

Restriktionsansatz:

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

erfolgreich, so wurde im zweiten Schritt das Gen ζ allein kloniert und exprimiert. Dieser *in vivo* Test zeigte schnell und einfach, ob die Mutation zu einem nicht mehr vollständig aktiven Protein führte.

3.1 Klonierungsmethode

3.1.1 Darstellung des Vektorkonstruktes

Die benötigten DNA-Fragmente wurden mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) an einer Matrizen-DNA gemeinsam mit *Primern* synthetisiert. Letztere sind Oligonukleotide, die an die Matrizen-DNA binden und entsprechend den gewünschten Mutations-Sequenzen entworfen wurden. Matrix-DNA wurde aus angezogenen Plasmid-DNA-enthaltenden *E. coli* Zellen nach Standardmethoden (Plasmid Midi Purification Kit, Qiagen, Hilden) isoliert. Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte in allen Fällen mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die so getrennte und damit gereinigte DNA-Bande konnte ausgeschnitten und nach einem Standardprotokoll (JET Sorb, GENOMED, Bad Oeynhausen) eluiert werden. Bei einem Verdau mit Restriktions-Endonukleasen wurden die DNA-Fragmente mit definierten Schnittmustern charakterisiert.

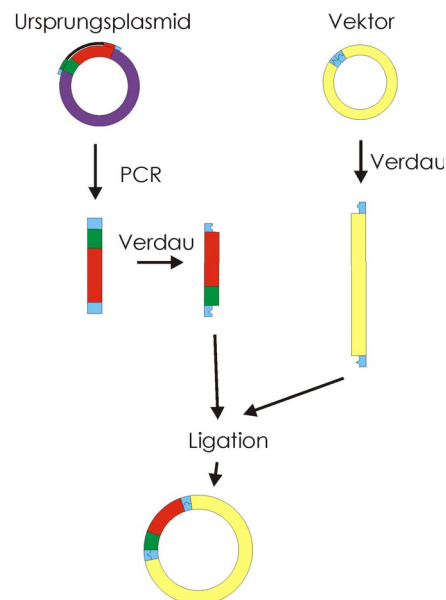


Abb.3.1.1.1 Schematische Darstellung der Klonierungsmethode. In violett und gelb wurde die Vektor-DNA koloriert. Das Gen ϵ ist grün, das Gen ζ rot eingefärbt. Blaue Bereiche stellen die Schnittstellen-Sequenzen dar.

Nach vierstündiger Reaktion erfolgte erneut ein Reinigungsschritt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Ein orientiertes Zusammenfügen der beiden DNA-Fragmente war nach dem Verdau aufgrund des Überhangs an komplementärer Einzelstrang-DNA (einige Nukleotide) gegeben. Bei der anschließenden Ligation mussten die Gene in die Multiple Klonierungsstelle des Vektors, wenige Nukleotide in 3'-Richtung von der ribosomalen Bindungsstelle des Vektors entfernt, eingefügt werden. Dies erfolgte mit der Restriktions-Endonuklease *NcoI* (New England Biolabs, Inc., Frankfurt a. M.). Unterhalb des Gens wurde zu einem Sequenzmotiv, das vom Verdauenzym *BamHI* (New England Biolabs, Inc., Frankfurt a. M.) geschnitten werden konnte, mutiert. Ebenso besaß die Multiple Klonierungsstelle des Vektors diese Schnittstelle, und ein Zusammenfügen zu einem zirkulären Plasmid wurde damit ermöglicht. Dies erfolgte in einem Ligationsansatz gemeinsam mit T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Inc., Frankfurt a. M.) bei 16°C für mehr als vier Stunden.

3.1.2 Transformation

10 μl des Ligationsansatzes wurden zusammen mit Ca^{2+} -kompetenten *E. coli* Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, 45 s bei 42°C Hitzeschock behandelt und erneut kurz auf Eis gestellt. Neben Ca^{2+} -kompetenten *E. coli* Zellen wurden auch elektrokompetente Zellen für Transformationen verwendet. Dabei wurde die Zellsuspension mit 1 μl des Ligationsansatzes vermischt und kurzzeitig einem elektrischen Feld (1 500 V) ausgesetzt. Bei dieser Methode war die Transformationseffizienz deutlich verbessert. Anschließend mit 500 μl LB-Medium vermischt, konnten die mit Vektor transformierten Zellen für 1 h bei 37°C eine Antibiotikaresistenz ausbilden. Danach wurden je 250 μl Bakteriensuspension auf Ampicillin enthaltende LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei einer erfolgreichen Transformation bildeten sich vereinzelte Kolonien aus. Die Präparation von kompetenten Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989).

Diese Einzelkolonien wurden großflächig auf Ampicillin enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen und dienten gemeinsam mit den 5'- und 3'-*Primer* des eingefügten DNA-Fragments als Matrize für eine Einzelkolonie-PCR. Aus Kolonien, von denen das in den Vektor ligierte Fragment reamplifiziert werden konnte, wurde Plasmid-DNA isoliert und ein Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* gemacht. Trennten sich bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese Vektor-DNA und ein Fragment der richtigen Größe, wurde dieser Klon als positiv erachtet und sequenziert.

3.2 Klonierung

3.2.1 Darstellung des Plasmidkonstruktes $p\epsilon,\zeta\Delta QE601$

Da im Plasmid pBT288 weder 5' aufwärts von Gen ϵ noch 3' abwärts von Gen ζ Schnittstellen für Restriktionsenzyme vorliegen, war es nicht möglich, dieses Fragment direkt aus dessen Plasmid-DNA zu schneiden und in einen anderen Vektor zu ligieren. Deshalb wurde zuerst ein Konstrukt erzeugt, welches die Gene ϵ und ζ enthielt und sowohl aufwärts des Startkodons als auch abwärts des Stopkodons Schnittsequenzen für Restriktionsenzyme enthielt. Mit Hilfe der Primer $\epsilon_{\text{for.}}$, $\zeta_{\text{rev.}}$ und pBT288 als Matix-DNA wurde ein 1.13 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, mit *NcoI* und *BamHI* (Abb. 3.2.2.1.b) verdaut und in pQE60 ligiert. Erfolgreich transformierte Einzelkolonien wurden isoliert und davon Plasmid-DNA isoliert. Das sequenzierte Plasmidkonstrukt wurde als $p\epsilon,\zeta\Delta QE601$ bezeichnet.

3.2.2 Darstellung der Punktmutanten

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei nicht-toxische Punktmutanten von ζ -Protein mit folgenden Mutationen hergestellt:

Lys ζ 46	zu	Ala ζ 46 und
Arg ζ 171	zu	Ser ζ 171

Da beide Mutanten nach dem gleichen Verfahren erzeugt wurden, wird im folgenden Abschnitt die Mutation von Lys ζ 46 zu Ala ζ 46 genauer erläutert:

Im ersten PCR Schritt wurde das Teilstück aufwärts der Mutationsstelle amplifiziert. Dieses umfasst das Gen ϵ und den Teil des Gens ζ bis kurz nach dem Leserahmen für Lys ζ 46. (Fragment B). Dies erfolgte mit den Primern pQE60_{Std.for} und $\epsilon\zeta\text{mut}_{(K46A)\text{rev.}}$. Als Matrize diente Plasmid-DNA von $p\epsilon,\zeta\Delta QE601$. $\epsilon\zeta\text{mut}_{(K46A)\text{rev.}}$ bindet über die Mutationsstelle hinweg an die Matrize und mutiert den Leserahmen AAA für Lys ζ 46 in ein Alaninkodon GCA (revers komplementär: TGC). Fragment B hat eine Größe von 0.49 kb (Abb. 3.2.2.2.c).

Ebenso wurde von kurz vor der Mutationsstelle mit dem *Primer* $\epsilon\zeta\text{mut}_{(K46A)\text{for}}$ bis nach dem Stopkodon mit *Primer* $\text{pQE60}_{\text{Std.rev}}$ das 0.83 kb große 3'-abwärts Fragment C des Gens ζ aus $\text{p}\epsilon,\zeta\Delta\text{QE601}$ gewonnen. (Abb. 3.2.2.2.d).

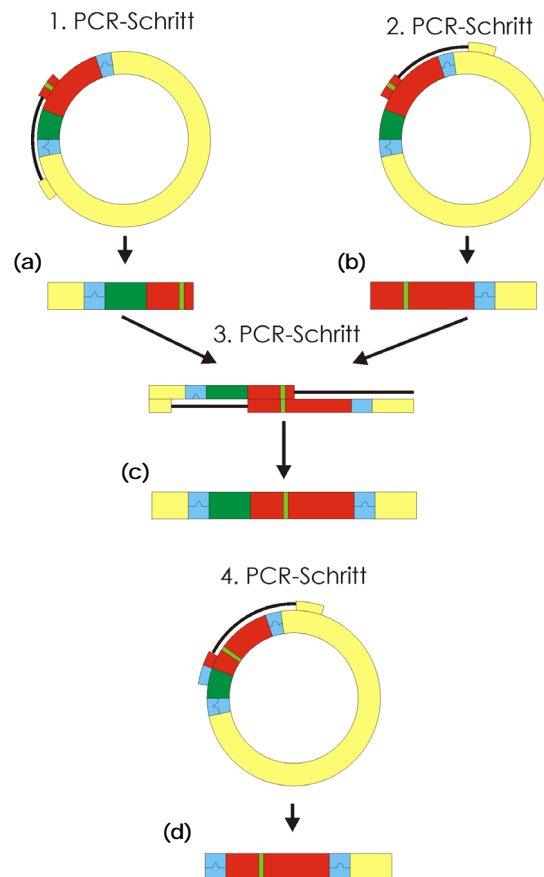


Abb.3.2.2.1 Schematische Darstellung der PCR-Produkte der zielgerichteten Mutagenese. In gelb wurde die Vektor-DNA koloriert. Das Gen ϵ ist grün, das Gen ζ rot eingefärbt. Blaue Bereiche stellen die Schnittstellen-Sequenzen dar, der hellgrüne Bereich im Gen ζ symbolisiert die zielgerichtete Mutagenese (a) Fragment B, (b) Fragment C, (c) Fragment D (d) Fragment E; In c wurde nur der Antisense-DNA-Strang dargestellt.

Diese beiden Fragmente, deren Sequenzen an der Mutationsstelle überlappen, wurden isoliert und gemeinsam mit den *Primern* $\text{pQE60}_{\text{Std.for}}$ und $\text{pQE60}_{\text{Std.rev}}$ als Matrize einer erneuten PCR verwendet. Dabei wurde das 1.3 kb große DNA-Fragment D amplifiziert (Abb. 3.2.2.2.e), das Gen ϵ und das mutierte Gen ζ beinhaltet. Das Fragment D wurde wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben isoliert, verdaut und in den Vektor pTRC99A ligiert. Nach der Ligation wurde das Konstrukt in den *E. coli* Stamm DH5 α transformiert. Der Vektor pTRC99A codiert eine Ampicillinresistenz, mit Hilfe derer selektioniert wurde. Kontrollen erfolgten wie

bei der Klonierung von $p\epsilon\zeta\Delta QE601$. Als positiver Klon erwies sich $pNS_{\epsilon,\zeta}(K46A)5$, dessen Plasmid-DNA isoliert wurde. Eine Sequenzierung zeigte, dass die Mutation erfolgreich war und keine zusätzliche Mutation eingeführt wurde.

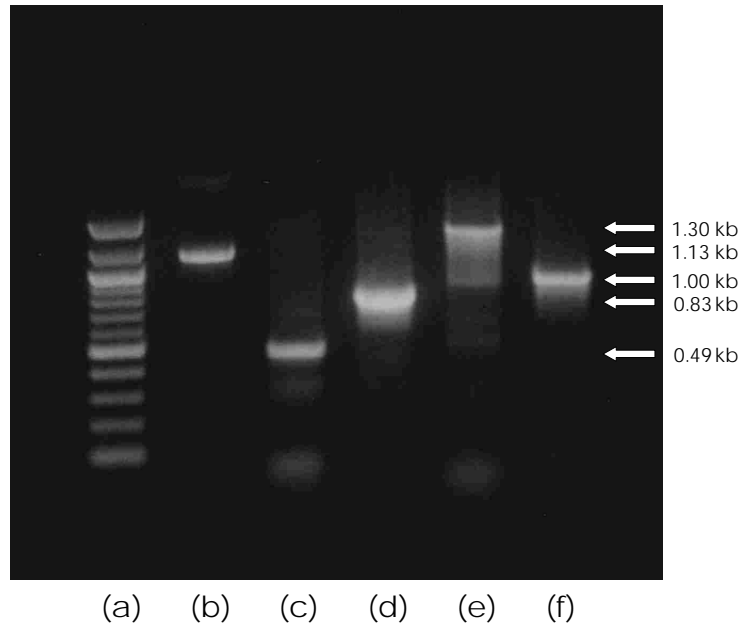


Abb.3.2.2.2 Abbildung einer Gelelektrophorese der PCR-Produkte zur Mutation von $Lys_{\zeta 46}$ zu $Ala_{\zeta 46}$; **(a)** 100 bp DNA-Marker New England Biolabs, Inc. (Frankfurt a. M.) Die zwei Banden mit stärkerer Intensität sind 1000 bp und 500 bp große DNA-Fragmente, dazwischen- und darunterliegende Banden unterscheiden sich in 100 bp, über der 1000 bp Bande befinden sich 1200 bp und 1500 bp große DNA-Fragmente, **(b)** Fragment A, **(c)** Fragment B, **(d)** Fragment C, **(e)** Fragment D, **(f)** Fragment (E);

Im letzten Schritt wurde das Gen ζ in pTRC99A ligiert. Dafür musste vor dem Startkodon von ζ mit *Primer* ζ_{for} eine *NcoI* Schnittstelle eingefügt werden. Als 3' *Primer* wurde $pTrc99A_{Std.rev.}$ verwendet, der ca. 100 bp abwärts der *BamHI* Schnittstelle von $pNS_{\epsilon,\zeta}(K46A)5$ bindet. Diese beiden *Primer* mit $pNS_{\epsilon,\zeta}(K46A)5$ Plasmid-DNA als Matrize in einer PCR eingesetzt führten zum ca. 1 kb großen Fragment E (Abb.3.2.2.f). Die weiteren Klonierungsschritte und Kontrollschritte wurden analog zur Klonierung von $pNS_{\epsilon,\zeta}(K46A)5$ durchgeführt. Das Konstrukt wurde in DH10 transformiert. Vom Positivklon $pNS_{\zeta}(K46A)2$ wurde anschließend Plasmid DNA sequenziert und als korrekt bestätigt.

Nach dem gleichen Schema erfolgte auch die Klonierung der Punktmutante $\epsilon,\zeta(R171S)$. In Tab.3.2.2.3 sind die mit den *Primern* erhaltenen Fragmente und die endgültigen Konstrukte verzeichnet.

	5' Primer	3' Primer	Matize	Fragmentgröße	verwendeter Vektor	infiltrierter Stamm
Fragment B	pQE60 _{Std. for.}	εζmut _{(R171S)rev.}	pε,ζΔQE601	883 bp		
Fragment C	εζmut _{(R171S)for.}	pQE60 _{Std. rev.}	pε,ζΔQE601	448 bp		
Fragment D	pQE60 _{Std. for.}	pQE60 _{Std. rev.}	Fragment B, Fragment C	1331 bp		
pNSε,ζ(R171S)1					pTrc99A	DH5α
Fragment E	ζ _{for.}	pTrc99A _{Std. rev.}	pNSε,ζ(R171S)1	961 bp		
pNSζ(R171S)1					pTrc99A	ER2566

Tab.3.2.2.3 Aufstellung der einzelnen Amplifizierungs- und Klonierungsschritte für pNSε,ζ(R171S)1 und pNSζ(R171S)1;

3.2.3 Darstellung der Valζ234Stop Mutante

Neben den Punktmutationen wurde auf gleiche Weise eine C-terminal verkürzte Mutante des Proteins ζ hergestellt. Es sollte damit die Frage geklärt werden, ob die DNA-Bindungsdomäne in diesem Bereich lokalisiert ist. Deshalb wurde das Gen verkürzt, sodass die zwei C-terminal-letzten Helices des Proteins nicht mehr kodiert wurden. Im Gen ζ wurde nach dem Leserahmen für Valζ234 ein Stopkodon mit anschließender *Bam*HI Schnittstelle eingeführt. Die Amplifizierung erfolgte mit den *Primern* pQE60_{Std.for.}, εζmut_{(V234Stop)rev.} und pε,ζΔQE601 Plasmid-DNA als Matrize. Nach einem Verdau mit *Nco*I und *Bam*HI wurde die erhaltene DNA mit der mit den gleichen Restriktions-Endonukleasen behandelte pTrc99A Vektor-DNA ligiert und in DH5α transformiert. Da sich das Konstrukt pNSε,ζ(V234STOP)1 als Positivklon erwies, diente dessen isolierte DNA als Matrize für eine Amplifikation des Gens ζ mit den *Primern* ζ_{for.} und pTrc99A_{Std.rev.}. Erneut wurde dieses Fragment mit den zwei Restriktionsenzymen behandelt, in pTrc99A ligiert und in DH5α transformiert. Plasmid-DNA des Positivklon pNSζ(V234STOP)1 wurde sequenziert und damit als korrekt bewiesen. Dies war die dritte ortsgerichtete Mutagenese des Gens ζ, die zu nicht-toxischem ζ-Protein führte.