

Institut für Organische Chemie der RWTH Aachen

*M·TaqI/L142W*  
Eine neue Variante zur sequenz-  
spezifischen Markierung von DNS

Forschungsarbeit

vorgelegt von  
Jürgen Nelles

Aachen, im September 2003

Die vorliegende Forschungsarbeit wurde im Zeitraum von Mai bis Juli 2003 am Institut für Organische Chemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Elmar Weinhold unter Anleitung von Frau Dipl. Chem. Amélie Monami durchgeführt.

Frau Dipl. Chem. Amélie Monami und Herrn Prof. Dr. Elmar Weinhold danke ich für die interessante Themenstellung, Frau Kerstin Glensk für ihre freundliche Unterstützung.

## Verwendete Symbole und Abkürzungen

$\varepsilon$	Absorptionskoeffizient, in $\text{l} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
$\rho$	Massenkonzentration, in $\text{kg} \cdot \text{l}^{-1}$
$\bar{A}_{260}$	Mittelwert der Absorption, gemessen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$
$\text{OD}^{600}$	Optische Dichte, gemessen bei $\lambda = 600 \text{ nm}$
$f_{\text{spektr.}}$	spektroskopischer Faktor
$c$	Stoffmengenkonzentration, in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$f_{\text{Verd.}}$	Verdünnungsfaktor
$\lambda$	Wellenlänge, in nm
u	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )

Abb.	Abbildung
AdoHcy	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl- L-methionin
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNS	Doppelstrang-DNS ( <i>double stranded DNA</i> )
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
M·HhaI	Methyltransferase aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>
M·TaqI	Methyltransferase aus <i>Thermus aquaticus</i>

---

min	Minute(n)
mol	Mol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>Pfu</i>	DNS-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R· <i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Escherichia coli</i>
R· <i>MunI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Mycoplasma unidentifed</i>
R· <i>NcoI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Norcardia corallina</i>
R· <i>TaqI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Thermus aquaticus</i>
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
ssDNS	Einzelstrang-DNS ( <i>single stranded DNA</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehung(en)
V	Volt

---

## Verwendete Abkürzungen für Aminosäuren und Nucleobasen

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## Inhaltsverzeichnis

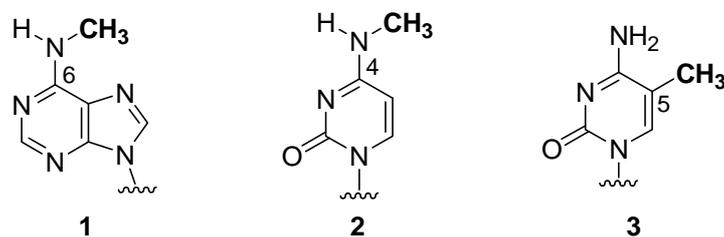
1	Einleitung	1
1.1	Sequenzspezifische Methylierung von DNS	1
1.2	Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion	7
2	Aufgabenstellung	9
3	Durchführung und Ergebnisse	10
3.1	Konzept	10
3.2	Präparation von pA1/A49A	11
3.3	Darstellung von pA1/A49A/N141N/L142W	12
3.4	Transformation von pA1/A49A/N141N/L142W	15
3.5	Präparation von pA1/A49A/N141N/L142W	15
3.6	Expressionstest	17
3.7	<i>Ex vivo</i> -Aktivitätstest	18
4	Zusammenfassung	19
5	Experimenteller Teil	20
5.1	Material und Methoden	20
5.2	Präparation von pA1/A49A	27
5.3	Darstellung von pA1/A49A/N141N/L142W	28
5.4	Transformation von pA1/A49A/N141N/L142W	32
5.5	Präparation von pA1/A49A/N141N/L142W	33
5.6	Expressionstest	34
5.7	<i>Ex vivo</i> -Aktivitätstest	35
6	Literaturverzeichnis	36

# 1 Einleitung

## 1.1 Sequenzspezifische Markierung von DNS

### 1.1.1 Methylierung von DNS

Die enzymatische Methylierung von DNS ist ein weit verbreiteter biochemischer Prozess. So findet man in nahezu allen Lebewesen neben den natürlich vorkommenden Nukleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin auch eine oder mehrere der methylierten Nukleobasen *N*6-Methyladenin **1**, *N*4-Methylcytosin **2** und *C*5-Methylcytosin **3** (siehe Abb. 1-1).

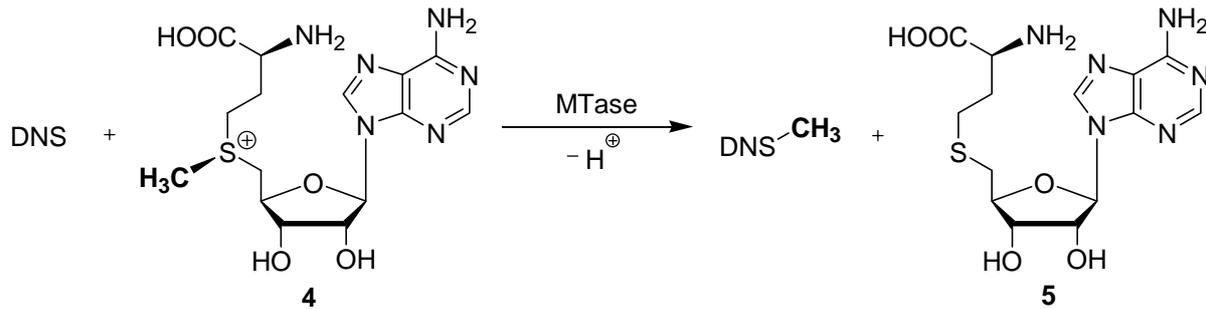


**Abb. 1-1.** Methylierte Nukleobasen.

In biologischen Systemen werden Methylgruppen-Übertragungen durch Methyltransferasen (MTasen) katalysiert. Diese werden nach dem jeweiligen Substrat in DNS-, RNS-, Protein- und Phospholipid-Methyltransferasen sowie Methyltransferasen für kleine Moleküle unterteilt. Alle bekannten DNS-Methyltransferasen katalysieren die Übertragung der Methylgruppe des Kofaktors *S*-Adenosyl-*L*-methionin (AdoMet) auf eine bestimmte Nukleobase in einer für sie spezifischen und meist palindromischen doppelsträngigen Sequenz innerhalb der großen Furche der DNS (CHENG, 1995; JELTSCH, 2002). Dabei werden zwei Gruppen von DNS-Methyltransferasen unterschieden:

- Die *C*-DNS-Methyltransferasen katalysieren die Methylierung des *C*5-Ring-Kohlenstoffatoms des Cytosins unter Ausbildung von *C*5-Methylcytosin und kommen in Prokaryoten und Eukaryoten vor.
- Die *N*-DNS-Methyltransferasen katalysieren die Methylierung der exocyclischen Stickstoffatome von Adenin bzw. Cytosin unter Ausbildung von *N*4-Methylcytosin bzw. *N*6-Methyladenin und kommen nur in Prokaryoten vor.

Die enzymatische Methylierung von DNS ist im Schema 1-1 dargestellt: Das durch Übertragung der in AdoMet **4** aktivierten Methylgruppe entstehende *S*-Adenosyl-*L*-homocystein **5** (AdoHcy) wirkt als Inhibitor für DNS-Methyltransferasen.



**Schema 1-1.** Enzymatische Methylierung von DNS.

Bei der enzymatischen Methylierung von DNS wird weder die WATSON-CRICK-Basenpaarung beeinflusst, noch werden Mutationen erzeugt. Die nicht enzymatische Methylierung hingegen vermag DNS zu schädigen und endogen cytotoxisch zu wirken. Alkylierungsmittel greifen hauptsächlich die Ringstickstoffatome der Purin-Basen an, der Angriff am C5-Atom von Cytosin und an der Aminogruppe von Adenin erfolgt dagegen kaum, so dass enzymatische und nicht enzymatische Methylierungen zu unterschiedlichen Produkten führen.

Die enzymatische Methylierung von DNS ist ein postreplikativer Prozess, dem erhebliche physiologische Bedeutung zukommt. Er erhöht den Informationsgehalt der DNS und nimmt verschiedene Funktionen wahr:

In Prokaryoten dient die enzymatische Methylierung von DNS als Teil eines Abwehrmechanismus gegen eindringende artfremde DNS und damit zum Schutz des eigenen Genoms. Dieser Abwehrmechanismus besteht zum einen aus einer Restriktionsendonuklease, die eine bestimmte DNS-Sequenz erkennt und schneidet, und zum anderen aus einer DNS-Methyltransferase, die die gleiche DNS-Sequenz erkennt und durch Methylierung vor der Fragmentierung schützt. Die in die Zelle eindringende artfremde DNS ist im Gegensatz zur zelleigenen DNS nicht durch Methylierung geschützt und wird im Allgemeinen von der Restriktionsendonuklease schneller fragmentiert als von der Methyltransferase durch Methylierung vor der Fragmentation geschützt. Das Enzym-Paar aus Restriktionsendonuklease und entsprechender DNS-Methyltransferase wird als Restriktions-Modifikations-System bezeichnet (WILSON und MURRAY, 1991). In Prokaryoten spielt die enzymatische Methylierung von DNS zudem eine Rolle bei der Initiation der Replikation und der Reparatur von DNS.

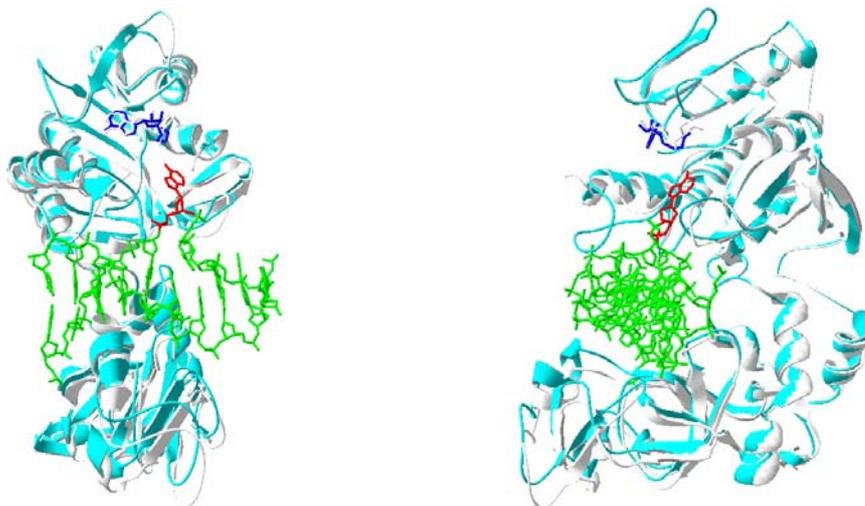
In Eukaryoten ist die enzymatische Methylierung von DNS bedeutend für die Regulation der Genexpression und damit für die genomischen Prägung. So beeinflusst z.B. die unterschiedliche Methylierung der Allele eines Gens die Zelldifferenzierung während der embryonalen Entwicklung. Zudem werden abnormale Methylierungsmuster in Tumorzellen als Hinweis auf die Bedeutung der Methylierung von bestimmten Genorten angesehen (JOST et al., 1993).

### 1.1.2 Die DNS-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* (M·TaqI)

Das Bakterium *Thermus aquaticus* wurde aus 50-70°C heißen Quellen isoliert. Es besitzt eine als M·TaqI bezeichnete DNS-Methyltransferase, die die exocyclische Aminogruppe von Adenin innerhalb der doppelsträngigen DNS-Sequenz 5'-TCGA-3' methyliert und zusammen mit der Restriktionsendonuklease R·TaqI ein Restriktions-Modifikations-System bildet.

Das aus 421 Aminosäuren aufgebaute Protein bildet zwei Domänen aus und hat ein Molekulargewicht von 47856 g/mol. Die N-terminale Domäne besteht aus neun zentral angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die von sieben  $\alpha$ -Helices flankiert sind. In diesem Teil des Enzyms befindet sich die Bindungsstelle für den Kofaktor, der durch VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken gebunden wird. Die C-terminale Domäne besteht aus vielen sehr kurzen  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices. Die beiden Domänen sind über eine kleine Polypeptid-Schleife miteinander verbunden und in Form eines „C“ angeordnet. Sie bilden so eine Furche, die mit einem Durchmesser von 2.1 nm dem von B-DNS entspricht. Die Oberfläche dieser Furche ist aufgrund eines hohen Anteils basischer Aminosäuren unter physiologischen Bedingungen positiv geladen und kann die negativ geladene DNS über Wasserstoffbrücken binden (GOEDECKE, 2000).

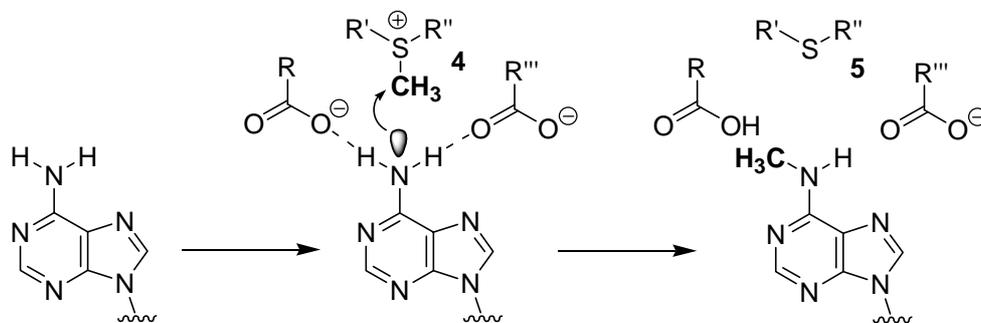
Die Methylierung von DNS durch M·TaqI erfolgt wie bei vermutlich allen anderen DNS-Methyltransferasen nach dem so genannten Basenausklapp-Mechanismus (*base flipping*): Im ersten Schritt erfolgt diffusionskontrolliert die reversible Assoziation von M·TaqI an die DNS, im zweiten Schritt das reversible Ausklappen der Zielbase Adenin. Dieses Ausklappen veranschaulicht die in Abb. 1-2 gezeigte Kristallstruktur von einem ternären Komplex aus M·TaqI, DNS (grün) und einem inaktiven Kofaktor-Analogon (blau).



**Abb. 1-2.** Frontansicht (links) und Seitenansicht der Kristallstruktur eines ternären Komplexes aus M·TaqI, DNS (grün) mit herausgeklapptem Adenin (rot) und einem inaktiven Kofaktor-Analogon (blau).

Das Adenin (rot) ist zusammen mit seiner Riboseeinheit und den benachbarten Phosphodiestergruppen komplett aus der DNS-Helix herausgedreht und im katalytischen Zentrum in passendem Abstand und richtiger Orientierung zur Methylgruppe des Kofaktors platziert. Das Zurückklappen des Adenins wird vermutlich durch eine Komprimierung der DNS, bei der das zur Zielbase komplementäre Thymin in Richtung der Helix-Achse der DNS verschoben wird, erschwert. Eine Übersicht über den Basenausklapp-Mechanismus geben z.B. LLOYD und CHENG (1997) sowie NELSON und BESTOR (1996).

Zur Methylierung bedarf es der Aktivierung von Substrat und Kofaktor. Diese erfolgt durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken zwischen der jeweiligen Spezies und dem Enzym. Schließlich greift das freie Elektronenpaar der Aminogruppe des Adenins nukleophil die Methylgruppe von AdoMet **4** an (siehe Schema 1-2).



**Schema 1-2.** Katalytische Methylierung von Adenin.

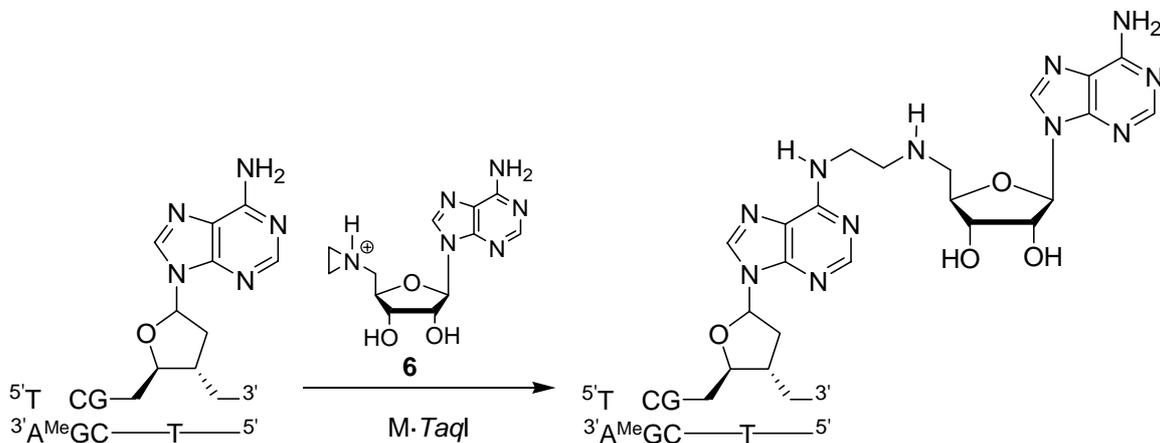
### 2.1.3 Übertragung eines nicht natürlichen Kofaktors auf DNS durch M-TaqI

Für die biochemische Forschung ist die sequenzspezifische Markierung von DNS von erheblichem Interesse. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind enzymatische Verfahren für solche Modifikationen prädestiniert. Insbesondere die Verwendung von Methyltransferasen zur Markierung nativer DNS bietet zwei wesentliche Vorteile: Zum einen ist die Modifikation kovalent und zum anderen sequenzspezifisch. Eine solche der natürlichen Methylierung nachempfundene Markierung von DNS wird als *SMILing* (*sequence-specific methyltransferase-induced labeling*) bezeichnet.

Da der Informationsgehalt der Methylgruppe sehr begrenzt ist und man auf den Einsatz von Radioaktivität verzichten möchte, wird eine Markierung mit Molekülgruppen, die z.B. durch Fluoreszenz, Lumineszenz oder Colorimetrie detektiert werden können, bevorzugt. Solche aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften leicht zu detektierenden Molekülgruppen werden Reportergruppen genannt. Bei deren Einsatz unterscheidet man zwei Methoden:

- Bei der direkten Methode werden die Reportergruppen direkt mit der jeweiligen Nukleobase kovalent verbunden.
- Bei der indirekten Methode werden zunächst so genannte Modifikationsgruppen mit der jeweiligen Nukleobase kovalent verbunden und in einem weiteren Schritt die eigentlichen Reportergruppen über kovalente oder nicht kovalente Interaktion an die Modifikationsgruppe gekuppelt.

Als erster künstlicher Kofaktor für DNS-Methyltransferasen wurde *N*-Adenosylaziridin **6** verwendet (PIGNOT et al., 1998). Im Gegensatz zu AdoMet befindet sich an der 5'-Position eine Aziridin-Einheit. Wird diese in protoniertem Zustand von der Nukleobase nukleophil angegriffen, öffnet sich der Aziridin-Ring und der gesamte Kofaktor wird auf die DNS übertragen (siehe Schema 1-3).



**Schema 1-3.** Durch *M·TaqI* katalysierte Übertragung von protoniertem *N*-Adenosylaziridin auf DNS.

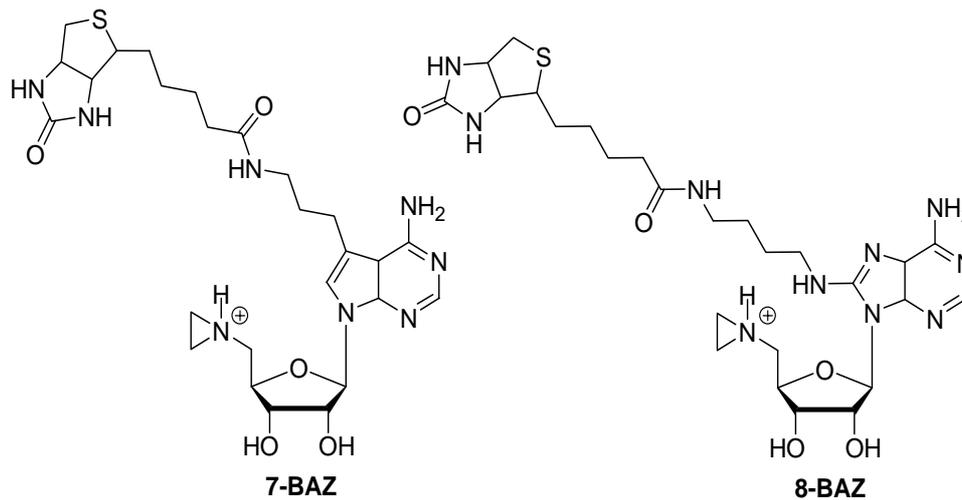
Auf diesem Weg kann *N*-Adenosylaziridin als Vehikel für eine Vielzahl von Reportergruppen eingesetzt werden (PLJEVALJICIC et al., 2003). So wurden mit der Reportergruppe Biotin z.B. die beiden Kofaktoren 7-BAZ und 8-BAZ dargestellt (siehe Abb. 1-3).

Das Konzept der durch Methyltransferasen vermittelten sequenzspezifischen Markierung von DNS kann wie folgt erweitert werden:

- Die Synthese neuer Kofaktoren kann z.B. die gleichzeitige Markierung von DNS mit unterschiedlichen Reportergruppen durch unterschiedliche DNS-Methyltransferasen sowie die gleichzeitige Detektion verschiedener Reportergruppen durch deren unterschiedliche physikalische Eigenschaften ermöglichen.
- Die Modifikation von DNS-Methyltransferasen kann z.B. durch Anpassung der Bindungsstelle die Entwicklung neuer Kofaktoren vereinfachen, sowie durch Variation der

Erkennungs-Sequenz die Begrenzung auf die natürlich vorkommenden Erkennungs-Sequenzen aufheben.

Bei der Entwicklung von für die Doppel-Markierung geeigneten künstlichen Kofaktoren wird von *N*-Adenosylaziridin ausgegangen. Durch Einführung unterschiedlich zu detektierender Reportergruppen lässt sich so ein Repertoire strukturanaloger Kofaktoren darstellen.



**Abb. 1-3.** 7-BAZ (links) und 8-BAZ.

Ein für die Überprüfung des Prinzips der Doppel-Markierung geeignetes Kofaktor-Paar bilden 7-BAZ und 8-BAZ. Die Methyltransferase *M·HhaI* kann nur 7-BAZ auf DNS übertragen, *M·TaqI* hingegen sowohl 7-BAZ als auch 8-BAZ. Ziel der weiteren Forschung ist die Variation von *M·TaqI*, so dass diese 7-BAZ nicht mehr auf DNS übertragen kann. Damit würde zum ersten Mal eine sequenzspezifische Markierung von DNS mit zwei unterschiedlichen künstlichen Kofaktoren in einem Schritt möglich.

Grundlage für diesbezügliche Überlegungen ist die Kristallstruktur von *M·TaqI* im Komplex mit DNS und einem nicht reaktiven Kofaktor-Analogen. Durch *molecular modelling* kann das nicht reaktive Kofaktor-Analogen durch *N*-Adenosylaziridin ausgetauscht und der für Derivatisierungen zur Verfügung stehende Platz abgeschätzt werden. Auf diesem Weg wurde eine Möglichkeit gefunden, durch Austausch nur einer Aminosäure die Kofaktor-Bindungs-tasche so zu verändern, dass ausschließlich die C8-Derivate von *N*-Adenosylaziridin hinein-passen.

## 1.2 Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Induktion einer Mutation, d.h. die bewusste Veränderung des Erbgutes, wird Mutagenese genannt. Dabei wird wie folgt unterschieden:

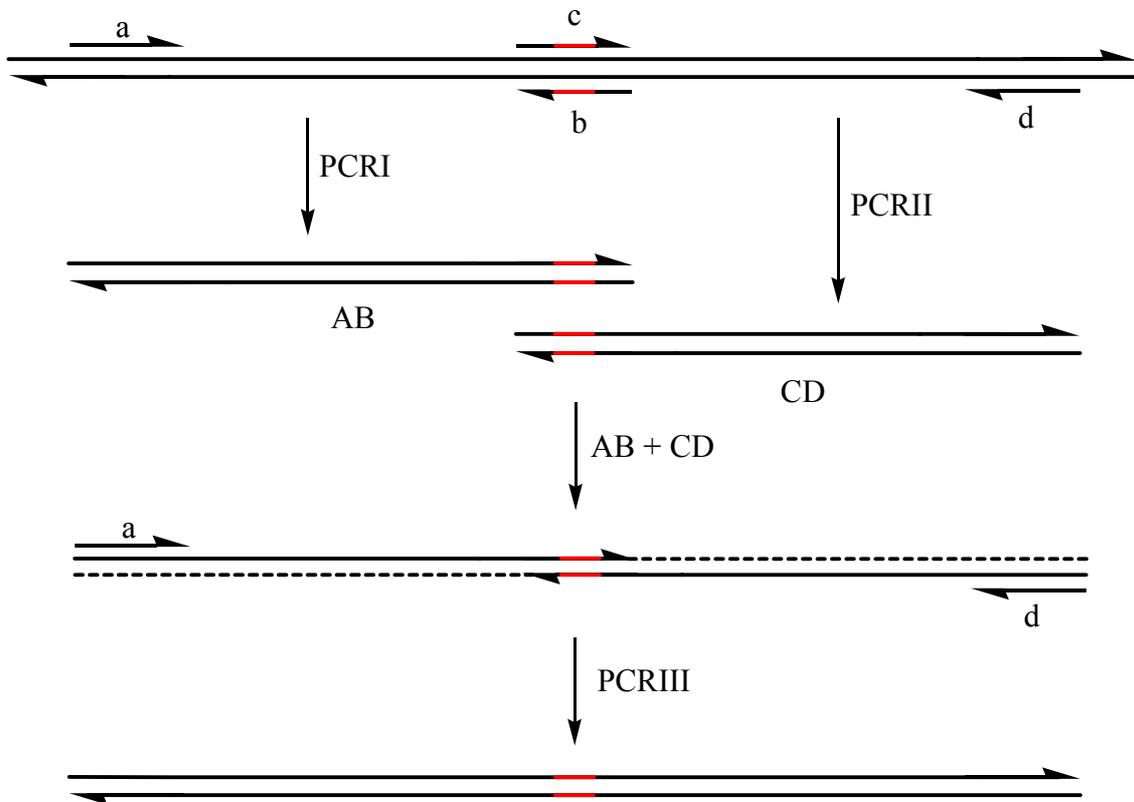
- Bei der ungerichteten Mutagenese wird das Erbgut zufällig an einem vorher nicht genau bestimmbar Ort durch biologische, chemische oder physikalische Methoden verändert.
- Bei der gerichteten Mutagenese wird das Erbgut auf eine genau definierte Art und Weise an einem genau definierten Ort zumeist durch biologische Methoden verändert.

Zur Veränderung eines Gen-Produktes werden meistens Punkt-Mutationen induziert, insbesondere der Austausch von Nukleotiden. Dieser kann folgende Auswirkungen haben:

- Der Austausch eines Nukleotids kann ein Codon in ein synonymes Codon umwandeln. Im Gen-Produkt wird die Aminosäure beibehalten und es kommt zu keiner Veränderung des ausgebildeten Proteins. Diese Form der Mutation wird als „still“ oder „stumm“ bezeichnet.
- Der Austausch eines Nukleotids kann ein Codon in ein anderes umwandeln. Als Folge davon wird im Gen-Produkt eine Aminosäure gegen eine andere ausgetauscht (*missense*-Mutation). Abhängig von der Art der eingetauschten Aminosäure und ihrer Lage kann die Funktion des Proteins eingeschränkt oder gar nicht mehr vorhanden sein. Dabei wird die Funktion entweder direkt über die Funktionalität der eingetauschten Aminosäure oder indirekt über deren Auswirkung auf die Proteinfaltung beeinflusst. Der Austausch eines Nukleotids kann ein Codon auch in ein Stop-Codon umwandeln (*nonsense*-Mutation). Dann bricht die Produktion des Gen-Produktes vorzeitig ab und in der Regel wird ein inaktives Proteinfragment erzeugt.

Eine Möglichkeit zur Induktion einer gerichteten Mutation bietet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Sie ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNS und wurde in den 1980er Jahren von MULLIS entwickelt, der 1993 dafür mit dem Nobelpreis für Chemie gewürdigt wurde. Für die Polymerase-Kettenreaktion, bei der genau definierte DNS-Bereiche bis zu einer Länge von etwa 40 kbp amplifiziert werden können, kommen thermostabile DNS-Polymerasen zum Einsatz, wie z.B. *Taq* aus *Thermus aquaticus* oder *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus*. Letztere hat den Vorteil, über einen Korrektur-Mechanismus zu verfügen, der die Anzahl von ungewollten Mutationen in der replizierten DNS sehr gering hält.

Zum Austausch eines Nukleotids ist die so genannte „*overlap extension*“-PCR geeignet, die z. B. von Ho et al. (1989) beschrieben und durch Schema 1-4 verdeutlicht wird.



**Schema 1-4.** „*overlap extension*“-PCR. Erläuterung siehe Text.

Zunächst werden in zwei separaten Polymerase-Kettenreaktionen zwei sich überlappende Fragmente des DNS-Zielabschnitts amplifiziert. Dabei wird die Mutation jeweils durch einen Primer in den überlappenden Bereich eingeführt. Die erste Polymerase-Kettenreaktion (PCR I) amplifiziert das DNS-Fragment AB. Der Primer b enthält die in das DNS-Zielfragment einzuführende Mutation (rot) und der Primer a die Wildtyp-Sequenz. Die zweite Polymerase-Kettenreaktion (PCR II) amplifiziert das DNS-Fragment CD. Der Primer c enthält die in das DNS-Zielfragment einzuführende Mutation (rot) und der Primer d die Wildtyp-Sequenz.

In einer anschließenden dritten Polymerase-Kettenreaktion (PCR III) wird auf Grundlage der zwei sich überlappenden DNS-Fragmente AB und CD das gesamte die Mutation enthaltende DNS-Zielfragment in der vollen Länge amplifiziert. Dazu werden die beiden Primer mit der Wildtyp-Sequenz verwendet.

## 2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist die Darstellung einer neuen Variante von M·TaqI, die von den beiden *N*-Adenosylaziridin-Derivaten 7-BAZ und 8-BAZ ausschließlich letzteres sequenzspezifisch auf DNS überträgt. Die Kofaktorspezifität des Enzyms soll durch eine Modifikation der Bindungstasche erreicht werden: Durch einen Aminosäure-Austausch wird an der Position 142 für Leucin das sterisch anspruchsvollere Tryptophan eingeführt. Dieses soll die Bindungstasche an der entsprechenden Stelle soweit verkleinern, dass ausschließlich die C8-Derivate von *N*-Adenosylaziridin darin Platz haben, nicht jedoch die entsprechenden C7-Derivate.

Zur Darstellung von M·TaqI/L142W soll zunächst eine entsprechende Punkt-Mutation in den Vektor pA1/A49A eingeführt und die daraus resultierende Mutante in *E. coli*-Zellen vom Stamm ER2267 transformiert werden. Anschließend soll die neue Variante von M·TaqI in *E. coli* überexprimiert werden und abschließend ein *ex vivo*-Aktivitätstest mit dem natürlichen Kofaktor AdoMet einen ersten Hinweis auf die Aktivität von M·TaqI/L142W liefern.



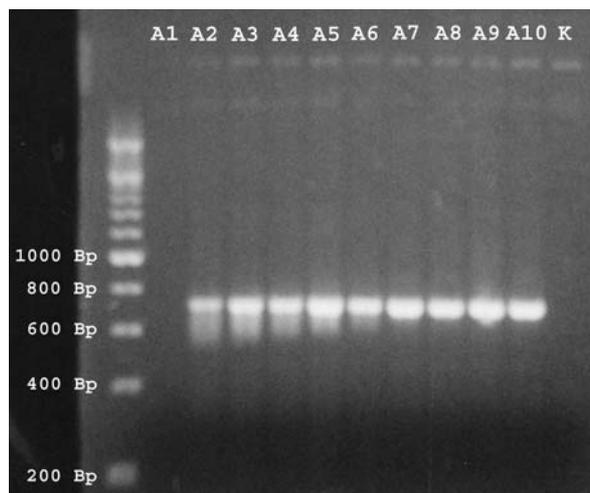


### 3.3 Darstellung von pA1/A49A/N141N/L142W

Die Darstellung des Plasmids pA1/A49A/N141N/L142W erfolgt in zwei Stufen: Ausgehend vom Plasmid pA1/A49A wird zunächst mittels *overlap extension*-PCR das die beiden Punktmutationen enthaltende DNS-Zielfragment dargestellt. Dieses wird anschließend in den Vektor pA1/A49A kloniert.

Bei der ersten Polymerase-Kettenreaktion wird die für die verwendete Polymerase optimale  $Mg^{2+}$ -Konzentration bestimmt. Die Ansätze der zu diesem Zweck durchgeführten  $Mg^{2+}$ -Konzentrationsreihe werden durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden neben einer 200 Bp DNS-Leiter jeweils 5  $\mu$ l von jedem der zehn PCRI-Ansätze A1 bis A10 sowie des Kontroll-Ansatzes K aufgetragen (siehe Abb. 3-3).

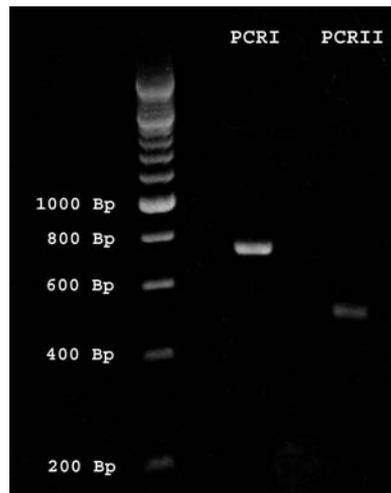
Bei den Ansätzen A2 bis A10 kann das 710 Bp große PCRI-Fragment identifiziert werden, jedoch zeigen nur die Ansätze A8 bis A10 scharfe Banden. Alle weiteren Polymerase-Kettenreaktionen werden mit einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von 4.0 mM, das entspricht dem Ansatz A8, durchgeführt.



**Abb. 3-3.** Agarose-Gel mit den Ansätzen der Konzentrationsreihe von PCRI.

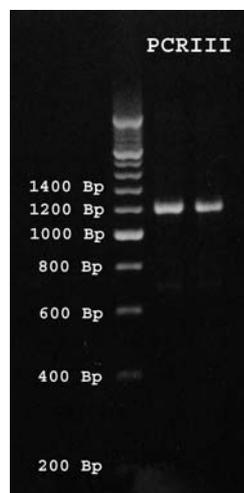
Die 710 Bp und 522 Bp großen DNS-Fragmente der ersten beiden Polymerase-Kettenreaktionen werden durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Agarose-Gel isoliert. Die Reinheit der isolierten DNS-Fragmente wird durch erneute Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden die isolierten DNS-Fragmente neben einer 200 Bp DNS-Leiter aufgetragen (siehe Abb. 3-4).

Auf dem Agarose-Gel kann sowohl das PCRI-Fragment als auch das PCRII-Fragment in hoher Reinheit identifiziert werden.



**Abb. 3-4.** Agarose-Gel mit den Produkten von PCR I und PCR II.

Das in der dritten Polymerase-Kettenreaktion amplifizierte 1203 Bp große DNS-Zielfragment wird durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Agarose-Gel isoliert. Die Reinheit des isolierten DNS-Zielfragmentes wird anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden zwei Proben des isolierte DNS-Zielfragmentes neben einer 200 Bp DNS-Leiter aufgetragen (siehe Abb. 3-5).

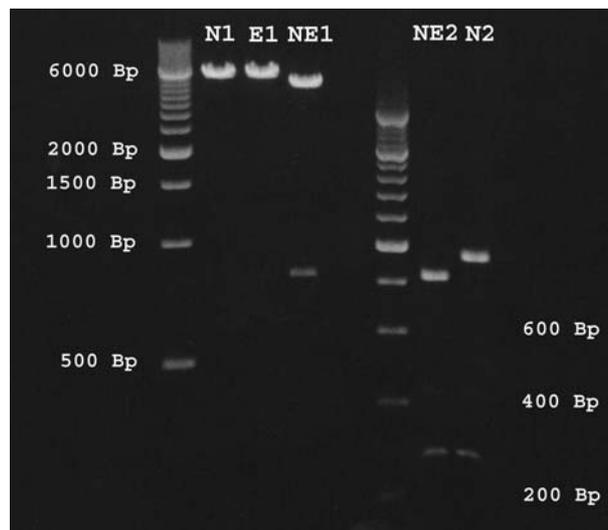


**Abb. 3-5.** Agarose-Gel mit dem Produkt von PCR III.

Auf dem Agarose-Gel ist neben der DNS-Leiter in jeder Bahn jeweils eine Bande in Höhe der 1200 Bp Markierung zu erkennen. Die Banden können dem DNS-Zielfragment zugeordnet werden, das demnach in hoher Reinheit vorliegt.

Die Klonierung des durch Polymerase-Kettenreaktion gewonnenen DNS-Zielfragment in den Vektor pA1/A49A erfolgt durch Ligation: Zunächst wird sowohl das DNS-Zielfragment als auch das Plasmid pA1/A49A mit *R·NcoI* und *R·EcoRI* fragmentiert. Die für die Ligation benötigten DNS-Fragmente, das 810 Bp große Teilstück des DNS-Zielfragmentes und das 4919 Bp große Teilstück vom Vektor pA1/A49A, werden durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Agarose-Gel isoliert.

Die Präparation der für die Ligation benötigten DNS-Fragmente wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu wird zum einen neben einer 500 Bp DNS-Leiter Plasmid-DNS aufgetragen, die mit *R·NcoI* (N1), mit *R·EcoRI* (E1) sowie mit *R·NcoI* und *R·EcoRI* (NE1) inkubiert wurde. Zum anderen wird neben einer 200 Bp DNS-Leiter DNS-Zielfragment aufgetragen, das mit *R·NcoI* und *R·EcoRI* (NE2) sowie nur mit *R·NcoI* (N2) inkubiert wurde (siehe Abb. 3-6).



**Abb. 3-6.** Agarose-Gel mit den DNS-Fragmenten für die Ligation.

Auf dem Agarose-Gel können die ersten beiden Banden neben der 500 Bp DNS-Leiter der linearisierten Plasmid-DNS zugeordnet werden, die Banden in der dritten Bahn der doppelt verdauten Plasmid-DNS. Die erste Bahn neben der 200 Bp DNS-Leiter kann dem doppelt verdaulichem DNS-Zielfragment zugeordnet werden, das fehlende dritte DNS-Fragment ist auf dem Photo nicht zu erkennen. Die zweite Bahn neben der 200 Bp DNS-Leiter kann dem einfach verdaulichem DNS-Zielfragment zugeordnet werden.

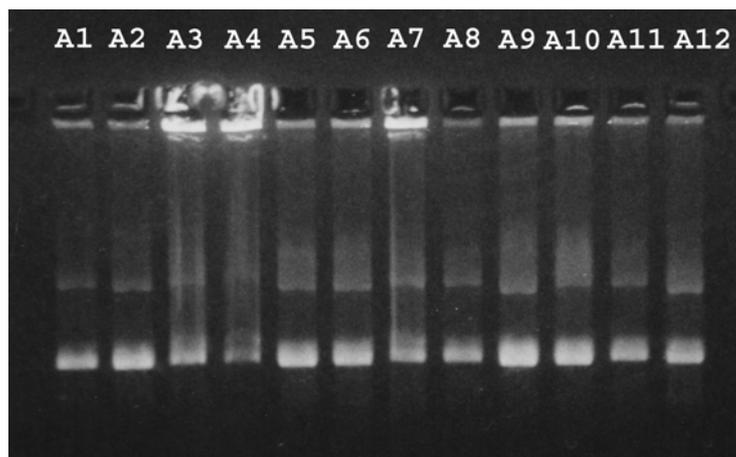
Die für die Ligation benötigten und in hoher Reinheit vorliegenden DNS-Fragmente werden mit T4 DNA Ligase ligiert. Der entsprechende Ansatz wird anschließend direkt für die Elektroporation eingesetzt.

### 3.4 Transformation von pA1/A49A/N141N/L142W

Der durch Ligation erzeugte Vektor pA1/A49A/N141N/L142W wird durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen vom Stamm ER2267 transformiert. Zudem wird zur Kontrolle parallel der Wildtyp pA1/A49A transformiert. Die Transformationsrate des Wildtyps beträgt  $3.2 \cdot 10^7$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  eingesetzte DNS, die Transformationsrate der Mutante ist mit  $5.2 \cdot 10^3$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  eingesetzte DNS deutlich geringer.

### 3.5 Präparation von pA1/A49A/N141N/L142W

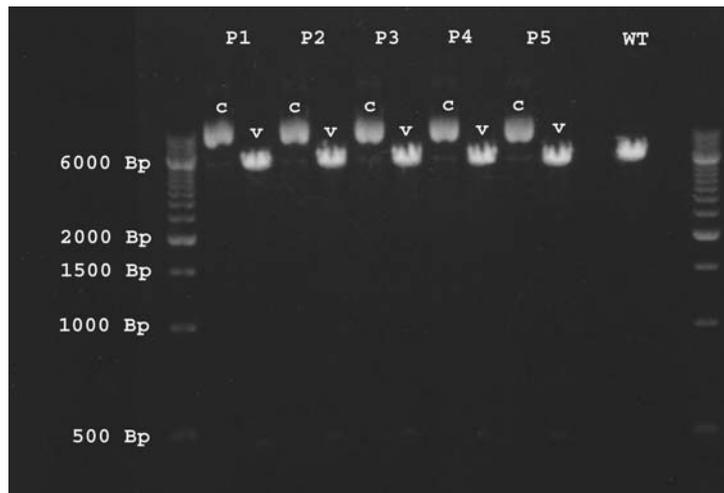
Zur Präparation des Plasmids pA1/A49A/N141N/L142W werden von den Transformanden zwölf Kolonien ausgewählt. Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgt jeweils aus den Zellen einer entsprechenden Kultur und wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Abb. 3-7).



**Abb. 3-7.** Agarose-Gel zur Kontrolle der Präparation von pA1/A49A/N141N/L142W.

Auf dem Agarose-Gel ist in jeder der zwölf Bahnen eine starke Bande mit einer Reihe von schwächeren verschmierten Banden zu erkennen. Demnach ist die Isolation der Plasmid-DNS bei jedem der zwölf Ansätze A1 bis A12 gelungen.

Bei fünf der zwölf Proben wird die Identität des Plasmids pA1/A49A/N141N/L142W nach Fragmentierung mit *R·MunI* und *R·NcoI* durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dazu wird neben einer 500 Bp DNS-Leiter abwechselnd für jede der fünf Proben P1 bis P5 jeweils nicht inkubierte, sowie mit *R·NcoI* und *R·MunI* inkubierte Plasmid-DNS aufgetragen. Als Kontrolle wird zudem mit *R·MunI* und *R·NcoI* inkubierte Wildtyp-Plasmid-DNS (WT) aufgetragen (siehe Abb. 3-8).



**Abb. 3-8.** Agarose-Gel zur Identifizierung von pA1/A49A/N141N/L142W.

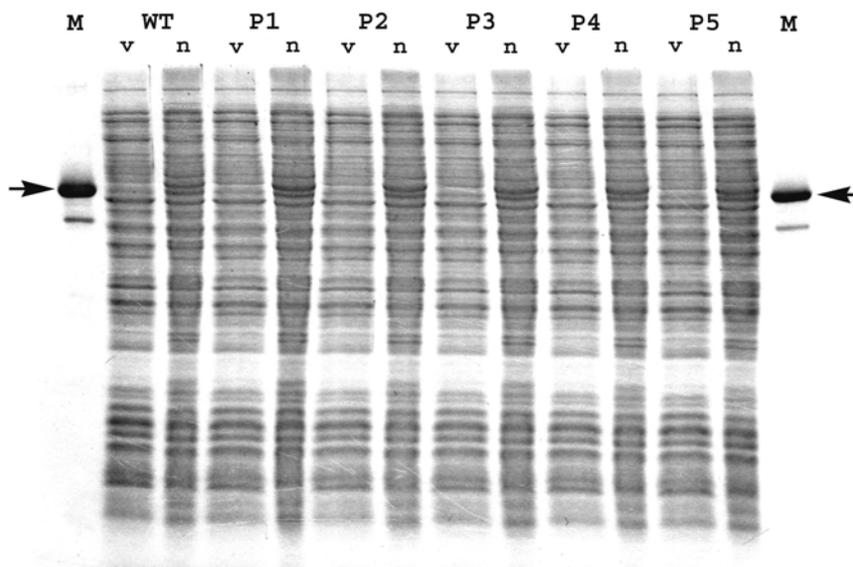
Auf dem Agarose-Gel kann für jede der fünf Proben jeweils zirkuläre (c) sowie doppelt verdaute (v) Plasmid-DNS identifiziert werden. Die aus dem Doppel-Verdau stammenden kleinen DNS-Fragmente sind auf dem Photo nicht zu erkennen. Mit diesem Restriktionstest ist das Vorhandensein der beiden Punkt-Mutationen in der Plasmid-DNS und damit die Identität des Plasmids pA1/A49A/N141N/ L142W nachgewiesen. Bei der Kontrolle ist nur eine Bande vorhanden, der Wildtyp wird wie erwartet nur durch *R·NcoI* linearisiert, nicht jedoch zusätzlich von *R·MunI* verdaut.

Die Identität des Plasmids pA1/A49A/N141N/L142W wird durch eine zusätzliche Sequenzierung bestätigt. Vom *E. coli*-Stamm ER2267/pA1/A49A/N141N/L142W wird für zukünftige Untersuchungen eine Glycerin-Stockkultur angelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6 Expressionstest

Durch einen Expressionstest wird die Expression von *M·TaqI/L142W* in *E. coli* überprüft und quantitativ mit der des Wildtyps verglichen. Dabei wird auf die Kulturen der *E. coli*-Stämme ER2267/pA1/A49A und ER2267/pA1/A49A/N141N/L142W aus 3.5 zurückgegriffen.

Die Expression von *M·TaqI* wird durch IPTG in Kulturen großer Dichte induziert. Jeweils vor der Induktion und 4 h danach wird ein Teil der Zellen geerntet. Das proteinhaltige Lysat dieser Zellen wird durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. An den Seiten des Gels wird der Marker (M) aufgetragen, dessen obere Bande aus bereits inaktivem *M·TaqI* besteht. Dazwischen werden von links nach rechts die Proben des Wildtyps (WT) und fünf Proben von *M·TaqI/L142W* (P1 bis P5) aufgetragen, abwechselnd zuerst das Lysat der Zellen vor und dann das Lysat der Zellen nach der Induktion (siehe Abb. 3-9).

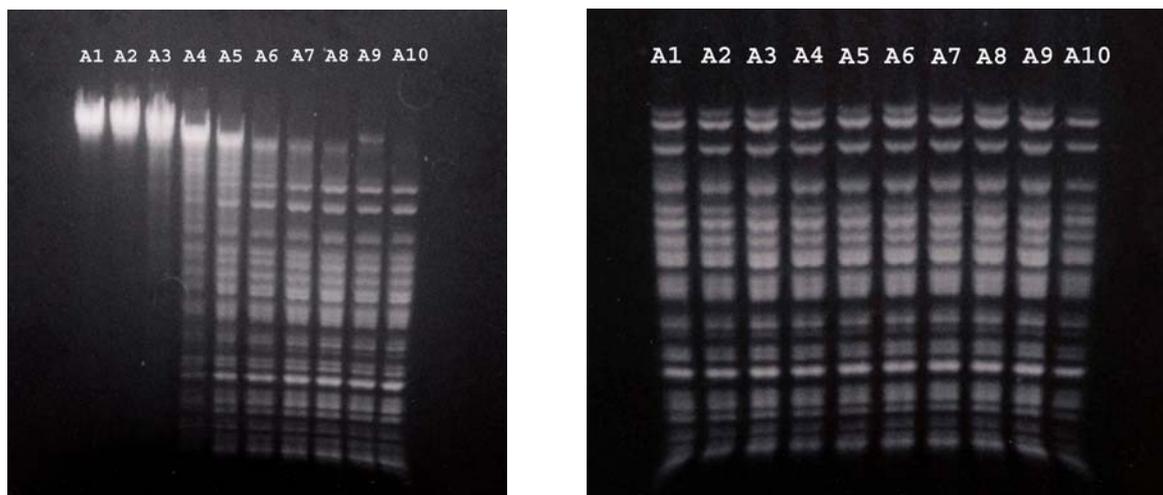


**Abb. 3-9.** Polyacrylamid-Gel von den Proben des Expressionstests.

Auf dem Gel sind in jeder Bahn in Höhe des Markers (Pfeile) zwei Banden zu erkennen, die *M·TaqI* zugeordnet werden können. Die Intensität der Banden nach Induktion (n) ist deutlich höher als die der Banden vor Induktion (v), während die Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonien nicht signifikant sind. Demnach unterscheidet sich die Expression der Variante *M·TaqI/L142W* nicht signifikant von der vom Wildtyp.

### 3.7 *Ex vivo*-Aktivitätstest

Durch einen *ex vivo*-Aktivitätstest mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet wird die Aktivität von *M·TaqI/L142W* qualitativ mit der des Wildtyps verglichen. Dabei wird auf jeweils eine Kultur der *E. coli*-Stämme ER2267/pA1/A49A/N141N/L142W und ER2267/pA1/A49A aus 3.5 zurückgegriffen. Die Aufzucht der Kulturen und Ernte der Zellen verläuft analog zum Expressionstest. Nach dem Ultraschallaufschluss der abgeernteten Zellen wird das Lysat durch Zentrifugieren von Zelltrümmern gereinigt und direkt für den Aktivitätstest verwendet. Dazu wird jeweils mit dem Lysat einer Kultur eine Konzentrationsreihe angesetzt, deren zehn Proben zunächst mit AdoMet und  $\lambda$ -DNS und anschließend mit der Restriktionsendonuklease *R·TaqI* inkubiert werden. Abschließend werden die Ansätze der beiden Konzentrationsreihen durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 3-10).



**Abb. 3-10.** Agarose-Gel von den Ansätzen des *ex vivo*-Aktivitätstests: *M·TaqI* (Wildtyp, links) und *M·TaqI/L142W* (Variante).

Das Agarose-Gel vom *ex vivo*-Aktivitätstest des Wildtyps lässt in den ersten beiden Bahnen jeweils eine einzelne starke Bande ungeschnittener  $\lambda$ -DNS erkennen, in den folgenden Bahnen sind mehrere nicht scharf zu trennende Banden von DNS-Fragmenten sichtbar. Das Agarose-Gel vom *ex vivo*-Aktivitätstest von *M·TaqI/L142W* weist in jeder Bahn mehrere, nicht scharf zu trennende Banden auf. Demnach vermag *M·TaqI/L142W* die  $\lambda$ -DNS nicht zu methylieren und damit vor der Fragmentierung zu schützen. Da Wildtyp und *M·TaqI/L142W* bei dem Test in vergleichbarer Menge vorliegen, kann von einer sehr geringen Aktivität oder gar Inaktivität der neuen Variante von *M·TaqI* ausgegangen werden.

## 4 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurde der Vektor pA1/A49A/N141N/L142W dargestellt, isoliert und in *E. coli* transformiert. Anschließend wurde das entsprechende Enzym M·*TaqI*/L142W in *E. coli* überexprimiert. Ein abschließender *ex vivo*-Aktivitätstest mit dem natürlichen Kofaktor AdoMet konnte keine Aktivität der neuen Variante von M·*TaqI* nachweisen.

Zur abschließenden Beurteilung von M·*TaqI*/L142W ist jedoch dessen Isolierung und Reinigung abzuwarten. Das so aufbereitete Enzym könnte durchaus eine ausreichende Aktivität mit den künstlichen Kofaktoren aufweisen.

Das Ergebnis der vorliegenden Forschungsarbeit zeigt aber, dass das Experiment nicht allein durch Vorhersagen von Strukturen ersetzt werden kann. Die auf der dreidimensionalen Struktur von M·*TaqI* beruhenden Überlegungen zur Gestaltung einer neuen Variante berücksichtigen nur rein statische sterische Aspekte, nicht hingegen thermodynamische und kinetischen Effekte. Zudem wurde der für den Weg des Kofaktors in die Bindungstasche und für die eigentliche Reaktion benötigte Platzbedarf nicht berücksichtigt, ebenso wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen Enzym und Kofaktor nicht betrachtet.

Eine Erklärung für die beobachtete Inaktivität von M·*TaqI*/L142W können nur weitere Untersuchungen liefern: Zum einen kann untersucht werden, ob der natürliche Kofaktor überhaupt in der Bindungstasche gebunden wird. Ist dies der Fall, dann müssen zukünftige Überlegungen den Platzbedarf, den die einzelnen Spezies für die eigentliche Reaktion benötigen, in die Planung für die Gestaltung von Enzymen mit einschließen. Zudem müssen die durch die Modifikation veränderten Wechselwirkungen in der Bindungstasche beachtet werden. So führt Tryptophan einen Wasserstoffbrücken-Akzeptor ein, der durch Interaktion mit anderen Aminosäuren oder dem Kofaktor die Aktivität des Enzyms beeinflussen kann. Zum anderen kann eine weitere Variante von M·*TaqI* mit einer modifizierten Bindungstasche dargestellt werden: Diese würde an der Aminosäureposition 142 über Phenylalanin anstatt Leucin verfügen und ebenfalls durch Mutagenese des Vektors pA1/A49A zugänglich sein. Dabei ist Phenylalanin sterisch nicht so anspruchsvoll wie Tryptophan und verfügt nicht über weitere funktionelle Gruppen. Die Einführung einer Restriktionsstelle für R·*MunI* wäre in diesem Fall jedoch nicht möglich.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Material

##### 5.1.1.1 Allgemeines

In der vorliegenden Forschungsarbeit werden alle Arbeiten mit Bakterien, Proteine oder DNS in sterilen Lösungen mit sterilem Gerät durchgeführt. Lösungen werden gegebenenfalls vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert, Geräte autoklaviert oder in der offenen Flamme sterilisiert. Alle Arbeiten mit Proteinen werden auf Eis durchgeführt.

##### 5.1.1.2 Bakterien

In der vorliegenden Forschungsarbeit werden alle Arbeiten mit lebenden Bakterien in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Es wird ausschließlich mit folgendem *E. coli*-Stamm gearbeitet:

- ER2267: F<sup>+</sup>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zzf::mini-Tn10 (Kan<sup>R</sup>)/ Δ(argF-lacZ)U169 glnV44 e14<sup>-</sup>(McrA<sup>-</sup>) rfbD1<sup>?</sup> recA1 relA1<sup>?</sup> endA1 spoT1<sup>?</sup> thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

Die Bakterien werden aerob bei 37°C entweder im Schüttler in flüssigem Nährmedium bei 250 U/min oder im Inkubator auf festem Nährmedium gezüchtet. Als Nährmedium wird ein Vollmedium nach LURIA und BERTANI verwendet:

- LB-Medium: 1.0% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1.0% (w/v) Natriumchlorid, pH 7.0 mit Natriumhydroxid
- LB-Platten: 1.0% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1.0% (w/v) Natriumchlorid, 1.5% (w/v) Agarose, pH 7.0 mit Natriumhydroxid

Das Nährmedium wird für 20 min bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Sofern erforderlich, wird nach Abkühlung auf etwa 50°C mit Antibiotika supplementiert, so dass eine Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin (Amp) und 35 µg/ml Kanamycin (Kan) vorliegt.

Zur Präparation von Plasmid-DNS erfolgt die Ernte der entsprechenden Zellen gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, bei kleineren Kulturen mit einer Eppendorf-Zentrifuge 10 min bei 4000 U/min und bei größere Kulturen mit einer Beckmann-Zentrifuge 15 min bei 17000 U/min. Die Isolation der Plasmid-DNS aus den Zellen erfolgt mit dem QIAprep<sup>®</sup> Miniprep-Kit (Qiagen, 2002) oder mittels Plasmid MiniPrep.

### 5.1.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

- TBE-Puffer (5-fach): 0.45 M Borsäure, 0.01 M EDTA, 0.45 M TRIS (pH 8.0)
- Probenpuffer (*loading buffer*, 6-fach): 0.25% (w/v) Bromphenol-Blau, 30% (v/v) Glycerin

### 5.1.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Proben-Puffer (2-fach): 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 0.001% (w/v) Bromphenol-Blau, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 52.5 mM TRIS·HCl (pH 6.8)
- SDS-Puffer (5-fach): 1 M Glycin, 0.5% (w/v) SDS, 125 mM TRIS (pH 8.3)
- Trenngel-Puffer (4-fach): 0.4% (w/v) SDS, 1.5 M TRIS·HCl (pH 8.8)
- Sammelgel-Puffer (4-fach): 0.4% (w/v) SDS, 0.5 M TRIS·HCl (pH 6.8)
- Trenngel (*lower-gel*): 1.25 ml Trenngel-Puffer (4-fach), 2.5 ml Acrylamid (30%), 1.25 ml Wasser, 25  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (100 mg/ml), 2.5  $\mu$ l TEMED
- Sammelgel (*upper-gel*): 375  $\mu$ l Sammelgel-Puffer (4-fach), 250  $\mu$ l Acrylamid (30%), 875  $\mu$ l Wasser, 12  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (100 mg/ml), 1.5  $\mu$ l TEMED
- Coomassie Färbelösung: 0.05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) Wasser
- Coomassie Entfärbelösung: 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Ethanol, 50% (v/v) Wasser

### 5.1.1.5 Isolierung von Plasmid-DNS

- EB-Puffer: 10 mM TRIS·HCl (pH 8.5)

Alle für die Isolierung von Plasmid-DNS mit dem QIAprep<sup>®</sup> Miniprep-Kit bzw. dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) verwendeten Puffer und Lösungen sind Bestandteil des jeweiligen Kits.

### 5.1.1.6 Ligase-Puffer

- Ligase-Puffer (10-fach, für T4 DNA Ligase, MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): 400 mM TRIS·HCl (pH 7.8), 100 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Adenosintriphosphat, 100 mM DTT

### 5.1.1.7 Restriktions-Puffer

- B3\*-Puffer (10-fach, für *Nco*I, Jena Bioscience GmbH (Jena)): 500 mM TRIS·HCl (pH 7.9), 100 mM Magnesiumchlorid, 1 M Natriumchlorid, 0.2% (w/v) Triton X-100, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA

- Y<sup>+</sup>/Tango-Puffer (5-fach, für *EcoRI* und *NcoI*, MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): 165 mM TRIS·Acetat (pH 7.9), 50 mM Magnesiumacetat, 330 mM Kaliumacetat, 0.5 mg/ml BSA
- G<sup>+</sup>-Puffer (10-fach, für *MunI*, MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): 100 mM TRIS·HCl (pH 7.5), 100 mM Magnesiumchlorid, 500 mM Natriumchlorid, 1 mg/ml BSA

#### 5.1.1.8 Polymerase-Kettenreaktion

- Primer (Jena Bioscience GmbH (Jena)): DNS-Sequenz siehe 5.1.4
- PCR-Puffer (10-fach, MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): 200 mM TRIS·HCl (pH 8.8), 100 mM Ammoniumsulfat, 100 mM Kaliumchlorid, 1% (w/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA
- dNTP-Lösung (10 mM, MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- Mg<sup>2+</sup>-Lösung (MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)): 25 mM Magnesiumchlorid

#### 5.1.1.9 Plasmid Mini Prep

- Lösung I: 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS·HCl (pH 8.0)
- Lösung II: 0.2 M Natriumhydroxid, 1% (w/v) SDS
- Lösung III: 5 M Kaliumacetat
- Phenol-Lösung: Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1)
- TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM TRIS·HCl (pH 8.0)

#### 5.1.1.10 Aktivitätstest

- Puffer A: 6.7 mM MES, 6.7 mM Natriumacetat, 6.7 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.5
- Puffer B: 1 M Natriumchlorid, 6.7 mM MES, 6.7 mM Natriumacetat, 6.7 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.5
- NEB 4 (10-fach, ohne Mg<sup>2+</sup>): 200 mM TRIS Acetat, 500 mM Kaliumacetat, 10 mM DTT, pH 7.9 mit KOH
- Test-Puffer: 80  $\mu$ M AdoMet, 10% (v/v) NEB 4 (10-fach, ohne Mg<sup>2+</sup>), 0.1 mg/ml BSA, 50  $\mu$ g/ml  $\lambda$ -DNS, 0.01% (v/v) Triton, 1 mM EDTA
- *TaqI*-Puffer: 15 mM TRIS·HCl (pH 8.0), 15 mM Magnesiumchlorid, 150 mM Natriumchlorid, 0.15 mg/ml BSA, 2000 u/ml R·*TaqI*

#### 5.1.1.11 Restriktionsendonukleasen

- R·*Mun*I: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
- R·*Nco*I: Jena Bioscience GmbH (Jena)
- R·*Eco*RI: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
- R·*Taq*I: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

#### 5.1.1.12 Sonstige Proteine

- BSA: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
- *Pfu*: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
- T4 DNA Ligase: MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

#### 5.1.1.13 Geräte

- Agarose Minigelsystem: MWG Biotech (Ebersberg)
- Autoklav "Varioklav Classic Line Standgerät": H+P Labortechnik AG (Oberschleißheim)
- Elektroporationsküvetten: Biozym Diagnostik (Oldendorf)
- Inkubator: Heraeus (Hanau)
- pH-Meter "766 Calmatic": Knick (Berlin)
- Schüttler „*innova*<sup>TM</sup> 4330“: New Brunswick Scientific (Edison, USA)
- Tischzentrifuge "Centrifuge 5415D": Eppendorf (Köln)
- Transformationsgerät "Micro Pulser<sup>TM</sup>": BIORad (München)
- Ultraschallgerät "Sonifier W-250": G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
- UV/Vis-Spektrometer „UV-Visible-Spektrometer Carey 3E“: Varian (Darmstadt)
- Vortexer "Vortex-Genie2": Scientific Industries
- Zentrifuge "Avanti J-20" mit Rotor „JA-17“: Beckmann (München)

#### 5.1.1.14 Chemikalien

Die in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu Biochemicals GmbH (Gaiberg), Jena Bioscience GmbH (Jena), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main), Qiagen (Hilden), Riedel-de Häen (Seelze), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg).

## 5.1.2 Methoden

### 5.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung von dsDNS-haltigen Lösungen erfolgt UV/Vis-spektroskopisch. Dazu werden 2 µl der dsDNS-haltigen Lösung mit 68 µl Wasser verdünnt und gegen Wasser als Standard in einer 1 cm Quarzküvette bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm gemessen. Gemäß Qiagen ergibt sich die dsDNS-Massenkonzentration  $\rho(\text{dsDNS})$  aus der gemittelten Absorption von drei Einzelmessungen  $\bar{A}_{260}$ , dem Verdünnungsfaktor  $f_{\text{Verd.}}$ , hier  $f_{\text{Verd.}} = 35$ , und dem spektroskopischen Faktor der dsDNS  $f_{\text{spektr.}} = 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  wie folgt:

$$\rho(\text{dsDNS}) = \bar{A}_{260} \cdot f_{\text{Verd.}} \cdot f_{\text{spektr.}} \quad (5.1)$$

Die Konzentrationsbestimmung von ssDNS-haltigen Lösungen erfolgt UV/Vis-spektroskopisch. Dazu werden 2 µl der ssDNS-haltigen Lösung mit 68 µl Wasser verdünnt und gegen Wasser als Standard in einer 1 cm Quarzküvette bei der Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm gemessen. Gemäß dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz ergibt sich die ssDNS-Konzentration  $c(\text{ssDNS})$  aus der gemittelten Absorption von drei Einzelmessungen  $\bar{A}_{260}$ , dem Verdünnungsfaktor  $f_{\text{Verd.}}$ , hier  $f_{\text{Verd.}} = 35$ , und dem anhand der DNS-Sequenz berechneten Absorptionskoeffizient  $\varepsilon_{\text{ber.}}$  wie folgt:

$$c(\text{ssDNS}) = \frac{\bar{A}_{260} \cdot f_{\text{Verd.}}}{\varepsilon_{\text{ber.}}} \quad (5.2)$$

### 5.1.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von proteinhaltigen Lösungen erfolgt nach der Methode von BRADFORD (1976). Dazu wird die proteinhaltige Lösung mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 900 µl BRADFORD-Reagenz versetzt. Nach 10 min wird die Absorption gegen Wasser als Standard in einer 1 cm Quarzküvette bei der Wellenlänge  $\lambda = 595$  nm gemessen. Die Konzentration wird anhand einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

### 5.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgt durch Gelelektrophorese mit 1%igen Agarose-Gelen in Ethidiumbromid-haltigem (0.5 µg/ml) TBE-Puffer (0.5-fach) bei 100 V. Dazu werden die Proben jeweils mit einem Sechstel ihres Volumens an Probenpuffer (6-fach) versetzt. Als Größenstandard (Marker) werden DNS-Leitern mit einem Abstand von 200 Bp (MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)) und 500 Bp (MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot))

verwendet. Direkt nach der Elektrophorese wird die DNS mit dem eingelagerten Ethidiumbromid durch UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312 \text{ nm}$  sichtbar gemacht und das Agarose-Gel mit einer Polaroidkamera fotografiert. Aus dem Agarose-Gel wird die DNS mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit (Qiagen, 2002) isoliert.

#### 5.1.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 7.5%igen Sammelgelen und 15%igen Trenngelen in SDS-Puffer bei 200 V. Zur Vorbereitung werden die Proben jeweils mit der gleichen Menge an Probenpuffer (2-fach) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Als Größenstandard (Marker) wird bereits inaktive M·TaqI verwendet. Direkt nach der Elektrophorese werden die Proteine durch Anfärben mit Coomassie sichtbar gemacht. Nach dem anschließenden Vakuumtrocknen wird das Polyacrylamid-Gel gescannt.

#### 5.1.3 DNS-Sequenzen der Primer

Nachstehend sind die DNS-Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer sowie deren Schmelzpunkte angegeben:

- Primer a:  
Sequenz: 5'...CTCATGTTTGACAGCTTATCATCGACTGC...3'  
Schmelzpunkt: 62°C
- Primer b:  
Sequenz: 5'...GAAAGGCCCCGTACCAATTGTACTTGCCC...3'  
Schmelzpunkt: 69°C
- Primer c:  
Sequenz: 5'...GGGCAAGTACAATTGGTACGGGGCCTTTC...3'  
Schmelzpunkt: 69°C
- Primer d:  
Sequenz: 5'...CCGGAGTGGTTTTTCTCGTAATCTACC...3'  
Schmelzpunkt: 60°C

Die beiden durch die Primer b und c in das DNS-Zielfragment einzuführenden Punkt-Mutationen sind fett gekennzeichnet.

Nachstehend ist die DNS-Sequenz des zur Sequenzierung verwendeten Primers sowie dessen Schmelzpunkt angegeben:

- Sequenz: 5'...GTGGAGATAGACCCAAAAGCC...3'  
Schmelzpunkt: 52°C

### 5.1.4 DNS-Sequenz von pA1/A49A

Nachstehend ist ein Ausschnitt der DNS-Sequenz von pA1/A49A mit der korrespondierenden Aminosäure-Sequenz von M·TaqI wiedergegeben:

1485 ATGGGTCTCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTAACGCTGCTCCTAGGAGCCTGGGCCGG  
0 M G L P P L L S L P S N A A P R S L G R

1545 GTGGAGACCCCCCGAGGTGGTGGACTTCATGGTCTCCCTGGCCGAGGCGCCAGGGGG  
21 V E T P P E V V D F M V S L A E A P R G

1605 GGAAGGGTGCTGGAGCCCGCCTGCGCCCATGGGCCCTTCCTCCGGGCTTTCCGGGAGGCC  
41 G R V L E P A C A H G P F L R A F R E A

1665 CACGGGACGGCCTACCGCTTCGTGGGGGTGGAGATAGACCCAAAAGCCCTGGACCTCCCC  
61 H G T A Y R F V G V E I D P K A L D L P

1725 CCCTGGGCCGAGGGCATCCTGGCGGACTTCCTCCTCCTGGGAGCCGGGGAGGCCTTTGAC  
81 P W A E G I L A D F L L W E P G E A F D

1785 CTGATCCTGGGCAATCCGCCTTACGGCATCGTAGGAGGAGCCAGCAAATACCCCATTCAC  
101 L I L G N P P Y G I V G E A S K Y P I H

1845 GTCTTCAAAGCGGTCAAGGACCTCTACAAGAAGGCCTTTTCCACCTGGAAGGGCAAGTAC  
121 V F K A V K D L Y K K A F S T W K G K Y

1905 AACTTGACGGGGCCTTTCTTGAAAAGGCCGTTTCGCCTTCTTAAGCCTGGTGGGGTCTCTC  
141 N L Y G A F L E K A V R L L K P G G V L

1965 GTCTTTGTAGTCCCAGCCACCTGGCTTGTCTGAGGATTTTGCCCTCCTTCGCGAGTTC  
161 V F V V P A T W L V L E D F A L L R E F

2025 CTTGCCCGGGAAGGGAAAACATCTGTATACTACCTTGGCGAGGTTTCCCAGAAAAAAG  
181 L A R E G K T S V Y Y L G E V F P Q K K

2085 GTTAGCGCTGTAGTGATTCGCTTCCAGAAGAGCGGAAAAGGCCTTTCACCTTGGGATAACC  
201 V S A V V I R F Q K S G K G L S L W D T

2145 CAAGAAAGCGAAAGCGGGTTCACGCCCATCCTCTGGGCTGAATATCCACATTGGGAAGGA  
221 Q E S E S G F T P I L W A E Y P H W E G

2205 GAGATTATCCGCTTTGAAACAGAGGAGACGCGGAAGATGGAAATATCGGGAATGCCACTG  
241 E I I R F E T E E T R K L E I S G M P L

2265 GGAGACCTCTTTCATATCCGCTTCGCCGCAAGAAGCCCTGAATTCAAGAAACATCCAGCA  
261 G D L F H I R F A A R S P E F K K H P A

2325 GTGAGAAAGGAACCGGGGCCAGGTCTTGTGCCTGTGCTCACAGGAAGAAATTTAAAGCCG  
281 V R K E P G P G L V P V L T G R N L K P

2385 GGGTGGGTAGATTACGAGAAAAACCACTCCGGGCTTTGGATGCCCAAGGAAAGGGCCAAG  
301 G W V D Y E K N H S G L W M P K E R A K

### 5.1.5 DNS-Sequenzen der Restriktionsendonukleasen

In Tabelle 5.1 sind die Erkennungs-Sequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen aufgelistet:

**Tab. 5.1.** Erkennungs-Sequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Restriktionsendonuklease	Organismus	Erkennungssequenz
R· <i>Nco</i> I	<i>Norcardia corallina</i>	5'...C <sup>↓</sup> C A T G G...3' 3'...G G T A C <sup>↑</sup> C...5'
R· <i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'...G <sup>↓</sup> A A T T C...3' 3'...C T T A A <sup>↑</sup> G...5'
R· <i>Mun</i> I	<i>Mycoplasma unidentifed</i>	5'...C <sup>↓</sup> A A T T G...3' 3'...G T T A A <sup>↑</sup> C...5'

## 5.2 Präparation von pA1/A49A

Zur Amplifikation des Plasmids pA1/A49A wird zunächst mit einer entsprechenden Stock-Kultur eine LB-Platte/Amp/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer so gewonnenen Kolonie werden 5 ml LB-Medium/Amp/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Anschließend wird 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert und das Nährmedium dekantiert. Die Zellen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Plasmid-DNS wird mit dem QIAprep<sup>®</sup> Miniprep-Kit aus den Zellen isoliert und in 50 µl EB-Puffer aufgenommen.

Die Identifizierung der isolierten Plasmid-DNS erfolgt durch Restriktion. Dazu wird die Plasmid-Lösung 1 h bei 37°C mit R·*Nco*I inkubiert, die Zusammensetzung des Restriktions-Ansatzes ist in Tab. 5.2 gegeben.

**Tab. 5.2.** Restriktion von pA1/A49A mit R·*Nco*I. Ansatzvolumen: 10 µl.

Substanz	Menge
pA1/A49A	112 ng
10-fach B3*-Puffer	1 µl
10-fach BSA	1 µl
R· <i>Nco</i> I	1 u

Die Präparation und Restriktion der Plasmid-DNS wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden neben einer 500 Bp DNS-Leiter sowohl 112 ng nicht inkubierte Plasmid-DNS als auch der gesamte Restriktions-Ansatz aufgetragen.

### 5.3 Darstellung von pA1/A49A/N141N/L142W

#### 5.3.1 PCRI

Die für die verwendete Polymerase optimale  $Mg^{2+}$ -Konzentration wird bei der ersten Polymerase-Kettenreaktion (PCRI) bestimmt. Dazu wird eine Konzentrationsreihe gemäß der Tab. 5.3 und 5.4 angesetzt. Zusätzlich wird eine Kontrolle gemäß Tab. 5.3, mit 5.0 mM  $Mg^{2+}$  und ohne Plasmid, durchgeführt. Der PCR-Zyklus ist in Tab. 5.5 angegeben. Im Anschluss an die PCR wird die Temperatur bei 4°C gehalten.

**Tab. 5.3.** PCR I-Ansatz. Ansatzvolumen: 50 µl

Substanz	Menge
pA1/A49A	112 ng
Primer a (25 µM)	1 µl
Primer b (25 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
10-fach Puffer	5 µl
$Mg^{2+}$ -Lösung (25 mM)	s. Tab 5.4
<i>Pfu</i>	1.25 u

**Tab. 5.4.**  $Mg^{2+}$ -Konzentrationsreihe für PCRI.

Ansatz	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
$c(Mg^{2+})$ in mM	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0

**Tab. 5.5.** PCRI-Zyklus.

Zyklus-Nr.	Denaturierung	Anlagerung	Polymerisationr
1	2 min bei 95°C	1 min bei 57°C	2 min bei 72°C
2–20	1 min bei 95°C	1 min bei 57°C	2 min bei 72°C
21	1 min bei 95°C	6 min bei 72°C	–

Zur Gewinnung des 710 Bp großen PCRI-Produktes werden 45 µl von Ansatz A8 durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das entsprechende DNS-Fragment wird mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit aus dem Agarose-Gel isoliert und in 50 µl EB-Puffer aufgenommen.

#### 5.3.2 PCR II

Die zweite Polymerase-Kettenreaktion (PCR II) wird mit zwei Ansätzen gemäß der Tab 5.6 durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kontrolle gemäß Tab. 5.6, jedoch ohne Plasmid, durchgeführt. Der PCR-Zyklus ist in Tab. 5.7 angegeben. Im Anschluss an die PCR wird die Temperatur bei 4°C gehalten.

**Tab. 5.6.** PCR II-Ansatz. Ansatzvolumen: 50  $\mu$ l

Substanz	Menge
pA1/A49A	112 ng
Primer c (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer d (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l
10-fach Puffer	5 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup> -Lösung (25 mM)	8 $\mu$ l
<i>Pfu</i>	1.25 u

**Tab. 5.7.** PCR II-Zyklus.

Zyklus-Nr.	Denaturierung	Anlagerung	Polymerisationr
1	2 min bei 95°C	1 min bei 55°C	2 min bei 72°C
2–20	1 min bei 95°C	1 min bei 55°C	2 min bei 72°C
21	1 min bei 95°C	6 min bei 72°C	–

Zur Gewinnung des 522 Bp großen PCR II-Produktes werden 45  $\mu$ l eines Ansatzes durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das entsprechende DNS-Fragment wird mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit aus dem Agarose-Gel isoliert und in 50  $\mu$ l EB-Puffer aufgenommen.

### 5.3.3 PCR III

Die dritte Polymerase-Kettenreaktion (PCR III) wird mit zwei Ansätzen gemäß der Tab 5.8 durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kontrolle gemäß Tab. 5.8, jedoch ohne Plasmid, durchgeführt. Der PCR-Zyklus ist in Tab. 5.9 angegeben. Im Anschluss an die PCR wird die Temperatur bei 4°C gehalten.

**Tab. 5.8.** PCR III-Ansatz. Ansatzvolumen: 50  $\mu$ l

Substanz	Menge
PCR I-Produkt	1 $\mu$ l
PCR II-Produkt	3 $\mu$ l
Primer a (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer d (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l
10-fach Puffer	5 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup> -Lösung (25 mM)	8 $\mu$ l
<i>Pfu</i>	1.25 u

**Tab. 5.9.** PCR II-Zyklus.

Zyklus-Nr.	Denaturierung	Anlagerung	Polymerisationr
1	2 min bei 95°C	1 min bei 55°C	2 min bei 72°C
2–30	1 min bei 95°C	1 min bei 55°C	2 min bei 72°C
31	1 min bei 95°C	6 min bei 72°C	–

Zur Gewinnung des 1203 Bp großen PCRIII-Produktes, des PCR-Zielfragmentes, werden 45 µl eines Ansatzes durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das entsprechende DNS-Fragment wird mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit aus dem Agarose-Gel isoliert und in 50 µl EB-Puffer aufgenommen.

### 5.3.4 Ligation

#### 5.3.4.1 Vorbereitung von Plasmid-DNS

Das für die Ligation benötigte Plasmid-Fragment wird durch Restriktion des Plasmids pA1/A49A mit R·*Eco*RI und R·*Nco*I erhalten. Zusätzlich werden zwei Kontrollen durchgeführt, bei denen das Plasmid jeweils nur mit einer Restriktionsendonuklease verdaut wird. Die Restriktions-Ansätze gemäß Tab 5.10 bis Tab 5.12 werden 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Gewinnung des für die Ligation benötigten 4919 Bp großen Plasmid-Fragmentes werden 45 µl des Restriktions-Ansatzes durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das entsprechende DNS-Fragment wird mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit aus dem Agarose-Gel isoliert und in 30 µl EB-Puffer aufgenommen

**Tab. 5.10.** Restriktion von Plasmid-DNS mit R·*Eco*RI und R·*Nco*I. Ansatzvolumen: 50 µl

Substanz	Menge
pA1/A49A	1 µg
10-fach Y <sup>+</sup> /Tango-Puffer	10 µl
R· <i>Eco</i> RI	10 u
R· <i>Nco</i> I	10 u

**Tab. 5.11.** Restriktion von Plasmid-DNS mit R·*Eco*RI. Ansatzvolumen: 25 µl

Substanz	Menge
pA1/A49A	0.5 µg
10-fach Y <sup>+</sup> /Tango-Puffer	5 µl
R· <i>Eco</i> RI	5 u

**Tab. 5.12.** Restriktion von Plasmid-DNS mit R·*Nco*I. Ansatzvolumen: 25 µl

Substanz	Menge
pA1/A49A	0.5 µg
10-fach Y <sup>+</sup> /Tango-Puffer	5 µl
R· <i>Nco</i> I	5 u

### 5.3.4.2 Vorbereitung von PCR-DNS

Das für die Ligation benötigte PCR-Fragment wird durch Restriktion des PCR-Zielfragmentes mit *R·EcoRI* und *R·NcoI* erhalten. Der Restriktionsansatz gemäß Tab 5.13 wird zunächst 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden zuerst 5 µl für die Agarosegel-Elektrophorese entnommen, danach 10 u *R·EcoRI* zugefügt und erneut 1 h bei 37°C inkubiert.

**Tab. 5.13.** Restriktion des PCR-Zielfragmentes mit *R·EcoRI* und *R·NcoI*. Ansatzvolumen: 50 µl

Substanz	Menge
PCR-Produkt-DNS	1 µg
10-fach <i>Y<sup>+</sup></i> /Tango-Puffer	10 µl
<i>R·NcoI</i>	10 u

Zur Gewinnung des für die Ligation benötigten 810 Bp großen PCR-Fragmentes werden 45 µl des Restriktions-Ansatzes durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das entsprechende DNS-Fragment wird mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit aus dem Agarose-Gel isoliert und in 30 µl EB-Puffer aufgenommen.

### 5.3.4.3 Ligation

Die Ligation von Plasmid-Fragment und PCR-Fragment erfolgt in einem Ansatz gemäß Tab. 5.14. Zusätzlich wird eine Kontrolle gemäß Tab. 5.15 durchgeführt. Die Ansätze werden zunächst 16 h bei 16°C inkubiert, anschließend wird die Ligase durch 10 min Inkubation bei 65°C inaktiviert.

**Tab. 5.14.** Ligation. Ansatzvolumen: 15 µl

Substanz	Menge
Plasmid-DNS	100 ng
PCR-Produkt-DNS	6 µl
10-fach Ligase-Puffer	1.5 µl
T4 DNA Ligase	1 u

**Tab. 5.15.** Kontrolle. Ansatzvolumen: 10 µl

Substanz	Menge
Plasmid-DNS	100 ng
10-fach Ligase-Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase	1 u

## 5.4 Transformation von pA1/A49A/N141N/L142W

### 5.4.1 Herstellung elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen vom *E. coli*-Stamm ER2267 (ohne Plasmid) wird von einer entsprechenden Stock-Kultur eine LB-Platte/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer so gewonnenen Kolonie werden 5 ml LB-Medium/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Mit 0.5 ml dieser Vorkultur werden 55 ml LB-Medium/Kan angeimpft und bei 37°C und 250 U/min bis zu einer OD<sup>600</sup> von 0.5 inkubiert. Die Kultur verbleibt 20 min auf Eis, anschließend wird 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert und das Nährmedium dekantiert. Die Zellen werden einmal mit Wasser und dreimal mit 10%igem Glycerin gewaschen, dazu werden sie jeweils in der Flüssigkeit suspendiert und 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen werden in 200 µl 10%igem Glycerin aufgenommen und in Portionen zu jeweils 40 µl bei -80°C gelagert.

### 5.4.2 Transformation durch Elektroporation

Jeweils 40 µl elektrokompente Zellen werden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 3 µl Ligations-Ansatz aus 5.3.4 bzw. 5 ng Plasmid in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0.1 cm überführt. Nach 1 min Inkubation auf Eis erfolgt die Elektroporation durch einen einfachen Puls (Programm EC1: 25 µF, 2.5 kV, 200 Ω). Anschließend wird der Elektroporations-Ansatz in 1 ml warmem LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Abschließend werden 10 µl, 100 µl und 500 µl des Ansatzes auf LB-Medium/Amp/Kan ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 5.5 Präparation von pA1/A49A/N141N/L142W

### 5.5.1 Isolation von pA1/A49A/N141N/L142W

Das Plasmid pA1/A49A/N141N/L142W wird aus zwölf der in 5.4.2 dargestellten Transformanden isoliert. Dazu werden mit jeweils einer Transformanden-Kolonie 2 ml LB-Medium/Amp/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Von dieser Vorkultur werden 0.5 ml bei 4°C zur weiteren Verwendung gelagert, die restlichen 1.5 ml werden 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Das Nährmedium wird vollständig entfernt und das verbleibende Zellpellet in 100 µl Lösung I vollständig gelöst. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wird 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird 150 µl eisgekühlte Lösung III zugegeben und weitere 5 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wird der Ansatz 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und erneut 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die so gereinigte Lösung wird zu 400 µl Phenol-Lösung gegeben und nach innigem Mischen 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 800 µl Ethanol vermischt und nach 10 min für weitere 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit werden 800 µl Ethanol (80%) zugegeben und 5 min erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wird die Flüssigkeit vollständig entfernt und die DNS in 30 µl TE-Puffer, der mit 0.5 µl RNase (10 mg/ml) versetzt ist, aufgenommen.

Die Plasmid-Präparation wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert, für die von jedem Ansatz jeweils 2 µl verwendet werden.

### 5.5.2 Identifizierung von pA1/A49A/N141N/L142W

Die Identifizierung der isolierten Plasmid-DNS erfolgt bei fünf der zwölf Proben durch Restriktion. Dazu werden die entsprechenden Plasmid-Lösungen und als Kontrolle Wildtyp-DNS 1 h bei 37°C mit R·NcoI und R·MunI inkubiert. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tab. 5.16 gegeben.

**Tab. 5.16.** Restriktion von Plasmid-DNS mit R·NcoI und R·MunI. Ansatzvolumen: 25 µl.

Substanz	Menge
Plasmid-DNS	500 ng
10-fach Y <sup>+</sup> /Tango	2.5 µl
R·MunI	5 u
R·NcoI	5 u

Die Restriktion der Plasmid-DNS wird durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dazu werden neben einer 500 Bp DNS-Leiter von jeder der fünf Transformanden abwechselnd 200 ng nicht inkubierte Plasmid-DNS und 20 µl des Restriktions-Ansatzes, jeweils mit einer entsprechenden Menge an Probenpuffer, aufgetragen. Zusätzlich werden 20 µl vom Kontroll-Ansatz, mit 4 µl Probenpuffer versehen, aufgetragen.

## 5.6 Expressionstest

Die Expression von M·TaqI wird durch den *tac*-Promotor kontrolliert und kann in Zellen des *E. coli*-Stammes ER2267 direkt durch IPTG induziert werden. Für den Expressionstest wird auf die bereits in 5.5 gezüchteten Kulturen der *E. coli*-Stämme ER2267/pA1/A49A und ER2267/pA1/A49A/N141N/L142W zurückgegriffen. Zunächst wird mit jeweils 200 µl einer entsprechenden Kultur 10 ml LB-Medium/Amp/Kan angeimpft und bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Bei einer OD<sup>600</sup> von 0.5 wird den Kulturen jeweils 1 ml zur Zellernte entnommen. Der Rest wird mit 0.1 M IPTG bis zu einer Gesamtkonzentration von 0.1 mM versetzt und 4 h weiterhin bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Anschließend wird den Kulturen jeweils erneut 1 ml zur Zellernte entnommen. Diese erfolgt durch 15 min Zentrifugieren bei 4000 U/min und Dekantieren des Nährmediums. Die Zellen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Kontrolle der Expression erfolgt durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Lysates der Zellen. Dazu werden die abgeernteten Zellen jeweils in 50 µl Wasser suspendiert, mit 50 µl Proben-Puffer (2-fach) versehen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Von dem Lysat der Zellen vor der Induktion werden jeweils 10 µl, von dem Lysat der Zellen nach der Induktion jeweils 5 µl und vom Marker 1 µg aufgetragen.

Auf dem Gel befindet sich in Höhe des M·TaqI-Markers das exprimierte M·TaqI. Durch Vergleich der Intensitäten kann die Menge an exprimiertem M·TaqI vor und nach der Induktion bzw. zwischen Wildtyp und Variante abgeschätzt werden.

## 5.7 *Ex vivo*-Aktivitätstest

Die Aktivität von Enzymen kann direkt im Zell-Lysat durch einen so genannten *ex vivo*-Aktivitätstest bestimmt werden. Die Aufzucht der Kulturen und Ernte der Zellen verläuft dabei wie beim Expressionstest. Es wird erneut auf die *E. coli*-Stämme ER2267/pA1/A49A und ER2267/pA1/A49A/N141N/L142W aus 5.5 zurückgegriffen.

Ausgehend von einem entsprechenden *E. coli*-Stamm wird jeweils eine LB-Platte/Amp/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer so gewonnenen Kolonie werden 5 ml LB-Medium/Amp/Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur werden 100 ml LB-Medium/Amp/Kan angeimpft und bei 37°C und 250 U/min bis zu einem OD<sup>600</sup> von 0.6 inkubiert. Dann wird mit 0.1 M IPTG bis zu einer Gesamtkonzentration von 0.1 mM versetzt und weitere 4 h bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Zur Ernte wird 15 min bei 4.000 U/min zentrifugiert und das Nährmedium dekantiert. Die Zellen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den Ultraschallaufschluss werden die Zellen jeweils in einem Puffer-Gemisch (80% (v/v) Puffer A, 20% (v/v) Puffer B, 0.2 mM PMSF, 4 ml pro 1 g Zellen) suspendiert und unter Eiskühlung drei mal für jeweils 30 s mit Ultraschall beschallt (*output control*: 8, *dutycycle*: 60%). Das Lysat wird durch Zentrifugieren (45 min bei 17000 U/min) von den Zelltrümmern gereinigt, mit der gleichen Menge Glycerin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den eigentlichen Aktivitätstest wird jeweils eine Konzentrationsreihe aus zehn Proben wie folgt angesetzt: Zunächst wird in neun Reaktionsgefäßen jeweils 20 µl Test-Puffer vorgelegt. In einem zehnten Reaktionsgefäß werden 38 µl Test-Puffer mit 2 µl der Protein-Lösung (100 µg/µl) versetzt. Von dieser Mischung werden 20 µl in das erste der neun anderen Reaktionsgefäße gegeben. Nach dem Mischen wird so bis zum neunten Gefäß weiter verfahren. Bei dem letzten Ansatz werden nach dem Mischen die hier entnommenen 20 µl verworfen, so dass pro Konzentrationsreihe zehn Gefäße mit jeweils 20 µl Lösung vorliegen. Die Ansätze werden 1 h bei 60°C inkubiert, anschließend mit 30 µl *TaqI*-Puffer versetzt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Die Analyse des Aktivitätstests erfolgt durch Agarose-Gelelektrophorese, für die von jedem Ansatz jeweils 20 µl, zusammen mit 4 µl Probenpuffer, aufgetragen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 284-253.
- Cheng, X. (1995). DNA modification by methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 4-10.
- Gassen, H.G., Gangolf, S. (Ed.) in: Gentechnische Methoden. Spektrum Akad. Verlag (1999).
- Goedecke, K. (2000): Kristallstruktur der N6-Adenin-DNA-Methyltransferase aus *Thermus aquaticus* im Komplex mit DNA und einem Cofaktoranalogen. Dissertation, Universität Dortmund.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. **77**, 51-59.
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNS Methyltransferases. *ChemBioChem*. **3**, 274-293.
- Jost, J.P., Saluz, H.P. (Ed.) in: DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. Birkhäuser Verlag (1993).
- Lloyd, R.S., Cheng, X. (1997). Mechanistic Link Between DNA Methyltransferases and DNA Repair Enzymes by Base Flipping. *Inc. Biopoly*. **44**, 139-151.
- Nelson, H., Bestor, T. (1996). Base eversion and shuffling by DNA methyltransferases. *Chemistry & Biology*. **3**, 419-423.
- Pignot, M., Siethoff, C., Linscheid, M., Weinhold, E. (1998). Kupplung eines Nucleosids mit DNA durch eine Methyltransferase. *Angew. Chem*. **110**, 3050-3053.
- Pljevaljcic, G., Pignot, M., Weinhold, E. (2003). Design of a New Fluorescent Cofaktor for DNA Methyltransferases and Sequence-Specific Labeling of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3486-3492.
- QIAprep<sup>®</sup> Miniprep Handbook. Qiagen (2002).
- QIAquick<sup>®</sup> Spin Handbook. Qiagen (2002).
- Wilson, G.G., Murray, N.E. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev.Genet.* **25**, 585-627.