviert)
50 μ l	Paraffinöl (autoklaviert)

Die Reaktionsansätze wurden kurz bei hoher Umdrehungszahl zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen und die nicht-mischbaren Phasen zu trennen. Das Paraffinöl diente als Kondensationsschutz während der PCR- Thermozyklen.

PCR-Programm:

5 min	92°C	} 31 Zyklen
1 min	92°C	
30 s	55°C	
1 min 30 s	72°C	
5 min	72°C	
5 min	4°C	

Restriktionsansatz:

76 μ l	DNA (PCR-Produkt, Vektor, Konstrukt)
10 μ l	Bovins Serumalbumin (BSA 10x)
10 μ l	<i>Bam</i> HI Restriktions-Reaktionspuffer
2 μ l	<i>Bam</i> HI Restriktions-Endonuklease (\equiv 40 U)
2 μ l	<i>Nco</i> I Restriktions-Endonuklease (\equiv 20 U)

Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 3 h.

Ligationsansatz:

11 μ l	Restriktions-Endonuklease-behandeltes PCR-Produkt
5 μ l	Restriktions-Endonuklease-behandelter Vektor
2 μ l	T4 DNA Ligationspuffer
2 μ l	T4 DNA Ligase (\equiv 800 U)

Die Reaktion erfolgte bei 16°C für 4 h.

3 Mutagenesestudien an den Genen ε und ζ

Ausgangs-DNA der Mutagenesestudien war Plasmid-DNA von pBT288. Darin bilden die Gene ω , ε und ζ ein Operon mit zwei Promoterregionen ($P\omega$ und $P\varepsilon$). In den Plasmiden pSM19035 und pBT288 liegen die beiden Gene ε und ζ in der Reihenfolge ε und anschließend ζ als Bicistron vor (Abb.3.1).



Abb.3.1 Schematische Darstellung des Genlocus vom ω,ε,ζ Operon in pSM19035 und pBT288

Bisherige Versuche, das Gen ζ allein, ohne *in vivo* Gegenwart des Gens ε zu klonieren, führten zu keinem Erfolg (Alonso, pers. Mitt.). Vektorkonstrukte mit unterschiedlichen Induktionsreagenzien, die die Gene ε und ζ getrennt beinhalten, bieten die Möglichkeit, das Gen ζ allein zu exprimieren. Eine Expression des Wild-Typ Gens ζ führt zum Zelltod. Als im Verlauf dieser Arbeit die Tertiärstruktur des Proteins ζ im Komplex mit ε geklärt war, konnten ortsgerechte Mutationen durchgeführt werden. Diese Studien erfolgten immer in zwei Schritten: Zuerst wurde ein Plasmidkonstrukt erstellt, das die Gene ε und ζ enthielt. War dies