

MUTANTEN DES HÜLLPROTEINS (B-PROTEIN) DES BAKTERIOPHAGEN FD

G.BRAUNITZER, S.BRAIG, F.KRUG und G.HOBOM

Max-Planck-Institut für Biochemie, München, DBR

Received 20 January 1970

Revised version received 28 January 1970

Spontaneous mutants of the bacteriophage fd and mutants resulting from fd-infected cultures of *E. coli* grown in the presence of 2.7-diaminofluoren and proflavin were isolated by means of free flow electrophoresis.

The amino acid analyses of the mutant coat proteins (B-proteins) show significant differences in comparison with the amino acid analyses of wild type coat protein.

1. Einleitung

Das Protein des Bakteriophagen fd (Mol.-Gew. 1.1×10^7 , 8000×50 Å, 88% Protein und 12% DNA) [1–2] besteht aus dem A-Protein (Adaptor-Protein, Gen 3) vom Mol.-Gew. 60 000, und den Hüllprotein (B-Protein, Gen 8) von Mol.-Gew. 5 600 [3–4]. Die Peptidkette des B-Proteins ist aus 49 Aminosäuren aufgebaut, deren Sequenz bekannt ist [5, 6]. Der Phage enthält 1900 Peptidketten des B-Proteins und eine Peptidkette des A-proteins.

Nach Inkubation von fd-infizierten *E. coli*-Kulturen mit Proflavin und 2.7-Diaminofluoren entstehen Mutanten, die sich durch ihr elektrophoretisches Verhalten und ihren Plaque-Typ vom Wildtyp unterscheiden [11].

Wir berichten hier über die Isolierung solcher Mutanten sowie spontaner Mutanten. Sie unterscheiden sich vom Wildtyp durch die Bruttoformel des B-Proteins. Diese Ergebnisse bestätigen die Korrektheit der früher beschriebenen Versuche und Methoden [7–9].

2. Material und Methoden

Aufzucht, Gewinnung und Aufarbeitung des Phagen fd haben wir bereits beschrieben [10]. Die Erzeugung der Mutanten erfolgte durch den "Mutanten-Generator" [11]. Die elektrophoretischen Verfahren waren

dieselben wie früher [7]. Zur Isolierung von Spontan-Mutanten wurden Acetat- und Phosphat-Puffer verschiedener pH-Werte und Ionenstärken verwendet.

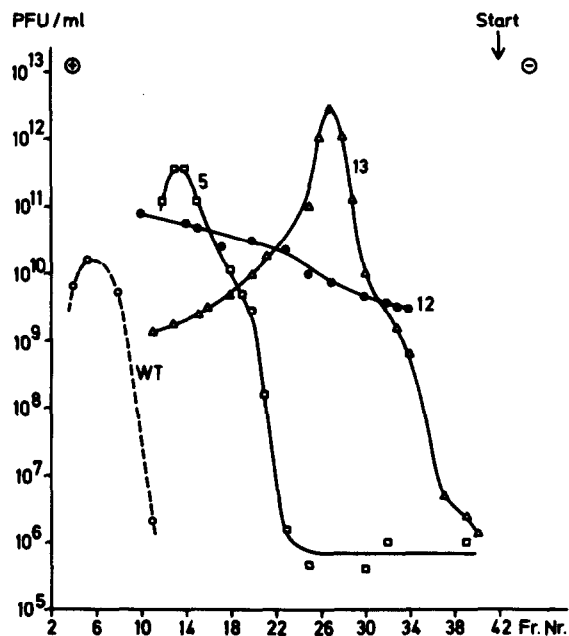


Abb. 1. Elektrophoretische Verteilungskurven der Reinlysate des fd-Wildtyps (WT) und der Selektionsschritte 5, 12 und 13 bei der Isolierung spontaner Mutanten. Na-K-Phosphatpuffer pH 6.4, $\mu = 0.03$, 1500 V, 125–135 mA.

Tabelle 1

Aminosäureanalysen der Hüllproteine einiger spontaner, sowie nach Inkubation mit Proflavin oder 2.7-Diaminofluoren erhaltenen Mutanten von fd (PF = Proflavin, DAF = 2.7-Diaminofluoren).

| | Wildtyp | 505 | 507 | PF 240.3 | DAF 221.3 | DAF 221.8 | DAF 245.5 |
|-----|---------|------|------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Lys | 5 | 4.99 | 5.15 | 4.93 | 5.00 | 5.52 | 4.93 |
| His | 0 | 0.92 | 1.06 | 1.09 | — | — | 1.01 |
| Asp | 3 | 2.53 | 2.37 | 2.64 | 2.59 | 2.28 | 2.11 |
| Thr | 3 | 3.33 | 3.05 | 3.26 | 3.17 | 3.15 | 3.30 |
| Ser | 4 | 5.48 | 4.27 | 4.30 | 4.29 | 4.52 | 4.10 |
| Glu | 3 | 3.60 | 3.37 | 3.66 | 3.00 | 3.13 | 3.03 |
| Pro | 1 | 2.11 | 1.42 | 1.21 | 1.71 | 1.26 | 1.18 |
| Gly | 4 | 3.78 | 4.25 | 4.53 | 5.61 | 5.53 | 4.32 |
| Ala | 9 | 7.85 | 8.65 | 9.58 | 9.06 | 10.21 | 9.60 |
| Val | 4 | 2.17 | 3.03 | 1.65 | 1.61 | 1.30 | 2.71 |
| Met | 1 | 0.73 | 0.86 | 0.55 | 0.95 | 0.20 | 0.89 |
| Ile | 4 | 3.59 | 3.62 | 3.17 | 3.37 | 3.42 | 3.65 |
| Leu | 2 | 2.30 | 2.18 | 2.44 | 2.39 | 2.24 | 2.15 |
| Tyr | 2 | 1.77 | 1.80 | 1.94 | 1.90 | 1.97 | 2.01 |
| Phe | 3 | 2.84 | 2.90 | 3.05 | 3.07 | 3.17 | 3.06 |
| Try | 1 | | + | + | | | |

Aminosäureanalysen wurden an 20-Stunden-Hydrolysaten ausgeführt.

3. Ergebnisse

Die Isolierung spontaner Mutanten des Hüllproteins gelang durch Anreicherung in 13 aufeinanderfolgenden Schritten. Jeder Selektionsschritt umfaßte die Vermehrung der Phagen und die Auftrennung des Phagen-“Lysats” in der trägerfreien Elektrophorese. Zur Vermehrung wurde jeweils Material der “kathodennahen” Fraktionen (Frakt. 25–35) des vorhergehenden Schrittes eingesetzt [7].

In Schritt 4 hatte sich das Titermaximum deutlich gegen die Kathode verschoben (Schritt 1: Frakt. 12–14; Schritt 4: Frakt. 33). Bei der Dialyse des Lysates von Schritt 5 gegen den bei der Elektrophorese verwendeten Puffer (Natriumacetat, pH 5.3) fiel der größte Teil des Materials aus. Zur weiteren Anreicherung verwendeten wir daher Phosphatpuffer (pH 6.4),

in dem die Phagen in Lösung blieben. Unter diesen Versuchsbedingungen wandert der fd-Wildtyp in den anodischen Randfraktionen (Fig. 1). Das Titermaximum von Lysat 5 lag in Frakt. 13–15. In 8 weiteren Schritten verschob sich das Maximum nach Frakt. 25–27. Aus diesen Fraktionen wurden schließlich genetisch einheitliche fd-Lysate (Einzelplaques) hergestellt und im präparativen Maßstab gezogen.

In Tabelle 1 sind die Aminosäureanalysen verschiedener Mutanten aufgeführt und den Daten des Wildtyps gegenübergestellt.

4. Diskussion

Diese Ergebnisse stützen die Befunde an verschiedenen Wildtypen (M13, fl, ZJ-2), die sich in der Bruttoformel der B-Proteine nur wenig unterscheiden [12]; das bedeutet, die Primärstruktur ist konservativ. Allerdings sind die Daten der Mutanten-Proteine bei Anspruch auf letzte Genauigkeit nur relativ zu werten,

da in dieser Studie nur eine Hydrolysenzeit (20 h) eingesetzt worden ist.

Immerhin unterscheiden sich die Präparate signifikant im Austausch einzelner Aminosäuren, womit nachgewiesen ist, daß Mutanten vorliegen. Besonders auffällig ist das Vorkommen von Histidin, das im B-Protein des Wildtyps fehlt. Wahrscheinlich beträgt die Summe der Aminosäure-Reste stets 49 und bestätigt somit den auf andere Weise gefundenen Molekulargewichtswert des B-Proteins. Die Sequenzanalyse soll über die Unterschiede in der Primärstruktur, gegebenenfalls auch über den Mechanismus der Mutationen Aufschluß geben.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danken wir herzlich für die Förderung der Arbeit, die Deutsche Forschungsgemeinschaft gewährte uns eine Sachbeihilfe; Frau K. Steinhoff und Herrn A. Stangl danken wir für die Durchführung der Analysen.

Literatur

- [1] D.A. Marvin und B. Hohn, *Bacteriol. Rev.* 33 (1969) 172.
- [2] H. Hoffmann-Berling, H.C. Kaerner und R. Knippers, *Advan. Virus. Res.* 12 (1966) 329.
- [3] E.F. Rossomando und N.D. Zinder, *J. Mol. Biol.* 36 (1968) 387.
- [4] T.J. Henry und D. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62 (1969) 80.
- [5] G. Braunitzer, F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler und G.v. Wettstein, *Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 725.
- [6] F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler, G.v. Wettstein und G. Braunitzer, *Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 1047.
- [7] G. Braunitzer, G. Hobom und K. Hannig, *Z. Physiol. Chem.* 338 (1964) 276.
- [8] G. Braunitzer, G. Hobom und K. Hannig, *Z. Physiol. Chem.* 338 (1964) 278.
- [9] G. Braunitzer, *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* 68 (1964) 733.
- [10] G. Hobom und G. Braunitzer, *Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 783.
- [11] G. Hobom und G. Braunitzer, *Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 797.
- [12] G. Braunitzer, F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler und G.v. Wettstein, *Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 725.