

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid /Bisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche-Boehringer, Mannheim
Adenosindiphosphat (ADP)	Roche-Boehringer, Mannheim
Agarose	Biorad, Richmond CA, USA
p-Aminobenzamidin	Sigma, St. Louis MO, USA
Ammoniumpersulfat	Biorad, Richmond CA, USA
Ammoniumsulfat	J.T. Naker, Deventer, NL
Ampicillin, Na-salz	Grünenberg GmbH, Stolberg
Bacto-Agar	Difco, Detroit MI, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit MI, USA
Biotin	Calbiochem, San Diego CA, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol (Cm)	Roche-Boehringer, Mannheim
Chlortetracycline Hydrochlorid (Tc)	Sigma, St. Louis MO, USA
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma, St. Louis MO, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
3'-Desoxynucleosid 5'-triphosphat (dNTP`s: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	Roche-Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis MO, USA
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva, Heidelberg
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	BioTech, St. Leon-Rot
Glutamat, Ka-salz	Sigma, St. Louis MO, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat (Km)	Sigma, St. Louis MO, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES)	Calbiochem, San Diego CA, USA
Laurylsulfat, Na-salz	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

	Biorad, Richmond CA, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
TM Vistra Green	Amersham,
Xylencyanolblau	Merck, Darmstadt
Yeast-Extrakt	Difco, Detroit MI, USA

2.1.2 Enzyme und Proteine

DNA modifizierende Enzyme	Roche-Boehringer, Mannheim MBI Fermentas, Vilnius, Litauen NEB, Beverly MA, USA
DNA-Marker (1kb Ladder, 100 Bp Ladder)	NEB, Beverly MA, USA
Antiseren	
Anti-Kaninchen IgG, Biotin-Konjugate	Sigma, St. Louis MO, USA
Anti-Ziege IgG, Biotin-Konjugate	DAKO, Hamburg
Serum 1562: polyklonal (Kaninchen)	Anti-DnaA-Protein von <i>E.coli</i> (Jueterbock, 1991)
Serum 1783: polyklonal (Kaninchen)	Anti-DnaA-Protein von <i>E. coli</i> (Jueterbock, 1991)
Serum H96: polyklonal (Schaf)	Anti-DnaB-Protein von <i>E. coli</i> (Lanka et al., 1978)
Bovine serum albumine (BSA)	Sigma, St. Louis MO, USA
DNA Gyrase (<i>M. luteus</i>)	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Expand TM High Fidelity PCR System	Roche-Boehringer, Mannheim
Lysozym	Roche-Boehringer, Mannheim
Proteinmarker, broad range	Roth, Karlsruhe NEB, Beverly MA, USA
Restriktionsendonukleasen	Roche-Boehringer, Mannheim NEB, Beverly MA, USA
RNase A	QIAGEN, Hilden
SSB (single-stranded DNA binding protein)	Promega, Madison, USA

Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Sigma, St. Louis MO, USA
Taq DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA

2.1.3 Sonstiges Material, Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer, Branchburg NI, USA
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Branchburg NI, USA
Branson Sonifier W-450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Centricon-30 Konzentrator	Millipore-Amicon, Beverly, USA
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, Maidstone, UK
Dynabeads	Dynal, Oslo, Norwegen
Fluorotrans Membran 0.2 µm	PALL, Portsmouth, GB
FluorImager™ mit ImageQuant Software	Molecular Dynamics, CA, USA
FPLC-System	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Hofer Gelapparatur	Hofer Scientific Instruments San Fransisco CA, USA
Minisart Sterilfilter, Porengröße 20µm	Sartorius, Göttingen
Mono Q Säule (HR 10/10)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
NAP™-25-Säulen	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Qiagen tip 100 Säulen	QIAGEN GmbH, Hilden
Qiagen Puffer Set	QIAGEN GmbH, Hilden
Semi Dry Blotapparatur (Pegasus)	Phase, Mölln

2.1.4 Puffer und Medien

1 x TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

1 x TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat (pH 8.5)
2 mM EDTA

1 x PBS-Puffer:

137 mM NaCl
8 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄ (pH 7.4)

1 x TBS-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
150 mM NaCl

G-Puffer:

45 mM HEPES-KOH (pH 7.6)
100 mM Kaliumglutamat
0,5 mM EDTA
10 mM Magnesiumacetat
1 mM DTT
0,2% NaN₃

10 x TA-Puffer:

330 mM Tris-Acetat (pH 7.8)
660 mM Kaliumacetat
100 mM Magnesiumacetat
5 mM DTT

TSS-Puffer:

1 x LB Medium
10% PEG (3350-8000)
5% DMSO (v/v)
30 mM Magnesiumchlorid

10 x Marians Puffer:

200 mM HEPES (pH 7.6)
50 mM Magnesiumacetat
10 mM EDTA
40 mM DTT
2% Triton X-100

1 x Marians-Puffer enthält 100 µM ATP und 5 mg/ml BSA. ATP und BSA werden erst nach dem Verdünnen der Stammlösung zugegeben und als getrennte Stammlösungen gelagert (100 mM ATP TE-Puffer pH 7.6; BSA 50 mg/ml in 50% Glycerin).

Puffer, die für die Proteinreinigung verwendet wurden, enthielten entweder 20% (w/v) Sucrose oder 20% (v/v) Glycerin.

L-Medium (pro Liter):

10 g Bacto-Tryptone

5 g Yeast-Extract

10 g NaCl

Die aus den Medien hergestellten Agarplatten enthielten zusätzlich 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium.

Sofern nicht anders angegeben beträgt die Antibiotika-Konzentration in den Nährlösungen und -böden:

Ampicillin (Ap) 50 µg/ml

Kanamycin (Km) 50 µg/ml

Chloramphenicol (Cm) 30 µg/ml

Tetracyclin (Tc) 5 µg/ml

Die IPTG-Konzentration beträgt in den Nährlösungen und -böden:

IPTG µM	5	10	15	20	40	60	100	500
µl *	1,25	2,50	3,75	5,00	10,00	15,00	25,00	125,00

* µl 1M IPTG Stammlösung pro 250 ml Nährlösung bzw. -böden

2.1.5 Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp
WM1490	<i>argH</i> , <i>deoB</i> or <i>deoC</i> , <i>dnaA850::Tn10</i> , <i>his-29</i> , <i>ilv</i> , <i>metB1</i> , <i>metD</i> , <i>rnh-224</i> , <i>trpA9605</i>
WM1963 [XL1-blue]	<i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> ; F' <i>lac: lac^R</i> , <i>lacZΔM15</i> , Tn 10, <i>proAB⁺</i> (Sambrook et al., 1989)
WM2121	<i>ara</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>fis::Km</i> , <i>recA56</i> , <i>rpsL</i> , <i>srlC300::Tn10</i> , <i>thi</i> (Koch et al., 1988)
WM2482 [MG1655]	prototroph
WM2665 [AN1459]	<i>ilv</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> , <i>srlC::Tn10</i>
WM2667	<i>argE3</i> , Δ (<i>lac-pro</i>), <i>dnaA219(Cos)</i> , <i>galk2</i> , <i>his-4</i> , <i>lacY1</i> , λ^- , <i>leuB6</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL31</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>tsx-33</i> , <i>xyl-5</i> (Weigel et al., 1999)
WM2747	<i>asnB32</i> , Δ (<i>dnaA</i>), <i>fuc-1</i> , <i>ilv-192</i> , <i>lysA</i> , <i>mad-1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thi-1</i> , <i>zia::pKN500</i> (Hansen und Yarmolinsky, 1986)

2.1.6 Plasmide und Vektoren

pLEX5BA *ori* ColEI rop, Ap, Promotorkassette p_{A1-04/03}, *rrnBt1t2*, *lacI*

Das Plasmid gehört zu dem pLEX-Vektorsystem (Krause et al., 1997). Diese Vektoren sind modular aufgebaut und für die Klonierung und Expression von regulatorischen oder toxischen Genen konzipiert. Die Plasmide bestehen aus einzelnen Kassetten, wodurch ein Austausch des Replikationsorigins, des Promotors und des Resistenzgens leicht möglich ist. Der Vektor pLEX5BA (4239 Bp) besitzt den gut reprimierbaren und durch IPTG hoch induzierbaren p_{A1-04/03} Promotor (Lanzer und Bujard, 1988) und hinter dem Polylinker den *E. coli* Terminator *rrnBt1t2*. Als Resistenzmarker besitzt das Plasmid das β -Lactamase-Gen.

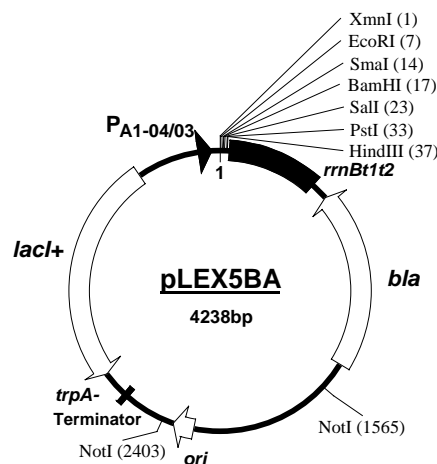


Abb. 5: Expressionsvektor pLEX5BA

pBEX5BA *ori* ColEI rop, Ap, Promotorkassette p_{A1-04/03}, *rrnBt1t2*, Biotin-tag, *lacI*

Das Plasmid pBEX5BA (4625 Bp) (Richter et al., 1998) ist eine Erweiterung des pLEX5BA-Vektors für die Expression aminoterminaler Fusionsproteine. Die 12,5 kDa Untereinheit des Carboxylase-Komplexes aus *Propionibacterium shermanii* (Biotin-tag) (Cronan, 1990) wurde vor den Polylinker kloniert. Die Carboxylase-Untereinheit enthält eine Sequenz, die von dem *E. coli* Enzym Biotin-Ligase erkannt und biotinyliert wird (Samols et al., 1988). Auf Grund des 'Biotin-tags' besitzen die klonierten Peptide ein 12,5 kDa höheres Molekulargewicht.

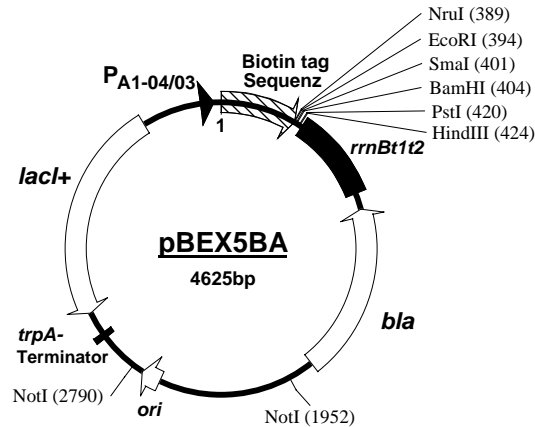


Abb. 6: Expressionsvektor pBEX5BA

pMMB2 *ori* ColD, Km, RSF1010 *repA*⁺, *repB*⁺, *repC*⁺

Das Plasmid pMMB2 (Taguchi et al., 1996) besitzt einen ColD Replikationsorigin und die kodierende Region für das Kanamycinresistenzgen. Das Plasmid besitzt außerdem ein 5,0 kBp großes Fragment auf dem RSF1010-Proteine *repA*, *repB*⁺ und *repC* mit Ihrem nativen Promotor kodiert sind. Diese Proteine sind für die Initiation der Replikation am RSF1010 *oriV* essentiell.

pMMB2Δ67 *ori* ColD, Km, RSF1010 *repA*⁺ *repC*⁺

Das Plasmid pMMB2Δ67 (Taguchi et al., 1996) entstand durch Deletion des kodierenden Bereiches des *repB*⁺-Genes vom Plasmid pMMB2. Die Deletion hat keinen Einfluß auf die Expression der Proteine RepA und RepC.

pYTA1 *oriV*_{RSF1010}^{*}, Ap

Das Plasmid pYTA1 (Taguchi et al., 1996) besteht aus einem modifizierten *oriV*_{RSF1010} und dem β-Lactamase-Gen als Resistenzmarker. Zwischen der *ssiA*-site und dem Resistenzgen wurde eine DnaA-Box eingefügt. Um stabil in einer Zelle etabliert zu werden, benötigt das Plasmid pYTA1 die Helferplasmide pMMB2 (DnaA unabhängige Replikation) oder pMMB2Δ67 (DnaA abhängige Replikation), die die entsprechenden Rep-Proteine von RSF1010 exprimieren. Beim Plasmid pYTC wurde das Ampicillinresistenzgen gegen das Chloramphenicolgen vom pACYC184 ausgetauscht (2.2.2.14).

pPS562 *ori* ColEI *rop*, Ap, lambda *cl857*, p_R p_L Promotoren, *dnaB*⁺, *dnaC*⁺

Das Plasmid pPS562 hat den ColEI Replikationsorigin von pUC9 und das β -Lactamase-Gen. Als Tandem angeordnet besitzt es die kodieren Bereiche der Proteine DnaC und DnaB. Vor jedem Gen befindet sich eine Ribosomenbindestelle. Die Promotoren p_R und p_L des λ -Phagen werden für die Expression verwendet. Das Protein des *cl857*-Gens ist eine temperatur-sensitive Mutante des λ *cl*-Repressors, welcher die Promotoren p_R und p_L reprimiert. Eine Expression der Proteine findet nur bei erhöhter Temperatur statt (42°C, instabiler Repressor), wohingegen bei 30°C nur eine sehr schwache Expression erfolgt.

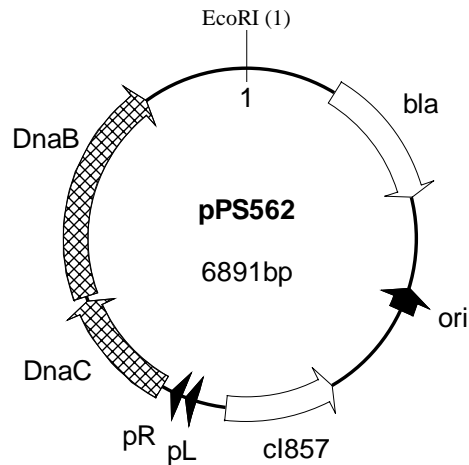


Abb. 7: DnaB-DnaC Expressionsplasmid pPS562

pLysS *ori* p15A, Cm, Lysozym

Das Plasmid besitzt den p15A Replikationsorigin und als Resistenzmarker das Chloramphenicolresistenzgen. Das Plasmid besitzt das Gen für Lysozym. Lysozym wird bei der Proteinexpression verwendet, um Gene, die von der T7-RNA Polymerase transkribiert werden, zu reprimieren. Lysozym interagiert mit der T7-RNA Polymerase und inaktiviert sie dadurch. Erst nach Induktion (verstärkte Expression) der T7-RNA Polymerase wird das gewünschte Protein effizient transkribiert.

pdnaA116 *ori* ColEI *rop*, Ap, Promotorkassette p_{A1-04/03}, *rrnBt1t2*, *dnaA*⁺

Das Plasmid pdnaA116 (Krause et al., 1997) hat eine Größe von 5762 Bp und dient zur Expression für das DnaA Protein von *E. coli*. Der kodierende Bereich des *dnaA*-Genes wurde in den Expressionsvektor pLEX5BA kloniert. Dabei wurde zusätzliche Sequenz hinter dem *dnaA* Leserahmen mit in den Vektor kloniert. Diese wird transkribiert aber nicht translatiert.

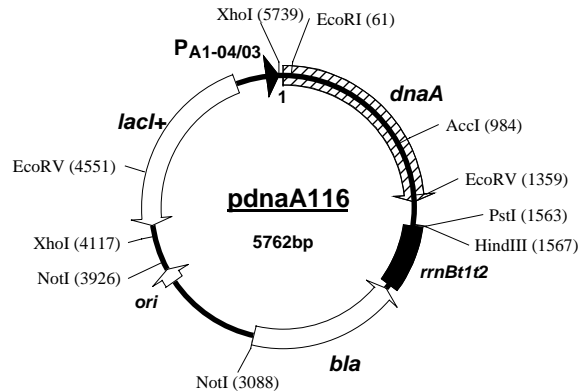


Abb. 8: DnaA Expressionsplasmid pdnaA116

p15ACm *ori* p15A, Cm

Das Plasmid hat eine Größe von ca. 1,9 kBp. Es wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotidprimern #1 und #2 (2.3) und pACYC184 als Template, Restriktion des PCR-Fragmentes mit *NotI*, anschließender Ligation und Selektion auf Chloramphenicol nach der Transformation in WM1963 erhalten. Das Plasmid besteht nur aus dem Replikationsursprung (p15A) und dem *cat*-Gen für die Chloramphenicolresistenz.

pSC101 Tc, *par*, *oriV*

Die Sequenz von pSC101 umfaßt 9263 Bp (Bernardi und Bernardi, 1984) und beinhaltet neben der kodierenden Sequenz des Initiatorproteins RepA und des Replikationsorigins (*oriV*) das Tetracyclinresistenzgen. Das Resistenzgen wurde später in pBR322 kloniert. pSC101 hat eine Kopienzahl von 6-7 pro Chromosomenequivalent. Die *par*-Region ist wichtig für die Stabilität des Plasmides in *E. coli*.

pACYC184 *ori* p15A, Cm, Tc

Das Plasmid pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) hat eine Größe von 4244 Bp. Das Plasmid besitzt neben dem p15A Replikationsorigin die kodierenden Sequenzen für das Tetracyclinresistenzgen und das Chloramphenicolresistenzgen.

pOC180 *ori* ColEI, *ori*C, Ap

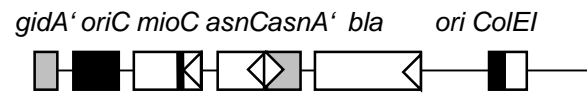
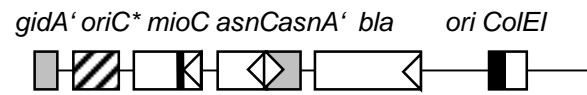
Das Plasmid (3827 Bp) stammt vom pOC170 ab. Beim pOC180 wurden die Reste der 'Multicloningsite' vom pT7-5 im pOC170 entfernt durch eine Restriktion mit *Sall* – *SacI*, anschließender Entfernung der über-hängenden Enden und Religation. Das Plasmid enthält die *ori*C Region von *E. coli* (Pos. -176 bis +1497 (Buhk und Messer, 1983)), den pBR322 Replikationsorigin auf einer *NotI*-Kassette und das *bla* Gen zur Selektion (Messer et al., 1992). Die *ori*C-Region beinhaltet neben dem *ori*C das vor dem *ori*C gelegene *gidA*'-Gen und die hinter *ori*C gelegenen *mioC*, *asnC* und *asnA*'-Region.

pOCBS *ori* ColEI, Ap

Das Plasmid (3914 Bp) wurde aus dem Plasmid pOC180 hergestellt. Die AT-reiche Region vom *E. coli oriC* wurde gegen die AT-reiche Region vom *B. subtilis oriC* ausgetauscht. Das mit den Primern #39 und #40 (2.3) amplifizierte DNA-Fragment wurde mit *XhoI* geschnitten und die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym unter Verwendung von dCTP und dTTP im Reaktionsansatz aufgefüllt.

Das mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *HindIII* erhaltene Fragment vom pOC180 wurde in den pUC19 (ebenfalls *SmaI* und *HindIII* geschnitten) ligiert. Das entstandene Plasmid pUC19ori wurde mit *Bam*HI geschnitten, mit Klenow-Enzym (nur dATP und dGTP im Reaktionsansatz) aufgefüllt und das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das *SmaI* - *HindIII* Fragment mit dem chimären Origin wurde von pUCoriBS in pOC180 zurückkloniert. Das entstandene Plasmid pOCBS hat die AT-reiche *E. coli oriC* Sequenz (Pos. 3-94) gegen die AT-reiche reiche Region vom *B. subtilis oriC* ausgetauscht (Pos. 2041-2219 (Moriya et al., 1985)).

Die 4 Nukleotide 5'-CAAG am 3'-Ende der DnaA-Box R1 wurden gegen 5'-GCTC ausgetauscht.

A**B****Abb. 9: Plasmide pOC180 (A) und pOCBS (B).**

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Molekularbiochemische Techniken

2.2.1.1 Wachstum von Bakterienkulturen, Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Kultivierung der Zellen des jeweiligen *Escherichia coli* Stammes werden diese in L-Medium bzw. auf L-Agarplatten bei 37 °C unter ständiger Belüftung bis zur gewünschten OD₆₀₀ inkubiert. Stämme, die einen *dnaA*(Null) Genotyp haben (WM1490, WM2747) werden bei 30 °C herangezogen. Eine Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum (Resistenz des Stammes und des entsprechenden Plasmides) erfolgte grundsätzlich.

Bakterienzellen in Nährmedien und als Isolierausstrich auf Agarplatten sind nur begrenzt haltbar. Zum längeren Aufbewahren von Bakterienstämmen werden Glycerinkulturen angelegt. Dazu werden 1,2 ml einer Übernachtskultur mit 0,3 ml sterilem Glycerin gemischt und bei –80 °C gelagert. Glycerinkulturen sind über mehrere Jahre haltbar.

2.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen mittels der TSS-Methode

10 ml LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft, und die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,2–0,3 für 20 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 10 min, 5000 rpm, 2 °C). Das Pellet wird in 1/10 Volumen TSS-Puffer resuspendiert. Der Puffer und die Zellen werden stets gekühlt (4 °C) aufbewahrt. Die Zellen können sofort zur Transformation eingesetzt werden oder für einige Monate bei –80 °C gelagert werden, wobei wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden ist.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen mittels der RuCl-Methode

50 ml LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft, und die Zellen bei einer OD₆₀₀ von ~0,45 für 20 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 10 min, 5000 rpm, 2 °C). Das Pellet wird in 2 ml Lösung I resuspendiert und die Zellen nach Zugabe von 14 ml Lösung I für 15 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert (siehe oben) und in 1,6 ml Lösung II aufgenommen. Die Zellen können bei –80 °C für einige Monate gelagert werden.

Lösung I: 0,39 g MES in 100 ml Bidest lösen pH 6.2

2,42 g RbCl₂

0,22 g CaCl₂

1,98 g MnCl₂*4H₂O in 50 ml Bidest lösen

Beide Lösungen werden vorsichtig gemischt und der pH-Wert mit verdünnter Essigsäure auf pH 5.8 eingestellt. Die Lösung wird auf 200 ml mit Bidest aufgefüllt und kann nach dem sterilfiltrieren bei 4 °C gelagert werden.

Lösung II: 0,42 g MOPS

1,66 g CaCl₂

0,24 g RuCl₂

In 100 ml Bidest lösen und nach der Zugabe von 30 ml Glycerin den pH-Wert auf pH 5.8 einstellen. Die Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt und kann nach dem Sterilfiltrieren bei 4 °C gelagert werden.

2.2.1.4 Transformation von *E. coli* Zellen (Chung et al., 1989)

Für die Transformation werden sowohl Plasmide als auch Ligationsansätze verwendet. Zu 100 µl kompetenten Zellen werden maximal 1 µg gereinigte Plasmid-DNA oder die entsprechende Menge eines Ligationsansatzes gegeben. Nach dem Mischen wird der Ansatz 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt (3 min 42 °C oder 90 s 43 °C). Zur phänotypischen Expression wird der Ansatz mit 500 µl vorgewärmtem L-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Transformationsansätze mit den Plasmiden pYTA1 bzw. pYTC wurden 60 min bei 37 °C bzw. 30 °C inkubiert. 100 µl–500 µl des Ansatzes werden auf antibiotikahaltigen Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37 °C oder 30 °C inkubiert. Resistente Kolonien wurden entweder mittels PCR zur Identifikation der Plasmide getestet oder die Klone kultiviert, das Plasmid isoliert (2.2.1.5) und mittels Restriktionsanalyse (2.2.1.10) identifiziert.

2.2.1.5 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

Die Minipräparation wurde zur schnellen Analyse von möglichen positiven Klonen mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. Die Qualität der Präparation reicht sowohl für Restriktionsanalysen, Klonierungen, PCR Template und in Ausnahmen nach exzessiver RNase A Behandlung für Sequenzierungen.

Reagenzien:

Lösung I: 10 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 8.0

Lösung II: 200 mM NaOH
1% SDS

Lösung III. 3,0 M Kaliumacetat pH 4,8
(60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml bidest)

Von einer Übernachtskultur werden ~1,0 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen in einer Eppendorfszentrifuge bei 10.000 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wird in 100 µl Lösung I resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Lösung II versetzt (Zellen lysieren) und vorsichtig gemischt. Nach erneuter Inkubation für 5 min bei RT werden 150 µl Lösung III zugegeben, vorsichtig gemischt (mehrmaliges invertieren), für 10-15 min bei 4 °C inkubiert, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gut gemischt. Zur besseren und schnelleren Phasentrennung wird kurz zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl abs. Ethanol wird die Plasmid-DNA ausgefällt und kann durch Zentrifugieren (Eppendorfszentrifuge bei 10.000 rpm für 15 min) abgetrennt werden.

Nach dem Trocknen wird das Pellet in 50 µl Bidest aufgenommen und ein Aliquot (2-5 µl) mittels einer Restriktionsanalyse (2.2.1.10) analysiert.

2.2.1.6 Präparative DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Qiagen-Protokoll ergibt größere und homogene Mengen an DNA. Diese eignet sich sehr gut zum Sequenzieren. Das angegebene Protokoll ist vorgesehen für DNA-Mengen bis zu 100 µg aus 25–100 ml Zellkultur.

25–100 ml einer Übernachtskultur plasmidhaltiger Zellen werden abzentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 10 min, 4000 rpm) und das Pellet in 4 ml P1-Puffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) lysiert und die Suspension erneut 5–10 min bei RT inkubiert.

Anschließend werden 4 ml P3-Puffer (3 M Kaliumacetat pH 5.5) dazugegeben, vorsichtig gut gemischt, die Suspension 20 min bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 15 min, 5000 rpm). Ist die Lösung nach dem Zentrifugieren nicht klar, wird der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wird auf eine mit 4 ml QBT-Puffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) equilibrierte tip 100 Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen des Überstandes wird die Säule 2 mal mit 10 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Isopropanol) gewaschen und die DNA mit 5 ml QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8.5, 15% Isopropanol) eluiert. Die DNA wird mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 60 min, 5500 rpm). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und in 100–200 µl Bidest aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt photometrisch.

2.2.1.7 Ethanolpräzipitation von DNA

Die Methode wurde verwendet, um verdünnte DNA-Lösungen zu konzentrieren bzw. um nach der Restriktion von DNA den Puffer zu wechseln. Für die Präzipitation werden zu der Lösung (max. 500 µl) 1 µl Glycogen und 2,5 Volumen abs. Ethanol zugegeben, durchmischt und für mindestens 60 min bei –20 °C inkubiert. Die DNA wird abzentrifugiert (Biofuge, 15 min, 15000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die getrocknete DNA wird in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder Bidest resuspendiert und die Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese oder photometrisch bestimmt.

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich ihrer Größe nach im Agarosegel elektrophoretisch auftrennen. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern. Kleinere Fragmente (bis 1000 Bp) werden in höherprozentigen Gelen (1,5-2% w/v), größere Fragmente in niederprozentigen Gelen (0,8-1% w/v) aufgetrennt.

Die Agarose wird durch Kochen in 1 x TBE-Puffer gelöst und in Gelkammern mit geeigneten Kämmen gegossen. Die Proben werden mit 10% ihres Volumens an Probenpuffer (15% Ficoll 4000, 20% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) vor dem Auftragen versetzt und die Elektrophorese bei ca. 10 V/cm durchgeführt. Unter Standardbedingungen enthält sowohl der Laufpuffer als auch

die Agarose Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration). Die DNA wird durch Ethidiumbromid gefärbt und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Als Alternative zur Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Gel mit TMVISTRA Green gefärbt. In diesem Falle enthält weder der Laufpuffer noch die Agarose Ethidiumbromid. Die Färbung mit VISTRA Green ist 10-100fach sensitiver als die Färbung mit Ethidiumbromid. Das Färben der DNA erfolgt in 100 ml 1 x TBE-Puffer mit 20 µl VISTRA Green für 15-30 min. Das Gel wird nach der Färbung am FluorImager (Molecular Dynamics) eingescannt und mittels ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet.

2.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um nach der Restriktion von DNA das gewünschte DNA Fragment zu isolieren, wurde die DNA mittels präparativer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und der Gelbereich, indem sich das zu isolierende DNA-Fragment befindet ausgeschnitten. Das Agarosefragment wird in 50 °C warmem Puffer gelöst und die DNA an die Membran einer Quicks핀-Säule gebunden. Nach dem Waschen der DNA kann diese durch Zugabe von 0,1 x TE-Puffer oder Bdest von der Membran eluiert werden. Das Protokoll und die verwendeten Lösungen entstammen dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

2.2.1.10 Restriktion von DNA

Zur Analyse von Plasmiden, PCR-Produkten und zur Erzeugung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurden Restriktionsendonucleasen des Typs II (Spaltung der DNA an der palindromischen Erkennungssequenz) verwendet.

Der Reaktionsansatz, in der Regel 20-30 µl, enthält 10% 10 x TA-Puffer. Für die Restriktion von 1-2 µg DNA wurden 20 Units an Restriktionsenzym verwendet. Wenn möglich erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 min bei 70 °C, ansonsten eine Phenolextraktion, um das Restriktionsenzym von der DNA abzutrennen.

2.2.1.11 Behandlung mit T4-Polymerase und Klenow-Enzym

Mit Hilfe von T4-Polymerase (ausgeprägte 3'-5'-Exonuclease-Aktivität) und des Klenow-Enzyms (DNA-Polymerase I ohne 5'-3'-Exonuclease-Aktivität) können

überstehende 3'-Enden entfernt und zurückgesetzte 3'-Enden aufgefüllt werden. Die Reaktion erfolgte in 1 x TA-Puffer unter Zusatz von dNTPs (Endkonzentration 200-400 μ M) für 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung (20 min 70 °C) der Enzyme gestoppt.

2.2.1.12 Behandlung mit Mung Bean-Nuclease

Mit der Mung Bean-Nuclease wurden überstehende (einzelnsträngige) 5'-Enden bis zum Beginn des Doppelstranges abgebaut. Die Reaktion erfolgte für 30-45 min bei 16 °C in 1 x TA-Puffer mit 1 mM ZnCl₂.

2.2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten, PCR-Produkten und Vektoren erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Die Konzentration von Vektor- bzw. Insertfragment wurde im Vergleich zu käuflichen Längenstandards abgeschätzt. Die Ligation erfolgte in der Regel bei 16 °C in 20 μ l über Nacht in 1 x Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 0,1 mg/ml BSA). Bei der Ligation von „sticky ends“ wird das Insert mindestens im 5-fachen Überschuß und bei der Ligation von „blunt ends“ wird das Insert mindestens im 10-fachen Überschuß zugegeben. Bei der Ligation von kleinen Fragmenten wird das Insert im bis zu 100-fachen Überschuß dazugegeben. Nach der Ligation wird die T4-DNA-Ligase hitzeinaktiviert. Wenn möglich wird der Restriktionsansatz mit einem Restriktionsenzym nachgeschnitten, wodurch der Anteil an „richtigen“ Klonen vergrößert wird. Der gesamte Ligationsansatz wird für die Transformation verwendet.

2.2.1.14 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR (Saiki et al., 1988)), beruht auf der zyklischen, exponentiellen und spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten zwischen zwei bekannten DNA-Sequenzen. Die Reaktion läßt sich in drei Stufen unterteilen: i) thermische Denaturierung der DNA-Matrize (Template), ii) spezifische Hybridisierung der Primer und iii) Elongation der Primer. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Perkin

Elmer und Promega) verwendet. Die Endprodukte weisen ein überstehendes 3'-Desoxyadenosin auf.

Die PCR wurde sowohl zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung als auch zum schnellen und einfachen Test von möglichen positiven Klonen nach der Transformation verwendet.

Die Amplifikation wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Als DNA-Template wurde entweder Plasmid-DNA (1 ng) oder plasmidhaltige bzw. plasmidfreie Bakterienkolonien verwendet. Zu dem DNA-Template werden je 10 pmol Primer sowie 200 µM dNTPs und der vom Hersteller empfohlene Puffer gegeben, für 2 min bei 96 °C denaturiert und 2-5 Units Polymerase hinzugefügt. Als Standard-PCR-Protokoll wurden folgende Bedingungen gewählt: 35 Zyklen, 15 sec Denaturierung bei 96 °C, 15 sec „annealing“ der Primer bei 56 °C und 1 min 72 °C zur Elongation der Primer. Die Annealingtemperatur der Primer wurde je nach der Länge der Primer variiert und der Elongationsschritt an die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst (ca. 1kb pro min DNA-Synthese bei Taq-Polymerase).

Die PCR-Produkte wurden auf analytischen Agarosegelen überprüft. DNA-Fragmente für die Klonierung wurden mit Glycogen ausgefällt, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym(en) geschnitten und für die Ligation verwendet.

2.2.1.15 Long-range PCR

Die long-range PCR (LR-PCR, Expand™ High Fidelity PCR System) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von über 3 kbp verwendet. Zur Amplifikation wurde ein Gemisch aus der Taq-DNA-Polymerase und der Pwo-DNA-Polymerase (Roche-Boehringer) verwendet. Das Prinzip ist das gleiche wie bei der oben beschriebenen PCR. Zur Amplifikation werden in 100 µl Reaktionsansatz je 20 pmol Primer, 400 µM dNTPs, 100-200 ng Template DNA und 10 µl DMSO (50%) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen in ein PCR-Gefäß gegeben. Die Polymerasen (2-5 Units) wurden nach dem ersten Denaturierungsschritt dazugegeben.

Als Standard-PCR-Protokoll wurden folgende Bedingungen gewählt: 35 Zyklen, 45 sec Denaturierung bei 96 °C, 60 sec „annealing“ der Primer bei 56 °C und 4 min 68 °C zur Elongation der Primer. Die Annealingtemperatur der Primer wurde je nach der Länge der Primer variiert und der Elongationsschritt an die Länge

des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst (ca. 1kb pro min DNA-Synthese).

Die PCR-Produkte wurden auf analytischen Agarosegelen überprüft. DNA-Fragmente für die Klonierung wurden mit Glycogen ausgefällt, mit dem entsprechenden Restriktionsenzym(en) geschnitten und für die Ligation verwendet.

2.2.1.16 DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing

Die Analyse der Sequenz von DNA beruht auf dem Einbau von Didesoxynukleotiden, was bei der Elongation zum Kettenabbruch führt (Sanger et al., 1977). Die Dye Terminator Methode beruht auf dem Einbau von mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden, die es ermöglichen, die Sequenzreaktion für alle 4 Nukleotide in einem Ansatz durchzuführen. Beim „Cycle-Sequencing“ wird die Reaktion in einem Thermocycler durchgeführt. Durch die lineare Amplifikation des betreffenden DNA-Fragmentes wird die Menge an benötigter Template-DNA deutlich reduziert. Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA verwendet, die nach der QIAGEN-Methode (2.2.1.6) gereinigt wurde. Die Sequenzreaktion konnte bis zu einer Länge von 600 - 700 Bp ausgewertet werden.

„Cycle Sequencing“

Die erforderliche Menge an DNA-Matrize wird in einem Gesamtansatz von 20 µl mit 1 µl (10 pmol) Primer und 4 µl Dye Terminator Ready Reaction Mix (Perkin Elmer) gemischt. Der Dye Terminator Ready Reaction Mix enthält AmpliTaq DNA-Polymerase, FS und eine Mischung aus Desoxynukleotiden und verschiedenem Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden (Verhältnis ist abhängig von der Länge des zu sequenzierenden Fragmentes). Die Sequenzreaktion erfolgt im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) für 25 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 96 °C, 5 sec Hybridisierung der Primer bei 60 °C (abhängig von den Sequenzierprimern) und 4 min Extension der Primer bei 60 °C. Die Übergänge zwischen den einzelnen Temperaturschritten müssen dabei schnell erfolgen („rapid ramp“). Die Proben werden anschließend bis zu ihrem Entnehmen bei 4 °C gehalten. Durch Zugabe von 1 µl 3 M Na-Acetat pH 5.2 und 50 µl 95% Ethanol wird die DNA gefällt. Die Ansätze werden zentrifugiert (Eppendorf-

Zentrifuge 5416, 30-60 min, 4000 rpm, 4 °C) und die DNA nach dem Waschen mit 250 µl 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5416, 15 min, 4000 rpm, 4 °C) für 3-5 min unter Vakuum getrocknet. Die Pellets werden in 6-9 µl Ladungspuffer (deionisiertes Formamid und 25 mM EDTA mit 50 mg/ml Blue Dextran im Verhältnis 5:1) aufgenommen, gevortext, kurz zentrifugiert und vor dem Auftrag auf das Gel für 2 min bei 90 °C denaturiert.

Sequenzgel

Für den ABI PRISM 377 Sequencer wird ein 48 cm WTR (well-to-read) Gel aus 4,25% Polyacrylamid/ 7 M Harnstoff verwendet.

Gellösung: 21 g	Harnstoff
7,1 ml	30% Acrylamid (29:1)
6,0 ml	10x TBE-Puffer
21,0 ml	Bidest (Merck)
15 µl	TEMED
500 µl	APS

Die Elektrophorese erfolgt bei 30°C mit 3500 V (50 mA) und 66 W sowie einer Laser Power von 40 mW.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Reinigung des DnaA-Proteins von *E. coli*

Die Aufreinigung des DnaA-Proteins erfolgte nach dem Protokoll von Schaper (Schaper 1995). Von frischen Transformanten des Stammes WM2121 mit dem DnaA Expressionsplasmid pdnaA116 (2.1.6 Plasmide und Vektoren) wird eine Übernachtskultur angesetzt. Zur Überexpression des DnaA-Protein werden 3 l LB-Medium 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft (Ausbeute ca. 20 mg DnaA-Protein). Die Kultur wird bei 30 °C inkubiert bis zur OD₆₀₀ ca. 0.5 und anschließend mit 1 mM IPTG bis zu 4 h induziert. Nach der Induktion werden die Zellen für 30 min auf Eis gehalten (Wachstumsstop) und anschließend geerntet (GSA-Rotor, 10 min, 8000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wird in 1/50 des Kulturvolumens an kaltem Aufschlußpuffer (45 mM HEPES/KOH pH 7.6, 500 mM K-Glutamat, 0,5 mM EDTA, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT, 1 mM p-Aminobenzamidin) resuspendiert und bei 4°C sonifiziert (Branson Sonifier 450, 10 x 10 sec, Stufe 1-1,5). Unlösliche Bestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen werden abzentrifugiert (SS34 Rotor, 15 min, 10000 rpm, 4 °C) und durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (0,28 g/ml feingepulvertes Ammoniumsulfat) das DnaA-Protein ausgefällt. Das Ammoniumsulfatpräzipitat wird abzentrifugiert (60 Ti Rotor, 30 min, 30000 rpm, 4 °C) und in 8 ml G-Puffer + 100 mM K-Glutamat aufgenommen (45 mM HEPES/KOH pH 7.6, 0,5 mM EDTA, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT, 20% Sucrose). Die Proteinlösung wird über eine NAP25-Säule entsalzt und mit G-Puffer + 100 mM K-Glutamat eluiert. Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels FPLC. Dazu wird die Proteinlösung auf eine Mono-S Säule (Kationenaustauscher, Pharmacia HR10/10) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule wird das DnaA-Protein mit einem linearen Gradienten von 100-1000 mM K-Glutamat in G-Puffer ohne Sucrose eluiert. Die Säule wird mit Hochsalz gewaschen und wieder auf die Anfangsbedingungen äquilibriert. Das DnaA-Protein enthält bis zu 1 M Salz. Die Reinheit des Proteins wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kontrolliert. Geeignete Fraktionen werden vereinigt, auf 1 mM ATP und 20% Sucrose eingestellt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Reinigung von DnaB und DnaC von *E. coli*

Die Aufreinigung erfolgte durch Adaption des Protokolls von N. Dixon (San Martin et al., 1995). DnaB und DnaC werden gleichzeitig überexprimiert. Während der Aufreinigung wird DnaC von DnaB und dem DnaB*DnaC Komplex getrennt. Aus einem Kulturvolumen von 2 l erhält man nach der Induktion ca. 6 g Zellpaste. Das entspricht in etwa 4 mg DnaB, 1,5 mg DnaC und 3,5 mg DnaBC. Durch die Überexpression beider Proteine zusammen erhöht sich die Löslichkeit von DnaB.

1000 ml L-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur von WM2666 (Stamm AN1459 mit den Plasmiden pPS562 und pLysS) angeimpft und bei 30 °C bis zur $OD_{600} \sim 0.5$ inkubiert. Die Induktion erfolgte durch eine Temperaturerhöhung auf 42 °C (Zugabe von 1000 ml 46 °C warmen L-Medium und schnellem Temperaturwechsel des Inkubators) für 3-4 h. Nach der Induktion werden die Zellen für 30 min auf Eis gehalten (Wachstumsstop) und anschließend geerntet (GSA-Rotor, 15 min, 8000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wird in 2 ml Resuspendierpuffer pro g Zellpaste aufgenommen. Die Zellsuspension wird mit Lysis-Puffer (20 ml/g Zellpaste) verdünnt und mit Lysozym (0,25 mg/ml Puffer) versetzt. Die Suspension wird 20 min bei 4 °C gerührt und anschließend noch 60 min bei 4 °C inkubiert. Um die Zellen zu lysieren, wird die Suspension unter starkem Rühren 6 min auf 37 °C erwärmt und wieder auf 4 °C abgekühlt. Durch Zentrifugation (SS34 Rotor, 20 min, 12000 rpm, 4 °C) werden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Der Überstand wird mit Ammoniumsulfat (0,2 g/ml) versetzt, 30-60 min bei 4 °C inkubiert und das Ammoniumsulfatpellet abzentrifugiert (SS34 Rotor, 18000 rpm, 30 min, 4 °C). Das Pellet wird in 5 ml Puffer A je 3 g Zellpaste aufgenommen, die Proteinlösung über eine Nap25-Säule entsalzt und mit Puffer A + 25 mM NaCl eluiert. Sollte die Proteinlösung nicht vollständig klar sein, wird erneut zentrifugiert (SS34 Rotor, 18000 rpm, 15 min, 4 °C). Die weitere Aufreinigung erfolgt mittels FPLC. Dazu wird die Proteinlösung auf eine Mono Q Säule (Anionenaustauscher, Pharmacia HR10/10) aufgetragen und mit einem Stufengradienten (1. Stufe 100 mM NaCl, 2. Stufe 200 mM NaCl, 3. Stufe 500 mM NaCl, jeweils in Puffer A) eluiert. Die Säule wird mit Hochsalz (Puffer A + 1 M NaCl) gewaschen und wieder auf die Anfangsbedingungen äquilibriert. Im Durchlauf der Säule befindet sich DnaC. Der DnaB*DnaC-Komplex kann mit 200 mM eluiert werden während DnaB erst mit 500 mM NaCl eluiert wird. DnaB und der DnaB*DnaC-Komplex weisen nach der Mono Q-Säule nur sehr wenige Verunreinigungen auf und können für *in vitro*

Experimente ohne weitere Aufreinigung verwendet werden. Fraktionen die DnaC beinhalten werden vereinigt und mit 0,4 mg/ml Ammoniumsulfat ausgefällt. Das Pellet wird abzentrifugiert (SS34 Rotor, 18000 rpm, 10 min, 4 °C), in Puffer A aufgenommen über eine Nap 25 Säule entsalzen und mit Puffer A + 25 mM NaCl eluiert. Alternativ dazu kann DnaC wird mittels Centricon 30 ankonzentriert werden. DnaB haltige Fraktionen werden ebenfalls über Centricon 30 ankonzentriert. Zur Reassoziaton des DnaB*DnaC-Komplexes werden DnaB und DnaC haltige Fraktionen (möglichst konzentriert) vereinigt und ATP (Endkonzentration 1 mM) dazugegeben. Das Gemisch wird 3 min bei 30 °C und 10 min auf Eis inkubiert. Die Trennung des Komplexes von den einzelnen Proteinen erfolgt mittels FPLC wie oben beschrieben. Der reassozierte DnaB*DnaC-Komplex zeigt im SDS-Polyacrylamidgel keine Verunreinigungen. Geeignete Fraktionen wurden auf Abwesenheit von Doppelstrang- und Einzelstrangnukleasen getestet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Versuche wurde der reassozierte DnaB*DnaC-Komplex verwendet.

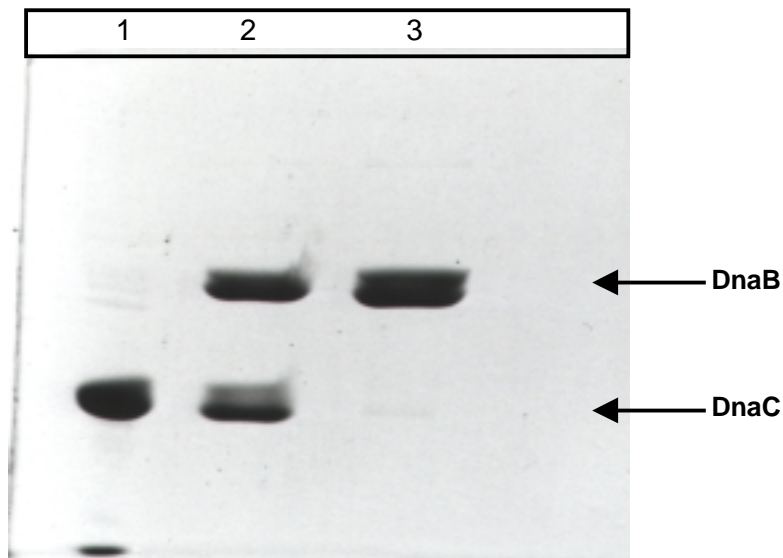


Abb. 10: SDS-PAGE von DnaC, DnaBC-Komplex und DnaB. Die Proteine wurden mit Centricon 30 ankonzentriert und nach der Ausbildung vom DnaBC-Komplex mittels Anionenchromatographie getrennt. Entsprechende Fraktionen wurden für die *in vitro* Versuche verwendet. Spur 1: DnaC, Spur 2: DnaBC-Komplex, Spur 3: DnaB

<u>Puffer:</u>	Resuspendierpuffer	Lysis-Puffer	Puffer A
	50 mM Tris - HCl pH 7.6	50 mM Tris pH 7.6	50 mM Tris pH 7.6
	10% Sucrose (w/v)	10% Sucrose (w/v)	20% Glycerin
		100 mM NaCl	2 mM MgCl ₂
		2 mM DTT	2 mM DTT
		10 mM Spermidin-HCl	100 µM ATP

2.2.2.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie Blue G-250“ an Proteine und einer damit verbundenen Verschiebung des Adsorptionsmaximums des Farbstoffes. In Perchlorsäure gelöst besitzt der Farbstoff eine rotbraune Farbe, die nach der Bindung an Protein zur Blaufärbung wird. Die Verschiebung des Adsorptionsmaximums des Farbstoffes ist zur Proteinkonzentration proportional. Proteinkonzentrationen von 10-100 µg/ml sind gut zu bestimmen.

Zu 200 µl BioRad Protein Test-Farbreagenz werden maximal 800 µl Proteinlösung pipettiert. Bei konzentrierten Proben, wird mit Bidest auf ein Endvolumen von 800 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch bei 595 nm unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden von BSA-Protein mit bekannter Konzentration.

2.2.2.4 Proteinschnellaufschluß

Zur schnellen Expressionskontrolle von klonierten Proteinen werden 4-5 ml L-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von ~0.5 wird 1-2 h mit 1 mM IPTG induziert. Vor der Induktion wird 1 ml der Kultur abgenommen und wie die induzierte Probe behandelt. 1 ml der induzierten Kultur wird abzentrifugiert (Biofuge, 10000 rpm, 5 min) und das Pellet in 100 µl CCE-Puffer (90 mM Tris pH 6.8, 5,7% SDS, 23% Glycerin, 0,07% β-Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau) aufgenommen. Die Proben werden 5-10 min bei 95 °C erhitzt und ein Aliquot (10-50 µl) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die denaturierende SDS-Gelelektrophorese werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels Elektrophoresepuffer (25 mM Tris pH 8.5, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) in vertikalen Flachbett-Minigelen (Hoefler). Die Zusammensetzung des Gelsystems gibt Tabelle 1 wieder.

Nach dem Aufbau der Elektrophoresevorrichtung erfolgte zunächst die Abdichtung der Glasplatten. Sofort nach dem Gießen des Trenngels wird dieses vorsichtig mit Bidest überschichtet, welches nach beendeter Polymerisierung und vor dem Gießen des Sammelgels wieder entfernt wird. Das Einlaufen der Proben erfolgte bei 100 V und die Auftrennung der Proteinproben bei 130 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hat.

Komponente	Abdichtung	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bisacrylamid 30/0.8%	1,65 ml	13,2 ml	3,30 ml
1 M Tris pH 8.8	1,90 ml	15,0 ml	---
0,25 M Tris pH 6.8	---	---	10,00 ml
Bidest	1,42 ml	8,0 ml	6,48 ml
10% SDS	50 µl	400 µl	200 µl
TEMED	10 µl	80 µl	60 µl
10% APS	40 µl	150 µl	80 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung eines 10% igen SDS-Polyacrylamidgels

Nach der Elektrophorese wird das Gel zum spezifischen Anfärben der Proteinbanden für 10-15 min in heiße (65 °C) Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie Blue G-250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig) gelegt und die unspezifische Färbung des Gels mit Entfärber (20% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Eisessig) wieder herausgewaschen.

Soll das Gel geblottet werden (2.2.2.6) wird das Gel nicht gefärbt.

2.2.2.6 Western Blot (semi-dry Methode)

Zum hochsensitiven Nachweis einzelner Proteine werden die Proteine aus dem SDS-Gel an einer PVDF-Membran (Pall-Science) fixiert, mit spezifischen Antikörpern markiert und nach einer Farbreaktion detektiert.

Vor dem Aufbau des Blots werden alle Komponenten mit Blotpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt und darauf geachtet, daß zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen sind. Zur besseren Benetzung der PVDF-Membran wird diese zuerst kurz in Methanol gebadet und anschließend gründlich mit Blotpuffer gewaschen. Auf die Kathodenseite der Blotapparatur werden zunächst 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, das Gel, die Membran und 6 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM). Abschließend wird der Deckel der Apparatur (Anode) aufgelegt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei Raumtemperatur für 60 min bei konstant 60 mA (ein Gel) bzw. 90 mA (zwei Gele).

2.2.2.7 Immunodetektion von Proteinen

Zur Immunodetektion wird die Membran nach dem Blotten zunächst für 5 min mit PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,24 g KH_2PO_4 auf 1000 ml) + 3% (w/v) BSA blockiert und zweimal 2 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (25 μl Serum 1783 bzw. 1562 für DnaA und 5 μl H96 für DnaB) in 21 ml PBS + 1% (w/v) BSA. Die Membran wird für 90 min unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend zweimal 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Als sekundärer Antikörper dient ein biotinyliertes Anti-Kaninchen-Konjugat (30 μl in 21 ml 1 x PBS + 1% BSA) für DnaA und ein biotinyliertes Anti-Ziege-Konjugat (30 μl in 21 ml 1 x PBS + 1% BSA) für DnaB. Die Membran wird 60 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend zweimal 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Nach dem Waschen wird die Membran 15 min in 21 ml PBS + 26 μl Streptavidin-Peroxidase (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) geschüttelt, zweimal mit PBS + 0,05% Tween 20 und einmal mit PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wird die Membran mit der Färbelösung (42,5 ml PBS, 7,5 ml Naphthol-Lösung (7,5 ml kalter Methanol + 25 mg 4-Chlor-1-Naphthol), 30 μl 30% H_2O_2) inkubiert und die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch Waschen mit Bidest gestoppt und die Membran getrocknet.

2.2.2.8 Nachweis von biotinylierten Proteinen

Für die Detektion von biotinylierten Fusionsproteinen wird die Membran nach dem Blotten 20 min mit PBS + 3% BSA blockiert und nach zweimaligem Waschen für 2 min mit PBS + 0,05% Tween 20 für 15 min mit 21 ml PBS + 26 µl Streptavidin-Peroxidase (1 µg/µl) inkubiert, zweimal mit PBS + 0,05% Tween 20 und einmal mit PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wird die Membran mit der Färbelösung (42,5 ml PBS, 7,5 ml Naphthol-Lösung (7,5 ml kalter Methanol + 25 mg 4-Chlor-1-Naphthol), 30 µl 30% H₂O₂) inkubiert und die Reaktion nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität durch Waschen mit Bidest gestoppt und die Membran getrocknet.

2.2.2.9 Gelretardierung von Protein-DNA-Komplexen

Die Bindung von Proteinen an DNA führt in nativen Polyacrylamid- und Agarosegelen zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität der Komplexe gegenüber der freien DNA (Fried und Crothers, 1981; Garner und Revzin, 1981).

Die Bindereaktion wurde in 20 µl 1 x Marians-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 4 mM DTT, 0,2% Triton X-100, 5 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 5% Glycerin) durchgeführt. Das DnaA-Protein wurde vor der Reaktion für 30 min mit 1 mM ATP versetzt.

Für die Bindereaktion wurden die DNA-Fragmente mit ansteigenden Mengen DnaA-Protein von *E. coli* 5 min bei 4 °C und 10 min bei 30° bzw. 37 °C inkubiert, mit 2 µl Glycerin versetzt und bis zum Auftragen auf das Gel bei 4 °C belassen. Für die Trennung der Komplexe von der freien DNA wurde ein vertikales 2% Agarosegel verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 °C für 90 min bei 4 V/cm.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit TMVISTRA Green gefärbt, am FluorImager (Molecular Dynamics) eingescannt und mittels ImageQuant (Molecular Dynamics) analysiert.

2.2.2.10 Herstellung von Zellrohextrakt

Zellen des Stammes WM1490 (*dnaA*(Null)) mit dem entsprechendem Plasmid wurden bei einer OD₆₀₀ ~0.5 mit 1 mM IPTG für 60-90 min induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Heraeus Zentrifuge 4000 rpm, 10 min, 4 °C) und in 1/10

Volumen TBS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgt durch Sonifizieren. Anschließend werden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt (Heraeus Zentrifuge 5000 rpm, 15 min, 4 °C). Vor dem Einfrieren werden die Aliquots mit 1/10 Volumen an Glycerin und G-Puffer (45 mM HEPES-KOH pH 7.6, 0,05 M EDTA, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 1 mM p-Aminobenzamidin) + 500 mM Kaliumglutamat versetzt.

2.2.2.11 „Solid-Phase Protein Binding Assay“ (SPP-Test)

Der SPP-Assay ist eine Methode zur qualitativen Analyse spezifischer Protein – Protein Interaktionen *in vitro*. Ein Interaktionspartner muß hierbei in biotinylierter Form vorliegen. Das Fusionsprotein wird über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an magnetische Kügelchen (Dynabeads) gekoppelt. Diesem Sandwich wird ein zweites Protein entweder gereinigt oder überexprimiert als Zellrohextrakt angeboten. Proteine, die miteinander spezifisch interagieren, werden abgetrennt und nach differenzierenden Waschschritten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Zur Untersuchung der Interaktion von DnaA mit sich selbst und mit DnaB wurden N-terminale Fusionsproteine von DnaA und DnaB mit einem 12,5 kDa Peptid hergestellt, das eine Zielsequenz für die Biotin-Ligase aus *E. coli* besitzt. Biotinylierte Fusionsproteine werden vom Vektor pBEX5BA aus exprimiert. *E. coli* besitzt nur ein biotinyliertes Protein, das in sehr geringen Mengen vorliegt und keinen Einfluß auf den Test hat.

Für einen Ansatz werden 150 µl einer Suspension von magnetischen Kügelchen dreimal mit 150 µl TBS-Puffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl) gewaschen und in 75 µl TBS-Puffer aufgenommen. Die Kügelchen werden für 10 min mit 500 µl Zellrohextrakt mit dem biotinylierten Fusionsprotein bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Kügelchen mit dem gekoppelten Protein einmal mit G-Puffer + 100 mM Kaliumglutamat und einmal mit G-Puffer + 500 mM Kaliumglutamat gewaschen und in 100 µl G-Puffer + 100 mM Kaliumglutamat resuspendiert. Zu den Kügelchen mit dem gekoppelten Protein werden entweder 500 µl Zellrohextrakt der entsprechenden DnaA Mutante oder 1 µg gereinigtes DnaA bzw. DnaB in 250 µl G-Puffer + 100 mM Kaliumglutamat gegeben, 5 min inkubiert und die Kügelchen abgetrennt. Die Kügelchen werden einmal mit 200 µl G-Puffer + 100 mM Kaliumglutamat und einmal mit 200 µl G-Puffer + 500 mM Kaliumglutamat

gewaschen und in 100 µl G-Puffer + 100 mM Kaliumglutamat aufgenommen. Der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Interaktion wurde für jede Protein-Protein Interaktion experimentell bestimmt. Ein Aliquot von jeder Fraktion wird mit 0,2% (v/v) CCE-Puffer (90 mM Tris pH 6.8, 5,7% SDS, 23% Glycerin, 0,07% β-Mercaptoethanol) versetzt, 5-10 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Das Gel wird geblottet und DnaA bzw DnaB Proteine durch Immunodetektion nachgewiesen.

2.2.2.12 Suppression des kälte-sensitiven Phänotypes von *dnaA219* (Cos-Suppression Test)

Der Stamm WM2667 besitzt das chromosomale *dnaA* Allel *dnaA219* unter der Kontrolle des Wildtyp Promotors. Bei der permissiven Temperatur (42 °C) kann der Stamm wachsen. Wohingegen der Stamm bei der nicht-permissiven Temperatur (30 °C) nicht wächst. Das *dnaA219* Allel führt zu einer Überinitiation. Die Replikation wird, im Vergleich zu *E. coli* Zellen mit einem *wtdnaA* Allel, öfter gestartet, als die Zelle die Replikation koordiniert beenden kann. Dadurch ist die Zelle nicht in der Lage bei der nicht-permissiven Temperatur zu wachsen. Durch moderate Inhibierung der Initiation bei 30 °C wird der Stamm in die Lage versetzt wieder wachsen zu können (Weigel et al., 1999).

Kompetente Zellen des Stammes WM2667 (*dnaA219*) werden transformiert mit Plasmiden, die Wildtyp DnaB oder DnaB Deletionsmutanten exprimieren und der Transformationsansatz nach dem Ausplattieren auf L-Platten mit Selektionsmarker bei 42 °C inkubiert. 4-8 Einzeltransformanten werden in 100 µl L-Medium resuspendiert und auf L-Platten mit Selektionsmarker und ansteigenden Konzentrationen an IPTG (0, 5, 10, 20, 40, 60, 100, 500 µM IPTG) gespottet. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C bzw. 42 °C wird das Wachstum der Zellen innerhalb der Spots ausgewertet. Wachstum bei 30 °C für mindestens eine IPTG Konzentration wurde als Cos-Suppression gewertet, unabhängig von der jeweiligen IPTG-Konzentration.

2.2.2.13 Replikation von pSC101 in einem *dnaA*(Null) Stamm (pSC101-Test)

Das Plasmid pSC101 besitzt einen DnaA abhängigen Replikationsursprung (*oriV*). Das plasmidkodierte Initiatorprotein RepA kann nur zusammen mit DnaA einen Teil der Doppelstrang-DNA aufwinden, stabilisieren und die Helikase (DnaB) laden. Der

pSC101-Test wird benutzt um die DnaA–DnaA Interaktion näher zu charakterisieren und von einer DnaA–DnaB Interaktion zu unterscheiden.

Kompetente Zellen des Stammes WM2747 (*dnaA*(Null)) werden mit Plasmiden transformiert, die entweder Wildtyp DnaA oder Deletionsmutanten von DnaA exprimieren. Einzelne Transformanten wurden in L-Medium angeimpft und bei einer OD_{600} von 0,2-0,3 für 30 min mit 10 mM IPTG (wtDnaA) bzw. 50 μ M IPTG (Mutanten) induziert und kompetente Zellen hergestellt (2.2.1.2). In einer zweiten Transformation werden 100 μ l der kompetenten Zellen mit 100 ng pSC101 DNA transformiert. Die Regeneration erfolgte für 30 min bei 37 °C in 1 ml L-Medium mit 50 μ M IPTG. Um überschüssiges IPTG zu entfernen, wurden die regenerierten Zellen einmal mit 1 ml L-Medium gewaschen und anschließend auf L-Platten mit Selektionsmarker und ansteigender Konzentration an IPTG (0, 5, 10, 20, 40, 60, 100, 500 μ M IPTG) ausplattiert. Nach der Inkubation für zwei Tage bei 30 °C bzw. 42 °C wird die Anzahl der Transformanten bestimmt. Kompetenz der Zellen wird durch eine Kontrolltransformation mit dem DnaA-unabhängigen Plasmid pACYC184 (Chang und Cohen, 1978) bestimmt. Eine Transformation des Stammes WM2482 mit pSC101 dient zur Kontrolle der Transformationseffizienz der pSC101 DNA Präparation. Wachstum der Zellen bei 30 °C bzw. 42 °C für mindestens eine IPTG Konzentration wurde als '+' gewertet und kein Wachstum über den gesamten getesteten IPTG-Bereich als '-'.

2.2.2.14 DnaA abhängiges Laden der DnaB-Helikase *in vivo* (pYTC-Test)

Die Plasmide pYTA1 und pYTC besitzen einen chimären Origin. Dieser besteht aus dem Origin *oriV* vom Plasmid RSF1010 mit einer insertierten DnaA-Box. Nach der Deletion der RSF1010 Primase ist die Initiation der Replikation am chimären Origin DnaA abhängig. Das Aufschmelzen der DNA geschieht durch das RSF1010 Initiatorprotein während DnaA die DnaB Helikase lädt. Das Testsystem eignet sich gut, um DnaA abhängiges Laden der Helikase zu charakterisieren.

Nach der Restriktion des Plasmides pYTA1 (Taguchi et al., 1996) mit *Xba*I und *Bsa*AI wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das 0,85 kb Fragment mit dem modifizierten *oriV**_{RSF1010} aus dem Gel eluiert und mit einem 0,8 kb großen *Xba*I - *Pvu*II Fragment vom Plasmid p15ACm, welches das Gen für die Chloramphenicolresistenz enthält, ligiert. Das Plasmid erhielt man durch Transformation von kompetenten WM1963 Zellen, die bereits das Helferplasmid

pMMB2Δ67 (2.1.6 Plasmide und Vektoren) besitzen, mit dem Ligationsansatz und Selektion auf chloramphenicolresistente Zellen. Transformation von kompetenten Zellen des *dnaA*(Null) Stammes WM1490, die bereits das Helferplasmid pMMB2Δ67 besitzen, mit pYTC war nicht möglich und zeigt, dass die Replikation des Plasmides DnaA abhängig ist.

Für den Test wurden kompetente Zellen des Stammes WM1490 mit dem Helferplasmid pMMB2Δ67 mit Plasmiden transformiert, die entweder wtDnaA oder DnaA-Deletionsmutanten exprimieren. Zellen, die beide Plasmide besitzen, werden bei einer OD₆₀₀ von 0.2 – 0.3 für 30 min mit 15 μM IPTG induziert, und kompetente Zellen hergestellt (2.2.1.2). 100 μl kompetente Zellen werden mit 1500 ng eines Gemisches von pYTC/pMMB2Δ67 (das entspricht ca. 300 ng pYTC DNA) transformiert. Die transformierten Zellen werden 90 min bei 37 °C in 500 μl L-Medium mit 20 μM IPTG regeneriert und auf Chloramphenicolresistenz selektioniert. DnaA Derivate werden bei unterschiedlichen Induktionslevels (15 μM und 100 μM IPTG) getestet). Nach Inkubation für 2 Tage bei 37 °C wurde die Anzahl der Transformanden bestimmt. Kompetenz der Zellen wurde durch eine Kontrolltransformation mit dem DnaA-unabhängigen Plasmid p15ACm bestimmt. Eine hohe Transformationseffizienz von pYTC wurde als '+' und keine oder nur geringe Transformationsrate als '-' gewertet.

2.2.2.15 FI*-Test

Der FI*-Test wurde verwendet um die Helikaseaktivität des gereinigten DnaB-DnaC Komplexes zu bestimmen. Nur DnaBC-Komplexe, die von DnaA am *oriC* geladen werden können und eine Helikaseaktivität besitzen, können mit diesem Test untersucht werden.

Eine Präparation von Plasmid DNA ergibt nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid zwei Banden. Bei diesen beiden Banden handelt es sich um, i) superhelikale DNA und ii) ringförmige DNA mit einem Bruch in einem der DNA-Stränge. DNA liegt in der Zelle nicht als entspannter Ring vor, sondern besitzt eine ausgeprägte Tertiärstruktur – Superspiralisierung der DNA. Diese natürlich vorkommende negative Superspiralität eines Plasmides wird als „FI“ bezeichnet. Ein Plasmid mit einer veränderten geringeren negativen Superspiralisierung (reduzierte Windungszahl) wird als „FI*“ bezeichnet. Das linearisierte Plasmid ist die Form „FIll“. Einzel- und

Doppelstrangbrüche können auf Grund von mechanischer Beanspruchung während der Aufreinigung entstehen oder durch Enzyme katalysiert werden. Ein Enzym, das schrittweise eine Änderung der negativen Superspiralisierung der DNA unter gleichzeitiger ATP-Hydrolyse katalysiert, ist die DNA-Gyrase (TypII Topoisomerase).

Der Test beruht auf der Bindung von DnaA an die DnaA-Boxen im *oriC* und einem daraus resultierenden Aufschmelzen der AT-reichen Region innerhalb des *oriC* (Bramhill und Kornberg, 1988). Nach dem Laden der Helikase, wird dieser Bereich durch die Helikaseaktivität von DnaB vergrößert (LeBowitz und McMacken, 1986; Baker et al., 1987). Die DNA Gyrase vermindert die negative Superspiralisierung der DNA vor der Helikase. Durch die kombinierte Aktivität von DnaB und Gyrase wird die Windungszahl reduziert und das Plasmid in die FI*-Form überführt, die in der Agarosegelelektrophorese durch ihr verändertes Laufverhalten gegenüber der FI-Form detektierbar ist. Bei der elektrophoretischen Auftrennung ist es wichtig, daß sowohl die Agarose als auch der Laufpuffer kein oder nur sehr wenig Ethidiumbromid enthalten. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA. Mit steigender Ethidiumbromidkonzentration wird eine Abnahme der negativen Superhelizität beobachtet. Beide DNA Konformationen (FI und FI*) zeigen bei einer Sättigung mit Ethidiumbromid das gleiche Laufverhalten im Agarosegel und können nicht voneinander unterschieden werden.

Die Durchführung des Testes erfolgte in Anlehnung an die Versuchsbeschreibungen von Doran et al. (Doran et al., 1998) und Sutton et al. (Sutton et al., 1998).

DnaA und der DnaBC-Komplex werden vor der Reaktion mit 100 µM ATP für 30 min bei 4 °C und 5 min bei 32 °C inkubiert. Auf Eis werden in einem Endvolumen von 25 µl 1 x FI*-Puffer (40 mM Hepes KOH pH 7,6, 11 mM Magnesiumacetat, 2 mM ATP, 1 mM DTT) 0,1 pmol Plasmid DNA, 23 pmol (als Tetramer) SSB-Protein (440 ng), 2,1 pmol HU-Protein (40 ng) und 10 pmol DnaA (540 ng) zusammenpipettiert und 5 min bei 4 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird weitere 5 min bei 32 °C inkubiert, 0,8 pmol DnaBC-Komplex (410 ng) und 0,65 pmol Gyrase (125 ng) dazugegeben und 30 min bei 32 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl Stopmix und Erwärmen auf 65 °C für 2 min gestoppt. 20 µl des Ansatzes werden auf ein 0,5-0,8% Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei Raumtemperatur für 20 –

24 h und bei konstant 1 V/cm durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel mit TMVistra Green gefärbt, am Fluormager eingescannt und mit der Software ImageQuant ausgewertet.

2.2.2.16 DnaA-abhängiges Laden der DnaB-Helikase *in vitro*

Um der Fragestellung nachzugehen auf welchen DNA-Strang die Helikase während der Initiation der Replikation geladen wird, wurde ein *in vitro* Ansatz gewählt. Aus KMnO₄-Footprint Daten war der Bereich innerhalb der *oriC*-Region, der von DnaA allein und von DnaA und SSB zusammen aufgeschmolzen wird, bekannt.

Durch Hybridisierung von Oligonukleotiden wurde ein Substrat erzeugt, das die DnaA-Box R1 von *oriC*, einen Doppelstrang- und Einzelstrangbereich enthält und damit den aufgeschmolzenen *oriC* simuliert. Am 5'-Ende des kurzen Oligonukleotides (Abb. 11 Oligonukleotid c) befindet sich ein Fluorescein. Dieses läßt sich im Fluormager leicht detektieren. Eine Färbung mit TMVistra Green nach der Elektrophorese muß nicht stattfinden.

Das Substrat (Abb. 11) besteht aus drei Oligonukleotiden. Die Doppelstrang- und Einzelstrangbereiche der Substrate orientieren sich an den experimentell bestimmten Daten für *oriC* (Krause und Messer, 1999). Das Substrat besitzt nur eine Erkennungssequenz für das DnaA-Protein. Die Länge des Doppelstrangbereiches mit der DnaA-Box, gebildet von den Oligonukleotiden a und b, beträgt 21 Nukleotide. Der vom Oligonukleotid a gebildete Einzelstrangbereich hat eine Länge von 29 Nukleotiden. Der Doppelstrang am linken Ende des Substrates wurde auf 16 Bp beschränkt, mit einem kurzen 10 Nukleotide langem Einzelstrang (Abb. 11 Oligonukleotid c), der nicht *oriC*-Sequenz besitzt und keine Basenpaarungen mit dem Oligonukleotid a ausbilden kann. Der nicht hybridisierte Einzelstrangbereich vom Oligonukleotid b hat eine Länge von 45 Nukleotiden und besitzt eine zufällige Sequenz. Um einen Einfluß der DNA Sequenz auf das Laden zu vermeiden, wurden zwei Substrate untersucht. Die durchgehende *oriC* Sequenz befand sich entweder im oberen DNA-Strang (Endung *UoriC* im Substratnamen) oder im unteren Strang (Endung *LoriC* im Substratnamen).

Substrat	Name	Oligonukleotide
	158 _{UoriC}	a oriC upper 66mer b R1 lower 66mer c AT lower 26mer
	158 _{LoriC}	a oriC lower 66mer b R1 upper 66mer c AT upper 26mer

Abb. 11: Schematische Darstellung der artifiziellen Substrate 158_{UoriC} und 158_{LoriC} Die Gesamtlänge des Substrates beträgt 66 Bp. Auf der rechten Seite befindet sich die DnaA-Box R1 (Bezeichnung und Orientierung analog zu *E. coli oriC*). Die durchgezogenen Linien repräsentieren *oriC*-Sequenz und die gestrichelten Linien unterschiedliche nicht-*oriC*-Sequenzen. Auf der rechten Seite (DnaA-Box R1) sind 21 Bp Doppelstrang und auf der linken Seite 16 Bp Doppelstrang. Die Länge des nicht basengepaarten Bereiches beträgt 29 Nukleotide. Das Sternchen (☆) symbolisiert das Fluorescein. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2c angegeben.

Der 45 Bp lange Einzelstrang (nicht-*oriC*-Sequenz) des Oligonukleotides b ist ausreichend, um ein SSB-Protein zu binden. Ein zweites SSB Tetramer könnte zwischen den Doppelstrangbereichen binden. Die Sequenz enthält die Erkennungssequenz für die Dam-Methyltransferase (GATC). Durch Verwendung von methylierten Nukleotiden während der Synthese oder nachträglicher Methylierung besteht die Möglichkeit den Einfluß der Methylierung auf die Replikation bzw. das Laden der Helikase zu untersuchen.

Hybridisierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden auf 93 pmol/µl verdünnt. Jeweils 5 µl der Oligonukleotide wurden zusammen mit 10 µl 10 x TA-Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 5 min auf 95 °C erhitzt und langsam (4-5 h) auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Volumen wurde mit Bidest auf 100 µl aufgefüllt. Von dieser Stammlösung wurde vor jedem Versuch eine 1:5 Verdünnung mit Bidest hergestellt, von der 2 µl pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden. Die

Endkonzentration an Substrat im Reaktionsansatz beträgt 1,86 pmol (80 ng). Die Hybridisierung wurde mit einem nativen 10% PAGE überprüft (1 x TBE Puffer).

DnaA abhängiges Laden der Helikase

Auf Eis wurden in einem Endvolumen von 25 μ l 1 x Marians-Puffer, 1,86 pmol Substrat und 3,7 pmol DnaA (200 ng) zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 4 °C und 5 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 13,6 pmol SSB-Monomer (3,4 pmol SSB-Tetramer, 260 ng) wurde 5 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 3,5 pmol DnaBC-Komplex dazugegeben. Nach der Inkubation für 10 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l Stopmix (3,6% SDS, 200 mM EDTA, 3,6% Glycerin) gestoppt, sofort auf 4 °C gekühlt und 25 μ l des Ansatzes auf ein 3% (w/v) Agarosegel aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei 4 °C und konstant 3 V/cm für 3-4 h durchgeführt. Das Gel wird vor und nach dem Färben mit TMVistra-Green am FluorImager eingescannt und mit der Software ImageQuant ausgewertet.

2.3 Oligonukleotide

a) Tabelle 2: Für Klonierungen benutzte Oligonukleotide

#	Name	Sequenz	Restriktions- endonuklease
1	7612A3Y	5'-CCGAC GCGGCCG CGAACCGACGACGGGTCGAA	<i>NotI</i>
2	7612A4Y	5'-GGAGAG GCGGCCG CACTGAAATCTAGAAATA TTTTATCTG	<i>NotI</i>
3	8211A4M	5'-CGAGG ATGCAT CCATGGCAGGAAATAAACCCCTTCAAC	<i>NsiI</i>
4	7320A2Y	5'-ATAAAA AAGCTT ATTATTTCGTCGTCGTA CTGCGG	<i>HindIII</i>
5	7320A3Y	5'-TACGG GGATCCC CAGCGAAGATCTGCTGGATCTG	<i>BamHI</i>
6	7320A0Y	5'-CGAGG ATGCAT GGCAGGAAATAAACCCCTTCAAC	<i>NsiI</i>
7	7320A1Z	5'-CAGC GGATCCT CGCTGGTACGCCCTGCGGATC	<i>BamHI</i>
8	7320A5Z	5'-CGAG GTCGAC GGAAGTCACACGAAAAACCCGTGG	<i>SalI</i>
9	7320A4Z	5'-ACTC AAGCTT TTTATTTCGCGACCTTCGATGAGCTCG	<i>HindIII</i>
10	8112A8M	5'-GCGTGACGCGGTGCAGGGCGGT CAGGG	
11	8116A2M	5'-GAGATCGT AAGCTT ATTATTTTACCCCGGTAA CGCCATCGTGTGGC	<i>HindIII</i>
12	9203A5W	5'-GG GGATCCT CAACAAAAAACCGC	<i>BamHI</i>
13	9305A1M	5'-GCTGG GGATCCC CGGAATTCTTCGCGACC	<i>BamHI</i>
14	8216A4M	5'-CCGG GGATCCC GATCTGCTGGATCTGGCTGAA TCCCGCGTCTTTAAAATTGCC	<i>BamHI</i>
15	8216A5M	5'-GCCC AAGCTT ATTATGTTTCGCACGACTTTTCGGC AATTTTAAAGACGCG	<i>HindIII</i>
16	8216A6M	5'-CCGG GGATCCC ATCGCCGATGTGCTCGACGC AACCGTGGCGCGTATTGAGCAGTTGTTTCAG	<i>BamHI</i>
17	8216A4M	5'-GCCC AAGCTT ATTATCCCAGTAACGCCATCGTGT GGCTGCTGAAACA ACTGCTCAATACG	<i>HindIII</i>
18	40209BB	5'-ACGCGAAGCTTCTGAGATCG	
19	8513A7M	5'-AAAT CTAGAC CAACTGGCGCGCGGGCGGCTCG	<i>XbaI</i>
20	8A323ADM	5'-GATGGT CTAGAC GATAGGTTCGGTTCTGCC GGGCGCGGGAC	<i>XbaI</i>
21	8C17A3M	5'-CGTAA ATGCAT GCCGCTTCGCCTTCG	<i>NsiI</i>
22	9707A3M	5'-GGTAACGGCATTATGGCGCGCAAGCCTAAT GCCAAAGTGG	
23	9707A2M	5'-CACCGCATGCAGCAGGTGAGTTGCACCCAGACCCG	
24	9325A2M	5'-CC AAGCTT TAATAGCAGCCTGATACAGATTAAATCAG	<i>HindIII</i>
25	9225A2M	5'-GCC AAGCTT ACAGCGCCTCACGCACG	<i>HindIII</i>
26	9414A2M	5'-GCC CCGGG CGTTTTCGCTCACC GGTTTGG	<i>XmaI</i>

#	Name	Sequenz	Restriktions- endonuklease
27	9414A1M	5' -GG CCCGGG GTACCATCGACAATATTCAG	<i>XmaI</i>
28	9610A2M	5' -CG CCCGGG TCGTGTGCTCGAGATCCCCG	<i>XmaI</i>
29	8911A1M	5' -GAATTCAT CTCGAG TTCACTTTCGCTTTGGCAG	<i>XhoI</i>
30	8911A2M	5' -GAATTC CTGCAG CGCTCCGCAGAACTGGTTAG	<i>PstI</i>
31	9129AC	5' -GAC ACACGT TTTCTGGTCACCATCGACAAT ATTCAGAAGACGG	<i>AflIII</i>
32	9129AD	5' -GCCC AAGCTT GGTTTACGATGACAATGTTCT GATTAAATTTG	<i>HindIII</i>
33	7820A1Y	5' -CGGGTCTGGGTGCGCTGCACCTGCTGCATGCG	
34	7820A2Y	5' -CGCATGCAGCAGGTGCAGCGCACCCAGACCCG	
35	5475	5' -GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC	
36	5474	5' -GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCA	
37	9225A1M	5' -CGACACGTTTAAACGTACGTGAGCTGGAAGG	<i>AflIII</i>
38	9325A1M	5' -CCGC AAGCTT CGTTTGCCTCACCCG	<i>HindIII</i>
39	BS upper	5' -CGG CTCGAG CTTATCCACAAATCCACAGG	<i>XhoI</i>
40	BS lower	5' -CGG CTCGAG GTTCTGGATGAAACTGCTTTT	<i>XhoI</i>
41	dnaA 3' in	5' -CATGCATGAGCTC AAGCTT CATAGGTTTACGATGAC AATG	<i>HindIII</i>
42	dnaA 87 5'	5' -GAATTC ATGCAT GTCGACGGTGCTGCAGCCACAAG- CGGCAGTGACGAGC	<i>NsiI</i>
43	dnaA 5' out	5' -TATC GAGCTCGT GTTTGGAC GTCGAC GTTAGAA CGATAGGTCGG	<i>SacI, SalI</i>
44	dnaC 3' in	5' -ATTTCGT CTCGAG CATCAGAACTGTTTCTTTGAGAAC	<i>XhoI</i>
45	dnaC 5' in	5' -CTACG GAGCTC ATCCCAGTTGAAGATCACCCACA	<i>SacI</i>
46	dnaA L233P	5' -CAGGATGAGTTACTAGCCACAGAATTCAGT	

Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben und die entsprechende Restriktionsendonuklease angegeben.

b) Für die Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

pLEX5BA for. (8112A6M)

5' -GGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGC

pBex5BA for. (8112A8M)

5' -GCGTGACGCGGTGCAGGGCGGTCAGGG

pLEX5BA rev. (8112A9M)

5' -CTCTCGCATGGGGAGACCCACACTACC

Die Primer liegen vor und hinter der Klonierungsstelle von pLEX5BA bzw. pBEX5BA und wurden verwendet um die Klone vom 5'-Ende bzw. vom 3'-Ende aus anzusequenzieren. Um Mutationen oder Deletionen zu überprüfen, die sich im Gen befinden, wurden Klonierungsprimer zum Sequenzieren verwendet.

c) Oligonukleotide für das Laden der Helikase *in vitro*

die 9 Bp Sequenz der DnaA-Box ist durch Fettdruck hervorgehoben.

F: Fluorescein-Marker

N: Gemisch aus allen 4 Nukleotiden während der Synthese

oriC upper 66mer

5' -GGATCCTAGAGATCTGTTCTATTGTGATCTCTTATTAGGATCGCACTGCCCT**TGTGGATAA**CAAGGA

oriC lower 66mer

5' -TCCTT**GTTATCCAC**AGGGCAGTGCGATCCTAATAAGAGATCACAATAGAACAGATCTCTAGGATCC

AT upper 26mer

5' -FGGATCCTAGAGATCTGTCTGGTCCGT

AT lower 26mer

5' -FACGGACCAGACAGATCTCTAGGATCC

R1 upper 66mer

5' -NNCTGCCCT**TGTGGATAA**CAAGGA

R1 lower 66mer

5' -TCCTT**GTTATCCAC**AGGGCAGNN

R1 upper 21mer

5' -FCTGCCCT**TGTGGATAA**CAAGGA

R1 lower 21mer

5' -FTCCTT**GTTATCCAC**AGGGCAG

