

**Struktur, Lokalisation/Regulation und
Interaktionspartner der Dam-Methyltransferase
aus
*Escherichia coli***

INAUGURALDISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

-Dr.rer.nat.-

des Fachbereichs Biologie und Chemie, FB 08
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Martina Schlickerrieder

Giessen, 2006

Diese Arbeit ist dem Netz aus Familie und Freunden, das mich in den letzten Wochen aufgefangen hat, gewidmet. Ohne Euch wäre diese Arbeit nie beendet worden! DANKE!

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt im Institut für Biochemie des Fachbereichs 08 der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Zeit vom November 2002 bis Juni 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. Albert Jeltsch

Dekan: Prof. Peter Schreiner
Fachbereich für Biologie und Chemie
Heinrich-Buff-Ring 58
35392 Giessen

Referent: Prof. Albert Jeltsch
School of Engineering and Science
Internationale Universität Bremen
Campus Ring 1
28759 Bremen

Koreferent: Prof. Gabriele Klug
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Giessen
Heinrich-Buff-Ring 26
35392 Giessen

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Stellen, die ich anderen Arbeiten oder Untersuchungen dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Martina Schlickerrieder

Giessen, den 14. Juni 2006

I Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Albert Jeltsch danken für die Bereitstellung des Themas, für seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld gerade in den letzten Wochen.

Prof. Klug möchte ich danken für die Erlaubnis das Fluoreszenzmikroskop und die IEF in ihrem Labor nutzen zu dürfen und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Pingoud danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor in Giessen beenden zu dürfen und für seine Hilfe und Unterstützung.

Meinem Bruder Klaus: ich weiß nicht, wie ich Dir danken kann. Danke für deine Geduld, dein Verständnis, deine Kraft, deine Energie, deine Unterstützung und nicht zu Letzt Danke (auch an Sonja) dafür, dass ich eine neue Sportart für mich entdeckt habe! Einen besseren Bruder kann ich mir nicht vorstellen!

Meinen Eltern: Danke für eure Liebe und Unterstützung!

Petra, Dari, Felicitas und Viviane: Danke, dass ich bei euch unterkommen durfte, Danke für euer Verständnis, eure Unterstützung und eure Hilfe!!!

Gabi: Danke für deine Energie, deine Hilfe und Unterstützung!

Sina, Claudia, Tinka: Danke für eure Freundschaft und dass Ihr immer für mich da seid!

Heike, Martin, Klaus und Juliane: Danke für eure Hilfe und Unterstützung und fürs Zuhören!

Paddy, Anke, Steffi, Ina, Dominik, Claudia und Jamilah: Danke, dass ich bei euch unterkommen durfte und Ihr für mich da seid.

Ina: Danke für deine Freundschaft, Hilfe und Unterstützung!

Wibke, Katja, Bene: Danke für eure offenen Ohren, eure Hilfe, euer Verständnis!

Ich möchte den DFF-lern, meiner Adoptivgruppe, danken für die Aufnahme in die Gruppe und die lustige Zeit im Labor!

Den „alten“ MTasen möchte ich danken für die lustige Zeit im Labor!

Andrea-Danke fürs Korrekturlesen!

Mädelsgruppe I Ina und Kristin: Danke für die lustige Zeit, das Essen und Pokerspielen!

Mädelsgruppe II: Ina, Wibke und Steffi: Danke für die Entdeckung neuer Gerichte- wobei ich ja noch gespannt bin auf die Mademiller Klees (schreibt man das so???)

Rachna: Thanks for your friendship, your help and discussions and the great experiences I have made visiting your wedding in India

Ilse, Peter, Jörg, Jutta, Ludwig, Lennard und Eva: Danke für die Aufnahme in eure Familie!

Jörg und Jutta: Danke fürs Zuhören!

Jens: Danke für so vieles, was ich im Moment nicht sagen kann!

Danke an alle, die hier nicht namentlich erwähnt sind, die mich aber in den letzten Jahren und v.a. in der letzten Zeit begleitet und unterstützt haben. DANKE!

II Abkürzungsverzeichnis

$\epsilon^x \text{ nm}$	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
μ	Mikro (10^{-6})
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A	Adenin oder Alanin
AAP	Agaroseauftragspuffer
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Cystein
ca.	circa
d	desoxy- oder Schichtdicke einer Küvette
D	Aspartat
Da	Dalton
<i>dam</i>	DNA-Adenin-Methyltransferase
DDMMR	<i>dam</i> -directed <i>mismatch</i> repair system
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	1, 4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Electron Spray Ionisation
etc.	et cetera [lateinisch für "und das übrige"]
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Phenylalanin oder Farad
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanin oder Glycin
His	Histidin
HK	Hauptkultur
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-(D-1-)thiogalaktopyranosid
k	Kilo-
l	Liter
LAP	Laemmligel-Auftragspuffer
LB	Luria-Bertani-
Lsg.	Lösung
m	milli- (10^{-3})
M	Molar
M.	Methyltransferase
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> Massenspektrometrie

MMR	<i>mismatch</i> -Reparatursystem
min	Minute(n)
Mtase	Methyltransferase
n	nano- (10 ⁻⁹)
N	Asparagin, Stickstoff, Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
o.g.	oben genannte
OD x nm	optische Dichte bei x nm Lichtwellenlänge
p	piko
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
ppm	<i>parts per million</i>
RE	Restriktionsenzym
R/M-System	Restriktions-/Modifikationssystem
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
AdoHcy	S-Adenosyl-L-Homocystein
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
sog.	sogenannte
Std.	Stunde (n)
STE	NaCl/Tris/EDTA-Puffer
t	Zeit
T	Thymin, Threonin oder Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	units (Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VK	Vorkultur
Vol.	Volumenteile
W	Tryptophan oder Watt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Anmerkungen:

Als Dezimaltrennzeichen wird in dieser Arbeit ein Punkt verwendet.

Aminosäuren werden mit dem international üblichen Drei-Buchstaben- bzw. Ein-Buchstaben-Code abgekürzt. Abkürzungen von SI-Einheiten werden nicht näher erläutert.

III Publikationsliste

- 1 Kirsten Liebert, Andrea Hermann, **Martina Schlickerieder** and Albert Jeltsch
Stopped-flow Aand Mutational Analysis of Base Flipping by the *Escherichia coli*
Dam DNA-(Adenin-N6)-methyltransferase
J. Mol. Biol. (2004) 341, 443-454
- 2 **Martina Schlickerieder** and Albert Jeltsch: Localisation of the Dam-
Methyltransferase of *Eschrichia coli*: in Produktion
- 3 **Martina Schlickerieder**, Robert Ahrends and Albert Jeltsch:
Interactionspartner of the Dam-Methyltransferase of *Escherichia coli*: in
Produktion

IV Posterpräsentationen

- 24-27.03.02 VAAM Jahrestagung in Göttingen
Poster PC017. M. Schlickenrieder, K. Vogl, J. Glaeser und J. Overmann
Bacteria-bacteria interactions in phototrophic consortia
- 23-26.03.03 VAAM Jahrestagung in Berlin
Poster PD011. Ann K. Manske, Jens Glaeser, Martina Schlickenrieder und Jörg Overmann
Biodiversity and novel strains of green sulfur bacteria
- Poster PF022. Martina Schlickenrieder, Kirsten Liebert, Sabine Urig und Albert Jeltsch
Biochemical studies on the dam-methyltransferase of Escherichia coli
- 20-24.09.03 GBM Herbsttagung in Dresden
Poster 265. Kirsten Liebert, Martina Schlickenrieder und Albert Jeltsch
Biochemical and structural investigations of the dam-DNA-methyltransferase of E.coli
- 28-31.03.04 VAAM Jahrestagung in Braunschweig
Poster PF019. Martina Schlickenrieder und Albert Jeltsch
Structural and biochemical studies of the dam-DNA-methyltransferase from Escherichia coli
- 12-15.05.04 Second Weissenburg Symposium-Biriciana
Symposium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina
- 25-28.09.05 VAAM Jahrestagung in Göttingen
Poster STP 024. Martina Schlickenrieder, Robert Ahrends und Albert Jeltsch
Interaction partners and localisation of the dam-Methyltransferase of Escherichia coli

19.-22.03.06

VAAM Jahrestagung in Jena

Martina Schlickerieder, Robert Ahrends und Albert Jeltsch

Interaction partners and localisation of the dam-Methyltransferase of Escherichia coli

V Inhaltsverzeichnis

I	Danksagung	III
II	Abkürzungsverzeichnis	IV
III	Publikationsliste	VI
IV	Posterpräsentationen	VII
V	Inhaltsverzeichnis	IX
VI	Zusammenfassung	XV
A	Einleitung	1
1	Wechselwirkung zwischen DNA und Proteinen	1
2	Epigenetik	
2.1	Nicht-kodierende RNA-Moleküle und Histon-Modifikationen	3
2.2	Methylierung der DNA	4
3	DNA-Methylierung	
3.1	DNA-Methylierung in Eukaryoten	5
3.2	DNA-Methylierung in Prokaryoten	6
4	DNA-Methyltransferasen	
4.1	Klassifikation und Aufbau	9
4.2	Genereller katalytischer Mechanismus	11
5	Die Dam-Methyltransferase aus <i>Escherichia coli</i>	12
6	Zielsetzung der Arbeit	16
B	Materialien und Methoden	18
1	Chemikalien und Enzyme	18
2	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	18
2.1	Bakterienstämme	18
2.1.1	HMS 174 (DE3)	18
2.1.2	XL1-Blue MRF ⁺	19
2.1.3	JM 109	20
2.1.4	JM 110	20
2.1.5	K12	20
2.1.6	LK 111 (λ) pLBM 4422	21
2.1.7	Tuner TM pLysS	21
2.1.8	Tuner TM pLacI	21
2.2	Plasmide	22

2.2.1	pET28a dam Wildtyp	22
2.2.2	pET28a dam Mutante	22
2.2.3	pET28a damGFP	22
2.2.4	Donorplasmid für die Homologe Rekombination	23
2.2.5	HR Kontrolle	23
2.2.6	pHisRV	23
2.2.7	pTriExEGFP	23
2.2.8	pcDNA EGFP	24
2.2.9	pGEX-6P-2	24
2.2.10	pACBSR	24
2.2.11	pET28a dam(APPY)GFP	24
3	Medien und Kultivierung	25
3.1	Antibiotika	25
3.2	Medien	25
3.2.1	Luria-Bertani-Medium	25
3.2.2	Medien der Fa. Silantes GmbH	26
3.2.3	Glycerinkulturen	26
3.3	Kultivierung	26
3.3.1	Anzucht der Bakterienstämme	26
3.3.2	Wachstumskurven	26
4	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> Zellen	26
5	Isolation von DNA aus Bakterienzellen	26
5.1	Isolation von genomischer DNA	26
5.2	Isolation von Plasmid-DNA	27
5.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	27
6	Aufreinigen von Proteinen mit His-Tag im „Batch“-Verfahren	27
6.1	Aufreinigung des Dam-Methyltransferase WT Proteins, des Dam Mutante Proteins und des DamGFP-Fusionsproteins	27
6.1.1	Verwendete Puffer	27
6.1.2	Proteinexpression	28
6.1.3	Herstellung des Ganzzellysates	29
6.1.4	Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren	29
6.1.4.1	Äquilibrierung der Ni-NTA-Agarose	29
6.1.4.2	Aufreinigung des gewünschten Proteins	29
6.1.5	Dialyse des Proteins	30
6.1.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
6.1.6.1	Spektrophotometer	30
6.1.6.2	Bradford-Test	31
6.2	Aufreinigung des Restriktionsenzym R.EcoRV	32
6.2.1	Verwendete Puffer	32
6.2.2	Proteinexpression	32

6.2.3	Herstellung des Ganzzelllysates	32
6.2.4	Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren	32
6.2.5	Dialyse des Proteins	33
6.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektrophotometers	33
6.3	Aufreinigung der Proteine mit GST-Tag	33
6.3.1	Verwendete Puffer	33
6.3.2	Proteinexpression	33
6.3.3	Herstellung des Ganzzelllysates	34
6.3.4	Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren	35
6.3.4.1	Äquilibrierung der Glutathion-Sepharose	35
6.3.4.2	Aufreinigung des Proteins	35
6.3.5	Dialyse des Proteins	36
6.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektrophotometers	36
7	Gelelektrophorese	37
7.1	Agarosegelelektrophorese und Färben von Agarosegelen	37
7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli	37
7.3	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen	37
7.3.1	Coomassiefärbung	37
7.3.2	Kolloidale Coomassiefärbung	37
7.3.3	Silberfärbung	38
7.3.4	Sypro-Orange Färbung	38
8	Semi-Dry Westernblot	39
9	Strukturanalysen der Dam-Methyltransferase aus <i>E. coli</i>	39
9.1	Optimierung der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der dam-MTase	39
9.1.1	Erste Aufreinigung	39
9.1.2	Ansätze um ausgefallenes Protein wieder zu lösen	40
9.1.3	Zugabe von SAM zu den Aufreinigungspuffern	41
9.1.4	Verwendung von Na-Phosphat-Puffer	41
9.1.5	Umstellung auf eine geringe Salzkonzentration und Verzicht auf Die Zugabe von Glycerin	42
9.1.6	Testen verschiedener SAM- und Salzkonzentrationen	42
9.1.7	Testen einer hohen Na-Phosphat-Puffer Konzentration	42
9.1.8	Testen verschiedener pH-Werte	42
9.1.9	Testen der Bedingungen 18 bis 21 des Dialysepuffers I	43
9.1.10	Messung der Proteinkonzentration mittels eines Durchflussphotometers	43
9.1.11	Veränderte Elutionsmethode	43
9.1.12	Verringerung der Na-Phosphatpuffer Konzentration, Zugabe	

	der Ziel-DNA vor der Dialyse und Umstellung der Aufreinigung	
	auf das „Batch“-Verfahren	44
	9.1.13 Testen verschiedener Bedingungen zur Erhöhung der Proteinstabilität bei 37°C	44
9.2	Mutagenese des <i>dam-MTase</i> Genes	45
9.3	Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie	48
9.4	¹⁵ N-Markierung der Dam-MTase	48
9.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR (=nuclear magnetic resonance)) Messungen	49
10	Lokalisation und Regulation der Dam-MTase	50
10.1	Herstellen des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein	50
10.2	Herstellen des Gens für das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein	55
10.3	Bestimmung der Aktivität	57
	10.3.1 <i>In vivo</i> Aktivität	57
	10.3.2 <i>In vitro</i> Aktivität	58
10.4	Homologe Rekombination	59
	10.4.1 Verwendete Plasmide	59
	10.4.1.1 Donorplasmid	59
	10.4.1.2 Plasmid HR Kontrolle	62
	10.4.1.3 Mutageneseplasmid pACBSR	64
	10.4.2 Durchführung der Homologen Rekombination	64
	10.4.3 Detektion positiver Klone	66
	10.4.4 Sicherung von positiven Klonen	68
10.5	Lokalisation	68
	10.5.1 Induktion von DamGFP, Dam(APPY)GFP bzw. EGFP	68
	10.5.2 Fixierung von Bakterienzellen	69
	10.5.3 Herstellung und Verwendung von agarbeschichteten Objektträgern	69
	10.5.4 Fluoreszenzmikroskopie	70
	10.5.5 Auswertung	70
11	Interaktionspartner der Dam-MTase aus <i>E. coli</i>	71
11.1	Vivapure Epoxy Coupling Kit	71
11.2	<i>Pulldown</i>	71
11.3	Herstellung des JM 109 Ganzzelllysates für die <i>far western</i> Analyse	72
	11.3.1 Anzucht der Zellen	72
	11.3.2 Aufschluß der Zellen und Gewinnen der löslichen Fraktion	72
	11.3.3 Fällung der Proteine	72
	11.3.3.1 TCA-Fällung für 1D-Gelelektrophorese	72
	11.3.3.2 TCA-Fällung für 2D-Gelelektrophorese	73
	11.3.3.3 Ammoniumsulfatfällung für 1D-Gelelektrophorese	73

11.4	Gelelektrophorese	73
11.4.1	1D-Gelelektrophorese	73
11.4.2	2D-Gelelektrophorese	73
11.5	<i>far western</i>	74
11.6	Optimierung der Pufferbedingungen	75
11.7	Identifikation der Interaktionspartner	76
11.7.1	Zuordnung der Spots	76
11.7.2	Sypro-Orange Färbung und Identifikation durch die Fa. Bruker Daltonik GmbH	76
11.7.3	Färbung mit Kolloidaler Coomassielösung, tryptischer Verdau Und Identifikation durch Dipl.-Biol. R.Ahrends	76
11.8	Biochemische Untersuchungen	77
11.8.1	Klonieren der Interaktionspartner	77
11.8.2	Aufreinigung der Interaktionspartner	81
11.8.3	Interaktionsassay	81
C	Ergebnisse	83
1	Strukturanalysen der Dam-MTase aus <i>E.coli</i>	83
1.1	Optimierung der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Dam-MTase	84
1.2	¹⁵ N-Markierung der Dam-MTase	86
1.3	Mutagenese des <i>dam</i> -Mtase Gens	87
1.4	CD-Spektroskopie	87
1.5	NMR-Messungen	88
2	Lokalisation und Regulation der Dam-MTase	92
2.1	Klonierung und Aktivitätsmessung der GFP-Fusionsproteine	92
2.1.1	Klonierung des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein	93
2.1.2	Herstellung des Gens für das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein	94
2.1.3	<i>In vivo</i> Aktivitätstest der Fusionsproteine	95
2.1.4	<i>In vivo</i> Stabilität der Fusionsproteine	96
2.1.5	<i>In vitro</i> Aktivitätstest des DamGFP-Fusionsproteins	97
2.2	Regulation der Expression der Dam-MTase	99
2.2.1	Herstellung des Donorplasmides	100
2.2.2	Herstellung des Plasmides HR Kontrolle	101
2.2.3	Durchführung der Homologen Rekombination	101
2.3	Intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase	103

2.3.1	Regulierte Expression des DamGFP-Fusionsproteins	103
2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	104
3	Interaktspartner der Dam-MTase	108
3.1	Vivapure Epoxy Coupling Kit und <i>Pulldown</i>	108
3.2	<i>far western</i>	110
3.2.1	Optimierung des <i>far western</i> Experimentes	111
3.2.2	<i>far western</i> Experiment	111
3.3	Identifikation der Interaktionspartner	113
3.4	Biochemische Untersuchungen der Interaktionspartner	114
D	Diskussion	120
1	Intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase	121
2	Interaktionspartner der Dam-MTase	124
E	Referenzen	130

VI Zusammenfassung

Die Dam-MTase aus *E.coli* ist eine N⁶-Methyltransferase. Sie katalysiert den Methylgruppentransfer von SAM auf das Adenin an der N⁶-Position innerhalb der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' in einer prozessiven Reaktion. Die Zielbase wird dabei um 180° aus der DNA-Doppelhelix herausgedreht. Das natürliche Substrat dieses Enzyms ist hemimethylierte DNA, die kurz nach der Replikation vorliegt, da der neusynthetisierte Tochterstrang noch nicht methyliert ist. Die Dam-MTase in *E.coli* ist nicht essentiell, dennoch übernimmt sie wichtige Aufgaben. Ist das *dam*-MTase Gen mutiert führt das zu einer erhöhten Zahl an Einzelstrangbrüchen, erhöhte Mutationsraten, Hyperrekombination, eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber DNA-schädigenden Faktoren und Störungen innerhalb vieler Stoffwechselwege, wie dem Energie-, Aminosäure- und Nukleotidstoffwechsel. Die Dam-MTase ist eine solitäre MTase, welche nicht mit einem Restriktionsenzym in einem R/M-System assoziiert ist. Sie ist beteiligt an der Regulation vieler Gene. Einige Promotoren werden nur im vollmethylierten Zustand, andere nur im hemimethylierten Zustand abgelesen. Außerdem synchronisiert sie die Replikation mit dem Zellzyklus und spielt eine Rolle in der Segregation der Chromosomen und in der post replikativen *mismatch* Reparatur.

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht die 3D-Struktur dieses Proteins zu lösen, da zu diesem Zeitpunkt keine Struktur eines Proteins aus der Familie der Dam-MTasen gelöst war und für mechanistische Untersuchungen nur Modelle basierend auf gelösten Strukturen anderer Methyltransferasen zur Verfügung standen. Um eine genaue Kenntnis über das Erkennen der Zielsequenz, der Kofaktorbindung und den Mechanismus des Methylgruppentransfers zu erhalten, sollte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Struktur gelöst werden. Dazu wurde die Aufreinigung des Proteins so weit optimiert, dass hochreines, hochkonzentriertes Protein in hohen Volumina in 300 mM Na-Phosphatpuffer pH6 und 100 µM SAM erhalten wurde, welches bei 20°C stabil vorlag, bei 37°C jedoch nicht. Eine 15N-Markierung des Proteins war erfolgreich durchgeführt worden. Da die NMR-Messungen bei 37°C durchgeführt werden müssten und alle Versuche, das Protein bei dieser Temperatur mit den für die NMR-Spektroskopie nötigen Voraussetzungen, stabil zu halten, fehlschlug, konnte die Struktur der Dam-MTase in dieser Arbeit nicht gelöst werden.

Um die Koordination der Replikation mit der post replikativen *mismatch* Reparatur und der Remethylierung zu untersuchen wurde zum einen mit verschiedenen Methoden nach Interaktionspartnern der Dam-MTase gesucht und zum anderen die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms mit Hilfe eines damGFP-Fusionsproteins untersucht.

Durch *far western* Analysen konnten 17 Interaktionspartner der Dam-MTase gefunden werden, wovon 11 durch MALDI-TOF MS und ESI MS identifiziert werden konnten. Um die Interaktion zu verifizieren, sollten diese durch biochemische Methoden weiter untersucht werden. Dazu wurden die Gene für diese Proteine als GST-Fusionen kloniert und aufgereinigt. Dies gelang mit 10 der Interaktionspartnern. Anschließend wurden Interaktionsassays mit der Dam-MTase durchgeführt. Die Interaktion konnte für sieben Proteine (Pyruvat-Kinase, α -Untereinheit der ATP-Synthase, Serin-Hydroxymethyltransferase, Fruktose-Biphosphat-Aldolase, Elongationsfaktor Tu, Uridin-Phosphorylase und Enolase) verifiziert werden. Es wurden auch Proteine der MMR (MutS und MutH) und der DNA-Replikationsmaschienerie (DNA-Polymerase I und III, Ligase A und B) als GST-Proteine kloniert. Die Interaktionsassays mit diesen Proteinen sollen folgen.

Bei der Untersuchung der Intrazellulären Lokalisation zeigte sich eine polare Lokalisation des damGFP-Fusionsproteins, welches *in vivo* und *in vitro* aktiv und stabil ist. Das GFP-Protein alleine zeigte diese polare Lokalisation nicht, ebenso wie eine methylierungsinactive Variante des damGFP-Fusionsproteins Dam(APPY)GFP. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Lokalisation mit der Methylierungsfunktion verbunden ist. Das DamGFP-Fusionsprotein kolokalisiert nicht mit der DNA. Durch Experimente mit Aztreonam behandelten Zellen konnte gezeigt werden, dass das methylierungsaktive Fusionsprotein an potentiellen Zellteilungsstellen lokalisiert, während die methylierungsinactive Variante eine Fluoreszenz in der gesamten Zelle aufweist. Mit Hilfe von *time lapse* Experimenten und Kolokalisationsstudien mit den Interaktionspartnern, die in der *far western* Analyse identifiziert wurden, soll in der Zukunft diese Lokalisation näher untersucht werden.

A Einleitung

1 Wechselwirkungen zwischen DNA und Proteinen

Proteine können mit der DNA unter anderem in Wechselwirkung treten, indem sie Wasserstoffbrückenbindungen mit potentiellen Wasserstoffdonatoren und - Akzeptoren der Basenpaare Adenin-Tymin und Guanin-Cytosin, die in die große und kleine Furche der DNA ragen, ausbilden. Dieses Muster an möglichen Wasserstoffdonatoren und- Akzeptoren ist spezifisch für eine bestimmte DNA Sequenz, wodurch es für die Proteine möglich wird, ihre spezifische Erkennungssequenz innerhalb des DNA-Stranges aufzufinden und zu binden. In geringerem Maße sind an der spezifischen Bindung auch hydrophobe Wechselwirkungen unpolarer Oberflächen beteiligt, ebenso wie indirekte durch Wassermoleküle vermittelte Kontakte. Die Erkennung und Bindung einer bestimmten DNA-Sequenz durch ein Protein spielt eine entscheidende Rolle in vielen zellulären Abläufen, wie die Replikation der DNA, bei der die daran beteiligten Enzyme an eine bestimmte Stelle des Genoms binden müssen, dem sog. Replikationsursprung, um davon ausgehend das gesamte Genom zu kopieren.

Nicht nur für die Vervielfältigung der DNA ist eine sequenzspezifische Bindung notwendig, sondern auch für die Reparatur von Fehlern in der DNA (wie falsch eingebaute Basen), die z.B. bei der Replikation entstehen oder die Reparatur von UV-Licht oder durch chemische Agentien beschädigter oder mutierter DNA. So bindet z.B. bei dem Mismatch Reparatur (MMR) System von *Escherichia coli* das Protein MutS nach der Replikation an fehlgepaarte Basen und sorgt zusammen mit MutL, MutH und weiteren Proteinen für den Austausch der fehlerhaften Basen gegen die korrekten Basen.

Auch für die Regulation und Transkription einzelner Gene ist die spezifische Erkennung von DNA-Sequenzen Voraussetzung. Bei der Transkription bindet eine DNA-abhängige RNA-Polymerase mit Hilfe von basalen Transkriptionsfaktoren an die sog. Promotorregion des zu transkribierenden Genes. Diese Bindung wird bei Bakterien von einer Untereinheit vermittelt, dem Sigmafaktor. Die RNA-Polymerase kann

verschiedene Sigmafaktoren rekrutieren, die unterschiedliche Promotorregionen binden können und somit zur Transkription unterschiedlicher Gene führen. In *E.coli* wird für die meisten Gene der Sigmafaktor σ^{70} verwendet. Gelangen die Zellen z.B. in ein Habitat mit höherer Temperatur (*heat shock*) wird der Sigmafaktor σ^{32} verwendet, welcher an die Promotorregion der Gene binden kann, die die Zelle benötigt, um sich diesen geänderten Umweltbedingungen anzupassen. Aber nicht nur durch diesen Mechanismus lässt sich die Genexpression regulieren. Es gibt zahlreiche Repressorproteine, die durch Bindung an eine Operatorsequenz in der Nähe der Promotorregion eine Bindung der RNA-Polymerase verhindern und somit die Expression dieser Gene blockieren. Ein Beispiel wäre der *lac*-Repressor aus *E.coli*, welcher in Abwesenheit von Lactose an die Operatorsequenz des *lac*-Operon bindet und somit verhindert, dass die Gene für den Abbau von Lactose transkribiert werden. Es gibt auch viele Aktivatorproteine, die durch ihre Bindung an eine spezifische Aktivator-Bindestelle, welche sich ebenfalls in der Nähe der Promotorregion befindet, erst eine Bindung der RNA-Polymerase an die Promotorregion ermöglichen oder verbessern. Ein Beispiel hierfür ist das *Catabolite Activator Protein* (CAP) das nach Bindung von zyklischem AMP (cAMP) an die CAP-Bindestelle von Genen, die unter der Katabolit Repression stehen, binden kann und somit die Bindung der RNA-Polymerase an diese Promotorsequenzen ermöglicht. Die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen durch Proteine ist somit von großer Bedeutung für viele zelluläre Abläufe.

2 Epigenetik

Mit Hilfe der Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch das Humane Genom Projekt im Jahre 2003 (Nature, Bd. 431, S. 931) versprach man sich große Durchbrüche in der Heilung vieler verschiedener Krankheiten. Dennoch blieben auch nach der Entschlüsselung der DNA-Sequenz viele Fragen unbeantwortet. Wie kommt es z.B. dazu, dass sich in einem multizellulären Organismus wie dem Menschen aus totipotenten Stammzellen unterschiedliche Zelltypen wie Haut-, Leber- oder Muskelzellen entwickeln, die noch dazu aufgrund ihrer speziellen Aufgaben unterschiedliche Gene exprimieren müssen, obwohl die genetische Information in allen Zelltypen identisch ist? Wie kann es zum Beispiel sein, dass eineiige Zwillinge, die ja genetisch identisch sind, oft so unterschiedlich aussehen oder an

unterschiedlichen Krankheiten leiden? Oder warum fangen Zellen plötzlich an, sich immer und immer wieder zu teilen, ohne dass eine Mutation festgestellt werden kann? Antworten auf diese Unstimmigkeiten liefert die Epigenetik, was übersetzt „jenseits konventioneller Genetik“ bedeutet. Die Epigenetik untersucht nicht die Sequenz oder die Organisation der Gene, sondern wie, wann und warum sie ein- oder ausgeschaltet werden. Im engeren Sinne beschäftigt sich die Epigenetik heute mit der Frage, welches die Mechanismen sind, die die stabile Veränderung der Regulation/Expression von Genen bewirken und wie dieser Zustand von Zelle zu Zelle weitergegeben wird (Russo et al, 1996).

2.1 Nicht-kodierende RNA-Moleküle und Histon-Modifikationen

Es gibt mehrere epigenetische Mechanismen. Bei Eukaryoten spielen in diesem Zusammenhang die Expression von nichtcodierenden RNA Molekülen, welche zu der Stilllegung spezifischer Gene führen (Matzke et al, 2001) und die Histone und deren Modifikationen eine große Rolle.

Histone sind kleine basische Proteine. Es sind fünf Typen von Histonen bekannt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Je zwei Moleküle von H2A, H2B, H3 und H4 bilden einen Nukleosomenkern (*core partikel*), um den sich die DNA in ca. zwei großen linksgängigen Windungen legen kann. Dadurch wird die DNA komprimiert. Chromatin das so verpackt ist wird als Euchromatin bezeichnet und ist im Allgemeinen transkriptional aktiv. Das fünfte zum Nukleosom gehörige Histon, H1, wird benötigt um eine übergeordnete Struktur, die einer Helix aus Nukleosomen entspricht, zu bilden. Dadurch wird die DNA Packung weiter verstärkt. Chromatin das so komprimiert ist wird als Heterochromatin bezeichnet und ist transkriptional inaktiv. Die Bildung von Eu- oder Heterochromatin wird reguliert durch Modifikationen der Histone. Diese Modifikationen können Methylierung, Phosphorylierung und Acetylierung umfassen. Man spricht auch von dem „Histon-Code“. Sind die Histone z.B. acetyliert kann eine Transkription erfolgen, da sich die Histone durch die von den Acetylgruppen vermittelte negative Ladung abstoßen und somit keine dichte Packung der DNA möglich ist. Sind die Histone z.B. am Lys9 des Histons H3 methyliert, führt das zu einer engeren Packung der DNA und es kann keine Transkription erfolgen. Insgesamt sind bis jetzt 30 verschiedene kovalente Histonmodifikationen

bekannt (Felsenfeld & Groudine, 2003, Skalnik, *Enzyklopedia of Biological Chemistry*, 2004; Matzke et al, 2001)

2.2 Methylierung der DNA

Ein anderer wichtiger epigentischer Mechanismus ist die Methylierung der DNA. Sie wird von Enzymen katalysiert die DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) genannt werden. Die Enzyme dieser Klasse übertragen eine Methylgruppe von dem Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf entweder ein Adenin oder ein Cytosin innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz (siehe Abb. 1).

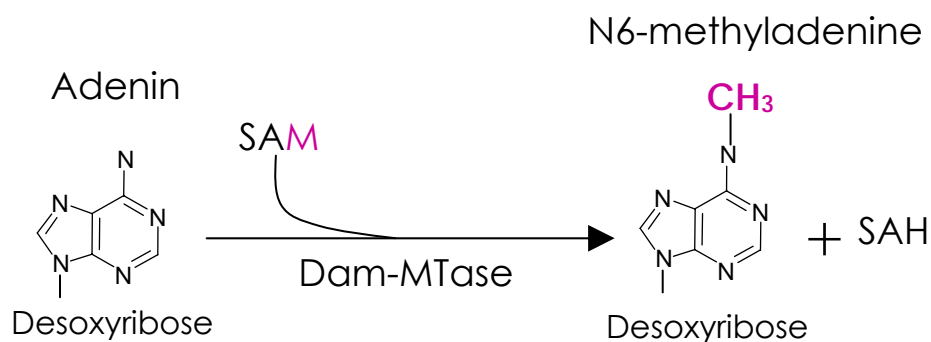


Abb. 1: Übertragung der Methylgruppe auf ein Adenin durch die dam-MTase

Dadurch entstehen die Basen C5-Methylcytosin, N4-Methylcytosin bzw. N6-Methyladenin (Cheng, 1995). Diese Basen werden oft als die fünften, sechsten und siebten Buchstaben im genetischen Alphabet bezeichnet. (Riggs, 1990, Jeltsch, 2002). 1948 bereits wurde DNA-Methylierung zum ersten Mal in Kalbsthymus-DNA beschrieben (Hotchkiss, 1948). In *Escherichia coli* wurde die erste DNA-MTase 1964 entdeckt (Gold & Hurwitz, 1964). Seitdem fand man DNA-Methylierung in fast allen untersuchten Organismen, von Archaeen, Bakterien und Viren bis zu Pilzen, Pflanzen und anderen höheren Eukaryoten. Allein in *Ceanorhabditis elegans* und *Saccharomyces pombe* wurde bis heute keine DNA-Methylierung gefunden (Cheng, 1995; Hermann et al, 2004). Allerdings wurde erst in den 1960er Jahren die mögliche physiologische Rolle der DNA-Methylierung in Pro- und Eukaryoten

aufgedeckt (Arber & Dussoix, 1962; Srinivasan & Borek, 1964). Seit dieser Zeit wurden mehr und mehr Aufgaben der DNA-Methylierung entdeckt und untersucht.

3 DNA-Methylierung

3.1 DNA-Methylierung in Eukaryoten

Die DNA-Methylierung in höheren Eukaryoten ist an der Kontrolle von vielen zellulären Prozessen beteiligt. DNA-Methylierung kommt hier an Cytosinen fast ausschließlich innerhalb von CpG-Dinukleotiden vor. Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in Promotorregionen führt normalerweise zu einer Stilllegung des betroffenen Genes. Dabei greifen mehrere Mechanismen zusammen. Zum einen können viele Transkriptionsfaktoren (wie E2F und NFκB) nicht an methylierte Promotorsequenzen binden, zum anderen werden durch die Methylierung 5-Methylcytosin-Bindeproteine rekrutiert, die als Repressoren dienen und außerdem führt DNA-Methylierung zu Histon-Deacetylierung, welche eine Kondensation des Chromatins induziert und somit zu einer starken und stabilen Repremierung der Genexpression führt (Jost & Saluz, 1993; Jeltsch, 2002; Marinus, 1994).

Die DNA-Methylierung ist aber nicht nur an der Genregulation beteiligt, sondern ist außerdem essentiell für eine normale embryonale Entwicklung in Mäusen (Li et al, 1992). Weiterhin kann die Methylierung von Cytosin zu C-T Transitionmutationen führen, die ca. ein Drittel aller somatischen- und Keimbahnmutationen im Menschen ausmachen (Bestor & Coxon, 1993).

Eine weitere wichtige Funktion der DNA-Methylierung ist die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in jeder Zelle von weiblichen Säugetieren. Diese findet während der frühen embryonalen Entwicklung statt und stellt sicher, dass nicht die doppelte Menge an Genprodukten, die auf dem X-Chromosom codiert sind, exprimiert wird. Dieser Vorgang wird auch als *dosage compensation* bezeichnet. (Skalnik, *Enzyklopedia of Biological Chemistry*, 2004; Razin & Cedar, 1994; Jeltsch 2002; Goll & Bestor, 2004).

Auch an einem Vorgang der *genomic imprinting* genannt wird ist die DNA-Methylierung in Säugetieren beteiligt. Dabei wird ein bestimmtes Methylierungsmuster im Genom während der Spermatogenese und Oogenese etabliert. Damit können mütterliche von väterlichen Allelen unterschieden werden.

Dieses *genomic imprinting* führt dazu, dass z.B. nur das mütterliche Allel des Genes exprimiert wird, aber nicht das väterliche. Treten bei diesem Prozess Fehler auf, führt das zu einer Anzahl von Krankheiten im Menschen (Goll & Bestor, 2004). Bis jetzt sind ~50 Gene in Säugetieren bekannt die *genomic imprinting* aufweisen. (Skalnik, *Enzyklopedia of Biological Chemistry*, 2004; Jeltsch, 2002).

Auch zwischen der Entstehung von Krebs und der DNA-Methylierung besteht ein Zusammenhang. Es wurde gezeigt, dass Krebszellen eine veränderte DNA-Methylierung aufweisen, wie z.B. eine globale Cytosin Hypomethylierung, welche zur genomischen Instabilität führt und zur Aktivierung von Retrotransposons führen kann. Desweiteren kann die Expression von Oncogenen stimuliert werden (Jeltsch, 2002). Zusätzlich tritt Hypermethylierung von CpG Motiven vor allem in den Promotorbereichen von Tumorsuppressorgenen auf, welche die Stilllegung dieser Gene zur Folge hat. (Skalnik, *Enzyklopedia of Biological Chemistry*, 2004; Razin & Cedar, 1994).

Neben der Entstehung von Krebs sind zwei genetische Krankheiten bekannt, die sich auf Mutationen in Proteinen zurückführen lassen, die in Verbindung mit der DNA-Methylierung stehen (ICF und Rett Syndrom) (Jeltsch, 2002; Hendrich, 2000).

Durch das Stilllegen von Transposons in Genomen von Säugetieren und Pflanzen durch Cytosin-Methylierung bzw. nachfolgender C-T Transitionsmutationen wird die Stabilität des Genoms erhöht und somit ist eine Möglichkeit gegeben sich gegen in das Genom integrierende DNA zu verteidigen (Goll & Bestor, 2004; Jeltsch, 2002).

Eine weitere Rolle wird der DNA-Methylierung in der Embryonalentwicklung gegeben, wobei darüber noch diskutiert wird (Goll & Bestor, 2004; Jeltsch, 2002).

Auch während des Alterns konnte eine genomweite Demethylierung beobachtet werden, die zu dem Verlust von Genregulation in alternden Zellen beitragen kann. (Jeltsch, 2002; Issa, 2000)

3.2 DNA-Methylierung in Prokaryoten

Für die DNA-Methylierung in Prokaryoten kann man drei Hauptaufgaben benennen. Zum einen kann durch die DNA-Methylierung zelleigene DNA von fremder DNA unterschieden werden. Diese Aufgabe ist assoziiert mit dem Vorhandensein von Restriktions-/Modifikationssystemen (R/M-Systeme). In diesen Systemen kommt die

DNA-Methyltransferase in Verbindung mit einem Restriktionsenzym vor, wobei beide Enzyme die gleiche Erkennungssequenz haben. Dabei schützt die DNA-Methyltransferase durch die Modifikation der Erkennungssequenz die zelleigene DNA vor dem Abbau durch das Restriktionsenzym. Zellfremde DNA trägt an der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym keine Modifikation und kann somit durch das Restriktionsenzym verdaut werden. Um sich wirksam vor dem Eindringen fremder DNA zu schützen, haben die meisten Bakterien mehrere verschiedene R/M-Systeme entwickelt, die unterschiedliche Erkennungssequenzen methylieren bzw. schneiden können. Zur Zeit sind mehr als 2000 verschiedene R/M-Systeme bekannt, wobei 700 verschiedene DNA-MTasen identifiziert und sequenziert sind, die 300 verschiedene DNA-Sequenzen methylieren. Die meisten prokaryotischen DNA-MTasen sind in solchen R/M-Systemen assoziiert (Jeltsch, 2002; Dryden, 1999).

In der postreplikativen *mismatch* Reparatur (MMR) fungiert die DNA-Methylierung als eine Art Wegweiser. Verantwortlich hierfür sind DNA-MTasen, die nicht in einem R/M-System vorkommen, wie z.B. die Dam-MTase aus *Escherichia coli* oder die CcrM-MTase aus *Caulobacter crescentus*. Sie werden auch solitäre MTasen genannt. Nach der Replikation ist für eine kurze Zeitspanne nur der Mutterstrang methyliert, der neusynthetisierte Tochterstrang jedoch nicht, da nur unmodifizierte Basen in die DNA eingebaut werden (siehe Abb. 2).

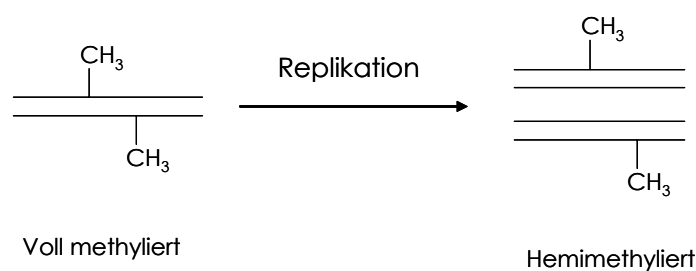


Abb. 2: Diagramm einer voll und hemimethylierten DNA

Ist ein Fehler während der Replikation entstanden können die Enzyme der MMR anhand des Methylierungsstatus der DNA-Stränge unterscheiden, welcher der beiden Stränge der neusynthetisiert wurde und somit die falsch eingebaute Base trägt. (siehe 5) (Jeltsch, 2002; Reisenauer et al, 1999; Marinus, 1996, Jeltsch & Gumpert, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2004).

Die dritte Hauptaufgabe ist die Kontrolle der Genexpression, der Replikation und des Zellzyklus. So wird z.B. die Initiation der Replikation in *E.coli* dadurch kontrolliert, dass nur ein vollständig methylierter Replikationsursprung, d.h. beide Stränge müssen methyliert sein, aktiv ist. Nach der Replikation liegt das Genom für eine kurze Zeit hemimethyliert vor, da der neusynthetisierte Tochterstrang noch keine Methylierungen trägt. An den dadurch ebenfalls hemimethylierten Replikationsursprung bindet das SeqA Protein, wodurch eine Methylierung an dieser Stelle nicht mehr möglich ist. Als Folge daraus wird eine erneute Initiation der Replikation verhindert (Jeltsch & Gumpert, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2004; Reisenauer et al, 1999). Anders als der Replikationsursprung sind einige Promotoren nur im hemimethylierten Zustand aktiv. Dadurch wird der bakterielle Zellzyklus mit der Replikation gekoppelt. (Jeltsch, 2002; Dryden, 1999). Ein Beispiel hierfür ist die Bildung der Pap-Pili in Uropathogenen *E.coli* (UPEC). Die *pap*-Gene, die für die Pili codieren, sind in den *pap*-Operon organisiert, welches von dem Promotor pBA aus transkribiert wird. 5' des Promotors befinden sich zwei DNA-Bereiche, GATC-I und GATC-II genannt, welche sowohl Bindungssequenzen für das Regulatorprotein Lrp (Leucin rich protein), als auch die Erkennungssequenz GATC für die Dam-Methyltransferase aufweisen. Im *off*-Zustand, also dem Zustand, indem keine Pili gebildet werden, bindet Lrp an GATC-II, wodurch zum einen dieser DNA-Bereich nicht methyliert werden kann und zum anderen die RNA-Polymerase nicht an den Promotor binden kann, da der Promotor mit dem GATC-II Bereich überlappt. Somit wird die Transkription der *pap*-Gene inhibiert. Die Bildung der Pili wird durch bestimmte Umweltsignale vermittelt, welche dazu führen, dass das Regulatorprotein CRP an cAMP bindet. Der CRP/cAMP-Komplex aktiviert nun die Bildung des Proteins PapI. Pap I bindet an LRP, wodurch dessen Affinität für GATC-II herab- und die Affinität für GATC-I heraufgesetzt wird. LRP kann aber nur an GATC-I binden, wenn dieser DNA-Bereich nicht voll methyliert ist. Das ist nach der DNA-Replikation der Fall, da dann der Bereich für einen kurzen Zeitraum hemimethyliert vorliegt. Dadurch kann der LRP-papI-Komplex eine zunächst instabile Bindung an GATC-I eingehen, wodurch eine erneute Methylierung verhindert wird. Da die Affinität von LRP zum GATC-II durch die Bindung von PapI herabgesetzt wird, kann dieser Bereich methyliert werden und LRP kann nicht mehr an diesen Bereich binden. Dadurch kann die RNA-Polymerase an den Promotor pBA binden. Nach einer erneuten DNA-Replikation liegt der GATC-I Bereich unmethyliert vor, wobei die Bindung des LRP-PapI-Komplexes

stabil wird. Dadurch kann LRP die RNA-Polymerase, die an den Promotor *pBA* gebunden hat, aktivieren und die Transkription der *pap*-Gene kann erfolgen, die Zelle befindet sich im *on*-Zustand (siehe Abb. 3). (Molekulare Infektionsbiologie, Hacker et al, 2000, S. 99/100, Hernday et al, 2002)

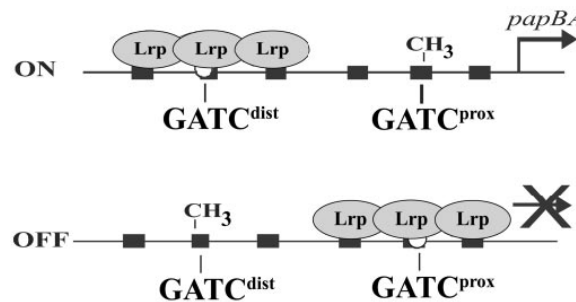


Abb. 3: Methylierungsstatus für den An und Aus Status bei der Bildung von Pap-Pili (aus Hernday et al, 2002)

4 DNA-Methyltransferasen

4.1 Klassifikation und Aufbau

Methyltransferasen werden über die Base, auf welche der Methylgruppentransfer stattfindet klassifiziert. Die Methyltransferasen, die einen Methylgruppentransfer auf ein Kohlenstoffatom katalysieren, werden als C-Methyltransferasen klassifiziert, während Methyltransferasen, die die Methylgruppe auf ein Stickstoffatom übertragen, N-Methyltransferasen genannt werden. In Eukaryoten wird fast ausschließlich die Base Cytosin an der C⁵-Position innerhalb der Erkennungssequenz CpG methyliert. Es wird aber auch von einer Methylierung der Sequenz CCWGG (W = A oder T) in Säugern berichtet. (Lorincz und Groudine, 2001). In Pflanzen wird neben der Methylierung an der Sequenz CpG auch noch eine Methylierung der Sequenz CNG (N = A, T, C oder G) gefunden (Gruenbaum et al, 1981). In Prokaryoten kommt sowohl eine Methylierung von Cytosin an der C⁵-oder N⁴-Position, als auch von Adenin an der N⁶-Position innerhalb unterschiedlicher Erkennungssequenzen vor. Die Erkennungssequenzen sind meist vier bis acht Nukleotide lang und sind palindrom, wie z.B. die Erkennungssequenz GATATC für die Methyltransferase M.EcoRV.

Sowohl die C-, als auch die N-Methyltransferasen sind Zwei-Domänen Proteine, die aus einer großen und einer kleinen Domäne bestehen. Die DNA-Bindestelle befindet sich in der Spalte zwischen den Domänen. Die kleine Domäne verschiedener MTasen

ist in ihrer Aminosäuresequenz, der Größe und Struktur sehr unterschiedlich. Das ist dadurch begründet, dass die kleine Domäne die meisten sequenzspezifischen Kontakte zwischen DNA und Protein herstellt. Dadurch ist das Erkennen der richtigen Zielsequenz, die charakteristisch für jedes Enzym ist, gegeben (Jeltsch, 2002). Die große Domäne formt die Bindestelle für den Kofaktor SAM und beinhaltet das katalytische Zentrum des Enzyms. Die Kernstruktur der großen Domäne ist hochkonserviert (siehe Abb. 4).

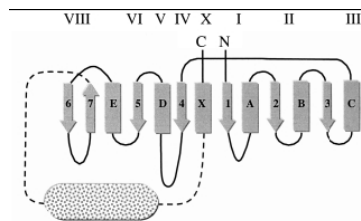


Abb. 4: Kernstruktur der großen Domäne (aus Jeltsch, 2002)

Sie besteht aus sechs parallelen und einem antiparallelem β -Faltblatt, die so angeordnet sind, dass zwei Subdomänen entstehen (β 1- β 3 und β 4- β 7). In diesen Subdomänen wird jedes β -Faltblatt von ein bis zwei α -Helices flankiert, so dass sich eine $\alpha/\beta/\alpha$ Abfolge als Grundeinheit ergibt. Die zwei Subdomänen stellen hydrophobe Bindungstaschen dar, wobei die β 1- β 3 Subdomäne den Kofaktor SAM bindet und die β 4- β 7 Subdomäne die ausgeklappte Zielbase aufnimmt (Jeltsch, 2002; Cheng & Roberts, 2001; Cheng, 1995). Die große Domäne kann bis zu zehn konservierte Aminosäuremotive besitzen. Cytosin- C^5 -MTasen enthalten zehn konservierte Aminosäuremotive (I-X) (Posfai et al, 1989; Klimasauskas et al, 1989; Kumar et al, 1994; Gong et al, 1997). Die Motive I (DXFXGXG), IV (GFPQC) und VI (ENV) sind dabei am stärksten konserviert. Den N-MTasen fehlt hingegen das Motiv IX der Cytosin- C^5 -MTasen (Malone et al, 1995). Sie besitzen somit nur neun unterschiedlich stark konservierte Motive, wobei die Motive I (DXFXGXG) und IV ((D/N/S)PP(Y/F)) am stärksten konserviert sind (Jeltsch, 2002). Das Motiv I, das sowohl bei C- als auch bei N-MTasen vorkommt, ist an der SAM-Bindung beteiligt. Bei den C-MTasen ist sowohl das Motiv IV als auch das Motiv IV an der Katalyse beteiligt, während bei N-MTasen nur das Motiv IV daran beteiligt ist (Schluckebier et al, 1995). Man sieht, dass in beiden Gruppen das Motiv IV an der Katalyse beteiligt ist, allerdings ist die Aminosäuresequenz des Motivs unterschiedlich. Dies ist ein Beispiel

dafür, dass die Teile von Proteinen, die sich in der Aminosäuresequenz in beiden Klassen unterscheiden, sich aber an strukturell äquivalenten Positionen befinden, die gleichen Aufgaben übernehmen (Jeltsch, 2002). Aufgrund der Aufeinanderfolge der konservierten Motive und der Position der DNA-bindenden Domäne zur katalytischen Domäne können die N-MTasen in drei Untergruppen (α , β und γ) unterteilt werden. Die MTasen die zur α -Gruppe gehören, sind kleine Proteine mit 260-334 Aminosäureresten (z.B. M.Ecodam oder M.EcoRV), während die Angehörigen der β -Gruppe unterschiedlich große Proteine sind mit Längen zwischen 228 bis 531 Aminosäureresten (z.B. M.PvuII oder M.RsrI). Die MTasen der γ -Gruppe, zu denen z.B. M.TaqI und M.EcoRI gehören, sind relativ große Proteine mit 325 bis 580 Aminosäureresten. Die Proteine dieser Gruppe zeigen auch eine große Ähnlichkeit zu den Cytosin-C⁵-MTasen (Wilson, 1992, Malone et al, 1995).

4.2 Genereller katalytischer Mechanismus

DNA-MTasen benutzen einen besonderen Mechanismus für die Modifikation der Zielbase. Zunächst bindet das Enzym unspezifisch an die DNA und sucht mittels linearer Diffusion die DNA nach der spezifischen Erkennungssequenz ab (Surby & Reich 1996 a und b). Die zu methylierende Base wird dann um 180° aus der DNA-Doppelhelix herausgeklappt und in der hydrophoben Tasche des katalytischen Zentrums gebunden, welche von Aminosäureresten der Motive IV, VI und VII der großen Domäne gebildet wird. Dieser Vorgang wird als *base flipping* bezeichnet und wurde erstmals 1994 bei der Strukturaufklärung der MTase M.HhaI im Kokristall mit ihrem spezifischen DNA-Substrat durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse gezeigt (siehe Abb. 5)(Klimasauskas et al 1994).



Abb. 5: Der DNA Anteil der MHhaI-DNA Kokristallstruktur mit der ausgedrehten Zielbase (aus Jeltsch, 2002)

Anschließend erfolgt der Transfer der aktivierten Methylgruppe von dem Kofaktor SAM auf die Zielbase, wobei die methylierte Base und S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) entstehen. Dieses *base flipping* wurde bis jetzt bei allen untersuchten MTase Kokristallstrukturen in Komplex mit DNA gefunden (Goedecke et al 2001; Klimasauskas et al 1994; Reinisch et al 1995). Aber es ist auch Teil des katalytischen Mechanismus von vielen DNA Reparaturenzymen wie z.B. die Uracil-DNA-Glycosylase (Jeltsch, 2002; Cheng & Roberts, 2001; Roberts & Cheng, 1998). Die Gründe für diesen ungewöhnlichen Mechanismus mögen in dem katalytischen Mechanismus dieser Enzyme liegen der einen engen Kontakt der Enzyme mit dem aromatischen Ringsystem der Zielbase erfordert und der nicht möglich wäre, würde die Zielbase sich innerhalb der DNA-Doppelhelix befinden. Die übertragene Methylgruppe ist in der großen Furche der DNA positioniert, wo sie leicht durch Proteine, die mit der DNA interagieren, detektiert werden kann.

5 Die Dam-Methyltransferase aus *Escherichia coli*

In *Escherichia coli* sind pro 100 mol Adenin 1.5 mol Adenin an der N⁶ Position methyliert. Diese Methylierung wird durch die Dam-Mtase katalysiert. Somit gehört dieses Enzym zu der Klasse der N⁶-MTasen. Innerhalb dieser Gruppe wird es der α -Gruppe zugeordnet. Das Gen für die Dam-MTase besitzt wie alle N-MTasen neun konservierte Aminosäure Motive. Das Motiv I im Aminosäurebereich 31-51 enthält das

FXGXG-Motiv, welches an der SAM-Bindung beteiligt ist (siehe auch Punkt 4.1). Das Motiv IV, welches an der Katalyse beteiligt ist und die Konsensussequenz (D/N/S)PP(Y/F) besitzt, liegt im Aminosäurebereich 181-184. Mutationen innerhalb dieses Motivs führen zu einem Aktivitätsverlust der Dam-MTase (Guyot et al, 1993).

Die Dam-MTase methyliert Adenin in der Sequenz 5'-GATC-3' an beiden Strängen. Normalerweise sind in *E. coli* alle 5'-GATC-3' Stellen voll methyliert, kurz nach der Replikation liegen die Stellen hemimethyliert vor und stellen dann das natürliche Substrat für die Dam-MTase dar. Die Verteilung der 5'-GATC-3' Stellen im *E. coli* Genom ist zufällig, abgesehen vom Replikationsursprung (*oriC*), welcher zehn mal mehr 5'-GATC-3' Stellen aufweist, als man bei einer zufälligen Verteilung vermuten würde (*Escherichia coli and Salmonella thyphimurium*, Neidhardt et al, 1987, Bd.1, S. 697-702). Insgesamt besitzt das *E.coli* Genom 18000 GATC-Sequenzen (Correnti et al, 2002).

Wie schnell die Remethylierung des Genoms erfolgt wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Urieli-Shoval et al (1983) schlussfolgerten aus ihren Studien, dass die Remethylierung der Replikationsgabel nicht mehr als 3000 bp hinterherhinkt. Lyons und Schendel (1984) fanden heraus, dass die DNA nach sieben Minuten zur Hälfte methyliert war, was vergleichbar ist mit ungefähr neun Prozent der Generationszeit. Die Mehrzahl der Experimente zeigen jedoch auf eine schnelle Remethylierung hin (*Escherichia coli and Salmonella thyphimurium*, Neidhardt et al, 1987, Bd.1, S. 697-702). Es gibt jedoch bis zu 20 GATC-Sequenzen die über den Zellzyklus unmethyliert bleiben (Woude et al, 1998; Woude et al, 1994).

Die Dam-MTase wird von dem *dam*-MTase Gen codiert, welches 834 bp lang ist und bei 74 min auf der *E.coli* Genkarte lokalisiert ist. Es befindet sich in einem Operon zusammen mit den Genen *aroK*, *aroB*, *damX*, *rpe*, *gph* und *trpS* (siehe Abb. 6). AroK (Shikimat-Kinase I) und AroB (3-Dehydroquinat-Synthase) sind an der Chorismat-Biosynthese beteiligt, die Funktion von DamX ist noch ungeklärt, wobei dem Protein eine Rolle in der Zellwandbiosynthese zugeordnet wird. Rpe (Ribulose Phosphat-3-Epimerase) ist ein Enzym des nicht-oxidativen Zweiges des Pentosephosphatweges. Gph (Phosphoglycolat-Phosphatase) ist Teil des Kohlenwasserstoff-Zyklus. TrpS (Tryptophanyl-tRNA-Synthetase) gehört zum tRNA Lade Stoffwechselweg. Die Expression der Dam-MTase wird von fünf Promotoren (*aroKp1*, *aroKp2*, *damp1*, *damXp1*, *damp2*) und einer Terminatorregion reguliert (Lobner-Olesen et al, 2005).

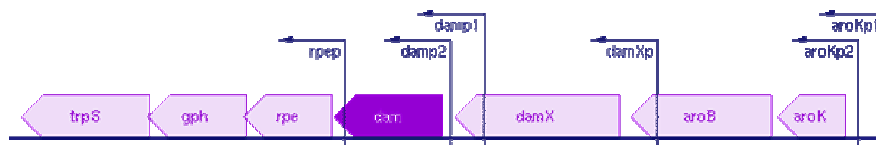


Abb. 6: Schema des Operons. Die Gene sind in den lila Kästchen angezeigt, die Promotoren mit den blauen Pfeilen

Alle diese Promotoren besitzen eine Erkennungssequenz für den σ^{70} Sigmafaktor. Da eine Überproduktion oder eine Unterproduktion der Dam-MTase zu einer Hypermutableität führt, welche ungünstig für die Zelle ist, muss die Menge an Dam-MTase in einer WT *E.coli* Zelle genau reguliert werden. Da die Promotoren über σ^{70} reguliert werden, geht man davon aus, dass die Genregulation durch Aktivatoren stattfindet in die *trans* wirken. (*Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*, Neidhardt et al, 1987, Bd.1, S. 697-702).

Das Genprodukt des *dam*-MTase Gens ist eine einzelne Polypeptidkette aus 278 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 32 kDa. Jede *E.coli* Zelle enthält durchschnittlich 130 Moleküle der Dam-MTase (Boye et al, 1992), gemessen durch Westernblot von Zellysaten mit einem Antikörper gegen die Dam-MTase im Vergleich mit Standardproteinen. Über die intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase ist bis jetzt nichts bekannt.

Für die Katalyse bindet die Dam-MTase zunächst an die DNA und dieser binäre Enzym-DNA-Komplex bindet dann den Kofaktor SAM. Die Dam-MTase katalysiert den Transfer von mehreren Methylgruppen auf die DNA in einer prozessiven Reaktion ohne sich von der DNA zu lösen. Auch andere solitäre MTasen, wie CcrM oder M.SssI methylieren die DNA in einer prozessiven Reaktion (Urig et al, 2002).

Da *dam* negative *E.coli* Zellen lebensfähig sind, kann man daraus schließen, dass die Dam-MTase nicht essentiell ist für *E.coli*. In *E.coli* Zellen mit Mutationen in dem *dam*-MTase Gen treten jedoch eine erhöhte Anzahl von Einzelstrangbrüchen, erhöhte Mutationsraten, Hyperrekombination und eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber DNA-schädigenden Faktoren auf (Marinus, 2000).

Des Weiteren sind viele zelluläre Prozesse, an denen die Dam-MTase an der Regulation beteiligt ist, gestört. Beispiel hierfür ist der Energie-, Aminosäure- und Nucleotidstoffwechsel. Bereits 1996 haben Henaut et al (Henaut et al, 1996) die

Existenz eines GATC regulierten Netzwerkes vorgeschlagen, welches in der Regulierung von Kälteschock und Sauerstoffshift beteiligt ist. (Oshima et al, 2002; Riva et al, 2004).

Ein Beispiel für die Beteiligung der Dam-MTase an der Regulation bestimmter Gene wurde bereits in Punkt 3.2 bei der Beschreibung der Regulation der Pap-Pili erwähnt. Neben den Pap-Pili wird ein Protein der äußeren Membran Ag43 ebenfalls durch Phasenvariation an der die Dam-MTase beteiligt ist, reguliert. Ag43 verursacht eine Autoaggregation der Zellen und ist wichtig für die Entstehung von Biofilmen und eine erhöhte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Reagentien. In der regulatorischen Region des *agn43* Gens befinden sich drei GATC-Sequenzen. Sind diese methyliert, kann der Repressor OxyR nicht binden und die Zellen befinden sich im ON-Zustand, das bedeutet Ag43 wird expremiert. Bindet jedoch OxyR an diese Sequenzen, wird eine Methylierung verhindert und es findet keine Expression statt, die Zellen befinden sich im OFF-Zustand (Correnti et al, 2002; Wallecha et al, 2002; Waldron et al, 2002; Lobner-Olesen et al, 2005).

Aber auch der Methylierungsstatus der Promotorregion von bestimmten Genen reguliert die Expression dieser Gene. Durch eine Methylierung der Promotorregion von *sulA* oder *trpR* wird die Expression dieser Proteine reduziert, wo hingegen die Methylierung der Promotorregion von *dnaA* eine Expressionserhöhung zur Folge hat (Lobner-Olesen, 2005).

Außerdem synchronisiert die Dam-MTase die Replikation und den Zellzyklus. So wird die Expression des Initiatorproteins der Replikation DnaA positiv durch die Methylierung der Dam-MTase reguliert (Braun & Wright, 1986). Wie oben bereits erwähnt enthält der Replikationsursprung 11 GATC-Sequenzen. Die Replikation findet nur statt, wenn diese GATC-Sequenzen am *oriC* voll methyliert sind. Nach der Replikation sind die GATC-Sequenzen am *oriC* und beim *dnaA*-Gen über einen Zeitraum von bis zu 13 min (im Gegensatz zu einigen Minuten für das restliche Genom) hemimethyliert, wodurch eine erneute Replikation verhindert wird (Campbell & Klecker, 1990; Kang et al 1999; Skarstad et al, 1986). Erreicht wird dies durch Bindung des SeqA Proteins an diese DNA-Abschnitte, wodurch eine Methylierung verhindert wird (Brendler & Austin, 1999; Lobner-Olesen et al, 2005).

Die Dam-Mtase spielt auch eine Rolle in der Segregation der Chromosomen und in der postreplikativen Mismatchreparatur (MMR). Das MMR erkennt

replikationsbedingte Basenfehlpaarungen, die direkt nach der Replikation auf der hemimethylierten DNA vorliegen. Da der parentale Strang die Methylgruppe trägt, ist in der Zeitspanne zwischen Replikation und Remethylierung eine Unterscheidung von parentalen und neusynthetisierte Strang und somit eine Reparatur der Fehlpaarung möglich. (Barras & Marinus, 1989; Modrich, 1989; Modrich & Lahue, 1996). Dabei bindet das Protein MutS zunächst an die Basenfehlpaarung, durch MutL welches an MutS bindet wird MutH aktiviert, welche den neusynthetisierten Strang an einer GATC-Stelle schenidet, die bis zu 1000bp von der Fehlpaarung entfernt liegen kann. Eine Helikase entwindet die beiden Stränge und der neusynthetisierte Strang wird durch eine Exonuklease abgebaut. Die DNA-Polymerase III füllt die entstandene Lücke wieder auf und eine Ligase verknüpft die Enden. Das MMR kann zwar auch ohne die Dam-MTase arbeiten, jedoch treten in Folge mehr Mutationen auf, da das MMR nicht mehr unterscheiden kann, auf welchem Strang sich die falsch eingebaute Base befindet. Somit bezeichnet man das MMR auch häufig als *dam directed mismatch repair system* (DDMMR) (Lewin, 1999; Messer und Noyer-Weidner, 1988; Jiricny, 1998; Modrich 1991). Nicht nur in der MMR, sondern auch in der *Very-Short-Patch Repair* (VSP), welche T/G Basenfehlpaarungen repariert, die durch Deaminierung von 5-Methylcytosin entstehen, ist die Dam-MTase beteiligt (Bell & Cupples, 2001).

6 Zielsetzung der Arbeit

Wie in Punkt 5 erläutert, ist die Dam-MTase an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Eine weitere Untersuchung dieses Enzyms soll neue Einblicke in die Funktion und den Mechanismus geben. Zu Beginn der Arbeit war keine Struktur eines Enzym aus der Dam-Familie gelöst. Alle Aussagen bezüglich des genauen katalytischen Mechanismus und der Komplexbildung mit DNA und SAM konnten nur anhand von Modellen, basierend auf vorhandenen Strukturen anderer Methyltransferasen, gemacht werden. Somit war ein Ziel dieser Arbeit die Enzymstruktur mit und ohne gebundener DNA und Kofaktor mittels der NMR-Spektroskopie zu lösen.

Um ihre vielfältigen Aufgaben innerhalb der Zelle zu vollziehen, ist es wahrscheinlich, dass die Dam-MTase mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten muss. Die Frage wie z.B: die Zelle die Replikation mit der MMR und der Remethylierung koordiniert, war von besonderem Interesse. Mittels Protein-Protein-Interaktionsstudien

sollten neue Interaktionspartner gefunden werden, welche dann mit biochemischen Methoden weiter untersucht werden sollten.

Um die Frage nach der o.g. Koordination und der Funktionsweise der Dam-MTase innerhalb der Zelle zu beantworten sollten Lokalisationsstudien mit einer *damGFP*-Fusion mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

B Materialien und Methoden

1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), New England Biolabs (NEB) GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland), Promega GmbH (Mannheim, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Roth, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg, Deutschland), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland), Polymer GmbH (Kassel, Deutschland), W. Balsler GmbH (Giessen, Deutschland), Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland), QUIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland), Silantes GmbH (München, Deutschland), Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA), Epicentre Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA) und Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde Reinstwasser (Seralpur Pro 90 CN, Filterset Typ 'HPLC', Seral GmbH, Ransbach-Baumbach) verwendet.

2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

2.1 Bakterienstämme

Alle nachfolgend aufgeführten Bakterienstämme sind *E.coli* Stämme, die von dem Sicherheitsstamm *E.coli* K12 abstammen.

2.1.1 HMS 174 (DE3) (Novagen GmbH, Madison, USA)

Genotyp

F- *recA1 hsdR*(*r_{K12}**m_{K12}*⁺) *Rif^r* (DE3)

Beschreibung

Dieser *E.coli* Stamm trägt den lysogenen Bakteriophagen λ DE3 und verfügt somit über eine chromosomale Kopie des T7 RNA Polymerase Genes, welches sich unter der Kontrolle des starken *lacUV5* Promotor/Operator befindet. Das bedeutet, dass im uninduzierten Zustand die Expression des T7 RNA Polymerase Genes durch den *lac* Repressor reprimiert wird. Die T7 RNA Polymerase ist eine sehr aktive RNA Polymerase mit deren Hilfe rekombinante Gene überexprimiert werden können. Die rekombinanten Gene befinden sich auf dem Vektor pET28a (siehe Punkt 2.2) unter Kontrolle des starken T7 RNA Polymerase spezifischen T7 Promotors und des *lac* Repressors. Wird Isopropylthiogalaktosid (IPTG), ein Analog zur Lactose, zum Medium gegeben, bindet es an den *lac* Repressor. Der *lac* Repressor verändert seine Form und kann nicht mehr an seine entsprechende Operatorsequenz binden. Dadurch kann die *E.coli* RNA-Polymerase an die *lacUV5* Promotorsequenz binden und die T7 RNA Polymerase wird expremiert. Diese bindet wiederum an ihre Promotorsequenz auf dem Plasmid, welche nun ebenfalls nicht mehr durch den *lac* Repressor reprimiert wird, und beginnt mit der Transkription des rekombinanten Genes (Studier et al. 1990; Dubendorff & Studier, 1991; Studier & Moffat 1986).

Dieser Stamm wurde ausschließlich zur Überexpression rekombinanter Gene verwendet.

2.1.2 XL1-Blue MRF` (Stratagene Europe)

Genotyp

$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$
[F' *proAB lac^pZ* Δ M15 Tn 10 (Tet^r)]

Beschreibung

Die Endonuklease-Defizienz (*endA1*) verbessert die Qualität isolierter Plasmid-DNA. Die Rekombinations-Defizienz (*recA*) vermittelt *Insert*-Stabilität. Die *hsdR*-Mutation verhindert die Spaltung klonierter DNA durch das *EcoK*-Endonuklease-System. Dieser Stamm wurde für die Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA verwendet.

2.1.3 JM 109 (Stratagene Europe)

Genotyp

e14-(mcrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_{K12}⁻m_{K12}⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB)
[F' *traD36 proAB lac⁺ΔM15*]

Beschreibung

Dieser Stamm wurde für die Herstellung des Ganzzelllysates verwendet, welches in der *far western* Analyse eingesetzt wurde (siehe 11.3). Außerdem wurde aus diesem Stamm die genomische Sequenz amplifiziert, die dem 3' Ende des *dam*-MTase Gens folgt (siehe 10.4.1.1).

2.1.4 JM 110 (Stratagene Europe)

Genotyp

rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)
[F' *traD36 proAB lac⁺ΔM15*]

Beschreibung

Der Stamm JM110 ist unter anderem in den Genen, die für die *dam*- und *dcm*-Methyltransferase kodieren, mutiert. Das bedeutet, dass das Genom keine *dam* Methylierung trägt. In dieser Arbeit wurde dieser Stamm verwendet, um die *in vivo* Aktivität der *Dam*-Methyltransferase und des *DamGFP*-Fusionsproteins nachzuweisen (siehe 10.3.1).

2.1.5 K12 (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland)

Genotyp

DSM No. 498, ATCC No. 23716

Beschreibung

Dieser Stamm ist ein nicht pathogener Laborstamm, von dem alle o.g. Stämme abstammen. Er wurde für die Homologe Rekombination und für die Amplifikation der genomischen Sequenzen der Interaktionspartner verwendet (siehe 10.4 und 11.8).

2.1.6 LK111 (λ) pLBM4422

Genotyp

r_Km_K thr-1 leuB6 thi-1 tonA21 supE44 lac^{HYZ} Δ M15 Hfr λ + pLBM4422

Beschreibung

Der Stamm LK111 diente zur Expression der Restriktionsendonuclease R.EcoRV (siehe 2.2.6). Er trägt außerdem ein Plasmid, das für die MEcoRV Methyltransferase und eine Cam-Resistenz kodiert. Er wurde freundlicherweise von Dr. Wolfgang Wende, Institut für Biochemie, JLU Giessen zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Tuner™ pLysS (Novagen GmbH, Madison, USA)

Genotyp

F⁻ ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLysS (Cm^R)

Beschreibung

Dieser Stamm ist eine *lacZY* Deletionsmutante des *E.coli* Stammes BL21. Durch die Mutation der *lac* Permease (*lacY*) gelangt IPTG gleichmäßig in alle Zellen einer Kultur, was zu einer konzentrationsabhängigen und gleichmäßigen Induktion innerhalb aller Zellen einer Population führt. Durch pLysS wird das T7 Lysozym bereitgestellt, wodurch die basale Expression verringert wird.

2.1.8 Tuner™ pLacI (Novagen GmbH)

Genotyp

F⁻ ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLacI (Cm^R)

Beschreibung

Siehe Punkt 2.1.7. Anstatt des pLysS Plasmides besitzt dieser Stamm das pLacI Plasmid, das den *lac* Repressor kodiert. Dadurch können mit diesem Stamm pETBlue™ und pTriEx™ Vektoren benutzt werden.

2.2 Plasmide

Als Expressionsvektor für die Dam-Methyltransferase, deren Mutanten oder GFP-Fusionen wurde in allen Fällen pET28a (Novagen GmbH) verwendet. Dieses Plasmid enthält das Gen für den Lactoserepressor *lacI^q* zur Unterdrückung der Expression des chromosomalen T7 RNA Polymerase Gens und des rekombinanten Genes das sich auf dem Plasmid unter der Kontrolle des T7 Promotors befindet. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird diese Repression aufgehoben (siehe 2.1.1). Der Vektor trägt außerdem den pBR322 Replikationsursprung und kodiert für eine Kanamycin-Kinase (*Kan^r*). Des weitern besitzt er N-Terminal der multiplen Klonierungsstelle eine Sequenz, die für sechs Histidine kodiert, einen sogenannten *His-Tag*. Der *His-Tag* wird mit dem Gen, das in die multiple Klonierungsstelle kloniert wurde, als Fusionsprotein expremiert und ermöglicht eine nachfolgende Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels der Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie

2.2.1 pET28a dam Wildtyp

In diesem Plasmid wurde die Wildtypsequenz des *dam*-Methyltransferase Gens aus dem *E.coli* Stamm JM 109 (siehe 2.1.3) in die multiple Klonierungsstelle über NdeI/HindIII Schnittstellen kloniert. Somit konnte die *dam*-Methyltransferase als Fusionsprotein mit einem *His-Tag* expremiert werden. Das Plasmid wurde von Fr. Sabine Urig, Institut für Biochemie, JLU Giessen zur Verfügung gestellt (Urig et al, 2002).

2.2.2 pET28a dam Mutante

Als Ausgangsplasmid für dieses Plasmid diente pET28a dam WT. Durch PCR-Mutagenese wurden neun Aminosäuren (AS), die sich zwischen dem *His-Tag* und dem Anfang des *dam*-Methyltransferasegenes befanden, entfernt (siehe 9.2)

2.2.3 pET28a damGFP

Für dieses Plasmid wurde die Sequenz des EGFP Gens über HindIII Schnittstellen C-Terminal von des *dam*-Methyltransferase Gens kloniert und anschließend die HindIII Schnittstelle und das Stopp-Codon des *dam*-MTase Gens mittels PCR-Mutagenese entfernt. Somit ist das Gen für ein DamGFP-Fusionsprotein entstanden (siehe 10.1).

2.2.4 Donorplasmid für die Homologe Rekombination

Als Ausgangsplasmid zur Herstellung des Donorplasmides diente das Plasmid pET28a damGFP (siehe 2.2.3). Es wurde eine 726 bp lange genomische Sequenz, die dem 3'-Ende des *dam*-Methyltransferasegenes folgt aus dem *E.coli* Stamm JM109 (siehe 2.1.3) amplifiziert und anschließend am 3'-Ende der Sequenz des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein über NotI/XhoI-Schnittstellen in das Plasmid pET28a damGFP kloniert. Gleichzeitig wurde auch eine Schnittstelle für die Homingendonuklease I-SceI eingeführt. Zur genauen Vorgehensweise siehe 10.4.1.

2.2.5 HR Kontrolle

Ausgangsplasmid für dieses Plasmid war pET28a dam Wildtyp. Durch PCR Mutagenese wurde an der Stelle 309 Thymin gegen Cytosin ausgetauscht, wodurch die Aminosäuresequenz nicht verändert wurde. Durch die Mutation wurde eine BamHI Schnittstelle entfernt. Dieses Plasmid diente als Kontrolldonorplasmid für die Homologe Rekombination. Zur genauen Vorgehensweise siehe 10.4.1.

2.2.6 pHisRV

Dieses Plasmid kodiert für die Restriktionsendonuclease R.EcoRV und kodiert für eine Amp-Resistenz. Das Protein hat einen His-Tag und diente als Negativkontrolle für die *far western* Analysen.

2.2.7 pTriExEGFP

Von diesem Plasmid wurde das EGFP Protein expremiert. Es diente als Negativkontrolle in der Lokalisationsstudie (siehe Punkt 10.5.4) und wurde freundlicherweise von Dr. Gregor Meiß, Institut für Biochemie, JLU Giessen zur Verfügung gestellt.

2.2.8 pcDNA EGFP

Von diesem Plasmid wurde das EGFP-Gen für die Herstellung des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein (siehe 2.2.3) amplifiziert. Es wurde freundlicherweise von Dr. Humaira Gowher, Institut für Biochemie, JLU Giessen zur Verfügung gestellt.

2.2.9 pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

In dieses Plasmid wurde die Wildtypsequenz der möglichen Interaktionspartner der Dam-Methyltransferase (siehe 11.8) aus dem *E.coli* Stamm K12 (siehe 2.1.5) in die multiple Klonierungsstelle über BamHI/Sall Schnittstellen (für *pykF*, *glyA*, *eno*, *tufA*, *gatY*, *udp*, *mutS*, *mutH*, *dnaX*, *polA*, *dnaN*, *fbaA*, *pgk*, *deoB*, *dnaE*, *galE*, *ligA*, *ligB*, *hoE*, *hoD*, *hoC*, *hoB*), über BamHI/NotI Schnittstellen (für *atpA* und *hoA*) bzw. über SmaI/NotI Schnittstellen (für *dnaQ*) einkloniert. Es entstanden somit 25 Plasmide, die für die o.g. Proteine als Fusionsproteine mit GST-Tag klonieren. Zur genauen Vorgehensweise siehe 11.8. Das Plasmid kodiert für eine Ampicillinresistenz.

2.2.10 pACBSR

Das Plasmid pACBSR diente als Mutageneseplasmid in der Homologen Rekombination. Es trägt das Gen für die *Homing*-Endonuclease I-SceI aus *Saccharomyces cerevisiae* und die λ Red Gene unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotor. Außerdem trägt es das Gen für die Cam-Resistenz. Es wurde freundlicherweise von Prof. F.R. Blattner zur Verfügung gestellt (Herring et al, 2003).

2.2.11 pET28a dam(APPY)GFP

Dieses Plasmid trägt das Gen für eine inaktive Variante des DamGFP-Fusionsproteins. Das Aspartat des aktiven Zentrums DPPY der Dam-MTase innerhalb des DamGFP-Fusionsproteins wurde gegen ein Alanin durch PCR-Mutagenese ausgetauscht. Dadurch ist diese Fusionsvariante katalytisch inaktiv (siehe 10.2).

3 Medien und Kultivierung

3.1 Antibiotika (AB)

Die nachfolgend aufgeführten Antibiotika-Stammlösungen wurden steril angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Tetracyclin

Die Konzentration der Stammlösung betrug 12 mg/ml, angesetzt in 50% Ethanol (EtOH). Die finale Konzentration in den Medien betrug 10 µg/ml.

Streptomycin

Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mg/ml, angesetzt in Reinstwasser. Die finale Konzentration in den Medien betrug 50 µg/ml.

Kanamycin (Kan)

Die Konzentration der Stammlösung betrug 25 mg/ml, angesetzt in Reinstwasser. Die finale Konzentration in den Medien betrug 25 µg/ml.

Chloramphenicol (Cam)

Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mg/ml, angesetzt in 100 % Ethanol. Die finale Konzentration in den Flüssigmedien betrug 20 µg/ml, in den Agarplatten 30 µg/ml.

Ampicillin

Die Konzentration der Stammlösung betrug 25 mg/ml, angesetzt in Reinstwasser. Die finale Konzentration in den Flüssigmedien betrug 75 µg/ml, in den Agarplatten 100 µg/ml.

3.2 Medien

3.2.1 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Dieses Vollmedium wurde zur Anzucht von *E.coli* Kulturen verwendet und nach der Vorschrift in „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“ (Ausubel et al, 1989) angesetzt.

3.2.2 Medien der Fa. Silantes GmbH (München, Deutschland)

Für die Inkorporation von ^{15}N in Proteine wurden die Medien OD2 und ECO der Fa. Silantes GmbH getestet (siehe Punkt 9.4). Zur Zusammensetzung siehe Fa. Silantes GmbH.

3.2.3 Glycerinkulturen

Um Bakterienkulturen über lange Zeiträume lagern zu können wurden sie als Glycerinkulturen angelegt und bei -80°C aufbewahrt. Zur Herstellung von Glycerinkulturen siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“

3.3 Kultivierung

3.3.1 Anzucht der Bakterienstämme

Zur Anzucht von *E. coli* siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“

3.3.2 Wachstumskurven

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wurde direkt nach dem Animpfen der Bakterienkultur und nachfolgend alle 20 min die optische Dichte bei ein Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) photometrisch bestimmt.

4 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock- und Elektrotransformation, sowie zur Durchführung Hitzeschock- und Elektrotransformation siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“

5 Isolation von DNA aus Bakterienzellen

5.1 Isolation von genomischer DNA

Zur Durchführung der Isolation von genomischer DNA siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“

5.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit, die Maxipräparation erfolgte mit dem Nucleobond®AX Kit der Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers.

5.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentration von Plasmid-DNA oder genomischer DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1 etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, um eventuelle Verunreinigungen durch Proteine zu detektieren. Das Absorptionsverhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ beträgt für reine dsDNA 1.8 - 2.0.

6 Aufreinigen von Proteinen mit His-Tag im „Batch“-Verfahren

6.1 Aufreinigung des Dam-Methyltransferase WT Proteins, des Dam Mutante Proteins und des DamGFP-Fusionsproteins

6.1.1 Verwendete Puffer

1 x STE: 10 mM NaCl, 1 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 µM EDTA

Aufschlusspuffer: 20 mM HEPES, 0.1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, pH 8.0

Elutionspuffer: 20 mM HEPES, 0.1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 200 mM Imidazol, pH 8.0

Dialysepuffer I: 20 mM HEPES, 0.1 mM DTT, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin

Dialysepuffer II: 20 mM HEPES, 0.1 mM DTT, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 70 % (v/v) Glycerin

6.1.2 Proteinexpression

Als Expressionsstamm diente der *E.coli* Stamm HMS 174 (DE3) (siehe 2.1.1).

Vorkultur

Um das gewünschte Protein exprimieren zu können wurde das entsprechende Plasmid mittels der Hitzeschocktransformation in Hitzeschocktransformation-kompetente HMS174 (DE3) Zellen transformiert (siehe 4). Die transformierten Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (AB) ausplattiert und über Nacht (ü/N) bei 37°C inkubiert (siehe 3.3.1). Am nächsten Tag wurde mit einem Klon dieser Platte eine 50 ml LB-Vorkultur (VK) mit den entsprechenden AB angeimpft und ü/N bei 37°C inkubiert (siehe 3.3.1).

Hauptkultur

Zwei Erlenmeyer Kolben mit je 500 ml LB-Medium und entsprechenden AB wurden mit je 10 ml der VK angeimpft und bei 37°C inkubiert (siehe 3.3.1) bis die Zelldichte eine OD₆₀₀ von 0.7 erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt wurden ca. 1.5 ml der Kultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Diese Probe diente als Referenz für die Induktion des gewünschten Proteins

Induktion

Der Start der Produktion des gewünschten Proteins erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Kultur wurde weitere zwei Stunden inkubiert. Danach wurden ca. 800 µl der Kultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Diese Probe diente zur Überprüfung der Induktion des gewünschten Proteins.

Ernte der Zellen

Nach zwei Stunden Induktion wurden die Zellen 15 min bei 4200 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman, J6-HC, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), die so gewonnenen Zellpellets in 1 x STE-Puffer aufgenommen, vereinigt und erneut zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet kann bei -20°C gelagert werden.

Um zu überprüfen, ob die Expression des Proteins induziert wurde, wurden die Proben, die vor und nach der Induktion entnommen wurden mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt und zehn min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden sie mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli analysiert (siehe 7.2 und 7.3).

6.1.3 Herstellung des Ganzzelllysates

Für die Herstellung des Ganzzelllysates wurde das Pellet aus einem Liter Bakterienkultur auf Eis aufgetaut und 30 ml gekühlter Auschlusspuffer zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte unter Eiskühlung mittels Ultraschall für insgesamt 10 min (20 x 15 s mit je 15 s Pause dazwischen). Um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden wurde die Probe in den Pausen geschwenkt. Das Gerät (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) hatte dabei folgende Einstellungen: *Timer: hold, Duty cycle: 50 %, Output control: zwischen 5 und 6*. Um nach dem Aufbruch der Zellen die entstandenen Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen zu entfernen wurde die Probe 75 min bei 20 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman J2-HS). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gekühlt.

6.1.4 Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren

Alle Schritte der Affinitätschromatographie erfolgten bei 4°C im Kühllabor.

6.1.4.1 Äquilibrierung der Ni-NTA-Agarose

Für die Aufreinigung der WT Dam-Methyltransferase, der Dam-Methyltransferase Mutante und des DamGFP-Fusionsproteins wurden 1500 µl (QIAGEN GmbH) in ein 50 ml „Greiner“-Reaktionsgefäß gegeben und mit 45 ml Aufschlusspuffer versetzt. Das Gemisch wurde 15 min auf einem Rolltisch bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

6.1.4.2 Aufreinigung des gewünschten Proteins

Der Überstand mit den löslichen Proteinen (siehe 6.1.3) wurde zu der äquilibrierten Ni-NTA-Agarose (siehe 6.1.4.1) in das „Greiner“-Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde für eine Stunde auf einem Rolltisch bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt bindet das gewünschte Protein mit dem His-Tag an die Ni-NTA-Agarose.

Anschließen wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm, 4°C und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen entfernt. Um noch ungebundenes Proteine von der Ni-NTA-Agarose zu entfernen erfolgten drei Waschschrirte, bei denen die Ni-NTA-Agarose mit jeweils 40 ml Aufschlusspuffer

gewaschen und anschließend wieder abzentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen Protein auf eine Säule (Econon-Colum, $\varnothing=12$ mm, Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben und eine Stunde bei geschlossener Säule inkubiert, damit sich die Ni-NTA-Agarose absetzen kann. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose nochmals mit fünf ml Aufschlusspuffer gewaschen. Die Elution des Proteins mit His-Tag von der Ni-NTA-Agarose erfolgte mit sieben ml Elutionspuffer durch das Sammeln von ein ml Fraktionen. Von jeder Fraktion wurden anschließend fünf μ l auf ein Whatman-Filterpapier getropft und mit Coomassie-Lösung angefärbt. Die Fraktionen mit ungefähr gleicher Proteinmenge wurden zusammengeführt.

6.1.5 Dialyse des Proteins

Um das Imidazol aus dem Puffer zu entfernen wurde das Protein für zwei Stunden gegen 500 ml Dialysepuffer I dialysiert. Für eine Lagerung des Proteins bei -20°C bedurfte es einer Glycerinkonzentration von 70 % (v/v). Um diese Glycerinkonzentration in der Probe zu erreichen wurde die Probe \bar{u}/N gegen 500 ml Dialysepuffer II dialysiert.

Die Überprüfung der Reinheit des Proteins erfolgte mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli.

6.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

6.1.6.1 Spektrophotometer

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Dialyse II erfolgte mittels der Messung der Extinktion der Proteinprobe bei 280 nm in einem Spectralphotometer (U-3000-Spektralphotometer, Hitachi, Tokio, Japan). Dazu wurde die Probe mit 1 x Methylierungspuffer (20 mM HEPES, 1 mM EDTA) und 500 mM NaCl entsprechend verdünnt, in eine Quarzmikroküvette (Fa. Hellma GmbH % Co KG, Müllheim, Deutschland; $d=1$ cm) pipettiert und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Mit Hilfe dieser Extinktion (E) und der Schichtdicke d der Küvette lässt sich die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ($E=c \times d \times \epsilon$) berechnen. Der molekulare Extinktionskoeffizient ϵ der einzelnen Proteine lässt sich durch die Anzahl der Tyrosin-

und Tryptophanreste und die Anzahl an Disulfidbrücken in dem Protein abschätzen (Pace et al, 1995):

$$\epsilon^{280\text{nm}} [M^{-1}\text{cm}^{-1}] = n_{\text{Trp}} \times 5500 + n_{\text{Tyr}} \times 1490 + (n_{\text{Cys-S-S-Cys}})^{125}$$

n_{Trp} = Anzahl der Tryptophanreste im Protein

n_{Tyr} = Anzahl der Tyrosinreste im Protein

$n_{\text{Cys-S-S-Cys}}$ = Anzahl der Disulfidbrücken im Protein.

$\epsilon^{280\text{nm}}$ für die WT Dam-Methyltransferase und die Dam-Methyltransferase Mutante: $39935 M^{-1}\text{cm}^{-1}$

$\epsilon^{280\text{nm}}$ für das DamGFP-Fusionsprotein und das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein: $56100 M^{-1}\text{cm}^{-1}$

6.1.6.2 Bradford-Test

Bradfordreagenz

100 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 wurden in 50 ml 95 % Ethanol gelöst. Diesem Gemisch wurden 100 ml Phosphorsäure (85% (w/v)) zugegeben. Mit Reinstwasser wurde das Volumen auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend durch einen Whatman #1 Filter filtriert. Das Reagenz wurde bei 4°C gelagert.

Eichreihe

Für die Eichreihe wurde zunächst eine 10 µg/µl BSA-Stammlösung (MBI Fermentas GmbH) 1:10 mit sterilem Reinstwasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden fünf, drei, 2,5, zwei, 1,5, ein, 0,5 und 0 µl in Parallele in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit sterilem Reinstwasser auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurde in jedes well 100 µl Bradfordreagenz gegeben und die Mikrotiterplatte 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Die Messung der colorimetrischen Reaktion erfolgte in einem ELISA-Reader (Dynatech MR500, Dynatech) bei 570 nm.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Von der zu messenden Proteinlösung wurden ein, drei und fünf µl in Parallele in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde mit den Proben genauso verfahren, wie mit den Proben für die Eichreihe.

Die Proteinkonzentration der Proteinlösung konnte mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt werden.

6.2 Aufreinigung des Restriktionsenzymes R.EcoRV

6.2.1 Verwendete Puffer

1 x STE: siehe 6.1.1

Aufschluss-/Waschpuffer: 30 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.2, 0.01 % Lubrol, 0.1 mM DTT, 0.8 M NaCl, 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 30 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.2, 0.01 % Lubrol, 0.5 M NaCl, 300 mM Imidazol

Dialysepuffer: 30 mM K-Phosphatpuffer, pH 7.2, 0.01 % Lubrol, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 300 mM NaCl, 70 % (v/v) Glycerin

6.2.2 Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte auf dem gleichen Wege wie bei der Expression der Dam-Methyltransferase und deren Mutanten und Fusionen (siehe 6.1.2), mit dem Unterschied, dass der Expressionstamm LK111 (λ) pLBM4422 und das Plasmid pHisRV, auf dem sich das Gen, das für R.EcoRV kodiert, verwendet wurden. Das Plasmid wurde über Elektrottransformation in die Zelle eingebracht (siehe 4).

6.2.3 Herstellung des Ganzzelllysates

Zur Herstellung des Ganzzelllysates siehe 6.1.3.

6.2.4 Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren

Alle Schritte der Affinitätschromatographie erfolgten bei 4°C im Kühllabor.

Zur Vorgehensweise siehe 6.1.4.1 und 6.1.4.2, mit dem Unterscheid, dass 500 μ l Ni-NTA-Agarose verwendet wurde.

6.2.5 Dialyse des Proteins

Die Dialyse des aufgereinigten Proteins erfolgte \bar{u}/N gegen den unter 6.2.1 angegebenen Dialysepuffer.

6.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektralphotometers

Zur Vorgehensweise siehe 6.1.6.1.

$\epsilon^{280\text{nm}}$ für R.EcoRV in der monomeren Form: $48480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

6.3 Aufreinigung von Proteinen mit GST-Tag

6.3.1 Verwendete Puffer

1 x STE: siehe 6.1.1

Aufschlusspuffer/Waschpuffer: 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8.0

Elutionspuffer: 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 20 mM reduziertes Glutathion, pH 8.0

Dialysepuffer I: 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7.5

Dialysepuffer II: 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 70 % (v/v) Glycerin, pH 7.5

6.3.2 Proteinexpression

Analytischer Maßstab:

Als Expressionsstamm diente der *E.coli* Stamm HMS 174 (DE3) (siehe 2.1.1).

Vorkultur

Um zu testen, ob das gewünschte Protein expremiert wurde, wurde das entsprechende Plasmid mittels der Hitzeschocktransformation in Hitzeschocktransformation-kompetente HMS174 (DE3) Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf eine Agarplatte mit entsprechenden AB

ausplattiert und über Nacht (ü/N) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einem Klon dieser Platte eine 3 ml Vorkultur (VK) mit den entsprechenden AB angeimpft und ü/N bei 37°C inkubiert.

Hauptkultur

Mit 100 µl der ü/N-Kultur wurde eine 3 ml Hauptkultur mit dem entsprechenden AB inokuliert und bei 37°C inkubiert bis die Zelldichte eine OD₆₀₀ von ca. 0.7 erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt wurden 0.5 ml der Kultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren (=Probe vor Induktion). Der Start der Produktion des gewünschten Proteins erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Kultur wurde weitere zwei Stunden inkubiert. Danach wurden ca. 300 µl der Kultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren (=Probe nach Induktion). Um zu überprüfen, ob die Expression des Proteins induziert wurde, wurden die Proben vor und nach Induktion mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli analysiert.

Präparativer Maßstab: siehe 6.1.2

6.3.3 Herstellung des Ganzzelllysates

Für die Herstellung des Ganzzelllysates wurde das Pellet aus einem Liter Bakterienkultur auf Eis aufgetaut und 30 ml gekühlter Ausschlußpuffer zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte unter Eiskühlung mittels Ultraschall für insgesamt 8 min (8 x 30 s mit je 30 s Pause dazwischen). Um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden wurde die Probe in den Pausen geschwenkt. Das Gerät (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) hatte dabei folgende Einstellungen: *Timer: hold, Duty cycle: 50 %, Output control: zwischen 5 und 6*. Um nach dem Aufbruch der Zellen die entstandenen Zelltrümmer zu entfernen wurde die Probe 60 min bei 20 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman J2-HS). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gekühlt.

6.3.4 Affinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren

Alle Schritte der Affinitätschromatographie erfolgten bei 4°C im Kühllabor.

6.3.4.1 Äquilibrierung der Glutathion-Sepharose

Für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde 1 ml Glutathion-Sepharose™4B (Amersham Biosciences Europe GmbH) in ein 50 ml „Greiner“-Reaktionsgefäß gegeben und mit 30 ml Aufschlusspuffer versetzt. Das Gemisch wurde 15 min auf einem Rolltisch bei 4°C inkubiert und anschließend 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

6.3.4.2 Aufreinigung des Proteins

Der Überstand mit den löslichen Proteinen (siehe 6.3.3) wurde zu der äquilibrierten Glutathion-Sepharose (siehe 6.3.4.1) in das „Greiner“-Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde für eine Stunde auf einem Rolltisch bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt bindet das gewünschte Protein mit dem GST-Tag an die Glutathion-Sepharose. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose mit dem gebundenen Protein abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm, 4°C) und der Überstand mit den ungebundenen Proteinen entfernt. Um noch ungebundene Proteine von der Glutathion-Sepharose zu entfernen erfolgten drei Waschschriffe, bei denen die Glutathion-Sepharose mit jeweils 40 ml Aufschlusspuffer gewaschen und anschließend wieder abzentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschriffe wurde die Glutathion-Sepharose mit dem gebundenen Protein in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (= Eluat 1) in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt. Zu der abzentrifugierten Glutathion-Sepharose wurde nochmals 500 µl Elutionspuffer gegeben, 30 min rollend inkubiert und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand (= Eluat 2) wurde ebenfalls in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

6.3.5 Dialyse des Proteins

Um das reduzierte Glutathion aus dem Puffer zu entfernen wurde das Protein für zwei Stunden gegen 500 ml Dialysepuffer I dialysiert. Für eine Lagerung des Proteins bei -20°C bedurfte es einer Glycerinkonzentration von 70 % (v/v). Um diese Glycerinkonzentration in der Probe zu erreichen wurde die Probe ü/N gegen 500 ml Dialysepuffer II dialysiert.

Die Überprüfung der Reinheit des Proteins erfolgte mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli.

6.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des Spektralphotometers

Zur Vorgehensweise siehe 6.1.6.1.

Der molekulare Extinktionskoeffizient ϵ der einzelnen Proteine wurde mit dem Programm Vector NTI berechnet:

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für PykF: 48280 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für Pgc: 54890 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für DnaQ: 54890 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für GlyA: 84190 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für Udp: 58020 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für DnaN: 56290 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für TufA: 60010 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für GalE: 87890 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für DnaX: 87540 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für DeoB: 84410 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für AtpA: 67810 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für PolA: 122190 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für HolD: 65440 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für GatY: 56290 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für LigA: 76400 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für HolC: 70560 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für LigB: 214450 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für HolE: 49410 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für HolB: 101600 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für Eno: 61050 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für MutH: 79260 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für HolA: 87990 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für MutS: 110580 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für DnaE: 138040 M⁻¹cm⁻¹

$\epsilon_{280\text{nm}}$ für FbaA: 81040 M⁻¹cm⁻¹

7 Gelelektrophorese

7.1 Agarosegelelektrophorese und Färben von Agarosegelen

Zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese und der Färbung von Agarosegelen siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“.

7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 2“.

7.3 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen

7.3.1 Coomassiefärbung

Zum Färben von SDS-Polyacrylamidgelen siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 2“.

7.3.2 Kolloidale Coomassiefärbung

Verwendete Lösung

a) 0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250, 2 % (w/v) Phosphorsäure, 5 % (w/v) Al_2O_3 , 10 % (v/v) EtOH. Die Substanzen wurden mit Wasser gelöst und ü/N gerührt. Anschließend wurde die Lösung gefiltert (Selecta Faltenfilter, Nr. 595 ½, Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Deutschland), um nicht gelöste Partikel zu entfernen. (Kang et al, 2002)

b) PageBlue™ Protein Staining Solution (MBI Fermentas GmbH)

Färbung

Um das SDS aus dem zu färbenden SDS-Polyacrylamidgel zu entfernen, wurde das Gel zunächst drei Mal für 10 min mit je 100 ml Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit Färbelösung bedeckt. Für 20-60 min bzw. ü/N wurde das Gel unter leichtem Schütteln gefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen wurde das Gel für 5 min mit Reinstwasser gewaschen.

7.3.3 Silberfärbung

Verwendete Lösungen

Fixativ: 40 % (v/v) EtOH, 12 % (v/v) Essigsäure, 0.05 % (v/v) Formaldehyd

50 % EtOH

Färbelösung: 0.2 % (w/v) AgNO₃, 0.075 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler: 6 % (w/v) Na₂CO₃, 0.004 % (w/v) Na₂S₂O₃, 0.05 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 40 % (v/v) EtOH, 12 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Um die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel zu fixieren, wurde das zu färbende Gel für drei mal zehn min in der Fixierlösung geschwenkt. Für die Entwässerung des Gels wurde es drei Mal für eine Dauer von 20 min mit 50 % EtOH behandelt. Anschließend folgten drei Waschschriffe von jeweils 20 sec mit Reinstwasser. Das Färben der Proteine erfolgte in der Färbelösung für 20 min. Die überschüssige Färbelösung wurde durch zwei Waschschriffe mit Reinstwasser von je 20 sec entfernt. Für die Entwicklung wurde das Gel 30-60 sec in der Entwicklerlösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel einmal kurz mit Reinstwasser abgespült und für 10 min in eine Stopplösung gegeben um die Entwicklung abzustoppen. Das Gel wurde für weitere 20 min in 50 % EtOH geschwenkt.

7.3.4 Sypro-Orange Färbung

Verändert nach Yan et al, 2000 und Malone et al, 2001

Verwendete Lösungen:

Waschlösung: 2 % (v/v) Essigsäure, 0.01 % (w/v) SDS

Färbelösung: Sypro-Orange (Molecular Probes, Eugene, USA) 1: 5000 in Waschlösung verdünnt

Durchführung:

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für eine Stunde unter leichtem Schütteln mit der Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 1.5 Stunden mit der Färbelösung gefärbt.

8 Semi-dry Westernblot

Zur Durchführung des Semi-Dry Westernblots siehe „Current Protocols in Molecular Biology Volume 1“. Um Proteine mit His-*Tag* zu detektieren wurde als erster Antikörper (AK) Anti-His Antibody (Amersham Biosciences Europe GmbH), als zweiter AK Anti-Mouse IgG (ganzes Molekül) konjugiert mit Alkaliner Phosphatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in der von den Herstellern angegebenen Verdünnung verwendet. Um Proteine mit GST-*Tag* zu detektieren wurde als erster AK Anti-GST Antibody (Amersham Biosciences Europe GmbH), als zweiter AK Anti-Mouse IgG (ganzes Molekül) konjugiert mit Alkaliner Phosphatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in der von den Herstellern angegebenen Verdünnung verwendet.

Als Substrat für die Alkaline Phosphatase wurden BCIP/NBT Tabletten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH nach den Angaben des Herstellers verwendet.

9 Strukturanalysen der Dam-Methyltransferase aus *E.coli*

9.1 Optimierung der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Dam-MTase

Da zur Durchführung der NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung der Dam-MTase eine Proteinkonzentration von über 300 μM in einem Volumen von mindestens 300 μl erforderlich war, wurde eine Optimierung der Affinitätschromatographie durchgeführt. Außerdem sollte das Protein möglichst rein und löslich vorliegen und es sollten möglichst keine anderen organischen Substanzen enthalten sein.

9.1.1 Erste Aufreinigung

die Aufreinigung erfolgte zunächst nicht im „Batch“-Verfahren, wie in 6.1.4 beschrieben, sondern über eine Säule (Econon-Colum, $\varnothing=12$ mm, Bio-Rad Laboratories GmbH). Die Expression des Proteins und die Herstellung des Ganzzelllysates erfolgten wie in den Punkten 6.1.1 bis 6.1.3 beschrieben. Anschließend wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose auf die Säule gegeben und mit 50 ml Aufschlusspuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen aus Punkt 6.1.3 über die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen und erneut über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit drei mal 50 ml

Aufschlusspuffer gewaschen. Danach wurde ein Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Säulenbett zehn min bei geschlossenem Drei-Wege-Hahn inkubiert. Zum eluieren wurde der Drei-Wege-Hahn geöffnet und die ersten vier bis fünf Tropfen verworfen. Anschließend wurden ein ml Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Fünf µl jeder Fraktion wurden auf ein Whatman-Filterpapier getropft und mit Coomassie-Lösung angefärbt. Die Fraktionen mit ungefähr gleicher Proteinmenge wurden zusammengeführt. Die Weiterbehandlung erfolgte wie in 6.1.5 und 6.1.6 angegeben.

9.1.2. Ansätze um ausgefallenes Protein wieder zu lösen

Zunächst wurde versucht, ausgefallenes Protein wieder in Lösung zu bekommen.

Dazu wurden 50 ml des ausgefallenen Dialysates II mit 1mM SAM und/oder 1 µmol einer DNA versetzt, die die Erkennungssequenz für die Dam-MTase trägt (= Ziel-DNA), versetzt.

Tab. 1: Sequenz der Ziel-DNA für die NMR-Spektroskopie. Die Erkennungssequenz für die Dam-MTase ist fett markiert

Ziel-DNA	Sequenz
Dam-L14	5'-cgg tag atc tac cg-3'

9.1.3 Zugabe von SAM zu den Aufreinigungspuffern

Es wurde zu allen Puffern kurz vor Gebrauch 100 µM SAM zugesetzt und die NaCl Konzentration im Dialysepuffer I auf 500 mM heraufgesetzt. Außerdem betrug der pH-Wert des Dialysepuffers I 8.0 statt 7.5. Des Weiteren wurde kein Dialysepuffer II verwendet. Außerdem wurden die Dialysate teilweise mit Ultrfree®-MC Centrifugal Filter Units 30,000 NMWL (Millipore, Bedford, MA 01730, USA) aufkonzentriert. Um die Proteinkonzentration weiter zu erhöhen wurde der lösliche Überstand aus bis zu 2.6 L Bakterienzellkultur über 1 ml Ni-NTA-Agarose gegeben.

9.1.4 Verwendung von Na-Phosphat-Puffer

Es wurde in allen Puffern statt HEPES Na-Phosphatpuffer in einer Konzentration von 20 mM verwendet. EDTA und DTT wurden im Dialysepuffer weggelassen. Den Puffern

wurde wie in 9.1.3 erwähnt 100 mM SAM zugegeben und die Änderungen bzgl. der Dialysepuffer wurden wie in 9.1.3 beschrieben, übernommen.

Um weitere Bedingungen zu testen wurde das Dialysat 1:2 mit verschiedenen Puffern gemischt (siehe Tab. 2) und bei 37°C inkubiert und anschließend überprüft wann und ob Protein ausgefallen ist. In allen Puffern betrug die Na-Phosphat-Puffer Konzentration 20 mM und die SAM Konzentration 100 µM. In den Ansätzen 11 bis 13 wurde das Dialysat nicht mit den Puffern gemischt wie in den Ansätzen eins bis zehn, sondern mittels Mini Dialysekammern (KMF, 7.000 MWCO) in die angegebenen Puffer umdialysiert.

Tab. 2: Ansätze 1-13 zur Optimierung der Affinitätschromatographie

Ansatz	pH	NaCl [mM]	Glycerin [% v/v]	Mg ²⁺ [mM]
1	7	500	10	-
2	6	500	10	-
3	5	500	10	-
4	4	500	10	-
5	8	-	5	-
6	8	-	5	5
7	8	500	-	-
8	6	-	-	-
9	5	-	-	-
10	4	-	-	-
11	6	-	-	-
12	6	250	-	-
13	6	250	5	-

9.1.5 Umstellung auf eine geringe Salzkonzentration und Verzicht auf die Zugabe von Glycerin

Die Na-Phosphatpuffer- und SAM Konzentration wurde beibehalten. Im Waschpuffer wurde aber die NaCl Konzentration von 500 mM auf 50 mM herabgesetzt. Ebenso im Elutionspuffer und im Dialysepuffer I, bei dem der pH-Wert 6.0 betrug. Außerdem wurde in allen Puffern auf die Zugabe von Glycerin verzichtet.

9.1.6 Testen verschiedener SAM- und Salzkonzentrationen

Dem Aufschluß- und dem Elutionspuffer wurden wieder 10% (v/v) Glycerin zugefügt, die Salzkonzentration im Elutionspuffer wurde wieder auf 500 mM NaCl erhöht. Außerdem wurde in allen Puffern die Konzentration des Na-Phosphatpuffers auf 200 mM angehoben. Es wurden zusätzlich vier verschiedene Bedingungen für den Dialysepuffer I mit pH-Wert 6.0 ausgetestet (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Ansätze 14-17 für die Optimierung der Affinitätschromatographie

Ansatz	NaCl [mM]	SAM [μ M]	Glycerin [% (v/v)]
14	50	100	-
15	500	100	-
16	500	200	-
17	500	200	5

9.1.7 Testen einer hohen Na-Phosphat-Puffer Konzentration

Die Na-Phosphatpuffer Konzentration im Dialysepuffer I wurde auf 300 mM heraufgesetzt. Die SAM Konzentration betrug 100 μ M, der pH-Wert 6.0. Es wurde kein Salz zugegeben.

9.1.8 Testen verschiedener pH-Werte

Die Bedingungen für den Dialysepuffer I wurden wie in Punkt 9.1.7 beschrieben, übernommen, allerdings wurden pH-Werte von 5.7, 6.0 und 7.0 getestet.

9.1.9 Testen der Bedingungen 18 bis 21 des Dialysepuffers I

Mit diesen Bedingungen wurden verschiedene Na-Phosphatpuffer Konzentrationen und die Zugabe von Ziel-DNA (siehe 9.1.2) getestet.

Tab. 4: Ansätze 18-21 für die Optimierung der Affinitätschromatographie

Ansatz	Na- Phosphatpuffer [mM]	pH	SAM [μ M]	Ziel-DNA [%]
18	300	6.5	100	-
19	100	6.5	100	-
20	100	6.5	100	20
21	60	6.5	100	20

9.1.10 Messung der Proteinkonzentration mittels eines Durchflussphotometers

Es wurde die Proteinkonzentration direkt nach der Elution mittels eines Durchflussphotometers bestimmt, um die Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt zu sammeln, was zu einer höheren Proteinkonzentration führen sollte.

9.1.11 Veränderte Elutionsmethode

Die in 6.1.4 beschriebene Elution der Proteinfraktion wurde modifiziert. Statt ein ml Fraktionen wurden Fraktionen von drei Tropfen gesammelt. Die Fraktionen die den höchsten Proteingehalt aufwiesen wurden zusammengeführt und dialysiert. Der Dialysepuffer wurde wie in 9.1.7 beschrieben angesetzt. Um die Konzentration des Proteins für die NMR-Messung zu erhöhen wurden die Proben nach dem Dialysieren mit Hilfe des Concentrator UFV 5BCC25 Ultrafree – 0.5 Centrifugal Filter Tub; Biomax 5K NMWL Membran 0.5 vol gemäß den Angaben des Hersteller aufkonzentriert statt wie zuvor in 9.1.3 beschrieben. Teilweise wurden die Proben nach der Konzentration mit der Ziel-DNA 1:1 im Verhältnis zur Proteinkonzentration vermischt.

9.1.12 Verringerung der Na-Phosphatpuffer Konzentration, Zugabe der Ziel-DNA vor der Dialyse und Umstellung der Aufreinigung auf das „Batch“-Verfahren

Die Na-Phosphatpufferkonzentration im Dialysepuffer I wurde auf 30 bzw. 50 mM reduziert, die 1.5 fache Menge an Ziel-DNA bezogen auf die Proteinkonzentration wurde vor der Dialyse zugegeben. Außerdem wurde das „Batch“-Verfahren (siehe 6.1.4) angewendet in Kombination mit der in 9.1.11 beschriebenen Elutionsmethode. Die SAM-Konzentration betrug 100 μ M verringert. Der pH-Wert des Dialysepuffers betrug 5.8.

9.1.13 Testen verschiedener Bedingungen zur Erhöhung der Proteinstabilität bei 37°C

Um die Proteinstabilität bei 37°C zu erhöhen wurden verschiedene Bedingungen für den Dialysepuffer I ausgetestet (siehe Tab. 5). Roti-Stab E (Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) ist dabei eine Substanz, die in 1 x Konzentration eingesetzt, die Stabilität von Proteinen erhöhen soll. DAPase ist ein Enzym, welches in der Lage ist nach bestimmten Aminosäuren zu spalten. Hierfür sollte es benutzt werden, um den His-Tag abzuspalten. Es wurde nach den Hinweisen des Herstellers verwendet.

Tab. 5: Ansätze 22 bis 31 für die Optimierung der Affinitätschromatographie

Ansatz	Na-Phosphatpuffer [mM]	pH-Wert	Salz [mM]	SAM [μ M]	DTT [mM]	Ziel-DNA	L-Arginin [M]	Roti-Stab E 4x	DAPase	Glycerin [% (v/v)]
22	30	5.8	270 KCl	100	-	-	-	-	-	5
23	100	5.8	100 KCl	100	-	-	-	-	-	5
24	50	5.8	300 NaCl	500	0.1	-	-	-	-	5
25	50	7	300 NaCl	500	0.1	-	0.5	-	-	5
26	300	5.8	-	500	-	-	-	1 x	-	-
27	200	7	-	100	-	-	-	-	-	-
28	20	7	150 NaCl	100	-	-	-	-	+	-
29	200	7	150 NaCl	100	-	-	1	-	+	-
30	200	7	150 NaCl	100	-	1.5 fach	1	-	+	-
31	200	10	150 NaCl	100	-	-	1	-	-	-

9.2 Mutagenese des *dam*-MTase Genes

Wie in Abb. 7 zu sehen ist, befindet sich zwischen dem *His-Tag* und dem Start des *dam*-MTase WT Genes ein Linker aus 11 Aminosäuren. Dieser lange Linker könnte die Aggregation des Proteins verstärken. Deswegen wurden die Codons für neun dieser Aminosäuren durch zielgerichtete PCR-Mutagenese deletiert.



Abb. 7: Aminosäuresequenz des N-terminalen Bereichs des *dam*-MTase Gens mit dem His-Tag. Die AS, die deletiert wurden, sind fett gedruckt

Zielgerichtete PCR-Mutagenese

Die zielgerichtete PCR-Mutagenese erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kirsch & Joly (1998). Durch diese Methode ist es möglich die Mutation eines Gens innerhalb des Plasmids ohne Umklonierungsschritte durchzuführen. Die PCR-Mutagenese erfolgt in einem zweistufigen Verfahren.

Erster Mutageneseschritt:

In der ersten Stufe wird die gewünschte Mutation durch PCR-Reaktion mit Hilfe eines mutierten PCR-Primers eingeführt. Oft wird neben der gewünschten Mutation zusätzlich eine Markerschnittstelle für ein RE durch eine stille Mutation eingeführt, um eine erfolgreiche Mutation kontrollieren zu können. Das so amplifizierte PCR-Produkt („Megaprimer“) trägt somit die mutierte Sequenz und hat in der Regel eine Länge von 200-700 bp.

Ausgangsplasmid für die Mutagenese war das Plasmid *dam*WT (siehe 2.2.1). Es wurde in einer 1:10 Verdünnung als *template* eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit der Pfu-Polymerase und den in Tab. 6 angegebenen Primern. Durch die Verwendung des Vorwärtsprimers wurden die Codons für die AS Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met und damit auch die NdeI-Schnittstelle deletiert (siehe Abb. 7). Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 10 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 65°C bis 55°C (pro Zyklus 1°C weniger); 1 min bei 72°C), 15 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 6: *Primer für die dam Mutagenese.*

<i>Primer</i>	Sequenz
Dam_korrekt	5'-atg ggc agc agc cat cat cat cat cat cac agc agc aag aaa aat cgc gct ttt-3'
Dam_korrekt_rück	5'-tac cac tca cgc gtt aac at-3'

Zweiter Mutageneseschritt:

Der *Megaprimer* diente in der zweiten PCR-Reaktion als *Primer*, von dem aus das gesamte Plasmid amplifiziert wird. Das resultierende PCR-Produkt trägt die Mutation in beiden Strängen der DNA und hat komplementäre Enden, deren Länge dem verwendeten *Megaprimer* entspricht. Aus diesem Grund ist das Produkt in zirkulärer Form stabil, auch wenn die Enden der DNA nicht durch eine Ligation kovalent verknüpft sind (Jeltsch & Lanio, 2002).

Von dem im ersten Mutageneseschritt hergestellten *Megaprimer* wurden 20 µl/50 µl Reaktionsvolumen in den zweiten Mutageneseschritt eingesetzt. Als *template* diente wieder das Plasmid pEt28a damWT (siehe 2.2.1) in einer 1:10 Verdünnung. Es wurde die Pfu-Polymerase der Fa. Promega GmbH und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 20 x (30 sec bei 94°C; 15 min sec bei 68°C), 1 x 20 min bei 68°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt.

DpnI-Verdau:

Um das als *template* verwendete Plasmid von dem PCR-Produkt, welches die Deletion trägt abzutrennen, wird der Ansatz anschließend mit dem RE DpnI verdaut. DpnI schneidet methylierte G^mATC Erkennungssequenzen. GATC-Sequenzen sind aber nur in Zellen mit aktiver Dam-Methyltransferase methyliert. Somit ist das PCR-Produkt unmethyliert, das *template*-Plasmid hingegen ist methyliert, da es aus *dam+* *E.coli* Zellen isoliert wurde.

Es wurden 20 U DpnI von MBI Fermentas GmbH direkt zu dem PCR-Ansatz gegeben, welcher anschließend 3 h bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde die DNA mit EtOH präzipitiert, in 10 µl Reinstwasser aufgelöst und in elektrokompetente XL1-Blue MRF⁻

Zellen transformiert, auf eine Agarplatte mit entsprechenden AB ausplattiert und Ü/N bei 37°C inkubiert.

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden acht Klone der Agarplatte, auf der die mit dem mutagenisierten Plasmid transformierten Zellen ausplattiert wurden, gepickt, jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C Ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen, mit den RE HindIII und NdeI (NEB GmbH) verdaut und anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert.

9.3 Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie Messungen erfolgten mit einem Gerät J-710 der Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt, Deutschland) und einer Scheibenküvette mit einer Flüssigkeitsdicke von 0.1 mm. Die Konzentration der Dam-MTase betrug 180 µM, die Konzentration der Ziel-DNA (siehe 9.1.2) betrug 20 µM. Es wurde sowohl Protein, als auch DNA alleine aufgenommen, wie auch beide gemeinsam. Es wurde in dem Wellenlängenbereich von 300 bis 180 nm gemessen (*far UV*). Der Stickstofffluß betrug 7L/min. Es wurden 36 Messungen, welche mit einer Geschwindigkeit von 500nm/min durchgeführt wurden, gemittelt. Als *Baseline* diente der Dialysepuffer I gegen den das Protein dialysiert wurde. Das Spektrum des Proteins wurde mit Standardkurven verglichen.

9.4 ¹⁵N-Markierung der Dam-MTase

Testen verschiedener Medien der Fa. Silantes GmbH

Es sollte für die ¹⁵N-Markierung der Zellproteine ein Medium der Fa. Silantes GmbH verwendet werden. Diese Medien beinhalten Bestandteile, die bereits die gewünschte(n) Isotopenmarkierung(en) tragen. Zunächst wurden das Wachstum der *E.coli* Bakterien auf den Medien ECO und OD2 ohne Isotopenmarkierung ausgetestet. Dazu wurde wie in 6.1.2 angegeben eine VK mit dem Plasmid pET28a dam WT (siehe 2.2.1) angezogen. Jeweils 100 ml der unmarkierten Medien ECO und

OD2 wurden mit der VK auf eine OD_{600} von 0.1 angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die OD_{600} der Kultur wurde alle 20 min gemessen. Nach 80 min und im Falle des OD2 Mediums bei einer OD_{600} von 0.66, im Falle des Mediums ECO bei einer OD_{600} von 0.58 wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert. Vor der IPTG-Zugabe wurde 1 ml der Bakterienkulturen entnommen, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren (= Probe vor Induktion). Nach 140 min wurde im Falle des Mediums OD2 476 μ l der Bakterienkultur, im Falle des Mediums ECO 343 μ l der Kultur abgenommen, zentrifugiert und bei -20°C eingefroren (=Probe nach Induktion). Die Proben vor und nach Induktion wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli analysiert. Die Dam-MTase wurde aus dem Zellpellet der OD2 Kultur wie in 6.1 beschrieben aufgereinigt und die Konzentration bestimmt.

15 N-Markierung des Dam-MTase WT Proteins

Für die 15 N-Markierung wurde das Medium OD2 mit 15 N-Markierung der Fa. Silantes GmbH verwendet. Dazu wurde 1L des Mediums mit der entsprechenden Menge Vorkultur angeimpft (s.o.) und weiterbehandelt wie in 6.1 angegeben. Für die Aufreinigung des 15 N-markierten Proteins wurde das Pellet in Aufschlusspuffer I (0.2 M Na-Phosphatpuffer pH 8, 0.1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM Imidazol, 100 μ M SAM) resuspendiert und aufgeschlossen. Die ersten drei Waschschrte wurden ebenfalls mit Aufschlusspuffer I durchgeführt, es folgte ein Waschschrte mit Aufschlusspuffer II (0.2 M Na-Phosphatpuffer pH 8, 0.1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol, 100 μ M SAM). Als Elutionspuffer wurde verwendet: 0.2 M Na-Phosphatpuffer pH 8, 0.1 mM DTT, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 200 mM Imidazol, 100 μ M SAM. Dialysiert wurde für 2 h gegen folgenden Puffer: 30 mM Na-Phosphatpuffer pH 5.8, 100 μ M SAM. Das Dialysat wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli analysiert und anschließend bei 4°C bis zur 15 N-HSQC Messung aufbewahrt.

9.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR (=nuclear magnetic resonance)) Messungen

Die NMR Messungen wurden von Dr. Christian Richter aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Schwalbe am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

10 Lokalisation und Regulation der Dam-MTase

10.1 Herstellen des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein

Um das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein herzustellen wurde das EGFP-Gen zunächst über eine HindIII-Schnittstelle ans 3'-Ende des *dam*-Methyltransferasegens in den Vektor pET28a dam WT einkloniert. Anschließend wurde das Stoppcodon des *dam*-Methyltransferasegens und die HindIII-Schnittstelle durch PCR-Mutagenese entfernt, so dass ein Fusionsprotein entstanden ist. Das neue Stoppcodon wurde durch am C-Terminus des GFP Gens eingeführt.

Klonieren des EGFP-Gens in den Vektor pET28a dam WT

Amplifikation des EGFP-Gens:

Ausgangsplasmid zur Amplifikation des EGFP-Gens war das Plasmid pcDNA EGFP (siehe 2.2.8). Dieses Plasmid wurde zunächst mit dem RE NdeI von NEB GmbH linearisiert. Dieses linearisierte Plasmid wurde in einer 1:10-Verdünnung als *template* eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit der Taq-Polymerase und den in Tab. 7 angegebenen *Primern*. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 35 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt. Das gereinigt PCR Produkt wurde mit dem RE HindIII der Fa. NEB GmbH gemäß den Angaben des Herstellers verdaut und anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 7: *Primer* für die Amplifikation des EGFP-Gens. Die Schnittstelle für HindIII ist fett gedruckt. Das neueingeführte Stoppcodon ist unterstrichen.

<i>Primer</i>	RE	Sequenz
egfp_hin	HindIII	5`-aag gaa agc ttg tga gca agg gcg agg agc tg-3`
egfp_rück	HindIII	5`-gcc gca agc tta ctt gta cag ctc gtc cat gc-3`

Restriktionsverdau und Behandlung des Vektors pET28a dam WT mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP):

Der Restriktionsverdau des Plasmides erfolgte mit dem Enzym HindIII der Fa. NEB GmbH gemäß den Angaben des Herstellers. Der verdaute Vektor wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die anschließende Behandlung des verdauten und gereinigten Vektors erfolgte mit der SAP der Fa. USB Co. nach den Angaben des Herstellers. Durch die Behandlung mit SAP werden die Phosphate des Zucker-Phosphat-Rückrates der DNA an der Schittstelle entfernt und somit eine Religation des Plasmides verhindert. Anschließend wurde der behandelte Vektor mit dem NucleoSpin® Extract II Kit aufgereinigt.

Ligation:

Die Ligation des Vektors und des PCR Produktes erfolgte mit der T4 Ligase der Fa. Promega GmbH nach den Angaben des Herstellers ü/N bei RT.

Anschließend wurde die DNA im Ligationsansatz mit Ethanol (EtOH) präzipitiert. Dazu wurde das vierfache Volumen an 100 % EtOH zu dem Ansatz dazugegeben, der Ansatz 30 min bei RT inkubiert und dann 30 min bei 9000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH versetzt und erneut 30 min bei 9000 g zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl Reinstwasser aufgelöst und die DNA in elektrokompetente XL1-Blue MRF`-Zellen (siehe 2.1.2) transformiert.

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden acht Klone der Agarplatte, auf der der Ligationsansatz nach Transformatton ausplattiert wurde, gepickt, jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen, mit dem RE HindIII (NEB GmbH) verdaut und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Von den Klonen, die das *Insert* in sich trugen, wurde mit den in Tab. 8 angegebenen *Primern* eine PCR durchgeführt. Es wurde die Taq-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 35 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend

wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tab. 8: *Primer* für die Detektion positiver Klone

Primer	Sequenz
egfp_hin	5`-aag gaa agc ttg tga gca agg gcg agg agc tg-3`
pET28a Seq-1	5`-ttt gtt agc agc cgg atc tca gtg-3`

Zielgerichtete PCR-Mutagenese 1

Erster Mutageneseschritt:

Mit zwei Klonen, die das *Insert* in der richtigen Position und Richtung trugen wurde die nachfolgende PCR-Mutagenese durchgeführt. Die Klone wurden in einer 1:10 Verdünnung als *template* eingesetzt. Es wurden die in Tab. 9 angegebenen *Primer* eingesetzt. Der Primer dam_mut1 trägt die einzuführenden Mutationen. Es wurde die Pfu-Polymerase der Fa. Promega GmbH und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 10 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 65-55°C (bei jedem Zyklus 1 °C weniger); 1 min bei 72°C), 15 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 9: *Primer* für den ersten Mutageneseschritt. Fett gedruckt sind die einzuführenden Mutationen. Unterstrichen ist die veränderte HindIII-Schnittstelle

Primer	Sequenz
dam_mut1	5`-gcg aaa aaa gga aag cct gtg agc aag ggc gag ga-3`
dam_mutrück	5`-tag gtc agg gtg gtc acg ag-3`

Zweiter Mutageneseschritt:

Von den im ersten Mutageneseschritt hergestellten *Megaprimern* wurden 20 µl in die zweite Mutagenese eingesetzt. Als *template* dienten wieder die in der ersten

Mutagenese eingesetzten Klone in einer 1:10 Verdünnung. Es wurde die Pfu-Polymerase der Fa. Promega GmbH und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 25 x (60 sec bei 94°C; 15 min sec bei 68°C), 1 x 20 min bei 68°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt.

Dpnl-Verdau:

Siehe Punkt 9.2

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden 16 Klone der Agarplatte, auf der die mit dem mutagenisierten Plasmid transformierten Zellen ausplattiert wurden, gepickt, jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen, mit den RE HindIII und PvuI (MBI Fermentas GmbH) verdaut und anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Sequenzierung:

Um die Korrektheit der Klone weiter zu überprüfen wurden sie sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Seqlab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttinen, Deutschland) nach den Angaben der Firma. Es wurden *Extended Hot Shot* Sequenzierungen durchgeführt. Die untersuchten Klone wurden jeweils zwei mal sequenziert, einmal mit dem *Primer* Seq2GFP, das andere mal mit dem *Primer* damGFP (siehe Tab. 10). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al, 1997) analysiert.

Tab. 10: *Primer* für die Sequenzierung

Primer	Sequenz
Seq2GFP	5`-cga cgg caa cta caa gac cc-3`
damGFP	5`-ggc gta tca cac aaa cag-3`

Zielgerichtete PCR-Mutagenese 2

Um bestehende Mutationen im Anfangsbereich des EGFP-Gens zurück zu mutieren wurde eine zweite PCR-Mutagenese durchgeführt.

Erster Mutageneseschritt:

Als *template* diente einer der sequenzierten Klone aus der PCR-Mutagenese 1 in einer 1:10 Verdünnung. Die verwendeten *Primer* sind in Tab. 11 angegeben. Der *Primer* *remut_GFP* trägt die einzuführenden Mutationen. Um die gelungene Mutation zu überprüfen wurde durch eine stille Mutation eine zusätzliche NdeI Schnittstelle eingeführt. Es wurde die Pfu-Polymerase (Promega GmbH) und folgendes Temperaturprofil eingesetzt: 1 x 5 min bei 94°C, 10 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 65-55°C (bei jedem Zyklus 1 °C weniger); 1 min bei 72°C), 15 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 11: *Primer* für den ersten Mutageneseschritt. Fett gedruckt sind die einzuführenden Mutationen. Die NdeI Schnittstelle ist unterstrichen

<i>Primer</i>	Sequenz
dam_mut1	5`-gcg aaa aaa gga aag cct gtg agc aag ggc gag ga-3`
remut_GFP	5`-gcc ggt ggt gca <u>tat</u> gaa ctt cag ggt cag ctt gcc-3`

Zweiter Mutageneseschritt:

20 µl des gereinigten PCR-Produkts aus dem ersten Mutageneseschritt dienen als *Megaprimer* für die zweite Mutagenese. Das *template* ist dasselbe wie in dem ersten Mutageneseschritt. Zur Vorgehensweise und zum Temperaturprofil siehe PCR-Mutagenese 1.

DpnI-Verdau:

Siehe PCR-Mutagenese 1

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden acht Klone der Agarplatte, auf der die mit dem mutagenisierten Plasmid transformierten Zellen ausplattiert wurden, gepickt, jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen, mit dem RE NdeI (MBI Fermentas GmbH) verdaut und anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Sequenzierung:

Siehe PCR Mutagenese 1

10.2 Herstellung des Gens für das Dam(APPY)GFP-Fusionsproteins

Erster Mutageneseschritt:

Als *template* diente das Plasmid pET28a damGFP in einer 1:10 Verdünnung. Die verwendeten *Primer* sind in Tab. 12 angegeben. Der *Primer* APPYf trug die einzuführenden Mutationen. Um die gelungene Mutation zu überprüfen wurde durch eine stille Mutation eine zusätzliche FspI Schnittstelle eingeführt. Es wurde die Pfu-Polymerase (Promega GmbH) und folgendes Temperaturprofil eingesetzt: 1 x 5 min bei 94°C, 25 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 12: *Primer* für den ersten Mutageneseschritt. Fett gedruckt sind die einzuführenden Mutationen. Die FspI Schnittstelle ist unterstrichen

Primer	Sequenz
APPYF	5'-atc cgt cgt cta ttg cgc acc gcc tta tgc acc gc-3'
dam_rück	5'-tta ttt ttt cgc ggg tga aac ga-3'

Zweiter Mutageneseschritt:

20 µl des gereinigten PCR-Produkts aus dem ersten Mutageneseschritt dienen als *Megaprimer* für die zweite Mutagenese. Das *template* ist dasselbe wie in dem ersten

Mutageneseschritt. Zur Vorgehensweise und zum Temperaturprofil siehe PCR-Mutagenese 1 des Punktes 10.1.

Dpnl-Verdau:

Siehe PCR-Mutagenese 1 des Punktes 10.1.

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden acht Klone der Agarplatte, auf der die mit dem mutagenisierten Plasmid transformierten Zellen ausplattiert wurde, gepickt und in ein PCR-Reaktionsgefäß geschickt. Gleichzeitig wurde jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB mit den Klonen inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen. Für die PCR wurde die Pfu-Polymerase (Promega GmbH) und folgendes Temperaturprofil eingesetzt: 1 x 5 min bei 94°C, 25 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt und anschließend mit dem RE FspI (MBI Fermentas GmbH) verdaut und agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Sequenzierung:

Um die Korrektheit der Klone weiter zu überprüfen wurden sie sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttinen, Deutschland) nach den Angaben der Firma. Es wurden *Extended Hot Shot* Sequenzierungen durchgeführt. Die untersuchten Klone wurden jeweils zwei Mal sequenziert, einmal mit dem *Primer* dam_hin, das andere mal mit dem *Primer* dam_rück (siehe Tab. 16). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al, 1997) analysiert.

10.3 Bestimmung der Aktivität

10.3.1 *In vivo* Aktivität

Aktivitätstest

Für den *in vivo* Aktivitätstest wurden die Plasmide pET28a dam Mutante (siehe 2.2.2), pET28a damGFP (siehe 2.2.3 und 10.1) und pET28a dam(APPY)GFP (siehe 2.2.11) jeweils sowohl in elektrokompetente JM 110 (siehe 2.1.4) als auch in elektrokompetente XL1-Blue MRF⁺ (siehe 2.1.2) transformiert und auf Agarplatten mit entsprechenden AB plattiert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am folgenden Tag wurde von jeweils einer Kolonie der Platten eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB inokuliert und über den Tag bei 37°C inkubiert. Am Abend wurde mit 100 µl dieser Kultur eine neue 3 ml LB-Kultur mit entsprechenden AB angeimpft und ü/N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden wieder neue 3 ml Kulturen mit 100 µl der ü/N-Kultur inokuliert, welche bis zum Abend bei 37°C inkubiert wurden. Am Abend wurde von diesen Kulturen wiederum eine neue ü/N-Kultur mit 100 µl inokuliert. Am folgenden Morgen wurde aus diesen Kulturen die Plasmid-DNA mittels einer Minipräparation gewonnen und mit den Plasmiden DpnI bzw. DpnII bzw. NdeI verdaut und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert.

Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse wurde zunächst wie bei dem Aktivitätstest verfahren. Allerdings wurde nicht die Plasmid-DNA isoliert, sondern die Kulturen in 1.5 ml-Reaktionsgefäßen geerntet und das Zellpellet ü/N bei -20°C eingefroren. Als Kontrolle wurde außerdem eine Kultur mit leeren JM 100-Zellen angeimpft, mit der in gleicher Weise verfahren wurde. Zu dem Zellpellet wurde 1 ml gekühlter Aufschlusspuffer (siehe 6.1.1) gegeben und die Zellen mittels Ultraschall unter Eiskühlung für insgesamt 2 min (5 s Pulse mit 5 s Pause dazwischen). Das Gerät hatte dabei folgende Einstellungen: *Timer: hold, Duty cycle: 50 %, Output control: zwischen 3*. Um nach dem Aufbruch der Zellen die entstandenen Zelltrümmer zu entfernen wurde die Probe 30 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge, Eppendorf AG, Deutschland). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde zu 50 µl Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen GmbH, Deutschlands) in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und für 2 h bei 4 °C rollend inkubiert. Anschließend wurden die Ni-NTA

Magnetic Agarose Beads zwei Mal mit dem Aufschlusspuffer (siehe 6.1.1) nach den Angaben des Herstellers gewaschen. Zu den Ni-NTA Magnetic Agarose Beads wurde anschließend 20 µl Lämmli-Auftragspuffer (siehe 7.2) gegeben, 15 min bei 70°C inkubiert und eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (siehe 7.2). Anschließend wurde das Gel geblottet und ein Western Blot mit anti-His AK durchgeführt (siehe 8).

10.3.2 *In vitro* Aktivität

Gelfiltration

Das DamGFP-Fusionsprotein wurde zunächst wie in 6.1 beschrieben aufgereinigt und 2 h gegen den Dialysepuffer I dialysiert. Anschließend wurde das Protein mittels einer Gelfiltration weiter aufgereinigt. Dazu wurde entgaster Dialysepuffer I und eine Superdex-75 Säule verwendet.

Die Fraktionen die das DamGFP-Fusionsprotein enthielten wurden gegen den Dialysepuffer II (siehe 6.1.1) dialysiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Western Blot

Von den Fraktionen, die das DamGFP-Fusionsprotein enthielten, wurde ein Western Blot mit anti-His AK durchgeführt.

Aktivitätstest

Mit den Fraktionen, die im Western Blot fast keine Degradationsprodukte aufwiesen wurde der Aktivitätstest durchgeführt.

Dazu wurden die in Tab. 13 beschriebenen Ansätze pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 3, 5, 7, 9, 11 mit DpnI, die Ansätze 4, 6, 8, 10, 12 mit DpnII verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tab. 13: Ansätze für den *in vitro* Aktivitätstest. Die Zahlenangaben in der Tabelle sind Angaben in μl

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
λ -DNA <i>dam dcm</i> (0.3 mg/ml)	1	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
λ -DNA (0.3 mg/ml)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DamGFP (5.7 μM)	-	-	-	-	0.8	0.8	-	-	0.8	0.8	-	-
Dam Mutante (3.3 μM)	-	-	-	-	-	-	1.6	1.6	-	-	1.6	1.6
SAM (10 mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
SAH (10 mM)	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
NaCl (5M)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 x Methyl.puffer (200 mM HEPES, 10 mM EDTA)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O	7	7	5	5	3.2	3.2	1.6	1.6	3.2	3.2	1.6	1.6

10.4 Homologe Rekombination

Die Homologe Rekombination wurde in Anlehnung an Harring et al, 2003 durchgeführt.

10.4.1 Verwendete Plasmide

10.4.1.1 Donorplasmid

Um das Donorplasmid herzustellen, sollte ein Teil der genomische Sequenz, die dem 3'-Ende des *dam*-Methyltransferasegenes folgt (siehe Abb. 8), an das 3'-Ende des Gens für das DamGFP-Fusionsproteins auf dem Vektor pET28a *damGFP* (siehe 10.1 und 2.2.3) über NotI und XhoI- Schnittstellen inkloniert werden. Dabei sollte gleichzeitig die Erkennungssequenz für I-SceI *Homing*-Endonuclease eingeführt werden.

```

ATGAAGAAAAATCGCGCTTTTTGAAGTGGGCAGGGGGCAAGTATCCCCTGCTGATGATATTAACGGCATTGCCCCAAGGGCGAATGCTGGTTGAGCCTTTGT
AGGTGCCGGGTCGGTGTCTCAACACCGACTTTTCTGTTATATCCTTGCCGATATCAATAGCGACCTGATCAGTCTCTATAACATTGGAAGATGCGTACTGATGAGT
ACGTACAGGGCCGACGCGAGCTGTTTGTCCCGAAACAAATGCGCCGAGGTTACTACTCAGTTCGCGAAGAGITCAACAAAAGCCAGGATCCGTCCGTCG
GGCGGTACTGTTTTATTTGAACCGTACGGTTACAACGGCCTGTGTCGTACAATCTGCGCGGTGAGTTAACGTGCCGTTCGGCCGCTACAAAAACCTATT
CCCCGAAGCAGAGTGTATCACTTCGCTGAAAAAGCGCAGAATCCTTTTCTATTGTGAGTCTACGCGGATAGCATGGCGCGCGCAGATGATGCATCCGTCGT
CTATTGGGATCCGCCTATGCACCGCTGTCTGCGACCGCCAACTTACGGCGTATCACACAAACAGTTTACGCTGAACAACAAGCGCATCTGGCGGAGATCGC
CGAAGGTCTGGTTGAGCGCCATATCCAGTGTCTATCCAATCACGATACGATGTAACGCGTGTAGTGGTATCAGCGCGCAAAATGTCATGCTGCAAGTTCGA
CGCAGTATAAGCAGCAACGGCGGCACACGTAAGGTGGACGAACTGCTGGCTTTGTACAAACCAGGAGTCTGTTACCCCGCAAAAAATAAttctcaaggag
agcgggATGAAACAGTATTTGATIGCCCCCTCAATCTGICGGCTGATTTTGGCCCGCTGGGTGAAGATACCGCAAAAGCCCTGGCAGCTGGCGCTGAIGTCGTGC
ATTTTGACGTCATGGATAACCACTATGTTCCCAATCTGACGATGGGCCAATGGTGTGAAATCCTTGCGTAACTAIGGCATTACCGCCCTATCGACGTACACCTGA
TGGTAAACCCGTCGATCGCATTTGCTGCTGATTTGCTGCGCTGGTGGCCAGCATCAITACCTTTCATCCAGAAGCCTCCGAGCAITGTGACCGCACGCTGCAAC
TGATTAAGAAAAATGGCTGTAAGCGGGTCTGGTATTAACCCGGCGACACCTCTGAGCTAICTGGATTACGTGATGGATAAGCTGGATGTGATCCTGCTGATGCC
GTCAACCCTGGTTTCGGCGGTCAGTCTTTCATTCCTCAAACTGGATAAACTGCGCGAAGTACGTGCGCGTATCGACGAGTCTGGCTTTGACATTCGACTAGAAGT
GGACGGTGGCGTGAAGGTGAACAACATGGCGAAATCGTTCGGCGGGCGCGGATATGTCGTCGCGGTTTCGGCAATCTTCGACCAGCCAGACTACAAA
AAGTCATGATGAAATGCGCAGTGAACCTGGCAAAGGTAAGTCATGAATAA

```

Abb. 8: Ausschnitt aus der genomischen Sequenz von *E. coli* K12 (NCBI/Blattner). Blau: Sequenz des *dam*-Methyltransferasegenes; lila: Sequenz des *rpe*-Genes; grün: intergenische Sequenz; gelb unterlegt: amplifizierte Sequenz.

Restriktionsverdau und Behandlung des Vektors pET28a *dam*GFP mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP)

Der Restriktionsverdau des Plasmides erfolgte mit den Enzymen NotI und XhoI der Fa. NEB GmbH gemäß den Angaben des Herstellers. Der verdaute Vektor wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die anschließende Behandlung des verdauten und gereinigten Vektors erfolgte mit der SAP der Fa. USB Co. nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der behandelte Vektor mit dem NucleoSpin® Extract II Kit aufgereinigt.

Amplifikation und Verdau der genomischen Sequenz

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-Amplifikation erfolgte mit den in Tab. 14 angegebenen *Primern* mit Hilfe des FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit der Fa. Epicentre Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA) nach den Angaben des Herstellers. Als template wurde die genomische DNA von JM 109 Zellen verwendet. Mit Hilfe des Rückprimers wurde die Erkennungssequenz für I-SceI eingeführt. Für die PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 2 min bei 94°C, 41 x (30 sec bei 94°C; 30 sec bei 60°C; 1 min bei 72°C), 1 x 10 min bei 72°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese

analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt. Das gereinigt PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI der Fa. NEB GmbH gemäß den Angaben des Herstellers verdaut und anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 14: Sequenz der *Primer* für die Amplifikation der genomischen Sequenz 3' des *dam*-Methyltransferasegens. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme (RE) mit denen anschließend geschnitten wird sind unterstrichen. Fett gedruckt ist die I-SceI-Schnittstelle, die für die Homologe Rekombination verwendet wird

Primer	RE	Sequenz
homf_NotI	NotI	5'-agc tac <u>gca gcc gct</u> tct caa gga gaa gcg gat gaa aca-3'
homrev_neu	XhoI	5'-agc tac <u>ctc gag</u> att acc ctg tta tcc cta act tac ctt tgc cag ttc act gcg-3'

Ligation

Die Ligation des Vektors und des PCR Produktes erfolgte wie in Punkt 10.1 beschrieben.

Detektion positiver Klone:

Um positive Klone zu identifizieren, wurden acht Klone der Agarplatte, auf der die mit dem Ligationsansatz transformierten Zellen ausplattiert wurden, gepickt, jeweils eine 3 ml LB-Kultur mit den entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus diesen Kulturen das Plasmid mit Hilfe einer Minipräparation gewonnen, mit den RE NotI und XhoI bzw. I-SceI (NEB GmbH) verdaut (siehe oben) und anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Spaltung mit I-SceI wurde das von der Firma mitgelieferte Testplasmid ebenfalls verdaut.

Sequenzierung

Zur Überprüfung der klonierten DNA-Fragmente wurde ihre Sequenz ermittelt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) nach den Angaben der Firma. Es wurden *Extended Hot Shot* Sequenzierungen durchgeführt. Die untersuchten Klone wurden jeweils zwei mal sequenziert, einmal mit dem *Primer* homf_NotI, das andere mal mit dem *Primer*

homrev_neu (siehe Tab. 14). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al, 1997) analysiert.

10.4.1.2 Plasmid HR Kontrolle

Zur Kontrolle für die homologie Rekombination wurde eine stille Mutation innerhalb des *dam*-Methyltransferasegenes eingeführt, durch die die einzige BamHI-Schnittstelle entfernt wurde. Wie in Abb. 9 zu sehen, wurde an der Stelle 309 des *dam*-Methyltransferasegens die Base Thymin durch Cytosin ersetzt werden. Dadurch bleibt die Aminosäure erhalten, die BamHI Schnittstelle aber nicht.

```

ATGAAGAAAAATCGCGCTTTTTGAAGTGGGCAGGGGGCAAGTATCCCCTGCTTGATGATATTAACGGCAITTGCCCAAGGGCGAATGCTGGTTGAGCCTTTGT
AGGTGCCGGGTCGGTGTCTCAACACCGACTTTTCTCGTTATATCCTGCGGATATCAATAGCGACCTGATCAGTCTCTATAACATTGTGAAGATGCGTACTGATGAGT
ACGTACAGGCCGCACGCGAGCTGTTTGTCCGAAACAAATTGCGCCGAGGTTTACTATCAGTTCGCGAAGAGTTCACAAAAGCCAGGATCCGTTCCGTCGG
GCGGTACTGTTTTATATTGAACCGCTACGGTTACAACGGCCTGTGCTGTTACAATCTGCGCGGTGAGTTTAACTGCGCTCGGCCGTACAAAAAACCTATTTC
CCGGAAGCAGAGTTGATCACTTCGCTGAAAAAGCGCAGAATGCCTTTTCTATTGTGAGTCTTACGCCGATAGCATGGCGCGCGCAGATGATGCATCCGTCGCT
ATTGCGATCCGCTTATGCACCGCTGTCTGCGACCGCCAACITTCAGGCGTATCACACAAACAGTTTTACGCTTGAACAACAAGCGCATCTGGCGGAGATCGCC
GAAGGCTGTTGAGCGCCATATCCAGTGTGATCTCCAATCACGATACGATGTTAACGCGTGAGTGGTATCAGCGCGCAAAATTCATGTCGTAAGTTCGAC
GCAGTATAAGCAGCAACGGCGGCACACGTA AAAAGGTGGACGAACTGCTGGCTTTGTACAAACCAGGAGTCGTTTACCCGCGAAAAATAA

```

Abb. 9: Sequenz des *dam*-Methyltransferasegens. Fett gedruckt: BamHI-Schnittstelle. Gelb unterlegt: zu mutierende Base

Zielgerichtete PCR-Mutagenese

Erster PCR-Mutagensschritt:

In diesem Fall wurden die in Tab. 15 angegebenen Primer verwendet. Der Hin-*Primer* trägt die einzuführende Mutation, der Rück-*Primer* trägt die einzuführende I-SceI-Schnittstelle. Als *template* diente das Plasmid pET28a dam WT (siehe 2.2.1). Für die PCR wurde die Pfu-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 95°C, 25 x (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 15: *Primer* für den ersten PCR-Mutagenschritt für die Herstellung des Plasmids HR Kontrolle. Die I-SceI-Schnittstelle ist unterstrichen, die mutierte Base ist fettgedruckt

Primer	Sequenz
HR Kontrolle_f	5`-aag cca gga ccc gtt ccg tc-3`
HR Kontrolle_rev	5`- <u>taa gga tag cag ggt aat</u> tta ttt ttt cgc ggg tga aac ga-3`

Zweiter PCR-Mutagenschritt:

In diesem Fall wurde als *template* das Plasmid pET28a dam WT (siehe 2.2.1) verwendet. Für die PCR wurden 10 µl des aufgereinigten *Megaprimers* aus der ersten PCR-Reaktion eingesetzt, die Pfu-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 95°C, 25 x (1 min bei 95°C; 15 min bei 68°C), 1 x 20 min bei 68°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt.

DpnI-Verdau:

Siehe Punkt 9.2

Detektion positiver Klone:

Um Klone zu finden, die die Mutation tragen wurden acht Klone von der Agarplatte gepickt und einerseits direkt in ein PCR-Gefäß geschmiert und andererseits eine 3 ml Kultur mit entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Von den acht Klonen und dem Plasmid pET28a dam WT wurde mit den in Tab. 16 angegebenen *Primern* das *dam*-Methyltransferasegen amplifiziert. Es wurde die Pfu-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 95°C, 25 x (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Das amplifizierte Produkt wurde anschließend mit dem RE BamHI von MBI Fermentas GmbH nach den Angaben des Herstellers verdaut und die Spaltprodukte anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert. Von den Klonen die sich durch diesen Restriktionsverdau als positiv erwiesen haben wurde von den ü/N-Kulturen das Plasmid mit einer Minipräparation isoliert und eine Testspaltung mit dem RE I-SceI der Fa. NEB GmbH nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Spaltung wurde das von der Firma mitgelieferte

Testplasmid ebenfalls verdaut. Die Spaltprodukte wurden anschließend Agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Tab. 16: *Primer* für die Detektion positiver Klone

Primer	Sequenz
Dam_hin	5`-atg aag aaa aat cgc gct ttt ttg a-3`
Dam_rück	5`-tta ttt ttt cgc ggg tga aac ga-3`

Sequenzierung

Um die Korrektheit der Klone weiter zu überprüfen wurden sie sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttinen, Deutschland) nach den Angaben der Firma. Es wurden *Extended Hot Shot* Sequenzierungen durchgeführt. Die untersuchten Klone wurden mit drei unterschiedlichen *Primern* sequenziert (dam_hin, dam_rück (siehe Tab. 16) und damGFP (5`- ggc gta tca cac aaa cag-3`)). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al, 1997) analysiert.

10.4.1.3 Mutageneseplasmid pACBSR

Siehe 2.2.10 und Abb. 10.

10.4.2 Durchführung der Homologen Rekombination („Gene gorging“)

Zunächst wurden jeweils 1 ng des Donorplasmids bzw. des Plasmids HR Kontrolle (siehe 10.4.1, 2.2.4 und 2.2.5) zusammen mit 1 ng des Mutageneseplasmids pACBSR (siehe 2.2.10) in TSS-kompetente JM 109 bzw. K12 transformiert, auf Cam/Kan-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml LB-Medium in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit einer Kolonie der Cam/Kan-Agarplatte inokuliert und kurz gevortext. Von dieser Zellsuspension wurde eine 1:1000 Verdünnung in LB-Medium angesetzt, von der jeweils 100 µl auf eine Cam-Agarplatte, eine Kan-Agarplatte, eine Cam/Kan-Agarplatte und eine LB-Agarplatte ohne AB ausplattiert wurden. Diese Platten stellten die t=0 Kontrolle dar und wurden ü/N bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag ausgezählt. Zu dem Rest der

unverdünnten Zellsuspension wurden 10 µl 20% sterile Arabinoselösung gegeben und die Kultur bei 37°C schüttelnd (1400 min⁻¹) für 30-60 min inkubiert (Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf AG). 1 µl einer 25 mg/ml Cam-Lösung wurde zu der Kultur gegeben, welche anschließend für weitere 7-12 h bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde. Danach wurde die Kultur je nach Trübungsgrad 1:100 bis 1:10000 in LB-Medium verdünnt und diese Verdünnungen auf Cam-Agarplatten, Kan-Agarplatten, Cam/Kan-Agarplatten und LB-Agarplatten ohne AB ausplattiert und ü/N bei 37°C inkubiert (t=7-12) und am nächsten Tag ausgezählt.

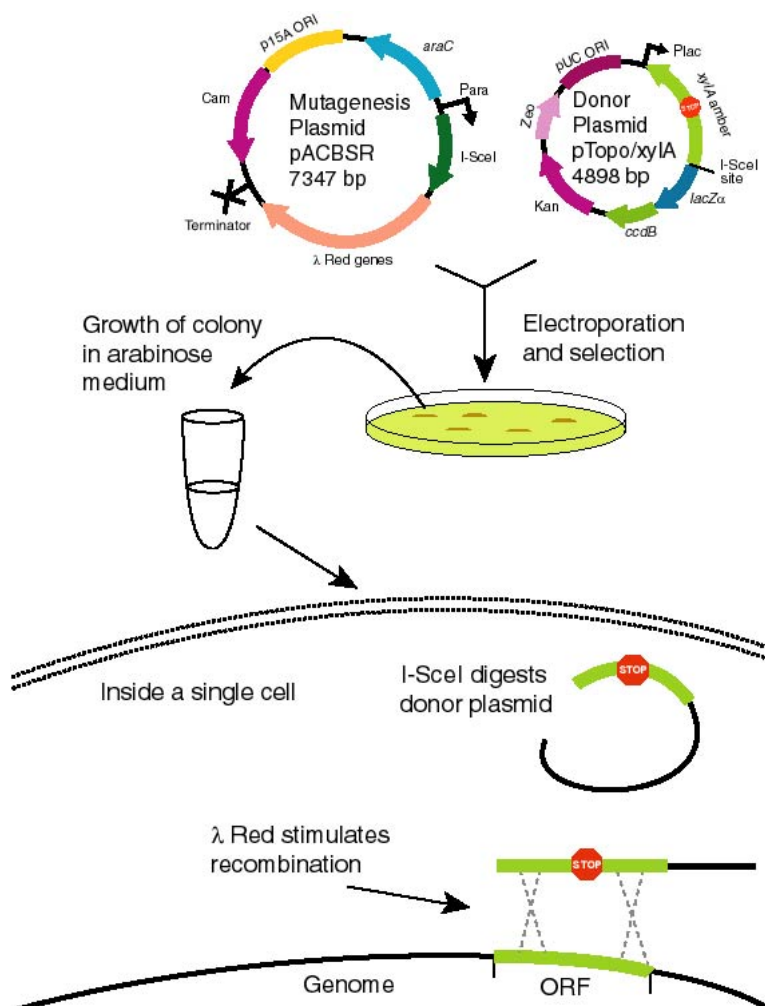


Abb. 10: Schema der Homologen Rekombination nach Harring et al, 2003

10.4.3 Detektion positiver Klone

Um positive Klone zu finden, welche das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein in das Genom integriert haben, wurden 25-96 Klone von der LB-Agarplatte ohne AB (t=7-12) gepickt und zunächst in ein PCR-Gefäß und anschließend auf eine LB-Agarplatte ohne AB oder eine Cam-Agarplatte (=Klonsicherungsplatte) geschmiert. Die Klonsicherungsplatte wurde bei 37°C ü/N inkubiert. In die PCR-Gefäße mit den Zellen wurden 30 µl Reinstwasser pipettiert und die Gefäße 5 min bei 95°C inkubiert. Von diesem Zellysatz wurden jeweils 2 µl als *template* in eine 20 µl PCR eingesetzt. Die *Primer* sind in Tab. 17 angegeben. Der *Primer* Screenf5 bindet auf dem *E.coli* Genom vor dem 5'-Anfang des *dam*-Methyltransferase Gens (siehe Abb. 11), der *Primer* Screenrev2korr bindet auf dem *E.coli* Genom am Anfang des *gph*-Genes (siehe Abb. 11). In der PCR-Reaktion wurde die Pfu-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 95°C, 30 x (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 60°C; 3 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Das amplifizierte Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tab. 17: *Primer* für die Detektion positiver Klone

<i>Primer</i>	Sequenz
Screenf5	5'-aag gtg taa tta gtt agt cag c-3'
Screenrev2korr	5'-cgc cgc gaa tat ctt caa ac-3'

ATGGATGAATCAAACCAGAACGACGAGCTGAAACCCGATCCCAGCGATCGCTACTGGTCGTTCTCGTCAATCTTGAACGTTCTGAGCGTACTGAACGTGGC
 GAACCCGACAGATCAATTTGATGATATTGAACCTGATGACACTGACGATCGCCGTCGACTCGTGCAGAAAAAGAGCGCAATGAGGAACCCGAAATCGAAGAAG
 AAATGACGAATCCGAAGATGAAACCGTGGATGAAGAGCGCGTAGAGCGTCTCCGCTAAGCGCAAAAAAGCAGCCAGTAAACCCGCTTCTCGTCAAGTATA
 TGATGATGGGCGTGGCATTCTGGTCTACTGCTGTGATCATCGGTATCGGTTCTGCGCTAAAAGCCCCCTCGACCCTCCAGCGATCAAACCCGCTGCTGGCGA
 GAAGAGTATTGATCTTCTGGCAATGCGACCGATCAGGCGAATGGCGTGCAGCCAGCGCCGGAAACCAGCTGCGGAAAAATACTCAGCAGGATGTTTCTCT
 GCCACCGATCTTCTACGCGGACTCAAGGGCAAACCCCGGTGGCAACGGATGGTCAACACAGTGTGAAGTGCAGGGTGACCTGAACAATGCGCTGACCC
 AGCCCAAAAATCAGCAACAGCTGAACAATGTGGCGGTCAATCCACGTTGCGGACTGAACCCGCAACGGTTGCGCCTGTTGCAATGGCAATGCATCGCGTG
 ACACGGCGAAAAACGCAAAACCGCTGAACGTCCTCCTACTACGCGCCAGCTCGTACGAGCGGGTATTGAACCGAAAAACCGCAAGCAACCGTGAAA
 ACGGAGCCGAAGCCGGTAGCACAGACGCGGAAGCGTACTGAACAGCTGCCCTGTGGCGAGCACGAAGGCACCCGGTGCAGCTTCTACGCCAGCAC
 CAAAAGAGACGGGACTACGGTCCAGTACAGACGGCATCCCGCGCAAAACACAGCAACACCCGCTGCTGGGGCGAAGACCGCAGGTAATGTTGGT
 CGTTGAAATCGGCACCGTCCAGCCATTACACTCTGCAGCTGAGCAGTTCTCTAACTACGACAACCTGAACGGTTGGGCGAAGAAAGAGAATCTGAAAAACTA
 CGTTGTCTATGAAACGACGCGTAATGGTACCGCTGGTATGCTGCTGGTTCTGGCGTACGCTTCAAGAAAGAGAGCGAAAAAGCGGATCTACATGCCAGC
 AGATGCCAGGCCAAAAACCCGTGGGCGAAACCGCTCGCTCAGGTACAGGCGGATCTGAAAGTAAcaaggttatctccgcaatggttatcgthgcgggagtgcctgaag
 cgctggatgctgtcggagctttctccacagccggagaggggtgtaattgtagtgcagcATGAAGAAAAATCGCGCTTTTTGAAAGTGGGCGAGGGGGCAAGTATCCCTGCTGATG
 ATATTAACGGCATTGCCCAAGGGCGAATGCTGTTGAGCCTTTGTAGGTGCGGGTCTGGTGTCTCAACACCGACTTTTCTCGTATATCTTCCGATATCAAT
 AGCGACCTGATCAGTCTATAACATGTGAAGATGCGTACTGATGAGTACGACAGCGCCGACGCGAGCTGTTGTTCCGAAACAAATGCGCCGAGGTTACT
 ATCAGTCCGCGAAGAGTCAACAAAAGCCAGGATCCGTTCCGTCGGGCGGACTGTTTTATTTGAACCGCTACGGTACAACGGCTGTGCTGTACATCTG
 CGGGGTAGITTAACGTGCCGTTCCGGCGCTACAAAAACCTATTCCCGGAAGCAGAGTGTATCACTTCGCTGAAAAAGCGCAGAATGCCITTTTCTATGTGA
 GTCTTACGCCGATAGCATGGCGCGCGCAGATGATGATCCGCTGCTATTGCGATCCGCTTATGCACCGCTGCTGCGACCGCCAACTTACGGCGTATCACA
 CAAACAGTTTTACGCTTGAACAACAAGCGCATCTGGCGGAGATCGCCGAAGGTCTGGTGAAGCGCCATATCCAGTGTGATCTCCAATCACGATACGATGTTAA
 CGCGTAGTGGTATCAGCGCGCAAAATGATGCTGCTCAAAAGTCGACGCGAGTATAAGCAGCAACGGCGGCACACGTA AAAAGTGGAGCAACTGCTGGCTT
 TGTAACAACAGGAGTCTTTACCCCGCAAAAAATAAhtcacaaggagaagcggATGAACAAGTATTTGATTGCCCCCTCAATCTGTCGGCTGATTTTGCCCCGCTG
 GGTGAAGATACCGCAAAAGCCCTGGCAGCTGGCGCTGATGCTGTCATTTGACGTCATGGATAACCACTATGTTCCCAATCTGACGATTGGGCCAATGGTGTG
 AAATCCTTGCCTAACTATGGCATTACCCGCCCTATCGACGTACACCTGATGGTGAACCCGTCGATCGCATTTGCTGCTGATTTGCTGCGCTGGTCCAGCATCA
 TTACCTTTCATCCAGAAGCCCTCCGAGCATGTTGACCGCACGCTGCAACTGATTAAGAAAAATGGCTGTAAGCGGGTCTGGTATTTAACCCCGGCACACCTCTGA
 GCTATCTGGATTACGTGATGGATAAGCTGGATGTGATCCTGCTGATGCCGTAACCCCTGGTTCCGGCGGTCAGTCTTTCCTCAAACACTGGATAAACTGCGCG
 AAGTACGTCGCGTATCGACGAGTCTGGCTTACATTCGACTAGAAGTGGACGGTGGCGTGAAGGTGAACAACATTGGCGAAATCGTGGCGGGCGCG
 GATATGTTCTGCGCCGTTCCGCAATCTCGACCAGCCAGACTACAAAAAGTCATGATGAAATGCGCAGTGAACCTGGCAAAGGTAAGTCAATAAATTGAA
 GATAATCGCGGCGCGCTTTGATCTTATGATGGTACGCTGGTGCAGATGCTCCTGGTCTGCTGCTGCGGTAGATATGGCGTGTATGCGCTGGAGTTGCCCGTCCG
 AGGTGAAGAACCGGTTATACCTGGATTGTAACGGCGCAGATGTTCTGATGGAGCGCGCATTGACCTGGGCGCGTCAAGAACCTGCGACTCAGCGTAAAAC
 AATGGGTAACCCGCCCCGTTGATGACGACATCCGGCAGAAGAACAGGTACGTATTCTGCGTAAACTGTTGATCGCTACTATGGCGAGGTTGCCGAAGAGGGG
 ACGTTTTGTTCCCGCACGTTGCCGATCGTTGGGCGCGTGCAGGCTAAAGGCCCTGCCCTAGGCCTGGTACCAACAACCCGACGCGCTGCTGCGCGCCG
 CTGCTCGAAGCCTTAGATAATCGCAATACTCAGCGTGGTATTGGTGGTATGATGTGCAAAAACAAAAACCGCAICCGGACCCCGCTGTTACTGGTGGCTGAG
 CGGATGGGAATGCCCCACAACAGATGCTGTTGTCGGCGACTCACGCAATGATATTCAGGCGGCAAAAGCGCGCAGGTTGCCATCAGTTGGCTTAACTACG
 GATATACTACGGCGAGGCTATCGATCTCAGCCAGCCTGATGTAATTTATCAGTCTATAAATGACCTTCTGCCCGCATAGGGCTTCCGCATAGCGAAAAATCAGGA
 ATCGAAAAATGACTAA

Abb. 11: genomische Sequenz des *E. coli* Genoms von den Genen *damX* bis *gph*. Kleinbuchstaben: intergenische Sequenz, Braun: Gen für DamX, Blau: Gen für Dam, Gelb: Gen für Rpe, rosa: Gen für Gph. Rot: Überlappung des 3'-Endes des *rpe*-Gens und des 5'-Beginns des *gph*-Gens, Lila unterlegt: *Primer Screenf5* und *Screenrev2korr*

Zur Identifizierung positiver Klone die die stille Mutation innerhalb des *dam*-MTase Gens in das Genom intergiert haben (Donorplasmid HR Kontrolle) wurden Kolonien zunächst auf eine Kan-Agarplatte und eine LB-Agarplatte ohne AB ausplattiert. Mit den Kolonien, die nicht auf der Kan-Agarplatte gewachsen waren, wurde eine PCR mit den Primern *dam_hin* und *dam_rück* (siehe Tab. 16) durchgeführt und das Produkt mit dem RE BamHI gespalten und agarosegelelektrophoretisch analysiert. Als Negativkontrolle wurde die PCR und der Verdau mit dem Plasmid pET28a *dam* Mutante durchgeführt.

10.4.4 Sicherung von positiven Klonen

Von den positiven Klonen wurde von der Klonsicherungsplatte eine Kolonie in 1 ml LB-Medium in einem 1.5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und kurz gevortext. Zu dieser Zellsuspension wurden 10 µl 20 % sterile Arabinoselösung zugegeben und die Kultur 1 h bei 37°C schüttelnd (1400 min⁻¹) für 60 min inkubiert (Eppendorf Thermomixer 5436). Anschließend wurden von der Kultur verschiedene Verdünnungen in LB-Medium hergestellt, auf LB-Agarplatten ohne AB ausplattiert und bei 37°C ü/N inkubiert. Am folgenden Tag wurden verschiedene Klone von diesen Platten gepickt und nacheinander zuerst auf eine Cam-Agarplatte, dann auf eine LB-Platte ohne AB ausplattiert und wiederum bei 37°C ü/N inkubiert. Von einem Cam-sensitiven Klon wurde anschließend von der LB-Agarplatte ohne AB eine Glycerinkultur abgelegt.

10.5 Lokalisation

10.5.1 Induktion von DamGFP, Dam(APPY)GFP bzw. von EGFP

Transformation von pET28a damGFP, pET28a dam(APPY)GFP bzw. pTriExEGFP

Die Plasmide pET28a damGFP und pET28a dam(APPY)GFP wurden in kompetente Zellen des Stammes Tuner™ pLysS, das Plasmid pTriExEGFP in kompetente Zellen des Stammes Tuner™ pLacI gemäß den Angaben des Herstellers transformiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden AB ausplattiert. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37 °C ü/N inkubiert.

Vorkultur

Am nächsten Tag wurde mit jeweils einem Klon dieser Platte eine 3 ml LB-Vorkultur (VK) mit den entsprechenden AB angeimpft und ü/N bei 37°C inkubiert.

Hauptkultur

Mit 100 µl der VK wurden mehrere 3 ml LB-Hauptkulturen mit den entsprechenden AB angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 0.4 oder 0.7 OD₆₀₀ mit 0-0.25 mM IPTG induziert und für 30 min bis 2 h inkubiert. Teilweise wurde der Zellkultur zum Zeitpunkt der Induktion 1 µg/ml finale Konzentration Aztreonam zugefügt. Für die DAPI-Färbung der lebenden Zellen wurde 10 min vor Ende der Induktion 10 µg/ml finale Konzentration DAPI zu den Zellen gegeben.

10.5.2 Fixierung der Bakterienzellen

Vorbereitung der Zellen:

1.5 ml der induzierten Kultur wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 1 x PBS (10 x PBS: 80 g NaCl, 2.2 g KCl, 9.9 g Na₂HPO₄, 2.0 g K₂HPO₄, pH 7.4) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen und die Zellen darin resuspendiert.

Fixierung:

Fixativ: 4% Paraformaldehyd in 1x PBS

Um die Zellen zu fixieren wurden 200 µl Fixativ zu der Zellsuspension gegeben und das Gemisch für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert. Alternativ wurde die Zellsuspension mit dem Fixativ bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurden die fixierten Zellen 1 min bei 14000rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl 1 x xPBS resuspendiert.

Aufbringen der Zellen

Es wurden 0.5-3 µl der Zellsuspension pro Kammer auf einen 12-Kammer teflonbeschichtete Hybridisierungs Objektträger (OT) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) aufgebracht und bei RT oder auf einem Heizblock bei 37°C eingetrocknet.

Gegenfärbung und Einbettung

Jeweils 1µl eines 1:1 Gemisches aus DAPI (10µg/ml) und DAPCO (25 mg 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)oktan in 1 ml 3x PBS lösen, anschließend 9 ml Glycerin zugeben) wurde auf die eingetrockneten, fixierten Zellen gegeben. Anschließend wurde der Hybridisierungs OT mit einem Deckglas (24 x 60 mm #1, Carl Roth GmbH & Co. KG) bedeckt und 15 min im Dunkeln inkubiert.

10.5.3 Herstellung und Verwendung von agarbeschichteten Objektträgern

Um lebende Zellen mikroskopieren zu können, wurden agarbeschichtete Objektträger nach Pfennig & Wagener, 1985 hergestellt. Dazu wurde der Agar mehrmal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend Reinstwasser auf eine Konzentration von 4% (w/v) gebracht. Anschließend wurde der Agar autoklaviert. Um die Hintergrundfluoreszenz des Agars zu reduzieren wurde die gleiche Menge

einer Sudanschwarzlösung zu dem geschmolzenen Agar gegeben. Die Agarkonzentration betrug 2% (w/v). Für die Sudanschwarzlösung wurden 1 mg Sudanschwarz in 100 ml Ethanol gelöst und mit 100 ml Reinstwasser gemischt, auf 60°C erhitzt und zu dem geschmolzenen Agar gegeben. 2 ml des Agars wurden mit einer Glaspipette in Zick-Zacklinien auf mit Azeton geputzte Objektträger aufgetragen und über Nacht staubfrei getrocknet. Es wurden 15 µl der Hauptkultur (siehe 10.5.1) auf einen agarbeschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) bedeckt. Für die Mikroskopie wurde eine Stelle verwendet, an der sowohl unbewegliche, als auch bewegliche Zellen vorhanden waren, damit man ausschließen kann, dass die unbeweglichen Zellen durch den aufquellenden Agar nicht zerquetscht wurde, was möglicherweise zu einem falschen Ergebnis führen könnte.

Für eine zusätzliche DAPI-Färbung wurde in den letzten 10 min der Induktionszeit DAPI in einer Konzentration von 1, 5 bzw 10 µg/ml zu der Hauptkultur gegeben.

10.5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Beobachtungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) gemacht. Die Fluoreszenz von GFP wurde mit dem Filteratz GFP-L (*excitation filter*: 480/40 nm, *dichromatic mirror*: 505 nm, *barrier filter*: BA 510 nm, Nikon) und die Fluoreszenz von DAPI mit dem Filteratz UV-2A (*excitation filter*: 330-380 nm, *dichromatic mirror*: 400 nm, *barrier filter*: 420 nm, Nikon GmbH), beobachtet. Digitale Aufnahmen mikroskopischer Präparate wurden mit dem DS-5M-L1 *all-in-one* Kamerasystem angefertigt, das eine 5 Megapixel Digitalkamera angeschlossen war (Nikon GmbH).

10.5.5 Auswertung

Für die Auswertung der Lokalisation des DamGFP-Fusionsproteins wurde die Fluoreszenz von 100 Zellen ausgezählt. Dafür wurden zwei Geraden durch die Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie gelegt und alle Zellen, die an diesen Geraden lagen und Fluoreszenz aufwiesen wurden bzgl. ihrer Fluoreszenz ausgewertet. Dabei wurde auch die Zelllänge und die Distanz vom Mittelpunkt des(r) Spots bis zum gegenüberliegenden Ende der Zelle ausgemessen.

Zur Auswertung der Zellen, die zusätzlich mit Aztreonam behandelt wurden, wurde ebenfalls die Zelllänge, die Anzahl der fluoreszenten Spots sowie die Distanz zwischen den Spots ermittelt. Es wurden 20 fädige *E.coli* Zellen ausgewertet.

11 Interaktionspartner der Dam-Methyltransferase aus *E.coli*

11.1 Vivapure epoxy coupling kit (Vivascience AG, Hannover, Deutschland)

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurde zunächst die Dam-MTase wie in 6.1 angegeben aufgereinigt und gegen 200 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.0 mit 150 mM NaCl dialysiert. Anschließend wurde das Protein gemäß den Angaben des Herstellers an die Säule gebunden. Um Interaktionspartner zu finden wurde das Zellpellet einer sechs ml JM 109 *E.coli* Zellkultur in einem ml 10 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7.2 mit 500 mM NaCl resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand wurde auf die Säule, welche die Dam-MTase gebunden hat, gegeben und es wurde gemäß den Angaben des Herstellers weiterverfahren. Die Säule wurde ü/N mit Elutionspuffer bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag eluiert. Das Eluat wurde mittel der Biomax Konzentratoren (siehe 9.1.11) aufkonzentriert oder alternativ mittels TCA gefällt und auf einem SDS-PAGE nach Lämmli mit anschließender Silberfärbung analysiert.

11.2 Pulldown

Hierfür wurde die Dam-MTase zunächst wie in 6.1 beschrieben aufgereinigt und gegen 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8.0 mit 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol dialysiert. Anschließend wurde das Protein an 50 µl Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* (Qiagen, Hildesheim, Deutschland) ü/N gebunden und weiterbehandelt gemäß den Angaben des Herstellers. Das Pellet aus sechs ml des *E.coli* Stammes JM110 wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand zu den Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* gemäß den Angaben des Herstellers gegeben und weiterbehandelt. Das Eluat wurde mittels TCA gefällt und auf einem SDS-PAGE nach Lämmli mit anschließender Silberfärbung analysiert. Alternativ wurde das Zelllysats mit der Dam-MTase gemischt und mittels UV-Licht (254 nm für 30 min) bzw. Glutaraldehyd (0.1%) *crosslinks* zwischen den Interaktionspartnern eingeführt und anschließend mit Hilfe

der Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* aufgereinigt und anschließend analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe der Dam-MTase.

11.3 Herstellung des JM109 Ganzzelllysates für die *far western* Analyse

11.3.1 Anzucht der Zellen

Zunächst wurden 50 ml LB-Medium ohne AB mit Zellen aus einer JM 109 (siehe 2.1.3) Glycerinkultur inokuliert und ü/N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium ohne AB mit 10 ml der ü/N-Kultur inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-0.7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4200 rpm, 4°C 15 min zentrifugiert, das Pellet mit 1 x STE (siehe 6.1.1) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde bei -20°C bis zu weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

11.3.2 Aufschluß der Zellen und Gewinnen der löslichen Fraktion

Das Pellet aus 11.3.1 wurde in 20 ml 1 x STE resuspendiert und mittels Ultraschall 5 min auf Eis aufgeschlossen (zur Vorgehensweise und den Einstellungen siehe 6.1.3). Um nach dem Aufbruch der Zellen die entstandenen Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen zu entfernen wurde die Probe 45 min bei 20 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman J2-HS, Rotor JA-20). Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Vor der Fällung der Proteine wurde mittels Bradford die Gesamtproteinmenge bestimmt (siehe 6.1.6.2).

11.3.3 Fällung der Proteine

11.3.3.1 TCA-Fällung für 1D-Gelelektrophorese

Für die 1D-Gelelektrophorese wurde eine HK von 50 ml geerntet, gewaschen und aufgeschlossen. Zur Vorgehensweise siehe 11.3.1 und 11.3.2. Zu dem ÜS mit den löslichen Proteinen wurde dann 1/10 des Volumens des ÜS 100 % TCA zugegeben und 30 min bei 14000 rpm bei 4 °C (Zentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert. Zu der Suspension wurde soviel 2M Tris-Puffer (ungepuffert) gegeben, bis ein Farbumschlag nach Blau erfolgte.

11.3.3.2 TCA-Fällung für 2D-Gelelektrophorese

Es wurde die Menge an μl vom ÜS (11.3.2) abgenommen die einer Gesamtproteinmenge von 250-300 μg entspricht und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 nM Serratia Nuclease (freundlicherweise von Dr. Gregor Meiss zur Verfügung gestellt) und 5 mM MgCl_2 für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1 Volumen 10 % TCA versetzt, 10 min bei RT inkubiert und dann 15 min bei 1300 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 10 % TCA gewaschen und erneut zentrifugiert. Der dritte Waschgang erfolgte mit 1 ml eiskaltem Azeton. Anschließend wurde das Pellet in der SpeedVac getrocknet.

11.3.3.3 Ammoniumsulfatfällung für 1D-Gelelektrophorese

Gelöste Proteine wurden in ein Becherglas auf Eis gegeben und dann schrittweise mit Ammoniumsulfat, welches mittels Mörser und Pistill fein gemahlen wurde, zu 100 % Sättigung unter Rühren versetzt. Die Suspension wurde ü/N bei 4°C gerührt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 3 ml 1 x PBS (siehe 10.5.2) resuspendiert und ü/N bei 4°C gegen 1 x PBS dialysiert. 1.5 ml des Dialysats wurden mit 400 μl Lämmli-Auftragspuffer versetzt.

11.4 Gelelektrophorese

11.4.1 1D-Gelelektrophorese

Die 1D-Gelelektrophorese erfolgte wie in 7.2 beschrieben. Verwendet wurden 200-300 μg der gefällten Proteine aus Punkt 11.3.3.

11.4.2 2D-Gelelektrophorese

Das getrocknete Pellet aus Punkt 11.3.3.2 wurde mit 300 μl Rehydrierungspuffer (8M Harnstoff, 2 % Triton-X-100, 50 mM DTT, 100 μl einer 1 %igen Bromphenolblaulösung/10 ml herzustellenden Rehydrierungspuffer) versetzt, resuspendiert und in eine Rehydrierungskassette gegeben. Die Schutzfolie des IPG (immobilisierter pH Gradient)-*Strips* (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurde mit zwei Pinzetten entfernt und der *Strip* mit der Gelseite nach unten in den Rehydrierungspuffer mit den resuspendierten Proteinen gelegt. Es sollten dabei keine Luftblasen unter dem *Strip*

sein. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde der *Strip* mit 3 ml Mineralöl bedeckt und über Nacht bei RT inkubiert. Das Mineralöl sollte den *Strip* vor Austrocknung schützen. Die Proteine ziehen dabei in das Gel des IPG-*Strips* ein. Für die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung (IEF), wurde jeweils ein kleines Stück Whatmanpapier auf die Elektroden der IEF-Laufkammer gegeben und befeuchtet. Anschließend wurde der IPG-*Strip* mit den Proteinen nach entfernen des überschüssigen Öls in die Laufkammer gelegt und wiederum mit frischem Mineralöl überschichtet. Anschließend wurde die IEF durchgeführt bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Die Bedingungen waren wie folgt: 20 min 250V, 3.5 h 8000V, 50000Vh 8000V und anschließend bei 500 V bis zur Beendigung der IEF. Der *Strip* konnte anschließend bei -20°C gelagert werden. Für die 2. Dimension wurde ein 12.5%-Polyacrylamidtrenngel mit einem 5% Sammelgel gegossen. Der IPG-*Strip* wurde dann in Equilibrierungspuffer mit DTT (6 M Harnstoff, 0.375 M Tris/HCl pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) DTT) für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der *Strip* für weitere 15 min bei RT in in Equilibrierungspuffer mit Iodacetamid (6 M Harnstoff, 0.375 M Tris/HCl pH 8.8, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 2.5% (w/v) Iodacetamid) equilibriert. Anschließend wurde mit 2 x Lämmllilaufpuffer überschüssiger Equilibrierungspuffer gewegewaschen und der *Strip* auf das Sammelgel gelegt. Dabei sollten keine Luftblasen zwischen dem Gel und dem IPG-*Strip* vorhanden sein. Der Proteinstandard wurde auf ein kleines Stück Whatmanpapier aufgetragen und neben dem IPG-*Strip* platziert. Anschließend wurde der Strip und das Whatmanpapier mit dem Proteinmarker mit 1% (w/v) *Low-Melting Point* Agarose eingegossen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 2 x Lämmllilaufpuffer für 16h bei 9mA/Gel (siehe 7.2).

11.5 *far western* (angelegt an das Protokoll aus „Current Protocols in Protein Science Vol.3“)

Für den *far western* wurden die Proteine aus dem Gel mit Hilfe des Semi-Dry Western Blots (siehe 8) auf Nitrocellulose Membranen (GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire, UK) transferiert. Die Membran mit den *E.coli* JM 109 Gesamtproteinen wurde 2h in Blockingpuffer I (0.1 % (w/v) Tween-20 in 2 x PBS) bei RT, anschließend ü/N bei 4°C in Blockingpuffer II (5 % Magermilchpulver (AppliChem GmbH), 2x PBS) inkubiert. Anschließend wurde der Blot kurz mit 2x PBS gewaschen, mit 200 ml Interaktionspuffer (Blockingpuffer II mit 20 mM Imidazol) versetzt und 15 min bei RT schüttelnd inkubiert.

Anschließend wurde 25 µg/ml Dam-Methyltransferase oder R.EcoRV in Interaktionspuffer zu der Membran gegeben und die Membran 6h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran kurz mit 2x PBS gewaschen, mit UV-Licht crosslinks (2 x Autocrosslink Programm, Stratalinker, Stratagene Europe) eingeführt und wieder mit 2 x PBS gewaschen. Anschließend wurde ein Western Blot mit anti-His AK (siehe 8) durchgeführt. Die Blots wurden mit einem Scanner digitalisiert und die digitalen bilder in dem Programm Adobe Photoshop 7.0 zur Auswertung übereinander gelegt.

Als Kontrolle wurden einige Blots nur mit dem zweiten AK inkubiert bzw. nicht mit der Dam-Methyltransferase bzw. R.EcoRV versetzt. Um zu kontrollieren, ob der Western Blot funktioniert hat wurde auf einige Blots nach dem Crosslink 25 µg/ml Dam-Methyltransferase bzw. R.EcoRV in einer Ecke aufgetragen.

11.6 Optimierung der Pufferbedingungen

Es wurden die in Tab. 18 aufgelisteten Puffer und Bedingungen ausgetestet.

Tab. 18: Optimierungsbedingungen für die *far western* Analyse

Ansatz	Proteinkonzentration [µg/ml]	Blockingpuffer I		Blockingpuffer II			Interaktionspuffer			Waschpuffer	Membran
		Tween-20 [v/v]	sonstiges	Magermilchpulver [w/v]	Diätdrink [w/v]	sonstiges	Magermilch Pulver [w/v]	Diätdrink [w/v]	sonstiges		
1	10, 15, 20, 25, 30, 35, 40	0.05%	1 x PBS	1%		1 x PBS	0.4 %		1 x PBS	1 x PBS	Nitrocellulose PVDF
2	25	0.1 %	1 x, 2 x, 3 x PBS	2%		1 x, 2 x, 3 x PBS	2 %		1, 2, 3 x PBS	1, 2, 3 x PBS	Nitrocellulose
3	25	0.1 %	1 x, 2 x, 3 x PBS	2%		1 x, 2 x, 3 x PBS	2%		2, 3, 4 x PBST	2, 3, 4 x PBST	Nitrocellulose
4	25	1 %	1 x PBS	5 %		1 x PBS	5 %		0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 x PBS	0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 x PBS	Nitrocellulose
5	25				4 % Mutaben	1 x PBS		1 % Mutaben	1 x PBS	1 x PBS	Nitrocellulose
6	25				1, 2, 4 % Megaslim	1 x TBST		1, 2, 4 % Megaslim	1 x TBST	1 x TBST	Nitrocellulose
7	25			5 %		1 x TBST	5 %		1 x TBST	1 x TBST	Nitrocellulose
8	25	0.1 %	2 x PBS	5 %		2 x PBS	5 %		2 x PBS, 20 mM Imidazol	2 x PBS	Nitrocellulose

11.7 Identifikation der Interaktionspartner

11.7.1 Zuordnung der Spots

Um die Interaktionspartner identifiziert durch *far western* auf der Membran identifizieren zu können wurden drei *far western* Experimente und ein silbergefärbtes 2D-Gel in dem Programm Photoshop übereinandergelegt und die Interaktionspartner auf dem Silbergefärbten 2D-Gel markiert.

11.7.2 Sypro-Orange Färbung und Identifizierung durch die Fa. Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)

Um die Interaktionspartner zu identifizieren wurde eine 2D-Gelelektrophorese wie in 11.4.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Sypro-Orange (siehe 7.3.4) gefärbt, die Proteinspots mit einem sterilem Skalpell ausgeschnitten, in sterilen 1.5 ml-Reaktionsgefäßen mit 50 µl sterilem Reinstwasser bedeckt und zu Bruker Daltonik GmbH zur Durchführung der MALDI-TOF MS Analyse geschickt.

11.7.3 Färbung mit Kolloidaler Coomassielösung, tryptischer Verdau und Identifikation durch Dipl.-Biol. Robert Ahrends (Humboldt-Universität zu Berlin)

Als Parallelansatz wurde ein weiteres 2D-Gel (siehe 11.4.2) mit Kolloidaler Coomassielösung von MBI Fermentas GmbH nach den Angaben des Herstellers gefärbt und die Spots mit einem sterilem Skalpell ausgeschnitten, in 1 mm Würfel geschnitten und in sterile 1.5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der folgende in Gel Tryptischer Vedau wurde nach einem Protokoll von David Miyamoto angelehnt an ein Protokoll von Shevchenko et al (1996) durchgeführt. Dafür wurden die Gelstücke zunächst ü/N bei RT mit 100 mM NH_4CO_3 gewaschen. Am nächsten Morgen wurde der ÜS abgenommen und 25-30 µl Acetonitril zugegeben und die Gelstücke für 10 min bei RT darin inkubiert. Dann wurde der ÜS abgenommen und die Gelstücke mittels der SpeedVac getrocknet. Zu den getrockneten Gelstücken wurden 150 µl 10 mM DTT in 100 mM NH_4CO_3 gegeben und 1 h bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit den Gelstückchen auf RT abgekühlt und der ÜS abgenommen und 150 µl 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH_4CO_3 zugegeben und 45 min bei RT im Dunkeln mit gelegentlichem vortexen inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke

mit 150 µl 100 mM NH_4CO_3 versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Der ÜS wurde abgenommen und 150 µl Acetonitril zugegeben und wieder 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals mit 100 mM NH_4CO_3 und Acetonitril gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet. Danach wurden die Gelstücke in 25-30 µl Verdauerpuffer (12.5 ng/µl Trypsin in 50 mM NH_4CO_3) im Eisbad 45 min inkubiert. Anschließend wurde der Trypsinhaltige Puffer entfernt und die Gelstücke mit 10 µl 50 mM NH_4CO_3 ü/N bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gelstücke bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert (Zentrifuge) und der ÜS in einem sterilen 0.2 ml-Reaktionsgefäß aufbewahrt. 20 µl 20 mM NH_4CO_3 wurden zu den Gelstücken gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Der ÜS wurde zu dem vorherigen ÜS in das 0.2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 25 µl 5 % (v/v) Ameisensäure, 50 % (v/v) Acetonitril zu den Gelstücken gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der ÜS zu den anderen ÜS in das 0.2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion mit 5 % (v/v) Ameisensäure, 50 % (v/v) Acetonitril wurde noch zweimal wiederholt. Die ÜS in dem 0.2 ml-Reaktionsgefäß wurden in der SpeedVac vollständig eingetrocknet und zu Robert Ahrends am Chemischen Institut an der Humboldt-Universität zu Berlin geschickt, welcher die Identifizierung durchführte.

11.8. Biochemische Untersuchungen

11.8.1 Klonieren der Interaktionspartner

Die Proteine, die als Interaktionspartner durch die *far western* Analyse identifiziert wurden (siehe 11.1-11.7) oder die durch theoretische Überlegungen als Interaktionspartner in Frage kommen konnten (Proteine der Replikationsmaschienerie und der MMR, wurden in den Vektor pGEX-6P-2 (siehe 2.2.9) kloniert. Für die Herstellung der *Primer* zur Amplifikation dieser Gene wurde die Sequenz dieser Gene auf der EcoGene Homepage (<http://ecogene.org/>) gesucht und die *Primer* für die Amplifikation des Gens *designed*.

Amplifikation der Gene der Interaktionspartner:

Dazu wurden Zellen einer *E.coli* K12 Kolonie in ein 0.2 ml-PCR-Reaktionsgefäß gegeben und 30 µl steriles Reinstwasser zugegeben. Diese Zellsuspension wurde 5 min

bei 95 °C inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden jeweils 2 µl in eine 20 µl PCR als *template* eingesetzt. Für die Amplifikation des *dnaN*-, *holA*-, *ligA*-, *ligB*-, *polA*-, *dnaE*-, *dnaX*-, *mutS*-, *holC*-, *deoB*-, *pykF*-, *glyA*-, *eno*-, *tufA*-, *atpA*-, *gatY*-, *udp*-, *galE*-, *dnaQ*-, *holE*-, *holD*-, *holB*- und *mutH*-Genes wurde die Pfu-Polymerase, die in Tab. 19 angegebenen *Primer* und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 94°C, 25 x (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die Amplifikation des *pgk*- und *fbaA* Gens erfolgte mit den in Tab. 19 angegebenen *Primern* mit Hilfe des FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit der Fa. Epicentre Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA) unter Zuhilfenahme der Premixe C und E nach den Angaben des Herstellers.

Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (siehe 7.1) analysiert und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt. Die gereinigten PCR Produkte der Gene *pykF*, *glyA*, *eno*, *tufA*, *gatY*, *udp*, *gltA*, *mutS*, *mutH*, *dnaX*, *polA*, *dnaN*, *fbaA*, *pgk*, *deoB*, *dnaE*, *galE*, *ligA*, *ligB*, *holE*, *holD*, *holC*, *holB* wurden mit den RE BamHI und Sall der Fa. MBI Fermentas GmbH, die PCR Produkte der Gene *atpA* und *holA* wurden mit den RE BamHI und NotI der Fa. MBI Fermentas GmbH und das PCR Produkt des Gens *dnaQ* wurde mit den RE SmaI und NotI der Fa. MBI Fermentas GmbH gemäß den Angaben des Herstellers verdaut und anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt.

Tab. 19: *Primer* für die Amplifikation der Gene der Interaktionspartner. Die Schnittstelle für die RE sind fett gedruckt.

<i>Primer</i>	RE	Sequenz
pykFf	BamHI	5`- tac ggg atc caa aaa gac caa aat tgt ttg -3`
pykFr	Sall	5`- agt cgt cga ctt aca gga cgt gaa cag atg -3`
glyAf	BamHI	5`-tca ggg atc ctt aaa gcg tga aat gaa cat tgc c -3`
glyAr	Sall	5`-atg cgt cga ctt atg cgt aaa ccg ggt aac gtg cg -3`
enof	BamHI	5`-tca ggg atc ctc caa aat cgt aaa aat ca -3`
enor	Sall	5`-atg cgt cga ctt atg cct ggc ctt tga tc -3`
tufAf	BamHI	5`-tca ggg atc ctc taa aga aaa att tga acg -3`
tufAr	Sall	5`-agt cgt cga ctt agc cca gaa ctt tag caa -3`
atpAf	BamHI	5`-tca ggg atc cca act gaa ttc cac cg -3`
atpAr	NotI	5`-agt cgc ggc cgc tta cca gga ttg ggt tgc -3`

gatYf	BamHI	5`-tca ggg atc cta cgt ggt atc gac aa -3`
gatYr	Sall	5`-agt cgt cga ctt atg ccc tgc cct cg -3`
udpf	BamHI	5`-tca ggg atc ctc caa gtc tga tgt -3`
udpr	Sall	5`-agt cgt cga ctt aca gca gac gac gcg c-3`
fbaAf	BamHI	5`-tca ggg atc ctc taa gat ttt tg -3`
fbaAr	Sall	5`-agt cgt cga ctt aca gaa cgt cga tgc c -3`
pgkf	BamHI	5`-tca ggg atc ctc tgt aat taa gat g -3`
pgkr	Sall	5`-agt cgt cga ctt act tct tag cgc gct ctt c -3`
deoBf	BamHI	5`-tca ggg atc caa acg tgc att tat tat gg -3`
deoBr	Sall	5`-agt cgt cga ctc aga aca tgg ctt tg -3`
galEf	BamHI	5`-tca ggg atc cag agt tct ggt tac c -3`g
galEr	Sall	5`-agt cgt cga ctt aat cgg gat atc cc -3`
ligAf	BamHI	5`-tca ggg atc cga atc aat cga aca ac -3`
ligAr	Sall	5`-aca ggg cga ctc agc tac cca gca a -3`
ligBf	BamHI	5`-tca ggg atc caa agt atg gat ggc g -3`
ligBr	Sall	5`-agt cgt cga cct aag gtt caa aac ct -3`
polAf	BamHI	5`-tga cgg atc cgt tca gat ccc cc -3`
polAr	Sall	5`-agt cgt cga ctt agt gcg cct gat c -3`
dnaNf	BamHI	5`-tca ggg atc caa att tac cgt aga acg -3`
dnaNr	Sall	5`-agt cgt cga ctt aca gtc tca ttg gca -3`
dnaEf	BamHI	5`-tca ggg atc ctc tga acc acg ttt cgt aca cc -3`
dnaEr	Sall	5`-agt cgt cga ctt agt caa act cca gtt cc -3`
dnaQf	SmaI	5`-tca gcc cgg gag cac tgc aat tac acg cc -3`
dnaQr	NotI	5`-agt cgc ggc cgc tta tgc tgc cca gag gc -3`
dnaXf	BamHI	5`-tca ggg atc cag tta tca ggt ctt agc -3`
dnaXr	Sall	5`-agt cgt cga ctc aaa tgg ggc gga tac -3`
holEf	BamHI	5`-tca ggg atc cct gaa gaa tct ggc t -3`
holEr	Sall	5`-agt cgt cga ctt att taa gtt tgg -3`
holDf	BamHI	5`-tca ggg atc cac atc ccg acg aga c -3`
holDr	Sall	5`-atg tgt cga ctc agt cgt ttc gag gg -3`
holCf	BamHI	5`-tca ggg atc caa aaa cgc gac gtt cta cc -3`
holCr	Sall	5`-agt agt cga ctt att tcc agg ttg ccg -3`
holBf	BamHI	5`-tca ggg atc cag atg gta tcc atg g -3`
holBr	Sall	5`-agt cgt cga ctt aaa gat gag gaa ccg g -3`

holAf	BamHI	5`-tca ggg atc cat tcg gtt gta ccc -3`
holAr	NotI	5`-agt cgc ggc cgc tca acc gtc gat aa -3`
mutSf	BamHI	5`-tca ggg atc cag tgc aat aga aaa ttt cg -3`
mutSr	Sall	5`-agtc gtc gac tta cac cag gct ctt caa gcg -3`
mutHf	BamHI	5`-taa tgg atc ctc cca acc tcg ccc act gc -3`
mutHr	Sall	5`-agt cgt cga cct act gga tca gaa aat gac g -3`

Restriktionsverdau und Behandlung des Vektors pGEX-6P-2 mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP):

Der Restriktionsverdau des Plasmides erfolgte mit den RE BamHI und Sall bzw. BamHI und NotI bzw. SmaI und NotI der Fa. MBI Fermentas GmbH gemäß den Angaben des Herstellers. Der verdaute Vektor wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die anschließende Behandlung des verdauten und gereinigten Vektors erfolgte mit der SAP der Fa. USB Co. nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der behandelte Vektor mit dem NucleoSpin® Extract II Kit aufgereinigt.

Ligation:

Die Ligation des Vektors und des PCR Produktes erfolgte mit der T4 Ligase der Fa. Promega GmbH nach den Angaben des Herstellers ü/N bei RT.

Anschließend wurde die DNA im Ligationsansatz mit Ethanol (EtOH) präzipitiert. Dazu wurde das vierfache Volumen an 100 % EtOH zu dem Ansatz dazugegeben, der Ansatz 30 min bei RT inkubiert und dann 30 min bei 9000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % EtOH versetzt und erneut 30 min bei 9000 g zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl Reinstwasser aufgelöst und die DNA in elektrokompente XL1-Blue MRF`-Zellen transformiert.

Detektion positiver Klone:

Um Klone zu finden, die das jeweilige amplifizierte Gen der Interaktionspartner tragen, wurden jeweils vier Klone von der Agarplatte gepickt und einerseits direkt in

ein PCR-Gefäß geschmiert und andererseits eine 3 ml Kultur mit entsprechenden AB damit inokuliert und bei 37°C ü/N inkubiert. Von den jeweils vier Klonen mit den in Tab. 19 angegebenen *Primern* eine PCR durchgeführt. Es wurde die Pfu-Polymerase und folgendes Temperaturprofil verwendet: 1 x 5 min bei 95°C, 25 x (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 55°C; 1 min bei 75°C), 1 x 10 min bei 75°C. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Die PCR Produkte wurden anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert. Von den Klonen die sich in der PCR als positiv erwiesen haben wurde von den ü/N-Kulturen das Plasmid mit einer Minipräparation isoliert und eine Testspaltung mit den jeweiligen RE (s.o.) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Spaltprodukte wurden anschließend agarosegelelektrophoretisch analysiert.

Sequenzierung:

Um die Korrektheit der Klone weiter zu überprüfen wurden sie sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) nach den Angaben der Firma. Es wurden *Extended Hot Shot* bzw. *Hot Shot* Sequenzierungen durchgeführt. Die untersuchten Klone wurden jeweils zwei mal sequenziert, einmal mit dem jeweiligen Vorwärts *Primer* für das zu überprüfende Gen, das andere mal mit dem jeweiligen Rückwärts *Primer* für das zu untersuchende Gen (siehe Tab. 19). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm GeneDoc mit den Grundeinstellungen (Nicholas et al, 1997) analysiert.

11.8.2 Aufreinigung der Interaktionspartner

Die Aufreinigung der Proteine mit *GST-Tag* erfolgte wie unter 6.3 angegeben.

11.8.3 Interaktionsassay

Um die Interaktion biochemisch zu verifizieren wurden zu 10 µl Glutathion-Sepharose™4B (Amersham Biosciences Europe GmbH) in 200 µl Interaktionspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8.0) jeweils 25 pmol Interaktionspartner mit *GST-Tag* (siehe 11.8.1) gegeben, kurz gevortext und für 1 h bei 4°C schüttelnd (IKA Minischüttler, Staufen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 1000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und der

ÜS verworfen. Die Glutathion-Sepharose wurde drei Mal mit Interaktionspuffer gewaschen. Dazu wurde die Glutathion-Sepharose mit 200 µl Interaktionspuffer versetzt und 5 min schüttelnd bei 4 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 1000 rpm anzentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Interaktionspuffer zugegeben und 25 pmol des Proteins Dam Mutante (siehe 6.1 und 9.2) zugegeben, kurz gevortext und wiederum für 1 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose wie oben beschrieben drei Mal gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 10 µl Lämmli-Auftragspuffer (siehe 7.2) zu der Glutathion-Sepahrose gegeben und die Proben 5 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben mittels des SDS-PAGE nach Lämmli (7.2) getrennt und ein Western-Blot mit anti-His AK als erstem AK durchgeführt (siehe 8). Als Kontrollen wurden sowohl Proben von den GST-Proteinen nach der Bindung an die Glutathion-Sepahrose, als auch Proben, in denen die Dam-Mtase mit der Glutathion-Sepharose ohne vorherige Bindung der GST-Proteine inkubiert wurde, mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot mit anti-His AK als erstem AK untersucht. Außerdem wurde der *GST-Tag* alleine als Interaktionspartner verwendet. Zudem wurden als Ladekontrollen immer 25 pmol der dam-MTase auf das Gel mitaufgetragen.

C Ergebnisse

1 Strukturanalysen der Dam-MTase aus *E.coli*

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Doktorarbeit war keine 3D-Proteinstruktur eines Mitglieds der Dam-Methyltransferase Familie bekannt. Somit standen für mechanistische Untersuchungen nur Modelle basierend auf gelösten Strukturen anderer Methyltransferasen zur Verfügung. Um eine genauere Kenntnis über das Erkennen der DNA-Zielsequenz, die Bindung des Kofaktors SAM und den Mechanismus des Methylgruppentransfer in dieser Familie zu erlangen, sollte die Struktur der Dam-Methyltransferase gelöst werden. Es wurde bereits versucht, die Dam-Methyltransferase zu kristallisieren (Doktorarbeit C. Beck, 2002). Da diese Versuche zu diesem Zeitpunkt nicht erfolgreich waren, wurde in dieser Arbeit versucht, die Proteinstruktur über NMR-Spektroskopie zu lösen. Vorteil dieser Methode ist, dass das Protein in Lösung untersucht wird und dass man, wenn einmal die Messbedingungen optimiert sind, verschiedene Zusätze, wie z.B. DNA zugegeben werden können ohne erneute Optimierung oder Kristallisierung. Nachteil ist, dass zu dem Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit die Messgrenze für Proteine bei 30-40 kDa lag. Die Struktur größerer Proteine konnte mit NMR noch nicht untersucht werden. Da die Dam-MTase ein Molekulargewicht von 32 kDa hat, liegt sie somit an der Messgrenze. Außerdem muss das zu messende Protein sehr rein sein, in hoher Konzentration vorliegen und das Mindestprobenvolumen betrug 300 µl. Die zu messende Proteinlösung sollte zudem möglichst frei von anderen organischen Substanzen sein, da diese ebenfalls ein NMR Signal geben würden und somit die Messung der Signale des Proteins stören bzw. überlagern würden. Unter all diesen Bedingungen sollte natürlich das Protein bei der zu messenden Temperatur stabil sein. Die NMR-Spektroskopie beruht auf einem Phänomen, das beobachtet wird, wenn man Atomkerne die einen Spin besitzen in einem statischen Magnetfeld platziert und sie einem zweiten oszillierendem Magnetfeld aussetzt. Nicht alle Atomkerne besitzen einen Spin. Die wichtigsten sind ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N und ^{15}N . Werden die Atomkerne nun dem oszillierendem Magnetfeld ausgesetzt, nehmen sie elektromagnetische Energie der geeigneten Frequenz auf und der Kernspin wird umgedreht. Diese Änderung der Orientierung des Kernspins verursacht das NMR-

Signal und die Energiedifferenz zwischen diesen zwei Orientierungen ist der Stärke des angelegten Magnetfeldes proportional. Information über die Struktur der zu untersuchenden Substanz bekommt man durch einen Effekt den man chemische Verschiebung nennt. Dieser kommt dadurch zustande, dass Atomkerne in unterschiedlichen Umgebungen Energie bei geringfügig verschiedenen Resonanzfrequenzen absorbieren. Dadurch entsteht eine Verschiebung des NMR-Signals bezogen auf eine Vergleichssubstanz, welche in ppm (parts per million) gemessen wird. Es gibt verschiedene NMR-Messungen. Bei der 2D-NOESY Messung werden Protonenpaare identifiziert, die weniger als 0.5 nm auseinander stehen. Ein 2D-NOESYSpektrum stellt damit eng benachbarte Protonenpaare dar. Für eine HSQC-Messung ist die Markierung des Proteins mit ^{15}N notwendig. Bei der Messung wird dann das Signal des ^{15}N Stickstoffatoms einer NH-Gruppe korreliert mit dem direkt daran gebundenen Proton. So repräsentiert jedes Signal in einem HSQC-Spektrum ein Proton, das an ein Stickstoffatom gebunden ist. Somit sollte jede AS außer Prolin ein Signal in dieser Messung geben.

1.1 Optimierung der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Dam-MTase

Wie oben beschrieben, sollte die Struktur der Dam-MTase mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht werden. Dazu war eine Mindestkonzentration von 300 μM löslichen Proteins nötig. Zusätzlich war ein Probenvolumen von mindestens 300 μl notwendig. Die Probe sollte möglichst frei von anderen Proteinen oder Abbauprodukten oder anderen organischen Substanzen sein, die die Messung stören könnten. Ziel war es die Affinitätschromatographie so zu optimieren, dass diese Bedingungen erfüllt wurden.

Zu Beginn der Optimierungsarbeit konnte die Dam-MTase mit einer Konzentration von bis zu 400 μM aufgereinigt werden (B 9.1.1), allerdings nur unter Verwendung von hohen Glycerinkonzentrationen. Das Protein war ausgefallen und die Versuche das Protein wieder in Lösung zu bekommen schlugen fehl (B 9.1.2).

Um die Glycerinkonzentration der zu messenden Probe zu verringern, wurde wie unter B 9.1.3 beschrieben das Protein nicht mehr gegen hohe Konzentrationen an Glycerin dialysiert. Um das Protein zusätzlich zu stabilisieren wurde allen Puffern der Kofaktor SAM zugesetzt und die Salzkonzentration und der pH-Wert im Dialysepuffer I

herauf gesetzt. Um auf die nötige Proteinkonzentration zu kommen wurden bis zu 2.6 L Bakterienkultur für die Aufreinigung verwendet und das Protein anschließend mit Ultrfree®-MC Centrifugal Filter Units aufkonzentriert. Das erhaltene Protein war stabil, die Proteinkonzentration betrug 400 μM in einem Volumen von 400 μl . Mit dieser Probe wurde eine 2D-NOESY Messung durchgeführt (siehe 1.3).

Da HEPES, EDTA, DTT und Glycerin die NMR-Messung störten (siehe 1.3), wurde wie in B 9.1.4 beschrieben in allen Puffern HEPES durch Na-Phosphatpuffer ersetzt. Außerdem wurden im Dialysepuffer zusätzlich EDTA und DTT weggelassen. In dem Aufschluß- und Elutionspuffer wurde die NaCl-, Glycerin und Na-Phosphatpufferkonzentration variiert. Dabei zeigte sich, dass in diesen Puffern eine Salzkonzentration von 500 mM NaCl, eine Glycerinkonzentration von 10 % (v/v) und eine Na-Phosphatpufferkonzentration von 200 mM für die Aufreinigung von löslichem Protein nötig waren. Bei der Zusammensetzung des Dialysepuffers wurden die Parameter pH-Wert, Salzkonzentration, Glycerinkonzentration, Zugabe von Mg^{2+} , Na-Phosphatpufferkonzentration und SAM-Konzentration variiert. Es zeigte sich dass eine Na-Phosphatpufferkonzentration von 300 mM, ein pH-Wert von 6 und eine SAM-Konzentration von 100 mM im Dialysepuffer zusammen mit den optimierten Aufschluß- und Elutionspuffern zu der Aufreinigung eines stabilen Proteins in einer Konzentration von 200 μM führte (B 9.1.4-9.1.8). Diese Probe wurde für die zweite 2D-NOESY Messung verwendet (siehe 1.3).

Um das Protein weiter zu stabilisieren wurde die 1.5-fache Menge an Ziel-DNA im Verhältnis zum Protein zu dem Protein vor bzw. nach der Dialyse zugegeben. Die Ziel-DNA ist 14 bp lang und trägt eine GATC Erkennungssequenz. Eine Zugabe vor der Dialyse stabilisierte das Protein. Eine Zugabe nach der Dialyse führte hingegen zur Aggregation des Proteins. Es wurde eine dritte 2D-NOESY Messung durchgeführt (siehe 1.3).

Da die Proteinkonzentration mit 200 μM noch zu gering war sollte mit Hilfe eines Durchflußphotometers durch exaktes Aufnehmen des Proteins die Konzentration erhöht werden. Da dies nicht zum Erfolg führte wurde die Elutionsmethode geändert und andere Konzentratoren (Concentrator UFV 5BCC25 Ultrafree – 0.5 Centrifugal Filter Tub; Biomax 5K NMWL Membran 0.5 vol) Konzentratoren verwendet. Damit konnte die Proteinkonzentrationen auf 350 μM in einem Volumen von 300 μl erreicht

werden. Das Protein blieb nach der Dialyse und bei einer Lagerung über Nacht bei 4°C stabil.

Durch die Zugabe der Ziel-DNA vor der Dialyse konnte die Na-Phosphatpufferkonzentration auf 30 mM gesenkt werden. Für die letzte 2D-NOESY Messung wurde eine Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration 300 µM in einem Volumen von 300 µl mit der 1.5-fachen Menge an Ziel-DNA und einem Puffer aus 30 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 und 100 µM SAM verwendet (siehe 1.3).

1.2 ¹⁵N-Markierung der Dam-MTase

Um eine ¹⁵N-HSQC NMR-Messung durchführen zu können, mussten die Stickstoffatome der Dam-MTase ¹⁵N-markiert werden. Dazu wurden die Medien ECO und OD2 der Fa. Silantes GmbH getestet. Zunächst wurden unmarkierte Medien, d.h. Medien ohne ¹⁵N-markierte Substrate verwendet, um die Expression der Dam-MTase in diesen Medien zu testen. Bei der Aufnahme der Wachstumskurven von Bakterienkulturen in den Medien ECO, OD2 und LB zeigten sich keine Unterschiede. Der Vergleich der Proben vor und nach Induktion zeigte, dass die Dam-MTase in den Medien OD2 und LB expremiert wurde, nicht aber im Medium ECO. Die Dam-MTase wurde aus Kulturen, die auf dem OD2 Medium angezogen wurden, aufgereinigt. Es wurde dabei eine Dam-MTase Konzentration erreicht, die mit einer Aufreinigung aus Zellen, die auf LB-Medium angezogen wurden, übereinstimmte. Deswegen wurden für die ¹⁵N-Markierung der Dam-MTase die Bakterien in ¹⁵N- markiertem OD2 Medium angezogen und die Dam-MTase wie in B 9.4 beschrieben aufgereinigt Die gemessene Konzentration der ¹⁵N-markierten Dam-MTase betrug 143 µM. Zu dieser Probe wurde 1.5-fach Ziel-DNA zugegeben, gegen 30 mM Na-Phosphatpuffer pH 5.8 und 100 µM SAM dialysiert und anschließend mittels SDS PAGE analysiert. Die Probe wurde ü/N bei 4°C aufbewahrt. Das Protein war am nächsten Tag nicht ausgefallen und wurde zur ¹⁵N-HSQC Messung verwendet.

1.3 Mutagenese des *dam*-MTase Gens

Zwischen dem N-Terminalen *His-Tag* und dem Start des *dam*-MTase Gens befindet sich ein *linker* aus 11 Aminosäuren. Dieser *linker* könnte die Aufreinigung des Proteins stören, z.B. dadurch, dass die Proteine darüber stärker zur Aggregation neigen. Deswegen wurde dieser *linker* durch PCR-Mutagenese von 11 AS auf zwei AS verkürzt. Wie in B 9.2 beschrieben, wurden durch den Vorwärtsprimer die Codons für die neun zu entfernenden AS und eine NdeI Schnittstelle entfernt. Der Erfolg der Mutation wurde durch einen Verdau mit NdeI und HindIII bestätigt. Da sich bei dem pET28a *dam* WT Plasmid sowohl eine HindIII- als auch eine NdeI-Schnittstelle befindet, sollten zwei Banden entstehen. Bei dem mutagenisierten Plasmid (pET28a *dam* Mutante Klon a) sollte die NdeI-Schnittstelle entfernt worden sein, wodurch das Plasmid durch den HindIII Verdau linearisiert werden konnte. Der *linker* aus elf Aminosäuren wurde demnach auf zwei AS verkürzt. Diese Mutante wurde bei den Optimierungsversuchen (9.1) ab dem Punkt 9.1.11 anstatt des WT Proteins verwendet. Leider führte auch dieser Ansatz nicht zu einer erhöhten Stabilität des *Dam*-MTase Proteins.

1.4 CD-Spektroskopie

Um zu überprüfen, ob das Protein gefaltet war, wurden mehrere *far-UV* CD-Spektren (siehe B 9.3) der *Dam*-MTase mit und ohne Ziel-DNA gemessen. Es wurden auch Proben gemessen, die zuvor in der NMR-Spektroskopie gemessen wurden und dort keine Signale gaben. Bei jeder Messung war zu sehen, dass das Protein gefaltet vorliegt. Das Spektrum ist mit und ohne Ziel-DNA gleich strukturiert. Im Vergleich mit Standardkurven wurde bestimmt, dass das Spektrum sich aus 37% α -Helix, 19% β -Faltblättern und 13% β -turns zusammensetzt (siehe Abb. 12) (Liebert et al., 2004).

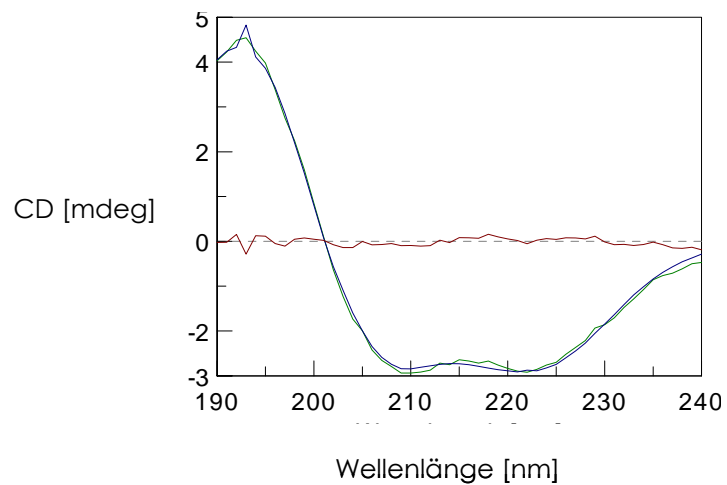


Abb. 12: CD-Spektrum einer 20 μM Proteinlösung in 30mM Phosphatpuffer pH6, 100 μM SAM. Braun: CD-Signal des Puffers, Blau: gemessenes Spektrum, Grün: angepasste Kurve

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aufreinigung der Dam-Mtase so optimiert wurde, dass hochreines Protein in hoher Konzentration und hohen Volumina in 300 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 und 100 μM SAM erhalten wurde, welches gefaltet vorlag und bei 20°C stabil, aber bei 37°C nicht stabil war. Eine ^{15}N -Markierung des Proteins war erfolgreich.

1.5 NMR-Messungen

Die erste 1D- und 2D-NOESY Messung erfolgte mit einer Dam-MTase die wie in Punkt B 9.1.1 und 9.1.3 beschrieben, aufgereinigt wurde. Es wurden 512 Messungen bei einer Temperatur von 293K durchgeführt und gemittelt. Dabei zeigte sich, dass die Protonen des Proteinrückgrates kaum zu sehen waren, da die Pufferbestandteile HEPES, DTT, EDTA und Glycerin in der Messung sehr starke Signale gaben (siehe Abb. 13).

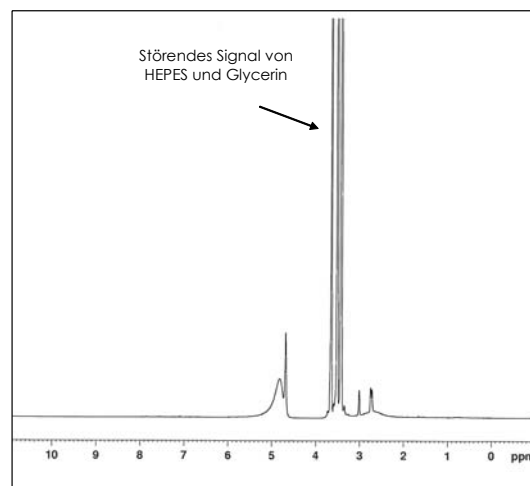


Abb. 13: 1D-NOESY-Messung der o.g. Proteinlösung. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben.

Für die zweite 2D-NOESY Messung wurde eine 200 μM Proteinlösung verwendet, die nach Aufreinigung gegen 300 mM Phosphatpuffer pH 6 und 100 μM SAM dialysiert wurde (B 9.1.7). Erneut wurden 512 Messungen bei 293K durchgeführt und anschließend gemittelt. Es zeigte sich, dass die Pufferbestandteile dieses Mal keine Signale gaben, jedoch wiederum die Protonen des Proteinrückrates kein Signal gaben.

Die Proteinkonzentration bei der dritten Messung betrug nur ca. 100 μM in einem Volumen von 250 μl . Zu dieser Probe wurde die Ziel-DNA (5'-cgg tag atc tac cg-3') (siehe B 9.1.9 und 1.1) zugegeben. Obwohl die Proteinkonzentration, als auch das Volumen gering waren, wurde eine 2D-NOESY Messung durchgeführt (293K, 512 Messungen). Auch jetzt konnten die Protonen des Proteinrückrates nicht detektiert werden. Allerdings konnten bei 13.5 ppm ein großer Peak, und bei 13.1, 12.75 und 12.4 ppm drei kleinere Peaks detektiert werden, welche den N1 und N5 Protonen der Thymin- und Guaninresten der Ziel-DNA zugeordnet wurden.

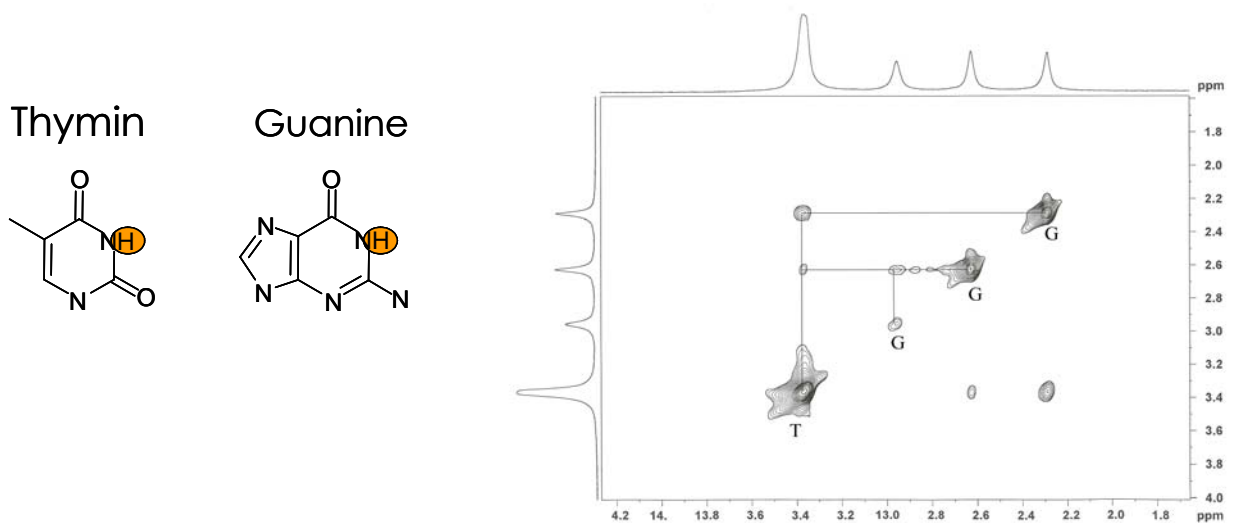


Abb. 14: 2D-NOESY Messung der Proteinlösung mit Ziel-DNA. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben. T steht für Thymin, G für Guanin. Die orange eingekreisten Protonen sind die Protonen, die das NMR Signal geben

Um zu überprüfen, ob die Peaks der Basen sich durch das Vorhandensein des Proteins verändern, wurde 1 mM Ziel-DNA in 300 mM Phosphat-Puffer pH 6 ohne Protein bei o.g. Bedingungen gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Die 2D-NOESY Messung (293K, 512 Messungen) einer Probe aufgereinigt wie in B 9.1.11 und 9.1.12 beschrieben (300 μ M, 300 μ l Volumen, Zugabe der 1.5-fachen Menge an Ziel-DNA vor der Dialyse) ergab keine messbaren Signale für das Protein oder die DNA.

Für die letzte Messung wurde die 15 N-markierte Dam-MTase (siehe 1.2) verwendet. Es wurde eine 15 N-HSQC Messung durchgeführt. Bei dieser Messung sollte man für jede AS einen Spot sehen. Zunächst wurde wieder bei 293K (=20°C) gemessen, wodurch nur sehr wenige Spots erkennbar waren (siehe Abb.??). Eine 1:5-Verdünnung mit Dialysepuffer ergab keine Änderung bei einer erneuten Messung. Die Proben wurden nochmals bei einer Temperatur von 310K (=37°C) gemessen, wodurch bei beiden Proben Signale detektiert werden konnten (siehe Abb. 15). Die unverdünnte Probe aggregierte nach zwei Stunden, die verdünnte Probe wurde über Nacht gemessen und fiel erst am nächsten Morgen aus.

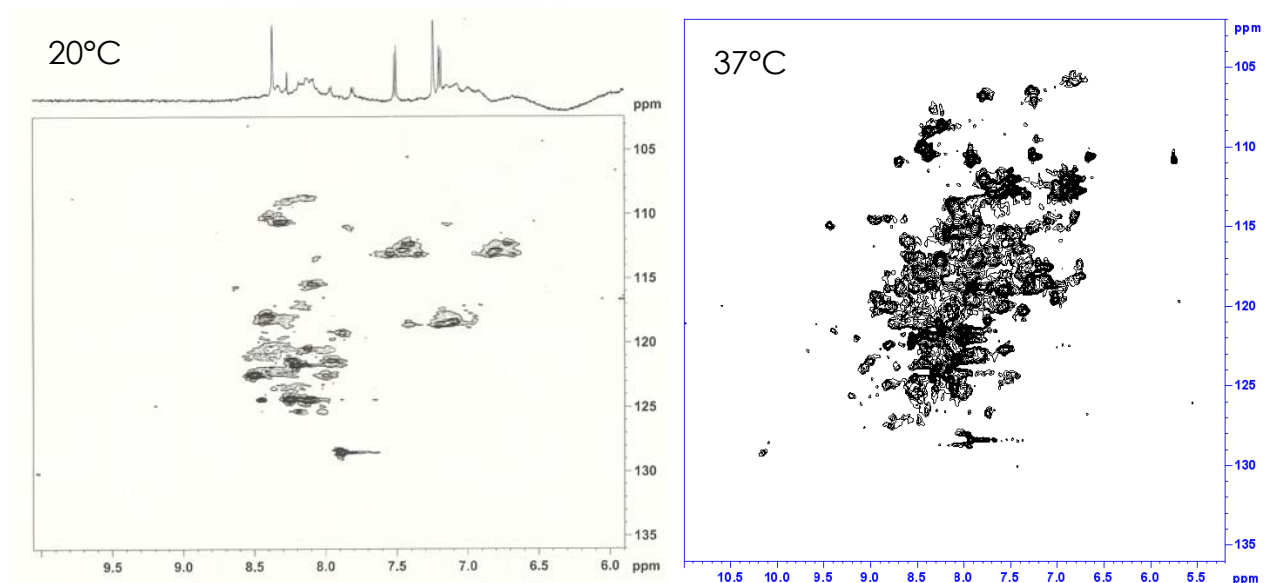


Abb. 15: ^{15}N -HSQC Messung der 1:5 verdünnten Proteinlösung. Auf dem Bild links sind die Signale dargestellt, die bei einer Messung bei 20°C zu detektieren waren, rechts diejenigen, die bei einer Messung bei 37°C detektieren waren

Um die 3D-Struktur des Proteins zu lösen, wären Messungen über drei bis vier Tage notwendig gewesen. Deswegen wurde nochmals versucht die Stabilität des Proteins bei 37°C zu erhöhen. Dabei wurden folgende Parameter des Dialysepuffers variiert: pH-Wert, Salzkonzentration, Na-Phosphatpufferkonzentration, SAM-Konzentration. Außerdem wurde die Verwendung von KCl anstatt von NaCl ausgetestet. Des Weiteren wurde Glycerin, Arginin oder Roti-Stab E dem Dialysepuffer zugesetzt, um die Stabilität zu erhöhen. Zusätzlich wurde versucht den His-Tag mit Hilfe des Enzyms DAPase abzuspalten, um Aggregation aufgrund des His-Tags zu vermeiden. Keiner der Ansätze führte dazu, dass die Proteinstabilität bei 37°C erhöht wurde.

Obwohl es gelungen war die Aufreinigung der Dam-MTase so zu optimieren, dass die hohen Anforderungen für die NMR-Spektroskopie erfüllt wurden (stabiles Protein mit einer Konzentration von $300\ \mu\text{M}$ in einem Volumen von $300\ \mu\text{l}$ in einem $30\ \text{mM}$ Na-Phosphatpuffer pH 6 und $100\ \mu\text{M}$ SAM), konnten bei den 2D-NOESY und der ^{15}N -HSQC Messungen bei 20°C keine oder nur sehr schwache NMR-Signale detektiert werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass das Protein unter diesen Bedingungen möglicherweise nicht gefaltet vorlag. Durch CD-Spektroskopische Messungen (siehe 1.4) konnte dies ausgeschlossen werden. Man konnte bei jeder Messung zeigen,

dass das Protein gefaltet war. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass bei einer Messtemperatur von 20 °C möglicherweise die Proteine zu unbeweglich waren und aneinander hafteten. Dadurch entstand eine Multimerisierung des Proteins auf einer Stufe die unterhalb der Aggregation lag. Dadurch wurde das Protein zu groß und lag oberhalb der Messgrenze für die NMR-Spektroskopie. Durch eine Messtemperatur von 37°C wurden die Proteine beweglicher und es konnten bei der ¹⁵N-HSQC Messung Signale detektiert werden. Eine weitere Untersuchung der Struktur der Dam-Methyltransferase wurde durch die Instabilität des Proteins bei 37°C nicht ermöglicht.

2 Lokalisation und Regulation der Dam-MTase

Wie in A 5 erwähnt wird die Geschwindigkeit der Remethylierung des Genoms durch die Dam-MTase in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Mehrheit der Experimente deutet auf eine schnelle Remethylierung hin. Bis jetzt ist ungeklärt, wie und wo innerhalb der Bakterienzelle dies stattfindet und wie die Remethylierung räumlich und zeitlich mit der Replikation und der *mismatch* Reperatur in Zusammenhang steht. Diese Fragen sollen mit Hilfe eines DamGFP-Fusionsproteins mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden. Von der Regulation der Transkription der Dam-MTase ist bis jetzt wie in A 5 beschrieben nur bekannt, dass das Gen durch sechs σ^{70} Promotoren und einer Terminatorregion reguliert wird. Da wie in A 5 erwähnt, eine Über- und Unterproduktion der Dam-MTase zu einer Hypermutableität führt, muss eine genaue Regulation der Produktion des Enzyms vorhanden sein. Um über die Regulierung mehr herauszufinden, sollte das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein über homologe Rekombination an die Stelle des endogenen Dam-MTase Gens in das Genom eingeführt werden.

2.1 Klonierung und Aktivitätsmessung der GFP-Fusionsproteine

Um die Lokalisation und Regulation der Dam-MTase näher zu untersuchen wurde ein Gen für ein DamGFP-Fusionsprotein kloniert. Um fundierte Aussagen treffen zu können, wurde die Aktivität des entstandenen Fusionsproteins untersucht. Um eine Aussage über die Funktionalität der Lokalisation treffen zu können wurde eine methylierungsinaktive Variante des DamGFP-Fusionsproteins hergestellt und deren intrazelluläres Lokalisationsverhalten analysiert.

2.1.1 Klonierung des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein

Um die Lokalisation und die Regulation der Dam-MTase *in vivo* verfolgen zu können, wurde ein das Gen für ein DamGFP-Fusionsprotein und eine methylierungsinactive Variante des DamGFP-Fusionsproteins Dam(APPY)GFP hergestellt. Dazu wurde wie in den Methoden beschrieben (siehe B 10.1) das *EGFP* Gen zunächst vom Vektor pcDNA EGFP amplifiziert. Bei dieser PCR wurden mit den *Primern* eine HindIII Schnittstelle in das Amplifikat eingeführt. Mit dem *Antisense-Primer* wurde zusätzlich ein Stoppcodon eingefügt. Über die HindIII Schnittstelle C-Terminal des *dam*-MTase Gens wurde das *EGFP* Gen in den Vektor pET28a *dam* Wildtyp kloniert. Mit einem anschließendem HindIII-Verdau des Plasmides, bei dem das einklonierte *EGFP* Gen wieder ausgeschnitten werden konnte, wurde der Erfolg der Klonierung bestätigt. Um zu überprüfen, ob das *EGFP* Gen in der 5`-3`-Orientierung in den Vektor kloniert wurde, wurde eine PCR-Amplifikation mit einem *Antisense-Primer*, der außerhalb des *dam*-MTase Gens auf dem Vektor bindet und einem *Sense-Primer*, der am 5`-Beginn des *EGFP* Genes bindet, durchgeführt. Eine erfolgreiche Amplifikation bestätigte die richtige Orientierung und Lokalisierung des *EGFP* Gens auf dem Vektor. Durch anschließende PCR Mutagenese wurde erfolgreich das Stoppcodon des *dam*-MTase Gens und die HindIII Schnittstelle zwischen den Genen entfernt, wodurch das Gen für ein DamGFP-Fusionsprotein entstand. Somit sollte das Plasmid nach der Mutagenese nur noch eine HindIII Schnittstelle am 3`-Ende des DamGFP-Fusionsprotein Gens aufweisen. Nach einem Verdau mit HindIII entstand ein linearisiertes Plasmid, was die erfolgreiche Mutagenese, wie in Abb. 16 gezeigt, bestätigte.

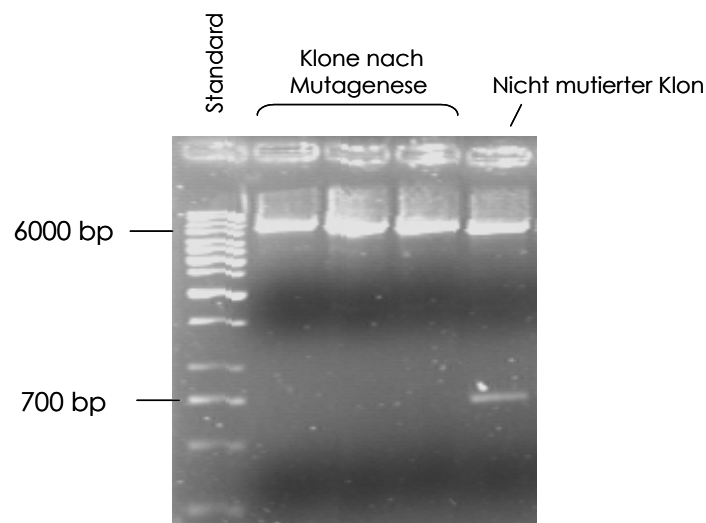


Abb. 16: Testverdau der Plasmide mit HindIII

In Spur 1-3 ist das Plasmid nach dem Verdau aufgetragen. Man sieht ein lineares DNA-Fragment mit einer Länge von 6866 bp. In Spur 4 wurde das Plasmid vor der Mutagenese als Negativkontrolle verdaut. Man sieht eine Bande mit einer Länge von 6145 bp und eine Bande mit einer Länge von 721 bp. Die anschließende Sequenzierung des *damGFP*-Fusionsproteins Gens zeigte sekundäre Mutationen innerhalb des *EGFP* Gens in der Nähe des aktiven Zentrums und am Ende des Gens. Die Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums wurden durch eine zweite PCR Mutagenese entfernt (siehe B 10.1), wobei mit dem *Antisense-Primer* gleichzeitig eine *NdeI* Schnittstelle eingeführt wurde. Somit sollte das Plasmid nach der Mutagenese zwei *NdeI* Schnittstellen besitzen, was durch einen Verdau des mutagenisierten Plasmides mit *NdeI* bestätigt wurde. Eine erneute Sequenzierung ergab eine korrekte DNA-Sequenz des *damGFP*-Fusionsprotein Gens, ausgenommen der Mutationen am Ende des *EGFP* Gens.

2.1.2 Herstellung des Gens für das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein

Wie in der Einleitung (siehe A 4) beschrieben ist das AS-Motiv DPPY das aktive Zentrum der N-Methyltransferasen. Wie Guyoet et al. (1993) zeigten, führen Mutationen in diesem Bereich zum teilweisen Verlust der katalytischen Aktivität der

Dam-MTase. In Liebert et al, 2004 wurde gezeigt, dass der Austausch des Aspartat Restes im DPPY Motiv zu einem Alanin in der Dam-MTase aus *E.coli* das Ausklappen der Zielbase verhindert, wodurch ein Aktivitätsverlust eintrat. Um eine vollkommen methylierungsinactive Variante des DamGFP-Fusionsproteins zu erzeugen wurde in dem Gen für das DamGFP-Fusionsprotein ebenfalls das Aspartat des DPPY Motives des Dam-MTase Teils gegen ein Alanin ausgetauscht. Dies erfolgte wie in Abschnitt B 10.2 angegeben durch PCR Mutagenese. Dabei wurde gleichzeitig eine FspI Schnittstelle eingeführt um eine erfolgreiche Mutation zu überprüfen. Die Plasmide die erfolgreich mutagenisiert wurden, wurden durch den Verdau mit FspI linearisiert. Außerdem wurde die erfolgreiche Einführung der Mutation durch Sequenzierung bestätigt.

2.1.3 *In vivo* Aktivitätstest der Fusionsproteine

Wie in B 10.5.1 beschrieben wurde überprüft, ob die Fusionsproteine *in vivo* aktiv sind. Dazu wurde das Plasmid pET28a dam WT, pET28a damGFP und pET28a dam(APPY)GFP jeweils in den Stamm *E. coli* JM 110 transformiert. Dieser Stamm ist *dam* negativ und besitzt kein T7 Expressionssystem. Da die pET Vektoren etwas durchlässig sind, was bedeutet, dass mit basaler Transkription etwas mRNA produziert wird, welche dann translatiert wird und eine geringe Menge des jeweiligen Proteins produziert wird, welches dann die genomische DNA und die Plasmid-DNA methylieren kann. Durch die Überprüfung des Methylierungsstatus des Plasmides oder der genomischen DNA kann die Aktivität des Proteins bestätigt werden. Um den Methylierungsstatus zu überprüfen, wurden die Plasmide isoliert und mit DpnI verdaut. Dieses RE spaltet nur methylierte G^mATC-Sequenzen. Somit kann überprüft werden, ob eine Methylierung durch die Dam-MTase vorliegt. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, können das Dam-MTase WT Protein und das DamGFP-Fusionsprotein die Plasmide methylieren, welche in Folge von DpnI gespalten werden können. Allerdings zeigte sich in beiden Fällen eine unvollständige Spaltung. Das Plasmid, welches das Gen für das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein trägt, konnte durch DpnI nicht gespalten werden, was darauf hinweist, dass das Plasmid nicht methyliert wurde. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass das DamGFP-Fusionsprotein *in vivo* aktiv ist, während das Dam(APPY)GFP-Fusionsprotein erwartungsgemäß inaktiv ist.

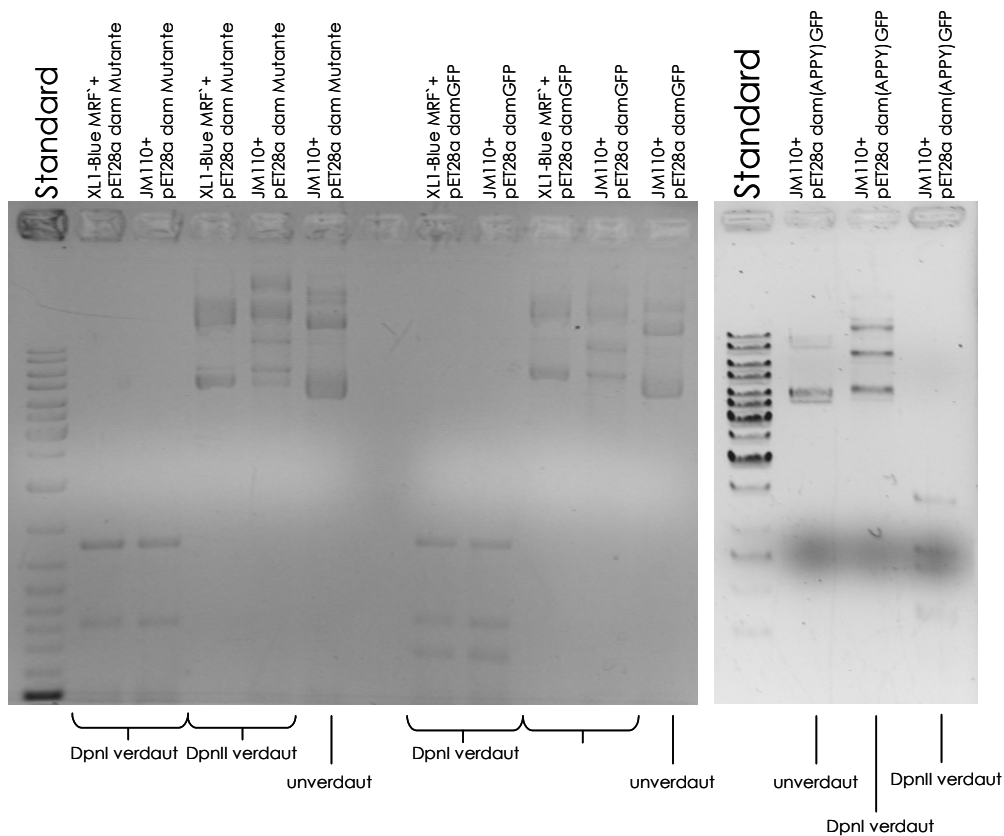


Abb. 17: Agarosegeleelektrische Analyse des *in vivo* Aktivitätstest

2.1.4 *In vivo* Stabilität der Fusionsproteine

Um eine verlässliche Aussage über die *in vivo* Aktivität zu treffen, musste überprüft werden, ob die Fusionsproteine *in vivo* tatsächlich als Fusion vorliegen und nicht etwa z.B. der GFP Teil abgespalten wurde. Dazu wurde das Dam-MTase WT Protein und das DamGFP-Fusionsprotein wie in B 10.3.1 beschrieben aus den JM 110 Zellen aufgereinigt und mittels Westernblot detektiert. In Abb. 18 Spur 1 sieht man die Aufreinigung aus JM 110 Zellen ohne Plasmid. Wie zu erwarten war, konnte nichts detektiert werden. In Spur 2 wurde das aufgereinigte Dam-MTase WT Protein aufgetragen, welches durch eine Bande in Höhe von ca. 32 kDa zu detektieren war. In Spur 3 wurde das aufgereinigte DamGFP-Fusionsprotein aufgetragen, welches durch eine Bande in Höhe von von ca. 61 kDa zu detektieren war. In dieser Spur konnten keine Abspaltungsprodukte detektiert werden. Somit konnte bewiesen werden, dass *in vivo* nur das DamGFP-Fusionsprotein vorliegt.

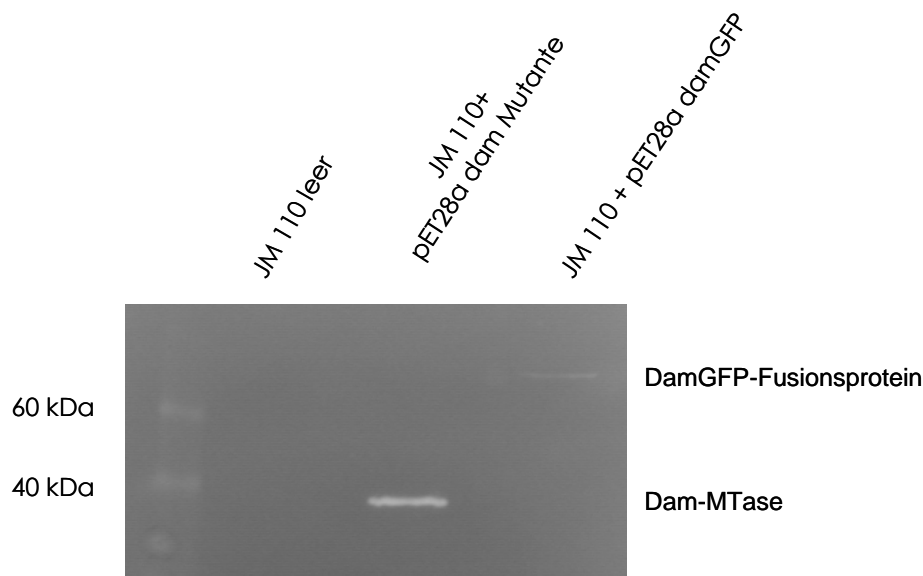


Abb. 18: *In vivo* Stabilität des DamGFP-Fusionsproteins. Detektion der Proteine mittels Westernblot mit anti-His Antikörper

2.1.5 *In vitro* Aktivitätstest des DamGFP-Fusionsproteins

Für das DamGFP-Fusionsprotein wurde auch die *in vitro* Aktivität bestimmt. Dazu wurde das Protein zunächst wie in B 6.1 beschrieben aufgereinigt. Es zeigt sich dass nicht nur das DamGFP-Fusionsprotein, sondern auch Abbauprodukte, unter anderem die Dam-MTase ohne den GFP Teil aufgereinigt wurde. Um nur das DamGFP-Fusionsprotein zu erhalten wurden die Eluate der Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration weiter aufgereinigt. Die Fraktionen, die nach der Gelfiltration aufgefangen wurden, wurden mittels Westernblot auf die Anwesenheit des Fusionsproteins und Degradationsprodukten untersucht. Die Fraktion, die nur das DamGFP-Fusionsprotein enthielt, wurde in dem *in vitro* Aktivitätsassay eingesetzt (siehe B 10.3.2). Als Substrat wurden an Erkennungssequenzen für die Dam-MTase umethylierte λ -DNA und eine λ -DNA, welche an diesen Stellen methyliert ist, verwendet. Die methylierte λ -DNA diente als Kontrolle zur Überprüfung der DpnI bzw. DpnII Spaltung. Dam-Mtase methylierte λ -DNA sollte durch DpnI (spaltet methylierte G^mATC-Sequenzen) gespalten, durch DpnII (spaltet unmethylierte GATC-Sequenzen) nicht gespalten werden. Als Kontrolle ob Pufferbestandteile bereits zu einer Methylierung oder Spaltung führen wurden die Substrate nur mit den Puffern auf ein Agarosegel aufgetragen (Ansätze 1 und 2, Tab. 13 B 10.3.2 und Abb. 19). Wie

erwartet, wurden die Substrate in diesen Kontrollansätzen nicht methyliert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche DpnI bzw. DpnII Spaltung wurden das an den Erkennungssequenzen der Dam-MTase unmethylierte Substrat mit DpnI bzw. DpnII verdaut (Ansätze 3 und 4). Es wurde erwartungsgemäß durch DpnI nicht verdaut und durch DpnII verdaut. In den Aktivitätstest (Ansätze fünf bis zwölf) wurde zum einen das DamGFP-Fusionsprotein bzw. die Dam-MTase Mutante zusammen mit dem Kofaktor SAM oder dem abreagierten Kofaktor SAH eingesetzt. Die Dam-MTase Mutante diente dabei als Positivkontrolle. In den Ansätzen mit SAH sollte keine Methylierung stattfinden, da kein Methylgruppendonor vorhanden war, wohingegen in den Reaktionen mit SAM eine Methylierung stattfinden sollte. Um den Methylierungsstatus der Substrate zu untersuchen wurden sie nach der Methylierungsreaktion mit DpnI bzw. DpnII verdaut. In den Ansätzen mit SAH und der *dam* und *dcm* negativen λ -DNA konnte weder mit der Dam-MTase Mutante (Ansätze 7 und 8), noch mit dem DamGFP-Fusionsprotein (Ansätze 5 und 6) eine Methylierung festgestellt werden (das bedeutet, dass das Substrat durch DpnI nicht gespalten, durch DpnII hingegen gespalten wurde). In den Ansätzen mit SAM konnte sowohl im Falle des DamGFP-Fusionsproteins (Ansätze 9 und 10), als auch der Dam-MTase Mutante (Ansätze 11 und 12) eine Methylierung des *dam* und *dcm* negativen Substrates festgestellt werden (d.h. es erfolgte eine Spaltung mit DpnI, aber keine mit DpnII). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das DamGFP-Fusionsprotein *in vitro* katalytisch aktiv ist.

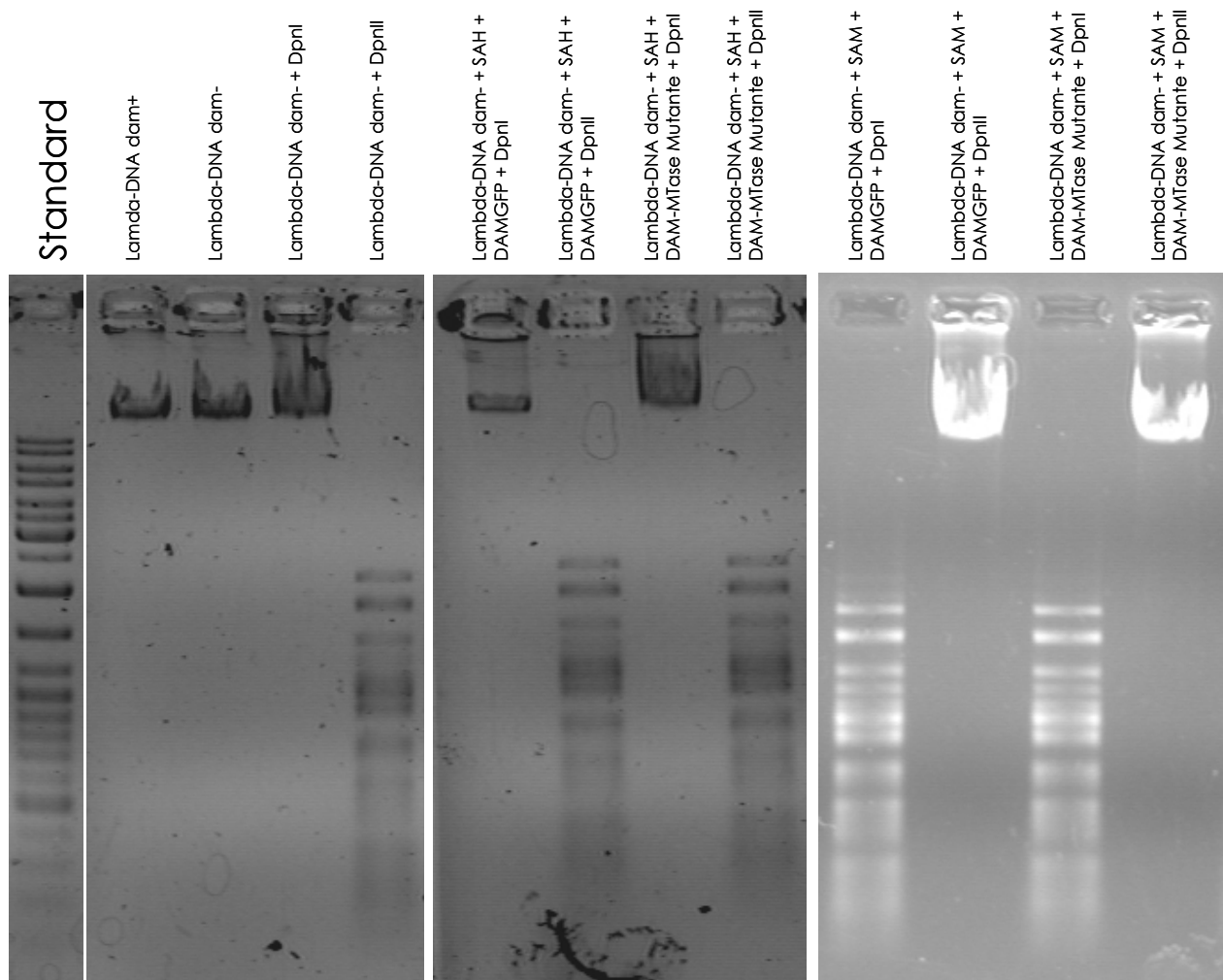


Abb. 19: Agarosegelelektrophoretische Analyse des *In vitro* Aktivitätstest

2.2 Regulation der Expression der Dam-MTase

Um die Regulation der Transkription und Expression Dam-MTase *in vivo* näher zu untersuchen, sollte das endogene Gen für die Dam-MTase im *E.coli* Genom gegen das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein mittels Homologer Rekombination ausgetauscht werden (siehe B 10.4). Dabei wird ein Mutageneseplasmid pACBSR verwendet, welches das Gen für Chloramphenicol trägt. Außerdem enthält es und unter einem Arabinoseinduzierten Promotor das Gen für die Homingendonuclease I-SceI. Weiterhin ist im Rekombinationsplasmid das λ Red Gen codiert, welches die λ Red vermittelte homologe Rekombination durchführt, I-SceI linearisiert das Donorplasmid. Das Donorplasmid sollte ein *high copy* Vektor sein und eine andere AB-Resistenz besitzen als das Mutageneseplasmid. Es trägt außerdem die zu insertierende Sequenz. In meinem Falle wurde der Vektor pET28a damGFP

verwendet, welcher diese Bedingungen erfüllt (besitzt eine Kanamycin Resistenz). Um diesen Vektor als Donorplasmid verwenden zu können, musste eine I-SceI Schnittstelle und eine zweite Region eingeführt werden, über die die Homologe Rekombination stattfinden kann. Als eine Rekombinationsregion stand bereits der *dam* Teil des *damGFP*-Fusionsprotein Gens zur Verfügung. Um die Homologe Rekombination durchführen zu können, wurde am 3`-Ende des *damGFP*-Fusionsprotein Gens ein Teil der genomischen Sequenz von *E.coli* einkloniert, der 3` auf das Gen für die Dam-MTase folgt (siehe Abb. 20 und B 10.4.1 und 2.2.1)).

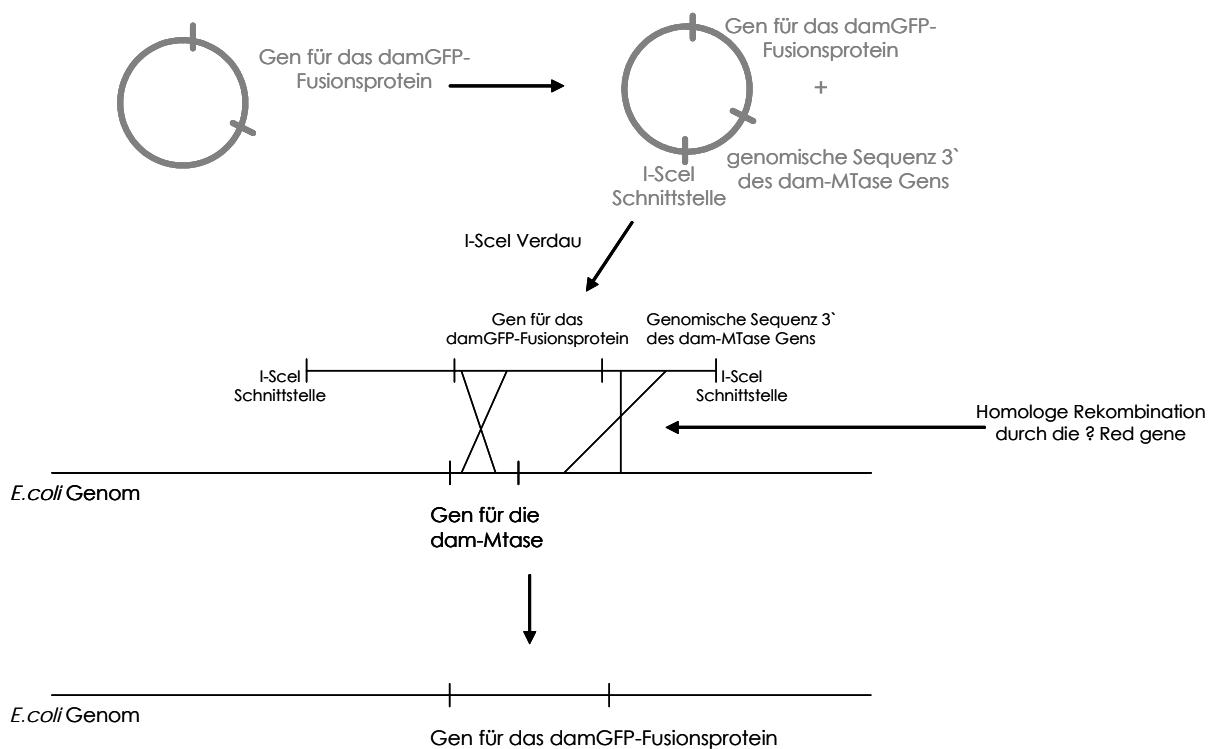


Abb. 20: Schema der Insertion des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein in das *E. coli* Genom

2.2.1 Herstellung des Donorplasmides

Für das Donorplasmid wurde wie in B10.4.1 beschrieben ein Teil der genomischen Sequenz 3` des Dam-MTase Gens amplifiziert. Mit dem *Antisense-primer* wurde die I-SceI Schnittstelle und die XhoI Schnittstelle eingefügt. Mit dem Sense-Primer wurde die NotI Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurde die amplifizierte Sequenz über die NotI und XhoI Schnittstellen in den Vektor pET28a *damGFP* am 3`-Ende des

damGFP Gens kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Testspaltung mit XhoI und NotI bestätigt. Außerdem wurde eine erfolgreiche Testspaltung mit I-SceI durchgeführt. Damit konnte bestätigt werden, dass das Plasmid linearisiert werden kann, was eine Voraussetzung ist für eine erfolgreiche Homologe Rekombination. Eine Sequenzierung des Donorplasmides ergab außerdem eine korrekte Sequenz.

2.2.2 Herstellung des Plasmides HR Kontrolle

Um zu überprüfen, ob die Homologe Rekombination mit dem verwendeten System funktioniert, wurde ein Kontrollplasmid hergestellt. Dazu wurde wie in B?? beschreiben durch zielgerichtete PCR-Mutagenese eine stille Mutation in das *dam*-MTase Gen auf dem Vektor pET28a *dam* WT eingeführt. Dadurch wurde die einzige BamHI Schnittstelle des Vektors zerstört. Bei einer erfolgreichen Mutation sollte demnach keine Linearisierung des Vektors mehr erfolgen. Durch den *Sense-Primer* wurde die Mutation (siehe B 10.4.1.2), durch den *Antisense-Primer* wurde die I-SceI Schnittstelle eingeführt. Um die Einführung der Mutation zu überprüfen wurde das *dam*-MTase Gen amplifiziert und anschließend mit BamHI gespalten. Als Kontrolle wurde das nicht mutierte Gen in der gleichen Weise behandelt. Aus den Kolonien die keine Linearisierung des Plasmides zeigten, wurde das Plasmid isoliert und mit I-SceI gespalten. Die Plasmide konnten erfolgreich gespalten werden. Eine Sequenzierung der positiven Plasmide bestätigte außerdem den Erfolg der Mutagenese.

2.2.3 Durchführung der Homologen Rekombination

Die Homologe Rekombination mit dem Donorplasmid wurde wie in B 10.4.2 beschrieben insgesamt sieben Mal durchgeführt. Es wurde sowohl der *E. coli* Stamm JM 109 (Versuche eins bis fünf), als auch K12 (Versuche sechs und sieben) für die Kotransformation des Plasmides pACBSR und des Donorplasmids bzw. des Plasmids HR Kontrolle verwendet. Eine der Kolonien, die beide Plasmide aufgenommen hat, wurde in LB-Medium resuspendiert und ein Teil dieser Resuspension wurde auf eine Cam-Agarplatte, eine Kan-Agarplatte, eine Cam/Kan-Agarplatte und eine LB-Agarplatte ohne AB ausplattiert. Diese Platten wurden ü/N bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag ausgezählt. Dabei sollten auf der Agarplatte ohne AB und auf der

Agarplatte mit Cam und Kan gleich viele Kolonien gewachsen sein. Dadurch ist zu erkennen, wie viele Bakterienzellen beide Plasmide aufgenommen haben und stellt eine Kontrolle für die Kotransformationseffizienz dar. Es wurde auf den Platten bei allen Durchführungen des Versuchs immer zwischen 150 und 200 Kolonien gezählt. Was bedeutet, dass die meisten Zellen beide Plasmide aufgenommen haben. Die Induktion der I-SceI Homingendonuklease und der λ Red Gene erfolgte mit Arabinose für 7 Stunden (Versuch eins bis drei und fünf bis sieben), 11 Stunden (Versuche vier und sieben) bzw. 12 Stunden (Versuche fünf und sechs). Die Kultur wurde anschließend 1:10000 verdünnt und auf verschiedene Agarplatten ausplattiert. Von den LB-Agarplatten ohne AB jeden Versuchs wurden bis zu 100 Kolonien gepickt und auf eine Insertion des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein getestet. Sollte das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein sich in das Genom integriert haben würde man ein Amplifikat der Länge 2297 bp erwarten. Falls das Gen für das Fusionsprotein nicht integriert wurde, würde man ein Amplifikat der Länge 1574 bp erwarten. Es zeigte sich in allen Fällen ein Amplifikat der Länge 1574 bp. Das bedeutet, dass das Gen für das DamGFP-Fusionsprotein nicht in das Genom integriert werden konnte. Ein möglicher Grund für das Scheitern der Integration des Gens für das DamGFP-Fusionsproteins könnte die Größe der zu insertierenden Sequenz gewesen sein. Um zu überprüfen, ob dieses System funktioniert wurde die Homologe Rekombination mit einem anderen Donorplasmid durchgeführt (HR Kontrolle), welches eine stille Mutation innerhalb des Gens für die Dam-MTase trägt, wodurch die BamHI Schnittstelle innerhalb des Gen entfernt wurde.

Die Homologe Rekombination mit dem Mutageneseplasmid und dem Plasmid HR Kontrolle als Donorplasmid wurde ein Mal in dem Stamm *E. coli* K12 durchgeführt. Die Agarplatten t=0 konnten nicht ausgezählt werden, da ein dichter Bakterienrasen gewachsen war. Die Induktion der I-SceI Homingendonuklease und der λ Red Gene erfolgte für sieben Stunden. Anschließend wurde wie in B.?? beschrieben, die Kultur in 1: 10000 Verdünnung auf verschiedene Agarplatten ausplattiert. Es wurden von der LB-Agarplatte ohne AB 100 Kolonien gepickt und auf eine Agarplatte mit und ohne Kan ausplattiert, um zu überprüfen, welche der Kolonien das Donorplasmid verloren hatte. Diese Kontrolle war notwendig, da zur Überprüfung ob die Homologe Rekombination durchgeführt wurde, das Gen für die Dam-MTase amplifiziert und anschließend mit BamHI gespalten wurde. Hätten die Zellen das Donorplasmid noch in sich getragen, könnte man nicht sicher sein, ob das Amplifikat von dem

Donorplasmid oder dem Genom stammt. Von den Kolonien, die nicht auf der Kan- Agarplatte gewachsen waren und somit das Donorplasmid nicht mehr in sich trugen, wurde das *dam*-MTase Gen amplifiziert und anschließend mit BamHI gespalten. Wenn die Homologe Rekombination erfolgreich verlaufen wäre, würde man keine Spaltung des PCR-Produktes sehen, da durch die stille Mutation die BamHI Schnittstelle entfernt wurde. Bei allen untersuchten Kolonien und der Negativkontrolle war allerdings eine Spaltung des PCR-Produktes zu sehen, was bedeutet, dass die BamHI Schnittstelle noch vorhanden war und die Homologe Rekombination nicht stattgefunden hat. Dass die Homologe Rekombination auch in diesem Falle nicht funktioniert hat, legt den Schluss nahe, dass das Scheitern der Integration des Gens für das DamGFP-Fusionsprotein nicht an der Größe der zu insertierenden Sequenz lag, sondern anscheinend das System an sich in meinem Falle nicht funktioniert hat. Da die Sequenzierung der Donorplasmide eine korrekte Sequenz bestätigte und sich die Donorplasmide auch mit der Homingendonuklease I-SceI *in vitro* spalten ließen, kann ein Fehler auf Seiten der Donorplasmide ausgeschlossen werden. Ein möglicher Grund für das Scheitern könnte das Mutageneseplasmid sein. Es wurde mir von Prof. F.R. Blattner zur Verfügung gestellt. Möglicherweise wurde ein fehlerhaftes oder falsches Plasmid zugesandt.

2.3 Intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase

Die Frage danach wie die Dam-MTase in *E.coli* das Genom nach der Replikation remethyliert und ob diese katalytische Aktivität evtl. auch räumlich mit der Replikationsmaschinerie oder der *mismatch* Reparatur in Zusammenhang steht, sollte mittels der Epifluoreszenzmikroskopie von Zellen, die das DamGFP-Fusionsprotein exprimieren, geklärt werden.

2.3.1 Regulierte Expression des DamGFP-Fusionsproteins

Um die Menge an Fusionsprotein in der Zelle steuern zu können wurde für die Plasmide pET28a damGFP und pET28a dam(APPY)GFP der *E.coli* Tuner pLysS Stamm, für das Plasmid pTriEx EGFP der *E.coli* Tuner pLacI Stamm verwendet. Mit diesen Stämmen sollte es möglich sein, die Expression der Proteine durch die Menge an zugegebenem IPTG zu regulieren. Je mehr IPTG zugegeben wird, desto mehr Protein

wird exprimiert. Zur Untersuchung der Lokalisation sollte das Fusionsprotein so gering wie möglich exprimiert werden. Durch eine volle Induktion mit 1 mM IPTG könnte sich das DamGFP-Fusionsprotein in *inclusion bodies* aggregieren, wodurch das Ergebnis verfälscht werden würde. Die Regulation der Expression wurde einmal für das DamGFP-Fusionsprotein getestet. Dabei wurde die Bakterienkultur mit 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 und 1 mM IPTG für zwei Stunden induziert, die Zellen anschließend mit Lämmli-Auftragspuffer versehen, bei 95°C aufgeköcht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das DamGFP-Fusionsprotein durch Westernblot mit dem anti-His-AK detektiert. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, kann die Menge des gebildeten DamGFP-Fusionsprotein mit der IPTG-Konzentration reguliert werden.

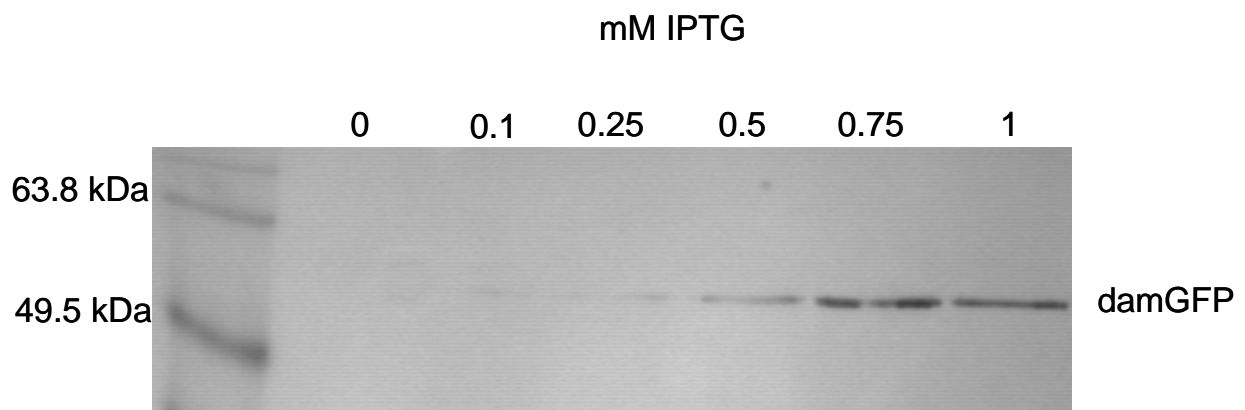


Abb. 21: Westernblot mit anti-His AK

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde eine Eifluoreszenzmikroskopie sowohl von lebenden, wie von fixierten Zellen durchgeführt. Da sich die gleichen Ergebnisse zeigten wurde mit der Mikroskopie von lebenden Zellen fortgefahren. Wie in B 10.5.1 und 10.5.2 beschrieben, wurden die Tuner pLysS Zellen mit dem Plasmid pET28a damGFP transformiert und eine Vorkultur und anschließend eine Hauptkultur gezogen. Die Hauptkultur wurde bei einer optischen Dichte von 0.7 bei 600 nm zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von IPTG induziert. Ohne Zugabe von IPTG zeigte sich eine sehr schwache Autofluoreszenz der Zellen. Bis zu einer IPTG Konzentration von 0.2 mM war die Fluoreszenz sehr schwach. Bei einer Induktion mit einer IPTG Konzentration von 0.2

mM konnte man die Fluoreszenz des exprimierten DamGFP-Fusionsproteins gut detektieren. Die Fluoreszenz wurde dabei überraschenderweise nicht homogen in der Zelle verteilt sondern an den Zellpolen in deutlich erkennbaren Punkten lokalisiert beobachtet.

Es wurden 100 Zellen, die bei einer OD_{600} von 0.7 mit 0.2 mM IPTG für zwei Stunden induziert wurden wie in B beschrieben ausgezählt. Wie in Abb. 22 zu sehen ist, zeigten 81 der ausgezählten Zellen einen polaren grün fluoreszierenden Spot, 12 Zellen hatten an jedem Zellpol einen grün fluoreszierenden Spot und 7 Zellen zeigten eine grüne Fluoreszenz in der gesamten Zelle.



Abb. 22: Statistische Auswertung 100 fluoreszenter Zellen

Es wurde zusätzlich die Länge der gezählten Zellen gemessen. Die mittlere Zelllänge betrug $1.84 \mu\text{m}$, die mittlere Distanz von einem Ende der Zell bis zur Mitte des grün fluoreszierenden Spots betrug $1.58 \mu\text{m}$. Man hätte argumentieren können, dass die Zellen mit Spots an beiden Polen Zellen sind, die kurz vor der Zellteilung stehen und bei denen die Tochterzellen jeweils einen polaren Spot aufweisen. Wäre dies der Fall gewesen, hätten die Zellen mit zwei Spots im Mittel länger sein müssen, als die Zellen, die nur einen Spot aufweisen. Allerdings zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Länge der Zellen und der Anzahl der Spots. Somit konnte das Vorhandensein von zwei Spots in der Zelle nicht dadurch erklärt werden. Möglicherweise wechselt der Spot während des Zellzykluses die Position innerhalb der Zelle und wandert von dem einen Pol zu dem anderen und die Zellen, in denen zwei polare Spots beobachtet wurden, stellen ein Zwischenstadium in diesem Prozess dar. Um diese Hypothese zu überprüfen müssten *time lapse* Experimente durchgeführt werden. Dies ist für die Zukunft geplant. Bei einer Induktion der Zellen mit 0.2 mM IPTG für zwei Stunden bei einer OD_{600} von 0.4 waren die meisten Zellen in der gesamten Zelle grün fluoreszent,

einige Zellen zeigten einen polaren grün fluoreszierenden Spot. Dasselbe Muster zeigte sich, wenn man die Zellen für 30 min statt für zwei Stunden induzierte. Je länger die Zellen induziert wurden, desto mehr polare Spots und desto weniger Zellen, die eine grüne Fluoreszenz in der gesamten Zelle hatten, konnten detektiert werden.

Um die Frage zu klären, ob die Dam-MTase mit der DNA kolokalisiert, wurden die DNA mit DAPI angefärbt. In Abb. 23 ist eine Überlagerung von zwei Bildern desselben Präparates dargestellt. Einmal wurde die GFP Fluoreszenz aufgenommen, das zweite Mal die DAPI Fluoreszenz. Um den Kontrast zu erhöhen wurde die ursprünglich blau fluoreszierende DAPI Färbung durch die Falschfarbe Rot ersetzt. Eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzen würde sich in einer Gelbfärbung zeigen. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, zeigte sich eine Überlagerung nur in den Zellen, die eine GFP Fluoreszenz in der gesamten Zelle zeigten. Zeigte sich eine polare Lokalisation der Dam-MTase (zu sehen durch den grün fluoreszierenden Spot) konnte keine Kolokalisation mit der DNA (dargestellt durch die Falschfarbe Rot) festgestellt werden.

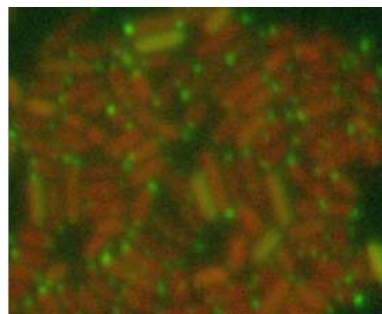


Abb. 23: Lokalisation von DNA und DamGFP. Rot: DAPI-Färbung (Falschfarbe), grün: DamGFP

Um zu überprüfen, ob die polare Lokalisation durch den GFP Teil des DamGFP-Fusionsproteins veranlasst wurde, wurde das GFP Protein alleine induziert und die Lokalisation untersucht. Dabei zeigte sich in allen Fällen eine Fluoreszenz in der gesamten Zelle (siehe Abb. 24).

Um zu überprüfen, ob die Lokalisation des DamGFP-Fusionsproteins mit der katalytischen Aktivität der Dam-Mtase in Zusammenhang steht wurde ein methylierungsinactive Variante des DamGFP-Fusionsproteins (Dam(APPY)GFP) hergestellt. Dieses Fusionsproteins ist durch einen AS-Austausch im katalytischen

Zentrum in der Lage die DNA zu binden, kann aber den Methylgruppentransfer nicht mehr katalysieren. Bei einer Induktion dieses Fusionsproteins zeigte sich, dass die Zellen, welche eine Fluoreszenz aufwiesen, in der gesamten Zelle grün waren. Es zeigten sich keine polaren Spots (siehe Abb. 24). Somit ist die polare Lokalisation des DamGFP-Fusionsproteins abhängig von der Methylierungsaktivität der Dam-MTase.

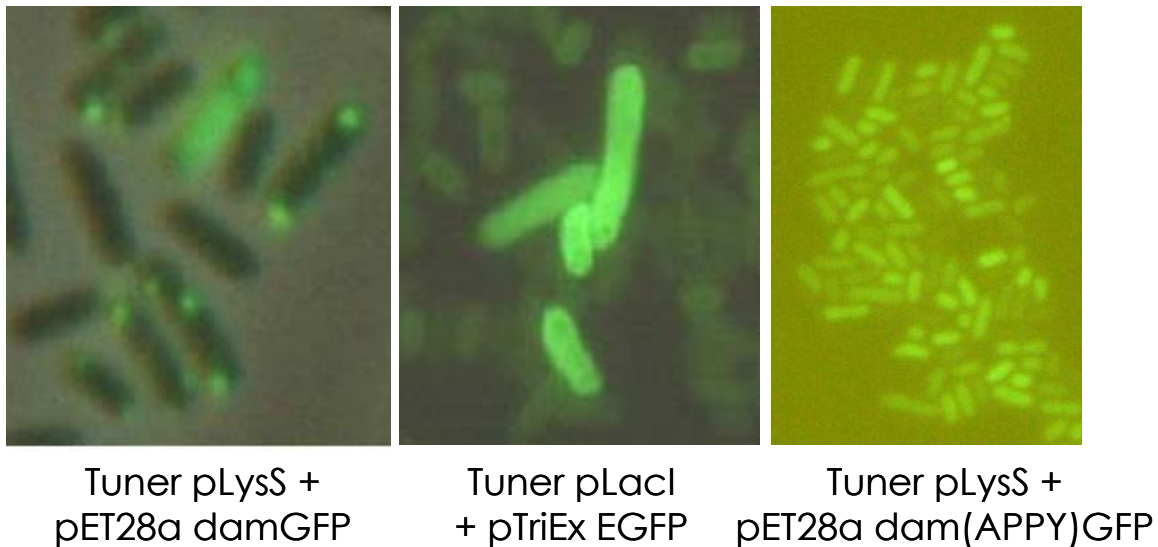


Abb. 24: Lokalisation von DamGFP, EGFP bzw. Dam(APPY)GFP in *E.coli* Zellen

Um zu untersuchen, ob die polare Lokalisation an die Zellteilung gekoppelt ist, wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Induktion und für die Zeitdauer der Induktion mit dem β -Lactam Antibiotikum Aztreonam inkubiert. Dadurch können die Zellen die Zellteilung mehr komplett durchführen. Dadurch entstehen fädige *E.coli* Zellen. Wäre die polare Lokalisation funktionell und nicht durch Verdrängung des Proteins durch das Nukleoid vermittelt, würde man eine Lokalisation des DamGFP-Fusionsproteins an den Stellen in der fädigen *E.coli* Zelle erwarten, an denen sich ohne Behandlung mit Aztreonam die Zellpole befinden würden. Die Aztreonam behandelten Zellen, welche das aktive DamGFP-Fusionsprotein trugen, zeigten fädiges Wachstum und grün fluoreszierende Spots, die sowohl polar lokalisiert waren, als auch in regelmäßigen Abständen entlang der Zelle, dabei eher an der Zellwand lokalisiert, als in der Mitte der Zelle (siehe Abb. 25). Die mittlere Distanz zwischen diesen Spots betrug $1.57 \mu\text{m}$. Die Zellen die mit Aztreonam behandelt wurden und bei denen die inaktive Variante (Dam(APPY)GFP) expremiert wurde, zeigte sich ein fädiges

Wachstum der Zellen und eine grüne Fluoreszenz in der gesamten Zelle (siehe Abb. 25).

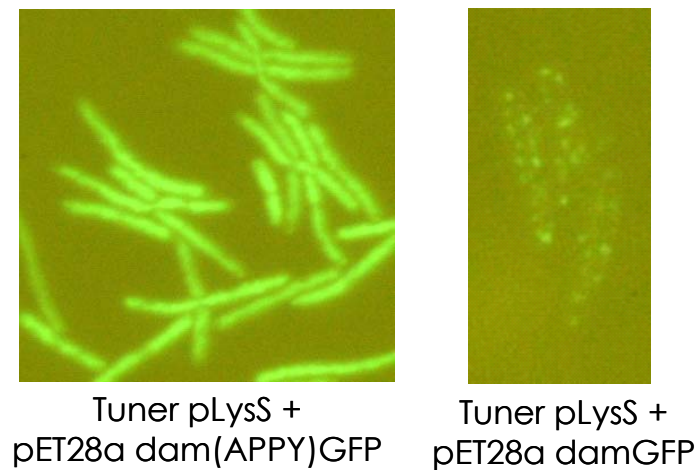


Abb. 25: Lokalisation von DamGFP bzw. Dam(APPY)GFP in Aztreonam-behandelten *E.coli* Zellen

3 Interaktionspartner der Dam-MTase

Wie in A 5 und in C 2 bereits erwähnt stellt sich die Frage wie die Dam-MTase das Genom rasch nach der Replikation und in Koordination mit der mismatch Reparatur durchführen kann. Man könnte davon ausgehen, dass z.B. die Dam-MTase mit Proteinen der DNA-Replikationsmaschienerie oder der mismatch Reparatur interagiert. Um mögliche Interaktionspartner der Dam-MTase zu finden und so möglicherweise die Funktionsweise dieses Enzyms innerhalb der Zelle zu klären, wurden verschiedene Versuche angewandt, um Interaktionspartner zu detektieren.

3.1 Vivapure Epoxy Coupling Kit und Pulldown

Das Vivapure Epoxy Coupling Kit verwendet eine Epoxy Membran. Ziel war es die aufgereinigte Dam-MTase an diese Membran zu binden und anschließend die löslichen Bestandteile des Zelllysats von *E.coli* JM 109 Zellen über die Säule laufen zu lassen. Die Proteine die fähig sind mit der Dam-MTase zu interagieren, sollten mit dieser zusammen eluiert werden. Auf einem silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel sollten bei einer erfolgreichen Durchführung eine Bande für die Dam-MTase und eine

bzw. mehrere zusätzliche Banden zu sehen sein. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Weder nach einer Aufkonzentrierung des Eluats durch Biomax Konzentratoren (siehe B 9.1.11), noch durch eine TCA Fällung des Eluats waren zusätzliche Banden zu der Bande der Dam-MTase zu detektieren. Für den Misserfolg könnten mehrere Faktoren ausschlaggebend gewesen sein. Zum einen ist es möglich, dass die Interaktionen zwischen der Dam-MTase und den Interaktionspartnern zu schwach war und die Interaktionspartner bei den verwendeten Bedingungen gewaschen wurden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Dam-MTase unter den zu verwendeten Bedingungen auf der Membran aggregierte und die Membran verstopft hat. Dies ist sehr wahrscheinlich, da die Durchflußgeschwindigkeit des Zellysats sehr gering war.

Ein weiterer Versuch Interaktionspartner der Dam-MTase zu detektieren war ein Pulldown Assay. Dafür wurde zunächst wie in B 6.1 beschrieben die Dam-MTase aufgereinigt und an die Ni-NTA-*Magnetic Agarose Beads* gebunden. Anschließend wurden die löslichen Bestandteile des Zellysats von JM 110 *E.coli* Zellen zu den *Beads* gegeben. Beim Eluieren sollten die putativen Interaktionspartner mit der Dam-MTase eluiert werden und anschließend mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung detektiert werden. Bei einer erfolgreichen Suche von Interaktionspartnern sollten zusätzliche Banden zu der Dam-MTase Bande auf dem Gel zu detektieren sein. Allerdings konnten keine zusätzlichen Banden detektiert werden. Alternativ wurde die aufgereinigte Dam-MTase mit dem JM 110 Zellysat mit UV Licht oder Glutaraldehyd gecrosslinkt und anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Sollte es in diesem Falle zu Interaktionen gekommen sein, sollten Banden auftreten mit einem Molekulargewicht das größer ist als das der Dam-MTase alleine. Leider konnten auch in diesem Falle keine Banden detektiert werden.

Aus den Versuchen kann man schlussfolgern, dass keine Proteine, die in großen Mengen in der Zelle vorhanden waren und die eine hohe Affinität für die Dam-MTase besitzen, als Interaktionspartner vorhanden waren. Allerdings können auch technische Schwierigkeiten nicht ausgeschlossen werden, da keine Positivkontrolle zur Verfügung stand.

3.2 *Far western Analyse*

Die *far western* Analyse ist eine Möglichkeit um Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen. Dabei wird ein Protein oder mehrere Proteine, die als Interaktionspartner in Frage kommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. In meinem Falle wurde ein *E.coli* Ganzzellysat verwendet. Anschließend wird die Membran mit zwei verschiedenen Blockingpuffern geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Dann wird das Protein nach dessen Interaktionspartner gesucht wird (in diesem Falle die Dam-MTase) in einem Interaktionspuffer zu der Membran gegeben. Die Dam-MTase kann dann mit den Proteinen auf der Membran interagieren. Die Protein-Protein-Interaktion wird durch UV-Crosslink fixiert. Die Sichtbarmachung der Interaktion erfolgt durch die Detektion der Dam-MTase mittels Westernblot mit anti-His AK (detektiert des His-Tag der Dam-MTase). Kann also die Dam-MTase auf der Membran detektiert werden, hat sie mit diesem Protein an dieser Stelle auf der Membran interagiert. Durch Vergleich der Stellen an denen die Dam-MTase in den *far western* Experimenten auf den Membranen detektiert wurde mit einem 2D SDS-Gel auf dem das *E.coli* Ganzzellysat aufgetrennt wurde, konnten die Interaktionspartner gefunden werden. Sie wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischen Untersuchungen identifiziert. Als Kontrollen wurden die *far western* Experimente mit dem Protein R.EcoRV anstelle der Dam-MTase durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich bei den gefundenen Interaktionen mit der Dam-MTase um unspezifische Interaktionen handelt. Um zu testen, ob der zweite AK alleine im Westernblot zur Detektion der Dam-MTase ausreicht und somit falsche Ergebnisse liefern würde, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt ohne den ersten AK (anti-His) einzusetzen. Außerdem wurden die Experimente durchgeführt ohne die Zugabe von Dam-MTase oder R.EcoRV, um zu überprüfen, ob der anti-His AK an sich Proteine des *E.coli* Ganzzellysates auf der Membran zu detektieren. Dies würde ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führen. Um zu testen, ob der Westernblot mit dem anti-His AK als ersten AK funktioniert, wurden 25 pmol Dam-MTase oder R.EcoRV nach der Durchführung der *far western* Experimente nach dem UV-Crosslink an einer Ecke der Membran aufgetragen und eintrocknen gelassen. Dies war eine wichtige Kontrolle für den Fall, dass keine Interaktion detektiert werden konnte. Konnte dieser Proteinspot in dem nachfolgenden Westernblot detektiert werden, war nachgewiesen, dass der Westernblot an sich funktioniert hat. Es wurden

verschiedene *far western* Protokolle ausgetestet. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll ist an das *far western* Protokoll aus den „*Current Protocols of Protein Science*“ (Ref.) angelehnt. Es wurde für diese Arbeit aber weiter optimiert.

3.2.1 Optimierung des *far western* Experiments

Um bei der *far western* Analyse keine unspezifischen Interaktionen zu bekommen wurden die Durchführung und die Pufferbestandteile des Protokolls optimiert (siehe Tab.18 B 11.5). Dabei zeigte sich, dass eine Proteinkonzentration von 25 µg/ml Dam-MTase für das Detektieren von Interaktionen notwendig ist. Wurde weniger Dam-MTase eingesetzt, konnten keine Interaktionen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass keine PVDF Membran für das Experiment verwendet werden konnte, da die gesamte Membran durch die Detektionsreaktion des Western Blots lila wurde. Es wurde in Folge Nitrocellulosemembran verwendet. Für den Blocking Puffer I wurden verschiedene Tween-20 und PBS Konzentrationen getestet. Es zeigte sich eine Tween-20 Konzentration von 0.1 % [v/v] und eine 2 x PBS Konzentration als beste Lösung. Für den Blockingpuffer II wurden verschiedene Konzentrationen an Magermilchpulver, PBS oder TBST und das verwenden von verschiedenen Diättrinks statt des Magermilchpulvers getestet. Die besten Konditionen waren 5% [w/v] Magermilchpulver in 2 x PBS. Für den Interaktionspuffer stellte sich heraus, dass ein Zufügen von 20 mM Imidazol zu 5% [w/v] Magermilchpulver in 2 x PBS die unspezifischen Interaktionen verringerte. Als Waschpuffer wurde ebenfalls 2 x PBS verwendet.

3.2.2 *far western* Experiment

Mit den optimierten Bedingungen (s.o.) wurden drei *far western* Experimente mit allen oben erwähnten Kontrollen durchgeführt. Dabei zeigten sich bei den *far western* Experimenten mit der Dam-MTase als Interaktionspartner mehrere Spots auf den Membranen, wie in Abb. 26 exemplarisch an einem *far western* Experiment. An diesen Stellen hat die Dam-MTase an das Protein welches an dieser Stelle auf die Membran geblottet wurde, gebunden. In diesen drei Experimenten wurden nicht immer die gleichen Spots detektiert werden. Für die Identifikation der Interaktionspartner wurden diejenigen Spots ausgewählt, welche in mindestens zwei

der drei Versuche wiederholt detektiert werden konnten. Die detektierten Spots sind umkreist. In den Experimenten die mit dem Enzym R.EcoRV anstelle der Dam-MTase durchgeführt wurden, konnte keine Interaktion detektiert werden, ebenso in den Experimenten ohne Zugabe an Dam-MTase bzw. an anti-His AK. Der Spot aus 25 pmol Dam-MTase oder R.EcoRV, der nach dem *far western* Experiment nach dem UV-Crosslinken in eine Ecke der Membran aufgetragen wurde, konnte in jedem Fall, außer in den Experimenten, die nur mit dem zweiten AK durchgeführt wurden, detektiert werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass in den Experimenten, in denen R.EcoRV eingesetzt wurde und keine Interaktionen zu detektieren waren, die Ursache dafür ein nicht funktionierender Westernblot war.

Somit zeigte sich, dass die Dam-MTase mit einigen Proteinen des *E.coli* Ganzzelllysates interagiert. Da bei der Durchführung der Experimente mit R.EcoRV keine Interaktionen detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktionen die die Dam-MTase aufweist, spezifisch sind. Ebenso konnte ausgeschlossen werden, dass der erste oder zweite AK alleine diese Proteine detektieren konnte.

Es wurden für die Identifikation 17 Interaktionspartner ausgewählt.

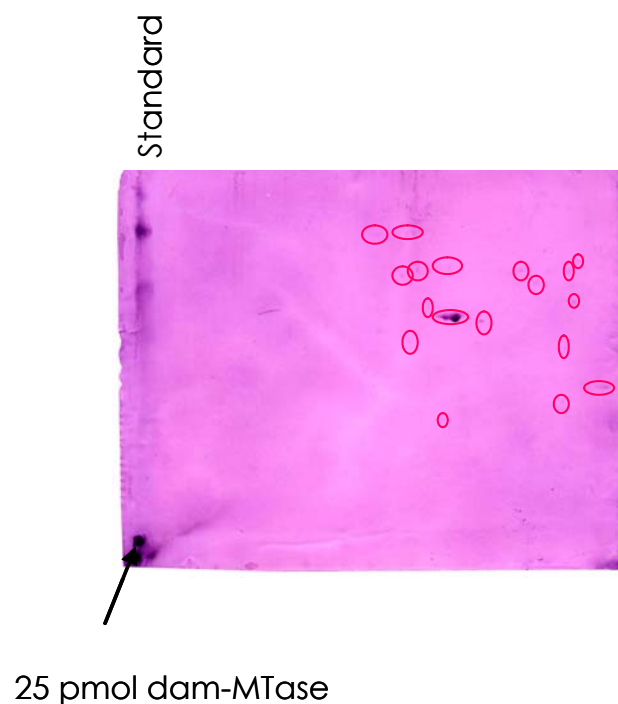


Abb. 26: *far western* Experiment. Die detektierten Interaktionen sind rot umrandet

3.3 Identifikation der Interaktionspartner

Um die Interaktionspartner zu identifizieren mussten die Spots auf den *far western* Membranen Spots auf einem 2D-Gel zugeordnet werden. Dazu wurden Bilder der drei *far western* Experimente und ein Bild eines 2D-SDS Gels in dem Programm Adobe Photoshop übereinandergelegt und die Spots auf den Membranen Proteinspots auf dem 2D Gel zugeordnet. Auch hier kann man erkennen, dass die Interaktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch sind, da nicht nur die Proteine, welche in großer Menge in *E.coli* vorkommen wie z.B. Spot 1 und 2, sondern auch Proteine, die in geringer Menge vorkommen, wie z.B. Spot 7 und 9 als Interaktionspartner detektiert wurden.

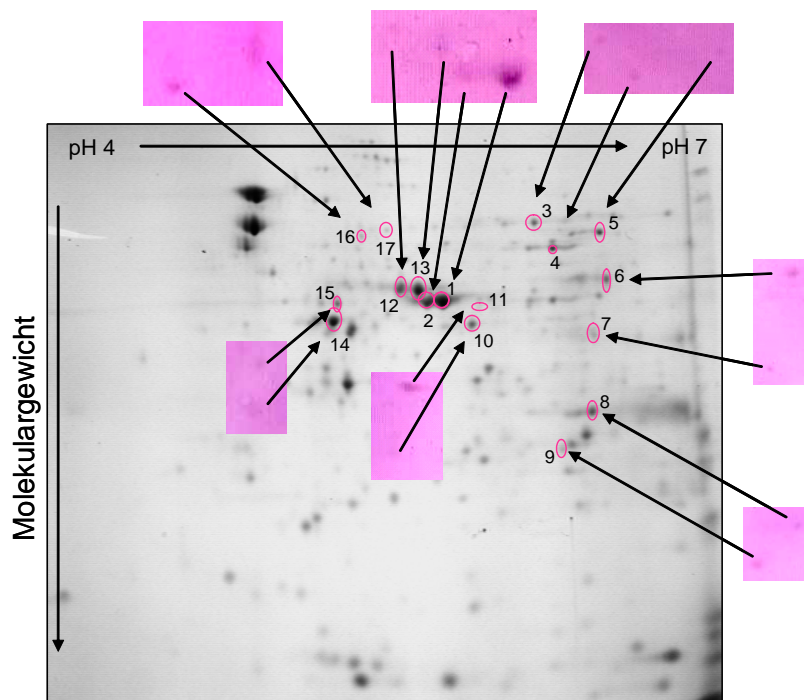


Abb. 27: Colloidal Coomassie gefärbtes 2D-SDS-Gel. In lila: Interaktionen detektiert durch *far western* Experimente. Die zugeordneten Interaktionspartner sind rot umrandet und nummeriert

Die Proteinspots wurden zum einen aus dem Sypro-Orange gefärbten Gel ausgeschnitten und zur Fa. Bruker Daltonik geschickt. Zum anderen wurde ein weiteres 2D-Gel mit kolloidalem Coomassie (MBI Fermentas) gefärbt, die Spots ausgeschnitten und der tryptische Verdau selbst durchgeführt (siehe B 11.7.3). Die Identifizierung dieser Spots erfolgte durch Robert Ahrends, HU Berlin. Bruker Daltonik identifizierte Spot Nr. 1-6 mittels MALDI-TOF MS, R. Ahrends identifizierte die Spots 1-17

mittels Nano-HPLC/Nano-ESI MS. In Tab. 20 sind die identifizierten Proteine mit ihrem Molekulargewicht und den Gennamen aufgelistet. Die Spots 5, 11, 16 und 17 konnten nicht identifiziert werden.

Tab. 20: Identifikation der Interaktionspartner durch massenspektrometrische Analysen. n.i.: nicht identifiziert

Interaktionspartner identifiziert durch <i>far western</i> und massenspektrometrische Analysen				
Spot	MALDI-TOF MS und/oder ESI	Gen	Protein (Swiss-Prot)	Molekulargewicht [kDa]
1; 2	MALDI-TOF und ESI	tuf A	Elongationsfaktor Tu (P02990)	44
3	MALDI-TOF und ESI	pykF	Pyruvat-Kinase (P14178)	51.4
4	MALDI-TOF und ESI	atpA	ATP-Synthase (P00822)	55.9
6	MALDI-TOF und ESI	glyA	Serin-Hydroxymethyltransferase (P00477)	46
7	ESI	galE	UDP-Galactose-4-Epimerase (P09147)	37.9
8	ESI	gatY	Tagatose-Biphosphat-Aldolase (P37192)	31.5
9	ESI	udp	Uridin-Phosphorylase (P12758)	27.8
10	ESI	fbaA	Fructose-Biphosphat-Aldolase (P11604)	39.8
12;13	ESI	eno	Enolase (P08324)	46.3
14	ESI	pgk	Phosphoglycerat-Kinase (P11665)	41.8
15	ESI	deoB	Phosphopentomutase/Desoxyribouratase (P07651)	45.1
5;11;16;17	MALDI-TOF und ESI	n.i.	n.i.	n.i.

3.4 Biochemische Untersuchungen der Interaktionspartner

Obwohl man aus den Kontrollen, die bei den *far western* Experimenten durchgeführt wurden, die Schlussfolgerung ziehen kann, dass es sich bei den identifizierten Interaktionen zwischen der Dam-MTase und den in Tab. 20 aufgelisteten Proteinen um spezifische Interaktionen handelt, sollten diese Interaktionen durch ein biochemisches Experiment weiter analysiert und verifiziert werden. Dazu wurde die genomische Sequenz der in Tab. 20 aufgelisteten Gene von dem *E.coli* Genom amplifiziert und in den Vektor pGEX-6P-2 als GST-Fusionsproteine kloniert. Die

Plasmide, die als positiv identifiziert und sequenziert wurden, wurden in HMS 174 (DE3) Zellen transformiert und in kleinem Volumen induziert. Konnte das Protein induziert werden wurde das Protein in großem Maßstab aufgereinigt, gelelektrophoretisch analysiert und die Konzentration bestimmt (siehe Tab. 21). Anschließend wurde ein mit den aufgereinigten GST-Proteinen und der Dam-MTase, welche einen His-*Tag* trägt) ein Interaktionsassay durchgeführt. Dazu wurden die GST-Proteine an die Glutathion-Sepharose gebunden. Nach Entfernen der ungebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen mit einem Puffer mit 100 mM NaCl wurde die Dam-MTase zu gegeben. Diese konnte dann mit dem GST-Protein, welches an der Glutathio-Sepharose gebunden ist, interagieren. Nachfolgend wurde wieder gewaschen, um ungebundene Dam-MTase zu entfernen. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose mit den daran gebundenen Interaktionspartnern auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Hinterher wurde die die Dam-MTase mittels Westernblot mit anti-His AK als erstem AK detektiert. Hat die Dam-MTase mit dem GST-Protein interagiert, sollte sie als Bande zu detektieren sein. Um zu überprüfen, in welchem Maße die Dam-MTase selbst an die Glutathion-Sepharose gebunden hat, wurde das Experiment ohne die Zugabe des GST-Proteins durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde auf das Gel 25 pmol Dam-MTase mit aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde das Experiment mit dem GST-*Tag* alleine durchgeführt. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Interaktion durch den GST-*Tag* vermittelt wird. Als weitere Kontrolle wurden die GST-Proteine nach Bindung an die Glutathionsepharose gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrcellulosemembran geblottet und mittels des anti-His AK detektiert. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die GST-Proteine mit dem anti-His AK detektiert wurden.

Tab. 21: Zusammenfassung der biochemischen Schritte

Gen	Amplifikation	Positiv identifiziert	Positiv sequenziert	Gelungene Proteininduktion	Protein aufgereingt
tufA	+	+	+	+	+
pykF	+	+	+	+	+
atpA	+	+	+	+	+
glyA	+	+	+	+	+
galE	+	+	+	+	+
gatY	+	+	+	+	-
Udp	+	+	+	+	+
fbaA	+	+	+	+	+
Eno	+	+	+	+	+
Pgk	+	+	+	+	+
deoB	+	+	+	+	+
mutH	+	+	+	+	-
holA	+	+	+	+	-
holB	+	+	+	+	-
holC	+	+	+	+	-
holD	+	+	+	+	-
holE	+	+	+	+	-
dnaQ	+	+	+	+	-
dnaN	+	-	-	-	-
dnaE	+	-	-	-	-
dnaX	+	+	?	-	-
polA	+	-	-	-	-
ligA	+	-	-	-	-
ligB	+	+	?	-	-
mutS	+	-	-	-	-

Die Gene *mutS*, *ligA*, *polA*, *dnaE* und *dnaN* konnten aus dem *E.coli* K12 Genom amplifiziert werden, bis jetzt konnte allerdings noch kein Klon als positiv identifiziert werden. Das Gen für *dnaX* und *ligB* konnte amplifiziert werden und es wurden auch positive Klone gefunden, aber eine bestätigende Sequenzierung steht noch aus. Die Gene für *dnaQ*, *mutH*, *holA-E* konnten in den Vektor kloniert, als positiv identifiziert und sequenziert werden und eine Induktion der Proteinexpression war erfolgreich. Es fehlt noch die Aufreinigung dieser Proteine und die Durchführung des Interaktionsassays. Alle anderen Gene konnten kloniert werden und die Korrektheit der Sequenz wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Proteine für die diese Gene codieren wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt (siehe B 6.3). Die einzige Ausnahme bestand in *GatY*, welches sich induzieren ließ, sich aber immer in *inclusion bodies* befand und sich deswegen nicht aufreinigen ließ. Der Interaktionsassay wurde mit den Kontrollen wie oben beschrieben für jeden Interaktionspartner drei bis fünf Mal wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die GST-Proteine nicht durch den anti-His-Antikörper detektiert wurden. Bei der Durchführung des Interaktionsassays mit dem

GST Protein alleine zeigte sich, dass dieses keine Interaktion mit der Dam-MTase einging, wie in Abb. 28 zu sehen ist.

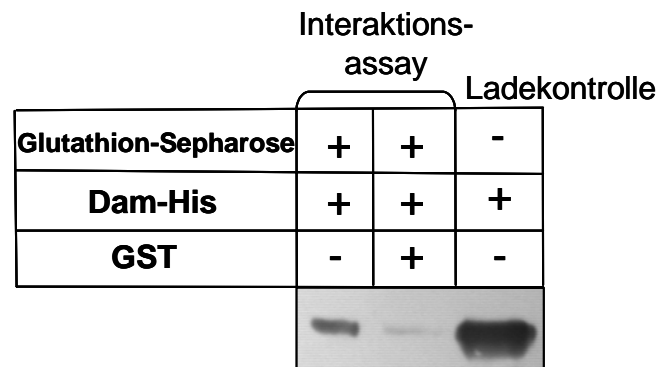


Abb. 28: Interaktionsassay mit dem GST-Tag als Interaktionspartner der Dam-MTase

In Spur eins wurde die Glutathin-Sepharose aufgetragen, die mit der Dam-MTase inkubiert wurde ohne vorherige Inkubation mit dem GST-Protein. Es zeigt sich, dass die Dam-MTase in gewissem Maße an die Glutathion-Sepharose bindet. In Spur zwei ist das Interaktionsexperiment mit dem GST-Tag aufgetragen. Es zeigt sich eine schwächere Bande als in Spur eins. Würde der GST-Tag alleine mit der Dam-Mtase interagieren, würde man hier eine Bande erwarten, deren Intensität die der Bande in Spur eins übersteigt. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass der GST-Tag alleine mit der Dam-MTase interagiert. In Spur drei ist die Menge an MTase aufgetragen die in das Experiment eingesetzt wurde. Sie dient als Lade- und Laufkontrolle. In Abb. 29 ist exemplarisch die Interaktion des Proteins GlyA mit der Dam-MTase dargestellt.

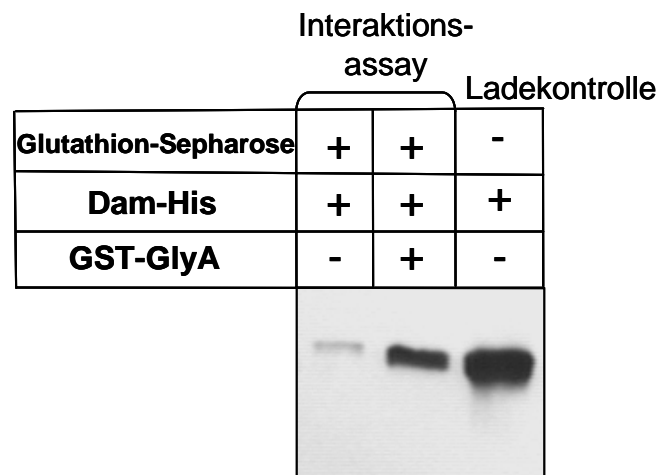


Abb. 29: Interaktionsassay mit der Serin-Hydroxymethyltransferase als Interaktionspartner der Dam-MTase

In Spur eins sieht man eine leichte Bande, was die Hintergrundbindung der Dam-MTase an die Glutathionsepharose darstellt (s.o.). In Spur zwei ist das Interaktionsexperiment aufgetragen. Man sieht eine dicke Bande, die durch den anti-His AK detektiert wurde. Da die Intensität dieser Bande die Bande in Spur eins übersteigt, kann man schlussfolgern, dass die Dam-MTase mit der Serin-Hydroxymethyltransferase interagiert. In Spur drei sieht man die Ladekontrolle von 25 pmol Dam-MTase. In Tab. 22 sind die Ergebnisse der bis jetzt durchgeführten Interaktionsexperimente dargestellt. Die Experimente wurden drei bis fünf Mal wiederholt. Wie oben erwähnt konnte GatY nicht aufgereinigt werden, demzufolge konnte auch das Interaktionsexperiment nicht durchgeführt werden. Für GalE und Pgc zeigte sich kein einheitliches Bild in den Interaktionsassays. Sie wurden demzufolge so bewertet, dass sie keine Interaktionspartner der Dam-MTase darstellen. Für die anderen untersuchten Proteine konnte die Interaktion, die sich im *far western* Experiment zeigte, verifiziert werden.

Tab. 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Interaktionsexperimente. n.i.: nicht identifiziert

Interaktionspartner identifiziert durch <i>far western</i> und Massspekrometrische Analysen					Interaktion verifiziert durch <i>pulldown</i> experimente (3-5 Mal)
Spot	MALDI-TOF MS and/or ESI	Gen	Protein (Swiss-Prot)	Molecular Weight [kDa]	
1; 2	MALDI-TOF and ESI	tuf A; tufB	Elongationsfaktor Tu (P02990)	44	ja
3	MALDI-TOF and ESI	pykF	Pyruvat-Kinase (P14178)	51.4	ja
4	MALDI-TOF and ESI	atpA	ATP-Synthase (P00822)	55.9	ja
6	MALDI-TOF and ESI	glyA	Serin-Hydroxymethyltransferase (P00477)	46	ja
7	ESI	galE	UDP-Galactose-4-Epimerase (P09147)	37.9	nein
8	ESI	gatY	Tagatose-Biphosphat-Aldolase (P37192)	31.5	n.i.
9	ESI	udp	Uridin-Phosphorylase (P12758)	27.8	ja
10	ESI	fbaA	Fructose-Biphosphat-Aldolase (P11604)	39.8	ja
12;13	ESI	eno	Enolase (P08324)	46.3	ja
14	ESI	pgk	Phosphoglycerat-Kinase (P11665)	41.8	nein
15	ESI	deoB	Phosphopentomutase/Desoxyribou ratase (P07651)	45.1	nein
5;11; 16;17	MALDI-TOF and ESI	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

D Diskussion

Die Dam-MTase aus *E.coli* ist eine solitäre Methyltransferase, die das Adenin der Erkennungssequenz 5'-GATC-3' methyliert. Sie reguliert in *E.coli* die Expression vieler Gene in vielen Stoffwechselwegen, Synchronisiert die DNA-Replikation mit dem Zellzyklus, ist verantwortlich für die Segregation der Chromosomen und spielt eine wichtige Rolle in der postreplikativen *mismatch* Reparatur (MMR). Nach der Replikation liegt die DNA hemimethyliert vor, da der neusynthesierte Strang noch nicht durch die Dam-MTase remethyliert wurde. In der Zeitspanne zwischen Replikation und Remethylierung erfolgt die MMR, welche an der Methylierung diskriminieren kann, welcher Strang der neusynthetisierte ist und somit die fehlerhafte Base trägt. Diese drei Prozesse, die DNA-Replikation, die MMR und die Remethylierung durch die Dam-MTase müssen demnach zeitlich und räumlich koordiniert ablaufen. Bis jetzt ist noch nicht bekannt, wie diese Koordination sichergestellt wird. Wie in A 5 bereits erwähnt, deuten die Mehrzahl der Experimente auf eine schnelle Remethylierung des *E.coli* Genoms nach der Replikation durch die Dam-MTase hin. So schlussfolgerten Stancheva et al (1999) aus ihren Studien mit Plasmidmolekülen, dass die Remethylierung der Replikationsgabel nicht mehr als 2000-4000 bp hinterherhinkt. Sie nutzen dazu einen Methylierungssensitiven Restriktionsenzym Versuch. Ein mögliches Modell wäre, dass die Dam-MTase mit der Replikationsmaschienerie interagiert und die Größe der hemimethylierten DNA Region durch einen DNA *loop*, an dem dann die MMR stattfinden kann, kontrolliert wird (siehe Abb. 30). Man weiß, dass die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III (codiert durch das Gen *dnaN*) mit den MMR Proteinen MutL und MutS, sowie mit der Ligase und der DNA-Polymerase I (codiert durch das Gen *polA*) interagiert (Lopez de Saro, 2001, 2006). Ein anderes Modell wäre, dass die Dam-MTase mit den Proteinen der MMR interagiert, z.B. MutS, und so die Koordination der drei Prozesse gewährleistet ist. Mit der Suche nach Interaktionspartnern und der Intrazellulären Lokalisation der Dam-MTase sollte dieser Fragestellung nachgegangen werden.

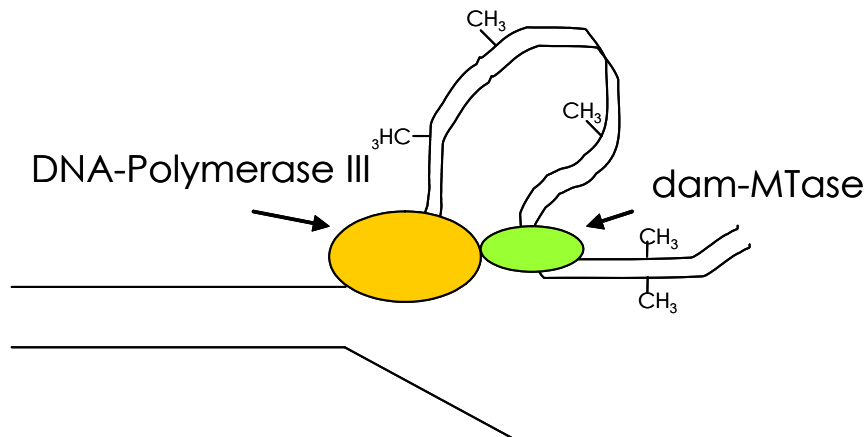


Abb. 30: Schematische Darstellung des vereinfachten Modells zur möglichen Koordination der DNA-Replikation und der Dam-MTase Remethylierung.

1 Intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, hat sich in der Molekularbiologie die Fusion des Proteins mit dem GFP-Protein bewährt (Margolin, 2000). Dieser Ansatz wurde auch in dieser Arbeit gewählt, um die intrazelluläre Lokalisation der Dam-MTase zu untersuchen. Dazu wurde ein DamGFP-Fusionsprotein kloniert und exprimiert. Es wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein *in vivo* wie *in vitro* methylierungsaktiv ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein *in vivo* stabil ist. Für das aktive DamGFP-Fusionsprotein zeigte sich in 81 von 100 fluoreszenten Zellen eine Lokalisation an einem Pol der Zelle. 12 Zellen zeigte sich eine Lokalisation an beiden Zellpolen. Da die Zelllänge dieser Zellen sich nicht von der Zelllänge der Zellen mit nur einem Spot unterscheidet, kann man nicht davon ausgehen, dass die Zellen mit zwei Spots Zellen sind, die kurz vor der Zellteilung stehen und jede Tochterzelle einen polaren Spot trägt. Man weiß von einigen Proteinen, dass sie von Pol zu Pol wandern, wie z.B. das MinC Protein in *E. coli* (Raskin & de Boer, 1999). Es ist denkbar, dass dies für die Dam-MTase ebenfalls der Fall ist und die Zellen, in denen zwei polare grün fluoreszierende Spots auftreten, Zellen sind die ein Zwischenstadium zeigen, in dem einige Proteine bereits an dem anderen Pol sind und der Rest nach an dem alten Pol. *Time lapse* Experimente könnten diese Frage beantworten und sind für die Zukunft geplant. Sieben Zellen zeigen eine Lokalisation des DamGFP-Proteins in der gesamten Zelle. Es zeigte sich auch, dass umso mehr Zellen eine polare Lokalisation des Fusionsproteins zeigen, je mehr Protein produziert

wurde. Dies kann so erklärt werden, dass der verwendete E.coli Stamm (Tuner pLysS) *dam* positiv ist, das bedeutet, dass endogene Dam-MTase hergestellt wird. Wenn man davon ausgeht, dass die Lokalisation der Dam-MTase funktional ist, dann würde die endogene Dam-MTase ebenfalls am Zellpol lokalisiert sein. Wird das DamGFP-Fusionsprotein dann vom Plasmid exprimiert, lokalisiert es zunächst in der gesamten Zelle und verdrängt dann die endogene Dam-MTase vom Zellpol. Man könnte argumentieren, dass in den Zellen, die eine Fluoreszenz in der gesamten Zelle aufweisen, das DamGFP-Fusionsprotein noch nicht die endogene Dam-MTase vom Zellpol verdrängt hat. Da die polare Lokalisation der Dam-MTase selbst bei einer sehr geringen Induktion mit 0.01 mM IPTG zu sehen ist, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um ein „Ablagern“ von zuviel produzierter Dam-MTase handelt. Da das GFP-Protein alleine in der gesamten Zelle verteilt ist, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Lokalisation des Fusionsproteins durch das GFP-Protein verantwortet wird.

In dem oben erwähnten hypothetischen Modell interagiert die Dam-MTase mit der DNA-Polymerase III. Wäre dies der Fall müssten sich auch die Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie an dem Zellpol befinden. Es finden sich in der Literatur zwei Modelle dafür wie und wo in der E.coli Zelle die Replikation stattfindet. In dem einen Modell (*fixed replication factories*) bleiben zwei gepaarte Replikationsapparate in der Mitte der Zelle bis die Replikation des Chromosoms abgeschlossen ist und wandern dann auseinander an die $\frac{1}{4}$ bzw. $\frac{3}{4}$ Position der Zelle. In dem anderen Modell (*translocating replication factories*) paaren sich auch zwei Replikationsapparate in der Mitte der Zelle für die Initiation der Replikation, bewegen sich aber dann schnell entgegengesetzt zu der $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Position der *E.coli* Zelle (Onogi et al, 2002). Für beide dieser Modelle gibt es Evidenzen, wobei die Mehrzahl der Experimente auf das zweite Modell hinweisen. So zeigten immunofluoreszenzexperimente, dass die β -Untereinheit der DNA-Polymerase III (codiert durch das Gen *dnaN*) in nicht replizierenden Zellen an den Zellpole lokalisiert ist und bei Initiation der Replikation zur Mitte der Zelle rekrutiert wird, um dann wieder in Richtung der Zellpole zu wandern (Onogi et al, 2002). Die Dam-MTase müsste demnach dasselbe Verhalten zeigen. Dies kann im Moment nicht bestätigt werden. Notwendig dazu wäre time lapse Experimente, die für die Zukunft geplant sind. Außerdem wird dies noch zusätzlich durch die geplanten Interaktionsassays und Kolokalisationsstudien (siehe Punkt 2) weiter überprüft. Über die intrazelluläre Lokalisation der MMR Proteine, wie MutS, ist noch nichts bekannt. Interaktionsstudien

und Kolokalisationsstudien mit MutS und MutH sind geplant, um Aufschluss darüber geben zu können, ob die Dam-MTase evtl. mit diesen Proteinen interagiert und somit die räumliche und zeitliche Koordination der drei Prozesse erfolgen kann.

Gordon et al. (2002) zeigten, dass der *oriC* des *E. coli* Chromosoms zu Beginn der Replikation in der Zellmitte lokalisiert ist, dann aber an die Pole wandert. Es könnte sein, dass die Dam-MTase an den *oriC* bindet oder an dieselben Strukturen an der Membran. Um diesen Punkt weiter zu untersuchen könnten Kolokalisationsstudien mit dem Protein DnaA durchgeführt werden, welches an den *oriC* bindet um die replikation zu initiieren oder SeqA, welches an den hemimethylierten *oriC* bindet, um eine erneute Initiation zu verhindern. Von SeqA ist bekannt, dass es bei Beginn der Replikation in der Zellmitte lokalisiert ist, und dann zu der $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Position in der Zelle wandert (Hiraga et al, 1998).

Durch die Behandlung der Zellen mit Aztreonam können sich die Zellen nicht mehr teilen. Es entstehen fädige *E. coli* Zellen. Das aktive DamGFP-Fusionsprotein lokalisiert in den mit Aztreonam behandelten Zellen an den Polen und entlang der Zelle an der Membran in gewissen Abständen. Die Distanz zwischen den Spots entsprach der Distanz von einem Spot zum anderen Zellpol in unbehandelten Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass in den Aztreonam behandelten Zellen die Dam-Mtase an potentiellen Zellteilungsstellen lokalisiert. Dasselbe Muster wurde z.B. für das IcsA Protein gezeigt, welches in *Shigella* ein Protein der äußeren Membran ist und den Aufbau des Aktinschwanzes vermittelt, wodurch das Bakterium in der Lage ist sich innerhalb der Wirtszelle zu bewegen (Janakiraman & Goldberg, 2004).

Um zu untersuchen, ob die polare Lokalisation der Dam-MTase etwas mit der Aktivität dieses Enzyms zu tun hat wurde eine methylierungsinaktive DamGFP-Variante Dam(APPY)GFP hergestellt. Bei dieser Variante ist die Aminosäure Aspartat des katalytischen Zentrums DPPY gegen ein Alanin eingetauscht. Dadurch kann die Dam-MTase zwar an die DNA binden, den Methylgruppentransfer allerdings nicht mehr katalysieren (Liebert et al, 2004). Diese methylierungsinaktive Variante zeigte keine polare Lokalisation, sondern war in der gesamten Zelle verteilt. Auch in den Aztreonam behandelten Zellen zeigte sie eine Lokalisation in der gesamten Zelle. Somit ist die polare Lokalisation der Dam-MTase verbunden mit der katalytischen Aktivität des Enzyms. Der Grund warum diese Mutante nicht polar lokalisiert ist, könnte darin liegen, dass diese Mutante die GATC Stellen binden kann, aber die DNA nicht methyliert und somit an der DNA gebunden bleibt. Dadurch würde dieses

Enzym dann mit der replizierten DNA „mitgeschoben“ und könnte nicht in einem Focus lokalisiert sein. Diese Hypothese kann mittels Messungen der Dissoziationsgeschwindigkeit der Dam-MTase und der Mutante von der DNA untersucht werden, die derzeit in Planung sind. *Time lapse* Experimente und Kolokalisationsstudien mit den Proteinen, welche im Interaktionsexperiment gefunden wurden, sollen weiteren Aufschluss über die Funktionsweise der Dam-MTase und die räumliche und zeitliche Koordination mit der Replikation und der MMR geben. Zusammenfassend geben diese Studien deutliche Hinweise auf eine ausgeprägte subzelluläre Strukturierung in *E.coli*, die mit funktionellen Aufgaben verbunden ist. Dafür dass solch eine Strukturierung in vielen Bakterien vorhanden ist, spricht die erstaunliche Anzahl an Proteinen, die an einem oder beiden Polen der Zelle lokalisiert sind, wie z.B. Komponenten des Chemotaxis Apparates von *E.coli* und *Caulobacter crescentus* oder der *Vibrio cholerae* TypII Sekretionsapparat (Janakiraman & Goldberg, 2004).

2 Interaktionspartner der Dam-MTase

Bis jetzt sind keine Daten über Interaktionspartner der Dam-MTase bekannt. In dieser Arbeit wurde mit drei Methoden versucht Interaktionspartner dieses Proteins zu finden. Zum einen wurde das Vivapure Epoxy Coupling Kit verwendet, zum zweiten wurde versucht mittels Pulldown Experimenten Interaktionspartner aus den Ganzzelllysat von *E.coli* Zellen zu finden und es wurde zum dritten mit *far western* Analysen nach Interaktionspartnern gesucht. Die ersten beiden Methoden führten nicht zum Erfolg. Mit den *far western* Experimenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden 17 Interaktionspartner der Dam-MTase detektiert. Bei der Durchführung des Experiments mit R.EcoRV an Stelle der Dam-MTase konnten unter den verwendeten Bedingungen keine Interaktionen nachgewiesen werden. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, um zu testen, ob die Proteine, die als Interaktionspartner der Dam-MTase gefunden wurden, spezifisch mit der Dam-MTase interagieren. Oft werden in Interaktionsstudien Proteine gefunden, die mit vielen Proteinen wechselwirken (sog. „klebrige“ Proteine), und somit zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Dies konnte zumindest insofern ausgeschlossen werden, da die Interaktionspartner unter den gegebenen Bedingungen nicht an das Restriktionsenzym R.EcoRV binden können. Außerdem wurde das Experiment ohne die Zugabe der Dam-MTase durchgeführt, um zu testen, ob der anti-His AK, der zur

Detektion der Dam-MTase verwendet wurde, von sich aus an die Proteine auf der Membran bindet. Des Weiteren wurde untersucht, ob der zweite AK ohne den ersten AK die Dam-MTase oder Proteine des *E.coli* Ganzzelllysates binden kann. Alle diese Kontrollen fielen negativ aus, was bedeutet, dass keine Interaktionen nachgewiesen werden konnten. Somit kann man den Schluss ziehen, dass die gefundenen Interaktionen der Dam-MTase mit 17 Proteinen des *E.coli* Ganzzelllysates spezifisch sind. Elf dieser Proteine wurden nachfolgend durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert. Sie sind in Tab. 23 nochmals aufgelistet.

Tab. 23: Interaktionspartner identifiziert durch *far western* und massenspektrometrische Analysen

Spot	Gen	Protein	Funktion
1; 2	tuf A	Elongationsfaktor Tu	Elongationsfaktor, Chaperon
3	pykF	Pyruvat-Kinase	Glycolyse
4	atpA	ATP-Synthase	ATP Synthese
6	glyA	Serin-Hydroxymethyltransferase	Umwandlung von Serin in Glycin und umgekehrt
7	galE	UDP-Galactose-4-Epimerase	Bildung von UDP-Galactose aus UDP-Glucose
8	gatY	Tagatose-Biphosphat-Aldolase	Galactidolfermentation
9	udp	Uridin-Phosphorylase	Bildung von Uracil aus Uridin
10	fbaA	Fructose-Biphosphat-Aldolase	Glycolyse, Gluconeogenese
12;13	eno	Enolase	Glycolyse
14	pgk	Phosphoglycerat-Kinase	Glycolyse
15	deoB	Phosphopentomutase/Desoxyribouratase	Abbau von Thymidin

Was auffällt ist, dass alle Interaktionspartner Enzyme sind, die in verschiedenen Stoffwechselwegen eine Funktion übernehmen. So sind die Pyruvat-Kinase, die Fructose-Biphosphat-Aldolase, die Enolase und die Phosphoglycerat-Kinase Teil der Glycolyse. Wobei für die Enolase auch bekannt ist, dass dieses Enzym auch Bestandteil des RNA-Degradosoms ist (Chandran, 2006), welches an der Membran gebunden ist. Von dem Elongationsfaktor Tu ist bekannt, dass er an einem Lysin teilweise methyliert ist (Laursen, 1981) und dass er neben seiner Funktion als Elongationsfaktor auch als Chaperon wirkt (Malki, 2002). Dabei zeigten die Studien,

dass dieses Protein an hydrophobe Regionen anderer Proteine und an ungefaltete oder denaturierte Proteine binden kann. Es schützt Proteine zudem vor thermaler Denaturierung (Malki, 2002). Außerdem ist es das Protein, das in der *E.coli* Zelle am häufigsten vorkommt. *atpA* codiert für die α -Untereinheit der ATP-Synthase, die zu den F_0F_1 -ATpasen gehört. Die α -Untereinheit ist Teil des F_1 Komplexes welcher cytosolisch ist, der F_0 Komplex hingegen ist ein integrales Membranprotein. Die Serinhydroxymethyltransferase ist im Auf- und Abbau von Serin aus Glycin und der Bildung von C1 Komponenten und SAM beteiligt. So entsteht aus L-Serin und Tetrahydrofolat (THF) L-Glycin und 5,10-methylene-THF. Aus 5,10-methylene-THF entsteht zunächst 5-methyl-THF, welches dann die Methylgruppe an L-Homocystein abgibt und L-Methionin und THF gebildet wird. L-Methionin reagiert mit ATP und einem Wassermolekül zu Phosphat, Diphosphat und SAM. Die UDP-Galaktose-4-Epimerase ist an der Umwandlung von UDP-Glucose in UDP-Galactose, welches ein Vorläufermolekül für das Zellwand Lipopolysaccharid ist, beteiligt. Die Tagatose-Biphosphat-Aldolase spielt eine Rolle in der galactidol Fermentation. Die Uridin-Phosphorylase wandelt Uridin in Uracil und Ribose-1-Phosphat um, die Phosphopentomutase baut Thymidin ab. Dieses Ergebnis wurde so nicht erwartet. Da es um die Fragestellung ging wie die räumliche und zeitliche Koordination von Replikation, MMR und Remethylierung stattfindet wurde eher erwartet, dass die Dam-MTase mit Proteinen der Replikationsmaschienerie oder der MMR interagiert. Ein Grund warum diese Enzyme als Interaktionspartner nicht gefunden wurden könnte sein, dass sie in sehr geringer Menge in der *E.coli* Zelle vorkommen. So sind in einer *E.coli* Zelle z.B. nur 10-20 Moleküle der DNA-Polymerase III vorhanden (Kornberg A, 1992). Obwohl durch die bei den *far western* Experimenten durchgeführten Kontrollen, wie z.B. die Durchführung desselben Experimentes mit einem anderen *E.coli* Protein, nämlich R.EcoRV, der Schluss zulässig ist, dass es sich bei den gefundenen Interaktionen um spezifische Interaktionen handelt, wurden die Interaktionen biochemisch weiter untersucht um sie zu verifizieren. Dazu wurden die Interaktionspartner die im *far western* Experiment identifiziert wurden, sowie einige Proteine der Replikationsmaschienerie und der MMR als GST-Proteine kloniert und aufgereingt.

Tab. 24: Zusammenfassung der biochemischen Arbeitsschritte

Gen	Amplifikation	Positiv identifiziert	Positiv sequenziert	Gelungene Proteininduktion	Protein aufgereingt
tufA	+	+	+	+	+
pykF	+	+	+	+	+
atpA	+	+	+	+	+
glyA	+	+	+	+	+
galE	+	+	+	+	+
gatY	+	+	+	+	-
Udp	+	+	+	+	+
fbaA	+	+	+	+	+
Eno	+	+	+	+	+
Pgk	+	+	+	+	+
deoB	+	+	+	+	+
mutH	+	+	+	+	-
holA	+	+	+	+	-
holB	+	+	+	+	-
holC	+	+	+	+	-
holD	+	+	+	+	-
holE	+	+	+	+	-
dnaQ	+	+	+	+	-
dnaN	+	-	-	-	-
dnaE	+	-	-	-	-
dnaX	+	+	?	-	-
polA	+	-	-	-	-
ligA	+	-	-	-	-
ligB	+	+	?	-	-
mutS	+	-	-	-	-

Für die MMR wurden die Proteine MutH und MutS, codiert durch die Gene *mutH* und *mutS* als zu untersuchende Interaktionspartner ausgewählt, für die Replikationsmaschienerie die DNA-Polymerase I, codiert durch das Gen *polA*, sowie die Ligasen A und B (codiert durch die Gene *ligA* und *ligB*) und die DNA-Polymerase III (codiert durch die Gene *holA-E* und *dnaQ*, *dnaX*, *dnaN* und *dnaE*). Die Proteine, die in den *far western* Experiment als Interaktionspartner identifiziert wurden, konnten alle bis auf die Tagatose-Biphosphat-Aldolase, welche in *inclusion bodies* vorlag, als GST-Fusionsproteine kloniert und aufgereinigt werden. Für die restlichen Proteine konnten teilweise bereits positive Klone sequenziert werden bzw. die GST-Proteine induziert werden. Mit den aufgereinigten GST-Proteinen und der Dam-MTase wurde ein Interaktionsassay durchgeführt. Für sieben der im *far western* untersuchten Proteine

konnte die Interaktion mit der Dam-MTase verifiziert werden. In Tab. 25 ist das Ergebnis nochmals aufgelistet.

Tab. 25: Ergebnisse des Interaktionsexperimentes. n.i.: nicht identifiziert

Spot	Gen	Protein	Funktion	Interaktion verifiziert durch <i>pull-down</i> experimente (3-5 Mal)
1; 2	tuf A	Elongationsfaktor Tu	Elongationsfaktor, Chaperon	ja
3	pykF	Pyruvat-Kinase	Glycolyse	ja
4	atpA	ATP-Synthase	ATP Synthese	ja
6	glyA	Serin-Hydroxymethyltransferase	Umwandlung von Serin in Glycin und umgekehrt	ja
7	galE	UDP-Galactose-4-Epimerase	Bildung von UDP-Galactose aus UDP-Glucose	nein
8	gatY	Tagatose-Biphosphat-Aldolase	Galactidolfermentation	n.i.
9	udp	Uridin-Phosphorylase	Bildung von Uracil aus Uridin	ja
10	fbaA	Fructose-Biphosphat-Aldolase	Glycolyse, Gluconeogenese	ja
12;13	eno	Enolase	Glycolyse	ja
14	pgk	Phosphoglycerat-Kinase	Glycolyse	nein
15	deoB	Phosphopentomutase/Desoxyribouratase	Abbau von Thymidin	nein

Somit interagiert die Dam-Mtase nach den hier verwendeten Untersuchungsmethoden mit dem Elongationsfaktor Tu, der Pyruvat-Kinase, der ATP-Synthase, der Serin-Hydroxymethyltransferase, der Uridin-Phosphorylase, der Fructose-Biphosphat-Aldolase und der Enolase. Die Tatsache, dass der Elongationsfaktor Tu auch als Chaperon wirkt, könnte ein Grund sein, warum es als Interaktionspartner der Dam-Mtase identifiziert wurde. Die Serin-Hydroxymethyltransferase ist vernetzt mit dem C1-Metabolismus und dem Methionin Stoffwechselweg, bei dem auch SAM, der Kofaktor der Dam-MTase gebildet wird. Im Zuge der Remethylierung werden große Mengen SAM benötigt, die so in der Zelle nicht vorliegen. Deshalb ist eine schnelle Resynthese aus SAH erforderlich. Diese Ergebnis suggeriert, dass möglicherweise alle Enzyme der SAM Remethylierung (Serin-Hydroxymethyltransferase, 5,10-THF Reduktase, Cobalamin-abhängige Homocystein-Transmethylase und Methionin-Adenosyltransferase) während der prozessiven Methylierung der DNA in einem Komplex vorliegen, was die Bereitstellung von

genügend SAM für diese Aufgabe wesentlich erleichtern würde. Es ist geplant diese Proteine ebenfalls als GST-Proteine und CFP-Proteine zu klonieren und Interaktions- und Kolokalisationsstudien durchzuführen.

Wie in C bei den Aztreonam behandelten *E.coli* Zellen zu sehen ist, welche das aktive DamGFP-Fusionsprotein exprimieren, sind die grün fluoreszierenden Spots entlang der fädigen *E.coli* Zelle an der Membran lokalisiert. Womöglich geschieht das durch Bindung an die ATP-Synthase Untereinheit oder andere membranständige Proteine. Was der biologische Sinn der Interaktion der Dam-MTase zu den Proteinen Pyruvat-Kinase, Uridin-Phosphorylase, Fruktose-Biphosphat-Aldolase und Enolase ist, ist momentan nicht ersichtlich. Ein Weg diese Interaktionen weiter zu untersuchen, wäre die Gene für diese Proteine in *E.coli* Zellen auszuschalten und dann zu analysieren, welchen Einfluss dies auf die Zelle bzw. auf die Aktivität der Dam-MTase hat. Des Weiteren ist geplant, die Gene für alle Interaktionspartner als CFP-Fusionen zu klonieren und Kolokalisationsstudien mit dem DamGFP-Fusionsprotein durchzuführen, um so herauszufinden ob sie auch in denselben polaren Foci vorliegen. Außerdem sollen die Proteine aus der Replikationsmaschienerie und der MMR (siehe Tab. 24) als GST-Proteine kloniert (soweit noch nicht geschehen) und aufgereinigt werden und der Interaktionsassay mit der Dam-MTase durchgeführt werden.

E Referenzen

Arber, W. & Dussoix, D. (1962)

Host controlled modification of Bacteriophage λ

J. Mol. Biol., 5, 18-29

Edt. Ausubel F.M. et al., 1989

Current protocols in Molecular Biology Volume 1 +2

Barras, F. & Marinus, M.G. (1989)

The great GATC: DNA methylation in E. coli

Trends Genet., 5, 139-143.

Bell DC, Cupples CG (2001)

Very-short-patch repair in Escherichia coli requires the dam adenine methylase.

J Bacteriol. 183(12):3631-5

Bestor, T.H. & A. Coxon (1993)

Cytosine methylation: the pros and cons of DNA methylation.

Curr Biol. 3(6):384-6.

Boye E, Marinus MG, Lobner-Olesen A. (1992)

Quantitation of Dam methyltransferase in Escherichia coli.

J Bacteriol. 174(5):1682-5.

Braun, R.E. & Wright, A. (1986)

DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two E. coli dnaA promoters in vivo and in vitro

Mol. Gen. Genet., 202, 246-250.

Brendler, T. & Austin, S. (1999)

Binding of SeqA protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences
EMBO, 18, 2304-2310.

Campbell, J.L. & Kleckner, N. (1990)

E. coli oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork
Cell, 62, 967-979.

Chandran V, Luisi BF. (2006)

Recognition of enolase in the Escherichia coli RNA degradosome.
J Mol Biol. 358(1):8-15. Epub 2006 Feb 21

Cheng, X. (1995)

Structure and function of DNA methyltransferases
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 24, 293-318.

Cheng, X. & Roberts, R.J. (2001)

AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping
Nucleic Acids Res., 29, 3784-3795.

Edt. Coligan, J.E. (1995)

Current protocols in ProteinScience Vol.3

Correnti J, Munster V, Chan T, Woude M. (2002)

Dam-dependent phase variation of Ag43 in Escherichia coli is altered in a seqA mutant.
Mol Microbiol. 44(2):521-32.

Dryden, D.T.F., (1999)

Bacterial DNA methyltransferases

In: S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases: Structures and functions

Xiadong Cheng & Robert M. Blumenthal (eds.), pp. 283-340
1999 World Scientific Publishing

Dubendorff JW, Studier FW. (1991)

Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter.

J Mol Biol. 219(1):61-8.

Felsenfeld, G. & Groudine, M. (2003)

Controlling the double helix

Nature 421, 448-453

Goll MG, Bestor TH. (2005)

Eukaryotic cytosine methyltransferases.

Annu Rev Biochem. 74:481-514.

Gold, M. & Hurwitz, J. (1964)

The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. V. Purification and properties of the deoxyribonucleic acid-methylating activity of *Escherichia coli*

J. Biol. Chem., 239, 3858-3865.

Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R.M. & Cheng, X. (1997)

Structure of PvuII DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment

Nucleic Acids Res., 25, 2702-2715.

Gordon, G.S. Shivers, R.P. & A. Wright (2002)

Polar localization of the *Escherichia coli* oriC region is independent of the site of replikation initiation

Mol. Microbiol. 44(2): 501-507

Gruenbaum, Y., Cedar, H. and Razin, A. (1982) Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature*, 295, 620-622.

Guyot, J.B., Grassi, J., Hahn, U. & Guschlbauer, W. (1993)
The role of the preserved sequences of dam methylase
Nucleic Acids Res., 21, 3183-3190.

Hacker, J (eds.) (2000)
Molekulare Infektionsbiologie, S.99-100
Springer Verlag

Henaut A, Rouxel T, Gleizes A, Moszer I, Danchin A.(1996)
Uneven distribution of GATC motifs in the Escherichia coli chromosome, its plasmids and its phages.
*J Mol Biol.*257(3):574-85.

Hendrich, B. (2000) Methylation moves into medicine. *Curr Biol*, 10, R60-63.

Hermann, A., Gowher, H. and Jeltsch, A. (2004)
Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases.
Cell Mol Life Sci., 61(19-20):2571-87.

Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D. (2002)

Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria.
Proc Natl Acad Sci U S A. 10;99 Suppl 4:16470-6.

Herring CD, Glasner JD, Blattner FR. (2003)
Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in Escherichia coli.
Gene. 311:153-63

Hiraga S, Ichinose C, Niki H, Yamazoe M. (1998)

Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E. coli*.

Mol Cell. 1(3):381-7.

Hotchkiss, R.D., 1948

The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper

J. Biol. Chem., 175, 315-332.

International Human Genome Sequencing Consortium(2004)

Finishing the euchromatic sequence of the human genome p931

Nature,431, 931-945

Issa, J.P. (2000) CpG-island methylation in aging and cancer. Curr Top Microbiol

Immunol, 249, 101-118.

Janakiraman A, Goldberg MB. (2004)

Evidence for polar positional information independent of cell division and nucleoid occlusion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 101(3):835-40.

Jeltsch, A. (2002)

Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases

ChemBiochem., 3, 274-293.

Jeltsch, A & Gumpert, R.I.

DNA-Modification: Bacterial Methyltransferases

In: Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz, W.J. & Lane, D.M., eds.)

Academic Press, San Diego, CA, USA

Jeltsch, A. and Lanio, T. (2002) Site-directed mutagenesis by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 182, 85-94.

Jiricny, J. (1998)

Replication errors: cha(lle)nging the genome

Embo J., 17, 6427-6436.

Jost, J.P. & Saluz, H.P. (1993)

Steroid hormone dependent changes in DNA methylation and its significance for the activation or silencing of specific genes.

EXS. 1993;64:425-51

Kang, S., Lee, H., Han, J.S. & Hwang, D.S. (1999)

Interaction of SeqA and dam methylase on the hemimethylated origin of *Escherichia coli* chromosomal DNA replication

J. Biol. Chem., 274, 11463-11468.

Kirsch, R.D. & Joly, E. (1998)

An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes

Nucleic Acids Res., 26, 1848-1850

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J. & Cheng, X. (1994)

HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix

Cell, 76, 357-369.

Klimasauskas, S., Timinskas, A., Menkevicius, S., Butkiene, D., Butkus, V. & Janulaitis, A. (1989)

Sequence motifs characteristic of DNA[cytosine-N4]methyltransferases: similarity to adenine and cytosine-C5 DNA-methylases

Nucleic Acids Res., 17, 9823-9832.

Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R.J. & Wilson, G.G. (1994)
The DNA (cytosine-5) methyltransferases
Nucleic Acids Res., 22, 1-10.

Laursen RA, L'Italien JJ, Nagarkatti S, Miller DL. (1981)
The amino acid sequence of elongation factor Tu of *Escherichia coli*. The complete
sequence.
J Biol Chem. 256(15):8102-9.

Li, E., Bestor, T.H. & Jaenisch, R. (1992)
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality
Cell, 69, 915-926.

Liebert, K., Hermann, A., Schlickerrieder, M. & Jeltsch, A. (2004)
Stopped-flow and mutational analysis of base flipping by the *Escherichia coli* Dam DNA-
(adenine-N6)-methyltransferase
J. Mol. Biol., 341, 443-454.

Løbner-Olesen, A., Skovgaard, O. & Marinus, M.G. (2005)
Dam-methylation: coordinating cellular processes
Curr. Opin. Microbiol., 8, 154-160.

Lopez de Saro FJ, O'Donnell M. (2001)
Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I.
Proc Natl Acad Sci U S A. 98(15):8376-80.

Lopez de Saro FJ, Marinus MG, Modrich P, O'Donnell M. (2006)
The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS.
J Biol Chem. 281(20):14340-9

Lorincz MC, Groudine M. (2001)

C(m)C(a/t)GG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA?
Proc Natl Acad Sci U S A. 98(18):10034-6.

Lyons, S.M. & Schendel, P.F. (1984)
Kinetics of Methylation in Escherichia coli K12
J. Bacteriol. 159: 421-423

Malki A, Caldas T, Parmeggiani A, Kohiyama M, Richarme G. (2002)
Specificity of elongation factor EF-TU for hydrophobic peptides.
Biochem Biophys Res Commun. 296(3):749-54.

James P. Malone, Melissa R. Radabaugh, Richard M. Leimgruber, Gary S. Gerstenecke
(2000)
Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications
Electrophoresis 22: 919-932

Malone, T., Blumenthal, R.M. & Cheng, X. (1995)
Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-
methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes
J. Mol. Biol., 253, 618-632.

Margolin W. (2000)
Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial
cells.
Methods. 20(1):62-72

Marinus, M.G. (2000)
Recombination is essential for viability of an Escherichia coli dam (DNA adenine
methyltransferase) mutant
J. Bacteriol., 182, 463-468.

Matzke, M., Matzke, A.J. and Kooter, J.M. (2001) RNA: guiding gene silencing. *Science*, 293, 1080-1083.

Messer W, Noyer-Weidner M.(1988)

Timing and targeting: the biological functions of Dam methylation in *E. coli*.

Cell. 54(6):735-7

Modrich, P. (1989)

Methyl-directed DNA mismatch correction

J, Biol, Chem., 264, 6597-6600.

Modrich, P. (1991)

Mechanisms and biological effects of mismatch repair

Annu. Rev. Genet., 25, 229-253.

Modrich, P. & Lahue, R. (1996)

Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology

Annu. Rev. Biochem., 65, 101-133.

Neidhardt, F.C. (Edt.)

Escherichia coli and *Salmonella typhimurium*

Cellular and Molecular Biology

1987 American Society of Microbiology

Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., Hiraga, S. & Mori, H.

(2002)

Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*

Mol. Microbiol., 45, 673-695.

Onogi T, Ohsumi K, Katayama T, Hiraga S. (2002)

Replication-dependent recruitment of the beta-subunit of DNA polymerase III from cytosolic spaces to replication forks in *Escherichia coli*.

J Bacteriol. 184(3):867-70.

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995).

How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4, 2411-2423.

Pfennig, N. & Wagener, S. (1986)

An improved method of preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms

J. Microbiol. Meth. 4: 303-306

Posfai, J., Bhagwat, A.S., Posfai, G. & Roberts, R.J. (1989)

Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases

Nucleic Acids Res., 17, 2421-35.

Raskin DM, de Boer PA. (1999)

MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*.

J Bacteriol. 181(20):6419-24.

Razin A, Cedar H. (1994)

DNA methylation and genomic imprinting.

Cell. 77(4):473-6

Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L. & Lipscomb, W.N. (1995)

The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing

Cell, 82, 143-153.

Reisenauer A, Kahng LS, McCollum S, Shapiro L. (1999)

Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator?

J Bacteriol. 181(17):5135-9.

Riva A, Delorme MO, Chevalier T, Guilhot N, Henaut C, Henaut A. (2004)
Characterization of the GATC regulatory network in *E. coli*.
BMC Genomics 20;5(1):48.

Roberts, R.J. and Cheng, X. (1998) Base flipping. *Annu Rev Biochem*, 67, 181-198.

Salnik, D.G. (2004)

Methyl-CpG-Binding proteins

In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz, W.J. & Lane, D.M., eds.)

Academic Press, San Diego, CA, USA

Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W. & Cheng, X. (1995)

Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases

J. Mol. Biol., 247, 16-20.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996)

Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.

Anal Chem. 68(5):850-8.

Skarstad, K., Boye, E. & Steen, H.B. (1986)

Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells

Embo J 5, 1711-7.

Srinivasan, P.R. and Borek, E. (1964) Species Variation Of The Rna Methylases.

Biochemistry, 72, 616-619.

Stancheva I, Koller T, Sogo JM (1999)

Asymmetry of Dam remethylation on the leading and lagging arms of plasmid replicative intermediates.

*EMBO J.*18(22):6542-51

Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189, 113-130

Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. (1990)

Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.

Methods Enzymol. 185:60-89.

Surby, M.A. & Reich, N.O. (1996a)

Contribution of facilitated diffusion and processive catalysis to enzyme efficiency: Implications for the EcoRI restriction-modification system

Biochemistry, 35, 2201-2208

Surby, M.A. & Reich, N.O. (1996b)

Facilitated diffusion of the EcoRI DNA methyltransferase is described by a novel mechanism

Biochemistry, 35, 2209-2217

Urieli-Shoval, S., Greenbaum Y. & A. Razin (1983)

Sequence and substrate specificity of isolated DNA-Methylases from *Escherichia coli* C. *J. Bacteriol.* 153: 274-280

Urig, S., Gowher, H., Hermann, A., Beck, C., Fatemi, M., Humeny, A. & Jeltsch, A. (2002)

The *Escherichia coli* dam DNA methyltransferase modifies DNA in a highly processive reaction

J. Mol. Biol., 319, 1085-1096.

Waldron DE, Owen P, Dorman CJ.(2002)

Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*.

Mol Microbiol. 44(2):509-20.

Wallecha A, Munster V, Correnti J, Chan T, van der Woude M. (2002)

Dam- and OxyR-dependent phase variation of agn43: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation.

J Bacteriol. 184(12):3338-47

Wilson, G.G. (1992)

Amino acid sequence arrangements of DNA-methyltransferases

Methods Enzymol., 216, 259-279.

van der Woude MW, Low DA. (1994)

Leucine-responsive regulatory protein and deoxyadenosine methylase control the phase variation and expression of the sfa and daa pili operons in Escherichia coli.

Mol Microbiol. 11(4):605-18.

van der Woude M, Hale WB, Low DA. (1998)

Formation of DNA methylation patterns: nonmethylated GATC sequences in gut and pap operons.

J Bacteriol. 180(22):5913-20.

Jun X. Yan, Rachel A. Harry, Carole Spibey, Michael J. Dunn Yan et al (2000)

Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes

Electrophoresis 21: 3657-3665